

Tuz Gölü'nden İzole Edilen Mikrofungusların
Tanımlanması, Alkol Dehidrogenaz Enzimi Açısından
Taranması ve Klonlama Çalışmaları

Bükay Yenice Gürsu

DOKTORA TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Ağustos 2013

Isolated Salt Lake Microfungi Identification,
Screening of Alcohol Dehydrogenase Enzyme
and Cloning Studies

Bükay Yenice Gürsu

DOCTORAL DISSERTATION

Department of Biology

August 2013

Tuz Gölü'nden İzole Edilen Mikrofungusların Tanımlanması,
Alkol Dehidrogenaz Enzimi Açısından Taranması ve Klonlama Çalışmaları

Bükay Yenice Gürsu

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Bilim Dalında
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Semra İLHAN

Ağustos 2013

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Bükay Yenice Gürsu'nun DOKTORA tezi olarak hazırladığı "Tuz Gölü'nden İzole Edilen Mikrofungusların Tanımlanması, Alkol Dehidrogenaz Enzimi Açısından Taranması ve Klonlama Çalışmaları" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Danışman : Prof.Dr. Semra İLHAN

Doktora Tez Savunma Jürisi:

Üye: Prof.Dr. İsmail KARABOZ

Üye: Prof.Dr. Kıymet GÜVEN

Üye: Prof.Dr. Semra İLHAN

Üye: Doç.Dr. Ahmet ÇABUK

Üye: Doç.Dr. Cansu FİLİK İŞÇEN

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof.Dr.Nimetullah BURNAK
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	v
SUMMARY.....	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Halofilik Mikroorganizmalar	4
2.2. Biyokatalizörler	7
2.2.1.Oksidoredüktazlar	8
2.2.2. Alkoldehidrogenazlar	8
2.3. Alkoldehidrogenaz Geni Üzerine Klonlama Çalışmaları	11
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER	13
3.1. MATERYAL	13
3.1.1. Besiyerleri	13
3.1.2. Çözeltiler	15
3.2. YÖNTEMLER	19
3.2.1. Araştırma Bölgesi	19
3.2.2. Örneklerin Toplanması	20
3.2.3. Fungus İzolasyonu	20
3.2.4. Toplam ADH Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	21
3.2.4.1. Hücre Özütlerinin Eldesi	21
3.2.4.2. ADH Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	21
3.2.4.3 Bradford Yöntemi ile Protein Tayini	22

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2.5. Fungus İdentifikasyonu	23
3.2.5.1 Klasik Yöntem ile İdentifikasyon	23
3.2.5.2. Moleküler Yöntem İle İdentifikasyon	24
3.2.5.3. ITS Gen Bölgelerinin Çoğaltılması	26
3.2.5.4. Aktin Gen Bölgesinin Çoğaltılması	27
3.2.6. Klonlanma Çalışmaları	28
3.2.6.1. Toplam RNA İzolasyonu	28
3.2.6.2. Toplam RNA'ya DNase Uygulanması	30
3.2.6.3. İzole Edilen RNA'ların Spektrofotometrik Analizleri....	30
3.2.6.4. Toplam RNA'dan Geri Transkripsiyon (RT) Reaksiyonu ile cDNA'nın Üretilmesi	30
3.2.6.5. Gen Spesifik Primerler ile ADH Geninin DNA'sının Üretilmesi	31
3.2.6.6. PCR ürünlerinin Saflaştırılması	33
3.2.6.7. PCR Ürünlerinin Klonlanması	34
3.2.6.8. Bakteriyal Transformasyon	35
3.2.6.9. Transformantların Koloni PCR ile Kontrolü	36
3.2.7. Enzim Saflaştırma Çalışmaları	37
3.2.7.1. SDS-PAGE profili	37
3.2.7.2. HPLC profili	38
4.BULGULAR	39
4.1. Fungus İzolasyonu ve Tanımlanması	38
4.2. ADH Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	42
4.3. Klasik ve Moleküler Tanımlama	44

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
4.4. Klonlama Çalışmaları	55
4.4.1. Toplam RNA İzolasyonu ve İzole Edilen RNA'ların Spektrofotometrik Analizleri	55
4.4.2. ADH Geninin cDNA' sının Üretilmesi	55
4.4.3. <i>Eurotium sp.</i> 5810'dan Klonlama Çalışmaları	56
4.4.4. <i>Penicillium sp.</i> 5797'den Klonlama Çalışmaları	57
4.4.5. <i>Aspergillus niger</i> (5800)'den Klonlama Çalışmaları	60
4.5. Enzim Saflaştırma Çalışmaları	64
4.5.1. Hücre Ekstraktı Dializatın SDS-PAGE Profilinin Belirlenmesi ...	64
4.5.2. Hücre Ekstraktı Dializatın HPLC Profilinin Belirlenmesi	65
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	67
6. KAYNAKLAR DİZİNİ	75
ÖZGEÇMİŞ	83

ÖZET

Bu çalışmada hipersalin çevrelerden mikrofungus izolasyonu ve bu fungusların Alkol Dehidrogenaz (ADH) enzimi açısından taranması amaçlanmıştır. İlâveten seçilen verimli izolatlardan klonlama çalışmaları yapılarak endüstriyel üretime geçişi sağlayacak verilerin ortaya konması hedeflenmiştir.

Bu amaçla, Tuz Gölü'nden alınan su örneklerinden mikrofungus izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Mikrofunguslar diagnostik literatürler kullanılarak geleneksel yöntemler ile cins seviyesinde tanımlanmıştır. Dokuz cinse (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Emericella*, *Eurotium*, *Penicillium*, *Scopulariopsis*, *Stemphylium* ve *Ulocladium*) ait toplam 51 mikrofungus izole edilmiştir. İzolatların büyük bir kısmının sırasıyla *Cladosporium*, *Penicillium*, *Alternaria* ve *Aspergillus* cinslerine ait olduğu belirlenmiştir.

38 izolat için ADH enzim aktivitesi taraması yapılmıştır. En yüksek aktivite saptanan 8 izolatın ITS (içsel transkrip ayırıcı) bölgeleri dizilerek moleküler yöntemlerle tanımlamaları yapılmıştır. En yüksek spesifik aktivite sırasıyla *Cladosporium macrocarpum* (5776), *Eurotium niveoglacum* (5778), *Aspergillus versicolor* (T55), *A. niger* (5800), *C. sphaerospermum* (5821), *C. cladosporioides* (5794), *Penicillium chrysogenum* (5797) ve *E. amstelodami* (5810) türlerinde saptanmıştır. Bu türler için spesifik enzim aktivitesi 3,21-5,93 U/mg arasında değişmektedir.

Alkol dehidrogenaz gen bölgesi klonlama çalışmaları için *E. amstelodami*, *P. chrysogenum* ve *A. niger* seçilmiştir. pJET1.2/blunt vektör klonlama plazmidi olarak kullanılmış ve bakteriyal transformasyon için *E. coli* EZ kompotent hücreleri ile çalışılmıştır. Söz konusu gen bölgesinden farklı gen bölgelerinin klonlanması üzerine enzim varlığını ortaya koymak için *A. niger* (5800) izolat özütüne amonyum sülfatla çöktürme ve diyaliz yöntemleri uygulanmıştır. Enzim spesifik aktivitesi ham özüte göre yaklaşık 20 kat artmıştır. Hücre özütü diyalizatında proteinlerin varlığının ve profillerinin ortaya konması için SDS-PAGE ve HPLC yönteminden faydalanılmıştır.

Anahtar kelimeler: Tuz Gölü, Halotolerant-Halofilik fungus- Alkol Dehidrogenaz

SUMMARY

In this study, focused on isolation of microfungi from hipersaline environment and screening of their ADH activity. In addition, intended to reveal of the data for provide the progression to the industrial production by cloning studies on selected active isolates.

For this purpose, microfungi were isolated from Tuz Gölü water samples. The microfungi were identified at genus level according to traditional identification literatures. Totally 51 microfungi was isolated relating to nine genera (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Emericella*, *Eurotium*, *Penicillium*, *Scopulariopsis*, *Stemphylium* and *Ulocladium*). Respectively isolates determined belonged to genera order of *Cladosporium*, *Penicillium*, *Alternaria* ve *Aspergillus*.

ADH enzyme activity screening was carried out for 38 isolates. Eight isolates with the highest activity were identified by molecular methods with sequencing of internal transcribe spacer (ITS) regions. The highest specific activity determined on the following species; *Cladosporium macrocarpum* (5776), *Eurotium niveoglacum* (5778), *Eurotium niveoglacum* (5778), *Aspergillus versicolor* (t55), *A. niger* (5800), *C. sphaerospermum* (5821), *C. cladosporioides* (5794),), *Penicillium chrysogenum* (5797) ve *E. amstelodami* (5810). Specific enzyme activity of these species ranged from 3.21 to 5.93 U / mg.

E. amstelodami, *P. chrysogenum* ve *A. niger* were selected for cloning studies. pJET1.2/blunt vector was used as a cloning plasmid and for bacterial transformation were studied with *E. coli* EZ competent cells. Due to cloning of different gene regions instead of interested gene, ammonium sulfate precipitation and dialysis methods applied to extract of *A. niger* (5800) for establish the presence of the enzyme. Enzyme specific activity increased approximately 20-fold compared to the crude extract. SDS-PAGE ve HPLC method was used to indicate the presence of proteins and protein profiles in dialyzed cell extract

Keywords: Tuz Gölü, Halotolerant-halophilic fungi, Alcohol Dehydrogenase

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında bana her açıdan destek olan değerli hocam Prof. Dr. Semra İLHAN'a çok teşekkür ederim

Tez çalışmalarım sırasında Tez İzleme Komitesinde görev alarak görüş ve önerileri ile katkıda bulunan değerli hocalarım Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden Prof.Dr. Kıymet GÜVEN ve Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden Prof.Dr. İsmail KARABOZ'a çok teşekkür ederim.

Araştırmalarım boyunca laboratuvarının tüm olanaklarından ve bilgilerinden faydalanmamı sağlayan değerli hocalarım Doç.Dr. Ahmet ÇABUK ve Yrd. Doç.Dr. Figen ÇALIŞKAN'a çok teşekkür ederim. Tez çalışmalarım sırasında malzeme yardımını ve desteğini esirgemeyen Doç.Dr. Cansu FİLİK İŞCEN'e , Öğr. Gör. Dr. Ferhan KORKMAZ'a ve değerli bölüm hocalarıma teşekkür ederim.

Öğr. Gör. Zerrin CANTÜRK'e, Erçin KOCABIYIK, Burcu AKÇAL ve tüm laboratuvar ekibine yardımlarından ve desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Araştırmalarımın kaynak sağlamama yardımcı olan FBAM ve BAP komisyonuna teşekkür ederim.

Tüm çalışmalarım sırasında bana her zaman destek veren sevgili eşim Aykut Bora GÜRSU ve canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Varlığımıza anlam katan oğluza...

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 NAD bağımlı alkol dehidrogenazlar tarafından katalizlenene alkol, aldehit ve keton dönüşüm reaksiyonları (Machielsen, 2007).....	10
3.1 Tuz Gölü üzerinde seçilen istasyonlar	19
3.2 ITS bölgeleri	25
3.3 ADH1, cDNA'sının tamamının klonlanması için primer tasarımı.....	33
3.4 pJET1.2/Blunt Vektör Haritası	35
3.5 pJET1.2/blunt Vektör Klonlama Bölgesi ile pJET1.2 Forward ve pJET1.2 reverse sekans primerlerinin DNA dizisi.....	36
4.1 %10 NaCl MEA besiyeri üzerinde inkubasyona bırakılmış membran üzerinde gelişen koloniler.....	39
4.2. 5776 kodlu izolatın MEA ve %10 NaCl MEA besiyerinde gelişimi.....	45
4.3. 5778 kodlu izolatın MEA ve %10 NaCl MEA besiyerinde gelişimi.....	45
4.4. 5779 kodlu izolatın MEA ve %10 NaCl MEA besiyerinde gelişimi.....	45
4.5. 5794 kodlu izolatın MEA ve %10 NaCl MEA besiyerinde gelişimi.....	46
4.6. 5797 kodlu izolatın MEA ve %10 NaCl MEA besiyerinde gelişimi.....	46
4.7. 5800 kodlu izolatın MEA ve %10 NaCl MEA besiyerinde gelişimi.....	46
4.8. 5810 kodlu izolatın MEA ve %10 NaCl MEA besiyerinde gelişimi.....	46
4.9 <i>Aspergillus niger</i> 5800 izolatına ait dizi bilgileri ve NCBI GenBankasındaki en yakın benzerliği.....	47
4.10 <i>Cladosporium sphaerospermum</i> 5821 izolatına ait dizi bilgileri ve NCBI GenBankasındaki en yakın benzerliği.....	48
4.11 <i>Eurotium niveoglacum</i> 5778 izolatına ait dizi bilgileri ve NCBI GenBankasındaki en yakın benzerliği.....	49

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.12 <i>Cladosporium cladosporides</i> (5794) izolatına ait dizi bilgileri ve NCBI GenBankasındaki en yakın benzerliği.....	50
4.13 <i>Penicillium chrysogenum</i> 5797 izolatına ait dizi bilgileri ve NCBI GenBankasındaki en yakın benzerliği.....	51
4.14 <i>Eurotium amstelodami</i> 5810 izolatına ait dizi bilgileri ve NCBI GenBankasındaki en yakın benzerliği.....	52
4.15 <i>Aspergillus versicolor</i> T55 izolatına ait dizi bilgileri ve NCBI GenBankasındaki en yakın benzerliği.....	53
4.16 <i>Cladosporium sp.</i> 5776 izolatına ait dizi bilgileri ve NCBI GenBankasındaki en yakın benzerliği.....	54
4.17 5810 nolu izolat cDNA'sından elde edilen PCR ürünleri.....	57
4.18. 5797 Gradyent PCR ürünleri ve agaroz jelden bantların kesimi.....	58
4.19 Jelden saflaştırılan bantlarla yapılan koloni PCR sonucu elde edilen bantlar.....	58
4.20 Plasmid kontrolü.....	59
4.21 <i>Penicillium chrysogenum</i> (5797)'dan klonlanan bölgenin NCBI Gen Bankasındaki en yakın benzerliği.....	59
4.22 <i>A. niger</i> 5800 cDNA'sından elde edilen PCR ürünleri.....	60
4.23 <i>A. niger</i> 5800 cDNA'dan klonlanan bölgenin NCBI Gen Bankasındaki en yakın benzerliği.....	61
4.24 <i>A. niger</i> 5800 genomik DNA'sından elde edilen PCR ürünleri.....	61
4.25 Genomik DNA'dan elde edilen bantların saflaştırılması.....	62
4.26 Gen bölgesinin iç primer ile kontrolü.....	62
4.27 Koloni PCR ile insert kontrolü.....	63
4.28 <i>A. niger</i> 5800'den klonlanan bölgenin NCBI Gen Bankasındaki en yakın benzerliği.....	63

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.29 <i>A. niger</i> 'den elde edilen ekstraktın diyaliz sonrası SDS-PAGE jel görüntüsü.....	65
4.30.a Hücre dializatına ait kromatogram.....	66
4.30.b Ticari ADH enzimine ait olan kromatogram.....	66

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.1 Örnek alım istasyonları ve özellikleri.....	19
3.2 ITS bölgeleri için primer dizileri.....	24
3.3 Çalışmada kullanılan primerler.....	32
4.1 Tuz Gölü su örneklerinden elde edilen mikrofunguslar.....	39
4.2 Belirlenen ADH aktiviteleri.....	42
4.3 Seçili izolatlara ait RNA miktarları.....	47
4.4 Ham özüt ve diyaliz bileşği ADH enzim aktivitesi.....	56

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Enzimler, protein yapısındaki biyokatalizörlerdir. Biyokatalizörlerin sulu ortamlarda olduğu kadar organik çözücülerde de çalışabilmesi, etkili katalitik verimlilikleri ile kimyasal, bölgesel spesifikliğı ve stereo seçiciliklerinin olması endüstride kullanımlarını cazip kılar. Mükemmel kiral (enantio) ve pozisyonel seçicilikleri sayesinde organik sentez çalışmalarında substrat transformasyonu için kullanılırlar. Yüksek seçiciliğı ve katalitik verime sahip olmaları da çok az yan ürün ile yüksek reaksiyon verimi sağlar ve kimyasal katalizörlere göre daha çevre dostudurlar. Bu özellikleri ile kompleks substratlar için yüksek reaksiyon seçiciliğinin önemli olduğu yiyecek, kimyasal ve farmasotik endüstri alanlarında pek çok uygulamaya sahiptirler (Powell et al., 2001; Schmid et al., 2001). Enzimler katalizledikleri reaksiyonlara göre sınıflandırılırlar. Oksidoredüktaz grubu enzimler, redoks tepkimelerini katalizleyen gruptur. Alkol dehidrogenazlar (ADH) bu grubun üyesidirler. Kemo, stereo ve regio selektif birçok reaksiyonu katalizlerler. İlaç ve kimya endüstrisinde üretim ve sentez aşamalarında kullanılırlar. Dolayısıyla bu biyokatalizörlerin endüstriyel anlamda geliştirilebilmeleri için; çeşitli mikroorganizmalardan verimli bir şekilde saflaştırılmaları, üretimi daha kolay olan maliyet ve süre bakımından da kazançlı olacak organizmalara aktarılımları önemlidir.

Endüstriyel önemi olan alkol dehidrogenazlar (ADH) (EC: 1.1.1.1) oksidoredüktazlar ailesindedirler. ADH'lar alkollerin üretiminde ve kullanımında anahtar enzimlerdir. Alkol ve aldehitlerin birbirine dönüşümünü katalizlerler ve bu enzim ailesi yaşamın üç domainine de dağılmıştır (Reid and Fewson, 1994). Alkol dehidrogenazlar kofaktör özelliklerine göre gruplandırılırlar. NAD(P)⁺ bağımlı ADH lar ise katalitik özellikleri ve dizi bilgilerine göre sınıflandırılırlar. Bunlardan kısa/orta zincirli çinko bağımlı alkol dehidrogenazlar etanol ve NAD⁺'ın asetaldehit ve NADH a dönüşüm reaksiyonlarını katalizlerler. Memeli ADH'ları çok çeşitli alkoller aldehitler

ve ketonlar için çalışırken fungus ADH'ları çoğunlukla etanol ve aldehide spesifiktirler (Pal et al., 2009). Farklı organizmalarda farklı ADH izoenzimi kodlayan ADH genleri bulunur ve bu genlerin regulasyonu karbon katabolit baskılaması altındadır. *Saccharomyces cerevisiae*'da etanolün kullanımından sorumlu olan ADH2, fermentasyon ortamında glikoz tükendiği anda etanolü ilk kullanan enzimdir.

ADH enzimleri özellikle kiral farmasötiklerin ve diğer biyolojik olarak aktif bileşiklerin üretimi için gerekli olan kiral alkollerin organik sentezinde önemli role sahiptirler. *Lactobacillus kefir*, *L. brevis* ve *Thermoanaerobicum sp.* gibi birçok ADH organik sentezde kullanılmaktadır. Bunlar genetik mühendisliği ile üretilmektedir ve böylece yüksek miktarda elde edilmeleri mümkündür. Enzimatik olarak sentezlenen bileşiklere örnek olarak *alkil 3-hidroksibütirat*, *1-asetoksi-2-propanol*, *2-bütanol* veya *2-pentanol* gibi alifatik alkoller verilebilir. Kiral farmasötiklerin üretiminde, funguslardan yararlanılmıştır. Çok çalışılan bir fungus olan *Neurospora crassa*' dan elde edilen ADH ile glokom hastalığı için aktif olarak uygulanan karbonik anhidraz enzim inhibitörü Trusopt (MK0507) sentezindeki ara ürün eldesi endüstriyel ölçekte yapılmaktadır (Liese et al., 2006). ADH enzimleri endüstriyel çözücülerin üretimi, sirke ve alkollü içeceklerin üretiminde de önemlidir (Reid and Fewson, 1994). ADH temelli tek kullanımlık biosensörlerin üretimi ile özellikle içecek endüstrisinde gıda kontrolü gerçekleştirilmektedir (Temiz et al. 2006; Tudorache and Bala, 2007).

Ekstremofil mikroorganizmalar ekstrem şartlarda çalışabilen endüstriyel anlamda eşsiz biyokatalizörler üretirler. Bu mikroorganizmalar yüksek tuz konsantrasyonu, yüksek sıcaklık, basınç, asidik ve bazik pH'lar gibi çok değişik ortamlarda yaşayabilmektedirler. Ekstremofillerdeki bu enzimlerin bir kısmı başarılı şekilde saflaştırılmış ve mezofilik organizmalara klonlanmıştır. Bunlara örnek olarak gıda, kimyasal ve farmasötik endüstride ve çevresel biyoteknolojide potansiyel kullanımı olan ekstremofil arke ve bakterilerden izole edilen, ekstraselüler polimer parçalayıcılar enzimler (amilazlar, pullulanazlar siklodekstrin glikoziltransferazlar, selulazlar, ksilanazlar, kitinazlar, proteinazlar) ve esterazlar, glikoz isomerazlar, alkol dehidrogenaz ve DNA-modifiye edici enzimlerdir (Lorenz et al., 2002; Temiz et al., 2008).

Yüksek tuz konsantrasyonunda gelişen ekstremofil halofilik ve halotolerant mikroorganizmalar da sahip oldukları enzimlerin osmotik şartlarda aktif olmalarından dolayı endüstriyel bir potansiyele sahiptirler. Bilgilerimize göre halofilik funguslar hakkında literatür birikimi sınırlıdır. Günümüz çalışmalarında alkol dehidrogenaz ailesine ait çok sayıdaki izoformlar farklı organizmalardan klonlanıp kontrol ettikleri biyolojik yollar araştırılmıştır (Passoth et al., 1998, Cao et al., 2008;). Ancak halofilik funguslar üzerine rapor edilen çalışma sayısı azdır. Çalışmamızda ekstrem ortam olan Tuz gölünden izole edilen fungusların total ADH aktivitesi bakımından taranması ve bu enzim grubunun 2. üyesi ADH2 geninin klonlanması hedeflenmiştir. Halofilik funguslarda etanol metabolizması ve enzimlerinin rekombinant olarak üretimi üzerine çalışmalar biyoteknolojik potansiyellerinin artırımı için önemli olacaktır.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Halofilik Mikroorganizmalar

Halofilik canlılar, yüksek tuz konsantrasyonuna sahip ortamlarda yaşayabilen canlılardır. Kushner'e (1978) göre halofiller üç grup altında incelenir. Çoğu deniz organizmaları olan az halofiller 0,5 M NaCl de yaşayabilenler, orta halofiller optimal büyümeleri 0,5–2,5 M NaCl de olanlar ve ekstrem halofiller optimal büyümeleri 4 M NaCl civarında olanlardır. Margesin ve Schinner'e (2001) göre ortalama 2,5 M üzeri NaCl konsantrasyonlarını tolere edebilen ekstrem halofiller de vardır (Cao et al., 2008).

Son yıllarda halofilik ve halotolerant funguslar, tuza dirençlilikleri bakımından mükemmel modeller oldukları için çalışma konusu olmaktadır (Petrovic et al., 2002). Toplam tuz konsantrasyonunun çok yüksek (doyma noktasında) olduğu hipersalin sularda da halofilik ve halotolerant funguslar bulunabilir. Bu tuzlu sular orjinlerine göre talasohalin ve atalosohalin diye adlandırılırlar. Atalosohalin sular yerin jeolojik yapısından kaynaklanan ve buradaki buharlaşma sonucu tuz yataklarından orjinleşmiş sulardır. Talasohalin çevreler ise deniz suyunun buharlaşması sonucu oluşmuştur ve sodyum klorid tuzunun baskın olduğu iyon kompozisyonuna sahiptirler. Solar tuzlular bu tip ortamlardır. Bu suni havuzların tuzluluk oranı %3-35 arasındadır. Bu tip tuzlalarda bir dizi birbiri ile bağlantılı havuzlarda deniz suyu solar radyasyon ile buharlaştırılarak tuz konsantrasyonu artırılır. Bu gibi ekstrem ortamlar yaşam için olumsuz gibi gözükse de pek çok mikroorganizma bu çevrelerde gelişebilir (Gunde-Cimerman et al., 2000). Hipersalin çevrelerdeki fungal çeşitlilik ve fungusların rolü hakkında çalışma azdır. İlk defa 1977 yılında Cronin ve Post doğal atalosohalin çevrelerden (Utah Büyük Tuz Gölü) halofilik fungus izole etmişlerdir (Díaz-Muñoz and Montalvo-Rodríguez, 2005). Halotolerant funguslar birçok kaynaktan izole edilebilirler. Acevedo 1987'de *Aspergillus* ve *Cladosporium* gibi bazı karasal funguslar deniz suyundan izole edilmişlerdir (Diaz Munoz, 2006). Funguslar hipersalin ortamlarda da büyüeyebilirler.

Kserofilik ve halofilik funguslar su aktivitesi düşük besiyerlerinde gelişebildikleri için bu tip ekstrem şartlarda hayatta kalmaları beklenir. 1977'de Büyük Tuz Gölünde Cronin ve Post batık haldeki bir çam ağacı parçasından *Cladosporium* genusuna ait halofilik bir fungus türü izole etmişlerdir (Cronin and Post, 1977). Suni tuz havuzlarında da *Alternaria alternata* ve *Cladosporium cladosporioides* yüksek frekansta izlenmiştir (Gunde-Cimerman et al., 2000).

Halofilik mikroorganizma proteinlerinin yüksek tuzlulukta karşılaştığı başlıca sorunlar aktiflik, stabil olma ve suda çözünmedir. Molar olarak tuz konsantrasyonlarının varlığı genellikle proteinler ve diğer makromoleküller üzerinde yıkıcı etki gösterir. Hidrofobik etkileşimleri artırarak tersiyer yapının çökmesine veya agregasyonuna, makromoleküllerin içyapısında gerçekleşmesi gereken veya diğer moleküllerle girilen elektrostatik etkileşimleri engeller, tuzun neden olduğu iyon hidrasyonu sebebiyle de biyolojik proseslerin oluşumu ve bu proseslerin devamı için olmazsa olmaz olan serbest su miktarını azaltır (Zaccai and Eisenberg, 1990, Madern et al., 2000).

İntraselüler olarak yüksek tuz konsantrasyonu hücrenin bütün enzimatik mekanizması için özel adaptasyonlar gerektirir. Böylece hücre yüksek tuz konsantrasyonlarına adapte olabilir. Ancak bu adaptasyonlar hücreyi, bütünlüğünü koruyabilmesi ve yaşamını devam ettirebilmesi için devamlı olarak yüksek tuz konsantrasyonlarına bağımlı kılar ve adaptasyon gösterebilmektedirler (Lanyi, 1974, Eisenberg and Wachtel, 1987; Eisenberg et al., 1992; Eisenberg, 1995; Ebel et al., 1999.)

Tuza adapte olmuş ya da çalışması için tuza gereksinim duyan enzimler, özellikle ozmotik basıncını dengelemek için inorganik iyonları kullanırlar. Halofil bakteriler organik çözülmüş maddeleri, içinde buldukları ortamın tuz konsantrasyonunun belirlediği şekilde, sitoplazmalarının ozmolaritesini korumak amacıyla kullanırlar. Bu nedenle intraselüler tuz konsantrasyonları ortamın tuz konsantrasyonuna göre oldukça düşük tutulur. Aynı durum ökaryotlardan tek hücreli halofilik bir alg olan *Dunaliella* için de geçerlidir. Hatta bu tip organizmalarda tuza adapte olmuş proteinlerin dış ortama maruz kalan sitoplazmik membranda bulunması beklenmelidir. Çünkü *Dunaliella* gibi düşük tuzluluk organizmaları, bu tarz

ekstraselüler enzimleri ortama salar ve böyle bir halofilik yaşam tarzında ve yüksek tuzluluğun hakim olduğu ortamlarda bu enzimlerin tam olarak işlevsel olması gerekmektedir.

Proteinlerin halofilik karakterlerinin belirlenmesinde en önemli faktörün, asidik köklerin artması olduğu yönünde iddialar öne sürülmüştür. Protein yüzeyinde negatif yükün artması yan gruplar arasında karşılıklı olarak bir itme yaratacağından, yapıyı kararsız bir hale sokar. Bu durumda, yapısal stabilite ve enzimatik aktivite için gerekli olan proteinin uygun pozisyonu, yalnızca yüksek konsantrasyonlarda katyonların negatif yüklere bağlanmasıyla korunabilir. Negatif yükün katyonlar tarafından dengelenmesi, halofil enzimlerin ve diğer proteinlerin tuzlu ortamlarda etkili olmasında önemli bir rol oynamaktadır. *Haloarcula marismortui*'de ferrodoksin ve malat dehidrogenaz arasındaki elektrostatik etkileşimleri açıklamak amacıyla, proteinlerin kristal yapısına klasik elektrostatik denklemler atomik düzeyde uygulanmış ve teorik bir analiz yapılmıştır. Buna göre düşük konsantrasyonlarda dengelenemeyen negatif yüklerin birbirini itmesi sonucu, halofilik proteinlerin kararsız hale geldiği gözlenmiştir. Bu elektrostatik etkileşimler yüksek tuz konsantrasyonlarında bile değişmeden kalmaktadır. Bunun bir sonucu olarak da, halofilik proteinlerin asidik kökleri proteinin doğal stabilitesini sağlamaktansa kümeleşmeyi önlemektedir. Böylece K⁺ iyonunun öncelikli görevinin negatif yük artışını dengelemek olmadığı anlaşılmaktadır (Elcock and McCammon, 1998; Oren, 2002; Gunde-Cimerman et al., 2005).

Lanyi ve Stevenson (1970) tuzun bütün etkisinin, özellikle çok yüksek konsantrasyonlarda, sadece negatif yük etkisini dengelemek olmadığı konusunda görüş belirtmişlerdir. Maximal elektrostatik yük dengesi yaklaşık 0,1 M veya en fazla 0,5 M konsantrasyonlarda zaten korunmuş olacaktır. Diğer aminoasitlere göre daha fazla su bağlama özelliğine uyumlu olarak glutamatın hücre içindeki yüksek konsantrasyonuna dikkat çektiler. Bunun hidrasyondan koruduğundan herhangi bir proteinin fonksiyonunu sürdürmesi için gereken önemli bir özellik olduğunu açıklamışlardır. Ayrıca asidik köklerin, stratejik yerlere konumlandırılmış temel kökler (lizin, arjinin) ile tuz köprüleri oluşturması sonucu protein yapısının stabilizasyonu daha da sağlamlaştırılmış olur (Lanyi and Stevenson, 1970).

Mevarech ve ark. (2000) proteinlerin halofilik adaptasyonları ile ilgili bilinenleri kapsamlı bir modelle özetlediler. Bu modele göre protein yüzeyindeki negatif yüklerin iki önemli görevi vardır. Birincisi içerdikleri hidratlanmış karboksil grupları ile yüksek tuz konsantrasyonlarında proteinin çözülebilmesini sağlarlar. İkincisi ise tuzun yarattığı hidrofobik etki ile kazanılan stabiliteye karşı kararsız elektrostatik itme dengesidir. Molar miktarlarda bulunan tuz enzimin hidrofobik bölgenin hareketliliğini azaltır böylece katalitik aktivite için gerekli olan, proteinin dinamik hareketlerini ve esnekliğini engeller. İşte bu elektrostatik itme kuvveti proteinin enzime marjinal stabiliteyi devam ettirme imkanı verir (Mevarech et al., 2000).

2.2. Biyokatalizörler

Enzimler reaksiyonların pek çoğunu hızlandıran, protein yapısındaki, biyolojik katalizörlerdir. Hücre içerisinde ve dışarısında meydana gelen binlerce tepkimenin hızını ve özgülüğünü düzenlerler. Enzimlerin ürüne dönüştürdükleri maddelere, substrat denir. Enzimlerle ilgili yapılan ilk çalışmalarda, enzimin etki ettiği substrat adının sonuna az eki getirilerek (Üreaz, lipaz, fosfataz v.b.) veya genel adlarıyla (pepsin, tripsin gibi) isimlendirilirken, günümüzde Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (NC-IUBMB) tarafından yapılan sistematik sınıflandırmaya göre isimlendirilmektedir. Bu sınıflandırmada her enzim dört rakamlı bir kod numarası ile (E.C.) tanımlanmıştır. Üst düzey sınıflandırma şöyledir:

EC 1 Oksidoredüktazlar: Yükseltgenme/indirgenme (redoks) tepkimelerini katalizler.

EC 2 Transferazlar: Fonksiyonel grupların (örn. bir metil veya fosfat grubunun) transferini katalizler.

EC 3 Hidrolazlar: çeşitli bağların hidrolizini katalizler.

EC 4 Liyazlar: Hidroliz ve yükseltgenme harici yollar ile çeşitli bağları keser.

EC 5 İzomerazlar: Tekil bir molekülde izomerizasyon değişikliklerini katalizler.

EC 6 Ligazlar: İki molekülü kovalent bağlarla birleştirir.

2.2.1.Oksidoredüktazlar

Alkol dehidrogenazlar dahil, oksidoredüktazlar sayısız kemo, stereo ve regio selektif sayısız reaksiyonu katalizlerler ve ilaç ve kimya endüstrisinde üretim ve sentez aşamalarında kullanılırlar. Biyokataliz için hücrelerin kullanıldığı proseslerde sıklıkla oksidoredüktazlar kullanılır. Bunlar kofaktör bağımlı enzimleridir. NAD(P)H gibi kofaktörler pahalıdır ve tekrar kullanılabilinmelidir. Biyokataliz için kofaktörün geri dönüşümü hücredeki metabolik olaylarla çok kolaylıkla sağlanır. Bununla birlikte planlanmamış istenmeyen ürünlerin oluşumu gibi yan etkiler olabilir. Yine de invitro kofaktör geri dönüşüm sistemlerinin geliştirilmesiyle, in vitro biokatalitik işlemlerde izole edilmiş enzimlerin kullanımı artmıştır (Powell et al., 2001; Schmid et al., 2001).

Alkol dehidrogenazlardan hem alkol üretiminin artırımı hem de alkol atışının sınırlandırılmasında oksidoredüktaz özelliklerinden yararlanılmaktadır. ADH'lar fermentatif mikroorganizmalarda etanol üretimini arttırmak amaçlı kullanıldıkları gibi kesikli kültürlerde ya da gıda endüstrisinde istenmeyen alkol ve aldehit miktarının kontrolünde de biyoteknolojik olarak kullanılmaktadır. Karbon katabolit regülasyonu ile baskılanmış ve baskı kaldırılmış (Repressed ve derepressed) hale gelebilen gen bölgeleri in-vitro koşullarda da kontrol edilebilirler. Bu ilke ile Adh1 promotör bölgesi rekombinant olarak biracılıkta kullanılmaktadır.

2.2.2. Alkoldehidrogenazlar (ADH)

Alkol, aldehit ve ketonların birbirlerine dönüşümleri bütün organizmalar için gerekli işlemlerdir. Oksidoredüktazlar bu reaksiyonları katalizlerler. Bir oksidoredüktaz enzim olan ADH birçok organizmada NAD in redüksiyonu ile (NAD⁺ to NADH) alkol, aldehit ve keton dönüşüm reaksiyonlarını katalizler. ADH in keşfi ve izolasyonu 1937 yıllarına dayanmaktadır ve 1974 yılında üç boyutlu yapısı belirlenen ilk dimerik enzimlerdir (Hellgren, 2009). İnsan ve birçok hayvanda toksik olabilecek alkolün yıkımından ve çeşitli metabolitlerin biyosentezinde görev alacak aldehit, keton

ve alkol gruplarının oluşumundan sorumlu iken maya, birçok bakteri ve bitkilerde fermentasyonun bir parçası olarak NAD^+ seviyesini sabit tutmak için tersinir reaksiyonları katalizlerler.

Alkol dehidrogenazlar birçok farklı kofaktör kullanırlar. Kullandıkları kofaktörlere göre alkol dehidrogenazlar 3 sınıfta toplanır:

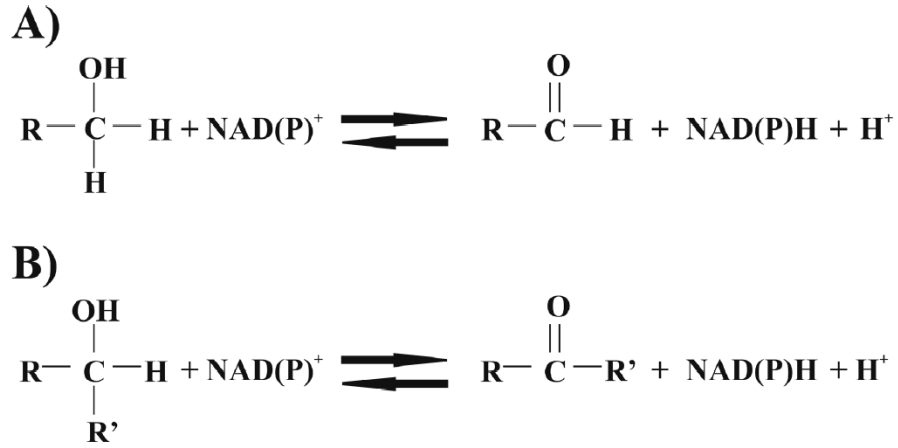
- (i) NAD(P) bağımlı alkol dehidrogenazlar
- (ii) flavin adenine dinucleotide (FAD) bağımlı alkol dehidrogenazlar
- (iii) pyrolo-quinoline quinone (PQQ), hem ya da kofactor F420

NAD(P) bağımlı alkol dehidrogenazlar en çok çalışılmış sınıftır ve genellikle üç major gurba ayrılırlar;

- (i) kısa zincirli alkol dehidrogenazlar
- (ii) demir ile aktive alkol dehidrogenazlar
- (iii) çinko bağımlı alkol dehidrogenazlar (Reid and Fewson, 1994).

Ayrıca NAD bağımlı bir diğer grup aldo-keto redüktaz (AKR) süper ailesidir (Seery et al., 1998; Jez and Penning, 2001; Hyndman et al., 2003). PQQ, hem ya da kofactor F420 gibi kofaktörleri kullanan alkol dehidrogenazlar NAD bağımsız alkol dehidrogenazlar olarak da bilinirler. FAD bağımlı alkol oksidazlar, geri dönüşümsüz alkol oksidasyonu yaparlar (Reid and Fewson, 1994).

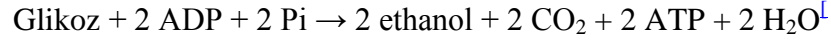
ADH'lar hemen hemen tüm canlılarda mevcuttur ve normal ve dallanmış zincirli alifatik ve aromatik alkoller, primer ve sekonder alkoller, aldehitler ve ketonlar, polyoller gibi çok çeşitli substratları katalizleme yeteneğine sahiptirler. Eksojen alkol ve aldehitlere karşı hücreyi koruma, alkol, alkan, şeker ve lipit metabolizması gibi çok geniş oranda metabolik süreçlere katılırlar (Machielsen, 2007).



Şekil 2.1. NAD bağımlı alkol dehidrogenazlar tarafından katalizlenen alkol, aldehit ve keton dönüşüm reaksiyonları A- alkollerin aldehitlere geri dönüşümlü reaksiyonu B- alkollerin ketonlara geri dönüşümlü reaksiyonu (Machielsen, 2007)

ADH enzimlerinin evrimleşme süreci için yapılan çeşitli organizmaların genetik karşılaştırmaları, glutatyon bağımlı formaldehit dehidrogenaz enziminin alkol dehidrogenaz 3 ailesi ile (ADH-3/ADH5) olan benzerliğini ortaya koymaktadır ve muhtemelen tüm ADH ailesi için atasal enzimdir. Evrimsel sürecin başlarında endojen ve eksojen formaldehidin elimine eden verimli yöntemler çok önemli olduğu için bu kapasitedeki atasal ADH-3 zaman içinde korunmuştur. Genetik duplikasyonlar ve ardından gelen mutasyonlarla diğer ADH'lar ortaya çıkmıştır (Danielsson and Jörnvall, 1992; Kavanagh et al., 2008). Şekerden alkol üretimin ilk olarak mayalarda başladığı kabul ediliyor. Aslında enerjik açıdan bakıldığında adaptif olmasa da diğer organizmalar için toksik düzeyde yüksek sayılabilecek oranda alkol üretimi sayesinde maya hücrelerinin etkin bir şekilde rekabeti ortadan kaldırdığını açıklar. Meyveler çürürken %4 ten daha fazla etanol içerebilirler, bunlarla beslenen hayvanlar için bu eksojen etanolü metabolize edebilecek bir sisteme ihtiyaç vardı. Günümüzde ADH-3 ün aynı zamanda nitrik oksit sinyalizasyonunda önemli bir rol oynadığı bilinse de bu düşünce maya dışındaki türlerde de etanol aktif ADH'ların korunmasını açıkladı (Ikuta et al., 1985; Staab et al., 2008).

Maya ve bakteriler (laktik asit bakterileri ve belli koşullarda *E. coli* hariç) glikozu laktata fermente edemezler. Bunun yerine, etanol ve CO₂ e fermente ederler. Reaksiyon genel olarak aşağıda görülebilir:



Birçok bakteri ve mayada alkol dehidrogenaz fermentasyonda önemli role sahiptir. Glikolizis sonucu oluşan pirüvat, asetaldehit ve CO₂'e dönüştürülür ve asetaldehit daha sonra alkol dehidrogenazlarca etanole indirgenir. Bu ikinci basamağın amacı NAD⁺'ın rejenarasyonudur ki bu sayede glikolizis devam edebilir. İnsanlar çeşitli meyve ve tahılların maya ile fermentasyonu sonucu alkollü içecekler üretmek için bu süreçten yararlanırlar. Mayaların kendi alkolünü üretebilmesi ve tüketebilmesi ilginçtir. Mayalardaki başlıca ADH (ADH1), insandakinden daha büyüktür ve insandaki iki alt birim yerine dört alt birimden oluşur. Katalitik bölgesinde de çinko atomu bağlıdır. Hayvan ve bitkilerdeki ile maya ve bakterilerdeki çinko içeren ADH'lar uzun zincirli alkol dehidrogenazlar ailesindedirler.

2.3. Alkoldehidrogenaz Geni Üzerine Klonlama Çalışmaları

İnsan alkol dehidrogenaz enziminin tüm cDNA'sının klonlanması Tohru Ikuta ve arkadaşları tarafından 1985 yılında gerçekleştirilmiştir (Ikuta et al., 1985). Funguslar üzerine yapılan alkoldehidrogenaz geni klonlama çalışmalarında daha çok fermentatif mikroorganizmalar kullanılmıştır. Birçok maya türü arasında ADH genlerinin dizileri iyi korunmuştur ancak regülasyonu, fizyolojik fonksiyonu ve gen kopya sayısı türler arasında farklılıklar göstermektedir. GenBank kayıtlarına göre *Saccharomyces cerevisiae* ve *Pichia stipitis* için 7 farklı ADH geni tanımlanmışken *Kluyveromyces lactis* için 4 gen tanımlanmıştır. *S. cerevisiae*'da sitozolik ADH1 ve ADH2 alkolik fermentasyonda rol alıp, etanolün üretimi ve kullanımından sorumludur (Lutstorf and Megnet 1968; Denis et al. 1983). *P. stipitis*' de ADH1 (PsADH1) ise hem fermentatif hem de solunum fonksiyonuna sahiptir (Cho and Jeffries 1998; Passoth et al. 1998). *Kluyveromyces lactis*, dört ADH genine sahiptir. Bunlardan ikisi, sitoplazmik

faaliyetleri için ve diğer ikisi mitokondriyal faaliyetler içindir. Sitoplazmik enzimlerin ikisi de *S. cerevisiae* daki ADH1 ile benzer bir işleve sahiptir. *Saccharomyces cerevisiae*'da ADH1'den ADH5'e kadar 5 farklı gen etanol metabolizmasındaki ADH izoenzimlerini kodlar. ADH2'nin haricinde diğerleri alkolik fermantasyon sırasında asetaldehiti etanole indirgerken, ADH2 revers reaksiyonu katalizler ve glikoz baskılanması altındadır. Etanolü okside ederek asetaldehide dönüştürür. Fermantasyon ortamında glikoz tükendiği anda etanolü ilk kullanan enzim ADH2'dir. Ancak ADH2 geni etanol ile uyarılmaz ancak fermente olabilecek şekerlerin azlığında ya da yokluğunda eksprese edilir. Bira fermantasyonu sırasında istenmeyen tereyağı kokusunu oluşturan diasetil bileşiklerinin oluşumunu indirgemek amaçlı maya ADH1 geni promotörü, bakteriyal genlerin ekspresyonunun kontrolünde kullanılmıştır (Jorgen Hansen 2004).

Eukaryotik ADH proteinlerin prokaryotlarda ifadesini gerçekleştiren Surisa ve arkadaşları, ekstremofilik bir fungus ve bio-etanol üretimi açısından önemli olan termotolerant metilotrofik *Hansenula polymorpha* dan ADH geni klonlanarak *E. coli* de eksprese ettirmişlerdir (Suwannarangsee et al., 2010). *Lactobacillus kefir*' in genomik DNA'sından yüksek enantio seçiciliği olan yeni bir ADH Chen Q ve arkadaşları tarafından klonlanmıştır (Huang et al., 2010). Prokaryotik ADH proteini de *Bacillus subtilis* organizmasından klonlanarak eukaryotik organizmada HD34 Bira mayasında eksprese edilmiştir (Ping et al., 2004). Yine prokaryotik alkol dehidrogenaz, termostabil bir arkeiden *Pyrococcus furiosus*' tan klonlanarak *E. coli* de fonksiyonel şekilde eksprese edilmiştir (Machielsen and van der Oost, 2006).

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL

3.1.1. Besiyerleri

MY1012- %10 glikoz-%12 NaCl Malt Ekstrakt Yeast Agar

Malt Ekstrakt	20 g
Pepton	1 g
Glikoz	100 g
Yeast Ekstrakt	5 g
Agar	20 g
Deiyonize Su	1 L

Besiyeri bileşenleri tartılarak otoklavlanmadan kaynar su içerisinde 100°C'de 30 dakika süre bekletilerek hazırlanmıştır (Gunde-Cimerman et al., 2000).

MY50G- %50 Glikoz Malt Ekstrakt Yeast Agar

Malt Ekstrakt	20 g
Pepton	1 g
Glikoz	500 g
Yeast Ekstrakt	5 g
Agar	20 g
Deiyonize Su	1 L

Besiyeri bileşenleri tartılarak glikoz hariç otoklavlanmıştır. Glikoz çözeltisi ayrıca hazırlanıp kaynar su içerisinde 30 dakika süre bekletildikten sonra otoklavdan çıkmış olan besiyerine ilave edilmiştir (Gunde-Cimerman et al., 2000).

%10 NaCl Malt Ekstrakt Agar

Malt Ekstrakt	20 g
Pepton	1 g
Glikoz	100 g
Yeast Ekstrakt	5 g
Agar	20 g
NaCl	100g
Deiyonize Su	1 L

Besiyeri bileşenleri tartılarak 121°C'de 15 dakika otoklavlanmıştır.

%17 NaCl Malt Ekstrakt Agar

Malt Ekstrakt	20 g
Pepton	1 g
Glikoz	100 g
Yeast Ekstrakt	5 g
Agar	20 g
NaCl	170g
Deiyonize Su	1 L

Besiyeri bileşenlerinden tuz ayrı olarak çözelti halinde hazırlanmış ve pH 6,5'a ayarlanıp otoklavlanmıştır. Besiyerine otoklavlandıktan sonra ilave edilmiştir.

%24 NaCl Malt Ekstrakt Agar

Malt Ekstrakt	20 g
Pepton	1 g
Glikoz	100 g
Yeast Ekstrakt	5 g
Agar	20 g
NaCl	240g
Deiyonize Su	1 L

Besiyeri bileşenlerinden tuz ayrı olarak çözelti halinde hazırlanmış ve pH 6,5'a ayarlanıp otoklavlanmıştır. Besiyerine otoklavlandıktan sonra ilave edilmiştir.

Malt Ekstrakt Broth

Malt Ekstrakt	20 g
Pepton	1 g
Glikoz	20 g
Deiyonize Su	1 L

Besiyeri bileşenleri tartılarak 121C'de 15 dakika otoklavlanmıştır. Bu besiyeri DNA izole edilecek miseliyal kütleinin geliştirilmesinde kullanılmıştır.

Minimal Medyum

50X tuz çözeltisi	20 ml
Glikoz	3,6 g
İz elemet çözeltisi	1 ml
Deiyonize Su	1 L

Besiyeri bileşenleri tartılarak 121C'de 15 dakika otoklavlanmıştır. Otoklavdan sonra 12 ml 1M KPO₄. pH 6,8 tampon ilavesi yapılmıştır. Bu besiyeri hücre ekstaktı elde etmek üzere miseliyal kütleinin geliştirilmesinde kullanılmıştır.

3.1.2. Çözeltiler**50X tuz çözeltisi**

NaNO ₃	30g
KCl	2,6 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,4g

Distile suda hacim 100 ml tamamlanacak şekilde hazırlanmıştır. Bu çözelti minimal medyum hazırlığında kullanılmıştır.

Cove'un İz Element Çözeltisi

Na ₂ B ₄ O ₇ :10H ₂ O	4 mg
CuSO ₄ :5H ₂ O	40 mg
MnSO ₄ .H ₂ O	80mg
FeCl ₃	80mg
NaMoO ₄ :2H ₂ O	80mg
ZnSO ₄ :7H ₂ O	800mg

Distile suda hacim 100 ml tamamlanacak şekilde hazırlanmıştır. Bu çözelti minimal medyum hazırlığında kullanılmıştır.

RNase çözeltisi

Pankreatik RNase (20U/mg) 10 mg

Na-asetat (0,01M, pH 5,2) 1 ml

Çözelti 100°C de 15 dakika ısıtılmıştır. Oda sıcaklığına kadar yavaşça soğutulmuştur. pH7,4'e 100µl 1 M Tris-HCl kullanılarak ayarlanmıştır. 100 µl'lik küçük hacimlere bölünerek -20 °C'de saklanmıştır.

CTAB –tamponu

Tris 2,42 g

NaCl 8,2 g

Na-EDTA 0,74 g

CTAB 2 g

pH 7,5'a ayarlanarak hacim distile suyla 100 ml'ye tamamlandı. 121°C de 15 dakika otoklavlandıktan sonra oda sıcaklığında saklanmıştır

TE- tamponu

Tris-HCL (10 mM) 0,16g

EDTA(1mM) 0,03g

Distile suyla 100 ml ye tamamlanarak pH 8'e ayarlanmıştır

Silicagel-mix

Silicagel (Merck) 30g

Celite 545 15 g

Pirofosfat Tamponu

Sodiumpyrophosphate
decahydrate (50 mM) 2,23g

Distile suyla 100 ml ye tamamlanarak pH 8.8'e %8 lik fosforik asit ile ayarlanmıştır

Fosfat Tamponu

Na_2HPO_4 (10 mM) 0,14g

Distile suyla 100 ml ye tamamlanarak pH 7.5'a NaH_2PO_4 (10 mM) ile ayarlanmıştır.

 β - NAD çözeltisi

β - NAD (15 mM) 0,15g

Her seferinde taze olarak, distile suyla 15 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır

AE çözeltisi

NaOAc (50 mM) 0,68g

EDTA (10 mM) 0,37g

Distile suyla 100 ml ye tamamlanarak pH 5'e asetik asit ile ayarlanmıştır.

ANE çözeltisi

NaOAc (10 mM) 0,14g

EDTA (2 mM) 0,07g

NaCl (100 mM) 0,58 g

Distile suyla 100 ml ye tamamlanarak pH 6'ya NaOH ile ayarlanmıştır.

Fenol/AE çözeltisi

Sıvı fenol eşit hacimde AE çözeltisi bileşiminden oluşmaktadır.

Fenol: Kloroform/ ANE çözeltisi

Fenol/AE çözeltisi 2.5 ml

Kloroform 2.5 ml

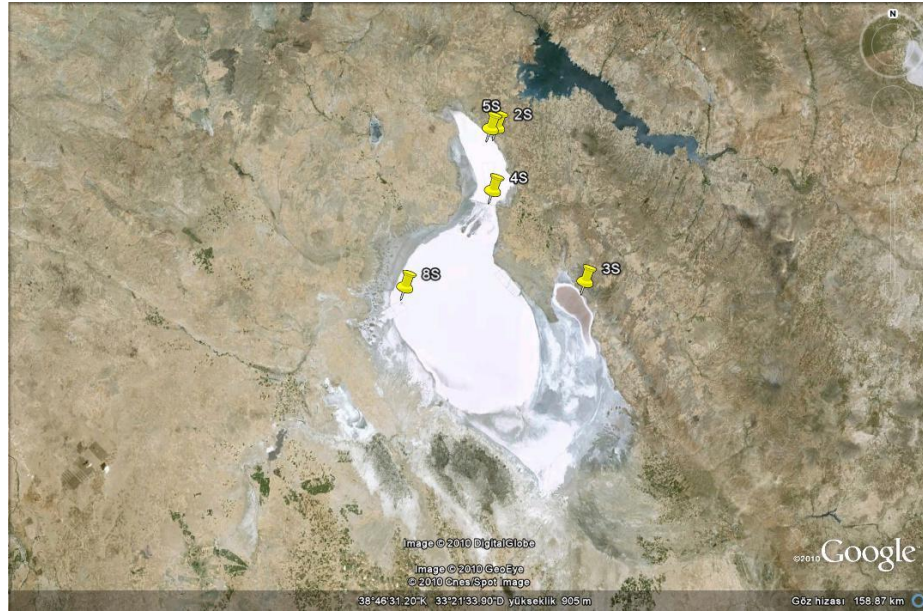
ANE çözeltisi 5 ml

8- hidroksikinolin 0,125 g

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Araştırma bölgesi

Türkiye'nin İç Anadolu bölgesinde yer alan Tuz Gölü, Ankara, Konya ve Aksaray illeri sınırlarının kesiştiği yerde olup bir kısmı Konya ili sınırları içerisinde yer almaktadır (Şekil 3.1). Türkiye'nin ikinci büyük gölü olan Tuz gölü ayrıca en sığ gölüdür. Deniz seviyesinden 905 metre yüksekte ve maksimum ölçüleri kuzeyden güneye 80, doğudan batıya ise 50 kilometre ile yaklaşık 1665 km² lik bir alan kaplar.



Şekil 3.1. Tuz Gölü üzerinde seçilen istasyonlar

Gölün ortalama su seviyesi 40 cm. civarındadır. Ortalama yükseklik seviyesi yağışın arttığı mayıs ayında yaklaşık 110 cm. yi bulur. Tuz Gölü doğuda Peçeneközü ve Melendiz, batıda ise İnsu dereleri ile beslenir. Gölün dışarıya direnağı yoktur. Kimyasal bileşim itibariyle burada NaCl karakterinde bir tuzluluk hakimdir ve sodyum klorür oranı, magnezyum klorür ve sodyum sülfat oranlarından üstündür.

3.2.2. Örneklerin toplanması

Tuz Gölü'nden Şekil 2'de gösterilen 5 farklı istasyondan steril cam kavanozlara alınan su örnekleri soğukta muhafaza edilerek laboratuara ulaştırılmış ve işleme alınana kadar +4°C'de saklanmıştır. Su örnekleri 2, 3, 4 kodlu istasyondan 2010 yılının haziran ayında 5 ve 8 kodlu istasyondan aynı yılın ekim ayında alınmıştır.

Çizelge 3.1. Örnek Alım istasyonları ve özellikleri

İstasyon Kodu		Koordinatları	pH	Yükseklik (m)	Sıcaklık(°C)
Haziran 2010	2	N 39° 04' 19'' E 33° 24' 41''	7,1	910m	25,8
	3	N 38° 47' 52'' E 33° 36' 52''	7,6	907m	31,7
	4	N 38° 57' 33'' E 33° 24' 9''	7,4	913m	30,2
Ekim2010	5	N 39° 04' 09'' E 33° 23' 49''	7,5	910m	16,6
	8	N 38° 47' 12'' E 33° 12' 10''	7,7	907m	22,7

3.2.3. Fungus izolasyonu

Su örnekleri 24 saat içinde işleme alınmıştır. Her bir örnekten 50 ml alınarak 0,45 µm çaplı steril nitroseluloz membran filtreden (Millipore) aseptik şartlarda geçirilmiştir. Filtreler %10 glikoz-%12 NaCl agar (MY10-12, a_w 0,88), %50 glikoz malt ekstrakt yeast ekstrakt agar (MY50G, a_w 0,89) ve %17, 24 ve 30 oranlarında NaCl içeren Malt Ekstrakt Agar (MEA) olmak üzere 5 farklı besiyerine (Gunde-Cimerman et al., 2000), (Butinar et al., 2005) yerleştirildikten sonra petriler 25-27°C'de 60 gün

boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon boyunca petriyerler izolasyon için takip edilmiştir.

MY10-12, ve MY50G da gelişen funguslar, %17 NaCl içeren MEA besiyerlerine inokule edilmiş ve burada gelişebilen koloniler MEA'a aktarılmıştır. %17 ve %10 oranında tuz konsantrasyonuna sahip olan MEA besiyerinde gelişebilen funguslar MEA da kültüre alınıp 27°C'de 14 gün inkübasyona bırakılmış ve +4°C'de saklanmıştır.

3.2.4. Toplam ADH enzim aktivitesinin belirlenmesi

3.2.4.1. Hücre özütlerinin eldesi

ADH oluşumunu teşvik için küfler 10 mM üre ve %0,1 iz element içeren minimal medyumda 24 saat boyunca 120 rpm ve 25°C'de inkübasyona bırakılmış ve miseller hasat edilip glikoz içermeyen 100 mM gliserollü minimal ortama aktarılmıştır (Sealy-Lewis and Fairhurst, 1995). Enzim ekstraksiyonu için 200 mg miselyum eşit hacimde silika jel ile birlikte hacimlerinin iki katı kadar soğuk pH 7,5 sodyum fosfat çözeltisi içinde 30 saniye süre ile homojenizatör (Heidolph) ile parçalanmıştır. Daha sonra soğutmalı santrifüjde 4°C'de 30 dakika süre ile 14000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant enzim aktivite tayininde kullanılmıştır.

3.2.4.2. ADH enzim aktivitesinin belirlenmesi

Hücre özütlerinin toplam ADH enzim aktivitesinin belirlenmesinde spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. Enzim aktivitesi değeri, substrat olarak 0,1 M etanol çözeltisi ve kofaktör β -NAD'ın, 25°C'de oluşturduğu NADH'ın 340 nm'de dakikada verdiği absorbans değişikliğinin ölçümüne dayanmaktadır (Skurský et al.,

1979; Vicente-Soler et al., 1991); Jelski et al., 2007). Enzim aktivitesi tayini için, süpernatanttan 0,1 ml alınıp üzerine 2,9 ml NAD (nikotinamid adenin dinükleotid) (7.5 mM), etil alkol (0,1 ml %95 etanol) ve sodyum pirofosfat çözeltisinden (22 mM pH=8,8) oluşan reaksiyon karışımı eklenerek 25°C'de, 340 nm'de dakikadaki absorbans değişimi ölçülmüştür. Buna göre bir ünite enzim, 1 dakikada 1µmol ürünün oluşumunu katalizleyen enzim miktarı olarak verilmiştir. Enzim spesifik aktivite hesaplanması için protein miktarı Bradford yöntemi ile tayin edildi.

Enzim aktivitesi ve spesifik aktivitenin hesaplanması:

Enzimatik reaksiyonda oluşan ürün temelde Beer-Lambert yasasına dayanan aşağıdaki formül yardımıyla ünite cinsinden hesaplanmıştır.

$$\text{Örnekteki enzim ünitesi} = \frac{V_t \times dA/dt \times 1000 \times \text{sulandırma faktörü}}{\epsilon_\lambda \times V_s \times d}$$

ϵ_λ absorpsiyon katsayısı $\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$

d küvetin ışık yolu 1cm

dA/dt dakikada absorbans değişimi dak^{-1}

Vt reaksiyon karışımının toplam hacmi ml

Vs reaksiyona katılan örnek hacmi ml

Spesifik aktivite bir miligram proteinde bulunan enzim ünite sayısı olarak verilmiş ve ünite/mg ($\mu\text{mol}\text{dk}^{-1}\text{mg}^{-1}$) olarak hesaplanmıştır.

3.2.4.3. Bradford Yöntemi ile Protein tayini

Bu yöntemde boya olarak kullanılan Commasie Brilliant Blue G250 negatif yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın kırmızı formu 465 nm'de absorbans verir. Proteine bağlanması ile birlikte mavi forma dönüşümü gerçekleşmesiyle 595 nm'de absorbans verir. Bu yöntemin avantajları kısa sürede uygulanması, hassasiyetinin 1-100 µg arasında olması, protein boya kompleksi stabilitesinin yüksek olması ve her bir çalışma için ayrı standart eğri gerektirmemesidir (Bradford, 1976).

Standart protein çözeltisi 1 ml'sinde 1 mg protein içerecek şekilde sığır serum albümini ile hazırlanmıştır. Bu çözeltden ependorf tüplerine 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60,

70 µl aktarılmış ve fosfat tamponu ile tüm tüplerin hacimleri 1 ml'ye tamamlanmıştır. Daha sonra bütün tüplere 250 µl Bradford reaktifi (SIGMA) ilave edilerek karışması sağlanmış ve protein boya kompleksinin oluşması için 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan protein boya kompleksi nanodrop 2000 (Thermo) cihazında yer alan Bradford Standart oluşturma programından yararlanılarak 595 nm'de köre karşı absorbans değerlerinin okunmasıyla standart grafik oluşturulmuştur. Cihaz tarafından oluşturulan standart grafik, bir sonraki ölçümlerde µg/µl cinsinden protein miktarını otomatik olarak vermiştir.

Toplam protein miktarını belirlemek üzere süpernatant örneklerinden 100 µl alınarak üzerlerine 25 µl reaktif ilave edilmiş, karıştırılıp 10 dakika inkübasyondan sonra 595 nm'de absorbans değerleri nanodrop cihazı ile kaydedilerek standart grafiği üzerinden µg/µl olarak belirlenmiştir.

3.2.5. Fungus İdentifikasyonu

3.2.5.1 Klasik yöntem ile identifikasyon

İzolasyon aşamasında elde edilen fungus izolatları öncelikle genus düzeyinde “Illustrated Genera of Imperfect Fungi” den yararlanılarak belirlenmiştir (Barnett and Hunter, 1999). Daha sonra her genusa ait türler aşağıda belirtilen kaynaklar doğrultusunda tanımlanmıştır.

İzolatların teşhisinde *Penicillium* türleri için “A Manual of The *Penicillium*” (Raper and Thom, 1949) ve “The Genus *Penicillium* and Its Teleomorphic States *Eupenicillium* and *Talaromyces*” (Pitt, 1979); *Aspergillus* türleri için “The Genus *Aspergillus*” (Raper and Fennell, 1965) ve “Identification of Common *Aspergillus* Species” (Klich, 2002) adlı eserler esas alınmıştır.

Aspergillus ve *Penicillium* dışındaki Moniliaceae familyasına ait diğer türler ile Dematiaceae familyasına ait türlerin teşhisi için “A Manual of Soil Fungi” (Gilman, 1957), “*Dematiaceous Hyphomycetes*” (Ellis, 1971) eserleri kullanılmıştır.

Yukarıda söz edilen kaynaklara dayalı identifikasyon işlemi ağırlıklı olarak stereomikroskop ve ışık mikroskobu ile inceleme gerektirmektedir. Mikrofungusların mikroskopik incelemesi “Lacto-cotton blue mounting” çözeltilisinde hazırlanan preparatlarla yapılmıştır (Sime et al., 2002).

Tanımlanan izolatlar mineral yağda saklanmıştır. Bu türlerin uluslar arasında kabul görmüş bir kültür koleksiyonunda kayıtlı olması ve muhafaza edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla Slovenia’da bulunan “MZKI WDCM599: Microbial Culture Collection of National Institute of Chemistry, National Institute of Chemistry” adlı merkezle bağlantı kurularak tanımlaması yapılan türlerin onaylanması ve koleksiyona kaydedilmesi sağlanmıştır. Belirlenen tür ve yazar isimleri “The CABI Bioscience and CBS Database of Fungal Names” den kontrol edilmiştir (<http://www.indexfungorum.org/names/NAMES.ASP>).

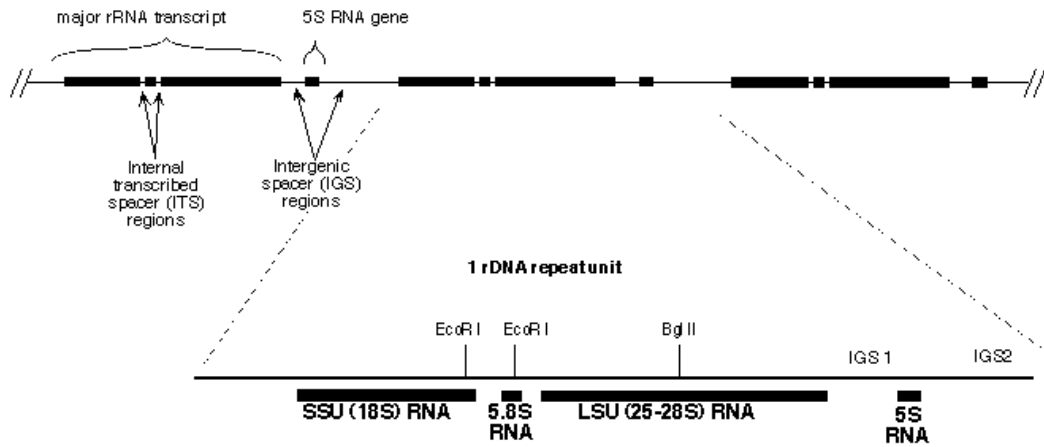
3.2.5.2. Moleküler yöntem ile identifikasyon

İzole edilen halofilik funguslardan DNA ekstraktı elde ederek ITS1–5.8 S ITS bölgeleri ITS5 ve ITS4 primer kombinasyonlarıyla çoğaltılmıştır (White et al., 1990). Moleküler sistematik için tür bazında ve türler içinde en kullanışlı bölgelerdir. Bu bölge diğer ribozomal DNA bölgelerinden daha çok varyasyon gösterir. Sıklıkla kullanılan ITS1+ITS4 primerlerine ek olarak fungal dizilerin selektif amplifikasyonuna imkan veren çeşitli primerler çizelge 3.2 de belirtilmiştir. (Gardes and Bruns, 1993).

Çizelge 3.2. ITS bölgeleri için primer dizileri

primer adı	dizi (5'→3')
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG

ITS1-F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA
ITS4-B	CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG
5.8S	CGCTGCGTTCTTCATCG
5.8SR	TCGATGAAGAACGCAGCG
SR6R	AAGWAAAAGTCGTAACAAGG



Şekil 3.2. ITS bölgeleri (www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm)

DNA ekstraksiyonu; Genomik DNA'nın izolasyonu için malt ekstrakt sıvı besiyerinde 7 gün boyunca miselyum oluşumu beklenmiştir. 500µl Cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) tamponu, silicagel mix ve steril metal boncuk 1,5 ml'lik yuvarlak dipli endorf tübüne aktarılmıştır. Yaklaşık $\pm 1 \text{ cm}^2$ kadar miselyum bu endorfa transfer edilip, 30-60 saniye süre ile titreşimli değirmende (RETSCH Mixer Mills) miselyumun parçalanması sağlanmıştır. Daha sonra 65°C sıcak su banyosunda en az 1 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda 500 µl kloroform eklenip 1-2 saniye vortekslenmiş ve 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonunda üst kısımda toplanan su fazı dikkatlice kloroform ve hücre artığını almadan temiz endorfa aktarılmıştır. Bu tekrar 500 µl kloroform ilave edilip 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir ve üst faz temiz endorfa alınarak üzerine hacminin iki katı kadar ($\pm 800 \mu\text{l}$) %96 lık etanol ilave edilmiştir. Elde yavaşça karıştırılıp DNA'nın prespite olması için -20°C'de bir gece bırakılmıştır. Daha sonra 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı dikkatlice atılıp DNA peleti 500µl %70'lik etanol ile

yıkanmıştır. 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra etanol dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Etanol tümüyle uzaklaşana kadar DNA peleti kurumaya bırakılmıştır. 97,5 µl TE tamponu ile 2,5 µl RNAse eklenerek 37°C'de 5-30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra kullanılincaya kadar DNA'lar -20°C'de saklanmıştır.

3.2.5.3. ITS Gen Bölgelerinin Çoğaltılması

İzole edilmiş fungus DNA'larından, ITS1-5,8SrDNA-ITS2 bölgeleri ITS4 ve ITS5 (White et al., 1990) evrensel primer çifti kullanılarak amplifiye edilmiştir. Son hacim 25 µl olacak şekilde, 1X PCR tamponu, 1,5 mM MgCl₂, 0,4 mM dNTP, 1,25 ünite Taq DNA polimeraz (Fermentas), 0,8 mM her bir primer ve 1 µl DNA ekstraktı kalıp olarak kullanılmak üzere reaksiyon kurulmuştur. PCR işleminde Ependorf Master Cycler Pro S cihazı kullanılmıştır.

Kullanılan Primerler	Primer Dizileri
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG

Reaksiyon döngü şartları:

Ön ısıtma	94°C	3 dakika
	94°C	35 saniye
40 döngü	52°C	35 saniye
	72°C	45 saniye
	72°C	7 dakika
	4°C	Sonsuz

PCR ürünleri elektroforezde %1 agaroz jel kullanılarak 90V'da 40 dakika süre yürütülerek kontrol edilmiştir. PCR ürünlerinin saflaştırılması ve otomatik DNA dizi analizi Macrogen Company (Korea)'ye yaptırılmıştır. Dizi analizi sonuçları National Center for Biotechnology Information (NCBI) internet sitesinde ki BLAST-n programı ile karşılaştırılmıştır (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi).

3.2.5.4. Aktin Gen Bölgesinin Çoğaltılması

İzole edilmiş *Cladosporium* spp. DNA'larından, aktin gen bölgeleri ACT-512F ve ACT-783R primer çifti ile amplifiye edilmiştir (Carbone and Kohn, 1999). Son hacim 25 µl olacak şekilde, 1XPCR tamponu, 1,5 mM MgCl₂, 0,4 mM dNTP, 1,25 ünite Taq DNA polimeraz (Fermentas), 0,8 mM her bir primer, ve 1 µl DNA ekstraktı kalıp olarak kullanılmak üzere reaksiyon kurulmuştur. PCR işleminde Ependorf Master Cycler Pro S cihazı kullanılmıştır.

Kullanılan Primerler	Primer Dizileri
ACT-512F	ATG TGC AAG GCC GGT TTC GC
ACT-783R	TAC GAG TCC TTC TGG CCC AT

Reaksiyon döndü şartları:

Ön ısıtma	94°C	3 dakika
	94°C	45 saniye
25 döngü	53°C	30 saniye
	72°C	60 saniye
	72°C	7 dakika
	4°C	Sonsuz

PCR ürünleri elektroforezde %1 agaroz jel kullanılarak 90V'da 40 dakika süre yürütülerek kontrol edilmiştir. PCR ürünlerinin saflaştırılması ve otomatik DNA dizi analizi Macrogen Company (Korea)'ye yaptırılmıştır. Dizi analizi sonuçları National Center for Biotechnology Information (NCBI) internet sitesinde ki BLAST-n programı ile karşılaştırılmıştır (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi).

Agaroz Jel Elektroforez; Gen bölgelerinin PCR ile amplifikasyonundan sonra bunların elektroforez işlemleri için 1X lik TAE tampon içinde 5-6V/cm akım uygulanan %1'lik agaroz jeller kullanılmıştır. Jellerde 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen) marker olarak kullanılmıştır. Kuyucuklara 5 µl örnek ve 1 µl jel yükleme boyası olacak şekilde yükleme yapılmıştır.

3.2.6. Klonlanma çalışmaları

3.2.6.1. Toplam RNA izolasyonu

Toplam RNA izolasyon çalışmalarında amaca uygun olarak Rosh marka RNA izolasyon kiti ve iki farklı klasik sıcak fenol (hot phenol) izolasyon yöntemi (Köhrer and Domdey, 1991); (Mukhtar et al., 1998) kullanılmıştır. Kit ile yapılan çalışmalar üretici firmanın protokolü doğrultusunda uygulanmıştır. Sıcak fenol izolasyon çalışması ise aşağıdaki protokoldeki gibidir. İzolasyon sırasında kullanılan tüm plastik ve cam malzemeler %0,1'lik DEPC'li sudan geçirilmiştir. Ayrıca tüm çözeltiler DEPC'li su ile hazırlanarak otoklavlanarak steril edilmiştir.

Sıcak fenol izolasyon yöntemi (Köhrer and Domdey, 1991) aşağıdaki protokoldeki gibi kullanılmıştır.

1. Yaklaşık 200 mg hücre, -20°C'de soğutulmuş, 0,5 ml gliserol (%25) çözeltisi içinde 30 saniye homojenize edilir.
2. Oda sıcaklığında 30 saniye santrifüj edilip süpernatant atılır.
3. 400 µl AE çözeltisi içinde pellet çözülür.
4. 40 µl 10% SDS (Sodyum dodesil sülfat) eklenerek kısa süreli vortekslemenin ardından hemen bir sonraki basamağa geçilir.
5. 500 µl sıcak fenol/AE eklenerek 15 saniye vorteksledikten sonra 5 dakika boyunca her 30 saniyede 5 saniye vortekslenerek 65°C'de bekletilir.
6. 30 saniye süre ile buzun içinde soğutulur.
7. Oda sıcaklığında 6000 rpm 10 dakika santrifüj edilir.
8. Alt tabaka olan fenol tabakası uzaklaştırılır.
9. 5. Basamaktan itibaren işlemler tekrar edilir.
10. Sulu süpernatant kısmı temiz bir mikrofüj tübüne alınır.
11. Eşit hacimde fenol:CHCl₃/ANE çözeltisi ile ekstrakte edilir. En yüksek devirde 30 saniye santrifüj edilir.
12. Süpernatant temiz bir tüpe alınır. CHCl₃:isoamyl alcohol (24:1) ile ekstrakte edilir. En yüksek devirde 30 saniye santrifüj edilir.

13. Sulu süpernatant temiz bir tüpe aktarılır.

14. 1/10 hacminde 3 M NaOAc eklenir ve vortekslenir. Yaklaşık hacmin 2.5 katı kadar EtOH eklenir. Vortekslenip -20°C 'de 30 dakika ya da daha fazla bekletilir

15. 4°C 'de en yüksek devirde 20 dakika santrifüjlenir.

16. 75% EtOH ile pelletler yıkanır ve hızlı bir şekilde kurutulur.

17. Pelleti 10 μl ddH₂O ile çözülür ve RNA -20°C 'de depolanır.

Klasik yöntem ile RNA ekstraksiyonu için (Mukhtar et al., 1998) diğer bir yöntem modifiye edilerek aşağıdaki protokoldeki gibi kullanılmıştır.

1. Yaklaşık 4 g hücre -70°C 'de 15 dakika süre ile dondurulmuş ve havanda parçalanmıştır.

2. Hücreler 50 ml'lik tüplere aktarılıp üzerlerine 10 ml RNA ekstraksiyon tampon, 10 ml doyurulmuş fenol çözeltisi (80°C) ve 500 μl guanidumtiyosiyonat eklenir. Yavaşça vortekslenip, alt üst ederek karıştırılır.

3. 4000 g'de 4°C 'de 15 dakika santrifüj edilir.

4. Üst sulu faz alınarak fenol ile tekrar ekstrakte edilir

5. Üst sulu faz bu kez eşit hacimde fenol; kloroform; izoamil (25;24;1) karışımı ile kloroform; isoamil (24;1) ile ekstrakte edilir.

6. Üst sıvı faz buz içerisinde temiz tübe konulur ve eşit hacimde 4M LiCl eklenir. -20°C 'de 2 saat prespite edilir ve 9000 g'de 4°C 'de 10 dakika santrifüj edilir.

7. Oluşan pellet 100 μl su da çözülerek 1/10 hacimde 3M NaOAc (pH 5,2) ve 2 katı hacimde etanol eklenir. -20°C 'de 1 gece prespite edilir.

8. Prespitasyondan sonra 20 dakika en üst hızda santrifüj edilir ve pellet %75 etanol ile yıkanır. 9000 g'de 4°C 'de 10 dakika santrifüj edilir ve pellet 20 μl suda çözülür.

9. DNase muamelesi yapıldıktan sonra 4. basamaktan itibaren işlemler tekrar edilir.

3.2.6.2. Toplam RNA'ya DNase uygulanması

Her iki sıcak fenol yöntemi ile RNA izolasyonu sonrasında olası DNA kontaminasyonunu engellemek üzere, toplam RNA'ya DNase I (New England BioLabs) uygulanmıştır. Reaksiyon üretici firmanın protokolüne yapılmıştır.

Reaksiyon koşulları;

1. 10 µg RNA final hacim 100µl olacak şekilde enzim ile birlikte sağlanan reaksiyon tamponu ile sulandırılır.

2. 2 ünite DNase I ilave edilerek 37°C'de 10 dakika inkübe edilir.

3. 1µl 0.5 M EDTA çözeltisi ilave edilir.

4. 10 dakika süre ile 75°C'de reaksiyon durdurulur.

DNaseI uygulanan RNA ların tekrar saf olarak eldesi için hot fenol yönteminin (Köhler and Domdey, 1991) 14. maddesinden itibaren basamaklar tekrar edilmiştir.

3.2.6.3. İzole edilen RNA'ların spektrofotometrik analizleri

İzole edilen RNA örneklerini miktarını belirlemek için Thermo marka nanodrop cihazı kullanılmıştır. RNA kalitesinin belirlenmesinde 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerlerinin oranı 1,8 veya üzeri olması esastır. Kör olarak RNA peletinin çözeltisi kullanılmıştır.

3.2.6.4 Toplam RNA'dan geri transkripsiyon (RT) reaksiyonu ile cDNA'nın üretilmesi

İlgili gen bölgesinin komplementer DNA'sının (cDNA) mRNA'dan oluşturulması hedeflenmiştir. Bu amaçla Oligo(dT)18 primerler kullanılmıştır. cDNA

sentezi adımları aşağıda verilmiştir. Reaksiyonda Fermentas “RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit” kullanılmıştır.

Aşağıda verilen maddeler uygun miktarda buz üzerinde hazırlanır.

- Oligo(dT)18 primer (0,5 µg/µl, HPLC saflığında) 1 µl
- dH₂O ile 12 µl’ye karıştırılarak tamamlanır ve 70 °C’de 5 dakika inkübe edilir..
- 4°C’de aşağıdakiler, verilen miktarlarda aşağıdaki sıra ile eklenir.
 - 5x M-MLV Rtase Buffer 5µl
 - Ribolock™ Ribonuclease inhibitor (20 u/µl) 1 µl
 - 10 mM dNTP mix 2 µl
- Yavaşça karıştırılır ve 37 °C’de 5 dakika inkübe edilir.
- RevertAid™ H Minus M-MuLV RT (200 u/µl) enziminden 1 µl eklenerek, 42 °C’de 60 dakika inkübe edilir.
- Reaksiyon 70 °C’de 10 dakika inkübe edilerek enzimin durdurulması ile sonlandırılır.

3.2.6.5. Gen spesifik primerler ile ADH geninin DNA’sının üretilmesi

Alkol dehidrogenaz enzimi üzerine funguslar üzerine yapılan çalışmaların çoğu fermentatif mayalar üzerinedir. İlgili gen konusunda filamentli funguslar üzerine genetik ve moleküler çalışmaların az olmasından dolayı dizi bilgileri gen bankasında sınırlı sayıdadır. Bu nedenle farklı türler için var olan alkoldehidrogenaz izoenzimlerinin gen bilgisi mRNA dizi seviyesinde tanımlanmış ve CLUSTAL W 1.83 analiz programı ile hizalanmıştır. Başlangıç ve bitiş kodonunu içine alacak şekilde. bu bölgelerden uygun yerlere yarıbozuk (dejenere) olarak ifade edilen primerler PRİMER 3 PLUS programı kullanılarak dizayn edilmiştir. İleri (forward) ve geri (reverse) olmak üzere farklı primer bölgeleri seçilmiştir. Klonlama öncesi doğru gen bölgesinin çalışılıp çalışılmadığının belirlenmesi için gen bölgesi içerisinde iç primerler dizayn edilmiştir. Çalışmada kullanılan primerler tabloda gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. Klonlama çalışmalarında kullanılan primerler

Primer Adı	Dizi Bilgisi (5' --> 3')	Ürün Büyüklüğü (bp)
Adh F	ATGACTAARTTSGASRTCCCC*	1050
Adh R	TCATTCRGGCAKCTCAAGGA*	
Adh1bF	GTCTACAAGCAGATCCCCGT	450
Adh1bR	GACTCCTTCAGGCCCTTGTA	
AdhiF	ACAATGCCTCAGTTCGAGATT	1000
AdhiR	TCTTCTCTATTTGCTGGTATC	
BYF	ACTATCCCGGAGAAGCAATGG	1100
BYR	CAAATCTTCCGTGTCTACCTGC	
pJET1.2 F	CGACTACTATAGGGAGAGCGGC	İnsert bç
pJET1.2 R	AAGAACATCGATTTCCATGGCAG	

*IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) kodlarına göre R= G/A, K= G/T, S= C/G bazlarına karşılık gelmektedir.

<u>A_fumigatus_</u>	ATGACTAAGTTCGACATCCCCTCCATGCAATGGGCCAGGTGGCCGAACAGGTCGGCGGC
<u>A_nidulans_</u>	-----ATGTCCATCCCCTACTATGCAATGGGCCAGGTGCGCCGAGAAGGTCGGCGGC
<u>S_cerevisiae_</u>	-----ATGCTATCCCAGAACTCAAAAAGGTGTTATCTTCTACGAATCCCACGGT
	* * * * *
<u>A_fumigatus_</u>	CCTCTGGTCTCAAGCAAATCCCTGTCCCAAAGCCCGGACCCGATGAGATCCTGGTCAAG
<u>A_nidulans_</u>	CCGCTCGTCTACAAGCAGATCCCCTGCCTAAGCCCGGTCCCGACCAGATCCTTGTGAAG
<u>S_cerevisiae_</u>	AAGTTGGAATACAAGATATTCAGTTCCAAAGCCAAAGCCAAAGCAATGTTGATCAAC
	* * * * *
<u>A_fumigatus_</u>	ATCCGTTACTCGGGCGTCTGCCACACCGACCTCCACGCCATGAAAGGCGACTGGCCTCTC
<u>A_nidulans_</u>	ATCCGCTACTCTGGGGTTTGCACACCGACCTACACGCTATGATGGGTCAGTGGCCAAATC
<u>S_cerevisiae_</u>	GTTAAATACTCTGGTGTCTGCACACTGACTTGCACGCTTGGCAGGTGACTGGCCATTC
	* * * * *
<u>A_fumigatus_</u>	CCTGTCAAGATGCCCTCGTCCGGTGGCCACGAGGGCGCCGGCGTCTCGTAGCCAAGGGC
<u>A_nidulans_</u>	CCCGTCAAAATGCCCTCGTCCGGTGGCCACGAGGAGCAGGAATCGTCTGGCAAAGGGC
<u>S_cerevisiae_</u>	CCAGTTAAGCTACCAATTAGTCCGGTGGTCCAGAAAGGTGGCGGTGTCGTTGTCGGCATGGT
	* * * * *
<u>A_fumigatus_</u>	GACCTCGTACGGAATTCGASATCGGCGACCACGAGGCATCAAGTGGCTGAACGGGTCC
<u>A_nidulans_</u>	GAACTGGTCCACGAATTCGASATCGGCGACCAAGCTGGCATCAAATGGCTCAATGGTTC
<u>S_cerevisiae_</u>	GAAAACGTTAAGGGCTGGAASATCGGTGACTACGCCGGTATCAAATGGTTGAACGGTCT
	* * * * *
<u>A_fumigatus_</u>	TGTCTCGCTGCGAGTCTGCAAGCAGGCCGATGAACCGCTTTGCCAGAATGCCTTGCTG
<u>A_nidulans_</u>	TGCGGAGAGTGCGAGTCTGCCGCAATCGGACGACCCCTCTGTGCACGCGCCAGCTC
<u>S_cerevisiae_</u>	TGTATGGCCTGTGAATACTGTGAATGGGTAACGAATCCAACCTGCTCACGCTGACTTC
	* * * * *
<u>A_fumigatus_</u>	TCCGGGTATACCGTCGATGGCACCTTCCAGCAGTACACGATTGGCAAAGCGACGCATCGG
<u>A_nidulans_</u>	TCTGGGTACTGTGACGGACGTTCCAGCAGTATGCGCTCGGAAAGGCGAGTCAATCGG
<u>S_cerevisiae_</u>	TCTGTTACACCACGACGGTCTTTCCAACAATACGCTACCGCTGACGCTGTTCAAGCC
	* * * * *

<u>A_fumigatus_</u>	TTCCTGAGGGCACCGGTCCTCAACACGGTGGTGCATGATCAACATCCGGGGCAGCTAT
<u>A_nidulans_</u>	TACCTCAAGGCCCTGTGATCAACACAGTTGTCGCATGATCACTATCAAGGGCAGCTAC
<u>S_cerevisiae_</u>	AAGTGTGTTCTGATGTCTTCAACCAAGTCGTCGAAGTCCATCTCTATTGTTGGTTCTTAC
	* ** ***** ** ** *** ** **
<u>A_fumigatus_</u>	GTTGGCAACCGACAGGATGGCGTCGAGGCGATTGATTTCTTCGCTCGCGGACTGATCAAG
<u>A_nidulans_</u>	GTTGGAACCGACAGGACGGTGTGCGAGGCTCTGGACTTCTTCGCTCGCGGCCTGATCAAG
<u>S_cerevisiae_</u>	GTCCGTAACAGAGCTGACACCAGAGAAGCTTTGGACTTCTTCGCCAGAGGTTTGGTCAAG
	** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** * ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
<u>A_fumigatus_</u>	GCTCCGTACAAGGTTGCTCCGCTTGCGGATCTGCCTAAGATCTATGAGCTCATGGAACAA
<u>A_nidulans_</u>	GCTCCGTTCAAGACGGCTCCTCTGAAGGATCTGCCGAAGATTTACGAGCTTATGGAACAA
<u>S_cerevisiae_</u>	TCTCCAATCAAGGTTGTCGGCTTGTCTACCTTGCCAGAAATTTACGAAAAGATGGAAGAAG
	**** * ** * * ** ** * ** ** *
<u>A_fumigatus_</u>	GGCAAGATCGCTGGTTCGCTACGTCCTTGAGATGCCCGAATGA
<u>A_nidulans_</u>	GGCAGAATCGCCGGTTCGTTATGTGCTAGAGATGCCAGAATAA
<u>S_cerevisiae_</u>	GGTCAAATCGTTGGTAGATACGTTGTTGACACTTCTAAATAA
	** **** * ** * ** * * ** * * ** *

Şekil 3.3. ADH1, cDNA'sının tamamının klonlanması için primer tasarımında kullanılan hizalamalar

3.2.6.6. PCR ürünlerinin saflaştırılması

PCR ürünlerinin jelden saflaştırılması Fermentas GeneJET Gel Extraction Kit ile yapılmıştır. Kit, silika bazlı spin kolon kullanılarak DNA saflaştırılması prensibiyle çalışmaktadır. Üretici firmanın protokolü doğrultusunda aşağıdaki gibi uygulanmıştır.

Her 100 mg jel parçası için 100µl DNA bağlama tamponu ilave edilir. Jel eriyene kadar 40-50°C su banyosunda alt üst edilerek karıştırılır.

Çözünür hale gelmiş olan jel kolona transfer edilir. 14000 rpm'de oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edilir. Toplama tüpünde biriken sıvı kısım atılır.

Kolon üzerine 700 µl yıkama tamponu ilave edilip, 14000 rpm'de oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edilir. Toplama tüpünde biriken sıvı kısım atılarak tekrar 1 dakika santrifüj edilir.

Kolon temiz bir tüp içerisine alınır. Kolon üzerine 50µl elüsyon tamponu ilave edilerek, 14000 rpm'de oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edilir.

3.2.6.7.PCR ürünlerinin klonlanması

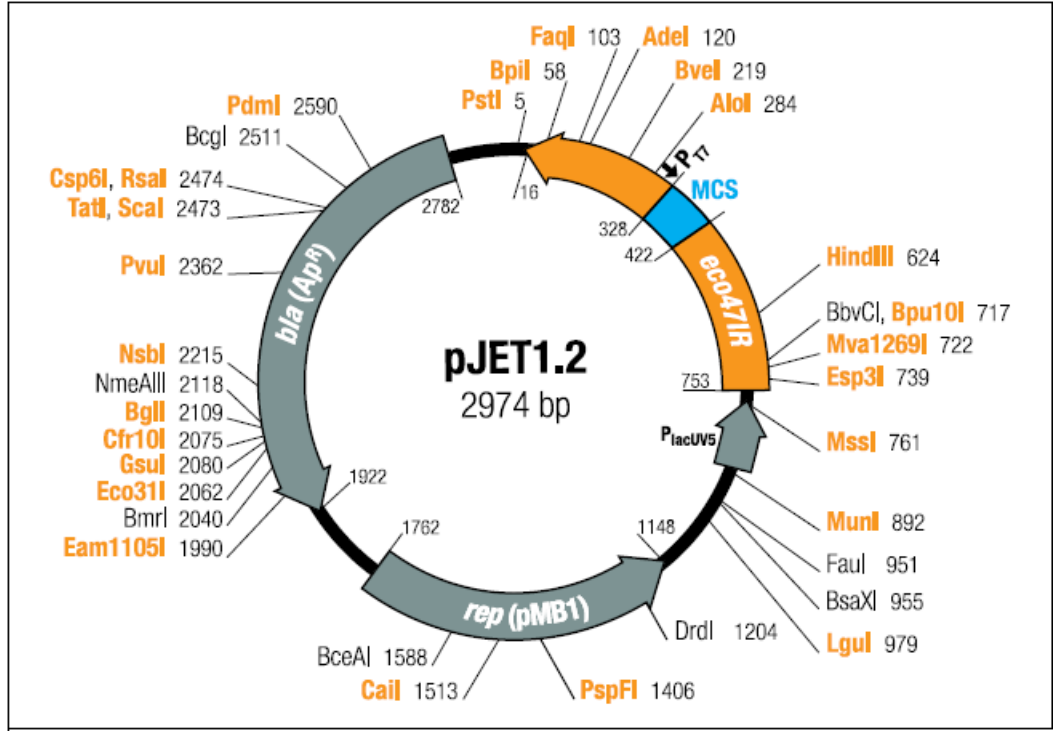
cDNA ve genomik DNA'dan elde edilen gen bölgelerinin klonlanması için Fermentas CloneJET PCR Cloning Kit kullanılmıştır. Klonlama vektörü olarak kit içerisindeki pJET1.2/blunt linearize klonlama vektörü kullanılmıştır (Şekil 3.4.). pJET1.2/blunt linearize vektörü letal bir gen içermektedir. Vektör kendi içerisinde katlanır ve halka olursa transformasyondan sonra letal bir restriksiyon enzimi sentezlenmektedir. Klonlama bölgesine DNA'nın oturmasıyla bu genin yapısı bozulur ve sadece insert içeren transformantlar gelişir. Bu sayede mavi beyaz koloni testine gerek kalmamaktadır. Öncelikle PCR ürünlerimiz vektöre oturacak şekilde DNA Blunting Enzim sayesinde küt uçlu hale getirilmiştir. Aşağıdaki protokol uyarınca PCR ürünlerinin hazırlığı için Blunting Reaksiyon Karışımı hazırlanmıştır.

-2X Reaksiyon buffer	10 µl
-PCR ürünü	2 µl
-dH ₂ O	5 µl
-DNA Blunting Enzim	1 µl

Toplam 18 µl olacak şekilde vorteks ile 3-5 saniye kadar karıştırılıp ve 70°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir ve hemen buza batırılarak soğutulmuştur. Vektör ve PCR ürünlerinin ligasyon reaksiyonu aşağıdaki gibi kurulmuştur;

- Blunting Reaksiyon Karışımı	18 µl
- pJET1.2/blunt Cloning Vector (50ng/ µl)	1 µl
-T4 DNA ligase	1 µl

Toplam 20 µl hacimli reaksiyon karışımı vorteks ile karıştırdıktan sonra 3-5 saniye santrifüjlenmiştir. Oda sıcaklığında 20 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Ligasyon karışımı doğrudan bakteriyal transformasyonda kullanılmıştır.



Şekil 3.4. pJET1.2/blunt vektör haritası

3.2.6.8. Bakteriyal transformasyon

Bakteriyal transformasyon için QIAGEN EZ kompetent *E.coli* hücreleri kullanılmıştır. Bu hücreler kullanıma hazır halde mikrosantrifüj tüplerinde -70°C 'de saklanmaktadır. Transformasyon öncesinde hücreler buz içerisinde tutulmuştur. Her bir kompetent hücre için $2\ \mu\text{l}$ ligasyon reaksiyon karışımından ilave edilmiş çok yavaş şekilde alt üst ederek karıştırıldıktan sonra buz içerisinde 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra hücreler sarsmadan 42°C su banyosunda 30 saniye tutulmuş ve hemen arkasından buzda 2 dakika inkübe edilmiştir. Üzerlerine $250\ \mu\text{l}$ SOC medyum eklenerek $100\ \mu\text{l}$ ampisillinli agara LB ($100\ \mu\text{g/ml}$ ampisillin) eküvyon ile ekim yapılmıştır. Hücreler 37°C 'de 1 gece boyunca 15-18 saat inkübasyona bırakılmıştır.

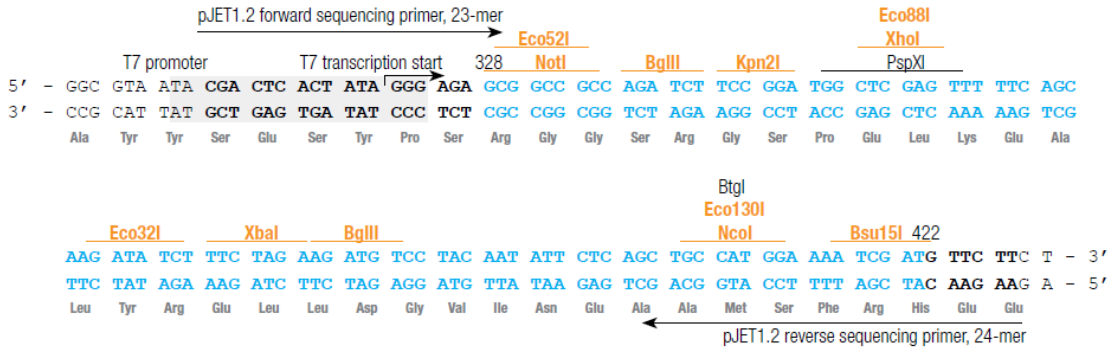
3.2.6.9. Transformantların koloni PCR ile kontrolü

Rekombinant klonların analizi için koloni PCR yapılmıştır. Seçilen rekombinat koloniler 50 µl Tris-HCl Ph 6,5 tamponu kullanılarak hücreler süspansiyon edilmişlerdir. 95°C’de 10 dakika süre ile patlatılan hücrelerden 1 µl. PCR reaksiyonu için kalıp olarak kullanılmıştır. Koloni PCR için pJET1.2/blunt Cloning vektörünün klonlama bölgesinin dışında yer alan primer bağlanma bölgelerine özel pJET1.2 Forward ve pJET1.2 Reverse sekans primerleri kullanılmıştır (Şekil 3.5.). PCR reaksiyonu son hacim 25 µl olacak şekilde, 1XPCR tamponu, 1,5 mM MgCl₂, 0,4 mM dNTP, 1,25 ünite Taq DNA polimeraz (Fermentas), 0,8 mM her bir primer, ve 1 µl DNA ekstraktı kalıp olarak kullanılmak üzere kurulmuştur. Reaksiyon döngü koşulları:

Ön ısıtma	94°C	3 dakika
	94°C	30 saniye
25 döngü	60°C	30 saniye
	72°C	60 saniye
	72°C	7 dakika
	4°C	Sonsuz

PCR ürünleri elektroforezde %1 agaroz jel kullanılarak 90V’da 40 dakika süre yürütülerek kontrol edilmiştir.

Multiple Cloning Site



Şekil 3.5. pJET1.2/blunt Vektör Klonlama Bölgesi ile pJET1.2 Forward ve pJET1.2 Reverse sekans primerlerinin DNA dizisi

3.2.7 Enzim Saflaştırma Çalışmaları

Enzim saflaştırma çalışmaları için elde edilen hücre özütü kullanılarak amonyum sülfatla $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ çöktürme yapılmıştır. Homojenizasyon sonrasında elde edilen süpernatant üzerine 30 dk. süresince bir karıştırıcı yardımı ile % 60 oranında doygunluk sağlanacak şekilde amonyum sülfat eklenerek gece boyunca 4°C 'de karıştırılarak peptidik bileşenler çöktürülmüştür. Ardından 13 000 rpm'de 1 saat 4°C 'de santrifüj sonrasında ADH peptidini içeren pellet elde edilmiştir. Amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen pellet diyaliz tüpüne aktarılmıştır. 20 mM Tris/HCl (pH 8.5) tamponuna karşı gece boyunca 4°C 'de diyaliz edilmiştir. Saflaştırmanın birinci aşamasında elde edilen dializat selüloz membran filtreden ($0.45 \mu\text{m}$ filtre edilip, DEAE-cellulose adsorbent içeren kolona uygulanmıştır. Çalışmalarda 1cm çap ve 30 cm boy ölçülerindeki kolon DEAE-Sepharose matriksi ile doldurularak hazırlanmıştır. Kromatografi sırasında akış hızı $500 \mu\text{l/dakika}$ olacak şekilde ayarlanıp ve mobil faz olarak 20 mM Tris/HCl (pH 8.5) tamponu kullanılmıştır. Kromatografi süresince her tüp $500 \mu\text{l}$ içerecek şekilde fraksiyonlar manuel olarak toplanmış ve etiketlenmiştir. Protein içeren fraksiyonların belirlenmesi için 280 nm 'de spektrofotometrede absorbans değerleri alınmıştır. Aynı zamanda elde edilen fraksiyonların ADH enzimi içeren kısımlarının belirlenmesi için toplanan fraksiyonlar ile enzim aktivite çalışmaları da gerçekleştirilmiştir.

3.2.7.1. SDS- PAGE profilinin belirlenmesi

Dializattan elde edilen peptid karışımının SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat PoliAkrilamid) jel elektroforezi ile saflık ve molekül ağırlığı analizi gerçekleştirilmiştir. Molekül ağırlıkları 10-200 kDa arası peptidler için SDS-PAGE çalışmaları Laemmli'ye (1970) göre gerçekleştirilmiş ve ayırma jeli %12 monomer çözeltisi (akrilamid/bis) olacak şekilde, %10 SDS içeren 1,5 M Tris-HCl tamponu (pH 8,8) ile hazırlanmıştır. Yükleme jeli, %4 monomer çözeltisi (akrilamid/bis) içerecek şekilde 0,5M Tris-HCl tamponu (pH 6,8) ile hazırlanmıştır. Polimerizasyon için amonyum persülfat, katalizör

olarak TEMED (N,N,N',N'-terametilenetilendiamin) kullanılmıştır. Örnekler ısı ile denatüre edilip, indirgeme işlemleri için 250 mM DTT eklenerek yürütme jelinde 80 V akımda 15 dakika, ayırma jelinde 120 V akımda 2 saat süresince oda sıcaklığında yürütülmüştür. İşlem sonrasında bantları görünür hale getirebilmek için %0.1 Coomassie Blue R-250 içeren çözeltide (% 40 metanol, %10 asetik asit ve %50 su içerisinde) 1 saat süresince çalkalamalı olarak boyanmıştır. Ayrıca molekül ağırlığı bilinen standart proteinlerde (205-6.5 kDa aralığında protein marker SIGMA M4038) aynı jelde yürütülmüştür.

3.2.7.2. HPLC profilinin belirlenmesi

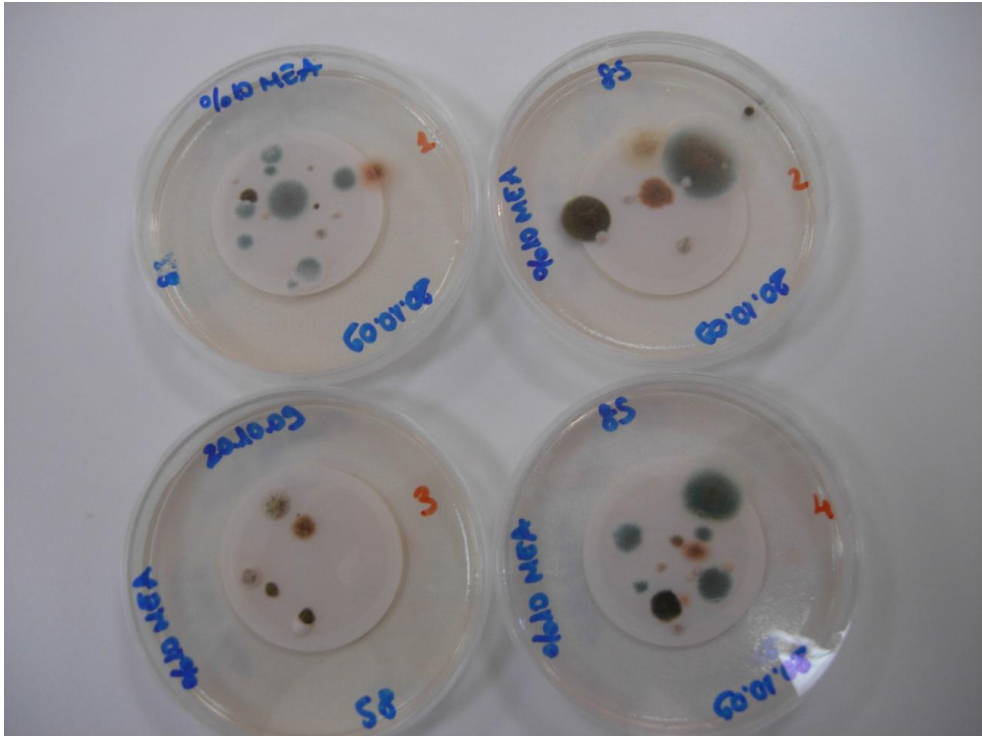
Hücre ekstraktının amonyum sülfat ile çöktürülmesi ve ardından diyaliz işlemi sonrası elde edilen dializatın Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi profilinin belirlenmesi için C18 ters faz analitik protein peptid kolonu kullanılmıştır. Çalışmada hareketli fazın akış hızı dakikada 1 ml olacak şekilde 100 dakika boyunca 220 nm'de absorbansı izlenmiştir (Santhoshkumar and Sharma, 2002). Hareketli faz için %0.12 derişimli trifloraasetik asitin (TFA) sudaki çözeltisi A tamponu olarak ve %0.10 derişimli TFA'nın asetonitril içindeki çözeltisi de B tamponu olarak kullanılmıştır. Ayırım sırasında % 0-70 B tamponu lineer gradient olarak uygulanmıştır.

BÖLÜM 4

BULGULAR

4.1. Fungus İzolasyonu ve Tanımlanması

5 farklı besiyerine inoküle edilen su örnekleri 60 gün boyunca takip edilmiş inkübasyonun dördüncü gününden başlayarak membran filtre üzerinde koloniler izole edilmiştir (Şekil 4.1). Kserofilik özellik gösteren organizmaların geliştiği MY10-12 ve MY50G besiyerlerinde oluşan koloniler %17 NaCl içeren MEA ve tuz içermeyen MEA besiyerlerine aktarılmıştır. %17 NaCl içeren MEA'da gelişebilen bütün organizmalar tuzsuz ortamda da gelişme gösterebilmiştir.



Şekil 4.1. %10 NaCl MEA besiyeri üzerinde inkübasyona bırakılmış membran üzerinde gelişen koloniler.

Çizelge 4.1. Tuz Gölü su örneklerinden elde edilen mikrofunguslar

İzolat	İzolat Kodu	Besiyeri
<i>Alternaria spp 1</i>	5780	% 10 MEA
<i>Alternaria spp 2</i>	5783	% 10 MEA
<i>Alternaria spp 3</i>	5788	% 10 MEA
<i>Alternaria spp 4</i>	5790	% 10 MEA
<i>Alternaria spp 5</i>	5787	% 10 MEA
<i>Alternaria spp 6</i>	5796	% 10 MEA
<i>Alternaria spp 7</i>	5801	% 10 MEA
<i>Alternaria spp 8</i>	5816	% 10 MEA
<i>Aspergillus spp 1</i>	5777	% 10 MEA
<i>Aspergillus spp 2</i>	5800	% 10 MEA
<i>Aspergillus spp 3</i>	t33	MY1012
<i>Aspergillus spp 4</i>	t36	MY1012
<i>Aspergillus spp 5</i>	t44	MY1012
<i>Aspergillus spp 6</i>	t55	MY1012
<i>Cladosporium spp.1</i>	5776	% 10 MEA
<i>Cladosporium spp.2</i>	5781	% 10 MEA
<i>Cladosporium spp.3</i>	5786	% 10 MEA
<i>Cladosporium spp.4</i>	5794	% 10 MEA
<i>Cladosporium spp.5</i>	5798	% 10 MEA
<i>Cladosporium spp.6</i>	5802	% 10 MEA
<i>Cladosporium spp.7</i>	5803	% 10 MEA
<i>Cladosporium spp.8</i>	5805	% 10 MEA
<i>Cladosporium spp.9</i>	5806	% 10 MEA

Çizelge 4.1. Devamı

İzolat	İzolat Kodu	Besiyeri
<i>Cladosporium spp.10</i>	5815	% 10 MEA
<i>Cladosporium spp.11</i>	5818	% 10 MEA
<i>Cladosporium spp.12</i>	5793	% 10 MEA
<i>Cladosporium spp.13</i>	5799	% 10 MEA
<i>Cladosporium spp.14</i>	5817	% 10 MEA
<i>Cladosporium spp.15</i>	5821	% 10 MEA
<i>Emericella ssp.</i>	t22	MY1012
<i>Eurotium spp 1</i>	5778	% 10 MEA
<i>Eurotium spp 2</i>	5810	% 10 MEA
<i>Eurotium spp 3</i>	5814	% 10 MEA
<i>Penicillium spp. 1</i>	5779	% 10 MEA
<i>Penicillium spp.2</i>	5784	% 10 MEA
<i>Penicillium spp. 3</i>	5785	% 10 MEA
<i>Penicillium spp. 4</i>	5797	% 10 MEA
<i>Penicillium spp. 5</i>	5809	% 10 MEA
<i>Penicillium spp. 6</i>	5812	% 10 MEA
<i>Penicillium spp. 7</i>	5813	% 10 MEA
<i>Penicillium spp. 8</i>	5709	MY1012
<i>Penicillium spp. 9</i>	5710	% 17 MEA
<i>Penicillium spp. 10</i>	t40	MY1012
<i>Penicillium spp. 11</i>	t57	MY1012
<i>Scopulariopsis spp.</i>	5808	% 10 MEA
<i>Stemphylium spp. 1</i>	5782	% 10 MEA

Çizelge 4.1. Devamı

İzolat	İzolat Kodu	Besiyeri
<i>Stemphyllum spp. 2</i>	t52	MY1012
<i>Stemphyllum spp. 3</i>	5795	% 10 MEA
<i>Ulocladium spp.1</i>	5791	% 10 MEA
<i>Ulocladium spp.2</i>	5804	% 10 MEA
<i>Ulocladium spp.3</i>	5807	% 10 MEA

Fungus izolasyon çalışmaları sonucunda 9 cinse ait toplam 51 izolat elde edilmiştir. Bu izolatlar klasik yöntemle genus düzeyinde “Illustrated Genera of Imperfect Fungi”den yararlanılarak (Barnett and Hunter, 1999) tayin edilmişlerdir. İzolatlardan 8 tanesi *Alternaria* cinsine, 6 tanesi *Aspergillus* cinsine, 15 tanesi *Cladosporium* cinsine, 1 tanesi *Emericella* cinsine, 3 tanesi *Eurotium* cinsine, 11 tanesi *Penicillium* cinsine, 1 tanesi *Scopulariopsis* cinsine 3 tanesi *Stemphyllum* cinsine, 3 tanesi *Ulocladium* cinsine ait olduğu belirlenmiştir. İzolatlar ADH enzim aktivitesi tarama çalışmasında kullanılmak üzere depolanmış, kullanılmadan önce MEA besiyerinde aktif hale getirilmiştir (Çizelge 4.1).

4.2 ADH Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

ADH enzim aktivitesi tarama çalışmasında kullanılmak üzere depolanmış fungus izolasyon çalışmaları sonucunda elde edilen izolatlar, kullanılmadan önce MEA besiyerinde aktif hale getirilmiştir. Aktif hale gelebilen 38 fungus için ADH enzim aktivitesi taraması yapılmıştır. En yüksek aktiviteye sahip olan izolat *Cladosporium* cinsine aittir. En düşük aktivite *Ulocladium* cinsi üyesinde bulunmuştur. İzolatların toplam enzim spesifik aktivite ortalaması alındığında $3,14 \mu\text{oldk}^{-1}\text{mg}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Genus düzeyinde gruplandırma yapılarak grupların ortalaması belirlenmiştir. Buna göre ortalama enzim aktiviteleri, *Alternaria* için $3,15 \mu\text{oldk}^{-1}$

$^1\text{mg}^{-1}$, *Aspergillus* için $3,68 \mu\text{moldk}^{-1}\text{mg}^{-1}$, *Cladosporium* için $3,49 \mu\text{moldk}^{-1}\text{mg}^{-1}$, *Eurotium* için $4,48 \mu\text{moldk}^{-1}$, *Penicillium* için $2,81 \mu\text{moldk}^{-1}\text{mg}^{-1}$, *Emericella* için $2,73 \mu\text{moldk}^{-1}\text{mg}^{-1}$, *Scopulariopsis* için $2,88 \mu\text{moldk}^{-1}\text{mg}^{-1}$, *Stemphylium* için $1,69 \mu\text{moldk}^{-1}\text{mg}^{-1}$, *Ulocladium* için $1,57 \mu\text{moldk}^{-1}\text{mg}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Tanımlama ve klonlama çalışmaları için enzim aktivitesi ortalamasının üzerinde olan türlerden sekiz tanesi seçilmiş ve bunlar aşağıdaki çizelgede koyu renkli olarak belirtilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Fungal İzolatlarda Belirlenen ADH Enzim Aktiviteleri.

Tür Adı	İzolat Kodu	Enzim aktivitesi (IU)	Spesifik Aktivite ($\mu\text{moldk}^{-1}\text{mg}^{-1}$)
<i>Alternaria sp.</i>	5780	117	3,44
<i>Alternaria sp.</i>	5783	101	1,94
<i>Alternaria sp.</i>	5796	118	2,68
<i>Alternaria sp.</i>	5816	106	4,52
<i>Aspergillus sp.</i>	5777	150	2,79
<i>Aspergillus sp.</i>	5800	225	5,12
<i>Aspergillus sp.</i>	t33	215	4,11
<i>Aspergillus sp.</i>	t36	110	2,06
<i>Aspergillus sp.</i>	t44	95	2,44
<i>Aspergillus sp.</i>	t55	237	5,53
<i>Cladosporium sp.</i>	5776	244	5,93
<i>Cladosporium sp.</i>	5793	74	1,89
<i>Cladosporium sp.</i>	5794	95	4,22
<i>Cladosporium sp.</i>	5798	100	4,15
<i>Cladosporium sp.</i>	5799	70	2,57
<i>Cladosporium sp.</i>	5802	111	2,42
<i>Cladosporium sp.</i>	5803	110	1,96
<i>Cladosporium sp.</i>	5806	91	4,21
<i>Cladosporium sp.</i>	5818	90	3,13
<i>Cladosporium sp.</i>	5821	106	4,39

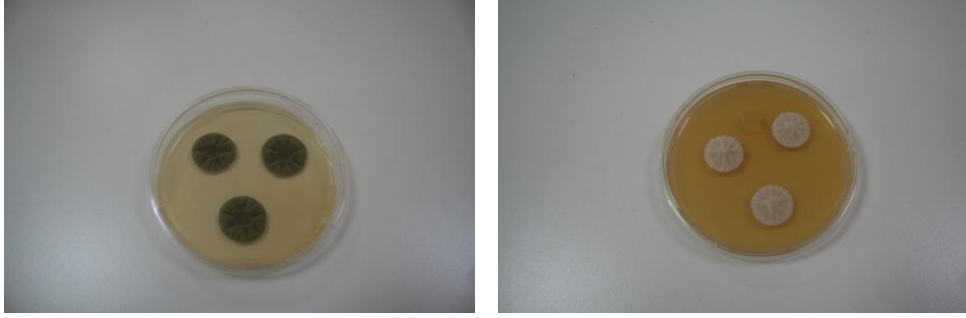
Çizelge 4.2. Devamı

Tür Adı	İzolat Kodu	Enzim aktivitesi (IU)	Spesifik Aktivite ($\mu\text{mol dk}^{-1}\text{mg}^{-1}$)
<i>Emericella sp.</i>	t22	72	2,73
<i>Eurotium sp.</i>	5778	144	5,74
<i>Eurotium sp.</i>	5810	124	3,21
<i>Penicillium sp.</i>	5709	79	2,74
<i>Penicillium sp.</i>	5710	91	2,58
<i>Penicillium sp.</i>	5779	137	3,20
<i>Penicillium sp.</i>	5785	194	3,06
<i>Penicillium sp.</i>	5797	237	3,90
<i>Penicillium sp.</i>	5809	68	2,10
<i>Penicillium sp.</i>	5812	127	2,23
<i>Penicillium sp.</i>	5813	90	3,50
<i>Penicillium sp.</i>	t40	101	2,02
<i>Penicillium sp.</i>	t57	84	1,84
<i>Scopulariopsis sp.</i>	5808	161	2,88
<i>Stemphylium sp.</i>	t52	93	1,72
<i>Stemphylium sp.</i>	5782	76	1,66
<i>Ulocladium sp.</i>	5791	79	1,44
<i>Ulocladium sp.</i>	5804	81	1,69

4.3. Klasik ve Moleküler Tanımlama

Seçili 8 tane fungus için klasik olarak cins düzeyinde tanımlamasının doğrulanması ve tür düzeyinde belirlenebilmesi için, ITS1-5,8SrDNA-ITS2 bölgeleri ITS4 ve ITS5 (White et al., 1990) evrensel primer çifti ile amplifiye edilmiştir. PCR ürün büyüklükleri yaklaşık 600 baz çifti olarak agaroz jelde yürütülerek belirlenmiştir. *Cladosporium* cinsine ait fungusların moleküler identifikasyonu için ITS1-5,8SrDNA-ITS2 gen bölgelerine ek olarak aktin gen bölgesi de çoğaltılmış ve yaklaşık 250 baz

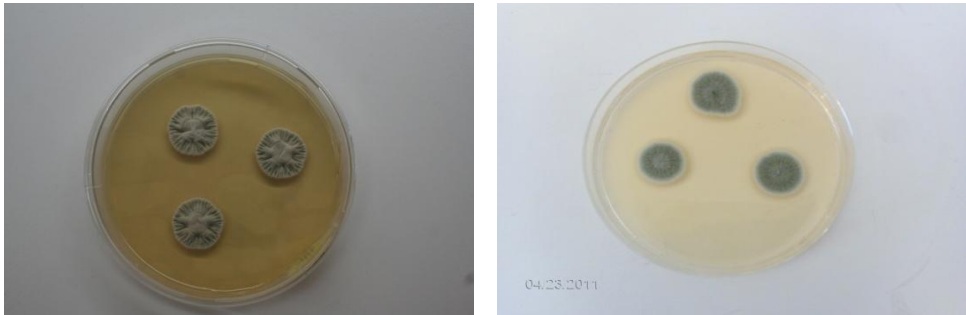
çiftlik PCR ürünleri agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir. Macrogen Company (Korea) tarafından yapılan DNA saflaştırılması ve otomatik DNA sekans analizi National Center for Biotechnology Information (NCBI) daki BLAST-n programı ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.2. 5776 kodlu izolatın MEA besiyerinde (solda) ve% 10 NaCl MEA besiyerinde (sağda) gelişimi



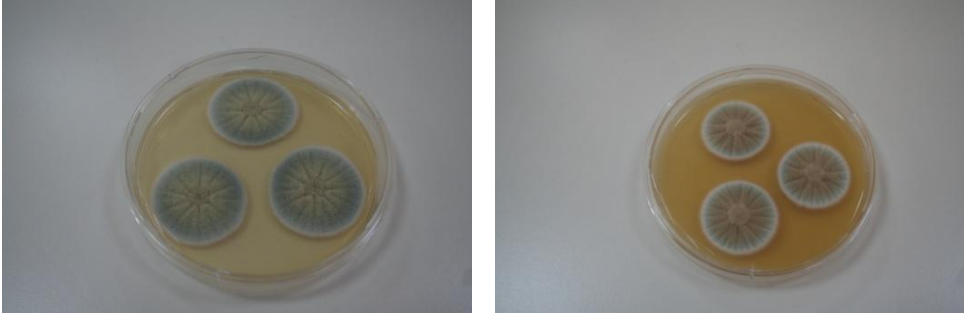
Şekil 4.3.5778 kodlu izolatın MEA besiyerinde (solda) ve% 10 NaCl MEA besiyerinde (sağda) gelişimi



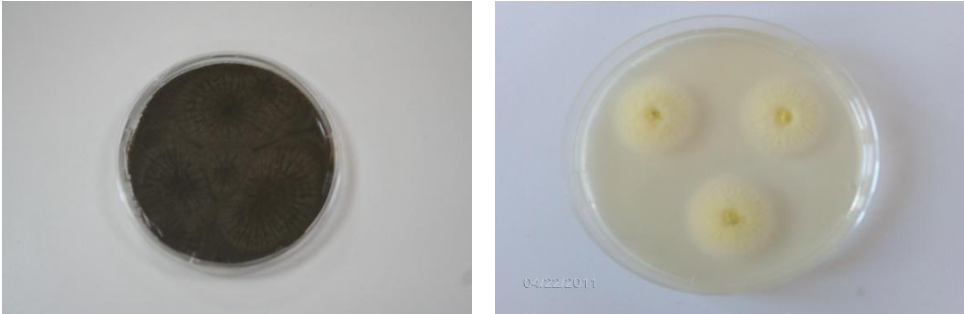
Şekil 4.4. 5821 kodlu izolatın MEA besiyerinde (solda) ve% 10 NaCl MEA besiyerinde (sağda) gelişimi



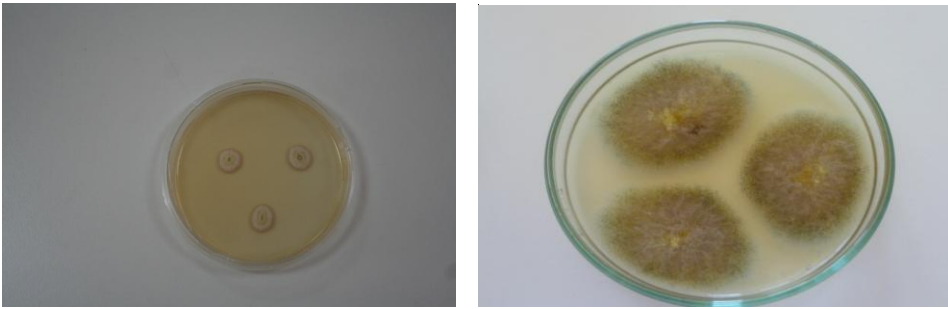
Şekil 4.5. 5794 kodlu izolatın MEA besiyerinde (solda) ve% 10 NaCl MEA besiyerinde (sağda) gelişimi



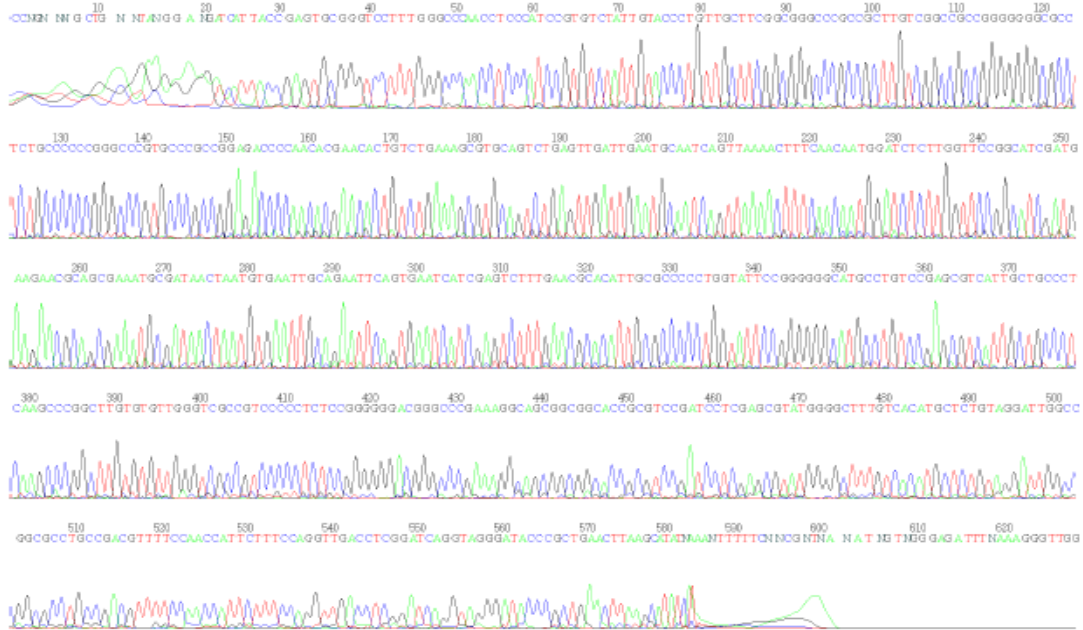
Şekil 4.6. 5797 kodlu izolatın MEA besiyerinde (solda) ve% 10 NaCl MEA besiyerinde (sağda) gelişimi



Şekil 4.7. 5800 kodlu izolatın MEA besiyerinde (solda) ve% 10 NaCl MEA besiyerinde (sağda) gelişimi



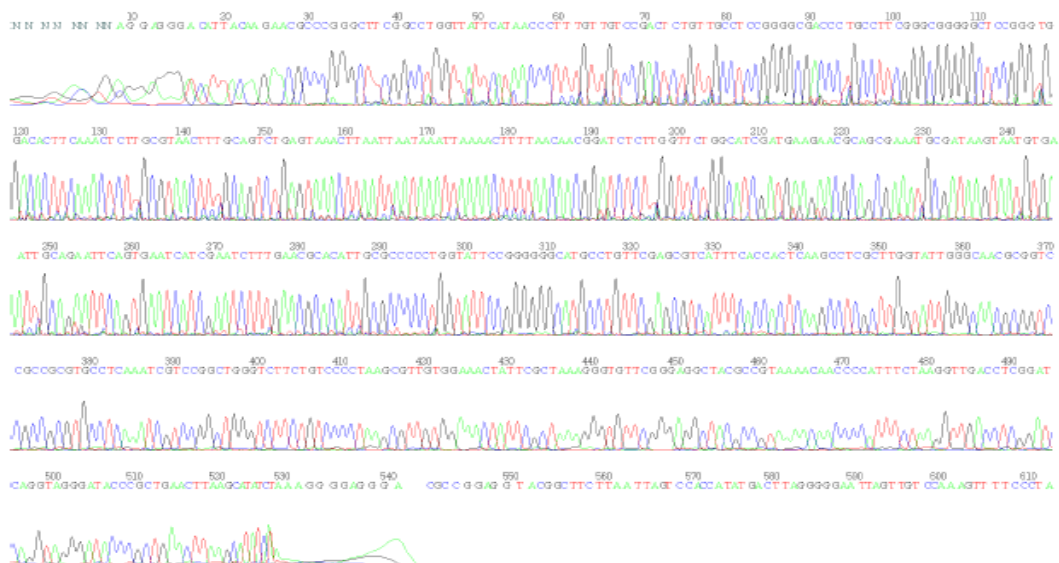
Şekil 4.8. 5810 kodlu izolatın MEA besiyerinde (solda) ve% 10 NaCl MEA besiyerinde (sağda) gelişimi



CCNGNNGCTGNNTANGGANGATCATTACCGAGTGCGGGTCCCTTTGGGCCCAACCTCCCATC
 CGTGTCTATTGTACCTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGCTTGTTCGGCCGCCGGGGGGGCGCC
 TCTGCCCCCGGGCCCGTGC CCGGCCGGAGACCCCAACACGAACACTGTCTGAAAGCGTGCA
 GTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAACCTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATC
 GATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGA
 GTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAATTG
 CTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCCCGTCCCCCTCTCCGGGGGGACGGGCCCGA
 AAGGCAGCGGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACATGCTCTGTAG
 GATTGGCCGGCGCCTGCCGACGTTTTCCAACCATTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTA
 GGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATNAAANTTTTTCNNGNTNANATNGTNGGGAGATTTN
 AAAGGGTTGGGNNCCATATAATTNCNGGTGGGGGGTTTTTATATC

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Eurotiomycetes sp. DC482 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcriber	1044	1044	85%	0.0	99%	GQ153049.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus niger strain AHBR19 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal trans	1040	1040	84%	0.0	100%	KF305758.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus niger strain AHBR17 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal trans	1040	1040	84%	0.0	100%	KF305756.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus niger strain AHBR3 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S riboso	1040	1163	84%	0.0	100%	KF305742.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus sp. AHBR2 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RN	1040	1040	84%	0.0	100%	KF305741.1
<input type="checkbox"/>	Fungal sp. W-3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1.	1040	1040	84%	0.0	100%	KC354375.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus niger strain KAML02 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal trans	1040	1040	84%	0.0	100%	KC119204.1

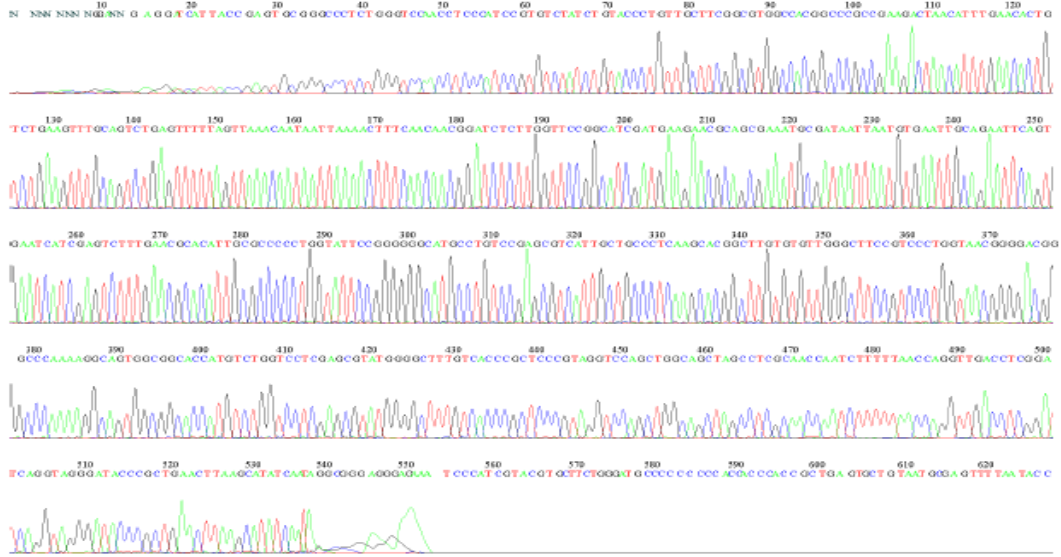
Şekil 4.9. *Aspergillus niger* 5800 izolatına ait dizi bilgileri ve NCBI GenBankasındaki en yakın benzerliği



NNNNNNNAGGAGGGACATTACAAGAACGCCCGGGCTTCGGCCTGGTTATTCATAACCCTT
 TGTTGTCCGACTCTGTTCCTCCGGGGCGACCCTGCCTTCGGGCGGGGGCTCCGGGTGGACA
 CTTCAAACCTTTGCGTAACTTTGCAGTCTGAGTAACTTAATTAATAAATTAATAAACTTTTAA
 AACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAA
 TTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGG
 GGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACGCGGTC
 CGCCGCGTGCCTCAAATCGTCCGGCTGGGTCTTCTGTCCCCTAAGCGTTGTGGAACTATTCCG
 CTAAGGGTGTTCGGGAGGCTACGCCGTAACAACCCCATTTCTAAGGTTGACCTCGGATC
 AGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCTAAGGGGAGGGACGCCGGAGGTACGGCT
 TCTTAATTAGTCCACCATATGACTTAGGGGGAATTAGTTGTCCAAAGTTTCCCTAAAATAGC
 CGACGTATCATCCCTTTGGCGATTTATTTGTTGATTACGTTTCTGTTTCTGTATCGGGCACT
 CCCGCGCCTGGTCCCCTC

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Cladosporium sphaerospermum genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, strain: J	989	989	56%	0.0	99%	AB572906.1
<input type="checkbox"/> Cladosporium sphaerospermum genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, strain: J	989	989	56%	0.0	99%	AB572901.1
<input type="checkbox"/> Cladosporium sphaerospermum genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, strain: J	983	983	56%	0.0	99%	AB572909.1
<input type="checkbox"/> Cladosporium sphaerospermum genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, strain: J	983	983	56%	0.0	99%	AB572908.1
<input type="checkbox"/> Cladosporium sphaerospermum genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, strain: J	983	983	56%	0.0	99%	AB572907.1
<input type="checkbox"/> Cladosporium sphaerospermum genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, strain: J	983	983	56%	0.0	99%	AB572903.1
<input type="checkbox"/> Cladosporium sphaerospermum genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, strain: J	983	983	56%	0.0	99%	AB572897.1
<input type="checkbox"/> Uncultured fungus clone L042884-122-064-C08 internal transcribed spacer 1, partial sequence:	983	983	56%	0.0	99%	GQ851893.1
<input type="checkbox"/> Cladosporium sphaerospermum isolate KH00280 18S ribosomal RNA gene, partial sequence:	983	983	56%	0.0	99%	GU017501.1
<input type="checkbox"/> Cladosporium sp. CBS 280.49 small subunit ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1	983	983	56%	0.0	99%	EU167574.1

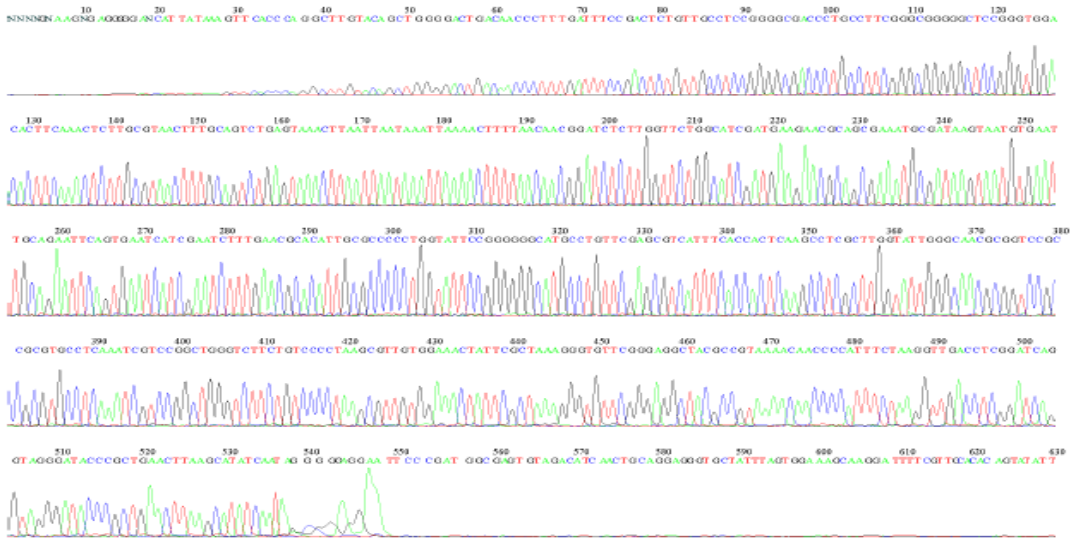
Şekil 4.10. *Cladosporium sphaerospermum* 5821 izolatına ait dizi bilgileri ve NCBI GenBankasındaki en yakın benzerliği



NNNNNNNNGGANNAGGATCATTACCGAGTGC GGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCATCCGT
 GTCTATCTGTACCCTGTTGCTTCGGCGTGGCCACGCCCCGCCGAAGACTAACATTTGAACAC
 TGTCTGAAGTTTGCAGTCTGAGTTTTTGTAAACAATAATTA AAACTTTCAACAACGGATCT
 CTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAATTAATGTGAATTGCAGAATT
 CAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTG
 TCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCTTCCGTCCCTGGTAACGG
 GGACGGGGCCAAAAGGCAGTGGCGGCACCATGTCTGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTC
 ACCCGCTCCCCTAGGTCCAGCTGGCAGCTAGCCTCGCAACCAATCTTTTTAACCAGGTTGAC
 CTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAGGCGGGAGGGAGAAATC
 CCATCGTACGTGCTTCTGGGATGCCCCCCCCACCACCCACCGCTGAGTGCTGTAATGCGAG
 TTTTAATACCAGGCNTCAGGGCGGGGGGGCAATCCCTTCTGCTCGTTGCGGTTCCGGCACA
 AGCGTGTCTATATCTTTTCCGCTTTTCAACAACACCCCCATGACATAGGGTTCTAACTCTTTT
 TTTGACCCCTCTTGTAAACGCCCTACTATCTCTCCCTCTATCTCTCCCGCACCATAACAA
 ATCTCATCCAGTCTCCTCTCACTTATAGACCCG

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Aspergillus proliferans strain ML280 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal tr	976	976	63%	0.0	99%	KC692212.1
<input type="checkbox"/>	Uncultured soil fungus clone BL21 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal tra	974	974	63%	0.0	99%	JQ666340.1
<input type="checkbox"/>	Eurotium sp. CCF 4098 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rR	974	974	63%	0.0	99%	FR848828.2
<input type="checkbox"/>	Eurotium niveoglaucum genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene,	974	974	63%	0.0	99%	HE578069.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus proliferans 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRN	974	974	63%	0.0	99%	FR851850.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus proliferans 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRN	974	974	63%	0.0	99%	FR848827.1
<input type="checkbox"/>	Eurotium repens 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gen	974	974	63%	0.0	99%	FR839678.1
<input type="checkbox"/>	Uncultured fungus clone L042886-122-066-A09 internal transcribed spacer 1, partial seque	974	974	63%	0.0	99%	GU054226.1
<input type="checkbox"/>	Uncultured fungus clone L042885-122-065-H02 internal transcribed spacer 1, partial seque	974	974	63%	0.0	99%	GU054218.1
<input type="checkbox"/>	Eurotium herbariorum strain ATCC 66470 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: inte	974	974	63%	0.0	99%	GU319986.1

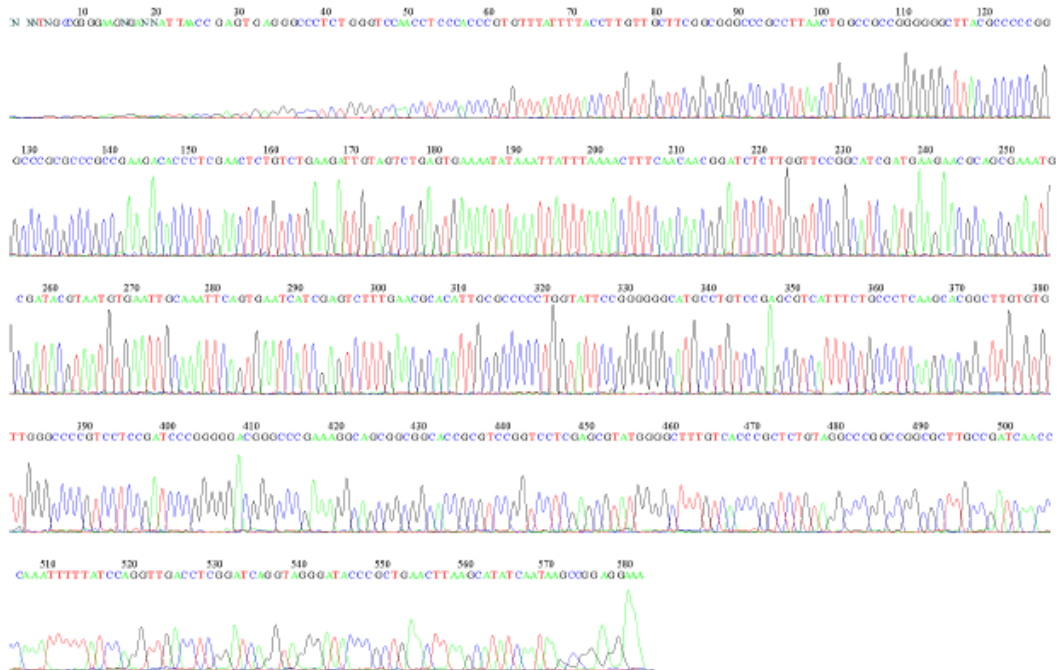
Şekil 4.11. *Eurotium niveoglaucum* 5778 izolatına ait dizi bilgileri ve NCBI GenBankasındaki en yakın benzerliği



NNNNGNAAGNGAGGGGGANCATTATAAAGTTACCCAGGCTTGTACAGCTGGGGACTGACA
 ACCCTTTGATTTCCGACTCTGTTGCTCCGGGCGACCTGCCTTCGGGCGGGGGCTCCGGGT
 GGACACTTCAAACCTTTGCGTAACTTTGCAGTCTGAGTAAACTTAATTAATAAATTA AAACT
 TTTAAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
 GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTC
 CGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTACCACTCAAGCCTCGTTGGTATTGGGCAACG
 CGGTCCGCCGCGTGCCTCAAATCGTCCGGCTGGGTCTTCTGTCCCCTAAGCGTTGTGGAAAC
 TATTCGCTAAAGGGTGTTCGGGAGGCTACGCCGTA AAAACAACCCCATTTCTAAGGTTGACCT
 CGGATCAGGTAGGGATAACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAGGGGGAGGAATTTCCCGATG
 GCGAGTGTAGACATCAACTGCAGGAGGGTGCTATTTAGTGGAAAGCAAGGATTTTCGTTGCA
 CACAGTATATTCAGGATTACCTGATCGGGCTAAAAGAAAAATGGGTAGGTCAAGCCGAAGC
 TCAGACGCTCGTCGTGATTTGGATCGTCTTTGGTGGTCGCCAACTATAAAGTGAGGATTCGC
 CTGACAAAAGACCCCTCGTATTTGGAATGATACGTTACGTTCAAAGTTTTTTCGTGTGTGA
 ATGATCTTTCACAGGTCATTACGGAAGTCTAGTTTTCTACTCGCAAAAAACAACGATAAT
 TCTTCCCCCGGGGGGGAGAGCCGCCCCCGGTATTACCCGCGCCCCACCACGCTCCCC
 CCTAACAT

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Uncultured fungus clone L046937-122-075-B06-unis 18S ribosomal RNA gene, partial seq	965	965	57%	0.0	99%	JF289132.1
<input type="checkbox"/>	Uncultured fungus clone L046937-122-075-B11-unis 18S ribosomal RNA gene, partial seq	965	965	57%	0.0	99%	JF289131.1
<input type="checkbox"/>	Uncultured fungus clone L046937-122-075-C11-unis 18S ribosomal RNA gene, partial seq	965	965	57%	0.0	99%	JF289130.1
<input type="checkbox"/>	Uncultured fungus clone L046937-122-075-D02-unis 18S ribosomal RNA gene, partial seq	965	965	57%	0.0	99%	JF289129.1
<input type="checkbox"/>	Uncultured fungus clone L046937-122-075-C08-unis 18S ribosomal RNA gene, partial seq	965	965	57%	0.0	99%	JF289128.1
<input type="checkbox"/>	Uncultured fungus clone L046937-122-075-G09-unis 18S ribosomal RNA gene, partial seq	963	963	56%	0.0	99%	JF289139.1
<input type="checkbox"/>	Uncultured fungus clone L046937-122-075-G08-unis 18S ribosomal RNA gene, partial seq	963	963	56%	0.0	99%	JF289138.1
<input type="checkbox"/>	Cladosporium cladosporioides strain F18 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; inter	963	963	56%	0.0	99%	HQ380770.1
<input type="checkbox"/>	Uncultured Cladosporium clone U3/L1-B10/E9 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	957	957	55%	0.0	99%	KC776197.1
<input type="checkbox"/>	Uncultured fungus clone L046938-122-076-A11-unis 18S ribosomal RNA gene, partial seq	957	957	56%	0.0	99%	JF289134.1

Şekil 4.12. *Cladosporium cladosporides* (5794) izolatına ait dizi bilgileri ve NCBI GenBankasındaki en yakın benzerliği



NNNTNGCCGGGGAAGNGANNATTAACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCG
TGTTTATTTTACCTTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACTGGCCGCCGGGGGCTTACGCC
CCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGTAGTCTGAGTGAAA
ATATAAATTATTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCA
GCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACA
TTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCTGCCCTCAAGCAG
GCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCTCCGATCCCGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGCA
CCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTT
GCCGATCAACCAAATTTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAACCGCTGAAC
TAAGCATATCAATAAGCCGGAGGAAA

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Penicillium sp. 2557 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer	1011	1011	95%	0.0	99%	FJ008995.1
<input type="checkbox"/> Uncultured Penicillium clone CEpbese390 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, intern	1005	1005	95%	0.0	99%	KC143745.1
<input type="checkbox"/> Uncultured fungus clone L042885-122-065-B01 internal transcribed spacer 1, partial sequenc	1005	1005	95%	0.0	99%	GQ999347.1
<input type="checkbox"/> Penicillium chrysogenum strain ACBF 003-2 internal transcribed spacer 1, partial sequence, t	1005	1005	95%	0.0	99%	GQ241341.1
<input type="checkbox"/> Penicillium dipodomyicola strain ACBF 002-3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, int	1005	1005	95%	0.0	99%	GQ161752.1
<input type="checkbox"/> Penicillium sp. SC10 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA ge	1005	1005	95%	0.0	99%	FJ847577.1
<input type="checkbox"/> Penicillium chrysogenum isolate NRRL 35688 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal f	1005	1005	95%	0.0	99%	EF200101.1
<input type="checkbox"/> Penicillium vinaceum isolate 533 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosom	1005	1005	95%	0.0	99%	DQ681340.1
<input type="checkbox"/> Penicillium citrinum isolate 608 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosom	1005	1005	95%	0.0	99%	DQ681331.1
<input type="checkbox"/> Penicillium chrysogenum strain EPA 467 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal	1005	1005	95%	0.0	99%	AY373903.1

Şekil 4.13. *Penicillium chrysogenum* 5797 izolatına ait dizi bilgileri ve NCBI GenBankasındaki en yakın benzerliği



GNCCATNCCCGTGTCTATCTGNACCCTGTTGCTTCGGCGTGGCCACGGCCCGCCGGAGACT
AACATTTGAACGCTGTCTGAAGTTTGCAGTCTGAGTTTTAGTTAAACAATCGTTAAAACTTT
CAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAATTAATGT
GAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCG
GGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCTTCCG
TCCCTGGCAACGGGGACGGGGCCAAAAGGCAGTGGCGGCACCATGTCTGGTCCTCGAGCGT
ATGGGGCTTTGTACCCGCTCCCGTAGGTCCAGCTGGCAGCTAGCCTCGCAACCAATCTTTT
AACCAGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAGCCCG
GAGGGAAAANNTCCCCACGGGAAATACNTCNTATATCCTATCTCCCTCTACACATCCAACG
TC

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Eurotium amstelodami strain SGE21 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal t	898	898	87%	0.0	99%	JX232268.1
<input type="checkbox"/> Eurotium amstelodami strain CASMB-SEF 9 internal transcribed spacer 1, partial sequenc	898	898	87%	0.0	99%	JQ867376.1
<input type="checkbox"/> Eurotium cristatum strain EN220 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal trans	893	893	87%	0.0	99%	JQ743649.1
<input type="checkbox"/> Eurotium rubrum strain 4-12 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcrib	893	893	87%	0.0	99%	HQ316568.1
<input type="checkbox"/> Eurotium amstelodami strain 8-4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal trans	893	893	87%	0.0	99%	HM992527.1
<input type="checkbox"/> Eurotium amstelodami genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, I'	889	889	88%	0.0	99%	HE974461.1
<input type="checkbox"/> Eurotium amstelodami genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, I'	889	889	88%	0.0	99%	HE974460.1
<input type="checkbox"/> Eurotium intermedium genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, IT	889	889	88%	0.0	99%	HE974459.1
<input type="checkbox"/> Uncultured fungus clone L046937-122-075-B02-unis 18S ribosomal RNA gene, partial seq	889	889	88%	0.0	99%	JF289076.1
<input type="checkbox"/> Eurotium amstelodami 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRN	889	889	88%	0.0	99%	FR848825.1

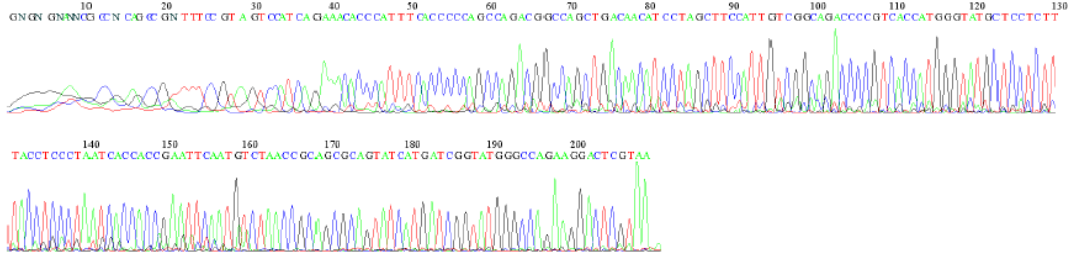
Şekil 4.14. *Eurotium amstelodami*5810 izolatına ait dizi bilgileri ve NCBI GenBankasındaki en yakın benzerliği



CNNGNGCGCCCAACCTCCCACCCGTGACTACCTAACACTGTTGCTTCGGCGGGGAGCCCTCT
 CGGGGGCGAGCCGCCGGGGACTACTGAACTTCATGCCTGAGAGTGATGCAGTCTGAGTCTG
 AATATAAAATCAGTCAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACG
 CAGCGAACTGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGC
 ACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCATCAAG
 CCCGGCTTGTGTGTGGGTGCTGTCGTCCTCCCCCCCCGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGGCGGC
 ACCGTGTCGGTCCCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCCGCTCGATTTAGGGCCGGCCGGGC
 GCCAGCCGACGTCCAACCATTTTTCTTCAGTTTGACCTCGGATCAGTTAGGGATAACCCGCTG
 AACTTAAGCNACGAANGCGGGGGGGCNGGNCTTNACTTGGGGGCATACCCCTGACAGG
 TTAGCGGTGGGGGACGTGGGATCAAAGCAGGACAGACGGGGCCGCCATTN

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Aspergillus versicolor strain IHB F 1902 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; intern	920	920	82%	0.0	100%	KF381083.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus sp. 2-13s internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA	920	920	82%	0.0	100%	KC790538.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus sp. 6-20s internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA	920	920	82%	0.0	100%	KC790511.1
<input type="checkbox"/> Purpureocillium lilacinum strain 6-20p internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S	920	920	82%	0.0	100%	KC790510.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus sp. 6-19p internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA	920	920	82%	0.0	100%	KC790507.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus sp. 6-17c internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA	920	920	82%	0.0	100%	KC790503.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus sp. 6-13c internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA	920	920	82%	0.0	100%	KC790493.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus sp. 6-12c internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA	920	920	82%	0.0	100%	KC790489.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus sp. 5-11s internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA	920	920	82%	0.0	100%	KC790483.1
<input type="checkbox"/> Fungal sp. AM2013 strain 28_Rp internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribo:	920	920	82%	0.0	100%	KC506195.1

Şekil 4.15. *Aspergillus versicolor* T55 izolatına ait dizi bilgileri ve NCBI GenBankasındaki en yakın benzerliği



NNCGCCNCAGCCGNTTTCGGTAGTCCATCAGAAACACCCATTTACACCCCAAGCCAGACGGCC
 AGCTGACAACATCCTAGCTTCCATTGTTCGGCAGACCCCGTCACCATGGGTATGCTCCTCTTTA
 CCTCCCTAATCACCACCGAATTCATGTCTAACCGCAGCGCAGTATCATGATCGGTATGGGC
 CAGAAGGACTCGTAA

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Davidiella tassiana isolate #9-07 actin gene, partial sequence	342	342	100%	5e-91	99%	gij189303952 EU730606.1
<input type="checkbox"/> Cladosporium macrocarpum culture-collection CBS:223.31 actin (act) gene, partial cds >qii15727	340	340	99%	2e-90	99%	gij157276915 EF679525.1
<input type="checkbox"/> Cladosporium macrocarpum culture-collection CBS:175.82 actin (act) gene, partial cds	340	340	99%	2e-90	99%	gij157276913 EF679524.1
<input type="checkbox"/> Cladosporium macrocarpum culture-collection CPC:12757 actin (act) gene, partial cds	335	335	99%	9e-89	99%	gij157276929 EF679532.1
<input type="checkbox"/> Cladosporium herbarum culture-collection CBS:111.82 actin (act) gene, partial cds	329	329	99%	4e-87	98%	gij157276885 EF679510.1
<input type="checkbox"/> Davidiella tassiana isolate #2-07 actin gene, partial sequence	326	326	100%	5e-86	98%	gij189303951 EU730605.1
<input type="checkbox"/> Cladosporium herbarum culture-collection CPC:11603 actin (act) gene, partial cds	324	324	99%	2e-85	98%	gij157276887 EF679514.1
<input type="checkbox"/> Cladosporium herbarum culture-collection CBS:300.49 actin (act) gene, partial cds	324	324	99%	2e-85	98%	gij157276887 EF679511.1
<input type="checkbox"/> Davidiella tassiana strain CPC:11600 actin (act) gene, partial cds >qii157276889 qbiEF679512.1	324	324	99%	2e-85	98%	gij82900690 DQ289867.1
<input type="checkbox"/> Cladosporium herbarum culture-collection CPC:12178 actin (act) gene, partial cds >qii15727690	313	313	99%	4e-82	97%	gij157276899 EF679517.1

Şekil 4.16. *Cladosporium macrocarpum* 5776 izolatına ait dizi bilgileri ve NCBI GenBankasındaki en yakın benzerliği

4. 4. Klonlama Çalışmaları

4.4.1. RNA'ların spektrofotometrik analizleri

Farklı yöntemler ile elde edilen toplam RNA miktarlarını belirlemek için Thermo marka nanodrop cihazı kullanılmıştır. Çalkalamalı etüvde 27°C'de, 3-5 gün süre ile çoğaltması beklenen izolatlardan elde edilen toplam RNA miktarı nanodrop ölçümlerine göre çizelgede verilmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Seçili izolatlara ait RNA miktarları

İzolat	RNA miktarı ng/ µl	İzolasyon Yöntemi
<i>Aspergillus versicolor</i> (T55)	142,2	Hot Fenol Ekst (Muhktar)
<i>Aspergillus niger</i> (5800)	465,4	Kit ekstraksiyonu
<i>Cladosporium macrocarpum</i> (5776)	118,6	Hot Fenol Ekstraksiyonu
<i>Cladosporium sphaerospermum</i> (5821)	331,9	Hot Fenol Ekst (Muhktar)
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (5794)	245,4	Kit ekstraksiyonu
<i>Eurotium amstelodami</i> (5810)	255,1	Kit ekstraksiyonu
<i>Eurotium niveoglacum</i> (5778)	202,9	Kit ekstraksiyonu
<i>Penicillium chrysogenum</i> (5797)	607,9	Kit ekstraksiyonu

4.4.2 ADH geninin cDNA' sının üretilmesi

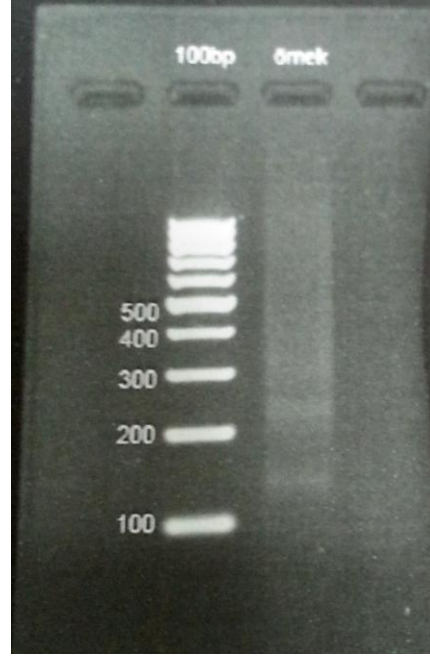
Sekiz izolattan elde edilen total RNA'lardan 5 µl kullanılarak Geri Transkripsiyon reaksiyonu ile cDNA oluşturulmuştur. RNA izolasyonu yapılan tüm izolatlardan elde edilen cDNA ürününden hedef gen bölgesini çoğaltmak amaçlı dejenere AdhF ve AdhR primer çifti ile Adh1bF ve Adh1R primer çiftleri ile gerçek zamanlı PCR reaksiyonu kurulmuştur. Reaksiyon koşulları aşağıdaki gibi düzenlenmiştir.

Ön ısıtma	95°C	5 dakika
	95°C	30 saniye
25 döngü	55°C	30 saniye
	72°C	45 saniye
	72°C	7 dakika
	4°C	Sonsuz

Gerçek zamanlı PCR reaksiyonu sonunda Tm analizine göre 8 izolattan sadece *Penicillium chrysogenum* (5797), *Aspergillus niger* (5800) ve *Eurotium amstelodami* (5810)'da ürün olduğu anlaşılmıştır.

4.4.3. *Eurotium amstelodami* (5810)'dan klonlama çalışmaları

Eurotium amstelodami (5810)'a ait total RNA'dan elde edilen cDNA'sından AdhF ve AdhR primer çifti ile gerçek zamanlı PCR reaksiyonu kurulmuştur. Tm analizi sonucu ürün varlığı anlaşılmıştır. Kontrol amaçlı gerçek zamanlı PCR ürünü, aynı primerler ile çoğaltılıp (rePCR) agaroz jelde yürütülmüştür. Jeldeki görüntüsü Şekil 4.17'de verilmiştir. Bantların, beklenen ürün büyüklüğünde olmadığı gözlenmiştir. 230bp ve 140 bp lik iki farklı bant elde edildiği için oluşan ürünler dizi analizine gönderilmemiştir.



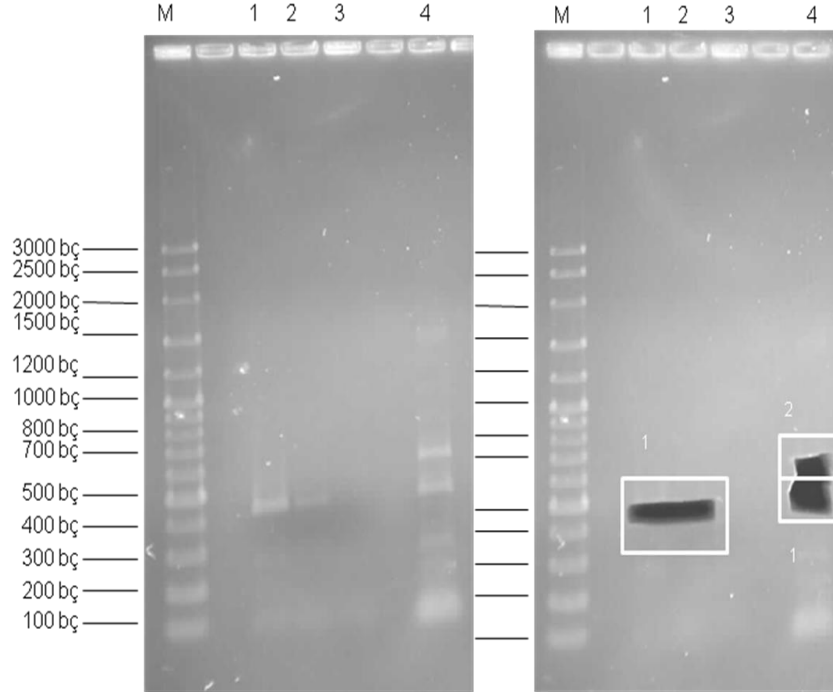
Şekil 4.17. 5810 nolu izolat cDNA sıندان elde edilen PCR ürünleri

4.4.4. *Penicillium chrysogenum* (5797)' den klonlama çalışmaları

cDNA'lardan verimli ürün alınamaması sonucu genomik DNA üzerinden hedeflenen gen bölgesini çoğaltmak yoluna gidilmiştir. Bu amaçla öncelikle 5797 nolu izolat seçilmiş ve gen bölgesi taraması AdhiF ve AdhiR çiftleri ile çalışılmıştır. Bu primer çifti için PCR reaksiyon döngü koşulları 37-40°C arasında gradient olarak aşağıdaki gibi düzenlenmiştir.

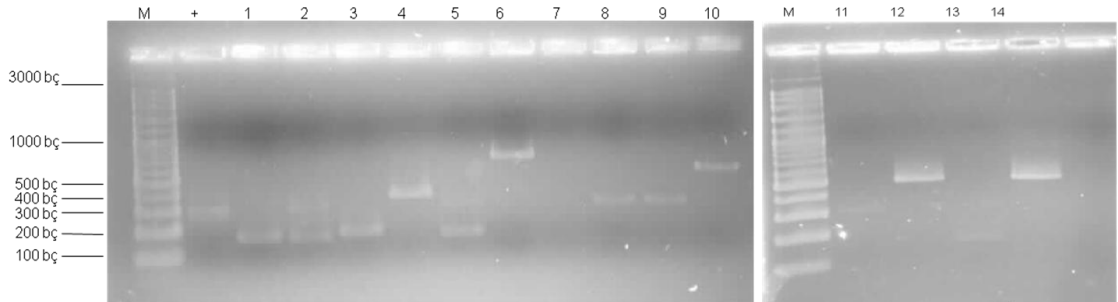
Ön ısıtma	95°C	5 dakika
25 döngü	95°C	30 saniye
	37-40°C	30 saniye
	72°C	45 saniye
	72°C	7 dakika
	4°C	Sonsuz

PCR ürünleri % 1'lik agaroz jelde koşturulduğunda, yaklaşık 500-700 baz çifti uzunluğunda bantlar görülmüştür. 3 nolu örneğin ise çalışmadığı görülmektedir (Şekil 4.19).



Şekil 4.18 *Penicillium chrysogenum* (5797) Gradient PCR ürünleri(soldaki resim), agaroz jelden bantların kesimi (sağdaki resim)

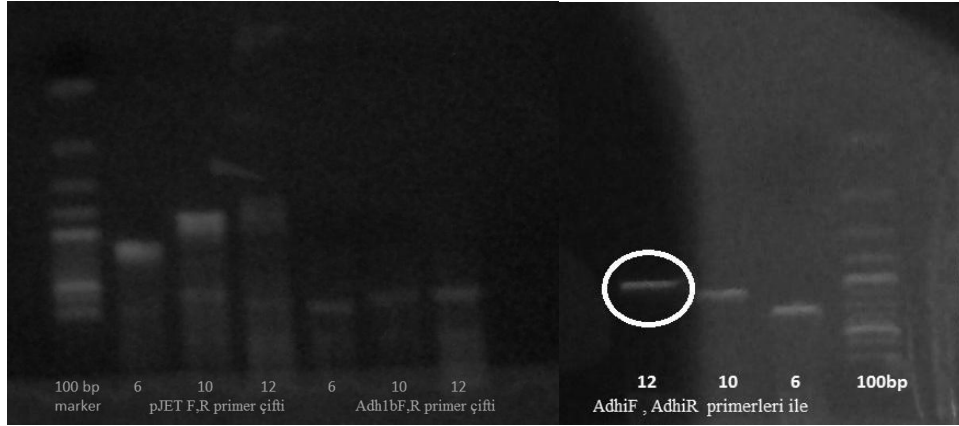
Agaroz jelden bantlar kesilip Fermentas GeneJET Gel Extraction Kit ile Jelden saflaştırılmıştır. 1 ve 2 nolu örnekler aynıdır ve birlikte kesilmiştir. 4 nolu örneğe ait alttaki kesilen bandın da 1 ve 2 nolu örnekle muhtemelen aynı büyüklükte olduğu düşünüldüğünden o bant da kesilip 1 ve 2 nolu bantlarla aynı tüp içerisinde saflaştırılmıştır. Ancak 4 nolu örneğin üstteki kesilen bandı 2 olarak numaralandırılmıştır ve farklı bir tüpe alınarak saflaştırılmıştır (şekil 4.20).



Şekil 4.19. Jelden saflaştırılan bantlarla yapılan koloni PCR sonucu elde edilen bantlar

Jelden saflaştırılan 1 ve 2 nolu bantlar pJET klonlama vektörüne ligasyon yapılmış, ardından *E. coli* MC1022 suşuna transfer edilmiştir. Transfer sonrası petride

gelişen 14 adet koloni seçilerek pJET1.2 F ve pJET1.2 F R primer çifti ile PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.20’de jelden izole edilen 1 ve 2 nolu banda ait koloni PCR ürünü olarak plazmid izolasyonuna gidilen koloniler 6, 10 ve 12 nolu kolonilerdir. Bu plazmidlerden insert bölgenin kontrolü 3 farklı plazmid çiftiyle yapılmıştır. Bunlardan birincisi vektöre bağlanma pJET1.2 F ve R primer çiftidir. İkincisi, gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan AdhiF, AdhiR primer çiftidir. Üçüncüsü ise, iç primer olarak dizayn edilen Adh1bF ve Adh1bR primer çiftleridir (Şekil 4.20). AdhiF, AdhiR ve pJET1.2 F, R ile kontrolde elde edilen ürünlerin büyüklüğü insert ile uyumludur. Ancak Adh1bF ve Adh1bR iç primerleri ile elde edilen ürün büyüklüğü beklenenin çok üzerindedir.



Şekil 4.20. Plazmid kontrolü

Plazmidlerin otomatik DNA dizi analizi SENTEGEN (Ankara) firmasına yaptırılmıştır. DNA dizi analizi sonuçları National Center for Biotechnology Information (NCBI) daki BLAST-n programı ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4.21)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Penicillium chrysogenum Wisconsin 54-1255 complete genome, contig Pc00c16	634	634	54%	3e-178	99%	AM920431.1
<input type="checkbox"/> Penicillium chrysogenum sulfate permease SutB (sutB) gene, complete cds	634	634	54%	3e-178	99%	AF163974.1

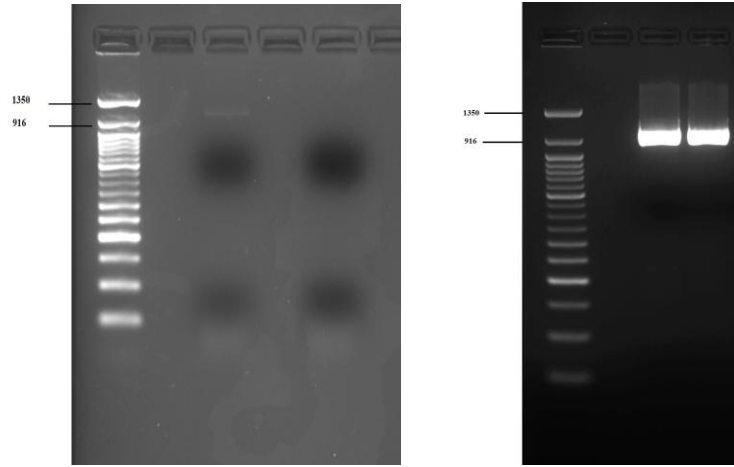
Şekil 4.21. *Penicillium chrysogenum* (5797)’dan klonlanan bölgenin NCBI Gen Bankasındaki en yakın benzerliği

4.4.5. *Aspergillus niger* (5800)' den Klonlama Çalışmaları

A. niger (5800) cDNA üzerinden klonlama çalışmaları

Total *Aspergillus niger* (5800) RNA'sından elde edilen cDNA'dan BYF ve BYR primerleri kullanılarak yaklaşık 1100 bp büyüklükte beklenen boyutlarda ürün elde edilmiştir. Ürün miktarını arttırmak ve primerlerin özgülüğünü kontrol amacıyla bant jelden saflaştırılmış ve aynı primerler ile tekrar PCR oluşturulmuştur. Bantlar aynı büyüklükte ve son derece yoğun elde edilmiştir (Şekil 4.22). PCR reaksiyon döngü koşulları aşağıdaki gibi düzenlenmiştir.

Ön ısıtma	95°C	5 dakika
	95°C	30 saniye
25 döngü	56°C	30 saniye
	72°C	60 saniye
	72°C	7 dakika
	4°C	Sonsuz



Şekil 4.22. *A. niger* 5800 cDNA'sından elde edilen PCR ürünleri

cDNA'dan ürünün beklenen büyüklükte ve saf olması sonucu klonlama çalışmalarına geçilmiştir. 1100 baz çiftlik ürünün pJET klonlama vektörüne ligasyonu yapılmış, ardından *E. coli* MC1022 suşuna transfer edilmiştir. Transfer sonrası petride gelişen 6 adet koloni seçilerek BYF ve BYR primerleri ile kontrol edilerek dizileme sürecine geçilmiştir. Otomatik DNA dizi analizi SENTEGEN (Ankara) firmasına yaptırılmıştır. DNA dizi analizi sonuçları National Center for Biotechnology Information (NCBI) daki BLAST-n programı ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4.23).

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Aspergillus niger CBS 513.88 qlutamine synthetase, mRNA	481	481	91%	4e-132	78%	XM_001389265.2
<input type="checkbox"/> Aspergillus niger CBS 513.88 qlutamine synthetase, mRNA	481	481	91%	4e-132	78%	XM_001389267.2
<input type="checkbox"/> Aspergillus niger qlutamine synthetase (qlhA) mRNA, partial cds	433	433	81%	1e-117	78%	AY319644.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus niger contig An01c0300, aenomic contig	329	329	60%	2e-86	79%	AM269977.1

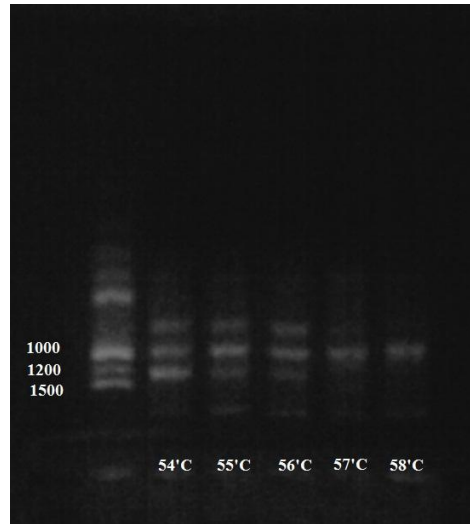
Şekil 4.23. *Aspergillus niger* (5800) cDNA'sından klonlanan bölgenin NCBI Gen Bankasındaki en yakın benzerliği

***A. niger* (5800) genomik DNA üzerinden klonlama çalışmaları**

Aspergillus niger (5800) genomik DNA'sından ilgili gen bölgesinin BYF ve BYR primerleri kullanılarak elde edilmesi hedeflenmiştir. PCR reaksiyon döngü koşulları 54-58°C arasında gradiyent olarak aşağıdaki gibi düzenlenmiştir

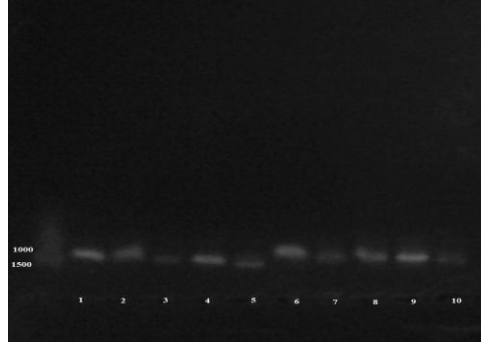
Ön ısıtma	95°C	5 dakika
	95°C	30 saniye
25 döngü	54-58°C	30 saniye
	72°C	60 saniye
	72°C	7 dakika
	4°C	Sonsuz

Genomik DNA üzerinde primerlerin birçok bölgeye bağlanmış olması sebebiyle farklı büyüklükte bantlar elde edilmiştir. Şekil 4.24 de verildiği gibi beklenen ürün büyüklüğüne yakın olan her bir bant tek tek jelden saflaştırılmıştır.



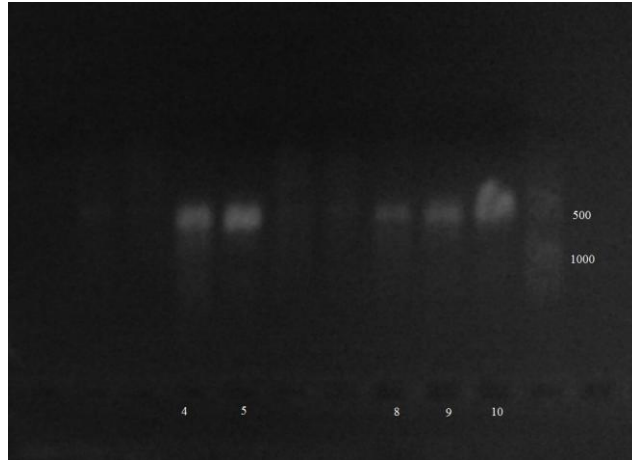
Şekil 4.24. *A. niger* 5800 genomik DNA'sından elde edilen PCR ürünleri

Gradyent PCR sonucu jelden her bir sıcaklıktan ikişer adet olmak üzere toplam 10 bant saflaştırılmıştır. Primer özgüllüğünün kontrolü açısından saflaştırılan bantlar kalıp olarak kullanılıp tekrar BYF ve BYR primerleri ile çoğaltılmıştır (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. Genomik DNA'dan elde edilen bantların saflaştırılması

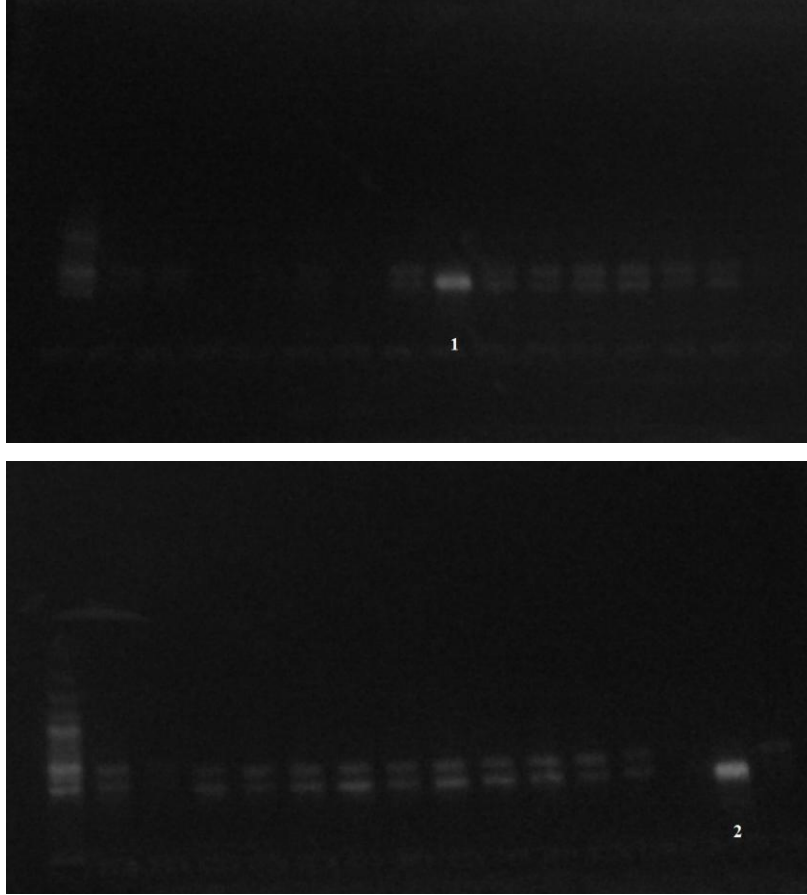
Yaklaşık olarak 1000bp ile 1200 bp aralığında bulunan 10 adet PCR ürününden hangilerinin ilgili gen bölgesini içerdiğinin kontrolü, iç primer olarak tasarlanan Adh1bF ve Adh1bR primer çiftleri ile sağlanmıştır (Şekil 4.26). Agaroz jel görüntüsüne göre 4, 5, 8, 9 ve 10 nolu jel ürünüde iç primerler oturmuştur. Klonlama çalışmaları için 4, 5 ve 9 nolu PCR ürünleri seçilmiştir.



Şekil 4.26. Gen bölgesinin iç primer ile kontrolü

Jelden saflaştırılan 4, 5 ve 9 nolu bantlar pJET klonlama vektörüne ligasyon yapılmış, ardından QIAGEN *E. coli* EZ suşuna transfer edilmiştir. Transfer sonrası petride gelişen toplam 30 adet koloni seçilerek ligasyon kontrolü pJET1.2 F ve pJET1.2 F R primer çifti ile gerçekleştirilmiştir. Seçilen kolonilerden 20 tanesinde insert varlığı tespit edilmiş ancak bunların sadece 2 tanesinin çok temiz bantlar olduğu anlaşılmıştır (Şekil 4.27). İnsertlerin BYF ve BYR primerleri ile kontrolü yapıldıktan sonra plasmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Örneklerin dizi analizi SENTEGEN (Ankara) firması

tarafından yapılmıştır. DNA dizi analizi sonuçları National Center for Biotechnology Information (NCBI) daki BLAST-n programı ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4.28).



Şekil 4.27. Koloni PCR ile insert kontrolü

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Aspergillus niger CBS 513.88 protein kinase_mRNA	534	1836	60%	8e-148	99%	XM_001393810.2
<input type="checkbox"/> Aspergillus niger contig An09c0170_genomic contig	1624	2775	94%	0.0	98%	AM270206.1

Şekil 4.28. *Aspergillus niger* 5800'den klonlanan bölgenin NCBI Gen Bankasındaki en yakın benzerliği

4.5. Enzim Saflaştırma Çalışmaları

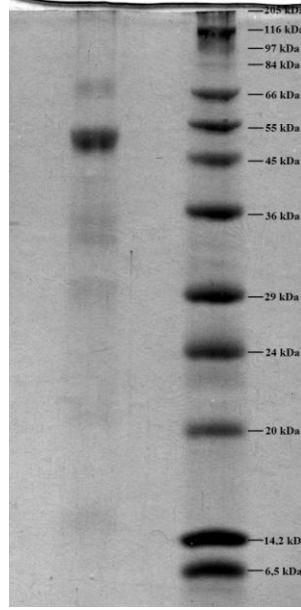
Klonlama organizması olarak seçilen *Aspergillus niger* (5800) hücre özütü amonyum sülfat çöktürme sonrası diyaliz işlemine alınmıştır. Ham özüt ve diyaliz bileşiği ADH enzim aktivitesi açısından incelenmiştir (Çizelge 4.4). Diyalizat, DEAE-Sefaroz matriksi ile doldurularak hazırlanan kolondan 500 µl/dakika olacak şekilde geçirilmiştir. Alınan 120 adet fraksiyonun 280 nm'de spektrofotometredeki absorbans değerleri incelenmiş, 92, 103, 110 ve 111 nolu fraksiyonlarda absorbans elde edilmiştir. Ancak elde edilen fraksiyonların ADH enzimi içeren kısımlarının belirlenmesi için toplanan fraksiyonlarda ile enzim aktivitesi gözlenmemiştir.

Çizelge 4.4. Ham özüt ve diyaliz bileşiği ADH enzim aktivitesi

	Absorbans 340nm	Protein mg/ml	Aktivite U/ml	Spesifik aktivite U/mg
Ham özüt	0,103	32,93	83	2,51
Dializ Sonrası	1,246	20,2	1002	49,8

4.5.1. Hücre ekstraktı dializatın SDS- PAGE profilinin belirlenmesi

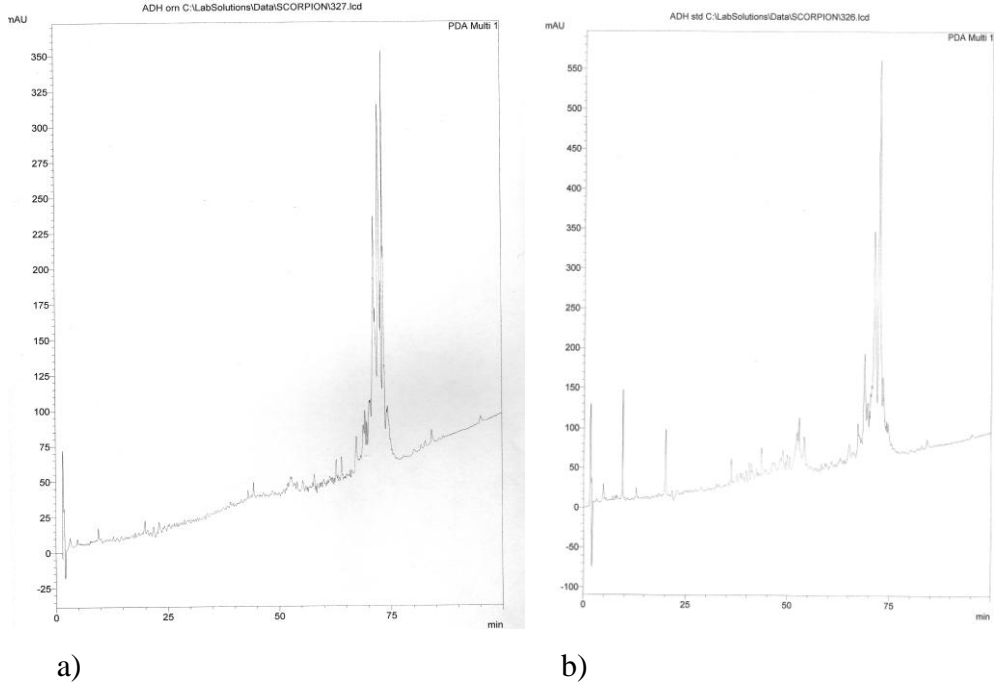
5800 kodlu *Aspergillus niger* den elde edilen dializattan 5 µl SDS-PAGE jeline yüklenmesi sonucu, Şekil 4.27 ile verilen jel görüntüsü elde edilmiştir. Protein marker ile birlikte yürütülen örnekte 45-55 kDa arasında belirgin bir bant gözlenmiştir. Ayrıca 66 kDa büyüklüğünde farklı bir bant, 45kDa ve 14,2 kDa arasında olmak üzere yaklaşık 6 farklı bant gözlenmiştir (Şekil 4.29).



Şekil 4.29. *A. niger*'den elde edilen ekstarktın diyaliz sonrası SDS-PAGE jel görüntüsü

4.5.2. Hücre ekstraktı dializatın HPLC profilinin belirlenmesi

Çalışma için 20 µl *Aspergillus niger* hücre ekstraktı dializatı tampon A içerisinde çözülerek HPLC'ye yüklenmiş ve ters faz sistemi kullanılarak ayrımlar gerçekleştirilmiştir. Çalışmada 100 dakika süresince, 0-70%B tampon çözeltisi olacak şekilde gradiyent faz uygulanmıştır. Karşılaştırma yapabilmek için *Saccharomyces cerevisiae*'dan elde edilen (SİGMA) ticari ADH enziminden 10 µg aynı koşullarda HPLC'ye yüklenmiştir. Hücre dializatına ait kromatogram ve ticari ADH enzimine ait olan kromatogram Şekil.4.30 ile verilmiştir.



Şekil 4.30. a) Hücre diyaliz çözeltisine ait kromatogram b) ticari ADH enzimine ait olan kromatogram

BÖLÜM 5

TARTIŞMA VE SONUÇ

Alkol dehidrogenazlar biyoteknolojik açıdan endüstride geniş kullanım alanı olan enzim grubudur. Keşfinin 1937'lere dayanması, üç boyutlu yapısı tanımlanan ilk enzim olması ve yaşamın tüm domainlerinde bulunması bu enzim üzerine yapılan çalışmaları önemli kılmaktadır. Günümüzde alkol dehidrogenazlar endüstriyel ölçekte alkol üretiminin artırımı ya da alkol atışının sınırlandırılmasında, ilaç endüstrisinde kiral farmasötiklerin sentezinde kullanılmaktadır.

Endüstriyel bir enzimin değişen çevresel koşulları tolere etmesi önemlidir. Ekstremofilik mikroorganizmalar, en uç yaşam koşullarına adapte olabilmeleri nedeniyle bu tip organizmalardan elde edilen enzimler daha uç koşullarda aktivite gösterebilirler. Çalışmamızda, hipersalin ortamlardan izole edilen halotolerant-halofilik fungusların iyi bir doğal kaynak olabileceği düşünülmüştür. Halofilik-halotolerant mikroorganizmalar tuzlu ortamlarda iş gören enzimleri, tuz stresine karşı kullandıkları mekanizmalar, bu stres koşullarında metabolik faaliyetlerini sağlayan proteinlerinin bulunuşu gibi bir takım özellikleri ile öne çıkmaktadırlar. Halofilik mikroorganizmalardan arke ve bakteriler üzerine yapılan yoğun çalışmalar yanında funguslar gibi halofilik-halotolerant mikroorganizmaların da izolasyonu ve biyoteknolojik açıdan araştırılması gerekmektedir.

Bu çalışma esas olarak Tuz Gölü'nden izole edilen halofilik-halotolerant fungusların izolasyonu ve elde edilen izolatların toplam alkol dehidrogenaz aktivitesi açısından taranması şeklinde iki kısımdan oluşmaktadır. Ayrıca bu çalışmada yüksek düzeyde enzim aktivitesine sahip izolatların endüstriyel potansiyelini ortaya çıkarmak üzere klonlama çalışmaları denenmiştir.

İzolasyon çalışmaları sonunda Tuz Gölünden alınan su örneklerinden 15 *Cladosporium*, 11 *Penicillium*, 8 *Alternaria*, 6 *Aspergillus*, 3 *Eurotium*, 3 *Stemphyllum*,

3 *Ulocladium*, 1 *Emericella*, 1 *Scopulariopsis* olmak üzere 9 farklı cinse ait toplam 51 izolat elde edilmiştir. Elli bir mikrofungus izolatının %29'u *Cladosporium*, %22'i *Penicillium*, %16'sı *Alternaria*, %12 si *Aspergillus*, %6'ı *Eurotium*, %6'ı *Stemphylium*, %6'ı *Ulocladium*, %2'si *Scopulariopsis*, %2'si *Emericella* cinsine aittir. Çalışmalarımızda tanımlanan cinslerin tümüne tuzlu ortamlardan fungus izolasyonu ile ilgili literatürlerde rastlanmaktadır. *Cladosporium*, *Alternaria* ve *Aspergillus* genuslarına ait izolat sayısının çoğunlukta olması, Tuz Gölü'nde bu organizmaların bulunma sıklığının yüksek olduğunu işaret etmektedir. İlk sırada yer alan *Cladosporium* cinsine ait izolat sayısını *Penicillium* cinsine ait izolat sayısı takip etmektedir.

Diaz Munoz (2006) ve Gunde-Cimerman (2000), hipersalin ortamlardan izole ettikleri halofilik-halotolerant fungus türlerinin sıklıkla *Cladosporium*, *Aspergillus* ve *Alternaria* cinslerinin üyeleri olduğunu bildirmişlerdir. Halofilik *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Eurotium* Hindistanda mangrov sedimentleri ve tuzlalardan, *Aspergillus niger* Cabo Rojo Solar tuzlasından, 4 *Emericella* türü Akdenizden, *Scopulariopsis Ulocladium* ve *Stemphylium* cinsi üyelerinin izole edilerek tanımlandığı rapor edilmiştir (Abdel-Hafez, 1981; Pitt and Hocking, 1985; Cantrell et al., 2006; Zalar et al., 2008; Nayak et al., 2012).

Çalışmamızda izole edilen mikrofungus çeşitleri literatür ile uyumlu olup biyoteknolojik açıdan farklı amaçlarla kullanılabilecek potansiyel kaynaklardır. Bu izolatlar Eskişehir Osmangazi Üniversitesi kültür koleksiyonunda muhafaza edilmektedir.

ADH enzim aktivitesi basit organizmalardan insan, hayvan ve bitki gibi kompleks canlılara kadar çok geniş alanda araştırılmıştır. Funguslar üzerine yapılan ADH enzim aktivite çalışmalarının birçoğu fermentatif mayalar üzerinedir. Literatürde halofilik-halotolerant funguslarda ADH enzim aktivite taranmasına ilişkin bir rapora rastlanmamıştır.

Çalışma süresince mikrofungus izolatları daha sonraki aşamalarda aktiflenerek kullanılmak üzere mineral yağda muhafaza edilmiştir. Mineral yağda fungus muhafazası yöntemi kolay uygulanabilirliği, ekonomik ve güvenilir olması nedeniyle

yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda mineral yağda muhafaza edilen toplam 51 izolattan ancak 38 tanesi aktif hale gelmiştir. İzolatlardan bir kısmının kaybedilmesi kullanılan muhafaza yönteminin bazı fungus türlerinin saklanması için uygun olmadığını akla getirmektedir. Fungus muhafazası için alternatif güvenilir diğer bir yöntem ise sıvı azotta depolamaktır. Ancak ekonomik olmaması sebebiyle çalışmamızda tercih edilmemiştir. Bununla birlikte *Cladosporium*, *Alternaria*, *Stemphylium*, *Ulocladium* gibi koyu renkli fungusların tekrarlı transferlerinin de kültürün kaybedilme sebeplerindedir.

Otuz sekiz izolatin ADH aktivitesinin cinslere göre değerlendirilmesinde aynı cinse ait izolatların ADH aktivite ortalamaları dikkate alınmıştır. İzolatlardan yapılan ADH aktivite çalışmaları sonucunda genusları gruplandırıp ortalamalarına bakıldığında *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Alternaria* ve *Eurotium* genuslarına ait grupların enzim spesifik aktivite ortalamaları *Cladosporium* için $3,49 \mu\text{moldk}^{-1}\text{mg}^{-1}$, *Alternaria* için $3,15 \mu\text{moldk}^{-1}\text{mg}^{-1}$, *Aspergillus* için $3,68 \mu\text{moldk}^{-1}\text{mg}^{-1}$ ve *Aspergillus* telemorfu olan *Eurotium* için $4,48 \mu\text{moldk}^{-1}\text{mg}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Bu genuslara ait grupların enzim spesifik aktivite ortalamalarının, tüm grupların toplam enzim spesifik aktivite ortalaması olan $3,14 \mu\text{moldk}^{-1}\text{mg}^{-1}$ değerinin üzerinde olduğu görülmektedir. Diğer *Penicillium*, *Emericella*, *Scopulariopsis*, *Stemphylium*, *Ulocladium* genuslara ait değerler ise bu ortalamanın altında kalmaktadır. Tuzlu sularda baskın olarak bulunan cins grupların enzim aktivitelerinin ortalamalarının da diğer gruplardan yüksek olması ilgi çekicidir.

Çalışmamızda enzimatik aktivitenin belirlenmesinde spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemin çeşitli organizmaların ADH enzimi aktivitelerinin belirlenmesinde kullanıldığı örneklere literatürde rastlanmaktadır. Bitkilerle yapılan çalışmalardan birinde toplam spesifik ADH enzim aktivitesinin pirinçte 5,3 U/mg, *Oryzicola*'da 3,7 U/mg, bezelyede 6,8 U/mg ve mazıda 3,2 U/mg olarak belirlenmiştir (Cobb and Kennedy, 1987). Flor yeast olarak adlandırılan şarap üstünü kaplayan mayalardan *Saccharomyces cheresiensis* ile yapılan ADH aktivite çalışmasında farklı karbon kaynaklarının enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Bu çalışmaya göre

karbon kaynağı olarak etanol kullanıldığında aktivite 3,5 U/mg olarak bulunurken, gliserolde 4,8 U/mg olarak bildirilmiştir (Fernández et al., 1972).

Enzim aktivitesi bakımından ortalamanın üstünde aktiviteye sahip olan sekiz izolatin cins düzeyinde tanımlanmalarının doğrulanması ve tür düzeyinde tanımlanması açısından moleküler teknikler kullanılmıştır. National Center for Biotechnology Information (NCBI) internet sitesinde ki BLAST-n programı ile hizalamaları sonucu benzerlik oranları *Aspergillus versicolor* (T55) ve *Aspergillus niger* (5800) için %100, *Cladosporium macrocarpum* (5776), *Cladosporium sphaerospermum* (5821), *Cladosporium cladosporides* (5794), *Eurotium* (5810) ve *Penicillium chrysogenum* (5797) için %99 olarak belirlenmiştir. Tür düzeyinde moleküler tanımlaması yapılan izolatlarımızın hepsi daha önceki çalışmalarda tuzlu ortamlardan izole edilmiş türler olduğu görülmüştür. *Cladosporium* cinsine ait örneklerin spor morfolojilerinin, koloni renk ve dokularındaki benzerlikler tür düzeyinde tanımlanmalarını zorlaştırmaktadır. Bu türlerin moleküler ITS1–5.8 S ITS gen bölgesine ek olarak aktin gen bölgesi ile desteklenmesi gereği doğmuştur (Butinar et al., 2005). Moleküler tanımlaması yapılan mikrofunguslardan RNA izolasyon çalışmaları yapılmıştır. Morfolojik özellikler ve moleküler tekniklerle elde edilen tanımlama verileri birbirleriyle uygunluk göstermiştir.

Yüksek ADH aktivitesi gösteren 8 izolatin tür düzeyinde tanımlaması yapıldıktan sonra klonlama çalışmalarını başlatmak üzere RNA izolasyonu sürecine geçilmiştir. cDNA eldesinde, RT-PCR ile genlerin izolasyonu gibi moleküler biyolojik çalışmalarda yüksek kalitede RNA eldesi önemlidir. Ye Li ve arkadaşları (2008) filamentli funguslardan RNA izolasyonunun zorluklarına değinmiştir. Filamentli fungusların kompleks hücre duvarı yapısına sahip olmaları ve yüksek seviyede içerdikleri polisakkaritler RNA'ya tutunmakta ve prespise etmektedir. Endojen ribonukleazlar da RNA izolasyonunu olumsuz yöne etkiler. Polisakkaritlerin olumsuz etkisinin etkin bir şekilde yok edilmesi ve endojen ribonukleazların etkisiz hale getirilmesi için guanidin tiyosiyonat ve benzil klorür kullanmışlardır (Li et al., 2010). Bu bilgiler doğrultusunda RNA izolasyon çalışmalarımızda kullanılan klasik yöntemler guanidin tiyosiyonat kullanımı ile modifiye edilmiştir. Toplam RNA izolasyonundan elde edilen cDNA'lardan gen ürününün alınması sonucu bizi farklı izolatlardan farklı RNA ekstraksiyon yöntemleri denemeye yönlendirmiştir. Filamentli funguslara özel

RNA izolasyon kitlerinden elde edilen RNA miktarı klasik yöntemle göre daha fazla olmuştur (Çizelge4.3).

Moleküler tekniklerle tanımlamaları yapılan sekiz izolattan ADH klonlama çalışmaları için izolat seçiminde, tuzlu ortamlarda baskın bulunan *Cladosporium* cinsine öncelik verilmiştir. Ancak primer tasarımı ve BLAST-n analizleri sırasında ADH enzimi bakımından bu cinse ait gen bilgisinin veri tabanında bulunmaması klonlama çalışmalarını zorlaştırdığından nispeten verilerin olduğu *Aspergillus* ve *Penicillium* cinslerinden de RNA izolasyonuna gidilmiştir.

Toplam RNA içerisinde Adh gen bölgesine ait RNA miktarının artırılması, cDNA havuzu içerisinde klonlama çalışmalarında kullanılacak ilgili gen miktarını arttırmak için gerekmektedir. ADH enzim proteininin artırılması için Adh genlerinin regülasyonunun bilinmesi önemlidir. ADH izoenzimlerinden Adh2 ve Adh1 genlerinin regülasyonu karbon katabolit baskılaması altındadır. Mayalarla yapılan bir çalışmada Adh1 ve Adh2 genlerinin uyarılması için farklı karbon kaynakları kullanılmıştır (De Smidt et al., 2008). Benzer bir başka çalışma ise *Aspergillus nidulans* için yapılmış ve ADH izoenzimlerinin substrat spesifikliği ve uyarılabilirliği tartışılmıştır (Sealy-Lewis and Fairhurst, 1995). Bu çalışmalarda Adh1 geni etanol ile indüklenirken Adh2 hem etanol hem de %0,1 fruktoz ile indüklendiği bildirilmiştir. Adh3 geninin regülasyonu ise oksijen miktarının kontrolü ile rapor edilmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda ADH enzim aktivite ve klonlama çalışmaları için funguslar 12-16 saat süre ile glikoz baskılaması yapmayacak kadar karbon kaynağı içeren (%1 glukoz) minimal besiyerinde büyütüldükten sonra tek karbon kaynağı olarak %0,1 fruktoz ve gliserol içeren besiyerlerine aktarılmıştır. İndükleyici ortam koşullarında büyütülen izolatlardan RNA ve cDNA eldesi gerçekleştirilmiştir.

Alkol dehidrogenaz izoenzimlerinden birinin klonlanması için, Adh1 ve Adh2 genlerinin başlangıç ve bitiş kodonlarını içine alacak şekilde primerler tasarlanmıştır. Bu bölgeye oturan primerlerle gerçekleştirilecek bir amplifikasyondan beklenen DNA fragmenti uzunluğu yaklaşık 1100 bp kadardır. Buna ilaveten gen bölgesinin içine oturan bir kontrol primer çifti daha tasarlanmıştır. Bu kontrol primerlerinin gen bölgesi içine oturmasıyla çoğaltacağı ürün büyüklüğü yaklaşık 450 bp kadardır. Klonlanan

DNA fragmentinin gen bölgesini içerip içermediği bu internal primerlerle kurulacak PCR ürününün kontrolü ile sağlanmıştır.

Klonlama çalışmalarımız sırasında birçok kez alkol dehidrogenaz gen bölgesi cDNA'dan çoğaltılmaya çalışılmıştır. *A. niger* 5800 izolatının cDNA'sından hedeflenen gen büyüklüğü ile örtüşen 1100 bç'lik DNA bölgesi QIAGEN EZ kompetent *E.coli* hücrelerine klonlanmıştır. Ancak dizi analizi sonucuyla hedef genin varlığı doğrulanamamıştır. İnsert DNA'nın dizi bilgisi BLAST-n programı ile karşılaştırıldığında %78 oranında *Aspergillus niger* CBS 513.88 glutamin sentetaza ait mRNA gen dizisi ile benzerlik görülmüştür (Şekil 4.23). cDNA havuzundan ilgili genin çekilememesi üzerine genomik DNA üzerinden hedef gene ulaşılması planlanmıştır. Bu doğrultuda *A. niger* 5800 ve *P.chrysogenum* 5797 olmak üzere iki izolatın genomik DNA'ları üzerinden QIAGEN EZ kompetent *E.coli* hücrelerine klonlama çalışmalarına devam edilmiştir. Uygulama sonucunda *P.chrysogenum* 5797 genomik DNA'sından, hedeflenen gen büyüklüğünden daha kısa fragmentler klonlanmıştır. Bu türe ait klonlana dizi bilgisi BLAST-n programı ile karşılaştırılmıştır. Buna göre dizi bilgisinin %99 *P. chrysogenum* sülfat permeaz SutB gen dizisi ile benzerliği görülmüştür. Diğer izolat *A. niger* 5800 genomik DNA'sından yapılan klonlama sonucunda hedeflenen gen büyüklüğünde insertler elde edilmiştir. Hedef genin çoğaltılıp çoğaltılmadığının kontrolü iç primerlerle sağlanmıştır. Kalıp olarak insert DNA'nın kullanıldığı iç primerler ile oluşturulan PCR reaksiyonu sonunda istenilen büyüklükte bantlar gözlenmiştir. Klonlanan insert DNA'nın dizi bilgisi BLAST-n programı ile hizalanmıştır. Ancak buna göre klonlanan gen bölgesinin % 99 *Aspergillus niger* CBS 513.88 protein kinase, mRNA dizisi ile homoloji gösterdiği görülmüştür (Şekil 4.28).

Farklı klonlama stratejileri uygulanmasına rağmen hedeflenen gen bölgesi çoğaltılamamıştır. cDNA'lar ile yapılan çalışmalardan ürün alınmasının nedeninin cDNA havuzu içerisinde Adh gen ifadesinin azlığından kaynaklandığı düşünülmüştür. Gene ait mRNA'ların az olması ve stabil olmaması da aynı sonucu doğuracaktır. ADH gen ifadesini arttırmak için *Aspergillus nidulans* ve mayalardaki gibi substrat bağımlı gen indüksiyonu yapılmıştır (Sealy-Lewis and Fairhurst, 1995). *Debaryomyces hansenii* çok az fermentatif osmotolerant bir mayadır. Alkol dehidrogenaz gen

regülasyonu fermentatif mayalardan ve *Aspergillus nidulans*'dan farklılık göstermektedir. Bu mayanın sahip olduğu bir alkol dehidrogenaz enzim ailesi üyesinden gliserol 3-fosfat dehidrogenaz geninin yüksek spesifik enzim aktivitesi göstermesine karşılık düşük protein ve RNA seviyeleri gösterdiği rapor edilmiştir. Gliserol 3-fosfat dehidrogenaz enziminin induksiyonun tuz stresi koşullarının uygulandığı ilk 15 dakika içinde gerçekleştiği bildirilmektedir (Thome P. , 2004).

Çalışmamız kapsamında hedeflenen gen bölgesi klonlanamamasına rağmen spektrofotometrik yöntemlerle klonlama çalışması yapılan tüm izolatlarda enzim aktivitesinin varlığı ortaya konmuştur. Protein olarak da varlığının ortaya konması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda enzim saflaştırma çalışmaları gerçekleştirilmiştir. ADH enzim proteininin varlığın göstermek üzere *A. niger 5800* hücreleri indukleyici ortamda büyütülmüştür. Hücre özütü amonyum sülfat ile çöktürülüp diyalizi gerçekleştirdikten sonra enzim aktivitesi açısından taranmıştır. Enzim spesifik aktivitesi ham özüte göre yaklaşık 20 kat artmıştır (Çizelge 4.4). Diyaliz sonrasında elde edilen peptid karışımının kolon kromatografisi sonucunda elde edilen fraksiyonlarında aktivite gözlenmemiştir. Bileşenler kolondan ayrıştırılamamıştır. Uygulanan kolon kromatografisi koşullarının bu proteinin saflaştırılması için uygun olmadığı sonucuna varılmıştır.

Hücre özütü diyalizatında proteinlerin varlığının ve profillerinin ortaya konması için SDS-PAGE kromatografi yöntemi uygulanmıştır. Diyaliz içerisinde 45-55 kDa arasında büyüklüğü sahip bir bant ile birlikte farklı hareketliliğe sahip 7 ayrı bant daha gözlenmiştir (Şekil 4.29). Alkol dehidrogenazların birçok izoenzim içerdikleri bilinmektedir. Bu nedenle SDS-PAGE profiliyle varlığı ortaya konulan farklı büyüklükteki peptidlerin hücre metabolik sürecinde var olan farklı ADH izoenzimlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Önceki çalışmalarda *Aspergillus nidulans* ADH izoenzimlerinin poliakrilamid jelde farklı hareketlilik gösterdiği rapor edilmiştir (Heather M., 1995).

Ayrıca diyaliz bileşenlerinin HPLC profili incelenmiştir. Bu amaçla diyaliz bileşenleri ile *Saccharomyces cerevisiae*'dan elde edilen (SIGMA) ticari ADH enzim çözeltisi aynı koşullarda incelenmiştir. Kromatogram verilerine göre her iki örnek için peptidlerin alı konma süreleri benzerlik göstermektedir (Şekil 4.30). 220 nm'de

peptidlere ait pikler 50. dakika ile 75. dakika arasındadır. Yapılan bir çalışmada maya kaynaklı ticari ADH'nin enzimatik olarak parçalanmasıyla elde edilmiş peptidlere ilişkin HPLC kromatogramında 25 ile 75. dakikalar arasında piklerin görüldüğü rapor edilmiştir (Santhoshkumar and Sharma, 2002). Diyaliz içeriğinde ADH proteininin varlığı, örneğe ait HPLC profiline olan benzerliğiyle de gösterilmiştir.

Bu çalışmamızda Tuz Gölü'nden izole edilen 38 mikrofungus cins düzeyinde tanımlanmıştır. Tanımlanan bu mikrofungusların halolerant olduğu ve hipersalin çevrelerde yaygın bulunan mikrofunguslarla paralellik gösterdiği ortaya konmuştur. Tanımlanan 38 izolatın alkol dehidrogenaz enzim aktivitesi açısından taranması gerçekleştirilmiştir. Tuzlu sularda yüksek sıklıkta bulunan cins üyelerinin ortalama alkol dehidrogenaz enzim aktivitelerinin seyrek olarak bulunanlara göre daha yüksek olduğu dikkat çekmektedir.

Debaryomyces hansenii örneğinde olduğu gibi ekstrem koşullarda yaşayan organizmalarda gen regülasyonunun ılımlı organizmalara göre farklılık gösterebileceği dikkate alınırsa klonlama çalışmalarında başarıyı arttırabilmek için öncelikle gen regülasyonu çalışmalarına ağırlık verilmelidir. Yapılan çoğu çalışmada gen regülasyonu karbon kaynağı ile kontrol edilmiştir. Farklı stres koşullarının ADH geni regülasyonu üzerine etkisi halofilik/halotolerant funguslarda da araştırılmalıdır.

HPLC çalışmalarında ortaya konulan peptid profili ileride yapılacak çalışmalar için temel bir bakış açısı oluşturacaktır. Gelecek projelerle *Aspergillus niger* 5800 suşundan aktivitesini belirlediğimiz ADH enzim proteininin amino asit dizisinin belirlenmesi, ilgili gene ait DNA dizisinin ortaya çıkarılmasında önemli bir veri oluşturacaktır. Bu amaçla hücre özütü diyalizatının içerdiği peptidler aktif HPLC fraksiyonlarından geri kazanılıp, SDS-PAGE ya da kütle spektrofotometresi ile proteinin molekül büyüklüğü ve saflığı ortaya çıkarılabilir. Böylece saf halde elde edilen aktif ADH aktivitesi bulunan peptidlerin amino asit dizi bilgisi EDMAN reaksiyonu ile biyokimyasal yolla belirlenebilir. Buradan elde edile amino asit dizi bilgisi hedef gen için daha spesifik primer tasarlanmasına olanak sağlayacaktır. Ayrıca amino asit dizinin biyoinformatik analizi ile Adh DNA dizi bilgisi putatif olarak ortaya konulabilir.

BÖLÜM 6**KAYNAKLAR DİZİNİ**

- Abdel-Hafez, S., 1981, Halophilic fungi of desert soils in Saudi Arabia. *Mycopathologia* 75, 75-80.
- Barnett, H., and Hunter, B., 1999, Illustrated genera of imperfect fungi (p. 218). St Paul: APS.
- Bradford, M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.
- Butinar, L., Sonjak, S., Zalar, P., Plemenitaš, A., and Gunde-Cimerman, N., 2005, Melanized halophilic fungi are eukaryotic members of microbial communities in hypersaline waters of solar salterns. *Botanica Marina* 48, 73-79.
- Cantrell, S.A., Casillas-Martínez, L., and Molina, M., 2006, Characterization of fungi from hypersaline environments of solar salterns using morphological and molecular techniques. *mycological research* 110, 962-970.
- Cao, Y., Liao, L., Xu, X.-w., Oren, A., Wang, C., Zhu, X.-f., and Wu, M., 2008, Characterization of alcohol dehydrogenase from the haloalkaliphilic archaeon *Natronomonas pharaonis*. *Extremophiles* 12, 471-476.
- Carbone, I., and Kohn, L.M., 1999, A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 553-556.
- Cobb, B., and Kennedy, R., 1987, Distribution of alcohol dehydrogenase in roots and shoots of rice (*Oryza sativa*) and *Echinochloa* seedlings. *Plant, Cell & Environment* 10, 633-638.
- Cronin, E., and Post, F., 1977, Report of a dematiaceous hyphomycete from the Great Salt Lake, Utah. *Mycologia* 59.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- Danielsson, O., and Jörnvall, H., 1992, " Enzymogenesis": classical liver alcohol dehydrogenase origin from the glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase line. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89, 9247-9251.
- De Smidt, O., Du Preez, J.C., and Albertyn, J., 2008, The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: a comprehensive review. *FEMS yeast research* 8, 967-978.
- Díaz-Muñoz, G., and Montalvo-Rodríguez, R., 2005, Halophilic black yeast *Hortaea werneckii* in the Cabo Rojo Solar Salterns: its first record for this extreme environment in Puerto Rico. *Caribb J Sci* 41, 360-365.
- Diaz Munoz, G.M., 2006, Fungal diversity present at a hypersaline environment in Cabo Rojo, Puerto Rico determined by characterization of isolates and analysis of environmental rRNA genes clones libraries (Puerto Rico: University of Puerto Rico, Mayaguez), pp. 140.
- Ebel, C., Faou, P., and Zaccai, G., 1999, Protein-solvent and weak protein-protein interactions in halophilic malate dehydrogenase. *Journal of Crystal Growth* 196, 395-402.
- Eisenberg, H., 1995, Life in unusual environments: progress in understanding the structure and function of enzymes from extreme halophilic bacteria. *Arch Biochem Biophys* 318, 1-5.
- Eisenberg, H., Mevarech, M., and Zaccai, G., 1992, Biochemical, Structural, and Molecular Genetic Aspects of Halophilism. In *Advances in Protein Chemistry*, F.M.R.J.T.E. C.B. Anfinsen, and S.E. David, eds. (Academic Press), pp. 1-62.
- Eisenberg, H., and Wachtel, E., 1987, Structural studies of halophilic proteins, ribosomes, and organelles of bacteria adapted to extreme salt concentrations. *Annual review of biophysics and biophysical chemistry* 16, 69-92.
- Elcock, A., and McCammon, J., 1998, Electrostatic contributions to the stability of halophilic proteins. *Journal of molecular biology* 280, 731-748.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- Ellis, M., 1971, Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew. Links.
- Fernández, M.J., Gómez-Moreno, C., and Ruiz-Amil, M., 1972, Induction of isoenzymes of alcohol dehydrogenase in “flor” yeast. *Archiv für Mikrobiologie* 84, 153-160.
- Gardes, M., and Bruns, T.D., 1993, ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2, 113-118.
- Gilman, J., 1957, A Manual of Soil Fungi. Ames (Iowa, USA: The Iowa State University Press).
- Gunde-Cimerman, N., Oren, A., and Plemenita, A., 2005, Adaptation to life at high salt concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya (Kluwer Academic Pub).
- Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., De Hoog, S., and Plemenitas, A., 2000, Hypersaline waters in salterns-natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS microbiology ecology* 32, 235-240.
- Hellgren, M., 2009, Enzymatic studies of alcohol dehydrogenase by a combination of in vitro and in silico methods (Institutionen för medicinsk biokemi och biofysik (MBB)/Department of Medical Biochemistry and Biophysics).
- Huang, Y., Liu, N., Wu, X., and Chen, Y., 2010, Dehydrogenases/reductases for the synthesis of chiral pharmaceutical intermediates. *Current Organic Chemistry* 14, 1447-1460.
- Hyndman, D., Bauman, D.R., Heredia, V.V., and Penning, T.M., 2003, The aldo-keto reductase superfamily homepage. *Chemico-Biological Interactions* 143-144, 621-631.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- Ikuta, T., Fujiyoshi, T., Kurachi, K., and Yoshida, A., 1985, Molecular cloning of a full-length cDNA for human alcohol dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82, 2703-2707.
- Jelski, W., Chrostek, L., and Szmitkowski, M., 2007, The activity of class I, III, and IV of alcohol dehydrogenase isoenzymes and aldehyde dehydrogenase in gastric cancer. *Digestive diseases and sciences* 52, 531-535.
- Jez, J.M., and Penning, T.M., 2001, The aldo-keto reductase (AKR) superfamily: an update. *Chemico-Biological Interactions* 130-132, 499-525.
- Kavanagh, K., Jörnvall, H., Persson, B., and Oppermann, U., 2008, Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families. *Cellular and molecular life sciences* 65, 3895-3906.
- Klich, M., 2002, Identification of common *Aspergillus* species. 122 pp. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
- Köhler, K., and Domdey, H., 1991, Preparation of high molecular weight RNA. *Methods in enzymology* 194, 398-405.
- Lanyi, J., 1974, Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 38, 272.
- Lanyi, J., and Stevenson, J., 1970, Studies of the electron transport chain of extremely halophilic bacteria. IV. Role of hydrophobic forces in the structure of menadione reductase. *The Journal of biological chemistry* 245, 4074.
- Li, L., Chang, S.-s., and Liu, Y., 2010, RNA interference pathways in filamentous fungi. *Cellular and molecular life sciences* 67, 3849-3863.
- Liese, A., Seelbach, K., and Wandrey, C., 2006, *Industrial biotransformations* (John Wiley & Sons).

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- Lorenz, P., Liebeton, K., Niehaus, F., and Eck, J., 2002, Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. *Current Opinion in Biotechnology* 13, 572-577.
- Machielsen, R., 2007, *Microbial Alcohol Dehydrogenases: Identification, Characterization and Engineering* (Wageningen: Wageningen University), pp. 136.
- Machielsen, R., and van der Oost, J., 2006, Production and characterization of a thermostable L-threonine dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *FEBS Journal* 273, 2722-2729.
- Madern, D., Ebel, C., and Zaccai, G., 2000, Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles* 4, 91-98.
- Mevarech, M., Frolow, F., and Gloss, L.M., 2000, Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt. *Biophysical Chemistry* 86, 155-164.
- Mukhtar, M., Parveen, Z., and Logan, D.A., 1998, Isolation of RNA from the filamentous fungus *Mucor circinelloides*. *Journal of microbiological methods* 33, 115-118.
- Nayak, S.S., Gonsalves, V., and Nazareth, S.W., 2012, Isolation and salt tolerance of halophilic fungi from mangroves and solar salterns in Goa-India. *Indian J Geomarine Sci* 41, 164-172.
- Oren, A., 2002, *Halophilic microorganisms and their environments* (Kluwer Academic Publishers).
- Pal, S., Park, D., and Plapp, B., 2009, Activity of yeast alcohol dehydrogenases on benzyl alcohols and benzaldehydes Characterization of ADH1 from *Saccharomyces carlsbergensis* and transition state analysis. *Chemico-Biological Interactions* 178, 16-23.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- Passoth, V., Schäfer, B., Liebel, B., Weierstall, T., and Klinner, U., 1998, Molecular cloning of alcohol dehydrogenase genes of the yeast *Pichia stipitis* and identification of the fermentative ADH. *Yeast* 14, 1311-1325.
- Petrovic, U., Gunde-Cimerman, N., and Plemenitas, A., 2002, Cellular responses to environmental salinity in the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*. *Mol Microbiol* 45, 665-672.
- Ping, W., Ge, J., Lou, Z., and Song, G., 2004, Alcohol Dehydrogenase from *Bacillus subtilis*: Cloning and Expression Gene in HD34 Beer Yeast. *Nature and Science* 2.
- Pitt, J., 1979, The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. 634 pp. London etc.
- Pitt, J.I., and Hocking, A.D., 1985, A laboratory guide to common *Penicillium* species (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Research Australia).
- Powell, K.A., Ramer, S.W., del Cardayré, S.B., Stemmer, W.P.C., Tobin, M.B., Longchamp, P.F., and Huisman, G.W., 2001, Directed Evolution and Biocatalysis. *Angewandte Chemie International Edition* 40, 3948-3959.
- Raper, K., and Fennell, D., 1965, The Genus *Aspergillus*, 686 pp. The Williams and Wilkins Comp Baltimore, USA.
- Raper, K., and Thom, C., 1949, A manual of the *Penicillia*. 875 pp. Williams and Wilkins, Baltimore: Maryland, USA.
- Reid, M., and Fewson, C., 1994, Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. *Critical reviews in microbiology* 20, 13-56.
- Santhoshkumar, P., and Sharma, K.K., 2002, Identification of a region in alcohol dehydrogenase that binds to α -crystallin during chaperone action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins & Proteomics* 1598, 115-121.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- Schmid, A., Dordick, J.S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., and Witholt, B., 2001, Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* 409, 258-268.
- Sealy-Lewis, H.M., and Fairhurst, V., 1995, Substrate specificity of nine NAD⁺-dependent alcohol dehydrogenases in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* 141, 2295-2300.
- Seery, L.T., Nestor, P.V., and FitzGerald, G.A., 1998, Molecular Evolution of the Aldo-keto Reductase Gene Superfamily. *Journal of Molecular Evolution* 46, 139-146.
- Sime, A., Abbott, L., and Abbott, S., 2002, A mounting medium for use in indoor air quality spore-trap analyses. *Mycologia*, 1087-1088.
- Skurský, L., Kovář, J., and Štachová, M., 1979, A sensitive photometric assay for alcohol dehydrogenase activity in blood serum. *Analytical Biochemistry* 99, 65-71.
- Staab, C., Hellgren, M., and Höög, J.-O., 2008, Medium-and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65, 3950-3960.
- Suwannarangsee, S., Oh, D.-B., Seo, J.-W., Kim, C.H., Rhee, S.K., Kang, H.A., Chulalaksananukul, W., and Kwon, O., 2010, Characterization of alcohol dehydrogenase 1 of the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Applied microbiology and biotechnology* 88, 497-507.
- Temiz, H., Okumus, E., Aykut, U., Dervisoğlu, M., and Yazıcı, F., 2008, Partial purification of pepsin from turkey proventriculus. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24, 1851-1855.
- Tudorache, M., and Bala, C., 2007, Biosensors based on screen-printing technology, and their applications in environmental and food analysis. *Analytical and bioanalytical chemistry* 388, 565-578.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- Vicente-Soler, J., Arguelles, J., and Gacto, M., 1991, Proteolytic activation of α , α -trehalose 6-phosphate synthase in *Candida utilis*. FEMS microbiology letters 82, 157-161.
- White, T., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J., 1990, Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols a guide to methods and applications, 315-322.
- Zaccari, G., and Eisenberg, H., 1990, Halophilic proteins and the influence of solvent on protein stabilization. Trends in Biochemical Sciences 15, 333-337.
- Zalar, P., Frisvad, J.C., Gunde-Cimerman, N., Varga, J., and Samson, R.A., 2008, Four new species of *Emericella* from the Mediterranean region of Europe. Mycologia 100, 779-795.

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Bursa'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini aynı şehirde tamamladı. 1998 yılında Uludağ Üniversitesi Biyoloji bölümünü kazandı ve buradan 2002 yılında mezun oldu. 2005 yılında Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji Bilim Dalı yüksek lisans programını bitirdi. 2006 yılında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Genel Biyoloji Bilim Dalında doktora programına başladı. 2007 yılında Aksaray Üniversitesi'nde Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. 2008 yılında geçici görevlendirme ile Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Genel Biyoloji Bilim Dalına Araştırma Görevlisi olarak atandı ve halen bu görevi yürütmektedir.