

## ***Bacillus subtilis* RSKK243'e Ait Bifonksiyonel Ksilanaz Geninin *E. coli* ve *B. subtilis*'te Klonlanması ve Enzim Karakterizasyonu\***

Bahri Devrim ÖZCAN, Numan ÖZCAN

Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootehni Bölümü, 01330, Adana - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 06.06.2000

**Özet:** *Bacillus subtilis* RSKK243 suşuna ait CMCse yan aktivitesine sahip bifonksiyonel ksilanaz geni *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis* suşlarında sırasıyla pUC18 ve pUB110 vektörleri yardımıyla klonlanmıştır. Bifonksiyonel ksilanaz geni, pUB110 plazmid ile enzimatik aktiviteler ve plazmid izolasyonu için CMCse ve ksilanaz negatif *Bacillus subtilis* YB886 suşuna, enzim üretimini artırmak için RSKK243'e, multi enzim kokteylleri üreten yeni suşlar oluşturmak amacıyla da değişik *B. subtilis* suşlarına aktarılmıştır. Rekombinant suşlar orjinal suşlar ile enzim üretimi ve multienzim aktiviteleri bakımından karşılaştırılmıştır. Buna ilaveten moleküler ağırlık ve zymogram analizleri için de sırasıyla SDS-PAGE ile SDS-CMC-PAGE ve SDS-Ksilan-PAGE jellerde karşılaştırılmıştır. Enzimin sıcaklık ve pH optimumları sırasıyla 50°C ve 5 olmuştur. Enzimin inaktivasyon sıcaklığı 90°C'de 15 dakika olarak belirlenmiştir.

**Anahtar Sözcükler:** *Bacillus subtilis*, ksilanaz, beta-glukanaz, gen klonlama

### **Cloning of *Bacillus subtilis* RSKK243 Bifunctional Xylanase Gene in *E. coli* and *B. subtilis* and Enzyme Characterization**

**Abstract:** A bifunctional gene xylanase of *B. subtilis* RSKK243 encoding detectable beta(1,4) glucanase (CMCase) activity in addition to a high level of main xylanase activity was cloned and expressed in *Escherichia coli* with pUC18 plasmid and in various *Bacillus subtilis* strains with pUB110 vector. For enzymatic analysis and plasmid isolation, the gene was also expressed in xylanase and beta glucanase negative *B. subtilis* YB886 strain with pUB110 vector. The pUB110 with bifunctional xylanase gene was transferred into *B. subtilis* RSKK243 for maximizing the enzyme yield, as well as into other RSKK strains to create novel strains with multiple enzyme capacities. Recombinant strains were compared with their original counterparts with respect to their enzyme yield and multiple enzyme activities. In addition, molecular size determination and zymogram analysis were performed on SDS-PAGE and SDS-CMC-PAGE and SDS-Xylan-PAGE gels. The temperature and optimum pH of the enzyme were determined to be 50°C and 5 respectively. The enzyme was totally inactivated when it was exposed to a temperature of 90°C for 15 minutes.

**Key Words:** *Bacillus subtilis*, xylanase, beta-glucanase, gene cloning

### **Giriş**

Büyük bir kısmı lignin, selüloz ve hemiselülozdan oluşan lignoselülozlar yeryüzünde en fazla bulunan doğal polimerlerdir. Yeryüzüne ulaşan güneş enerjisinin %0,1'i bitkilerin fotosentezi sonucu tutulmaktadır (1). Ksilan bitkilerde en fazla bulunan hemiselülozdur ve yüksek bitkilerin toplam kuru maddelerinin %35'ini oluşturarak selülozdan sonra ikinci sırada yer alır (2). Ayrıca tahıl danelerinin fiber içeriklerinin büyük bir kısmını da ksilan oluşturur (3). Beta 1,4 ksilanlar; beta-1,4 bağlantılı D xylosyl ünitelerinden oluşur. Ksilanaz parçalanması için

endo ve ekzo beta (1,4) ksilanaz ile beta-ksilanaz dışında alfa-arabinofuranosidaz, alfa-glukoronidaz ve değişik esterazlar gibi çok çeşitli enzimlere ihtiyaç duyarlar (4). Beta (1,4) ksilanaz yem ve kağıt sanayinin yanısıra alfa-amilaz enzimi ile birlikte fırıncılık sanayinde de kullanılmaktadır (5). Ksilanın yemlerde kısmi olarak hidrolizi rumen sindirimi esnasında selülaz enzimlerinin yemdeki selüloza ulaşımını kolaylaştırır. Ksilanın yemden tamamen uzaklaştırılması barsak rahatsızlıklarına neden olduğundan arzu edilmez (2). Bifonksiyonel ksilanaz enzimleri mikroorganizmalarda oldukça yaygın olarak bulunmaktadır (2). Mikrobiyal ksilanaz genlerinin ksilanaz

\* Bu çalışma TÜBİTAK (VHAG-1377) tarafından desteklenmiştir.

aktivitesi yanında önemli düzeyde beta (1,3) (1,4) glukanaaz (likenaz) ve CMCCase aktiviteleri taşımalarına karşılık bazı endo-(1,4) glukanaaz genlerinin de CMCCase aktiviteleri yanında ksilanaz yan aktivitesi bulundukları bilinmektedir. Bu nedenle ksilanaz ve selüloz enzimleri birlikte sınıflandırılarak familyalara ayrılmışlardır (6).

Sonuç olarak bu çalışmamızda *B. subtilis* RSKK243 suşundan ksilanaz ana aktivitesi yanında belirgin ölçüde CMCCase yan aktivitesi gösteren bifonksiyonel bir gen *E. coli*'de pUC18 plazmidini ile klonlanarak izole edilmiştir. Enzim fonksiyonlarını araştırmak amacıyla da aynı gen pUB110 plazmidini ile bu enzimleri üretmeyen *B. subtilis* YB886 suşuna aktararak ilgili enzimin hücre dışı üretimi gerçekleştirilmiştir. Son olarak enzime ait fiziksel özellikler de belirlenmiştir.

## Materyal ve Metot

### Bakteri, Plazmid ve Büyüme Ortamları

*B. subtilis* RSKK243 suşu Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi'nden, *E. coli* XL1-Blue MRF' bakterisi Stratagene'den, *B. subtilis* YB886 suşu Daniel R. Zeigler, *Bacillus* Genetic Stock Centre, Department of Biochemistry, The Ohio State University, Columbus, OH 43210, U.S.A'dan temin edilmiştir. *E. coli* pUC18 ve *B. subtilis* pUB110 plazmidleri Sigma (U.S.A.)'dan satın alınmıştır. Rekombinant bakteriler için büyüme ortamlarına sırasıyla 50µl/ml amfisilin ve 20µg/ml kanamisin ilave edilmiştir. Kimyasallar aksi belirtilmedikçe Sigma'dan sağlanmıştır.

### Enzim Aktivitelerinin Kalitatif ve Kantitatif Olarak Belirlenmesi

Beta-glukanaaz (CMCase) aktivitesi gösteren bakteriler LB-CMC-Agar (%0,1 w/v carboxymethyl cellulose, %1,5 w/v agar) besi yerlerinde Congo-red boyama tekniği ile bulunmuşlardır (7). *B. subtilis* RSKK243 için ortama hiçbir antibiyotik ilave edilmezken rekombinant *E. coli* ve rekombinant *B. subtilis* YB886 için ortama sırasıyla 50µg/ml amfisilin ve 20µg/ml kanamisin ilave edilmiştir.

Alfa-amilaz, beta-glukanaaz, ksilanaz ve likenaz (beta-1,3-1,4 glukanaaz) aktiviteleri aksi belirtilmedikçe 1 ml %2 w/v olarak 50 mM Na-asetat, pH 6'da hazırlanan substratların 1 ml kültür süpernatantı (enzim) ile 55°C'de 1 saat inkübasyonu sonucunda indirgenen şekerlerin DNS metodu (8)'na göre tayini ile belirlenmiştir (9).

### Enzim Aktivitelerinin Poliakrilamid Jellerde Gösterilmesi

*B. subtilis* bakterilerine ait süpernatant proteinleri eşit hacimde %20 w/v TCA (Trichloro acetic acid) ile çöktürülüp Laemmli (10)'a göre hazırlanan %10 w/v SDS-PAGE ve %0,2 w/v CMC veya ksilan içeren jellere uygulandı (9). SDS-PAGE jeldeki toplam proteinler Coomassia blue boyamasıyla ortaya çıkarılırken SDS-CMC-PAGE jellerde CMCCase ve ksilanaz bantları jel proteinlerinin renatürasyonundan sonra Saul ve ark.(11)'dan modifiye edilen Özcan ve ark. (9)'na göre gerçekleştirildi.

### Rekombinant DNA Teknikleri

*B. subtilis* RSKK243'den kromozomal DNA hücrelerin lizozim ve sarkosil kullanılarak parçalanması ve DNA'nın fenol, kloroformla proteinlerden saflaştırılması ile elde edildi (12). Kromozomal DNA RNAz (100 µg/ml) ile 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Kromozomal DNA BamH1 ile kısmi kesilerek %0,4'lük agaroz jelde analiz edildi (13). 1 ile 5 kbp DNA fragmentleri agaroz jelden kesilerek elektroelüzyon (Strata-eluter, Stratagene) ve Prep-A-gene clean (Bio-rad) kit ile agaroz jelden arındırılarak pUC18/BamH1/BAP + Ligaz (Pharmacia) vektörü ile önce 16°C'de 1 saat, sonra 4°C'de 1 gece ligasyona bırakıldı (14). Ligasyon sıvısı CaCl<sub>2</sub> ile kompatent hale getirilmiş *E. coli* XL1 Blue MRF' bakterilerini transforme etmede kullanıldı (15, 16). Transforme bakteriler 37°C'de 1 saat inkübe edildikten sonra Amfisilin-Xgal-LB-agar (50 µg/ml amfisilin, 40 µg/ml Xgal) plaklarına ekilerek rekombinant bakteriler rekombinant olmayanlardan ayrılmıştır. CMCCase aktivitesi gösteren rekombinant *E. coli* klonundan plasmid DNA Birnboim ve Doly (17)'ye göre çıkarılmıştır. Rekombinant pUC18'den bifonksiyonel ksilanaz geni BamH1 ile kesilerek %0,8 w/v jelden gene clean kit ile izole edilip aynı enzimle kesilen pUB110'a ligasyon yapılmıştır. Rekombinant pUB110 *B. subtilis* YB886'ya elektroporasyon (Invitro-gen) tekniği ile PEB (272 mM sukrose, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 7 mM potassium phospathe) solusyonu ve 0,1 cm kuvvet kullanılarak; 100 Ω, 50µF, 1500V değerleri alınarak transfer edilmiştir (18). Rekombinant *B. subtilis* bakterileri CMCCase testi için 20µg/ml kanamisin içeren LB-CMC-Agar plaklarına ekilmişlerdir.

### Bulgular

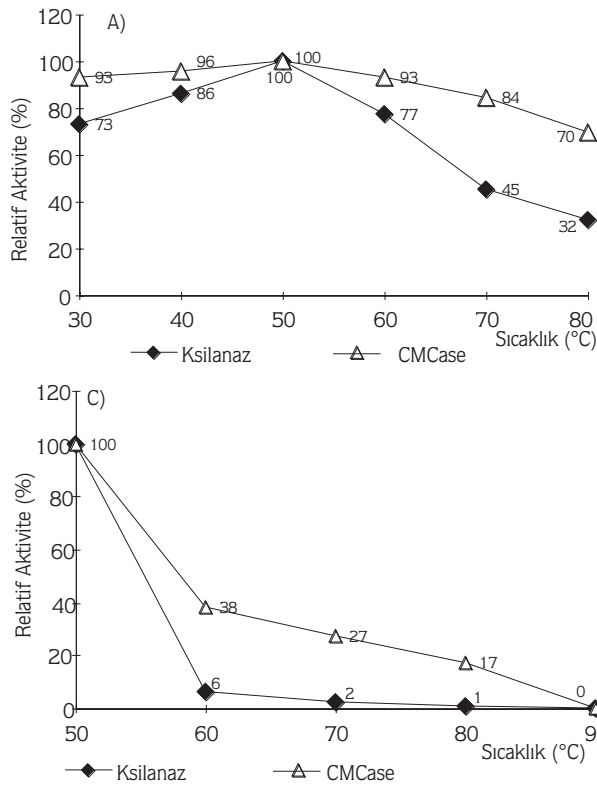
*Bacillus subtilis* RSKK243'e ait gen bankası CMCCase aktivitesi bakımından tarandı ve bir adet CMCCase pozitif

*E. coli* kolonisi bulundu. Bu koloniye ait rekombinant plazmid izole edilerek taşıdığı 2-3 kbp uzunluğunda BamH1-BamH1 DNA parçası pUB110 vektörüne takılmıştır (Şekil 1). Oluşturulan rekombinant plazmid (pUB110C) elektroporasyon tekniği ile *B. subtilis* YB886 suşuna aktararak enzimin ekstraselüler olarak üretimi gerçekleştirilmiştir. Aynı plazmid RSKK243, 244 ve 246 suşlarına da aktararak değişik enzim kokteyllerinin üretimi amaçlanmıştır.

Bifonksiyonel ksilanaz enziminin sıcaklık optimumu hem ksilanaz hemde CMCase aktiviteleri için 50°C olarak



Şekil 1. Bifonksiyonel ksilanaz-CMCase geninin insert analizi (pUC18/BamH1, pUC18+ksilanaz geni/BamH1).

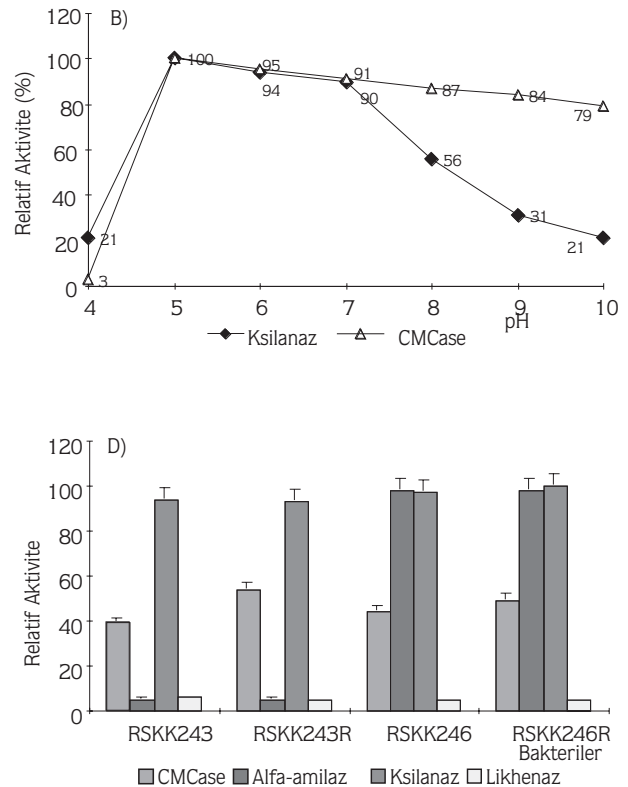


belirlenmiştir (Şekil 2-A). Enzim için optimum pH değeri 5-6 arasında bulunmuştur (Şekil 2-B).

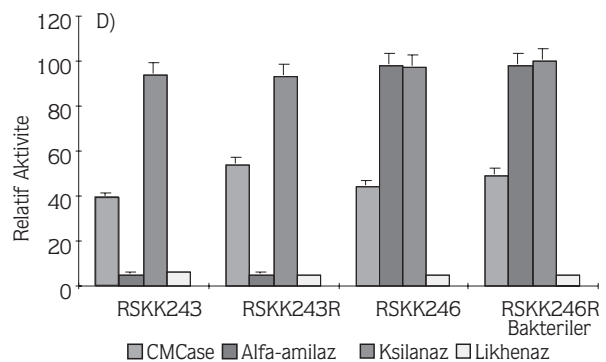
Enzim değişik sıcaklıklarda 15 dakika tutulduktan sonra substrat ile normal koşullarda (55°C, 1 saat) inkübasyona bırakılmıştır. Enzimin 90°C'de 15 dakika tutulması aktivitesinin tümünün kaybolmasına yol açmıştır (Şekil 2-C).

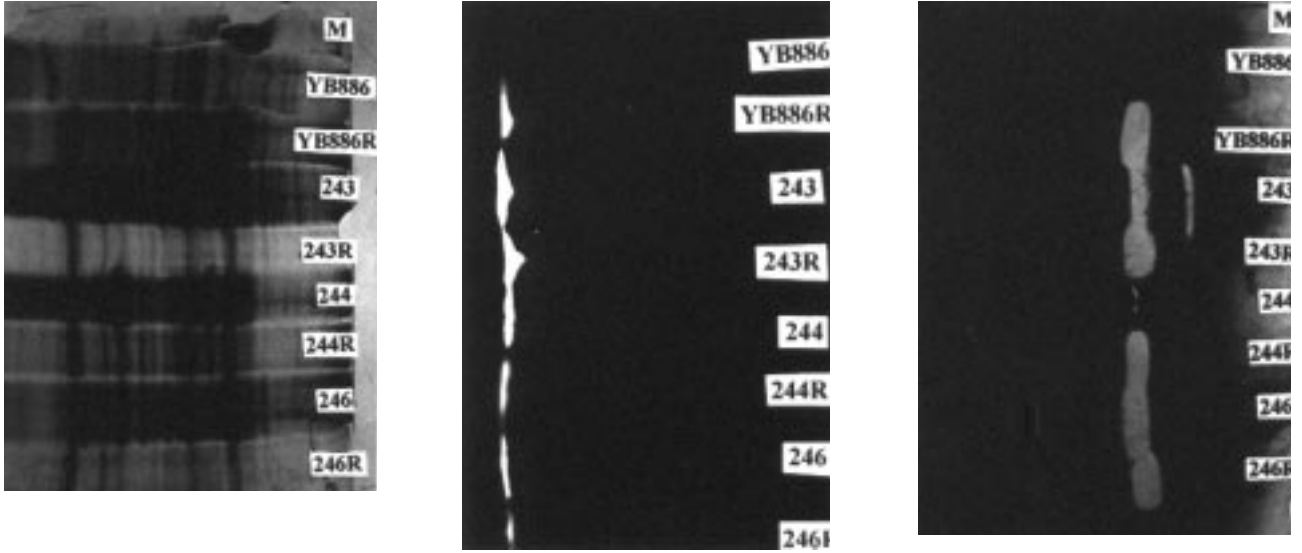
*B. subtilis* YB886 suşuna ait süpernatant nişasta, ksilan, likenan ve CMC'ye karşı aktif herhangi bir enzim üretmezken, bifonksiyonel ksilanaz geninin pUB110 plazmidini ile aktarılması sonrasında YB886 rekombinant suşu yüksek düzeyde ksilanaz ve belirli düzeyde CMCase aktivitesi göstermiştir. Fakat bifonksiyonel genin ksilanaz ve CMCase üreten RSKK243 ve RSKK246 suşuna aktarımı bu enzimlerin mevcut seviyesinde herhangi bir artış sağlamamıştır (Şekil 2-D).

Orjinal ve rekombinant bakteri suşları SDS-PAGE jelde karşılaştırıldığında aralarında belirgin bir farklılık görülememiştir (Şekil 3-A). Bunun üzerine zymogram analizleri yapılmıştır.



Şekil 2. Bifonksiyonel gene ait ksilanaz ve CMCase enzimleri için sıcaklık optimumu (A), pH optimumu (B), sıcaklık direnci (C), substrat seçiciliği (D) değerleri.





Şekil 3. Değişik *B. subtilis* suşlarının SDS-PAGE (A), SDS-Ksilan-PAGE (B) ve SDS-CMC-PAGE (C) jeldeki görünüşleri.

SDS-Ksilan-PAGE ve SDS-CMC-PAGE jelde YB886 suşu herhangi bir aktif bant üretmezken bifonksiyonel geni alan YB886R ile RSKK243R, RSKK244R ve RSKK246R suşları aynı moleküler ağırlığa sahip birer aktif bant oluşturmuştur (Şekil 3-B, 3-C).

### Tartışma ve Sonuç

*Bacillus subtilis* RSKK243'e ait plazmid gen bankası (kütüphanesi) beta-glukanaz aktivitesi bakımından taranmıştır. Beta-glukanaz (CMCase) aktivitesi gösteren klon bu gen bankasından izole edilmiştir. Halbuki enzimin değişik substratlar üzerindeki etkisi incelendiğinde ksilanaz aktivitesinin ana aktivite olduğu ve beta-glukanaz aktivitesinin önemli sayılacak bir yan aktivite olduğu tespit edilmiştir. Lignoselülozların yapısında yer alan beta-glukan ve ksilanlar bir arada mozaik formunda bulunmaları sebebiyle lignoselüloolitik enzimlerden herbirinin bu şekilde çoklu (multiple) aktivite göstermeleri doğal karşılanmalıdır (2). Ksilanaz ve CMCase enzimleri değişik gen organizasyonlarına göre 17 sınıf altında kategorize edilmiştir (6). Bunlar içerisinde *Bacillus lautus*'a ait endoglukanaz enzimini de (19) içeren ailesine ait enzimler; endoglukanaz aktivitesi yanında bir miktar da ksilanaz yan aktivitesi taşımaktadırlar. Bunun aksine içerisinde *Bacillus subtilis* C-125'e ait ksilanaz (xyn) enzimini de içeren F ailesine ait enzimler yüksek ksilanaz aktivitesinin yanısıra belirgin düzeyde

(detectable) beta-glukanaz aktivitesi taşımaktadırlar (6, 20). Bizim klonladığımız bifonksiyonel ksilanaz geni de belki bu kategoride sınıflandırılabilir. Klonlanan DNA fragmentine ait ksilanaz ve CMCase aktivitelerinin sıcaklık ve pH optimum değerlerinde görülen paralellik bu hipotezimizi destekler mahiyettedir. Bu durumun daha kapsamlı araştırılması ve sınıflandırılması için klonlanan DNA fragmentinin baz dizilişlerinin okunması gerekmektedir.

YB886 suşu herhangi bir CMCase aktivitesi üretmezken YB886R suşu RSKK243 gen verici bakteriyel aynı moleküler ağırlıkta bir CMCase enzimi üretmesi bifonksiyonel ksilanaz geninin *Bacillus subtilis* RSKK243 bakterisinden orijin aldığı en açık bir göstergesi olmuştur (Şekil 3-C).

Enzimin sıcaklık ve pH optimum değerleri 50°C ve 5-6 arasında bulunmuştur (Şekil 2-A, 2-B). Sıcaklık ve pH optimumundan ksilan ve CMC üzerinde ayrı ayrı belirlenmiş ve elde edilen değerlerdeki paralellik her iki aktivitenin aynı proteinden kaynaklanacağı görüşünü güçlendirmiştir. Ksilan ve CMC ile hazırlanan zymogram analizleri de bu görüşü doğrular niteliktedir (Şekil 3-B, 3-C). Enzimin ksilan ve CMC'ye karşı gösterdiği aktivite 90°C'de 15 dakika inkübasyon ile tamamen inaktif duruma geçtiği bulunmuştur (Şekil 2-C). Enzimin bifonksiyonel oluşu ve sıcaklığa duyarlı oluşu (inaktivasyon 55°C-90°C) fırıncılık sanayinde kullanılma

ihtimalini artırmaktadır (21). *Bacillus subtilis* RSKK246 suşundan izole edilen alfa-amilaz ile birarada kullanılması düşünülmüştür (14, 22). Bu nedenle bifonksiyonel ksilanaz geni alfa-amilaz üreten RSKK244 ve RSKK246

suşlarına aktarılmıştır. Ayrıca yem sanayinde probiyotik olarak kullanılmak üzere bu enzimleri üreten rekombinant bir maya (*Saccharomyces cerevisiae*) da geliştirilmiştir (23).

## Kaynaklar

1. Coughlan, M.P.: The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. In Biotechnology and Genetic Engineering Reviews. Intercept Ltd. Newcastle upon Tyne, (3): 39-109. 1985.
2. Wong, K.K.Y., Tan, L.U.L., Saddler, J.N.: Multiplicity of Beta-1,4-Xylanase in Microorganisms: Functions and Applications. Microbiological Reviews. 1988. 52, (3): 305-317.
3. Cowan, W.O.: Animal Feed. Industrial Enzymology. Second edition. McMillan Press Ltd. pp. 69. London. Ed. by T. Godfrey ve S. West. 1996.
4. Flint, H.J., Martin, J., McPherson, C.A., Daniel, A.S., Zhang, J.X.: A bifunctional enzyme, with separate xylanase and beta(1,3-1,4)-glucanase domains, encoded by the *xynD* gene of *Ruminococcus flavefaciens*. Journal of Bacteriology. 1993; 175, (10): 2943-2951.
5. Monfort, A., Blasco, A., Prieto, J.A., Sanz, P.: Combined Expression of *Aspergillus nidulans* endoxylanase X24 and *Aspergillus oryzae* alpha-amylase in industrial baker's yeasts and their use in bread making. Applied and Environmental Microbiology. 1996; 62, (10): 3712-3715.
6. Shimada, K., Karita, S., Sakka, K., Ohmiya, K.: Cellulases, xylanases, and their genes from bacteria. Recombinant Microbes for Industrial and Agricultural Application. Marcel Dekker Inc. New York. Y. Murooka and T. Imanaka. 395. 1994.
7. Teather, R.M., Wood, P.J.: Use of Congo-red polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. Appl. Environ. Microbiol. 1982; (43): 777-780.
8. Miller, G.L., Blum, R., Glennon, W.E., Burton, A.L.: Measurement of carboxymethylcellulase activity. Anal. Biochem. 1960; (2): 127-132.
9. Özcan, N., Cunningham, C. ve Harris, W.J.: Cloning of a cellulase gene from the rumen anaerobe *Fibrobacter succinogenes* SD35 and partial characterization of the gene product. Letters in Applied Microbiology. 1996; (22): 85-89.
10. Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature. 1970; (227): 680-685.
11. Saul, D.J., Williams, L.C., Grayling, R.A., Chamley, L.W., Love, D.R., Bergquist, P.L.: *celB*, a gene coding for a bifunctional cellulase from the extreme thermophile '*Caldocellum saccharolyticum*'. Applied and Environmental Microbiology. 1990; (56): 3117-3124.
12. Cutting, S.M., Van der Horn, P.B.: Genetic analysis in molecular biology methods for *Bacillus*. C.R. Harwood ve S.M. Cutting. 27-74. 1990.
13. Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J.: Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 1982.
14. Özcan, N., Uyarlar, A.: *B. subtilis* alfa-amilaz geninin *E. coli*'de klonlanarak rekombinant alfa-amilaz enziminin üretimi. Ç.Ü.Z.F. Dergisi. 1996; 11, (4): 175-182.
15. Barat-Gueride, M., Docherty, R., Rirckwood, R.: DNA replication and transcription. Mitochondria: A Practical Approach. IRL. Press Inc., Oxford. 247-250. 1987.
16. Hanahan, D.: Techniques for transformation of *Escherichia coli*. DNA cloning, A Practical Approach. IRL. Press Inc., Oxford. D.M. Glover (1):121-127. 1985.
17. Birnboim, H.C., Doly, J.: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Research. 1979; (7): 1513-1523.
18. Brigidi, P., De Rossi, E., Betarini, M.L., Ricardi, G., Matteazzi, D.: Genetic transformation of intact cells of *Bacillus subtilis* by electroporation. FEMS Microbiology Letters. 1990; (67): 135-138.
19. Schwarz, W.H., Schimming, S., Rücknagel, K.P., Burgschwaiger, S., Kreil, G., Staudenbauer, W.L.: Nucleotide sequence of the *celC* gene encoding endoglucanase C of *Clostridium thermocellum*. Gene. 1988; (63): 23-30.
20. Hamamoto, T., Honda, H., Kudo, T. ve Horikoshi, K.: Nucleotide sequence of the xylanase a gene of alkalophilic *Bacillus* sp. strain C-125. Agric. Biol. Chem. 1987; 51, (3): 953-955.
21. Godfrey, T., West, S.: Introduction to industrial enzymology. Industrial Enzymology, Second edition. Stockton Press, New York. T. Godfrey ve S. West. 1996.
22. Özcan, N., Uyarlar, A.: *Bacillus* spp'lere ait alfa-amilaz genlerinin *Bacillus subtilis* kromozomuna aktarılması ve *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis*'te klonlanması. XIII. Ulusal Biyoloji Kongresi, Moleküler Biyoloji Seksiyonu. (2): 393-402. 1997.
23. Özcan, N., Kutlu, H.R., Görgülü, M., Akıncık, N., Büyükalaca, S.: Construction of novel yeasts producing feed enzymes. 4<sup>th</sup> Balkan Conference on Operational Research. HELORS, Thessaloniki, Greece. Volume of Abstracts. 30-31. 1997.