

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***Anoxybacillus kestanbolensis* AC26 SARI L-ARABİNOZ İZOMERAZ GENİNİN
KLONLANMASI, EKSPRESYONU VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nazan DALKIRAN

**AĞUSTOS 2012
TRABZON**

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***Anoxybacillus kestanbolensis* AC26 SARI L-ARABİNOZ İZOMERAZ GENİNİN
KLONLANMASI, EKSPRESYONU VE KARAKTERİZASYONU**

Nazan DALKIRAN

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
“YÜKSEK LİSANS (BİYOLOJİ)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih :03 / 08 / 2012
Tezin Savunma Tarihi :31 / 08 / 2012

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI

Trabzon 2012

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Ana Bilim Dalında

Nazan DALKIRAN Tarafından Hazırlanan

Anoxybacillus kestanbolensis AC26 SARI L-ARABİNOZ İZOMERAZ GENİNİN
KLONLANMASI, EKSPRESYONU VE KARAKTERİZASYONU

başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 07/ 08/ 2012 gün ve 1469 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ

Üye : Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI

Üye : Yrd. Doç. Dr. Kadriye İNAN


.....

.....

.....

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“*Anoxybacillus kestanbolensis* AC26 Sarı L-arabinoz izomeraz geninin klonlanması, ekspresyonu ve karakterizasyonu” adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Bu tez çalışmasında, araştırma konusunun belirlenmesinde ve çalışmaların devamında, her türlü bilgi, eleştiri ve önerileri ile yol gösteren danışman hocam Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI'ya ve laboratuvar çalışmalarının yürütülmesi için laboratuvar imkanlarından, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ'e teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Ayrıca, laboratuvar çalışmalarında ve çalışmalar dışındaki her türlü konuda yardımlarıyla bana destek olan K.T.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuvarının tüm çalışanlarına, özellikle çalışmamın her aşamasında bilgi ve yardımlarını esirgemeyerek yol gösterici olan Yrd. Doç. Dr. Kadriye İNAN'a, Arş. Gör. Dilşat Nigar ÇOLAK'a, Arş. Gör. Fulya AY ŞAL'a, ve hiçbir zaman hakkımı ödeyemeyeceğim Arş. Gör. Ayşegül ÖZER'e sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim. Tez yazım zamanlarımda benden anlayışını esirgemeyen hocam Arş. Gör. Mutlu GÜLTEPE'ye ve bana tez yazımında çok destek olan Onur TOSUN'a çok teşekkür ederim.

Özellikle, maddi ve manevi destekleriyle bana her zaman güç veren değerli aileme minnet ve şükranlarımı sunmaktan onur duyarım.

Nazan DALKIRAN

Trabzon 2012

TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Anoxybacillus kestanbolensis* AC26 Sarı L-arabinoz izomeraz geninin klonlanması, ekspresyonu ve karakterizasyonu u” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI’nın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 03 / 08 / 2012

Nazan DALKIRAN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ.....	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET.....	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER DİZİNİ.....	XII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. İzomerazların Alt Sınıfları.....	2
1.2.1. L-Arabinoz İzomerazların Özellikleri.....	2
1.2.2. L-arabinoz İzomerazın Çalışma Mekanizması.....	3
1.2.3. L-Arabinoz İzomerazın Kristal yapısı.....	4
1.2.4. L-Arabinoz İzomerazın Alt Birim Arayüzü ve Aktif Bölgesi.....	5
1.2.5. L-Arabinoz İzomerazın Mikrobiyal Kaynakları.....	6
1.3. <i>Anoxybacillus</i> Cinsinin Genel Özellikleri.....	7
1.4. Enzim ve Termal Kararlılık.....	8
1.5. Termofilik Organizmaların ve Enzimlerin Biyoteknolojide Kullanımı.....	9
1.5.1. L-Arabinoz İzomerazın Endüstriyel Önemi ve L-ribuloz.....	11
1.6. L-Arabinoz Operonu	12
1.6.1. L-Arabinoz Operonunun Regülasyonu	12
1.6.1.1. Arabinoz Varlığına Yanıt Olarak DNA Loop ve Işık-Anahtar Mekanizmasının Düzenlenmesi.....	13
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	15
2.1. Kullanılan Kimyasallar.....	15
2.2. Kullanılan Hücreler	16
2.3. Moleküler Çalışmalar	16
2.3.1. Genomik DNA İzolasyonu	16

2.3.2.	Primerler	17
2.3.3.	L-Arabinoz İzomeraz Geninin PCR Yöntemi ile Baz Diziliminin Belirlenmesi ve Klonlanması	17
2.3.4.	Ekspresyon Primerlerinin Sentezi	18
2.3.5.	L-Arabinoz İzomeraz Geninin pET-28a(+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması.	18
2.4.	Gen Ürününün Elde Edilmesi ve Saflaştırılması.....	19
2.4.1.	Protein Konsantrasyonu Tayini	19
2.4.2.	L-Arabinoz İzomerazın Ekspresyonu.....	19
2.4.3.	Hücre Ekstratının Elde Edilmesi	20
2.4.4.	L-Arabinoz İzomerazın Saflaştırılması	20
2.4.4.1	Isı Şoku Uygulaması	20
2.4.4.2.	Kolon Kromatografisi	20
2.4.4.3.	SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi	21
2.5.	L-Arabinoz İzomerazın Karakterizasyonu	21
2.5.1.	Karakterizasyon Deneylerinde Kullanılan L-Arabinoz İzomeraz Aktivite Deneyi	21
2.5.2.	Enzim Miktarının Belirlenmesi	22
2.5.3.	Optimum Sıcaklık.....	22
2.5.4.	Optimum pH.....	23
2.5.5.	Metal İyonlar ve Kimyasalların L-AI Aktivitesi Üzerine Etkileri	23
2.5.6.	Isıl Kararlılığı	23
2.5.7.	pH Kararlılığı	23
2.5.8.	Substrat Spesifikliği	24
2.5.9.	Enzim Kinetiği	24
3.	BULGULAR	25
3.1.	<i>Anoxybacillus kestanbolensis</i> AC26 Sarı L- Arabinoz İzomeraz Geninin Baz Diziliminin Belirlenmesi	25
3.2.	L-Arabinoz İzomeraz Geninin pET28 a+ Vektörüne Klonlanması ve Ekspres Edilmesi.....	26
3.3.	L-Arabinoz İzomeraz Enziminin Saflaştırılması.....	27
3.4.	L-Arabinoz İzomerazın Enziminin Karakterizasyonu	28
3.5.1	L-Arabinoz İzomeraz Aktivitesinin Belirlenmesi	29
3.5.2.	Enzim Miktarının Belirlenmesi	29
3.4.3.	Optimum Sıcaklık.....	29

3.4.4.	Optimum pH.....	30
3.4.5.	Isıl Kararlılığı	31
3.4.6.	pH Kararlılığı	31
3.4.7.	Substrat Spesifikliği	32
3.4.8.	Metal İyonlarının ve İnhibitörlerin Etkisi	33
3.4.9.	Kinetik İncelemeler	35
4.	TARTIŞMA.....	36
5.	SONUÇLAR	42
6.	ÖNERİLER	44
7.	KAYNAKLAR	45
8.	EKLER	52
	ÖZGEÇMİŞ	

Yüksek Lisans

ÖZET

Anoxybacillus kestanbolensis AC26 SARI L-ARABİNOZ İZOMERAZ
KLONLANMASI, EKSPRESYONU VE KARAKTERİZASYONU

Nazan DALKIRAN

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI
2012, 51 Sayfa, 2 Ek Sayfa

L-arabinoz izomeraz (L-AI; intramoleküler oksidoredüktazlar; EC 5.3.1.4) hücre içi bir enzimdir ve pentoz fosfat yan yolu için L-arabinozun L-ribuloza veya D-galaktozun D-tagatoza geri dönüşümlü izomerizasyonu sağlar. Mikrobiyal L-arabinoz izomerazlar özellikle D-tagatoz sentezlenmesi açısından endüstriyel açıdan oldukça ilgi çekmektedir. Endüstriyel kullanım için özellikle termofilik bakterilerin enzimleri tercih edilmektedir. Yüksek sıcaklıklarda gerçekleşen endüstriyel enzimatik reaksiyonlar, kontaminasyon riskini ve substrat viskozitesini azaltmaktadır.

Bu çalışma *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26 Sarı L-arabinoz izomeraz geninin klonlanmasını, gen ürününün izolasyonunu ve karakterizasyonunu konu almaktadır. *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26 Sarı L-arabinoz izomerazını kodlayan 1503 nt⁶ lik genin baz dizilimi belirlenerek pET28a+ vektörüne klonlandı. Geni içeren vektör, *E.coli* BL21(DE3)pLysS hücrelerine aktarılarak L-arabinoz izomeraz ekspres edildi ve saflaştırıldı. Saflaştırılan L-AI'nin optimum sıcaklığı 65°C ve optimum pH'ı 8,5 olarak belirlendi. L-arabinoz için K_m değeri 6,5 mM olarak belirlendi. Mn^{+2} , Co^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+2} , Ca^{+2} , Cu^{+2} , Li, K ve Zn^{+2} metal iyonlarının etkisi incelendi. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı L-arabinoz izomeraz moleküler ağırlığı 55,6776 kDa olarak tespit edildi. Elde edilen veriler ışığında, enzimin biyokimyasal özellikleri, enzimin önemli bir endüstriyel enzim olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Anoxybacillus*, L-arabinoz izomeraz, L-ribuloz, Ekspresyon

Master Thesis

SUMMARY

CLONING, EXPRESSION AND CHARACTERISATION OF L-ARABINOSE
ISOMERASE FROM *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26 SARI
Nazan DALKIRAN

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Assoc. Prof. Sabriye ÇANAKÇI
2012, 51 Pages, 2 Pages Appendix

L-arabinose isomerase (intramolecular oxidoreductases; EC 5.3.1.4) is an intracellular enzyme and provides reversible isomerization of L-arabinose to L-ribulose or D-galactose to D-tagatose for pentose phosphate pathway. Microbial L-arabinose isomerases draw great attention in terms of synthesis of D-tagatose in industry. Particularly, thermophilic enzymes are preferred for industrial use. Industrial enzymatic reactions that occur at high temperatures reduce the risk of contamination and viscosity of substrate.

This work describes the cloning, isolation, and characterization of L-arabinose isomerase from *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26 Sari. A 1503 nt L-arabinose isomerase gene coding for L-arabinose isomerase from *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26 SARI sequenced and cloned into pET28a+ vector. Vector encoding this gene was transformed into *E.coli* BL21(DE3)pLysS, expressed and purified. It was determined that the purified L-arabinose isomerase optimum temperature is 65 °C and optimum pH is 8.5. It was determined that the enzyme had K_m (6.5 mM) for L-arabinose. Metal ion effects to L-AI were observed with chloride salts of Mn^{+2} , Co^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+2} , Ca^{+2} , Cu^{+2} , Li, K and Zn^{+} metal ions. The molecular mass of the L-AI was determined to be 55.6776 kDa on SDS-PAGE. In the light of all data it has been suggested that the enzyme's biocatalytic properties proved to be one of the important industrial enzymes.

Key Words: *Anoxybacillus*, L-arabinose isomerase, L-ribulose, Expression

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. L-arabinoz izomeraz aracılığıyla L-arabinozun ve D-galaktozun biyodönüşümü.	3
Şekil 2. <i>E.coli</i> L-arabinoz izomeraz monomerinin N-terminal,C-terminal ve aktif bölgesinin gösterimi.....	4
Şekil 3. <i>E.coli</i> LA yapısı ve dizi hizalaması	6
Şekil 4. AraC'nin rol aldığı ışık-anahtar mekanizması.....	14
Şekil 5. <i>A. kestanbolensis</i> AC26 Sarı L-AI geninin pGEM-T Easy vektörüne klonlanması.....	25
Şekil 6. <i>A. kestanbolensis</i> AC26 Sarı L-AI geninin PGEM-T easy vektörüne klonlanması.....	27
Şekil 7. Saflaştırılmış rekombinant <i>A. kestanbolensis</i> AC26 Sarı L-AI'sının SDS-PAGE analizi	28
Şekil 8. <i>A. kestanbolensis</i> AC26 Sarı L-arabinoz izomerazının aktivitesinin gösterilmesi.....	28
Şekil 9. <i>A. kestanbolensis</i> AC26 Sarı L-AI enzim miktarının belirlenmesi	29
Şekil 10. <i>A. kestanbolensis</i> AC26 Sarı L-AI'ın optimum sıcaklık grafiği.....	30
Şekil 11. <i>A. kestanbolensis</i> AC26 Sarı L-AI'ın optimum pH grafiği	30
Şekil 12. <i>A.kestanbolensis</i> AC26 Sarı L-AI'ın ısıl karalılığı.....	31
Şekil 13. <i>A. kestanbolensis</i> AC26 Sarı L-AI'ın pH karalılığı.....	32
Şekil 14. <i>A. kestanbolensis</i> AC26 Sarı L-AI'ın substrat spesifikliği.....	32
Şekil 15. <i>A. kestanbolensis</i> AC26 Sarı L-AI'ına metal iyonlarının etkisi	33
Şekil 16. <i>A. kestanbolensis</i> AC26 Sarı L-AI'ına $MnCl_2$ ve $CoCl_2$ 'nin farklı konsantrasyonlarının etkisi.	34
Şekil 17. <i>A. kestanbolensis</i> AC26 Sarı L-AI'ına Şeker Alkollerinin etkisi	34
Şekil 18. <i>A. kestanbolensis</i> AC26 Sarı L-AI'ın Michaelis-Menten eğrisi.....	35
Şekil 19. <i>A. kestanbolensis</i> AC26 Sarı L-AI'ın Lineweaver-Burk eğrisi.....	35

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Termofilik bakterilerin kullanıldığı biyoteknolojik uygulamalar.....	10
Tablo 2. <i>A.kestanbolensis</i> AC26 Sarı L- arabinoz izomeraz geninin diğer mikroorganizmaların L-AI % nükleotit benzerliği	26

SEMBOLLER DİZİNİ

DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	: Deoksinükleotid Trifosfat
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
IPTG	: İzopropil β -D-1-tiogalaktopiranozid
kDa	: Kilodalton
L-AI	: L-arabinoz İzomeraz
LB	: Luria-Bertani
nm	: Nanometre
OD	: Optik Yoğunluk
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RG	: Revers Giraz
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS- PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TAE	: Tris Asetik Asit EDTA
TE	: Tris-EDTA
Tris	: Tris (hidroksimetil) aminometan
X-gal	: 5-Bromo-4-Kloro-İndolil- β -D-galaktopiranozid
V _{max}	: Maksimum Hız

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Enzimler, hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen ve genel olarak protein yapısında olan moleküllerdir. Organik kimyada kullanılan metotlar ile gerçekleştirilmesi güç olan birçok reaksiyonun, uygun ve spesifik enzimlerle kolaylıkla gerçekleşmesi, enzimlerin canlı hücrelerden izole edilerek çeşitli amaçlar için kullanılması fikrini ortaya koymuştur. Uygun koşulların sağlanması halinde etkilerini gösterebilmeleri, enzimlerden doğal ortamlarının dışındaki pek çok alanda yararlanabilme imkânı sağlamaktadır.

Enzimatik işlemlerin geleneksel işlemlere oranla daha az miktarda atık oluşturarak, daha az çevre kirliliğine yol açması, uygun ve ekonomik şartlarda gerçekleştirilebilmesi enzim kullanımını daha cazip hale getirmektedir (Gümüsel, 2002). Ayrıca biyolojik sistemlerde olduğu kadar endüstriyel uygulamalar içinde önemli özelliklere sahip olan enzimler, son derece seçici ve verimli olmaları, ılımlı şartlarda çalışmaları ve biyolojik olarak parçalanabilmeleri gibi pek çok avantaja sahiptirler. Bu özellikleri sebebiyle endüstri açısından büyük önem taşımaktadırlar (Sağiroglu, 1999). Günümüzde enzimler tıp, kimya endüstrisi, gıda, ziraat, tekstil, deri sektörü, birçok endüstriyel malzemenin üretimi ve işlenmesi, çeşitli toksik maddelerin muamelesi gibi pek çok alanda kullanılmaktadırlar (Telefoncu, 1997).

Enzimler bitki, hayvan ve mikroorganizmalar gibi farklı kaymalardan elde edilebilmektedir. Fakat potansiyel endüstriyel uygulamalarda mikrobiyal enzimler geniş çapta kullanım alanına sahiptirler (Sağiroglu, 1999). Enzim kaynağı olarak mikroorganizmaların tercih edilmesinin nedenleri; mikroorganizma kaynaklı enzimlerin katalitik aktivitelerinin yüksek olması, istenmeyen yan ürünleri oluşturmaması, daha kararlı ve daha ucuz olmaları, büyük boyutlarda ve yüksek saflıkta elde edilmeleri gibi avantajlara sahip olmasıdır. Örneğin mikrobiyal enzimler ekstrem sıcaklık ve pH değerlerinde çok yüksek düzeyde aktivite gösterebilirler (Horikoshi, 1999; Wiesman, 1987). Ayrıca mikroorganizma kökenli enzimlerin suda çözünmeyen matrikslerle immobilize edilerek daha uzun süre kullanılabilmesi, endüstriyel alanlarda mikrobiyal enzimlerin kullanılmasını sağlamıştır (Gümüsel, 2002).

Bu bilgiler doğrultusunda enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle, biyoteknolojinin endüstriyel enzimlerle ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar, daha da önem kazanmaktadır.

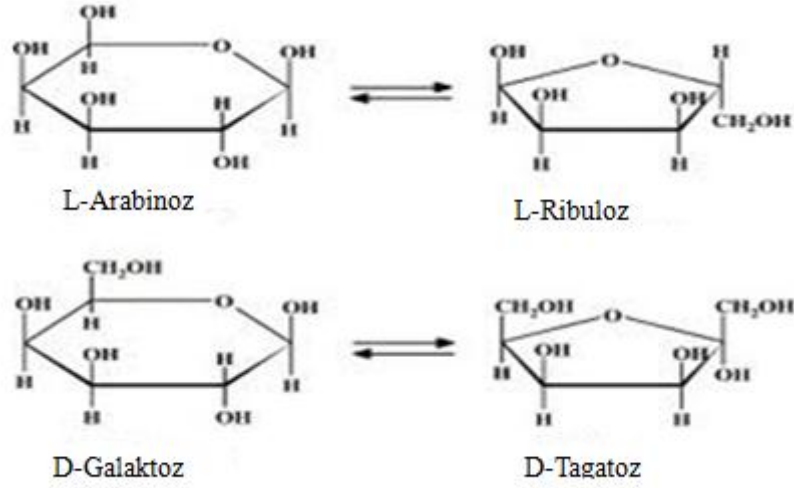
1.2. İzomerazların Alt Sınıfları

İzomerazlar, bir molekül içindeki değişiklikleri katalize ederler ve yaptıkları kataliz reaksiyonlarına göre alt sınıflara ayrılırlar.

1. EC5.1 Rasemaz ve Epimerazlar
2. EC5.2 Cis-trans İzomerazlar
3. EC5.3 İntromoleküler Oksidoredüktazlar
4. EC5.4 İntromoleküler Transferazlar (Mutazlar)
5. EC5.99 Diğer tür izomerizasyon reaksiyonlarını katalize edenler.

1.2.1. L-Arabinoz İzomerazların Özellikleri

L-arabinoz izomeraz, bu alt sınıflar arasından EC5.3 intramoleküler oksidoredüktazlar arasında yer alır. L-arabinoz izomeraz (EC 5.3.1.4) hücre içi bir enzimdir ve pentoz fosfat yan yolu için L-arabinozun L-ribuloza veya D-galaktozun D-tagatoza geridönüşümlü izomerizasyonunu sağlar. (Kim vd., 2001; Roh, vd., 2000) (Şekil 1). *Mycobacterium smegmatis* SMDU suşunun karbohidrat metabolizmaları çalışmaları sırasında L-ribulozun % 90 oranında L arabinoza dönüşümü rapor edilmiştir (Ahmed vd., 1999; Ahmed and Izumori, 2001).



Şekil 1. L-arabinoz izomeraz aracılığıyla, L-arabinozun ve D-galaktozun biyodönüşümü (Manjasetty ve Chance, 2006).

L-AI'ların büyük bir çoğunluğu aktiviteleri ve termal kararlılıkları için metal iyonlarına ihtiyaç duyarlar (Rhimi ve Bejar, 2006). Özellikle aşırı termofillerin Co^{+2} gereksiniminin aksine, mezofilik ve termofilik L-AI'ların isomerizasyon reaksiyonlarını arttırmak için kofaktör olarak Mn^{+2} gereksinimi olduğu rapor edilmiştir (Kim vd., 2002; Lee vd., 2004). Ancak mezofilikler için yapılan çalışmalarda bu özelliğinin mutlak gerekli olmadığı (Banerjee vd., 1995; Patrick vd., 1971), termofilik L-AI'ların ise Mn^{+2} metal iyonlarına mutlak gereksinimi olduğu vurgulanmıştır (Lee vd., 2005).

L-arabinoz izomeraz enzimi L-arabinoz için spesifik olmasına rağmen, diğer aldozları da (D-galaktoz, DL-fukoz ve D-xyloz) keto formlarına dönüştürebilir. L-arabinozun enzimin aktif bölgesine bağlanması, L-arabinozun C2 ve C5 üzerindeki hidroksil gruplarının hidrojenleri ve enzimin E330 ve E305 aminoasitlerinin karboksil gruplarının oksijenleri ile hidrojen bağı yapması ile olur (Manjasetty ve Chance, 2006).

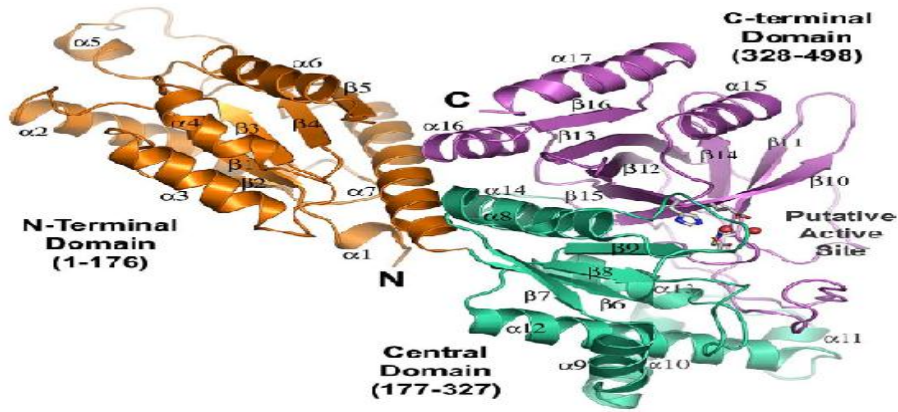
1.2.2. L-arabinoz İzomerazın Çalışma Mekanizması

L-AI'ın yapısı henüz tam olarak çözülmüş değildir. Reaksiyon mekanizmasını anlamak için X-ray kristallografi çalışmalarına ihtiyaç vardır. İzomerazlar aralarında düşük sıra benzerliği göstermesine rağmen, L-arabinoz izomeraz ksiloz izomeraz ile birçok benzerlik gösterir. İki enzim de aldöz-ketoz izomerizasyonunu gerçekleştirir ve hidrit kayması mekanizması ile çalışırlar. Bu mekanizma, substrat halkasının açılması, hidritin

C-2'den C-1'e kaydırılması ve halkanın kapanması şeklinde ceryan etmektedir. Bu mekanizmada ayrıca iki değerlikli katyonlar önemli rol oynamaktadır (Rose vd., 1969).

1.2.3. L-Arabinoz İzomerazın Kristal Yapısı

L-arabinoz izomerazın monomer yapısı 3 domainden oluşmaktadır; 1) N-terminal domain, 2) Merkezi domain ve 3) C-terminal domaini. Asimetrik biriminde kristallografik trimer yapı oluşturur. Kristal içinde paketlenme, hegzamer oluşturabileceği fikrini önerir. Daha önce yapılan elektron mikroskopisi ve biyokimyasal çalışmalar mezofilik araA enziminin solusyon içinde hegzamer olduğunu desteklemektedir, ancak termofilik araA enziminin tetramer yapıda olduğunu ileri sürer (Patrick ve Lee ,1969; Wallace vd., 1978). Genel olarak araA monomerinin yapısı 16- β zincir ve 17- α heliks içerir (Hutchinson ve Thornton, 1996) (Şekil 2.)

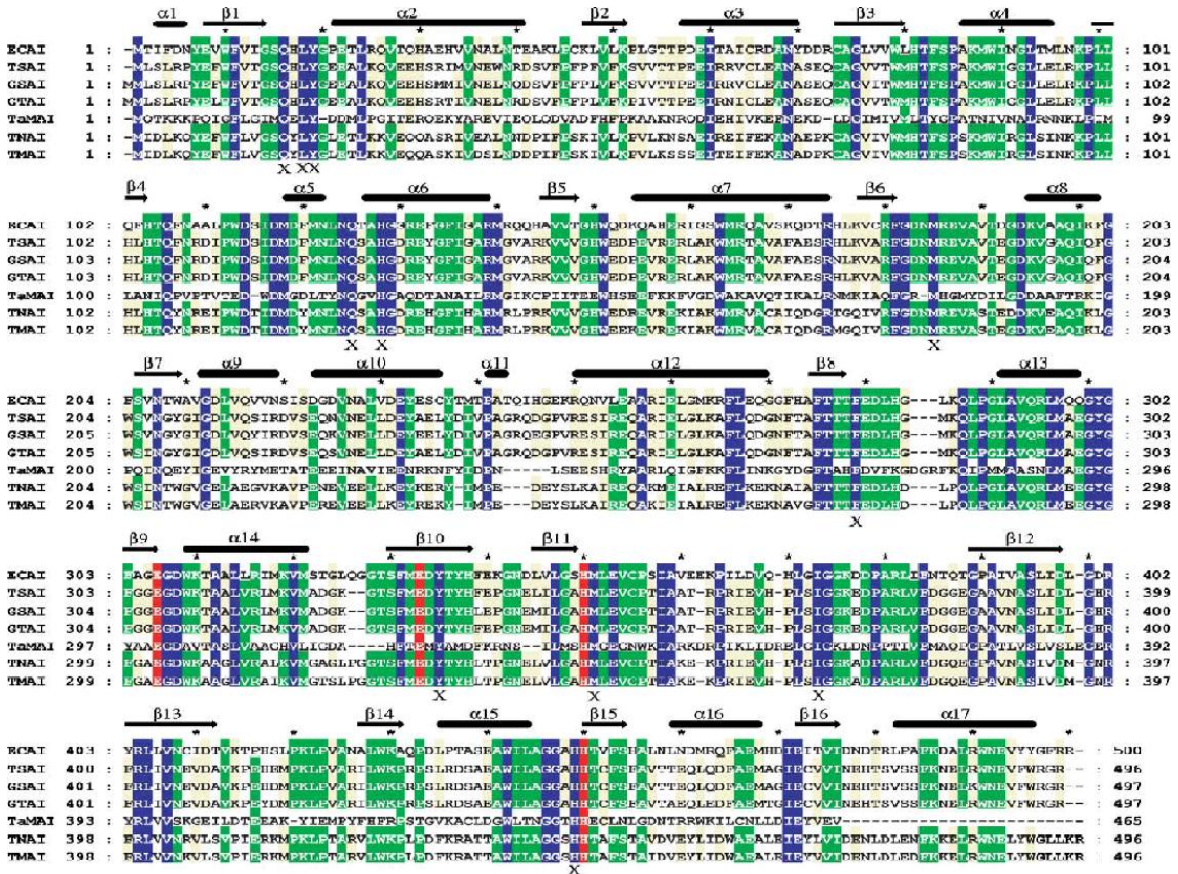


Şekil 2. *E.coli* L-arabinoz izomeraz monomerinin N-terminal, C-terminal ve aktif bölgesinin gösterimi (Manjasetty ve Chance, 2006).

1.2.4. L-Arabinoz İzomerazın Alt Birim Arayüzü ve Aktif Bölgesi

Alt birimler arasındaki etkileşimler, potansiyel tuz köprüleri, iyon çiftleri ve hidrojen bağlarından oluşur. Ayrıca alt birim etkileşimleri önemli ölçüde hidrofoik etkileşimleri de içerir. Mezofilik, termofilik ve aşırı termofilik enzimlerde alt birim etkileşimlerine katılan birçok bölge korunmuştur. Bitişik alt birim ara yüzlerindeki yarıkların oluşumu şaşırtıcı derecede üç arayüz bölgesi ile uyumludur. Şekil 3'te X olarak ifade edilen bu aminoasitler yarık boyunca sıralanan her üç domainde de vardır. Bu amino asitler mezofilik, termofilik ve aşırı termofilik enzimler arasında iyi korunmuştur. Bu aminoasitlerin çoğu aktif bölgeye giren substratın ve aktif bölgeden çıkan ürünün geometrisini değiştiren yapısal düzenlemeler için önerilen loop bölgelerinde yer alır (Manjasetty ve Chance, 2006).

Ayrıca alt birim arayüzlerinde güçlü bir elektron yoğunluğunun olduğu ve bu bölgelerin proteine metal iyonlarının bağlanma bölgeleri (H450, H350, E330, E306) olduğu ileri sürülür (Stark ve Russell, 2003).



Şekil 3. E.coli L-AI yapısı ve dizi hizalaması; Termofilik AI'lerden TSAI (*Thermus* sp tr Q846C7. IM6501) 60%; GSAI (*Geobacillus stearothermophilus* gi5616309) %59; GTAI (*Geobacillus thermodenitrificans* gi49574582,) %60 ve TaMAI (*Thermoanaerobacter metharanii* trQ70G56) % 24 benzerlik göstermektedir. Aşırtermofilik AI'lerden TNAI (*Thermotoga neapolitana* tr Q8RMB9) %54 ve TMAI (*Thermotoga maritima* sp Q9WYB3) %53 benzerlik göstermektedir. Korunmuşluk derecesine göre maviyle gösterilen aminoasitler %100; yeşille gösterilenler %80 ve krem ile gösterilenler ise %60 korunmuş aminoasitlerdir. Aktif bölgede oldukları kabul edilen aminoasitler ise (E306, E333, H350 ve H450) kırmızı ile gösterilmiştir. İkincil yapı elementleri (β -zincirler ve α -sarmallar) sırasıyla oklar ve silindirlerle gösterilmiştir. Hizalamanın altında X olarak gösterilenler ise yarıklarda bulunan amino asitlerdir (Manjasetty ve Chance, 2006).

1.2.5. L-Arabinoz İzomerazın Mikrobiyal Kaynakları

Enzim kaynağı olarak, çeşitli biyokatalizör kaynakları kullanılmaktadır. Bunların içinden L-arabinoz izomeraz kaynağı olarak patenti alınan bakteriler; *A. flavithermus* (Li vd., 2011), *E. coli* (Roh vd., 2000), *G. stearothermophilus* (Kim vd., 2001), *Thermotoga neapolitana* (Kim vd., 2002), *Thermus* sp. (Kim vd. 2003), *Thermotoga maritima* (Lee vd., 2004), ve *Thermoanaerobacter mathranii* (Jørgensen vd., 2004). *Arthrobacter globiformis*

(Izumori vd., 1984), *Gluconobacter oxydans* (Manzoni ve Rollini 2001), *Enterobacter agglomerans* (Muniruzzanman vd., 1994) ve *Klebsiella pneumoniae* (Shimonishi vd. 1994) olarak rapor edilmiştir. Bu mikroorganizmalar arasında *A. kestanbolensis* AC26 Sarı L-arabinoz izomerazı bugüne kadar rapor edilmemiştir.

Endüstriyel kullanım için özellikle termofilik bakterilerin enzimleri tercih edilmektedir. Yüksek sıcaklıklarda gerçekleşen endüstriyel enzimatik reaksiyonlar, kontaminasyon riskini ve substrat viskozitesini azaltmaktadır.

1.3. *Anoxybacillus* Cinsinin Genel Özellikleri

Anoxybacillus cinsi Pikuta vd., (2000) tarafından *Bacillus* cinsinden ayrılıp bakteri sistematığıne kazandırılmıştır. *A. pushchionensis* K1^T bu cinsin tip türüdür *Anoxybacillus* cinsi de bu şekilde sıcak su kaynaklarından izole edilerek sistematığıne kazandırılmıştır. *Anoxybacillus* cinsi *Bacillus* cinsinden Pikuta vd., (2000) tarafından ayrılan bir cinstir *Anoxybacillus* cinsini *Bacillus* cinsinden ayırmada 16S rRNA gen sıraları kullanılmaktadır. 16S gen analizleri sonucu *Anoxybacillus* cinsinin bakterileriyle *Bacillus* cinsinin bakterileri arasında % 95'den daha az benzerlik olduğu görülmektedir. Ancak *Anoxybacillus* cinsinin kendi üyeleri arasındaki benzerlik çoğu zaman % 97 nin üzerindedir ve cins içinde 16S sonucuna göre bir tür ayrımı yapmak oldukça zordur. *Anoxybacillus* cinsi bakterilerin kendi arasındaki ayrımı DNA-DNA hibridizasyonu ile yapmak mümkündür (İnan, 2011).

Bu cins 19 tür içermektedir. Bu türler; *A. flavithermus*, *A. kestanbolensis*, *A. ayderensis*, *A. pushchinoensis*, *A. voinovkiensis*, *A. gonensis*, *A. bogrovensis*, *A. contaminans*, *A. caldiproteolyticus*, *A. eryuanensis*, *A. mongoliensis*, *A. salavatliensis*, *A. tengchongensis*, *A. tepidamans*, *A. thermarum*, *A. kamchatkensis*, *A. rupiensis* ve *A. karnarcensis*, *A. amylolyticus*'dur.

Genellikle bu cinse ait bakteriler fakültatif anaerop, gram pozitif, hareketli veya hareketsiz ve endosporludurlar. Orta derecede termofilik özellikteki bakterilerdir.

Anoxybacillus cinsine ait bakterilerin habitatları aşırı sıcak olmayan termal kaplıcalardır. Optimum büyüme sıcaklıkları ortalama 55 °C olan bu bakteriler 37-70 °C arasında hayatta kalabilmektedirler.

1.4. Enzim ve Termal Kararlılık

Mezofilik organizmalardan elde edilen proteinlerin denatüre olduğu yüksek sıcaklıklarda termal kararlı proteinler aktivitelerini korurlar ve kararlı halde kalırlar. Mezofilik ve termofilik proteinler arasındaki sistematik farklılıkları belirlemek için Kumar ve arkadaşları (2001) yapmış oldukları bir araştırmada aşırı termofilik *Pyrococcus furiosus* ve mezofilik *Clostridium symbiosum* bakterilerindeki glutamat dehidrojenaz enzimini incelediler. Mezofilik glutamat dehidrojenazın 107 tuz köprüsü içerirken termofilik glutamat dehidrojenazın ise 168 tuz köprüsü içerdiğini belirlediler. Böylece yapılan çalışmalar mezofilik proteinlerdeki tuz köprüsü sayısının, termofilik proteinlerdeki tuz köprüsüne sayısına oranla yaklaşık % 70 daha az olduğunu göstermiştir. Tuz köprülerinin sayısı ile proteinin termal kararlılığı arasında kuvvetli bir korelasyon vardır. Bunun nedeni tuz köprüleri yüksek sıcaklıklarda daha karardır ve yüksek sıcaklıklardaki tuz köprülerini kırmak için daha fazla enerjiye ihtiyaç duyulur. Böylece tuz köprüleri yüksek sıcaklıklarda protein çözülmesine karşı kinetik kararlılık sağlar (Das ve Gerstein, 2000).

Yapılan bir çalışmada, termal kararlılığı arttıran en az 13 farklı fiziksel ve kimyasal faktörün olduğunu gösterilmiştir (Querol vd., 1996). Bu faktörlerden bazıları tuz köprülerinin optimizasyonu, daha kısa halkalar, halkalarda glisin miktarının azaltılması ve prolin miktarının artırılması, hidrojen bağları ve proteinlerin iç kısımlarındaki hidrofobik paketlemelerdir. Bu faktörler üzerine birçok araştırmacı tarafından yapılan araştırmalar mevcuttur (Colacina ve Crichton, 1997; Grupta vd., 1995; Querol vd., 1996; Jaenicke ve Bohm, 1998; Scandurra vd., 1998; Vieille vd., 1996; Vogt ve Argos, 1997).

Haney vd., (1999) termofilik bir arkeobakteri olan *Methanococcus jannaschii*'den izole edilen 115 adet termofilik protein ile mezofilik *Methanococcus* türlerindeki bu 115 adet proteinin homoloğu olan proteinlerin sıralarını karşılaştırmıştır. Bu çalışma sonucunda proteinin termal kararlılığının oluşmasında, amino asit değişimlerinin önemli bir rol oynadığını ortaya koymuşlardır. Termofilik proteinlerin yüklü amino asitler (Arg, Lys, His, Asp ve Glu), valin ve izolösin içeriğinde artış görülürken, yüklü polar amino asit (Ser, Thr, Gln, Asn, Cys) içeriğinde ve denatürasyona sebep olan asparagin ve glutamin içeriğinde azalma olduğu görülmüştür.

Mezofilik proteinler termofilik proteinler ile karşılaştırıldığında, bunların daha az halka delesyonuna maruz kaldığı görülür ve bu yüzden termofilik proteinler mezofilik proteinlerden daha kısadır. Halka delesyonu proteinin üç boyutlu yapısının entropisini

düşürerek, serbest enerjisini arttırır. Proteinlerdeki halka delesyonu protein kararlılığını arttırır (Thompson ve Eisenberg, 1999). Aynı zamanda termofilik proteinler üç boyutlu yapılarına katlanırken, daha küçük ve daha az sayıda oyuklar oluşturabilecek daha etkili bir paketlemeye sahiptirler (Russell vd., 1997, 1998).

1.5. Termofilik Organizmaların ve Enzimlerin Biyoteknolojide Kullanımı

Termofilik organizmalar, mikrobiyologlar ve biyokimyacılar için oldukça cezbedici bir konudur. Termofilik organizmaların hücre bileşenleri termal kararlı olduğu gibi, aşırı derecede asidik ve alkalik şartların denatürasyonlarına da dirençlidir (Haki ve Rakshit, 2003).

Günümüzde doğal kaynakların azalması nedeniyle mikroorganizmalar birçok üretim alanı için potansiyel kaynak olarak görünmekte ve bu konuda yoğun çalışmalar yapılmaktadır (Topal vd., 2000). Endüstride son yıllarda termofilik mikroorganizmalardan elde edilen enzimler tercih edilmektedir. Termofilik enzimlerin pH değişikliklerine ve yüksek sıcaklıklara karşı gösterdiği kararlılık, bu enzimlerin endüstri alanlarında tercih edilme nedenleridir. Termofilik enzimler, mikroorganizmaların optimum büyüme sıcaklığından daha yüksek bir sıcaklıkta bile kararlı ve aktiftir. Bu yüksek sıcaklıklar, reaksiyon sırasında meydana gelebilecek kontaminasyon riskini önemli derecede azaltır, çünkü biyolojik döngüde kontaminasyona sebep olan bakterilerin çoğu mezofiliktir (Burg, 2003). Ayrıca bu yüksek sıcaklıklarda, reaksiyona katılan maddelerin difüzyon hızları ve çözünürlükleri önemli derecede artar ve bu da daha fazla ürün oluşumunu sağlar (Kumar ve Swati, 2001; Mozhaev, 1993).

Bu nedenle termofilik organizmalar biyoteknoloji açısından oldukça önem taşımakta ve pek çok biyoteknolojik uygulamada yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Farklı ekolojik alanlardan termofilik mikroorganizmaların fazla miktarda izolasyonu ve bu mikroorganizmalardan faydalı enzimlerin ekstraksiyonu ile biyoteknoloji alanında daha büyük adımlar atılabilir (Kohilu vd., 2001).

Biyoteknolojide termofilik organizmalar, bazı yakıt ve kimyasalların üretilmesinde ve genetik manipulasyonların yapılabilmesinde kullanılmasına rağmen, biyoteknoloji açısından en önemli özellikleri biyokimyasal reaksiyonları çok yüksek sıcaklıklarda katalizleyebilen termofilik enzimleri üretmeleridir.

Bu enzimlerden bazıları, son zamanlarda saflaştırılmış ve başarılı bir şekilde klonlanıp mezofilik konaklarda ekspres edilmiştir. Bu enzimlere örnek olarak, DNA polimerazlar, amilazlar, ksilanazlar, kitinazlar, selülazlar, proteazlar, lipazlar, izomerazlar ve gıda ve kimya endüstrilerinde DNA'yı modifiye edebilen enzimler verilebilir. Bu enzimler moleküler biyoloji alanında, nişasta endüstrisi, gıda endüstrisi, petrol endüstrisi, kimyasal endüstrisi, ilaç endüstrisi, kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi gibi pek çok endüstri alanında geniş ölçüde kullanılmaktadır. Termofilik bakterilerin kullanıldığı biyoteknolojik uygulamalar Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. Termofilik bakterilerin kullanıldığı biyoteknolojik uygulamalar

Enzim	Sıcaklık Aralığı (°C)	Reaksiyonları	Kullanım alanları
Amilolitik enzimler	90-100	Nişasta → dekstroz şurup	Fırıncılık, mayalanma, deterjan, gıda, ve içecek endüstrisinde ve tatlandırıcı üretiminde
Ksilanaz	45-65, 105	Kraft hamuru → ksilan+lignin	Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde
Kitinazlar	65-75	Kitin → kitobioz Kitin → N-asetil glukozamin Kitin → deasetilaz	Gıda, kozmetik, ilaç, çimento endüstrisinde, atık su temizlenmesinde, kâğıt üretiminde
Selülaz	45-55, 95	Selüloz → glukoz	Deterjan ve tekstil endüstrisinde, çöp ve atıkların işlenmesinde
Proteaz	65-85	Protein → peptidler ve amino asitler	Fırıncılık, mayalanma, deterjan, gıda, ilaç ve deri endüstrisinde
Lipazlar	30-70	Yağ uzaklaştırması, hidrolizis, alkalizis, aminolizis	Süt, deterjan, kağıt, ilaç, kozmetik, deterjan, deri ve tekstil endüstrisi
DNA polimeraz	90-95	DNA'nın çoğaltılması	Genetik mühendisliği / PCR

1.5.1. L-Arabinoz İzomerazın Endüstriyel Önemi ve L-ribuloz

L-arabinoz izomeraz (EC 5.3.1.4), L-arabinozu L-ribuloza kolayca dönüştürür (Cheetham ve Wootton 1993; Roh vd., 2000). Bir ketopentoz olan L-ribuloz, pahalı ve doğada nadir bulunan bir şekerdir. Özellikle tatlandırıcı ve ilaç endüstrisinde, yapay ve nadir bulunan şekerlere olan ilgi sürekli artmaktadır (Scott, 2002). Mikrobiyal ve enzimatik reaksiyonlar, D şekerleri L şekerlere dönüştürmek için oldukça uygundur. L-ribuloz farklı organizmalarda, bir metabolik yolun ara ürünü olmasına rağmen doğada nadir bulunur (Ahmed, 2001). Biyoteknolojik L-ribuloz üretimi esas olarak, ribitolun ham madde olarak kullanıldığı çalışmalarda incelenmiştir. Özellikle asetik asit bakterileri kullanılarak ribitolden L-ribuloz üretimi çalışmaları yapılmıştır (Ahmed vd., 1999). Ribitolden L-ribulozun üretildiği başka çalışmalarda mevcuttur (Compello ve Veiga, 1973; Moses ve Ferrier, 1962; Osao vd., 2001). Fakat ribitol oldukça pahalıdır ve doğada nadir bulunmaktadır (Aldachi vd., 2001). Bunun aksine bir aldopentoz olan L-arabinoz doğada bol miktarda bulunmaktadır. Özellikle hemiselüloz ve pektin gibi lignoselülozik maddelerin genel bileşenidir. Örneğin, şeker endüstrisinin yan ürünü olan şeker pancarı posasının, önemli miktarlarda L-arabinoz içerdiği rapor edilmiştir. L-arabinoz, kağıt hamurundan asit veya enzimatik hidroliz, filtrasyon ve aseton damıtma yöntemleri ile kolayca izole edilebilir (Spagnuolo vd., 1999). L-ribuloz pek çok bakteride, L-arabinoz izomeraz ile L-arabinozu kullanan yolun bir ara ürünüdür.

L-arabinoz izomeraz, substratların benzer konfigürasyonları sayesinde, endüstriyel açıdan dikkat çeken D-galaktozun D-tagatoza dönüşümünü de gerçekleştirir. Ticari olarak kimyasal ve biyolojik tagatoz üretimi yapılmaktadır. Her iki yöntemde galaktozun tagatoza izomerizasyonuna dayanmaktadır (Cheetham ve Wootton 1993; Roh vd., 2000). D-tagatoz, D-galaktozdan kimyasal olarak üretilmesine rağmen, kimyasal üretim, işlemlerinin oldukça kompleks olması, yan ürünlerin oluşması gibi bazı dezavantajlara sahiptir. L-arabinoz izomeraz, doğada fazla bulunan ve ucuz olan D-galaktozu D-tagatoza çeviren etkili bir enzimdir.

1.6. L-Arabinoz Operonu

Operon, işlevsel olarak ilişkili genlerin oluşturduğu gen kümeleridir. Genellikle bir polisistronik mRNA üzerindeki, çok sayıda polipeptiti (veya rRNA) kodlayan genleri kapsar (Brock, 2010). L-arabinoz operonu (*araBAD*) bu sistemlerden biridir.

Bu çalışmada incelenen *A. kestanbolansis* AC26 Sarı L-arabinoz izomerazı, L-arabinoz operonunun bir parçasıdır ve operonun çalışma mekanizmasının bilinmesi, bu operonda bulunan genlerin nasıl çalıştığını anlamak için gereklidir.

1.6.1. L-Arabinoz Operonunun Regülasyonu

Esherichia coli, karbon ve enerji kaynağı olarak L-arabinoz üzerinde büyüebilmektedir (Scheif, 1996). Arabinoz operonunun genlerinden birinin ürünü olan AraC proteini ekspresyon seviyesini kontrol eder ve bu nedenle de arabinoz varlığının algılayıcısıdır. AraC proteini, arabinozun katabolizması için gerekli olan *araB*, *araA*, *araD* genlerinin yanı sıra, arabinozun alınımı için gerekli olan *araE*, *araFGH* genlerinin şeker varlığındaki indüklenme oranları hakkında da bilgi verir (Scheif, 2002).

Arabinoz operonunun genetik analizlerine 40 yıldan fazla zaman önce Ellis Englesberg tarafından başlanmıştır (Gross ve Englesberg, 1959). Englesberg ve arkadaşları AraC proteinin, diğer arabinoz spesifik proteinlerin ekspresyonunun indüklenmesinde primer aktivitesinin olduğuna dair, oldukça ikna edici kanıtlar sağlamışlardır (Englesberg vd., 1965, 1969; Gielow vd., 1971; Sheppard ve Englesberg, 1967). Yani, AraC ekspresyonunun açılmasında pozitif bir rol oynamaktadır. Daha sonra, tanımlayıcı biyokimyasal deneyler gerçekten de *araB*, *araA*, *araD*, genlerine hizmet eden p_{BAD} promotorunun ekspresyonunun açılmasında AraC'nin pozitif bir rol oynadığını kanıtlamıştır (Greenblatt ve Schleif, 1971).

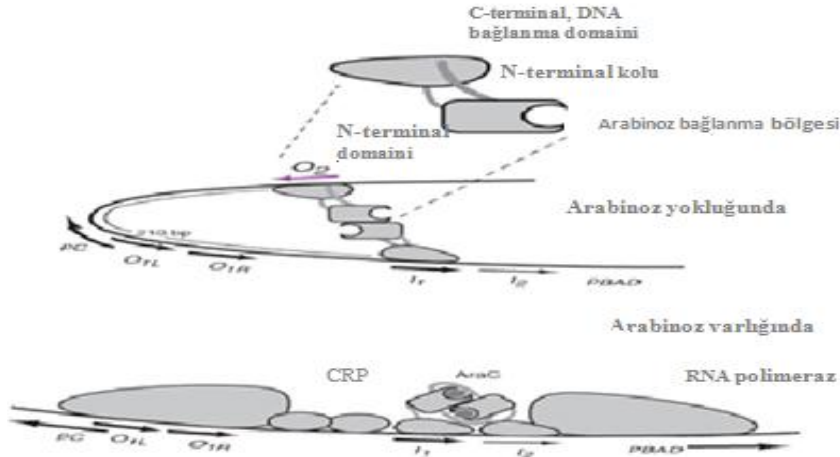
Englesberg'in genetik çalışmaları aynı zamanda AraC'nin p_{BAD} promotorunu negatif olarak baskıladığını ortaya çıkarmıştır. Sadece baskılamanın varlığını değil aynı zamanda baskılama için gerekli bölgenin promotordan en az birkaç yüz nükleotit yukarıda yer aldığını doğrulamak için yapılan çeşitli deneyler DNA loop'un keşfedilmesine yol açmıştır (Dunn vd., 1984). Loop oluşumunda, AraC proteini aynı anda DNA üzerinde 200'den fazla baz çifti ile ayrılan 2 alana bağlanır ve sonuç olarak DNA loop yapısı meydana gelir. Bunun sonucunda ise p_{BAD} promotoru negatif olarak baskılanır.

1.6.1.1. Arabinoz Varlığına Cevap Olarak DNA Loop ve Işık -Anahtar Mekanizmasının Düzenlenmesi

AraC proteini homodimer olarak fonksiyon göstermektedir. DNA bağlanma domaini ve arabinoz bağlanma bölgesini içeren dimerizasyon domaininden oluşur.

Arabinozun yokluğunda AraC proteini I_1 ve O_2 bölgelerine bağlanarak DNA loop oluşumunu sağlar (Şekil 3). Böylece hem RNA polimerazın p_{BAD} promotoruna ulaşımını hem de cAMP-CRP (cAMP reseptör protein) kompleksinin CRP' ye bağlanmasını engeller. Aynı zamanda p_C promotorundan da kendi sentezini engellemiş olur. Bu şekilde negatif regülasyonda rol alır.

Ancak arabinozun varlığında AraC bitişik olan I_1 ve I_2 bölgelerine bağlanmayı tercih eder. I_2 bölgesine bağlanma muhtemelen doğrudan RNA polimeraz etkileşimi ile sonuçlanır. Oysaki RNA polimerazda aynı zamanda I_1 ' de bağlı bulunan AraC'nin DNA bağlanma bölgesi ile temas eder. Bu nedenle indüklenme meydana gelir, çünkü artık AraC DNA looping yapmaz ve AraC, RNA polimeraz ile etkileşerek aktif olarak transkripsiyonu destekler (Seabold ve Schleif, 1998) (Şekil 4).



Şekil 4. AraC'nin rol aldığı ışık-anahtar mekanizması: L-arabinoz varlığında N-terminal kol DNA bağlanma bölgesi ile etkileşir ve O_2 ve I_1 bölgelerine bağlanarak loop oluşumunu sağlar. Bu p_C ve p_{BAD} promotorlarının ikisininide baskılar. L-arabinoz yokluğunda arabinoz ve N-terminal kol arasında etkileşim meydana gelir DNA bağlanma bölgeleri ayrılır. Bu bölgeler ayrı ayrı I_1 ve I_2 bölgelerine bağlanır ve p_{BAD} promotorunun indüklenmesine neden olur (Schleif, 2002).

Öncedende bahsedildiği üzere L-arabinoz izomerazlar endüstriyel kullanım alanına sahip olan enzimler arasında yer almaktadır. Ancak ülkemizde bu konu ile ilgili yapılmış fazla çalışma bulunmamaktadır. Bundan dolayı, bu çalışma ile özellikle endüstriyel alanda kendi çalışmalarımızın sonuçları ve ürünlerinden faydalanabilmek amaçlanılmıştır. Bu doğrultuda, *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26 Sarı L-arabinoz izomerazının klonlanması ve saflaştırılması yapılmıştır. Saflaştırılan enzimin karakterizasyon çalışmalarında, etkili olduğu pH ve sıcaklık değerleri, metal iyonları ile etkileşimi, substrat spesifikliği belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmalar sonucunda L-arabinoz izomerazın endüstriyel açıdan önemi ve bu alanda kullanılabilirliği belirlenerek endüstriye ve literatüre yeni bir enzim kazandırmak amaçlanılmıştır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Kimyasallar

Tripton (Merck V441613949), Maya ekstrakt (Merck VM175053), NaCl (Merck K34243404), Etil alkol, Kanamisin (Applichem A1493), IPTG (Applichem A1008), Amfisilin (Applichem A0839), *NheI* (Promega), *EcoRI* (Promega), *BamHI* (Fermentas), T4 DNA ligaz (NEB), Taq DNA polimeraz (Promega), Genomik DNA İzolasyon Kiti (Promega A1125), Jelden DNA Çıkarma Kiti (Fermentas K0513), EDTA (Merck 84211000), dNTP seti (Promega), pGEM-T Easy Klonlama Vektörü (Promega A1360), pET-28a(+) Ekspresyon Vektörü (İnvitrogen), Etidyum Bromür (Sigma), Agaroz (Sigma), Lizozim (Merck), CaCl₂ (Aktar Kimya), X-Gal (Applichem A10070005), Commassie Brilliant Blue G-250, Commassie Brilliant Blue R-250 (Merck 2C2133453), Fosforik Asit (Merck 563.2500), BSA (NEB), HisLink™ Protein Purification kiti (Promega), Sodyum Asetat (Merck TA867065), K₂HPO₄ (Merck A678671), KH₂PO₄ (Merck 567300), Trizma Baz (Sigma T1503), Nutrient Agar (MerckVL646350), SDS (Merck), Akrilamid (Sigma A8887), Bis-akrilamid (Promega), Bromofenol mavisi (Gerbu 080702), β-merkaptotanol (Merck 805740), Metanol, Asetik asit (Riedel-dan Haen 27225), Gliserol (Merck K40789992008), Amonyom sülfat (Merck A734116), TEMED (Janssen Chimica), Protein markır (Biolab), KCl (Merck), CoCl₂ (Merck), ZnCl₂ (Merck), MgCl₂ (Sigma), CaCl₂ (Aktar Kimya), LiCl (Sigma), FeSO₄ (Merck), CuCl₂ (Merck), MnCl₂ (Merck), Karbazol (Sigma), L-sistein (Merck), Sülfirik asit (Merck), MOPS (Amresco), Glisin (Merck), L-arabinoz (Sigma), D-riboz, D-mannoz (Bacto), D-ksiloz (Fisher Bioreagents), D-galaktoz (Sigma), D-glukoz (Himedia), İmidazol (Merck).

2.2. Kullanılan Hücreler

Escherichia coli BL21(DE3)pLysS, *Escherichia coli* JM101, *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26 Sarı

2.3. Moleküler Çalışmalar

2.3.1. Genomik DNA İzolasyonu

Agar ortamından alınan tek koloni, 3 mL hacimli Luria Bertani (LB) ortamına aktarılarak *A. kestanbolensis* AC26 Sarı hücreleri bir gece boyunca 55 °C'de bir sulu çalkalayıcıda inkübe edildi.

İnkübe edilen gece kültürü 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Hücreler 480 µl 50 mM EDTA içerisinde çözüldü. 120 µl 10 mg/ml lizozim ilave edildi, hafifçe pipetleyerek karıştırıldı ve 37 °C'de 60 dk inkübe edildi. Elde edilen karışım 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Tüpe 600 µl *Nuclei Lysis* solüsyonu eklendi ve hafifçe pipetle karıştırıldı. Karışım 80 °C'de 5 dk inkübe edildi ve oda sıcaklığına ulaştıktan sonra 3 µl *RNase* solüsyonu eklendi. Tüp 2-5 kez alt-üst edildi ve 37 °C'de 30 dk inkübe edildi. Karışım oda sıcaklığına ulaştıktan sonra 200 µl *Protein Precipitation* solüsyonu eklendi ve 20 sn vorteksledikten sonra 5 dk süreyle buzda bırakıldı. 5 dk sonunda 13.000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Süpernatant içinde 600 µl izopropanol bulunan yeni bir ependorfa aktarıldı. Ependorf pellet oluşuncaya kadar alt üst edildi ve 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Süpernatant döküldü ve kurutma kağıdı kullanarak tüm süpernatant sıvısının atıldığından emin olundu. Pelletin üzerine 600 µl oda sıcaklığında % 70'lik etanol eklendi ve alt üst edildikten sonra 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Pipetörle süpernatant uzaklaştırıldı ve etanolün tamamının uzaklaşması için mikrosantrifüj tüpü 15 dk 37 °C'de bekletildi. Pellet üzerine 100 µl *DNA Rehydration* solüsyonu eklendi ve 65 °C'de 1 saat inkübe edildi. Genomik DNA izolasyonu tamamlandıktan sonra, elde edilen DNA kullanılacağı zaman kadar +4 °C'de saklandı.

DNA miktarı spektrofotometrede 260 nm'de yapılan ölçümler ile hesaplandı. DNA'lar % 0,8'lik 0,5 µg/mL etidyum bromür içeren agaroz jelde yürütüldü ve BioDocAnalyze sistemi kullanılarak görüntülendi.

2.3.2. Primerler

Anoxybacillus cinsine ait bir tür olan *A. flavithermus* (NCBI GenBank: CP000922) türünün genom haritasından yararlanılarak *Anoxybacillus* cinsi üyelerinde kullanılabilen 2 adet PCR primeri dizayn edildi.

Primerlerin sıraları şu şekildedir:

AraisoF: 5'- gTg TTA TTA TTA CgT CCT T -3' 19 nt

AraisoR: 5'- CgT AAA ggC ggT gAA gTT gCC -3' 21 nt

2.3.3. L-Arabinoz İzomeraz Geninin PCR Yöntemi ile Baz Diziliminin Belirlenmesi ve Klonlanması

AraisoF ve AraisoR primerleri ile *A. kestanbolensis*'in genomik DNA'sı kalıp olarak kullanılarak PCR reaksiyonları gerçekleştirildi. PCR şartları şu şekildedir: 95 °C'de 2 dakikalık denatürasyon basamağı ardından 36 döngü 94 °C'de 1 dk denatürasyon, 50-55 °C'de 1.30 dk bağlanma (annealing) ve 72 °C'de 2 dk uzama (extention) ve son olarak da 72 °C'de 5 dakika olacak şekilde son uzamaya tabi tutularak gerçekleştirildi. PCR sonucunda oluşan DNA fragmentleri, 0,5 µg/ml etidyum bromür ihtiva eden % 1'lik agaroz jelde yürütülerek BioDocAnalyze jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi. PCR reaksiyonu ile çoğaltılan parçalar, pGEM-T Easy Klonlama Kiti kullanılarak pGEM-T Easy klonlama vektörüne, firmanın öngördüğü konsantrasyonlar ve şartlar gerçekleştirilerek klonlandı (5 µl 2X tampon, 1 µl pGEM-T vektör, 3 µl PCR ürünü ve 1 µl T4 DNA ligaz). Klonlama sonunda oluşan kolonilerden rekombinant plazmitler, Maniatis vd. (1982) geliştirdiği plazmit izolasyon yöntemine göre izole edildi ve agaroz jelde yürütülerek rekombinant genler seçildi. Bu şekilde doğruluğu teyit edilen klonların baz dizini, otomatik dizi analizatörleri aracılığı ile (Macrogen, Güney Kore) belirlendi. Sekans sonuçları Genbank'taki (NCBI, NIH, Washington, DC) verilerle karşılaştırıldı ve bu sekansın L-arabinoz izomeraz genine ait olduğu tespit edildi.

2.3.4. Ekspresyon Primerlerinin Sentezi

Yapılan çalışmalar sonucunda tüm sırası elde edilen geni klonlamak için bir *E. coli* ekspresyon vektörü seçildi. pET28a+ ekspresyon vektörünün çoklu klonlama bölgesinde, kesim bölgesi bulunan restriksiyon enzimlerinin çalışabildiği bölgeyi içine alan (*NheI* ve *BamHI* restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleri içerecek şekilde) ve bu enzim geninin içerisinde kesim bölgesi olmayan özel ekspresyon primerleri dizayn edildi.

NheI ve *BamHI* restriksiyon endonükleaz kesim bölgelerini içerecek şekilde dizayn edilen primerler şu şekildedir;

AraizF -5' CgCTAgCgTg TTA TTA TTA CgT CCT TAT g -3'	29 nt
AraizR -5' gggATCC CTA TTA TAT TAA ATC TTA TTT TCC -3'	31 nt.

2.3.5. L-Arabinoz İzomeraz Geninin pET-28a(+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

Dizayn edilen ekspresyon primerleri kullanılarak aynı PCR şartları ile yeniden PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. PCR ile üretilen bu genin uç kısımlarında *NheI* ve *BamHI* restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleri bulunmaktadır. pET-28a(+) ekspresyon vektörü, ve içerisinde arabinoz izomeraz geni taşıyan pGEM-T vektörü, *NheI* ve *BamHI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesildi. Kesim reaksiyonu, 10X enzim tamponu içerisinde, 10 U enzim varlığında 37 °C'de 2 saat boyunca gerçekleştirildi. Birinci enzim kesim basamağından sonra etanol presipitasyonu yapıldı ve sonra ikinci enzim kesim basamağı gerçekleştirildi. Kesim ürünleri % 1'lik agaroz jelde yürütüldü. Lineer hale getirilen pET28a+ vektörü ve pGEM-T vektöründen kesilen arabinoz izomeraz genin bulunduğu bantlar jelden kesilip alındı ve bir Jelden Çıkarma Kiti (Fermentas) aracılığı ile temizlendi. Temizlenen ürünler ligasyon işlemi ile halkalaştırıldı. Ligasyon; 1 µl 10X tampon, 1 U T4 DNA ligaz enzimi, 3 µl vektör DNA, 2 µl insert DNA ve 3 µl ddH₂O içerecek şekilde 10 µl son hacimde 16 °C'de 16 saat boyunca gerçekleştirildi.

Ligasyon ürünleri CaCl₂ transformasyon metodu kullanılarak *E. coli* BL21(DE3)pLysS suşuna aktarıldı. Transformasyon için, 200 µl konak hücre içeren tüpe 10 µl ligasyon ürünü eklendi ve tüp 30 dakika buz içinde bekletildi. İnkübasyon sonrasında 42 °C ısıtıcı blokta 2 dakika bekletildi ve her bir tüpe 200 µl LB besiyeri eklendi. Tüpler

37 °C’de iki saat bekletildikten sonra LBA petrilere (50 µg/ml kanamisin içeren) yayılarak 37 °C’de 1 gece inkübe edildi. Petri üzerinde oluşan kolonilerden rastgele seçim yoluyla tarama yapıldı. Seçilen koloniler 3 ml (50 µg/ml kanamisin içeren) LB besiyeri içinde bir gece boyunca 37 °C’de inkübe edildi. Üretilen hücrelerden plazmitler izole edildi. İzole edilen plazmitler *NheI* ve *BamHI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesildi ve klon olan koloniler tespit edildi. Doğru klon olduğu belirlenen koloniler LBA petrisine ekim yapılarak 37 °C’de 1 gece inkübe edildi ve doğru olduğu belirlenen koloni bundan sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere saklandı.

2.4. Gen Ürününün Elde Edilmesi ve Saflaştırılması

2.4.1. Protein Konsantrasyonu Tayini

Protein konsantrasyonu tayini Bradford’un (1976) geliştirdiği yöntemle yapıldı. Protein boyası ve BSA (Bovin Serum Albumin) kullanılarak 595 nm dalga boyunda protein konsantrasyonu standardı grafiği oluşturuldu. Standart grafik için 2, 4, 6, 10, 15, 20, 40, 60, 80 µg BSA içeren çözeltiler 0,15 M NaCl ile 100 µl’ye tamamlandı. Her bir örneğin üzerine 5 ml boya eklendi. Protein ve boya karışımları vortekslendi ve oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. Standart grafik oluşturulduktan sonra, örneklerin ölçümü yapılırken değişik miktarlardaki örnekler 0,15 M NaCl ile 100 µl’ye tamamlandı ve üzerlerine 5 ml boya eklendi. Protein ve boya karışımı vortekslendikten sonra oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. Süre sonunda standart grafiğin yüklendiği Agilent 8453E UV-Visible Spectroscopy System cihazı kullanılarak 595 nm’de ölçümler yapıldı ve protein konsantrasyonu µg/µl cinsinden hesaplandı.

2.4.2. L-Arabinoz İzomerazın Ekspresyonu

L-arabinoz izomeraz genini içeren koloniden 50 µg/ml kanamisin içeren 100 ml LB besiyerine ekim yapılarak, 37 °C’de 1 gece büyümeye bırakıldı ve oluşan kültürün optik yoğunluğu ölçüldü. Bu kültür kullanılarak, 2 L 50 µg/ml kanamisin içeren LB’ye optik yoğunluğu 0,1 olacak şekilde tekrar ekim yapıldı. Kültürün optik yoğunluğu 0,6-0,9 olduktan sonra son hacimde 1 mM IPTG olacak şekilde, IPTG eklenerek T7 promotörü

altında enzimin üretimi indüklendi. İndükleme yapıldıktan sonra kültür 4 saat daha büyütüldü. Büyütülen hücreler 11.000 rpm’de 15 dk santrifüj edilerek çöktürüldü. Yapılan işlemlerin aynısı negatif olarak kabul edilecek olan L-arabinoz izomeraz genini içermeyen pET28a+ vektörünü taşıyan *E. coli* BL21(DE3)pLysS suşu için yapıldı.

2.4.3. Hücre Ekstratının Elde Edilmesi

Enzim üretiminden sonra elde edilen pellet 50 mM fosfat (pH 7) tamponunda çözüldü ve % 70 şiddetinde, 0,6 devirde 5 dk Sartorius Labsonic sonikatör ile sonike edildi. Hücre solüsyonu 14800 rpm’de 15 dk boyunca santrifüj edildi. Pellet kısmı atılarak süpernatant kısmı alındı. Aynı işlemler, L-arabinoz izomeraz genini bulandırmayan pET28a+ vektörünü barındıran *E. coli* BL21(DE3)pLysS suşu için yapıldı.

2.4.4. L- Arabinoz İzomerazın Saflaştırılması

2.4.4.1. Isı Şoku Uygulaması

Elde edilen kaba ekstrat 15 dk. 65 °C’de bekletildi. Daha sonra 20 dk 14800 rpm’de santrifüj edildi. Süpernant alınarak, çöken kısımdan uzaklaştırıldı. Enzimin aktivitesini koruduğundan emin olmak için süpernatantta L-arabinoz izomerazın aktivitesi arandı.

2.4.4.2. Kolon Kromatografisi

L-AI enziminin saflaştırılması, N-terminaline takılan HisTaq kuyruğundan yararlanılarak nikel içeren bir saflaştırma kiti olan HisLink™ Protein Purification Resin (Promega) sayesinde gerçekleştirildi. Saflaştırma için; 1. Ni bağlama tamponu (Ni-Binding Buffer-20 mM Tris-HCl pH:7,5, 200 mM NaCl, 5 mM β-merkaptotanol), 2. Ni yıkama tamponu (Ni-Washing Buffer-20 mM Tris-HCl pH:7,5, 200 mM NaCl, 5mM β-merkaptotanaol, 20 mM imidazol) ve 3. Ni-elüsyon tamponu (Ni Elution Buffer-20 mM Tris-HCl pH: 7,5, 200 mM NaCl, 5mM β-merkaptotanol, 500 mM imidazol) çözeltileri kullanıldı. Hazırlanan 1. tampon çözeltisinden 5 ml kolondan geçirildi ve kolona Ni-bağlanması sağlandı. Ardından 2. tampon ve ısı şoku ile saflaştırılan enzim karışımını

içeren solüsyon (10 ml buffer ve 5 ml enzim) 2 kez kolondan geçirildi. Bu basamakta HisTag kuyruğuna sahip olan L-AI'nin nikel afinitesi ile kolona bağlanması ve bağlanamayan proteinlerin kolondan ayrılması sağlandı. Daha sonra washing buffer (15 ml) kolondan geçirildi ve bağlanamayan proteinlerden temizlendi. Ardından 3. tampon çözeltisi 2 ml olacak şekilde kolondan geçirildi ve bu işlem kolon temizlenene kadar gerçekleştirildi ve ayrı ayrı tüplere alındı. 3. tamponda bulunan imidazol aracılığıyla HisTag kuyruğuna sahip olan protein nikelinden ayrıldı ve kolondan alındı. Tüplerdeki enzimler ayrı ayrı protein boyası ile test edildi. Enzimin en aktif olduğu tüplerden enzimler alındı.

2.4.4.3. SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi

Protein jel elektrofrezileri Hoeffler SE 600 marka elektrofrezde % 10'lik jel kullanılarak 18 mA'lık akım altında gerçekleştirildi. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı L-AI'sının moleküler ağırlığını belirlemek için saf L-AI ve moleküler ağırlığı belli olan bir protein markırı ile SDS-PAGE yapıldı. Her bir örnekten 50 µg protein (saf enzim, kaba ekstrakt, negatif, protein marker) kullanıldı. Örneklerin üzerine eşit miktarlarda muamele tamponu (0,15 M Tris-HCl pH 6,8; % 4 SDS; % 20 Gliserol; % 6 β-merkaptotanol) ilave edildi ve 99 °C'de 4 dakika bekletilerek Maniatis vd., (1982) tarafından tanımlanan % 10'luk SDS-PAGE'e yüklendi ve 18 mA akım altında yürütüldü. Yürütme işlemi sonrasında jel, Commasie Brilliant Blue (% 0,125 Commasie Brilliant Blue R-250, % 50 metanol, % 10 asetik asit) boyası ile 1 saat boyandı. Ardından 1. yıkama solüsyonunda (% 50 Metanol, % 10 Asetik asit % 40 ddH₂O) 1 saat ve 2. yıkama solüsyonunda (% 7 asetik asit ve % 5 metanol) bantlar belirginleşinceye kadar bekletildi. Jel görüntüsü bilgisayar tarayıcısı ile fotoğraflandı.

2.5. L-Arabinoz İzomerazın Karakterizasyonu

2.5.1. Karakterizasyon Deneylerinde Kullanılan L-Arabinoz İzomeraz Aktivite Deneyi

Karakterizasyon deneylerinde kullanılan L-arabinoz izomeraz aktivite deneyi için 0,39 µg/µl enzim kullanılarak, 40 mM substrat (L-arabinoz), 1 mM MnCl₂ ve 1mM CoCl₂

içeren 100 mM MOPS pH 7 tamponunda (oda sıcaklığında), 100 µl son hacimde, 55 °C’de, 20 dk, Biometra Personal Cyler PCR cihazında gerçekleştirilen reaksiyon şartları kullanıldı. Reaksiyon buz üzerinde (+4 °C’de) sonlandırıldı. Reaksiyon sonunda açığa çıkan L-ribuloz miktarı Dishe vd., (1951) tarafından geliştirilmiş sistein karbozol- sülfürik asit yöntemi ile belirlendi. Reaksiyon çözeltisi üzerine 40 µl % 1,5’lik sistein hidroklorür konuldu. Bunu takiben 40 µl % 0,12’lik karbozol konuldu. Oluşan karışım vortekslenildikten sonra üzerine 1,2 ml % 70’lik sülfürik asit ilave edilerek vortekslendi. Karışım 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Ölçümler 560 nm dalga boyunda gerçekleştirildi. 30. dk’da yapılan ilk ölçümün ardından, yapılan her bir ölçüm 1 dk ara ile gerçekleştirildi. 1 ünite, hazırlanan enzim özütü ile 65 °C’de L-arabinozdan 1 dakikada oluşan L-ribuloz (µmol/dk) olarak tanımlandı. Reaksiyonun gerçekleştirildiği tüm koşullar (reaksiyon sıcaklığı, reaksiyon pH’ sı, substrat konsantrasyonu, metal iyonları derişimi, enzim miktarı) enzim karakterize edildikçe yeniden düzenlendi.

2.5.2. Enzim Miktarının Belirlenmesi

Deneyleerde kullanılacak enzim miktarını belirlemek için 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml enzim miktarlarıyla reaksiyonlar gerçekleştirildi. Reaksiyon 40 mM substrat (L-arabinoz), 1 mM MnCl₂ ve 1mM CoCl₂ içeren 100 mM MOPS pH 7 tamponunda (oda sıcaklığında), 100 µl son hacimde, 55 °C’de, 20 dk süre ile gerçekleştirildi. Reaksiyonlar sonucunda enzim miktarı-aktivite (%) grafiği oluşturularak karakterizasyon çalışmalarında kullanılacak enzim miktarı belirlendi.

2.5.3. Optimum Sıcaklık

A. kestanbolansis AC26 Sarı L-AI’sının en iyi çalıştığı optimum sıcaklık değeri, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ve 99 °C’ye ayarlanmış Biometra Personal Cyler PCR cihazında gerçekleştirilen seri reaksiyonlar sonucu belirlendi. Bu reaksiyon serisinde enzimin en iyi çalıştığı sıcaklık değeri sonraki çalışmalarda kullanıldı.

2.5.4. Optimum pH

A. kestanbolansis AC26 Sarı L-AI aktivitesine aktivitesine pH'nın etkisinin araştırılması amacıyla, 100mM MOPS (pH 4-8) ve glisin glisin (pH 8-11) tamponları kullanıldı. Belirlenen optimum pH aktivite değeri daha sonra yapılacak kinetik parametrelerin belirlenmesi çalışmalarında kullanıldı.

2.5.5. Metal İyonları ve İnhibitörlerin L-AI Aktivitesi Üzerine Etkileri

A. kestanbolensis AC26 Sarı L-AI aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi optimum şartlarda enzim reaksiyonunun içerisinde 1 mM'lık $MnCl_2$, $CoCl_2$, $MgCl_2$, $FeSO_4$, $CaCl_2$, $ZnCl_2$, $CuCl_2$, $LiCl$ ve KCl , gibi çeşitli metal iyonları ve EDTA ve β -merkaptotanol kimyasalları ilave edilerek belirlendi. İçerisinde metal iyonu ve kimyasal bulundurmayan reaksiyonun aktivitesi %100 kabul edildi. Deneyin ikinci aşamasında Mn^{+2} ve Co^{+2} iyonlarının kullanılan farklı konsantrasyonlarının (1-2,5-5-10 mM) L-AI aktivitesi üzerindeki etkileri belirlendi. İnhibitör olarak şeker alkollerini (L-arabitol, ribitol ve mannitol), normal reaksiyon şartlarında son hacimde 10 mM olacak şekilde kullanıldı.

2.5.6. Isıl Kararlılığı

A. kestanbolensis AC26 Sarı L-AI'nın kararlılığına ısının etkisini incelemek için saflaştırılan enzim belirli zaman aralıklarında (0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 dk.) 50, 55, 60, 65, 70 75 ve 80 °C 'lerde inkübe edildi. 30 dk aralıklarla gerçekleştirilen reaksiyonlar spektrofotometrede 560 nm dalga boyunda ölçüldü.

2.5.7. pH Kararlılığı

A. kestanbolansis AC26 Sarı L-AI' nın pH kararlılığını belirlemek için saf enzim özütü, pH 4-8 MOPS (100 mM) ve pH 8-11 glisin glisin (100 mM) tamponlarında 25 °C'de inkübe edildi. Çeşitli zaman aralıklarında inkübe edilen enzimlerden alınarak optimum çalışma şartlarında (40 mM L-arabinoz varlığında 100 μ l son hacimde ve 65

°C’de 20 dk boyunca pH 8,5 olan glisin tamponunda) aktivite ölçümü yapıldı ve enzimin kalan aktivitesi hesaplandı. İlk anda alınan aktivite ölçümü % 100 kabul edildi.

2.5.8. Substrat Spesifikliği

A. kestanbolensis AC26 Sarı L-AI’nın substrat spesifikliğini incelemek için L-arabinoz, D-riboz, D-mannoz, D-ksiloz, D-galaktoz, D-glukoz gibi farklı aldoz grubu şekerler substrat olarak kullanıldı. Optimum reaksiyon şartlarında *A.kestanbolensis* AC26 Sarı L-AI’sının farklı aldozlar üzerindeki etkisi belirlendi.

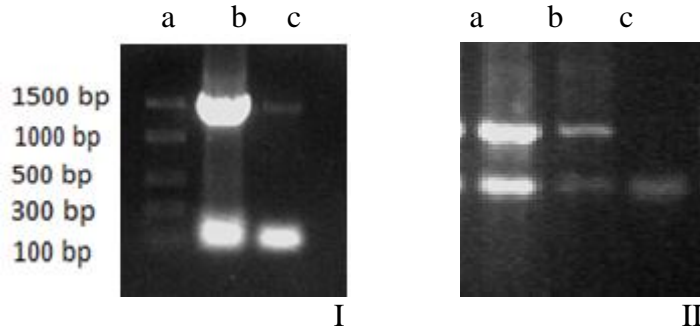
2.5.9. Enzim Kinetiği

A. kestanbolensis AC26 Sarı L-AI’nın kinetik verilerini hesaplamak için spektrofometrede hazırlanan L-ribuloz standardı kullanıldı. Reaksiyonlar değişen substrat konsantrasyonları (1 mM - 50 mM) ile 5 µl enzim varlığında gerçekleştirildi. Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerleri hazırlanan Lineweaver–Burk eğrisinde x ve y eksenleri kestiği noktalara karşılık gelen değerlerin tersi olarak belirlendi (Lineweaver ve Burk, 1934). Michaelis-Menten grafiği çizilerek yapılacak olan çalışmalarda kullanılacak substrat konsantrasyonu olarak belirlendi.

3. BULGULAR

3.1. *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26 Sarı L- Arabinoz İzomeraz Geninin Baz Diziliminin Belirlenmesi

A. kestanbolensis AC26 Sarı L-AI geninin baz dizilimini belirlemek amacıyla, kalıp olarak bu bakterinin genomik DNA'sı kullanılmış ve Araisof ve Araisor primerleri ile PCR gerçekleştirilmiştir. PCR sonuçları 0,5 mg/ml etidyum bromür içeren % 1,0'lik agaroz jelde yürütüldü ve sonuçlar BioDocAnalyze jel görüntüleme sistemi ile görüntüledi. PCR reaksiyonu ile çoğaltılan parçalar, pGEM-T Easy Klonlama Kiti kullanılarak pGEM-T Easy klonlama vektörüne, klonlandı. Klonlama sonunda oluşan kolonilerden rekombinant plazmitler, plazmit izolasyon yöntemine göre izole edildi, doğru klon bulunduktan sonra sekans ettirildi. Sekans sonuçları Genbank'taki (NCBI, NIH, Washington, DC) verilerle karşılaştırıldı ve bu sekansın 1503 nt'lik L-arabinoz izomeraz geni olduğu ve 496 aminoasiti kodladığı belirlendi. Elde edilen nükleotit gen dizini ekte verilmiştir. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı L-arabinoz izomeraz geninin diğer mikroorganizmalara % nükleotit benzerliği Tablo 2'de gösterilmiştir.



Şekil 5. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı L-AI geninin pGEM-T Easy vektörüne klonlanması I-a) Marker b) L-AI geni PCR ürünü (5 µl) c) L-AI geni PCR ürünü (3 µl) II- a-b) L-AI genini içeren pGEM-T Easy klonlama vektörünün *EcoRI* ile kesimi c) L-AI geni PCR ürünü.

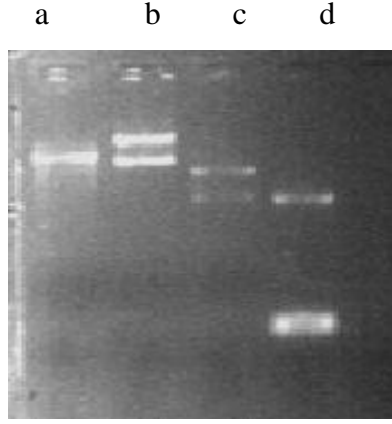
Tablo 2. *A.kestanbolensis* AC26 Sarı L- arabinoz izomeraz geninin diğer mikroorganizmaların L-AI % nükleotit benzerliği

Mikroorganizma	% Benzerlik
<i>Anoxybacillus flavithermus</i> WK1	% 98
<i>Thermus sp.</i> IM6501	% 90
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG80-2	% 89
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> strain IAM 11001	% 88
<i>Anoxybacillus flavithermus</i> strain TC-06	% 88
<i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426	% 87
<i>Geobacillus sp.</i> Y412MC52	% 86
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	% 86
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5	% 86
<i>Geobacillus sp.</i> C56-T3	% 85
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	% 85

3.2. L-Arabinoz İzomeraz Geninin pET28a+ Vektörüne Klonlanması ve Ekspres Edilmesi

L-arabinoz izomeraz geninin vektöre (pET28a+) klonlanması için, *A. kestanbolensis* AC26 Sarı suşuna ait genomik DNA kullanılarak, klonlama için sentez edilen ekspresyon primerleri ile PCR gerçekleştirildi. PCR sonucu elde edilen DNA fragmanı pGEM-T Easy vektörüne klonlandı. Plazmit izolasyonu ile elde edilen L-AI genini içeren pGEM-T Easy vektörü ve pET28a+ ekspresyon vektörü *NheI* ve *BamHI* restriksiyon enzimleri ile kesildi. Kesim ürünleri % 1,0'lık agaroz jelde yürütüldü ve jelden çıkartma kiti ile jelden çıkartıldı. Jelden çıkartılan vektör ve insert DNA ile ligasyon yapıldı.

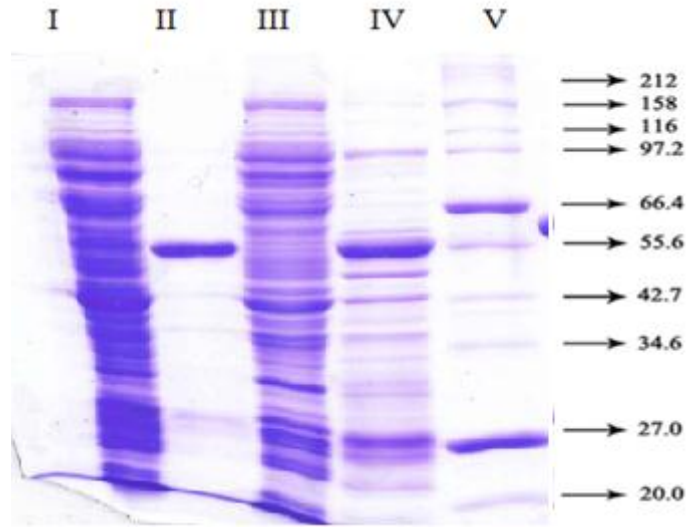
Ligasyon ürünü *E. coli* JM101 suşuna aktarıldı ve bu suş içindeki plazmitlerin izole edilmesi sonucu L-AI genini içeren klon bulundu. Elde edilen klon *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücrelerine transforme edildi.



Şekil 6. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı L-AI geninin pET28a+ vektörüne klonlanması a) Kesilmemiş pET28a+ vektörü b) pET28a+ vektörünün *NheI* ve *BamHI* enzimleri ile kesimi c) L-AI genini içeren pET28a+ vektörünün *NheI* ve *BamHI* enzimleri ile kesimi d) L-AI geni PCR ürünü.

3.3. L-Arabinoz İzomerazın Saflaştırılması

E.coli BL21(DE3)pLysS hücresine transforme edilen L-AI geninin ekspresyonu sağlanarak önce hücre özütünün elde edilmesi, bunun ardından ısı şoku uygulaması ve son olarak N-terminalinde bulunan HisTaq kuyruğu aracılığıyla HisLink™ Protein Purification kiti ile kolon kromatografisi yapılarak saflaştırıldı. Saflaştırılan L-arabinoz izomeraz SDS PAGE'de yürütülerek protein bandı gösterildi. Moleküler ağırlığının 55,6776 kDa (URL-1, 2012) olduğu belirlendi.

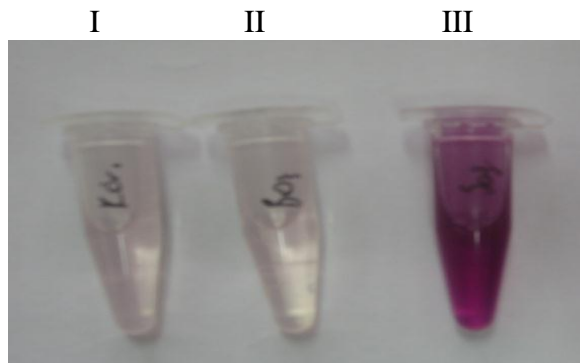


Şekil 7. Saflaştırılmış rekombinant *A. kestanbolensis* AC26 Sarı L-AI SDS-PAGE analizi: I) Kaba ekstre II) Saf enzim III) Gen içermeyen vektör IV) Isı şoku uygulaması V) Protein marker (2-212 kDa- Biolabs).

3.4. L-Arabinoz İzomerazın Karakterizasyonu

3.4.1. L-Arabinoz izomeraz Aktivitesinin Belirlenmesi

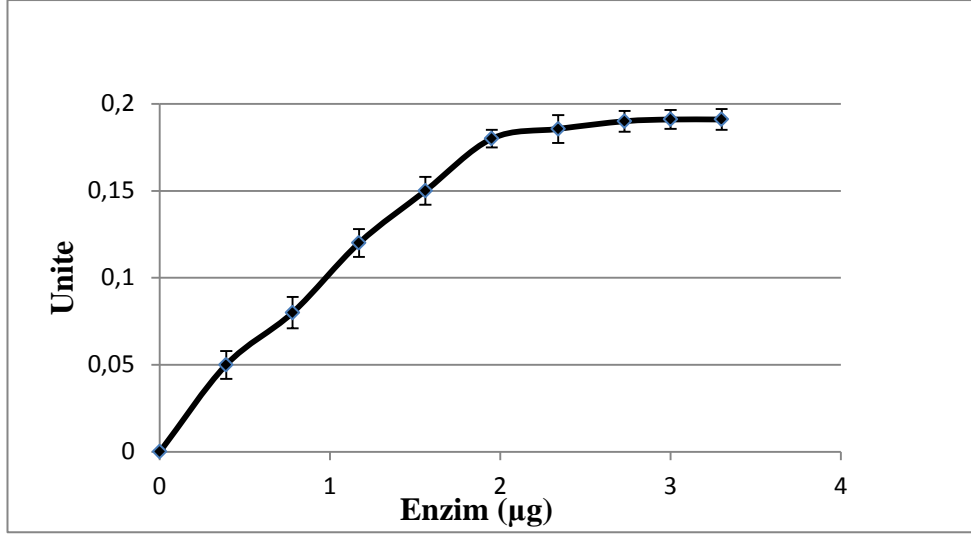
Saf olarak elde edilen L-AI aktivitesini belirlemek için sistein, karbozol, sülfirik asit yöntemi kullanıldı ve renk değişimi sonucu aktivite varlığı tespit edildi.



Şekil 8. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı L-arabinoz izomerazının aktivitesinin gösterilmesi. I- Kontrol II - AI genine sahip olmayan vektör ile indüklenmiş *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücre özütü reaksiyonu III- saf L-AI aktivitesi.

3.4.2. Enzim Miktarının Belirlenmesi

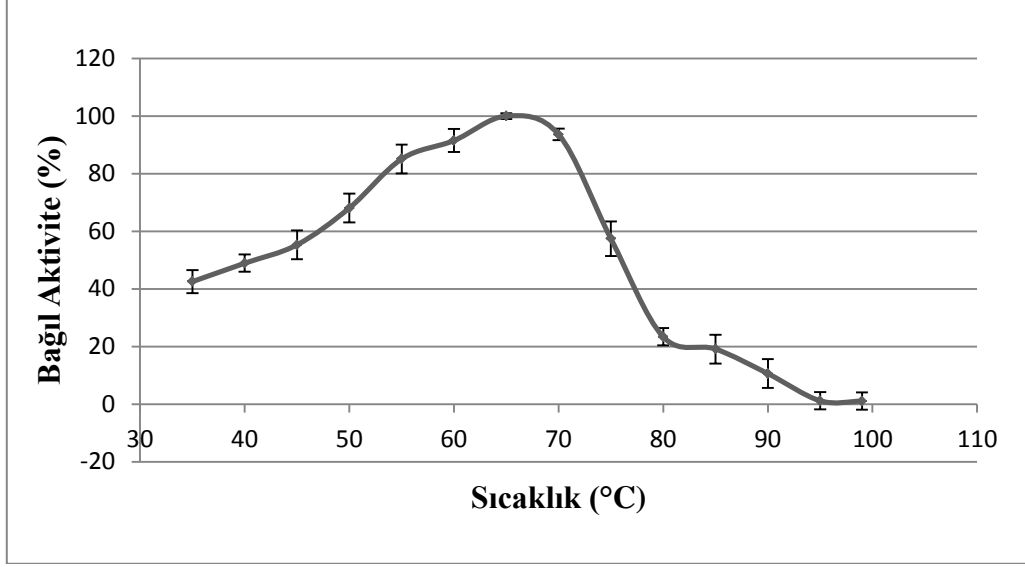
Substrat miktarı sabit tutularak, kademeli olarak enzim miktarı artırıldı ve enzim artışına karşılık gelen aktiviteler hesaplandı. Deneylerde kullanılacak enzim miktarı 1,95 μg olarak belirlendi. Enzim miktarı L-AI aktivite grafiğinde enzim miktarının ve aktivitenin doğrusal artış gösterdiği noktadaki enzim miktarı deneylerde kullanılmak üzere seçildi.



Şekil 9. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı L-AI enzim miktarının belirlenmesi

3.4.3. Optimum Sıcaklık

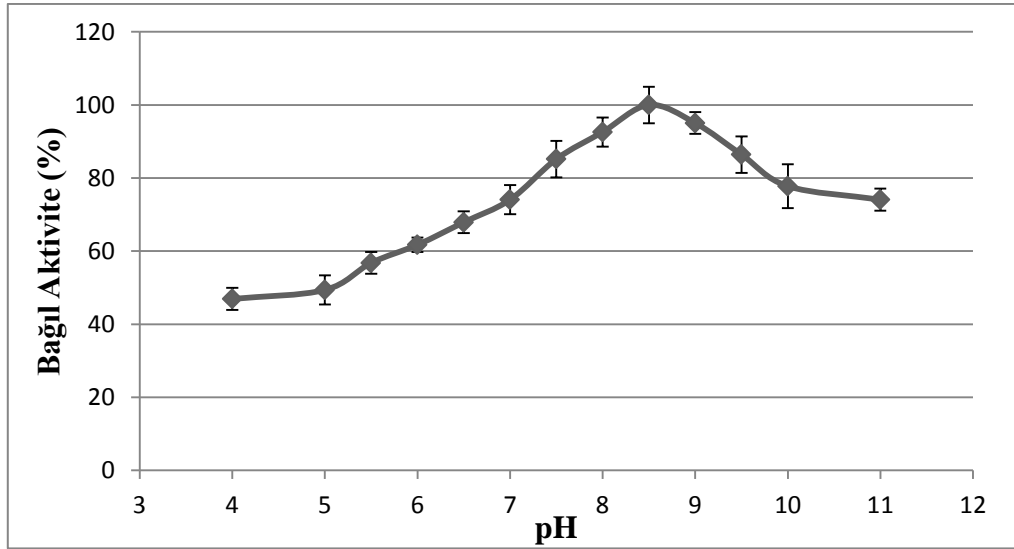
A. kestanbolensis AC26 Sarı L-arabinoz izomerazının optimum sıcaklığını belirlemek için 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99 $^{\circ}\text{C}$ ' lerde aktivitesi ölçüldü. Sıcaklık–aktivite grafiği oluşturulması sonucu enzimin optimum sıcaklığı 65 $^{\circ}\text{C}$ olarak belirlendi. Bundan sonraki çalışmalarda reaksiyonlar bu sıcaklık kullanılarak gerçekleştirildi.



Şekil 10. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı L-AI'ın optimum sıcaklık grafiği

3.4.4. Optimum pH

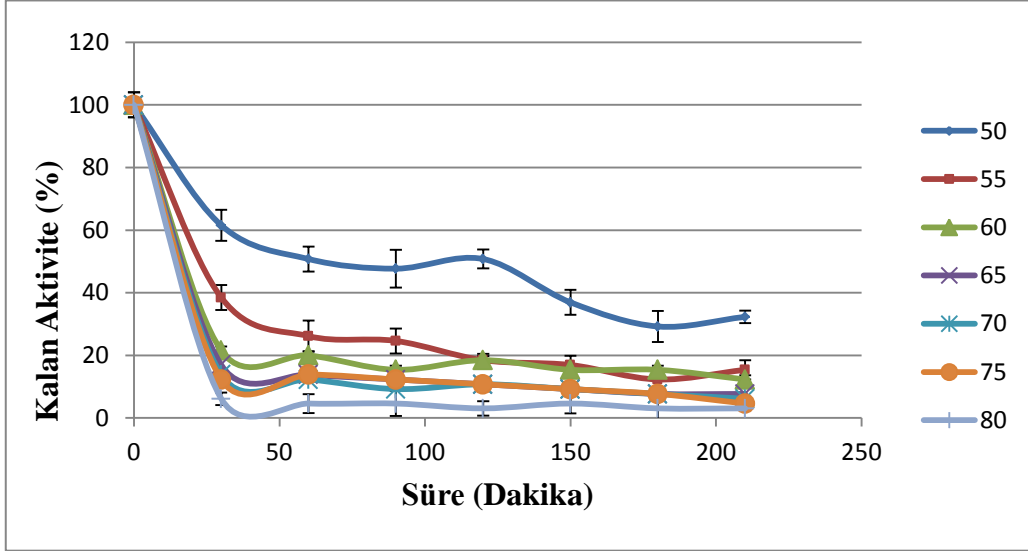
L-arabinoz izomeraz aktivitesi üzerinde pH'ın etkisini incelemek için pH 4-8 (MOPS), pH 8-11 (glisin glisin) aralığındaki tamponlar kullanılarak bir seri reaksiyon gerçekleştirildi. Spektrofotometrede yapılan ölçümler ile elde edilen pH-aktivite grafiği sonucu optimum pH 8,5 olarak belirlendi.



Şekil 11. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı L-AI'ın optimum pH grafiği

3.4.5. Isıl Kararlılığı

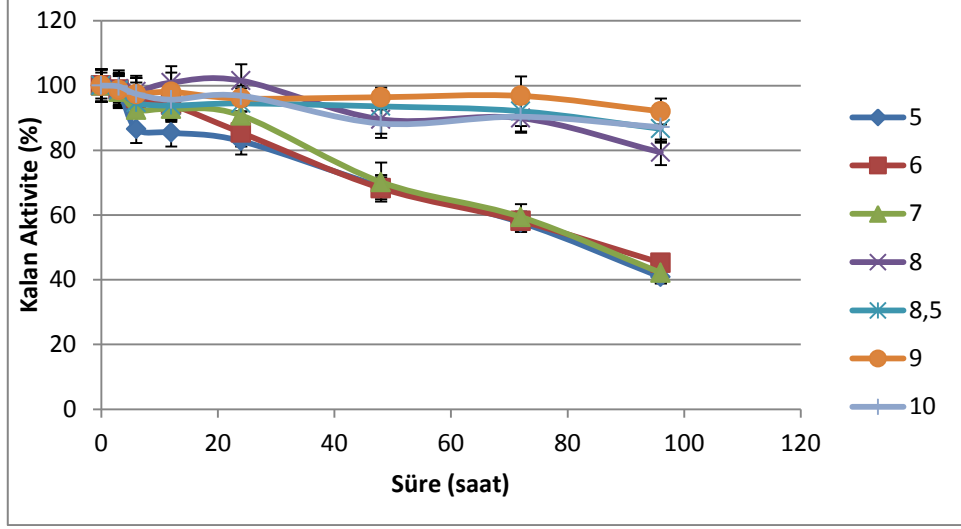
A. kestanbolensis AC26 Sarı L-AI kararlılığında ısının etkisini incelemek için enzim belirli sıcaklıklarda, belirli zaman aralıklarında (50, 55, 60, 65, 70, 75, 80°C’ de 3,5 saat) inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 50 ve 55 °C’ lerde enzimin diğer sıcaklıklara göre daha kararlı olduğu, ilk yarım saatten sonra her sıcaklıkta enzimin aktivite kaybettiği belirlendi. Enzim aktivitesinin % olarak zamana göre değişen grafiği çizilirken enzimin başlangıçtaki aktivite değeri (0. dk) % 100 kabul edildi.



Şekil 12. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı L-AI’ın ısıl kararlılığı

3.4.6. pH Kararlılığı

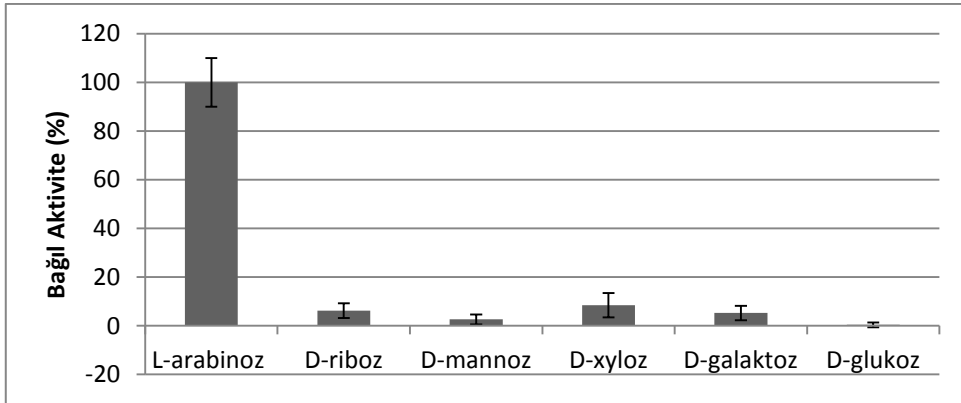
A. kestanbolensis AC26 Sarı L-AI’ın pH kararlılığını belirlemek için, enzim farklı pH’daki (5-10) tamponlar içerisinde 25 °C’ de (~oda sıcaklığında) inkübe edildi. Belirli zaman aralıklarında alınan aktivite ölçümleri sonucu enzimin 8, 8,5, 9, 10 pH’larında kararlı olduğu belirlendi. pH 5, 6 ve 7 değerlerinde ise enzim aktivitesinin 24. saatten sonra düştüğü belirlendi. Enzim aktivitesinin % olarak zamana göre değişen grafiği çizilirken enzimin başlangıçtaki aktivite değeri (0. dk) % 100 kabul edildi.



Şekil 13. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı L-AI'nin pH karalılığı

3.4.7. Substrat Spesifikliğı

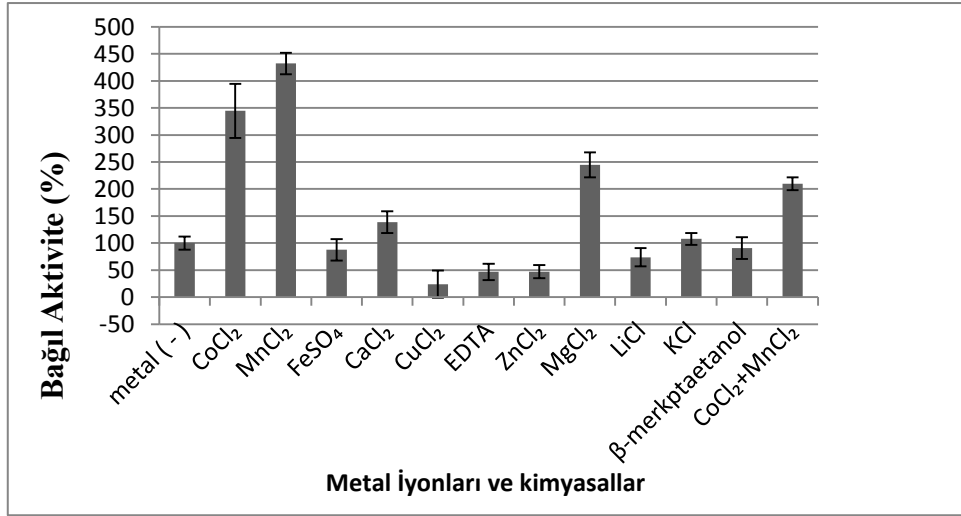
A. kestanbolensis AC26 Sarı L-AI substrat spesifikliğini incelemek için L-arabinoz, D-riboz, D-mannoz, D-ksiloz, D-galaktoz, D-glukoz gibi farklı aldoz şekerleri optimum reaksiyon şartlarında substrat olarak kullanıldı. Bu reaksiyonlar sonucu alınan ölçümler ile en yüksek aktivite değeri % 100 olarak kabul edildi. Bu ölçümler sonucu oluşturulan substrat- aktivite grafiğinden bu enzimin sadece L-arabinoz aldözuna spesifik olduğu görüldü. Diğer aldöz şekerleri ile çok az reaksiyona girdiği glukoz ile reaksiyon vermediği belirlendi.



Şekil 14. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı L-AI'nin substrat spesifikliğı

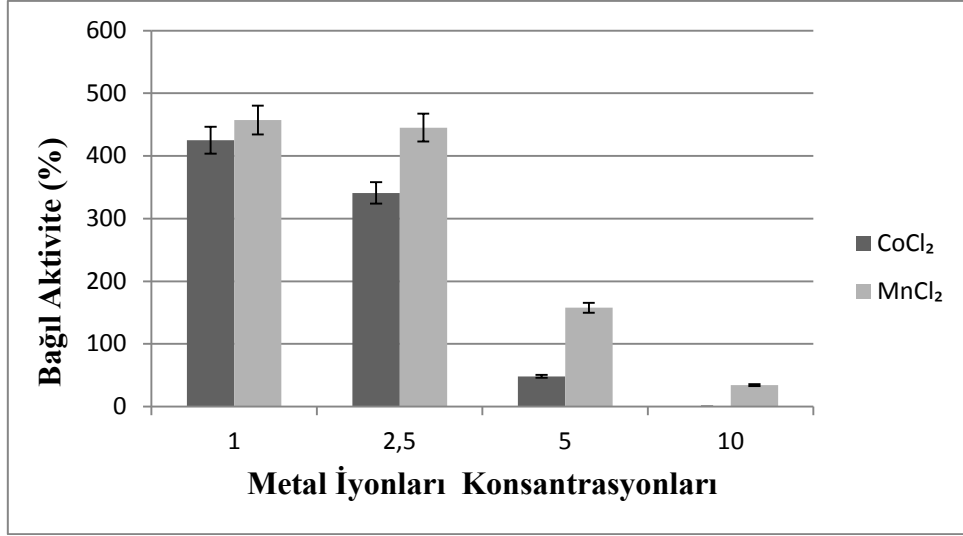
3.4.8. Metal İyonları ve İnhibitörün Etkisi

A. kestanbolensis AC26 Sarı L-AI aktivitesi üzerinde çeşitli metal iyonlarının ve kimyasalların nasıl bir etki olduğunun incelenmesi amacıyla substrat olarak L- arabinozun kullanıldığı çeşitli deneyler yapıldı. İlk olarak çeşitli metal iyonlarının klor ve sülfat tuzları ve bazı kimyasalların enzimin aktivitesi üzerindeki etkileri incelendi. EDTA ile muamele ve diyaliz edilen saf enzimi ile yapılan bu deneyde, içerisinde metal iyonu bulunmayan reaksiyonun aktivitesi % 100 kabul edildi. Deneyin sonucunda enzimin aktivitesini en fazla $MnCl_2$ 'ün arttırdığı belirlendi. $MnCl_2$ ' den sonra $CoCl_2$, $MgCl_2$, $CaCl_2$, KCl ve $MnCl_2+CoCl_2$ 'ün enzimi aktive ettiği belirlendi. Diğer metal iyonları ve kimyasalların ise enzimin aktivitesini inhibe ettiği gözlemlendi. Bunların arasından en fazla enzim inhibisyonuna neden olanın $CuCl_2$ olduğu görüldü. EDTA ve β -merkptoetanolin de enzim aktivitesini inhibe ettiği belirlendi.



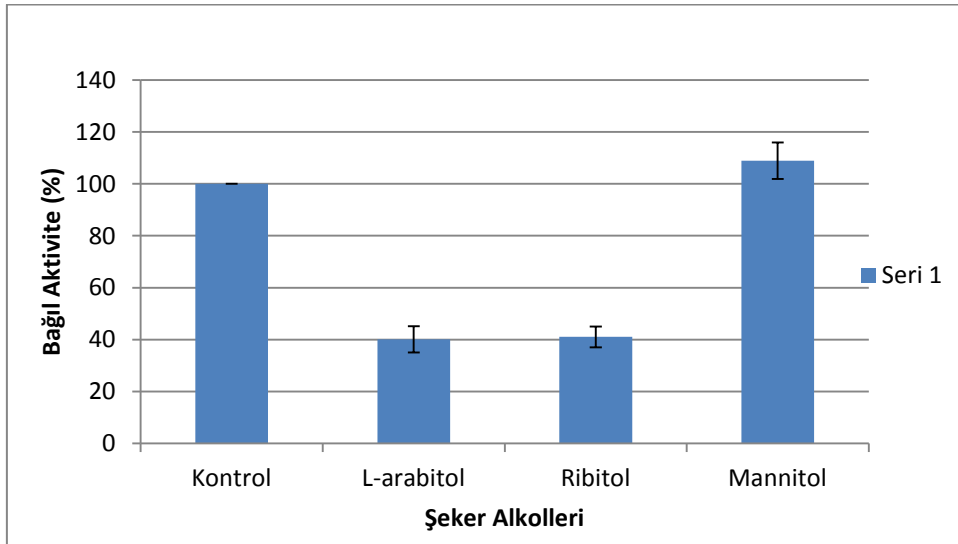
Şekil 15. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı L-AI'ına metal iyonlarının etkisi

Deneyin diğer aşamasında Co^{+2} ve Mn^{+2} nin farklı konsantrasyonlarda (1, 2,5, 5, 10 mM) enzimin aktivitesi üzerindeki etkileri incelendi. Bunun sonucunda her iki metal tuzunun da 1 mM'lık konsantrasyonlarının en yüksek aktivite değerini verdiği belirlendi.



Şekil 16. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı L-AI'ına MnCl₂ ve CoCl₂'nin farklı konsantrasyonlarının etkisi

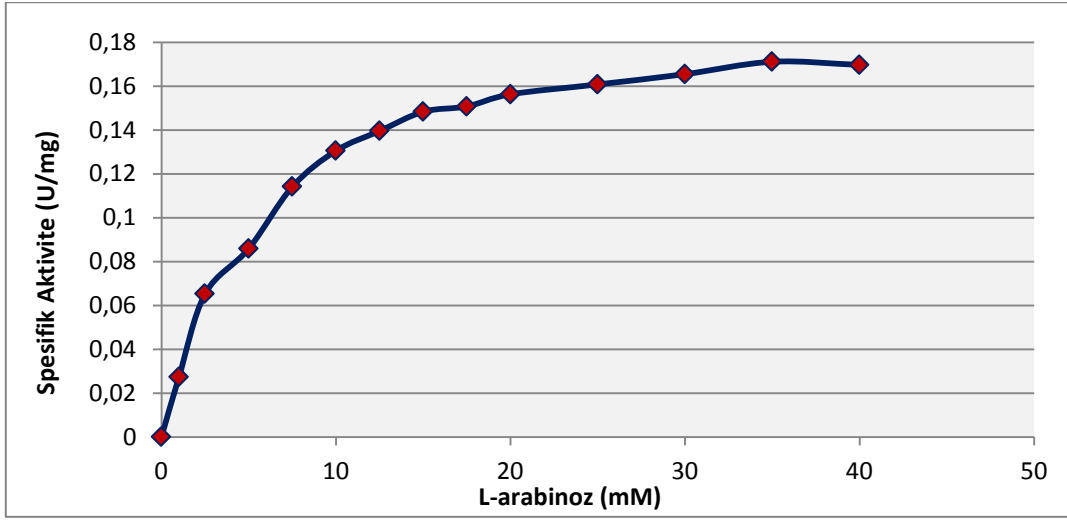
Şeker alkollerinin L-AI'nın aktivitesi üzerindeki etkileri incelendi ve sonuç olarak L-arabitol ve ribitolün enzim aktivitesini inhibe ettiği, mannitolün aktiviteyi etkilemediği belirlendi.



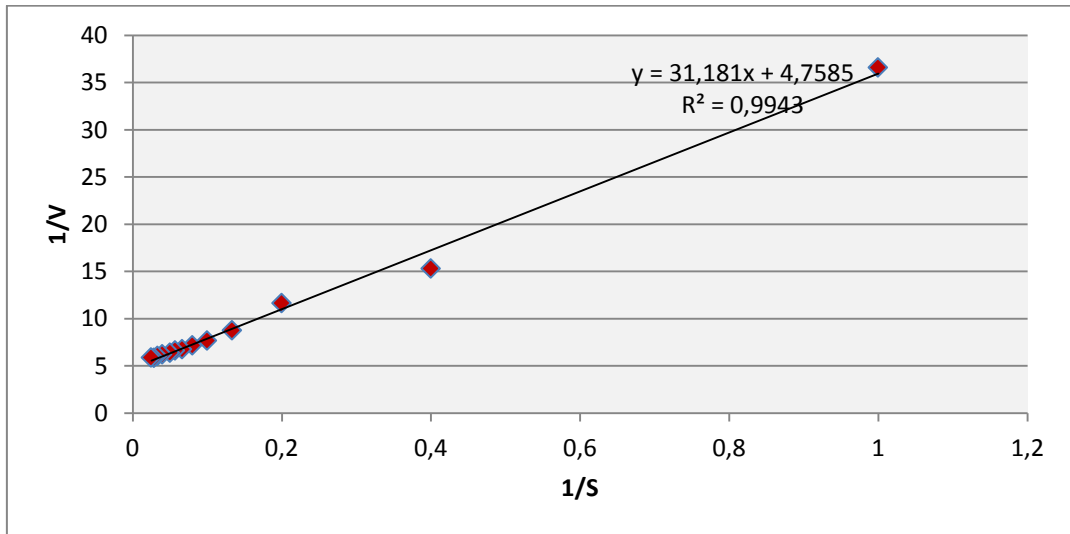
Şekil 17. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı L-AI'sına şeker alkollerinin etkisi

3.4.9. Kinetik İncelemeler

A. kestanbolensis AC26 Sarı L-AI kinetik parametrelerinin incelenmesinde substrat olarak L-arabinoz varlığında, substrat konsantrasyonu-aktivite grafiği çizilerek enzimin basit Michaelis-Menten kinetiğine uyduğu tespit edildi. Substrat olarak L-arabinoz için çizilen Lineweaver-Burk eğrilerinin oluşturduğu doğrunun x-eksenini kestiği nokta $-1/K_m$ 'ye eşitlenerek K_m değeri 6,552 mM, y-eksenini kestiği nokta ise $1/V_{maks}$ 'a eşitlenerek V_{maks} değeri 140,1002 U/mg olarak hesaplandı. Sonuçlar Şekil 14 ve 15'de gösterildi.



Şekil 18. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı L-AI'ın Michaelis-Menten eğrisi



Şekil 19. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı L-AI'ın Lineweaver-Burk eğrisi

4. TARTIŞMA

Yapılan bu tez çalışması ile *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26 Sarı bakterisine ait olan L-arabinoz operonu içerisinde yer alan L-arabinoz izomeraz geninin klonlanması ve karakterizasyonun yapılması amaçlanmıştır. Bu çalışma, L-AI enziminin bu bakteride ilk kez incelenmesi bakımından önemlidir. Bunun yanında günümüzde mikrobiyal kökenli enzimlere ilginin artması ve bunların içinden özellikle termofilik bakterilerin ilgi odağı olması, yapılan bu tez çalışmasının önemini arttırmaktadır.

Bu tez çalışmasında incelenen L-arabinoz izomeraz geni, *A. kestanbolensis* AC26 Sarı bakterisinin L-arabinoz operonunda yer almaktadır. Bu bakterideki L-arabinoz operonunun gen sırası *Anoxybacillus* cinsine ait bir tür olan *A. flavithermus* (NCBI GenBank: CP000922) türünün genom haritasından yararlanılarak bulunmuştur. Bu iki bakterinin L-arabinoz operonunun gen sıraları karşılaştırıldığında regülatör gen olarak *araR* geninin varlığı belirlenmiştir. Benzer şekilde *Bacillus subtilis* L-arabinoz operonunun regülatör geni *araR* geni olarak rapor edilmiştir (Sa-Nogueira vd., 1997). *E.coli*'de ise *araR* regülatör genine karşılık *araC* geni bulunmaktadır. Operonda yer alan yapısal genlerin sırası, *A. flavithermus* ve *A. kestanbolensis* AC26 Sarı' da *araDBA*, *E.coli*'de *araBAD*, *Bacillus subtilis*'de ise *araABD* olarak belirlendi.

Bu tez çalışmasında *A. kestanbolensis* AC26 Sarı L-AI geninin tüm nükleotit ve aminoasit sırası belirlenerek Genbank'taki mevcut diğer L-AI'lar ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen verilere göre, *A. kestanbolensis* AC26 Sarı L-AI nükleotit sırası *A. flavithermus* WK1 L-AI geni ile % 98, *Thermus sp.* IM6501 L-AI geni ile % 90, *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 L-AI geni ile % 89, *Geobacillus stearothermophilus* IAM 11001 L-AI geni ile % 88, *A. flavithermus* TC-06 L-AI geni ile % 88, *Geobacillus kaustophilus* HTA426 L-AI geni ile % 87, *Bacillus stearothermophilus* L-AI geni ile % 86 benzer bulunmuştur. Elde edilen enzimin Genbank' taki verilere göre 5.3.1.4 E.C numarasına sahip L-arabinoz izomeraz olduğu belirlenmiştir.

Elde edilen nükleotit dizisi aminoasit dizisine çevrilerek literatürdeki diğer L-AI'lar ile karşılaştırılmıştır. Diğer L-AI'larda korunmuş bölgelerin çoğunun *A. kestanbolensis* AC26 Sarı L-AI'sında da korunmuş olduğu, sadece bu bölgeler arasında yer alan dört (V226-I226; R295-Q295; G340-S340; I468-V468) amino asitin farklı olduğu belirlendi. Bu bölgeler üzerinde mutasyon çalışmaları yapılarak enzimin substrata (özellikle D-

galaktoza) ve metal iyonlarına ilgisinin arttırılabileceği düşünölmektedir. Metal bağlanma bölgeleri olarak belirlenen E306, E330, H350, H450 amino asitlerin ise sırasıyla E306, E331, H348 ve H448 amino asitlerine denk geldiği belirlendi. Bununla birlikte substratın bağlandığı ve ürünün salındığı bölgelerdeki amino asitlerin aynı şekilde korunmuş olduğu göröldü.

A. kestanbolensis AC26 Sarı L-AI enzimi pET-28a(+) vektörüne klonlanmış ve genin fazla miktarda ekspresyonu için *E.coli* BL21(DE3)pLysS hücrelerine transforme edilmiştir. Ekspresyonu sağlanan enzimin saflaştırılması için enzimin N-terminaline takılan HisTaq kuyruğundan faydalanılmıştır. Hücre özütünün elde edilmesinden sonra ısı şoku uygulamasının ardından Ni⁺² afinite kolon kromatografisi ile enzim saflaştırılmıştır. Elde edilen protein SDS-PAGE ile analiz edilerek denatüre haldeki moleküler ağırlığının 55,6776 kDa (URL-1 2012) olduğu belirlenmiştir ve literatür taraması yapıldığında *T. maritima*'da 56,658 kDa (Lee vd., 2004), *T. neapolitana*'da 56,677 kDa (Kim vd.,2002), *Geobacillus stearothermophilus*'da 56 kDa (Kim vd., 2005), *Thermoanaerobacter mathranii*'de 53 kDa (Jorgensen vd., 2004), *E.coli*'de 56 kDa olarak belirlenmiş olduğu göröldü. Bu sonuçlar doğrultusunda proteinin beklenen moleküler ağırlıkta ve diğer L-AI'lar ile benzer olduğu göröldü.

Yüksek sıcaklıklarda gerçekleşen endüstriyel enzimatik reaksiyonlar, kimyasal bozulmalara daha dayanıklı olmalarından dolayı, endüstriyel kullanım için özellikle termofilik bakterilerin enzimleri mezofilik bakterilerinkine oranla daha fazla tercih edilmektedir. L-AI'lar için optimum sıcaklıklar; mezofiller için 30-50 °C, termofiller için 60-70 °C, aşırı termofiller için ise 85-90 °C olarak belirlenmiştir (Izumori vd., 1978; Jorgensen vd., 2004; Kim vd.,2002, 2003; Lee vd., 2004). 50 °C'nin üzerindeki aktivitenin nedeni mezofilik ve termofilik organizmaların amino asit sıraları karşılaştırılarak araştırıldı. Yapılan çalışmalar, termofilik ve aşırı termofilik proteinlerde, polar amino asit bileşenlerinde (Q, N, S veya T) azalma, yüklü amino asit (K, E veya R) bileşenlerinde artma olduğunu göstermiştir (Chakravarthy ve Varadarajan 2000; Sterner ve Liebl 2001). Mezofilik bir L-AI ile karşılaştırıldığında, *A. kestanbolensis* AC26 Sarı L-AI amino asit bileşimde glutamat (E) ve arjinin (R) amino asitinin sayısında artma, threonin (T), glutamin (Q) ve asparajin (N) amino asitlerinin sayısında azalma vardır. Bu sonuçlar termoaktiflik ve amino asit içeriği arasındaki ilişkiyi desteklemektedir. Yapılan optimum sıcaklık çalışmaları sonucunda enzimin optimum 65 °C'de aktivite gösterdiği bulunmuştur. Literatürde bu enzimin diğer bakterilerdeki optimum çalışma sıcaklığının; *Thermus*

sp.IM6501'de 60 °C (Kim vd., 2003), *Thermoanaerobacter mathranii*'de 65 °C (Jorgensen vd., 2004), *Geobacillus stearothermophilus*' da 65°C (Kim vd., 2005), *T. neapolitana*'da 85 °C (Kim vd., 2002), olduğu görülmüştür. Dolayısıyla optimum sıcaklığın diğer termofilik L-arabinoz izomerazlara yakın olduğu söylenebilir.

Reaksiyonun gerçekleştiği ortamın pH'sı enzimin primer ve sekonder yapısını, dolayısıyla aktivitesini etkiler. Mikrobiyal sistemlerden elde edilen diğer benzer enzimlerin ortak özellikleri L-arabinozun izomerizasyonunda olduğu gibi alkalik pH'larda gerçekleşmesidir. Bu bilgiye paralel olarak yapılan optimum pH çalışmalarında enzimin optimum aktivitesi pH 8,5 olarak belirlenmiştir. Literatürdeki diğer L-AI'ların optimum pH karşılaştırılmasında; *Geobacillus thermodenitrificans*'da pH 8,5 (Kim ve Oh, 2005), *T. neapolitana*'da pH 7.0 (Hong, vd., 2006), *Thermoanaerobacter mathranii*'de pH 8.0 (Jorgensen vd., 2004), *Thermus* sp. IM6501'de pH 8,5 (Kim vd., 2003) ve *Geobacillus stearothermophilus*' da pH 8,0 (Kim vd., 2005) dir. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı L-AI optimum pH'sı, optimum pH'sı bilinen enzimlerin optimum pH'sı ile benzer olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara bakıldığı zaman mezofilik, termofilik ve aşırı termofilik L-AI'ların genellikle alkalik ortamlarda optimum aktiviteye ulaştığı söylenebilir.

A. kestanbolensis AC26 Sarı L-arabinoz izomerazının ısıl kararlılık çalışmaları sonucunda ilk yarım saatte, 60 °C'nin altındaki sıcaklıklarda aktivitenin % 60'ın altına düştüğü görülmektedir. 60 °C'nin üstündeki sıcaklıklarda ise % 15'in altına düştüğü belirlendi. İlk 50 dk'dan sonrasında ise aktivitenin korunduğu belirlendi. Literatürdeki çalışmalara bakıldığında *G. thermodenitrificans* L-AI'sının 60 °C'nin altında kararlı kaldığı (en fazla % 90'a kadar düştüğü), ancak 60 °C'nin üstünde reaksiyon süresinin artmasıyla enzim aktivitesinin düştüğü (% 50'nin altına) görülmüştür (Kim ve Oh., 2005). *G.stearothermophilus*' da 55 °C'nin altında kararlı, fakat 60 °C'nin üstünde kararsız olduğu belirlenmiştir (Kim vd., 2005). Bu enzimin metal bağlı bir enzim olduğu, fakat ısıl kararlılığının yüksek olmadığı belirlenmiştir. Bunun ısı muamelesi sırasında enzimi kararlı tutacak tampon ve metal iyonlarının ortamda bulunmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Isıl kararlılık enzimin yapısıyla alakalıdır (Zhou vd., 2001). Isıl kararlılık pH ve metal iyonları gibi çevresel faktörlerden etkilenmektedir. Enzimin immobilizasyonu ile ısıl kararlılığı artan enzim çalışmaları bulunmaktadır.

A. kestanbolensis AC26 Sarı L-arabinoz izomerazının pH kararlılığının incelenmesi sonucu, 96 saat inkübe edildikten sonra aktivitenin; pH 8,'de % 79, pH 8,5'ta % 86, pH 9'da % 92 ve pH 10'da % 87'ye kadar, pH 5-6-7'de ise % 40'a kadar kararlı kaldığı

gözlemlendi. Bu sonuçlar doğrultusunda *A.kestanbolensis* AC26 Sarı L-AI'nın yüksek pH'larda daha kararlı olduğu söylenebilir. Literatürler incelendiğinde *G.thermodenitrificans*'ın L-AI'nın nötral pH'larda (7,5-8,0) daha kararlı olduğu bulunmuştur (Kim ve Oh, 2005). Yine aynı şekilde *G.stearothermophilus*'un L-AI'nın nötral pH'larda (7-8) daha kararlı olduğu belirtilmiştir. *Escherichia coli*'de L-AI'm alkalın şartlarda (8-10) kararlı olduğu asidik şartlarda enzim kararlılığının bozulduğu rapor edilmiştir (Yoon vd, 2002). *A. kestanbolensis* AC26 Sarı L-arabinoz izomerazının pH kararlılığı, pH kararlılığı bilinen L-AI 'ların pH kararlılıkları ile benzer olarak bulunmuştur.

Bilinen bütün L-AI'lar, aldozlardan L-arabinoza ve D-galaktoza karşı yüksek aktivite göstermektedir (Izumori vd., 1978; Jorgensen vd., 2004; Kim vd., 2002, 2003 ; Patrik ve Lee 1968; Yamanaka ve Wood, 1966). *A. kestanbolensis* AC26 Sarı LAI substrat spesifikliğine bakıldığında en yüksek aktiviteyi L-arabinoza (%100) karşı gösterdiği belirlenmiştir. D-ribozda %6, D-mannoz %2, D-glukozda %0,3, D-galaktozda %5 ve D-ksilozda %8 aktivite göstermiştir. Bu sonuçlar L-AI'm substrat olarak L-arabinoza spesifik olduğunu göstermiştir. *G. thermodenitrificans* ve *G. stearothermophilus* L-AI'ları ile yapılan çalışmalarda da L-arabinoza karşı yüksek aktivite görülürken D- glukozu karşı aktiviteye rastlanılmamış ve diğer aldozlara karşı düşük aktivite görülmüştür (Kim vd., 2003; Kim ve Oh 2005). Kim vd. (2009) L-AI'nın kristal yapısı üzerine yaptıkları çalışmada L-arabinoz ve D-galaktozun enzimin aktif bölgesine hidrojen bağları ile nasıl bağlandığı gösterilmiştir. Bu substratların C2 ve C5 atomları ile enzimin E330 ve E305 amino asitleri arasında hidrojen bağı oluşmaktadır. Bu bağlanmada L-arabinozun C2-C5 atomları ve E330-E305 amino asitleri arasındaki mesafe 2.0Å ve 1.9Å olarak belirtilmiştir. D- galaktoz için bu değerler ise 5.5Å ve 5.3Å 'dur. L-arabinozun aktif bölgeye daha yakın olması D-galaktozdan daha çok L-arabinozu tercih etmesinin sebebini açıklamaktadır. Li vd.,(2011) yapmış oldukları çalışmada *Anoxybacillus flavithermus* L-arabinoz izomerazının D-galaktoza olan ilgisini L-arabinoza olan ilgisinden % 60 daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. *Anoxybacillus* cinsi bir bakteri olmasına rağmen, *A. kestanbolensis* AC26 Sarı L-arabinoz izomerazı ile substrat spesifikliği açısından farklılık göstermektedir. Diğer L-AI'lar ve *A. flavithermus* L-AI'nın aktif bölgelerinin korunmuş bölgeleri *A. kestanbolensis* AC26 Sarı L-AI'ında 4 aminoasit açısından (V226-I226; R295-Q295; G340-S340; I468-V468) farklılık göstermektedir. *A. flavithermus* ve *A.*

kestanbolensis AC26 Sarı L-AI'nın substrat ilgisindeki farklılığının aminoasit dizilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

L-arabinoz izomerazlar C2'den C1'e hidrit değişim mekanizması ile izomerizasyon yaparlar ve metal iyonları bu reaksiyonda önemli bir rol alır. Özellikle Mn^{+2} ve Co^{+2} metal iyonlarının L-arabinoz izomerazı aktive ettikleri bilinmektedir. Yapılan bu çalışmada L-arabinoz izomerazın saflaştırılması sırasında, ortama katılan metal iyonlarının uzaklaştırılması için enzim, EDTA ile diyaliz edilmiştir. Bu yüzden içerisinde metal iyonu olmadan yapılan reaksiyon ölçümü negatif kabul edildi ve metal iyonlarının enzimin aktivitesi üzerindeki etkileri görülmüş oldu. En yüksek aktivite Mn^{+2} (% 432) ve Co^{+2} (% 344) varlığında görülmüştür. Mg^{+2} (% 244), $Mn^{+2} + Co^{+2}$ (% 209), Ca^{+2} (% 138) ve K^{+2} (% 107) metal iyonlarının aktiviteyi arttırdığı, Li^{+} (% 73), Cu^{+2} (% 24), Fe^{+2} (% 87) ve Zn^{+2} (% 47) metal iyonlarının ise inhibe ettiği görülmüştür. Bu sonuçların sebebinin enzimin metal bağlanma bölgelerindeki aminoasitlerle etkileşimi sonucu olduğu düşünülmektedir. Özellikle Mn^{+2} aktif bölge aminoasitleri ile koordine edilerek substrat ve aktif bölge arasında aracılık etmektedir. Literatüre bakıldığında; *G.thermodenitrificans*'da Mn^{+2} , Co^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} iyonlarının aktiviteyi arttırdığı, Fe^{+2} , Cu^{+2} iyonlarının aktiviteyi inhibe ettiği belirtilmiştir. Cu^{+2} iyonunun *Thermus sp.* (Kim vd.,2003), *T.neopolitana* (Kim vd., 2002), *Bacillus stearothermophilus* US100 (Rhim ve Bejar, 2005) enzim aktivitesini inhibe ettiği, Mn^{+2} , Co^{+2} iyonlarının ise aktive ettiği sonuçlarıyla örtüşmektedir. Mn^{+2} , mezofilik ve termofilik bakterilerde, arabinozun ribuloza dönüşüm reaksiyonun oranını arttıran, enzimin kofaktörü olarak bilinmektedir (Jorgensen vd., 2004; Nakamatu ve Yamaka, 1969; Patrick ve Lee, 1968). Aşırı termofiller ise gıda ürünlerinde kullanılmasına izin verilmeyen Co^{+2} iyonuna gereksinim duyarlar. Bu yüzden, *A. kestanbolensis* AC26 Sarı L-arabinoz izomerazı aktivitesi için Co^{+2} iyonuna gereksinim duymadığından endüstriyel L-ribuloz üretiminde kullanılabilir. Bu enzimin diğer inhibitörleri olan şeker alkollerinin etkisi incelendiğinde L-arabitol ve ribitolun güçlü bir inhibitör olduğu *G.thermodenitrificans*, *G.stearothermophilus*, *E. coli* ve *Mycobacterium smegmatis* (Kim ve Oh, 2005; Patrick ve Lee, 1968; Yamaka ve Wood, 1966) L-AI'ları ile yapılan çalışmalarda da rapor edilmiş ve *A.kestanbolensis* AC26 Sarı L-AI'yı da inhibe ettiği görülmüştür. Mannitolün enzim aktivitesini düşürmediği görülmüştür. *L. gayoni* L-AI'sı ile yapılan çalışmada mannitolün enzim aktivitesini değiştirmedeği rapor edilmiştir (Patrick ve Lee, 1968; Yamaka ve Wood, 1966).

Bu yüksek lisans tezinde *A.kestanbolensis* AC26 Sarı L-AI' nın L-arabinoz için K_m (6,5 mM) değerinin literatürdeki AI'ların K_m 'sine göre oldukça düşük, yani substrata ilgisinin daha yüksek olduğu bulunmuştur. *G. stearothermophilus*'un 67 mM (Kim vd., 2005), *Escherichia coli*'nin 60 mM (Yoon vd., 2003), *Bacillus stearothermophilus* US100'de 28,57 mM (Rhimi ve Bejar, 2005), *T. neapolitana*'da 116 mM (Kim vd., 2002), *T. maritima*'da 31 mM (Lee vd., 2004), olarak belirlenmiştir. Bu değerler ile karşılaştırıldığında *A.kestanbolensis* AC26 Sarı L-arabinoz izomerazının oldukça iyi bir K_m değeri vardır ve diğer L-AI'lara karşı endüstriyel açıdan avantaj sağlamaktadır. *A.kestanbolensis* AC26 Sarı L-AI'nın V_{max} değeri 140,1002 U/mg bulunmuştur. Literatürler incelendiğinde *T. neapolitana*'da V_{max} 119 U/mg (Kim vd., 2002), *T. maritima*'da 41,3 U/mg (Lee vd., 2004), *B. stearothermophilus* US100'de 41,8 U/mg (Rhimi ve Bejar, 2005), *G. stearothermophilus*'un 96 U/mg (Kim vd., 2005)' dir. *A.kestanbolensis* AC26 Sarı L-AI'nın iyi bir V_{max} değerinin olduğu görülmektedir ve bu açıdan diğer L-AI'lara karşı endüstriyel açıdan avantaj sağlamaktadır.

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26 Sarı L-arabinoz izomeraz geni klonlandı ve ekspres edildi. Saflaştırılan L-arabinoz izomeraz enziminin optimum pH, optimum sıcaklık, metal iyon etkisi ve kinetik parametreleri gibi biyokimyasal özellikleri araştırıldı.

A. kestanbolensis AC26 Sarı bakterisinin PCR ile elde edilen 1503 nt'lik L-arabinoz izomeraz geni, ilk olarak p-GEMT Easy klonlama vektörüne klonlandı ve sekans edilerek L-arabinoz izomeraz olduğu kesinleşti. L-arabinoz izomeraz olduğu kesinleştikten sonra gen pET28a+ ekspresyon vektörüne klonlanarak ekspres edildi ve saflaştırıldı.

A. kestanbolensis AC26 Sarı L-arabinoz izomerazının moleküler ağırlığının aminoasit sekansına göre 55,6776 kDa olduğu tespit edildi.

A. kestanbolensis AC26 Sarı L-arabinoz izomerazının optimum pH değerinin 8,5, optimum çalışma sıcaklığının ise 65 °C olduğu belirlendi. Enzimin substratı olarak L-arabinoz kullanılarak ilgili kinetik parametreleri incelendi ve bu substrat için K_m değeri 6,552 mM ve V_{max} değeri 140,1002 U/mg olarak belirlendi.

A. kestanbolensis AC26 Sarı L-arabinoz izomerazının ısıl kararlılığı incelendi. 50°C'de aktivitesinin 210. dk'da % 32 'ye, 55 °C'de % 15'e düştüğü, 60 °C'de % 12'ye, 65 °C'de % 7'ye, 70 °C'de % 6, 75 °C'de % 4 ve 80 °C 'de aktivitenin % 3'e düştüğü belirlendi.

A. kestanbolensis AC26 Sarı L-arabinoz izomerazının pH kararlılığı incelendi. Enzimin aktivitesinin 96. saate pH 5'de % 40'a, pH 6'da % 45'e ve pH 7'de % 42'ye pH 8'de % 79, pH 8,5'ta % 86'ya, pH 9'da % 92'ye, pH 10'da ise % 87'ye düştüğü gözlemlendi.

MnCl₂, CoCl₂, MgCl₂, FeSO₄, CaCl₂, ZnCl₂, CuCl₂, LiCl ve KCl metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerindeki etkisi incelendi. Metal iyonlarının 1 mM'lık konsantrasyonlarda aktiviteyi; LiCl'ün % 73'e, CuCl₂'ün % 24'e, FeSO₄'ün % 87'ye ZnCl₂'ün % 47'ye düşürdüğü gözlemlendi. MnCl₂'ün % 432'ye, CoCl₂'ün % 344'e, MgCl₂'ün % 244'e, CaCl₂'ün %138'e, ve KCl'nin % 107'ye ve CoCl₂+MnCl₂'ün % 209'a ve % 102'ye çıkardığı gözlemlendi. Kimyasalların *A. kestanbolensis* AC26 Sarı L-arabinoz izomerazının aktivitesi üzerindeki etkisi incelendiğinde EDTA'nın aktiviteyi % 46'ya, β-merkaptetanolün % 90'a düşürdüğü gözlemlendi. Diğer bir inhibitör grubu olan şeker

alkollerinden L-arabitol ve ribitolün aktiviteyi % 50 'den fazla düşürdüğü ve mannitolün enzim aktivitesini etkilemediği belirlendi.

A. kestanbolensis AC26 Sarı L-arabinoz izomerazının substrat spesifikliğı araştırıldı. Aldoz grubu şekerler ile yapılan incelemede, L-arabinoz ile yapılan reaksiyonun aktivite değeri % 100 kabul edildi. Buna bağılı olarak aktivitenin, D-riboz'da % 6'ya, D-mannoz'da % 2'ye, D-xyloz'da % 8'e, D-galaktoz'da % 5'e ve D-glukoz'da % 0,3'e düştüğü gözlemlendi.

6. ÖNERİLER

L- ribuloza karşılık, D-Tagatoz tüketimini endüstride oldukça geniş yer kaplamakta ve bunun öneminin daha da artacağına dair beklentiler bulunmaktadır. D-tagatozun üretmek için, L-arabinoz izomeraz kaynağı olarak termofilik bakteriler tercih edilmektedir. Çünkü tagatoz üretimi için yüksek sıcaklığın sağladığı; D-galaktozun D-tagatoza dönüşümündeki dengenin D-tagatoz yönünde olması, kontaminasyon riskini minimuma indirmesi gibi avantajları bulunmaktadır. Bu nedenle yüksek sıcaklığa, yüksek pH'ya ve kimyasal denatürasyona dayanıklı yeni enzimlerin elde edilmesine ihtiyaç vardır. Yapılan bu çalışmada ısı kararlılığının çok yüksek olmadığı belirlenen bu enzimin daha da kararlı hale getirilmesi için enzimin muhafaza edildiği koşullar değiştirilebilir. Enzim tampon ve metal iyonları içerisinde muhafaza edilerek kararlılığı artırılabilir.

Özellikle ısı kararlılığını arttırmak ve endüstride yararlı bir enzim olmasını sağlamaya yönelik L-arabinoz izomerazın aktif bölgesinde çeşitli mutasyonlar ve bununla birlikte enzimin immobilizasyon çalışmaları yapılabilir.

Anoxybacillus kestanbolensis AC26 Sarı L-arabinoz izomerazının araştırıldığı bu çalışmadaki karakterizasyon deneyleri L-arabinozun L-ribuloza çevrimi reaksiyonlarına göre yapılmıştır. L-arabinoz üzerinden yapılan bu çalışmaların D-galaktoz üzerinden D-tagatoza çevrimi için yapılması önerilebilir.

Enzim inhibisyonu üzerinde yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör çeşitleri artırılarak karakterizasyon çalışmaları zenginleştirilebilir.

Ayrıca karakterize edilmiş olan bu enzimin L-arabinoz operonunda bulunan diğer genlerle birlikte klonlanıp karakterizasyonu yapılarak, operon çalışmalarına katkı sağlanabilir.

7. KAYNAKLAR

- Ahmed, Z. ve Izumori, K., 2001. Bacterial L-ribose and L-arabinose Isomerase: Production, Isolation, Immobilization and Characterization, Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research, 35,1 - 4,90 – 104.
- Ahmed, Z., 2001. Production of Natural and Rare Pentoses Using Microorganisms and Their Enzymes, Electron. J. Biotechnol, 4, 2, 7.
- Ahmed, Z., Shimonishi, T., Bhuiyan, S., H., Utamura, M., Takada, G. ve Izumori, K., 1999. Biochemical Preparation of L-ribose and L-arabinose From Ribitol: A New Approach, Journal of Bioscience and Bioengineering, 88, 444-448.
- Adachi, O., Fujii, Y., Ano, Y., Moonmangmee, D., Toyama, H., Shinagawa, E., Theeragool, G., Lotong, N., ve Matsushita, K., 2001. Membrane-bound Sugar Alcohol Dehydrogenase in Acetic Acid Bacteria Catalyzes L-ribulose Formation and NAD-Dependent Ribitol Dehydrogenase is Independent of the Oxidative fermentation, Biosci. Biotechnol. Biochem, 65, 115–125.
- Banerjee, S., Anderson, F. ve Farber, G. K., 1995. The Evolution of Sugar Isomerases. Protein Eng., 8, 1189–1195.
- Bradford, M.M., 1976. Rapid and Sensitive Method for The Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilising The Principle of Protein Dye Binding, Anal. Biochem., 72, 248 – 254.
- Burg, B., V., D., 2003. Extremophiles as a Source for Novel Enzymes, Current Opinion in Microbiology, 6, 213-218.
- Chakravarthy, S. ve Varadarajan, R., 2000. Elucidation of Determinants of Protein Stability Through Gene Sequence Analysis, FEBS Lett., 227, 260-267.
- Cheetham, P., S., J. ve Wootton, A., N., 1993. Enzyme Microb Technol, Bioconversion of D-galactose into D-tagatose, 15, 105–108.
- Colacino, F. ve Crichton, R., R., 1997. Enzyme Thermostabilization: The State of the Art, Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 14, 211-277.
- Compello, J.P. ve Veiga, L.A. 1973. Enzymatic Preparation of L-ribulose and D-xylulose, An. Acad. Brasil. Cienc., 45, 309-313.
- Das, R. ve Gerstein, M., 2000. The Stability of Thermophilic Proteins: A Study Based on Comprehensive Genome Comparison, Funct. Integr. Genomics, 1, 76-88.

- Dische , Z. ve Borenfreund, E., 1951. A New Spectrophotometric Method for the Detection and Determination of Ketosugars and Trioses. J. Biol. Chem., 192, 583-587.
- Dunn, T., Hahn, S., Ogden, S. ve Schleif, R., 1984. An Operator at -280 Base Pairs That is Required for Repression of *araBAD* Operon Promoter: Addition of DNA Helical Turns Between the Operator and Promoter Cyclically Hinders Repression, Proc. Natl Acad. Sci USA, 81, 5017-5020.
- Englesberg, E., Irr, J., Power, J. ve Lee, N., 1965. Positive Control of Enzyme Synthesis by Gene *araC* in the L-arabinose System, J. Bacteriol., 90, 946-957.
- Englesberg, E., Sheppard, D., Squires, C. ve Meronk, F., Jr., 1969. An Analysis of "Revertants" of a Deletion Mutant in the C Gene of the L-arabinose Gene Complex in *Escherichia coli* B/r: Isolation of Initiator Constitutive Mutants (Ic), J. Mol. Biol., 43, 281-298.
- Gielow, L., Lagen, M. ve Englesberg, E., 1971. Initiator Constitutive Mutants of the L-arabinose Operon (OIBAD) of *Escherichia coli* B/r, Genetics, 69, 289-302.
- Gümüşel, F., 2002. Biyoteknoloji, Genetik ve Sağlık Sektörü, Kocaeli Sanayi İçin Teknolojik Uzgörü Ortak Projesi, 73-135.
- Greenblatt, J. ve Schleif, R., 1971. Regulation of the Arabinose Operon in vitro, Nat New Biol, 233, 166-170.
- Gross, J. ve Englesberg, E., 1959. Determination of the Order of Mutational Sites Governing L-arabinose Utilization in *Escherichia coli* B/r by Transduction with Phage P1bt, Virology, 9, 314-331.
- Gupta, M., 1995. Thermostability of Enzymes, Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Haki, G., D. ve Rakshit, S., K., 2003. Developments in Industrially Important Thermostable Enzymes: a Review, Bioresource Technology, 89, 17-34.
- Haney, P.J., Badger, J.H., Buldak, G.L., Reich, C.I., Woese, C.R. ve Olsen, G., 1999. Thermal Adaptation Analyzed by Comparison of Protein Sequences from Mesophilic and Extremely Thermophilic *Methanococcus* species, Proc. Natl. Acad. Sci., 96, 3578-3583.
- Hong, Y. H., Lee, D. W., Lee, S. J., Choe, E. A., Kim, S. B., Lee, Y. H., Cheigh, C. I. ve Pyun, Y. R., Production of D-tagatose at High Temperatures Using Immobilized *Escherichia coli* Cells Expressing L-arabinose Isomerase from *Thermotoga neapolitana*, 2007. Biotechnol Lett, 29, 569 – 574.
- Horikoshi, K., 1999. Alkaliphiles: Some Applications of Their Products for Biotechnology, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 63, 735-750.

- Hutchinson, E., G. ve Thornton, J., M., 1996. Promotif- a Program to Identify and Analyze Structural Motifs in Proteins, Protein Sci., 5, 212–220.
- Izumori K., Miyoshi T., Tokuda S. ve Yamabe K., 1984. Production of Dtagatose from Ducitol by *Arthrobacter globiformis*, Appl Environ Microbiol,46, 1055–1057.
- Izumori, K., Ueda, Y. ve Yamanaka, K.,1978. Pentose Metabolism in *Mycobacterium smegmatis*: Comparison of L-arabinose Isomerases Induced by L-arabinose and D-galactose, J. Bacteriol,113, 1, 413 – 414.
- İnan, K., 2011. İzmir ve Aydın İllerindeki Bazı Kaplıcalardan İzole Edilen Termofilik Bakteri İzolatlarının Moleküler Taksonomisi ve D1021 İzolatının Glukoz İzomerazının Karakterizasyonu Doktora Tezi, K.T.Ü, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Jaenicke, R. ve Bohm, G., 1998. The Stability of Proteins in Extreme Environments, Curr. Opin. Struct. Biol., 8, 738-748.
- Jorgensen, F., Hansen, O., C. ve Stougaard, P., 2004. Enzymatic conversion of D-galactose to D-tagatose: Heterologous Expression and Characterization of a Thermostable L-arabinose Isomerase from *Thermoanaerobacter mathranii*, Appl Microbiol Biotechnol, 64, 816–822.
- Kim, P., Yoon, S., H., Roh, H., J. ve Choi, J., H., 2001. High Production of D-tagatose, A Potential Sugar Substitute, Using Immobilized L-arabinose Isomerase, Biotechnol. Prog. 17, 208–210.
- Kim, B., C., Lee, Y., H., Lee, H., S., Lee, D., W., Choe, E., A. ve Pyun, Y., R., 2002. Cloning, Expression and Characterization of L-arabinose Isomerase from *Thermotoga neapolitana*: Bioconversion of D-galactose to D-tagatose Using the Enzyme, FEMS Microbiol Lett., 212, 121–126.
- Kim, H., J., Ryu, S., A., Kim, P. ve Oh, D. K., 2003. Feasible Enzymatic Process for D-tagatose Production by an Immobilized Thermostable L-arabinose Isomerase in a Packed-Bed Bioreactor, Biotechnol Prog,19, 400–404.
- Kim, J. W., Kim, Y., W., Roh, H., J., Kim, H., Y., Cha, J., H., Park, K., H. ve Park, C., S., 2003. Production of Tagatose by A Recombinant Thermostable L-arabinose isomerase from *Thermus sp.* IM6501, Biotechnol Lett. 25, 963–967.
- Kim, H. J. ve Oh, D. K., 2005. Purification and Characterization of an L-arabinose Isomerase from an Isolated Strain of *Geobacillus thermodenitrificans* producing D-tagatose, Journal of Biotechnology, 120, 2, 162 -173.
- Kim, H. J., Kim J. H., Oh H. J. ve Oh, D. K., 2005.Characterization of a Mutated *Geobacillus stearothermophilus* L-arabinose Isomerase that Increases the Production Rate of D-tagatose, J Appl Microbiol, 101, 1, 213-217.

- Kim, H. J., Prabhu, P., Jeya, M., Tiwari, K. M., Moon, H. J., Singh, R. K. ve Lee, J. K., 2009. Characterization of an L-arabinose Isomerase from *Bacillus subtilis*, Appl Microbiol Biotechnol, 85, 1839-1847.
- Kohilu, U., Nigam, P., Singh, D. ve Chaudhary, K., 2001. Thermostable, Alkaliphilic and Cellulase Free Xylanases Production by *Thermoactinomyces thalophilus* Subgroup C., Enzyme Microb. Technol., 28, 606–610.
- Kumar, H., D. ve Swati, S., 2001. Modern Concepts of Microbiology, Second Revised, Vikas Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi.
- Lee, D., W., Jang, H., J., Choe, E., A., Kim, B., C., Lee, S., J., Kim, S., B., Hong, Y., H. ve Pyun, Y., R., 2004. Characterization of A Thermostable L-arabinose (D-galactose) Isomerase from the Hyperthermophilic *Eubacterium Thermotoga maritima*, Appl Environ Microbiol, 70, 1397–1404.
- Lee, D.W., Choe, E.A., Kim, B.C., Eom, S.H., Hong, Y.H., Lee, S.J., Lee, H.S. ve Lee, D.Y., 2005. Distinct Metal Dependence for Catalytic and Structural Functions in the L-arabinose Isomerase from the Mesophilic *Bacillus halodurans* and the Thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*. Arch Biochem Biophys 434, 333–343.
- Li, Y., , Zhu, Y., Liu, A. ve Sun Y., 2011. Identification and Characterization of a Novel L-arabinose Isomerase from *Anoxybacillus flavithermus* Useful in D-tagatose Production, Extremophiles, 441-450.
- Lineweaver, H. ve Burk, D., 1934. The Determination of Enzyme Dissociation Constant, Journal of American Chemical Society, 56, 658 -661.
- Madigan, M.T. ve Martinko, J.J., 2010. Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi, Prof.Dr. Cumhuriyet Çökmüş, 11, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Maniatis, T. ve Fritsch, E.F., 1982. Sambrook, J., Molecular Cloning A Laboratory Manuel, Cold Spring Harbor, New York, 545 p.
- Manjasetty, B.A. ve Chance, M.R., 2006. Crystal Structure of Escherichia coli L-Arabinose Isomerase (ECAI), The Putative Target of Biological Tagatose Production, J. Mol. Biol., 306, 297 – 309.
- Manzoni, M. ve Rollini, M., 2001. Bioconversion of D-galactitol to Tagatose by Acetic acid Bacteria, Process Biochem, 36, 971–977.
- Mozhaev, V., 1993. Mechanism-Based Strategies for Protein Thermostabilization, Trends in Biotechnology, 11, 88-95.
- Moses, V. ve Ferrier, R.J., 1962. The Biochemical Preparation of D-xylulose and L-ribulose, Biochemical Journal, 83:8-14.

- Muniruzzanamn, S., Tokunaga, H. ve Izumori, K., 1994. Isolation of *Enterobacter agglomerans* strain 221e from Soil, a Potent D-tagatose Producer from Galactitol, J Ferment Bioeng, 78, 145–148.
- Osao, A.; Yoshikazu, F., Yoshitaka, A., Duangtip, M., Hirohide, T., Emiko, S., Gunjana, T., Napha, L. ve Kazunobu, M., 2001. Membrane-bound Sugar Alcohol Dehydrogenase in Acetic Acid Bacteria Catalyzes L-ribulose Formation and NAD-Dependent Ribitol Dehydrogenase is Independent of the Oxidative Fermentation, Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 65, 136-139.
- Patrick, J., W. ve Lee, N., J., 1968. Purification and Properties of an L-Arabinose Isomerase from *Escherichia coli*, Biol. Chem., 243, 4312.
- Patrick, J., W. ve Lee, N., 1969. Subunit Structure of Larabinose Isomerase from *Escherichia coli*, J. Biol. Chem., 244, 4277–4283.
- Patrick, J., W., Lee, N., Barnes, N., B. ve Englesberg, E., 1971. Coordination of enzyme synthesis in the Larabinose operon in *Escherichia coli*. I. The effect of manganous ion on the synthesis of L-arabinose isomerase, J. Biol. Chem., 246, 5102–5106.
- Pikuta, E., Lysenko, A., Chuvilskaya, N., Mendrock, U., Hippe, H., Suzina, N., Nikitin, D., Osipov, G. ve Laurinavichius, K., 2000. *Anoxybacillus pushchinensis* gen. nov., sp. nov., a Novel Anaerobic, Alkaliphilic, Moderately Thermophilic Bacterium from Manure, and Description of *Anoxybacillus flavithermus* comb. nov., Int. J.Syst. Evol. Microbiol., 50, 2109-2117.
- Querol, E., Perez-Pons, J., A. ve Mozo-Villarians, A., 1996. Analysis of Protein Conformational Characteristics Related to Thermostability, Protein Eng., 9, 265-271.
- Rhimi, M. ve Bejar, S., 2005. Cloning, Purification and Biochemical Characterization of Metallic-ions Independent and Thermoactive L-arabinose Isomerase from the *Bacillus stearothermophilus* US100 strain. Biochim Biophys Acta, 1760, 191–199.
- Roh, H., J., Kim, P., Park, Y., C. ve Choi, J., H., 2000. Bioconversion of D-galactose into D-tagatose by Expression of L-arabinose Isomerase, Biotechnol Appl Biochem, 31, 1–4.
- Rose, I., A., O’conell, E., L. ve Mortlock, R., P., 1969. Stereochemical evidence for a cisenediol intermediate in Mn-dependent Aldoseisomerases. Biochim. Biophys. Acta., 178, 376.
- Russell, R., Ferguson, J., Hough, D., Danson, M. ve Taylor, G., L., 1997. The Crystal Structure of Citrate Synthase from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* at .9 A Resolution, Biochemistry, 36, 9983-9994.
- Russell, R., Gerike, U., Danson, M., Hough, D. ve Taylor, G., L., 1998. Structural Adaptations of the Cold-Active Citrate Synthase from an Antarctic Bacterium, Structure, 6, 351-361.

- Sağıroğlu, A., 1999. Serbest Tripsin ile Peptit ve Sentezlerinde Reaksiyon Ortamının Karakterizasyonu, XIII Kimya Kongresi, Eylöl, Samsun, Kongre Kitabı: 261.
- Sa-Nogueria, I., Nogueria, T. V., Soares, S. ve Lencastre, H., 1997. The *Bacillus subtilis* L-arabinose (ara) Operon: Nucleotide Sequence, Genetic Organization and Expression, *Microbiology*, 143, 957-969.
- Scandurra, R., Consalvi, V., Chiaraluce, R., Politi, L. ve Engel, P., C., 1998. Protein Thermostability in Extremophiles, *Biochimie.*, 80, 933-941.
- Schleif, R., 1996. Two Positively Regulated Systems, *ara* and *mal*. In *Escherichia coli* and *Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, pp. 1300-1309. Edited by F.C. Neidhardt, R. Curtiss, III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W.s. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter ve H. E. Umbarger. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Schleif, R., 2002. Regulation of the L-arabinose Operon in *Escherichia coli*. Biology Departmen, Johns Hopkins University, 3400 N. Charles St, Baltimore, MD21218, USA.
- Scott, A., 2002. Danisco aims to ramp up sales of “pharmaceutical sugars.” Chem. Week 164, 43.
- Seabold, R. ve Schleif, R., 1998. Apo-AraC Actively Seeks to Loop, *J Mol Biol*, 278, 529-538.
- Sheppard, D. ve Englesberg, E., 1967. Further evidence for positive control of the L-arabinose system by gene *araC*, *J Mol Biol*, 25, 443-454.
- Shimonishi, T., Okumura, Y. ve Izumori, K., 1994. Production of D-tagatose from galactitol by *Klebsiella pneumoniae* strain 40b, *J. Ferment Bioeng.*, 78, 145–148.
- Stark, A. ve Russell, R., B., 2003. Annotation in Three Dimensions. PINTS: Patterns in Non-homologous Tertiary Structures. *Nucl. Acids Res.*, 31, 3341–3344.
- Spagnuolo, M., Crecchio, C., Pizzigallo, M. D. R ve Ruggiero, P., 1999. Fractionation of Sugar Beet Pulp into Pectin, Cellulose, and Arabinose by Arabinases Combined with Ultrafiltration, *Biotechnol. Bioeng.*, 64, 685–691.
- Stener, R. Ve Liebl, W., 2001. Thermophilic Adaptation of Proteins, *Crit Rev Biochem Mol Biol* ., 36, 39-106
- Telefoncu, A., 1997. Enzimoloji, Lisansüstü Yaz Okulu. Kuşadası, Aydın-Türkiye, 446 s.
- Thompson, M., J. ve Eisenberg, D., 1999. Transproteomic Evidence of a Loop-Deletion Mechanism for Enhancing Protein Thermostability, *J. Mol. Biol.*, 290, 595-604.

- Topal, S., Pembeci, C., Borcaklı, M., Batum, M. ve Çeltik, Ö., 2000. Türkiye'nin Tarımsal Mikroflorasının Endüstriyel Önem Sahip Bazı Enzimatik Aktivitelerinin İncelenmesi-I Amilaz, Proteaz, Lipaz, Turkish Journal of Biology, 24, 79-93.
- URL-1, www.endmemo.com/bio/promw.php. 10 Temmuz 2012.
- Vogt, G., Woell, S. ve Argos, P., 1997. Protein Thermal Stability, Hydrogen Bonds, and Ion Pairs, J. Mol. Biol., 269, 631-643.
- Vieille, C., Burdette, D., S. ve Zeikus, J., G., 1996. Thermozyms, Biotechnol. Ann. Rev., 2, 1-83.
- Wallace, L., J., Eiserling, F., A. ve Wilcox, G., 1978. The Shape of L-arabinose Isomerase from *Escherichia coli*, J. Biol. Chem., 253, 3717-3720.
- Wiseman, A., 1987. Handbook of Enzymes Biotechnology, Second Edition. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry, New York, 274-373.
- Yamanaka, K. ve Wood, W. A., 1966. L-arabinose Isomerase, Methods Enzymology 9, 596 – 602.
- Yoon S. H., Kim P. ve Oh D.K., 2003. Properties of L-arabinose Isomerase from *Escherichia coli* as Biocatalyst for Tagatose Production. World J Microbiol Biotechnol 19, 47-51
- Zhou, F., X., Merianos, H., J., Brunger, A., T. ve Engelman, D., M., 2001. Polar Residues Drive Association of Polyleucine Transmembrane Helices, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98, 2250-2255.

8. EKLER

Ek 1. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı L-AI geninin nükleotit sırası

GTGTTATTATTACGTCCTTATGAATTTTGGTTTTTGGACAGGAAGTCAGCATTATATATGGGG
AAGAGGTATTACAACAAGTGGAAGGGCATTTCGAGAACGATCGTCAATGAGTTGAATCGTGA
TTCCGTGTTCCCGTTCTCCTTCGTTTTCAAATCGGTTCGTAACAACGCCAGAAGAAATTCGG
AACGTTTGCCTTGAGGCGAATGCGAGCGAACAATGCGCCGGAGTCATTACTTGGATGCATA
CGTTCTCGCCAGCGAAGATGTGGATTGGCGGCCCTGTTGGAGTTGCGAAAACCATTATTGCA
TCTTCATACGCAGTTTAACCGTGATATTCCATGGGATAGCATCGATATGGACTTTATGAAC
TTAAACCAATCGGCTCACGGTGACCGGGAATACGGATTTATCGGTGCGAGAATGGGAGTGG
CCCGGAAAGTGTTGTTGGTTCATTGGGAAGACCCAGAAGTCCGGGAGCGGCTGGCGAAATG
GATGCGGACGGCCGTCGCCTTTGCGGAAAGCCGCCAGCTCAAAGTGGCTCGTTTCGGCGAT
AACATGCGTGAAGTGGCGGTAACGGAAGGGGACAAAGTGGGAGCGCAAATTC AATTCGGTT
GGTCGGTCAACGGTTATGGTGTGGGGATTTAGTGCAATCGATTCGTGATGTTTCTGAACA
AAGCATTAAACGAACCTGCTTGATGAATACGCCGAACGTATGACATGGTACCTGCCGGCCGT
CAAGATGGACCTGTTTCGCGAATCCATCCGCGAGCAGGCTCGAATTGAGCTTGGGTAAAAG
CCTTTTTGCAAGATGGCAACTTCACCGCCTTTACGACGACGTTTCGAGGACTTGCATGGCAT
GAAGCAACTCCCAGGACTTGCGGTTCAACAGCTCATGGCAGAAGGATATGGATTTGGCGGC
GAAGGCGATTGGAAAACAGCCGCCCTCGTTTCGGTTGATGAAAGTGATGGCCGATGGCAAAG
GGACGTCGTTTATGGAAGACTACACGTACCACTTTGAGCCGAGCAACGAACCTGATTCTCGG
CGTCATATGCTCGAAGTATGTCCGACGATCGCGGCAACGCGACCGCGCATTGAAGTTCAT
CCGCTTTCCATTGGCGGAAAAGAAGATCCAGCCCGCCTCGTGTTTGACGGCGGCGAGGGCG
CGGCGGTCAATGCTTCGCTGATCGATTTAGGGCACCGCTTCCGTCTCATTGTCAATGAAGT
CGATGCGGTAAAACCGAAACACAACATGTCGAAATTGCCAGTTGCCCGCATTTTATGGAAA
CCGCGCCCATCGTTGCGCGATTTCGGCTGAAGCATGGATTTTAGCTGGCGGCGCGCATCATA
CGTGTTTCTCATTTGCGGTTACAACAGAACAATTGCAAGACTTTGCGGAAATAATCGGTGT
GGAGTGTGTAGTGATTAATGAACATACTTCTGTGCATCGTTCAAAAATGAATTGAGATGG
AATGAGGTGTTCTGGGGTGGAAAATAAGATTTAATATAATAG

Ek 2. A. *kestanbolensis* AC26 Sarı L-AI geninin amino asit sırası

VLLLRPYEFWFLTGSQHLYGEEVLQQVEGHSRTIVNELNRDSVFPFSFVFKSVVTTPEEIR
 NVCLEANASEQCAGVITWMHTFSPAKMWIGGLELRKPLLHLHTQFNRDIPWDSIDMDFMN
 LNQSAHGDREYGFIGARMGVARKVVVGHWEDPEVRERLAKWMRTAVAFaesrQLKVARFGD
 NMREVAVTEGDKVGAQIQFGWSVNGYGVGDLVQSIRDVSEQSINELLDEYAELYDMVPAGR
 QDGPVRESIREQARIELGLKAFLODGNFTAFTTTTFEDLHGKQLPGLAVQQLMAEGYGFGG
 EGDWKTAAALVRLMKVMADGKGTSFMEDYTYHFEPSNELILGAHMLEVCP TIAATRPRIEVH
 PLSIGGKEDPARLVFDGGEGA AVNASLIDLGHRFR LIVNEVDAVKPKHNMSKLPVARILWK
 PRPSLRDSAEAWILAGGAHHTCF SFAVTTEQLQDFAEIIIGVECVVINEHTSVASFKNELRW
 NEVFWGGKStopDLIStopStop

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Ankara'da doğdu. İlkokulu ve Ortaokulu Bandırma'da Vecihbey İlköğretim Okulu'nda okudu. Lise eğitimini, 2004 yılında Kemal Pireci Yabancı Dil Ağırlıklı Süper Lisesi'nde tamamladı. 2004 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümüne giriş yaptı ve 2009 tarihinde bu bölümden mezun oldu. Aynı yıl içerisinde Karadeniz Teknik Üniversitesi'nde Biyoloji Bölümü, Biyoloji Ana Bilim Dalı altında Moleküler Biyoloji Bilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı ve bu alanda yüksek lisans eğitimine devam etmektedir. İyi seviyede İngilizce bilmektedir.