

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***Anoxybacillus kestanbolensis* AC26Sarı Suşundan Arabinofuranosidaz Geninin
Klonlanması, Ekspresyonu ve Enzimin Karakterizasyonu**

**Biyolog
Murat KAÇAĞAN**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nce
“Yüksek Lisans (Biyoloji)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir**

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 17.06.2008

Tezin Savunma Tarihi : 06.08.2008

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ahmet ÇOLAK

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. İsmail DEMİR

Enstitü Müdür V. : Doç. Dr. Salih TERZİOĞLU

Trabzon 2008

ÖNSÖZ

Anoxybacillus kestanbolensis AC26Sarı Arabinofuranosidaz geninin klonlanması, ekspresyonu ve enziminin karakterizasyonu konulu tez çalışması Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Çalışmalarımın yürütülmesi sırasında gerek deneylerin yapılması gerekse tezimin yazımı sırasında her türlü değerli bilgisini ve fikirlerini benimle paylaşan, desteğini benden esirgemeyerek yardımcı olan danışman hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI'ya ve hocam Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ'e sonsuz teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim sürecinde bilgilerini benimle paylaşan ve desteklerini hep yanımda hissettiğim Kadriye İNAN'a, Derya YANMIŞ'a, Dilşat Nigar ÇOLAK'a, Elif SEVİM'e, , Fulya AY'a, Hakan KARAOĞLU'na, Mutlu GÜLTEPE'ye, Pınar YEŞİLGİL'e, Uğur UZUNER'e, Yusuf BEKTAŞ'a, Zeliha CEVHER'e ve Rize Üniversitesi öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Cemal SANDALLI'ya ve Yrd. Doç. Dr. Fatih Şaban BERİŞ'e katkılarından dolayı teşekkür ederim. Cihaz kullanımında gösterdikleri anlayışın yanında her türlü bilgi ve desteğini esirgemeyen tüm Biyoloji Bölümü laboratuvarları Hocaları ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Desteğini her zaman yanımda hissettiğim, hayat arkadaşım Özlem'e ve oğlum Oğuzhan'a sonsuz teşekkür ederim.

Murat KAÇAĞAN

Trabzon 2008

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET	VI
SUMMARY	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ	IX
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	X
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. <i>Anoxybacillus</i> Cinsinin Genel Özellikleri.....	2
1.3. <i>Anoxybacillus kestanbolensis</i> AC26Sarı Bakterisinin İzole Edildiği Kaplıcanın Genel Özellikleri.....	3
1.4. Termofilik Bakterilerin Genel Özellikleri.....	6
1.4.1. DNA Yapısı.....	6
1.4.2. Protein Yapısı.....	7
1.4.3. Hücre Membran Yapısı	8
1.4.4. RNA Yapısı.....	9
1.4.5. Küçük Moleküller	9
1.5. Termofilik Organizmaların ve Enzimlerin Biyoteknolojik ve Endüstriyel Kullanım alanları.....	9
1.6. Arabinofuranosidaz (Abf) Enziminin Genel Özellikleri.....	13
1.6.1. Arabinofuranosidaz Enziminin Biyoteknolojik Uygulamaları	15
1.6.1.1. Abf Şarap Endüstrisindeki Rolü.....	16
1.6.1.2. Abf'nin Asetik Asit Üretimi ve Ekmeğin Kalitesinin Artırılmasındaki Rolü.....	16
1.6.1.3. Abf'nin Kağıt Hamuru ve Kağıt Endüstrisindeki Rolü.....	17
1.6.1.4. Abf'nin Hayvan Yemi Endüstrisindeki Kullanımı.....	18
1.6.1.5. Abf'nin Meyve Suyu Üretimindeki Rolü.....	18
1.6.1.6 Abf'nin Substrat Spesifikliği.....	19

1.6.2.	Abf'nin Aktif Bölgeleri.....	19
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR	22
2.1.	<i>Anoxybacillus kestanbolensis</i> AC26Sarı'da Abf Aktivitesinin Tespiti	22
2.2.	Moleküler Çalışmalar	23
2.2.1.	Genomik DNA İzolasyonu	23
2.2.2.	Abf Geninin PCR Yöntemi ile Belirlenmesi ve Klonlanması	23
2.2.3.	Ters PCR (Inverse PCR) İle Genin Kalan Kısımlarının Yakalanması ve Klonlanması	24
2.2.4.	Abf Geninin pET28-a(+) Vektörüne Klonlanması, Ekspresyonu ve Enziminin Saflaştırılması	25
2.3.	Biyokimyasal Çalışmalar	27
2.3.1.	Protein Tayini	27
2.3.2.	Reaksiyonlarda Kullanılacak Enzim Miktarının Belirlenmesi	27
2.3.3.	Optimum Sıcaklık	27
2.3.4.	Optimum pH	28
2.3.5.	Enzim Kinetiği	28
2.3.6.	pH Kararlılığı	28
2.3.7.	Isıl Kararlılığı	29
2.3.8.	Aktivatör Etkisi	29
2.3.9.	İnhibitör Etkisi	29
2.3.10.	Substrat Spesifikliğinin Belirlenmesi	30
2.3.11.	Doğal ve SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi	31
3.	BULGULAR	32
3.1.	<i>Anoxybacillus kestanbolensis</i> AC26Sarı'de Abf Aktivitesinin Tespiti	32
3.2.	Abf Aktivitesi	32
3.3.	Moleküler Çalışmalar	33
3.3.1.	Abf Geninin PCR Yöntemi ile Belirlenmesi ve Klonlanması	33
3.3.1.1.	Dejenerat Primer Sentezi	33
3.3.1.2.	PCR Reaksiyonu ile Abf Gen Parçasının Çoğaltılması ve Klonlanması	33
3.3.1.3.	Ters PCR (Inverse PCR) ile Genin Kalan Kısımının Bulunması	34
3.3.2.	Arabinofuranosidaz Geninin pET28-a(+) Vektörüne Klonlanması ve Ekspresyonu	42
3.4.	Biyokimyasal Çalışmalar	42
3.4.1.	Reaksiyonlarda Kullanılacak Enzim Miktarının Belirlenmesi	43
3.4.2.	Optimum Sıcaklık	44

3.4.3. Optimum pH	44
3.4.4. Kinetik İncelemeler	45
3.4.5. pH Kararlılığı	47
2.4.6. Isıl Kararlılığı	47
3.4.7. Aktivatör Etkisi	48
3.4.8. İnhibitör Etkisi.....	49
3.4.9. Enzimin Substrat Spesifikliği.....	49
3.4.10. Doğal ve SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	51
4. TARTIŞMA	52
5. SONUÇLAR	56
6. ÖNERİLER.....	58
7. KAYNAKLAR.....	59

ÖZGEÇMİŞ

ÖZET

Bu çalışmada, *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26Sarı suşundan α -L-Arabinofuranosidaz geninin elde edilmesi, klonlanması, ekspresyonu ve enziminin karakterizasyonu yapılmıştır.

Klonlanıp ekspres edilen bu enzimin molekül ağırlığı 57 kDa olup amino asit benzerliğine göre glikosil hidrolaz familya 51 sınıfı bir enzim olduğu belirlendi. Ekspresyon vektörüne (pET28a+) his taq kuyruk içerecek şekilde klonlanan arabinofuranosidaz (Abf) geni *Escherichia coli* BL21 hücrelerine aktararak enziminin ekspresyonu gerçekleştirildi. MagneHis™ Protein Purification System (Promega) kiti kullanılarak enzim saflaştırıldı ve karakterizasyonu yapıldı. Enzimin çeşitli pH aralıklarında (pH 4.0 - 10.0) ve sıcaklıklarda (40-90°C) gerçekleştirilen çalışmalar sonucu optimum aktivite gösterdiği pH'ın 6.5 ve optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın 65°C olduğunu belirlendi. Substrat olarak *p*-nitrophenyl α -L-arabinofuranosid ve şeker beet arabinan kullanılarak yapılan kinetik çalışmalar sonucunda K_m değerleri sırasıyla 0.139 mM ve 5.21 mg/ml, V_{max} değerleri ise sırasıyla 1019 U/mg protein ve 156.25 μ mol olarak belirlendi. Metal iyonlarının ve çeşitli kimyasalların enzime olan etkileri değişik konsantrasyonlarda gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda belirlendi ve 1 mM konsantrasyonda Cu^{2+} ve Hg^{2+} bivalent metal iyonlarının enzim aktivitesini neredeyse tamamen inhibe ettiği görüldü. Saflaştırılan enzim şeker beet arabinan, rye arabinoxylan, oat spelt xylan ve arabinoooligosakkaritleri (arabinobiose, arabinotriose, arabinotetraose ve arabinopentaose) hidroliz ederek arabiboz şekeri açığa çıkardığı gözlemlendi ve bu açığa çıkan arabiboz şekeri ince tabaka kromatografisi (TLC) ile tespit edildi. *A. kestanbolensis* AC26Sarı suşuna ait arabinofuranosidaz enziminin endo arabinanaz aktivitesi substrat olarak Red Debranched Arabinan (RDA) kullanılarak araştırıldı ve yapılan deneyler sonucunda enzimin endoarabinanaz aktivitesine sahip olmadığı görüldü. Yapılan çalışmalar sonucunda enzimin bir ekzo-arabinofuranosidaz olduğuna karar verildi.

Anahtar Kelimeler: α -L-Arabinofuranosidaz, *Anoxybacillus kestanbolensis*, Arabinan, Rye arabinoxylan, Arabinoooligosakkarit

SUMMARY

Cloning, Expression and Characterization of Thermophilic Arabinofuranosidase from *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26Sari

The gene, AbfAC26Sari, encoding an α -L-arabinofuranosidase from *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26Sari, was isolated, cloned, expressed, and characterized.

On the basis of amino acid sequence similarities, this 57 kDa enzyme could be assigned to family 51 of the glycosyl hydrolase classification system. Characterization of the purified recombinant α -L-arabinofuranosidase produced in *Escherichia coli* BL21 revealed that it is active at a broad pH range (pH 4.0 to 10.0) and at a broad temperature range (40-90°C), and it has an optimum pH of 5.5 and an optimum temperature of 65°C. Abf gen, includes his taq tail, cloned in expression vector (Pet28 a +) was transformed into E. coli cell BL21 and enzyme expression was done. The enzyme was purified by MagneHisTM Protein Purification System (Promega) and characterized. Kinetic experiment at 65°C with *p*-nitrophenyl α -L-arabinofuranoside and arabinan as substrate gave a V_{max} of values 1019 U/mg and 156.25 μ mol , and K_m values of 0.139 mM ve 5,21 mg/ml, respectively. Effects of metal ions and chemicals on the enzyme was determined by the studies that were conducted with different concentrations. Cu^{+2} and Hg^{+2} (1Mm) almost completely inhibited the enzyme activity. The recombinant arabinofuranosidase released L-arabinose from arabinan, arabinoxylan, oat spelt xylan, arabinobiose, arabinotriose, arabinotetraose, and arabinopentaose and the sugars were separated by thin layer chromatography. Endoarabinase activity of ABf from *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26Sari was studied by using RDA as substrate. Endoarabinase activity was not detected. These findings suggest that ABfAC26Sari is an exo-acting enzyme.

Key Words: α -L-Arabinofuranosidase, *Anoxybacillus kestanbolensis*, Arabinan, Arabinoxylan, Arabinooligosaccharides

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Abf enziminin aktif bölgeleri.....	20
Şekil 2. Abf enziminin florojenik substrat (metilumbellipheril pNP- α -L-arabinofuranoside) ile muamelesi sonucu oluşan doğal PAGE 'i.....	32
Şekil 3. Dejenerat primerler kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltılan <i>A. kestanbolensis</i> AC26Sarı'ya ait 300 nükleotidlik Arabinofuranosidaz gen parçasının baz dizilimi	34
Şekil 4. Ara F ve Ara R primerleri kullanılarak yapılan ters PCR sonucu elde edilen (altı çizili) Abf geninin bir parçası.....	35
Şekil 5. PCR ve Ters PCR'lar sonucu elde edilen <i>A. kestanbolensis</i> AC26Sarı Abf geninin tamamı.....	35
Şekil 6. <i>A. kestanbolensis</i> AC26Sarı'nın Arabinofuranosidaz geninin nükleotit bazında diğer yakın bakterilerle karşılaştırılması	38
Şekil 7. pET28a(+) ekspresyon vektörünün <i>NdeI</i> ve <i>HindIII</i> enzimleri ile kesimi	42
Şekil 8. pET28 a+ ekspresyon vektöründe Abf geni.....	43
Şekil 9. Reaksiyonlarda kullanılacak toplam saf proteini belirlemek için yapılan protein miktarı – Abf aktivite grafiği	43
Şekil 10. Sıcaklık- Abf aktivite grafiği	44
Şekil 11. pH - Abf aktivite grafiği.....	45
Şekil 12. pNP- α -L-arabinofuranoside substratı için Michaelis- Menten eğrisi.....	45
Şekil 13. pNP- α -L-arabinofuranoside substratı için Lineweaver-Burk eğrisi.....	46
Şekil 14. Arabinan substratı için Lineweaver-Burk eğrisi	46
Şekil 15. Abf enziminin pH kararlılığı.....	47
Şekil16. Abf enzimin ısı kararlılığı.....	48
Şekil17. Abf enziminin inhibitör-aktivatör grafiği	48
Şekil18. İnce Tabaka Kromatografisi ile arabinooligosakkaritlerin parçalanması sonucu açığa çıkan arabinoz şekerleri	50
Şekil 19. İnce Tabaka Kromatografisi ile Arabinofuranosidaz enziminin şeker beet arabinan, arabinoxylan ve oat spelt xylan'ı substrat olarak kullanılarak yapılan reaksiyon sonucu oluşan son ürünün Arabinoz olduğunu gösterir şekildir	50
Şekil 20. Saflaştırılan Abf enziminin SDS-PAGE jeli.....	51

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Çamköy Çamur İlçası (Aydın) suyunun özellikleri	3
Tablo 2. <i>Anoxybacillus</i> cinsi bakterilerin genel özellikleri	4
Tablo 3. <i>Anoxybacillus</i> cinsinin kendisine yakın olan diğer cinslerle olan benzerliği veya farklılıkları	5
Tablo 4. Termofilik bakterilerin enzimlerinin kullanıldığı biyoteknolojik uygulamalar	13
Tablo 5. Bazı mikrobiyal α -L arabinofuranosidaz özellikleri	15
Tablo 6. Abf geninin ortaya çıkarılması ve klonlanmasında kullanılan primerler.	26
Tablo 7. Dejenerat primerlerle elde edilen 300 bp'lik parçanın GenBank'taki verilerle karşılaştırılması	34
Tablo 8. <i>Anoxybacillus kestanbolensis</i> AC26Sarı Arabinofuranosidaz geninin tamamının diğer mikroorganizmalarla olan nükleotit benzerliği	37
Tablo 9. <i>Anoxybacillus kestanbolensis</i> AC26Sarı Arabinofuranosidaz geninin diğer mikroorganizmalara olan amino asit benzerliği	41

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Abf	: Arabinofuranosidaz
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic Acid
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
dNTP	: Deoxynucleotide Triphosphate
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
IPTG	: Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
DTT	: Dithiothreitol
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat -poliakrilamid jel
pNP	: 4-nitrophenil
RDA	: Red Debranched Arabinan

1. GENEL BİLGİLER

1.1 Giriş

Termofilik bakteriler ilk olarak 1966 yılında Thomas Brock tarafından keşfedilmiş ve daha sonra dünyanın çeşitli yerlerindeki sıcak su kaynaklarından çok sayıda termofilik mikroorganizma izole edilmiştir. *Anoxybacillus* cinsi de bu şekilde sıcak su kaynaklarından izole edilerek sistematige kazandırılmıştır. *Anoxybacillus* cinsi *Bacillus* cinsinden Pikuta ve arkadaşları tarafından 2000 yılında ayrılan bir cinstir. Bu cins 10 tür içermektedir. Bu türler; *Anoxybacillus flavithermus*, *Anoxybacillus kestanbolensis*, *Anoxybacillus ayderensis*, *Anoxybacillus pushchinoensis*, *Anoxybacillus voinovkiensis*, *Anoxybacillus gonensis*, *Anoxybacillus contaminans*, *Anoxybacillus kamchatkensis*, *Anoxybacillus rupiensis* ve *Anoxybacillus amylolyticus*'tur. Bu türlerin bazılarının değişik enzimler açısından taramaları yapılmıştır. Ancak şimdiye kadar herhangi bir *Anoxybacillus* türünün arabinofuranosidaz enzimi ve geni hakkındaki bir bilgiye rastlanmamaktadır.

Bitki hücre duvarı başlıca selülozlar, hemiselülozlar ve ligninlerden meydana gelen karmaşık bir yapıdır. Hemiselülozlar selülozlarla birlikte, doğada en bol bulunan yenilenebilir biyomas polimerleridir. Selüloz ve hemiselülozun tam degradasyonunda birçok enzim görev alır. İki şeker arasındaki glikosidik bağ selülazlar ve hemiselülazlar gibi glikosid hidrolazlar (GH) tarafından koparılır (Miyanaga vd., 2004). Glikosidik bağ doğadaki en kararlı bağlardan birisidir. Yarı ömrü 5 milyon yıldan fazladır (Wolfenden vd., 1998). Bu enzimler glikosidik bağların hidrolizlerini 10^{17} kattan daha fazla hızlandırır. Bu da onları en etkili katalistlerden biri yapar (Shallom vd., 2002). Selülazlarla birlikte hemiselülazların, bitki biyomasının çözünebilir sakkaritlere tam degradasyonundan sorumlu olmaları bu enzimlerin doğada karbon döngüsünde anahtar rol oynamalarını sağlar. Bu çözünebilir sakkaritler mikroorganizmalar ve yüksek hayvanlar için karbon ya da enerji kaynakları olarak kullanılabilir (Shallom vd., 2002). α -L-arabinofuranosidazlar (E.C.3.2.1.55) bitkisel hücre duvarında ve diğer canlı yapılarında bol miktarda bulunan heteropolisakkaritler olan hemiselüloz, pektin ve arabinogalaktonun yapısında bulunan arabinoksilan, arabinogalakton, L-arabinan ve diğer L-arabinoz içeren hemiselülozlardaki α -(1,2)-, α -(1,3)- ve α -(1,5)-L-arabinofuranosidik bağları hidroliz ederler. Yan zincirleri degrades ettikleri için aksesuar

enzim olarak bilinirler. Bu enzimler ksilanın tamamen degradesyonu için diğer hemiselülazlarla birlikte çalışırlar (Bezalel vd., 1993 ; Suurnakki vd., 1997).

Glikosid hidrolazların ticari kullanımı son yıllarda özellikle biyoteknoloji endüstrisinde oldukça artmıştır. Spesifik enzimler, yiyecek işlemede doğal şekerin üretimi için invertazlar, meyve suyu işlemede selülazlar, laktozun indirgenmesinde β -galaktosidaz kullanılır. Kot tekstilinde kumaşın biyolojik taşlanması (selülazlar), kağıt hamurunun biyolojik olarak ağartılmasında ve kağıt endüstrisinde (ksilanazlar) ve sıvı yakıtlardaki katı biyoması dönüştürme gibi biyomas degradesyonunda, lignoselüloz maddelerin biyolojik olarak fermantatif ürünlere dönüştürülmesi ve hayvanların yedikleri bitkisel yemlerin sindirilebilirliğinin geliştirilmesinde gittikçe daha çok kullanılmaktadır (Coughlan & Hazlewood, 1993; Bazalel vd., 1993; Suurnaki vd., 1997). Ayrıca, α -L arabinofuranosidazlar monoterpenleri, sesquiterpenleri ve şarabın aromatik potansiyelini oluşturan diğer alkollerini hidroliz edebilme yeteneğine sahiptir. Bu nedenle bu enzimlerin tat geliştirilmesinde kullanılması ve şarap aromatisasyonu üzerine çalışılmıştır (Sanchez-Torres vd., 1996; Martino vd., 2000). Bitki ve diğer canlılarda var olan ve arabinoz içeren moleküllerdeki arabinozları serbest hale getiren bu enzimler sayesinde hem arabinoz bir tatlandırıcı olarak kullanılabilen hem de bu sayede moleküllerin işlenmesi kolaylaştırılmaktadır. L-arabinoz tatlı olmasına rağmen, vücut tarafından emilimi gerçekleştirilemeyen bir şekerdir. Ayrıca L-arabinozun sakkarozla birlikte alındığında sakkarozdan sağlanan enerjiyi azalttığı ve aynı zamanda sindirimi ve emilimi de azalttığı bilinmektedir. Bu yüzden, L-arabinoz şeker hastalarında hem alınan sakkarozun emilimini azaltması münasebetiyle fonksiyon gösterirken hem de vücut tarafından emilimi olmadığından tatlandırıcı fonksiyonu nedeniyle kullanımı fayda sağlamaktadır (Seri vd., 1996).

Yapılan bu çalışmanın amacı termofilik karakterli bir cins olan *Anoxybacillus*'a ait bir tür olan *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26Sarı suşundan endüstriyel öneme sahip bir enzim olan arabinofuranosidaz enzim geninin klonlanması, ekspresyonu ve enziminin karakterizasyonu yapılmasıdır.

1.2. *Anoxybacillus* Cinsinin Genel Özellikleri

Anoxybacillus cinsi Pikuta ve arkadaşları tarafından 2000 yılında *Bacillus* cinsinden ayrılıp bakteri sistematığına kazandırılmıştır. *Anoxybacillus pushchionensis* K1^T bu cinsin tip türüdür. *Anoxybacillus pushchionensis* ilk izole edildiğinde bu bakterinin anaerop bir bakteri

olduğu düşünülendiğinden oksijensiz ortamda üreyebilen anlamına gelen ‘anoksi’ eki cins isminin başına getirilerek adlandırılmıştır. Ancak, daha sonra yapılan çalışmalarda bu tip türün tam olarak oksijensiz ortamda değil oksijenli ortamlarda da yaşayabildiği anlaşıldığından *Anoxybacillus* cinsinin zorunlu anaerop özelliği fakültatif anaerop olarak değiştirilmiştir.

Genellikle bu cinse ait bakteriler gram pozitif, hareketli veya hareketsiz ve endosporludurlar (Tablo 2). Orta derecede termofilik özellikteki bakterilerdir. *Anoxybacillus* cinsini *Bacillus* cinsinden ayırmada 16S rRNA gen sıraları kullanılmaktadır. 16S rRNA gen analizleri sonucu *Anoxybacillus* cinsinin bakterileriyle *Bacillus* cinsinin bakterileri arasında %95’den daha az benzerlik olduğu görülmektedir. Ancak, *Anoxybacillus* cinsinin kendi üyeleri arasındaki benzerlik oranı çoğu zaman %97’nin üzerindedir ve cins içinde 16S rRNA sonucuna göre bir tür ayrımı yapmak oldukça zordur. *Anoxybacillus* cinsi bakterilerin kendi arasındaki ayrımı DNA-DNA hibridizasyonu ile yapmak mümkündür.

Anoxybacillus cinsine ait bakterilerin habitatları aşırı sıcak olmayan termal kaplıcalardır. Bunun yanında çamurdan (*Anoxybacillus flavithermus*), gübreden (*Anoxybacillus pushchinoensis*) ve jeotermal topraklardan (*Anoxybacillus amylolyticus*) izole edilen türler de mevcuttur. *Anoxybacillus contaminans* türü ise kontamine olmuş jelatinden izole edilmiştir. Optimum büyüme sıcaklıkları ortalama 55°C olan bu bakteriler, 37- 70°C arasında hayatta kalabilmektedirler.

1.3. *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26Sarı Bakterisinin İzole Edildiği Kaplıcanın Genel Özellikleri

Bu çalışmada kullanılan ve α -L-Arabinofuranosidaz genine sahip olduğu ortaya çıkarılan *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26Sarı bakterisi Aydın Çamköy Çamur Ilcasından izole edilmiştir. İzole edildiği kaplıcanın sıcaklığı 74°C ve pH’sı 7.2’dir (Tablo 1).

Tablo 1. Çamköy Çamur Ilcası (Aydın) suyunun özellikleri

Morfolojik Özellikler	Katyonlar (mg/L)	Anyonlar (mg/L)
pH : 7,2	Potasyum : 75	Bikarbonat : 2210
Sıcaklık : 74°C	Sodyum : 1550	Sülfat : 52
Silisyom oksit : 47 mg/L	Amonyum : 12	Klorür : 1440
	Kalsiyum : 32	
	Magnezyum : 54	

Tablo 2. *Anoxybacillus* cinsi bakterilerin genel özellikleri.

Özellikler	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	<i>Anoxybacillus pushchinoensis</i>	<i>Anoxybacillus contaminans</i>	<i>Anoxybacillus kamchatkensis</i>	<i>Anoxybacillus gonensis</i>	<i>Anoxybacillus kestabolensis</i>	<i>Anoxybacillus ayderensis</i>	<i>Anoxybacillus voinovskiensis</i>	<i>Anoxybacillus amylolyticus</i>
DSMZ/ NCIBM numarası	DSM 2641	DSM 12423	DSM 15866	DSM 14988	NCIBM 13933	NCIBM 13971	NCIBM 13972	NCIBM 13956	DSM 15939
Kaynak	Sıcaksu Kaynağı, Yeni Zelanda	Pushchino araştırma bölgesi, Rusya	Kontamine olmuş jelatin	Kamchatka Yarımadası, Rusya	Gönen Kaplıcası, Türkiye	Kestanbol Kaplıcası, Türkiye	Ayder Kaplıcası, Türkiye	Voinovskie Kaplıcası, Rusya	Mount Rittmann, Antarktika
Hareket	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Gram Boyanma	+	+	Gram değişken	+	+	+	+	+	+
Solunum	Fakültatif anaerob	Fakültatif anaerob	Fakültatif anaerob	Fakültatif anaerob	Fakültatif anaerob	Fakültatif anaerob	Fakültatif anaerob	Fakültatif anaerob	Fakültatif anaerob
Hücre Şekli	Çubuk	Çubuk	Çubuk	Çubuk	Çubuk	Çubuk	Çubuk	Çubuk	Çubuk
Spor Oluşumu	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Büyüklik	0,85 x 2,3-7,1 µm	0,4-0,5 x 2,5-3,0 µm	0,7-1,0 x 4,0-10,0 µm	1,0 x 2,5-8,8 µm	0,75 x 5,0 µm	0,65 x 4,75 µm	0,55 x 4,60 µm	0,4 -0,6 x 1,5-5,0 µm	0,5 x 2,0-2,5 µm
Sıcaklık Aralığı	30-72°C	37-65°C	50-60°C	38-67°C	40-70°C	40-70°C	30-70°C	30-64°C	45-65°C
Optimum Sıcaklık	60°C	62°C	50°C	60°C	55-60°C	50-55°C	50°C	54°C	61°C
pH aralığı		8,0-10,5	4-5/9-10	5,7-9,9	6,0-10,0	6,0-10,5	6,0-11,0		
Optimum pH	6,0-9,0	9,5-9,7	7,0	6,8-8,5	7,5-8,0	7,5-8,5	7,5-8,5	7,0-8,0	5,6
Optimum NaCl (%)	%2,5	%1	%5		%4	%2,5	%1,5	% ≤ 3	%0,6
Katalaz	+	-	+	-	+	+	+	+	+
DNA G+C (mol %)	41,6	42,2	44,4	42,3	42,8	50	43,6	43,9	43,5

Tablo 3. *Anoxybacillus* cinsinin kendisine yakın olan diğer cinslerle olan benzerliği veya farklılıkları.

Özellikler	<i>Anoxybacillus</i>	<i>Amphibacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Tindallia</i>	<i>Alkaliphilus</i>	<i>Desulfotomaculum</i>	<i>Sporolactobacillus</i>
Hareket	+/-	+	+	+	+/-	+	+/-	+
Gram Boyama	+	+	+	+/-	+	+	+/-	+
Oksijen İhtiyaçları	An.atl./ Fklt.aer	Fklt.aer	Anrp./ Fklt.aer	An.atl	Zornl. Anrp.	Zornl. Anrp.	Zornl. Anrp.	Anrp./ Faklt.aer
Sülfatın İndirgenmesi	-	-	-	-	-	-	+	-
Nitratın İndirgenmesi	+/-	-	+/-	+/-	-	-	-	-
Katalaz Testi	+/-	-	+	-	-	ND	-	-
Oksidaz Testi	+/-	-	+/-	-	-	ND	-	-
NaCl (3-12%) İhtiyaçları	-	-	+/-	+/-	+	-	+/-	-
CO ₃ ²⁻ İhtiyacı	+/-	-	-	-	+	-	+/-	-

An.atl: Aeorotolerant anaerop, Fklt.aer: Fakultatif aerop, Anrp: Anaerop, Zornl. Anrp: Zorunlu anaerop, +: Pozitif sonuç, -: Negatif sonuç, ND: Bilgi mevcut değil.

1.4. Termofilik Bakterilerin Genel Özellikleri

Termofilik organizmalar yüksek sıcaklıklarda hücre ve içerisindeki moleküllerin fonksiyonel halde kalmasını ve bunu gerçekleştirmek içinde çeşitli adaptasyonlara sahiptirler. Termofilik bir organizmanın büyümesini sınırlayan faktörlerin neler olduğu ve bir mikroorganizmanın büyümesinin üst sıcaklığının ne olduğu günümüzde tam olarak açıklanamamıştır. Termofilik bakteriler çeşitli adaptasyonlarla yüksek sıcaklıklarda büyümektedirler. Bu adaptasyonları şu şekilde incelenebilir.

1.4.1. DNA Yapısı

Süpersarmal plazmitler en az 107°C'ye kadar termal denatürasyona dirençli olurken lineer çift zincirli DNA'lar ise 65°C'de termal denatürasyona uğramaktadır. Topolojik olarak kapalı olmasından dolayı plazmit DNA'sı termal denatürasyona karşı daha dirençlidir. Plazmit DNA'sı termal denatürasyona dirençli olmasına rağmen, termal degradasyona karşı dirençli değildir. Yüksek tuz konsantrasyonunun, çift zincirli DNA'yı 107°C'de termal degradasyona karşı koruduğu yapılan bir çalışma ile görülmüştür (Marguet ve Foreterre, 1994). Tuzlar tarafından DNA'nın termal degradasyona karşı korunması, termofilik bakterilerin yaşamı ile ilgilidir. Çünkü termofilik bakteriler, hücre içi yüksek tuz konsantrasyonuna sahiptirler.

Bütün hipertermofillerde, bazı termofilik bakterilerde ve arkeobakterilerde reverse giraz (RG) enzimi bulunur. RG, pozitif süper sarmal DNA oluşmasını ve bağlantı sayısında aşırılık olmasını sağlar (Duguet vd., 1995; Forterre vd., 1996). Bağlantı sayısındaki aşırılık, yüksek sıcaklıklarda DNA'nın fonksiyonel halde kalması için gereklidir. Mezofilik bakterilerin ve birçok canlının DNA'sı RG enzimini içermediği için, negatif süpersarmallık gösterirler. Bu yapı DNA'nın daha kolay denatüre olmasına sebep olur. Sonuçta negatif süpersarmal DNA termal denatürasyona karşı pozitif süper sarmal DNA'dan daha dirençsizdir. Ayrıca, DNA'ya bağlanan histon ve histon benzeri proteinler yüksek sıcaklıklarda DNA'nın çift zincirli yapıda kalmasında önemli rol oynarlar (Lopez-Garcia vd., 1999).

Genomik DNA'nın yüksek G+C içeriğinin DNA'yı denatürasyona karşı koruduğuna inanılırdı. Fakat, yapılan en son çalışmalar gösterdi ki kromozomal DNA'nın

G+C içeriği ile hipertermofillerin optimum büyüme sıcaklıkları arasında hiçbir bağlantı yoktur (Marguet ve Foreterre, 1994).

1.4.2. Protein Yapısı

Mezofilik proteinlerin denatüre olduğu yüksek sıcaklıklarda termal proteinler aktivitelerini korurlar ve kararlı halde kalırlar. Proteinin termal kararlılığı endüstriyel uygulamalarda ve bilimsel çalışmalarda çok önemli olmasına rağmen, yıllardır yapılan deneysel ve teorik çalışmalar proteinlerin termal kararlılığını sadece kısmen açıklayabilmiştir (Vogt vd., 1997).

Mezofilik ve termofilik proteinler arasındaki sistematik farklılıkları belirlemek için Kumar ve arkadaşları (2001) yapmış oldukları bir araştırmada hipertermofilik *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. Yapılan çalışmalar gösterdi ki mezofilik proteinlerdeki tuz köprüsü sayısı, termofilik proteinlerdeki tuz köprüsü sayısına oranla yaklaşık %70 daha azdır. 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 bir çok araştırmacı tarafından yapılan araştırmalar mevcuttur (Grupta vd., 1995; Russel ve Toylar, 1995; Querol vd., 1996; Vieille vd., 1996; Colacina ve Crichton, 1997; Vogt ve Argos, 1997; Jaenicke ve Bohm, 1998; Scandurra vd., 1998). Protein yapısında mutasyonları meydana getiren protein mühendisliği ise deneysel analizlerin favori şeklidir ve kararlılığı artırır.

Haney ve arkadaşları (1999) yaptıkları bir çalışmada termofilik bir arkeobakteri olan *Methanococcus jannaschii*'den izole edilen 115 adet termofilik proteinin mezofilik *Methanococcus* türlerindeki bu proteinlere homolog olan proteinlerin sıralarını

karşılaştırmıştır. Bu çalışma sonucunda proteinin termal kararlılığının oluşmasında, aminoasit değişimlerinin önemli bir rol oynadığını ortaya koymuşlardır. Termofilik proteinlerin yüklü aminoasitler (Arg, Lys, His, Asp ve Glu), valin ve izolösin içeriğinde artış görülürken, yüklü polar aminoasit (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 yapılarının entropisini düşürerek, serbest enerjisini artırır. Proteinlerdeki halka delesyonu protein kararlılığını artırır (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).

1.4.3. Hücre Membran Yapısı

Mezofilik organizmalar, ısıya karşı dirençli olmayan lipid bilayer yapısında bir hücre membranına sahiptirler. Hipertermofiller, yüksek sıcaklıklarda hayatta kalabilmeleri için lipid monolayer yapısında olan yüksek sıcaklıklarda erimeye karşı direnç gösteren bir membran yapısına sahiptirler. Ayrıca arkeobakteriler, hücre membran yapılarında sıcaklığa ve degradesyona karşı dirençli olan eter lipitlerini içerirler (Daniel ve Cowan, 2000).

Termofilik organizmalar daha etkili ve sıkı bir şekilde katlanabilen aminoasitlere sahip olmalarından dolayı termofilliğe direnç gösterirler. Glisin ve serin kuvvetli hidrojen bağı yapma özelliklerinden dolayı proteininin daha iyi katlanmasını ve ısıya karşı daha yüksek bir direnç göstermesini sağlarken, aspartik ve glutamik asitler içerdikleri amin gruplarından dolayı heliks yapısını kuvvetlendirirler (Senes vd., 2000; Zhou vd., 2001; Adamian ve Liang, 2002; Rinia vd., 2002).

Sıcaklık arttıkça sitoplazma membranının proton geçirgenliği artar. Artan proton geçirgenliği, yüksek sıcaklıklarda bakterilerin büyümesini engeller. Düşük proton geçirgenliği yüksek sıcaklıklarda büyüme için önemli bir etkidir. Bu nedenle termofilik bakteriler, yüksek sıcaklıklarda taşıma sisteminde iyon olarak daha az geçirgen olan sodyum iyonunu kullanırlar (Tolner vd., 1997).

1.4.4. RNA Yapısı

Galtier ve arkadaşları (1999) yapmış oldukları bir çalışmada, rRNA'nın GC içeriği ile optimum büyüme sıcaklıkları arasında pozitif bir ilişkinin olduğunu göstermiştir. Ayrıca baz modifikasyonları ve protein bağlanma bölgelerindeki değişmelerin RNA'ları kararlı hale getirdiği belirtilmektedir (Fang vd., 2001). Termofilik bir bakteri üzerinde yapılan bir çalışmada, transfer RNA geninin bir bazındaki tek bir atomun değişmesi yüzünden bakterinin ısıya karşı direnç özelliği kazandığı kaydedilmiştir (Watanabe vd., 1976). Yapılan bu çalışmada, *Thermus thermophilus*'un tRNA'sındaki timin-55 pozisyonundaki oksijen atomu yerine bir kükürt atomu sokulmuştur.

1.4.5. Küçük Moleküller

Küçük moleküllerin kararlılığı termofillerin sahip olması gereken diğer bir özelliktir. GTP, translasyon, RNA sentezi ve diğer bir çok işlem için gerekli olan bir moleküldür ve bu molekülün 100°C'deki yarılanma ömrü birkaç saniyedir. Ayrıca, ATP, UTP, NAD ve FAD gibi diğer birçok küçük molekül de ısıya karşı dirençli değildir. Termofilik bakterilerde bu sorunun üstesinden gelmek için ihtiyaç duyulan moleküller kullanılacakları zaman sentezlenir (Çanakçı, 2003).

1.5. Termofilik Organizmaların ve Enzimlerin Biyoteknolojik ve Endüstriyel Kullanım Alanları

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). Bu nedenle termofilik organizmalar biyoteknoloji açısından oldukça önem taşımaktadır. 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 enzimleri üretmeleridir.

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 aktiftirler. Bu yüksek sıcaklıklar, reaksiyon sırasında meydana gelebilecek kontaminasyon riskini önemli derecede azaltır. Çünkü biyolojik döngüde kontaminasyona sebep olan bakterilerin çoğu mezofiliktir (Burg vd., 2003). Ayrıca, bu yüksek sıcaklıklarda, reaksiyona katılan maddelerin difüzyon hızları ve çözünürlükleri önemli derecede artar ve bu da daha fazla ürün oluşumunu sağlar (Mozhaev vd., 1993; Kumar ve Swati, 2001). Bu sıcaklıklarda suyun yüzey geriliminin ve vizkositesinin azalması da diğer bir avantajdır.

Termofilik enzimler, belirtilen bu avantajlarından dolayı bir çok endüstriyel alanda tercih edilmektedirler. Bununla birlikte bu enzimlerden bazıları, son zamanlarda saflaştırılmış ve başarılı bir şekilde klonlanıp mezofilik konaklarda ekspres edilmiştir. Bu enzimlere örnek olarak, DNA polimerazlar, amilazlar, arabinofuranosidazlar, ksilanazlar, kitinazlar, selülazlar, proteazlar, lipazlar ve gıda ve kimya endüstrilerinde DNA'yı modifiye edebilen enzimler verilebilir. Bu enzimler moleküler biyoloji alanında, nişasta endüstrisi, gıda endüstrisi, petrol endüstrisi, kimyasal endüstrisi, kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi gibi pek çok endüstri alanında geniş ölçüde kullanılmaktadır (Tablo 4).

Moleküler çalışmaların temelini, PCR kullanımı oluşturmaktadır. DNA'yı arttırma kapasitesine sahip olan PCR yöntemiyle, genetik mühendisliğinde önemli bir ilerleme kaydedilmiştir. Bu yöntemde peş peşe gelen üç adım, 90-95°C'de DNA zincirlerinin denatürasyonu, 55-70°C'de renatürasyonu ve 75°C de sentez aşamasıdır (Saiki vd., 1988). Bu nedenle, bu reaksiyonlarda kullanılan enzimlerin bu sıcaklıklara dayanıklı olması gerekmektedir.

PCR yönteminin kullanıldığı ilk zamanlarda, primer DNA zincirinin uzatılmasını katalizleyen DNA polimerazlar *Escherichia coli*'den izole edilirdi. Bu enzimler yüksek sıcaklıklarda enzimatik aktivitelerini kaybettiklerinden her bir denatürasyon ve renatürasyon aşamasından sonra yeni bir polimeraz enziminin ilavesi gerekmekteydi. Bu nedenle PCR, çok fazla zaman harcanan ve pahalı bir yöntemdi (Erllich vd., 1988). Termal kararlı polimerazların bulunmasıyla, PCR yöntemi oldukça kolaylaştı ve önemli ölçüde gelişti. İlk termal kararlı DNA polimeraz, termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus*'dan karakterize edildi (Chien vd., 1976). Daha sonra *Phyrococcus furiosus* ve *Thermococcus litoralis* bakterilerinin de DNA polimeraz enzimleri karakterize edildi. Bu mikorganizmalardan elde edilen DNA polimerazlar, 99°C'de bile aktivitelerinin önemli bir kısmını korumaktadırlar.

Termofilik DNA polimeraz enzimleri, PCR reaksiyonlarını katalizledikleri için dünya ticaretinde büyük paya sahiptirler. Bu reaksiyonlar, spesifik DNA sıralarını hızlı ve verimli bir şekilde arttırdığı için besin analizi, klinik tıp ve adli tıp alanlarında önemli araştırmalar ve incelemeler yapılırken kullanılmaktadırlar. Ayrıca bu reaksiyonlar bugün biyoteknoloji ile ilgili birçok işlemin oluşturulmasında önemli bir rol oynamaktadır (Aguilar vd., 1996).

Termofilik enzimlerin en geniş kullanıldığı alanlardan biri nişasta endüstrisidir.. Endüstriyel nişasta işlemi, nişastanın glukoz, maltoz veya oligosakkarit şuruplarına hidrolizini içerir. Nişastanın tam hidrolizi için pek çok enzim kullanılmaktadır. Bu enzimler, amilazlar, pullulanazlar, siklodekstrin glikoziltransferazlar, glukoamilazlar ve ksiloz izomerazlardır (Poonam ve Dalel, 1995). Bu enzimler veya bu enzimleri içeren şuruplar nişastanın işlenmesi yanında içecek endüstrisinde, ekmek yapımında ve peynir endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Ayrıca tatlandırıcı üretiminde ve pek çok gıda ürününün koku, yapı ve görünüşünün değişime uğratılmasında da bu enzimler yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Nişasta endüstrisi, termofilik enzimlerin yıllık endüstriyel tüketiminin %30'unu oluşturmaktadır (Van der Maarel vd., 2002).

Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi en hızlı büyüyen endüstrilerden biridir. Bu alanda, klorlu bileşiklerin yerine termal kararlı ksilanazların kullanımı artmaktadır. Kraft kağıt hamurunun ağartılmasında çok fazla miktarda kullanılan klorlu bileşikler, toksik ve mutajenik olan sürekli biriken yan ürünleri oluşturur. Bu yan ürünler de çevresel kirliliğe ve biyolojik sistemlerde sorunlara sebep olur. Bu nedenle, günümüzde bu kimyasalların kullanımını en aza indirmek amacıyla, kağıt endüstrisinde ksilanazlar kullanılmaktadır (Vikari vd., 1994; Eriksson ve Heitmann 1998). Ksilanazlar kağıt ve kağıt hamuru endüstrisindeki kullanımlarından başka, zirai hayvan yemlerinin besin değerini arttırmakta, hasır ve keten gibi bitki elyafının zamkının giderilmesinde ve meyve sularının ağartılmasında kullanılmaktadır.

Dünya üzerinde en fazla miktarda bulunan ve yenilenebilir fosilsiz karbon kaynağı selülozdur. Selülozun hidrolizi için endoglukanazlar, exoglukanazlar ve β -glukosidazlar kullanılmaktadır. Endüstriyel işlemlerde, termal kararlı selülozitik enzimler deterjanların yapısına katılarak yıkama sonucunda çamaşırların yumuşak ve daha parlak renkte olmasını sağlarlar. Ayrıca tekstil endüstrisinde, çöp ve atıkların işlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Bhat vd., 2000).

Lipazlara duyulan ilgi, endüstrideki uygulama alanlarından dolayı, özellikle son on yıldır oldukça artmıştır. Termal kararlı lipazlar, gıda endüstrisinde tat ve hoş koku bileşeni olarak, kozmetikte yağlayıcı madde ve katkı maddesi olarak, kağıt endüstrisinde kağıt hamurundaki zifti uzaklaştırıcı madde olarak kullanılır ve ayrıca süt endüstrisinde, ilaç endüstrisinde, deterjan endüstrisinde ve deri ve tekstil endüstrisinde de kullanılmaktadır.

Dünya enzim marketlerinin %65'inden fazlasını teşkil eden proteazlar, endüstriyel açıdan önemli enzimlerdir (Rao vd., 1998). Bu enzimler geniş ölçüde gıda, ilaç, deri ve tekstil endüstrisinde kullanılmaktadır. Bu enzimlerin ana kaynağı *Phyrococcus*, *Thermococcus*, *Bacillus* ve *Stapylococcus* cinslerine ait mikroorganizmalardır. Optimum olarak 75°C'de aktif hücre dışı bir proteaz, *Bacillus stearothermophilus* TP26 suşundan izole edilmektedir (Gey ve Unger, 1995).

Termal kararlı enzimler, bir çok biyoteknolojik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Farklı ekolojik alanlardan termofilik mikroorganizmaların fazla miktarda izolasyonu ve bu mikroorganizmalardan faydalı enzimlerin ekstraksiyonu ile biyoteknoloji alanında daha büyük adımlar atılabilir (Kohilu vd., 2001).

Tablo 4. Termofilik bakterilerin enzimlerinin kullanıldığı biyoteknolojik uygulamalar

Enzim	Sıcaklık Aralığı	Reaksiyonları	Kullanım alanları
Amilolitik enzimler	90-100	Nişasta → dekstroz şurup	Fırıncılık, mayalanma, deterjan, gıda, ve içecek endüstrisinde
Arabinofuranosidazlar	55-90	Arabinan→Arabinoz	Meyve suyu, şarap, ekmek endüstrisi
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, kağıt 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, alkolizis, aminolizis	Süt, deterjan, kağıt, ilaç, kozmetik, deterjan, deri ve tekstil endüstrisi
DNA polimeraz	90-95	DNA arttırılması	Genetik mühendisliği/ PCR

1.6 Arabinofuranosidaz (Abf) Enziminin Genel Özellikleri

Abf'nin biyokimyasal özellikleri hakkında mevcut bilgiler bakteri, mantar ve bitkilerden izole edilen enzimler üzerinde gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilmiştir. Mikrobiyal Abf'ların moleküler ağırlıkları değişkendir (Tablo 5). Örneğin *Streptomyces*

purpurancens IFO 3389 Abf'sinin molekül ağırlığı 495 kDa kadar yüksek iken, *Streptomyces thermaviolaces* Abf'si ise 37 kDa kadar düşük olabilmektedir (Komae vd., 1982 ; Tsujibo vd., 2002).

Sıcaklığın ve pH'ın Abf'ye olan etkisi enzimin nereden izole edildiğine bağlıdır. En yüksek ısıl kararlılık *Thermotoga maritima* MSB8'den izole edilen enzimde görülmektedir. Klonlanan bu enzimin pH 7.0'de optimum sıcaklığı 90°C'dir. Bu enzim optimum sıcaklığı olan 90°C'de (pH 7.0'da) 24 saat kararlıdır. Ayrıca bu enzim 100°C gibi yüksek bir sıcaklıkta 20 dakikadan uzun bir süre aktivitesinin %50'sini koruyabilmektedir. Diğer bir örnek ise pH aralığı 5.0-9.0 olacak şekilde 8.3 saat 85°C'de kararlı kalabilen *Rhodothermus marinus* Abf'sidir (Gomes vd., 2000; Margolles vd., 2003).

Arabinofuranosidazların aktivitesi enzime ve kullanılan kimyasalların konsantrasyonuna bağlı olarak metal iyonu, iyonik veya iyonik olmayan deterjanlar, şelatlayıcı ve indirgen kimyasallar tarafından etkilenir (Hespell ve O'Brayn 1992; Margolles vd., 2003). Örneğin, *Bifidobacterium longum* B667 ve *Thermobacillus xylanilyticus* D3 Abf'leri EDTA'dan ve DTT'den etkilenirken Cu^{2+} 'den etkilenmemektedir (Debeche vd., 2000; Margolles vd., 2003). Ag^+ , Hg^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} ve Ni gibi metal iyonları bazı enzim aktiviteleri üzerine inhibitör etkiye sahiptirler (Sakamoto vd., 2003; Margolles vd., 2003; Tsujibo vd., 2002).

Bazı arabinofuranosidazlar üzerinde moleküler seviyede çalışmalar gerçekleştirilmiş ve bu enzimleri kodlayan genler tanımlanmış, klonlanmış ve çeşitli bakteriyel ve fungal sistemlerde ekspres edilmişlerdir. Ayrıca, bu genlerin protein ürünleri sıra analizine tabi tutulmuş ve filogenetik ağaç analizinde kullanılarak rapor edilmişlerdir (Degrassi vd., 2003).

Tablo 5. Bazı mikrobiyal α -L arabinofuranosidaz özellikleri

Mikroorganizma	Enzim ismi	Molekül ağırlığı	Optimum sıcaklık	Optimum ph	GH familyası
<i>Aspergillus oryzae</i> HL15	Afase	60	60	5.5	-
<i>Aspergillus oryzae</i>	AbfA	228	50	5	51
<i>Aspergillus kawachii</i>	AkAbfA	80	50	4.0	51
<i>Fusarium oxysporum</i>	AbfB	-	4.0	50	-
<i>Penicillium purpurogenum</i>	Abf1	49.6	50	5	54
<i>Bacillus pumilus</i> PS213	AF	22056	55	7.0	51
<i>Bifidobacterium breve</i> K-110	AFase	60	-	-	51
<i>Bifidobacterium longum</i>		61-260	45	6.0	51
<i>Streptomyces thermavolaces</i>	STX-IV	37	60	5.0	62
<i>Thermoanaerobactere ethanolicus</i>	XarB	85	65	-	3
<i>Thermobacillus xylaniliticus</i> D3	AbfD3	56.071	75	6.2	51
<i>Thermobifida fusca</i>	-	92	65	9	-
<i>Thermotoga maritima</i> MSB8	AFase	332	90	7.0	51
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> L1	AFase	75	70	7.0	51
<i>Geobacillus caldoxyloliticus</i> TK4	AbfTK4	57	75	6.0	51

1.6.1. Arabinofuranosidaz Enziminin Biyoteknolojik Uygulamaları

Lignoselluloz parçalayıcı enzimlerin önemi, onların pek çok endüstriyel ve biyoteknolojik işlemlerde rol almalarından ötürü iyi bilinmektedir. Bu çabalar, ucuz tarımsal atık materyallerinin kullanımı çağını başlatmıştır. α -L-Arabinofuranosidazlar,

diğer lignoselluloz parçalayıcı enzimlerle olan sinerjistik özelliklerinden ötürü, çeşitli tarımsal ve endüstriyel işlemlerde umut vaat edici araçlar olarak görülmektedirler (Aryon vd., 1987; Saha, 2000). Bu tarımsal ve endüstriyel işlemler önemli tıbbi bileşiklerin üretilmesini, şarap aromasının geliştirilmesini, ekmek kalitesinin artırılmasını, kağıt hamurunun işlenmesini, meyve suyunun berraklaştırılmasını, hayvan yemi kalitesinin artırılmasını, biyoetanol üretilmesi ve oligosakkaritlerin sentezini içermektedir.

Yiyecek maddesi olarak tatlı olmasına rağmen, insanlar tarafından absorpsiyonunun çok az olmasından dolayı L-arabinoz'a karşı duyulan ilgi gün geçtikçe artmaktadır (Matuso vd., 2000). Bunun yanında, L-arabinozun memelilerde sukroz şekeri ile birlikte alındığında bağırsaklardaki emilimi azaltarak kandaki şeker (glukoz) miktarında önemli bir düşüşe yol açtığı kanıtlanmıştır (Seri vd., 1996).

1.6.1.1. Abf'nin Şarap Endüstrisindeki Rolü

Şarap kalitesinin en önemli karakteristik özelliği aromatik kokusudur. Bazı monoterpenlerin şarap aromasına katkıda buldukları bilinmektedir (Mateo ve Jimenez, 2000). Terpenler aromanın büyük bir kısmını teşkil ederler (Giinata vd., 1988). Çoğu üzüm, şarap, diğer alkoloik içecekler (brendi, bitters v.s.) ve meyve sularında bulunan monoterpenlerin büyük bir kısmı disakkaritlere bağlıdır (Schwab vd., 1990; Biskup vd., 1993) ve bunlarında çoğu indirgen olmayan bir şeker olan ve Abf'ler tarafından serbest hale getirilen α -L-Arabinofuranozudur. Glikosidik bağın yıkılması iki aşamada gerçekleşir. İlk aşama öncü moleküle bağlıdır. Glikosidik bağ α -L-arabinofuranosidazlar tarafından kırılır ve diğer aşama ise doğru glikosidaz aktivitesi ile gerçekleşir ve bunun sonucunda monoterpenler açığa çıkar (Biskup vd., 1993).

1.6.1.2. Abf'nin Asetik Asit Üretimi ve Ekmeğin Kalitesinin Artırılmasındaki Rolü

Bayatlama ekmeğin saklanması sırasında meydana gelen en büyük problemdir. Bu olay ekmeğin raf ömrünü azaltır ve endüstride ciddi kayıplara yol açar (Gobbetti vd., 2000). Pentosanlar ekmeğin bayatlamasında ve kıvamının oluşmasında rol alan önemli bileşiklerdir (Casier vd., 1973; Jankiewicz ve Michniewicz, 1987; Kim ve D'Appolonia,

1977). Hamura eklenen pentazonlar α -L-Arabinofuranosidaz içeren, ksilan bozucu ekzojenik enzimler ve buğday unu enzimleri tarafından hidroliz edilebilirler (Fessas ve Schiraldi, 1998; Jimenez ve Martinez, 1999). Bu enzimler esas olarak arabinoz ve ksiloz gibi serbest pentozları üretirler ve böylece hamurdaki çözünebilir karbonhidratları artırır (Gobbetti vd., 1999; Gobbetti vd., 2000; Jimenez ve Martinez, 1999; Martinez-anaya ve Devasa, 1999). Bu olay hamur laktik asit bakterisi *Lactobacillus hilgardii*'nin metabolizmasını doğrudan ilgilendirir (Gobbetti vd., 2000). Bu bakteri asetik asit üreterek asitleşme oranını artırır. Örneğin Gobbetti ve arkadaşları (2000) *Aspergillus niger* Abf'sini, *Lactobacillus plantarum* 20B ve pentazonları kullanarak çözünebilir karbonhidrat asitleşme oranında ve asetik asit üretiminde artış olmadığını ortaya koydular. Abf, hamurdaki pentazonların arabinofuranozil bağlarını kırarak pentozları *Lactobacillus plantarum* fermantasyonu için uygun hale getirir. Böylece bu enzim muamelesi ile ekmeğin bayatlaması azaltılırken raf ömründe artırılarak aynı zamanda ekmek endüstrisinde ekonomik katkı sağlamış olur (Gobbetti vd., 2000; Jimenez ve Martinez, 1999; Martinez-anaya ve Devasa, 1999).

1.6.1.3 Abf'nin Kağıt Hamuru ve Kağıt Endüstrisindeki Rolü

Kağıt hamurunu daha kullanışlı hale getirmek için bazı ticari ksilanazlar mevcuttur (Viikari vd., 1999). Abf, kağıt hamurunun delignifikasyonunda arabinoz yan zincirlerini açığa çıkarabilme özelliğinden dolayı delignifikasyonu artırır ve bunun sonucunda kağıt hamurunun beyazlaşması (biobleaching) artırmış olur (Gübitz vd., 1997; Bezalel vd., 1993). Ligninin yarı beyazlatılmış kağıt hamurundan uzaklaştırılması kağıt hamurunun *Geobacillus stearothermophilus* L1 Abf'sinin ksilanazla birlikte reaksiyona ilave edilmesiyle artırılmıştır (Gübitz vd., 1997). Bu enzim bir termofilik ksilanaz ile sinergistik olarak etkileşerek delignifikasyon işleminde ligninin %19.2'sini uzaklaştırmaktadır. Kombine enzim uygulaması kullanılarak elde edilen delignifikasyon, enzimlerin ayrı ayrı kullanılarak elde edilen delignifikasyondan daha etkili olduğu görülmüştür. Yumuşak kağıt hamurunun α -L-arabinofuranosidaz'ca yoğun ksilanaz ve mannanoz ile muamelesi hamurun beyazlaşmasını arttırmıştır (Gomes vd., 2000).

Mikroorganizmalardan izole edilen arabinofuranosidaz'ların enzimatik ve biyokimyasal özellikleri çalışılmıştır. Enzimin pH ve ısıl karalılığı, metal iyon gereksinimi,

substrat spesifikliği gibi spesifik özellikleri hakkındaki bilgiler enzimin endüstriyel açıdan daha etkin kullanılabilirliği için önemlidir.

1.6.1.4 Abf'nin Hayvan Yemi Endüstrisindeki Kullanımı

Mikroorganizmaların üretimi sonucu ortaya çıkan asitle sindirilen yemlerle konak canlıya enerji kaynağı sağlanır (Dehority ve Scatt, 1967). Hemisellülozlar esas olarak ksilanlar, toplam karbonhidratların %30'unu temsil etmesine rağmen, enerji kaynağı olarak kullanım oranları sindirimlerinin zor olmasından dolayı azdır (Coen ve Dehority, 1970). Hayvan yemlerinin sindirilmesi hemisellüloz polimerlerinin arabinozil yan gruplarıyla yer değiştirme derecesinin artmasıyla ilişkilidir (Greve vd., 1984). L-arabinoz yan grupları ksilanların toplam hidrolizini engeller (Dehority ve Scatt, 1967). Bu yüzden arabinozil yan zincirlerini hemisellülozlardan uzaklaştırabilen her hangi bir mekanizma onların sindirilebilme özelliğini artırır. α -L-arabinofuranosidaz ilavesiyle ksilanazların aktivitesini engelleyen arabinoz yan grupları uzaklaştırılmış olur. Böylece çözünebilir hücre duvarı polisakartlerinin hidrolizi teşvik edilmiş olunur (Kormelink ve Voragen,1993). Ksilanaz ve Abf karışımı ilavesi bazı ülkelerde sindirimi artırmak amacıyla kullanılan bir yöntemdir (Roche vd., 1995). Bu yaklaşım Avrupa Birliđi tarafından teşvik edilmiştir (AIR contract number AIR1 CT92). Bitki materyallerinin sindirimini artırmak amacıyla ksilan yıkıcı enzim üretimini artıran genetik düzenlemeler bir strateji olarak görülmektedir (Kaneko vd., 1998). Bu strateji Abf genlerinin ksilan parçalayıcı enzimlerin etkinliğini artırmak amacıyla bakterilerden klonlanmasını içermektedir. Bu yaklaşım *Prevotella ruminicola* Abf'si klonlanıp kullanıldığında kanıtlanmıştır (Gasparic vd., 1995).

1.6.1.5. Abf'nin Meyve Suyu Üretimindeki Rolü

Abf enzimi meyve sularının berraklaştırılması uygulamalarında kullanılmalarından ötürü ilgi çekmektedirler (Romboust vd., 1988). Şimdiye kadar önemli ölçüde α -L-arabinofuranosidaz içeren pektinolitik enzim karışımları kullanılmıştır (Pilnik,1982). Bu enzimler özellikle 1,5 bağlı arabinan zincirlerindeki 1,3 yan zincirlerini kırarlar ve böylece bu olay sonucunda 1,5 bağlı arabinozlar çökerler. 1,5 Arabinanaz 1,5 arabinana etki ederek çözeltinin çözünürlüğünü artırır (Churms vd., 1983). Örneğin elma suyu üretiminde çökelti

oluşması çözünebilir arabinanın varlığından dolayı problemdir. Çökeltiler yeterli miktarda α -L-arabinofuranosidaz ve endoarabinofuranosidaz ilavesiyle uzaklaştırılabilir (Voragen vd., 1988). Miyazaki (2005) termofilik bir bakteri olan *T. maritima* MSB8'den hem ekzo hemde endo arabinanaz aktivitesine sahip bir termofilik Abf tanımladı. Bu her iki özellik meyve suyu endüstrisinde çökelti oluşumunu önlemek için kullanılmaktadır.

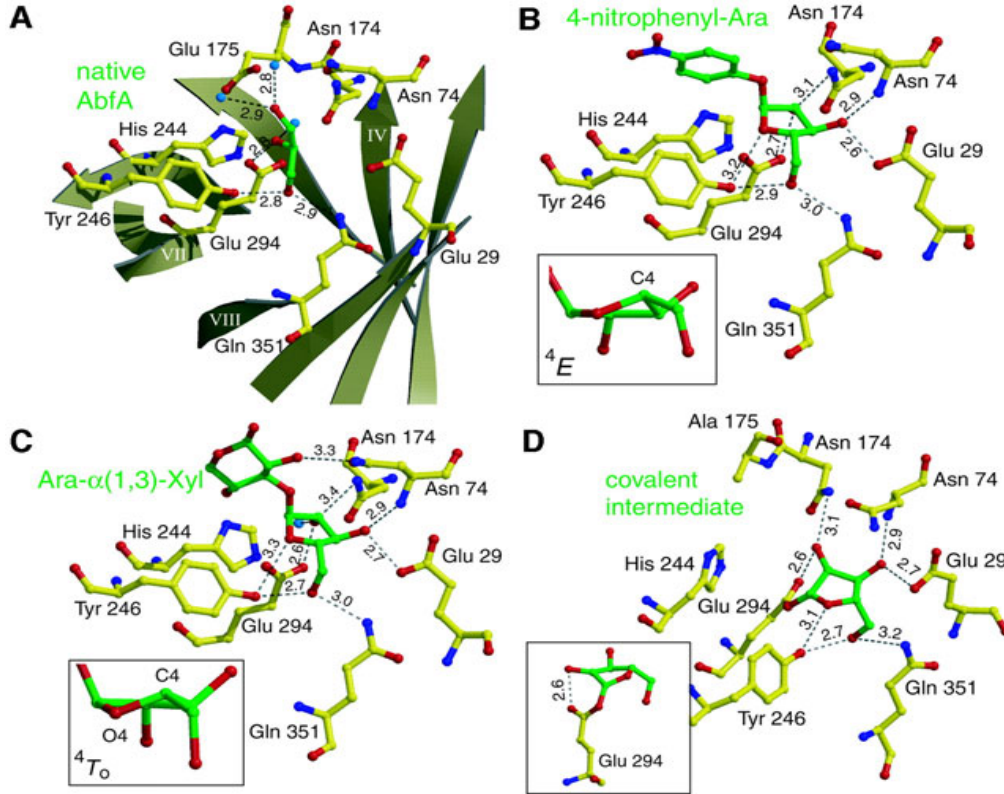
1.6.1.6 Abf'ların Substrat Spesifikliği

Arabinofuranosidaz'lar *pNP-glycoside*, *pNP- α -L-arabinopyranoside*, *pNP- β -L-arabinopyranoside*, *pNP- β -D-galactopyranoside*, *pNP- β -D-xylopyranoside*, *pNP-N-acetyl- β -D-glucosaminide*, *pNP- β -D-fucopyranoside*, *pNP- α -D-galactopyranoside*, *pNP- α -D-glucopyranoside*, *pNP- β -D-glucopyranoside*, *pNP- α -L-rhamnopyranoside*, *pNP- α -D-xylopyranoside*, and *pNP- α -L-arabinofuranoside* gibi çok sayıdaki substratı hidroliz etme yeteneği birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir. Farklı mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin substrat spesifikliği organizmadan organizmaya değişiklik göstermektedir. Arabinofuranosidaz'ın yaygın substratı *pNP- α -L-arabinofuranoside*'dir. Ayrıca, doğal polisakkarit substratları ise arabinan, arabinoxylan, ksilan ve arabinoooligosakkaritlerdir.

1.6.2. Abf'ın Aktif Bölgeleri

Abf'nin doğal ve Michaelis kompleksinin kristal yapısı incelendiğinde kataliz ve substrat bağlanma reaksiyonları için gerekli 9 tane anahtar amino asit (Glu29, Arg69, Asn74, Asn174, Glu175, His244, Tyr246, Glu294 and Gln351) olduğu görülmektedir (Şekil 1). Bu amino asitlerin çoğunun lokalizasyonu ve fonksiyonu GH-A grubunda korunmuştur (Sakon vd., 1996). Glu 175 katalitik amino asiti β zincir 6'nın sonunda yer alan korunmuş His244 amino asitine hidrojen bağlanmasında foksiyon gösterir. Diğer GH-A grubu enzimlerinde bu pozisyonunda homolog amino asitler bulunmaktadır ve familya 5'te histidin ve tirozin, familya 1, 2, 17 de Asn, familya 26'da Asp, familya 10 Gln ve familya 3'te serin olabilmektedir (Ryttersgaard vd., 2002). AbfA'da β zincir 4'ün sonunda proton vericinin önünde yer alan Asn 174 amino asiti arabinofuranozil grubunun C 2

şekerinin (karbon 2 şeker) hidroksil grubuyla bir hidrojen bağının oluşmasında görev alır (şekil 1C)



Şekil 1. Abf enziminin aktif bölgeleri

Bu amino asitler GH-A grup üyelerinde sabittir ve aktif bölgenin konformasyonel ve protonlanma durumlarının sağlanmasında önemli yapısal ve fonksiyonel role sahip olduğu gösterilmiştir. Örneğin, GH-5 familyasında homolog Asn'nin Asp ile yer değiştirmesi neredeyse enzim aktivitesinin tamamıyla kaybı ile sonuçlanır (Navas ve Beguin, 1992). İlave olarak bu amino asitin kovalent Glikosil-enzim ara maddesinin fonksiyonunun belirlenmesinde önemli bir role sahip olduğu görülmektedir (Ryttersgaard vd., 2002). AbfA'nın Arg69 amino asiti aktif bölgenin (β zinciri 2'nin sonu) alt kısmında bulunmaktadır ve familya 1, 2, 5, 17 ve 53'te korunmuştur. Buna ilaveten Glu294'ün $O^{\epsilon 1}$ ile Try 246 ile de bir hidrojen bağı oluşturabilir ve bu korunmuş amino asit -1 alt ünitesinde arabinofuranozil endosiklik O4 ve O5 ile 2 hidrojen bağı daha oluşturabilir.

AbfA'da β zincir 8'in sonunda Ala350 ve Gln351 arasında tek bir prolin içermeyen sis peptid bağı vardır. Bu sıra dışı yapı Gln351 yan zincirinin fonksiyonunu değiştirir. Böylece arabinofuranozil kısmının 5'-OH grubu ile bir hidrojen bağı oluşturmasını sağlar

(Şekil 1B-D). Bu sıradışı sis (cis) peptid bağı en az 6 farklı GH familyasında (β/α)₈ topolojisiyle bulunmaktadır (1, 2, 5, 17, 18 ve 42) (Sakon vd., 1996; Juers vd., 1999). AbfA 6'da farklı olarak çoğu GH-A enzim üyelerinde çoğunlukla triptofan olan aromatik bir amino asit bir sonraki amino asitle sis peptid bağı oluşturur. AbfA'ya benzer olarak bu enzimlerde sis peptid bağı triptofan pozisyonunu sınırlar ve substrat ile hidrojen bağları oluşturmasını sağlar. Glikosidazlarda yapısal olarak çok farklı substratlar ile aynı bölgede ve benzer amaçlar için bu nadir tipte bağların meydana gelmesi (β/α)₈ topolojisini paylaşan glikosidaz familyaları arasındaki önerilen genel evlasyonel ilişkileri için ekstra destek sağlar (Juers vd., 1999).

Furanoz 3-OH Asn 74'ün omurga durumundaki azotuyla 2,9°A mesafede bir hidrojen bağı içerisinde yer alır (Şekil 1B). Bu amino asit familya 1, 5, 10 ve 26 fonksiyonlarında korunmuş histidin amino asitine benzer bir pozisyonda β zincir 2'nin C terminal ucunun üzerinde yerleşir. AbfA yapısında olmayan histidin amino asiti diğer GH51 grup üyelerinde β zincir 3'un sonunda yerleşmiştir ve glikozil kısmın C3-OH'ı ile bir hidrojen bağı oluşturur (Ryttersgaard vd., 2002). AbfA'daki aktif bölgenin ilgi çekici bir özelliği β zincir 1'in sonundaki Glu29'dur ve bu Glu29 alt ünite -1'de substrat ile direkt bir ilişki kurar. Glu29'un O^{el} ile 4-nitrophenyl-Ara ve Ara- α (1,3)-xyl'in furanoz C3 hidroksilleri arasında çok güçlü hidrojen bağları gözlenir (Şekil 1B-C). *Thermobacillus xylanilyticus*'un GH-51 α -L arabinofuranosidazında bu amino asitin yer değiştirilmesi katalitik aktivitenin azalmasına neden olmuştur ve bu da bu amino asitin üçüncü katalitik amino asit olduğunu destekler (Debeche vd., 2002). Son zamanlarda elde edilen yapılarda, Glu29'un katalitik reaksiyonunda doğrudan yer alan kolay kırılabilir bağdan çok uzak olduğu açıkça görülmektedir. Buna ilaveten, substrata bağlanmada önemli bir rol sergiler ve ayrıca substratla olan bu güçlü hidrojen bağları yanısıra Glu29 substrata bağlanmada görev alan diğer iki amino asit olan Asn74 ve Glu351 ile de hidrojen bağları oluşturabilir. Glu29'un eliminasyonu büyük olasılıkla substratın indirgen olmayan ucunda hidrojen bağlanma şebekesini etkiler ve böylece aktivitede ciddi bir düşüşe sebep olur.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26Sarı'da Abf Aktivitesinin Tespiti

A. kestanbolensis AC26Sarı LB besiyerinde bir gece büyütüldükten sonra elde edilen taze kültürden 100 mL LB besiyerine optik yoğunluk (O.D.) 0.1 olacak şekilde gece kültüründen besiyerine ekim yapıldı. Yoğunluk O.D. 0.6-0.8'e ulaşıncaya kadar %1 olacak şekilde steril olarak hazırlanmış sığır bebet arabinan eklenerek kültür indüklendi. Kültür 65 °C de 2-3 gün bekletilerek 13.000 rpm'de 30 dak santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü. Oluşan çökelek, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) ve %10 sakkarozdan oluşan (TS) tamponda çözüldü ve sıvı azot tankında bir dakika bekletildikten sonra oda sıcaklığına alındı ve bu işlem üç kez tekrarlandı (Belduz vd., 1993). Oda sıcaklığında çözüldükten sonra, hacminin 1/20'si kadar 10 mg/mL'lik lizozim ilave edilerek hücre süspansiyonu 35 dakika buz üzerinde bekletildi, daha sonra 16.000 x g'de 30 dak. santrifüj edildi ve protein özütünü içeren sıvı kısım, steril bir tüpe alınarak çözünebilir hücre proteinleri elde edildi. Elde edilen hücre ekstraktları Arabinofuranosidaz aktivitesini belirlemek üzere kullanıldı.

Arabinofuranosidaz aktivitesi ilk olarak poliakrilamid jelde belirlendi. Bu amaçla hücre içinden ve kültür süpernatantından elde edilen protein özütleri doğal PAGE'e yüklendi. Yapılan elektroforezin ardından jel, 4-Methylumbelliferyl α -L-arabinofuranoside ile reaksiyona bırakıldı ve reaksiyon sonucunda UV ışığı altında incelenerek aktivitenin olup olmadığı kontrol edildi.

Daha sonra enzim aktivitesinin deney tüpünde belirlenmesi amacıyla reaksiyonlar gerçekleştirildi. Reaksiyonlar şu şekilde oluşturuldu: 0.2 M pNP- α L-arabinofuranoside ve 10 μ g kaba enzim pH'sı 6.5 olan 50 mM fosfat tamponu içerisinde, son hacim 0.5 mL olacak şekilde, 65°C'de 5 dak inkübe edildi. Reaksiyon, inkübasyon süresi sonunda, 0.5 mL soğuk 1 M Na₂CO₃ ilavesi ile sonlandırıldı. Oluşan renk 405 nm de spektrofotometrik olarak ölçüldü.

2.2. Moleküler Çalışmalar

2.2.1. Genomik DNA İzolasyonu

A. kestanbolensis AC26Sarı'ya ait genomik DNA bakterinin LB besiyerinde bir gece 55°C'de inkübe edilmesinden sonra Sambrook ve arkadaşlarının (1989) geliştirmiş oldukları yönteme göre izole edildi. Elde edilen sıvı kültürler 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve hücreler 13.000 rpm'de 3-4 dak santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatant kısımları dökülerek pellet kısımları alındı. Pelletlerin üzerine, 500 µl TE tamponu (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 8,0) ilave edildi ve vortekslenerek çözüldü. Üzerine 10 µg lizozim ilave edilerek karıştırıldı ve 1 saat 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra üzerine 50 µl %10'luk SDS eklendi ve 30 dakika 37°C'de inkübe edildi. Daha sonra her bir tüpe 3 M'lık 1/10 hacim sodyum asetat (pH 5.2) eklendi ve 65°C'de 30 dakika bekletildi. Her 10 dakikada bir tüpler alt üst edildi. Hemen sonrasında üzerine 500 µl fenol: kloroform: izoamilalkol (25: 24: 1) ilave edildi, alt üst edilerek karıştırıldı ve 5 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra, üst kısımdaki sıvı pipet yardımıyla yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alındı ve pellet kısımları atıldı. Bu tüplere 500 µl kloroform ilave edildi ve alt üst edilerek 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Bu kloroform aşaması 2 kez tekrarlandıktan sonra yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılan sıvının üzerine 1/10 hacim 3 M sodyum asetat ve 2 hacim %96'lık soğuk etil alkol ilave edildi ve -20°C'de 30 dakika bekletildi. Daha sonra 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi ve üst kısımdaki sıvı atıldı. Kalan pellet üzerine 500 µL %70'lik soğuk etanol ilave edildi ve 5 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra, üst faz döküldü ve kalan pellet 37°C'de 10 dakika kurutuldu. Elde edilen DNA pelletleri, 100 µL TE tamponunda çözüldü. DNA miktarı spektrofotometrede 260 nm'de yapılan ölçümler ile hesaplandı. DNA'lar %0.7'lik 0.5 µg/ml etidyum bromür içeren agaroz jelde yürütüldü ve BioDocAnalyze sistemi kullanılarak görüntülendi

2.2.2. Abf Geninin PCR Yöntemi ile Belirlenmesi ve Klonlanması

A. kestanbolensis AC26Sarı suşunun şeker beet arabinanlı besiyerinde Abf aktivitesine sahip olduğu tespit edildikten sonra arabinofuranosidaz enzim genini ortaya çıkarmak için Çanakçı vd., (2007)'nin GH51 familyasındaki arabinofuranosidaz genlerinin

karşılaştırılması ile dizayn ettikleri TK4 F ve TK4 R primerleri sentez ettirildi (Tablo 6). Bu primerler ve *A. kestanbolensis* AC26Sarı suşunun genomik DNA'sı kalıp olarak kullanılarak PCR reaksiyonları gerçekleştirildi. PCR şartları şu şekilde oluşturuldu: 95°C'de 1 dak denatürasyon basamağının ardından 35 döngü 94°C'de 1 dak denatürasyon, 55°C'de 1 dak bağlanma (annealing) ve 72°C'de 1 dak uzama (extention) ve son olarak da 72°C'de 4 dak olacak şekilde son uzamaya tabi tutularak gerçekleştirildi. PCR sonucunda oluşan DNA fragmentleri, 0.5 µg/mL etidyum bromür ihtiva eden % 0.7'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. Klonlama sonunda oluşan kolonilerden rekombinant plazmitler, plazmit izolasyon kiti (Promega-USA) ile firmanın öngördüğü şartlara göre izole edildi ve agaroz jelde yürütülerek rekombinant klonlar 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 α -L-Arabinofuranosidaz geninin bir parçası (300bp) olduğu tespit edildi (Şekil 3).

2.2.3. Ters PCR (Inverse PCR) ile Genin Kalan Kısımlarının Yakalanması ve Klonlanması

GenBank'daki karşılaştırmalar sonucunda tespit edilen 300 baz çiftlik gen parçasının diğer kısımlarının da yakalanması için ters PCR (Inverse PCR) çalışması gerçekleştirildi. Bu nedenle, elde edilen bu gen parçasına ait baz dizilimi kullanılarak uç kısımlarından dış taraflara doğru olacak şekilde, 2 adet primer (Ara F ve Ara R) (Tablo 6) dizayn edildi. Daha sonra *A. kestanbolensis* AC26Sarı'ya ait genomik DNA *Bam*HI restriksiyon endonükleaz enzimiyle bir gece boyunca kesilerek her bir kesimin kendi üzerine yapışması için DNA ligaz enzimi ile (self-ligasyon) ligasyon reaksiyonları gerçekleştirildi ve DNA fragmentleri halkalaştırıldı. Self ligasyon reaksiyonu, 2.5 µg kesilmiş DNA, 40 µL 10X tampon, 1 U T4 DNA ligaz enzimi içerecek şekilde 400 µL son hacimde 16°C'de bir gece boyunca gerçekleştirildi. Ligasyon sonrası DNA'lar etanol çöktürmesi ile çöktürülerek 20 µL TE tamponu içerisinde çözüldükten sonra PCR reaksiyonlarında kullanıldı.

Dizayn edilen *Ara F* ve *Ara R* (Tablo 6) primerleri kullanılarak yapılan PCR reaksiyonu 200 µL'lik ince duvarlı PCR tüpleri içerisinde, 50 µL'lik son hacimde gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı 1X PCR tamponu, 200 µM dNTP, 2,5 mM MgCl₂, her bir primerden 25 pmol, 10-40 ng kalıp genomik DNA ve 1 U *Taq* DNA polimeraz içerecek şekilde hazırlandı. Reaksiyon Biometra Personal Cycler PCR cihazı kullanılarak; 95°C'de 1 dakikalık ilk denatürasyon basamağı ardından 37 döngü 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 55°C'de 1 dakika bağlanma (annealing) ve 72°C'de 4 dakika uzama (extention) olacak şekilde son uzamaya tabi tutularak gerçekleştirildi. Sonuçlar % 0,7'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi. Elde edilen parçalar, baz dizilimini belirlemek üzere, pGEM-T Easy klonlama vektörüne daha önce belirtilen şekilde klonlandı ve sekans ettirildi. Sekans analizine göre yapılan analiz sonucu Abf geninin sadece bir parçasının elde edildiği tespit edildi. Bunun üzerine iki adet ters PCR için *Ara F* ve *XylanAraR* primerleri dizayn edildi (Tablo 6). Genomik DNA *HinfI* enzimi ile kesilerek kendi üzerine yapıştırıldı ve sentez edilen primerlerle PCR reaksiyonları gerçekleştirildi. Oluşan PCR ürünü pGEM-T Easy klonlama vektörüne klonlanarak sekans ettirildi. Sonuç analiz edilerek *A. kestanbolensis* AC26Sarı'ya ait arabinofuranosidaz enzim geninin tamamı elde edilmiş oldu.

2.2.4. Abf Geninin pET28-a(+) Vektörüne Klonlanması, Ekspresyonu ve Enziminin Saflaştırılması

Yapılan invers PCR reaksiyonları sonucunda elde edilen Abf geninin bir *E. coli* vektörüne (pET28-a(+)) klonlanması için *A. kestanbolensis* AC26Sarı'ya ait arabinofuranosidaz enzim geninin içerisinde kesim bölgesi olmayan ve ayrıca pET28-a(+) ekspresyon vektörünün çoklu klonlama bölgesinde kesim bölgesi bulunan restriksiyon enzimlerinin çalışabildiği özel ekspresyon primerleri (*Ara NdeI* ve *Ara HindIII*) dizayn edildi (Tablo 6).

Tablo 6. Abf geninin ortaya çıkarılması ve klonlanmasında kullanılan primerler (M: A ve C, R: A ve G, Y:C ve T, N : A ve C ve G ve T)

Primerler ismi	Kullanılan primerler
TK4 F	5'- MGN TAY CCN GGN GGN AAY TTY -3'
TK4 R	5'- CAT YTC RTT NCC NAR RCA C-3'
<i>Ara F</i>	5'- CTC ATg gCT ATA AAg AgC CAC- 3'
<i>Ara R</i>	5'- CCA TCT TCC CAg TTg TAA CCA- 3'
<i>Ara F2</i>	5'-gACAgCTgTTgAATATgggAg-3
<i>XylanAraR</i>	5'- CTTACCTCgATgAgTGTTgTAg-3'
<i>Ara NdeI</i>	5'- CCA TAT GGC TGA AAA AAC AGC-3'
<i>Ara HindIII</i>	5'-CAA GCT TAA TTA ATG TTT AGC CAA ACG-3'

Bu primerler kullanılarak PCR reaksiyonları gerçekleştirildi. Oluşan PCR ürünü, *NdeI* ve *HindIII* enzimleriyle kesildi ve aynı enzimlerle kesilmiş pET28-a(+) vektörüne DNA ligaz enzimi yardımıyla yapıştırıldı. Yapılan ligasyon reaksiyonları sonrasında gen pET28-a(+) vektörünün *NdeI* ve *HindIII* bölgelerine klonlanmış oldu. pET28-a(+) vektörü çoklu klonlama vektörünün 5' ve 3' taraflarında histidin kuyruklar içerecek şekilde dizayn edilmiştir. Yapılan klonlama çalışmasında gen sadece 5' ucunda histidin kuyruk içerecek şekilde güçlü bir promotor olan T7 promotorunun arkasına klonlandı. Ligasyon ürünü, *E. coli* JM101 kompatent hücrelerine transforme edildi. Transformasyon sonucu oluşan kolonilerden plazmit izolasyonları gerçekleştirildi ve doğru klon seçilmeye çalışıldı. Elde edilen doğru klonlu plazmit *E. coli* BL 21 DE3 Lys hücrelerine transforme edilerek enzimin ekspresyonu gerçekleştirildi. Proteinin ekspresyonu için Abf geni klonlanmış *E. coli* BL21 hücreleri, 1mg/mL kanamisin içeren LB besiyerinde 37 °C'de bir gece büyütüldü ve gece kültüründen optik dansitesi 0.1 (600 nm) olacak şekilde yeni kanamisinli (1 mg/mL) besiyerine hücreler aşılandı. Kültür, yaklaşık olarak O.D. 0.6'ya ulaştığında 1 mM IPTG ile indüklenerek 3 saat daha indüklenmiş kültürün 37°C'de büyümesi gerçekleştirildi. Hücreler, 13.000 rpm'de çöktürülerek his taq kuyruğu takılan hücre içi Abf proteinini elde etmek için çözünebilir proteinler dondurma-kırma yöntemiyle izole edildi. Proteine takılan his taq kuyruğundan yararlanılarak protein MagneHisTM Protein Purification System (Promega) kiti kullanılarak üretici firmanın öngördüğü şekilde saflaştırıldı ve biyokimyasal deneylerde kullanılmak üzere muhafaza edildi.

2.3. Biyokimyasal Çalışmalar

2.3.1. Protein Tayini

Hücre içi ve süpernatanttaki protein miktarlarının tayini Bradford'un (1976) geliştirmiş olduğu metoda göre gerçekleştirildi. 100 ml boya çözeltisi hazırlamak için 10 mg/mL Commasie Brilliant Blue G-250, 5 mL %95'lik etanol içerisinde iyice çözülerek üzerine 10 mL %85'lik fosforik asit ilave edildi ve 100 mL'ye saf su ile tamamlandı. Hazırlanan çözelti filtre kağıdı ile süzülerek temizlendi.

Hazırlanan kalibrasyon eğrisinde standart olarak bovin serum albumin (BSA) kullanıldı. Kalibrasyon eğrisi için; 2, 4, 6, 10, 15, 20, 40, 60, 80 µg BSA içeren çözeltiler 0,15 M'lık NaCl ile 100 µL'ye tamamlandı. Ardından üzerine 5 mL yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan boya çözeltisinden ilave edildi ve vorteksenerek 10 dakika oda sıcaklığında beklemeye bırakıldı. Örnekler için BSA yerine 10 µL hücre ekstratı kullanılarak aynı işlemler gerçekleştirildi. Süre sonunda Agilent 8453E UV-visible Spectroscopy System cihazı kullanılarak 595 nm'de ölçümler yapıldı ve protein miktarı µg/µL cinsinden hesaplandı.

2.3.2. Reaksiyonlarda Kullanılacak Enzim Miktarının Belirlenmesi

Reaksiyonlarda kullanılacak enzim miktarı, yapılan ön çalışmalar sonucunda, 1, 2, 3, 5, 7.5, 10, 12.5 ve 15 µg protein içeren bir dizi reaksiyon serisi sonucunda belirlendi. Reaksiyonlar daha önce belirtilen Abf aktivitesi şartlarına göre gerçekleştirildi.. Oluşturulan protein miktarı-aktivite grafiği yardımı ile ileriki çalışmalarda (optimum pH, optimum sıcaklık v.s) kullanılacak olan enzim miktarı belirlendi. Karakterizasyon çalışmaları en az üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

2.3.3. Optimum Sıcaklık

A. *kestanolensis* AC26Sarı arabinofuranosidaz enziminin en iyi çalıştığı optimum sıcaklık değeri, 1 mM substrat konsantrasyonunda (pH 6.0) 2.5 µg saf protein ile 40, 50,

60, 65, 70, 80, ve 90°C'ye ayarlanmış su banyolarında gerçekleştirilen bir seri reaksiyonlar ile belirlendi. Bu reaksiyon serisinde enzimin en iyi çalıştığı sıcaklık değeri daha sonraki çalışmalarda kullanılacak olan reaksiyon sıcaklığı olarak belirlendi.

2.3.4. Optimum pH

A. kestanbolensis AC26Sarı arabinofuranosidaz aktivitesine pH'nın etkisi, 50 mM asetat tamponunda pH 4.0 – 5.5, 50 mM fosfat tamponunda pH 5.5-7.5 ve 50 mM Tris-HCl tamponunda pH 8.0 - 9.5, 50 mM glisin pH 10.0 değerlerinde 65°C derecede gerçekleştirilen reaksiyonlarla belirlendi. Gözlenen optimum pH değeri daha sonra yapılacak olan pH ve ısıl kararlılığı, inhibitör ve aktivatör maddelerin etkisi ve kinetik parametrelerin belirlenmesi gibi çalışmalarda reaksiyon pH'sı olarak kullanılmıştır.

2.3.5. Enzim Kinetiği

A. kestanbolensis AC26Sarı Abf enziminin kinetik verileri, yapılan ön çalışmalar sonucunda belirlenen, 0,1 ile 10 mM arasındaki substrat konsantrasyonlarıyla gerçekleştirilen bir seri reaksiyonlar ile belirlendi. Arabinofuranosidaz aktivitesi, 2.5 µg/µL saf protein içeren hücre ekstraktı ile 65°C'de, pH'sı 6.5 olan 50 mM fosfat tamponu içerisinde 5 dakikalık reaksiyon süresi sonunda reaksiyon soğuk 0.5 mL 1 M Na₂CO₃ ile sonlandırılarak 405 nm'deki spektrofotometrik ölçümlerle belirlendi. Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerleri hazırlanan Lineweaver–Burk eğrisinde x ve y eksenlerini kestiği noktalara karşılık gelen değerlerin tersi olarak belirlendi (Lineweaver ve Burk, 1934).

2.3.6. pH Kararlılığı

A. kestanbolensis AC26Sarı arabinofuranosidaz'nın pH kararlılığını belirlemek için enzim, pH'sı 5.0 olan 50 mM asetat tamponunda; pH'sı 6.0 ve 7.0 olan 50 mM fosfat tamponlarında, pH'sı 8.0 ve 9.0 olan Tris-HCl tamponlarında ve pH'ı 10.0 olan glisin tamponunda, 65°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sürelerinin bitiminde tüplerden örnekler alınarak standart aktivite testine göre ölçümler gerçekleştirildi. Aynı zamanda sıfırıncı

dakikada alınan örneklerin aktiviteleri ile daha sonra belli sürelerde alınan örneklerin aktiviteleri karşılaştırılarak pH kararlılığı ortaya çıkarıldı.

2.3.7. Isıl Kararlılığı

A. kestanbolensis AC26Sarı Arabinofuranosidaz'ının 50-70°C arasında göstermiş olduğu ısıl kararlılığını belirlemek amacıyla enzim 50, 55, 60, 65, 70°C sıcaklıklarda inkübe edildi. İnkübasyon sırasında belli zaman aralıklarında her bir sıcaklıktaki tüpten örnekler alındı ve bu türlerdeki aktivite standart metoda göre belirlendi. Ayrıca reaksiyon başında yani sıfırıncı dakikada tüplerden alınan örneklerin aktivitesi ile istenilen dakikada alınan örneklerdeki aktiviteler kıyaslarak bir sıcaklık stabilitesi grafiği çizildi.

2.3.8. Aktivatör Etkisi

Çeşitli konsantrasyonlardaki metal iyonlarının ve bazı kimyasalların Arabinofuranosidaz aktivitesi üzerine olan etkisi enzimin optimum aktivite gösterdiği reaksiyon şartlarında (12,5 mM substrat konsantrasyonu, pH 6,5, 65°C'de 5 dakika) gerçekleştirilen reaksiyonlarla belirlendi. Bu amaçla reaksiyon tüplerine ilave edilen aktivatör maddeler şunlardır: Ca^{+2} , Hg^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} metal iyonlarının klorür tuzları, EDTA, β -merkaptolanol ve DTT'dir.

2.3.9. İnhibitör Etkisi

Arabinofuranosidaz aktivitesi üzerine metal iyonlarının ve bazı kimyasalların inhibitör etkisi, metal iyonları için Ca^{+2} , Hg^{+2} , Zn^{+2} , ve Cu^{+2} bivalent metal iyonlarının klorür tuzlarının yanı sıra EDTA, β -merkaptolanol, DTT kimyasalları kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucu belirlendi. Reaksiyonlar enzimin çalıştığı optimum şartlarda çeşitli konsantrasyonlarda inhibitör madde içerecek şekilde gerçekleştirildi.

2.3.10. Substrat Spesifikliğinin Belirlenmesi

A. kestanbolensis AC26Sarı arabinofuranosidaz enziminin substrat spesifikliğinin belirlenmesi amacıyla şu substratlar kullanıldı: *p*NP- α -L-arabinofuranoside, *p*NP- α -L-arabinopyranoside, *p*NP- β -L-arabinopyranoside, *p*NP- β -D-galactopyranoside, *p*NP- β -D-xylopyranoside, *p*NP-N-acetyl- β -D-glucosaminide, *p*NP- β -D-fucopyranoside, *p*NP- β -D-galactopyranoside, *p*NP- β -D-glucopyranoside, *p*NP- β -D-glucopyranoside, *p*NP- β -L-rhamnopyranoside, *p*NP- β -D-xylopyranoside, and *p*NP- β -L-arabinofuranoside. Reaksiyon şartları daha önce belirtilen *p*NP- α -L-arabinofuranoside substratı kullanılarak yapılan standart aktivite testinde kullanılan şekilde dizayn edildi.

Enzimin endoarabinanaz aktivitesine sahip olup olmadığı substrat olarak RDA (Red debranched Arabinan) kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre araştırıldı. Enzim ve substratın birlikte inkübasyonunun ardından hidrolizlenmeyen substratlar dört kat etanol ilave edilerek çöktürüldü ve süpernatantın absorbansı 520 nm dalda boyunda spektrofotometrede ölçülerek hidrolizlemenin olup olmadığı dolayısıyla enzimin endoarabinanaz aktivitesine sahip olup olmadığı tespit edildi.

A. kestanbolensis AC26Sarı saf arabinofuranosidaz enziminin şugar beet arabinan, oalt spelt xylan, ryearabinoxylan ve arabino oligasakkaritleri parçalaması sonucu oluşan arabinoz şekeri hem indirgen şeker tayinine dayalı bir metod olan Dinitrosalisilik asit metodu (Miller, 1959) ile hem de ince tabaka kromatografisinde gösterildi. %10'luk şugar beet arabinan, %5'lik ryearabinoxylan, %7'lik oalt spelt xylan ve %2 arabino oligasakkarit maddelerinden 650 μ L, 15 μ L saf enzim (4.5 μ g) 50 mM fosfat tamponu pH 6.5 içeren reaksiyon tüpünün son hacmi saf su ile 1 mL'ye tamamlandı. Oluşturulan reaksiyon tüpleri 16 saat süreyle 65°C'de inkübe edildi. Her bir maddenin enzimsiz olarak hazırlanan kontrol tüpleri de reaksiyona sokuldu. Reaksiyon sonucunda tüpler 13.000 de 5 dakika santrifüj edildi.

İlk olarak numunelerden 500 μ L alındı ve üzerine eşit hacimde dinitrosalisilik asit solüsyonu ilave edildi. Karışımlar, kaynar su banyosunda 5 dak bekletildi, soğutuldu ve tüplerdeki indirgen şekerler her tüp kendi körüne karşı olarak 540 nm dalda boyunda spektrofotometrede yapılan ölçümler sonucunda belirlendi. Ayrıca herbir tüpten 3'er μ L alınarak TLC silika jele (silica gel 60 F₂₅₄ Merck) emdirildi ve hemen kurutuldu. Daha sonra yürütme solüsyonu etil asetat, asetik asit ve su (2:1:1) olacak şekilde ayarlandı. Kurutulan silika jel, yürütme solüsyonuna dik bir şekilde yerleştirildi ve solüsyonun önce

tabaka üzerinde jelin sonuna kadar yürümesi için beklendi. Yürütme solusyonu silika jelin en üst kısmına geldiğinde silika jel yürütme solusyonundan çıkarıldı ve kurutuldu. Etanol içerisinde %5 sülfirik asit olacak şekilde hazırlanan püskürtme solusyonu, silika jel üzerine püskürtülerek tekrar kurutuldu ve 121 °C de 10 dakika ısıtılarak şekerlerin oluşturduğu spotlar gözlemlendi.

2.3.11. Doğal ve SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrez

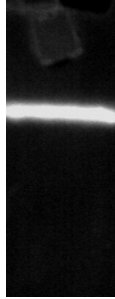
Protein jel elektrofrezleri Hoeffler SE 600 marka elektrofrezde % 12'lik SDS-PAGE kullanılarak 15 mA'lik akım altında gerçekleştirildi. *A. kestanbolensis* AC26Sarı arabinofuranosidaz'nın moleküler ağırlığı, moleküler ağırlığı belli olan bir protein markırı ile bizim proteinimizin SDS poliakrilamid jel elektrofrezinde birlikte yürütülmesi ile belirlendi. İşlem sırasında her bir örnekten 35 µg protein kullanıldı. Örneklerin üzerlerine eşit miktarlarda muamele (0,15 M Tris-HCl pH 6.8; % 4 SDS; %20 Gliserol; % 6 β-merkaptoetanol) tamponu ilave edildi ve sonrasında 99°C'de 4 dakika bekletilerek denatürasyonları gerçekleştirildi. Daha sonra Maniatis ve arkadaşları (1982) tarafından tanımlanan %12'lik sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jeline (SDS-PAGE) yüklendi ve 15 mA akım altında, yürütme boyası jelden çıkana kadar yürütüldü. Yürütme işlemi sonrasında jel Coomassie Brilliant Blue (%0.125 Coomassie Brilliant Blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit) boyası ile 2-4 saat boyandı ve Yıkama-I (%50 metanol, %10 asetik asit) solüsyonunda 1 saat bekletildikten sonra Yıkama-II (%7 asetik asit, %5 metanol) solüsyonuna aktarıldı ve bir bilgisayar tarayıcısı ile fotoğraflandı.

Saflaştırılan enzimin doğal haldeki moleküler ağırlığı Gel filtrasyon kolonu ile HPLC'de belirlendi. Kolon dengeye getirildikten sonra protein markırları molekül ağırlıklarına göre sırasıyla kolondan geçirilip zamana bağlı grafikleri çizildi. Kullanılan protein markırları şunlardır: Karbonik anhidraz (29 kDa), BSA (Bovine Serum Albumin)(66 kDa), Alkol dehidrogenaz (150 kDa), β-amylase (200 kDa) ve Apoferritin (443 kDa). Daha sonra saf protein aynı şartlar altında kolondan geçirilerek protein markırları ile çizilen grafik yardımıyla enzimin moleküler ağırlığı belirlendi.

3. BULGULAR

3.1. *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26Sarı'da Abf Aktivitesinin Tespiti

Anoxybacillus kestanbolensis AC26Sarı, LB besiyerinde bir gece büyütüldükten sonra elde edilen kültürden aşılana taze kültürün sugar beet arabinanla indüklenerek besiyerinde 2-3 gün üremesi sonucu oluşan kültürün çöktürölüp, dondurma-kırma yöntemiyle hücre içi proteinleri elde edildi. Elde edilen kaba enzim ekstraktları Arabinofuranosidaz aktivitesini belirlemek üzere kullanıldı. İzole edilen bu kaba enzim ekstraktı % 10'luk doğal poliakrilamid jelde yürütüldü. Arabinofuranosidaz enziminin, florojenik bir substrat olan 4-Methylumbelliferyl- α -L arabinofuranoside ile reaksiyonu sonucu, Abf aktivitesini görmek için, yürütölen doğal jel 50 mM fosfat tamponunda 20-30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra florojenik substrat ile 5 dakika 55 °C'de bekletilerek UV ışık altında bant oluşumu gözlemlendi (Şekil 2).



Şekil 2. Arabinofuranosidaz enziminin florojenik substrat (4-Metilumbellipheril p NP- α -L-arabinofuranoside) ile muamelesi sonucu oluşan doğal PAGE görüntüsü.

3.2. Abf Aktivitesi

Abf aktivitesinin 0.1 M p NP- α -L-arabinofuranoside substratı kullanılarak yapılan tespiti için dondurma-kırma yöntemiyle elde edilen 10 μ g/ μ L ham enzim, pH'sı 6.5 olan 50 mM fosfat tamponu içerisinde, son hacim 0.5 mL olacak şekilde, 55°C'de 10 dak inkübe edilerek gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucu belirlendi. Reaksiyon, inkübasyon süresi sonunda, 0.5 mL soğuk 1 M Na₂CO₃ ilavesi ile sonlandırıldı. Oluşan renk, 405 nm

de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Yapılan bu çalışmalar sonucunda *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26Sarı bakterisinin Arabinofuranosidaz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiş oldu.

3.3. Moleküler Çalışmalar

3.3.1. Abf Geninin PCR Yöntemi ile Belirlenmesi ve Klonlanması

3.3.1.1. Dejenerat Primer Sentezi

A. kestanbolensis AC26Sarı bakterisinin Abf aktivitesi olduğu tespit edildikten sonra arabinofuranosidaz enzim genini ortaya çıkarmak için Çanakçı ve arkadaşlarının (2007) dizayn ettikleri dejenerat primerler sentezletirildi (Tablo 6).

3.2.1.2. PCR Reaksiyonu ile Abf Gen Parçasının çoğaltılması ve Klonlanması

A. kestanbolensis AC26Sarı Abf genini yakalamak amacıyla, bu bakterinin genomik DNA'sı kalıp olarak kullanıldı ve tasarlanan TK4F-TK4R (Tablo 6) primerleri ile PCR reaksiyonları gerçekleştirildi. Pozitif kontrol olarak, Abf genine sahip olduğu bilinen *Geobacillus caldoolyolyticus* TK4 (Çanakçı vd., 2007) genomik DNA'sı kullanılarak aynı primerler ile PCR reaksiyonları gerçekleştirildi. PCR sonuçları, 0.5mg/mL etidyum bromür içeren %1,0'lük agaroz jelde yürütüldü ve sonuçlar BioDocAnalyze jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi. Dejenerat primerler kullanılarak elde edilen DNA parçası, pGEM-T Easy klonlama vektörüne klonlandı. Klonlama sonunda oluşan kolonilerden rekombinant plazmitler, plazmit DNA'sı izolasyon yöntemine göre izole edildi. Gen parçasının klonlandığı doğru klon seçildi ve bir sekans firmasına gönderilerek sekans analizi gerçekleştirildi. Sekans sonuçları, GenBank'taki (NCBI, NIH, Washington, DC) verilerle karşılaştırıldı ve bu sekansın α -L-Arabinofuranosidaz geninin bir parçası (300 bp, Şekil 3) olduğu tespit edildi. Sekans sonuçlarına göre yapılan analiz Tablo 7'de gösterildi.

CGATATCCAGGTGGGAATTTTGTGTCTGGTTACAACCTGGGAAGATGGAATTGGTCCAAAA
 GAAAAACGCCACGACGGCTTGATTTGGCATGGAAGACGATCGAAACAAATGAGGTTGGA
 TTGAATGAATTTATTGATTGGGCAAAGATGGTTCGGAGCCGAAGTGAATATGGCCGTCAAC
 TTAGGCACGCGAGGTATTGATGCGGCACGAACTTGGTTCGAATACTGCAACCATCCATCG
 GGCTCGTATTACAGCGATTTGCGTATTTCTCATGGCTATAAAGAGCCACATAAAAATTAAA
 ACATGGTGT

Şekil 3. Dejenerat primerler kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltılan *A. kestanbolensis* AC26Sarı'ya ait 309 nükleotidlik Arabinofuranosidaz gen parçasının baz dizilimi

Tablo 7. Dejenerat primerlerle elde edilen 300 bp'lik parçanın GenBank'taki verilerle karşılaştırılması

Mikroorganizmalar	% Benzerliği
<i>Anoxybacillus kestanbolensis</i> AC26Sarı	%100
<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	%95
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	%93
<i>Geobacillus caldxylosilyticus</i>	%91
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG80-2	%95
<i>Bacillus halodurans</i>	%84

3.2.1.3. Ters PCR (Inverse PCR) ile Genin Kalan Kısımının Bulunması

GenBank'taki karşılaştırmalar sonucunda 300 baz çiftlik bir bölgesi elde edilen genin diğer bölgelerinin yakalanması için ters PCR (Inverse PCR) çalışması gerçekleştirildi. Bu nedenle, elde edilen bu gen parçasına ait baz dizilimi kullanılarak uç kısımlarından dış taraflara doğru olacak şekilde 2 adet invers PCR primeri (*Ara F* ve *Ara R*) dizayn edildi (Tablo 6). Daha sonra *A. kestanbolensis* AC26Sarı'ya ait genomik DNA *BamHI* restriksiyon endonükleazıyla bir gece boyunca kesilerek kendi üzerine yapışması için DNA ligaz enzimi ile (self-ligasyon) ligasyon reaksiyonları gerçekleştirildi ve DNA fragmenti halka haline getirildi. Yapılan ters PCR reaksiyonları sonucu elde edilen parça baz dizilimini belirlemek üzere, pGEM-T Easy klonlama vektörüne daha önce belirtilen şekilde klonlandı ve sekans ettirildi. Yapılan analiz sonucu, Abf geninin 5' bölgesinin

tamamen elde edildiği ancak 3' bölgesinin ise küçük bir bölümünün elde edilemediği belirlendi (Şekil 4).

ATGGCTGAAAAACAGCAACGATGATCATAGAGAAAGATTTCAAAGTCGC
TGAAATCGACAAGCGTATCTATGGTTCGTTTATCGAGCATCTTGGTCGTG
CTGTATATGGAGGAATTTATGAGCCGGGTCATCCTGAAGCTGATGAAAAT
GGCTTTCGTCAAGATGTTATTGAATTGGTGAAAGCGTTGCAAGTGCCAAT
TATCCGATATCCAGGTGGGAATTTTGTGTCTGGTTACAACCTGGGAAGATGGAA
 TTGGTCCAAAAGAAAAACGCCACGACGGCTTGATTTGGCATGGAAGACGATC
 GAAACAAATGAGGTTGGATTGAATGAATTTATTGATTGGGCAAAGATGGTCGG
 AGCCGAAGTGAATATGGCCGTAACCTAGGCACGCGAGGTATTGATGCGGCAC
 GAACTTGGTCGAATACTGCAACCATCCATCGGGCTCGTATTACAGCGATTG
 CGTATTTCTCATGGCTATAAAGAGCCACATAAAATTTAAACATGGTGT**TTAGG**
TAATGAAATGGATGGTCCGTGGCAAATTGGTCATAAGACAGCTGTTGAAT
ATGGGAGAATTGCTTGTGAAGCAGCCAAGGTGATGAAATGGGTG

Şekil 4. Ara F ve Ara R primerleri kullanılarak yapılan ters PCR sonucu elde edilen (altı çizili) Abf geninin parçası.

Sekans sonucuna göre Abf geninin tamamının belirlenmesi için iki adet daha invers PCR primeri (*Ara F* ve *XylanAraR*, Tablo 6) dizayn edildi. *A. kestanbolensis* AC26Sarı genomik DNA'sı *HinfI* enzimi ile kesilerek kendi üzerine yapıştırılması için DNA ligaz enzimi ile (self-ligasyon) ligasyon reaksiyonları gerçekleştirildi ve DNA fragmentleri halka haline getirildi. Bu DNA fragmentleri kullanılarak PCR reaksiyonları gerçekleştirildi. Oluşan PCR ürünü, pGEMT Easy klonlama vektörüne klonlanarak sekans ettirildi. Sekans sonucu elde edilen gen dizini analiz edildi (Tablo 8). Yapılan analizler sonucunda *A. kestanbolensis* AC26Sarı'ya ait arabinofuranosidaz enzim geninin tamamının elde edildiği görüldü (Şekil 5).

ATG GCT GAA AAA ACA GCA ACG ATG ATC ATA GAG AAA GAT TTC AAA
 GTC GCT GAA ATC GAC AAG CGT ATC TAT GGT TCG TTT ATC GAG CAT
 CTT GGT CGT GCT GTA TAT GGA GGA ATT TAT GAG CCG GGT CAT CCT
 GAA GCT GAT GAA AAT GGC TTT CGT CAA GAT GTT ATT GAA TTG GTG
 AAA GCG TTG CAA GTG CCA ATT ATC CGA TAT CCA GGT GGG AAT TTT
 GTG TCT GGT TAC AAC TGG GAA GAT GGA ATT GGT CCA AAA GAA AAA
 CGC CCA CGA CGG CTT GAT TTG GCA TGG AAG ACG ATC GAA ACA AAT
 GAG GTT GGA TTG AAT GAA TTT ATT GAT TGG GCA AAG ATG GTC
 GGA

Şekil 5. PCR ve Ters PCR'lar sonucu elde edilen *A. kestanbolensis* AC26Sarı Abf geninin tamamı

Şekil 5'in devamı.

GCC GAA GTG AAT ATG GCC GTC AAC TTA GGC ACG CGA GGT ATT GAT
 GCG GCA CGA AAC TTG GTC GAA TAC TGC AAC CAT CCA TCG GGC TCG
 TAT TAC AGC GAT TTG CGT ATT TCT CAT GGC TAT AAA GAG CCA CAT
 AAA ATT AAA ACA TGG TGT TTA GGT AAT GAA ATG GAT GGT CCG TGG
 CAA ATT GGT CAT AAG ACA GCT GTT GAA TAT GGG AGA ATT GCT TGT
 GAA GCA GCC AAG GTG ATG AAA TGG GTG GAT CCG ACA ATT GAA CTT
 GTG GCG TGT GGA AGT TCT GGA AGA AAT ATG CCG ACA TTT GCG GAA
 TGG GAG GCG ACT GTT CTC GAT CAC ACG TAC GAG CAT GTT GAT TAT
 ATT TCC CTA CAT CAG TAC TTT GGA AAC CGA GAT AAT GAT ACG GCA
 AAT TAC TTA GCC ATG TCG TTG GAA ATG GAT GAT TTT ATT CGA TCT
 GTT GTA ACG ATT GCT GAT TAT GTG AAG GCG AAA AAG CGC AGT AAG
 AAA ACA ATC TAT CTT TCG TTT GAT GAA TGG AAT GTA TGG TAT CAT
 TCT AAT GAA AAT GAT AAG CGG GTT GAG CCT TGG ACT ATT GCT CCA
 CCT TTA TTG GAA GAT ATC TAT AAT TTT GAG GAT GCA CTT CTT GTT
 GGT TGT ATG CTT ATT ACA CTA ATG AAA CAT GCA GAT CGA GTG AAA
 ATT GCT TGT CTA GCT CAG TTA GTT AAT GTC ATT GCA CCA ATC ATG
 ACG GAA AAG AAC GGT CCA GCA TGG AAG CAA ACG ATT TAT TAC CCG
 TTT ATG CAT GCT TCT ATT TAC GGA AGG GGA GTA GCG CTT CAT CCA
 ATC GTT TCT GGC CCG AAA TAT GAT AGT AAA GAT TTT ACG GAC GTC
 CCA TAC CTA GAA TCA ATC GCT GTT TAC AAT GAA GAG AAA GAG GAA
 GTA ACG GTA TTT GCG GTT AAC CGT GAT ATG GAA GCA CCA TTA TTA
 CTC GAA TGT GAC ATT CGC AAT TTT GAA AAT TAT CGT GTC ATT GAA
 CCT ATT GTC TTG GAG TGT GAC AAT GTA AAG CAA ACA AAT TCA GTA
 CAA TCG TTC CCT GTT GTT CCT CAT CGA AAT GGT GAT GCT CGA TTG
 TTG GAT GGA AAG TTG CTA ACT AAG CTA TCG AAG CTA TCA TGG AAC
 GTC ATT CGT TTG GCT AAA CAT TAA

Tablo 8. *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26Sarı Arabinofuranosidaz geninin tamamının diğer mikroorganizmalarla olan n¼kleotit % benzerliği

Mikroorganizmalar	% Benzerliği
<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	%82
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	%81
<i>Geobacillus caldoxylosilyticus</i>	%77
<i>Bacillus halodurans</i>	%72
<i>Bacillus subtilis</i>	%65

```

Geobacillus_stearothermophilus ATGGCTACGAAAAAGCAACGATGATCATCGAAAAAGACTTCAAATCGC 50
Geobacillus_thermoleovorans ATGGCTACAAAAAAGCAACCATGATCATCGAAAAAGACTTCAAATTCG 50
Anoxybacillus_kestanbolensis ATGGCTGAAAAAACAGCAACGATGATCATAGAGAAAGATTTCAAAGTCGC 50
Geobacillus_caldoxylosilyticus ATGAACACAAAAAAGCCAAAATGATTGTCGAAAAAGATTTTCAAGATTGC 50
Bacillus_halodurans ---ATGACACTTACAGCAACAATGGTTGTCGACAAATCGTTTAAAATTGG 47
Bacillus_subtilis -----ATGAAAAAAGCGCAATGATTGTAGACAAAGAATATAAAAATCGG 44
* * * * *

Geobacillus_stearothermophilus TGAAATCGACAACGTATTTACGGTTCCTTTATCGAGCACCTCGGCCGCG 100
Geobacillus_thermoleovorans TGAAATCGACAACGCATCTATGGCTCGTTTATTGAACACCTCGGCCGCG 100
Anoxybacillus_kestanbolensis TGAAATCGACAAGCGTATCTATGGTTCGTTTATCGAGCATCTTGGTCGTG 100
Geobacillus_caldoxylosilyticus GGAATTCGATAAGCGGATTTATGGCTCATTATAGAGCATCTTGGCCGTG 100
Bacillus_halodurans CGAAATTGATAAGCGCATTTATGGTTCATTATGAGCACCTAGGACGTG 97
Bacillus_subtilis TGAAGTAGATAAACGGATTTATGGCTCGTTTATCGAACATATGGTTCGTG 94
* * * * *

Geobacillus_stearothermophilus CTGTATACGGAGGGATTTATGAGCCGGGACATCCGCAGGCAGATGAAAAC 150
Geobacillus_thermoleovorans CGGTATACGGGGGGATTTATGAGCCGAGCCATCCGCAGGCCGATGAAAAC 150
Anoxybacillus_kestanbolensis CTGTATATGGAGGAATTTATGAGCCGGGTATCCGTAAGCTGATGAAAAC 150
Geobacillus_caldoxylosilyticus GGTATATCGAAGAGATTTATCGAATCGGTAAGAGCTGCAAGTTCCATT 150
Bacillus_halodurans CTGTTTATGAAGGAATTTATGAACCCGGACACCTGATGGGGATGAGCAA 147
Bacillus_subtilis CGGTATATGAAAGCATATACGAGCCTGATCACCTGAAGCGGATGAAGAT 144
* * * * *

Geobacillus_stearothermophilus GGCTTCCGGCAAGATGTCATCGAGCTGGTCAAAGAGCTGCAAGTGCCGAT 200
Geobacillus_thermoleovorans GGCTTCCGGCAGGATGTCATTGAAATGGTCAAAGAGTTACAAGTGCCCAT 200
Anoxybacillus_kestanbolensis GGCTTTCGTCAAGATGTTATTGAATTGGTCAAAGCGTTGCAAGTGCCCAT 200
Geobacillus_caldoxylosilyticus GGATTCGTAAGAGATGTTATCGAATGGTAAAAGAGCTGCAAGTTCCATT 200
Bacillus_halodurans GGGTTTCGCAAAGACGTTATCCGGCTCGTTCAAGAAGCTGCAAGTGCCACT 197
Bacillus_subtilis GGATTTAGAAAAGATGTCAGTCCGCTGATCAAAGAATTACAGGTTCCCAT 194
* * * * *

Geobacillus_stearothermophilus CATCCGCTATCCGGGCGGGAATTTTGTGTCCGGTTACAAC TGGGAAGATG 250
Geobacillus_thermoleovorans TATCCGCTATCCGGGCGGGAATTTTGTGTCCGGTTACAAC TGGGAGGACG 250
Anoxybacillus_kestanbolensis TATCCGATATCCAGGTGGGAATTTTGTGTCTGGTTACAAC TGGGAAGATG 250
Geobacillus_caldoxylosilyticus AATTCTGTTATCCAGGAGAACTTTGTTTCCGGGTATAAC TGGGAAGATG 250
Bacillus_halodurans CGTACGCTATCCTGGCGGGAATTTTGTATCCGGTTACAAC TGGGAGGATG 247
Bacillus_subtilis CATCCGCTATCCGGGCGGAACTTTTATCCGGATACAAC TGGGAGGACG 244
* * * * *

Geobacillus_stearothermophilus GAGTGGGGCCAAAAGAGCAGCGTCCCGCTCGGCTTGATTTGGCGTGGAAAG 300
Geobacillus_thermoleovorans GAGTCCGGCCAAAAGAAAAGCGGCGCGCGGCTTGATTTGGCATGGAAAG 300
Anoxybacillus_kestanbolensis GAATTGGTCCAAAAGAAAACGCCACGACGGCTTGATTTGGCATGGAAAG 300
Geobacillus_caldoxylosilyticus GGGTAGGTCCGAAAAGAAAAGCGGCGGCTTTGGAGTTAGCGTGGAAA 300
Bacillus_halodurans GGGTAGGTCTGTTTCCGAAAAGGCAAAGCGGTTGGATTTAGCGTGGAGA 297
Bacillus_subtilis GTGTCCGACAGTCGAAAACCGCCGAGACGGCTTGACTTGGCATGGCAA 294
* * * * *

Geobacillus_stearothermophilus TCGGTGAAACGAATGAAATTGGCTTGAATGAATTTATGGATTGGGCCAA 350
Geobacillus_thermoleovorans TCAGTGGAAACGAATGAAATTGGCTTGAATGAATTTGTCGATTGGGCCAA 350
Anoxybacillus_kestanbolensis ACGATCGAAACAAATGAGGTTGGATTGAATGAATTTATGATTGGGCCAA 350
Geobacillus_caldoxylosilyticus TCAATTGAAACAAATGAAATCGGTGTCAATGAATCGTGGAGTGGCGAA 350
Bacillus_halodurans ACGACGGAGACGAATGAAATAGGGACAAATGAATTTGTTGATTGGGCCAA 347
Bacillus_subtilis ACGACAGAAACCAATGAAGTGGGAACAAATGAATTTTATCTTGGGCCAA 344
* * * * *

Geobacillus_stearothermophilus GATGGTCGGAGCTGAAGTGAATATGGCCGTCAACTTAGGGACGCGTGGCA 400
Geobacillus_thermoleovorans GATGGTCGGAGCCGAAGTGAATATGGCCGTCAACTTAGGGACGCGCGGCA 400
Anoxybacillus_kestanbolensis GATGGTCGGAGCCGAAGTGAATATGGCCGTCAACTTAGGGACGCGGAGTA 400
Geobacillus_caldoxylosilyticus ACTTGTCAATGCTGAAGTCAATATGGCCGTAACTTAGGAACACCGCGCA 400
Bacillus_halodurans AAAGGTTGGGGCAGAGGTGAATATGGCTGTGAACCTCGGCTCTCGCGGG 397
Bacillus_subtilis AAAGGTGAACACTGAGGTCAATATGGCCGTCAACTTAGGCACAAGAGGCA 394
* * * * *

```

Şekil 6. *A. kestanbolensis* AC26Sarı Arabinofuranosidaz geninin nükleotit sırasının bazı arabinofuranosidaz enzim genleriyle ClustalW programı kullanılarak karşılaştırılması.

Şekil 6'nın devamı

<i>Geobacillus_stearothermophilus</i>	TTGATGCGGCGCGCAACTTAGTTCGAATACTGCAACCACCCGTCGGGCTCC	450
<i>Geobacillus_thermoleovorans</i>	TTGATGCGGCGACGCAACTTGGTTGAATATTGCAACCACCCGTCGGGCTCG	450
<i>Anoxybacillus_kestanbolensis</i>	TTGATGCGGCGACGAACTTGGTTCGAATACTGCAACCATCCATCGGGCTCG	450
<i>Geobacillus_caldoxylosilyticus</i>	TTGATGCTGCCCGCAATTTAGTTCGAATATTGCAACCATCCATCAGGTTTCG	450
<i>Bacillus_halodurans</i>	TTGATGCAGCCCGTAATCTTGTGGAGTATTGTAACCATCCGTCGGTTCT	447
<i>Bacillus_subtilis</i>	TAGATGCGGCGCGCAATCTCGTTGAATATTGCAACCATCCGAAAAGGCTCT	444
	* * * * *	
<i>Geobacillus_stearothermophilus</i>	TACTACAGCGATTTGCGCATTTCCACGGCTACAAAGAGCCTCATAAAAT	500
<i>Geobacillus_thermoleovorans</i>	TATTACAGCGATTTGCGCATTTCCACGGCTATAAAGAGCCGCATAAAAT	500
<i>Anoxybacillus_kestanbolensis</i>	TATTACAGCGATTTGCGTATTTCTCATGGCTATAAAGAGCCACATAAAAT	500
<i>Geobacillus_caldoxylosilyticus</i>	TATTATAGTGATTTACGTATTTCCACGGCTACAAAGAACCGCATAAAGAT	500
<i>Bacillus_halodurans</i>	TATTGGAGTGATCTACGCATCTCCATGGATACAAAGATCCGCATAAATAT	497
<i>Bacillus_subtilis</i>	TACTGGAGTGATTTAAGAAGATCGCATGGCTATGAACAGCCGATGGCAT	494
	** * * * *	
<i>Geobacillus_stearothermophilus</i>	TAAAACGTGGTGCTTGGGCAATGAGATGGACGGTCCGTGGCAAATCGGCC	550
<i>Geobacillus_thermoleovorans</i>	TAAAACATGGTGTCTAGGCAATGAGATGGACGGTCCGTGGCAAATGGGCC	550
<i>Anoxybacillus_kestanbolensis</i>	TAAAACATGGTGTTTAGGTAATGAAATGGATGGTCCGTGGCAAATGGTCC	550
<i>Geobacillus_caldoxylosilyticus</i>	TAAAACGTGGTGTTTAGGAAATGAAATGGTCCGTCCATGGCAAATCGGCC	550
<i>Bacillus_halodurans</i>	TAAAACATGGTGTTTAGGGAATGAGATGGATGGTCCGTGGCAAATCGGCC	547
<i>Bacillus_subtilis</i>	CAAAAACATGGTGTCTTAGGAAACGAAATGGATGGACCATGGCAGATCGGCC	544
	* * * * *	
<i>Geobacillus_stearothermophilus</i>	ATAAGACGGCGGTTGAGTACGGACGAATCGCTTGTGAAGCGGCCAAAGTG	600
<i>Geobacillus_thermoleovorans</i>	ACAAGACAGCCGTTGAGTACGGACGAATCGCTTGTGAAGCGGCCAAAGTG	600
<i>Anoxybacillus_kestanbolensis</i>	ATAAGACAGCTGTTGAATATGGGAGAATTGCTTGTGAAGCAGCCAAAGTG	600
<i>Geobacillus_caldoxylosilyticus</i>	ATAAGACTGCAGTAGAATATGGGCGCATTCCTGCGAAGCGGCCAAAGTG	600
<i>Bacillus_halodurans</i>	AAAAACAGCAGAAGAATACGGTCTGTAGCGGCGAAGCAGGAAAAGTG	597
<i>Bacillus_subtilis</i>	ACAAAACAGCTGATGAATACGGACGGCTTGCCGACAGACAGCAAAGTG	594
	* * * * *	
<i>Geobacillus_stearothermophilus</i>	ATGAAGTGGGTCGACCCGACGATTGAACCTTGTGTGTGGAAGCTCAA	650
<i>Geobacillus_thermoleovorans</i>	ATGAAATGGGTAGATCCGACCATTGAACCTTGTGCGTGCGGAAGTTCAGG	650
<i>Anoxybacillus_kestanbolensis</i>	ATGAAATGGGTGGATCCGACAATTGAACCTTGTGGCGTGTGGAAGTTCGG	650
<i>Geobacillus_caldoxylosilyticus</i>	ATGAAATGGGTGATCCAACGATTGAGCTTGTGCGTTGTGGAAGTTCACA	650
<i>Bacillus_halodurans</i>	ATGAAGCTCGTAGACCCTTCCATAGAACTCGTTGCTTGTGGGAGCTCAA	647
<i>Bacillus_subtilis</i>	ATGAAATGGGTTGACCCATCAATTGAACCTGTTGCTGCGGACGATCCAA	644
	* * * * *	
<i>Geobacillus_stearothermophilus</i>	CCGAAATATGCCAACGTTTGCAGGAAATGGGAAGCGACGGTCTTGACCATA	700
<i>Geobacillus_thermoleovorans</i>	CAGAAATATGCCAGCGTTTGCAGGAAATGGGAAGCGACGGTCTTGATCACA	700
<i>Anoxybacillus_kestanbolensis</i>	AAGAAATATGCCGACATTTGCAGGAAATGGGAGGCGACTGTTCTCGATCACA	700
<i>Geobacillus_caldoxylosilyticus</i>	CCGCAACATGCCAACCTTTGCAGGAAATGGGAGGCAACAGTGCCTTGATCATA	700
<i>Bacillus_halodurans</i>	CAGTAAAATGGCAACGTTTCGCGGATTTGGGAAGCAACGGTCTTAGACATA	697
<i>Bacillus_subtilis</i>	CAGCGGATGCGCCAGCTTTATCGATTGGGAAGCGAAGTGCCTTAGACATA	694
	* * * * *	
<i>Geobacillus_stearothermophilus</i>	CGTATGACCATGTGCGACTATATTTCTCCATCAATACTATGGAAACCGG	750
<i>Geobacillus_thermoleovorans</i>	CGTATGAGCATGTGCGATTATATTTCCCTCCATCAATACTTTGGAAATCGA	750
<i>Anoxybacillus_kestanbolensis</i>	CGTACGAGCATGTTGATTATATTTCCCTACATCAGTACTTTGGAAACCGA	750
<i>Geobacillus_caldoxylosilyticus</i>	CGTATGAACATGTAGAATACATTTGCTTACATCAATATTATGGGAATCGT	750
<i>Bacillus_halodurans</i>	CGTACGATATGTAGACTATATTTGCTACATACTTATTACGGAAATCGT	747
<i>Bacillus_subtilis</i>	CGTATGAGCATGTCGACTATATCTCTTCCACTTACTACGGAAACCGG	744
	* * * * *	
<i>Geobacillus_stearothermophilus</i>	GACAAATGATACGGCCAATTTATTTGGCGTTGTCGCTGGAAATGGATGATTT	800
<i>Geobacillus_thermoleovorans</i>	GATAATGACACGGCGAATTTATTTGGCGCTGTCGCTGGAAATGGATGATTT	800
<i>Anoxybacillus_kestanbolensis</i>	GATAATGATACGGCAATTTACTTAGCCATGTCGTTGGAAATGGATGATTT	800
<i>Geobacillus_caldoxylosilyticus</i>	GATAATGATACAGCGAATTTACTTAGCTCTTACATTAGAAATGGACGATTT	800
<i>Bacillus_halodurans</i>	GATGATGATCTAGCAAATCTTTGCTCAGTCGATGGATATGGATGATTT	797
<i>Bacillus_subtilis</i>	GATAAATCTGCGCAACTTACTTGGCACGTTCTATGGATTTGGATCTATT	794
	* * * * *	
<i>Geobacillus_stearothermophilus</i>	TATCCGTTTCGGTTGTGCGCCATCGCCGATTATGTGAAGGCGAAAAACGAA	850
<i>Geobacillus_thermoleovorans</i>	TATCCGTTTCGGTTGTGCGCCATCGCCGATTACGTGAAGGCGAAAAACGAA	850
<i>Anoxybacillus_kestanbolensis</i>	TATTCGATCTGTTGTAACGATTGCTGATTATGTGAAGGCGAAAAACGCA	850
<i>Geobacillus_caldoxylosilyticus</i>	TATCCGTTTCGTTGTGCAATTGCAGACTATATTAAGCGAAAAACGCA	850
<i>Bacillus_halodurans</i>	CATTCGCTCAGTGATTGCGATTGCTGATTATGTGAAGGCGAAAAACGCA	847
<i>Bacillus_subtilis</i>	TATCAAATCAGTCGCTGCGACCTGTGACTATGTAAAGCGAAAAACGCA	844
	* * * * *	

Şekil 6'nın devamı

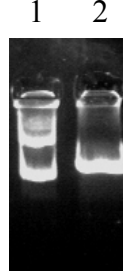
<i>Geobacillus_stearothermophilus</i>	AAAAGAAGAAGTGACGATTTTTGCGGTCAACCGTGATATGGAAGACGCGT	1300
<i>Geobacillus_thermoleovorans</i>	AAAAGAAGAAGTGACGATTTTTGCGGTCAACCGTGATATGGACGATTTCGT	1300
<i>Anoxybacillus_kestanbolensis</i>	GAAAGAGGAAGTAACGGTATTTGCGGTTAACCGTGATATGGAAGCACCAT	1300
<i>Geobacillus_caldoxylosilyticus</i>	AAACGAGGAATTTACGATCTTTGCGGTCAACCGTGACTTGGAAAGATGCAC	1300
<i>Bacillus_halodurans</i>	AGCCGAAGAAGTGACGATCTTTGCGGTAAATAAACACCAACAGAAATCGC	1297
<i>Bacillus_subtilis</i>	GGAAGAAACACTCACTATTTTTGCGGTAAACAAGGCT---GAGGATCAGA	1291
	* * * * * * * * *	
<i>Geobacillus_stearothermophilus</i>	TGTTGTTGGAATGCGATGTTTCGCGATTTTTGAAGACTACCGTGTCAATTGAA	1350
<i>Geobacillus_thermoleovorans</i>	TATTGCTTGAATGCGATGTCGCGCATTTTTGACGATTATCGCGTTATTGAA	1350
<i>Anoxybacillus_kestanbolensis</i>	TATTACTCGAATGTGACATTCGCAATTTTTGAAAATTATCGTGTCAATTGAA	1350
<i>Geobacillus_caldoxylosilyticus</i>	TGTTGTTAGAATGTGATATCCGTAATTTTCGATGGATATCAAGTGATCGAA	1350
<i>Bacillus_halodurans</i>	TAAATTTACAATGTGATATGCGTAGCTTTGAAGGGTATCACGTATTGGAG	1347
<i>Bacillus_subtilis</i>	TGGAGACGGATTTTCGCTCAGAGGCTTTGAATCCTACCAATCCGACGAG	1341
	* * * * * * * * *	
<i>Geobacillus_stearothermophilus</i>	CATATCGTTTTGGAACATGACAACGTGAAACAAACGAATTCGGCCCAATC	1400
<i>Geobacillus_thermoleovorans</i>	CATATCGTATTGGAACATGAAAACGTGAAACAAACGAATTCGGCGCAATC	1400
<i>Anoxybacillus_kestanbolensis</i>	CCTATTGTCTTGGAGTGTGACAATGTAAGCAAACAAATTCAGTACAATC	1400
<i>Geobacillus_caldoxylosilyticus</i>	CATATTTATTTTAGAGCATGAGAACGTAAAACAAACAAATTCGGCAACCCA	1400
<i>Bacillus_halodurans</i>	CATATTGTCTTGAACATGAAAATATGAAAGCGACAATCAAGGACGAGA	1397
<i>Bacillus_subtilis</i>	CACATCGTACTTGAGCATCAGGATATCAAAGCAACAAACAGCATAACAG	1391
	* * * * * * * * *	
<i>Geobacillus_stearothermophilus</i>	TTCCCGGTTGTCCCGCATCGCAACGGCGATGCCAGCTTTCCGATAGAA	1450
<i>Geobacillus_thermoleovorans</i>	TTCCCGGTCGTTCCGCACCGCAACGGCGATGCTCAACTATCCGGCGGGA	1450
<i>Anoxybacillus_kestanbolensis</i>	GTTCCCTGTTGTTCCCTCATCGAAATGGTGATGCTCGATTGTTGGATGGAA	1450
<i>Geobacillus_caldoxylosilyticus</i>	TTCCCTGCTGTTCCACACAGCAATGGAAATGCCCATCTATCAGATGGAA	1450
<i>Bacillus_halodurans</i>	A---CAGGTAACGCCTCATACAATGGTGACTCCGCCATTGATCAAGGGC	1444
<i>Bacillus_subtilis</i>	AAAAAATGTCGTTCCGCATTCACCGGATCATCGTCTGTGACGAAAACG	1441
	* * * * * * * * *	
<i>Geobacillus_stearothermophilus</i>	AAGTGTCGGCCACGTTGCCAAAGTTATCGTGGAACGTCATCCGTTTAGGA	1500
<i>Geobacillus_thermoleovorans</i>	AAGTGTCGGCGACGTTGTGCGAAGTTATCGTGGAATGTGATTTCGTTTAGGA	1500
<i>Anoxybacillus_kestanbolensis</i>	AGTTGCTAACTAAGCTATCGAAGCTATCATGGAACGTCATTTCGTTTGGCT	1500
<i>Geobacillus_caldoxylosilyticus</i>	AAGTGGTAGCCAGTTGCCAAAGCTATCGTGGAATGTGATTTCGTTTGGCT	1500
<i>Bacillus_halodurans</i>	GGCTGACAGCGAATCTAGCAAAGCTATCTTGAACGTAATTCGGCTAGGG	1494
<i>Bacillus_subtilis</i>	GCTTAACTGCTCATTTACGCCACTTTCCTGGAATGTGATCCGCCTGAAA	1491
	* * * * * * * * *	
<i>Geobacillus_stearothermophilus</i>	AAAAGGTGA---	1509
<i>Geobacillus_thermoleovorans</i>	AAACGATAA---	1509
<i>Anoxybacillus_kestanbolensis</i>	AAACATTAA---	1509
<i>Geobacillus_caldoxylosilyticus</i>	AAGAAATAA---	1509
<i>Bacillus_halodurans</i>	AAAAAATAA---	1503
<i>Bacillus_subtilis</i>	AAACAGTCATAA	1503
	* * * * *	

Tablo 9. *A. kestanbolensis* AC26Sarı Arabinofuranosidaz geninin diğer arabinofuranosidazlara olan amino asit benzerliği

Mikroorganizmalar	% Benzerlik
<i>Geobacillus_thermoleovorans</i>	%96
<i>Geobacillus_stearothermophilus</i>	%94
<i>Geobacillus_caldoxylosilyticus</i>	%93
<i>Bacillus_halodurans</i>	%87
<i>Bacillus_subtilis</i>	%82

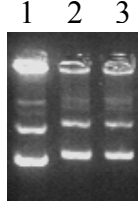
3.3.2. Arabinofuranosidaz Geninin pET28-a(+) Vektörüne Klonlanması ve Ekspresyonu

Abf geninin pET28-a(+) vektörüne klonlanması için *A. kestanbolensis* AC26Sarı'ya ait genomik DNA kullanıldı ve ekspresyon primerleri olarak dizayn edilen primerler (Tablo 6) ile PCR reaksiyonları gerçekleştirildi. PCR sonucu elde edilen DNA fragmetleri *Nde*I ve *Hind*III restriksiyon ezimleri ile kesildi. Aynı enzimler kullanılarak pET28-a(+) vektörü de kesildi. Kesim ürünleri %0.7'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak fotoğraflandı.



Şekil 7. pET28-a(+) ekspresyon vektörünün *Nde*I ve *Hind*III enzimleri ile kesimi 1. pET28-a(+), 2. pET28-a(+) klonlama vektörünün *Nde*I ve *Hind*III ile kesimi.

Yapılan kesim reaksiyonları sonucunda elde edilen lineer vektör ve PCR ürünü DNA Ligaz yardımıyla birbirine yapıştırıldı ve elde edilen ligasyon ürünü *E. coli* JM 101 suşuna aktarıldı ve bu suş içindeki plazmitlerin incelenmesiyle ilgilenilen geni içeren klon bulundu ve böylece klonlama gerçekleştirildi. Ancak klonlamanın gerçekleştirildiği pET28-a(+) vektörü güçlü bir promotora sahip bir ekspresyon vektörüdür ve ekspresyonun verimli bir şekilde olabilmesi için elde edilen klonun T7 promotor sistemini, daha iyi bir şekilde tanıyacak olan bir hücreye aktarılması gereklidir. Bu amaçla elde edilen klon *E. coli* BL21 DE3 hücresine transforme edildi.



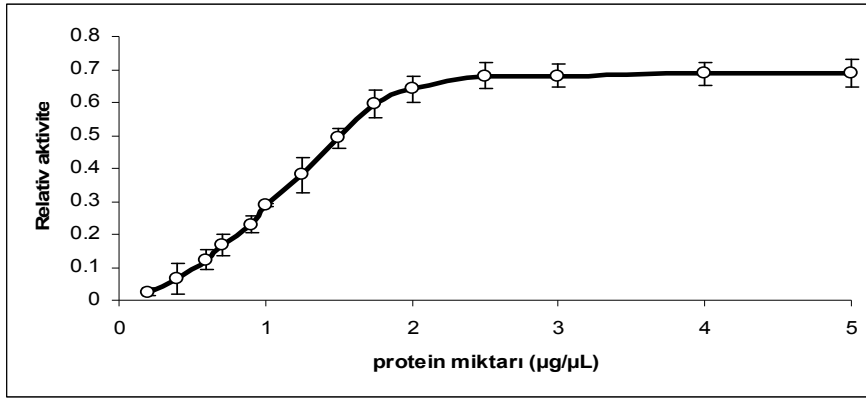
Şekil 8. pET28-a(+) ekspresyon vektöründe Abf geni 1. Herhangi bir klonlamanın olmadığı pET28-a(+), 2. klon (pET28-a(+) ve Abf geni), 3. klon (pET28-a(+) ve Abf geni)

3.4. Biyokimyasal Çalışmalar

Daha önceden de vurgulandığı gibi, *A. kestanbolensis* AC26Sarı bakterisinin arabinofuranosidaz aktivitesine sahip olduğu yapılan doğal jelin 4-methyl-umbellipheryl α -L arabinofuranoside ile boyanması ile belirlendi. Ayrıca, *A. kestanbolensis* AC26Sarı bakterisinin bu aktiviteye sahip olduğu elde edilen enzim özütü ile yapılan aktivite deneyi ile gösterildi. Ayrıca bu enzimi kodlayan 1509 bazlık Abf geninin baz dizisi belirlendi ve bu gen bir ekspresyon vektörü olan pET28-a(+) vektörüne klonlandı *E. coli* BL21 DE3 hücresinde ekspresyonu gerçekleştirildi. Klonlama sırasında ekspresyon vektöründe var olan enzime his taq kuyruğundan yararlanılarak saflaştırmalar gerçekleştirildi. Saflaştırma, MagneHisTM Protein Purification System (Promega) kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Ardından enzimin biyokimyasal özellikleri (optimum pH ve stabilitesi, optimum sıcaklık ve stabilitesi, inhibitör aktivatör etkisi, kinetik parametreleri v.s) incelendi. İncelemeler sırasında bütün deneyler en az üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

3.4.1. Reaksiyonlarda Kullanılacak Enzim Miktarının Belirlenmesi

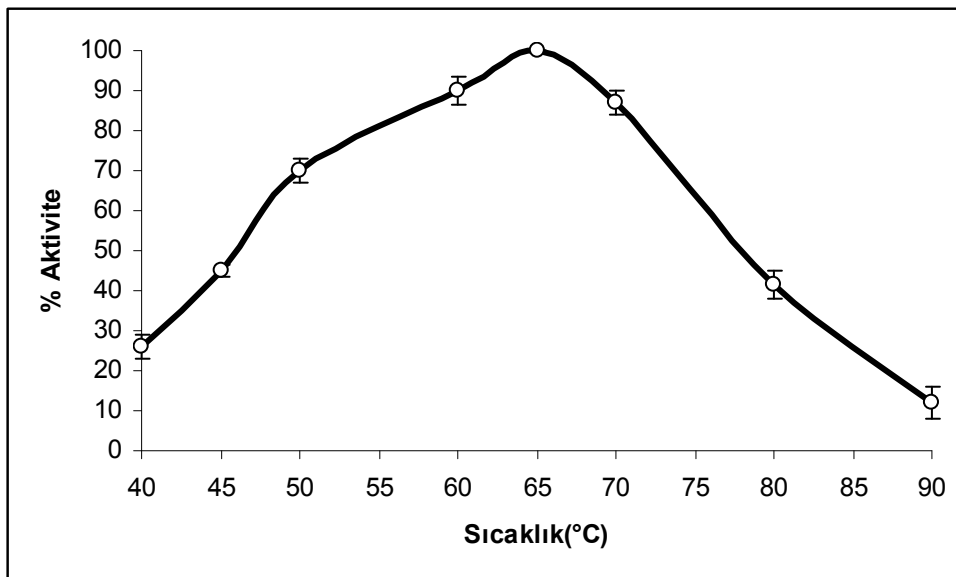
Yapılan çalışmalarda kullanılacak olan protein miktarı, 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4 ve 5 μ g gibi değişken miktarlarda enzim ve belirli miktarda substrat'ın (1 mM) kullanıldığı reaksiyonlar sonucu belirlendi (şekil 9). Şekil 9'da görüldüğü gibi, yapılan reaksiyonlar sonucu, 2.5 μ g/ μ L saf enzim kullanıldığında protein miktarı-aktivite grafiğinde aktivite artışı durağana geçmektedir. Bu sonuç dikkate alınarak Abf aktivite deneylerinde kullanılacak olan enzim miktarının 2.5 μ g saf protein olduğuna karar verildi.



Şekil 9. Reaksiyonlarda kullanılacak toplam saf proteini belirlemek için yapılan protein miktarı – Abf aktivite grafiği

3.4.2. Optimum Sıcaklık

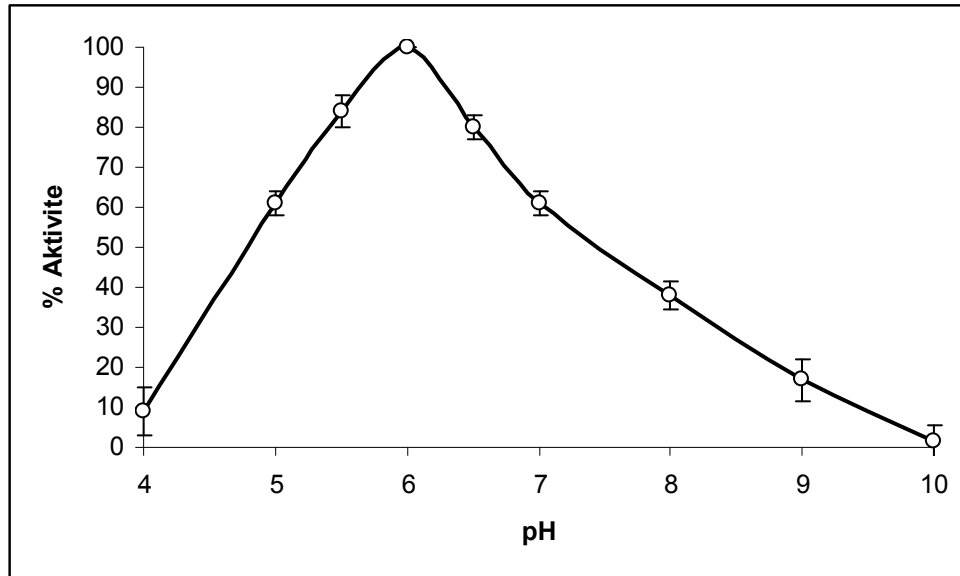
A. kestanbolensis AC26Sarı'nın Arabinofuranosidaz aktivitesine sıcaklığın etkisi 40, 50, 60, 65, 70, 80 ve 90°C'lerde incelendi ve elde edilen sonuçlar Şekil 10'da gösterildi. Yapılan optimum sıcaklık çalışmaları sonucunda, Abf enziminin optimum sıcaklığının 65°C olduğuna karar verildi. Enzimin, 90°C gibi yüksek sıcaklıkta ~% 15 aktivite gösterirken, 80°C de ise yaklaşık %50 aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Enzimin *A. kestanbolensis* AC26Sarı'nın optimum büyüme sıcaklığı olan 55 °C'de ise %80'e yakın bir aktivite gösterdiği görülmektedir. *A. kestanbolensis* AC26Sarı Arabinofuranosidaz enziminin 90°C'den yüksek sıcaklıklarda herhangi bir aktivitesi gözlenmemiştir. Bu çalışma sonucunda enzimin optimum sıcaklığının 65°C olduğu sonucuna varıldı.



Şekil 10. Sıcaklık- Abf aktivite grafiği

3.4.3. Optimum pH

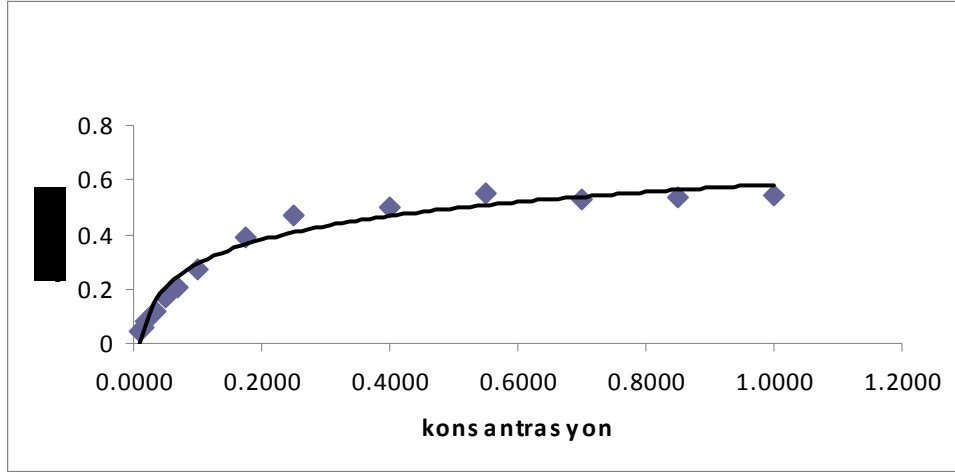
A. kestanbolensis AC26Sarı Arabinofuranosidaz aktivitesine pH'nın etkisi pH 4.0-10.0 aralığındaki tamponlar kullanılarak yapılan reaksiyonlarla belirlendi (Şekil 11). Yapılan bu çalışmalar sonucunda, Arabinofuranosidaz enziminin optimum pH'sının pH 6.0 olduğu belirlendi. Enzim pH 10.0'da hemen hemen hiç bir aktivite göstermezken, pH 4.0'da yaklaşık olarak %10 aktivite göstermektedir. pH 6.0'dan aşağı ve yukarıya doğru gidildikçe aktivitenin simetrik bir şekilde azaldığı gözlemlendi.



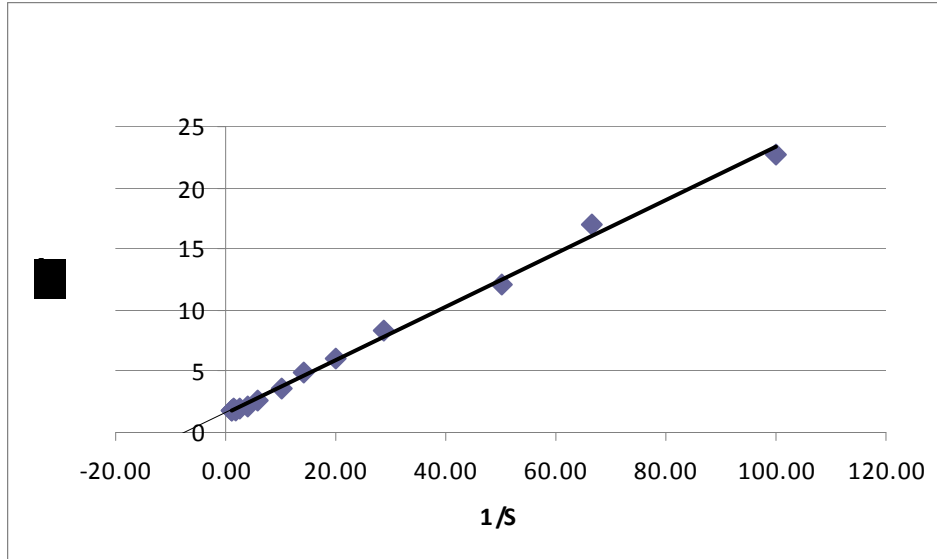
Şekil 11. pH - Abf aktivite grafiği

3.4.4. Kinetik İncelemeler

A. kestanbolensis AC26Sarı Arabinofuranosidaz enziminin substrat olarak *p*NP- α L-arabinofuranoside varlığında substrat-aktivite grafiği çizildiğinde enzimin basit Michaelis- Menten kinetiğine uyduğu tespit edildi (Şekil 12). Substrat olarak, *p*NP- α L-arabinofuranoside kullanılarak çizilen Lineweaver-Burk eğrilerinin oluşturduğu doğrunun x-eksenini kestiği nokta $-1/K_m$ 'ye eşitlenerek K_m değeri 0.139 mM, y-eksenini kestiği nokta ise $1/V_{max}$ 'a eşitlenerek V_{max} değeri 1019 U/mg olarak hesaplandı (Şekil 13).

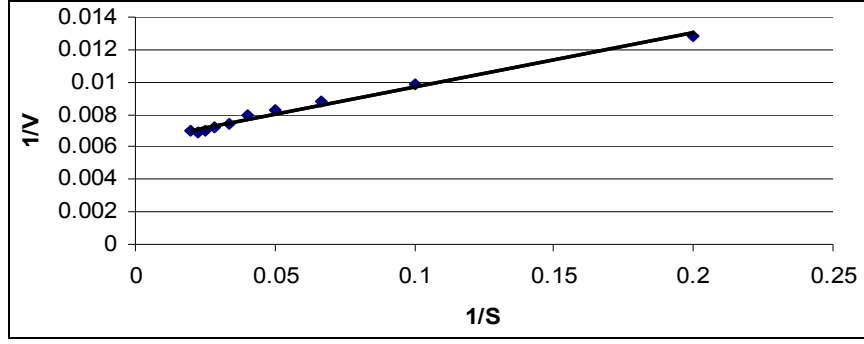


Şekil 12. *pNP-αL-arabinofuranoside* substratı için Michaelis- Menten eğrisi



Şekil 13. *pNP-αL-arabinofuranoside* substratı için Lineweaver-Burk eğrisi

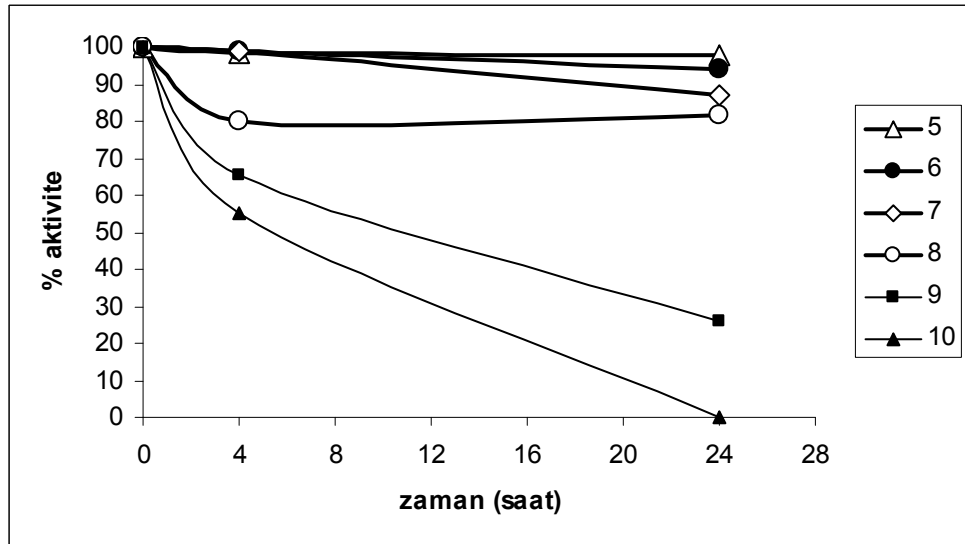
Aynı zamanda Arabinofuranosidazların etkili bir şekilde hidrolize edebildikleri diğer bir substrat, bir polisakkarit olan, şeker beet arabinandır. *A. kestanolensis* AC26Sarı Arabinofuranosidazının şeker beet arabinanı kullanıp kullanmadığını test etmek amacıyla yapılan araştırmada bu maddeyi substrat olarak kullandığı belirlendi ve substrat olarak şeker beet arabinan kullanılarak substrat-aktivite grafiği çizildi (Şekil 14). Abf enziminin arabinan'ı substrat olarak kullandığında, K_m 'si 5,21 mg/mL ve V_{max} 'ı ise 156.25 μmol olarak belirlendi.



Şekil 14. Arabinan substratı için Lineweaver-Burk eğrisi

3.4.5. pH Kararlılığı

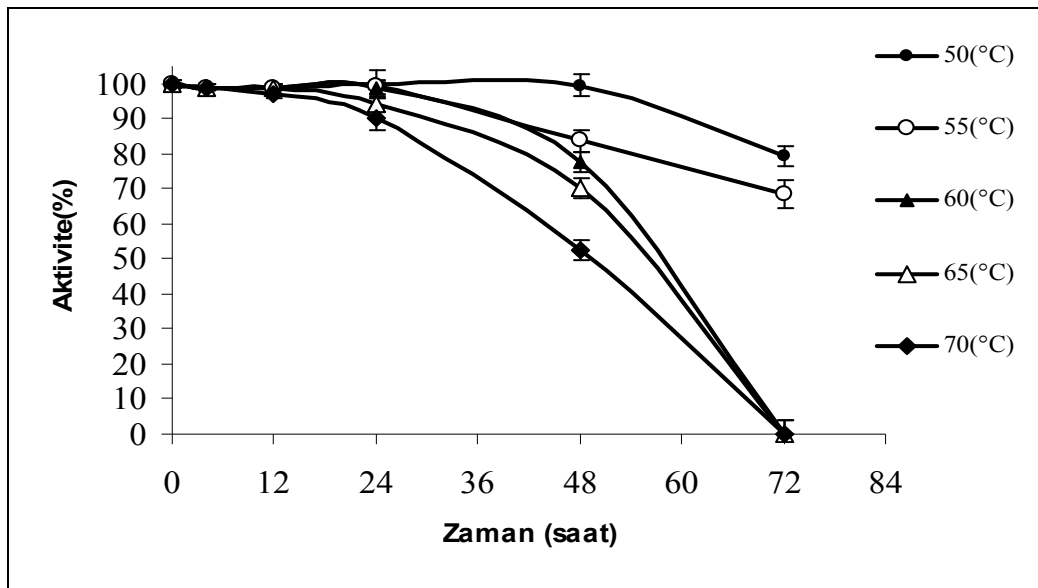
A. kestanbolensis AC26Sarı Arabinofuranosidaz'ın pH kararlılığı, enzimin; pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 ve 10.0 olan tamponlarda 65°C'de, 24 saat inkübe edilmesiyle belirlendi. 24 saat sonunda pH 10.0'da enzim aktivitesi tamamen kaybolurken, pH 9.0 da ise aktivitenin yaklaşık olarak % 30 olduğu görüldü. Buna rağmen enzimin 65°C pH 5.0 ve 6.0'da 24 saat boyunca herhangi bir aktivite kaybı olmadığı görüldü (Şekil 15).



Şekil 15. Abf enziminin pH kararlılığı

2.4.6. Isıl Kararlılığı

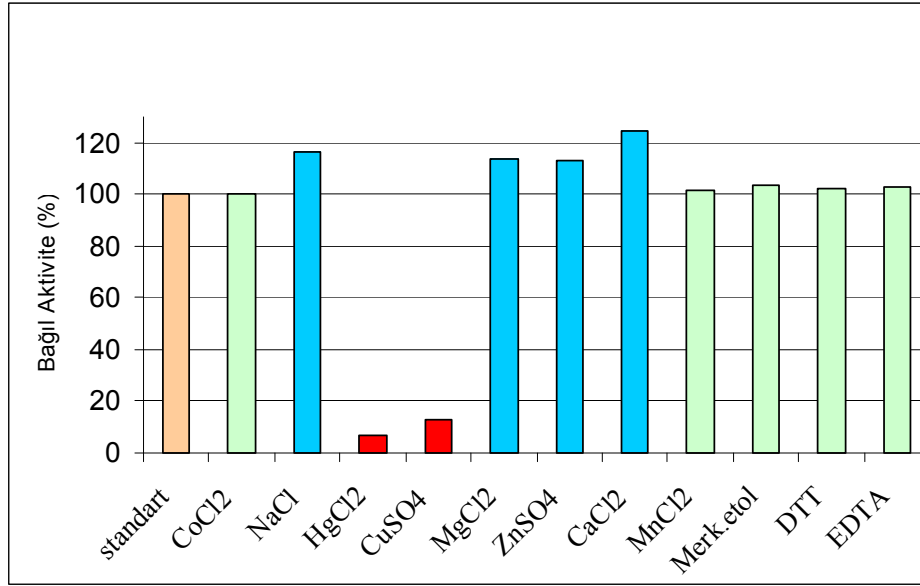
A. kestanbolensis AC26 Sarı Arabinofuranosidaz enziminin ısıl kararlılığı enzimin 50-70°C de belirli bir süre inkübe edilmesi sonucunda belirlendi. Bu süre sonucunda her bir sıcaklıktan alınan enzim örneklerindeki kalan aktivite standart metoda göre 65°C belirlendi. 24 saat sonucunda 50-55°C’de, 48 saat sonrasında 50°C’de aktivite kaybı olmadığı görüldü. 72 saat sonrasında ise 60-65-70°C’lerde aktivitenin tamamen kaybolduğu görüldü (Şekil 16).



Şekil 16. Abf enzimin ısıl kararlılığı.

3.4.7. Aktivatör Etkisi

Zn^{+2} , Mg^{+2} , Na^{+} ve Ca^{+2} metal iyonlarının Abf aktivitesi üzerine olan etkisi, *p*-nitrophenyl- α -L-arabinofuranoside substratı ve 1 mM konsantrasyonda metal iyonu varlığında gerçekleştirilen bir dizi reaksiyonlar ile belirlendi. Hiçbir metal iyonunun kullanılmadığı enzimle yapılan reaksiyon standart alınarak yapılan deneylerde, yaklaşık olarak % 20 aktivite artışı gözlemlendi (Şekil 17).



Şekil 17. Abf enziminin inhibitör-aktivatör grafiği

3.4.8. İnhibitör Etkisi

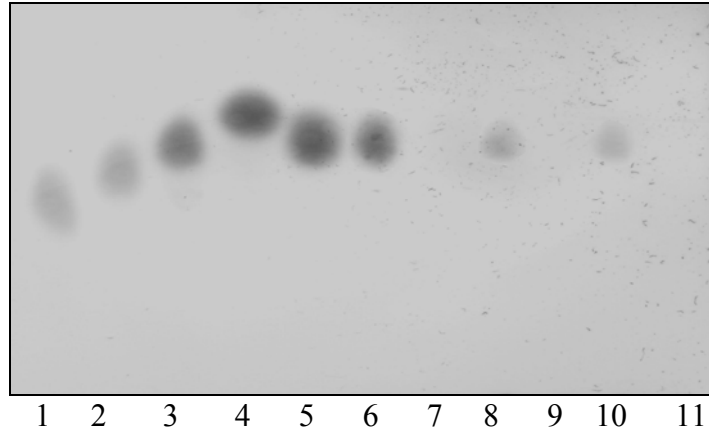
Abf aktivitesi üzerine metal iyonlarının inhibitör etkisi *p-nitrophenil-α-L-arabinofuranoside* substrat olarak kullanılarak gerçekleştirildi ve Co^{+2} , Hg^{+2} , Cu^{+2} , ve Mn^{+2} gibi bivalent metal iyonlarının klorür veya sülfat tuzları ve çeşitli kimyasallarla yapılan deneyler sonucunda Hg^{+2} ve Cu^{+2} 'nin Abf aktivitesi üzerine etkili bir inhibitör özelliğinin olduğu görüldü. En yüksek inhibisyonu 1 mM'lık konsantrasyonda %95, daha yüksek konsantrasyonlarda %100 etki ile Hg^{+2} metal iyonu sağlarken Mn^{+2} ise hiç bir inhibitör etki göstermedi. Çeşitli kimyasal maddelerle yapılan deneyler sonucunda ise merkaptoletanol (10 mM), DTT(10 mM) ve EDTA (10 mM)'nın Abf enzimi üzerine belirtilen konsantrasyonlarda etkisi olmadığı görüldü (Şekil 17).

3.4.9. Enzimin Substrat Spesifikliği

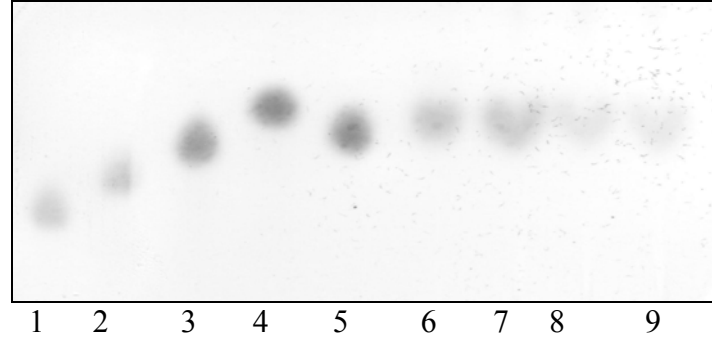
A. kestanbolensis AC26Sarı Arabinofuranosidazının, gerçekleştirilen çoklu reaksiyonlar sonucunda *pNP-glycoside*, *pNP-α-L-arabinopyranoside*, *pNP-β-L-arabinopyranoside*, *pNP-β-D-galactopyranoside*, *pNP-β-D-xylopyranoside*, *pNP-N-acetyl-β-D-glucosaminide*, *pNP-β-D-fucopyranoside*, *pNP-α-D-galactopyranoside*, *pNP-α-D-glucopyranoside*, *pNP-β-D-glucopyranoside*, *pNP-α-L-rhamnopyranoside*, *pNP-α-D-xylopyranoside* substratlarını hidroliz edemediği görüldü. Enzimin sadece *pNP-α-L-*

arabinofuranoside'i hidroliz edebildiği ortaya çıkarıldı. Enzimin ekzoarabinofuranosidaz mı yoksa endoarabinofuranosidaz mı olduğunun belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmalarda bu özellik için spesifik olan RDA (Red debranched Arabinan) kimyasalını hidrolizleme özelliği araştırıldı. Yapılan deneyler sonucunda enzimin endoarabinanaz aktivitesine sahip olmadığı, yani sadece ekzo-arabinanaz aktivitesine sahip olduğu tespit edildi.

Abf enziminin şeker beet arabinan, arabinoxylan, oat spelt xylan ve arabinooligosakkaritleri hidroliz edebilmesi özellikleri Dinitrosalisilik asit (Miller, 1957) metodu kullanılarak belirlendi ve parçalamanın hangi seviyede olduğunun ortaya çıkarılması için reaksiyon sonucunda oluşturulan ürünler TLC ile gösterildi. Bu amaçla gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucunda oluşan ürünler, silika jel 60 F₂₅₄'e tatbik edildi ve bu plakalar üzerinde hareket etmeleri sağlandıktan sonra TLC plakaları üzerinde şekerlerin varlığı belirlendi. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen sonuçlar Şekil 18 ve 19'da görülmektedir.



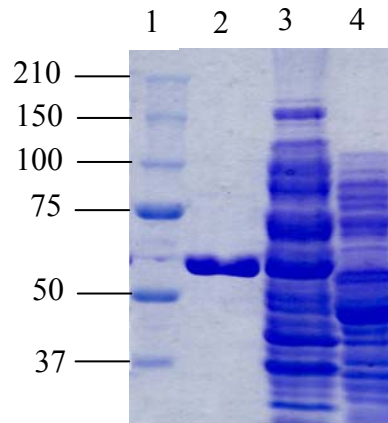
Şekil 18. İnce Tabaka Kromatografi (TLC) ile arabinofuranosidaz enziminin şeker beet arabinan, arabinoxylan ve oat spelt xylan'ı parçalaması sonucunda oluşan son ürünlerin gösterilmesi. 1. arabinopentaose, 2. arabinotetraose, 3. arabinotriose, 4. arabinobiose, 5. arabinoz, 6. arabinan'ın (2%, w/v) saf enzimle (1 U) reaksiyonu sonucu (16 saat, 65°C) açığa çıkan arabinoz, 7. enzimsiz arabinan, 8. rye arabinoxylan'ın saf enzimle (1 U) reaksiyonu sonucu (16 saat, 65°C) açığa çıkan arabinoz (2%, w/v), 9. enzimsiz arabinoxylan, 10. oalt spelt xylan'ın (2%, w/v) saf enzimle (1 U) reaksiyonu sonucu (16 saat, 65°C) açığa çıkan arabinoz, 11. enzimsiz oat spelt xylan.



Şekil 19. İnce Tabaka Kromatografisi ile arabinooligosakkaritlerin parçalanması sonucu oluşan ürünlerin gösterimi. 1. arabinopentaose, 2. arabinotetraose, 3. arabinotriose, 4. arabinobiose ve sırasıyla arabinopentaose, arabinotetraose, arabinotriose, arabinobiose şekerlerinin 16 saat saf enzim ile reaksiyonu sonucu oluşan arabinoz.

3.4.10. Doğal ve SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi

pET28-a(+) vektörüne klonlanan Abf enzimi Promega histaq protein saflaştırma kiti kullanılarak saflaştırıldı. Elde edilen saf protein SDS-PAGE’de tek bant olarak gösterildi (Şekil 20). SDS-PAGE’de protein markırları ile birlikte yürütülerek fotoğraflandı ve BioDocAnalyze sistemi kullanılarak, enzimin moleküler ağırlığı ~60 kDa olarak hesaplandı.



Şekil 20. Saflaştırılan Abf enziminin SDS-PAGE görüntüsü 1. Protein markır, 2. saf enzim AbfAC26Sarı’dan expresse edilmiş, 3. İçerisinde Abf geni olan *E coli* BL21 DE3’ün kaba ekstraktı, 4. İçerisinde Abf geni olmayan *E coli* BL21 DE3’ün kaba ekstraktı (sadece pET28a(+) vektor)

4.TARTIŞMA

K.T.Ü Fen Bilimleri Estitüsünde yüksek lisans tezi olarak hazırlanan bu çalışma *Anoxybacillus* cinsine ait bir bakteriden ilk kez bir arabinofuranozidaz enzimini kodlayan genin klonlanması ve karakterizasyonunun yapılması açısından önem taşımaktadır. Bu cins Pikuta vd. (2000) tarafından *Bacillus* cinsinden ayrılmıştır. Yapmış olduğumuz çalışmalar sonucunda ortaya çıkardığımız *A. kestanbolensis* AC26Sarı türüne ait Arabinofuranosidaz geninin tüm nükleotit ve aminoasit sırası belirlenerek GenBank'ta mevcut diğer Arabinofuronidazlar ile karşılaştırılmıştır. Sonuçta nükleotit düzeyinde *Geobacillus stearothermophilus* T6 AbfA (AF159625) geni ile %81, *Geobacillus thermoleovorans* Abf geni ile %82, *Geobacillus caldoxyloliticus* Abf ile %77, *Bacillus halodurans* ABf'si ile %72 ve *Bacillus subtilis* Abf'si ile de %65 ve aminoasit düzeyinde *Geobacillus stearothermophilus* T6 AbfA (AF159625) geni ile %96, *Geobacillus thermoleovorans* Abf geni ile %94, *Geobacillus caldoxyloliticus* Abf ile %93, *Bacillus holodurans* Abf'si ile %87 ve *Bacillus subtilis* Abf'si ile de %82 benzer olduğunu belirlenmiştir (Gilead and Shoham 1995, Bezalel vd., 1993; Canakci vd., 2007, Kaneko vd., 1994). Aminoasit karşılaştırması bu tür enzimlerin yüksek aktivite göstermesi için gerekli korunmuş 9 aminoasitin (Glu29, Arg 69, Asn74, Asn174, Glu175, His244, Try246, Glu294, Gln351) *A. kestanbolensis* AC26Sarı Arabinofuranosidaz'da da tamamen korunmuş olduğunu göstermiştir. Bütün bu bilgiler dikkate alındığında *A. kestanbolensis* AC26Sarı Arabinofuranosidazının GH51 familyasına ait bir enzim olduğu görülmektedir.

AbfAC26Sarı'nın, *Geobacillus stearothermophilus* T6 AbfA ile diğer *Geobacillus* enzimlerine benzemesine ilaveten, onlarla kıyaslandığında bazı farklı özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. Örneğin optimum sıcaklıkları karşılaştırıldığında AbfAC26Sarı'nın optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın *Geobacillus stearothermophilus* suşlarından (T6 ve L1 suşları; 70°C) ve *Geobacillus caldoxyloliticus*'dan (75°C) daha düşük olduğu gözlenmiştir (Gilead and Shoham 1995; Bezalel vd., 1993; Canakci vd., 2007). Yine termofilik bir bakteri olan *Thermotoga maritima* MSB8'nin (Miyazaki 2005) Abf enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 90°C'dir. Ayrıca bu enzim, 100°C gibi yüksek bir sıcaklıkta 20 dakikadan uzun bir süre aktivitesini %50'sini koruyabilmektedir.

A. kestanbolensis AC26Sarı ve *Geobacillus stearothermophilus* (T6 and L1) saf enzimleri pNP α -L-AF'ı parçalarken diğer pNP-glycosides'leri hidroliz etmemektedir.

Buna karşılık *Geobacillus caldxylolyticus* TK4 arabinofuranosidaz'ı hem *pNP- α -D-xylopyranoside*'ı hem de *p-NP α AF*'ı hidroliz edebilmektedir. AbfAC26Sarı *pNP α -L-arabinopyranoside* veya gum arabik'i hidroliz etmemesi ve sadece *pNP α -L-AF*'ın katalizlemesi bu enzimin bu tür bağların kırılması için spesifik olarak kullanılmada avantajlı olduğunu göstermektedir. AbfAC26Sarı'nın α -bağlantılarına spesifik olması bu enzimi diğerlerinden ayıran önemli bir özelliğidir. Enzim şeker beet arabinan, ryearabinoxylan, oalt spelt xylan gibi maddelere karşı aktivite göstermektedir ve oligosakkaritlerin α -1,5-bağlarını keserek yalnızca arabinoz şekerini ortaya çıkarmaktadır. Enzim arabinogalaktan, gum arabik ve karboksimetil selüloz'a karşı hiç bir aktivite göstermemektedir. Substrat kullanımı bakımından *Geobacillus stearothermophilus* T6 α -L-arabinofuranosidaz'a benzerlik göstermektedir (ortak substratlar: şeker beet arabinan, oat spelt xylan ve rye arabinoksyolan) ancak bu enzimler, AbfAC26Sarı arabinofuranosidazından farklı olarak karboksimetil sellüloz'u da hidroliz etmektedirler. AbfAC26Sarı'nın polisakkaritleri hidroliz etme kapasitesi *Geobacillus caldxylolyticus* TK4'ün α -L-Afase'ından daha geniştir. AbfAC26Sarı şeker beet arabinan, ryearabinoxylan, oat spelt xylan ve α -1,5-bağlı oligosakkaritleri hidroliz ederken, RDA'yı (Red Debranched Arabinan) hidroliz edememesinden dolayı *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26Sarı türünden izole edilen enzim bir exo-arabinofuranosidaz olarak nitelendirilebilir. Exoarabinofuranosidaz enzimleri meyve sularının berraklaştırılması uygulamalarında endoarabinofuranosidazlar ile birlikte kullanılmalarından ötürü ilgi çekmektedirler (Romboust vd., 1988). Meyve sularının berraklaştırılmasında şimdiye kadar önemli ölçüde α -L-arabinofuranosidaz içeren pektinolitik enzim karışımları kullanılmıştır (Pilnik vd.,1982). Bu enzimler ortamdaki 1,5 bağlı arabinan zincirlerindeki 1,3 yan zincirlerini kırarlar ve arabinozları çöktürürler. Örneğin elma suyu üretiminde çökelti oluşması çözünabilir arabinanın varlığından dolayı problemdir. Çökelti yeterli miktarda α -L-arabinofuranosidaz ve endoarabinofuranosidaz ilavesiyle uzaklaştırılabilir (Voragen vd., 1988). Miyazaki (2005) termofilik bir bakteri olan *Thermotoga maritima* MSB8'den hem ekzo hem de endo arabinofuranosidaz aktivitesine sahip bir termofilik Abf tanımladı. Bu her iki özellik meyve suyu endüstrisinde çökelti oluşumunu önlemek için kullanılmaktadır. AbfAC26Sarı Abf'si exoarabinofuranosidaz aktivitesine sahip bir bakteridir ve yapılacak olan ileri genetik çalışmalarda exoarabinofuranosidaz aktivitesinin yanında AbfAC26Sarı Abf'sine endoarabinofuranosidaz özellik kazandırılabilir ve bu enzim endüstriyel açıdan daha önemli hale getirilebilir.

pNP α AF ve şugar beet arabinan substrat olarak kullanıldığında AbfAC26Sarı'nın K_m değerleri herbir substrat için sırasıyla 0.139 mM and 5.21 mg/ml olarak belirlenmiştir. Bu K_m değerleri açısından AbfAC26Sarı diğer bazı bakteriyal Arabinofuranosidazlar ile karşılaştırıldığında onlardan daha aktif bir enzim olduğu görülmektedir. Şöyleki, pNP α AF substrat olarak kullanıldığında *G. stearothermophilus* T6 ve L1 ve *Geobacillus caldxylolyticus* AbfATK4'ün K_m değerleri 0.42 mM, 0.22 mM ve 0.17 mM'dir. Ayrıca substrat olarak arabinan kullanıldığında elde edilen K_m değeri ise *Geobacillus caldxylolyticus* AbfATK4'da 67.56 mg/mL'dir. Bütün bunlar göz önüne alındığında AbfAC26Sarı'nın pNP α AF substratına *G. stearothermophilus* T6, L1 ve *G. caldxylolyticus* AbfATK4 enzimlerinden ve arabinan substratına da AbfATK4 enziminden daha yüksek ilgi duyduğunu göstermektedir.

<http://www.cbs.dtu.dk/suppl/natureprotocols/> deki veriler ile Emanuelsson'un (2007) yaptığı çalışmalar *A. kestanbolensis* AC26Sarı arabinofuranosidazının hücre içi bir enzim olduğunu desteklemektedir. *G. stearothermophilus*'un iki arabinofuranosidazı bulunmaktadır ve L1 α -L-AFase hücre dışı ve T6 α -L-AFase çoğunlukla membrane bağımlı (cell associated) iken, *G. caldxylolyticus* α -L-AFase, hem hücre içinde hemde hücre dışında olabilmektedir. Aynı zamanda *B. pumilus* α -L-arabinofuranosidaz'ı da bir hücre dışı enzimdir. Kengo ve arkadaşları (2003) yapmış oldukları bir çalışma ile bazı yollardan ksilooligosakkaritler hücre içine girebildiğini ancak, ksilan ve arabinan gibi diğer polisakkaritlerin hücre içine giremediklerini belirtmektedirler. Bu bilim adamları aynı zamanda karakterize ettikleri enzimin hücre içi bir enzim olduğunu belirtmektedirler. Ancak, bu durumda da genel olarak substratları hücre içine giremeyen bir enzimin hücre içinde bulunmasının nedeni sorgulanmaktadır. Bu bilim adamları bu sorunun cevabını şu şekilde vermektedirler: Bu hücre içi ksilanazların fonksiyonu ksilooligosakkaritleri ksiloz'a hidroliz etmek olabilir yada bu enzimler yapısal bir enzimdir. Bu veriler göz önüne alınarak AbfAC26Sarı enziminde hücre içinde sadece arabinooligosakkaritleri parçalayan bir enzim olabileceği yada yapısal bir enzim olabileceği düşünülmektedir.

Genellikle bakteriyal arabinofuranosidazlar pH 5.5-7.0 arasında optimum aktivite gösterirken özellikle fungal enzimler daha düşük pH'da optimum aktivite göstermektedirler. *Rhodothermus marinus* Abf'si (Gomes vd., 2000) pH aralığı 5-9 olacak şekilde 8.3 saat 85°C'de kararlı kalabilmektedir. AbfAC26Sarı, pH 4.5 - 7.5 arasında 5 saat boyunca kuvvetli bir stabilite gösterirken, aynı zamanda 65 °C'den düşük sıcaklıklarda da 24 saat inkübasyon sonrasında yaklaşık olarak %95 aktivitesini koruduğu görülmektedir.

Bunun yanında *Geobacillus stearothermophilus* T-6 suşundan elde edilen Abf enziminin 70°C de 4 saat sonunda aktivitesi tamamen kaybolurken AbfAC26Sarı ise 4. saatte %100 aktivite gösterdiği 48. saat sonunda aktivitesinin %50' den fazlasını koruduğu belirlenmiştir (Gilead ve Shoham, 1995). Bu da AbfAC26Sarı'nın yüksek bir sıcaklık ve pH stabilitesine sahip olduğunu göstermektedir.

AbfAC26Sarı'nın aktivitesi Cu^{2+} ve Hg^{2+} metal iyonları varlığında tamamen inhibe olmaktadır. Zn^{2+} , Mg^{2+} ve Ca^{2+} metal iyonları kullanıldığında %15-20 arasında bir aktivite artışı gözlenmiştir. Aktivite üzerine Co^{2+} , Mn^{2+} , EDTA, DTT ve β -mercaptoethanol'ün her hangi bir etkisi olmamaktadır. Cu^{2+} , Zn^{2+} ve Hg^{2+} metal iyonları GH51 için inhibitör maddeleri olarak bilinirler ama Cu^{2+} ve Hg^{2+} AbfAC26Sarı Abf'sini inhibe etmesine rağmen Zn^{2+} AbfAC26Sarı'nın Abf'sine aktivatör olarak etki etmiş olması AbfAC26Sarı'yı familya-51 üyelerinden ayıran önemli bir özelliği olmuştur. *Geobacillus stearothermophilus* T6 Abf'sinde Ca^{2+} inhibitör etkiye sahipken AbfAC26Sarı'da Ca^{2+} aktiviteyi yaklaşık olarak %15-20 artırmıştır.

Gelişen teknolojiyle paralel olarak günümüzde sıkça rastlanan hastalıklardan biri olan şeker hastalığı (diabetes mellitus) endüstriyel açıdan gün geçtikçe önem kazanmaktadır. Enzimin arabinan'ı parçalaması sonucu açığa çıkan L-arabinoz tatlı olmasına rağmen vücut tarafından emilimi gerçekleştirilemeyen bir şekerdir. Bununla birlikte, L-arabinozun sakkarozla birlikte alındığında sakkarozdan sağlanan enerjiyi azalttığı ve aynı zamanda sindirimi ve emilimi de azalttığı bilinmektedir (Seri vd.,1996). Bu yüzden L-arabinoz şeker hastalarında hem alınan sakkarozun emilimini azaltması münasebetiyle fonksiyon gösterirken hem de vücut tarafından emilimi olmadığından tatlandırıcı fonksiyonu nedeniyle kullanımı fayda sağlamaktadır. Elde edilen sonuçlar, AbfAC26Sarı enziminin bu amaçla kullanılabileceğini göstermektedir.

Nihayetinde, *Anoxybacillus* cinsinden izole edilen termostabil AbfAC26Sarı, substrata ilgisi yüksek olan ve sekans sonucuna göre de familya 51 glycosyl hidrolase sınıfına ait ilk enzimdir. Belirlenen özellikleri itibari ile de mevcut kullanımda olan ticari formlarına alternatif olarak değerlendirilebileceği kanaatine varılmıştır. Bu itibarla daha ileri çalışmalar planlanacaktır.

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26Sarı'ya ait Arabinofuranosidaz geni klonlanıp, ekspres edildi ve optimum pH, optimum sıcaklık, pH ve ısıl kararlılığı, inhibitör ve aktivatörleri ve kinetik parametreleri gibi özellikleri açısından karakterizasyonu yapıldı.

Anoxybacillus kestanbolensis AC26Sarı bakterisinin Abf'ye sahip olduğu doğal PAGE ve aktivite deneyleri ile ortaya çıkarıldı. Yapılan çalışmalar sonucunda bakterinin oldukça yüksek Arabinofuranosidaz aktivitesi sergilediği saptandı.

Bakterinin Abf genine ait 300 baz çiftlik DNA parçası tasarlanan dejenerat primerler yardımıyla çoğaltıldı ve p-GEMT Easy klonlama vektörüne klonlanarak baz dizilimi belirlendi. Elde edilen bölgeden yararlanılarak invers PCR primerleri dizayn edildi ve invers PCR reaksiyonları ile genin geri kalan tüm bölgelerinin nukleotit sırası ortaya çıkarıldı. Elde edilen bu gen his taq kuyruk içerecek şekilde bir ekspresyon vektörü olan pET28-a(+)'ya N-terminalinde bir histidin kuyruk içerecek şekilde klonlandı ve ekspres edildi. Ekspreslenen protein MagneHisTM Protein Purification System (Promega) kiti kullanılarak saflaştırıldı. Saf proteinin moleküler ağırlığı gel filtrasyon kolonu ile HPLC'de 230 kDa olarak belirlendi. Yapılan SDS-PAGE sonucunda enzimin tek bir alt biriminin moleküler ağırlığı 57 kDa olarak belirlendiğinden enzimin bir homotetramer olduğuna karar verildi.

Anoxybacillus kestanbolensis AC26Sarı'ya ait saf Abf enzimi kullanılarak yapılan incelemelerde, Abf'nin optimum pH değerinin 6.5 optimum çalışma sıcaklığının ise 65°C olduğu tespit edildi. Enzimin substratı olarak p-nitrophenil- α -L- arabinofuranoside ve arabinan kullanılarak yapılan kinetik çalışmalarında bu substratlar için K_m değeri sırasıyla 0.139 mM ve 5.21 mg/mL ve V_{max} değeri ise sırasıyla 1019 U/mg ve 156.25 μ mol olarak belirlendi. Enzimin 55°C'de ısıl kararlılığını 72 saat sonunda %80 oranında koruyabildiği ve değişik pH'larda bekletilen Abf'nin de pH 5.0, 6.0, 7.0 de 24 saat sonunda aktivitenin %100'e yakın olarak kararlı kaldığı belirlendi.

Zn⁺², Mg⁺², Zn⁺² ve Ca⁺² metal iyonlarının Abf aktivitesi üzerine aktivator etki yaptığı ve Hg⁺², Cu⁺² bivalent metal iyonlarının Abf aktivitesini 1 mM gibi düşük bir konsantrasyonda kuvvetli inhibe ettiği belirlendi.

A. *kestanbolensis* AC26Sarı Abf'si RDA'yı (Red Debranched Arabinan) parçalayamadığı, bu yüzden de endoarabinanaz aktivitesine sahip olmadığı sadece ekzoarabinofuranosidaz aktivitesine sahip bir enzim olduğu belirlendi ve sugar beet arabinan, rye arabinoxylan ve oalt spelt xylandan 16 saat 65°C inkübasyonları sonunda bu maddeleri hidroliz edip son ürün olarak arabinoz şekerinin ortaya çıkardığı ve arabino oligosakkaritleri de hidroliz ederek açığa çıkan şekerler ince tabaka kromatografisinde (TLC) silika jel üzerinde analiz edildi ve yapılan incelemeler sonucunda enzimin bu maddelerden sadece arabinoz ürettiği belirlendi.

6. ÖNERİLER

Bitki hücre polisakkariti hemisellüloz ve pektinlerin etkili bir biçimde yıkımının başarılması biyoteknologlar için önemli bir amaçtır. Arabinofuranosidazlar hemiselüloz parçayıcı enzimlerden birisidir. Bu yüzden Abf'lerin bütün özelliklerinin detaylı bir şekilde çalışılması gerekmektedir. Ayrıca, enzimin diğer hemisellülozlar ve ticari olarak mevcut olan pektinazlar ile sinergistik etkileri üzerindeki çalışmalar endüstriyel ürünlerin çoğunun geliştirilmesine yardımcı olabilir. Bu enzimlerin nasıl etkileştikleri lignosellulazlar üzerindeki etkileri ve onların yapı ve fonksiyonlarının moleküler seviyede anlaşılmasına çalışılması gereken diğer önemli noktalardır. Buna ilaveten, Abf'lerin izolasyonu, karakterizasyonu ve bu enzimleri kodlayan genler, biyomass yıkıcı enzimlerin ticari olarak üretimi gibi bazı endüstriyel işlemlerin tasarlanmasında önemli rol üstlenmektedir. Bakterilerin genetik mühendisliği, etanol üretimi gibi tam sakkarifikasyon işlemlerinde yeni yollar açacak α -L-Abf genleri içeren lignosellüloz yıkıcı enzimlerin elde edilmesi için önemli olacaktır. Etkili hemisellüloz yıkıcı enzimlerin kullanımı kağıt ve kağıt hamuru beyazlaştırılması, bio etanol üretiminde kimyasal kullanımını azaltarak çevresel kirliliğin azaltılmasına yardımcı olacaktır. Çeşitli mutasyonlarla enzimin pH ve sıcaklık stabiliteleri artırılabilir. Ayrıca yapılan çalışmalar sonucunda *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26Sarı'dan klonlanarak karakterize edilen arabinofuranosidaz enzimi Red debranched Arabinan'ı hidroliz etmediği için ekzoarabinofuranosidaz özelliği göstermektedir. Yapılacak olan ileri genetik çalışmalar sonucunda ekzoarabinofuranosidaz özelliği gösteren bu enzime endoarabinofuranosidaz özelliği kazandırılabilir ve substrata olan yüksek ilgisinde yararlanılarak endüstriye kazandırılabilir.

7. KAYNAKLAR

- Adamian, L. ve Liang, J., 2002. Interhelical Hydrogen Bonds and Spatial Motif in Membrane Proteins: Polar Clamps and Serine Zippers, *Proteins*, 47, 209-218.
- Aguilar, A., 1996, Extremophile Research in the European Union: from Fundamental Aspects to Industrial Expectations, *FEMS Microbiol. Rev.*, 18, 89-92.
- Aryon AP, Wilson B, Strauss CR ve Williams PJ., 1987. The properties of glycosidases of *Vitis vinifera* and a comparison of their β -glucosidase activity with that of exogenous enzymes. An assessment of possible applications in enology. *Am J Enol Viticult.*, 38, 182–188.
- Belduz, A.O., Dulger, S. ve Demirbag, Z., 2003. *Anoxybacillus gonensis* sp. nov., a Moderately Thermophilic, Xylose-Utilizing, Endospore-Forming Bacterium, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53, 1315-1320.
- Bezalel L, Shoham Y, Rosenberg E., 1993. Characterization and delignification activity of a thermostable α -L-arabinofuranosidase from *Bacillus stearothermophilus*. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 40:57–62.
- Bhat, M., 2000, Cellulases and Related Enzymes in Biotechnology, *Biotechnol. Adv.*, 18, 355–383.
- Biskup SE, Intert F, Holthnujzen JH, Stengele M, Schultz G., 1993, Glycosically bound volatiles-A review 1986–1991. *Flav Fragr J.*, 8, 61–80.
- Burg, B.V.D., 2003, Extremophiles as a Source for Novel Enzymes, *Current Opinion in Microbiology.*, 6, 213-218.
- Canakci S, Belduz AO, Saha BC, Yasar A, Ayaz F.A. ve Yayli N., 2007. Purification and characterization of a highly thermostable α -L-arabinofuranosidase from *Geobacillus caldoxylyticus* TK4. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 75, 813-820
- Casier JPJ, De Paepe G, Brummer J.M. ve 1973. Effect of watersoluble wheat and rye pentosans on the baking properties derived from wheat flours and other raw materials. *Getreide Mehl und Brot.*, 27, 36–43.
- Chien, A., Edgar, D. ve Trela, J., 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophilic *Thermus aquaticus*, *J. Bacteriol.*, 127, 1550–1557.
- Churms SC, Merrield EH, Stephen AM, Walvyn DR, Polson A, Merwe van den KJ, Spies H.S.C. ve Costa N., 1983. An Arabinan from apple-juice concentrates. *Carbohydr Res.*, 113:339–344.
- Coen J.A. ve Dehority B.A., 1970, Degradation and utilization of hemicellulose from intact forages by pure cultures of rumen bacteria. *Appl Microbiol.*, 20:362–368

- Colacino, F. ve Crichton, R.R., 1997, Enzyme Thermostabilization: The State of the Art, Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 14, 211-277.
- Conference of the Cereal Across the Continents, 1997. Instituto de Agroquímica Tecnología de Alimentos, Valencia, 168.
- Coughlan M.P. ve Hazlewood O., 1993. Beta-1,4-o-xylan-degrading enzyme systems: Biochemistry, molecular biology and applications. Biotechnol Appl Biochem., 17,259-289.
- Çanakçı, S., 2003, Gönen, Kestanbol ve Diyadin Kaplıcalarından Termofilik Bakteriler İzolasyonu, Moleküler Yöntemlerle Karakterizasyonu ve Tanımlanması, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Das, R. ve Gerstein M., 2000, The Stability of Thermophilic Proteins: A Study Based on Comprehensive Genome Comparison, Funct. Integr. Genomics., 1, 76-88.
- Daniel, R.M. ve Cowan, D.A.C., 2000, Biomolecular Stability and Life at High Temperatures, Cell. Mol. Life Sci., 57, 250-254.
- Debeche, T., Bliard, C., Debeire, P. and O'Donohue, M. J., 2002. Probing the catalytically essential residues of the α -L-arabinofuranosidase from *Thermobacillus xylanilyticus*. Protein Eng., 15, 21-28.
- Debeche T., Cummings N., Connerton I., Debeire P. ve O'Donohue MJ., 2000. Genetic and biochemical characterization of a highly thermostable α -L-arabinofuranosidase from *Thermobacillus xylanilyticus*. Appl Environ Microbiol., 6,1734–1736
- Degrassi G., Vindigni A. ve Venturi VA., 2003. Thermostable α -arabinofuranosidase from xylanolytic *Bacillus pumilus*: purification and characterization. J Biotechnol., 101,69–79.
- Dehority BA., 1967, Rate of isolated hemicellulose degradation and utilization by pure cultures of rumen bacteria. Appl Microbiol 15, 987–993 genomics.
- Duguet, M., 1995, Nucleic Acids and Molecular Biology, Volume 9, Lilley D. ve Eckstein, F., Eds., Springer Verlag., Berlin, Germany, 84.
- Emanuelsson O., Brunak S., Heijne G. ve Nielsen H., 2007. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. Nature Protocols., 2:953-971.
- Eriksson, L. ve Heitmann, J., 1998. Proceedings of the Technical Association of the Pulp and Paper Industry, Volume 3, Montreal.
- Erlich, H., Gelfand, D. ve Saiki, R., 1988. Specific DNA Amplification Product Review. Nature., 33, 461–462.

- Fang, X.W., Golden, B.L., Littrell, K., Shelton, V., Thiyagarajan, P., Pan, T. ve Sosnick, T.R., 2001. The Thermodynamic Origin of the Stability of a Thermophilic Ribozyme, PNAS, 98, 8, 4355-4360.
- Fessas D, Schiraldi A., 1998. Texture and staling of wheat bread crumb: effects of water extractable proteins and pentosans. Thermochim Acta, 323:17–26.
- Forterre, P., Bergerat, A. Ve Lopez-Garcia, P., 1996. The Unique Topology and DNA Topoisomerases of Hyperthermophilic Archeae, FEMS Microbiol. Rev., 18, 237-248.
- Galtier, N., Tourasse, N. ve Gouy, M., 1999. A Nonhyperthermophilic Common Ancestor to Extant Life Forms. Science, 283, 220-221
- Gasparic A, Romana M-L, Martin J, Wallace RJ, Nekrep FV, Flint HJ., 1995. Isolation of genes encoding b-D-xylanase, b-Dxylosidase and a-L-arabinofuranosidase activities from the rumen bacterium *Prevotella ruminicola* B14. FEMS Microbiol Lett., 125:135–142.
- Gey, M. ve Unger, K., 1995. Calculation of the Molecular Masses of Two Newly Synthesized Thermostable Enzymes Isolated from Thermophilic Microorganisms, J. Chromatogr., 166, 188–193.
- Giinata Z, Bitteur S, Brillouet JM, Bayanove C, Cordonnier R., 1988. Sequential enzymic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape. Carbohydr Res., 184, 139–149.
- Gilead, S.; Shoham, Y., 1995. Purification and characterization of alpha-L-arabinofuranosidase from *Bacillus stearothermophilus* T-6; Appl. Environ. Microbiol., 61, 170-174
- Gobbetti M, De Angelis M, Arnaut P, Tossut P, Corsetti A, Lavermicocca P., 1999. Added pentosans in breadmaking: fermentations of derived pentoses by sourdough lactic acid bacteria. Food Microbiol., 16:409–418.
- Gobbetti M, Lavermicocca P, Minervini F, De Angelis M, Corsetti A., 2000. Arabinose fermentation by *Lactobacillus plantarum* in sourdough with added pentosans and a-L-arabinofuranosidase: a tool to increase the production of acetic acid. J Appl Microbiol., 88, 317–324
- Gomes J, Gomes I, Terler K, Gubala N, Ditzelmu"ller G, Steinera W., 2000. Optimisation of culture medium and conditions for a-L-arabinofuranosidase production by the extremothermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*. Enzyme Microb Technol., 27, 414–422.
- Greve LC, Labavitch JM, Hungate RE., 1984. a-L-Arabinofuranosidase from *Ruminococcus albus* 8: purification and possible roles in hydrolysis of alfalfa cell wall. Appl Environ Microbiol., 47, 1135–1140.

- Grupta, M., 1995. *Thermostability of Enzymes*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York
- Gubitz GM, Haltrich D, Latal B, Steiner W., 1997. Mode of depolymerisation of hemicellulose by various mannanases and xylanases in relation to their ability to bleach softwood pulp. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 47, 658–621.
- 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.
- Hespell RB, O'Bryan P., 1992. Purification and characterization of an α -L-arabinofuranosidase from *Butyrivibrio fibrisolvens* GS113. *Appl Environ Microbiol.*, 58, 1082–1088.
- Jaenicke, R. ve Bohm, G., 1998. The Stability of Proteins in Extreme Environments, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 8, 738-748.
- Jankiewicz M, Michniewicz J., 1987. The effect of soluble pentosans isolated from rye grain on staling of bread. *Food Chem.*, 25, 241–246.
- Jimenez T, Martinez-Anaya MA (eds)., 1999. Enzymes, a key to improve bread and dough quality: degradation by products and relationship with quality. In, Abstracts of the 17th ICC.
- Juers, D.H., Huber, R.E. and Matthews, B.W., 1999. Structural comparisons of TIM barrel proteins suggest functional and evolutionary relationships between β -galactosidase and other glycohydrolases. *Protein Sci.*, 8, 122-136.
- Kaneko S, Arimoto M, Ohba M, Kobayashi H, Ishii T, Kusakabe I., 1998. Purification and substrate specificities of two α -L-arabinofuranosidases from *Aspergillus awamori* IFO4033. *Appl Environ Microbiol.*, 64, 4021–4027.
- Kaneko, S.; Sano, M.; Kusakabe, I., 1994. Purification and some properties of α -L-arabinofuranosidase from *Bacillus subtilis* 3-6. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 3425-3428.
- Kim SK, D'Appolonia BL., 1977. Bread staling studies. III. Effect of pentosans on dough, bread, and bread staling rate. *Cereal Chem.*, 54, 225–229.
- 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.
- Kormelink FMJ, Voragen AGJ., 1993. Degradation of different [(glucurono)arabino] xylans by combination of purified xylan degrading enzymes. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 38, 688–695.

- Kumar, H.D. ve Swati, S., 2001. Modern Concepts of Microbiology, Second Revised, Vikas Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi.
- Kumar, S., Tsai, C. ve Nussinov, R., 2000. Factors Enhancing Protein Thermostability, Protein Engineering., 13, 179-191.
- Lopez-Garcia, P., 1999. DNA Supercoiling and Temperature Adaptation: A Clue to Early Diversification of Life, J. Mol. Evol., 49, 439-452.
- Margolles A, de los Reyes-Gavila' n CG ., 2003. Purification and functional characterization of a novel α -L-arabinofuranosidase from *Bifidobacterium longum* B667. Appl Environ Microbiol., 69, 5096–5103.
- Marguet, E. ve Forterre, P., 1994. DNA Stability at Temperature Typical for Hyperthermophiles, Nuc. Acid. Res., 22, 1681-1686.
- Martinez-Anaya MA, Devesa A (eds.), 1999. Enzymes and sourdough starters govern bread and dough quality: influence on dough-bread pentosans. In: Abstracts of the 17th ICC Conference of the Cereal Across the Continents, Instituto de Agroquímica Tecnología de Alimentos, Valencia p 168.
- Martino, A., Schiraldi, C., Di Lazzaro, A., Fiume, I., Pijeri, P.G. and De Rosa, M., 2000. Process Biochem., 36, 93-102
- Mateo JJ, Jimenez M., 2000. Monoterpenes in grape juice and wines. J Chromatogr A., 881, 557–567.
- Matuso N, Kaneko S, Kuno A, Kobayashi H, Kusakabe I., 2000. Purification, characterization and gene cloning of two α -L-arabinofuranosidases from *Streptomyces chartreusis* GS901. Biochem., J 346, 9–15.
- Miyazaki K., 2005. Hyperthermophilic α -L-arabinofuranosidase from *Thermotoga maritima* MSB8: molecular cloning, gene expression, and characterization of the recombinant protein. Extremophiles., 9, 399–406.
- Miller GL., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Anal Chem., 31, 426-428.
- Miyanaga A., Koseki T., Matsuzawa H., Wakagi T., Shoun H., and Fushinobu S., 2004. Crystal Structure of a Family 54 α -L-Arabinofuranosidase Reveals a Novel Carbohydrate-binding Module That Can Bind Arabinose. The J Biol. Chem., 279, 44907–44914
- Mozhaev, V., 1993. Mechanism-based Strategies for Protein Thermostabilization, Trends Biotechnol., 11, 88–95.
- Navas, J. and Beguin, P., 1992. Site-directed mutagenesis of conserved residues of *Clostridium thermocellum* endoglucanase CelC. Biochem. Biophys. Res. Commun., 189, 807-812.

- Pikuta E, Lysenko A, Chuvilskaya N, Mendrock U, Hippe H, Suzina N, Nikitin D, Osipov G, 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.
- Pilnik W., 1982. Enzymes in the beverage industry. In: Dupuy P(ed) Use of enzymes in food technology, Lavoisier, Paris, pp 425–449.
- Poonam, N.ve Dalel, S., 1995. Enzyme and Microbial Systems Involved in Starch Processing, Enzyme Microb. Technol., 17, 770–778.
- Querol, E., Perez-Pons, J.A. ve Mozo-Villarians, A., 1996. Analysis of Protein Conformational Characteristics Related to Thermostability, Protein Eng., 9, 265-271.
- Rao, M., Tankasale, A., Ghatge, M. ve Desphande, V., 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62, 597–634.
- Roche N, Berna P, Desgranges C, Durand A., 1995. Substrate use and production of a-L-arabinofuranosidase during solidstate culture of *Trichoderma reesei* on sugar beet pulp. Enzyme Microb Technol., 17, 935–941.
- Romboust FM, Voragen AGJ, Searle-van Leenwen MF, Geraeds CCJM, Schols HA, Pilnik W., 1988. The arabinanases of *Asperigillus niger*—puri.cation and characterization of two a-L- arabinofuranosidase and an endo-1,5-a-L-arabinanase. Carbohydr Polym., 9, 25–47.
- Russell, R.J.M. ve Taylor, G.L., 1995. Engineering Thermostabilitiy: Lessons from Thermophilic Proteins, Curr. Opin. Biotechnol., 6, 370-374.
- 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 1.9 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.
- Ryttersgaard,C., Lo Leggio,L., Coutinho,P.M., Henrissat,B. And Larsen,S., 2002, *Aspergillus aculeatus* b-1,4-galactanase: substrate recognition and relations to other glycoside hydrolases in clan GH-A.Biochemistry., 41, 15135-15143.
- Saha BC., 2000. a-L-Arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. Biotech Adv., 18, 403–423.

- Sakamoto T, Kawasaki H., 2003. Purification and properties of two type-B α -L-arabinofuranosidases produced by *Penicillium chrysogenum*. Bioch et Biophys Acta., 1621, 204–210.
- Sakon,J., Adney,W.S., Himmel,M.E., Thomas,S.R. and Karplus,P.A., 1996. Crystal structure of thermostable family 5 endocellulase E1 from *Acidothermus cellulolyticus* in complex with cellotetraose.Biochemistry., 35, 10648-10660.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. ve Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Volume 2, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sanchez-Torres, P., Gonzalez-Candelas, L. and Ramon, D., 1996. FEMS Microbiol. Lett., 145, 189-194
- Scandurra, R., Consalvi, V., Chiaraluce, R., Politi, L. ve Engel, P.C., 1998. Protein Thermostability in Extremophiles, Biochimie., 80, 933-941.
- Schwab W, Scheller G, Schreier P., 1990. Glycosidically bound aroma components from sour cherry. Phytochemistry., 29, 607–612.
- Senes, A., Gerstein, M.ve Engelman, D.M., 2000. Statistical Analysis of Amino Acid Patterns in Transmembrane Helices: The Gxxxg Motif Occurs Frequently and in Association with Beta-Branched Residues at Neighboring Positions, J. Mol. Biol., 296, 921-936.
- Seri K, Sanai K, Matsuo N, Kawakubo K, Xue C, Inoue S., 1996. L-arabinose selectively inhibits intestinal sucrase in uncompetitive manner and reduces glycemic response after sucrose ingestion in animals. Metabolism.,45, 1368–1374.
- Shallom D, Belakhov V, Solomon D, Shoham G, Baasov T, Shoham Y., 2002. Detailed kinetic analysis and identification of the nucleophile in α -L-arabinofuranosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6, a family 51 glycoside hydrolase. J. Biol. Chem., 277, 43667–43673.
- Shallom D, Belakhovb V, Solomonb D, Gilead-Gropper S, Baasovb T, Shoham G, Shoham Y., 2002. The identification of acid-base catalyst of α -L-arabinofuranosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6, a family 51 glycoside hydrolase. FEBS Letters.,514, 163-167.
- Suurnakki, M. Tenkanen, J. Buchert and L. Viikari., 1997. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 57, 261–287.
- Ryttersgaard,C., Lo Leggio,L., Coutinho,P.M., Henrissat,B. And Larsen,S., 2002. *Aspergillus aculeatus* b-1,4-galactanase: substrate recognition and relations to other glycoside hydrolases in clan GH-A. Biochemistry., 41, 15135-15143.
- Rinia, H. A., Boots, J. W., Kik, R. A., Snel, M. M. E., Demel, R. A., Killian, J. A., van der Eerden, J.P.J.M. ve Kruijff, B., 2002. Domain Formation in

- Phosphatidylcholine Bilayers Containing Transmembrane Peptides: Specific Effects of Flanking Residues, Biochemistry, 41, 2814-2824.
- Thompson, M.J ve Eisenberg, D., 1999. Transproteomic Evidence of a Loop-Deletion Mechanism for Enhancing Protein Thermostability, J. Mol. Biol., 290, 595-604.
- Tolner, B., Poolman, B. ve Konings, W.N., 1997. Adaptation of Microorganisms and Their Transport Systems to High Temperatures, Comp. Biochem. Physiol., 118, 423-428.
- Tsujibo H, Takada C, Wakamatsu Y, Kosaka M, Tsuji A, Miamuto K, Inamori Y., 2002. Cloning and expression of an arabinofuranosidase (STX- IV) *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520, and characterization of the enzyme. Biosci Biotechnol Biochem., 66, 434-438.
- Van der Maarel, M., Van der Veen, B., Uitdehaag, H., Leemhuis, H. ve Dijkhuizen, L., 2002. Properties and Applications of Starchconverting Enzymes of the α -amylase Family, J. Biotechnol., 94, 137-155.
- Vieille, C., Burdette, D.S., Zeikus, J.G., 1996. Thermozyms, Biotechnol. Ann. Rev., 2, 1-83.
- Vikari, L., Kantelinen, A., Sundquist, J. ve Linko, M., 1994. Xylanases in Bleaching: from an Idea to the Industry, FEMS Microbiol. Rev., 13, 335-350.
- Vogt, G. ve Argos, P., 1997. Protein Thermal Stability: Hydrogen Bonds or Internal Packing, Folding Design., 2, 40-46.
- Vogt, G., Woell, S ve Argos, P., 1997. Protein Thermal Stability, Hydrogen Bonds, and Ion Pairs, J. Mol. Biol., 269, 631-643.
- Voragen AGJ, Rombouts FM, Searle-van leeuwen MF, Schols HA, Pilnik W., 1988. The degradation of arabinans by endoarabinanase and arabinofuranosidases purified from *Aspergillus niger*. Food Hydrocolloids., 1, 423-437.
- Watanabe, K., Oshima, T. ve Nishimura, S., 1976. CD Spectra of 5-methyl-2-thiouridine in tRNA-met-F from an Extreme Thermophile, Nuc. Acids. Res., 3, 1703-1713.
- Wolfenden, R., Lu, X., and Young, G., 1998. J. Am. Chem. Soc., 120, 6814-6815
- Zhou. F.X., Merianos, H.J., Brunger, A.T. ve Engelman, D.M., 2001. Polar residues drive association of polyleucine transmembrane helices, Proc. Natl. Acad. Sci., 98, 2244-2250

ÖZGEÇMİŞ

20.06.1979 tarihinde Trabzon'un Akçaabat ilçesinde doğdu. İlk öğrenimini Akçaabat'ta , lise öğrenimini Trabzon Fatih Süper Lise'de tamamladı. 1999 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Tıbbı Laboratuar Bölümünden mezun oldu. 2000 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans öğrenimine başladı ve 2004 yılında Biyolog ünvanı ile mezun oldu. Aynı yıl Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yrd. Doç. Dr Sabriye ÇANAKÇI danışmanlığı altında yüksek lisans öğrenimine başladı. Trabzon Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesinde Laboratuar Teknisyeni olarak görev yapmakta, evli ve bir çocuk babasıdır.