

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***ANOXYBACILLUS KESTANBOLENSIS* AC26 SARI RİBULOKİNAZ GENİNİN  
KLONLANMASI, EKSPRESYONU VE KARAKTERİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Biyolog Müslüm TOKGÖZ**

**ŞUBAT 2013**  
**TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***ANOXYBACILLUS KESTANBOLENSIS* AC26 SARI RİBULOKİNAZ GENİNİN  
KLONLANMASI, EKSPRESYONU VE KARAKTERİZASYONU**

**Biyolog Müslüm TOKGÖZ**

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

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 11 / 02 / 2013**  
**Tezin Savunma Tarihi : 26 / 02 / 2013**

**Tez Danışmanı : Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI**

**Trabzon 2013**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Biyoloji Anabilim Dalında**

**Müslüm TOKGÖZ tarafından hazırlanan**

***ANOXYBACILLUS KESTANBOLENSIS* AC26 SARI RİBULOKİNAZ GENİNİN  
KLONLANMASI, EKSPRESYONU VE KARAKTERİZASYONU**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 12 / 02 / 2013 gün ve 1493/4  
sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**olarak kabul edilmiştir.**

**Jüri Üyeleri**

**Başkan : Prof. Dr. Eşref Edip KEHA .....**

**Üye : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ .....**

**Üye : Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI .....**

**Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ**

**Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ

“*Anoxybacillus kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinaz geninin klonlanması, ekspresyonu ve karakterizasyonu” adlı çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı’nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Lisansüstü eğitimim süresince danışmanlığımı üstlenerek, gerek konu seçimi, gerekse çalışmaların yürütülmesi sırasında deneyim ve bilgilerini benimle paylaşan, yardım ve desteğini esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI’ya ve laboratuvar çalışmalarım sırasında, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım sayın hocam Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’e teşekkürü borç bilirim.

Ayrıca, çalışmamın her aşamasında bilgi ve yardımlarını esirgemeyerek yol gösterici olan, her konuda desteğini gördüğüm sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Kadriye İNAN’a, Arş. Gör. Halil İbrahim GÜLER’e, Arş. Gör. Fulya AY ŞAL’a, Arş. Gör. Dilşat Nigar ÇOLAK’a, Murat KAÇAĞAN’a ve laboratuvar çalışmalarım ve çalışmalar dışındaki her türlü konuda yardımlarıyla bana destek olan K.T.Ü. Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuvarının tüm çalışanlarına sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bugünlere gelmemde büyük emeği olan, beni her zaman destekleyen değerli aile bireylerime ve nişanlım Berna COŞGUN’a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Müslüm TOKGÖZ

Trabzon 2013

## TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum “*Anoxybacillus kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinaz geninin klonlanması, ekspresyonu ve karakterizasyonu” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI'nın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.11 / 02 / 2013

Müslüm TOKGÖZ

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ.....	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET.....	VIII
SUMMARY .....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER DİZİNİ.....	XII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Termofilik Bakterilerin Genel Özellikleri.....	2
1.3. Termofilik Mikroorganizmaların Yüksek Sıcaklığa Dayanıklılık Mekanizması.....	2
1.4. Termofilik Bakterilerin Habitatları .....	3
1.5. <i>Anoxybacillus</i> Cinsinin Genel Özellikleri .....	4
1.6. Termofilik ve Termostabil Enzimler .....	5
1.7. Operon Kavramı ve Arabinoz Operonu .....	5
1.8. Transferazlar ve Ribulokinazlar .....	7
1.9. Ribulokinaz Aktivite Tayin Yöntemleri.....	8
1.9.1. Sistein-Karbozol Metodu .....	8
1.9.2. İkili Enzim Metodu .....	8
1.10. Ribulokinaz- Substrat Etkileşimi.....	9
1.11. Ribulokinazın Metabolik ve Endüstriyel Önemi.....	10
1.12. Tezin Amacı ve Önemi.....	11
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR .....	12
2.1. Kullanılan Kimyasallar.....	12
2.2. Kullanılan Hücreler .....	12
2.3. Moleküler Çalışmalar .....	13
2.3.1. Genomik DNA İzolasyonu.....	13
2.3.2. Primer Sentezi .....	13

2.3.3.	Ribulokinaz Geninin PCR Yöntemi ile Belirlenmesi.....	14
2.3.4.	Ribulokinaz Geninin pET-28a(+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması.....	15
2.4.	Gen Ürününün Elde Edilmesi ve Saflaştırılması.....	15
2.4.1.	Ribulokinaz Aktivitesinin Ölçümü.....	15
2.4.2.	Hücre Üretimi.....	16
2.4.3.	Hücre Ekstraktının Elde Edilmesi .....	16
2.4.4.	Ribulokinazın Saflaştırılması .....	17
2.4.4.1.	Isı Şoku Uygulaması .....	17
2.4.4.2.	Ni-Affinite Kromatografi Yöntemi ile Saflaştırma.....	17
2.4.5.	Protein Konsantrasyonu Tayini .....	18
2.4.6.	SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi .....	18
2.5.	Ribulokinazın Karakterizasyonu .....	19
2.5.1.	Optimum Sıcaklık.....	19
2.5.2.	Optimum pH.....	19
2.5.3.	Enzim Kinetiği .....	19
2.5.4.	Metal İyonları ve Kimyasalların Ribulokinaz Aktivitesi Üzerine Etkileri.....	20
2.5.5.	Isıl Kararlılığı .....	20
2.5.6.	pH Kararlılığı .....	20
2.5.7.	Substrat Spesifikliği .....	20
3.	BULGULAR .....	21
3.1.	<i>Anoxybacillus kestanbolensis</i> AC26 Sarı Ribulokinaz Geninin Baz Diziliminin Belirlenmesi.....	21
3.2.	Ribulokinaz Geninin pET-28a(+) Vektörüne Klonlanması ve Ekspres Edilmesi..	22
3.3.	Ribulokinaz Aktivitesi.....	24
3.4.	Ribulokinazın Saflaştırılması .....	24
3.4.1.	Hücre Özütünün Elde Edilmesi ve Isı Şoku Muamelesi .....	24
3.5.	Ribulokinaz Enziminin Karakterizasyonu.....	25
3.5.1.	Optimum Sıcaklık.....	25
3.5.2.	Optimum pH.....	26
3.5.3.	Kinetik İncelemeler .....	27
3.5.4.	Isıl Kararlılığı .....	27
3.5.5.	pH Kararlılığı .....	28
3.5.6.	Substrat Spesifikliği .....	29

3.5.7.	Metal İyonları ve Kimyasalların Etkisi .....	30
4.	TARTIŞMA.....	32
5.	SONUÇLAR .....	36
6.	ÖNERİLER .....	37
7.	KAYNAKLAR.....	38
8.	EKLER .....	42
	ÖZGEÇMİŞ	



Yüksek Lisans

ÖZET

*ANOXYBACILLUS KESTANBOLENSIS* AC26 SARI RİBULOKİNAZ GENİNİN  
KLONLANMASI, EKSPRESYONU VE KARAKTERİZASYONU

Müslüm TOKGÖZ

Karadeniz Teknik Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Danışman: Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI  
2013, 41 Sayfa, 2 Ek Sayfa

Ribulokinazlar (transferazlar, EC 2.7.1.16) L-ribulozu, L-ribuloz 5 fosfata; D-ribulozu, D-ribuloz 5 fosfata dönüşümünü sağlayan enzimlerdir. Bu enzimin katalizlediği reaksiyonlar sonucunda oluşan ürünler, pentoz fosfat yolunda kullanılır.

Bu çalışma *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26 sarı ribulokinaz geninin klonlanmasını, gen ürününün izolasyonunu ve karakterizasyonunu konu almaktadır. Yapılan bu çalışmada *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazını kodlayan 1695 nt'lik genin baz dizilimi belirlenerek pET-28a(+) vektörüne klonlandı. Geni içeren vektör, *E.coli* BL21 (DE3) pLysS hücresine aktarılarak ribulokinaz ekspres edildi ve saflaştırıldı. Saf ribulokinaz, 60°C ve pH 9'da optimum aktivite gösterdi. Enzimin, D-ribuloz için  $K_m$  değeri 0,94 mM olarak belirlendi. Enzimin aktivitesi üzerine  $Mg^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ , Li, K,  $Zn^{+2}$  metal iyonlarının,  $\beta$ -merkaptetanol ve EDTA'nın etkileri araştırıldı.  $Mg^{+2}$  ve  $\beta$ -merkaptetanol'ün aktiviteyi arttırdığı,  $Zn^{+2}$ 'in aktiviteyi inhibe ettiği,  $Ca^{+2}$ , Li, K, EDTA'nın ise aktiviteyi etkilemediği görüldü. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazının moleküler ağırlığı 61,96 kDa olarak tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** *Anoxybacillus*, Ribulokinaz, Ekspresyon

Master Thesis

SUMMARY

CLONING, EXPRESSION AND CHARACTERIZATION OF RIBULOKINASE FROM  
*ANOXYBACILLUS KESTANBOLENSIS* AC26 SARI

Müslüm TOKGÖZ

Karadeniz Technical University  
The Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Biology Graduate Program  
Supervisor: Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI  
2013, 41 Pages, 2 Appendix Pages

Ribulokinases (transferase; EC 2.7.1.16) convert L-ribulose to L-ribulose 5 phosphate and D-ribulose to D-ribulose 5 phosphate. The products as a result of reactions catalyzed by this enzyme are used in pentose phosphate pathway.

This study describes the cloning of a ribulokinase gene from *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26 Sari, isolation, and characterization of the gene product. A 1695 nt gene coding for ribulokinase from *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26 Sari sequenced and cloned into pET-28a(+) vector. Vector encoding ribulokinase gene was transformed into *E.coli* BL21 (DE3), expressed and purified. The purified ribulokinase showed optimal activity at 60°C in pH 9. *K<sub>m</sub>* value for D-ribulose was determined to be 0.94 mM. Effects of metal ions (Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Li, K, Zn<sup>2+</sup>), β-mercaptoethanol and EDTA on the enzyme activity were studied. Enzyme activity was increased by Mg<sup>2+</sup> and β-mercaptoethanol, and inhibited by Zn<sup>2+</sup>. In addition, Ca<sup>2+</sup>, Li, K, and EDTA had no effect on the enzyme activity. Molecular mass of *A. kestanbolensis* AC26 Sari ribulokinase was determined to be 61.96 kDa.

**Key words:** *Anoxybacillus*, Ribulokinase, Expression

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Şekil 1. L- arabinozun, D- ksiluloz -5 fosfata dönüştürülmesi .....	6
Şekil 2. Ribulokinazların biyodönüşüm mekanizması.....	7
Şekil 3. İkili enzim metodunda biyodönüşüm mekanizması .....	8
Şekil 4. <i>Bacillus halodurans</i> L-ribulokinaz' ın kurdele modeli. ....	9
Şekil 5. L-ribulozun, ribulokinaz enzimi ile etkileşiminin gösterimi .....	10
Şekil 6. <i>S. cerevisiae</i> 'de L-arabinozdan etanol üretiminin gösterilmesi.....	11
Şekil 7. <i>A. kestanbolensis</i> AC26 Sarı ribulokinaz geninin pGEM-T Easy vektörüne klonlanması.....	21
Şekil 8. <i>A. kestanbolensis</i> AC26 Sarı ribulokinaz geninin pET-28a(+) vektörüne klonlanması.....	23
Şekil 9. <i>A. kestanbolensis</i> AC26 Sarı ribulokinaz geninin, pET-28a(+) vektörü içinde Plasmapper programı kullanılarak gösterilmesi.....	23
Şekil 10. <i>A. kestanbolensis</i> AC26 Sarı ribulokinaz aktivitesinin gösterilmesi .....	24
Şekil 11. <i>A. kestanbolensis</i> AC26 Sarı ribulokinazının SDS-PAGE analizi .....	25
Şekil 12. <i>A. kestanbolensis</i> AC26 Sarı ribulokinazının optimum sıcaklık grafiği.....	26
Şekil 13. <i>A. kestanbolensis</i> AC26 Sarı ribulokinazının optimum pH grafiği. ....	26
Şekil 14. <i>A. kestanbolensis</i> AC26 Sarı ribulokinazının Michaelis-Menten eğrisi.....	27
Şekil 15. <i>A. kestanbolensis</i> AC26 Sarı ribulokinazının ısıl kararlılığı .....	28
Şekil 16. <i>A. kestanbolensis</i> AC26 Sarı ribulokinazının pH kararlılığı .....	29
Şekil 17. <i>A. kestanbolensis</i> AC26 Sarı ribulokinazının substrat spesifikliğı.....	30
Şekil 18. <i>A. kestanbolensis</i> AC26 Sarı ribulokinazına metal iyonları ve kimyasalların etkisi.....	31

## TABLÖLAR DİZİNİ

### Sayfa No

Tablo 1. <i>A. kestanbolensis</i> AC26 Sarı ribulokinaz geninin diğer mikroorganizmalarla % nükleotit benzerliği .....	22
---	----

## SEMBOLLER DİZİNİ

ATP	: Adenozin tri fosfat
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	: Deoxynucleotide Triphosphate
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic Acid
IPTG	: Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
kDa	: Kilodalton
LB	: Luria-Bertani
$\mu$ l	: Mikro Litre
nm	: Nanometre
OD	: Optik Yoğunluk
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RG	: Reverse Giraz
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS- PAGE	: Sodyum dodesil sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TAE	: Tris Asetik Asit EDTA
TE	: Tris-EDTA
Tris	: Tris (hidroksimetil) aminometan
Vmax	: Maksimum hız
X-gal	: 5-bromo-4-chloro-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside

# 1. GENEL BİLGİLER

## 1.1 Giriş

Enzimler, ilk defa 1897' de Buncher kardeşler tarafından canlı hücrelerden elde edilmiştir. Doğal katalizörler olarak işlev görererek hücre içerisinde meydana gelen binlerce tepkimenin hızını ve özgülüğünü belirleyen, büyük çoğunluğu protein yapısında olan ve bütün canlı organizmalarda bulunan makro moleküllerdir (Bahar, 1996).

Enzimler, canlı için yaşamsal önemi olan pek çok fonksiyonun kontrolünde rol alırken, bir yandan da organizmada hemen hemen bütün kimyasal tepkimelere katılarak, oluşumlarını inanılmaz boyutlarda hızlandırır. Katalizledikleri reaksiyonlardan değişmeden çıkarlar. Bu nedenle, her enzim bir biyokatalizördür. Başka bir deyişle, enerji açısından normal koşullarda hiç gerçekleşmeyecek ya da çok yavaş gerçekleşebilecek kimyasal tepkimelere katılarak, kendileri bir değişikliğe uğramadan, bu tepkimelerin çok hızlı bir şekilde gerçekleşmesini sağlarlar. Kuramsal olarak enzimler belli bir tepkimeye girip, bir değişikliğe uğramadan çıktıkları için, sürekli olarak aynı türden tepkimelere katılabilmelidir, ancak gerçekte durum böyle değildir, çünkü enzimlerin de bir ömrü vardır (Sağiroğlu, 1999).

Enzimatik işlemlerin geleneksel işlemlere oranla daha az miktarda atık oluşturarak, daha az çevre kirliliğine yol açması, uygun ve ekonomik şartlarda gerçekleştirilebilmesi, enzim kullanımını daha cazip hale getirmektedir (Gümüşel, 2002).

Ayrıca biyolojik sistemlerde olduğu kadar endüstriyel uygulamalar için de önemli özelliklere sahip olan enzimler, son derece seçici ve verimli olmaları, ılımlı şartlarda çalışmaları ve biyolojik olarak parçalanabilmeleri gibi pek çok avantaja sahiptirler. Bu özellikleri sebebiyle endüstri açısından büyük önem taşımaktadırlar (Sağiroğlu, 1999). Günümüzde enzimler tıp, kimya endüstrisi, gıda, ziraat, tekstil, deri sektörü, birçok endüstriyel malzemenin üretimi ve işlenmesi, çeşitli toksik maddelerin degradasyonu gibi pek çok alanda kullanılmaktadırlar (Karademir vd., 2002; Telefoncu, 1997).

Enzimler bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kaynaklı olabilirler. Bitkisel ve hayvansal enzimlerin endüstriyel ihtiyacı karşılayamaması, bu alandaki ilginin giderek artan bir şekilde mikrobiyal enzimlere yönelmesini sağlamıştır. Hayvansal kaynaklardan enzim üretimi, pahalı olmasının yanında, arz ve talep gibi pazar faktörleri tarafından da

etkilenmektedir. Buna karşılık birçok bitkisel kaynaklı enzim nispeten kolay elde edilebilir. Fakat bitkisel kaynakların da endüstriyel hammadde olarak kullanımları, gıda ihtiyaçlarına bağlıdır. Mikrobiyal enzimler ise büyük çapta üretimi mümkün kılacak yöntemlerle üretilebilirler. Mikroorganizmalar biyokimyasal çeşitlilikleri ve genetik manipülasyonlara uygunluğu gibi sebeplerden dolayı mükemmel bir enzim kaynağı olarak değerlendirilmektedir. Günümüzde endüstride kullanılan enzimlerin yaklaşık % 90'ı mikroorganizmaların fermantasyonu ile üretilmektedir (Grupta vd., 2003).

## **1.2. Termofilik Bakterilerin Genel Özellikleri**

Dünya üzerinde yaşayan canlılar üç ana grup altında toplanmaktadır. Bunlar ökaryotlar, bakteriler ve arkealardır (Trent, 2000).

Bakteriler üreyebildikleri uygun sıcaklıklara göre üç grup altında toplanırlar. Sakrofiller, -10 °C'ye kadar düşük sıcaklıklarda dahi büyüeyebilen optimum büyüme sıcaklıkları 15 °C'den düşük sıcaklıklar olan bakterilerdir. Mezofiller normal ortam sıcaklıklarında (15-50°C) üreyebilen bakterilerdir. Termofiller ise genel olarak 50 °C'nin üzerinde yaşayabilen bakterileri kapsayan gruptur. Termofilik bakterilerin bazı türleri 100 °C'yi aşkın sıcaklıklarda bile yaşayabilirler. Bu bakteriler çok yüksek sıcaklıklarda yaşayabildiklerinden dolayı aşırı termofiller olarak adlandırılırlar. Termofilik bakterilerin optimal büyüme sıcaklıkları 50 °C üstü sıcaklıklar iken, aşırı termofillerde 80 °C üstü sıcaklıklardır.

## **1.3. Termofilik Mikroorganizmaların Yüksek Sıcaklığa Dayanıklılık Mekanizması**

Termofilik bakteriler diğer bakteri gruplarından farklı olarak yüksek sıcaklıklarda hücre ve moleküllerinin fonksiyonel olarak kalmasına izin verecek çeşitli adaptasyonlara sahiptir. Bu adaptasyonlar termofilik bakterilerin DNA yapılarında, protein yapılarında, hücre membran yapılarında ve küçük moleküllerinde olmaktadır.

Yüksek tuz konsantrasyonunun çift zincirli DNA'yı 107 °C'de termal degradasyona karşı koruduğu görülmüştür (Marguet ve Foreterre, 1994). Termofilik bakteriler, hücre içi yüksek tuz konsantrasyonlarına sahiptirler. Ayrıca aşırı termofilik bakterilerin sahip oldukları reverse giraz (RG) enzimi sayesinde DNA'ları pozitif süper sarmallık

kazanmaktadır (Duguet vd., 1995; Forterre vd., 1996). Pozitif süper sarmal DNA, termal denatürasyona karşı daha dirençlidir. Ek olarak DNA'ya bağlanan histon ve histon benzeri proteinler, DNA'nın yüksek sıcaklıklarda çift zincirli yapıda kalmasında etkilidir (Lopez vd., 1999).

Termofilik bakteri proteinlerinde bulunan tuz köprüleri, mezofilik bakteri proteinlerinde bulunan tuz köprülerine oranla oldukça fazladır. Tuz köprüleri sayısındaki artışla proteinlerin termal kararlılıkları doğru orantılıdır (Kumar vd., 2001). Tuz köprüleri sayısındaki artışın yanı sıra termofilik bakteri proteinlerinde yüklü aminoasit (Arg, Lys, His, Asp ve Glu) içeriğinde artış görülürken, denatürasyona sebep olan asparagin ve glutamin içeriğinde azalma görülür (Haney vd., 1999).

Diğer bir adaptasyon ise termofilik bakterilerin hücre membranlarında görülür. Sakrofillerin hücre membranları doymamış yağ asitlerince zengin lipitler içerirken, termofilik hücre membranı doymuş yağ asitlerince zengin lipitler içerir (Özdemir, 2008). Ayrıca mezofilik bakteriler ısıya karşı dirençli olmayan lipit bilayer hücre membranına sahipken hipertermofiller ise yüksek sıcaklıklara karşı erimeye dirençli lipit monolayer hücre membranına sahiptirler (Daniel ve Cowan, 2000).

Bunlara ek olarak, termofilik bakteriler birçok işlem için gerekli olan GTP, ATP ve NAD gibi moleküllerini sıcaklıkta bozulma riskleri nedeniyle kullanacakları zaman sentezlerler (Çanakçı vd., 2003).

#### **1.4. Termofilik Bakterilerin Habitatları**

Termofilik bakterilerin doğal yaşam alanları, dünya üzerinde çok geniş yayılım gösterir. Bunlar termal kaplıcalar, volkanik aktiviteye sahip topraklar ve denizaltı menfezleridir. Özellikle sıcak su kaynaklarında termofilik bakterilere oldukça çok rastlanılır. Termofilik mikroorganizmalar yapay sıcak ortamlarda da bulunabilirler. Ev tipi ya da endüstriyel su ısıtıcılarının sıcaklığı 55 - 80 °C olduğundan buralar termofilik mikroorganizmaların gelişimi için uygun yerlerdir. Elektrik santralleri ve diğer yapay sıcaklık kaynakları termofillerin geliştikleri ortamları oluştururlar.

Termofilik bakterilerin ilk defa 1888 yılında Miquel tarafından izole edilmesini takiben farklı bölgelerden çok sayıda termofilik bakteri izole edilmiştir. İzole edilen bu bakteriler, *Bacillus* ve *Alcyclobacillus* cinsleri altında gruplandırılmış ve özellikle *Bacillus* cinsi tanımlanan termofilik türlerin büyük bir çoğunluğunu içermekteydi. Sonraki yıllarda



moleküler tekniklerin gelişmesiyle beraber *Bacillus* cinsi bakterilerin geniş ve çeşitli grupları yeni cinslere bölünmüştür. Bu cinsler *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Virgibacillus*, *Salibacillus*, *Gracilibacillus*, *Ureibacillus*, *Anoxybacillus*, *Geobacillus* ve son olarak *Aeribacillus*'tur (İnan, 2011).

*Anoxybacillus* cinsi de sıcak su kaynaklarından izole edilerek sistematığe kazandırılmıştır. *Anoxybacillus* cinsi *Bacillus* cinsinden Pikuta vd.,(2000) tarafından ayrılan bir cinstir. Bu cins 19 tür içermektedir. Bu türler; *A. flavithermus*, *A. kestanbolensis*, *A. ayderensis*, *A. pushchinoensis*, *A. voinovkiensis*, *A.gonensis*, *A. bogrovensis*, *A. contaminans*, *A. caldiproteolyticus*, *A. eryuanensis*, *A. mongoliensis*, *A. salavatliensis*, *A. tengchongensis*, *A. tepidamans*, *A. thermarum*, *A. kamchatkensis*, *A. rupiensis* ve *A.karnarcensis*, *A. amylolyticus*'dur.

### 1.5. *Anoxybacillus* Cinsinin Genel Özellikleri

Pikuta vd., (2000) tarafından *Bacillus* cinsinden ayrılarak sistematığe kazandırılan *Anoxybacillus* cinsinin tip türü *A. pushchionensis* K1<sup>T</sup>'dir. *A. pushchionensis* ilk izole edildiğinde bu bakterinin anaerop bir bakteri olduğu düşünüldüğünden ‘anoksi’ eki cins isminin başına getirilerek isimlendirilmiştir. Fakat daha sonra yapılan çalışmalarda bu tip türün tam olarak oksijensiz ortamların yanı sıra, oksijenli ortamlarda da yaşayabildiği anlaşıldığından *Anoxybacillus* cinsininin zorunlu anaerop özelliği, fakültatif anaerop olarak değiştirilmiştir.

*Anoxybacillus* cinsine ait bakteriler genellikle gram pozitif, hareketli veya hareketsiz ve endosporlu olup orta derecede termofilik özelliktedir. *Anoxybacillus* cinsini *Bacillus* cinsinden ayırmada 16S rRNA gen sıraları kullanılmaktadır. 16S rRNA gen analizleri sonucu *Anoxybacillus* cinsinin üyeleri ile *Bacillus* cinsinin üyeleri arasında %95'den daha az benzerlik olduğu görülmektedir. Ancak *Anoxybacillus* cinsinin kendi üyeleri arasındaki benzerlik 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 (İnan, 2011).

*Anoxybacillus* cinsine ait bakterilerin habitatları aşırı sıcak olmayan termal kaplıcalardır. Bunun yanında çamurdan (*A. flavithermus*), gübreden (*A. pushchinoensis*) ve jeotermal topraklardan (*A. amylolyticus*) izole edilen türler de mevcuttur. *A. contaminans* türü ise kontamine olmuş jelatinden izole edilmiştir. Optimum büyüme sıcaklıkları

ortalama 55 °C olan bu bakteriler 37-70 °C arasında hayatta kalabilmektedirler (Dalkıran, 2012).

### **1.6. Termofilik ve Termostabil Enzimler**

Termofilik mikroorganizmaların biyoteknolojik önemleri günden güne artmaktadır. Bu organizmaların hücre bileşenleri termal kararlı olmalarının yanı sıra, aşırı derecede asidik ve alkali şartların denatürasyonuna karşı da dirençlidir (Haki ve Rakshit, 2003).

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

Son zamanlarda bazı termofilik enzimlerin başarıyla saflaştırılması yapılmış, bunun yanı sıra klonlanıp mezofilik konaklarda ekspres edilmiştir. Bu enzimlere örnek olarak, lipazlar, kitinazlar, selülozlar, amilazlar, DNA polimerazlar, ksilanazlar verilebilir.

Termostabil enzimler ise, protein stabilitesinin anlaşılması için model olarak kullanılır. Ayrıca bunların yüksek sıcaklıklarda proses avantajları da bulunmaktadır. Bu duruma örnek verilecek olunursa, organik çözücü içerisindeki kimyasal reaksiyonların hızlarındaki artışın nedeninin yüksek sıcaklıklarda ortam viskozitesindeki azalma ve difüzyon katsayısındaki artışın olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.

Çözünürlüğü düşük olan hidrofobik bileşiklerin olduğu çeşitli işlemlerde, sıcaklığın yükseltilerek çözünürlüğün artırılması ile reaksiyon hızının artması sağlanmaktadır. Ayrıca yüksek sıcaklık, biyolojik hidroliz reaksiyonlarının hızlarını arttırmakta ve kontaminasyon riskini de azaltmaktadır (Enez, 2011).

### **1.7. Operon Kavramı ve Arabinoz Operonu**

Operon genel anlamıyla işlevsel olarak ilişkili genlerin oluşturdukları düzenleyici bir sinyalin ya da promotorun kontrolü altındaki gen kümelerine verilen addır.

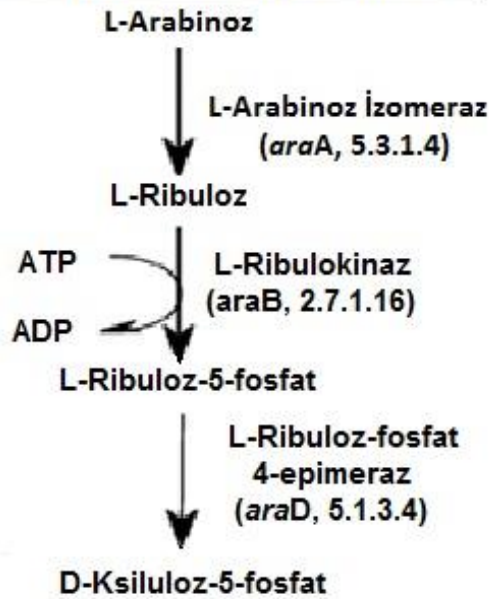
Operon terimi, ilk defa 1960 yılında Proceedings of the French Academy of Science da önerilmiş ve burada operon teorisinden bahsedilmiştir. 1993 yılında bir nematod olan *Caenorhabditis elegans* da var olduğu keşfedilene kadar operonların sadece

prokaryotlarda oldukları düşünülmüştür. Başlangıçta operonlarda tüm genlerin bir tek feedback düzenleme mekanizması yoluyla kontrol edildiği söylenmiştir. Fakat daha sonra farklı operonların farklı mekanizmalara sahip oldukları anlaşılmış ve genel bir düzenleme mekanizmasından bahsetmenin mümkün olmadığı anlaşılmıştır. Açıklanan ilk operon ise *E.coli*' deki *lac* operonu olmuştur. François Jacob, André Michel Lwoff ve Jacques Monod operon ve virüs sentezi ile ilgili buluşlarından dolayı, 1965 yılında Fizyoloji ve Tıp Dalında Nobel Ödülünü kazanmışlardır (URL-1, 2013).

Arabinoz operonu da arabinozun canlıya alınımını sağlayan genleri, operonun regülasyonunu sağlayan genleri ve yapısal genleri içerir. Bu operonun yapısal genleri *araA*, *araB* ve *araD* 'dir. Gen dizilişlerinin farklı organizmalarda farklılıklar göstermesine karşın, tüm organizmalarda görevleri aynıdır. *araA* geni arabinoz izomerazı, *araB* geni ribulokinazı ve *araD* geni de ribuloz-5 fosfat 4 epimerazı kodlar. Bu üç genin çalışması sonucunda ise, arabinozdan ksiluloz-5 fosfat oluşur.

Arabinoz operonun regülasyonunu sağlayan gen, farklı bakterilerde farklı isimlerle adlandırılmıştır. Örneğin, bu gen *E.coli* 'de *araC* olarak adlandırılırken *Bacillus subtilis*'de *araR* olarak adlandırılmıştır ( Schleif, 2010; Sá-Nogueira ve Jaime mota, 1997). Oluşan son ürün olan ksiluloz -5 fosfat ise, pentoz fosfat yoluna dahil olur (Agarwal vd., 2011).

### **L-Arabinozun Parçalanması**



Şekil 1. L- arabinozun, D- ksiluloz -5 fosfata dönüştürülmesi (Manjasetty ve Chance, 2006).

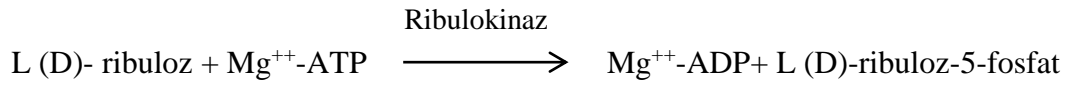
### 1.8. Transferazlar ve Ribulokinazlar

Transferazlar, bir molekülden başka bir moleküle bir fonksiyonel grubu (örneğin metil veya fosfat grubunu) transfer eden enzimlerdir ve gerçekleştirdikleri reaksiyonlara göre alt sınıflara ayrılırlar.

1. EC 2.1 Bir karbonlu gruplar aktaran enzimleri içerir.
2. EC 2.2 Aldehit ya da keton gruplarını aktaran enzimleri içerir.
3. EC 2.3 Asil grupları aktaran enzimleri içerir.
4. EC 2.4 Glikozil grupları aktaran enzimleri içerir.
5. EC 2.5 Metil grubu haricindeki alkil ve aril gruplarını aktaran enzimleri içerir.
6. EC 2.6 Azotlu gruplar aktaran enzimleri içerir.
7. EC 2.7 Fosforlu gruplar aktaran enzimleri içerir.
8. EC 2.8 Kükürtlü gruplar aktaran enzimleri içerir.
9. EC 2.9 Selenyumlu gruplar aktaran enzimleri içerir.

Ribulokinaz enzimi bu gruplardan EC 2.7 fosforlu gruplar aktaran enzimler içinde yer alır; L-ribulokinaz EC 2.7.1.16, D-ribulokinaz EC 2.7.1.47 şeklinde numaralandırılmıştır.

Ribulokinaz enziminin substratları D-ribuloz, L- ribuloz ve ATP 'dir.



Şekil 2. Ribulokinazların biyodönüşüm mekanizması (Agarwal vd., 2011).

Ribulokinaz enzimi, diğer kinaz enzimlerinden farklıdır çünkü ribulokinaz 2-ketopentoz olan D-ribuloz, L-ribuloz, D-ksiluloz ve L-ksilulozu hemen hemen aynı  $k_{cat}$  değeriyle fosforlar (Lee vd., 2001).

## 1.9. Ribulokinaz Aktivite Tayin Yöntemleri

Ksilulokinaz ve ribulokinaz aktivite tayin metodları birbirleri yerine kullanılabilir. Bu iki enzim için bu zamana kadar iki tip aktivite tayin metodu geliştirilmiştir.

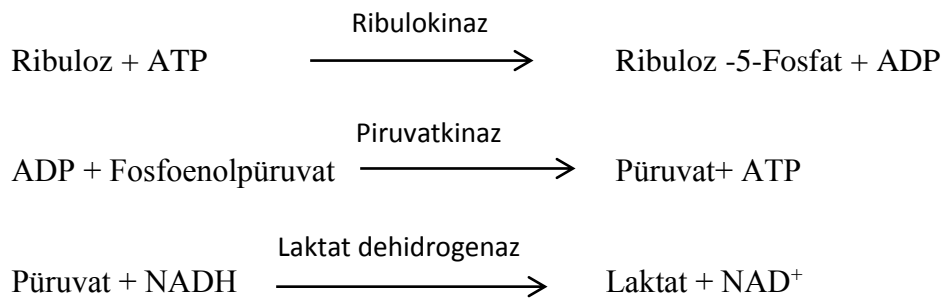
Bu iki metod sistein- karbozol ve ikili enzim metodlarıdır (Shamanna ve Sanderson, 1979).

### 1.9.1. Sistein-Karbozol Metodu

Dische ve Borenfreund (1951) tarafından geliştirilen bu metot, ortamda azalan ribuloz miktarının spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanır. Azalan ribuloz miktarı spektrofotometrede 540 nm'de ölçülerek bulunur.

### 1.9.2. İkili Enzim Metodu

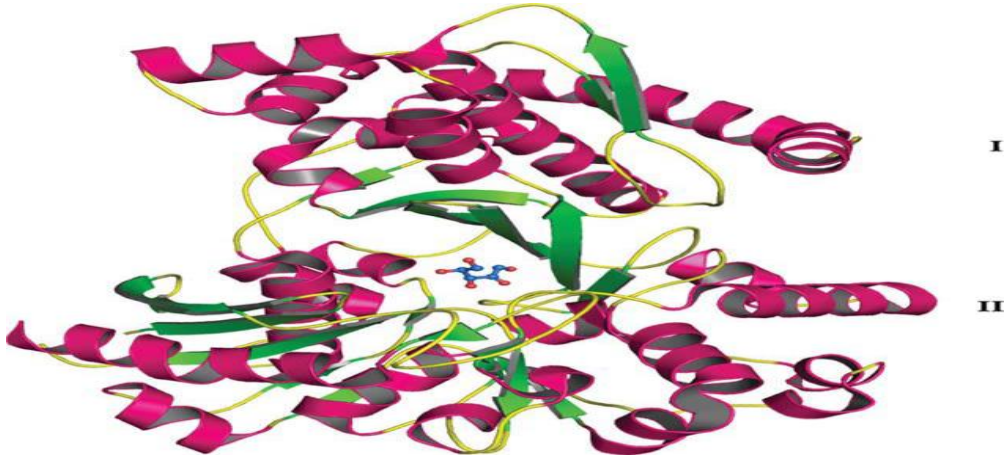
Bu metotta ise kinaz (ribulokinaz, ksilulokinaz) enziminin yanı sıra piruvat kinaz ve laktat dehidrogenaz enzimleri de kullanılır. Son reaksiyon basamağında gerçekleşen NADH'nin NAD<sup>+</sup> a dönüşümünde oluşan NAD<sup>+</sup>'ın ölçümüne dayanılarak yapılan bu yöntemde spektrofotometrede 340 nm'de ölçüm yapılır.



Şekil 3. İkili enzim metodunda biyodönüşüm mekanizması

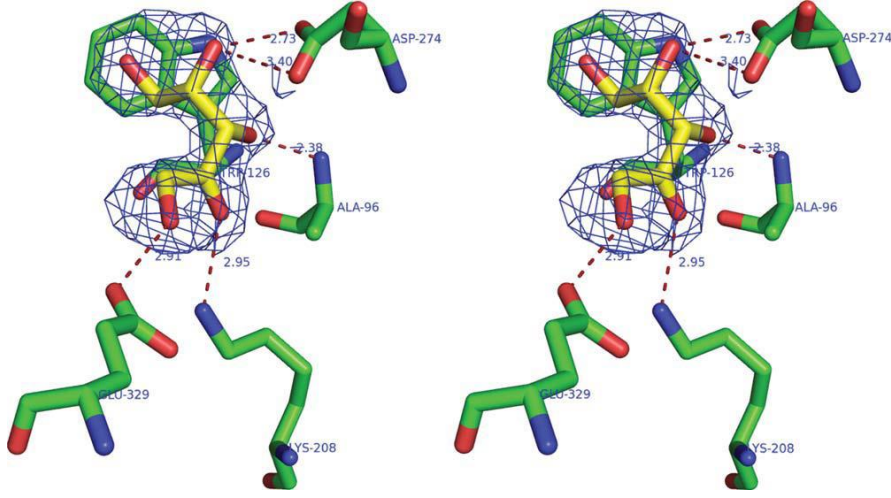
### 1.10. Ribulokinaz- Substrat Etkileşimi

Ribulokinazlar, şeker kinazlar familyasına ait proteinlerdir. Yapısal olarak bu familya üyeleri iki domainden (domain I ve domain II) oluşmaktadır. Bu iki domain birbirinden aktif bölgeyi oluşturan yarıkla ayrılmışlardır. Genellikle bu protein ailesi üyeleri ATP'ye bağlanır ve  $\gamma$ - fosfat grubunun hidrolizini katalizler ya da şeker hidroksil grubu gibi bir substrat transferini sağlar. Kataliz, substrat bağlanmasıyla indüklenen bir domainin birleşmesiyle devam eder. Bu yapı maya hekzokinaz mekanizmasının indüklenmesiyle uyum gösterir. Fosfat transferi, yüksek oranda korunmuş iki aspartat amino asiti tarafından başlatılır. Aspartatlardan biri domain I'in N terminalinde bulunur ve ATP bağımlı  $Mg^{+2}$  ile bağlantı kurar. Bu özellik bu familya üyeleri arasında değişmeyen ve onlara ait belirleyici bir özelliktir (Di Luccio vd., 2007).



Şekil 4. *Bacillus halodurans* L-ribulokinaz'ın kurdele modeli. L-ribuloz boşluğun orta kısmında mavi renkli top ve çubuk modeli ile gösterilmektedir. Küçük ve büyük domainler I ve II olarak gösterilmiştir (Agarwal vd., 2011).

Ribulokinaz enzimi, substratları olan L- ve D- ribulozu 5. karbonlarından fosforlar. X- ray analizine göre, L- ribuloz domainler arasında bulunan boşluğa bağlanır ve ilk önce domain II ile etkileşim kurar. L-ribulozdaki 5 oksijen atomunun 4'ü (O1, O2, O3 ve O4) domain II'nin korunmuş aminoasitleriyle hidrojen bağı yapar. Domain II' deki bu korunmuş aminoasitler, Glu329, Lys208, Ala96 ve Asp274'dür. Substratın alifatik zincir bölümüyle domain I'de bulunan Trp126'nın  $\pi$  elektron bulutu etkileşir (Agarwal vd., 2011).



Şekil 5. L-ribulozun, ribulokinaz enzimi ile etkileşiminin gösterimi (Agarwal vd., 2011).

Ribulokinaz enzimi, diğer kinaz enzimlerinden farklıdır çünkü ribulokinaz 2-ketopentoz olan D-ribuloz, L-ribuloz, D-ksiluloz ve L-ksilulozu hemen hemen aynı  $k_{cat}$  değeriyle fosforlar (Lee vd., 2001).

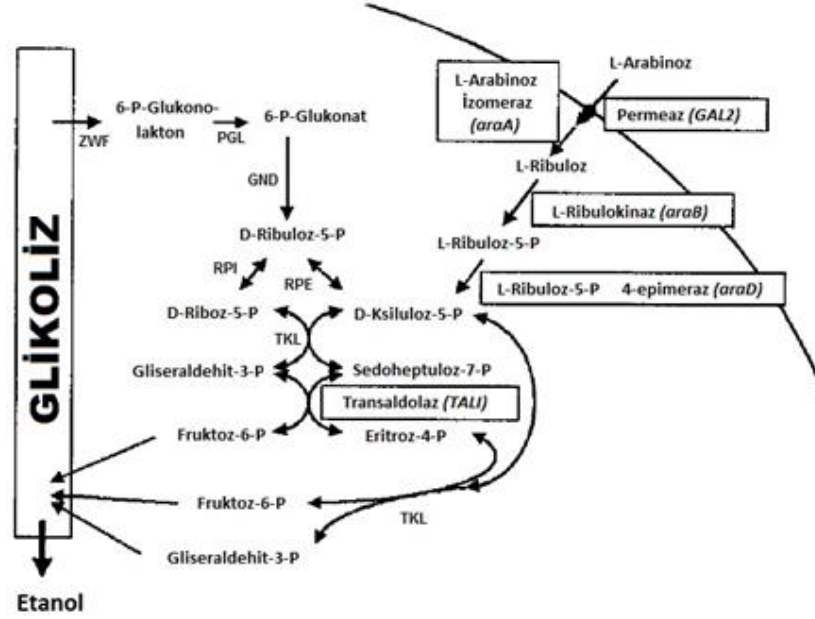
Ribulokinazlarla bazı diğer kinazların aktif bölgeleri kıyaslandığında ksilulokinazlarla benzer büyüklükte oldukları, gliserol kinazdan ise daha büyük oldukları belirlenmiştir. Bu bakımdan ribulokinazların aktif bölgesinin geniş substrat seçiciliği bakımından uygun oldukları belirlenmiştir (Agarwal vd., 2011).

### 1.11. Ribulokinazın Metabolik ve Endüstriyel Önemi

Ribulokinaz enzimlerinin birçok metabolik yolda yer aldığı görülmektedir. Ribulokinaz enzimi metabolik olarak Pentoz Fosfat Yolu dışında Pentoz-Glukoronat dönüşümünde, B6 vitamini metabolizmasında ve riboflavin metabolizmaları ara basamaklarında yer almaktadır (URL-2, 2013).

Ribulokinaz enzimi, endüstriyel açıdan pek kullanılmamasına karşın günümüzde farklı metabolik yollardan etanol üretiminin hedeflendiği çalışmalar içinde yer almaktadır. Becker ve Boles (2003)'un yaptıkları çalışmada, *Saccharomyces cerevisiae*'de arabinoz kullanarak etanol üretmeyi sağlamışlardır. *Saccharomyces cerevisiae*'nin arabinozlu ortamda büyüterek etanol üretmesi için ortamda L-ribulokinazın bulunmasının gerekli

olduğu saptanmıştır. Ancak ortamda L-ribulokinazın aşırı derecede bulunmasının ise *Saccharomyces cerevisiae*'nin büyümesini yavaşlatarak etanol üretiminin azalmasına neden olduğu da belirtilmiştir.



Şekil 6. *S. cerevisiae*'de L-arabinozdan etanol üretiminin gösterilmesi (Becker ve Boles, 2003).

### 1.12. Tezin Amacı ve Önemi

Yapılan literatür incelemelerinde ribulokinaz enzimi ile ilgili çalışmaların tamamının mezofilik bakteri kaynaklı olduğu görülmekle birlikte henüz termofilik bir bakteriden bu enzim karakterize edilememiştir. Ayrıca ülkemizde de henüz bu enzimle ilgili hiçbir çalışma yoktur. Bu çalışmada, termofilik bir bakteri olan *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26 Sarı suşunun ribulokinazı klonlanıp, ekspres edildikten sonra saflaştırılmış ve enzimin karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Termofilik bakteri kökenli bir ribulokinaz enzimi, yapılan bu tez kapsamında ilk defa karakterize edilmiştir.



## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Kullanılan Kimyasallar

Tripton (Merck V441613949), Yeast ekstrakt (Merck VM175053), NaCl (Merck K34243404), Etil alkol, Kanamisin (Applichem A1493), IPTG (Applichem A1008), Amfisilin (Applichem A0839), *NheI* (Promega), *E.coRI* (Promega), *HindIII* (Promega), T4 DNA ligaz (NEB), Taq DNA polimeraz (Promega), Genomik DNA İzolasyon Kiti (Promega A1125), Jelden DNA Çıkarma Kiti (Fermentas K0513), EDTA (Merck 84211000), dNTP seti (Promega), pGEM-T Easy Klonlama Vektörü (Promega A1360), pET-28a(+) Ekspresyon Vektörü (İnvitrogen), CaCl<sub>2</sub> (Aktar Kimya), X-Gal (Applichem A10070005), Commassie Brilliant Blue G-250, Commassie Brilliant Blue R-250 (Merck 2C2133453), Etanol, Fosforik Asit (Merck 563.2500), BSA (NEB), Sodyum Asetat (Merck TA867065), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck A678671), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck 567300), Trizma Baz (Sigma T1503), Akrilamid (Sigma A8887), Bis-akrilamid (Promega), Bromofenol mavisi (Gerbu 080702), Ba(OH)<sub>2</sub> (Sigma B4059), ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (JT. Baker 4382), Mg(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (Sigma M5661), β-merkaptoetanol (Merck 805740), Metanol (JT. Baker 8405), Asetik asit (Sigma 27225), Gliserol (Merck K40789992008), Amonyom sülfat (Merck A734116), TEMED (Janssen Chimica), Protein markır (Biolab), KCl (Merck 104936), MgCl<sub>2</sub> (Sigma 63063), CaCl<sub>2</sub> (Aktar Kimya), LiCl (Sigma L0505), L-sistein (Merck 2470), Carbazol (Sigma C5132), Sülfirik asit (Merck 1-00731), D- Ribuloz (O micron RBU-004), L-Ribuloz (Carbosynth MR03777091), D ve L- Ksiluloz (Carbosynth MX079321001).

### 2.2. Kullanılan Hücreler

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

## 2.3. Moleküler Çalışmalar

### 2.3.1. Genomik DNA İzolasyonu

*A. kestanbolensis* AC26 Sarı'ya ait genomik DNA bakterinin LB besiyerinde bir gece 55°C'de inkübe edilmesinin ardından Promega Genomik DNA İzolasyon Kiti kullanılarak izole edildi. Elde edilen sıvı kültürler 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve hücreler 13.000 rpm'de 3-4 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatant kısımları dökülerek pellet kısımları alındı. Pellet üzerine, 480 µl EDTA ilave edildi. 10 mg/ml'lik konsantrasyondaki lizozimden 120 µl ilave edildikten sonra pipetlenmek suretiyle karıştırıldı ve ardından 37°C'de 60 dk inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj yapıldı. Pellet üzerine 600 µl *Nuclei Lyzsis* solüsyonu ilave edilerek pipetleme ile çözüldü. Ardından 80°C'de 5 dk inkübasyondan sonra oda sıcaklığına kadar soğutulularak 3 µl *RNase* solüsyonu eklendi. Tüp 2-5 kez alt üst edildikten sonra 37°C'de 30 dk inkübe edildi. Ardından 200 µl *Protein Precipitation* solüsyonu eklenip 20 sn vortekslemenin ardından 5 dk buzda bekletildi. Bu süre sonunda 13.000 rpm'de 3 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant ayrı bir mikrosantrifüj tüpüne alınıp üzerine 600 µl izopropanol eklendi. Pellet oluşuncaya kadar alt üst edilmesinden sonra 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatant döküldü ve kurutma kağıdı ile tüm süpernatant uzaklaştırıldı. Pelletin üzerine 600 µl, oda sıcaklığında %70'lik etanol eklenip alt üst edildikten sonra 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra etanolün tamamen uzaklaştırılması için mikrosantrifüj tüpü 15 dk 37°C'de bekletildi. Etanolün tamamen uzaklaştırıldığından emin olunduktan sonra pellet üzerine 100 µl *DNA Rehydration* solüsyonu eklendi ve 65°C'de 1 saat inkübe edildi. Elde edilen genomik DNA kullanılacağı zamana kadar +4°C'de saklandı.

### 2.3.2. Primer Sentezi

*A. kestanbolensis* AC26 Sarı suşunun ribulokinaz genini ortaya çıkarmak için RbikR ve RibkF primerleri dizayn edildi. Bu primerler, Genbank'da bulunan *Anoxybacillus flavithermus* WK1'e ait ribulokinaz geni baz alınarak, ribulokinaz genini direkt olarak pET-28a(+) ekspresyon vektörüne klonlanabilecek şekilde dizayn edildi. Primerler dizayn edilirken, ribulokinaz gen bölgesi içerisinde kesim bölgesi olmayan fakat pET-28a(+)

ekspresyon vektörünün çoklu klonlama bölgesinde kesim bölgesi bulunan *NheI* ve *HindIII* restriksiyon enzimlerinin kesim bölgelerini de içermesi göz önünde bulunduruldu. *NheI* ve *HindIII* restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleri içerecek şekilde dizayn edilen primerlerin sıraları şu şekildedir:

RbikR-5'-CAA gCT TAA TCA CgA TAA ACT TAT AgA TTT TTT C-3' 33 nt  
 RibkF 5'- CgC TAg CAT ggg gAA AAA gTA TgT CAT Tgg-3' 30 nt

### 2.3.3. Ribulokinaz Geninin PCR Yöntemi ile Belirlenmesi

RbikR ve RibkF primerleri ile *A. kestanolensis* AC26Sarı'nın genomik DNA'sı kalıp olarak kullanılarak, PCR reaksiyonları gerçekleştirildi. PCR şartları şu şekilde oluşturuldu: 95 °C'de 2 dakikalık deanaturasyon basamağının ardından 36 döngü 94°C'de 1 dakika denaturasyon, 55°C'de 1,5 dakika bağlanma (annealing) ve 72°C'de 2 dakika uzama (extention) ve son olarak da 72°C'de 5 dakika olacak şekilde son uzamaya tabi tutularak gerçekleştirildi. PCR sonucunda oluşan DNA fragmentleri, 0,5 µg/ml etidyum bromür ihtiva eden % 0,7'lik agaroz jelde yürütülerek BioDocAnalyze jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi. PCR reaksiyonu ile çoğaltılan gen bölgesi, pGEM-T Easy Klonlama Kiti kullanılarak pGEM-T Easy kolanlama vektörüne, firmanın öngördüğü şartlarda (5 µl 2X tampon, 1 µl pGEM-T Easy vektör, 3 µl PCR ürünü ve 1 µl T4 DNA Ligaz) 16 °C'de bir gece boyunca ligasyon işlemi gerçekleştirildi. Ertesi gün elde edilen ligasyon ürünü, kompotent olarak hazırlanan *E. coli* JM101 hücresine CaCl<sub>2</sub> metoduyla transforme edildi. Transformasyon işlemi şu şekilde gerçekleştirildi: 200 µl kompotent hücre içeren tüpe 10 µl ligasyon ürünü eklendi ve tüp, 30 dakika buz içinde bekletildi. İnkübasyon sonrasında daha önceden hazırlanan 42°C ısıtıcı blokta 2 dakika bekletilerek plazmidin hücre içine girmesi sağlandıktan sonra her bir tüpe 200 µl LB besiyeri eklendi. Tüpler 37°C'de iki saat bekletildikten sonra LBA petrilere (50 µg/ml amfisilin içeren) yayılarak 37°C'de 1 gece inkübe edildi. Ayrıca amfisilin içeren bu LBA petrilere, X-gal ve IPTG sürüldü ve mavi-beyaz koloni oluşması sağlandı. Transformasyon sonunda oluşan kolonilerden rekombinant plazmitler, Maniatis vd. (1982) geliştirdiği plazmit izolasyon yöntemine göre izole edildi ve agaroz jelde yürütüldü. Agaroz jelde daha ağır olan ve bu yüzden de kontrol vektör plazmitine göre daha yavaş yürüyen plazmitler seçilerek, *EcoRI* restriksiyon enzimiyle kesildi ve kesim sonuçları agaroz jelde kontrol edildi. *EcoRI* kesim şartları; 1X enzim tamponu içerisinde, 3 U enzim varlığında 37°C'de 2 saat boyunca

gerçekleştirildi. Bu şekilde doğruluğu teyit edilen klonların baz dizini, otomatik dizi analizatörleri aracılığı ile (Macrogen, Hollanda) belirlendi. Sekans sonuçları Genbank'taki (NCBI, NIH, Washington, DC) verilerle karşılaştırıldı ve bu sekansın ribulokinaz genine ait olduğu tespit edildi.

#### **2.3.4. Ribulokinaz Geninin pET-28a(+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması**

PCR ürününün, sekans sonuçlarıyla ribulokinaz genine ait olduğu kesinleştirildikten sonra, daha önce bahsi geçen ekspresyon primerleriyle tekrar PCR gerçekleştirilerek gen bölgesi çoğaltıldı. Oluşan PCR ürünü *NheI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleriyle kesildi. Aynı şekilde pET-28a(+) ekspresyon vektörü de aynı enzimlerle kesildi. Kesilmiş PCR ürünü ve kesilmiş pET-28a(+) vektörü %0,7'lik agaroz jelde yürütüldü, kesim ürünü oluşan PCR ve pET-28a(+) vektör DNA'ları jelden kesilip alındı ve Jelden Çıkarma Kiti (Fermentas) ile temizlendi. Temizlenen PCR ürünü ve pET-28a(+) vektörü, DNA ligaz enzimleriyle ligasyon yapıldı. Elde edilen ligasyon ürünü önce *E. coli* JM101 hücresine CaCl<sub>2</sub> metoduyla transforme edildi. pET-28a(+) da kanamisin direnç geni olduğu için transformasyondan sonra hücreler 1 mg/ml içeren LBA'lı petriye yayıldı ve 37 °C'de bir gece büyütüldü. Transformasyon sonucu oluşan kolonilerden plazmit izolasyonları gerçekleştirildi ve doğru klon seçilmeye çalışıldı. Elde edilen doğru klonlu plazmit, *E. coli* BL21 (DE3) pLysS hücresine transforme edildi. Klonlama sonucunda enzim aktivitesi olup olmadığını kontrol etmek için ribulokinaz geni transforme edilmiş *E. coli* BL21' den enzim izolasyonu yapılarak ribulokinaz aktivitesi kontrol edildi. Ribulokinaz aktivitesi görüldükten sonra enzim çalışmalarına başlandı.

#### **2.4. Gen Ürününün Elde Edilmesi ve Saflaştırılması**

##### **2.4.1. Ribulokinaz Aktivitesinin Ölçümü**

Ribulokinaz aktivitesi, Neuberger ve arkadaşlarının (1981) yaptıkları yöntemin değiştirilmesiyle belirlendi. Buna göre 50 mM Tris-HCl (pH 7,9), 20 mM magnezyum asetat, 10 mM KF, 12 mM ATP, 3 mM ribuloz, 10 mM β-merkaptotetanaol ve 10 µl enzim son hacim 200 µl olacak şekilde mikro santrifüj tüpüne konuldu. Santrifüj tüpü,

reaksiyonun gerçekleşmesi için 65 °C'de 20 dk ısıtıcı blokta bekletildi. Bu süre sonunda santrifüj tüpüne reaksiyonu durdurması için %5'lik 300 µl ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O çözeltisi ve oluşan ribuloz-5-fosfatların da çöktürülmesi için de 0,1M Ba(OH)<sub>2</sub>' den 300 µl eklendi ve 13.000 rpm'de 3 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüjden sonra ayrı bir mikro santrifüj tüpüne, süpernatantdan 200 µl alındı ve üzerine 40 µl %1,5' lik sistein, 40 µl %0,12' lik karbozol ve 900 µl %70'lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eklenerek vortekslendi. Karışım 20 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İçinde ribulokinaz olmayan reaksiyon koyu renk verirken, ribulokinaz içeren reaksiyon sonucunda renk açılması görüldü. Ölçümler 540 nm dalga boyunda gerçekleştirildi.

Reaksiyonun gerçekleştirildiği tüm koşullar (reaksiyon sıcaklığı, reaksiyon pH'sı, enzim miktarı) enzim karakterize edildikçe yeniden düzenlenmiştir ve karakterizasyon çalışmalarının hepsinde azalan ribuloz miktarı ölçülmüştür.

#### **2.4.2. Hücre Üretimi**

Ribulokinaz genini içeren koloniden 50 µg/ml kanamisin içeren 50 ml LB'ye ekilerek gece boyu büyümeye bırakıldı ve oluşan kültürün optik yoğunluğu ölçüldü. Bu kültür kullanılarak, 2 L 50 µg/ml kanamisin içeren LB'ye optik yoğunluğu 0,1 olacak şekilde tekrar ekim yapıldı. Kültürün optik yoğunluğu 0,6-0,9 olduktan sonra son hacimde 1 mM IPTG olacak şekilde, IPTG eklenerek enzim üretimi indüklendi. İndükleme yapıldıktan sonra kültür yaklaşık 4 saat daha büyütüldü. Büyütülen hücreler 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek çöktürüldü.

#### **2.4.3. Hücre Ekstraktının Elde Edilmesi**

Elde edilen pellet, fosfat (pH 8) tamponunda çözülerek %70 şiddetinde, 0,6 devirde 5 dk Sartorius Labsonic sonikatör ile sonike edildi. Elde edilen hücre solüsyonu, 14.800 rpm'de 15 dk boyunca santrifüj edildi. Pellet kısmı atılarak süpernatant alındı. Elde edilen süpernatantın saflaştırılması aşamasına geçildi.

## **2.4.4. Ribulokinazın Saflaştırılması**

### **2.4.4.1. Isı Şoku Uygulaması**

Elde edilen kaba ekstrat 15 dk süreyle 65 °C’de bekletildi. Bekletmenin ardından, 15 dk 14800 rpm’de santrifüj yapıldı. Süpernant alındı, çöken kısım uzaklaştırıldı. Enzimin aktivitesini koruduğundan emin olmak için süpernatanttan, ribulokinaz aktivitesine bakıldı.

### **2.4.4.2 Ni-Affinite Kromotografi Yöntemi ile Saflaştırma**

Ribulokinazın saflaştırılması, N-terminaline ilave edilen HisTag kuyruğundan yararlanılarak nikel içeren bir saflaştırma kiti olan HisLink™ Protein Purification Resin (Promega) sayesinde gerçekleştirildi. Saflaştırma için, Nikel bağlama tamponu (Ni-Binding Buffer; 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl, 5mM β-merkaptotetanol); Nikel yıkama tamponu (Ni-Washing Buffer; 20 mM Tris-HCl pH:7,5, 200 mM NaCl, 5mM β-merkaptotetanol, 20 mM imidazol) ve Nikel-elüsyon tamponu (Ni Elution Buffer; 20 mM Tris-HCl pH:7,5, 200 mM NaCl, 5mM β-merkaptotetanol, 500 mM imidazol ) çözeltileri kullanıldı. Hazırlanan Nikel bağlama tamponundan 5 ml kolondan geçirildi ve kolona Nikelin bağlanması sağlandı. Ardından Nikel yıkama tamponu ve ısı şoku ile kısmi olarak saflaştırılan enzim solüsyonu (10 ml tampon ve 5 ml enzim) 2 kez kolondan geçirildi. Bu basamakta HisTag kuyruğuna sahip olan ribulokinaz, nikel afinitesi ile kolona bağlanırken diğer proteinlerin kolondan ayrılması sağlandı. Daha sonra, enzim içermeyen Nikel yıkama tamponu (15 ml) kolondan geçirildi ve kolondan istenmeyen proteinler uzaklaştırıldı. Nikel yıkama tamponunu takiben, elüsyon tamponundan her seferde 2 ml kolondan geçirildi ve ayrı ayrı tüplere alındı. Elüsyon tamponunda bulunan imidazol ile HisTag kuyruğuna sahip olan protein nikelden ayrıldı ve kolondan alındı. Tüplerdeki enzimler ayrı ayrı protein boyası ile test edildi. Enzimin en aktif olduğu tüplerden enzimler alındı.

#### 2.4.5. Protein Konsantrasyonu Tayini

Protein konsantrasyonu tayini Bradford'un (1976) yılında geliştirdiği yönteme göre yapıldı. 100 ml boya çözeltisi hazırlanırken 10 mg Commassie Brilliant Blue G-250 boyası önce 5 ml % 95'lik etanol içinde iyice çözülerek, üzerine 10 ml %85'lik fosforik asit eklendi. Daha sonra oluşan karışım saf su ile 100 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti karanlık bir yerde filtre kağıdı ile filtre edildi. Bu boya ile ilk olarak BSA (Bovin Serum Albumin) kullanılarak 595 nm dalga boyunda protein konsantrasyonu standardı grafiği oluşturuldu. Standart grafik için 1,2, 4, 6,10, 15, 20, 40, 60, 80 µg BSA içeren çözeltiler 0,15 M NaCl ile 100 µl'ye tamamlandı. Her bir örneğin üzerine 5 ml hazırlanan Commassie Brilliant Blue G-250 boyasından eklendi. Protein ve boya karışımları vortekslendi ve oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. Standart grafik oluşturulduktan sonra, örneklerin ölçümü yapılırken değişik miktarlarda örnek 0,15 M NaCl ile 100 µl'ye tamamlandı ve üzerine 5 ml boya eklendi. Protein ve boya karışımı vortekslendikten sonra oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. Süre sonunda standart grafiğin yüklendiği Agilent 8453E UV-Visible Spectroscopy System cihazı kullanılarak 595 nm'de ölçümler yapıldı ve protein konsantrasyonu µg/µl cinsinden hesaplandı.

#### 2.4.6. SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi

Protein jel elektrofrezleri Hoeffler SE 600 marka elektrofrez ünitesinde % 10'luk poliakrilamid jel kullanılarak 18 mA'lik akım altında gerçekleştirildi. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazın moleküler ağırlığını belirlemek için saf ribulokinaz, moleküler ağırlığı belli olan bir protein markırı ile SDS PAGE'e tabi tutuldu. Her bir örnekten 50 µg protein (saf enzim, kaba ekstrakt, negatif, protein marker) kullanıldı. Örneklerin üzerine eşit miktarlarda muamele tamponu (0,15 M Tris-HCl pH 6,8; % 4 SDS; %20 Gliserol; % 6 β-merkaptolanol) ilave edildi ve 99°C'de 4 dakika bekletilerek Maniatis vd., (1982) tarafından tanımlanan %10'luk SDS PAGE'e yüklendi ve 18 mA akım altında elektrofrez tabi tutuldu. Yürütme işlemi sonrasında jel, Commassie Brilliant Blue (% 0,125 Commassie Brilliant Blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit) boyası ile 1 saat boyandı. Ardından 1. yıkama solüsyonunda (%50 Metanol, % 10 Asetik Asit %40 ddH<sub>2</sub>O)

1 saat ve 2. yıkama solusyonunda ( %7 asetik asit ve %5 metanol) bantlar belirginleşinceye kadar bekletildi. Jel görüntüsü bilgisayar ortamına dijital olarak kaydedildi.

## **2.5. Ribulokinazın Karakterizasyonu**

### **2.5.1. Optimum Sıcaklık**

*A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazın en iyi çalıştığı optimum sıcaklık değeri 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80°C'ye ayarlanmış ısıtıcı bloklarda gerçekleştirilen seri reaksiyonlar sonucu belirlendi. Bu reaksiyon serisinde enzimin en iyi çalıştığı sıcaklık değeri sonraki çalışmalarda inkübasyon sıcaklığı olarak kullanıldı.

### **2.5.2. Optimum pH**

*A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinaz aktivitesine pH'nın etkisini incelemek üzere pH 5,0- 5,5 için 50 mM asetat tamponu, pH 6,0- 6,5- 7- 7,5 için 50 mM fosfat tamponu, pH 8,0- 8,5- 9,0 için 50 mM Tris-HCl ve pH 9,5- 10 için glisin tamponları kullanıldı ve reaksiyon optimum sıcaklık olan 60 °C'de gerçekleştirildi.

Belirlenen optimum pH aktivite değerleri daha sonra yapılacak kinetik parametrelerin belirlenmesi çalışmalarında kullanıldı.

### **2.5.3. Enzim Kinetiği**

*A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazının kinetik verilerini hesaplamak için spektrofometrede hazırlanan D-ribuloz standardı kullanıldı. Reaksiyonlar farklı substrat konsantrasyonları ve 4 µl enzim varlığında, 60 °C'de gerçekleştirildi. Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ) ve maksimum hız ( $V_{max}$ ) değerleri belirlendi (Lineweaver ve Burk, 1934). Michaelis-Menten grafiği çizilerek yapılacak olan çalışmalarda kullanılacak substrat konsantrasyonu belirlendi.



#### 2.5.4. Metal İyonları ve Kimyasalların Ribulokinaz Aktivitesi Üzerine Etkileri

*A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinaz aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi 60 °C’de enzim reaksiyonunun içerisinde 1 mM’lık MgCl<sub>2</sub>, KF, FeSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, LiCl ve KCl, gibi çeşitli metal iyonları, EDTA ve β-merkaptolanol kimyasalları ilave edilerek belirlendi. İçerisinde metal iyonu ve kimyasal bulundurmayan kontrol reaksiyonunun aktivitesi %100 olarak kabul edildi.

#### 2.5.5. Isıl Kararlılığı

*A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazın kararlılığına ısının etkisini incelemek amacıyla, saflaştırılan enzim belirli zaman aralıklarında (0.dk, 30.dk, 60.dk, 90.dk, 120.dk, 150.dk, 180.dk, 210.dk.) 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C 75 °C ve 80 °C ‘de inkübe edildi. 30 dk aralıklarla gerçekleştirilen reaksiyonlar spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda ölçüldü.

#### 2.5.6. pH Kararlılığı

*A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazın pH kararlılığını belirlemek için saf enzim özütü, pH 5-5,5 asetat tamponu (200 mM); pH 6-6,5-7-7,5 fosfat tamponu; pH 8-8,5-9 Tris-HCl tamponu ve pH 9,5-10 için glisin (200 mM) tamponlarında 60°C’de inkübe edildi. Çeşitli zaman aralıklarında inkübe edilen enzimlerden alınarak optimum çalışma şartlarında aktivite ölçümü yapıldı ve enzimin kalan aktivitesi hesaplandı. İlk anda alınan aktivite ölçümü % 100 olarak kabul edildi.

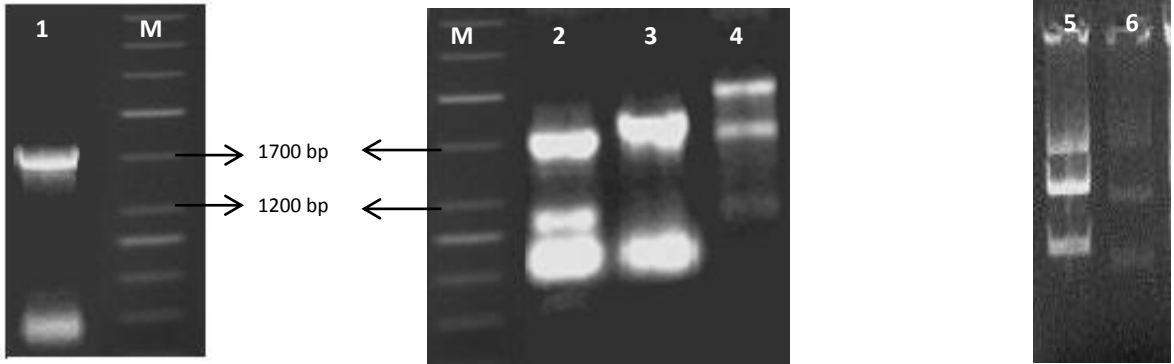
#### 2.5.7. Substrat Spesifikliği

*A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazının substrat spesifikliğini incelemek için D-ribuloz, L- ribuloz, D-ksiluloz ve L-ksiluloz şekerleri substrat olarak kullanıldı. Optimum reaksiyon şartlarında bu enzimin farklı şekerler üzerindeki etkisi belirlendi.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26 Sarı Ribulokinaz Geninin Baz Diziliminin Belirlenmesi

*A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazını kodlayan geni belirlemek amacıyla, bu bakterinin genomik DNA'sı kalıp olarak kullanılarak RibkF ve RbikR primerleri ile PCR gerçekleştirildi. PCR sonuçları 0,5 mg/ml etidyum bromür içeren % 1,0'lik agaroz jelde yürütüldü ve sonuçlar BioDocAnalyze Jel Görüntüleme Sisteminde görüntülendi. PCR sonucu elde edilen DNA bölgesi pGEM-T Easy klonlama vektörüne klonlandı. Klonlama sonunda oluşan kolonilerden plazmit izolasyonu yapıldı. Klon olduğu düşünülen plazmitlerin sekans sonuçları Genbank'taki (NCBI, NIH, Washington, DC) verilerle karşılaştırıldı ve elde edilen DNA bölgesinin 1695 nt'lik ribulokinaz geni olduğu tespit edildi. Elde edilen baz dizini Ek.1' de verilmiştir. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinaz geninin diğer mikroorganizmalara % benzerliği Tablo 1 'de verilmiştir.



Şekil 7. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinaz geninin pGEM-T Easy vektörüne klonlanması. M) Markır, 1) *A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinaz geni, 2) PCR ile çoğaltılan ribulokinaz geninin *EcoRI* ile kesimi 3) PCR ile çoğaltılan ribulokinaz geninin kesilmemiş hali 4) Ribulokinaz genini içeren pGEM-T Easy vektörünün *EcoRI* ile kesimi 5) Ribulokinaz genini içeren pGEM-T Easy vektörü 6) Klonlama yapılmamış olan pGEM-T Easy vektörü.

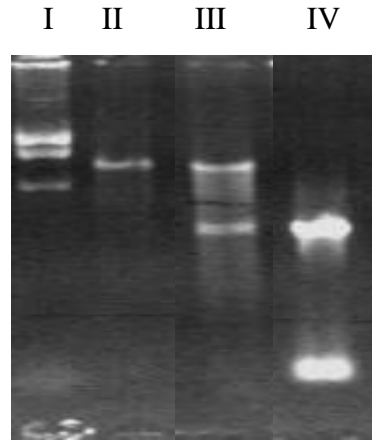
Tablo 1. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinaz geninin diğ er mikroorganizmalarla % nükleotit benzerliğ i

Mikroorganizma	% Benzerlik
<i>Anoxybacillus flavithermus</i> WK1	% 99
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG80-2	% 90
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> CCB US3 UF5	% 86
<i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426 DNA	% 86
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> T-6	% 86
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	% 86
<i>Geobacillus sp.</i> C56-T3	% 85
<i>Geobacillus sp.</i> Y412MC52	% 84
<i>Geobacillus sp.</i> Y412MC61	% 84
<i>Thermobacillus composti</i> KWC4	% 73

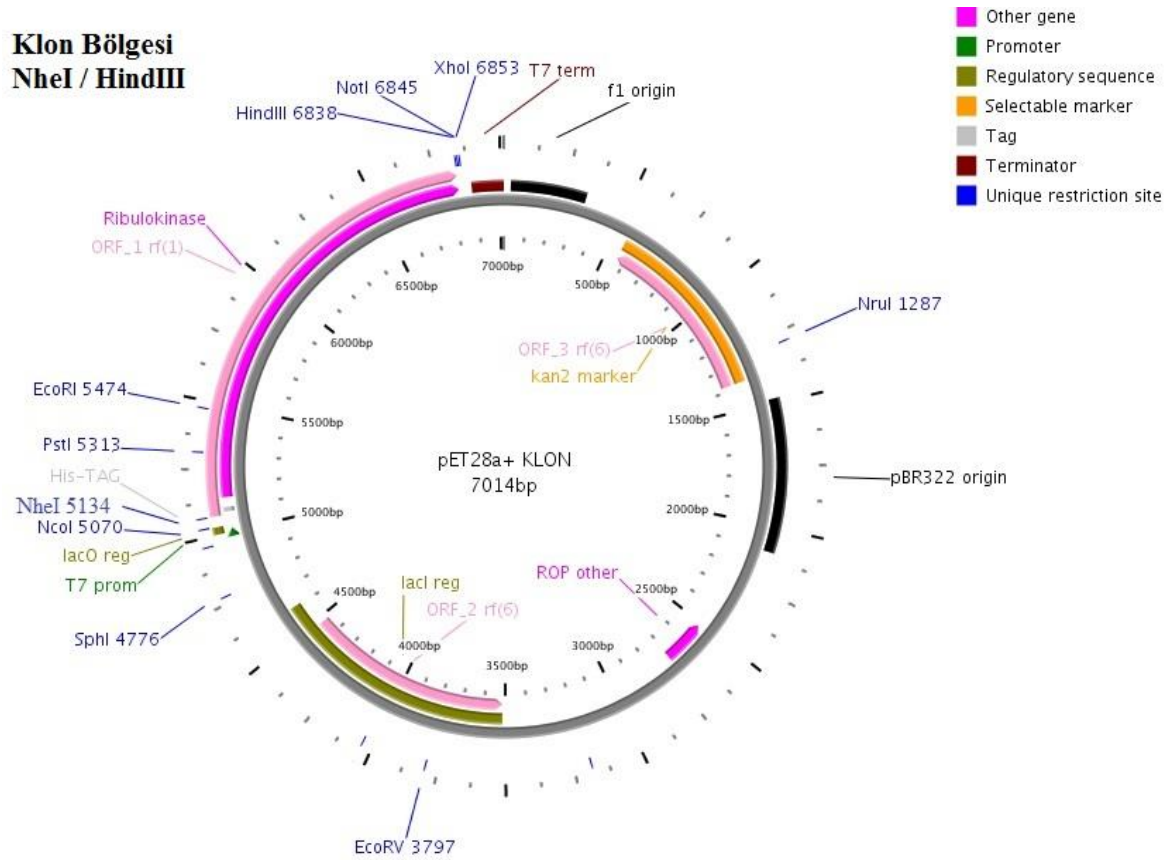
### 3.2. Ribulokinaz Geninin pET-28a(+) Vektörüne Klonlanması ve Ekspres Edilmesi

Ribulokinaz geni, ekspresyon vektörü olan pET-28a(+)’ya klonlanabilmesi için öncelikle pGEM-T easy klonlama vektörüne klonlandı. Ribulokinaz genini içeren pGEM-T Easy vektörü izole edildi. Ribulokinaz genini içeren pGEM-T easy vektörü ve boş pET-28a(+) ekspresyon vektörü *NheI* ve *HindIII* restriksiyon ezimleri ile kesildi. %1,0’lik agaroz jelde yürütülen DNA fragmentleri jelden çıkarma kiti ile jelden çıkartıldı ve ligasyon yapıldı.

Ligasyon ürünü, *E. coli* JM101 hücresine aktarıldı, ardından yapılan plazmit DNA’sı izolasyonu sonucu ribulokinaz genini içeren plazmit, *E. coli* BL21 (DE3) pLysS suşuna transforme edildi.



Şekil 8. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinaz geninin pET-28a(+) vektörüne klonlanması. I- Kesilmemiş pET-28a(+), II- pET-28a(+)'nın *NheI* ve *HindIII* ile kesimi, III- Ribulokinaz genini içeren pET-28a(+) vektörünün *NheI* ve *HindIII* enzimleri ile kesimi, IV- Ribulokinaz PCR ürünü.



Şekil 9. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinaz geninin, pET-28a(+) vektörü içinde Plasmapper programı (URL-3, 2013) kullanılarak gösterilmesi

### 3.3. Ribulokinaz Aktivitesi

Klon olduğu teyit edilen hücre ekstraktındaki ribulokinaz aktivitesini belirlemek için, sistein- karbozol- sülfirik asit yöntemi kullanıldı ve renk değişimi sonucu aktivite varlığı tespit edildi. Renk değişimi Şekil 9' da; kontrol (enzim içermeyen) ve ribulokinaz enzimi içeren tüpler Şeklinde gösterildi.



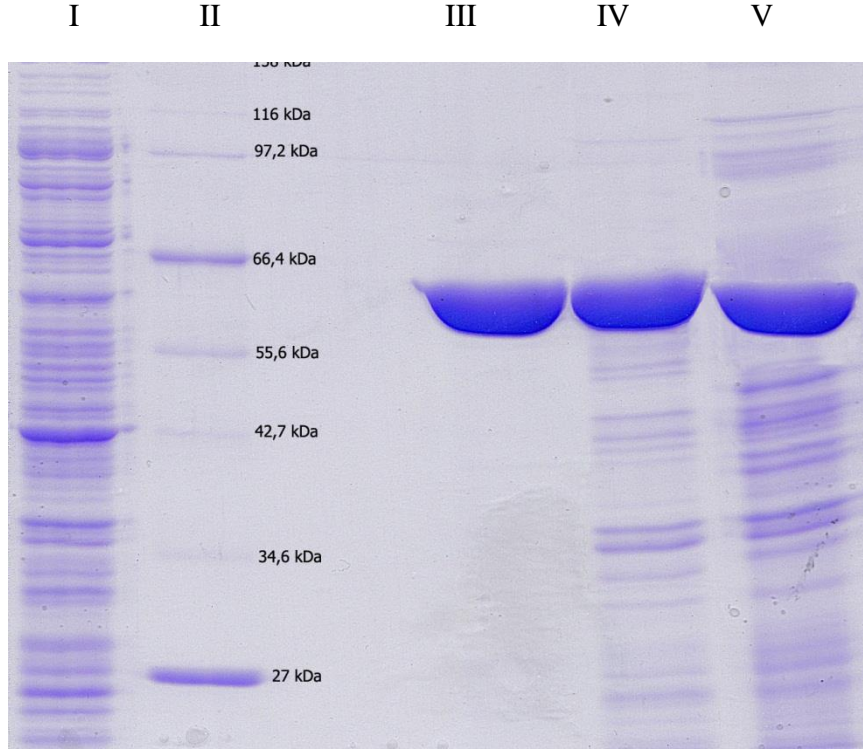
Şekil 10. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinaz aktivitesinin gösterilmesi. I- Kontrol, II- Ribulokinaz aktivitesi.

### 3.4. Ribulokinazın Saflaştırılması

#### 3.4.1. Hücre Özütünün Elde Edilmesi ve Isı Şoku Muamelesi

*E.coli* BL21 (DE3) pLysS hücresine transforme edilen ribulokinaz geninin ekspresyonu sağlanarak önce hücre özütü elde edildi. Ardından ısı Şoku uygulaması ile ekstraktaki çok sayıdaki *E. coli* proteini denatüre edildi ve son olarak proteinin N-terminalinde bulunan HisTag kuyruğu yardımıyla HisLink™ Protein Purification kiti ile kolon kromatografisi ile saflaştırılması gerçekteştirildi. Saflaştırılan ribulokinaz, SDS PAGE' de yürütülerek enzime ait protein bandı gösterildi. ExPASy programı (URL-4, 2013) kullanılarak bu proteinin 61,96 kDa olduğu hesaplandı. Ayrıca SDS PAGE' de

kullanılan markır proteinleri yardımı ile enzimin moleküler ağırlığının 61,96 kDa olduğu teyit edildi.

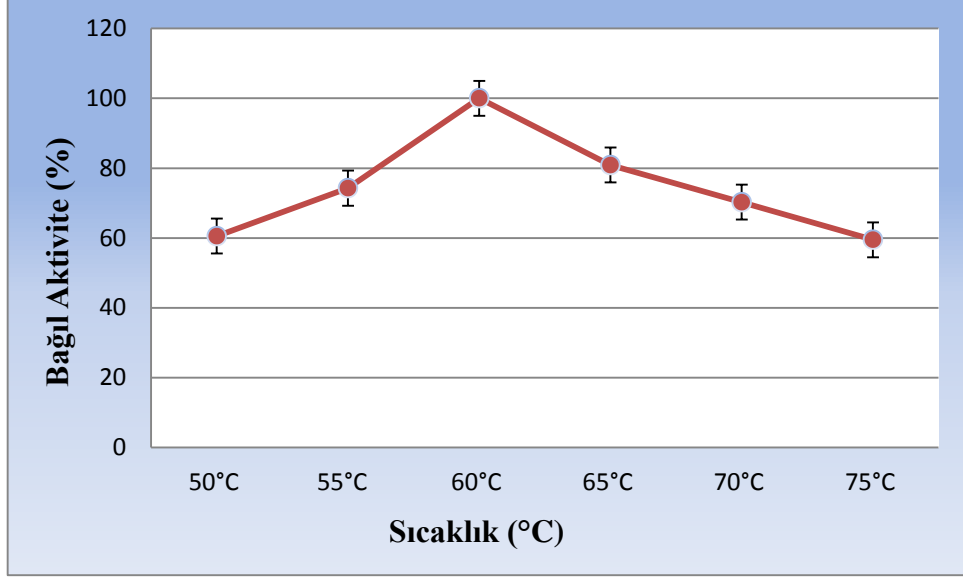


Şekil 11. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazının SDS-PAGE analizi: I) Ribulokinaz geni içermeyen indüklenmiş pET-28a(+) vektörü, I) Protein markır, III) Saflaştırılmış enzim IV) Isı şoku uygulaması V) Kaba ekstrat.

### 3.5. Ribulokinaz Enziminin Karakterizasyonu

#### 3.5.1. Optimum Sıcaklık

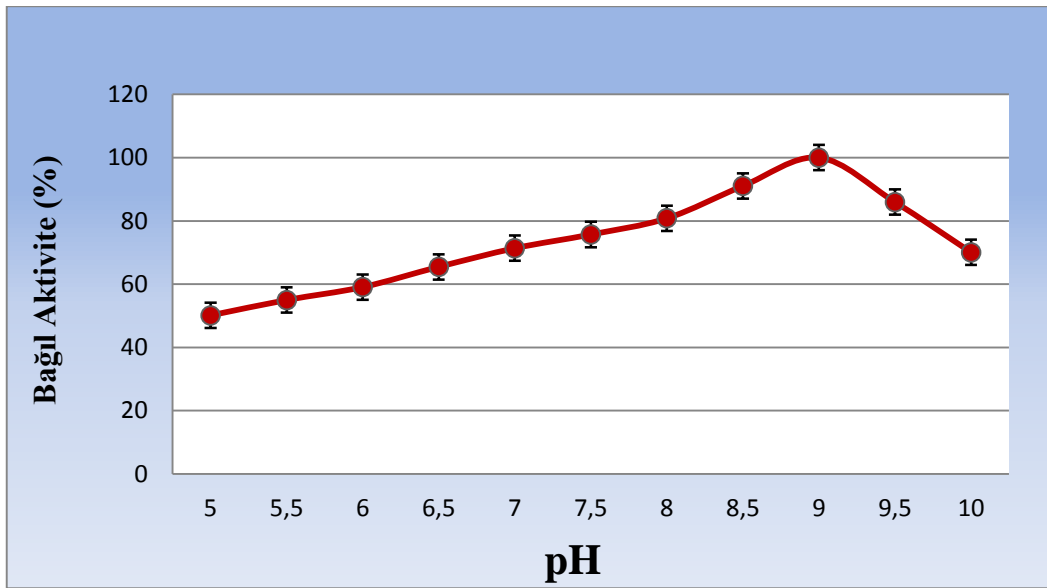
*A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazının optimum sıcaklığını belirlemek için 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 °C'lerde enzim aktivitesi ölçümü gerçekleştirildi. Sıcaklık–aktivite grafiği oluşturulması sonucu enzimin optimum sıcaklığı 60 °C olarak belirlendi. Bundan sonraki çalışmalarda reaksiyonlar bu sıcaklık kullanılarak gerçekleştirildi.



Şekil 12. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazının optimum sıcaklık grafiği

### 3.5.2. Optimum pH

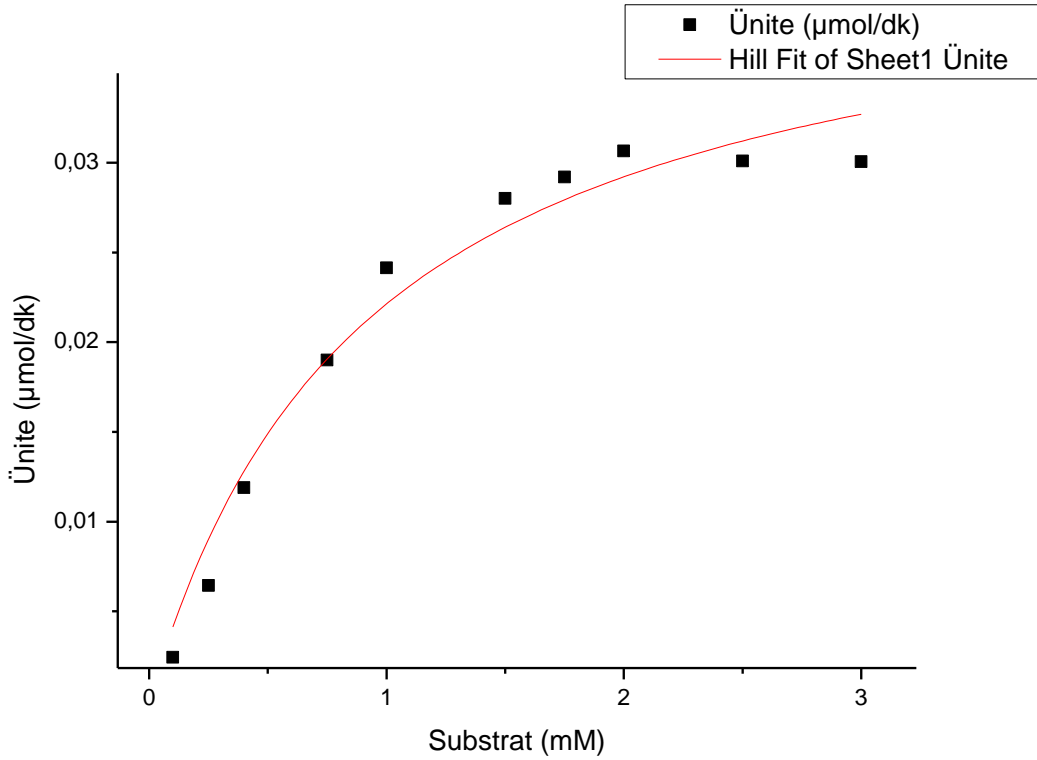
*A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinaz aktivitesine pH'nın etkisinin araştırılması deneyinde, pH 5,0-5,5 için 50 mM asetat tamponu; pH 6,0-6,5-7,0-7,5 için 50 mM fosfat tamponu; pH 8,0-8,5-9,0 için 50 mM Tris-HCl; pH 9,5- 10 için glisin tamponları kullanıldı. Sonuç olarak ribulokinazın en yüksek aktiviteyi pH 9'da verdiği belirlendi.



Şekil 13. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazının optimum pH grafiği

### 3.5.3. Kinetik İncelemeler

*A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazının kinetik parametrelerinin incelenmesinde substrat olarak D-ribuloz varlığında, substrat konsantrasyonu-aktivite grafiği çizilerek enzimin basit Michaelis-Menten kinetiğine uyduğu tespit edildi. Origin Pro 8.1 programı kullanılarak yapılan hesaplamalarda bu enzimin  $K_m$  değerinin 0,94 mM,  $V_{maks}$  değerinin ise 3,197  $\mu\text{mol/dk/mg}$  oldukları bulundu. Ayrıca bu enzimin  $k_{cat}$  değerinin ise  $3,31\text{s}^{-1}$  olduğu belirlendi.



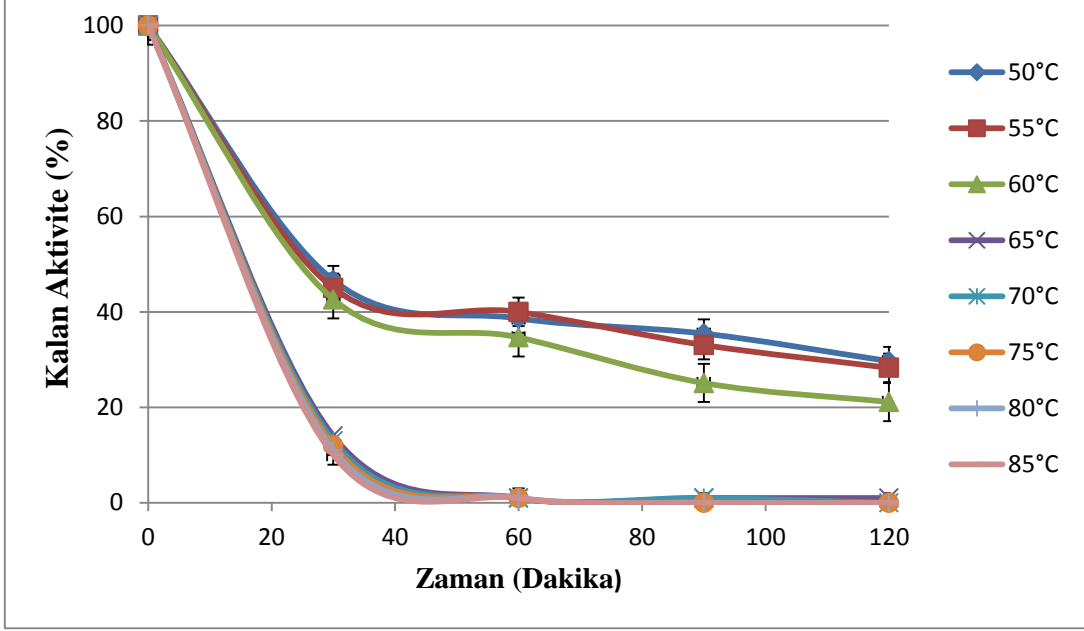
Şekil 14. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazının Michaelis-Menten eğrisi

### 3.5.4. Isıl Kararlılığı

*A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazının kararlılığına ısının etkisini incelemek amacıyla saf enzim belirli sıcaklıklarda, belirli zaman aralıklarında (50, 55, 60, 65, 70, 75 ve  $80^{\circ}\text{C}$ ' de 2 saat) inkübe edildi ve optimum şartlarda reaksiyon gerçekleştirildi. Yapılan spektrofotometrik ölçümler sonrasında, enzimin 50, 55 ve  $60^{\circ}\text{C}$ 'lerde diğer sıcaklıklara göre daha kararlı olduğu görüldü. Diğer sıcaklıklarda ise ilk yarım saatten sonra enzimin



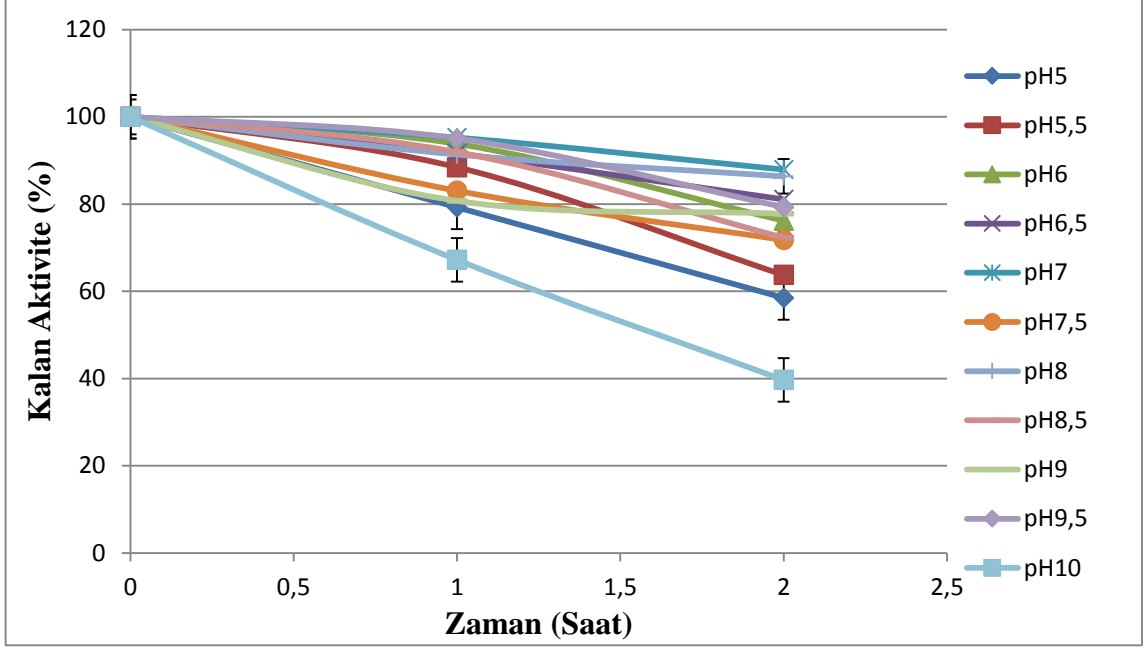
tamamen aktivitesini kaybettiği gözlemlendi. Enzim aktivitesinin % olarak zamana göre değişen grafiği çizilirken ilk alınan aktivite değeri (0. dk) %100 kabul edildi.



Şekil 15. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazının ısıl kararlılığı

### 3.5.5. pH Kararlılığı

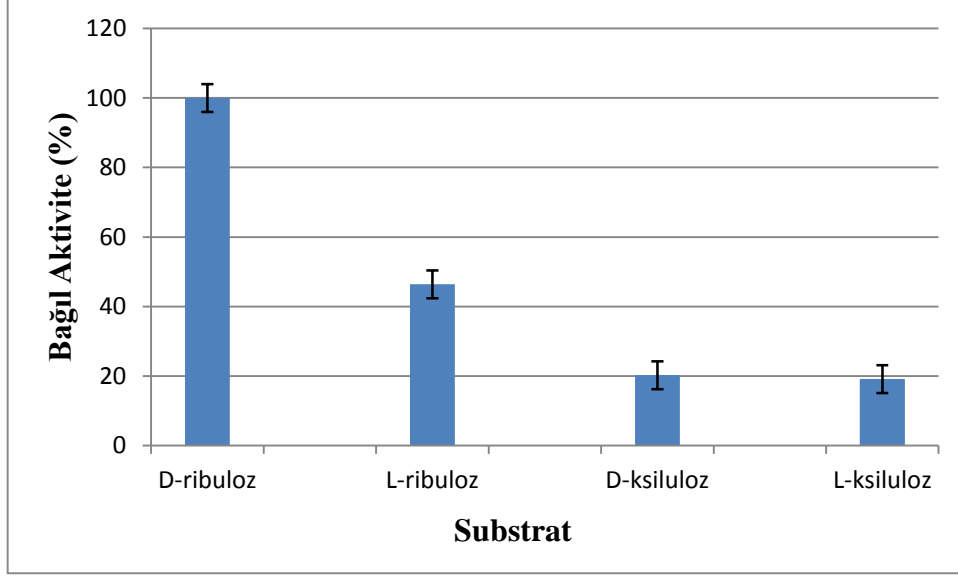
*A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazının pH kararlılığını belirlemek için saflaştırılmış enzim, pH 5- 5,5- 6- 6,5- 7-7,5- 8- 8,5- 9,0-9,5- 10,0'da 60 °C'de (optimum sıcaklığında) inkübe edildi ve % kalan aktivite hesaplandı. Belirli zaman aralıklarında alınan aktivite ölçümleri sonucu enzimin pH 5- 5,5 ve 10'da aktivitesini kaybettiği belirlendi. Buna karşın diğer pH' larda enzim aktivitesinin önemli derecede korunduğu gözlemlendi. Enzim aktivitesinin % olarak zamana göre değişen grafiği çizilirken ilk ölçüm değeri (0. dk) %100 kabul edildi.



Şekil 16. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazının pH kararlılığı

### 3.5.6. Substrat Spesifikliği

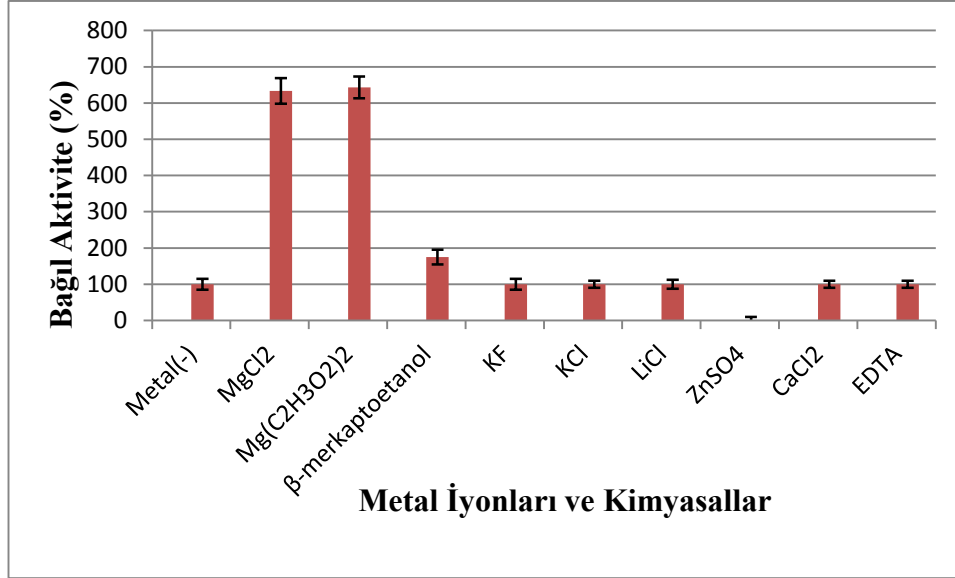
*A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazının substrat spesifikliğini incelemek amacıyla, D-ribuloz, L- ribuloz, D-ksiluloz ve L-ksiluloz şekerleri optimum reaksiyon şartlarında substrat olarak kullanıldı. Bu reaksiyonlar sonucu alınan ölçümlerde en yüksek aktivite değeri %100 olarak kabul edildi. Bu ölçümler sonucu oluşturulan substrat-aktivite grafiğinde en iyi aktivitenin D-ribuloz' da olduğu görüldü. Aktivitenin L-ribuloz' da %50 düzeyinde olduğu; D-ksiluloz ve L-ksiluloz'da ise %20' de kaldığı gözlemlendi.



Şekil 17. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazının substrat spesifikliğı

### 3.5.7. Metal İyonları ve Kimyasalların Etkisi

*A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinaz üzerine metal iyonları ve kimyasalların etkisini araştırmak için yapılan deneyde;  $MgCl_2$ ,  $Mg(C_2H_3O_2)_2$ ,  $\beta$ -merkaptotanol, KF, KCl, LiCl,  $ZnSO_4$ ,  $CaCl_2$  ve EDTA metal iyonları ve kimyasalları kullanıldı. Bu maddelerden, reaksiyonun son hacmi 1 mM olacak şekilde ilave edildi. İçinde metal iyonu ve kimyasal bulunmayan ölçüm sonucu, %100 olarak kabul edildi. Yapılan deney sonucunda,  $MgCl_2$  ve  $Mg(C_2H_3O_2)_2$ 'nin enzimin aktivitesini önemli derecede arttırdığı belirlendi. Ayrıca,  $\beta$ -merkaptotanol'ün de aktiviteyi arttırdığı tespit edildi. Buna karşın  $ZnSO_4$  'ın aktiviteyi inhibe ettiği görüldü. KF, KCl, LiCl ve  $CaCl_2$ 'ün ise aktivite üzerinde herhangi bir etkilerinin olmadıkları belirlendi.



Şekil 18. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazına metal iyonları ve kimyasalların etkisi.

#### 4. TARTIŞMA

Yapılan bu çalışmada *A. kestanbolensis* AC26 Sarı bakterisine ait L-arabinoz operonu içerisinde yer alan ribulokinaz geninin klonlanması ve karakterizasyonunun yapılması amaçlanmıştır. Ribulokinaz enziminin daha önce termofilik bir mikroorganizmadan çalışılmamış olması dikkate alındığında böyle bir çalışmanın gerekliliği ortaya çıkmıştır. Bu açığın kapatılması amacıyla böyle bir çalışmanın yapılması uygun görülmüştür.

Bu çalışmada *A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinaz geninin 1695 bazlık tüm nükleotit ve buna karşılık gelen 564 amino asitlik sırası belirlenerek Genbank'taki mevcut diğer ribulokinaz'lar ile karşılaştırılması yapılmıştır. Karşılaştırma sonunda *A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazı *A. flavithermus* WK1 ribulokinaz geni ile %99, *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 L-ribulokinaz geni ile %90, *Geobacillus thermoleovorans* CCB US3 UF5 ribulokinaz geni ile %86, *Geobacillus kaustophilus* HTA426 DNA L-ribulokinaz geni ile %86 oranında benzer olduğu belirlenmiştir. Baz dizini belirlenen enzimin Genbank'taki verilere göre 2.7.1.16 E.C numarasına sahip ribulokinaz enzimi olduğu belirlenmiştir.

Elde edilen nükleotit sırasından amino asit sırası belirlenerek literatürdeki diğer ribulokinazlar ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucu *A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazın diğer ribulokinazlardaki korunmuş bölgelerle aynı bölgelere sahip olduğu görülmüştür. *Bacillus halodurans* ribulokinazın ATP bağlanma bölgesi, <sup>447</sup>GGLPQK<sup>452</sup> dizisi olarak belirtilmiştir (Agarwal vd., 2011). Bu dizinin *A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazında <sup>445</sup>GGLPQK<sup>450</sup> sırasında bulunduğu görülmüştür. Ribulozun 4 oksijen atomu (O1, O2, O3 ve O4) *Bacillus halodurans* ribulokinazının 4 amino asitiyle (Glu329, Lys208, Ala96 ve Asp274) hidrojen bağı yapar (Agarwal vd., 2011). Bu 4 amino asitin, *A. kestanbolensis* AC26 sarı ribulokinazda Glu327, Lys206, Ala94 ve Asp272 olduğu belirlenmiştir.

*A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazın 1695 nükleotidlik sırasına karşılık gelen 564 amino asitlik sırasının, Genbank'da bulunan ribulokinazlarla uyum gösterdikleri belirlenmiştir. Buna göre; *Anoxybacillus flavithermus* WK1 ribulokinazının 564 amino asit (accession number: YP\_002314899), *Deinococcus maricopensis* DSM 21211 ribulokinazının 564 amino asit (accession number: YP\_004169580) ve *Bacillus subtilis*

BSn5 ribulokinazının ise 560 amino asitten (accession number: YP\_004204700) oluşmuştur (URL-5, 2013).

*A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinaz geni pET-28a(+) ekspresyon vektörüne klonlanmış ve *E. coli* BL21 (DE3) pLysS hücresine aktarılmıştır. Kaba ekstrat olarak elde edilen enzim, önce ısı ile kısmi saflaştırılmıştır. Daha sonra ise N-terminaline takılan Histidin kuyruğundan (HisTag) yararlanılarak, Nikel Afinite Kromatografisi ile tamamen saflaştırılmıştır. Elde edilen proteinin SDS-PAGE analizi yapılmış ve moleküler ağırlığının 61,96 kDa (ExPASy) olarak hesaplanmıştır. SDS-PAGE analizi sonucunda, *A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazının çok iyi ekspres olduğu belirlenmiştir.

Literatür incelendiğinde, mezofilik bakterilerin ribulokinaz enzimlerinin çalışıldığı görülmektedir. Buna göre *E. coli* ribulokinaz (Lee ve Bendet, 1967) ve *Lactobacillus plantarum* ribulokinazının (Burman ve Horecker., 1958) optimum sıcaklıkları 37 °C olarak belirtilmiştir. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazının optimum sıcaklığı 60 °C olarak bulunmuştur. Ancak Genbank'da nükleotit ve protein sırası verilen termofilik ribulokinazların hiçbirinin, bu güne kadar karakterizasyon çalışması yapılmamıştır. Buna karşın ribulokinazların da içinde bulunduğu şeker kinazlar ailesine dahil termofilik ksilulokinazın, karakterizasyon çalışması yapılmıştır. Bu çalışmaya göre D- ksilulokinazın optimum sıcaklığı 65 °C olarak bulunmuştur (Ahmad ve Scopes., 2002). Bu sıcaklığın *A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazın optimum sıcaklığına yakın olduğu görülmektedir.

Yapılan çalışmalarda, *A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazın en iyi aktivitesinin pH 9'da olduğu görülmüştür. Literatürdeki diğer ribulokinazlar ile karşılaştırıldığında; *Lactobacillus plantarum*'ın ribulokinazının optimum pH'sı 7 (Burman ve Horecker., 1958), *Saccharomyces cerevisiae*'de ekspres edilen *E. coli* ribulokinazının optimum pH'sı 7,5 (Sedlak ve Ho., 2001) olarak bulunmuş, bu özellik bakımından *A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazın bu enzimlerden farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Diğer yandan Fromm (1959)'ın yaptığı çalışmada ise *Aerobacter aerogenes* D-ribulokinazının pH 7-9,5 arası geniş bir aralıkta çok iyi bir aktivite gösterdiği belirlenmiştir ve bu bakımdan *A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazı ile uyum göstermektedir.

*A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazın tamponsuz ortamda yapılan ısıl kararlılık çalışmaları sonucunda ilk yarım saatte, 50, 55 ve 60 °C' de aktivitelerinin %45'ini koruduğu; 65, 70, 75 ve 80 °C' de ise aktivitelerinin yaklaşık %10'nunu koruduğu belirlenmiştir. Lee ve Bendet (1967)'e göre saflaştırılmış *E. coli* ribulokinazı 60,5 °C'de 30 dk sonra aktivitesini tamamen koruduğu, kısmen saflaştırılması yapılan ribulokinazın ise

60,5 °C'de 15 dk sonra aktivitesinin % 30'unu kaybettiği belirtilmiştir. Ancak *E. coli* ribulokinazıyla yapılan bu çalışma tamponlu ortamda yapılmıştır. Isıl kararlılık esas olarak enzimin yapısıyla alakalı olmakla beraber, metal iyonları ve pH gibi çevresel faktörler de ısıl kararlılığını etkiler (Ay, 2010).

*A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazının 60°C'de 2 saat boyunca yapılan pH kararlılığının incelenmesi sonucunda; pH 5'de %58, pH 5,5'de %63, pH 6'da %85, pH 6,5'da %86, pH 7'de %92, pH 7,5'da %72, pH 8'de %73, pH 8,5'da %72, pH 9'da %77, pH 9,5'da %80 ve pH 10'da %40'a kadar aktivitenin korunduğu gözlemlendi. Bu sonuçlar doğrultusunda *A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazın pH 6-7 aralığında oldukça kararlı olduğu; pH 7-9,5'da da kararlılığının yüksek olduğu söylenebilir. Burma ve Horecker (1957)' in yaptıkları çalışmada *Lactobacillus plantarum* ribulokinazın, pH 6'nın altında ve pH 7,5'in üstü pH'larda kararlı olmadığı ve bu kararsızlığın nedeninin ise bu pH'larda enzim aktivitesinin zaten çok düşük olduğundan kaynaklanabileceği vurgulanmıştır. Lee ve Bendet (1967)' in *E. coli* ribulokinazı üzerine yaptıkları bir çalışmada ise enzimin 4 ve 20°C' de asidik pH'larda kararlı olmadıklarını, ama pH 7,6 ve üstünde kararlı olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca pH 7,6'da 60,5°C'de 30 dk boyunca enzimin kararlı kaldığı da belirtilmiştir. *A. kestanbolensis* AC 26 Sarı ribulokinazının pH 7,5'da 2 saat boyunca bekletildiği göz önünde bulundurularak pH kararlılığı bakımından *E. coli* ribulokinazına göre daha kararlı olduğunu söyleyebiliriz.

*A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazın substrat spesifikliğine bakıldığında en yüksek aktiviteyi D-ribulozda (%100) gösterirken; L-ribulozda %30, L-ksilulozda %20 ve D-ksilulozda %15 oranında aktivite göstermiştir. Lim ve Cohen (1966)'da yaptıkları çalışmada *E. coli* D-ribulokinazının substrat spesifikliğine bakılmış; L-fukuloz %100, D-ribuloz %42, D-ksiluloz %38 aktivite gösterirken L-ribuloz hiç aktivite göstermemiştir. Bu durum D-ribulokinazın özelliği olan L-ribuloza karşı aktivitesinin olmamasındandır. Buna karşın ribulokinazlar (L-ribulokinaz), D ve L-ribulozun ikisinde de aktivite gösterir. Bu sonuç *A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazının, L-ribulokinaz olduğunu doğrulamaktadır.

Metal iyonları, tuzları ve çeşitli kimyasallar enzim karakterizasyon çalışmalarında önemlidir. Ancak, literatürde bugüne kadar çalışılan ribulokinazlar için sadece Mg<sup>+2</sup> ve β-merkaptoetanol üzerinde durulmuştur. Yapılan çalışmalarda *A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazın diğer kinaz enzimlerinde olduğu gibi Mg<sup>+2</sup> iyonunun enzimin aktivitesinde önemli bir rolü olduğu görülmüştür. Metal iyonlarının etkisi araştırılırken, içerisinde hiçbir

metal iyonu bulunmayan reaksiyon ölçüm sonucu %100 olarak kabul edilmiştir.  $Mg^{+2}$  iyonu varlığında ribulokinaz aktivitesinin % 633'e,  $\beta$ -merkaptolanol varlığında ise % 175'e kadar yükseldiği belirlenmiştir.  $K^+$ ,  $Li^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$  ve EDTA' nın ribulokinaz aktivitesine etkisinin olmadığı ama  $Zn^{+2}$ 'nin aktivitesini tamamen inhibe ettiği görülmüştür.  $Mg^{+2}$  iyonu ise ribulokinazların aktivite deneylerinde reaksiyona ilave edildiğinde aktiviteyi önemli derecede arttırdığı bilinmektedir. Çünkü  $Mg^{+2}$  iyonu, ATP ile etkileşerek ATP'nin reaktif hale geçmesini sağlar (URL-6, 2013).  $\beta$ -merkaptolanol genellikle disülfid bağlarını indirgeyici bir kimyasaldır ve enzim aktivitesini inhibe eder. Ancak  $\beta$ -merkaptolanol enzim aktivitesini inhibe etmediğinden dolayı bu enzim aktivitesi için serbest SH gruplarına veya S-S köprülerine ihtiyaç duymamaktadır yorumu yapılabilir (Ay, 2010). Fromm (1959) yaptığı çalışmada  $\beta$ -merkaptolanolün, *Aerobacter aerogenes* D-ribulokinaz aktivitesinin %55 arttırdığını belirlemiştir. Bu sonuç, *A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinaz ile uyum göstermektedir.

Yine Fromm'un çalışmasında (1959)  $ZnSO_4$  reaksiyonu durdurmak için kullanmıştır. Bu durumu göz önünde bulundurarak  $Zn^{+2}$ 'nin reaksiyonu durdurmasının şaşırtıcı olmadığını söyleyebiliriz.

*A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinaz  $K_m$  değeri 0,94 mM olarak bulunmuştur. *E. coli* ribulokinazının  $K_m$  değeri 0,39 mM (Lee vd., 2001), yine *E. coli*'deki farklı bir çalışmada ise  $K_m$  değerinin 0,27 mM (Lee ve Bendet, 1967) olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar bu enzimin  $K_m$  değerinin çok iyi olmadığını göstermektedir.

*A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazının yüksek sıcaklıklarda aktivite göstermesi, iyi pH kararlılığına sahip olması ve *E. coli* BL21 (DE3) pLysS hücresinde çok iyi ekspres olması gibi özelliklerinden dolayı literatürde bulunan ribulokinazlardan daha üstün olduğu söylenebilir. Aynı zamanda yapılan literatür araştırmalarında şu ana kadar üzerinde çalışma yapılmış bir termofilik ribulokinaza rastlanmadığından dolayı literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.



## 5. SONUÇLAR

Bu çalışmada *A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinaz geni, bir *E. coli* vektörüne klonlanarak ekspres edildi. Saflaştırılan ribulokinazın optimum pH, optimum sıcaklık, metal iyonları etkisi ve kinetik parametreleri gibi biyokimyasal özellikleri araştırıldı.

*A. kestanbolensis* AC26 Sarı bakterisinden PCR ile elde edilen 1695 nt'lik ribulokinaz geni, ilk olarak pGEM-T Easy klonlama vektörüne klonlandı ve sekans edilerek ribulokinazı kodlayan gen olduğu kesinleştirildi. Ribulokinaz olduğu kesinleşen gen pET-28a(+) ekspresyon vektörüne klonlanarak, *E. coli* BL21 (DE3) pLysS suşunda ekspres edildi ve saflaştırıldı.

*A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazının optimum pH değerinin 9, optimum çalışma sıcaklığının ise 60°C olduğu tespit edildi. Enzimin substratı olarak D-ribuloz ile ilgili kinetik parametreleri incelendi ve bu substrat için  $K_m$  değeri 0,94 mM ve  $V_{max}$  değeri 3,197 U/mg olarak belirlendi. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazının  $k_{cat}$  değeri 3,31 s<sup>-1</sup> olarak belirlendi.

*A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazının pH kararlılığı incelendi. Enzim aktivitesinin pH 5'de %58'e, pH 5,5'de %63'e, pH 6'da %85'e, pH 6,5'da %86'ya, pH 7'de %92'ye, pH 7,5'da %72'ye, pH 8'de %73'e, pH 8,5'da %72'ye, pH 9'da %77'ye, pH 9,5'da %80'e ve pH 10'da %40'a düştüğü belirlendi.

*A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazının ısıl kararlılık deneyi sonucunda ilk yarım saatte, 50, 55 ve 60 °C' de aktivitelerinin %45'ini koruduğu; 65, 70, 75 ve 80 °C' de ise aktivitelerinin yaklaşık %10'nunu koruduğu belirlendi.

Mg<sup>+2</sup>, Li, Ca<sup>+2</sup>, K, Zn<sup>+2</sup> metal iyonlarının, EDTA ve β- merkaptoetanol kimyasallarının etkilerine bakıldı. Bu metal iyonları ve kimyasallar reaksiyonlara 1 mM konsantrasyonda olacak şekilde eklendi. LiCl, CaCl<sub>2</sub>, KCl ve KF'nin aktiviteye hiçbir etkide bulunmadığı, MgCl<sub>2</sub> ve Mg(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub>'ın aktiviteyi %633'e, β- merkaptoetanol'ün %175'e yükselttiği; ZnSO<sub>4</sub>'ın aktiviteyi inhibe ettiği gözlemlendi.

*A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazın substrat spesifikliğı incelendi. D-ribuloz ile yapılan reaksiyonun aktivitesi %100 olarak kabul edildi. Buna bağlı olarak aktivitenin, L-ribuloz'da % 46'ya, D-ksiluloz'da % 20'ye ve L-ksiluloz'da %19'a düştüğü belirlendi.

*A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazının moleküler ağırlığının amino asit sekansına göre ve yapılan SDS PAGE analizine göre, 61,96 kDa olduğu tespit edildi.

## 6. ÖNERİLER

Ribulokinazlar üzerine yapılan tüm çalışmalar mezofilik mikroorganizma kaynaklı olup, termofilik mikroorganizma kaynaklı ribulokinazlarla ilgili çalışma bulunmamaktadır. Termofilik mikroorganizma kökenli ribulokinazlarla da çalışmalar yapılarak bu enzimin daha ayrıntılı bir biçimde araştırılması faydalı olacaktır.

Ribulokinazlar, endüstride henüz çok yer edinmemiş bir enzim sınıfı olup daha çok metabolik yollarda etkilidirler. Ancak bu tip enzimlerin, farklı substratlarla aktivitelerinin olup olmadığı gibi başka özellikleri de araştırılarak endüstride kullanılabilir hale getirilebilir.

*A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazı, pET-28a(+) vektörüne klonlandığında, *E. coli* BL21 (DE3) pLysS hücresinde çok iyi seviyede ekspres olmaktadır. Ribulokinazın bu derece yüksek seviyede ekspres olma özelliğinden yararlanılarak ekspresyonu iyi olmayan proteinlerle füzyon proteinler oluşturulabilir ve ekspresyon seviyeleri artırılabilir.

*A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazının *K<sub>m</sub>* değeri, literatürdeki diğer ribulokinazların *K<sub>m</sub>* değerlerinden yüksek olduğu belirlenmiştir. *K<sub>m</sub>* değerinin düşürülmesi için bu enzimde mutasyon çalışmaları yapılabilir.

Ribulokinaz enzimi ve arabinoz operonundaki diğer genler beraber klonlanarak, diğer genlerin karakterizasyonu yapılabilir ve bu sayede operon çalışmalarına büyük ölçüde katkı sağlanabilir.

## 7. KAYNAKLAR

- Agarwal, R., Burley, S., K. ve Swaminathan, S., 2011. Structural insight into mechanism and diverse substrate selection strategy of L-ribulokinase, Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 80, 261-268.
- Ahmad, S. ve Scopes, R., K., 2002. Isolation and properties of a constitutive D-xylulokinase from a novel thermophilic *Saccharococcus caldoxylosilyticus* DSM 12041 (ATCC 700356), Enzyme and Microbial Technology, 30, 627-632.
- Ay, F., 2010. *Anoxybacillus* sp. PDF1 Lipaz Geninin Klonlanması, Ekspresyonu ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Bahar, T., 1996. Enzim İmmobilizasyonu İçin Manyetik Polistiren Partiküllerin Hazırlanması ve Bu Partiküllerdeki İmmobilize Edilmiş Glukoamilazın Manyetik Olarak Stabilize Edilmiş Akışkan Yatak Reaktör (MSAYR)'de Kullanılması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Becker, J. ve Boles, E., 2003. A modified *Saccharomyces cerevisiae* strain that consumes L-arabinose and produces ethanol, Applied and Environmental Microbiology, 4144-4150.
- Bradford, M., M., 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem., 72, 248-254.
- Burman, D., P. ve Horocker, B., L., 1958. Pentose fermentation by *Lactobacillus plantarum*. III. Ribulokinase, The Journal of Biological Chemistry, 231, 1039-1051.
- Çanakçı, S., 2003. Gönen, Kestanbol ve Diyardın Kaplıcalarından Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, Moleküler Yöntemlerle Karakterizasyonu ve Tanımlanması, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Dalkıran, N., 2012. *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26 Sarı L-arabinoz İzomeraz Geninin Klonlanması, Ekspresyonu ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Daniel, R., M. ve Cowan, D., A., C., 2000. Biomolecular Stability and Life at High Temperatures, Cell Mol. Life Sci., 57, 250-254.
- Di Luccio, E., Petschacher, B., Voegtli, J., Chou, H., T., Stahlberg, H., Nidetzky, B. ve Wilson, D., K., 2007. Structural and Kinetic Studies of Induced Fit in Xylulose Kinase from *Escherichia coli*, Journal of Molecular Biology, 365,3, 783-798.

- Dische, Z. ve Borenfreund, E., 1951. A New Spectrophotometric Method for The Detection and determination of Ketosugars and Trioses, J. Biol. Chem., 192, 583-587.
- Duguet, M., 1995. Nucleic Acids and Molecular Biology, 9, Lilley D. ve Eckstein, F., Eds., Springer Verlag., Berlin, Germany, 84.
- Enez, B., 2011. *Geobacillus stearothermophilus*' tan Ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz Enziminin İzolasyonu, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.
- Forterre, P., Bergerat, A. ve Lopez-Garcia, P., 1996. The Unique Topology and DNA Topoisomerases of Hyperthermophilic Archeae, FEMS Microbiol. Rev., 18, 237-248.
- Fromm, H., J., 1959. D-Ribulokinase from *Aerobacter aerogenes*, The Journal of Biological Chemistry, 234, 3097-3101.
- Gupta, R., Gırgas, P., Mohapatra, H., Goswami, V., K. ve Chauhan, B., 2003. Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. Process Biochemistry, 1-18.
- Gümüsel, F., 2002. Biyoteknoloji, Genetik ve Sağlık Sektörü, Kocaeli Sanayi İçin Teknolojik Uzgörü Ortak Projesi, 73-135.
- Haki, G., D. ve Rakshit, S., 2003. Developments in Industrially Important Thermostable Enzymes: a Review, Bioresource Technology, 89, 17-34.
- Haney, P., J., Badger, J., H., Buldak, G., L., Reich, C., I., Woese, C., R. ve Olsen, G., J., 1999. Thermal adaptation analyzed by comparison of protein sequences from mesophilic and extremely thermophilic *Methanococcus* species, Proceedings of the National Academy of Sciences, 96, 3578-3583.
- İnan, K., 2011. İzmir ve Aydın İllerindeki Bazı Kaplıçalardan İzole Edilen Termofilik Bakteri İzolatlarının Moleküler Taksonomisi ve D1021 İzolatının Glukoz İzomerazının Karakterizasyonu, Doktora Tezi, K.T.Ü, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Karademir, A., Akgül, M. ve Tutuş, A., 2002. Kağıt Endüstrisinde Enzim Kullanımına Genel Bir Bakış, K.S.Ü Fen ve Mühendislik Dergisi, 5, 1, 61-71.
- Kumar, H., D. ve Swati, S., 2001. Modern Concepts of Microbiology, Second Revised, Vikas Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi.
- Lee, N. ve Bendet, I., 1967. Crystalline L-ribulokinase from *Escherichia coli*, The Journal of Biological Chemistry, 242, 2043-2050.
- Lee, L., V., Gerratana, B. ve Cleland, W., W., 2001. Substrate Specificity and Kinetic Mechanism of *Escherichia coli* Ribulokinase, Archives of Biochemistry and Biophysics, 396,2, 219-224.

- Lim, R. ve Cohen, S., 1966. D-Phosphoarabinoisomerase and D-Ribulokinase in *Escherichia coli*, The Journal of Biological Chemistry, 241, 4304-4315.
- Lineweaver, H. ve D. Burk., 1934. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. J. Am. Chem. Soc., 56, 658-666.
- Lopez-Garcia, P., 1999. DNA Supercoiling and Temperature Adaptation: A Clue to Early Diversification of Life?, J. Mol. Evol., 49, 4, 439-452.
- Maniatis, T., Fritsch, E., F. ve Sambrook, J., 1982. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, U.S.A.
- Manjasetty, B.A. ve Chance, M. R., 2006. Crystal Structure of *Escherichia coli* L-Arabinose Isomerase (ECAI), The Putative Target of Biological Tagatose Production, Journal of Microbiology and Biotechnology., 360, 297-309.
- Marguet, E. ve Forterre, P., 1994. DNA Stability at Temperature Typical for Hyperthermophiles, Nucleic Acids Research, 22, 1681-1686.
- Neuberger, M., S., Hartley, B., S. ve Walker, J., E., 1981. Purification and properties of D-ribulokinase and D-xylulokinase from *Klebsiella aerogenes*, Biochem. J., 193, 513-524.
- Özdemir, S., 2008. Ağır Metallerin Değişik Termofilik Bakterilerdeki Akümüasyonu, Biyosorbisyonu ve Çevre Biyoteknolojisinde Kullanımı Üzerine Çalışmalar, Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.
- Pikuta, E., Lysenko, A., Chuvilskaya, N., Mendrock, U., Hippe, H., Suzina, N., Nikitin, D., Osipov, G. ve Laurinavichius, K., 2000. *Anoxybacillus pushchinensis* gen. nov., sp. nov., a Novel Anaerobic, Alkaliphilic, Moderately Thermophilic Bacterium from Manure, and Description of *Anoxybacillus flavithermus* comb. Nov., Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 50, 2109-2117.
- Sá-Nogueira, I. ve Mota, L., J., 1997. Negative Regulation of L-Arabinose Metabolism in *Bacillus subtilis*: Characterization of the araR (araC) Gene, Journal of Bacteriology, 179, 1598-1608.
- Sağiroğlu, A., K., 1999. Enzim Teknolojisi, Bilim ve Teknik, 383, 74-80.
- Schleif, R., 2010. AraC protein, regulation of the L-arabinose operon in *Escherichia coli*, and light switch mechanism of the AraC action, Federation of European Microbiological Societies, 34, 779-796.
- Sedlak, M. ve Ho, N., W., Y., 2001. Expression of *E.coli* araBAD operon encoding enzymes for metabolizing L-arabinose in *Saccharomyces cerevisiae*, Enzyme and Microbial Technology, 28, 16-24.

Shamanna, D., K. ve Sanderson, K., E., 1979. Uptake and Catabolism of D-Xylose in *Salmonella typhimurium* LT2, Journal of Bacteriology, 139,1, 64-70.

Telefoncu, A., 1997. Enzimoloji, Lisansüstü Yaz Okulu. Kuşadası, Aydın-Türkiye, 446 s.

Trent, D., J., 2000. Extremophiles in Astrobiology: Per Ardua ad Astra, Gravitational and Space Biology Bulletin, 13, 2, 5-11.

URL-1, <http://en.wikipedia.org/wiki/Operon>. 6 Ocak 2013.

URL-2, [http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?map00040](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00040). 27 Ocak 2013.

URL-3, <http://wishart.biology.ualberta.ca/PlasMapper>. 10 Ocak 2013.

URL-4, [http://web.expasy.org/compute\\_pi](http://web.expasy.org/compute_pi). 9 Ocak 2013.

URL-5, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>. 29 Ocak 2013.

URL-6, [http://www.proteopedia.org/wiki/index.php/Kyle\\_Schroering\\_Sandbox](http://www.proteopedia.org/wiki/index.php/Kyle_Schroering_Sandbox). 1 Şubat 2013.

## 8. EKLER

### Ek 1. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinaz geninin nükleotit sırası

ATGGGGAAAAAGTATGTCATTGGTATCGACTATGGGACGGAATCGGGACGCGCCGTCTCTCG  
TTGATCTGGAAGGGAACGAAATTGCGGACCACGTCACCCCGTATCATCACGGAGTCATTGA  
TGAAGTGTGCCGGAATCGAACGTACAAC TAGAACCAGACTGGGCACTGCAGCACCCGGGC  
GATTATATCGAAGTGTGGCGACCGCTGTTCCAGCTGTATTGCAAAAGTCAGGGGTAAACC  
CGGCGGATGTGATCGGGGTCGGAATTGATTTTACAGCTTGTACGATGTTGCCGATCTCTGG  
CTCCGGCGAGCCGCTTTGCTTGAAGCCCGAATTCAAGCATCGCCCACACAGCTGGGTGAAA  
TTGTGGAAGCATCATGCTGCCCAGGATGAAGCGAACTTGCTCAATGAAATGGCGGCGAAAA  
GGGGGAAGCGTTTTTACCGCGCTACGGTGAAAAATTTTCATCGGAATGGATGATTGCGAA  
AATTTGGCAGATTCTGAATGAAGATCCGGATATTTATGACCAAACCGATCTCTTTTTAGAG  
GCAACCGACTGGGTGATCTTCAAATGACCGGTCAACTTGTGCGCAACAGCTGCACGGCCG  
GTTATAAGTCGATTTGGCATAAACAAGACGGCTATCCGAGTAAGGAGTTTTTTCAGAGCGCT  
TGATCCGCGACTGGAACACTTAACAGAATCGAAACTTCGCGGTTTCGATCGTTCCGCTCGGC  
ACAAGGGCAGGAGTACTGACGAAGGAAATGGCGGCCATGATGGGCCTTCTTCCGGGAACAG  
CCGTTGCAGTCGGAATGTGATGCTCATGCGGCCGTACCGGGTGTGGGGTTCGTTGAACC  
GGCAAAATGGTGATGGCGATGGGAACATCGATATGCCATATGTTACTTGGTACGGAAGAA  
AAGTATGTGGAAGGAATGTGCGGGGTTGTGAGGATGGCATCATTCGGGATATTTCCGGCT  
ATGAAGCCGGGCAGTCAGCGGTGGGCGACATTTTCGCTTGGTATGTTGAACAAAGTGTTC  
GGCCTATGTGAAAGAAGCAGCGGAAAAAGAGGGAGTTAGTGTCCATGAGTGGCTTGAAAAG  
CGAGCCGCTGCCTATCGGCCGGGGAAACAGGACTGCTCGCTTTAGACTGGTGGAAACGGAA  
ACCGTTCAGTATTGGTCGACACGGATTTAACCGGGTTGATCATCGGTTATACGTTGCTGAC  
GAAACCGGAAGAAATTTACCGTGCATTGCTTGAAGCAACGGCCTTCGGTACACGGAAAATT  
ATCGACGCCTTTGTTGGAAGCGGTATCAATGTGGATGAGCTGTATGCATGTGGCGGATTGC  
CACAAAAAATAAGTTACTCATGCAAATTTATGCCGATGTGACCAACCGTGAGATTAATAAT  
TGCAGCGTCGAAGCAAACCTCCAGCGGTAGGAGCTGCTATGTTTCGCGGCGGTTCGCGGCCGGC  
AAAGAAAACGGTGGGTATGAATCAATTATTGAAGCGGCACGAAACATGGGGAAAGTACGGG  
AAGAAACATTCAGCCAATTCGGGAGAATGTCGCCATTTATGAACAGTTGTATCAAGAATA  
TACGAAGCTGCATGACTATTTTGGTCGTGGGGAAAACGATGTGATGAAGCGGCTTAAACAT  
TGGAAGAGACCGCACGGGCGGTGAAAAATCTATAAGTTTATCGTGA

**Ek 2. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinaz geninin amino asit sırası**

MGKKYVIGIDYGTESGRAVLVDLEGNEIADHVTPYHHGVIDEVLPEENVQLEPDWALQHPG  
DYIEVLATAVPAVLQKSGVNPADVIGVGIDFTACTMLPISGSGEPLCLKPEFKHRPHSWVK  
LWKHHAQDEANLLNEMAAKRGEAFLPRYGGKISSEWMIAKIWQILNEDPDIYDQTDLFLE  
ATDWVIFKMTGQLVRNSCTAGYKSIWHKQDGYPSEFFRALDPRLEHLTESKLRGSIVPLG  
TRAGVLTKEMAAMMGLLPGTAVAVGNVDAHAAPGVGVVEPGKMVMAMGTSICHMLLGTEE  
KYVEGMCVVVEDGIIIPGYFGYEAGQSAVGDIFAWYVEQSVPAYVKEAAEKEGVSVHEWLEK  
RAAAYRPGETGLLALDWWNGNRSVLVDTDLTGLIIGYTLLTKPEEIYRALLEATAFGTRKI  
IDAFVGSGINVDELYACGGLPQKNKLLMQIYADVNTREIKIAASKQTPAVGAAMFAAVAAG  
KENGYESII EAARNMGKVREETFKPIPENVAIYEQLYQEYTKLHDYFGRGENDVMKRLKH  
WKETARAVKKSISLS



## **ÖZGEÇMİŞ**

1986 yılında Ordu'da doğdu. İlkokulu Alanyurt İlköğretim Okulunda, ortaokulu Malatya Atatürk İlköğretim Okulunda okudu. Lise eğitimini, 2004 yılında Malatya Süper Lisesi'nde tamamladı. 2005 yılında Kafkas Üniversitesi Biyoloji Bölümünde yüksek öğrenimine başladıktan bir yıl sonra Karadeniz Teknik Üniversitesi'ne yatay geçiş yaptı. 2009 yılında yine aynı üniversitede yüksek lisans eğitimine başladı ve halen burada yüksek lisans eğitimine devam etmektedir. İyi derecede İngilizce bilmektedir.