

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS* 12 SUŞUNDAN İKİ FARKLI
ALFA-L-ARABİNOFURANOSİDAZ GENİNİN KLONLANMASI,
EKSPRESYONU, SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İclal ŞAHİN

OCAK 2014

TRABZON

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS* 12 SUŞUNDAN İKİ FARKLI
ALFA-L-ARABİNOFURANOSİDAZ GENİNİN KLONLANMASI,
EKSPRESYONU, SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Biyolog İclal ŞAHİN

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

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 02.01.2014
Tezin Savunma Tarihi : 31.01.2014

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI

Trabzon 2014

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalında

İclal ŞAHİN tarafından hazırlanan

***GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS* 12 SUŞUNDAN İKİ FARKLI
ALFA-L-ARABİNOFURANOSİDAZ GENİNİN KLONLANMASI,
EKSPRESYONU, SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 07 /01 / 2014 gün ve 1536 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 ÇANAĞCI

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Geobacillus stearothermophilus 12 suşundan iki farklı alfa-L-arabinofuranosidaz geninin klonlanması, ekspresyonu, saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmalarını içeren bu araştırma, 2010 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında hem bilimsel anlamda yol göstericilik yapan hem de maddi ve manevi desteğini gördüğüm danışman hocam Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI'ya; çalışmaların her aşamasında her türlü bilgi ve desteğini esirgemeyen hocam Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ'e ve Doç. Dr. Elif SEVİM'e teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Tez çalışmasının her alanında hem maddi hem de manevi desteklerini gördüğüm Yrd. Doç. Dr. Kadriye İNAN'a, Arş. Gör. Dilşat Nigar ÇOLAK'a, Arş. Gör. Fulya AY ŞAL'a, Arş. Gör. Halil İbrahim GÜLER'e, Müslüm TOKGÖZ'e, Aycan AŞIK'a, daha önce çalışmış ve halen çalışmakta olan tüm laboratuvar arkadaşlarıma her türlü destekleri için çok teşekkür ederim.

Ayrıca bu süreçte her türlü zorluğu benimle beraber göğüsleyen ve her adımda benimle olan ve olmaya devam edeceğini bildiğim sevgili aileme sonsuz teşekkürlerim sunuyorum. Verdiğiniz emekler ve yaptığınız büyük fedakarlıklar için çok teşekkür ederim.

İclal ŞAHİN
Trabzon, 2014

TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum ‘‘*Geobacillus stearothermophilus* 12 Suşundan İki Farklı alfa-L-Arabinofuranosidaz Geninin Kolonlanması, Ekspresyonu, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu’’ başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI’nın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.
31/01/2014

İclal ŞAHİN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VII
SUMMARY	VIII
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	IX
TABLolar LİSTESİ	X
SEMBOLLER VE KISALTMALAR	XI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Termofilik Bakteri Olarak <i>Geobacillus</i> 'lar	2
1.3. Termofilik Organizmalar ve Biyoteknolojideki Kullanımları.....	2
1.4. Arabinofuranosidaz Enzimi.....	3
1.5. α -L-Arabinofuranosidazların Çalışma Mekanizmaları	5
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	8
2.1. Mikroorganizmalar	8
2.1.1. <i>Geobacillus stearothermophilus</i> 12	8
2.1.2. <i>Escherichia coli</i> DH5 α	8
2.1.3. <i>Escherichia coli</i> BL21 (D3) LysS.....	8
2.2. Plazmitler.....	8
2.2.1. pGEM [®] -T Easy Klonlama Vektörü.....	8
2.2.2. pET28a+ Ekspresyon Vektörü	9
2.3. Kullanılan Besiyerleri, Kimyasallar ve Antibiyotikler.....	10
2.3.1. Kimyasallar	10
2.3.2. Antibiyotikler	11
2.4. Arabinofuranosidaz Proteinlerinin Tespiti	11
2.5. Genomik DNA İzolasyonu	12
2.6. <i>Geobacillus stearothermophilus</i> 12 <i>abf1</i> ve <i>abf2</i> Genlerinin Çoğaltılması.....	13
2.7. DNA Fragmentlerinin pGEM [®] -T Easy Vektörüne Klonlanması.....	19

2.8.	<i>E. coli</i> DH5 α 'ya Transformasyon.	19
2.9.	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> 12 <i>abf1</i> ve <i>abf2</i> Genlerinin Ekspresyonu.....	20
2.9.1.	<i>abf1</i> ve <i>abf2</i> Genlerinin Çoğaltılması.	20
2.9.2.	<i>abf1</i> ve <i>abf2</i> PCR Fragmentlerinin pET28a+ Vektörüne Klonlanması	20
2.9.3.	<i>abf1</i> ve <i>abf2</i> Genlerinin <i>E. coli</i> BL21 Hücresinde Ekspresyonunun Belirlenmesi.....	21
2.10.	Abf1 ve Abf2 Proteinlerinin Saflaştırılması.....	22
2.10.1.	Ni-NTA Kromatografisi.....	22
2.11.	Abf1 ve Abf2 Enzimlerinin Karakterizasyonu.....	23
2.11.1.	Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	23
2.11.2.	Protein Tayini	23
2.11.3.	Reaksiyonlarda Kullanılacak Enzim Miktarının Belirlenmesi.....	24
2.11.4.	Enzimlerin Optimum Sıcaklık ve Isıl Stabilitesi ile Optimum pH ve pH Stabilite Değerlerinin Belirlenmesi	24
2.11.5.	Kimyasal Ajanların ve Metal Katyonların Etkisi	24
2.11.6.	Substrat Spesifikliği	25
3.	BULGULAR	25
3.1.	<i>abf1</i> ve <i>abf2</i> 'nin Tam Gen Dizisinin Belirlenmesi	26
3.2.	Abf1 ve Abf2 Proteinlerinin Saflaştırılması.....	28
3.3.	Abf1 ve Abf2 Enzimlerinin Karakterizasyonu.....	29
3.3.1.	Protein Tayini	29
3.3.2.	Reaksiyonlarda Kullanılacak Enzim Miktarının Belirlenmesi.....	29
3.3.3.	Optimum Sıcaklık.....	29
3.3.4.	Optimum pH.....	30
3.3.5.	Enzim Kinetiği	32
3.3.6.	pH Kararlılığı	34
3.3.7.	Isıl Kararlılığı	36
3.3.8.	Aktivatör ve İnhibitör Etkisi.....	37
3.3.9.	Substrat Spesifikliğinin Belirlenmesi	39
4.	TARTIŞMA.....	41
5.	SONUÇLAR	47
6.	ÖNERİLER	49
7.	KAYNAKLAR.....	50

ÖZGEÇMİŞ

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

Geobacillus stearothermophilus 12 SUŞUNDAN İKİ FARKLI
ALFA-L-ARABİNOFURANOSİDAZ GENİNİN KLONLANMASI, EKSPRESYONU,
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

İclal ŞAHİN

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI
2014, 54 Sayfa

Gerçekleştirilen bu çalışmada, daha önce yapılan çalışmalarla iki adet arabinofuranosidaz enzimine sahip olduğu belirlenen *Geobacillus stearothermophilus* 12 bakterisinin bu her iki enzimine ait olan gen dizileri öncelikle ortaya çıkarıldı. Her bir gen bir *E. coli* ekspresyon vektörü olan pET28a'ya klonlanarak *E. coli* BL21 pLys hücresi içinde ekspres edildi. Ekspres edilen proteinler sahip oldukları histidin kuyruktan faydalanılarak afinite kromatografisi yardımıyla saflaştırıldı. Saflaştırılan proteinlerin karakterizasyonları gerçekleştirildi. Her iki enzimin de 56-57 kDa civarında olduğu, optimum çalışma sıcaklıklarının birbirlerinden farklı olup Abf1'in optimum olarak 65°C'de, Abf2'nin ise 50°C'de aktivite gösterdiği, optimum çalışma pH'larının ise Abf1'in 6,5; Abf2'nin ise 5,5 olduğu belirlendi. Abf 1'in 6,0'nın üzerindeki pH'larda uzun süre kararlı olduğu, buna karşı Abf2'nin pH kararlılığının iyi olmadığı tespit edildi. Her iki enzimin de substrat olarak p-NP α -L arabinofuranosidden başka bir substratı kullanmadığı görüldü.

Anahtar Kelimeler: *Geobacillus stearothermophilus* 12, α -L arabinofuranosidaz, enzim saflaştırılması, enzim karakterizasyonu

Master Thesis

SUMMARY

CLONING, EXPRESSION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION of TWO
DIFFERENT ALPHA-L-ARABINOFURANOSIDASE GENES FROM *Geobacillus*
stearothermophilus 12 STRAIN

İclal ŞAHİN

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Assoc. Prof. Sabriye ÇANAKÇI
2014, 54 Pages

This study, firstly, finds out the gene sequence of two arabinofuranosidase enzymes belonging to the bacteria called *Geobacillus stearothermophilus* 12 which has been found out to have these two enzymes in former studies. On the basis of these sequences, each gene is expressed in the cell of *E. coli* BL21 plys by cloning them to pET28 which is an *E.coli* expression vector. The proteins expressed were purified via affinity chromatography and by making use of their Histidine Tag. The characterization of these purified proteins was done. In this study, it is shown that both enzymes are about 57 kDa and that they have different optimum activation temperature. The optimum activation temperature of Abf1 is 65°C whereas it is 50°C for Abf2. Moreover, it is found out that the optimum PH activation of Abf1 is 6,5 and it is 5,5 for Abf2. It is also identified that Abf1 is stable a long time at pH over 6,0 but the pH stability of Abf2 is not good. It is also observed that both enzymes do not use any substrate other than pNP a-L arabinofuranosidase.

Key Words: *Geobacillus stearothermophilus* 12, α -L arabinofuranosidase, enzyme purification, enzyme characterization

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Mısır kepeğinin heteroksilanının şematik yapısı.....	4
Şekil 2. Glikozidazların genel mekanizmaları.....	7
Şekil 3. pGEM-T Easy vektörünün şematik görünümü.....	9
Şekil 4. pET28a+ ekspresyon vektörünün şematik görünümü.....	10
Şekil 5. Native jelde <i>G. stearothermophilus</i> 12 arabinofuranosidaz aktivitesi	12
Şekil 6. <i>abf1</i> geninin nükleotit ve amino asit sırası	26
Şekil 7. <i>abf2</i> geninin nükleotit ve amino asit sırası	28
Şekil 8. Abf1 ve Abf2 enzimlerinin SDS-PAGE Görüntüsü.....	31
Şekil 9. Abf1 enzimi-optimum sıcaklık grafiği	30
Şekil 10. Abf2 enzimi-optimum sıcaklık grafiği	30
Şekil 11. Abf1 enzimi-optimum pH grafiği	31
Şekil 12. Abf2 enzimi-optimum pH grafiği	31
Şekil 13. Abf1 enzimi <u>Michaelis-Menten</u> grafiği	32
Şekil 14. Abf1 enzimi Linnerweaver-Burk grafiği.....	33
Şekil 15. Abf2 enzimi <u>Michaelis-Menten</u> grafiği	34
Şekil 16. Abf2 enzimi Linnerweaver-Burk grafiği.....	34
Şekil 17. Abf1 enzimi- Arabinan Linnerweaver-Burk grafiği	35
Şekil 18. Abf2 enzimi- Arabinan Linnerweaver-Burk grafiği	35
Şekil 19. Abf1 enzimi-pH kararlılığı grafiği	36
Şekil 20. Abf2 enzimi-pH kararlılık grafiği	37
Şekil 21. Abf1 enzimi-ısı kararlılığı grafiği	38
Şekil 22. Abf2 enzimi-ısı kararlılık grafiği	38
Şekil 23. Abf1 enzime aktivatör ve inhibitör etkisi.....	39
Şekil 24. Abf2 enzime aktivatör ve inhibitör etkisi.....	39

TABLÖLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Heteroksilanların parçalanmasında görev alan enzimler.....	4
Tablo 2. Çalışmada kullanılan antibiyotikler.....	11
Tablo 3. Çalışmada kullanılan primerler ve plazmitler	14
Tablo 4. <i>abf1</i> geninin çoğaltılması için kullanılan PCR reaksiyonu karışımı	16
Tablo 5. <i>abf1</i> geninin çoğaltılması için kullanılan PCR protokolü.....	16
Tablo 6. İnvers PCR için genomik DNA kesimi	17
Tablo 7. Self- Ligasyon protokolü.....	17
Tablo 8. İnvers PCR için kullanılan PCR reaksiyonu karışımı	18
Tablo 9. İnvers PCR protokolü.....	18
Tablo 10. Ligasyon reaksiyonu	19

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

a.a.	: Amino acid
Abf1	: Arabinofuranosidase1
Abf2	: Arabinofuranosidase2
bç	: Baz çifti
BSA	: Bovine serum albumin
DNA	: Deoksiribonükleic Asit
dNTP	: Deoxyribonucleotide triphosphate
DTT	: Dithiothreitol
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
HCl	: Hidroklorür
IPTG	: Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
Kan	: Kanamysin
kDa	: Kilodalton
LB	: Luria Broth
M	: Molar
MALDI-TOF	: <u>Matrix-assisted laser desorption/ionization</u> - Time-of-flight
mg	: Miligram
mM	: Milimolar
Ni-NTA	: Nickel- Nitroloacetic acid
nm	: Nanometer
OD	: Optical Density
PAGE	: Polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	: Polymerase Chain Reaction
rRNA	: ribozomal Ribonükleic Acid
SDS	: Sodium dodecyl sulfate
U	: Unit
UV	: Ultraviyole
X-Gal	: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside
μ l	: Mikroliter
μ M	: Mikromolar

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

16S rRNA dizin analizleri dikkate alındığında, çoğu termofilik türün *Bacillus* rRNA grup 5'e ait olduğu görülmektedir (Ash vd., 1991; Rainey vd., 1994). Bu bakterilerin çoğu daha sonra *Geobacillus* olarak tekrar isimlendirilerek, sınıflandırılmaya katılmıştır (Nazina vd., 2001). Bunlar: *Geobacillus stearothermophilus*, *G. thermoglucosidasius*, *G. thermodenitrificans* (Manachini vd., 2000), *G. kaustophilus*, *G. thermocatenulatus* ve *G. thermoleovorans* (Maugeri vd., 2000).

Bacillus cinsine ait olan termofilik bakteriler 60°C ve üstü yüksek sıcaklıklarda büyüme göstermektedirler. Yüksek sıcaklıklarda büyüme gösteren bu *Bacillus* cinsi bakteriler kaplıcalardan, kükürt kaynaklarından, jeotermal olarak sıcak olan topraklardan ya da insan kaynaklı termal sistemlerden izole edilmektedirler (Hjörleifsdottir ve arkl., 1989; Marteinson ve arkl., 1996; Maugeri vd., 2000). Bu bakteriler termal kararlı enzimleri (proteazlar, amilazlar, pullulanazlar, glukoz-izomerazlar, glukoz hidrolazlar, ksilanazlar ve DNA restriksiyon endonükleazlar) ve endüstriyel kullanıma sahip ekzopolisakkaritleri nedeni ile biyoteknolojik öneme sahiptirler (Harwood, 1989; Sharp vd., 1992; Maugeri vd., 2000).

Son yıllarda, ksilan degrade eden enzimler, tarımsal alanlardaki pratik uygulamaları nedeni ile oldukça dikkat çekici olmuşlardır. Hemiselulozlar, lignoselulozik biyomasın yaklaşık %20-35'ini meydana getiren ve önemli ölçüde yenilenebilir bir biyomas polimeridir, bu özellikte olan bir diğer polimer de selülozdur (Ward ve Moo-Young, 1989). L-arabinosil rezidüleri tıpkı arabinan, arabinoksilan, gum arabik ve arabinogalaktanda olduğu gibi, hemiselulozlar içerisinde de geniş miktarda yayılmıştır. (Saha, 2000).

α -L-arabinofuranosidazlar (EC 3.2.1.55) arabinoksilan, arabinogalaktan ve L-arabinan gibi hemiselulozları parçalayan enzimlerdir, α -L-arabinofuranozidik bağları kırması ve diğer enzimler ile sinerjistik çalışması hemiseluloz ve pektinlerin tamamen hidroliz edilmesine izin vermektedir. α -L-arabinofuranosidazlar bitki, bakteri ve mantarlarda bulunmaktadır.

α -L-arabinofuranosidazlara karşı büyüyen ilginin sebebi çeşitli endüstriyel işlemlerde kullanılabilmesidir. Bu işlemler arasında L-arabinozun katkı maddesi olarak

kullanılması, monoterpenollerin hidrolizi ile şarabın aromasının artırılması, meyve sularının berraklaştırılması, ekmeğin bayatlamasının geciktirilmesi, hayvansal besin sindiriminin geliştirilmesi ve kağıt hamuru delignifikasyonunun artırılması bulunmaktadır. (Amore vd., 2012).

1.2. Termofilik Bakteri Olarak *Geobacillus*'lar

Oldukça geniş bir cins olan *Bacillus* cinsi, zaman ile yeni cinslere ayrılmıştır. Bunlar: *Alicyclobacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Virgibacillus*, *Salibacillus*, *Gracilibacillus*, *Ureibacillus* ve *Geobacillus* (Nazina vd., 2001). Bu cinsler 16S rRNA dizi analizleri esas alınarak, filogenetik gruplara ayrılmıştır. Orijinal *Bacillus* cinsi aerobik ve fakültatif anaerobik, çubuk şeklinde, gram-pozitif (ya da gram-değişken) endospor meydana getirebilen bir cinstir (Claus ve Berkeley, 1986; Banat vd., 2004). Bu cins aynı zamanda, termofilik, sakrofilik, asidofilik, alkalofilik, heterotropik veya ototropikal büyüme gösterebilmek için geniş bir karbon kaynağı kullanım özelliğine sahip tatlı su ve halofilik bakteri türlerini de içinde barındırmaktadır. (Nazina vd., 2001).

Daha önce *Bacillus* grup 1 ve grup 5'te bulunan organizmaların çoğu termofilik, aerobik ve spor meydana getiren türlerdir. Termofilik basiller ile ilgili yapılan taksonomik çalışmalar sonunda *Geobacillus stearothermophilus*'u tip türü kabul eden yeni bir cins olan *Geobacillus* cinsi ortaya çıkarılmıştır.

Geobacillus'lar aerobik ve fakültatif anaerobik, çubuk şeklinde, tek ya da kısa bir zincir oluşturan, gram pozitif ya da gram değişken, elipsel ya da silindirik spor oluşturabilen, bir bakteridir. Sporlarının hücredeki yeri terminal ya da subterminal olabilmektedir. Kemoorganotropik canlılardır. Fakültatif termofiliktirler. Büyüme sıcaklıkları 37–75°C arasında olmak ile birlikte optimum büyüme sıcaklıkları 55–65°C arasındadır. Optimum pH aralıkları 6,2–7,5'dir. % 48,2–58 G:C oranına sahiptirler (Nazina vd., 2001).

1.3. Termofilik Organizmalar ve Biyoteknolojideki Kullanımları

Termofilik bakteriler toprakta ve volkanik habitatlarda yaygın olarak mevcuttur ve sınırlı bir tür kompozisyonları bulunmaktadır. Buna rağmen ana besinsel içeriklerin

hepsinde büyüyebilir ve mezofilik bakteriler ile aynı substratları metabolize edebilirler. 60⁰C üzerindeki optimal büyüme sıcaklıklarında gösterdikleri çoğalabilme kabiliyetleri, bu gibi yüksek sıcaklıklarda dahi kararlı olabilen makramoleküllere sahip olmalarından kaynaklanmaktadır.

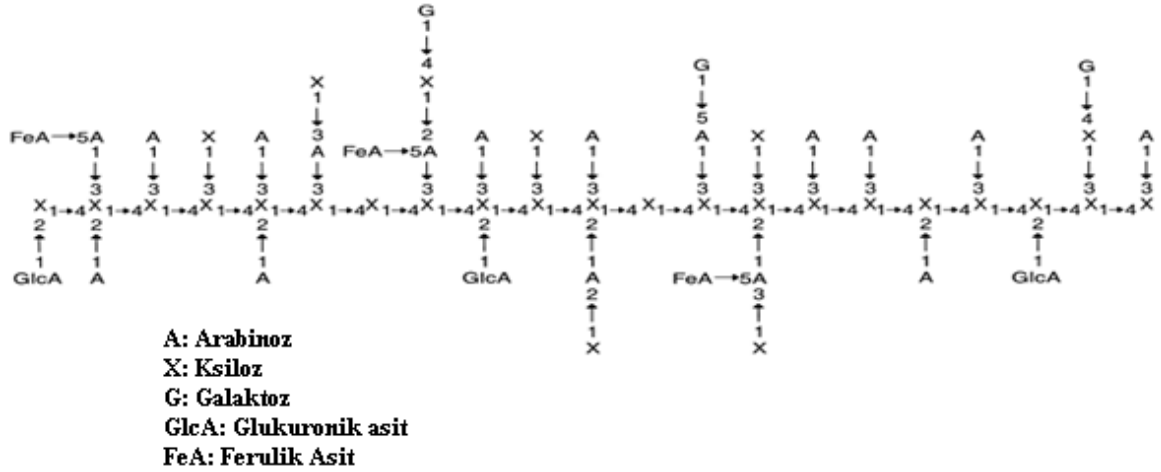
Termofilik bakterilerin yüksek sıcaklıklarda büyümelerinin ve eşsiz makromoleküllere sahip olmalarının bir takım sonuçları bulunmaktadır: 1. metabolizma hızları yüksektir, 2. sahip oldukları enzimler fiziksel ve kimyasal olarak kararlıdır ve 3. mezofilik türlerden daha yüksek miktarda son ürün meydana getirirlerken, bunlardan daha düşük bir büyüme hızına sahiptirler. Termofilik işlem süreçleri oldukça kararlı, hızlı ve mali açıdan ucuz bir şekilde gerçekleşirken; reaktant aktiviteyi ve ürün eldesini kolaylaştırır.

Termofilik bakteriler; kimyasal hammadde ve yakıt üretiminde, atıkların biyolojik dönüşümünde, enzim teknolojisinde ve tek hücre proteinlerinin üretiminde kullanılmaktadırlar (Zeikus, 1979).

Endüstrideki enzimlerin teknik uygulamalarda kullanılabilmeleri için çeşitli sıcaklık ve pH aralıklarında, ortamda tuz, alkali ve yüzey maddeleri bulunduğunda çalışıp çalışmadıklarına bakmak gerekir. Enzimlerin ana uygulamaları, yüksek sıcaklık, düşük tuz konsantrasyonu, düşük alkalın şartlar ve yüzey aktif maddelerinin bulunup bulunmaması üzerine yoğunlaşmaktadır (Iyer ve Ananthanarayan, 2008).

1.4. Arabinofuranosidaz Enzimi

Hemiselulozlar doğada geniş ölçüde bulunmaktadır. Yenilenebilir ve sürdürülebilir bir enerji kaynağı olmalarından dolayı da, araştırmacılar tarafından son zamanlarda oldukça ilgi gösterilen bir kaynak olmuştur. Çoğu tarımsal hammadde ve atık, hemiseluloz içermektedir (mısır koçanı, mısır kabuğu, pirinç kepeği ve buğday kepeği). Bunların hepsi yüksek miktarlarda da ksilan içermektedir (Raweesri vd., 2008). Bundan dolayı da arabinofuranosidazlar olmadan sadece endo-ksilanazlar ile parçalanmaları kolay değildir (Liab vd., 2000; de lima Damasio vd., 2013).



Şekil 1. Mısır kepeğinin heteroksilanının şematik yapısı (Saulnier vd.'den alıntı, 1995, Elsevier Science izni ile.)

Ksilanlar, bitki hücre duvarının ana heteropolisakkarit yapıdaki bileşenlerinden biri olmasının yanında ikincil hücre duvarında yüksek miktarda bulunmaktadır, yapısında düz β -D-(1,4)-bağlı ksilopiranosid omurgasına bağlı (1,2)- ya da (1,3)-bağlı α -L-arabinofuranosil, α -D-glukuronik asit, O-2- ve/veya O-3-bağlı asetat grupları bulunmaktadır. Ayrıca biyomasın kaynağına göre değişik yapılar da içermektedir (Zhou vd., 2012). Bu heterojen içerikten dolayı, arabinoksilanın enzimatik degradasyonu, dalları kıran ve depolimerize edici enzimlere ihtiyaç duymaktadır (de Lima Damasio vd., 2013)

Hemiselulozun tamamen parçalanması için ana omurgayı depolimerize eden bu enzimler; endoksilanazlar (EC 3.2.1.8), β -ksilosidazlar (EC 3.2.1.37) ve glukuronoksilan hidrolazlar (EC 3.2.1.136) ile ksilan omurgasındaki diğer atomları hidroliz edebilen α -L-arabinofuranosidazlar (EC 3.2.1.55), asetilksilan esterazlar (EC 3.1.1.72), feruloyil esterazlar (EC 3.1.1.73) ve α -glukuronidazlardır (EC 3.2.1.39).

Tablo 1. Heteroksilanların parçalanmasında görev alan enzimler

Enzim	Görevi
Endo-ksilanaz	Ksilan omurgasındaki β -1,4-ksiloz bağlarını parçalamak
Ekzo-ksilanaz	Ksilobiyoz açığa çıkaran β -1,4-ksiloz bağlarını kırmak
β -Ksilosidaz	Kısa zincirli ksilooligosakkaritlerden ve ksilobiyozdan ksiloz açığa çıkarmak
α -Arabinofuranosidaz	Arabinoksilanlardaki terminal indirgenmeyen α -arabinofuranozu parçalamak
α -Glukuronidaz	Glukuronoksilanlardan glukuronik asit açığa çıkarmak
Asetilksilan esteraz	Asetil ksilanlardaki asetilester bağlarını kırmak
Ferulik asit esteraz	Ksilanlardaki feruloyilester bağlarını kırmak
<i>p</i> -Kumarik asit esteraz	Ksilanlardaki <i>p</i> -Kumaril ester bağlarını kırmak

Bu enzimlerden arabinofuranosidazlar ksilan omurgasındaki arabinofuranosil ünitelerini uzaklaştırmaktadır, böylece endoksilanaz hidrolizi kolaylaşmakta ve ksilosidaz/arabinofuranosidaz'ın bifonksiyonel kapasitesi sayesinde hücre duvarı materyalinin tamamen hidrolizi mümkün olmaktadır (Zhou vd., 2012).

α -L-arabinofuranosidazlar (EC 3.2.1.55) ekzo hemiselulazlardır. Bu enzimler arabinan, arabinogalaktan ve heteroksilan içeren değişik oligosakkarit ve polisakkaritlerden arabinofuranosil açığa çıkarmak için terminal α -1,2, α -1,3 ve α -1,5 bağlarını hidroliz etmektedir (Kaji, 1984; dos Santos, 2011). α -L-arabinofuranosidazlar diğer glikozit hidrolazlar ile beraber çalışmaktadır. Beraber çalıştıkları bu enzimler; arabinanazlar (EC 3.2.1.99) ve ksilanazlardır (EC 3.2.1.8). Bu enzimler hayvansal besin stoklarının sindirimini geliştirilmesini içeren tarımsal işlemlerde, kağıt hamurunun delignifikasyonunda, şarap yapımı sürecinde aromanın artırılmasında, meyve sularının berraklaştırılmasında, biyoyakıt üretimi için lignoselulosik biyomasın fermente edilebilir şekerlere indirgenmesinde kullanılabilir olmaları (Sheehan ve Himmel 1999; dos Santos, 2011) ve antiglitematik etki göstermeleri (Seri vd., 1996) sebebi ile dikkat çekici olmuşlardır (Çanakçı vd., 2008).

Termal kararlı α -L-arabinofuranosidazlar çoğu kullanım için yüksek sıcaklığa ihtiyaç duymaktadır. Çünkü yüksek sıcaklık reaksiyon hızını ve substrat çözünürlüğünü artırırken kontaminasyon riskini azaltmaktadır (Beguin ve Aubert 1994). Bu nedenlerden dolayı α -L-arabinofuranosidazlar endüstriyel olarak oldukça ilgi çekmektedirler (dos Santos, 2011).

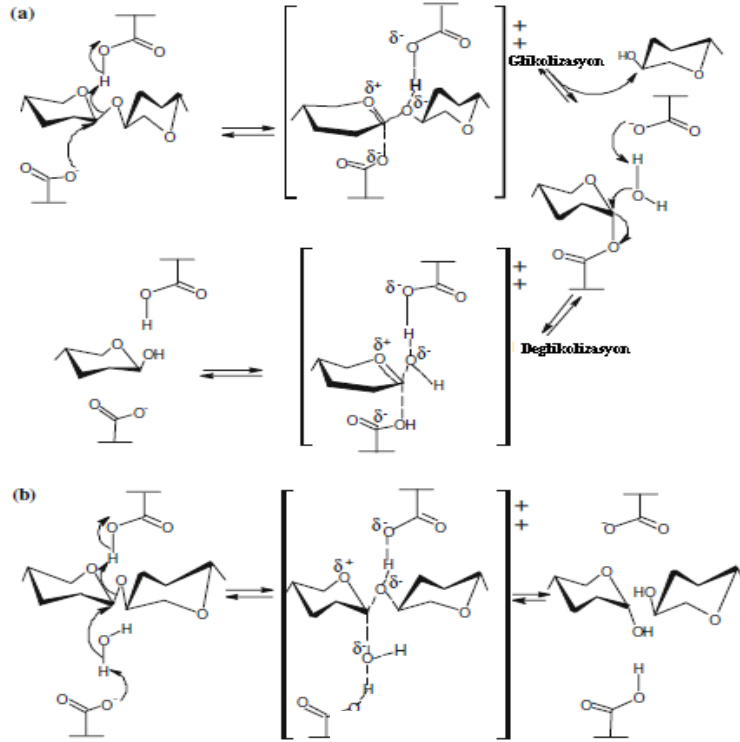
1.5. α -L-Arabinofuranosidazların Çalışma Mekanizmaları

Diğer glikozit hidrolazlarda olduğu gibi, α -L-AFazlar da asit-baz destekli kataliz yöntemi içeren 2 esas mekanizmayı kullanarak glikozidik bağı kırmaktadır. Bu iki yöntem ya tamamen tutulmaya ya da anomerik şeklin inversiyonuna sebep olmaktadır (de Groot vd., 2000; Zechel ve Withers, 2000). Her iki mekanizmada da, Şekil 2'de gösterildiği gibi, hidroliz genellikle 2 karboksilik aside ihtiyaç duyar ki bu asitler her glikozit hidrolaz ailesinde (Rye ve Withers, 2000) bulunmaktadır ve ekzokarboxonyum iyonu benzeri transisyon durumu boyunca devam etmektedir (Piston vd.,1996; Rye ve Withers, 2000; Zechel ve Withers, 2000; Shallom vd., 2002).

GH3, GH51 ve GH54 ailelerinin üyelerinden olan ve iki basamaklı çift-yer değişimli mekanizmayı kullanarak glikozidik bağı kıran diğer α -L-AFazlar Şekil 2a'da

gösterilmektedir. Bu da kristal yapı çalışmaları ile doğrulanmıştır. GH51 ailesinde yer alan enzimlerin reaksiyon yollarındaki anlar Hövel ve ark. (Hövel vd., 2003) tarafından tanımlanmıştır. Reaksiyonun (glikolizasyon) ilk basamağında, asit-baz rezidüsü genel bir asit gibi iş görür, glikozidik oksijeni protonlar ve ayrılan grubun kararlılığını sağlar. Substratın karşı anomerik şekli ile kovalent bir glikozil enzim ortamı meydana gelince, nükleofilik rezidü, kesilen zincirin anomerik karbonuna saldırır. İkinci basamakta (deglikolizasyon), genel bir baz gibi iş gören asit-baz rezidüsü su molekülünü aktifleştirir ve böylece su molekülü orijinal bağın aynı doğrultusunda bulunan glikozil enzim ortamının anomerik merkezine saldırır, bu merkez anomerik şeklin overall retentionu ile şekerlerin serbestleşmesini sağlar (Ferchichi vd., 2003; Hövel vd., 2003).

GH43 ailesinde bulunan inverting a-L-AFazlar tekli-yer değiştirme mekanizmasını kullanır. Bu mekanizmada, ayrılan aglikon ile protonlanan genel bir katalist asit gibi davranan diğer karboksil asitlerin aksine, tek bir karboksilat, genel bir katalist baz gibi davranır, proton kaybeden nükleofilik su molekülü, bağa saldırır (Şekil. 2b) (Shallom vd., 2002; Zechel ve Withers, 2000; Numan ve Bhosle, 2006).



Şekil 2. Glikozidazların genel mekanizmaları: a:Tutulma mekanizması, b:İnvert mekanizma. Ref.'tan alıntı. (98).

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Mikroorganizmalar

2.1.1. *Geobacillus stearothermophilus* 12

Geobacillus stearothermophilus 12 bakterisi Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ), Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji laboratuvarınca izole edildi ve bu laboratuvarında stoklanmaktadır.

2.1.2. *Escherichia coli* DH5α

E. coli DH5α suşu klonlama hücresi olarak kullanıldı. DH5α *fhuA2* $\Delta(\text{argF-lacZ})$ U169 *phoA glnV44* Φ 80 $\Delta(\text{lacZ})$ M15 *gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17* genotipik özelliklere sahiptir. JM101 $\Delta(\text{LacZ})$ M15 genini içerir ve böylece rekombinant plazmitlerin mavi veya beyaz koloni görünümüne izin verir.

2.1.3. *Escherichia coli* BL21 (D3) LysS

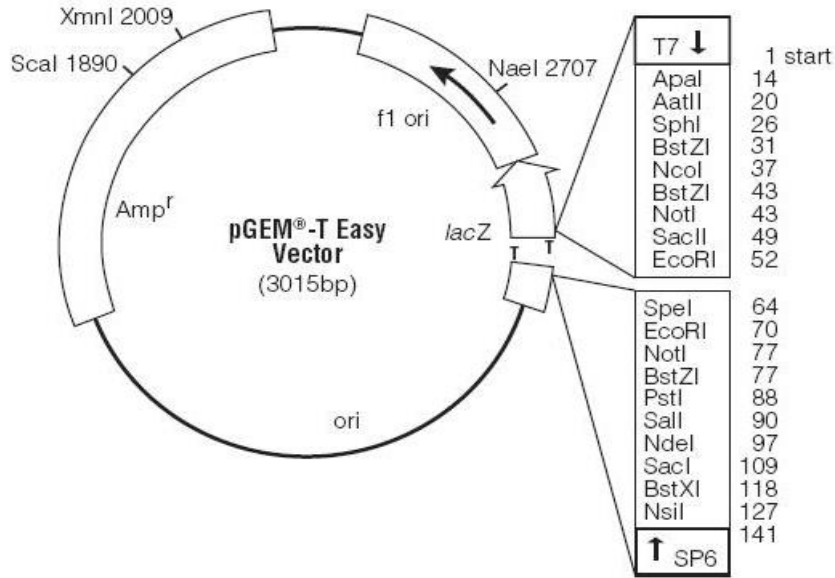
Çalışmada *G. stearothermophilus* 12 Abf1 ve Abf2 proteinin ekspresyonu, F⁻, *ompT*, *hsdS_B*, (rB⁻ mB⁻), *gal*, *dcm* (DE3), pLysS (Cam^R) fenotipik özelliğe sahip *E. coli* BL21 (D3) LysS suşunda gerçekleştirildi.

2.2. Plazmitler

2.2.1. pGEM[®]-T Easy Klonlama Vektörü

pGEM[®]-T Easy (Promega) vektörü PCR ürünlerinin klonlanmasında kullanıldı. pGEM[®]-T Easy PCR ürünlerinin klonlanması için uygun bir sistemdir. Bu vektör pGEM[®]-5Zf(+) vektörünün *EcoRV* ile kesimi ve 3' uçlarına terminal timin bazlarının ilavesi ile

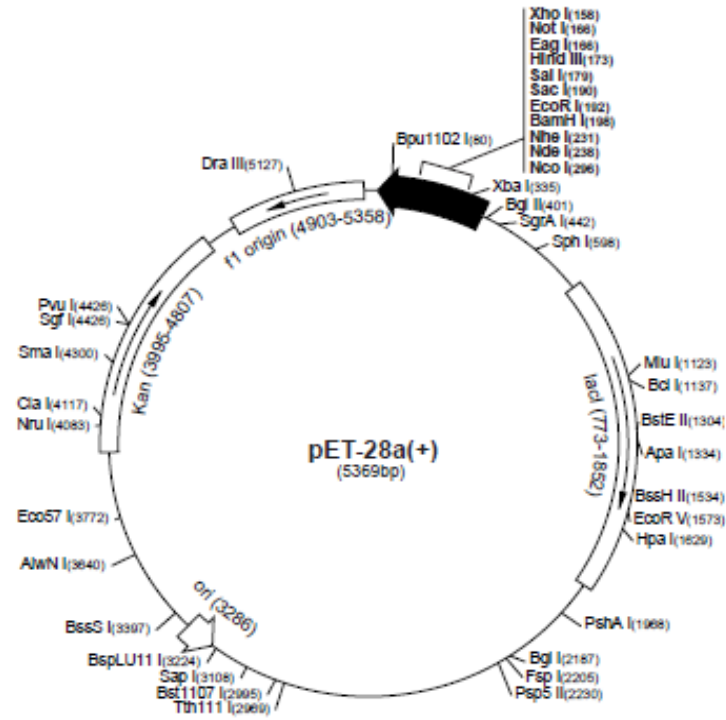
türetilmiştir. pGEM[®]-T Easy vektörü T7 ve SP6 RNA polimeraz promotorlarının kuşattığı ve içerisinde çoklu restriksiyon kesim bölgesinin bulunduğu β -galaktosidaz enziminin α -peptidini kodlayan gen bölgesini içerir. α -peptidinin inaktivasyonu rekombinant klonların renk değişimi ile kolayca seçilebilmesine olanak tanır (Şekil 3).



Şekil 3. pGEM-T Easy vektörünün şematik görünümü

2.2.2. pET28a+ Ekspresyon Vektörü

Güçlü T7 RNA polimeraz promotor bölgesi içeren pET28a+, yüksek seviyede protein ekspresyonuna izin verir. Ayrıca vektör N-terminal ve C-terminal uçlarında his taq kuyruğu içerir ve bu özelliği ile proteinlerin nikel kolon kromatografisi ile kolay ve hızlıca saflaştırılmasına imkan verir. Çalışmada *abf1* ve *abf2* genlerinin ekspresyonu için kullanılan bu vektör kanamisin direnç geni taşımaktadır (Şekil 4).



Şekil 4. pET28a+ ekspresyon vektörünün şematik görünümü

2.3. Kullanılan Besiyerleri, Kimyasallar ve Antibiyotikler

2.3.1. Kimyasallar

Çalışmada kullanılan diğer kimyasallar; Tris-HCl, Sükroz, Lizozim, Akrilamit, Bis-Akrilamit, Glisin, Trizma Baz, Gliserol, Coomassie Brilliant Blue R-250, Coomassie Brilliant Blue G-250, Kloroform, İzamiloalkol, Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA), Sodyum Asetat, Amonyum Asetat, IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside), X-Gal (5-bromo 4-chloro 3-indolyl beta D-galactopyranoside), Brom Fenol Blue, Agaroz, Sodyum dedosil sülfat (SDS), Metanol, Asetik asit, Etanol, Etidyum bromür, orto-nitrofenil galaktosidaz, Sodyumbikarbonat, Sodyum fosfat, Potasyum klorür, Magnezyum sülfat, DTT, Triton X-100, Sodyum deoksikolat, Sodyum sarkosil, Magnezyum klorür Sigma firmasından; Amonyum persülfat, Beta-merkaptotanol, Glukoz, Sodyum hidroksit, *p*NP-alfa-L-arabinopiranosid, *p*NP- β -L-arabinopiranosid, *p*NP- β -D-galaktopiranosid, *p*NP- β -D-ksilopiranosid, *p*NP-N-acetil- β -D-glukosaminid, *p*NP- β -D-fucopiranosid, *p*NP-alfa-D-galaktopiranosid, *p*NP-alfa-D-glukopiranosid, *p*NP- β -D-glukopiranosid, *p*NP-alfa-L-ramnopiranosid, *p*NP-alfa-D-ksilopiranosid ve *p*NP-alfa-L-arabinofuranosid,

metilumbelliferil α -L arabinofuranosid, Kalsiyum klorür, Sodyum klorür Merck firmasından; çalışmada kullanılan restriksiyon endonükleaz enzimleri, tamponları ve BSA New England Biolab firmasından, dTTP, dATP, dCTP, dGTP Fermentas firmasından sağlandı.

2.3.2. Antibiyotikler

Çalışmada kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları aşağıdaki Tablo 2' de verilmiştir.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan antibiyotikler

Antibiyotikler	Stok mg/ml	Son μ g/ml <i>E.coli</i>	Son μ g/ml <i>Geobacillus</i>
Kanamisin	15	30	10
Ampisilin	100	100	-

2.4. Arabinofuranosidaz Proteinlerinin Tespiti

Karbon kaynağı olarak arabinoz içeren LB broth içerisinde 60°C 'de 72 saat büyütülen *Geobacillus stearothermophilus* 12 kültürü inkübasyon süresinin sonunda santrifüj edilerek çöktürüldü. Pellet kısmı uzaklaştırıldıktan sonra ekstrasellüler kısım liyofilizasyon işlemine tabii tutuldu. Yoğunlaştırılan ekstrasellüler kısımdan bir miktarı native jel elektroforezinde kullanıldı. Jele kontrol olarak daha önce laboratuvarında çalışılmış olan ve moleküler büyüklüğü belirli olan arabinofuranosidaz aktivitesine sahip olan suşların ekstrasellüler ekstraktları da yüklendi. Arabinofuranosidaz aktivitesi Çanakçı vd., (2007) prosedürüne göre 4-methylumbelliferyl- α -L-arabinofuranoside kullanılarak boyandı ve görüntüldü. Yapılan bu deneme sonucunda *G. stearothermophilus* 12 suşunda ekstrasellüler arabinofuranosidaz aktivitesi olan iki protein bandının varlığı gözlemlendi (Şekil 5).



Şekil 5. Native jelde *G. stearothermophilus* 12 arabinofuranosidaz aktivitesi. 1: 12 suşu, 2: pozitif kontrol

Bu aşamadan sonra *G.stearothermophilus* 12 suşu arabinoz içeren 2 lt LB broth içerisinde 72 saat inkübe edildi. Santrifüj işlemine tabi tutulan kültürün süpernatant kısmı liyofilize edildi ve yoğunlaşması sağlandı. Yoğunlaşan süpernatant kısmı Kaneko vd., (1998) prosedürüne göre CM-Sepharose CL-6B (katyon ion exchange) kolonu kullanılarak kısmi saflaştırılması gerçekleştirildi. Kısmi saflaştırılması gerçekleştirilen iki protein bandı SDS-PAGE jelinden kesilerek MALDI-TOF analizleri için UMDNJ (University of Medicine & Dentist of New Jersey) center of Advanced Proteomics Research Laboratuvarına gönderildi.

2.5. Genomik DNA İzolasyonu

Geobacillus stearothermophilus 12 genomik DNA izolasyonu için LB Broth besiyerinde çalkalamalı su banyosunda 55°C’de bir gece inkübe edildi, genomik DNA izolasyonu, Genomik DNA Purification Kiti ve Sambrok vd., (1989)’nin genomik DNA izolasyon prosedürlerine göre yapıldı.

2.6. *G. stearothermophilus* 12 *abf1* ve *abf2* Genlerinin oğaltılması

MALDI-TOF analizleri sonucunda gelen protein sekanslarının korunmuş bölgeleri kullanılarak *abf1* geninin belirli bir kısmının çoğaltılması için dejenerat *ab_Fwd* ve *ab_Rev* primerler kullanıldı (Tablo 3).

Tablo 3. Çalışmada kullanılan primerler ve plazmitler

Primerler*	Nükleotit Sırası	Özellikleri
ab_Fwd	MGN TAY CCN GGN GGN AAY TTY	<i>abf1</i> genin çoğaltılması için kullanılan dejenerat primerler
ab_Rev	CAT YTC RTT NCC NAR RCA C	<i>abf1</i> genin çoğaltılması için kullanılan dejenerat primerler
AraGstF2	CgA gCC ATA gAT gCg TTT gTC g	<i>abf1</i> geninin tamamlanması için kullanılan invers-PCR primerleri
AraGstR2	CgT TCg gTT gTg gCC ATT gCT g	<i>abf1</i> geninin tamamlanması için kullanılan invers-PCR primerleri
Abf2-1 Fwd	ggNTgYTTTgCNgAYgARTAYCATTgg	<i>abf2</i> genin çoğaltılması için kullanılan dejenerat primerler
Abf2-1 Rev	ACATVTBRAAYACATgRTANgTHggBgT	<i>abf2</i> genin çoğaltılması için kullanılan dejenerat primerler
Abf2.2 fwd	CATCCTTCCAATGATACTCATCCGC	<i>abf2</i> geninin tamamlanması için kullanılan invers-PCR primerleri
Abf2.2 rev	GCAAACGGTTAACGTCTTGCAAGCG	<i>abf2</i> geninin tamamlanması için kullanılan invers-PCR primerleri
Ex-abf1 Fwd	TAACATATGAGTATGAAAAAAGCAACCATG	<i>abf1</i> geninin pET28a+ vektörüne klonlamak için kullanılan primerler
Ex-abf1 Rev	TATAAGCTTTATTGCTTTGCTAAACGAATG	<i>abf1</i> geninin pET28a+ vektörüne klonlamak için kullanılan primerler
IsabfF	GGCTAGCGTGAGAAACAGAGCGGTAATAAACG	<i>abf2</i> geninin pET28a+ vektörüne klonlamak için kullanılan primerler
IsabfR	CGGGATCCCTATCATTGTCGTTCAATCAAAGCCGC	<i>abf2</i> geninin pET28a+ vektörüne klonlamak için kullanılan primerler
Abf1 UpFwd	CTCTTCCAAGAAGGGGCAAATATCTGAC	<i>abf1</i> geninin 5' bölgesini çoğaltmak için kullanılan primerler
Abf1 UpRev	CCTATCACCTCAAATGGTTCGCTGCATAGATGCGTTTGTGCGATTTCCGG	<i>abf1</i> geninin 5' bölgesini çoğaltmak için kullanılan primerler
Abf1 DownFwd	CGAGCGCCTACGAGGAATTTGTATCGCGCCTTTGTTGGAGGATATTTAT AA	<i>abf1</i> geninin 3' bölgesini çoğaltmak için kullanılan primerler
Abf1 DownRev	TTATTGCTTTGCTAAACGAATGACGTTC	<i>abf1</i> geninin 3' bölgesini çoğaltmak için kullanılan primerler
Plazmitler	Özellikleri	
pGEM-T Easy	<i>E.coli</i> klonlama vektörü	
pET28a+	<i>E.coli</i> ekspresyon vektörü	
pES1	Rekombinant vektör, <i>abf1</i> geni taşıyan pET28a+ vektörü	
pES6	Rekombinant vektör, <i>abf2</i> geni taşıyan pET28a+ vektörü	

*: Altı çizgili kısımlar restriksiyon enzim kesim bölgelerini göstermektedir. N=A/G/C/T; Y=C/T; R= A/G; D=A/G/T; Tm= primer bağlanma sıcaklığı; nt=nükleotit

Genin belirli bir kısmını çoğaltmak için dejenerat primerler ve *G. stearotherophilus* 12 genomik DNA'sı kullanılarak yapılan PCR reaksiyonu karışımı 50 µl hacimde yapıldı. PCR reaksiyon karışımı ve protokolü Tablo 4 ve Tablo 5'de verilmiştir.

Tablo 4. *abf1* geninin çoğaltılması için kullanılan PCR reaksiyonu karışımı

İçerik	Son konsantrasyon	Hacim (µl)
5X Taq DNA polimeraz Tampon	1X	10 µl
MgCl ₂	1,5 mM	3 µl
10 mM dNTP mix	0,2 mM	1 µl
Forward primer (10 pmol/µl)	0,4 µM	2 µl
Reverse primer (10 pmol/µl)	0,4 µM	2 µL
Template DNA	10-500 ng	1 µl
Taq DNA polimeraz		0,2 µl
Distile su		30,8 µl

Tablo 5. *abf1* geninin çoğaltılması için kullanılan PCR protokolü

Döngü	Zaman	Sıcaklık (°C)
1X	2 dk	94
36X	30 sn	94
	45 sn	Tm sıcaklığı
	2 dk	72
1X	5 dk	72

İnvers PCR, çalışılan genin yalnızca içerisinde belirli bir sekans bölgesi biliniyorsa genin tamamını bulmak için yapılan bir polimeraz zincir reaksiyonudur. Standart PCR yöntemi ile bir kısmı belirlenen *abf1* geninin tamamını elde etmek için invers PCR yapıldı. İnvers PCR protokolü Ochman vd., (1988) tarafından tanımlanan şekilde gerçekleştirildi.

Çoğaltılan *abf1* geninin içerisindeki restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleri NEB Cutter V2.00 software programı kullanılarak belirlendi. Genin içerisinde bulunmayan restriksiyon endonükleaz enzimleri seçilerek genomik DNA kesimi (Tablo 6) gerçekleştirildi. Restriksiyon kesim reaksiyon 37°C 16 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra ısı ile enzim inaktivasyonu gerçekleştirildi.

Tablo 6. İners PCR için genomik DNA kesimi

İçerik	Hacim
10X restriksiyon tampon	5 µl
2U enzim	X
BSA*	1 µl
Genomik DNA	20 µl
Distile su	30µl tamamlanır

* gerekli reaksiyonlarda

Daha sonra self-ligasyon aşaması gerçekleştirildi (Tablo 7). Örnekler 16°C bir gece inkübasyona bırakıldı ve inkübasyondan sonra etanol presipitasyonu ile enzim inaktivasyonu sağlandı.

Tablo 7. Self- Ligasyon protokolü

İçerik	Hacim
10X ligasyon tamponu	40 µl
2U enzim	X
Kesilmiş DNA	10 µl
Distile su	400 µl tamamlanır

İnaktivasyondan sonra örnekler genin bilinen bölgesine komplementer olarak tasarlanan iners PCR primerleri (Tablo 3) kullanılarak iners PCR gerçekleştirildi. İners PCR reaksiyon karışımı ve protokolü Tablo 8 ve 9'de verilmiştir.

Tablo 8. İners PCR için kullanılan PCR reaksiyonu karışımı

	Son konsantrasyon	Hacim (µl)
5X Taq DNA polimeraz tamponu	1X	10 µl
MgCl ₂	1,5 mM	3 µl
10mM dNTP mix	0,2 mM	1 µl
Forward primer (10 pmol/ µl)	0,2 µM	1 µl
Reverse primer (10 pmol/ µl)	0,2 µM	1 µL
Template DNA		10 µl
Taq DNA polimeraz		0,5 µl
Distile su		23,5 µl
Toplam		50

Tablo 9. İnvers PCR protokolü

Döngü	Zaman	Sıcaklık(°C)
1X	2 dk	94
36X	1 dk	94
	1 dk	54
	2,5 dk	72
1X	5 dk	72

G. stearothermophilus 12 suşunda var olan ikinci arabinofuranosidaz geni (*abf2*) tasarlanan Abf2-1 Fwd ve Abf2-1 Rev primerleri (Tablo 3) ile çoğaltılmış ve nükleotit dizisi Tablo 3 ve Tablo 4’de verilen prosedürler kullanılarak tespit edilmiştir.

abf2 geninin tespit edilen internal nükleotit sekansından yola çıkılarak invers-PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiş ve *abf2* geninin geri kalan kısımları çoğaltılmıştır. İnvers PCR reaksiyonu Tablo 5, 6, 7 ve 8’de kullanılan protokoller ve Tablo 3’de verilen primerler yardımı ile elde edilmiştir.

Agaroz jel elektroforezi PCR ürünlerin görüntülenmesi ve ayırımı için kullanıldı. Yaygın olarak PCR ürünleri için %1’lik, plazmitler için %0,8’lik jel kullanıldı. Agaroz gerekli miktarlarda tartılıp 1X TAE tampon içerisinde çözüldü ve sıcaklığı düşürülerek içerisine etidyum bromür ilave edildi. Agaroz jel 110 Volt da yaklaşık yarım saat yürütüldü ve DNA fragmentleri UV ışığı altında görüntülendi.

2.7. DNA fragmentlerinin pGEM[®]-T Easy Vektörüne Klonlanması

PCR ürünleri klonlama vektörü olan pGEM[®]-T Easy (Promega) vektörüne üretici firmanın önerileri doğrultusunda klonlandı. Ligasyon reaksiyonu Tablo 10’de verilmiştir.

Tablo 10. Ligasyon reaksiyonu

İçerik	Hacim
2X Rapid Ligasyon tamponu	5 µL
pGEM-T vector	1 µL
PCR ürünü	X µL
T4 DNA ligase	1 µL
Total	10 µL

2.8. *E. coli* DH5 α 'ya Transformasyon

Kompetent hücre hazırlamak için *E. coli* DH5 α hücrelerinin Luria Bertani (LB) Broth besiyerine ekimi yapıldı ve 37°C'de gece boyunca kültüre edildi. Bir gecelik kültürden LB Broth besiyerine 1:100 oranında aşılama yapıldı. Hücreler 37°C'de yoğunlukları 600 nm dalga boyunda OD 0,4–0,5 olacak şekilde büyütüldü. Hücreler ardından 4°C'de 4.000×rpm hızda 5 dk santrifüj edildi ve pelletin üzerine 10 ml 100 mM soğuk CaCl₂ ilave edilerek elle çözümleri sağlandı. Hücreler 30 dk buz üzerinde bekletildi ve tekrar 4°C'de 4.000×rpm hızında 5 dk santrifüj edildi. Pellet üzerine 2 ml 100 mM soğuk CaCl₂ ilave edilerek çözünmesi sağlandı. Elde edilen kompetent hücreler +4°C'de 2 gün içerisinde kullanılmak üzere muhafaza edilebilir.

Transformasyon deneyi Sambrok ve ark., (1989) tanımladığı şartlarda gerçekleştirildi. 0,2 ml kompetent *E. coli* hücrelerine 3–5 μ l ligasyon karışımından ilave edildi. Karışım 30 dk buz üzerinde bekletildi ve daha sonra 90 sn. 42°C'de bekletildi. Ardından ependorf tüplerinin içerisine 200 μ l LB Broth besiyeri ilave edilerek 37°C'de 2 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonucunda hücreler içerisinde 50 mg/ml ampisilin bulunan LB-Agar besiyeri üzerine cam bagetle yayıldı. Petriler 37°C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonucunda oluşan kolonilerden seçilen klonlar izole edilerek sekanslama işlemi için Macrogen Inc., Hollanda firmasına gönderildi.

2.9. *G. stearothermophilus* 12 *abf1* ve *abf2* Genlerinin Ekspresyonu

2.9.1. *abf1* ve *abf2* Genlerinin Çoğaltılması

İnvers PCR yöntemi ile tam gen dizisi elde edilen *abf1* ve *abf2* genleri pET28a+ vektörüne klondı. *abf1* geninin çoğaltmak için tasarlanan Ex-*abf1* Fwd ve Ex-*abf1* Rev primerlerin uçlarına sırasıyla *NdeI* ve *HindIII* restriksiyon endonükleaz enzimleri ilave edildi.

abf2 geninin çoğaltmak için tasarlanan Isabf2 Fwd ve Isabf2 Rev primerlerin uçlarına sırasıyla *NheI* ve *BamHI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ilave edildi.

abf1 ve *abf2* genlerini tam uzunlukta çoğaltmak için yapılan PCR reaksiyonu; 50 μ l son hacimde, 1X iProof HF Tampon, 0,2 mM her bir dNTP'den, 0.5 μ M her bir primerden,

100 ng genomik DNA ve 0.02 U/ μ l iProof Polimeraz (BioRAD) enzimi kullanılarak gerçekleştirildi. Kullanılan PCR programı aşağıda verilmiştir.

1. Ön Denatürasyon	98 °C'de	30 sn.	
2. Denatürasyon	98 °C'de	10 sn.	} 35 döngü
3. Primer Bağlanma	55 °C'de	30 sn.	
4. Uzama	72°C'de	1 dk.	
5. Son Uzama	72°C'de	10 dk.	

PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde 10 kb DNA markırı ile yürütülerek, büyüklükleri doğrulandı.

2.9.2. *abf1* ve *abf2* PCR Fragmentlerinin pET28a+ Vektörüne Klonlanması

abf1 ve *abf2* PCR ürünleri, PCR Purification Kiti (Fermentas) üreticisinin önerileri doğrultusunda temizlendi. Ekspresyon vektörünün inşası için 5 μ l pET28a+ (40 μ g/ μ l), 9 μ l PCR ürünü, 1X BSA, 1X Restriksiyon Tamponu, 10U gerekli enzimleri içeren 20 μ l toplam hacimde restriksiyon kesim reaksiyonu 37°C'de 2 saat inkübe edilerek gerçekleştirildi. Reaksiyon sonunda enzimler ısı inaktivasyonu ile inaktive edildi.

8 μ l reaksiyon karışımına 1 μ l 10X Ligase Tampon ve 1 μ l T4 DNA Ligaz (10U/ μ l) enzimi ilave edildi ve 16°C'de bir gece inkübasyonu gerçekleştirildi. Ligasyon sonrası plazmit, CaCl₂ tekniği ile kompetent hale getirilmiş *E.coli* BL21 (DE3) Lys hücresine transforme edildi ve plazmit içeren hücreler 30 μ g/ml kanamisin içeren LB agar besiyerinde seçildi.

2.9.3. *abf1* ve *abf2* Genlerinin *E.coli* BL21 Hücresinde Ekspresyonunun Belirlenmesi

abf1 ve *abf2* genlerinin hücrede ekspresyonunun belirlenmesi için üç doğrulama adımı gerçekleştirilmiştir. Birinci adımda; *abf1* ve *abf2* genlerini içeren plazmitlerin transforme edildiği *E.coli* hücrelerinde rastgele belli sayıda hücre seçildi. Bu hücreler 30 μ g/ml kanamisin içeren 2 ml LB sıvı besiyerinde 37 °C'de kültüre edildiler. Daha sonra doğru plazmiti içeren hücrenin tespiti için koloni PCR yöntemi kullanılarak doğrulandılar. Koloni

PCR 2X Thermo-Start™ PCR Master Mix (Thermo SCIENTIFIC) kullanılarak gerçekleştirildi. 20 µl son hacimde; 1X master mix, 0,5 pmol/µl pET28a+ kontrol primerleri, 7 µl dH₂O ve 1 µl hücre kültürü ilave edilerek yapıldı. Genin çoğaltılması için kullanılan program aşağıda verilmiştir.

1. Ön Denatürasyon	95 °C'de	15 dk.	
2. Denetürasyon	95 °C'de	30 sn.	} 35 döngü
3. Primer bağlanma	50 °C'de	30 sn.	
4. Uzama	72 °C'de	1 dk.	
5. Son Uzama	72 °C'de	5 dk.	

PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve 10 kb DNA markır kullanılarak doğru büyüklükteki bantlar pozitif sonuç olarak değerlendirildi.

İkinci adımda; *abf1* ve *abf2* genlerini içeren plazmitlerin transforme olduğu ve PCR reaksiyonu pozitif *E.coli* hücrelerinden belirli sayıda seçildi ve 2 ml LB (Kan^{30µg/ml}) sıvı besiyerinde 37 °C'de bir gece kültüre edildi. Ertesi gün hücreler 1:100 oranında 5 ml taze LB (Kan^{30µg/ml}) sıvı besiyerine aşılandı. Hücreler 600 nm'de OD 0,3 oluncaya kadar büyütüldü. OD 0,3 olunca son konsantrasyonda 1 mM olacak şekilde IPTG eklendi. IPTG eklendikten sonra 3 saat daha 37°C'de inkübe edildi. 1,5 ml her bir hücreden alınarak ependorf tüplerine aktarıldı ve 12 000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi. Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra, pellet -20 °C'de bir gece inkübe edildi. Ertesi gün hücreler 500 µl dH₂O'da çözüldü ve sonikasyon işlemi ile patlatıldı. 13200 rpm'de 30 dk santrifüj edildi. Süpernatant % 12'lik SDS-PAGE'de yürütülerek sonuçlar gözlemlendi. SDS-PAGE analizi Laemmli ve ark., 1970'in prosedürüne göre gerçekleştirildi.

Üçüncü adımda, SDS-PAGE analizinde ekspresyon seviyesi güçlü olarak gözlenen örnekler seçildi. Bu örneklerle sahip *E.coli* BL21 (DE3) Lys hücreleri 5 ml LB (Kan^{30µg/ml}) sıvı besiyerinde 37°C'de bir gece büyütüldü ve Plazmit MiniPrep (Fermentas) Kiti kullanılarak plazmit izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen plazmitler pET28a+ vektörü için tasarlanan kontrol primeri ile sekanslama işlemi gerçekleştirildi. Sekans sonuçları değerlendirilerek, herhangi bir baz değişiminin ve mutasyonun olmadığı plazmiti içeren hücre seçildi ve saflaştırma basamağı için bu hücre kullanıldı.

2.10. Abf1 ve Abf2 Proteinlerinin Saflaştırılması

Doğru transformant *E. coli* BL21 (DE3) LysS hücreleri 50 ml LB (Kan 30µg/ml) sıvı besiyeri içerisinde 37 °C’de bir gece boyunca büyütüldü. Ertesi gün 1:100 oranında taze 1 lt LB (Kan 30µg/ml) sıvı besiyerine aşlanarak 600 nm’de OD 0,3 olana kadar kültüre edildi. OD 0,3 olunca, son hacimde 1 mM olacak şekilde IPTG ile indüklendi. İndükleme işleminde sonra hücreler 3 saat daha büyütüldü ve 12000 rpm’de 20 dk santrifüj edilerek pellet kısmı toplandı. Pellet 10 ml % 0.08’lik NaCl ile yıkandı ve – 20 °C’de bir gece inkübe edildi.

Ertesi gün pelletler oda sıcaklığında çözülmesi için 10-15 dk. bekletildi. Pelletlerin üzerine 50 mM fosfat tamponu ilave edilerek çözülmesi sağlandı. Homojen bir biçimde çözülen hücrelerin sonikasyon işlemi ile patlatılması sağlandı. Santrifüj işlemi ile hücre içi proteinleri elde edildi.

2.10.1. Ni-NTA Kromotografisi

Hücre içi protein ekstraktı üzerine 5 ml Ni-NTA resin eklendi ve 8°C’de 2 saat karışması sağlandı. Resin- süspansiyon karışımı 5 ml Bio- Rad plastik kolonlarına döküldü ve resinin süzülmesi sağlandı. Kolon, hacminin 5 katı kadar Ni-Binding Buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, 5 mM beta merkapttoethanol) ile yıkandı. Daha sonra kolon hacminin 10 katı kadar Ni-Washing Buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, 5 mM beta merkapttoethanol, 20 mM imidazol) ile yıkandı. Son olarak enzimin alınması için, kolon hacminin 10 katı kadar Ni-Elution Buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, 5 mM beta merkapttoethanol, 400 mM imidazol) ilave edildi ve fraksiyonlar 1 ml’lik hacimler şeklinde toplandı. Toplanan fraksiyonlar %12’lik SDS-PAGE jeline yüklenerek, enziminin geldiği fraksiyonlar belirlendi.

2.11. Abf1 ve Abf2 Enzimlerinin Karakterizasyonu

2.11.1. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Abf1 ve Abf2 enzimlerinin aktivitesi 0,5 ml toplam hacimde 50 mM fosfat tamponu, dilusyon edilmiş enzim solusyonları ve substrat olarak *p*-nitrophenyl alfa-L-arabinofuranosit kullanılarak 75°C de 10 dk. inkübasyona tabi tutularak belirlenecektir. İnkübasyondan sonra 0,5 ml soğuk 1M Na₂CO₃ ilavesi ile reaksiyon sonlandırılacak ve alfa-L- Arabinofuranosidaz aktivitesi 405 nm de ölçülerek belirlenecektir.

2.11.2. Protein Tayini

Elde edilen solüsyondaki protein miktarlarının tayini Bradford'un (1976) geliştirmiş olduğu metoda göre gerçekleştirildi. 100 ml boya çözeltisi hazırlamak için 10 mg 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'lıkNaCl ile 100 µl'ye tamamlandı. Ardından üzerine 5 ml yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan boya çözeltisinden ilave edildi ve vortekslenerek 15 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 hesaplanacaktır.

2.11.3. Reaksiyonlarda Kullanılacak Enzim Miktarının Belirlenmesi

Reaksiyonlarda kullanılacak enzim miktarı, yapılan ön çalışmalar sonucunda, 0,1; 0,3; 0,5; 0,8; 1,0; 1,2; 1,5; 1,9; 2,0 ve 2,5 µg protein içeren bir dizi reaksiyon serisi sonucunda belirlendi. Reaksiyonlar yukarıda belirtilen şartlarda gerçekleştirildi.

Oluşturulan protein miktarı-aktivite grafiği yardımı ile ileriki çalışmalarda (optimum pH, optimum sıcaklık v.s) kullanılacak olan enzim miktarı belirlendi.

2.11.4. Enzimlerin Optimum Sıcaklık ve Isıl Stabilitesi ile Optimum pH ve pH Stabilite Değerlerinin Belirlenmesi

Enzimlerin optimum çalıştığı sıcaklığı her iki enzim (Abf1 ve Abf2) için uygun pH tamponu içerisinde 45-90°C sıcaklık aralığı kullanılarak belirlenecektir. Bu sıcaklık aralığında, *p*-nitrophenyl alfa-L-arabinofuranosit ve saflaştırılmış Abf1 ve Abf2 enzimlerini içeren reaksiyonların inkübasyonunun ardından enzim aktiviteleri ölçülerek optimum çalışma sıcaklığı belirlenecektir. Enzimlerin ısıl stabiliteyi ise, enzimlerin 50, 55, 60, 70, 80 ve 90°C de farklı zaman periyotlarında inkübasyonunun ardından belli zamanlarda alınan örneklerin aktiviteleri ile ilk başlangıç aktivitesinin karşılaştırılması ile belirlenecektir.

Abf1 ve Abf2 enzimlerinin optimum pH'sı, pH 4.0 ile 11 arasında değişen reaksiyon tamponları içerisinde optimum sıcaklıkta enzim aktivitesi ölçülerek gerçekleştirilecektir. Optimum pH'ı belirlemek için, 50 mM sodyum asetat pH 4,0- 5,5 arasında, 50 mM fosfat tamponu pH 5,5- 7,5 arasında, 25 mM Tris-HCl pH 7,5- 9 arasında, 50 mM glisin-NaOH pH 10 tamponları kullanılacaktır. Enzimlerin pH stabilitesinin belirlenmesi için enzimler belirtilen tamponlar içerisinde 55°C'de belli zaman aralığında inkübe edildikten sonra alınan enzim örneklerinin kalan aktivitelerinin standart metoda göre ölçülmesi ve elde edilen sonuçların başlangıçtaki aktivite değerleri ile karşılaştırılmaları ile ortaya çıkarılacaktır.

2.11.5. Kimyasal Ajanların ve Metal Katyonların Etkisi

CuSO₄, ZnSO₄, MgCl₂, MnCl₂, CaCl₂, CoCl₂ ve NaCl gibi çeşitli metallerin, EDTA gibi şelatlayıcı ve DTT, β-mercaptoetanol gibi indirgeyici ajanların, Abf1 ve Abf2 enzimi üzerine olan etkileri belirlenecektir. Bu durumda da elde edilen sonuçlar herhangi bir aktivatör veya inhibitörün kullanılmadığı kontrol reaksiyonu ile karşılaştırılacaktır.

2.11.6. Substrat Spesifikliği

Abf1 ve Abf2 enzimlerinin substrat spesifikliğinin belirlenmesinde birbirinden farklı birkaç pNP-glikosid substratını parçalama yeteneği ortaya çıkarılacaktır. Bu substratlar şunlardır: pNP-alfa-L-arabinopiranosid, pNP-β-L-arabinopiranosid, pNP-β-D-galactopiranosid, pNP-β-D-ksilopyranosid, pNP-N-asetil-β-D-glukosaminid, pNP-β-D-fukopiranosid, pNP-alfa-D-galaktopiranosid, pNP-alfa-D-glukopiranosid, pNP-β-D-glukopiranosid, pNP-alfa-L-ramnopiranosid, pNP-alfa-D-ksilopiranosid ve pNP-alfa-L-arabinofuranosid substratları kullanılan metotlar gerçeleştirildi. Bu substratların kullanıldığı çalışmalarda substrat araştırılması yapılacaktır.

3. BULGULAR

3.1. *abf1* ve *abf2*'nin Tam Gen Dizisinin Belirlenmesi

Yapılan standart PCR ve invers PCR reaksiyonları sonucunda *abf1* geninin 1509 nükleotit çiftinden oluştuğu belirlendi.

```
atgagtatgaaaaaagcaaccatgatcatcgaaaaagacttcaaaaatcgccgaaatcgac
M S M K K A T M I I E K D F K I A E I D
aaacgcatctatggctcgtttatcgaacatctcggccgcgcggtatacggagggtttat
K R I Y G S F I E H L G R A V Y G G I Y
gagcccgccatccgcaagccgacgaaaaatgggttccggcaagatgtcatcgagctggtc
E P G H P Q A D E N G F R Q D V I E L V
aaagactgcaagtgccattatccggttatccgggggaaattttgtgtccggttacaac
K E L Q V P I I R Y P G G N F V S G Y N
tgggaggatggcgttgggcccgaagaaaagcggccgcgcggtggatttggcatggcgg
W E D G V G P K E K R P R R L D L A W R
tcgggtggaacgaatgaaatcgggttgaatgaatttatggactgggccaagatggcggg
S V E T N E I G L N E F M D W A K M V G
gccgaagtaaatatggctgtcaacttagggacacgaggcattgatgcagcagcaactta
A E V N M A V N L G T R G I D A A R N L
gtcgaatactgcaaccaccatcgggctcgtattacagcgatttgcgtatttcccacggc
V E Y C N H P S G S Y Y S D L R I S H G
tataaagagccccataaaattaaaaactgggtgtcctcggaatgagatggacggcccgctgg
Y K E P H K I K T W C L G N E M D G P W
caaatcggccataaaacggccatcgagtaacggacgaattgcctgtgaagcggccaagtg
Q I G H K T A I E Y G R I A C E A A K V
atgaaatgggtagatccgaccattgaaacttgttgcgtgcggaagttcaggcagaaaatg
M K W V D P T I E L V A C G S S G R N M
tcgacatttgcggaatgggaagcgaactgttcttgaccatacgtatgaccatgtcgactat
S T F A E W E A T V L D H T Y D H V D Y
atttctctcatcaatactatggaacccgggacaatgatacggccaattatttggcgctg
I S L H Q Y Y G N R D N D T A N Y L A L
tcgctggaaatggatgattttattcgttccggttggccattgctgattacgtgaaggcg
S L E M D D F I R S V V A I A D Y V K A
aaaaaacggaagcaagaagacgattcatcttctgttggacgaatggaacgtatggtaccat
K K R S K K T I H L S F D E W N V W Y H
tcgaaatgaggcggataagcaaatgaaaccgtggacggtggcgccgctttgttggaggat
S N E A D K Q I E P W T V A P P L L E D
atttataactttgaagatcgcttcttctgctgcatgcttattacgctcatgaaacat
I Y N F E D A L L V G C M L I T L M K H
gccgatcgggtgaaaattgcctgcttggctcaattagtgaaatgtcattgacccgatcatg
A D R V K I A C L A Q L V N V I A P I M
acggaaaaaagcggccggcatggaagcaaacgatttactatccggtttatgcatgcctcg
T E K N G P A W K Q T I Y Y P F M H A S
gtttacggcagaggagtggttgcacccagtcatttcaagtccgaaatcgcagcaaaa
V Y G R G V A L H P V I S S P K Y D S K
gacttccagatgttccgattttagagtcgatcgcgtgtttacaatgaagaaaaagaagaa
D F T D V P Y L E S I A V Y N E E K E E
gtgacgatttttgcggtcaaccgtgatatggaagacggttgttgttggatgcatggtt
V T I F A V N R D M E D A L L L E C D V
cgcagttttgaagactacogtgcattgaaacatcgttttggaaacatgacaacgtgaaa
R S F E D Y R V I E H I V L E H D N V K
caaacgaattcggccaatcttcccgggttgcacacatcataacggcgatgccaactg
Q T N S A Q S S P V V P H H N G D A Q L
tcgggtgggaaaatgtcggccatgttgcggaagttatcgtggaacgtcattcgtttagca
S G G K M S A M L P K L S W N V I R L A
aagcaataa
K Q -
```

Şekil 6. *abf1* geninin nükleotit ve amino asit sırası

abf2 geninin ise 1518 nükleotit çiftinden oluştuğu belirlendi (Şekil 7).

```

gtgagaaacagagcggtaataaacgtcgacatgccaaaaggaaccatcaacaagaacatt
M R N R A V I N V D M P K G T I N K N I
tacggccattttgcggaacatcttggggcgttgacatttatgaaggaatttgggtcggagaa
Y G H F A E H L G R C I Y E G I W V G E
gactctccgattccgaatacaaatgggattcgcgaacgatgtattgcaagcgttgaaaaac
D S P I P N T N G I R N D V L Q A L K N
ataaaagttccggttctacgggtggccgggctgctttgcggtatgagtatcattggaag
I K V P V L R W P G G C F A D E Y H W K
gatgggggtggcccaaggagcagcgcaaaaaaatgattaacacccattggggagggggtg
D G V G P R E Q R K K M I N T H W G G V
attgagaacaatcatttcggcattcagcagtttatgatgttgtgcgaaatgcttgaatgc
I E N N H F G I H E F M M L C E M L E C
gagccttataatttggcgcaatgttaggcagcgccacggttcaagagatgtcagaatggatt
E P Y I C G N V G S G T V Q E M S E W I
gagtatatgacatttgatggagaatcgccaatggcgaattggcgcaaggagaatggggcg
E Y M T F D G E S P M A N W R K E N G R
gagaagcgtggaagttgaaatatttccgggtcgggaatgaaaactggggctgcgaggg
E K P W K L K Y F G V G N E N W G C G G
aatatgcgccctgaatattacgcccagctgtatcgccgctatcaaacatattgacagaat
N M R P E Y Y A D L Y R R Y Q T Y V R N
tacggggacaatcaaatttataaaattgcctgtggtgcaaatgtagatgactattactgg
Y G D N Q I Y K I A C G A N V D D Y Y W
acagaagtttaaatgaaaaatgcccagcgttattatggatgggttgagccttcattattat
T E V L M K N A S R F M D G L S L H Y Y
acaattcctggggacttttggctcgggaaaggctccgccaaggattttacggaagatgag
T I P G D F W L G K G S A T D F T E D E
tggtttattacattgaaaaaggcgttatatcgatgaattgattacgaggcatagcacg
W F I T L K K A L Y I D E L I T R H S T
attatggataagtacgatccggaaaagcgcgtcgggctcattgtggatgaatggggaaacg
I M D K Y D P E K R V G L I V D E W G T
tggatgacgtagagccaggcagcaatccgggattccttatatcaacaaaatacaatccgt
W Y D V E P G T N P G F L Y Q Q N T I R
gatgcttgcgcagctctccattttcatattttccataaccattgtgatcgagtgoga
D A L V A A L H F H I F H N H C D R V R
atggcgaatatcgcgcaaacgggttaacgtccttgcaagcggtcattttgacaagaggggaa
M A N I A Q T V N V L Q A V I L T R G E
caaatgattctcacgcctacgtatcatgtgtttgacatgtataaggttcaccaagatgcc
Q M I L T P T Y H V F D M Y K V H Q D A
gagttgttggaatagagtcttcatgtgcccagatgatgagcatcgcggggaaacggttgccg
E L L A I E S S C A E Y E H R G E T L P
caggtaagcatcactgcacccaagaacggggaaggaactgtccatattcagtttatgcaat
Q V S I T A S K N G E G T V H I S L C N
attgatcatcgaaatgaggcggtagtagatttagagtttcggtggagacagcctcgcacgc
I D H R N E A V V D L E F R G D S L A R
aagcaagtattcggcagcgtgtaacagcgaatgagatgaatgcccataataacatttgaa
K Q V F G T M L T A N E M N A H N T F E
aagccggatgcagtgaaagcccgaaaccggtccggtcaaatagagctcggccaacatacactg
K P D A V K P E P F R Q I E L G Q H T L
atggccaaaacttccgcccattgtctgtcgtcacttttagcagattgttggaaaataaagcggct
M A K L P P M S V V T L A I V E N K A A
ttgattgaacgacaatga
L I E R Q -

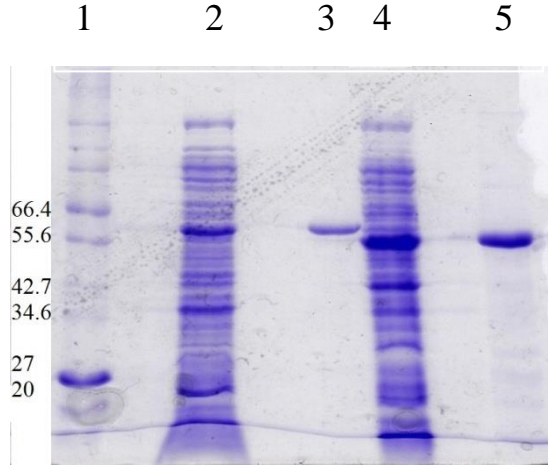
```

Şekil 7. *abf2* geninin nükleotit ve amino asit sırası

3.2. Abf1 ve Abf2 Proteinlerinin Saflaştırılması

Tüm nükleotit sıraları tespit edilen *abf1* ve *abf2* genlerini bir *E. coli* ekspresyon vektörü olan pET28a+'ya klonlamak için tasarlanan primerler ve klonlama stratejisi yapılan çalışmalar kısmında verilmiştir. pET28a+'ya klonlanan genlerin *E. coli* BL21 (DE3) Lys hücrelerinde aşırı ekspresyonları sağlanmış ve Ni-NTA kolon kromatografisi kullanılarak saflaştırılmışlardır.

Yapılan saflaştırılma işlemi sonucunda Abf1 proteininin % 95 saflık oranında elde edildiği ve SDS-PAGE analizleri sonucunda proteinin moleküler ağırlığının 57 kDa olduğu, Abf2 proteininin ise; proteinin % 95 saflık oranında elde edildiği ve SDS-PAGE analizleri sonucunda proteinin moleküler ağırlığının 56 kDa olduğu tespit edilmiştir (Şekil 11).



Şekil 8. Abf1 ve Abf2 enzimlerinin SDS-PAGE Görüntüsü. 1. Marker, 2. pET28a +Abf1 klonunun kaba ekstraktı, 3. Saf Abf1 enzimi, 4. pET28a +Abf2 klonunun kaba ekstraktı ve 5. Saf Abf2 enzimi

3.3. Abf1 ve Abf2 Enzimlerinin Karakterizasyonu

3.3.1. Protein Tayini

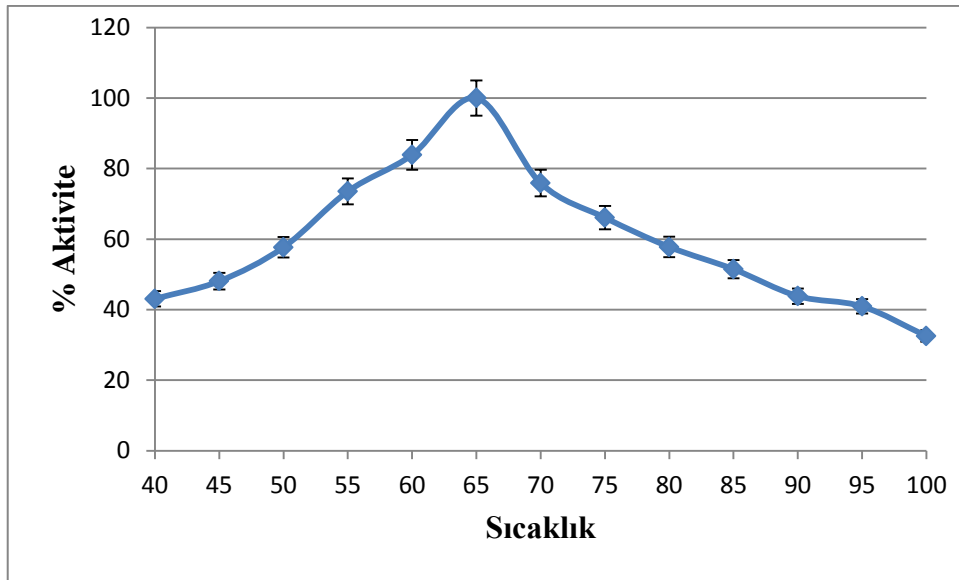
Yapılan protein tayini sonucunda Abf1 enziminin protein miktarı 1,28 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olarak bulunurken; Abf2 enziminin protein miktarı 0,28 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olarak bulundu.

3.3.2. Reaksiyonlarda Kullanılacak Enzim Miktarının Belirlenmesi

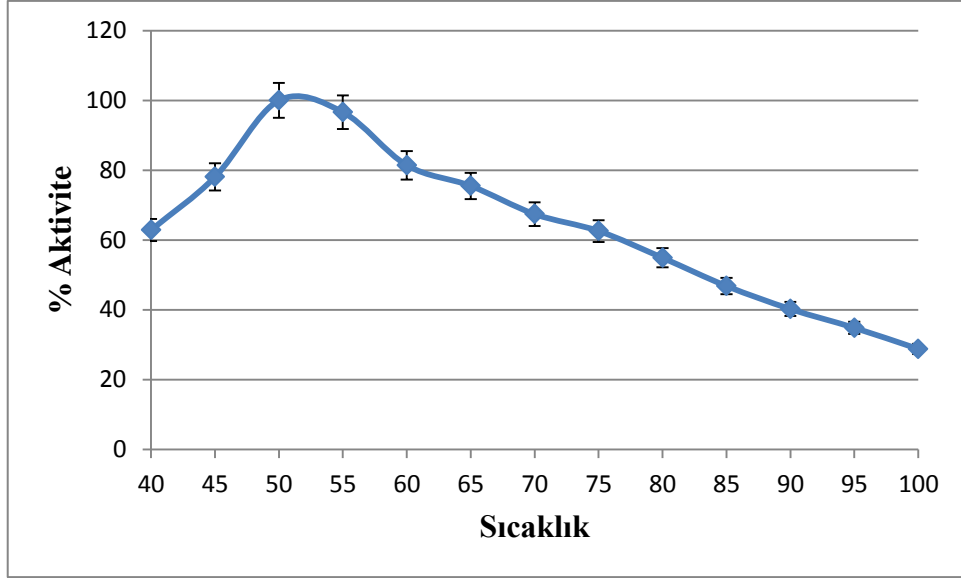
Reaksiyonlarda kullanılacak enzim miktarı, Abf1 için 2,0 μg olarak belirlenirken; Abf2 için 2,5 μg olarak belirlendi.

3.3.3. Optimum Sıcaklık

Abf1 enziminin en iyi çalıştığı optimum sıcaklık değeri, 0,2 mM substrat konsantrasyonunda (pH 6,0) 2,0 µg saf protein ile 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ve 100°C'ye ayarlanmış su banyolarında gerçekleştirilirken; Abf2 enziminin en iyi çalıştığı optimum sıcaklık değeri, 0,4 mM substrat konsantrasyonunda (pH 6,0) 2,5 µg saf protein ile aynı sıcaklıklarda gerçekleştirilen bir seri seri reaksiyonlar ile belirlendi. Yapılan reaksiyonlar neticesinde Şekil 9 ve Şekil 10'da görüldüğü gibi Abf1 enziminin optimum sıcaklığı 65°C, Abf2 enziminin optimum sıcaklığı 50°C olarak belirlendi. Bu reaksiyon serisinde enzimlerin en iyi çalıştığı sıcaklık değerleri daha sonraki çalışmalarda kullanılacak olan reaksiyon sıcaklıkları olarak belirlendi.



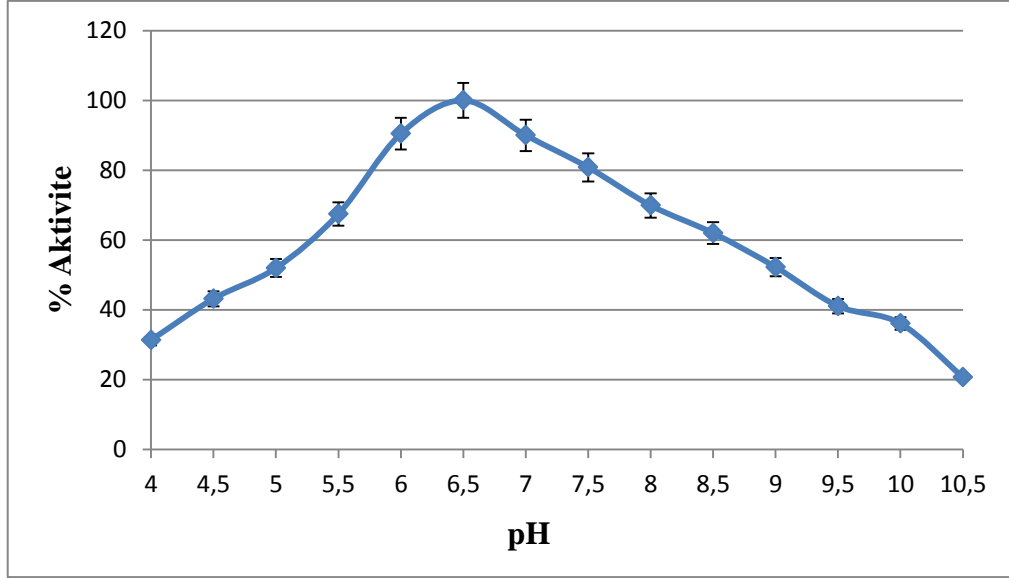
Şekil 9. Abf1 enzimi-optimum sıcaklık grafiği



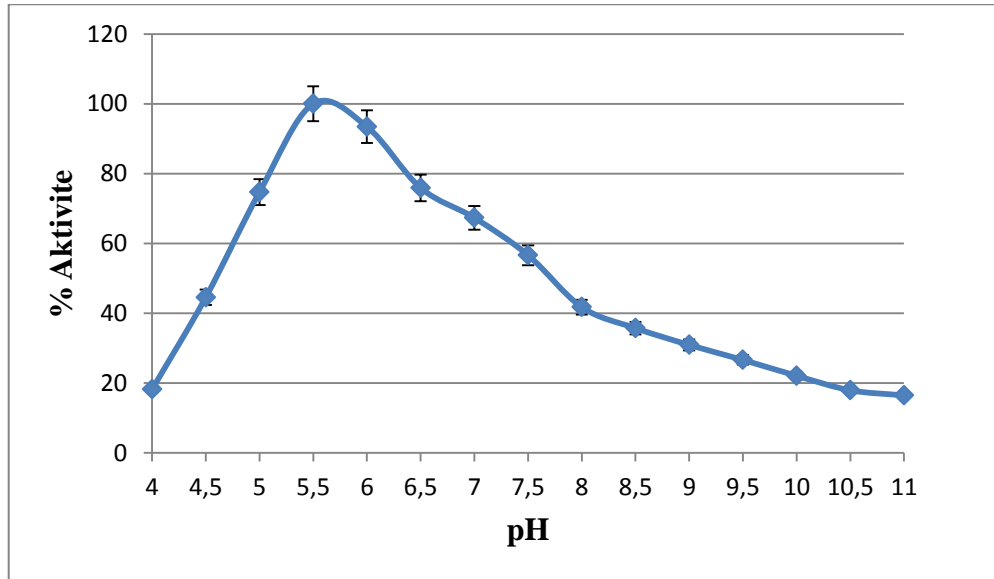
Şekil 10. Abf2 enzimi-optimum sıcaklık grafiği

3.3.4. Optimum pH

Abf1 enziminin aktivitesine pH'ın etkisi, 50 mM asetat tamponunda pH 4–5,5; 50 mM fosfat tamponunda pH 5,5-8; 25 mM Tris-HCl tamponunda pH 8–9 ve 50 mM glisin pH 9-10,5 tamponlarında 65°C'de gerçekleştirilen reaksiyonlarla belirlenirken, Abf2 enziminin aktivitesine pH'ın etkisi, aynı tampon değerlerinde 50°C'de gerçekleştirilen reaksiyonlarla belirlenmiştir. Çalışma sonucunda Abf1 enziminin optimum pH'sı Şekil 11'de görüldüğü gibi 6,5 olarak belirlenirken; Abf2 enziminin optimum pH'sı Şekil 12'de görüldüğü gibi 5,5 olarak belirlendi.



Şekil 11. Abf1 enzimi-optimum pH grafiği

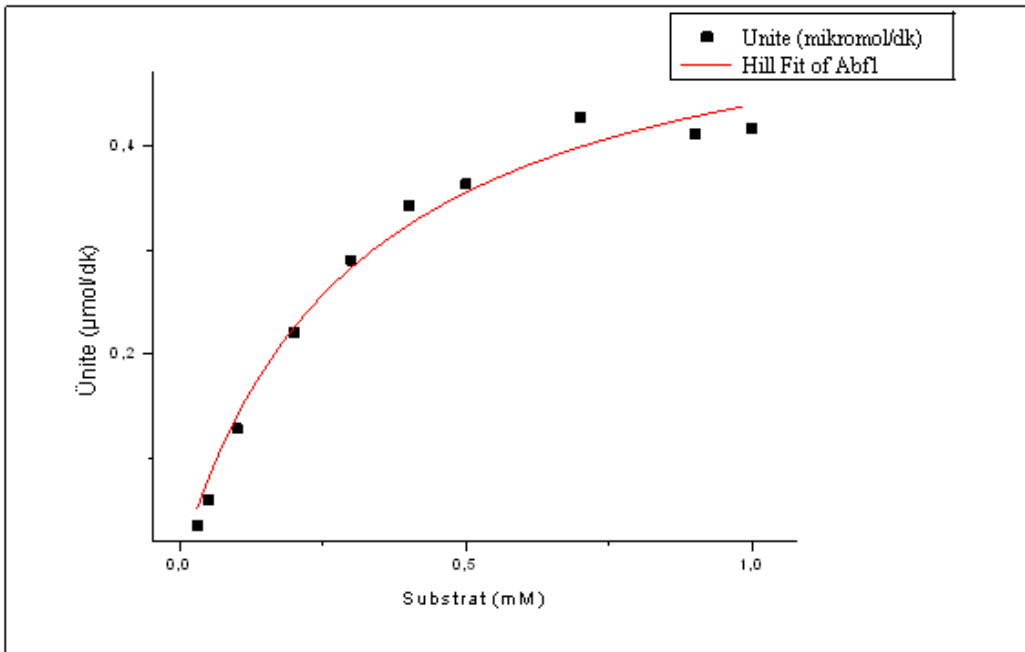


Şekil 12. Abf2 enzimi-optimum pH grafiği

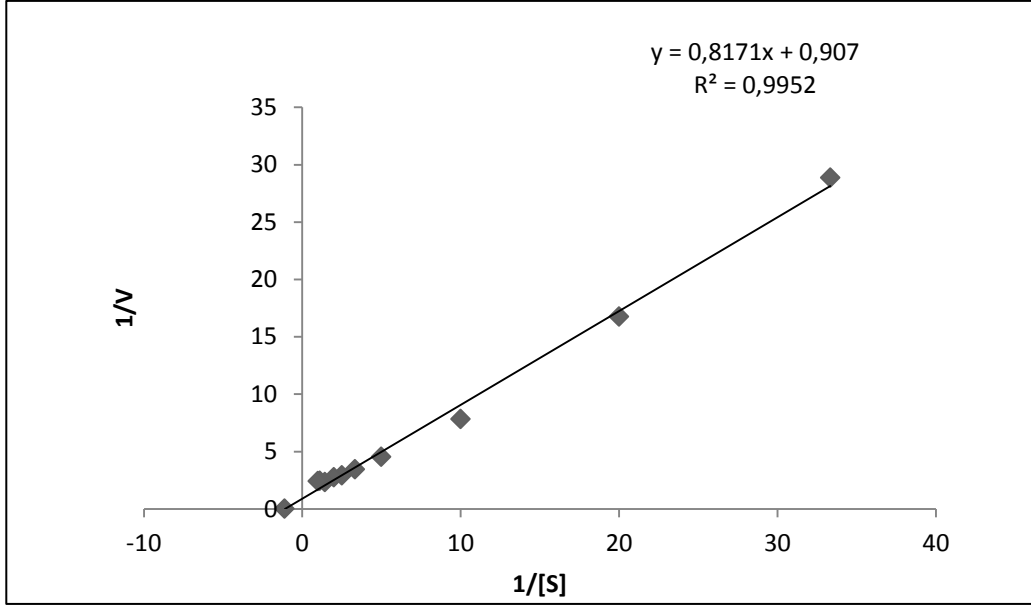
3.3.5. Enzim Kinetiği

Geobacillus stearothermophilus 12 Abf1 enziminin kinetik verileri, yapılan ön çalışmalar sonucunda belirlenen 0,01; 0,03; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,7; 0,9 ve 1 mM arasındaki substrat konsantrasyonları ile gerçekleştirilen seri reaksiyonlar ile belirlendi. Arabinofuranosidaz aktivitesi, 2,0 µg saf protein içeren hücre ekstratı ile 65°C'de, pH'sı

6,5 olan 50 mM fosfat tamponu içerisinde 10 dakikalık reaksiyon süresi sonunda reaksiyon soğuk 0.5 ml 1 M Na₂CO₃ ile sonlandırılarak 405 nm'deki spektrofotometrik ölçümlerle belirlendi (Şekil 13). Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerleri hazırlanan Lineweaver–Burk eğrisinde x ve y eksenleri kestiği noktalara karşılık gelen değerlerin tersi olarak belirlendi (Lineweaver ve Burk, 1934). Şekil 13'de gösterilen Michaelis-Menten grafiği çizilerek elde edilen 0,2 mM substrat konsantrasyonu daha sonra yapılacak olan çalışmalarda kullanılacak substrat konsantrasyonu olarak belirlendi. Yapılan çalışmalar sonucunda Abf1 enziminin K_m değeri $0,31 \pm 0,04$ mM ve V_{max} değeri 290 U/mg olarak bulundu (Şekil 13-Şekil 14).

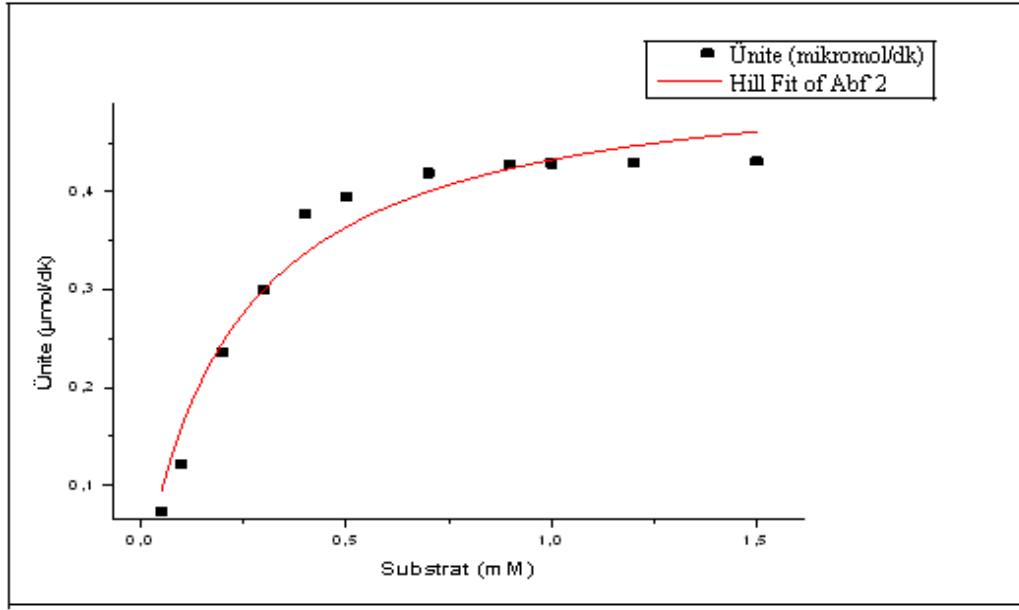


Şekil 13. Abf1 enzimi Michaelis-Menten grafiği

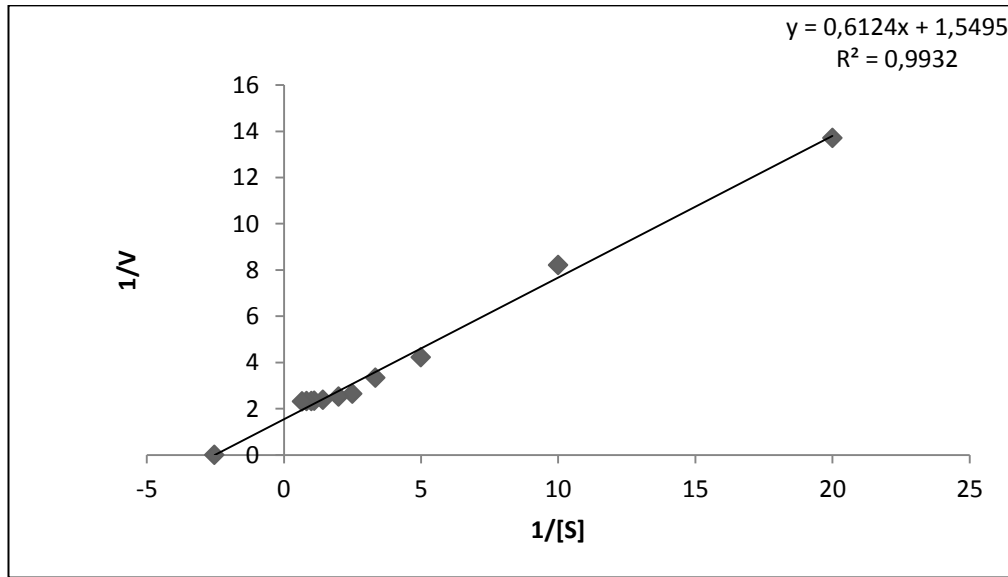


Şekil 14. Abf1 enzimi Linnerweaver-Burk grafiği

Geobacillus stearothermophilus 12 Abf2 enziminin kinetik verileri ise, yapılan ön çalışmalar sonucunda belirlenen 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,7; 0,9; 1,0; 1,2 ve 1,5 mM arasındaki substrat konsantrasyonları ile gerçekleştirilen seri reaksiyonlar ile belirlendi. Arabinofuranosidaz aktivitesi, 2,5 µg saf protein içeren hücre ekstratı ile 50°C’de, pH’sı 5,5 olan 50 mM fosfat tamponu içerisinde 10 dakikalık reaksiyon süresi sonunda reaksiyon soğuk 0,5 ml 1 M Na₂CO₃ ile sonlandırılarak 405 nm’deki spektrofotometrik ölçümlerle belirlendi (Şekil 15). 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). Şekil 15’te gösterilen Michaelis-Menten grafiği çizilerek elde edilen 0,4 mM substrat konsantrasyonu daha sonra yapılacak olan çalışmalarda kullanılacak substrat konsantrasyonu olarak belirlendi. Yapılan çalışmalar sonucunda Abf2 enziminin K_m değeri 0,23±0,03 mM ve V_{max} değeri 213,2 U/mg olarak bulundu (Şekil 16).



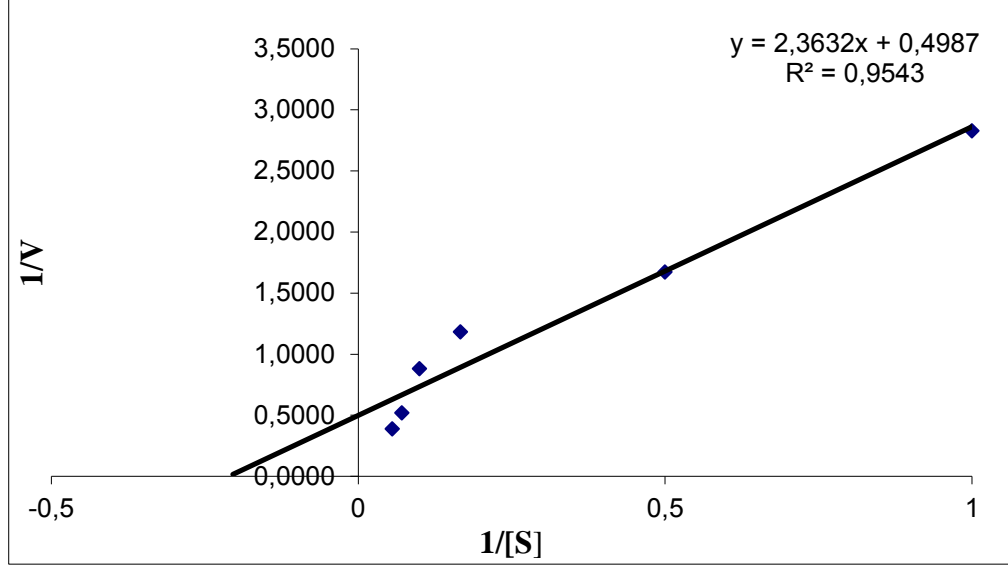
Şekil 15. Abf2 enzimi Michaelis-Menten grafiği



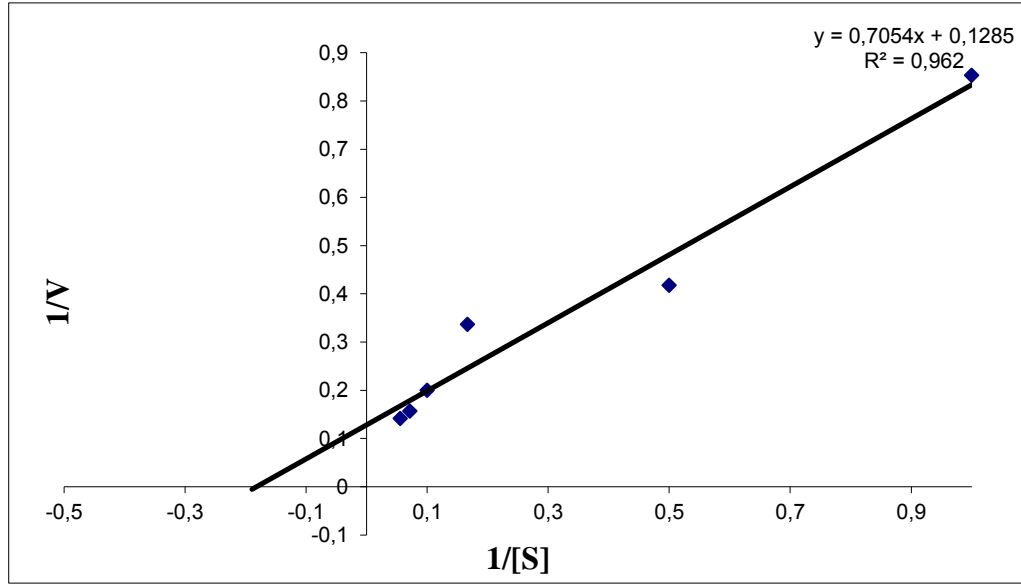
Şekil 16. Abf2 enzimi Linnerweaver-Burk grafiği

Aynı zamanda Arabinofuranosidazların etkili bir şekilde hidrolize edebildikleri diğer bir substrat, bir polisakkarit olan arabinandır. *Geobacillus stearothermophilus* 12 bakterisine ait Abf1 ve Abf2 enzimlerinin arabinanı kullanıp kullanmadığını test etmek amacıyla yapılan araştırmada bu maddeyi substrat olarak kullandığı belirlendi ve substrat olarak arabinan kullanılarak Linnerweaver-Burk substrat-aktivite grafikleri elde edildi (Şekil 17-18). Abf1 ve Abf2 enzimlerinin arabinanı substrat olarak kullandığında, K_m

değerlerinin sırasıyla; 4,74 $\mu\text{g/ml}$ ve 5,49 $\mu\text{g/ml}$ olduğu belirlenirken, V_{max} değerlerinin de sırasıyla 20,052 U/mg ve 77,82 U/mg olduğu belirlendi.



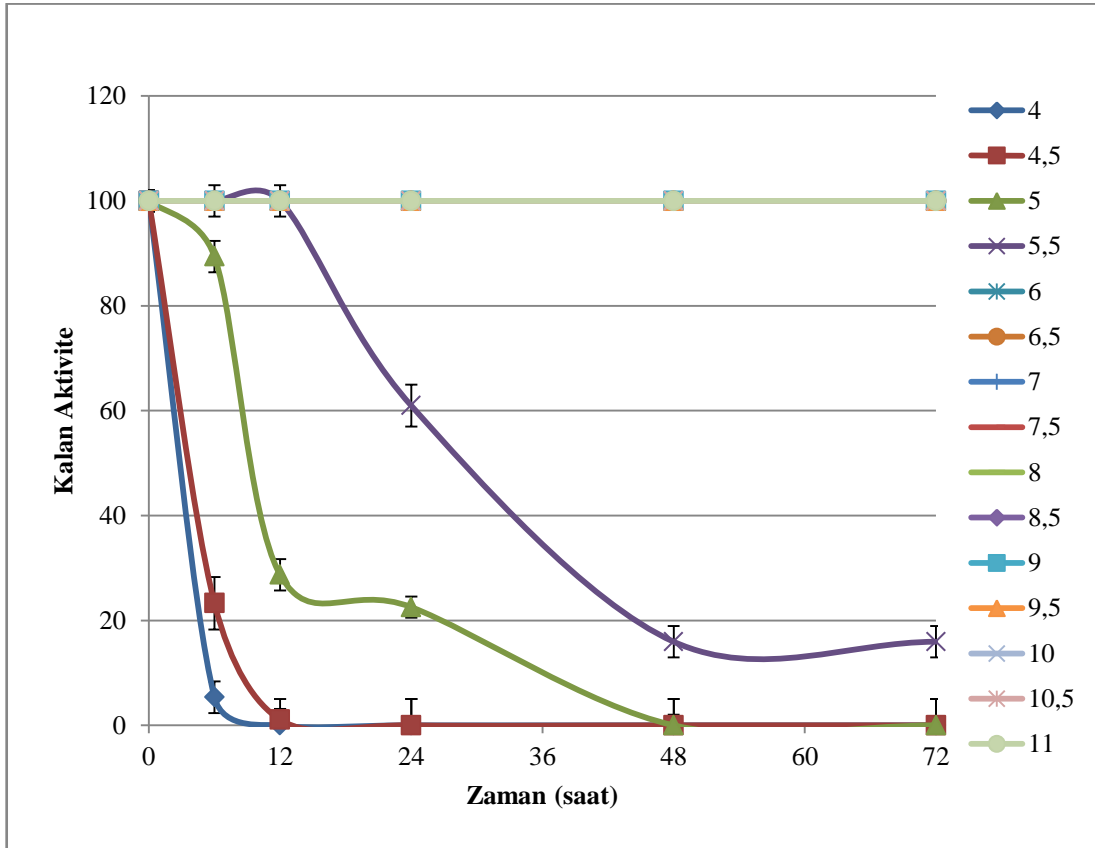
Şekil 17. Abf1 enzimi - Arabinan substratı için Lineweaver-Burk eğrisi



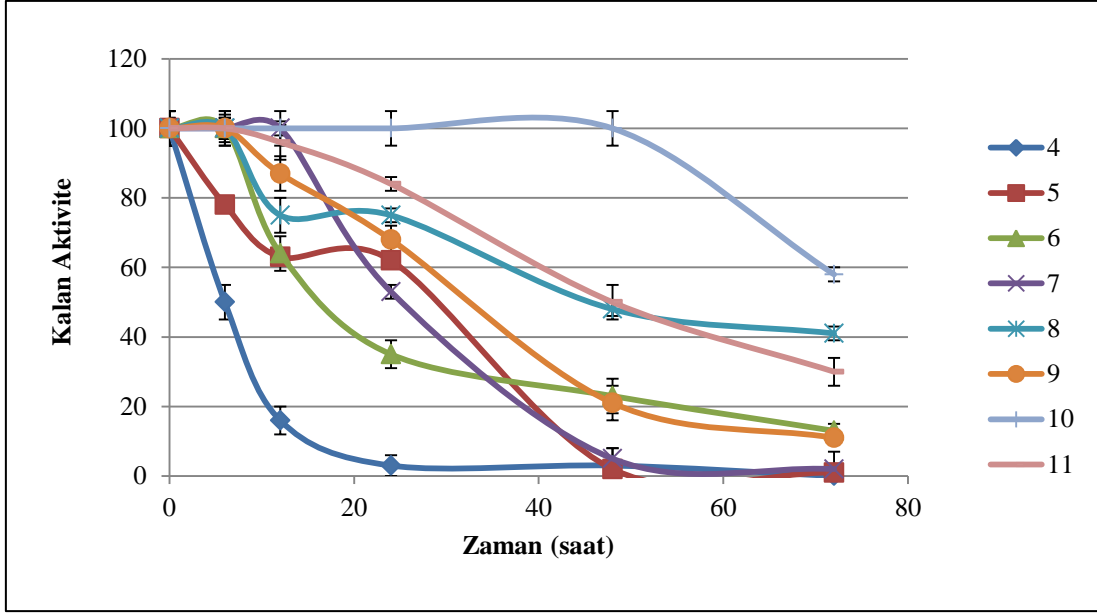
Şekil 18. Abf2 enzimi - Arabinan substratı için Lineweaver-Burk eğrisi

3.3.6. pH Kararlılığı

Geobacillus stearothermophilus 12 Abf1 enziminin pH kararlılığını belirlemek için enzim, 50 mM asetat tamponunda pH 4 –5,5; 50 mM fosfat tamponunda pH 5,5-7,5 (pH 6 – 8,0), 25 mM Tris-HCl tamponunda pH 8 - 9,5, (pH 8 – 9) , ve 50 mM glisin pH 10 (pH 9 –11) tamponunda, 65°C’de inkübe edilirken; Abf2 enziminin pH kararlılığını belirlemek için enzim aynı tampon değerlerinde 50°C’de inkübe edildi. İnkübasyon sürelerinin bitiminde tüplerden örnekler alınarak standart aktivite testine göre ölçümler gerçekleştirildi. Aynı zamanda sıfırıncı dakikada alınan örneklerin aktiviteleri ile (sıfırıncı dakika aktivitesi %100 kabul edilmiştir) daha sonra belli sürelerde alınan örneklerin aktiviteleri karşılaştırılarak Şekil 19’da gösterildiği gibi Abf1 eziminin pH 5,5-11 arasında 72 saat boyunca aktivite kaybına uğramadığı, Abf2 enziminin ise; Şekil 20’de gösterildiği gibi pH 10 civarında 48 saate kadar kararlı olduğu gözlemlendi ama diğer pH değerlerinde kararlılığını koruyamadığı gözlemlendi.



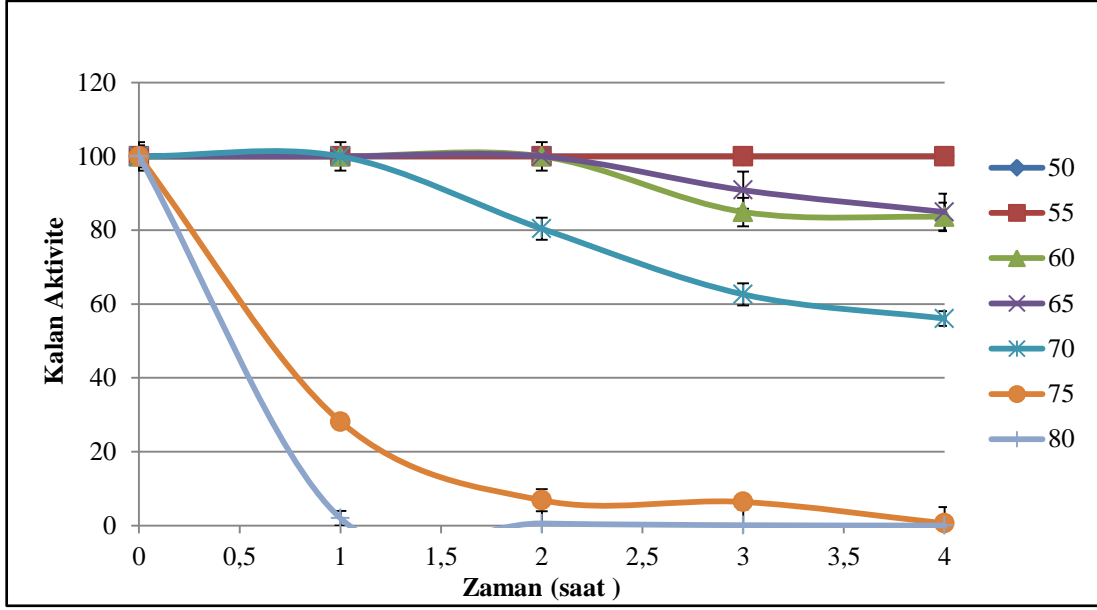
Şekil 19. Abf1 enzimi-pH kararlılığı grafiği



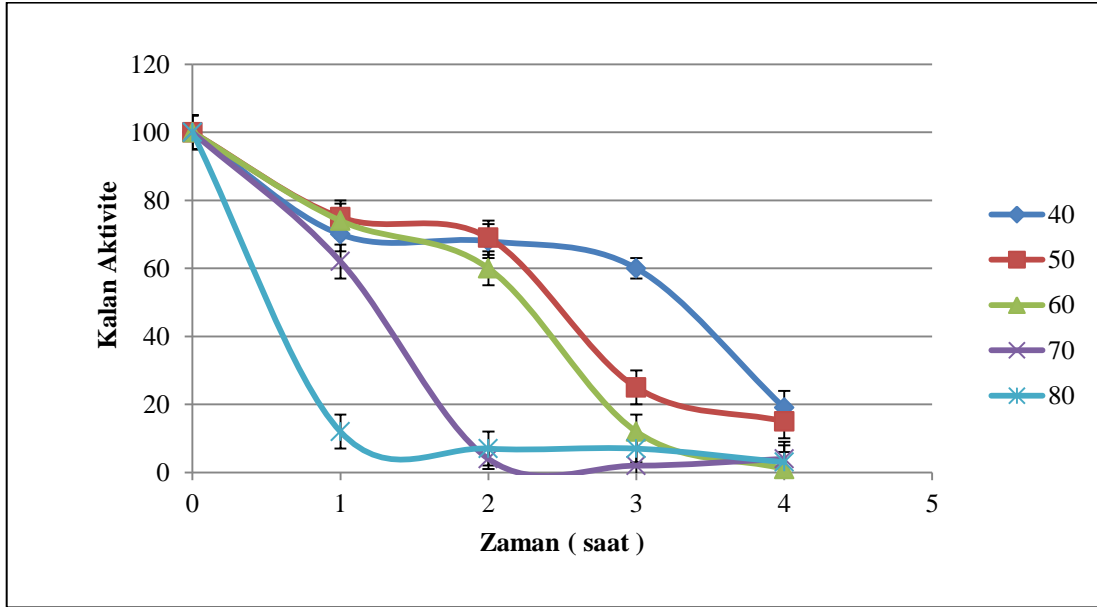
Şekil 20. Abf2 enzimi-pH kararlılık grafiği

3.3.7. Isıl Kararlılığı

Geobacillus stearothermophilus 12 Abf1 enziminin 50-80°C arasında göstermiş olduğu ısıl kararlılığını belirlemek amacıyla enzim 50, 55, 60, 65, 70, 75 ve 80 °C sıcaklıklarında inkübe edildi. Abf2 enziminin ise; 40-80°C arasında göstermiş olduğu ısıl kararlılığını belirlemek amacıyla enzim 40, 50, 60, 70 ve 80°C sıcaklıklarında inkübe edildi. İnkübasyon sırasında belli zaman aralıklarında her bir sıcaklıktaki tüplerden örnekler alındı ve bu tüplerdeki aktivite standart metoda göre belirlendi. Ayrıca reaksiyon başında yani sıfırıncı dakikada tüplerden alınan örneklerin aktivitesi (sıfırıncı dakika aktivitesi %100 kabul edilmiştir) ile istenilen dakikada alınan örneklerdeki aktiviteler kıyaslandı. Buna göre; Abf1 enziminin ısıl stabilitesinin Şekil 20’de gösterildiği gibi 70°C’de 1 saat, 65°C’de ise 2 saat %100 olduğu diğer sıcaklıklardaki stabilitesinin ise iyi olmadığı görüldü. Abf2 enziminin ısıl stabilitesinin ise; Şekil 21’de gösterildiği gibi 40-60°C arasında 2 saat inkübasyonu sonucunda %65-70 aktivite göstermiştir. Yüksek sıcaklıklarda ise; aktivitesinde düşüş olduğu gözlenmiştir.



Şekil 21. Abf1 enzimi-ısı kararlılığı grafiği

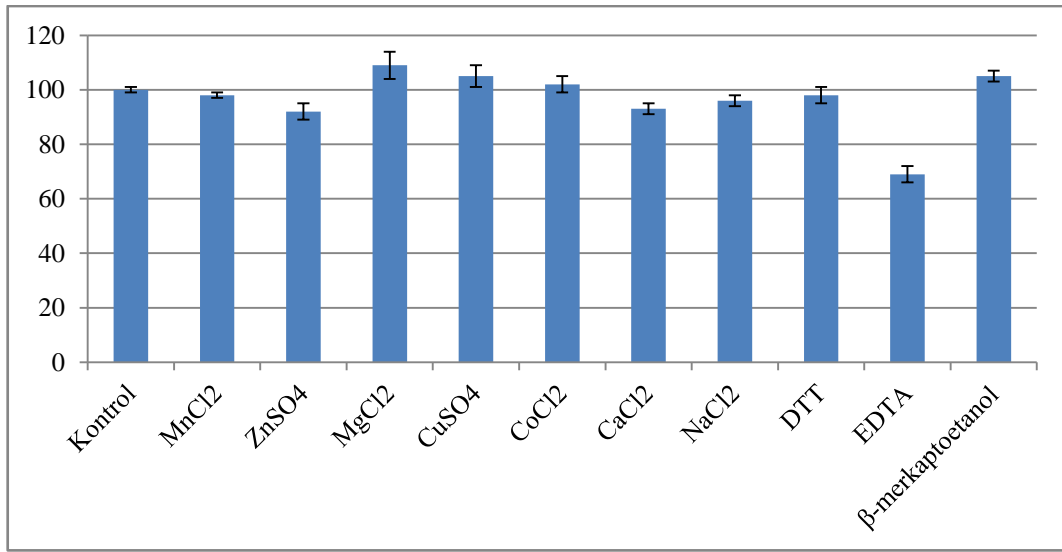


Şekil 22. Abf2 enzimi-ısı kararlılık grafiği

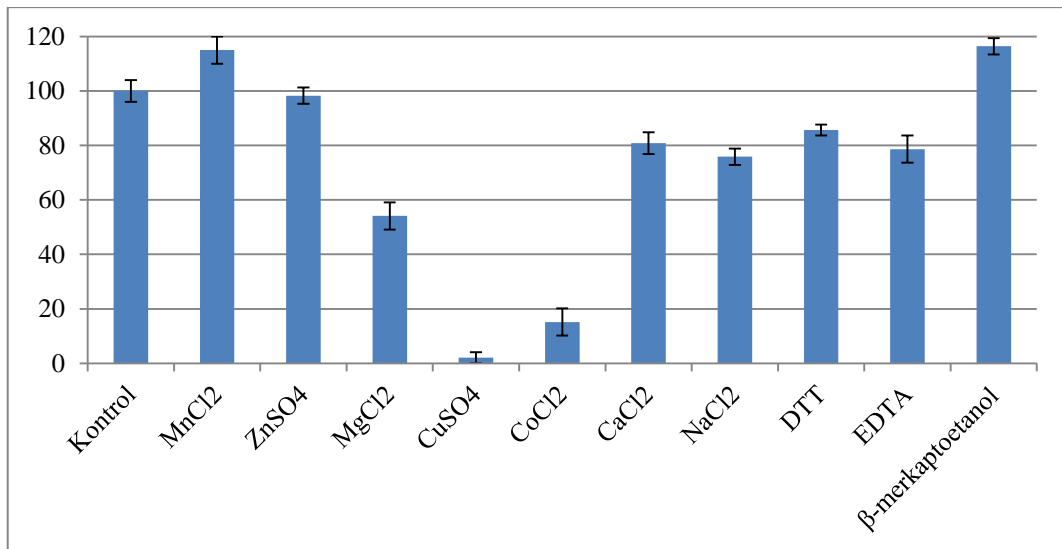
3.3.8. Aktivatör ve İnhibitör Etkisi

Çeşitli konsantrasyonlardaki metal iyonlarının ve bazı kimyasalların Abf1 aktivitesi üzerine olan etkisi enzimin optimum aktivite gösterdiği reaksiyon şartlarında (0,2 mM substrat konsantrasyonu, pH 6,5; 65°C'de 10 dakika) belirlendi. Çeşitli

konsantrasyonlardaki metal iyonlarının ve bazı kimyasalların Abf2 aktivitesi üzerine olan etkisi de enzimin optimum aktivite gösterdiği reaksiyon şartlarda (0,4 mM substrat konsantrasyonu, pH 5.5, 50°C’de 10 dakika) gerçekleştirilen reaksiyonlarla belirlendi. Bu amaçla reaksiyon tüplerine ilave edilen aktivatör maddeler şunlardır: Mn^{+2} , Zn^{+2} , Mg^{+2} , Cu^{+2} , Co^{+2} , Ca^{+2} ve Na^{+} bivalent metal iyonlarının klorür tuzları, EDTA, β -merkaptotanol ve DTT’dir. Çalışma sonucunda Abf1 enzimi için Şekil 22’deki grafik elde edilirken Abf2 enzimi için Şekil 23’deki grafik elde edildi.



Şekil 23. Abf1 enzimine aktivatör ve inhibitör etkisi



Şekil 24. Abf2 enzimine aktivatör ve inhibitör etkisi

3.3.9. Substrat Spesifikliğinin Belirlenmesi

Geobacillus stearothermophilus 12 Abf1 ve Abf2 enzimlerinin substrat spesifikliğinin belirlenmesi amacıyla řu substratlar kullanıldı: *p*NP- α -L-arabinofuranoside, *p*NP- α -L-arabinopyranoside, *p*NP- β -L-arabinopiranoside, *p*NP- α -D-galaktopiranoside, *p*NP- β -D-galaktopiranoside, *p*NP- α -D-ksilopiranoside, *p*NP- β -D-ksilopiranoside, *p*NP- α -D-glukopiranoside, *p*NP- β -D-glukopiranoside, *p*NP- α -L-ramnopiranoside, *p*NP-N-asetil- β -D-glukosaminide ve *p*NP- β -D-fukopiranoside. Reaksiyon şartları daha önce belirtilen *p*NP- α -L-arabinofuranosid substratı kullanılarak yapılan standart aktivite testinde kullanılan şekilde tasarlandı. Yapılan çalışma sonucunda her iki enzimin de *p*NP- α -L-arabinofuranosid substratı dışında herhangi bir substrat üzerinde etkili olmadığı görülmüştür.

4. TARTIŞMA

K.T.Ü Fen Bilimleri Estitüsünde yüksek lisans tezi olarak hazırlanan bu çalışma *Geobacillus* cinsine ait bir bakteri olan *Geobacillus stearothermophilus* 12 bakterisinin sahip olduğu iki adet alfa-L-arabinofuranosidaz enzimini kodlayan genlerin klonlanması ve karakterizasyonlarının yapılması açısından önem taşımaktadır. *Geobacillus* cinsi *Bacillus* cinsinden 2001 yılında ayrılmıştır ve *Geobacillus stearothermophilus* tip türü olarak belirlenmiş ve sınıflandırmaya katılmıştır (Nazina vd. 2001; Çanakçı vd. 2007). Bu tez kapsamında yapılan çalışmalar sonucunda ortaya çıkarılan *Geobacillus stearothermophilus* 12 suşuna ait iki adet Arabinofuranosidaz geninin tüm nükleotit ve aminoasit sırası belirlenerek bu diziler GenBank'ta mevcut diğer Arabinofuranosidazlar ile karşılaştırılmış ve sonuçta nükleotit düzeyinde Abf1'in *Geobacillus vulcani*'ye ait arabinofuranosidaz geni ile %92, *Geobacillus thermoleoverans* Abf geni ile %92, *Geobacillus thermodenitrificans* Abf geni ile %92 ve *G. stearothermophilus* T6 arabinofuranosidazı ile %91 oranında benzer olduğu görülmüştür. Ayrıca elde edilen Abf1 sekansının aminoasit düzeyinde *Geobacillus kaustophilus* α -N-arabinofuranosidazına %98, *Geobacillus denitrificans*'ın Abf'sine %97 oranında benzer olduğunu belirlenmiştir. Abf2 geninin nükleotit ve amino asit sekanslarının GenBank'taki sıralarla karşılaştırılması sonucunda ise *Geobacillus stearothermophilus*'un Abf'sine %99 oranında benzer olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Geobacillus stearothermophilus 12 bakterisinden elde edilen iki arabinofuranosidaz enziminin gen sıraları birbirleri ile kıyaslandığında aralarında farklılık olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda da, bu iki gen bölgesinden elde edilen enzimlerin birbirlerinden farklı özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir. *Geobacillus stearothermophilus* 12'nin Abf1'inin optimum sıcaklık ve pH değerleri sırası ile 65°C ve 6,5'tur; Abf2'nin optimum sıcaklık ve pH değerleri ise; sırası ile 50°C ve 5,5'tur.

Geobacillus stearothermophilus 12 bakterisi gibi, iki farklı α -L-arabinofuranosidaz enzimine sahip olan başka canlı türleri de bulunmaktadır. *Bacillus subtilis*, *Penicillium capsulatum*, *Streptomyces diastaticus*, *Streptomyces chartreusis* GS901 ve *Aspergillus awamori* IFO 4033 bu türler arasında en dikkat çekenlerdir.

Bacillus subtilis türünün 37°C’de, substrat olarak *p*-nitrophenil- α -L-arabinofuranosid kullanılarak gerçekleştirilen kinetik çalışmalarında sahip olduğu AbfA ve Abf2 enzimlerinin moleküler ağırlıkları sırası ile; 58 kDa ve 57 kDa olarak tespit edilmiştir. Bu moleküler ağırlıklar *Geobacillus stearothermophilus* 12 bakterisinin Abf1 ve Abf2 enzimlerinin moleküler ağırlıklarına çok yakındır. *Bacillus subtilis*’e ait AbfA ve Abf1 enzimlerine ait optimum sıcaklık değerleri; 50°C ve 60°C; optimum pH değerleri ise; 8.0 olarak belirlenmiştir. *Geobacillus stearothermophilus* 12 bakterisinin Abf1 ve Abf2 enzimlerinin sıcaklık değerleri *Bacillus subtilis*’in enzimlerinin değerine çok yakın olmakla beraber, *Geobacillus stearothermophilus* 12 bakterisinin Abf1 ve Abf2 enzimlerinin pH değerleri düşüktür. *Bacillus subtilis*’e ait AbfA ve Abf1 enzimlerinin *p*-nitrophenil- α -L-arabinofuranosid substratına ait K_m değerleri; 0,498 mM ve 0,421 mM ve V_{max} değerleri; 317 U/mg ve 311 U/mg olarak belirtilmiştir. Dolayısıyla her iki enzimin bu substrata olan ilgisi birbirine yakındır. Ama *Geobacillus stearothermophilus* 12 bakterisinin Abf1 ve Abf2 enzimlerinin K_m değerleri daha düşük olduğundan, *Bacillus subtilis*’e göre; afinitesi daha yüksektir. AbfA ve Abf1 enzimlerinin ikisi de GH51 ailesine ait olmakla beraber substrat spesifikliği açısından birbirlerinden ayrılmaktadır. AbfA enzimi α -1,5-L-arabinanın düz haldeki 1-5 bağlarına ve α -1,5-bağlı arabino-oligomerlerine etki ederken; branched sugar beet arabinan, arabinoksilan ve arabinogalaktan üzerine etkisi düşüktür. Abf2 enziminin, branched sugar beet arabinanın ve arabinoksilanın (1-2) ve (1-3) bağlarına etkisi, AbfA enziminden daha fazladır. AbfA ve Abf2 enzimlerinin branched sugar beet arabinan substratı için K_m değerlerine bakıldığında sırasıyla 4,4±0,6 mM ve 0,35±0,03 mM olduğu görülmüştür. Dolayısıyla AbfA enziminin branched sugar beet arabinana olan afinitesinin Abf2 enziminden çok daha düşük olduğu görülmüştür. Bundan dolayı her iki enzim beraber çalışarak *Bacillus subtilis* bakterisindeki arabinoz içeren polisakkaritleri birlikte hidroliz ederek arabinoz içeren oligosakkaritlerden en yüksek oranda fayda sağlamaktadır (Inácio vd., 2008). Bununla birlikte *Geobacillus stearothermophilus* 12 bakterisine ait Abf1 ve Abf2 enzimleri de arabinanın 1,5- α -L-bağlı-arabinofuranosid bağlarına etki etmektedir. Ama tıpkı *Bacillus subtilis* bakterisinin enzimlerinde olduğu gibi Abf1 ve Abf2 enzimleri arasında da arabinana olan afinitede farklılık bulunmaktadır. Abf1 ve Abf2 enzimlerinin arabinan substratı için K_m değerleri; sırasıyla 4,74 μ g/ml ve 5,49 μ g/ml’dir. Bu değerler de Abf1 enziminin arabinan substratına olan afinitesinin Abf2 enziminden yüksek olduğunun göstermiştir.

Bir fungus türü olan *Penicillium capsulatum* ile 37°C'de, substrat olarak 4-nitrophenil- α -L-arabinofuranosid kullanılarak gerçekleştirilen kinetik çalışmalarda ise; AraI ve AraII olarak isimlendirilen enzimlerin moleküler ağırlıklarının 64,5 kDa ve 62,7 kDa olduğu ve *Geobacillus stearothermophilus* 12 bakterisinin Abf1 ve Abf2 enzimlerinden daha ağır olduğu görülmüştür. AraI ve AraII enzimlerinin optimum sıcaklık değerleri sırasıyla; 60°C ve 55°C iken; optimum pH değerinin 4.0 olduğu görülürken; Abf1 ve Abf2 enzimlerinin sıcaklık değerlerinin bu değerlere yakın olduğu ama pH değerlerinin daha yüksek olduğu görülmüştür.. AraI pH 4.0'da 70°C'de 17.5 dk.'da %50 aktivite gösterirken; AraII de pH 4.0'da 60°C'de 9 dk.'da %50 aktivite göstermektedir. Bu iki enzimin K_m değerleri; 0,18 mM ve 1,3 mM; V_{max} değerleri ise; 0.21 ve 0.16 IU ml⁻¹ olarak tespit edilmiştir. Her iki enzim *p*-nitrofenil- α -L-arabinofuranosidaz üzerine %100, arabinan (beet pulp) üzerine % 95-%96 oranında etkiliyken; çözünebilir arabinoksilan üzerine etkileri, çözülemeyen arabinoksilan üzerine olan etkilerinden daha yüksektir. AraI ve AraII enzimlerinin *p*-Nitrofenil- α -L-arabinofuranosidaz substratı açısından sahip olduğu K_m değerlerine bakıldığında AraI enziminin AraII enziminden daha yüksek bir afiniteye sahip olduğu görülmüştür. *Geobacillus stearothermophilus* 12 bakterisinin *p*-Nitrofenil- α -L-arabinofuranosidaz substratı açısından sahip olduğu K_m değerlerine bakıldığında ise; yüksek afinitenin Abf2 enzime ait olduğu tespit edilmiştir. (Filho vd., 1996).

Streptomyces diastaticus ET ve *Streptomyces chartreusis* GS901 türleri de iki adet α -L-arabinofuranosidaz taşıyan fungus türleridir. *Streptomyces diastaticus* ET'nin C1 ve C2 olarak isimlendirilen α -L-arabinofuranosidazlarının moleküler ağırlıkları 38 kDa ve 60 kDa'dur. *Geobacillus stearothermophilus* 12 bakterisinin Abf1 ve Abf2 enzimlerinin ise moleküler ağırlıklarının C2 enziminin moleküler ağırlığına yakın olduğu görülmüştür. C1 ve C2 enzimleri pH 5-6,5 arasında optimum aktivite gösterirken; pH 3,5-7,5 arasında %90 aktivite göstermektedir. Abf1 ve Abf2 enzimlerinin de pH değerleri bu değerlere çok yakındır. C1 ve C2 enzimlerin ısıl kararlılıkları ise; birbirinden farklıdır. C1 ve C2 enzimleri 25°C'de 8 saat inkübe edildiklerinde sırası ile aktivitelerinin %50'sini ve %80'ini kaybetmişler; 50°C'de 3 saat inkübe edildiklerinde ise; sırası ile aktivitelerinin %90 ve %40'ını kaybetmişlerdir. Her iki enzim de *p*-nitrophenyl- α -L-arabinofuranosidi hidroliz etmekte ve arabinoksilan ile debranched β -1,5-arabinandan arabinozu serbest hale getirebilmektedir. Substrat olarak *p*-nitrophenyl- α -L-arabinofuranosid kullanıldığında bu iki enzimin K_m değerinin sırası ile; 10 mM ve 12,5 mM olduğu bulunmuştur. Dolayısıyla C1 enziminin *p*-nitrophenyl- α -L-arabinofuranosid substratına olan afinitesi yüksektir. Bu

substrat açısından Abf1 ve Abf2 enzimlerinin K_m değerleri ise; C1 ve C2'den oldukça düşüktür. Bu da Abf1 ve Abf2 enzimlerinin substrata olan afinitesinin yüksek olduğunu göstermektedir. Bu C1 ve C2 enzimleri arabinoksilan ile debranched β -1,5-arabinan substratları ile aktivite gösterdikleri tayin edilmişse de bu substratlar için kinetik bir hesaplama yapılmamıştır (Tajana vd., 1992).

Streptomyces chartreusis GS901 türünün sahip olduğu α -L-arabinofuranosidaz enzimleri α -L-AFaz I ve α -L-AFaz II olarak isimlendirilmektedir. α -L-AFaz I ve α -L-AFaz II enzimlerinin en yüksek aktivite gösterdikleri sıcaklık değerleri; 55°C ve 50°C olarak tespit edilmişken; en yüksek aktivite gösterdikleri optimum pH değerleri sırası ile; pH 5.5 ve pH 7,0 olarak tespit edilmiştir. α -L-AFaz I'in 45°C 'nin üzerinde, pH 5,5'un altında ve pH 8,5'in üzerinde aktivitesini kaybettiği; α -L-AFaz II'nin de 40°C 'nin üzerinde, pH 5,0'in altında ve pH 9,0'in üzerinde aktivitesini kaybettiği tespit edilmiştir. Her iki enzimin de PNP- α -L-Araf'ı hidroliz ettiği ama PNP- α -L-Arap, PNP- β -D-Xylp ve PNP- β -D-Galp'i hidroliz edemediği bulunmuştur. Ayrıca α -L-AFaz I enzimi metil 3,5-di-O- α -L-arabinofuranosil- α -L-arabinofuranosit'in arabinozil yan zincirlerindeki (1 \rightarrow 3) bağlarını (1 \rightarrow 5) bağlarından daha iyi kırarken, α -L-AFaz II enzimi sadece (1 \rightarrow 5) bağları üzerine etki etmekte ve böylece bu bağı α -L-AFaz I enziminden daha iyi kırmaktadır. α -L-AFaz II enzimi için düz 1 \rightarrow 5-bağlı arabinan iyi bir substratken; α -L-AFaz I enzimi düz zincir halindeki arabinanı parçalamakta zorlanmaktadır. α -L-AFaz I ve α -L-AFaz II enzimlerinin arabinan substratını hidroliz etme oranlarına (% olarak) bakıldığında; sırasıyla % 35,7 ve % 4,3 olduğu ve arabinan substratı üzerine α -L-AFaz I enziminin daha etkili olduğu görülmüştür. Dolayısıyla α -L-AFaz I ve α -L-AFaz II enzimleri arasındaki sinerjistik etki sayesinde arabinanın ve debranched arabinanın arabinoza dönüşümü sağlanmaktadır (Matsou vd., 2000).

İki adet α -L-Arabinofuranosidaza sahip olan bir diğer canlı türü de bir fungus olan *Aspergillus awamori* IFO 4033'tür. *Aspergillus awamori* IFO 4033'den elde edilen ve α -L-Arabinofuranosidaz I ve α -L-Arabinofuranosidaz II olarak isimlendirilen iki adet α -L-Arabinofuranosidaz enzimi ile yapılan çalışmalarda da bu enzimlerin moleküler ağırlıkları 81 kDa ve 62 kDa olarak tespit edilmiştir. Ayrıca her iki enzimin de optimum sıcaklık değeri 60°C , pH değeri 4.0 olarak belirlenmiştir. Ancak 60°C 'nin üzerindeki sıcaklıklarda ve pH 3,0-7,0 arasında da kararlı oldukları gözlenmiştir. Bu enzimler *p*-nitrophenyl- α -L-arabinofuranosid, O - α -L-arabinofuranosil-(1-3)- O - β -D-ksilopyranosil-(1-4)-D-ksilopyranoz, ve arabinoz içeren polisakkaritlerden arabinoz açığa çıkarmaktadır ancak O -

β -D-ksilopiranosil-(1-2)-*O*- α -L-arabinofuranosil-(1-3)-*O*- β -D-ksilopiranosil-(1-4)-*O*- β -D-ksilopiranosil-(1-4)-D-ksilopiranozda bu işlemi gerçekleştirememektedir. α -L-Arabinofuranosidaz I, *O*- β -D-ksilopiranosil-(1-4)-[*O*- α -L-arabinofuranosil-(1-3)]-*O*- β -D-ksilopiranosil-(1-4)-D-ksilopiranozdan arabinoz açığa çıkarırken; α -L-Arabinofuranosidaz II bu hidroliz reaksiyonunu katalizleyememektedir (Kaneko vd., 1998). Her iki enzimin de metil arabinofuranobiyositler üzerine olan etkilerine bakıldığında α -L-Arabinofuranosidaz I enziminin, metil arabinofuranobiyozidesin (1-3) bağı üzerinde, α -L-Arabinofuranosidaz II enziminden daha etkili olduğu görülmüştür. α -L-Arabinofuranosidaz II enziminin ise; metil arabinofuranobiyozidesin (1-2) bağı üzerinde, α -L-Arabinofuranosidaz I enziminden daha etkili olduğu görülmüştür. *Aspergillus awamori* IFO 4033 bakterisinin Arabinofuranosidaz I ve α -L-Arabinofuranosidaz II enzimlerinin arabinoz içeren polisakkaritler ile gerçekleştirilen aktivite çalışmalarına bakıldığında %88,0 arabinoz içeren debrached arabinanın parçalanmasında Arabinofuranosidaz I ve Arabinofuranosidaz II enzimlerinin sırasıyla %25,6 ve %23,3 etkili olduğu görülmüştür. Bu enzimlerin %81,0 arabinoz içeren arabinanın parçalanmasındaki etkilerinin ise; sırasıyla %36,3 ve %67,4 olduğu görülmüştür. Bu da arabinan substratı üzerine α -L-Arabinofuranosidaz II enziminin, α -L-Arabinofuranosidaz I enziminden yaklaşık iki kat etkili olduğunu görülmüştür. Bununla birlikte α -L-Arabinofuranosidaz I ve α -L-Arabinofuranosidaz II enzimleri sinerjistik olarak substratlara etki etmekte ve bu etki sayesinde substratlardan en yüksek oranda yarar sağlanmaktadır (Kaneko vd., 1998).

Geobacillus stearothermophilus 12 bakterisi bu tez kapsamında çalışılan enzimleri açısından, bu enzimden yapısında bir adet bulunduran farklı bakterileri ile de kıyaslanmıştır. Örneğin termofilik bir bakteri olan *Thermomicrobia* cinsine ait olduğu bulunan alfa-L-arabinofuranosidaz (araF) enziminin gen dizisi literatür ile karşılaştırıldığında, dizinin *Geobacillus stearothermophilus*'a benzediği bulunmuştur. Enzim karakterizasyonu açısından karşılaştırıldığında, *Geobacillus stearothermophilus* 12'nin Abf1 ve Abf2'sinin optimum sıcaklıklarının daha düşük olduğu, optimum pH değerine bakıldığında ise; Abf1'in optimum pH değerinin daha yüksek, Abf2'nin optimum pH değerinin ise; daha düşük olduğu tespit edilmiştir. *Thermomicrobia*'nın AraF enziminin *p*-nitrophenyl- α -L-arabinofuranosid substratı için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla; 0,6 mM ve 122U/mg'dır. *Geobacillus stearothermophilus* 12 bakterisinin Abf1 ve Abf2 enzimlerinin *p*-nitrophenyl- α -L-arabinofuranosid substratı için K_m değerleri 0,31±0,04 mM ve 0,23±0,03 mM'dır, V_{max} değerleri ise; 290U/mg ve 213,2 U/mg'dır. Dolayısıyla Abf1

ve Abf2 enzimleri endüstriyel kullanım açısından *Thermomicrobia*'nın AraF enziminden daha kullanışlıdır (Birgisson vd., 2004). *Bacillus subtilis* 3-6 suşunun alfa-L-arabinofuranosidaz enzimi ile karşılaştırıldığında ise, *Geobacillus stearothermophilus* 12'nin Abf1'inin optimum sıcaklığının yüksek olduğu, Abf2'nin optimum sıcaklığının ise; düşük olduğu; optimum pH değerinin ise; *Geobacillus stearothermophilus* 12'nin Abf1'ininki ile aynı olduğu ancak *Geobacillus stearothermophilus* 12'nin Abf2'sinin düşük olduğu tespit edilmiştir (Kaneko vd., 1994). *Ruminococcus albus* 8 bakterisinden elde edilen alfa-L-arabinofuranosidaz enziminin optimum pH değerine bakıldığında, *Geobacillus stearothermophilus* 12'nin hem Abf1'inin hem de Abf2'sinin optimum değerinin bu enzimin değerinden düşük olduğu görülmektedir. Ayrıca *p*-nitrophenyl- α -L-arabinofuranosid substratı açısından K_m değeri 1,3 mM'dır. Dolayısıyla hem Abf1'den hem de Abf2'den oldukça düşük bir afiniteye sahiptir (Greve vd., 1984). Bir mantar türü olan *Aspergillus niger*'e alfa-L-arabinofuranosidaz açısından bakıldığında, optimum sıcaklığının *Geobacillus stearothermophilus* 12'nin Abf1'inden düşük, Abf2'sinden yüksek olduğu; optimum pH değerinin de *Geobacillus stearothermophilus* 12'nin hem Abf1'inden hem de Abf2'sinden düşük olduğu görülmüştür. Dolayısıyla enzimlerin her biri farklı optimum sıcaklık ve pH değerlerine sahiptir ve bu değerler enzimlerin kullanışlılığını etkilemektedir. Ama en önemli etkenlerden bir de enzim ile substratın birbirlerine olan ilgisidir. *Geobacillus stearothermophilus* 12 bakterisine ait Abf1 ve Abf2 enzimlerinin hem optimum sıcaklık ve pH değerleri hem de substratlara olan ilgisi açısından endüstriyel bir kullanıma sahip olabileceği görülmektedir.

Geobacillus stearothermophilus 12 bakterisi, Abf1 ve Abf2 enzimlerine benzer enzimlere sahip olan diğer bakteriler ile d kıyaslanmıştır. Örneğin; *Bacillus stearothermophilus* T-6 bakterisinin optimum sıcaklığının *Geobacillus stearothermophilus* 12'nin hem Abf1'inden hem de Abf2'sinden yüksek olduğu; optimum pH değerinin ise; Abf1'den düşük Abf2 ile aynı olduğu görülmektedir. Bir diğer suş olan *Bacillus stearothermophilus* L-1'in de alfa-L-arabinofuranosidazının hem optimum sıcaklık değeri hem de optimum pH değeri *Geobacillus stearothermophilus* 12'nin Abf1'inkinden ve Abf2'sininken yüksektir (Gilead ve Shoham, 1995). *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26Sari'den elde edilen α -L-arabinofuranosidaza bakıldığında optimum sıcaklığının *Geobacillus stearothermophilus* 12'nin Abf1'inki ile aynı, Abf2'ninkinden ise; yüksek olduğu görülmüştür, optimum pH değerine bakıldığında da *Geobacillus stearothermophilus* 12'nin Abf1'inkinden düşük Abf2'ninki ile de aynı olduğu

görülmüştür. *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26Sari'den elde edilen α -L-arabinofuranosidazın *p*-nitrophenyl α -L-arabinofuranosid substratı için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla; 0,139 mM ve 1,019 U/mg olmakla birlikte hem Abf1 hem de Abf2 enziminin K_m değerinden düşüktür, bundan dolayı da afinitesi daha yüksektir (Çanakçı vd., 2008). *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26Sari'den elde edilen α -L-arabinofuranosidazın arabinan substratı için K_m değeri ise; 5,21 mg/ml'dir. Bu değer de *Geobacillus stearothermophilus* 12'nin Abf1 ve Abf2 enzimler ile karşılaştırıldığında daha düşük bir afiniteyi göstermektedir (Çanakçı vd., 2008). Bir başka bakteri olan *Geobacillus caldxylolyticus* TK4'ün α -L-arabinofuranosidazının optimum sıcaklığının *Geobacillus stearothermophilus* 12'nin hem Abf1'inkinden hem de Abf2'ninkinden yüksek olduğu pH değerinin ise; Abf1'inkinden düşük Abf2'ninkinden ise; yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca bu bakterinin *p*-nitrophenyl- α -L-arabinofuranosid substratı için K_m değeri 0,17 mM olup Abf1 ve Abf2'den yüksek bir afiniteye sahip olduğu gösterirken; V_{max} değeri 588,2 U/mg olup, Abf1 ve Abf2'den yüksektir. *Geobacillus caldxylolyticus* TK4'ün α -L-arabinofuranosidazının arabinan substratı için K_m ve V_{max} değerlerinin ise; 67,56 mg/ml ve 0,0148 μ mol olduğu görülmüştür. Buna göre; Abf1 ve Abf2 enzimlerinin afinitelerinin yüksek olduğu tespit edilmiştir (Çanakçı vd., 2007).

Geobacillus stearothermophilus 12'nin Abf1 ve Abf2 enzimleri ile *Geobacillus stearothermophilus* T6 enzimleri *pNP* α -L-AF'ı parçalayabilirken diğer *pNP*-glycosides'leri hidroliz edememektedirler. *A. kestanbolensis* AC26sari enzimleri ise; *pNP* α -AF ve arabinanı parçalamakta olup *pNP* α -AF ve arabinan için K_m değeri ise; 0,139 mM ve 5,21 mg/ml'dir. *Geobacillus stearothermophilus* 12'nin Abf1 ve Abf2 enzimlerinin arabinan için K_m değerleri ise; 4,74 μ g/ml ve 5,49 μ g/ml, V_{max} değerleri ise; 20,052 U/mg ve 77,82 U/mg'dır. Bu değerler dikkate alındığında *A. kestanbolensis* AC26sari enziminin afinitesinin hem Abf1'den hem de Abf2'den yüksek olduğu görülmüştür. Buna karşılık *Geobacillus caldxylolyticus* TK4 arabinofuranosidaz enzimi de hem *pNP*- α -D-ksilopiranosid'i hem de *pNP* α AF'ı hidroliz edebilmektedir.

pNP α AF substrat olarak kullanıldığında *Geobacillus stearothermophilus* 12'nin Abf1'inin K_m değeri $0,31 \pm 0,04$ mM ve V_{max} değeri 290 U/mg olarak hesaplanmıştır. *Geobacillus stearothermophilus* 12'nin Abf2'sinin K_m değeri $0,23 \pm 0,03$ mM ve V_{max} değeri 213,2 U/mg olarak hesaplanmıştır. Bu K_m değerleri açısından *Geobacillus stearothermophilus* 12'nin Abf1 ve Abf2'sinin diğer bazı bakteriyal arabinofuranosidazlar ile karşılaştırıldığında onlara yakın bir K_m değerine sahip olduğu görülmektedir. Şöyleki,

pNPaAF substrat olarak kullanıldığında *G. stearothermophilus* T6 ve L1, *Geobacillus caldaxylolyticus* AbfATK4 ve *Ruminococcus albus* 8'in K_m değerleri 0,42 mM; 0,22 mM, 0,17 mM ve 1,6 mM'dir. *Thermomicrobia* cinsi bakterinin α -L-arabinofuranosidaz enziminin K_m değeri ise; 0,6 mM ve V_{max} değeri 122 U/mg'dir. Buna göre en yüksek afiniteyi ise; *Geobacillus caldaxylolyticus* AbfATK4 göstermektedir.

Geobacillus stearothermophilus 12 bakterisinin Abf1 ve Abf2 enzimlerine metal iyon etkisine bakıldığında da; Abf1 enziminin aktivitesinin kullanılan kimyasallardan sadece EDTA ile %30 civarında azaldığı diğer kimyasallar ise aktivite üzerinde çok bariz bir artma ya da azalma olmadığı gözlenmiştir. *Geobacillus stearothermophilus* 12 bakterisinin Abf2 enziminin aktivitesinin ise Mg^{2+} , Cu^{2+} ve Co^{2+} metal iyonları varlığında tamamen ya da kısmen inhibe olduğu gözlenmiştir. Ayrıca EDTA, DTT, Na^+ , ve Ca^{2+} 'nın ise *Geobacillus stearothermophilus* 12 bakterisinin Abf2 enziminin aktivitesinde %15-20 arasında bir azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. β -merkaptolanol ise; Abf2'nin aktivitesinde artışa neden olmuştur. Genel olarak bakıldığında Cu^{2+} , ve Zn^{2+} metal iyonlarının arabinofuranosidazlar için inhibitör etkilerinin olduğu bilinmektedir ancak bunlardan hiçbirisi Abf1'in üzerinde bir etki meydana getirmemiştir. *Geobacillus stearothermophilus* T-6 Abf'sinde Ca^{2+} 'un inhibitör etkiye sahip olduğu bilinmekte olup benzer bir etki de *Geobacillus stearothermophilus* 12 bakterisinin Abf2 enziminde görülmektedir. Abf2'nin EDTA gibi Şelatlayıcı kimyasallardan etkilenmesi onun bir metaalloprotein olabileceğini göstermektedir.

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada *Geobacillus stearothermophilus* 12 bakterisine ait iki adet α -L-Arabinofuranosidaz geni olduğu bulundu. Bu iki gen *abf1* ve *abf2* olarak isimlendirilmektedir. Bu iki gen ayrı ayrı klonlanıp, ekspres edildi. Ekspresyonun ardından bu enzimlerin karakterizasyon işlemleri gerçekleştirilerek, optimum aktivite gösterdikleri pH ve sıcaklık değerleri, kararlı oldukları pH ve ısıl değerleri, inhibitör ve aktivator etkisi ve kinetik parametreleri gibi özellikleri belirlendi.

Geobacillus stearothermophilus 12 bakterisinin sahip olduğu *abf1* ve *abf2* proteinleri hem native jelde görüntüledi hem de yapılan aktivite çalışmaları sonucunda ortaya çıkarıldı. *Geobacillus stearothermophilus* 12 bakterisinin *abf1* genine ait 1509 baz çiftlik DNA parçası ve *abf2* genine ait 1518 baz çiftlik DNA parçası tasarlanan primerler yardımıyla invers PCR ile çoğaltıldı ve p-GEMT-Easy klonlama vektörüne klonlanarak baz dizisi belirlendi. Daha sonra bu genler His Taq kuyruğu içeren bir ekspresyon vektörü olan pET28-a(+)'ya N-terminalinde bir histidin kuyruk içerecek şekilde klonlandı ve ekspresyonu gerçekleştirildi. Ekspreslenen protein Ni-NTA kromatografisi ile saflaştırıldı. Saflaştırmanın ardından *abf1* ve *abf2* proteinleri moleküler ağırlıklarının tespiti için SDS-PAGE ünitesine yüklenmiş, *abf1* proteininin moleküler ağırlığı 57 kDa, *abf2* proteininin moleküler ağırlığı ise; 56 kDa olarak tespit edilmiştir. Bu iki enzimin SDS-PAGE ile ağırlıklarının birbirlerinden çok farklı görülmesinin sebebi olarak; anyonik yüklü SDS'in bu enzimlerin farklı iyonik yüke sahip aminoasitlerine bağlanma kuvvetinin değişmesi gösterilebilir.

Geobacillus stearothermophilus 12'ye ait saf *abf1* ve *abf2* enzimleri kullanılarak yapılan çalışmalarda, *abf1*'in optimum pH değerinin 6,5; optimum çalışma sıcaklığının ise, 65°C olduğu; *abf2*'nin optimum pH değerinin 5,5; optimum çalışma sıcaklığının ise, 50°C olduğu tespit edildi. Her iki enzimin, substrat olarak kullanılan *p*-nitrophenil- α -L-arabinofuranosid ile gerçekleştirilen kinetik çalışmalarda bu substrat için K_m değerlerinin *abf1* ve *abf2* için sırayla 0,31±0,04 mM ve 0,23±0,03 mM olduğu ve V_{max} değerlerinin ise *abf1* ve *abf2* için sırayla 290 U/mg ve 213,2 U/mg olduğu belirlendi. Her iki enzimin, substrat olarak kullanılan arabinan ile gerçekleştirilen kinetik çalışmalarda bu substrat için K_m değerlerinin *abf1* ve *abf2* için sırayla 4,74 μ g/ml ve 5,49 μ g/ml olduğu ve V_{max} değerlerinin ise; 20,052 U/mg ve 77,82 U/mg olduğu belirlendi. Her iki enzim pH ve ısıl

kararlılıkları açısından karşılaştırıldığında ise; abf1 enziminin aktivitesinde pH 6-11 arasında 72 saat inkübasyon sonunda herhangi bir aktivite kaybının olmadığı tespit edilirken, abf2 enziminin ise pH 10 civarlarında 48 saate kadar kararlılığını koruduğu ancak diğer pH değerlerinde ise kararlılığının çok iyi olmadığı tespit edildi.

Geobacillus stearothermophilus 12'nin Abf1'inin aktivitesinin, kullanılan kimyasallardan sadece EDTA ile %30 civarında azaldığı, Mg^{2+} , Cu^{2+} ve Co^{2+} metal iyonları ile β -merkaptolanol varlığında aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir. *Geobacillus stearothermophilus* 12'nin Abf2 aktivitesine bakıldığında ise; Mg^{2+} , Cu^{2+} ve Co^{2+} metal iyonları varlığında aktivitede büyük ölçüde azalma olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında Ca^{+2} , Na^{+} ve EDTA'nın da *Geobacillus stearothermophilus* 12'nin Abf2'sinin aktivitesinde %15-20 arasında bir azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. Mn^{+2} , DTT ve β -merkaptolanol ise; Abf2'nin aktivitesinde artışa neden olmuştur.

Abf1 ve abf2 enzimleri substrat spesifiklikleri açısından karşılaştırıldığında ise; her iki proteinin de *p*-nitrophenil- α -L- arabinofuranosid dışında herhangi bir substrata karşı aktivitesinin olmadığı görülmüştür.

6. ÖNERİLER

Termofilik bakteriler ve bu bakterilerin sahip oldukları termofilik enzimler hem bilimsel hem de endüstriyel açıdan oldukça önemlidir. Çünkü bu termofilik bakteriler ve termofilik enzimleri; kimyasal hammadde ve yakıt üretiminde, atıkların biyolojik dönüşümünde, enzim teknolojisinde ve tek hücre proteinlerinin üretiminde kullanılmaktadırlar. Termofilik bakterilerin enzimlerinin bu kadar ilgi çekici olmasının en önemli sebeplerinden biri yüksek sıcaklıkta sahip oldukları ısıl kararlılıktır. Bu durum termofilik bakterilere olan ilgiyi artırarak, değişik enzimlerinin de bulunmasını veya mevcut olanların detaylı bir şekilde incelenmesine imkan verebilir. Bu enzimler arasında en ilgi çekici olan ise; arabinofuranozidazlardır. Arabinofuranozidazlar; yenilenebilir ve sürdürülebilir bir enerji kaynağı olan bitki hücre polisakariti hemiselulozların yıkımında kullanılmaktadır. Bu çalışma kapsamında üzerinde durulan α -L-arabinofuranozidazlar da optimum verimlilik için yüksek sıcaklığa gerek duymaktadır. Abf1 ve Abf2 olarak iki tipi bulunan bu termofilik enzimin daha detaylı incelenerek, endüstriyel kullanım alanlarının daha da genişletilmesi mümkün olabilir. Bu tez kapsamında üzerinde çalışılan Abf enzimleri *Geobacillus* cinsi bir bakteriden elde edilmiştir. Dolayısıyla bakteri üzerinde gerçekleştirilebilecek çeşitli mutasyonlar ile sahip oldukları bu enzimlerin veya başka enzimlerinin pH aralıkları, metal iyon etkinliği ve diğer çalışma koşulları değiştirilebilir ya da iyileştirilebilir. Ayrıca, her iki enzim ayrı ayrı ele alınarak, çalışılarak ve mutasyona tabii tutularak bakteri üzerindeki etkileri araştırılabilir. Böylece daha kapsamlı araştırma, geliştirme çalışmaları ile aynı enzimin değişik özelliklere sahip tipleri meydana getirilebilir.

7. KAYNAKLAR

- Amore, A., Amoresano, A., Birolo, L., Henrissat, B., Leo, G., Palmese, A. ve Faraco, V., 2012. A family GH51 α -L-arabinofuranosidase from *Pleurotus ostreatus*: identification, recombinant expression and characterization, Applied Microbiology Biotechnology, 94, 4, 995–1006.
- Ash, C., Farrow, J. A. E., 1991. Wallbanks, S. ve Collins, M. D., Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences, Letters in Applied Microbiology, 13, 4, 202-206.
- Banat, I. M., Marchant R. ve Rahman, T. J., 2004. *Geobacillus debilis* sp. nov., a novel obligately thermophilic bacterium isolated from a cool soil environment, and reassignment of *Bacillus pallidus* to *Geobacillus pallidus* comb. nov., International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54, 6, 2197–220.
- Béguin P. ve Aubert, J. P., 1994. The biological degradation of cellulose, FEMS Microbiology Reviews, 13,1, 25-58.
- Birgisson, H., Fridjonsson, O., Bahrani-Mougeot, F. K., Hreggvidsson, G. O., Kristjansson, J. K. ve Mattiasson, B., 2004. A new thermostable α -L-arabinofuranosidase from a novel thermophilic bacterium, Biotechnology Letters, 26, 17, 1347-1351.
- Claus, D. ve Berkeley, R. C. W., 1986. Genus *Bacillus* Cohn 1872, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Edited by Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. ve Holt, J. G., Baltimore: Williams ve Wilkins. 2, 1105-1139.
- Çanakçı, S., Kaçagan, M., İnan, K., Beldüz, A.O. ve Saha, B.C., 2008. Cloning, purification, and characterization of a thermostable alfa-L-arabinofuranosidase from *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26Sarı, Applied Microbiology and Biotechnology, 81, 1, 61-68.
- Çanakçı, S., Beldüz, A. O., Saha, B. C., Yaşar, A., Ayaz, F. A. ve Yaylı, N., 2007. Purification and characterization of a highly thermostable α -L Arabinofuranosidase from *Geobacillus caldoolyolyticus* TK4, Applied Microbiology and Biotechnology, 75, 4, 813–820.
- de Grootet L.M.J., van de Vondervoort P.J.I., de Vries R.P., van Kuyk P.A., Ruijter I.J.G. ve Visser J., 2003. Isolation and characterization of two specific regulatory *Aspergillus niger* mutants shows antagonistic regulation of arabinan and xylan metabolism. Microbiology, 149, 5, 1183–1191.

- de Lima Damasio, A. R., Pessela, B. C., da Silva, T. M., Guimaraes, L. H. S., Jorge, J. A., Guisan, J. M., de Lourdes, M. ve Polizeli T. M., 2013. Co-immobilization of fungal endo-xylanase and α -L-arabinofuranosidase in glyoxyl agarose for improved hydrolysis of arabinoxylan, Journal of Biochemistry Advance Access., 154, 3, 275-280.
- dos Santos, C. R., Squina, F. M., Navarro, A. M., Oldiges, D. P., Leme, A. F. P., Ruller, R., Mort, A. J., Prade, R. ve Murakami, M. T., 2011. Functional and biophysical characterization of a hyperthermostable GH51 α -L-arabinofuranosidase from *Thermotoga petrophila*, Biotechnology Letters., 33,1, 131–137.
- Ferchichi, M., Re`mond, C., Simo, R. ve O'Donohue, M.J., 2003. Investigation of the functional relevance of the catalytically important Glu²⁸ in family 51 arabinosidases, FEBS Letters, 553, 381–386.
- Filho, E. X. F., Puls, J. ve Coughlan, M. P., 1996. Purification and Characterization of Two Arabinofuranosidases from Solid-State Cultures of the Fungus *Penicillium capsulatum*, Applied And Environmental Microbiology, 62, 1, 168-173.
- Gilead S. ve Shoham, Y., 1995. Purification and Characterization of α -L-Arabinofuranosidase from *Bacillus stearothermophilus* T-6, Applied And Environmental Microbiology, 61, 1, 170–174.
- Greve, L. C., Labavitch, J. M., ve Hungate, R. E., 1984. α -L-Arabinofuranosidase from *Ruminococcus albus* 8: Purification and Possible Role in Hydrolysis of Alfalfa Cell Wall, Applied And Environmental Microbiology, 47, 5, 1135-1140.
- Harwood, C. R., 1989. *Bacillus*, Biotechnology Handbooks, Plenum Press, 2.
- Hjörleifsdóttir, S., Kristjánsson, J. K. ve Alfredsson, G. A., 1989. Thermophilic organisms in submarine freshwater hot springs in Iceland, Microbiology of extreme environments and its potential for biotechnology, 49, 18-23.
- Hövel, K., Shallom, D., Niefind, K., Belakhov, V., Shoham, G., Baasov, T., Shoham, Y. ve Schomburg, D., 2003. Crystal structure and snapshots along the reaction pathway of a family 51 α -L-arabinofuranosidase, The EMBO Journal, 22, 19, 4922–4932.
- Iyer, P. V. ve Ananthanarayan L., 2008. Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment, Process Biochemistry, 43,10, 1019–1032.
- Inácio, J. M., Correia, I. L., ve de Sá-Nogueira I., 2008. Two distinct arabinofuranosidases contribute to arabino-oligosaccharide degradation in *Bacillus subtilis*, Microbiology, 154, 9, 2719-2729.
- Kaji, A., 1984. L-Arabinosidase, Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, 42, 383-394

- Kaneko, S., Sano, M., ve Kusakabe, I., 1994. Purification and Some Properties of α -L-Arabinofuranosidase from *Bacillus subtilis* 3-6, Applied And Environmental Microbiology, 60, 9, 3425-3428.
- Kaneko, S., Arimoto, M., Ohba, M., Kobayashi, H., Ishii, T. ve Kusakabe, I., 1998. Purification and Substrate Specificities of Two α -L-Arabinofuranosidases from *Aspergillus awamori* IFO 4033, Applied And Environmental Microbiology, 64, 10, 4021-4027.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature, 227, 648- 654.
- Liab, K., Azadi, P., Collins, R., Tolan, J., Kim, J.S. and Eriksson, K.L., 2000. Relationships between activities of xylanases and xylan structures, Enzyme and Microbiology Technology., 27,1-2, 89–94.
- Manachini, P. L., Mora, D., Nicastro, G., Parini, C., Stackebrandt, E., Pukall, R. ve Fortina, M. G., 2000. *Bacillus thermodenitricans* sp. nov., nom. rev., International Journal Systematic and Evolutionary Microbiol, 50, 3, 1331-1337.
- Marteinsson, V. T., Birrien, J. L., Jeanthon, C. ve Prieur, D., 1996. Numerical taxonomic study of thermophilic *Bacillus* isolated from three geographically separated deep-sea hydrothermal Vents, FEMS Microbiology Ecology, 21, 4, 255–266.
- Matsuo, N., Kaneko, S., Kuno, A., Kobayashi, H. ve Kusakabe, I., 2000. Purification, characterization and gene cloning of two α -L-arabinofuranosidases from *Streptomyces chartreusis* GS901, Biochemical Journal, 346, 9-15.
- Maugeri T. L., Gugliandolo, C., Caccamo, D. ve Stackebrandt E., 2001. A Polyphasic Taxonomic Study of Thermophilic *Bacilli* from Shallow, Marine Vents, Systematic And Applied Microbiology, 24, 4, 572–587
- Nazina, T. N., Tourova, T. P., Poltarau, A. B., Novikova, E. V., Grigoryan, A. A., Ivanova, A. E., Lysenko, A. M., Petrunyaka, V. V., Osipov, G. A., Belyaev, S. S., ve Ivanov, M. V., 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen.nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. Thermodenitrificans*, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51, 2, 433–446.
- Numan, M. Th. ve Bhosle, N. B., 2006. α -L-Arabinofuranosidases: the potential applications in biotechnology, Journal of Industrial Microbiology Biotechnology, 33, 4, 247–260.

- Ochman, H., Gerber, A. S. ve Hartl, D. L., 1988. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction, Genetic Society of America, 120, 3, 621-623.
- Piston, S.M., Voragen A.G. ve Beldman, G., 1996. Stereochemical course of hydrolysis catalyzed by arabinofuranohydrolases, FEBS Letters, 398, 1, 7-11.
- Rainey, F. A., Fritze, D. ve Stackebrandt, E., 1994. The phylogenetic diversity of thermophilic members of the genus *Bacillus* as revealed by 16S rDNA analysis, FEMS Microbiology Letters, 115, 2-3, 205-211.
- Raweesri, P., Riangrunrojana, P. ve Pinphanichakarn, P., 2008. α -L-Arabinofuranosidase from *Streptomyces* sp. PC22: Purification, characterization and its synergistic action with xylanolytic enzymes in the degradation of xylan and agricultural residues, Bioresource Technology, 99, 8981-8986.
- Rye C.S. ve Withers S.G., 2000. Glycosidase mechanisms, Current Opinion in Chemical Biology, 4, 5, 573-580.
- Saha, B.C., 2000. α -L-arabinofuranosidase: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology, Biotechnology Advances, 18, 5, 403-423.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F ve Maniatis, T., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y..
- Seri, K., Sanai, K., Matsuo, N., Kawakubo, K., Xue, C. ve Inoue, S., 1996. L-Arabinose selectively inhibits intestinal sucrase in an uncompetitive manner and suppresses glycemic response after sucrose ingestion in animals, Metabolism, 45, 11, 1368-1374.
- Sharp, R. J., Riley, P. W. ve White, D., 1992. Heterotrophic Thermophilic Bacilli, Thermophilic Bacteria (J. K. Kristjánsson, ed.), Boca Raton, CRC Press, 19-50.
- Shallom, D., Belakhov, V., Solomon, D., Shoham, G., Baasov, T. ve 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, The Journal of Biological Chemistry, 277, 43667-43673.
- Sheehan, J. ve Himmel, M., 1999. Enzymes, energy, and the environment: a strategic perspective on the US Department of Energy's research and development activities for bioethanol, Biotechnology Progress, 15, 5, 817-827.
- Tajana, E., Fiechter, A. ve Zimmermann, W., 1992. Purification and Characterization of Two α -L-Arabinofuranosidases from *Streptomyces diastaticus*, Applied And Environmental Microbiology, 58, 5, 1447-1450.
- Ward, O. P., Moo-young, M. ve Venkat, K., 1989. Enzymatic Degradation of Cell Wall and Related Plant Polysaccharides, Critical Reviews in Biotechnology, 8, 4, 237-274.

- Zechel, D.L. ve Withers, S.G., 2000. Glycosidase mechanisms: anatomy of a finely tuned catalyst, Account of Chemical Research, 33, 1, 11–18.
- Zeikus, J.G., 1979. Thermophilic bacteria: Ecology, physiology and technology, Enzyme and Microbial Technology, 1,4, 243-252.
- Zhou, J., Bao, L., Chang, L., Zhou, Y. ve LuJ, H., 2012. Biochemical and kinetic characterization of GH43 b-D-xylosidase/a-L arabinofuranosidase and GH30 a-L-arabinofuranosidase/b-D-xylosidase from rumen metagenome, Journal of Industrial Microbiology Biotechnology, 39, 143–152.

ÖZGEÇMİŞ

İclal ŞAHİN, 10.09.1985 yılında Erzurum'da doğdu. İlkokulu ve ortaokulu 1991-1999 yılları arasında Sakarya'da okuduktan sonra lise eğitimini 2003 yılında Erzincan'da tamamladı. 2006 yılında Giresun Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünde başlayan lisans eğitimine, 2007 yılında yatay geçiş yaptığı Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünde 2010 yılında tamamlayarak, aynı sene Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI danışmanlığında tezli yüksek lisans programna başladı. Halen bu alanda eğitimine devam etmektedir.