

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

BAZI TERMOFİLİK *BACILLUS* TÜRLERİNİN TERMOSTABİL α -GLUKOZİDAZ
ÜRETİM KAPASİTELERİ VE ENZİM/LERİN KISMİ KARAKTERİZASYONU

Arzu ÇÖLERİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA

2007

Her hakkı saklıdır

Prof. Dr. Cumhuri ÇÖKMÜŞ danışmanlığında, Arzu ÇÖLERİ tarafından hazırlanan bu çalışma 22/01/2007 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile Biyoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Yavuz BEYATLI

Üye : Prof. Dr. Cumhuri ÇÖKMÜŞ

Üye : Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

Üye :Prof. Dr. Gülay ÖZCENGİZ

Üye : Prof. Dr. Serpil TAKAÇ

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Ülkü MEHMETOĞLU

Enstitü Müdürü

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Tez adı: Bazı Termofilik *Bacillus* Türlerinin Termostabil α -Glukozidaz Üretim Kapasiteleri ve Enzim/lerin Kısmi Karakterizasyonu

ÖZET

Doktora Tezi

BAZI TERMOFİLİK *BACILLUS* TÜRLERİNİN TERMOSTABİL α -GLUKOZİDAZ ÜRETİM KAPASİTELERİ VE ENZİM/LERİN KISMİ KARAKTERİZASYONU

Arzu ÇÖLERİ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Cumhuri ÇÖKMÜŞ

α -Glukozidaz üreticisi termofilik *Bacillus* spp. izolatlarını belirlemek amacıyla Aydın, Ankara, Denizli, İzmir, Manisa ve Nevşehir illerinde bulunan 46 farklı sıcak su kaynağından toplanan 191 adet örnekten koloni morfolojileri yönünden farklılık gösteren toplam 451 adet termofilik *Bacillus* izolatı elde edilmiştir. Yüksek amilaz aktivitesine sahip 67 adet termofilik *Bacillus* izolatı seçilerek izolatların hücre içi ve hücre dışı α -glukozidaz üretim kapasiteleri, pNPG substratı kullanılarak belirlenmiştir. İzolatların α -glukozidaz üretme kapasiteleri, toplam enzim miktarları baz alınarak belirlenmiş ve izolatların pelet yaş ağırlığına göre toplam α -glukozidaz miktarları 77.18-0.001 U/ml/g arasında bulunmuştur. Yüksek enzim üretme kapasitesine sahip *Bacillus* sp. A333 (48.64 U/ml/g), A343 (10.79 U/ml/g), E134 (32.09 U/ml/g), F84a (36.64 U/ml/g) ve F84b (77.18 U/ml/g) izolatlarının 48 saatlik zamana bağlı α -glukozidaz üretimleri, standart olarak kullanılan *G. stearothermophilus* ATCC 12980 suşu (34.26 U/ml/g) ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. Hücre içindeki maksimum enzim üretimi zamanı 4. saat (A343, E134), 8. saat (F84a, F84b) ve 12. saat (A333) olarak belirlenmiş olup izolatlara göre değişiklik göstermiştir. *Bacillus* sp. A333 izolatı hücre dışı, *Bacillus* sp. A343 izolatı ise hücre içi α -glukozidaz üreticisi olarak seçilmiş ve kısmen saflaştırılan enzimlerin %10'luk N-PAGE ve 4-MUG substratı ile yapılan aktivite analizi sonuçları, A333 ve A343 izolatlarında ayırıcı birer enzim bandı yanında standart suşlarda da elektroforetik mobiliteleri aynı olan ortak bir enzim bandı olduğunu göstermiştir. α -Glukozidaz enzimi daha sonra N-PAGE'deki bu bantlardan ekstrakte edilerek %10'luk SDS-PAGE'de ayrılmış ve *Bacillus* sp. A333 ile A343 enzimlerinin, molekül ağırlıkları 44 ve 60 kDa civarında ikişer adet farklı proteine sahip oldukları belirlenmiştir. A333 α -glukozidazı optimum pH'ı 6.8, optimum aktivite sıcaklığı 60°C ve pNPG substratına karşı K_m değeri 1.38 mM olarak bulunurken, bu değerler A343 enzimi için sırasıyla 7.0, 65°C ve 0.85 mM olarak belirlenmiştir. İki izolata ait enzimlerin 20 farklı substrata olan spesifikliğı ve ince tabaka kromatografisi sonuçları A333 α -glukozidazının yüksek derecede transglukozilasyon aktivitesine, A343 enziminin ise geniş substrat spesifikliğıne sahip olduğunu göstermiştir. Bunun yanı sıra, *Bacillus* sp. A333 α -glukozidazının, A343 enzimine göre daha geniş bir pH ve sıcaklık aralığında stabilite gösterdiği ve her iki enzimin de test edilen inhibitörlerin çoğuna dirençli olduğu bulunmuştur. Yapılan bu çalışma ile biyoteknolojik uygulamalarda kullanım potansiyeline sahip yeni termostabil ekzo- α -1,4-glukozidaz üreticisi iki *Bacillus* sp. izolatı belirlenmiştir.

2007, 175 sayfa

Anahtar Kelimeler: Termostabil α -glukozidaz, glukozil hidrolaz, *Bacillus* spp.

ABSTRACT

Ph.D Thesis

THERMOSTABLE α -GLUCOSIDASE PRODUCTION CAPACITIES OF SOME THERMOPHILIC *BACILLUS* Spp. AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF ENZYME/S

Arzu ÇÖLERİ

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof.Dr. Cumhur ÇÖKMÜŞ

A total of 191 samples were collected from 46 different hot springs in Aydın, Ankara, Denizli, İzmir, Manisa and Nevşehir cities in order to determine the α -glucosidase producer thermophilic *Bacillus* spp. From these samples 451 thermophilic *Bacillus* isolates having different colony morphology were obtained and screened for amylase activity. Sixtyseven of 451 thermophilic *Bacillus* isolates which had high amylase activity were selected to determine the intracellular and extracellular α -glucosidase production capacities by using pNPG substrate. α -Glucosidase production capacities of the isolates were designated basing on their total enzyme amount per pellet wet weight, and were found between 77.18-0.001 U/ml/g. Time course of high enzyme producers *Bacillus* sp. A333 (48.64 U/ml/g), A343 (10.79 U/ml/g), E134 (32.09 U/ml/g), F84a (36.64 U/ml/g) and F84b (77.18 U/ml/g) were determined by comparing with standard strain *G. stearotherophilus* ATCC 12980 (34.26 U/ml/g) for 48 hours. The maximum intracellular enzyme production time was found as 4 hours (A343, E134), 8 hours (F84a, F84b) and 12 hours (A333) which showed variations according to the isolates. *Bacillus* sp. A333 and A343 were selected as an extracellular and intracellular α -glucosidase producers, respectively. After partial purification of α -glucosidases from two isolates, 10% N-PAGE and activity staining with 4-MUG substrate showed that both A333 and A343 had a differential enzyme band in addition to a common band showing the same electrophoretic mobilities with the standard strains. α -Glucosidase was then eluted from N-PAG bands and seperated by 10% SDS-PAGE, and results showed that *Bacillus* sp. A333 and A343 isolates had two different protein bands having approximately 44 and 60 kDa molecular weight. A333 α -glucosidase showed optimum activity at 60°C, pH 6.8 and 1.38 K_m value for pNPG substrate while these results were found 65°C, 7.0 and 0.85, respectively for isolate A343. Specificity for 20 different substrates and Thin layer chromatography of enzymes demonstrated that A333 enzyme had high transglycosylation activity while A343 had wide substrate specificity. In addition, the results showed that *Bacillus* sp. A333 α -glucosidase was more stable in a wide range of pH and temperature, and both enzymes were found to be resistant to the most of the inhibitors tested. By this study, two new thermostable exo- α -1,4-glucosidase producer *Bacillus* strains were isolated having biotechnological pottential.

2007, 175 pages

Key Words : Thermostable α -glucosidase, glucosyl hydrolase, *Bacillus* spp.

TEŞEKKÜR

Tüm yüksek lisans ve doktora öğrenim sürem boyunca bana destek olan ve bana bu konuda çalışma imkanı sunarak önerileri ile beni yönlendiren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Cumhuri ÇÖKMÜŞ'e;

Her konuda yardımını aldığım ve çalışmalarım boyunca laboratuvarında çalışma olanağı sunan Tez İzleme Komitesi üyesi Sayın Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK'e (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi) ve katkılarından dolayı TİK üyesi Sayın Prof. Dr. Yavuz BEYATLI'ya (Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi);

Tüm yaşantım ve özellikle doktora öğrenimim boyunca maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen sevgili annem ve babama, bu tezin temelini oluşturan arazi çalışmamda bana yardım ederek her konuda destek olan sevgili kardeşime;

Geç saatlere kadar çalışırken beni laboratuvarında yalnız bırakmayıp her konuda yanımda bulunarak, destek ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Köksal CİHAN'a, arkadaşlığı ile bana destek veren dostum Tülin İBŞİRLİOĞLU'na, yardım ve desteğinden dolayı sevgili arkadaşım Sayın Yrd. Doç. Dr. Birgül ÖZCAN'a, desteğinden dolayı Sayın Arş. Gör. Dr. Mehlika BENLİ'ye, istatistik analizlerindeki yardımlarından dolayı Sayın Doç. Dr. Çağla TÜKEL'e, laboratuvar çalışmalarımda bana yardım eden sevgili öğrencilerim Esra AYANCI, Yetiş GÜLTEKİN, Gökçe KABAKÇI ve Nilgün TEKİN'e;

Tezimi proje olarak destekleyen TÜBİTAK'a (Proje no:TBAG-HD126 (105T039)), laboratuvarlarında çalışmama olanak sağlayan A. Ü. Biyoteknoloji Enstitüsü'ne, çalışmalarımda düşüncelerinden yararlandığım Sayın Prof. Dr. Serpil TAKAÇ'a (Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi) ve Dr. Mitch HALLORAN'a (A. Ü. Biyoteknoloji Araştırma Laboratuvarı), standart suşlar ve kaynak sağlayarak yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ'e (KTÜ Fen-Edebiyat Fakültesi);

En içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Arzu ÇÖLERİ

Ankara, Ocak 2007

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1 Termofilik <i>Bacillus</i> Cinsi Bakterilerin Özellikleri.....	3
2.2 α -Glukozidaz Kaynakları.....	5
2.3 α -Glukozidaz Üreticisi Termofilik <i>Bacillus</i> Türleri.....	6
2.4 α -Glukozidazların Karbonhidrat Metabolizmasındaki Yeri.....	8
2.5 α -Glukozidazların Hücresel Yerleşimleri.....	10
2.5.1 Hücre içi α -glukozidazlar.....	11
2.5.2 Hücre dışı α -glukozidazlar	11
2.5.3 Hücreye bağlı α -glukozidazlar.....	12
2.5.4 <i>Bacillus</i> sporlarında bulunan α -glukozidazlar.....	13
2.6 α -Glukozidazların Sınıflandırılması.....	14
2.6.1 Substrat spesifikliği temeline göre sınıflandırma.....	15
2.6.2 Etki mekanizmasına göre sınıflandırma.....	15
2.6.3 Etki şekline göre sınıflandırma.....	15
2.6.4 Amino asit dizisi benzerliğine göre sınıflandırma.....	16
2.7 α -Glukozidazların Etki Mekanizması.....	18
2.7.1 Nükleofilik ikili-yer değiştirme mekanizması.....	19
2.7.2 Oksokarbonyum iyonu mekanizması.....	20
2.8 α -Glukozidazların Substrat Spesifiklikleri.....	21
2.8.1 Maltooligosakkaritlere etki eden α -glukozidazlar.....	22
2.8.2 İzomaltooligosakkaritlere etki eden α -glukozidazlar.....	24
2.8.3 Maltooligosakkaritlere ve izomaltooligosakkaritlere etki eden α -glukozidazlar.....	25
2.8.4 Maltooligosakkaritler ve polisakkaritlere etki eden α -glukozidazlar.....	26
2.8.5 α -Glukozidazlarda transglukozilasyon aktivitesi.....	27
2.9 Enzim Kinetiği.....	28
2.10 α -Glukozidazların Kinetik Özellikleri.....	30
2.11 α -Glukozidazların Üç Boyutlu Yapıları.....	31
2.12 α -Glukozidazların Katalitik Özellikleri.....	35
2.13 α -Glukozidazların Moleküler Özellikleri	37
2.14 Proteinlerin Amonyum Sülfat ile Kısmen Saflaştırılması.....	40
2.15 α -Glukozidazların Farklı pH ve Sıcaklıklardaki Aktivite ve Stabiliteleri.....	41
2.16 Termotabil α -Glukozidazların Yüksek Sıcaklığa Adaptasyon Mekanizmaları.....	42
2.17 İnhibitör ve Substrat Analoglarının α -Glukozidazlar Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	45
2.17.1 Tiol (-SH) grubu içeren inhibitörlerin etkileri.....	45
2.17.2 Substrat analogu inhibitörlerin etkileri.....	47

2.17.3 Etanol, sodyum dodezil sülfat ve ürenin denatüre edici etkileri.....	48
2.17.4 Metal iyonları ve EDTA'nın denatüre edici etkileri.....	49
2.18 Genetik ve Protein Mühendisliği Teknikleri Kullanılarak	
α -Glukozidazların Stabilizasyonunun Arttırılması.....	51
2.19 α -Glukozidazların Biyoteknolojik ve Endüstriyel Uygulama Alanları.....	54
2.19.1 α -Glukozidazların temel araştırmalardaki uygulama alanları.....	55
2.19.2 α -Glukozidazların nişasta endüstrisindeki uygulama alanları.....	56
2.19.3 α -Glukozidazların oligosakkaritler ve glukokonjugantların	
biyosentezindeki uygulama alanları.....	57
2.19.4 α -Glukozidazların sterilizasyonun doğrulanmasında kullanılışı.....	58
2.19.5 α -Glukozidazların sağlık sektöründeki uygulama alanları.....	58
2.19.6 Ticari α -glukozidazlar.....	59
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	60
3.1 Materyal.....	60
3.1.1 Termofilik <i>Bacillus</i> izolatları.....	60
3.1.2 Standart Termofilik <i>Bacillus</i> suşları.....	60
3.1.3 Besiyerleri.....	65
3.1.4 Biyokimyasal ve morfolojik testlerde kullanılan kimyasallar.....	66
3.1.5 α -Glukozidaz aktivitesi tayini için kullanılan kimyasallar ve aletler.....	66
3.1.6 Poliakrilamid jel elektroforezde kullanılan kimyasallar ve aletler.....	67
3.1.7 Optimum sıcaklık ve pH değerlerinin belirlenmesinde kullanılan	
kimyasallar.....	67
3.1.8 Substrat spesifikliğinin belirlenmesinde kullanılan kimyasallar.....	68
3.2 Yöntem.....	68
3.2.1 Bakteri izolasyonu ve kültürlerin hazırlanması.....	68
3.2.2 Koloni morfolojisi ve besiyerinde amilaz aktivitesinin belirlenmesi.....	69
3.2.3 Gram boyama ve faz kontrast mikroskopik inceleme.....	69
3.2.4 Biyokimyasal testlerin yapılışı.....	70
3.2.5 İzolatların enzim üretim koşulları.....	71
3.2.6 Hücre dışı enzim eldesi.....	72
3.2.7 Hücre içi enzim eldesi.....	72
3.2.8 <i>p</i> -Nitrofenolün ekstinksiyon katsayısının hesaplanması.....	73
3.2.9 Enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	73
3.2.10 Enzim ünitesinin tanımı.....	74
3.2.11 α -Glukozidaz miktarlarının izolatlara göre dizini.....	74
3.2.12 İzolatların ve <i>G. stearothermophilus</i> ATCC 12980 suşunun	
48 saatlik zamana bağlı üretiminin belirlenmesi.....	75
3.2.13 Kısmi enzim saflaştırması.....	76
3.2.13.1 <i>Bacillus</i> sp. A333 izolatından α -glukozidazın saflaştırılması	76
3.2.13.2 <i>Bacillus</i> sp. A343 izolatından α -glukozidazın saflaştırılması.....	77
3.2.14 Kısmen saflaştırılan α -glukozidazların elektroforetik	
davranışlarının belirlenmesi.....	77
3.2.15 Sodyum dodezil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezin	
(SDS-PAGE) yapılışı.....	78
3.2.16 Native-poliakrilamid jel elektroforezin (N-PAGE)	
yapılışı.....	78
3.2.17 Enzimlerin molekül ağırlıklarının belirlenmesi.....	79

3.2.18 Enzimlerin farklı sıcaklık ve pH'daki aktivite ve stabilitelerinin belirlenmesi.....	79
3.2.19 Enzim kinetiği çalışmaları.....	80
3.2.20 Substrat spesifikliğinin belirlenmesi.....	80
3.2.20.1 Enzim aktivitesinin farklı substratlar kullanılarak belirlenmesi.....	81
3.2.20.2 Enzim aktivitesi sonucu oluşan glukoz miktarının ölçülmesi.....	81
3.2.21 İnce tabaka kromatografisi'nin yapılışı.....	82
3.2.21.1 Farklı substratların hidrolizi sonucu açığa çıkan ürünlerin İnce tabaka kromatografisi ile belirlenmesi.....	82
3.2.21.2 İnce tabaka kromatografisi'nde kullanılacak enzim yıkım ürünlerinin hazırlanması.....	82
3.2.22 İnhibitörlerin ve metal iyonlarının α -glukozidaz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi.....	83
3.2.22.1 Üre, SDS, ve etanolün α -glukozidaz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi.....	83
3.2.22.2 p-CMB, EDTA ve metal iyonlarının α -glukozidaz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi.....	84
3.2.22.3 Glukono- γ -lakton, redükte L-glutasyon, tris, histidin ve glukozun α -glukozidaz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi.....	84
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	85
4.1 Termofilik <i>Bacillus</i> spp. İzolatları.....	85
4.2 p-Nitrofenolün Farklı Sıcaklıklardaki Ekstinksiyon Katsayıları.....	92
4.3 67 Adet Termofilik <i>Bacillus</i> İzolatının ve 4 Adet Termofilik <i>Bacillus</i> Standart Suşun Hücre İçi ve Dışı Enzim Üretim Değerleri.....	93
4.4 İzolatların α -Glukozidaz Enzim Miktarlarının Dizini.....	100
4.5 <i>Bacillus</i> spp. A333, A343, E134, F84a ve F84b İzolatlarının ve Standart <i>G. stearothermophilus</i> ATCC 1280 Suşunun 48 Saatlik Zamana Bağlı α -Glukozidaz Üretimleri.....	108
4.6 <i>Bacillus</i> sp. A333 ve A343 İzolatları ve Standart Suşların Biyokimyasal ve Morfolojik Test Sonuçları.....	120
4.7 α -Glukozidaz Saflaştırma Sonuçları.....	127
4.8 Enzimlerin SDS ve N-PAGE'deki Elektroforetik Mobiliteleri ile Molekül Ağırlıkları.....	129
4.9 <i>Bacillus</i> sp. A333 ve A343 α -Glukozidazlarının Farklı Sıcaklık pH Değerlerindeki Aktivite ve Stabilitate Sonuçları.....	132
4.10 Enzim Kinetiği Sonuçları.....	138
4.11 Substrat Spesifikliğinin Sonuçları.....	139
4.12 İnce Tabaka Kromatografisi Sonuçları.....	143
4.13 İnhibitörlerin ve Metal İyonlarının Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	151
4.13.1 Üre, SDS, ve etanolün enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	151
4.13.2 Glukono- γ -lakton, redükte L-glutasyon, tris, histidin ve glukozun enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	155
4.13.3 p-CMB, EDTA ve metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	156
5. SONUÇ.....	158
KAYNAKLAR.....	161
EKLER.....	168
EK 1 Enzim Aktivitesi'nde Kullanılan Kimyasalların Hazırlanışları ve İçerikleri.....	169

EK 2 SDS-PAGE’de Kullanılan Stoklar ve Hazırlanışları.....	170
EK 3 N-PAGE’de Kullanılan Stoklar ve Hazırlanışları.....	172
EK 4 Enzimlerin pH Stabilitesinin ve Aktivitesinin Belirlenmesinde	
 Kullanılan Tamponlar ve Hazırlanışları.....	173
ÖZGEÇMİŞ.....	175

SİMGELER DİZİNİ

APS	Amonyum Persülfat
B.	<i>Bacillus</i>
bç	Baz çifti
dak	dakika
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
€	Ekstinksiyon katsayısı
G.	<i>Geobacillus</i>
g	Gram
h	Saat
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
Hsp	Isı şoku proteini
kDa	Kilodalton
L	Litre
M	Molar
MI	%1 nişastalı <i>G. thermoglucosidasius</i> besiyeri
MII	%2 nişastalı <i>G. thermoglucosidasius</i> besiyeri
ME	Merkaptoetanol
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
mA	Miliamper
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MIAA	Monoiodoasetik asit
N-PAGE	Native-Poliakrilamid Jel Elektroforez
NEM	N-etilmaleimit
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforez
pNP	<i>para</i> -nitrofenol
pNPG	<i>para</i> -nitrofenol α-D-glukopiranozit
pCMB	<i>para</i> -kloromerküribenzoat
pCMBS	<i>p</i> -kloromerküribenzen sülfonat
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
SDS	Sodyum Dodezil Sülfat
SDS-PAGE	Sodyum Dodezil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez
-SH	Sülfidril grubu
TEMED	Tetra Etil Metilen Diamin
V	Volt
4-MUG	4-metilumbelliferil α-D-glukopiranozit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Nişastanın glukozil hidrolaz familyasındaki enzimlerle parçalanması sonucu oluşan maltooligosakkartiler ve glukoz molekülleri.....	9
Şekil 2.2 a. α -Glukozidaz enziminin substrata etki şekli, b. α -Glukozidaz'ın pNPG substratına etki şekli.....	18
Şekil 2.3 α -Glukozidazların geri dönüşümlü enzimatik reaksiyonlarını açıklayan nükleofilik yer değiştirme mekanizması.....	20
Şekil 2.4 α -Glukozidaz enziminin spesifiklik gösterdiği substratlar.....	21
Şekil 2.5 Michaelis-Menten grafiği.....	29
Şekil 2.6 Lineweaver-Burk grafiği.....	30
Şekil 2.7 α -Glukozidazların (α/β) ₈ -fıçı yapısı gösteren 3 boyutlu yapısı ile domain organizasyonları.....	33
Şekil 2.8 <i>Bacillus thermoamyloliquefaciens</i> KP1071 suşuna ait α -Glukozidaz II. enziminin üç boyutlu yapısı.....	35
Şekil 4.1 Nevşehir ili (E) Kozaklı ilçesi Altınsu mevkiinde bulunan E10 kodlu sıcak su kaynağı (96°C).....	85
Şekil 4.2 Nevşehir ili (E) Kozaklı ilçesi Belediye Kaplıcası'nda bulunan E4 kodlu ana sıcak su kaynağı (98°C).....	86
Şekil 4.3 İzmir ili (D) Kocaoba mevkiinde bulunan D21 kodlu sıcak su kaynağı (60°C).....	86
Şekil 4.4 İzmir ili (D) Doğanbey mevkiinde bulunan D30 kodlu sıcak su kaynağı (65°C).....	87
Şekil 4.5 67 adet termofilik <i>Bacillus</i> spp. izolatu ve 4 adet termofilik <i>Bacillus</i> standart suşun 15 saatlik hücre içi, hücre dışı ve toplam α -glukozidaz enzim aktivitesi/yaş ağırlık değerlerinin t-test istatistik analizi sonucu oluşturulan grafiği.....	105
Şekil 4.6 <i>Bacillus</i> sp. A333 izolatının zamana bağlı 48 saatlik üreme eğrisi, pH değişimi ve α -glukozidaz üretim değerleri grafiği.....	109
Şekil 4.7 <i>Bacillus</i> sp. A343 numaralı izolatın zamana bağlı 48 saatlik üreme eğrisi, pH değişimi ve α -glukozidaz üretim değerleri grafiği.....	111
Şekil 4.8 <i>Bacillus</i> sp. F84a numaralı izolatın zamana bağlı 48 saatlik üreme eğrisi, pH değişimi ve α -glukozidaz üretim değerleri grafiği.....	113
Şekil 4.9 <i>Bacillus</i> sp. F84b numaralı izolatın zamana bağlı 48 saatlik üreme eğrisi, pH değişimi ve α -glukozidaz üretim değerleri grafiği.....	114
Şekil 4.10 <i>Bacillus</i> sp. E134 numaralı izolatın zamana bağlı 48 saatlik üreme eğrisi, pH değişimi ve α -glukozidaz üretim değerleri grafiği.....	116
Şekil 4.11 <i>G. stearothermophilus</i> ATCC 12980 numaralı standart suşun 48 saatlik zaman bağlı üreme eğrisi, pH değişimi ve α -glukozidaz üretim değerleri grafiği.....	118
Şekil 4.12 <i>Bacillus</i> sp. A333'ün a.18 saatlik NA besiyerindeki üremesi, b.MI besiyerindeki iyot ile test edilmiş amilaz aktivitesi ve c. NB besiyerindeki 24 saatlik faz kontrast mikroskop görüntüsü.....	122

Şekil 4.13 <i>Bacillus</i> sp. A343'ün a.18 saatlik NA besiyerindeki üremesi, b. MI besiyerinde iyot ile test edilmiş amilaz aktivitesi ve c. NB besiyerindeki 24 saatlik faz kontrast mikroskop görüntüsü.....	123
Şekil 4.14 <i>G. stearothermophilus</i> ATCC 12980'in a.18 saatlik NA besiyerindeki üremesi, b. MI besiyerinde iyot ile test edilmiş amilaz aktivitesi ve c. NB besiyerinde 24 saatlik faz kontrast mikroskop görüntüsü.....	124
Şekil 4.15 a. <i>Bacillus</i> sp. A333 ve A343 α -glukozidaz enzimlerinin ve standart bakteri enzimlerinin N-PAGE sonrası 4-MUG substratı ile yapılan aktivite boyaması, b. <i>Bacillus</i> sp. A333 ve A343 α -glukozidazlarının preparatif N-PAGE'den ekstrakte edilen enzim bantlarının SDS-PAGE'deki protein profilleri.....	130
Şekil 4.16 <i>Bacillus</i> sp. A333 ve <i>Bacillus</i> sp. A343 α -glukozidaz enzimlerinin farklı sıcaklık değerlerindeki aktivite ve stabiliteleri.....	134
Şekil 4.17 <i>Bacillus</i> sp. A333 ve <i>Bacillus</i> sp. A343 α -glukozidaz enzimlerinin farklı pH değerlerindeki aktivite ve stabiliteleri.....	136
Şekil 4.18 <i>Bacillus</i> sp. A333 izolatına ait α -glukozidaz enziminin pNPG Substratına göre a. Michaelis-Menten ve b. Lineweaver-Burk grafikleri.....	138
Şekil 4.19 <i>Bacillus</i> sp. A343 izolatına ait α -glukozidaz enziminin pNPG Substratına göre a. Michaelis-Menten ve b. Lineweaver-Burk grafikleri.....	139
Şekil 4.20 <i>Bacillus</i> sp. A333 α -glukozidazının 10 dakikalık reaksiyon süresinde çeşitli substratlara olan etkisini gösteren ince tabaka kromatografisi.....	144
Şekil 4.21 <i>Bacillus</i> sp. A333 α -glukozidazının 2 saatlik reaksiyon süresinde maltooligosakkaritlerden glukoz oluşumu gösteren ince tabaka kromatografisi.....	145
Şekil 4.22 <i>Bacillus</i> sp. A333 α -glukozidazının 2 saatlik reaksiyon süresinde maltooligosakkaritlerden glukoz oluşumu gösteren ince tabaka kromatografisi.....	146
Şekil 4.23 <i>Bacillus</i> sp. A343 α -glukozidazının 10 dakikalık reaksiyon süresinde çeşitli substratlara etkisini gösteren ince tabaka kromatografisi.....	148
Şekil 4.24 <i>Bacillus</i> sp. A343 α -glukozidazının 2 saatlik reaksiyon süresinde maltooligosakkaritlerden glukoz oluşumu gösteren ince tabaka kromatografisi.....	149
Şekil 4.25 <i>Bacillus</i> sp. A343 α -glukozidazının 2 saatlik reaksiyon süresinde maltooligosakkaritlerden glukoz oluşumu gösteren ince tabaka kromatografisi.....	150
Şekil 4.26 <i>Bacillus</i> sp. A333 α -glukozidaz stabilitesi üzerine 25 ve 60°C'deki üre, SDS ve etanolün etkisi.....	153
Şekil 4.27 <i>Bacillus</i> sp. A343 α -glukozidaz stabilitesi üzerine 25 ve 60°C'deki üre, SDS ve etanolün etkisi.....	154

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 <i>Bacillus</i> cinsi mikroorganizmaların genel özellikleri.....	3
Çizelge 2.2 Bakteri, Arke ve Ökaryot domainlerine ait α -glukozidaz enzimleri.....	7
Çizelge 2.3 Bazı α -glukozidazların substrat spesifiklikleri ve pNPG substratına ait K_m değerleri.....	23
Çizelge 2.4 Saflaştırılan bazı α -glukozidazların yapısal ve katalitik özellikleri.....	38
Çizelge 2.5 Bazı <i>Bacillus</i> cinsi α -glukozidazların sıcaklık ve pH istekleri.....	42
Çizelge 2.6 Termofilik üreme özelliğinin artmasına bağlı olarak bakteriyel oligo-1,6-glukozidaz ve α -glukozidaz* enzimlerindeki prolin amino asit köklerinin sayısındaki artış.....	43
Çizelge 3.1 Termofilik <i>Bacillus</i> spp. izolasyonu için 6 farklı ile ait jeotermal alanlarından toplanan su, sediment ve toprak örneklerinin alındığı bölgeler ve numune özellikleri.....	61
Çizelge 4.1 <i>Bacillus</i> spp. izolatlarının genel sayısal sonuçları.....	88
Çizelge 4.2 Jeotermal bölgelere göre <i>Bacillus</i> izolatlarının ve yüksek kapasitede amilolitik özellik gösteren termofilik izolatların dağılımı.....	88
Çizelge 4.3 Amilaz aktivitesi gösteren 67 adet termofilik <i>Bacillus</i> cinsi izolatın morfolojik özellikleri.....	89
Çizelge 4.4 pNP'ün pH 6.8'de ve farklı sıcaklıklarda 400 nm dalga boyundaki milimolar ekstinksiyon katsayıları.....	93
Çizelge 4.5 67 adet termofilik <i>Bacillus</i> spp. izolatı ve 4 adet termofilik <i>Bacillus</i> standart suşun 15 saatlik hücre dışı ve içi α -glukozidaz üretim değerleri.....	94
Çizelge 4.6 67 adet termofilik <i>Bacillus</i> spp. izolatı ve 4 adet termofilik <i>Bacillus</i> standart suşun 15 saatlik hücre içi, hücre dışı ve toplam α -glukozidaz aktivitesi/yaş ağırlık (U/ml/g) değerlerinin t-test dizini.....	101
Çizelge 4.7 <i>Bacillus</i> sp. A333 izolatın zamana bağlı 48 saatlik üreme eğrisi, pH değişimi ve α -glukozidaz üretim değerleri.....	109
Çizelge 4.8 <i>Bacillus</i> sp. A343 izolatının zamana bağlı 48 saatlik üreme eğrisi, pH değişimi ve α -glukozidaz üretim değerleri.....	111
Çizelge 4.9 <i>Bacillus</i> sp. F84a izolatının zamana bağlı 48 saatlik üreme eğrisi, pH değişimi ve α -glukozidaz üretim değerleri.....	112
Çizelge 4.10 <i>Bacillus</i> sp. F84b izolatının zamana bağlı 48 saatlik üreme eğrisi, pH değişimi ve α -glukozidaz üretim değerleri.....	114
Çizelge 4.11 <i>Bacillus</i> sp. E134 izolatının zamana bağlı 48 saatlik üreme eğrisi, pH değişimi ve α -glukozidaz üretim değerleri.....	116
Çizelge 4.12 <i>G. stearothermophilus</i> ATCC 12980 numaralı standart suşun zamana bağlı 48 saatlik üreme eğrisi, pH değişimi ve α -glukozidaz üretim değerleri.....	117
Çizelge 4.13 <i>Bacillus</i> sp. A333, A343, E134, F84a, F84b izolatlarının ve standart suşun 48 saatlik zamana bağlı kültürlerinden elde edilen hücre içi ve hücre dışı enzim aktivitesi/yaş ağırlık (U/ml/g) sonuçları.....	119

Çizelge 4.14 <i>Bacillus</i> sp. A333 ve A343 izolatları ile standart <i>Bacillus</i> türlerine ait biyokimyasal test sonuçları.....	125
Çizelge 4.15 <i>Bacillus</i> sp. A333 hücre dışı α -glukozidazının amonyum sülfatla saflaştırma basamakları.....	128
Çizelge 4.16 <i>Bacillus</i> sp. A343 hücre içi α -glukozidazının amonyum sülfatla saflaştırma basamakları.....	128
Çizelge 4.17 <i>Bacillus</i> sp. A333 ve A343 α -glukozidazlarının farklı sıcaklıklardaki bağıl aktivite ve stabiliteleri.....	133
Çizelge 4.18 <i>Bacillus</i> sp. A333 ve A343 α -glukozidazlarının farklı pH'lardaki bağıl aktivite ve stabiliteleri.....	135
Çizelge 4.19 <i>Bacillus</i> sp. A333 α -glukozidazının değişik substratlara bağıl olarak oluşturduğu glukoz miktarı (%).....	140
Çizelge 4.20 <i>Bacillus</i> sp. A343 α -glukozidazının değişik substratlara bağıl olarak oluşturduğu glukoz miktarı (%).....	142
Çizelge 4.21 <i>Bacillus</i> sp. A333 ve A343 α -glukozidazları ile standart saf α -glukozidaz enzimlerinin stabilitesi üzerine üre, SDS ve etanolün 25 ve 60°C'deki etkisi.....	152
Çizelge 4.22 <i>Bacillus</i> sp. A333, A343 ve <i>G. stearothermophilus</i> ATCC 12016 ait α -glukozidaz enzimlerine inhibitörlerin etkisi.....	155
Çizelge 4.23 <i>Bacillus</i> sp. A333, A343 ve <i>G. stearothermophilus</i> ATCC 12016 ait α -glukozidaz enzimlerine p-CMB, EDTA ve metal iyonlarının etkisi.....	157

1. GİRİŞ

α -Glukozidazlar (EC 3.2.1.20, α -D-glukozit glukohidrolaz, ekzo- α -1,4-glukozidaz) bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalarda karbohidrat metabolizmasında anahtar rol oynarlar. Mikroorganizmalarda oldukça yaygın olup çeşitli bakteri, maya ve küflerden hücre dışı, hücre içi veya hücreye bağlı formları saflaştırılarak karakterize edilmiştir. Mikroorganizmalar tarafından nişasta parçalanmasının son basamağı α -glukozidazlar ile gerçekleştirilir. α -Amilaz (EC 3.2.1.1), amiloglukozidaz (EC 3.2.1.3) ile pullunaz (EC 3.2.1. 41) gibi nişastaya etki eden diğer glukozil hidrolaz enzimlerinin katalizi ile oluşan kısa zincirli maltooligosakkaritlerdeki α -1,4 glukozidik bağları spesifik olarak parçalayıp α -D-glukoz monomerlerini oluştururlar. Aynı zamanda α -glukozidazlar çoğunlukla transglukozilasyon aktivitesine sahip olup reaksiyonları geri dönüşümlüdür.

Substrat spesifiklikleri büyük ölçüde farklılık gösterir. Oligosakkaritleri polisakkaritlere oranla daha hızlı hidroliz ederler. Bu nedenle α -glukozidazlar, oligosakkarit ve α -D-glukozitleri de içeren düşük molekül ağırlıklı substratların terminal, redükleyici olmayan, α -1,4-glukopiranoz birimlerini ve aynı zamanda çözünür nişasta ve glukojen gibi α -glukanları da hidrolize edebilme yeteneğine sahiptirler. Glukozil hidrolazların 13. ve 31. familyalarına dahil olan α -glukozidazlar, substrat spesifikliğine, etki mekanizmasına, substrata etki şekline ve amino asit dizisinin benzerliğine göre sınıflandırılırlar.

Gerçekleştirilmesi güç endüstriyel işlemlere daha uygun olmaları gerçeğinden dolayı termofilik enzimlere endüstriyel ve biyoteknolojik ilgi giderek artmaktadır. Endüstriyel açıdan 60°C'nin üzerinde stabil olabilen enzimler avantajlıdır. Bu nedenle enzimlerin stabilitesini arttırmaya yönelik devam eden bir talep vardır. Biyoteknolojik işlemleri yüksek sıcaklıklarda yürütmenin en önemli avantajları arasında mezofilik mikroorganizmalarca kontaminasyon riskinin düşürülmesi ve daha yüksek bir işlem sıcaklığına izin verdiğinden dolayı organik bileşiklerin çözünürlüğünün artışına bağlı olarak işlem veriminin oldukça artmasıdır. Ekstrem koşullara adapte olmuş yeni mikroorganizmaların tespit edilmesi ile genetik bilginin, istenen bir mezofilik konakta klonlanarak ifade (ekspresyon) edilmesi ve rekombinant DNA teknolojisi ile yeni

spesifik termostabil enzimlerin üretimi mümkün olabilmektedir. Yapılan çalışmalarda farklı *Bacillus* türlerine ait α -glukozidaz enzimleri *E. coli*'de klonlanarak üretimi arttırılmış ve protein mühendisliği yolu ile katalitik olarak daha aktif ve stabil hale getirilebilmiştir. Bu amaçlarla enzim üreticisi ekstremofilik mikroorganizmaların taranması sonucu yeni termostabil enzimlerin bulunuşuyla, gelecekte yeni endüstriyel ve biyoteknolojik uygulama alanlarının açılması mümkün olacaktır.

Uygulama alanları temel araştırmalar, klinik laboratuvarlar ve endüstriyel işlemler olmasından dolayı bu yararları ile glukozidazlar günümüzde ilgi duyulan enzim grupları arasındadır. Ticari olarak endüstriyel etanol üretimi sırasında nişastanın fermente şekerlere dönüştürülmesinde α -amilaz enzimi ile beraber kullanılmaktadır. Glukozidazlar birer biyokatalizör olarak oligosakkarit ve glukokonjugantların yanısıra di- ve tri-sakkaritlerin sentezinde görev almaktadırlar. Son yıllarda sağlık sektöründe klinik biyokimya analizlerinde, α -amilaz ve serum klorürün tayininde kullanılan kitlerde de yine α -glukozidaz enziminden yararlanılmaktadır. Ayrıca hastanelerde sterilizasyon kontrolünde kullanılan kitlerin yapımında indikatör olarak termofilik *Bacillus* cinsi mikroorganizmalara ait α -glukozidazlar kullanılmaktadır. Ülkemizde, endüstriyel olarak bu kadar önemli olan termostabil α -glukozidazların karakterizasyonu ile ilgili şu ana kadar herhangi bir çalışma yapılmamıştır.

Bu çalışma ile Türkiye'nin farklı bölgelerindeki sıcak su kaynakları ve kaplıcalardan toplanan su ve toprak örneklerinden termostabil α -glukozidaz üreten termofilik *Bacillus* izolatları elde edilmiştir. Bu izolatların termostabil α -glukozidaz üretim kapasiteleri standart *Bacillus* türleri ile kıyaslanarak yüksek enzim üreticisi izolatlar belirlenmiştir. Hücre dışı ve hücre içi şeklinde yüksek oranda α -glukozidaz üreten *Bacillus* sp. A333 ve A343 izolatları seçilerek enzim karakterizasyonları yapılmıştır. Enzimlerin kısmi saflaştırılması, elektroforetik mobiliteleri ve molekül ağırlıkları, farklı sıcaklık ve pH değerlerindeki aktivite ve stabiliteleri, kinetik özellikleri, substrat spesifiklikleri ve substrata etki şekilleri ile inhibitörlerin enzimler üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Böylece standart enzimlerden ve birbirinden farklılık gösteren, biyoteknolojik işlemlerde kullanıma uygun termostabil α -glukozidaz üreten iki yeni *Bacillus* sp. izole edilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Termofilik *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Özellikleri

Carl Woese tarafından 16 ve 18S rRNA dizilerinin karşılaştırılmasıyla oluşturulmuş sınıflandırmaya göre, *Bacillus* cinsi mikroorganizmalar Bakteri (Eubakteri=Gerçek Bakteriler) domaini içerisine dahil edilmiştir (Woese and Wolfe 1985, Woese 1999). *Bacillus* cinsi organizmalar Gram (+), spor oluşturabilen, çubuk şeklinde, anaerob veya fakültatif aerob, katalaz pozitif, mikroorganizmalardır (Claus and Berkeley 1986). *Bacillus* cinsi mikroorganizmaların ayırt edilmesinde kullanılan temel özellikler çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1 *Bacillus* cinsi mikroorganizmaların genel özellikleri (Claus and Berkeley 1986)

Özellik	<i>Bacillus</i> cinsi
Çubuk şekli	+
Hücre çapı	<2.5 µm
Filament varlığı	-
Kıvrılmış çubuklar veya filamentlerin varlığı	-
Hareket yeteneği	+
Endospor oluşumu	+
Gram reaksiyonu	+
Zorunlu anaerob üreme	D
Fakültatif anaerob üreme	D
Homolaktik fermentasyon	D
Sülfatın sülfite redüksiyonu	-
Katalaz aktivitesi	+
Oksidaz aktivitesi	D
Glukozdan asit oluşumu	+
Nitratın nitrite redüksiyonu	D
G+C oranı (%mol)	32-69

Not: D, Değişken

Bacillus türlerine ait sporlar, vejetatif hücre formlarına oranla besin yetersizliği, ısı, UV radyasyonu, dezenfektanlar ve H₂O₂ gibi okside edici ajanlarla muameleye karşı çok daha dirençlidirler. Vejetatif hücrelerdeki endospor şekli, türün özelliğine bağlı olarak terminal, subterminal ve sentral olmak üzere üçe ayrılır. Ayrıca endospor vejetatif hücrede yine türün özelliğine bağlı olarak şişkinlik oluşturabilir. Sporları ise elipsoidal, yuvarlak, oval, muz şeklinde veya silindirik şekillerde olabilirler. *Bacillus* sporları içten dışarıya doğru; öz, iç spor ceket, dış spor ceket, korteks ve ekzosporiyum kısımlarından oluşur. Spor protoplastı ve özündeki düşük su içeriği, spor ceketindeki kalsiyum ve dipikolinik asit gibi yüksek mineral seviyesi, azaltılmış spor geçirgenliği ve spor kromozomunun asitle çözünebilen (SASP) bir grup küçük proteinle doyurularak DNA zararının önlenmesi direncin nedenleridir. Stres koşullarında spor oluşturabilme yeteneklerine bağlı olarak basiller; düşük sıcaklıklardan yüksek sıcaklıklara, asidik, alkali veya tuzlu ortamlara kadar çok çeşitli habitatlardan izole edilebilmişlerdir (Claus and Berkeley 1986). Biyokimyasal, morfolojik ve moleküler biyolojik tekniklere göre spor oluşturabilen Gram (+) *Bacillus*'ların taksonomik sınıflandırılması aşağıdaki gibidir.

Domain	= Bacteria (<i>Eubacteria</i>)
Alem	= <i>Firmicutes</i> (Gram (+) Bakteri)
Sınıf	= <i>Bacilli</i>
Ordo	= <i>Bacillales</i>
Family	= <i>Bacillaceae</i>
Genus	= <i>Bacillus</i>

Son zamanlarda yapılan taksonomik çalışmalarda 45-75°C arasında gelişebilen termofilik, aerobik, spor oluşturabilen bakteriler *Bacillus*, *Anoxybacillus*, *Brevibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Alicyclobacillus*, *Sulfobacillus*, *Thermobacillus* olmak üzere yedi ayrı cins altında toplanmıştır. Ancak 16s rRNA dizi analizlerine göre termofilik türlerin çoğu *Bacillus* cinsi genetik grup 1 ile 5 arasında değerlendirilmektedir ve özellikle termofilik gelişme özelliği 60°C ve üzerindeki türlerin *Bacillus* rRNA grup 5 içinde toplandıkları görülmüştür. Nazina ve arkadaşlarının (2001) yaptığı taksonomik çalışmalar sonucunda en iyi tanımlanmış türlerden biri olan ve daha önce *Bacillus*

stearothermophilus olarak adlandırılan tür genetik grup 5 içerisinde, *Geobacillus stearothermophilus* olarak yeniden adlandırılmıştır. Yine *Bacillus flavithermus*, *Bacillus* cinsi altında *Anoxybacillus flavothermus* olarak sınıflandırılmıştır (Nazina *et al.* 2001, Nicolaus *et al.* 2004, Ezeji *et al.* 2005). Yeni termofilik türlerin izolasyonu yapılarak biyokimyasal, morfolojik ve özellikle moleküler biyolojik karakteristikleri tanımlandıkça çok çeşitli habitatlarda yaşayabilen bu ilginç mikroorganizmalar hakkındaki bilgimiz de giderek artmaktadır.

2.2 α -Glukozidaz Kaynakları

α -Glukozidazlar doğada oldukça yaygın olarak bulunan önemli enzim gruplarından biridir. Bakteriler, Arkeler ve Ökaryotları içeren üç temel domaine ait canlı sınıfında da çoğunlukla sentezlenmekte olup, α -amilazlar ile ilişkili olarak görev yaparlar (Bourne and Henrissat 2001). Her üç domaine ait canlılardan izole edilen α -glukozidazlar ve bazı özellikleri çizelge 2.2’de görülmektedir. Enzim kaynağına göre α -glukozidazların hücredeki konumları, sıcaklık ve pH istekleri ile substrat spesifiklikleri değişiklik göstermektedir. Bu da organizmaların kullandığı farklı metabolik yollardan kaynaklanmaktadır. İzole edilerek saflaştırılan Ökaryotik α -glukozidazlarına; bir maya olan *Saccharomyces italicus* Y1225 (Halvorson and Ellias 1958), bir küf olan *Aspergillus niger* (Lee *et al.* 2001) ve insan lizozomal α -glukozidazı (Hermans *et al.* 1991) örnek verilebilir. Yine Arke domainine ait hipertermofilik arkeler olan *Sulfolobus solfataricus* 98/2 (Rolfsmeier *et al.* 1998), *Thermococcus* sp. AN185 (Piller *et al.* 1996) ve *Pyrococcus furiosus* (Costantino *et al.* 1990) suşlarından da α -glukozidazlar izole edilmiştir.

Enzim sentezinin kolay yapılabilmesi ve ucuz maliyeti sebebi ile şu ana kadar karakterize edilerek saflaştırılan α -glukozidazların çoğu Bakteri domainine ait canlı gruplarından izole edilmiştir. *Thermus caldophilus* GK24 (Nashiru *et al.* 2001), *Thermomonospora curvata* (Janda *et al.* 1997), *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* (Wimmer *et al.* 1997), *Rhizobium* sp. USDA 4280 (Berthelot and Delmotte 1999) suşlarından izole edilen α -glukozidazlar, Bakteri domainine ait enzimler arasındadır.

2.3 α -Glukozidaz Üreticisi Termofilik *Bacillus* Türleri

Şu ana kadar karakterize edilen Bakteri domainine ait α -glukozidazların büyük bir kısmı çizelge 2.2'den de anlaşılacağı gibi *Bacillus* cinsi mikroorganizmalardan izole edilmiştir. Fermentasyon işlemleriyle tipik enzim üretimi *Bacillus*'lar ile oldukça kısa zamanda ve çok düşük maliyetli azot ve karbon kaynaklarıyla yapılabilir. Bu özellikleri sayesinde *Bacillus* cinsi mikroorganizmalar, sağladıkları düşük maliyet ile yüksek seviyede enzim üretimi için uygun enzim kaynakları olarak görülürler (Arellano-Carbajal and Olmos-Soto 2002). Çoğunlukla termofilik *Bacillus* suşlarından izole edilen α -glukozidazların, mezofilik türlerde tanımlanan örnekleri de bulunmaktadır. Mezofilik *Bacillus* türlerinden izole edilen α -glukozidazlara *Bacillus subtilis* LMM-12 (Arellano-Carbajal and Olmos-Soto 2002), *B. licheniformis* NCIB 6346 (Thirunavukkarasu and Priest 1984), *B. amyloliquefaciens* (Urlaub and Wober 1978), *Bacillus* sp. ATCC 21591 (Kelly *et al.* 1983) enzimleri örnek gösterilebilir (Çizelge 2.2).

α -Glukozidazların izole edildiği *Bacillus* cinsi mikroorganizmaların çoğu termofilik türlerdir. Bunun nedeni termofilik *Bacillus* türlerinin yaşadığı ekstrem ortamlardan kaynaklanmaktadır. Sıcak su kaynakları gibi ekstrem koşullarda canlı kalabilmek için; bu tip ortamlarda az miktarda bulunan nişasta gibi polisakkaritlerin hidrolizi yolu ile karbon ve enerji kaynağı elde etmek, termofilik *Bacillus* cinsi mikroorganizmalara önemli bir üstünlük sağlamaktadır. İzole edilerek karakterize edilen termostabil α -glukozidaz üreticisi suşlar arasında; *B. caldovelax* DSM411 (Giblin *et al.* 1987), *B. flavocaldarius* KP1228 (FERM-P9542) (Suzuki *et al.* 1987a), *B. thermoamyloliquefaciens* KP1071 (FERM-P84776) (Kashiwabara *et al.* 2000), *G. stearothermophilus* ATCC 7953 (Albert *et al.* 1998), *G. stearothermophilus* ATCC 12016 (Suzuki *et al.* 1984b), *G. thermodenitrificans* HR010 (Ezeji *et al.* 2005), *Geobacillus* HTA-462 (Hung *et al.* 2005) ve *Bacillus* sp. DG0303 (Lee 2000) türleri bulunmaktadır (Çizelge 2.2). Bu termofilik türler arasından özellikle *G. stearothermophilus* ATCC 12016 ve *G. stearothermophilus* ATCC 7953 suşlarından izole edilen α -glukozidazlar endüstriyel öneme sahip olup, ticari olarak saflaştırılıp üretilmektedir.

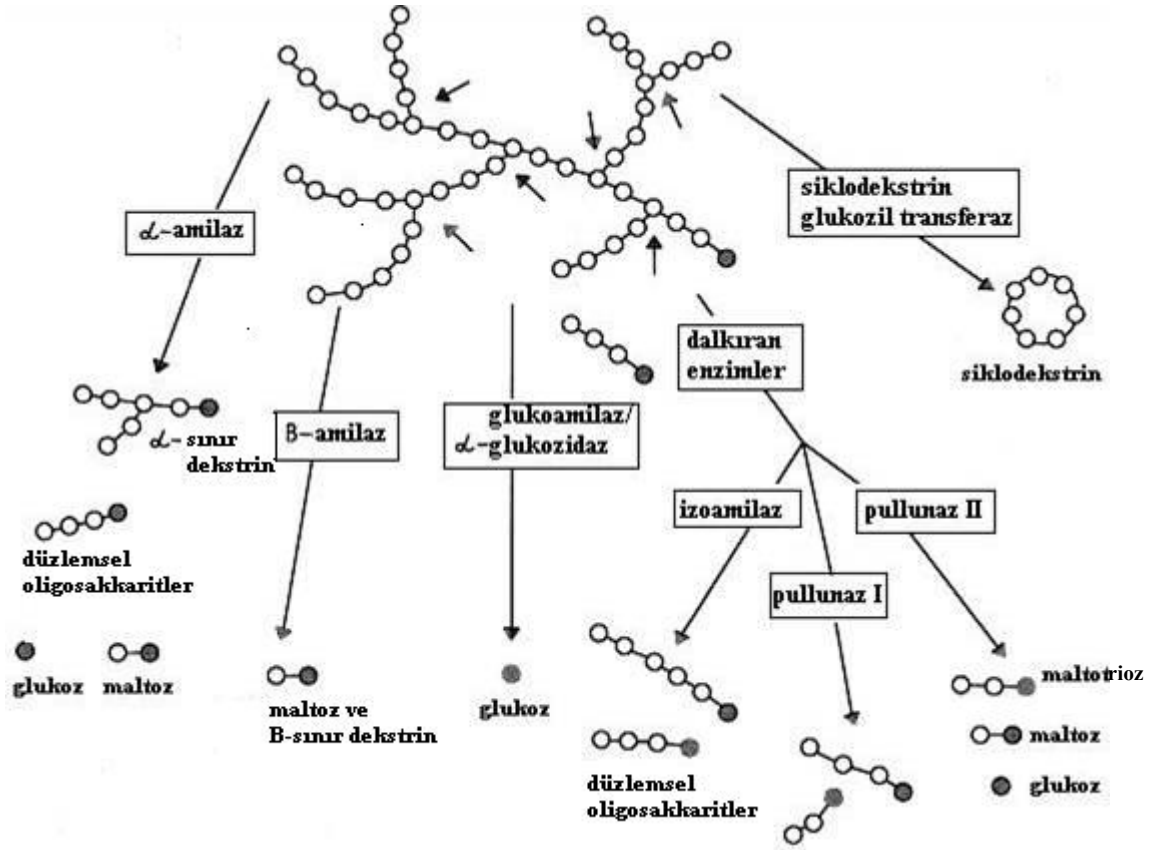
Çizelge 2.2 Bakteri, Arke ve Ökaryot domainlerine ait α -glukozidaz enzimleri

Enzim kaynağı organizma	Glukozil hidrolaz familyası	Hücresel yerleşimi	Sıcaklık isteği	pH isteği	Kaynak
Bakteri Domaini					
<i>B. subtilis</i> LMM-12	GH-13. familya	Hücre içi/dışı	50°C	6-7	Arellano and Olmos 2002
<i>B. licheniformis</i> NCIB 6346	GH-13. familya	Hücre içi/dışı	37°C	6.0	Thirunavukkarasu and Priest 1984
<i>B. amyloliquefaciens</i>	GH-13. familya	Hücre içi	39°C	6.8	Urlaub and Weber 1978
<i>Bacillus</i> sp. ATCC 21591	GH-13. familya	Hücre dışı	40°C	7.0	Kelly <i>et al.</i> 1983
<i>Bacillus</i> sp. SAM1610	GH-13. familya	Hücre içi	75°C	5.5	Nakao <i>et al.</i> 1994b
<i>Bacillus</i> sp. DG0303	GH-13. familya	RE	RE	RE	Lee 2000
<i>B. caldovelax</i> DSM411	GH-13. familya	Hücre içi	50-60°C	5.5-6	Giblin <i>et al.</i> 1987
<i>B. flavocaldarius</i> KP1228 (FERM-P9542)	RE	Hücre içi	85°C	5.1	Suzuki <i>et al.</i> 1987a
<i>B. thermoamiloliquefaciens</i> KP1071 (FERM-P8477) AGL II	GH-31. familya	Hücre içi	81°C	7.0	Kashiwabara <i>et al.</i> 2000
<i>B. thermoamiloliquefaciens</i> KP1071 (FERM-P8477) AGL I	GH-13. familya	Hücre dışı	55-60°C	7.1	Suzuki <i>et al.</i> 1992
<i>B. thermoamiloliquefaciens</i> KP1071 (FERM-P8477) AGL III	GH-31. familya	Hücre içi	RE	RE	Kashiwabara <i>et al.</i> 2000
<i>G. stearothermophilus</i> ATCC 7953	GH-13. familya	Hücre içi	63-77°C	7.7	Albert <i>et al.</i> 1998
<i>G. stearothermophilus</i> ATCC 12016	GH-13. familya	Hücre içi	70°C	6.3	Suzuki <i>et al.</i> 1984b
<i>G. thermodenitrificans</i> HR010	RE	Hücre içi/dışı	RE	RE	Ezeji <i>et al.</i> 2005
<i>Geobacillus</i> sp. HTA-462	GH-13. familya	Hücre içi	60°C	9.0	Hung <i>et al.</i> 2005
<i>Thermus caldophilus</i> GK24	GH-13. familya	Hücre içi	85-90°C	6-8.5	Nashiru <i>et al.</i> 2001
<i>Thermomonospora curvata</i>	RE	Hücre içi	54°C	7-7.5	Janda <i>et al.</i> 1997
<i>Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus</i>	RE	Hücre içi/dışı	65-85°C	5-7	Wimmer <i>et al.</i> 1997
<i>Rhizobium</i> sp. USDA 4280	RE	Hücre içi	35°C	6-6.5	Berthelot and Delmotte 1999
Arke Domaini					
<i>Sulfolobus solfataricus</i> 98/2	GH-31. familya	Hücre içi	85°C	4.5	Rolfsmeier <i>et al.</i> 1998
<i>Thermococcus</i> sp. AN1	GH-31. familya	Hücre içi	110°C	7.0	Piller <i>et al.</i> 1996
<i>Pyrococcus furiosus</i>	GH-31. familya	Hücre içi	105-115°C	5-6	Costantino <i>et al.</i> 1990
Ökaryot Domaini					
<i>Saccharomyces italicus</i> Y1225	GH-13. familya	Hücre içi	30°C	6.8	Halvorson and Ellias 1958
<i>Aspergillus niger</i>	GH-31. familya	Hücre içi	37°C	4-4.5	Lee <i>et al.</i> 2001
İnsan lizozomal α -glukozidazı	GH-31. familya	Hücre içi	37°C	4-5	Hermans <i>et al.</i> 1991

2.4 α -Glukozidazların Karbohidrat Metabolizmasındaki Yeri

Nişasta molekülü D-glukoz monomerlerinden oluşan bir polisakkarit olup, yaklaşık olarak % 10-30 oranında amiloz ve %70-90 oranında da amilopektin polimerlerinden meydana gelir. Amiloz 6000 kadar D-glukoz molekülünün birbirlerine α -1,4 glukozidik bağ ile bağlanmışıyla oluşmuş düz zincirler içeren bir polimerdir. Amilopektin ise α -1,4 glukozidik bağ ile bağlı 10 ile 60 adet glukoz molekülünün biraraya getirdiği kısa düz zincirler ve bu zincirlere α -1,6 glukozidik bağ ile dallanarak bağlanmış 15 ile 45 glukoz molekülünden oluşur (Niehaus *et al.* 1999, Maarel *et al.* 2002).

Ticari olarak çok önemli olan nişasta molekülü, mikroorganizmaların karbohidrat metabolizmasında anahtar rol oynar ve son olarak D-glukoz molekülüne parçalanması α -amilaz familyasına (EC 3.2.1.-) ait bir seri enzimin hidroliz reaksiyonu ile gerçekteştirilir. Endo-enzim olarak bilinen α -amilaz (EC 3.2.1.1) zincirin iç bölgesindeki redükleyici α -1,4 glukozidik bağlarına ve ekzo-enzim olarak bilinen glukaoamilaz (EC 3.2.1.3) ise terminal α -1,4 ve α -1,6 glukozidik bağlara etki ederek dallanmış, uzun zincirli nişasta moleküllerini maltodekstrinlere, maltoza ve α -sınır deksrinlere parçalarlar (şekil 2.1). Dallanmış amilopektin zincirlerini ise α -1,6 glukozidik bağlara etki ederek kıran pullunaz (EC 3.2.1.4) ve izoamilaz (3.2.1.68) enzimleri parçalar. Nişasta parçalanmasına, bu enzimler yanında α -1,6 glukozidik bağları spesifik olarak parçalayıp D-glukoz molekülleri oluşturan oligo-1,6-glukozidaz (EC 3.2.1.10) ile 6-8 glukoz birimini α -1,4 bağlarıyla halkasal yapıda birleştiren siklodekstrin glukozil transferaz (EC 3.2.1.19) enzimleri de katılır (Poonam and Singh 1995, Horváthová *et al.* 2000).



Şekil 2.1 Nişastanın glukozil hidrolaz familyasındaki enzimlerle parçalanması sonucu oluşan maltooligosakkaritler ve glukoz molekülleri (Horváthová *et al.* 2000)

(○) Redükleyici D-glukoz birimi, (●) Redükleyici olmayan D-glukoz birimi, “→” işareti nişasta molekülündeki α-1,6 dallanma noktalarını göstermektedir

İşte bu farklı glukozil hidrolaz enzimleri tarafından maltooligosakkaritler, maltoz ve dekstrinlere kadar parçalanan nişasta molekülünün tamamen D-glukoz monomerlerine hidrolizi, mikroorganizmalarda hücre içi, hücre dışı veya hücreye bağlı olarak yerleşen α-glukozidazlar (EC 3.2.1.20) tarafından katalize edilir. α-Amilaz enzimi ile birlikte kullanıldığında, nişastanın tamamen hidrolizinde görev alması, α-glukozidazın nişasta metabolizmasındaki önemini arttırmaktadır. Bu nedenlerle glukoz şurubu yapımı gibi endüstriyel işlemlerde, nişastanın tamamen hidrolizi için α-glukozidaz enziminin, α-amilazlar ile beraber kullanılması belirgin avantajlar sağlar (Kelly and Fogarty 1983).

Nişasta ve selüloz gibi polisakkaritler sıcak su kaynaklarında seyrek bulunurlar ve bu ortamlara ateş veya rüzgar gibi dış faktörlerin etkisiyle taşınırlar. Sıcak su kaynaklarında polisakkarit hidrolizi ve şeker karamelizasyonu aktif işlemler olduğundan, karbohidratların hızlı sindirimini sağlayan metabolik yollar mikroorganizmaların hayatta kalması için gereklidir. Mikroorganizmalarda dış ortamdan alınan nişastanın hidrolizi çoğunlukla doğrusal maltooligosakkaritler oluşturan α -amilaz ve maltoz ile maltodekstrinleri glukozu dönüştüren α -glukozidaz enzimlerinin varlığına bağlıdır. Bu da mikroorganizmanın maltozu ana enerji ve karbon kaynağı olarak kullanabilme yeteneğini ve hücre ekstraktlarında yapay substrat olan *p*-nitrofenol- α -D-glukopiranozite (pNPG) hidrolitik aktivitesinin varlığını gösterir (Rolfmeier and Blum 1995, Rolfmeier *et al.* 1998).

Nişasta hidrolizi yanında; α -glukozidazların galaktoz, sakkaroz ve maltoz metabolizmasında da anahtar rol oynadığı bilinmektedir. α -Glukozidazlar ökaryotlarda ve prokaryotlarda yaygın olarak bulunmakta ve hücrelerde besinlerin kullanımında ve posttranslasyonel modifikasyon işleminde önemli görevler üstlenmektedir (Hung *et al.* 2005). Bu enzim ökaryotlarda da oldukça önemli olup, eksikliği insanlarda ve hayvan türlerinde resesif genlerin kalıtım ile aktarılıp lizozomal glikojen depolama hastalığı olarak bilinen, Glukonojenezis Tip II veya Pompe hastalığına yol açar (Hermans *et al.* 1991).

2.5 α -Glukozidazların Hücresel Yerleşimleri

α -Glukozidazların ilgi çekici özelliklerinden biri de hücresel yerleşimleridir. Enzim kaynağına bağlı olarak hücre içi, hücre dışı veya hücreye bağlı formları çok çeşitli canlılardan izole edilebilmiştir. Bunların yanında termofilik *Bacillus* cinsi mikroorganizmalarda sporla ilişkili formları da belirlenmiştir. şu ana kadar rapor edilen bakteriyel α -glukozidazların çok büyük bir kısmı çizelge 2.2’de de görüldüğü gibi hücre içi enzimlerdir (Hung *et al.* 2005). Termofilik *Bacillus* suşlarında ise enzim üretimi hücre içi olup, bu konu ile ilgili yapılan çalışmalar arasında sadece *B. thermoamyloliquefaciens* KP1071 suşunun hücre dışı bir α -glukozidaz ürettiği belirtilmiştir (Suzuki *et al.* 1992).

2.5.1 Hücre içi α -glukozidazlar

Kashiwabara ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptığı bir çalışmada *G. thermoamyloliquefaciens* KP1071 suşunun farklı moleküler, katalitik ve immünolojik özelliklere sahip üç çeşit termostabil α -glukozidaz enzimi sentezlediği belirlenmiştir. Aynı mikroorganizmaya ait bu enzimlerin hücrel yerleşimleri de farklılık göstermektedir. α -Glukozidaz I hücre dışı bir enzimdir. α -Glukozidaz II ve III enzimleri ise hücre içinde sentezlenen enzimlerdir. *Thermononospra curvata* ile yapılan başka bir araştırmada α -glukozidaz enziminin hücre içinde biriktirildiği saptanmıştır. Enzim membran fraksiyonunda çok az aktivite gösterirken kültür sıvısında belirlenememiştir (Janda *et al.* 1997).

G. stearothermophilus ATCC 7953 α -glukozidaz enziminin hücre içi bir enzim olduğu ve vejetatif hücrelerden sonikasyon yolu ile ekstrakte edildiği belirtilmiştir. 18 saatlik zamana bağlı kültür kullanılarak yapılan çalışmada, α -glukozidaz sentezi vejetatif hücre büyümesinin başlangıcındaki ilk 2 saatlik lag fazından logaritmik üreme fazına kadar artarak hücre içinde devam ettiği belirlenmiştir. Duraklama fazına gelindiğinde 8. saatten sonra enzim aktivitesi giderek azalmıştır (Albert *et al.* 1998). Bunların dışında termofilik *Bacillus* cinsine ait *G. stearothermophilus* ATCC 12016 (Suzuki *et al.* 1984b), *Bacillus* sp. SAM 1606 (Nakao *et al.* 1994b), *B. caldovelax* DSM 411 (Giblin *et al.* 1987), *B. flavocaldarius* KP1228 (FERM-P9542) (Suzuki *et al.* 1987a) ve *Geobacillus* sp. HTA-462 (Hung *et al.* 2005) suşları hücre içi α -glukozidaz üreticileri olarak tanımlanmıştır.

2.5.2 Hücre dışı α -glukozidazlar

Thirunavukkarasu ve Priest (1984) *B. licheniformis* NCIB 6346 ile yaptıkları çalışmada α -glukozidaz enziminin hücredeki dağılımları incelendiğinde, yerinin değişiklik gösterdiği görülmüştür. Genç hücrelerde enzim çoğunlukla stoplazmiktir ancak hücre geç logaritmik faza girdiğinde, protoplast oluşumu ile hücre dışına salınmaktadır. Son olarak duraklama fazının erken aşamasında kültür sıvısında görülmektedir. Mezofilik özellikteki *B. licheniformis* suşu yanında *Bacillus* sp. ATCC 21591 (Kelly *et al.* 1983)

ve *B. subtilis* LMM-12163 (Arellano-Carbajal and Olmos-Soto 2002) suşlarında da benzer şekilde enzim hücre dışına salgılanmaktadır.

Suzuki ve arkadaşları (1976a) *G. thermoglucosidasius* KP1006 ile yaptığı çalışmada nişasta varlığında 48 saat süresince oligo-1,6-glukozidaz üretim miktarını belirlemişlerdir. Buna göre enzimin stoplazmada logaritmik büyüme fazında sentezlenmeye başlayıp biriktirildiği ve logaritmik fazın ortasında besiyerine bırakılmaya başladığı gözlenmiştir. Enzim seviyesinin besiyeri sıvısında duraklama fazının sonuna kadar arttığı belirlenmiştir. Enzim üretimi nişasta ve dolayısıyla maltooligosakkaritler tarafından indüklenmiştir. Araştırmacılar tüm bu veriler ışığı altında, bu suşa ait termostabil oligo-1,6-glukozidazın kültür sıvısında hücre lizisine bağlı olarak görülmeye başladığını öngörmüşlerdir (Kelly and Fogarty 1983). α -Glukozidazlara benzerlik gösteren bu enzim dışında daha önce de belirtildiği gibi sadece *G. thermoamyloliquefaciens* KP1071 suşunun hücre dışı termostabil bir α -glukozidaz ürettiği rapor edilmiştir (Kashiwabara *et al.* 2000).

2.5.3 Hücreye bağlı α -glukozidazlar

Mezofilik *Bacillus* LMM-12 suşu ile yapılan çalışmada 18 saatlik enzim üretimi ve büyüme eğrisi çıkarılmıştır. Enzim durağan faza 8. saatten sonra girmiştir. α -Glukozidaz sentezi logaritmik fazın sonlarında başlamış ve 18. saatin sonuna kadar devam etmiştir. Hem hücre içi hem de hücre dışı α -glukozidaz konsantrasyonları 15. saatten sonra maksimum spesifik aktivite göstermiştir. Bu izolatın sergilediği hücre içi ve dışı α -glukozidaz üretim sonuçlarına göre enzim hücreye bağlı şekilde bulunmakta ve geç logaritmik fazda sentezlendikten sonra, kültür sıvısına salınmaktadır (Arellano-Carbajal and Olmos-Soto 2002).

B. amyloliquefaciens suşu ile yapılan farklı bir çalışmada, α -glukan metabolizmasında iş yapan α -amilaz, izoamilaz ve α -glukozidaz enzimlerini ürettiği belirlenmiştir. Bu suşa ait α -glukozidaz enziminin hem hücre dışı ve hem de membrana bağlı bir enzim olduğu görülmüştür. Membrana bağlı α -glukozidaz sentezi incelenirken, tuz solüsyonlarının ve

kelatör ajanların enzimi membrandan uzaklaştırmadığı fakat deterjanlar kullanıldığında enzimin zardan çözüldüğü gözlenmiştir (Urlaub and Wober 1978).

Amilolitik aktiviteye sahip 4 mezofilik *Bacillus* cinsi izolat ile yapılan farklı bir çalışmada, α -glukozidaz aktivitesi tespit edilmiştir. Bu suşlar α -glukozidaz aktivitesini hücre dışı veya membana bağlı fraksiyonlarda göstermişlerdir. Enzim aktivitesinin kısmen veya tamamen büyüme ile ilişkili sentezde görev aldığı saptanmıştır. Besiyerindeki yüksek veya düşük konsantrasyondaki glukoz varlığına bağlı olarak α -glukozidazların bu izolatlarda farklı aktivite ve üretim profili göstermeleri, α -glukozidazın polisakkarit metabolizmasının regülasyonunda önemli bir görev üstlenebileceğine işaret etmektedir (Castro *et al.* 1995).

Yukarıda rapor edilen mezofilik türlerin dışında termofilik *Bacillus* türlerinden sadece *Geobacillus thermodenitrificans* HR010 suşunun hücre membranı ile ilişkili olarak hem hücre içi ve hem de hücre dışı enzim ürettiği rapor edilmiştir (Ezeji *et al.* 2005).

2.5.4 *Bacillus* sporlarında bulunan α -glukozidazlar

α -Glukozidaz enziminin bakteriyel sporlardaki mevcudiyeti ve potansiyel rolü ile ilgili çok az bilgi vardır. Bu konu ile ilgili olarak Albert ve arkadaşları (1998) yaptıkları çalışmada, *G. stearothermophilus* ATCC 7953 suşunun vejetatif hücre ve sporla ilişkili ekstraktlarındaki α -glukozidaz enzimlerinin moleküler ağırlıkları dışında benzer özellikler gösterdikleri saptanmıştır. Her iki enzimin de aynı genin ürünleri olduğu fakat spor ile ilişkili formu oluşturmak için modifikasyona uğradığı kabul edilmektedir. Spor kümelerinin inkübasyonu esnasında ilk 2 saatlik süre boyunca α -glukozidaz aktivitesinde bir artış görülmemiştir. Bu süre sonunda sporla ilişkili ekstraktlardaki α -glukozidaz sentezinin arttığı görülmüştür. En yüksek α -glukozidaz üretimi bir gün boyunca sporulasyona uğrayan sporlarda belirlenmiştir. Vejetatif hücrelerin sporulasyon süreleri ne kadar uzatılırsa, spor kümelerindeki enzim üretiminin de o kadar azaldığı görülmüştür. α -Glukozidazın sürekli olarak spor ve vejetatif hücrelerde bulunması, sporun varlığını sürdürdüğünü gösteren kullanışlı bir belirteçtir. Nemli sıcaklıkla sterilizasyonu takiben sporun canlılığından daha uzun süre aktivitesini koruması

nedeniyle sterilizasyon kontrolünde kullanılan kitlerin hazırlanmasında α -glukozidazlardan yararlanılır. Spor ceketindeki α -glukozidaz enzimi, çimlenme ve dışarıya doğru büyümede, hücre duvarı öncüsü olan N-asetil glukozamin birimlerinin yapımında ve bu dönemde gerekli enerji ihtiyacının karşılanmasında görev almaktadır. Özetle, *G. stearothermophilus* ATCC 7953 suşunda α -glukozidaz enzimine muhtemelen hem sporulasyondaki çimlenme ve dışarıya doğru büyüme evresinde hem de normal vejetatif hücre fonksiyonlarının gerçekleştirilmesinde gerek duyulmaktadır (Albert *et al.* 1998, Setlow *et al.* 2004).

2.6 α -Glukozidazların Sınıflandırılması

Karbohidratların sınırsız kombinasyon ihtimalleri, sterokimyasal çeşitliliklerinin sebebidir ve bu nedenle söz konusu moleküllerin seçici hidrolizi için dizayn edilmiş çok sayıda enzim bulunmaktadır (Henrissat *et al.* 1995). Glukozil hidrolazların substrat veya ürün spesifikliğine, hidroliz etkisine (ekzo veya endo) ve sterokimyasal mekanizmalarına dayanan pek çok sınıflandırma sistemi mevcuttur. 1991’de Henrissat tarafından amino asit dizisi benzerliklerine dayalı yeni bir sınıflandırma ortaya atılmıştır. Bu sınıflandırma sistemi sürekli güncelleştirilmekte olup şu ana kadar belirlenmiş 107 ayrı amino asit dizisi temelli glukozil hidrolaz (GHs) familyası mevcuttur (http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/fam/acc_GH.html, 10.12.2006). Bu yeni sınıflandırma sistemi dört farklı sınıflandırma grubu altındaki bilgileri barındırdığından glukozil hidrolazların doğru olarak sınıflandırılmasına olanak sağlar (Henrissat and Davies 1997).

IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) enzim sınıflandırması, enzimin katalizlediği reaksiyon tipini ve substrat spesifikliğini temel alır. Glukozil hidrolaz familyasına dahil edilen α -glukozidazlar IUBMB’nin sınıflandırmasına göre EC 3.2.1.20 koduna sahip olup ilk üç basamak enzimin glukozidik bağları hidroliz ettiğini gösterirken, dördüncü basamak ise enzimin maltoz ve maltooligosakkaritlere spesifik olduğunu belirtir. Yine de EC sınıflandırması geniş substrat spesifikliği gösteren enzimler için yeterli değildir. α -Glukozidazlar ile aynı familya içerisinde yer alan oligo-1,6 glukozidazlar (EC 3.2.1.10)

izomaltoz substratına spesifiklik göstermektedir. Ancak farklı mikroorganizmalardan elde edilen bazı α -glukozidazlar çok geniş substrat spesifikliğine sahip olup hem maltoza hem de izomaltoza etki eder. Bu nedenlerle yapı ve dizi benzerliğine dayalı bir sınıflandırma sistemi glukozil hidrolazların doğru yerlere koyularak sınıflandırılmasında çok daha yararlı olmuştur (Henrissat 1991).

2.6.1 Substrat spesifikliğine göre sınıflandırma

En basit sınıflandırma sistemi olup bir enzimin IUBMB'nin tavsiyelerine uygun olarak verilen EC numarası ile ifade edilmesidir. Buna bir örnek olarak α -glukozidaz (EC 3.2.1.20) ve β -glukozidaz (EC 3.2.1.21) enzimleri arasındaki farklı sınıflandırma verilebilir. Bu sınıflandırmaya göre α -glukozidaz, α -D-glukozit ve β -glukozidaz ise β -D-glukozit substratlarını tercih eder ve farklı numaralarla adlandırılırlar. Ancak bu sınıflandırmada enzimler hem oldukça geniş hem de bazı durumlarda ortak substrat spesifikliğine sahip olabilirler. Yine de en yaygın olarak uygulanan substrat spesifikliğine dayalı sınıflandırmadır (Henrissat 1991, Henrissat and Davies 1997).

2.6.2 Etki mekanizmasına göre sınıflandırma

Glukozil hidrolazlar anomerik konfigürasyonun net bir geri dönüşümü ($\alpha \leftrightarrow \alpha$) veya ters dönüşümü ($\alpha \rightarrow \beta$) ile sonuçlanan iki temel mekanizma ile etki ederler. Bu sınıflandırma da dört farklı hidrolaz grubu mevcut olup ekvatoryal veya aksiyal glukozidik bağlara etki etmesine ve anomerik konfigürasyonu geri veya ters dönüştürmesine bağlı olarak gruplandırılırlar. α -Glukozidazlar, etki mekanizmasına göre substratın anomerik konfigürasyonunu geri dönüşüm mekanizmasını kullanarak α konformasyonunda düzenlerler ve reaksiyonları da geri dönüşümlüdür. α -D-glukanları kullanarak son ürün olarak α -D-glukoz moleküllerini oluştururlar (Henrissat and Davies 1997).

2.6.3 Etki şekline göre sınıflandırma

Glukozil hidrolazlar polisakkaritlere endo- veya ekzo- şekilde etki etme biçimine göre de sınıflandırılırlar. Hidrolazlar ya polisakkariti uç kısmından parçalayarak ekzo-

enzim ya da polimer zinciri içindeki herhangi bir noktadan etki ederek endo-enzim adını alırlar. α -Glukozidazlar, substratlarının redükleyici olmayan terminal ucuna etki ederek ekzo tipi enzim grubuna dahil olurlar. Bu enzimlerin katalitik birimleri, polisakkaritleri uç kısımandan koparmaya yarayan bir paket içerisinde yer alır. Bu paketin derinliği ve şekli substrata bağlanacak alt birimlerin sayısını ve hidroliz sonucu oluşan ürünün uzunluğunu belirler (Henrissat *et al.* 1995, Henrissat and Davies 1997).

2.6.4 Amino asit dizi benzerliğine göre sınıflandırma

1991 yılından sonra yapılan bu sınıflandırma sisteminde, amino asit dizisi ve enzimin yapısal özellikleri birbirleriyle ilişkilendirilerek yararlı yapısal ve mekanistik bilgiler amino asit dizisinden belirlenmiş ve glukozil hidrolazlar amino asit dizi benzerliklerine göre familyalar halinde sınıflandırılmışlardır. Birden fazla glukozil hidrolazın tüm domaini sıralanıp kıyaslandığında aynı familyaya ait oldukları görülmüştür. Protein katlanmaları sekanstan daha iyi korunduğundan pek çok glukozil hidrolaz familyasının benzer katlanmaya sahip olma ihtimali de yüksektir. Bu strateji, sekans karşılaştırma metotlarının hassasiyetini belirgin bir şekilde artırır (Henrissat *et al.* 1995). Katalitik mekanizma enzimin ince yapısına bağlı olduğundan, familya sınıflandırması doğrudan olarak her familyanın bilinen sterokimyasını yansıtır. Bu dizi temelli familyalardaki enzimler ya monospesifik olup tek bir familya içinde sınıflandırılırlar ya da polispesifik olup birden fazla familya içerisine dahil edilirler ve evrimsel olarak farklılıklar gösterirler. Üç boyutlu yapı evrim süresince amino asit dizisine göre daha çok korunduğundan, bazı dizi temelli familyalar benzer yapılar gösterir ve “klan” veya diğer adıyla “süperfamilyalar” içinde sınıflandırılır. Klan ortak bir atadan geldiği bilinen bir grup familyadır. Bir klan içindeki familyaların korunmuş katalitik bölge ve mekanizmalarının yanında üç boyutlu yapıları da belirgin olarak benzerlik gösterir (Henrissat 1991, Henrissat and Bairoch 1996).

Amino asit dizisi benzerliklerine göre gruplandırılan familyalar sistemi, diğer sınıflandırmalara tamamlayıcı olup, şimdiye kadar belirlenmiş üç boyutlu yapılar ile birleştirildiğinde çok güçlü analitik ve tahmini araçlar haline gelmektedir. Enzimlerin sadece substrat spesifikliklerine göre değil yapısal özelliklerine göre de

sınıflandırılmasını sağlar. Bu sınıflandırmanın bir avantajı da bir protein, bir gen veya bir domainin enzimatik aktivitesi bilinmeden önce sınıflandırılabilmesidir. Ayrıca amino asit dizisi benzerliğine göre yapılan bu sınıflandırma çoklu domaine sahip glukozil hidrolazların her bir domainindeki N- veya C-terminal uçlarının yerleşimlerini de belirler (Henrissat and Bairoch 1993).

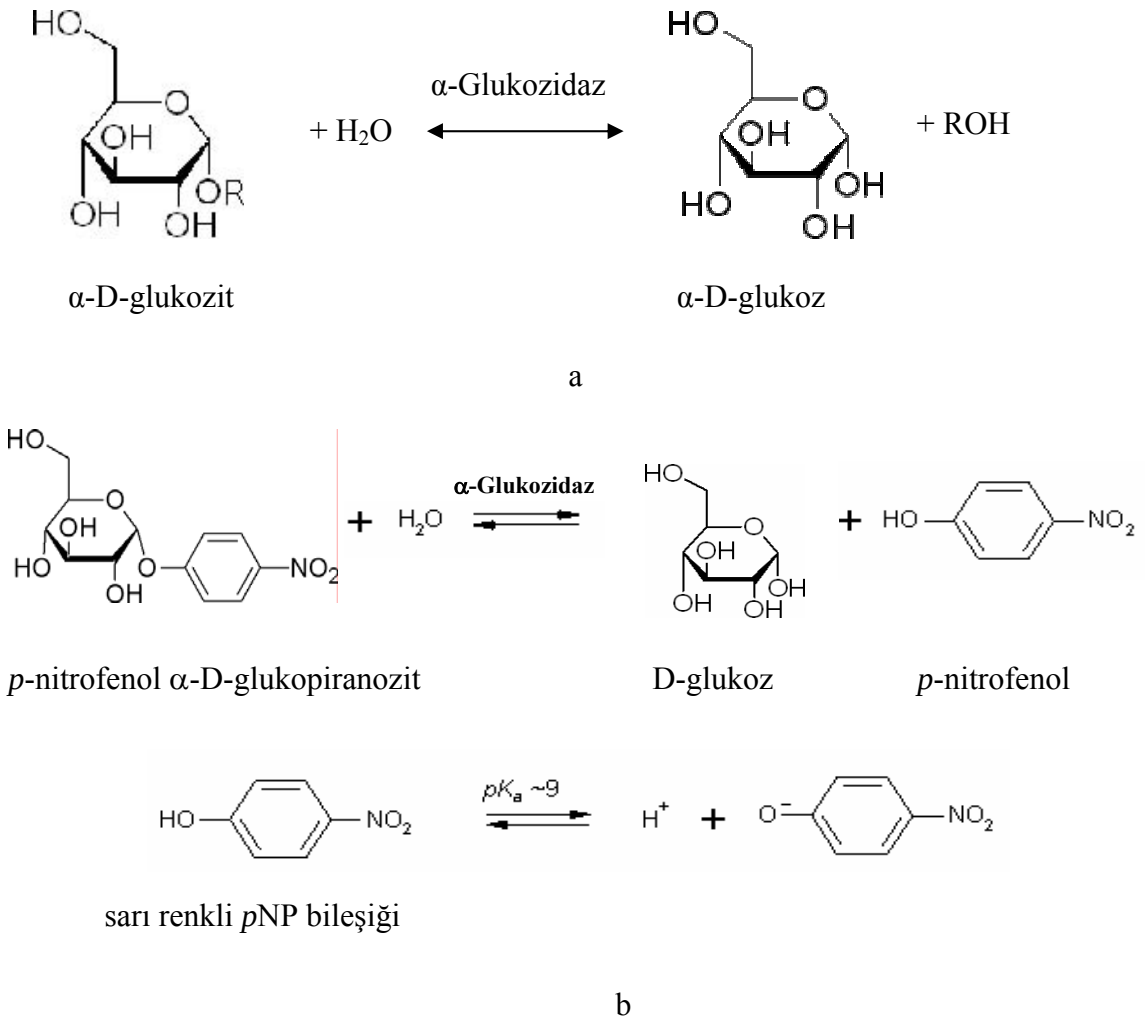
Bu veriler, α -glukozidazların polispesifik olduğunu ve enzim kaynağı mikroorganizmaya bağlı olarak çok farklı substratlara etki edebildiğini göstermektedir. α -Glukozidazların spesifikliğı izole edildiğı kaynağı göre değışiklik gösterir. Bu farklılık enzimin substrat bağlama bölgesinin üç boyutlu yapısındaki değışikliklere bağlıdır. α -Glukozidazlar son zamanlarda belirlenen primer yapılarına göre filogenetik olarak birbirinden farklılık gösteren I. α -Glukozidaz familyası (13. Familya) ve II. α -Glukozidaz familyası (31. Familya) olmak üzere iki ayrı sınıfta gruplandırılır. 13. familya genellikle prokaryotik enzim gruplarını içerip GH-H klanına dahil iken, 31. familya α -glukozidazlar ise daha çok arkeal ve ökaryotik canlıların enzimlerini kapsar. Buna göre I. α -glukozidaz familyasına *S. cerevisia*, *G. stearothermophilus* ATCC 12016, *Bacillus* sp. SAM1606, *G. thermoamyloliquefaciens* KP1071 α -glukozidaz I enzimleri dahil olurken II. α -glukozidaz familyasında *Aspergillus niger*, *G. thermoamyloliquefaciens* KP1071 α -glukozidaz II ve III, *Sulfolobus solfataricus* 98/2, *Pyrococcus furiosus*, *Candida sucubaensis*, İnsan lizozomal asit gibi α -glukozidazlar yer almaktadır (Chiba 1997). *B. flavocaldarius* KP1228 (FERM-P9542) ve *Bacillus* sp. SAM1606 α -glukozidazları benzer şekilde trehaloz hidrolizi yapabilmektedirler. KP1228 enziminin trehaloz aktivitesinin evrimsel kökeni henüz bilinmemektedir ancak SAM1606 enzimiyle yapılan mutasyon çalışmalarında trehaloz aktivitesinin tek bir Gly273 amino asit değışikliğı ile yok olduğı gözlenmiştir. KP1228 enzimi, ne *Bacillus* sp. SAM1606 gibi $(\alpha/\beta)_8$ varil yapılı α -amilaz grubuna dahil olan α -glukozidazlar ve ne de ökaryotik α -glukozidazlar ile amino asit dizi benzerliğı göstermiştir (Henrissat and Davies 1997, Murakami *et al.* 1998, Bourne and Henrissat 2001, Noguchi *et al.* 2003).

Çok sayıda polispesifik familyanın varlığı glukozil hidrolazların ortak bir evrimsel atadan gelerek sonradan yeni substrat spesifiklikleri kazandıklarını göstermektedir. α -Glukozidazların birden fazla familya içinde sınıflandırılıp üç temel kingdom'a ait

canlılardaki mevcudiyeti, onların enzim spesifikliğini ve karbohidrat metabolizmasını evrimsel olarak çalışmak için uygun markerlar olduğunu göstermektedir (Henrissat 1991).

2.7 α -Glukozidazların Etki Mekanizması

α -Glukozidazlar spesifik olarak ekzo tipi hidroliz reaksiyonu ile substratın redükleyici olmayan terminal ucundan her seferinde bir D-glukoz molekülünü serbest bırakırlar. Şekil 2.2. a, b’de de görüldüğü gibi enzim spesifik olarak α -glukozidik bağa etki edip oluşturduğu ürünün anomerik konfigürasyonu da α -D-glukoz tipindedir.



Şekil 2.2.a. α -Glukozidaz enziminin substrata etki şekli, b. α -Glukozidaz’ın pNPG substratına etki şekli

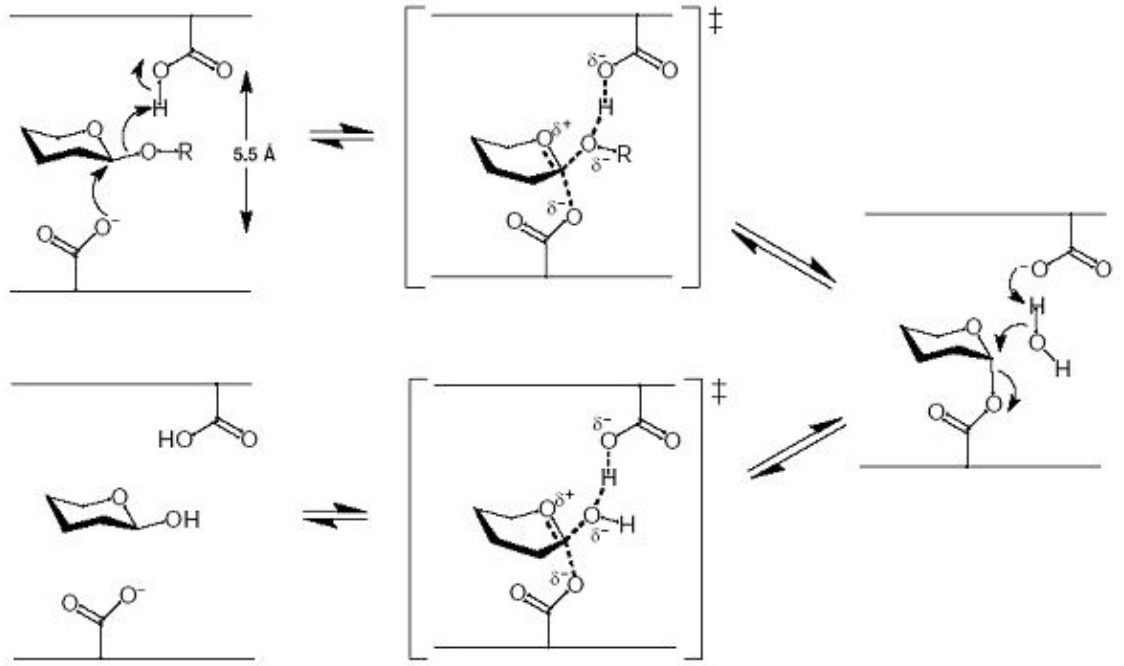
Glukozidazlar ile ilgili her geçen gün artan X-ışını kristalografik çalışmalar, substrat analogları ve inhibitörler ile ilgili analizler ve bölgeye spesifik mutasyon çalışmaları sayesinde, etki mekanizmaları, katalitik bölgeleri ve üç boyutlu yapıları ile ilgili bilgiler giderek artmaktadır (Rye and Withers 2000). Bu çalışmalar sonucunda glukozidazların, bir substrat bağlanma bölgesi ve bir de katalitik bölge olmak üzere en az iki fonksiyonel grup içerdiği kesinlik kazanmıştır. Bağlanma bölgesi (histidin amino asit kökü), hidrolize edilecek karbohidratı, dolayısıyla substrat spesifikliğini belirler. Katalitik bölge (aspartik asit ve glutamik asit kökü) ise genel bir asit-baz reaksiyonu ile substratın glukozidik bağını parçalar. Biri nükleofil biri de proton vericisi olarak iş gören iki amino asit kökü doğrudan katalizde görev alır. Glukozidazlar tarafından bir glukozidik bağın hidrolizinde öngörülen iki “geri dönüşümlü” mekanizma vardır; bunlar nükleofilik yer değiştirme ve oksokarbonyum iyonu mekanizmaları olarak adlandırılmaktadır (Henrissat *et al.* 1995).

2.7.1 Nükleofilik ikili-yer değiştirme mekanizması

Nükleofilik yer değiştirme mekanizmasında katalitik bölgede yer alan Aspartat (Asp) bir nükleofil ve Glutamat (Glu) ise proton vericisi olarak iş görür. İyonize olabilen bu amino asit köklerinin karboksil (-COOH) ve karboksilat (-COO⁻) grupları glukozidik bağın uçlarını 5.5 Å mesafede ters yöne doğru çeker (Şekil 2.3). Anomerik karbon atomu ile glukozil oksijen üzerinde gerçekleşen elektrofilik ve nükleofilik etkiler sonucu, birbirine kovalent bağ ile bağlı bir β -glukozil enzim kompleksi oluşur. Bu enzim-substrat kompleksindeki kovalent bağ, bir su molekülünün hidroksil iyonu ile yer değiştirerek D-glukoz molekülü tekrar α -anomerik forma dönüşür. Böylece glukozidik bağ parçalanır. Bu mekanizma aynı zamanda glukozidazların reaksiyonu geri dönüşümlü ($\alpha \leftrightarrow \alpha$) olarak nasıl gerçekleştirdiğini ve transglukozilasyon aktivitesini de açıklamaktadır. Glukozidik bağın hidrolizinde bir su molekülü iş görürken, glukozil-enzim kompleksinin hidroliz edildiği transglukozilasyon işleminde ise, bir alkol glukozil-enzim kompleksi arasındaki bağı kopararak reaksiyonu tersine çevirir (Henrissat *et al.* 1995, Chiba 1997, Maarel *et al.* 2002) .

2.7.2 Oksokarbonyum iyonu mekanizması

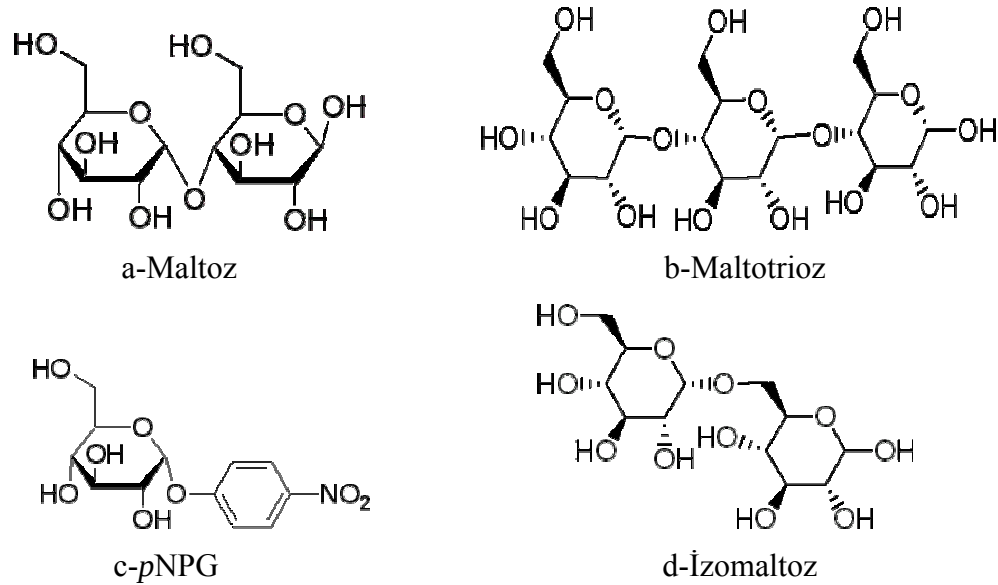
Öngörülen bu mekanizmada iki katalitik grup olan karboksil ve karboksilat iyonları hidrolitik reaksiyonda beraber iş görür. Karboksilat grubunun, oluşan β -oksokarbonyum iyonu arabileşimini stabilize etmekte ve karboksil grubunun ise glukozidik bağın oksijenine etkide iş gördüğü düşünülmektedir. Hidroksil grubu, oksokarbonyum iyonundaki amomerik karbon atomuna düzlemin aşağı ve yukarı bölgesinden etkiler. Bunun sonucu olarak su molekülünün hidroksil grubu ile oksokarbonyum iyonu nükleofilik olarak yer değiştirir ve sırasıyla önce β -anomer sonra da α -anomer forma dönüşüm olur. Böylece glukozidik bağın hidrolizi gerçekleşerek, α -anomer formunda bir substrat oluşur. Karbohidratların glukozidazlar tarafından hidrolizi ve α -glukozidik bağlara spesifikliğı bu şekilde açıklanır (Chiba 1997, Maarel *et al.* 2002).



Şekil 2.3 α -Glukozidazların geri dönüşümlü enzimatik reaksiyonlarını açıklayan nükleofilik yer değiştirme mekanizması (Rye and Withers 2000)

2.8 α -Glukozidazların Substrat Spesifiklikleri

α -Glukozidazların substrat spesifiklikleri, substratın glukozidik bağ tipine (α -1,4 veya α -1,6), aglukon spesifikliğine (yapay veya doğal substrat) ve etki edebildiği substrat zincir uzunluğuna (di-, oligo ve polisakkaritler) göre sınıflandırılabilir (Noguchi *et al.* 2003). α -Glukozidazların çoğu sadece sentetik α -glukozitleri ve oligosakkaritleri değil çözünür nişasta ve glikojen gibi α -glukanları da hidroliz edebilme yeteneğine sahiptir. Dissakkaritleri ve oligosakkaritleri hızlı bir şekilde hidroliz edebilirken, daha büyük karbohidratları ve polisakkaritleri nispeten yavaş hidroliz ederler (Kelly and Fogarty 1983). Hidrolitik aktivitelerinin yanısıra bazı α -glukozidazlar transglukozilasyon aktivitesine de sahiptirler. α -Glukozidazların substrat spesifikliği ve transglukozilasyon aktivitesi büyük oranda enzim kaynağı mikroorganizmaya göre değişiklik gösterir. Substrat spesifikliği ve transglukozilasyon aktivitesindeki bu değişiklikler, enzimlerin katalitik ve substrat bağlanma bölgelerindeki yapısal değişikliklerden kaynaklanır (Nakao *et al.* 1994a).



Şekil 2.4 α -Glukozidaz enziminin spesifiklik gösterdiği substratlar

(a) maltoz (b) maltotrioz (c) pNPG (*para*-nitrofenol α -D-glukopiranozit) ve (d) izomaltoz

α -Glukozidazların spesifiklikleri, temelde α -D-glukopiranozil birimleriyle ilişkilidir. α -konfigürasyonundaki redükleyici uca sahip şeker birimlerini tercih etmektedirler. α -

Glukozidazların bu özelliklerinden yararlanılarak enzim aktivitesini kolorimetrik reaksiyon ile ölçmek için *p*NPG (Şekil 2.4. c) gibi yapay substratlar geliştirilmiştir. *p*NPG substratına ilgileri farklı da olsa, bir enzimin bu yapay substratı kullanıyor olması onun α -konformasyonundaki D-glukoz birimlerini kopardığını gösteren en önemli kanıttır (Kelly *et al.* 1983). α -Glukozidazlar doğal veya yapay substratlara spesifikliklerine göre ikiye ayrılırlar. Doğal bir substrat olan maltoza ve izomaltoza (Şekil 2.4. a, d) ya da yapay bir substrat olan *p*NPG'ye yüksek aktivite gösterenler olmak üzere iki ana grup altında toplanırlar. Ancak çok çeşitli substrat spesifikliklerine sahip olduklarından, son yıllarda α -glukozidazlar çizelge 2.3'de de görüldüğü gibi kullanılan doğal substratlara spesifikliklerine göre de dört sınıf altında toplanmışlardır (Wimmer *et al.* 1997).

2.8.1 Maltooligosakkaritlere etki eden α -glukozidazlar

Substrat spesifikliğine göre bu gruba dahil olan enzimler tipik birer α -glukozidaz olup, maltoz ve 2-6 glukoz birimi içeren maltooligosakkaritlerdeki α -1,4 glukozidik bağlara yüksek spesifiklik gösterirler. α -sınır dekstrinler, amilopektin ve çözünür nişastadan glukoz monomerlerinin hidrolizi, dallanma noktaları olan α -1,6 bağlarına geldiğinde izomaltoz, panoz ve dekstrandaki α -1,6 bağlara etki edemediklerinden durmaktadır. *G. stearothermophilus* ATCC 7953 suşunun termostabil α -glukozidaz enzimi en yüksek aktiviteyi *p*NPG'ye gösterirken, maltoz ve maltooligosakkaritlere daha az etki göstermektedir. Ancak α -1,6 glukozidik bağlar içeren izomaltoza ve izomaltooligosakkaritlere ise ya çok az ya da hiç aktivite göstermemiştir (Albert *et al.* 1998).

G. stearothermophilus ATCC 7953 suşuna ait α -glukozidaz dışında bu gruba dahil olan suşlardan *Geobacillus* HTA-462'nin *p*NPG, maltoz ve maltooligosakkaritlere (Hung *et al.* 2005), *Bacillus* sp. ATCC 21591'nin *p*NPG, maltoz ve maltotrioza (Kelly *et al.* 1983), *B. thermoamyloliquefaciens* KP1071'in maltoz, maltooligosakkaritler ve *p*NPG'ye (Kashiwabara *et al.* 2000) karşı yüksek aktivite gösterdikleri belirlenmiştir.

Çizelge 2.3 Bazı α -glukozidazların substrat spesifiklikleri ve pNPG substratına göre K_m değerleri

Enzim kaynağı	Hücreyel yerleşimi	Substrat spesifikliği	Transgli-kozilasyon aktivitesi	pNPG substratı için K_m değeri	Kaynak
I-Maltooligosakkaritlere etki edenler					
<i>Geobacillus</i> HTA-462	Hücre içi	pNPG, maltoz, maltooligosakkaritler	+	0.18 mM	Hung <i>et al.</i> 2005
<i>G. stearothermophilus</i> ATCC 7953	Hücre içi	Maltoz, maltooligosakkaritler, nigeroz trehaloz, pNPG	RE	1.44mmol/lt	Albert <i>et al.</i> 1998
<i>Bacillus</i> sp. ATCC 21591	Hücre dışı	pNPG, maltoz, maltotrioz	+	RE	Kelly <i>et al.</i> 1983
<i>B. thermoamyloliquefaciens</i> KP1071	Hücre içi	Maltoz, maltooligosakkaritler, pNPG	RE	RE	Kashiwabara <i>et al.</i> 2000
II-İzomaltooligosakkaritlere etki edenler					
<i>Thermus caldophilus</i> GK24	Hücre içi	izomaltoz, nigeroz, izomaltotrioz, sakkaroz, panoz, turanoz, izomaltotetroz, pNPG	+	14.2 mM	Nashiru <i>et al.</i> 2001
III- Maltooligosakkaritlere ve izomaltooligosakkaritlere etki edenler					
<i>Bacillus</i> sp. SAM1606	Hücre içi	pNPG, izomaltoz, sakkaroz, maltoz, maltotrioz, trehaloz, turanoz	+	5.3 mM	Nakao <i>et al.</i> 1994b
<i>Thermomonospora curvata</i>	Hücre içi	pNPG, maltoz, maltotrioz, sakkaroz, maltotetroz, maltopentoz, maltoheksos, izomaltoz	RE	2.3 mmol/L	Janda <i>et al.</i> 1997
<i>Pyrococcus furiosus</i>	Hücre içi	pNPG, metil- α -D-glukozit, maltoz, izomaltoz	RE	0.26 mM	Costantino <i>et al.</i> 1990
<i>Thermococcus</i> AN1	Hücre içi	pNPG, nigeroz, panoz, palatinoz, izomaltoz, maltoz, turanoz	RE	0.41 mM	Piller <i>et al.</i> 1996
<i>B. licheniformis</i> NCIB 8549	Hücre dışı	pNPG, izomaltoz, sakkaroz, maltoz	+	RE	Kelly <i>et al.</i> 1986
<i>Saccharomyces italicus</i> Y1225	Hücre içi	pNPG, maltoz, izomaltoz, sakkaroz, turanoz, trehaloz	RE	2.8X10 ⁻⁴ M	Halvorson and Ellias 1958
<i>Sulfolobus solfataricus</i> 98/2	Hücre içi	Maltoz, maltotrioz, maltotetroz, maltoheptoz, dekstrin, metil α -D-glukozit, izomaltoz, dekstran, pNPG	RE	3.2 mM	Rolfmeier and Blum 1995
<i>B. thermoamyloliquefaciens</i> KP1071 (FERM-P8477) AGL II	Hücre içi	Maltoz, izomaltoz pNPG	RE	RE	Kashiwabara <i>et al.</i> 2000
<i>B. flavocaldarius</i> KP1228 (FERM-P9542)	Hücre içi	α -sınır dekstrin, panoz, izomaltosakkaritler (n=2-6), pNPG, maltoz, sakkaroz, turanoz, metil α -D-glukozit, trehaloz	RE	0.12 mM	Murakami <i>et al.</i> 1998

RE; Rapor edilmedi.

Çizelge 2.3 Bazı α -glukozidazların substrat spesifiklikleri ve pNPG substratına göre K_m değerleri (devam)

Enzim kaynağı	Hücre sel yerleşimi	Substrat spesifikliği	Transglikozilasyon aktivitesi	pNPG substratı için K_m değeri	Kaynak
VI-Maltooligosakkaritler ve polisakkaritlere etki edenler					
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	Hücre içi	pNPG, maltoz, glikojen, nişasta	RE	2.16 mM	Rolfsmeier <i>et al.</i> 1998
<i>G. stearothermophilus</i> ATCC 12016	Hücre içi	Maltooligosakkaritler (n=2-6), α -glukanlar, fenil α -D-glukozit, dekstrin, amiloz, amilopektin, nişasta	+	0.63 mM	Suzuki <i>et al.</i> 1984b
<i>B. thermoamiloliquefaciens</i> KP1071 (FERM-P8477) AGL I	Hücre dışı	pNPG, fenil α -D-glukozit, sakkaroz, turanoz, melozitoz, nigeroz, maltooligosakkaritler (n=2-6), amiloz, amilopektin, nişasta, dekstrin	RE	7.1 mM	Suzuki <i>et al.</i> 1992
<i>Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus</i>	Hücre dışı	pNPG, maltoz, maltotrioz, pullulan, maltotetroz, maltopentoz, nişasta	+	RE	Wimmer <i>et al.</i> 1997
<i>Aspergillus niger</i>	RE	Nişasta, maltooligosakkaritler, pNPG	+	0.31 mM	Lee <i>et al.</i> 2001
<i>B. subtilis</i> LMM-12	Hücre dışı	pNPG, nişasta, maltooligosakkaritler	RE	65 μ g/ml	Arellano and Olmos 2002
İnsan lizozomal α -glukozidazı	Hücre içi	Glukojen, maltoz, izomaltoz	RE	RE	Hermans <i>et al.</i> 1991

RE; Rapor edilmedi.

2.8.2 İzomaltooligosakkaritlere etki eden α -glukozidazlar

İzomaltoza spesifiklik gösteren diğer bir enzim grubu da oligo-1,6-glukozidazlar olup sadece α -1,6 glukozidik bağlara etki ederler. Ancak sayıları oldukça az olan bazı α -glukozidazlar, tıpkı oligo-1,6-glukozidaz enzimleri gibi maltoz yerine izomaltoza spesifiklik gösterirler. Bu gruptaki α -glukozidaz enzimlerinin üç boyutlu yapısı, *B. cereus* oligo-1,6-glukozidaz enzimi ile büyük ölçüde benzerlik göstermiştir. İzomaltoza etkilerinden dolayı substrat spesifikliğine göre oligo-1,6-glukozidaz olarak adlandırılabilir bazı α -glukozidazların, katalitik özellikleri ve substrat bağlama bölgeleri daha detaylı incelendiğinde farklılıklar görülmüştür. Bazı bölgelerdeki spesifik amino asit değişiklikleri, bu iki enzim arasındaki substrat spesifiklik farklılıklarına yol açar. Buna alternatif olarak tüm polipeptit zincirinin primer yapısındaki küçük farklılaşmalar biraraya geldiğinde, enzimin substrat bağlama ve aktif bölgelerindeki steroyapıyı etkileyerek substratlara olan ilgilerini değiştirir (Nakao *et al.* 1994a, Inohara-Ochiai *et al.* 1997, Nashiru *et al.* 2001).

Bu gruba dahil olan α -glukozidazlar arasında *Thermus caldophilus* GK24'a ait enzim bulunur. GK24 α -glukozidazının izomaltoz, nigeroz, izomaltotrioz, sakkaroz, panoz, turanoz, izomaltotetroz, pNPG'ye spesifiklik gösterdiği saptanmıştır (Nashiru *et al.* 2001).

2.8.3 Maltooligosakkaritlere ve izomaltooligosakkaritlere etki eden α -glukozidazlar

Bazı grup α -glukozidazlar hem maltozdaki α -1,4 hem de izomaltozdaki α -1,6 glukozidik bağlara etki edebilirler. Bu gruptaki enzimlerin oligo-1,6-glukozidazlar ile benzer substrat bağlama bölgelerine sahip oldukları belirlenmiştir. Nakao ve arkadaşları (1994a) termofilik *Bacillus* sp. SAM1606 α -glukozidaz enziminin diğer enzimler içinde en geniş substrat spesifikliğine sahip olduğunu belirlemişlerdir. Enzim α - α' trehaloz, maltoz, nigeroz, izomaltoz, sakkaroz, turanoz, maltotrioz, maltotetroz ve izomaltotrioz gibi çeşitli α -D-glukopiranozitleri hidroliz etme yeteneğine sahiptir. Bu enzim trehalozu etkili bir şekilde parçalayabilen tek α -glukozidaz olarak rapor edilmiştir. *B. cereus* ve *G. thermoglucosidasius* oligo-1,6 enzimleriyle korunmuş bölgelerinde %80 dizi homolojisi göstermiştir. Ancak trehaloz, maltoz ve sakkarozu hidrolize edemeyen bu enzimler ile substrat spesifikliği açısından farklılıklar görülmüştür (Nakao *et al.* 1994a, Inohara-Ochiai *et al.* 1997).

B. flavocaldarius KP1228 enzimi trehaloza olduğu kadar maltoz, sakkaroz ve pNPG'ye de aktivite göstermektedir. *Bacillus* sp. SAM1606 enzimi trehalozun α -1,1 glukozidik bağlarına etki eden tek α -glukozidaz olarak rapor edilmiştir. SAM1606 aynı zamanda sakkaroz, nigeroz, maltoz, izomaltoz ve pNPG'ye spesifiklik gösterirken dekstrin ve çözüner nişastaya etki etmez. Bu nedenlerle KP1228 enzimi substrat spesifikliği açısından trehalazlardan çok, *Bacillus* sp. SAM1606 α -glukozidazı ile benzerlik göstermektedir (Murakami *et al.* 1998).

Termofilik bir aktinomiset olan *Thermomonospora curvata* α -glukozidazında test edilen α -1,4 maltooligosakkaritlerden maltozun enzim için en iyi substrat olduğu

belirlenmiştir. Maltooligosakkaritlerin moleköl ağırlıkları arttıkça α -glukoz oluşumu giderek azalmaktadır. Enzim sakkarozu çok iyi parçalasa da sakkaroz varlığında enzim üretimi indüklenmediğinden, sakkaroz metabolizmasından sorumlu olmadığı belirtilmiştir (Janda *et al.* 1997).

Termofilik bir arke olan *Thermococcus* AN1 α -glukozidazının tercih ettiği substratlar; sırasıyla pNPG, nigeroz, panoz, palatinoz, izomaltoz, maltoz ve turanoz'dur. Şaşırtıcı şekilde enzim panoz ve nigerozu, maltoz ve izomaltozdan daha iyi hidroliz etmiş ve maltooligosakkaritlere karşı spesifiklik göstermemiştir. Enzimin substrat spesifikliği diğer termostabil α -glukozidazlardan farklı olup, hidroliz aktivitesi sırasıyla pNPG ve α -1,3, α -1,6 ve α -1,4 glukozidik bağlar yönündedir (Piller *et al.* 1996).

Thermus caldophilus GK24 α -glukozidazı sakkarozu, turanozu ve nigerozu etkili bir şekilde parçalayarak izomaltooligosakkaritlere katalitik aktivite gösteren oligo-1,6-glukozidazlardan farklılık gösterir. TcaAG enzimi diğer α -glukozidazlardan farklı olarak α -1,3 glukozidik bağ içeren sakkarozu karşı yüksek aktivite gösterir (Nashiru *et al.* 2001). Bu tür substrat spesifikliği gösteren diğer α -glukozidazlardan, *B. licheniformis* NCIB 8549'un pNPG, izomaltoz, sakkaroz, maltoza (Kelly *et al.* 1986), *Saccharomyces italicus* Y1225'in pNPG, maltoz, izomaltoz, sakkaroz, turanoz, trehaloza (Halvorsen and Ellias 1958), *Sulfolobus solfataricus* 98/2'nin maltoz, maltotrioz, maltotetroz, maltoheptoz, dekstrin, metil α -D-glukozit, izomaltoz, dekstran, pNPG'ye (Rolfmeier and Blum 1995), *Pyrococcus furiosus*'un pNPG, metil- α -D-glukozit, maltoz, izomaltoza (Costantino *et al.* 1990) ve *B. thermoamyloliquefaciens* KP1071 (FERM-P8477)'in maltoz, izomaltoz, pNPG'ye (Kashiwabara *et al.* 2000) spesifiklik gösterdikleri belirlenmiştir.

2.8.4 Maltooligosakkaritler ve polisakkaritlere etki eden α -glukozidazlar

α -Glukozidazların çok büyük bir kısmı nişasta gibi α -glukanları hidroliz etme yeteneğine sahip değildir. Daha çok kısa zincirli maltooligosakkaritlere spesifiklik gösterirler. Ancak α -1,6 bağları kırabilen bazı α -glukozidazlar, nişastanın dallanma noktalarına etki ederek hidrolizi gerçekleştirebilirler. *G. thermoamyloliquefaciens*

KP1071 α -glukozidaz I enzimi, *G. stearothermophilus* ATCC 12016 enzimi gibi, bir ekzo- α -1,4-glukozidazdır. α -Glukozidaz I; maltooligosakkaritler α -sınır dekstrinler, sakkaroz, turanoz, nigeroz, melozitoz, amiloz ve çözünür nişasta gibi test edilen doğal substratları hidrolize edebilir. Yine de enzim amiloz, amilopektin ve çözünür nişastaya nazaran düşük moleküler ağırlıklı maltooligosakkaritlere ve α -sınır dekstrinlere çok daha fazla spesifiklik göstermiştir (Suzuki *et al.* 1992).

Maltooligosakkaritlerin yanında polisakkaritlere de etki edebilen enzimler arasında *Sulfolobus solfataricus* α -glukozidazının pNPG, maltoz, glukojen, nişastayı (Rolfmeier *et al.* 1998), *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus*'un pNPG, maltoz, maltotrioz, pullulan, maltotetroz, maltopentoz, nişastayı (Wimmer *et al.* 1997), *A. niger*'in nişasta, maltooligosakkaritler, pNPG'yi (Lee *et al.* 2001), *B. subtilis* LMM-12'nin pNPG, nişasta, maltooligosakkaritleri (163 Arellano-Carbajal and Olmos-Soto 2002) ve insan lizozomal α -glukozidazının da glikojen, maltoz, izomaltozu (Hermans *et al.* 1991) hidrolize edebildiği belirlenmiştir.

2.8.5 α -Glukozidazlarda transglukozilasyon aktivitesi

Hidrolitik aktivitelerinin yanısıra bazı α -glukozidazlar transglukozilasyon aktivitesine de sahiptirler. Enzimatik reaksiyonların spesifikliği, etkinliği ve güvenilirliği sebebi ile transglukozilasyon aktivitesi, son yıllarda biyoaktif bileşiklerin biyosentez uygulamalarında ilgi çekici hale gelmiştir. α -Glukozidazların transglukozilasyon aktiviteleri de substrat spesifiklikleri gibi farklılık gösterir (Hung *et al.* 2005).

Geobacillus sp. HTA-462 düşük konsantrasyonlardaki maltoz (10-100 mM) varlığında kuvvetli bir transglukozilasyon aktivitesine sahiptir. Enzim transglukozilasyon aktivitesi ile maltozdan izomaltoz ve panoz oluşturmaktadır. *A. niger*'in de yüksek bir transglukozilasyon aktivitesi olduğu bilinmektedir (Lee *et al.* 2001). Bu iki enzim arasındaki en önemli fark transglukozilasyon sonrası oluşan glukoz miktarıdır. Maltoz miktarı yükseldikçe HTA-462 enzimi ile glukozilasyon ürünlerinin miktarı artarken; *A. niger*'de hidroliz sonucu oluşan glukoz miktarı artmaktadır. *Geobacillus* sp. HTA-462 ile yapılan çalışmada, enzimin sadece maltooligosakkaritleri ve pNP bileşiklerini değil

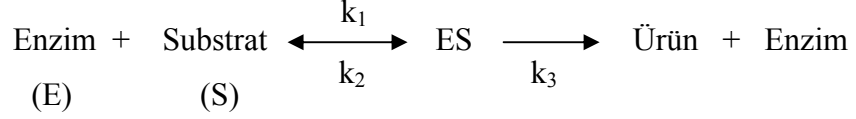
aynı zamanda alkil alkoller, kloramfenikol, kortizon ve fenol fitalein gibi şeker olmayan hidroksil bileşikleri de şeker vericisi olarak kullanabildiği gözlenmiştir (Hung *et al.* 2005).

Aynı cinse ait *G. stearothermophilus* ATCC 12016 ve HTA-462 α -glukozidazları %96 amino asit dizi benzerliği gösterse de, transglukozilasyon aktivitelerinde farklılıklar saptanmıştır. *G. stearothermophilus* ATCC 12016 enzimi 10 mM'lık maltozun tamamını glukoz oluşumunda kullanmaktadır. Şeker olmayan akseptörler varlığındaki transglukozilasyon ürünlerinin miktarı da daha düşüktür. HTA-462 enzimi ise oluşan glukozun yarısını transglukozilasyon aktivitesi ile izomaltoza dönüştürmektedir. HTA-462 enzimi ile yüksek maltoz konsantrasyonlarında oluşan glukoz miktarı azalırken, buna bağlı olarak transglukozilasyon ürünü olan izomaltoz oluşmaktadır (Hung *et al.* 2005).

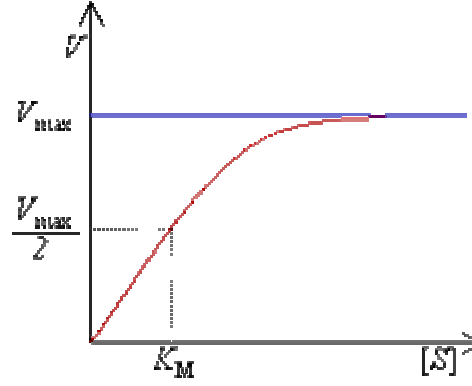
Bunların yanında transglukozilasyon aktivitesi gösterdiği rapor edilen diğer α -glukozidaz üreticisi suşlar arasında, maltozu izomaltoza dönüştüren *Bacillus sp.* ATCC 21591 (Kelly *et al.* 1983), sakkaroz ve izomaltozu kullanan *Thermus caldophilus* GK24 (Nashiru *et al.* 2001), sakkarozu %35 verimle kullanan *Bacillus sp.* SAM1606 (Nakao *et al.* 1994b), izomaltoz, maltoz ve maltotriozu kullanan *B. licheniformis* NCIB 8549 (Kelly *et al.* 1986) ve *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* bakterileri bulunmaktadır (Wimmer *et al.* 1997).

2.9 Enzim Kinetiği

Enzim kinetiği, enzimlerle katalizlenen reaksiyonların hızlarını etkileyen etkenlerle ilgilidir. Enzim kinetiği çalışmaları, aynı reaksiyonu katalizleyen tek bir enzimle ya da bir multi enzim kompleksi ile çalışıldığına dair bilgiler verir. Kinetik sabitleri kıyaslayarak eşdeğer gibi görünen iki enzimin aynı genin ürünü olup olmadığı ya da aynı reaksiyonu katalizleyen farklı proteinler olduğu hakkında kararlar verilebilir. Enzim ve substrat reaksiyona girdikten sonra bir enzim substrat kompleksi (ES) oluşur. Bu geçiş durumundan sonra enzim substratı ürüne dönüştürür. Tek substratlı bir enzimatik kataliz reaksiyonu aşağıdaki gibidir.



Enzim reaksiyonları üzerinde ilk çalışmalar Michaelis-Menten tarafından yapılmıştır. Michaelis-Menten kinetiğine göre başlangıç enzim derişimi sabit alınıp reaksiyon hızının substrat derişimine bağıllığı incelenir. Sonuçta oluşan hiperbolik bir fonksiyon ve eğri elde edilir (Şekil 2.5). Bunun çözümü ile Michaelis-Menten bağıntısı bulunur.



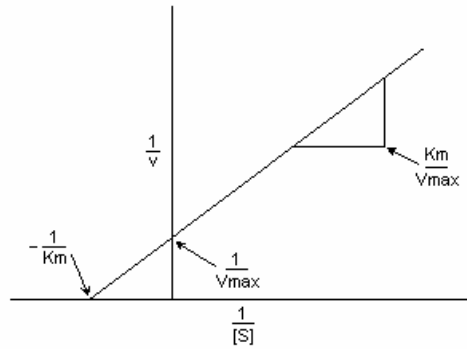
Şekil 2.5 Michaelis-Menten grafiği (Erarslan ve ark. 2005)

$$V = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Michaelis-Menten Bağıntısı})$$

Reaksiyonunu başlangıç hızı (V) ile substrat konsantrasyonu [S] arasında hiperbolik bir ilişki vardır. Başlangıç hızı ölçümleri için, toplam substratın en fazla %10-20'sinin kullanıldığı reaksiyon süresi sağlıklı sonuçlar almak için uygun bir zaman dilimi olarak belirlenmiştir. V_{max} ; bütün enzimin ES şeklinde mevcut olduğu maksimal sınır hızdır. Maksimum hızın yarısına ($V_{max}/2$) karşılık gelen derişim K_m (Michaelis-Menten sabiti) olarak belirtilir. V_{max} ve K_m bir enzimin aktivitesini belirleyen önemli enzim sabitleridir. K_m değeri enzim için karakteristik bir sabit olup substratın hücre içi konsantrasyonu için yaklaşık bir değer belirler. Ayrıca belirli bir enzimin substrat özgüllüğü hakkında bilgi verir. En düşük K_m değerini veren substrat enzim için en yüksek görünür aktiviteyi gösterir. Ayrıca enzim için en iyi olan substrat, V_m/K_m oranı en yüksek olandır (Erarslan ve ark. 2005).

Michaelis-Menten grafiği ile bir hiperbol elde edildiğinden, uygulamalarda kolaylık sağlamak amacı ile bunun bir doğru denklemi haline getirilmesi gerekmektedir. Eksen ölçekleri uygun şekilde değiştirilerek doğru denklemine dönüştürülebilir. Bunlardan en çok kullanılan Lineweaver-Burk denklemidir. Bu denkleme göre ordinata $1/V_{\max}$, apsiste $1/[S]$ değerleri olmak üzere bir doğru elde edilir. Bu doğrunun eğimi ise $K_m/V_{\max}$ 'dır (Şekil 2.6) (Lineweaver and Burk 1934).

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (\text{Lineweaver-Burk denklemi})$$



Şekil 2.6 Lineweaver-Burk grafiği (Erarslan ve ark. 2005)

2.10 α -Glukozidazların Kinetik Özellikleri

α -Glukozidazlar substratlara olan ilgilerine göre farklılık gösterirler. Yapılan enzim kinetiği çalışmalarında yapay bir substrat olan *p*NPG'ye karşı ilgilerinin de farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Çizelge 2.3'de farklı kaynaklardan izole edilen α -glukozidazların *p*NPG substratına karşı K_m değerleri görölmektedir. Bir substrat için K_m sabiti ne kadar düşük ise, enzimin substrata olan ilgisi de o kadar fazla olmaktadır. Farklı suşlardan izole edilen α -glukozidazların enzim kinetiği çalışmalarında, *p*NPG substratına ait K_m değerleri; *B. flavocaldarius* KP1228 (FERM-P9542) için 0.12 mM (Murakami *et al.* 1998), *Geobacillus* HTA-462 için 0.18 mM (Hung *et al.* 2005), *P. furiosus* için 0.26 mM (Costantino *et al.* 1990), *Thermococcus* AN1 için 0.41 mM (Piller *et al.* 1996), *G. stearothermophilus* ATCC 12016 için 0.63 mM (Suzuki *et al.* 1984b), *A. niger* için 0.31 mM (Lee *et al.* 2001), *S. solfataricus* 98/2 için 3.2 mM (Rolfmeier

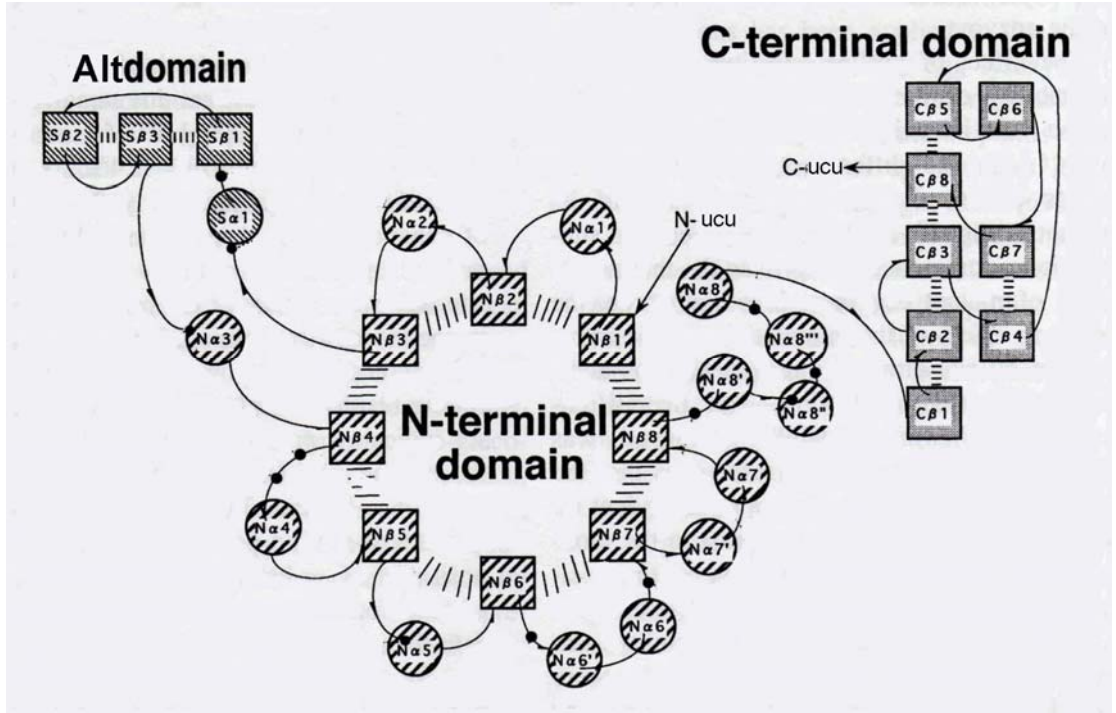
and Blum 1995), *Bacillus* sp. SAM1606 için 5.3 mM (Nakao *et al.* 1994b), *B. thermoamyloliquefaciens* KP1071 (FERM-P8477) için 7.1 mM (Suzuki *et al.* 1992) ve *T. caldophilus* GK24 için ise 14.2 mM (Nashiru *et al.* 2001) olarak belirlenmiştir. Bu suşların pNPG substratına ilgisi belirlenmiş K_m değerlerine göre sıralandıkları şekilde azalmaktadır.

2.11 α -Glukozidazların Üç Boyutlu Yapıları

Şu ana kadar yapılan çalışmalarda farklı kaynaklardan elde edilen az sayıda α -glukozidaz saflaştırılarak birincil yapısını oluşturan amino asit dizisi çıkarılmış ve X-ışını kristalografisi ile üç boyutlu yapıları belirlenmiştir. Bilindiği gibi birincil yapı, ikincil ve üçüncül yapıyı doğrudan etkilediğinden amino asit dizisinin bilinmesi; proteinin katlanması, üç boyutlu yapısı ve katalitik özellikleri hakkında önemli bilgiler sunmaktadır. α -Glukozidazlar daha önce de belirtildiği gibi Henrissat'ın amino asit dizi homolojisine göre yaptığı sınıflandırmaya göre glukozil hidrolazların 13. ve 31. familya sınıflarına dahil edilmişlerdir (Henrissat *et al.* 1995). α -Glukozidazların da dahil olduğu α -amilaz familyası ya da glukozil hidrolazların 13. familyası olarak bilinen enzimler pek çok ortak özellik gösterirler (Maarel *et al.* 2002). Bu grup aşağıdaki özellikleri içeren enzimleri kapsar:

- 1- Enzimatik reaksiyonlarda ($\alpha \leftrightarrow \alpha$) geri dönüşüm mekanizmasını kullanarak α -glukozidik bağlara hidroliz reaksiyonu ya da transglukozilasyon aktivitesi gösterirler.
- 2- Bir protein içerisinde bulunan ve kendine ait bir fonksiyona sahip bölüme domain adı verilir. Tek bir protein içindeki domain bölümleri, hep birlikte proteinin toplam fonksiyonunu belirler. Amino asit dizisi araştırmaları sonucu bu enzimlerin, farklı katlanma motifleri içeren ve birbiriyle uzaktan ilişkili çoklu domainlere sahip proteinler olduğu ve özellikle β -iplikçiklerindeki ikincil yapıları oluşturan korunmuş dört eşdeğer bölge içerirdikleri belirlenmiştir. Üç boyutlu yapıları N-terminal-domain, alt-domain ve C-terminal domain adlı üç bölgeden oluşmuştur.

- 3- α -Amilaz familyası enzimlerinde en çok korunan domain N-terminal domainidir. Bu familya üyeleri, 8 paralel β -ipliğinin birbirlerine ilmiklerle bağlanmış 8 α -heliksle çevrelenerek katlandığı oldukça simetrik bir varil yapısına sahiptirler. $(\alpha/\beta)_8$ varil yapısına ilk defa tavuk kası trioz fosfat izomeras enziminde rastlandığından TIM varili olarak da adlandırılır. Alt domain ilmik bölgelerince zengin bir α -heliks ile β -iplikliği içerir. Sekiz antiparalel β -iplikliği Greek-anahtar motifinde katlanarak C-domainini oluşturur. Alt domain, ilmikler ile C-terminal domainin β -iplikliklerini, N-terminal domainin $(\alpha/\beta)_8$ -varil yapısındaki α -helikse bağlar. Böylece bu yapı ile aktif bölgede derin bir yarık açılmış olur (Şekil 2.7).
- 4- Katalitik bölgeyi oluşturan korunmuş bölgelerde hidroliz reaksiyonundan sorumlu ortak iki aspartat ve bir glutamat amino asit kökleri mevcuttur. Substrat bağlama bölgesi ve katalitik amino asit yan zinciri C-terminal ucun yanındaki β -iplikliğinde veya $\beta \rightarrow \alpha$ ilmiğinde yer alır.
- 5- Substrat ve ürün spesiflikleri oldukça geniştir. α -Glukozidazların substrat spesifliği arasındaki bu farklılıklar tamamen korunmuş bölgelerdeki substrat bağlama bölgelerinde oluşan amino asit değişiklikleri ile açıklanabilir. Dizi karşılaştırması sonucu, aktif bölgede veya ona yakın yerlerde bulunan bu korunmuş bölgelerin enzimin substrat spesifliğini belirlemede önemli olduğu görülmüştür.
- 6- Tüm bu benzerlikler, glukozil hidrolaz familyasına ait bu enzimlerin birbirine analog olduklarına ve aynı yapısal motifleri içermelerinden dolayı ortak bir atadan gelerek üç boyutlu yapılarını evrimsel süreçte koruduklarına işaret etmektedir (Suzuki *et al.* 1992, Watanabe *et al.* 1994, Inohara-Ochiai *et al.* 1997, Watanabe *et al.* 2001, 2002, Horváthová *et al.* 2000).



Şekil 2.7 α -Glukozidazların $(\alpha/\beta)_8$ -fiçı yapısı gösteren 3 boyutlu yapısı ile domain organizasyonları (Watanabe and Suzuki 1998)

Şu ana kadar 50'ye yakın ökaryotik ve prokaryotik kökenli α -glukozidaz saflaştırılarak tüm amino asit dizileri çıkarılmıştır. Ancak amino asit dizi karşılaştırmaları halâ devam etmektedir. Familya 13'deki α -glukozidazların katalitik amino asit kökleri olan aspartat ve glutamat, α -amilazlarda olduğu gibi korunmuş olan 3. ve 4. bölgededir. Kısıtlı sayıda rapor edilen dizi homolojisi sonuçlarına göre *S. carlsbergensis* CB11 α -glukozidazı, *G. stearothermophilus* ATCC 12016 α -glukozidazı, *Bacillus* sp. SAM1606 α -glukozidazı ve *T. caldophilus* GK24 α -glukozidazlarının birbirlerine %60-85 arasında benzerlik gösterdikleri saptanmıştır. Tüm bu α -glukozidazlar $(\alpha/\beta)_8$ -varil yapısı gösteren bu dört korunmuş bölgeyi içermekte olup 13. familya grubuna dahildirler. Amino asit dizisi belirlenen yukarıdaki α -glukozidazlar, $(\alpha/\beta)_8$ -fiçı yapısı gösteren diğer bir enzim grubu olan oligo-1-6 glukozidazlar ile kıyaslandıklarında yine %40-70 oranında benzerlik göstermişlerdir. Farklı substrat spesifikliği içerseler de *B.cereus* ATCC 7064 oligo-1,6 glukozidazı ve *G. thermoglucosidasius* KP1006 oligo-1,6 glukozidazı ile aynı yapısal motiflere sahip olduklarından, ortak bir atadan evrimleştikleri düşünülmektedir

(Suzuki and Tomura 1992, Nakao *et al.* 1994a, Taki *et al.* 1996, Chiba *et al.* 1997, Inohara-Ochiai *et al.* 1997, Nashiru *et al.* 2001, Noguchi *et al.* 2003).

Otuzbirinci Famiya grubuna dahil olan enzimlerin üç boyutlu yapısı çok detaylı aydınlatılamasa da yine de bu grup ile ilgili bir kaç çalışma mevcuttur. Otuzbirinci familyadaki α -glukozidaz enzimleri çok farklı domainlere ait canlıların enzimlerini içerir. Bir küf olan *A. niger* α -glukozidazı, bir termofilik *Bacillus* olan *G. thermoamyloliquefaciens* α -glukozidaz II ve III enzimleri ile bir hipertermofilik arke olan *S. solfataricus* α -glukozidazı şaşırtıcı şekilde İnsan lizozomal α -glukozidaz enzimi ile amino asit dizileri açısından benzerlik göstermiş ve 31. familya glukozil hidrolazlara dahil edilmişlerdir. Familya 13'deki 1., 3. ve 4. korunmuş bölgelerden yoksun olan bu enzimler, sadece ikinci korunmuş bölgeye ve katalitik aspartat kökünü içeren 5. bir korunmuş bölgeye daha sahiptirler (Hermans *et al.* 1991, Chiba 1997, Rolfsmeier *et al.* 1998, Kashiwabara *et al.* 2000).

G. thermoamyloliquefaciens α -glukozidaz II ve III enzimleri dizi homolojisi açısından bakteriyel α -glukozidazlardan çok, şaşırtıcı şekilde ökaryotik enzimlere benzerlik göstermiştir. Bu nedenlerle çoğunlukla arke ve ökaryotik canlıların α -glukozidazlarının sınıflandırıldığı 31. familya grubuna dahil edilmişlerdir. α -Glukozidaz II enzimin öngörülen üç boyutlu yapısını; 14 β -iplikçiğinden oluşan N-terminal bölgesi, 8 α -heliks ile 4 β -iplikçiğinden oluşan A-bölgesi ve 14 β -iplikçiğinden oluşan C-terminal bölgesi oluşturur. Enzimin homohekzamerik üç boyutlu yapısı şekil 2.8'de görülmekte olup domain organizasyonundan dolayı $\beta(\alpha\beta)\beta$ sandviç motifi ismi verilmiştir (Kashiwabara *et al.* 2000).



Şekil 2.8 *Bacillus thermoamyloliquefaciens* KP1071 suşuna ait α -Glukozidaz II enziminin üç boyutlu yapısı (Kashiwabara *et al.* 2000)

2.12 α -Glukozidazların Katalitik Özellikleri

Kristalografi çalışmaları ile elde edilen üç boyutlu yapı bilgilerinin bölge spesifik mutasyon ve inhibitör analizleri ile kombinasyonu; α -glukozidazlarda substrat ve ürün arasındaki ilişkiyi ve aktif bölge ile civarında bulunan amino asit farklılıklarının daha iyi anlaşılmasına yardımcı olmuştur (Maarel *et al.* 2002). Katalitik bölge ile ilgili yapılan üç boyutlu yapı, amino asit dizi analizi ve bölgeye spesifik mutasyon çalışmalarında (Şekil 2.4) α -glukozidazların evrim süresince 4 korunan bölgeye, katalitik bölgelerinde iyonlaşabilen bir aspartat (Asp) ve glutamat (Glu) köküne ve substrat bağlama bölgelerinde de enzimin substrat spesifikliğini sağlayan bir Histidin (His) amino asit köküne sahip oldukları saptanmıştır (Çizelge 2.4), (Kelly and Fogarty 1983).

Hung ve arkadaşlarının (2005) *Geobacillus* sp. HTA-462 suşu ile yaptıkları çalışmada *Bacillus* sp. SAM1606, *Geobacillus* sp. GTA-462 ve *G. stearothermophilus* ATCC 12016 suşlarının α -glukozidazların; Aspartat, glutamat, aspartat katalitik kökleri içerdikleri dizi analizleri sonucu belirlenmiştir. *Geobacillus* sp. HTA-462 α -glukozidaz enziminin katalitik bölgesi Asp199, Asp326 ve Glu256 amino asit kökleri yanında, Asp98 kökünü de içermektedir. Ayrıca *B. cereus* oligo-1,6 glukozidaz enziminde

His103 köküne denk gelen substrat bağlama bölgesi, HTA-462 enziminde His101 amino asit köküne tekabül etmektedir.

Bacillus sp. SAM1606 enziminin dizi analizi çalışmaları ve bölge spesifik mutasyon çalışmalarına göre, substrat spesifikliğini belirleyen Gly273 ve Thr342 köklerinin Glu271 ve Asp345 köklerinden oluşan katalitik bölge yakınında bulunduğu belirlenmiştir. SAM1606 enzimidaki Gly273 amino asit kökünün diğer α -amilaz familyasındaki enzimlerinin az korunmuş bölgelerindeki bir pozisyona denk geldiği ve enzime diğer α -glukozidaz enzimlerinden farklı olarak eşsiz bir trehaloz aktivitesi kazandırdığı saptanmıştır. *B. cereus* oligo-1,6-glukozidaz enziminin Pro273 ve Thr342 kökleri glisin ve asparajin kökleri ile yer değiştirildiğinde tıpkı SAM1606 α -glukozidazı gibi trehaloz substratına ilgisinin katalitik olarak 192 kat arttığı görülmüştür. Bu da α -glukozidazın sadece birkaç amino asit değişikliği ile oligo-1,6 glukozidaz enziminden kolaylıkla evrimleşebildiğini göstermiştir. SAM1606 α -glukozidazının tek bir amino asit değişikliği ile oldukça geniş substrat spesifikliğine sahip oligo-1,6 glukozidaza kolaylıkla dönüşebileceği görülmüştür (Inohara-Ochiai *et al.* 1997, Noguchi *et al.* 2003).

T. caldophilus GK24 α -glukozidaz enziminin Asp198, Glu265 ve Asp327 amino asit köklerinin katalitik merkezi, His100 ve His326 köklerinin ise katalizde görevli substrat bağlama bölgelerini oluşturduğu belirlenmiştir (Nashiru *et al.* 2001). *B. thermoamyloliquefaciens* KP1071 suşuna ait II. α -glukozidaz enziminin katalitik olarak aktif bölgesinde Asp407 ve Asp 484 amino asitlerinin mevcut olduğu saptanmıştır (Kashiwabara *et al.* 2000). Takii ve arkadaşları (1996), α -amilaz familyasındaki çok sayıda enzimde katalitik ve bağlanma bölgelerinin korunduğu esasına dayanarak, *G. stearothermophilus* ATCC 12016 α -glukozidazının Asp199, Glu256 ve Asp366 köklerinin aktif merkezde ve His103 ile His325 amino asit köklerinin de substratın redükleyici olmayan terminal α -glukozil kökleriyle reaksiyona girdiğini belirlemişlerdir.

2.13 α -Glukozidazların Moleküler Özellikleri

Şu ana kadar α -glukozidaz enzimini kodlayan genin hem prokaryotik hem de ökaryotik canlılarda kromozomal DNA üzerinde bulunduğu belirlenmiştir. Geni saflaştırılarak izole edilen α -glukozidaz enzim genlerinin büyüklükleri, protein içeriklerindeki amino asit sayıları ve enzimlerin moleküler ağırlıklarına ait bilgiler çizelge 2.4’de gösterilmiştir. Şimdiye kadar belirlenmiş pek çok mikrobiyal α -glukozidazın molekül ağırlığı 30 ile 102 kDa arasında değişiklik göstermekle birlikte, genellikle 70 kDa’un altında bulunmuştur (Piller *et al.* 1996).

Hung ve arkadaşlarının (2005) *Geobacillus* sp. HTA-462 suşu ile yaptıkları çalışmada 1.7 kilo bazlık enzim geni klonlanarak *E. coli*’ye aktarılmıştır. Üretilen proteinin, 555 amino asit içerdiği ve moleküler büyüklüğünün 65 kDa olduğu belirlenmiştir. *G. stearothermophilus* ATCC 12016 α -glukozidazının 65.3 kb’lık ve 555 amino asit köklük dizileri, 1665 baz çiftlik nükleotit dizisinden çıkarılmıştır. (Takii *et al.* 1996). *B. thermoamyloliquefaciens* KP1071 suşuna ait II. α -glukozidaz enziminin 787 amino asitlik dizisi belirlenmiş ve üç boyutlu yapısı çıkarılmış, molekül ağırlığı 90 kDa olarak belirlenmiştir (Kashiwabara *et al.* 2000).

Çizelge 2.4 Saflaştırılan bazı α -glukozidazların yapısal ve katalitik özellikleri

Enzim kaynağı mikroorganizma	Glukozil hidrolaz familyası	Genin moleküler ağırlığı	Amino asit sayısı	Moleküler ağırlığı	Üç boyutlu yapısı	Katalitik bölgesindeki amino asit/ler	Substrat bağlama bölgesindeki amino asit/ler	Kaynak
<i>Bacillus</i> sp. SAM1606	GH-13. familya	2321 bç	587	68.9 kDa	Trimerik (α/β) ₃ varil yapısı	Asp214, Glu21, Asp345	Thr342, Gly273 (trehaloz için)	Nakao <i>et al.</i> 1994a
<i>G. stearothermophilus</i> ATCC 12016	GH-13. familya	1665 bç	555	62 Da	(α/β) ₈ varil yapısı	Asp326, Asp199, Glu256	His103, His325	Suzuki <i>et al.</i> 1984b
<i>B. stearothermophilus</i> ATCC 7953	GH-13. familya	RE	RE	86.7 kDa	RE	RE	RE	Albert <i>et al.</i> 1998
<i>Geobacillus</i> HTA-462	GH-13. familya	1.7 kb	555	65 kDa	Homodimerik (α/β) ₈ varil yapısı	Asp199, Asp326, Glu256 Asp98	His101	Hung <i>et al.</i> 2005
<i>B. thermoamyloliquefaciens</i> KP1071 (FERM-P8477) AGL II	GH-31. familya	RE	RE	90 kDa	$\beta(\alpha/\beta)\beta$ sandviç motifi	Asp407, Asp484	RE	Kashiwabara <i>et al.</i> 2000
<i>B. thermoamyloliquefaciens</i> KP1071 (FERM-P8477) AGL I	GH-13. familya	RE	RE	62 kDa	Monomerik (α/β) ₈ - varil yapısı	RE	RE	Suzuki <i>et al.</i> 1992
<i>B. flavocaldarius</i> KP1228 (FERM-P9542)	GH-13. veya 31. familya	RE	RE	102 kDa	Globüler homotetramer (α_4)	RE	RE	Murakami <i>et al.</i> 1998
<i>B. caldovelax</i> DSM 411	RE	RE	RE	30 kDa	RE	RE	RE	Giblin <i>et al.</i> 1987
<i>T. caldophilus</i> GK24	GH-13. familya	RE	RE	61.43 kDa	Monomerik (α/β) ₈ varil yapısı	Asp198, Glu265, Asp327	His100, His326	Nashiru <i>et al.</i> 2001
<i>S. cerevisiae</i>	GH-13. familya	1.8 kb	584	RE	(α/β) ₈ varil yapısı	Val216, Asp215	RE	Yamamoto <i>et al.</i> 2004
<i>A.s niger</i>	GH-31. familya	RE	RE	125.kDa	homodimer	Asp224	RE	Lee <i>et al.</i> 2001
<i>S. solfataricus</i> 98/2	GH-31. familya	RE	RE	80 kDa	homotetramerik	RE	RE	Rolfsmeier and Blum 1995
<i>P. furiosus</i>	GH-31. familya	RE	RE	125 kDa	RE	RE	RE	Costantino <i>et al.</i> 1990
İnsan lizozomal α -glukozidazı	GH-31. familya	RE	952	110 kDa	RE	Asp518, Trp516	RE	Hermans <i>et al.</i> 1991
<i>B. coagulans</i> ATCC 7050*	GH-13. familya	RE	RE	60 kDa	(α/β) ₈ varil yapısı	Asp199, Glu255, Asp332	RE	Suzuki ve Tomura 1986a
<i>B. cereus</i> ATCC 7064*	GH-13. familya	RE	RE	60 kDa	(α/β)-varil yapısı	Asp199, Glu255, Asp329	His103, His328	Suzuki <i>et al.</i> 1982
<i>B. thermoglucosidasius</i> KP1006 (DSM 2542)*	GH-13. familya	1686 bç	562	60 kDa	(α/β)-varil yapısı	Asp199, Glu256, Glu330	RE	Suzuki <i>et al.</i> 1979

NOT: * işaretli mikroorganizmalara ait enzimler oligo-1,6-glukozidaz enzimleridir, RE; Rapor edilmedi.

Lee'nin (2000) yaptığı bir çalışmada termofilik *Bacillus* DG0303'den α -glukozidaz enzimi izole edilmiş ve saflaştırılarak amino asit dizisi çıkarılmıştır. Enzimin termostabil olup 562 amino asit kökü içerdiği rapor edilmiştir.

Nakao ve arkadaşları (1994) termofilik *Bacillus* sp. SAM1606 suşuna ait α -glukozidaz enzimini *E. coli*'ye transforme ederek klonlamışlardır. 587 amino asit kökü içeren bu enzimin moleküler ağırlığı 68.886 Da olarak belirlenmiştir. α -Glukozidaz enzimini kodlayan genin 2321 baz çiftinden oluştuğunu saptanmıştır. *B. flavocaldarius* KP1228 (FERM-P9542) suşundan trehaloz ve maltoz aktivitesine sahip yeni ve termostabil bir hücre içi α -glukozidaz izole edilmiştir. Gel filtrasyonu ile yapılan çalışmada enzimin molekül ağırlığı 420.000 Da olarak bulunmuştur. Enzim globüler katlanmış homotetramerik (α_4) bir üç boyutlu yapıya sahiptir. Enzim monomerik veya trimerik (α_3) *Bacillus* sp. SAM1606 α -glukozidazına substrat spesifikliği yönünden benzemektedir. Ancak SAM1606 enziminden, doğal veya denatüre haldeyken daha büyük moleküler ağırlık göstermesi ve daha oligomerik (α_4) bir yapıya sahip olması yönünden farklılık göstermiştir (Murakami *et al.* 1998).

G. stearothermophilus ATCC 7953'ün spor formundaki α -glukozidaz enziminin molekül ağırlığı 92.7 kDa iken vejetatif hücre formunda enzimin moleküler ağırlığı 86.7 kDa'dur. Moleküler ağırlık farkı yaklaşık 45-50 amino asit köküne denk gelir. Vejetatif hücre formundaki enzimin muhtemelen translasyon sonrası modifikasyon ile değiştirilerek spor formunda boyutunun arttırıldığı düşünülmektedir. Bu modifikasyonun, α -glukozidazın spordaki spesifik hedefine ulaşmasına yardımcı olduğu tahmin edilmektedir (Albert *et al.* 1998).

Ökaryotik ve arkeal α -glukozidazların molekül ağırlıkları nispeten daha büyük olup 80 ile 125 kDa arasında değişiklik gösterir. Çalışılan *Thermococcus* AN1 arkeal α -glukozidazın molekül ağırlığı 60 kDa olarak belirlenmiştir. Bir hipertermofilik arke olan *S. solfataricus* suşunda 2083 baz çiftlik α -glukozidaz geni klonlanarak *E. coli*'de ifadesi yapılmıştır. Enzim 693 amino asitten oluşan 80.5 kDa'luk bir protein kodlar (Rolfmeier *et al.* 1998). Ayrıca *A. niger* ve *P. furious* enzimlerinin molekül ağırlıkları 125 kDa olarak saptanmıştır (Piller *et al.* 1996, Lee *et al.* 2001). Yapılan diğer bir

çalışmada ise İnsan lizozomal α -glukozidaz enziminin 952 amino asit kökünden oluşan, 110 kDa'luk bir protein olduğu bulunmuştur (Hermans *et al.* 1991).

2.14 Proteinlerin Amonyum Sülfat ile Kısmen Saflaştırılması

Enzim saflaştırma işlemleri proteinin kullanım amacına göre değişiklik gösterir. Daha ileri saflaştırma tekniklerine geçmeden önce uygulanan birincil ayırma teknikleri hücre parçalanması, berraklaştırma, santrifüjleme, amonyum sülfat presipitasyonu ve diyaliz aşamaları uygulanır. Hidrofobik gruplar genellikle proteinin iç kısmında yer alır, bazıları da yüzeyde yerleşmiştir. Su bu gruplar ile temas kurmakta zorlanır ve bu grupların üzerinde su moleküllerinin dizilmesi söz konusu olur. Protein çözeltisine çok miktarda tuz ilavesiyle yeterli miktarda su molekülü protein yüzeyinden uzaklaştırılırsa protein agregasyona uğrayarak çöker. Proteinlerin hidrofobik kısımlarının birbiriyle etkileşerek çökmesi ile oluşan bu olaya “salting out” denilir. Daha büyük ve daha fazla hidrofobik alanları olan proteinler, daha az amonyum sülfat ile çökerken, daha küçük ve daha az hidrofobik alanlara sahip proteinlerde durum tam tersinedir. Bu olaya protein fraksiyonlaması denilir. Amonyum sülfat fraksiyonlaması ile proteinler denatüre olmadan konsantre halde yoğunlaştırılabilir. “Salting out” ile enzim en fazla 4-5 kat saflaştırılabilmektedir. Bundan sonraki aşamada ortama eklenen tuzun uzaklaştırılması amacıyla da diyaliz işlemi uygulanır. Protein çözeltisi, selüloz asetatı yapılmış ve küçük molekülleri geçirirken, büyük molekülleri alıkoyan yarı geçirgen bir diyaliz torbasına koyularak distile suya veya tampona karşı diyaliz edilir. Küçük moleküller membrandaki ozmotik basınç dengelenene kadar serbestçe membrandan geçerler. Böylece ortamdaki tuz molekülleri uzaklaştırılır. Ancak amino asit dizisi ve X-ışını kristalografik çalışmalarında çok miktarda saf enzime ihtiyaç duyulduğundan, amonyum sülfat çöktürmesinden sonra jel fitrasyonu, iyon değiştirme veya afinite kolon kromatografisi gibi çok daha ileri saflaştırma tekniklerine ihtiyaç vardır (Nakao *et al.* 1994a, Erarslan ve ark. 2005).

2.15 α -Glukozidazların Farklı pH ve Sıcaklıklardaki Aktivite ve Stabiliteleri

Enzim aktivitesini etkileyen en önemli faktörler sıcaklık ve pH değişimleridir. Her enzimin çalışması için gerekli bir optimum sıcaklık ve pH değeri vardır. Reaksiyon hızı maksimuma erişinceye kadar sıcaklıkla artar. Sıcaklığın daha da arttırılması sonucunda enzimin termal denatürasyonuna bağlı olarak reaksiyon hızında bir azalma meydana gelir. pH değişiklikleri ise aktif bölgenin iyonizasyonu ve reaksiyon hızı üzerinde etkilidir. Ortamdaki H^+ iyonu konsantrasyonu, enzim ve substratın spesifik gruplarının reaksiyona girebilmeleri için iyonize veya iyonize olmamış durumda bulunmalarına etki eder. Özellikle glukozidazların enzimatik reaksiyonları, aktif merkezlerinde bulunan aspartat ve glutamat köklerindeki karboksil gruplarının iyonlaşmasına bağlıdır. Katalitik olarak aktif olan protein molekülünün yapısı amino asit yan zincirlerinin karakterine bağlı olduğundan, pH'daki aşırılıklar da enzimin denatüre olmasına sebep olur (Rye and Withers 2000, Erarslan ve ark. 2005).

Bir enzimin pH ve sıcaklık isteği genellikle elde edildiği mikroorganizmanın yaşadığı ortamla ilişkilidir. *Bacillus* cinsi mikroorganizmalar çok çeşitli habitatlardan izole edildiğinden, içerdikleri α -glukozidazların sıcaklık ve pH optimumları da çeşitlilik gösterir (Çizelge 2.5). Bazı mezofilik ve termofilik *Bacillus* suşlarından izole edilen α -glukozidazların sıcaklık optimumları 37 ile 85°C arasında değişiklik göstermektedir. Yine alkali ortamlardan asidik ortamlara kadar farklı habitatlarda yaşayabilen *Bacillus* suşlarına ait α -glukozidazların pH istekleri 5 ile 9 arasında rapor edilmiştir. Tüm bu özelliklerin yanında termofilik enzimlerin konformasyonel stabiliteleri, onların yüksek sıcaklıklardaki stabilitelerinin de artmasına sebep olmaktadır (Suzuki *et al.* 1987a, Hung *et al.* 2005).

Çizelge 2.5 Bazı *Bacillus* cinsi α -glukozidazların sıcaklık ve pH istekleri

Enim kaynağı organizma	Hücrel yerleşimi	Sıcaklık optimumu	pH optimumu	Kaynak
<i>B. subtilis</i> LMM-12	Hücre içi/dışı	50°C	6-7	Arellano and Olmos 2002
<i>B. licheniformis</i> NCIB 6346	Hücre içi/dışı	37°C	6.0	Thirunavukkarasu and Priest 1984
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Hücre içi	39°C	6.8	Urlaub and Wober 1978
<i>Bacillus</i> sp. ATCC 21591	Hücre dışı	40°C	7.0	Kelly <i>et al.</i> 1983
<i>Bacillus</i> sp. SAM1610	Hücre içi	75°C	5.5	Nakao <i>et al.</i> 1994b
<i>B. caldovelax</i> DSM411	Hücre içi	50-60°C	5.5-6	Giblin <i>et al.</i> 1987
<i>B. flavocaldarius</i> KP1228 (FERM-P9542)	Hücre içi	85°C	5.1	Suzuki <i>et al.</i> 1987a
<i>B. thermoamyloliquefaciens</i> KP1071 (FERM-P8477)	Hücre içi	81°C	7.0	Kashiwabara <i>et al.</i> 2000
<i>B. thermoamyloliquefaciens</i> KP1071 (FERM-P8477)	Hücre dışı	55-60°C	7.1	Suzuki <i>et al.</i> 1992
<i>G. stearothermophilus</i> ATCC 7953	Hücre içi	63-77°C	7.7	Albert <i>et al.</i> 1998
<i>G. stearothermophilus</i> ATCC 12016	Hücre içi	70°C	6.3	Suzuki <i>et al.</i> 1984b
<i>Geobacillus</i> HTA-462	Hücre içi	60°C	9.0	Hung <i>et al.</i> 2005

2.16 Termostabil α -Glukozidazların Yüksek Sıcaklığa Adaptasyon Mekanizmaları

Termofilik mikroorganizmalar tarafından üretilen termostabil enzimler oldukça spesifik olup pek çok ekstrem koşula içsel stabilite gösterdiklerinden endüstriyel işlemlerde kullanım potansiyeline sahiptir. Bu alandaki gelişmeler, dünyadaki farklı sıcak su kaynaklarına sahip ekolojik bölgelerden yeni ve ekstremofilik mikroorganizmaların izolasyonu ve özellikle termostabil enzimlerinin ekstraksiyonu ile mümkün olabilmektedir (Haki and Rakshit 2003). Ekstremozimlerin stabilitelerinin anlaşılmasında üç boyutlu yapıları ile ilgili pek çok çalışma yapılmaktadır. Bu yaklaşım hem mezofil hem de termofilik organizmalara ait homolog enzimlere ait detaylı yapısal bilgiler gerektirir. Ekstremozimlerin stabilitesinde artışa neden olabilecek yapısal farklılıklar bu şekilde belirlenebilir (Hough and Danson 1999).

Termostabil α -glukozidazlar, yüksek sıcaklarda uzun süre stabil olarak kalabilmektedirler. Stabilitelerinin sebeplerini araştırmak amacıyla çok çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Suzuki ve arkadaşları (1987b), mezofilik karakterden termofilik karaktere doğru sıcaklığa adaptasyon göstermiş mikroorganizmaların glukozidaz enzimlerinin amino asit dizilerini, üç boyutlu yapılarını ve moleküler özelliklerini incelediklerinde, “prolin kuralı” diye adlandırdıkları bir teori geliştirmişlerdir. Bu kurala göre β -dönüşlerin ikinci bölgelerindeki prolin köklerinin sıklığı ve hidrofobik amino asit köklerinin toplam sayısı arttıkça, protein termostabilitesi de artmaktadır. Çizelge 2.6’da da görüldüğü gibi *B. cereus* ATCC 7064, *B. coagulans* ATCC 7050, *G. thermoamyloliquefaciens* KP1071, *G. thermoglucosidasius* KP1006, *G. caldotenax* KP1213, *Bacillus* sp. SAM1606, *G. flavocaldarius* KP1228 ve *T. caldophilus* GK24 suşlarının sıcaklık istekleri bu doğrultuda giderek artmaktadır. Amino asit içeriklerinin kıyaslanması ile yapılan çalışmada, mikroorganizmaların termofilik özelliklerinin artmasına bağlı olarak glukozidazlardaki prolin içeriklerinin sayısının da arttığı belirlenmiştir. *B. cereus* oligo-1,6-glukozidaz ile yapılan bölgeye spesifik mutasyon çalışmaları da prolin kuralını doğrulamıştır (Suzuki *et al.* 1987b, Watanabe *et al.* 1991, Nakao *et al.* 1994a, Watanabe and Suzuki 1998, Nashiru *et al.* 2001).

Çizelge 2.6 Termofilik üreme özelliğinin artmasına bağlı olarak bakteriyel oligo-1,6-glukozidaz ve α -glukozidaz* enzimlerindeki prolin amino asit köklerinin sayısındaki artış (Suzuki *et al.* 1987b, Nakao *et al.* 1994a, Watanabe and Suzuki 1998, Nashiru *et al.* 2001).

Mikroorganizma	Sıcaklık istekleri (°C)	Enzimdeki prolin kökü içeriği (mol/%)
<i>B. cereus</i> ATCC 7064	10-40	2.37
<i>B. coagulans</i> ATCC 7050	30-55	4.63
<i>G. thermoamyloliquefaciens</i> KP1071	30-66	5.69
<i>G. thermoglucosidasius</i> KP1006	42-69	6.79
<i>G. caldotenax</i> KP1213	65-72	6.90
<i>Bacillus</i> sp. SAM1606*	65-75	7.14
<i>G. flavocaldarius</i> KP1228	51-82	8.51
<i>T. caldophilus</i> GK24*	60-79	8.90

Glukozidazlar, globüler monomerik bir yapıda katlanmış tek bir polipeptit zincirinden oluşmuştur. Prolin kökleri glukozidazların yapı ve fonksiyonunun korunması için çok

önemli olup özel bir amino asittir; çünkü içerdiği pirolidin halkasıyla en güçlü heliks kırıcı olarak bilinir. Ana polipeptit zincirinin konformasyonel olarak hareket yeteneğini düşürerek proteinlerin globüler şekilde katlanmasına neden olur. Polipeptit ana zincirini kendi üzerine döndürerek diğer dönüşlerdeki polar yan zincirlerle daha kolay hidrojen bağı oluşturmalarını sağlar ve üç boyutlu yapısını daha stabil hale getirir. Prolin köklerinin ve toplam hidrofobik köklerin sayısının artırılmasıyla, polipeptit zinciri daha kuvvetli hidrofobik ilişkilerle, daha yoğun şekilde paketlenabilir ve sonuçta molekül daha sıkı bir yapıya sahip olur. Termostabilitenin mezofilik enzimlerden termofilik enzimlere doğru gidildikçe yükselmesi ile prolin kökü sayısının belirgin artışı arasındaki ilişki prolin kuralını doğrulamaktadır (Suzuki *et al.* 1987b, Watanabe *et al.* 1991, Watanabe and Suzuki 1998, Watanabe *et al.* 1997, Watanabe and Suzuki 1998).

Termodinamik analizler sonucu prolin, lösin ve alanindeki büyük artışlar termostabil glukozidazlarda daha çok hidrofobik bağ oluşumuna ve dolayısıyla sıcaklığa karşı stabilite artışına yol açtığı belirlenmiştir (Suzuki *et al.* 1987b). Tüm bu etkiler enzimlerin daha sıkı bir konformasyonda olmasına bağlı olarak üre, SDS ve etanolün katlanmayı engelleyici etkisine de daha dirençli olmalarına neden olmuştur. Termostabil α -glukozidazların bu yapısal stabiliteleri, sıcaklığa ve denatüre edici ajanlara dirençleri yanında; proteolizize ve pH değişikliklerine karşı da daha dirençli olmalarını sağlamaktadır (Suzuki and Imai 1982).

Prolin içeriklerinin yanında ısı şoku proteinleri (Hsp) olarak adlandırılan şaperoninler de α -glukozidazların katlanmasında anahtar moleküller olarak bilinirler. Katlanmamış proteinlere bağlanarak yanlış katlanmayı ve agregasyonu önlerler ve dolayısıyla da proteinlerin doğru konformasyonlarda üç boyutlu yapılarını kazanmalarını sağlarlar. Tüm bu işlemlerde GroEL ve onun kofaktörü GroES iş görür. Termofillerin doğal olarak yüksek sıcaklıklara adaptasyonlarından dolayı, mezofilik akrabalarına göre daha yüksek termostabiliteye sahip şaperoninler içerdikleri belirlenmiştir. *G. stearothermophilus* ve *E. coli* şaperoninleri karşılaştırıldığında *G. stearothermophilus*'a ait GroEL proteininin ısı ve denatüre edici ajanlara karşı belirgin olarak dirençli olduğu saptanmıştır. α -Glukozidaz enziminin şaperoninler ile ilişkilerini belirlemek için yapılan çalışmalarda, Hsp 60 grubu GroEL proteinini termal stabiliteyi belirgin şekilde

arttırdığı, Hsp 70 grubu proteinlerin ise açık bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir (Schön and Schumann 1995, Ewalt *et al.* 1997, Watanabe *et al.* 2002).

2.17 İnhibitör ve Substrat Analoglarının α -Glukozidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Enzimlerin aktifliğini azaltan veya tamamen ortadan kaldıran maddelere inhibitör adı verilir. Enzim inhibitörleriyle yapılan çalışmalar sonucu, enzimlerin substrata karşı spesifikliğı, aktif bölgelerindeki işlev gruplarının özelliğı, enzimatik reaksiyonun mekanizması ve enzim molekülünün kendine özgü yapısının devam ettirilmesinde etkin olan işlev gruplarının durumu hakkında önemli bilgiler edinilir. İnhibitör varlığındaki enzimatik reaksiyonlar geri dönüşümlü ve dönüşümsüz olmak üzere ikiye ayrılır. Geri dönüşümlü reaksiyonlar ise yarışmalı ve yarışmasız olmak üzere iki grupta toplanır. Yarışmalı inhibitörler substrata çok yakın bir yapıya sahip olduğundan enzime bağlanmaları aynı substrat gibidir. Ancak ortamdaki substrat miktarı yükseltildiğinde inhibitörün etkisi azalarak reaksiyon hızı artar. Yarışmasız inhibitörler ise enzimin ya aktif bölgesine ya da aktif merkez dışında kalan bir bölgeye bağlanarak enzimde yapısal olarak değişikliğe sebep olur. Bu nedenle substrat miktarı arttırılsa da enzimin üç boyutlu yapısı bozulduğu için inhibisyon derecesi azalmaz (Erarslan ve ark. 2005).

2.17.1 Tiol (-SH) grubu içeren inhibitörlerin etkileri

Tiol grubu bileşikler bir sülfür atomu ve bir hidrojen atomundan (-SH) oluşmuş merkaptanlar olarak bilinen yapılardır ve biyolojik sistemlerde önemli bir rol oynarlar. Protein katlanmasında iki sistein amino asit kökünün tiol grupları biraraya geldiğinde, oksidasyon reaksiyonu sonucu disülfid bağı (-S-S-) oluşur. Eğer sistein kökleri aynı peptit zincirinin birer parçası ise disülfid bağı bir proteinin üç boyutlu yapısına ya da farklı peptit zincirleri arasında oldukça kuvvetli kovalanet bağlar oluşturarak, çok alt üniteli enzimlerin dördüncül yapılarına katkıda bulunabilir. Bir enzimin aktif bölgesindeki sülfidril grupları, enzim substratı ile kovalent olmayan bağlar yaparak katalitik aktivitede rol oynayabilir. Yapısında -SH grubu bulunduran inhibitörler ise enzim yüzeyinde aktif bölgeyi etkisi altında tutan bir bölgeye tutunarak aktif merkezi inhibe edebilirler. Enzimlerin aktif bölgelerinde veya üç boyutlu yapılarına katkıda

bulunan sistein köklerinin varlığını saptamak için N-etilmaleimit (NEM), *p*-kloromerküribenzoat (*p*CMB), *p*-kloromerküribenzen sülfonat (*p*CMBS) ve monoiodoasetik asit (MIAA) gibi –SH grubu inhibitörler test edilir (Suzuki and Tomura 1986a).

Suzuki ve Tomura (1986a), *B. cereus* ATCC 7064 ve *B. coagulans* ATCC 7050 oligo-1,6-glukozidaz enzimlerinin sistein kökü içermelerinden dolayı *p*CMB ile %85 oranında kuvvetli şekilde inhibe olduğunu belirlemiştir. Bu veriler enzimlerin *p*CMB için aktif merkezden uzakta bir bölgeye sahip olduklarını ve civanın bağlanması sonucu tüm moleküler konformasyonun ve aktif bölgedeki yapının tiol grubu ile değişebileceğini göstermiştir. İnhibisyon çalışmaları, oligo-1,6-glukozidaz enzimlerinin aktivitesi için zorunlu ve aktif merkezden uzakta başka bir bölgenin varlığına işaret etmektedir (Suzuki and Tomura 1986a, 1986b, Watanabe *et al.* 1996).

Alkalifilik *Bacillus* F5 oligo-1,6 glukozidaz ile yapılan çalışmada, enzimin monoiyodoasetat ile *p*CMB gibi SH-grupları tarafından %100 inhibe olduğu belirlenmiştir. Pek çok *Bacillus* oligo-1,6 glukozidaz enziminin sistein amino asit kökü içermeyip *p*CMB ile inhibe olmadığı belirlenmiştir. Ancak F5 oligo-1,6 glukozidazının bazı metal iyonları ve *p*CMB ile inhibisyonu sonucu, enzimin aktif merkezine katkıda bulunabilecek bir sülfidril grubu içerdiği tespit edilmiştir (Yamamoto and Horikoshi 1990).

Sülfidril ajanlarının *Saccharomyces italicus* α -glukozidazı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Enzimin 10 dakika boyunca 5.10^{-5} M'lık *p*CMB ile inkübasyonu sonucu aktivite tamamen kaybolmuştur. Enzimin sülfidril ajanlarıyla aktivite kaybetmesi sonucu -SH gruplarının enzim katalizinde direk olarak görev aldığı söylenemez, ancak sülfidril ajanlarıyla inhibisyon muhtemelen –SH gruplarının da reaksiyona eşlik ettiği geri dönüşümlü yapısal değişikliklerden kaynaklanmaktadır. Enzimin ağır metaller ile inhibisyonu ve *p*CMB ile inaktivasyonu, substrat katalizine bir –SH grubunun katıldığını göstermektedir (Halvorson and Ellias 1958).

Yapılan çalışmalarda, pCMB'nin çeşitli termostabil α -glukozidazlar üzerindeki inhibisyon oranları belirlenmiştir. Buna göre pCMB ile *Geobacillus* HTA 462 enziminin %100 (Hung *et al.* 2005), *G. thermoamyloliquefaciens* KP1071 enziminin %100 (Suzuki *et al.* 1992), *G. stearothermophilus* ATCC 12016 enziminin %4 (Suzuki *et al.* 1984b) ve *B. flavocaldarius* KP1228 enziminin (Suzuki *et al.* 1987a) ise dirençli olduğu bulunmuştur.

2.17.2 Substrat analogu inhibitörlerin etkisi

Glukozidazlar, bir bağlama bölgesi ve bir de katalitik merkez olmak üzere iki fonksiyonel grup içerirler. Bağlama bölgesi, hidroliz edilecek karbohidrata spesifikklik sağlarken, katalitik bölge ise hidrolize edilecek bağın doğasını belirler. Bu nedenlerle kuvvetli bir yarışmalı inhibitör hem katalitik hem de spesifik bölgeler ile ilişkilendirilerek oturarak inhibisyonu sağlayabilir. Substrata benzer yapılar gösteren redükte L-glutasyon, glukono- γ -lakton, histidin, bir amin olan tris ve son ürün olan glukoz, glukozidazlar için substrat analogu inhibitörler olarak kullanılır (Kelly and Fogarty 1983).

Son ürün olan glukoz da bu enzim için yarışmalı bir inhibitördür. Glukon bileşeninin aldehit fonksiyonu, sorbitol grubu bir alkolle veya glukono- γ -laktondaki gibi bir lakton ile yer değiştirildiğinde glukozun inhibitör etkisi ortadan kalkmıştır. Bundan da inhibisyon için spesifik bağlama bölgesine tam bir glukoz molekülünün bağlanması gerektiği çıkarılmaktadır. L-glutasyon kuvvetli bir antioksidan olup oksijen formlarının redüksiyonunu sağlar. Ayrıca proteinlerdeki sistein bağlarıyla disülfid bağları oluşturarak inhibisyona yol açabilir (Kelly and Fogarty 1983).

B. cereus ATCC 7064 ve *G. thermoglucosidasius* oligo-1,6 glukozidaz enzimleri ile yapılan çalışmada Tris, D-glukono- γ -lakton ve D-glukoz, pNPG substratı ile aktif merkez için yarışmıştır. Glukoz ve bir amin olan Tris her iki enzimin de yarışmalı inhibitörleri olarak belirlenmiştir (Suzuki *et al.* 1982). *S. italicus* α -glukozidazının aminlerle inhibisyonu pH'ya bağlıdır. Tris, alkalik pH'da asidik pH'dan daha çok inhibisyona yol açmaktadır. Ayrıca alkali pH'da Tris ile inhibisyon, ortamda fazla

substrat varken geri dönüşümlü olmaktadır. Enzim aktivitenin histidin ile inhibisyonu, histidinin imidazol halkasının katalizle ilişkili olduğunu göstermektedir (Halvorson and Ellias 1958).

2.17.3 Etanol, sodyum dodezil sülfat ve ürenin denatüre edici etkileri

Bir proteinin hidrofobik karakteri, saf etanol gibi polar olmayan konvansiyonel çözücülerdeki çözünürlüğüne göre belirlenebilir. Etanol gibi organik çözücüler proteinlerin iç kısımlarındaki ve yüzeylerindeki hidrofobik karakterlerle etkileşerek çökmesine ve denatüre olmasına sebep olur. Bir proteindeki hidrofobik karakter arttıkça organik çözücülerde çözülme olasılıkları da artar. Protein içeriğindeki hidrofobik amino asitlerin su ve etanolde çözüldüğünde oluşan serbest enerji farkları bize hidrofobisite hakkında bilgi verir. Yüksek sıcaklıklarda protein yapısını sağlamlaştırarak bütünlüğünün korunmasına sebep olan hidrofobik kuvvetler, organik çözücülerin etkisi ile tesirlerini yitirirler; bu da proteinini hızla denatürasyon ile sonuçlanır. Ayrıca termostabil bir enzimin etanolde aktivasyon göstermesi biyokatalitik reaksiyonlarda istenilen bir özelliktir; çünkü suda zor çözülen bazı substratlar, yüksek sıcaklıklarda etanolde çok daha iyi çözünürler. Bu da reaksiyon verimini artırır (Cid *et al.* 1982).

Sodyum dodezil sülfat (SDS) anyonik bir deterjan ve nemlendirme ajanı olup hem asidik hem de alkalen solüsyonlarda etkilidir. Çoğunlukla proteinlerin çözülmesinde ve denatürasyonunda kullanılır. Proteinlerin çoğu SDS'e bağlandığı zaman yüzeylerinde belirgin bir negatif yük artışı görülür. Protein konformasyonu ve aktivitesindeki değişiklikler proteinin SDS ile denatüre olup üç boyutlu yapısını kaybettiğini gösterir (Zubay 1988).

Üre, temel bir protein metaboliti olup serbest amonyağın (NH_4^+) uzaklaştırılmasında, proteinlerin denatürasyonunda ve çözünürlüğünün artırılmasında kullanılır. 6M guanidin klorür ile denatüre olan proteinlerin tekrar üç boyutlu yapılarını kazanmalarını sağlar. Denatüre proteinlerin tekrar katlanarak doğal veya aktif formlarına dönüşmelerine katkıda bulunur (Zubay 1988).

Termostabil enzimlerin konformasyonel stabiliteleri, onların pH ve sıcaklıktaki stabiliteleri yanında denatüre edici ajanlar olan etanol, SDS ve üreye karşı da daha dirençli olmalarına yol açar. pH ve stabilitedeki farklılıklara bakıldığında *B. cereus* ATCC 7064 ve *G. thermoglucosidasius* oligo-1,6 glukozidaz enzimlerinin konformasyonel stabilitelerinde farklılıklar olduğunu görülmüştür. Bu enzimlerin SDS, etanol ve üre gibi denatüre edici ajanlara karşı toleransları da çoğunlukla farklıdır. Bu veriler mezofilik enzimin daha kırılgan bir yapıya sahip olduğunu ve sonuç olarak konformasyonunun denatüre edici ajanlara daha duyarlı olduğunu göstermektedir (Suzuki *et al.* 1982, Suzuki *et al.* 1986a).

Geobacillus sp. HTA-462 α -glukozidazı %15 konsantrasyondaki etanolde aktivasyonunu korumuştur. Evrensel organik çözücülere yüksek tolerans, suda çözünmeyen veya zor çözünen bileşiklerin çözünmesini sağlar. Yüksek sıcaklıklarda ve geniş bir pH aralığında aktivite gösterebilen HTA-462 α -glukozidazı gibi enzimler, biyosentez reaksiyonlarında istenilen özelliklere sahiptir ve sadece dar bir pH aralığında veya yüksek sıcaklıklarda çözülebilen bileşiklerin kullanılabilmesine olanak sağlarlar (Hung *et al.* 2005).

Thermococcus AN1 arkeal α -glukozidazının enzim aktivitesi etanol varlığında %196 bağıl aktivite göstermiştir. Etanolün etkisi transglukozidasyon aktivitesini artırır ve reaksiyon için uygun bir substrat özelliği kazanır. Enzimin izomaltoz varlığındaki reaksiyon ürünlerinden biri glukoz, diğeri de etanol olarak saptanmıştır. Hipertermofilik enzimin yüksek termostabilitesi, denatürasyona sebep olan etanole karşı aşırı bir konformasyonel stabilite kazanmasını sağlamıştır (Piller *et al.* 1996)

2.17.4 Metal iyonları ve EDTA'nın denatüre edici etkileri

EDTA divalent iyonların kelatörü olup metalloproteinlerin ve aktivasyonları için divalent katyonlara ihtiyaç duyan enzimlerin bir inhibitörüdür. EDTA metalloproteinlerin aktif bölgelerindeki çinko iyonlarına bir kelatör olarak davranır. Kalsiyuma bağımlı sistein proteazları gibi metal iyonlarına bağımlı enzimleri de inhibe

eder. Ayrıca metale gereksinim duyan biyolojik işlemlerle de ilişkili olabilmektedir (Zubay 1988).

Enzimlerin aktivite göstermeleri için gerekli olan ve protein yapısında olmayan, genellikle metal iyonlarından meydana gelmiş olan yan gruplarına kofaktör adı verilmektedir. Pekçok enzim, kofaktör olarak Cu^{+2} , Fe^{+2} , Zn^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarına gereksinim duyar. Cu^{+2} , Hg^{+2} , Ag^{+2} gibi ağır metal iyonları veya bunların türevleri ise katalitik merkezinde sistein kökleri içeren bazı enzimlerin -SH gruplarıyla birleşerek merkaptür meydana getirebilir ve enzimi inhibe edebilir. Yapılarında sülfidril grubu taşıyan enzimler böylece ağır metal iyonları ile birleşerek inhibe olurlar (Zubay 1988).

Thermococcus AN1 α -glukozidazı ile yapılan araştırmada Hg^{+2} , Co^{+2} ve Ni^{+2} iyonlarıyla inhibe edilmesi, dithioteritolün tiol gruplarına etkisine bağlanmıştır. Kelatör EDTA ile muamele, muhtemelen eser miktardaki ağır metalleri ortamdan uzaklaştırarak enzim aktivitesini arttırmıştır. Bunun yanında çift değerlikli metal iyonları olan Mg^{+2} , Ca^{+2} ve Zn^{+2} aktiviteyi çok az miktarda düşürmüştür (Piller *et al.* 1996).

S. italicus α -glukozidazı Ba^{+2} , Mn^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarından etkilenmemiştir ancak Co^{+2} %90 ve Ca^{+2} ise %40 inhibisyonuna yol açmıştır. Ağır metaller ile ön inkübasyonun enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırıldığında, α -glukozidazın Cu^{+2} , Hg^{+2} , Ag^{+2} , Pb^{+2} ve Zn^{+2} ağır metalleriyle tamamen fakat Fe^{+2} ile kısmen inhibe olduğu belirlenmiştir (Halvorson and Ellias 1958).

T. curvata α -glukozidazı, test edilen tüm ağır metal iyonlarına duyarlılık göstermiştir. Bunun aksine Mg^{+2} aktiviteyi %61 ve Ca^{+2} ise %21 oranında arttırmıştır (Janda *et al.* 1997). *P. furious* α -glukozidaz enziminin bir kelatör ajan olan EDTA ile inkübasyon sonucu aktivitesindeki belirgin düşüş, metal iyonlarının enzim stabilitesi ve aktivitesinde önemli olabileceğini göstermiştir (Costantino *et al.* 1990).

2.18 Genetik ve Protein Mühendisliği Teknikleri Kullanılarak α -Glukozidazların Stabilizasyonunun Arttırılması

Enzimlerin kullanıldığı endüstriyel uygulamalarda geçerli olan koşullar daha çok sıcaklık ve pH ile ilişkili ekstrem ortamlardır. Bu nedenle enzimlerin stabilitesinin arttırılması üzerine yoğun bir talep vardır. Genetik ve protein mühendisliği; yüksek sıcaklığa, ekstrem pH'a, okside edici ajanlara ve organik çözücülere stabilitesi arttırılmış ticari enzimlerin geliştirilmesi için kullanılan modern tekniklerdir. Enzimlerin stabilizasyonunda katkı maddeleri kullanımı, immobilizasyon ve kimyasal modifikasyon gibi teknikler de kullanılmaktadır (Haki and Rakshit 2003). Stabilizasyon ile ilgili ilk yaklaşım, sıcak su kaynakları gibi ekstrem ortamlardan yeni mikrobiyal suşların izole edilerek istenilen özellikler açısından taranmasıdır. Özellikle termofilik mikroorganizmalardan izole edilen termozimler, sadece termal denatürasyona değil bununla ilişkili olarak diğer denatüre edici ajanlara karşı da stabildirler ve biyoteknolojik kullanım potansiyeline sahiptirler. Henüz mikrobiyal çeşitliliğin %1'inden azı aydınlatılabildiğinden, yeni enzimlerin keşfedilmesi ve biyokatalizde kullanılmaları uçsuz bucaksız bir araştırma konusu olarak dikkat çekmektedir (Sellek and Chaudhuri 1999, Mozhaev 1993).

Genetik ve protein mühendisliği uygulamaları için stabilize edilecek enzimin amino asit dizisi, üç boyutlu yapısı, pH ve sıcaklık stabilite ve denatüre edici ajanlara karşı stabilizasyonu ile ilgili bilgilere gerek duyulmaktadır. Ekstremozimlerin stabilite ve denatürasyon temeli yapıları tam olarak anlaşılmadığından, farklı stabilite gösteren homolog enzimlerin amino asit dizilerinin karşılaştırılması ile mutant enzim dizaynı protein mühendisliğine bir alternatif olarak geliştirilmiştir (Hough and Danson 1999).

Çok sayıdaki termofilik enzim *E. coli*'de ifade edilerek başarıyla üretilmiştir. Rekombinant DNA teknolojisi kültüre edilemeyen veya kültüre edilmesi zor olan mikroorganizmaların enzimlerinin üretimi için önemli bir yöntemdir. Her ne kadar ekstremozimler istenilen katalitik reaksiyonlar için içsel stabiliteye sahip olsalar da belirli bir süre sonra denatüre olma ihtimalleri vardır ve bu nedenle aktivite ile

stabiliteleri arttırılabilir. Enzimlerin performansını arttırabilmek için geliştirilen bir takım teknikler vardır (Sellek and Chaudhuri 1999).

Proteinlerin termostabilizasyonunun arttırılmasında bölge spesifik mutasyonların da içinde olduğu pek çok yaklaşım geliştirilmiştir. Bölge spesifik mutasyon ile proteinlerin tüm primer yapılarını istenilen şekilde değiştirebilmek mümkün hale gelmiştir. Bölge spesifik mutasyon tekniği kullanılarak yapılan çalışmalar arasında; proteinlerdeki glisin ve alanin amino asitlerinin prolin ile değiştirilmesi (katılaştırıcı mutasyonlar) önemli bir uygulamadır (Watanabe and Suzuki 1998, Demirjian *et al.* 2001).

Protein mühendisliğinde şu an tercih edilen yaklaşımlardan bir diğeri de rastgele mutasyonlar ile oluşturulan mutantların istenilen özellik için taranmasıdır. Bu yaklaşımda hataya eğilimli PCR ile oluşturulan nokta mutasyonlar, üçlü kodonlarda değişikliğe sebep olarak protein içerisine yeni bir amino asit eklenmesine olanak sağlar. Bu metotun rastgele yapısından dolayı ilgilenilen özelliğin bulunması için çok sayıda mutant organizmanın taranması gerekir (Maarel *et al.* 2002).

İstenilen iki özelliğe de sahip yeni mutant genlerin yaratılmasına olanak sağlayan DNA düzenlemesi (shuffling) yöntemi de yine alternatif bir enzim üretim metotudur. Yakından ilişkili gen dizisi parçalarının rastgele rekombinasyonu, yeni genlerin oluşumunu sağlar. DNA düzenlemesi yöntemi, fonksiyonel çeşitlilik sağlaması amacı ile doğal olarak mevcut homolog genler arasında yürütülmektedir. Bu yaklaşım aynı zamanda stabilitesinin geliştirilmesi veya bir substrata karşı aktivitesinin arttırılması istenen ekstremozimlerde varyasyonları geliştirmek için uygulanabilmektedir (Hough and Ve Danson 1999).

Bacillus sp. SAM1606'nın düşük gelişme oranı, bakterinin enzim üretimini, saflaştırmayı, karakterizasyonu ve daha sonraki uygulamaları zorlaştırmıştır. Bu nedenle SAM1606 α -glukozidaz geni kolay üreyebilen *E. coli*'ye transforme edilerek daha yüksek miktarlarda ifadesi sağlanmıştır. Böylece α -glukozidaz transformant *E. coli* hücrelerinden, enzim saflaştırması ve karakterizasyonu ile ilgili çalışmalarda kullanılabilecek miktarlarda kolaylıkla elde edilebilmiştir (Nakao *et al.* 1994a).

G. stearothermophilus ATCC 12016 suşuna ait 2.8 kilobazlık α -glukozidaz enzimi *E. coli*'ye klonlanarak ifadesi sağlanmıştır. Enzim üretimi, transforme edildiği *E. coli* konağında 7 kat arttırılabilmektedir. Klonlanan enzim *Geobacillus* α -glukozidazı ile moleküler ağırlığı, antijenik determinantları, sıcaklık ve pH istekleri açısından birebir benzerlik göstermiştir (Takii *et al.* 1992).

G. thermoglucosidasius oligo-1,6 glukozidaz ile yapılan genetik çalışmalarda enzim geni çok etkili bir şekilde GroEL ısı şoku proteini ile kombine edilerek *E. coli*'ye aktarılmış ve ifadesi sağlanmıştır. Watanabe ve arkadaşlarının (2002) yaptığı çalışmada oligo-1,6 glukozidazın *E. coli*'deki üretimi Hsp 60 takımı proteinler ile 3.8 kat arttırılabilmektedir. Termostabil proteinlerin aynı termofile ait GroEL ile *E. coli*'de kombinasyonel ifadesinin, protein biyogenezdeki farklardan kaynaklanan problemleri önleyerek termostabil enzim üretimini arttırdığı tespit edilmiştir.

Watanabe ve Suzuki (1998) *B. cereus* ATCC 7064 suşuna ait oligo-1,6-glukozidaz enziminin üç boyutlu yapısını çıkararak bölge spesifik mutasyon ile enzimin termostabilitesini arttırmaya yönelik bir çalışma yapmışlardır. Mezofilik mikroorganizma enzimine rastgele seçilen toplam 12 yerde bölge spesifik mutasyon ile prolin kökleri eklenmiştir. Bunun sonucunda termostabilizasyon 5.6°C arttırılabilmektedir.

Thermococcus AN1 termofilik arke suşunun α -glukozidaz enzimi 110°C'de ve pH 7.0'de optimum aktivite gösterir. Enzimin 100°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda sabilitesini arttırmak için immobilizasyon (epoksi ve cam boncuklarla), kimyasal modifikasyon (çapraz veya çapraz olmayan bağlar) ve çeşitli katkı maddeleri ekleme (polihidroksilik moleküller, BSA, tuzlar) işlemleri uygulanmıştır. Enzimin yarı ömrü, %90 sorbitol, %1 dithiotreitol ve %1 BSA varlığında veya %90 sorbitol varlığında BSA ile çapraz bağlar yaparak 110°C'de 4 dakikadan, 130°C'de 30 ila 60 dakikaya kadar arttırılabilmektedir (Piller *et al.* 1996).

Yamamoto ve arkadaşları (2004) tarafından yapılan çalışmada *S. cerevisiae* mayasının ürettiği α -glukozidaz ve oligo-1,6-glukozidaz enzim genleri saptanarak izole edilmiştir. Yapılan bölge spesifik mutasyon deneylerinde oligo-1,6-glukozidazda, α -1,6 glukozidik

bağlara karşı spesifiktikten sorumlu amino asit kökünün Val216 olduğu, fakat α -1,4 glukozidik bağlara spesifik α -glukozidazda bu amino asit pozisyonunda Thr273 olduğu belirlenmiştir. Tek bir amino asit değişikliği ile enzimin substrat tercihi değiştirilmiştir. Bu iki enzim genleri birleştirilerek kimerik bir enzim oluşturulmuş ve bu yeni enzim ile hem α -1,4 glukozidik bağları hem de α -1,6 glukozidik bağları hidrolize edebilmiştir. Böylece protein mühendisliği yolu ile aynı mikroorganizmaya ait hem oligo-1,6-glukozidaz hem de α -glukozidaz aktivitesinin olduğu yeni bir kimerik enzim elde edilmiştir.

2.19 α -Glukozidazların Biyoteknolojik ve Endüstriyel Uygulama Alanları

Termofilik mikroorganizmalardan izole edilen enzimler mezofilik benzerlerine göre, doğal içsel stabiliteleri nedeni ile, daha yüksek sıcaklıklarda ve geniş pH aralıklarında aktivite ve stabilite gösterirken; organik çözücülere, proteazlara, deterjanlara ve denatüre edici bileşiklere de daha dayanıklıdırlar. Bu özellikleri, biyoteknolojik ve endüstriyel işlemlere daha uygun ve dayanıklı yeni termofilik enzimlerin potansiyel kullanım alanlarını giderek arttırmaktadır. Biyoteknolojik işlemleri yüksek sıcaklıklarda termozimler ile yürütmek önemli avantajlar sağlar. Termofilik enzimler daha sıkı konformasyona sahip olmaları sebebi ile yüksek sıcaklıkta, ekstrem pH aralıklarında ve organik çözücülerde gerçekleştirilen endüstriyel işlemlerde aktif ve stabil kalabilmektedirler. Bunun dışında kimyasal reaksiyonlara göre enzimatik reaksiyonlar çok daha spesifik, etkili ve güvenilirdir. Sıcaklığa bağlı olarak artan aktivasyon enerjisinden dolayı reaksiyon oranları da oldukça yükselir. Daha yüksek bir işlem sıcaklığına izin verdiklerinden, organik bileşiklerin ve substratın çözünürlüğü dolayısıyla da işlem verimi oldukça artar. Yüksek sıcaklıklardaki endüstriyel işlemlerde mezofilik mikroorganizmaların kontaminasyon riski düşer. Tüm bu avantajları yanında enzimatik reaksiyonlar kimyasal reaksiyonlara göre çok daha hızlı olduğundan, istenilen ürünün sentezi çok daha kısa zamanda ve daha düşük maliyet ile gerçekleştirilebilir. Bu amaçlar ile enzim üreticisi ekstremofilik mikroorganizmaların taranması sonucu yeni termostabil enzimlerin keşfedilmesi, gelecekte yeni endüstriyel ve biyoteknolojik uygulama alanlarının açılmasını mümkün kılacaktır (Niehaus *et al.* 1999, Sellek and Chaudhuri 1999, Demirjan *et al.* 2001, Haki and Rakshit 2003).

Bir organizmanın enzimi gelişme koşulları civarında fonksiyon göstermeye adapte olmuştur. Bu nedenle yaşamın tanımlandığı ekstrem koşullar, enzim aktivitesinin tespit edilebileceği koşullar olarak ifade edilir (Hough and Ve Danson 1999). Termofilik enzimlerin doğal ortamlarına adaptasyonlarındaki stabilite faktörleri hakkında kısıtlı bilgiler mevcuttur. Termofilik enzimlere ait temel araştırmalar, yüksek sıcaklıklardaki protein termostabilitesi ile mikrobiyal gelişim ve metabolizmasının aydınlatılmasına olanak sağlayacaktır (Costantino *et al.* 1990, Demirjian *et al.* 2001).

2.19.1 α -Glukozidazların temel araştırmalardaki uygulama alanları

Termostabil α -glukozidazlar, günümüzde çoğunlukla temel enzimolojik çalışmalarda, sağlık sektöründe, nişastanın işlenmesi ve oligosakkaritlerin sentezi gibi önemli endüstriyel uygulamalarda aktif olarak kullanılmaktadır (Kelly and Fogarty 1983). Özellikle son yıllarda farklı canlı gruplarından elde edilen çeşitli α -glukozidazların amino asit dizileri ve üç boyutlu yapıları çıkarılmış, reaksiyon mekanizmaları ve aktif merkezleri belirlenmiş ve kristalografi çalışmaları yapılmıştır. Yapılan temel enzimolojik araştırmalar glukozil hidrolaz 13. familya ve 31. familya gruplarında dahil edilen bu enzimler hakkında daha detaylı bilgi sahibi olmamızı sağlamıştır. Bu bilgiler ışığı altında Jespersen ve arkadaşları (1993) amino asit dizi kıyaslamaları ile α -glukozidazların da dahil olduğu nişasta parçalanmasından sorumlu glukozil gidrolazların filogenetik ağaçlarını çizmişlerdir. α -Glukozidazlar bu ağaç içerisinde iki kol halinde dağılmışlardır. Evrimsel olarak farklı kaynaklardan izole edilen bazı α -glukozidazlar, benzer katalitik ve yapısal özellikleri ile aynı dal içinde birleşmiştir. Bu fonksiyonel çeşitliliklerinin orijinini ortaya çıkarabilmek amacıyla α -glukozidazların araştırılması, evrim çalışmaları için iyi birer araç olduklarını göstermiştir (Henrissat *et al.* 1995, Hung *et al.* 2005).

Ekstremozimlerin kullanıldığı işlemlerin uygulanabilirliği için enzim pratik uygulamalarda yeterli miktarda olmalıdır. Bazı ekstremofillerin büyük hacimlerde üretilmeleri ve buradan ekstremozimlerin saflaştırılması oldukça zordur. Bu nedenle çoğunlukla uygulamalarda ilgili geni mezofilik bir konağa aktararak enzim ifadesi sağlanır. Bu da, konak hücre proteinleri ısıyla kolayca presipite olduğundan, ifade

ürününün saflaştırılması için ilk başlangıç basamağında bir kolaylık sağlar (Hough and Ve Danson 1999).

Bunun yanında üretimi ve saflaştırması kolay olan enzim üreticisi termofillerden enzim saflaştırması çok daha kısa basamaklar ile gerçekleştirilebilir. *G. thermoglucosidasius* oligo-1,6-glukozidaz enzimi kolay ve 4 basamaklı bir yöntemle saflaştırılabilmektedir. Ag-Ab kompleksi oluşumuna bağlı immünosorbent tekniği termofilik enzimlerin saflaştırılmasında kullanılabilecek önemli yöntemlerden biridir. Çünkü bu proteinler mezofilik olanlardan çok daha fazla stabil olup, Ag-Ab kompleksinin zayıflatılması için gerekli zor koşullara çok daha dayanıklıdır. Termofilik enzimlerin inhibitörlere karşı duyarlılıklarının bilinmesi onların termostabilitelerinden de yararlanılarak saflaştırma basamaklarını çok daha kolaylaştırılabilir (Suzuki *et al.* 1984a).

2.19.2 α -Glukozidazların nişasta endüstrisindeki uygulama alanları

Şu an α -amilaz familyasına ait nişasta parçalayıcı enzimler dünyadaki enzim üretiminin yaklaşık %30'unu kapsamaktadır. Nişastanın endüstriyel biyodönüşüm işlemleri sıvılaştırma, sakkarifikasyon ve izomerizasyon basamaklarını içerir (Niehaus *et al.* 1999). α -Glukozidazlar gibi yeni termostabil nişasta parçalayıcı enzimlerin bulunuşu, daha önce kimyasal reaksiyonlarla yapılan bu işlemlerin verimini belirgin şekilde arttırmıştır. α -Glukozidazlar; özellikle maltodekstrinlerin, modifiye nişastaların veya glukoz ve fruktoz şuruplarının yapımı esnasındaki sıvılaştırma işleminde, α -amilazlar ile beraber kullanılmaktadır. Ayrıca termofilik *Bacillus* cinsi mikroorganizmalar fermentasyon işlemleriyle tipik enzim üretimini oldukça kısa zamanda ve çok ucuz azot ve karbon kaynaklarıyla yapılabildiklerinden, düşük maliyet ile yüksek seviyede enzim üretimi için nişasta hidrolizi işlemlerinde kullanılmak için iyi adaylardır (Kelly and Fogarty 1983, Nashiru *et al.* 2001, Arellano-Carbajal and Olmos-Soto 2002, Maarel *et al.* 2002).

2.19.3 α -Glukozidazların oligosakkarit ve glukokonjugantların biyosentezindeki uygulama alanları

Hidrolitik aktivitelerinin yanısıra bazı α -glukozidazlar transglukozilasyon aktivitesine de sahiptirler. Normal koşullarda glukozidik bağları parçalayan glukozidazlar, uygun in-vitro reaksiyon koşullarında transglukozilasyon aktivitelerinden dolayı, reaksiyon koşullarını tersine çevirerek tekrar glukozidik bağ yapabilirler. Glukozidazların katalizlediği reaksiyonları, ortama fazla miktarda substrat ekleyerek veya glukozit oluşumunun termodinamik olarak tercih edildiği bazı organik çözücüler kullanarak yürütmek mümkündür. Enzimatik reaksiyonların spesifikliği ve güvenilirliği sebebi ile transglukozilasyon aktivitesi, son yıllarda di- ve trisakkaritler ile glukokonjugantların biyosentezinde uygulanmaya başlamıştır (Bill and Flish 1996, Vic *et al.* 1996, Watt *et al.* 1997, Hung *et al.* 2005).

Malá ve Králová'nın (2000) yaptığı çalışmada, *B. stearothermophilus*'dan izole edilen α -glukozidaz, hidroliz aktivitesi yanında transglukozilasyon aktivitesi sayesinde ters hidroliz ile oligosakkarit sentezi için bir katalist olarak kullanılmıştır.

Geobacillus sp. HTA-462 enzimi, antibiyotiklerin de dahil olduğu şeker olmayan hidroksil bileşikleri etkili bir şekilde glukozilleyebilmektedir. Enzim sayesinde %60 verimle 1-O- α -D-glukopiranozil-kloramfenikol adlı yeni bir kloramfenikol türevi sentezlenmiştir. Bu yeni kloramfenikol türevi, kloramfenikolün antimikrobiyal etkisini arttırarak, öncüsünden 15 kat daha fazla suda çözülebilme özelliği göstermiştir. Enzimin termostabilitesi, yüksek pH'daki (pH 9) stabilitesi ve geniş substrat spesifikliği ile endüstriyel uygulamalarda yüksek bir kullanım potansiyeline sahip olduğu bildirilmiştir (Shirai *et al.* 2003, Hung *et al.* 2005).

2.19.4 α -Glukozidazların sterilizasyonun doğrulanmasında kullanılışı

Bacillus cinsi sporlarda, spor çimlenmesi ve dışarıya doğru büyüme esnasında iş gören α -glukozidaz enzimi, 4-MUG substratını hidroliz miktarı ölçülerek hastane ortamlarında buhar basınçlı sıcaklık ile yapılan sterilizasyonun doğrulanmasında biyolojik indikatör olarak kullanılmaktadır. Biyolojik indikatörler hazır olarak üretici firmalardan alınabilmektedir. Buhar basınçlı sıcaklığın kullanıldığı sterilizasyonda biyolojik indikatör olarak yüksek direncinden dolayı termofilik *G. stearothermophilus* ATCC 7953 suşu kullanılır. Üç kuşak biyolojik indikatör mevcuttur. İlk iki kuşak indikatörlerde *Bacillus* sporları kullanılır; ancak uzun zaman gerektirir ve kesin sonuç almak için 24-168 saat beklenmelidir. Son yıllarda ise ameliyathaneler gibi sterilizasyonun acilen kontrol edilmesi gereken ortamlarda kullanılmak üzere Attest firması (AttestTM 1291 Rapid Readout Biological Indicator, 3M, St Paul, MN, USA) yeni bir biyolojik indikatör kiti geliştirmiştir. Bu üçüncü kuşak biyolojik indikatörde sterilizasyon kontrolünün hızlı tanısı için sterilizasyon işleminden sonra ilk 1 ile 3 saat içerisinde canlı kalabilen sporlarla ilişkili α -glukozidaz enzim aktivitesi ölçülür. Bu üçüncü kuşak biyolojik indikatörlerde kullanılan α -glukozidaz enzimi, sterilizasyon doğrulama süresini 1-3 saat kadar kısa bir zaman diliminde ve güvenilir şekilde yapılmasına olanak sağlamaktadır (Albert *et al.* 1998, Setlow *et al.* 2004).

2.19.5 α -Glukozidazların sağlık sektöründeki uygulama alanları

Sağlık sektöründe akut pankreatitis hastalığının teşhisi amacıyla klinik biyokimya laboratuvarlarında α -amilaz miktar tayini rutin olarak çalışılmaktadır. Son yıllarda vücut sıvılarındaki α -amilaz miktarını ölçmek amacıyla, hassasiyeti diğer yöntemlere göre oldukça yüksek olan ve α -glukozidazın kullanıldığı iki farklı yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden ilkinde ucu etilidin ile bloke edilmiş 4-nitrofenil- α -1,4-D-maltoheptozit substratı kullanılmaktadır. Substratın terminal redükleyici ucu normal şartlarda α -glukozidazın hidrolizini engellemek amacıyla kimyasal olarak bloke edilmiştir. Ortamda α -amilazın mevcudiyetine bağlı olarak bloke edilmiş substrat iç kısmından kesilir. Böylece substratın redükleyici ucu açılarak α -glukozidazın parçalamasına olanak sağlanmış olur. α -Glukozidaz hidrolizi sonucunda açığa çıkan pNP miktarı ölçülür.

Sonuçta oluşan *p*NP ile α -amilaz miktarı arasında doğru orantı vardır. Bu şekilde α -amilaz miktarı tayin edilir (Omichi and Ikena 1985, Lorentz 2000).

İkinci yöntem ise US04547280 patent numasına sahip maltoz sensörüdür (Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan). Bu da α -glukozidaz enziminin kullanıldığı ve ticari öneme sahip ürünlerden biridir. Kit α -glukozidaz ve glukoz oksidaz enzimlerinin immobilize edildiği bir enzim membranı ve elektrokimyasal değişikliği ölçen palladiyum bir elektrot içerir. α -Amilazın parçaladığı maltoz bileşiğini α -glukozidaz glukozu çevirir ve glukoz miktarına bağlı olarak oluşan ürünler glukoz oksidaz enzimi ile reaksiyona girerek H_2O_2 (hidrojen peroksit) oluşturur. Elektrodun ölçtüğü H_2O_2 miktarı ile α -amilaz miktarı tayin edilir. Bu enzimatik metot, enzimin substrata olan spesifikliğini kullanarak insan serumu ile oluşabilecek ara bileşiklerin oluşumunu engeller. İmmobilize enzimlerin kullanıldığı maltoz sensörü metodu daha güvenilir olması, kısa sürede sonuçlanması, klinik biyoanalizörlerde kullanılabilmesi ve renklendirici reaktiflere ihtiyaç duymadan sonuçlandırıldığı için diğer geleneksel metotlara üstünlük sağlar.

2.19.6 Ticari α -glukozidazlar

Ticari üretimi yapılan α -glukozidazlar mevcuttur. Kikkoman firması (α GLS-SE; Kikkoman Corporation 250 Noda, Noda City Chiba Pref. 278-8601, JAPAN) tarafından rekombinant *E. coli* hücrelerinden izole edilerek saflaştırılan α -glukozidaz enzimi ticari olarak üretmektedir. Liyofilize enzim 52-55°C'de ve pH 6-9 arasında aktivite göstermekte olup *p*NPG'ye karşı K_m değeri 5.5×10^{-5} 'dir. Molekül ağırlığı 60 kDa olarak belirlenmiştir.

Toyobo firması (AGH-211; Toyobo Co., Ltd., JAPAN) *G. stearothermophilus* ATCC 12016'dan izole edip saflaştırdıkları α -glukozidazı ticari olarak piyasaya sürmüşlerdir. Bu enzim 65 kDa molekül ağırlığındadır ve pH 6-7'de 60°C'de optimal aktivite göstermektedir. Enzimin *p*NPG'ye Michaelis sabiti 6.3×10^{-4} olarak bildirilmiştir. Sigma firması (G3651; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) tarafından üretilen *G. stearothermophilus* ATCC 12016 α -glukozidazı yine ticari olarak liyofilize halde saflaştırılarak satışa sunulmuştur.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Termofilik *Bacillus* izolatları

Türkiye’den termofilik *Bacillus* spp. izolasyonu amacı ile 6 ildeki 19 jeotermal alana ait 46 farklı sıcak su kaynağından (Erişen ve ark. 1996) 78 su, 113 toprak ve sediment örneği olmak üzere toplam 191 numune toplanmıştır. 2004 yılı Haziran-Eylül ayları arasında Aydın (A Bölgesi), Manisa (B Bölgesi), Denizli (C Bölgesi), İzmir (D Bölgesi), Nevşehir (E Bölgesi) ve Ankara (F Bölgesi) illerinden toplanan numunelerden bakteri izolasyonları yapılmıştır. İllere göre su, toprak ve sediment örneklerinin alındığı jeotermal alanlar, mevkii adları ve numune özellikleri çizelge 3.1’de verilmiştir. Enzim karakterizasyonu yapılan *Bacillus* sp. A333 kodlu izolat Aydın ili, Germencik ilçesine bağlı Ömerbeyli köyünde bulunan MTA (Maden Tetkik Arama) sondaj kuyusundan ve *Bacillus* sp. A333 kodlu izolat ise Aydın ili, Salavatlı ilçesine bağlı Yavuzköy’deki MTA sıcak su sondajından alınan örnekten izole edilmiştir.

3.1.2 Standart termofilik *Bacillus* suşları

Standart termofilik *Bacillus* suşu olarak kullanılan *G. stearothermophilus* ATCC 12980, *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 43223, *Anoxybacillus flavothermus* DSM 2641, *Anoxybacillus kestanbolensis* NCIB 13971, *Anoxybacillus gonensis* NCIB 13933, *Anoxybacillus ayderensis* NCIB 13972 Prof. Dr. Ali Osman Beldüz’den (Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü) ve TÜBİTAK projesi kapsamında alınan *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 (DSM 5934), *Geobacillus thermoglucosidasius* DSM 2542 ve *Bacillus amyloliquefaciens* DSM 7 standart suşları ise DSMZ (the German National Resource Centre for Biological Material)’den temin edilmiştir.

Çizelge 3.1 Termofilik *Bacillus* spp. izolasyonu için 6 farklı ile ait jeotermal alanlardan toplanan su, sediment ve toprak örneklerinin alındığı bölgeler ve numune özellikleri

AYDIN İLİ (A Bölgesi)

1. Germencik-Ömerbeyli köyü		20.06.04
1.1. ÖB. 1. MTA Kuyusu= Aktaş Mevkii		
No	Numune Özelliği	Sıcaklık/pH
A10'	Sediment	-
1.2. ÖB. 2. MTA Kuyusu= Aktaş Mevkii		
A11*	Toprak a	-
A12*	Toprak b	-
1.3. ÖB. 3 MTA Kuyusu= Aktaş Mevkii		
A3	Su	46°C/pH6-7
1.4. ÖB. 4 MTA Kuyusu= Horçayı Mevkii		
A13'	Sediment	-
A14'	Sediment	-
A15'	Sediment	-
A16'	Sediment	-
A17'	Sediment	-
A18'	Sediment	-
1.5. ÖB. 5 MTA Kuyusu= Öziçi Mevkii (Kaynak kuru)		
A19*	Toprak	-
A20*	Toprak	-
A21*	Toprak	-
A29*	Toprak	-
A30*	Toprak	-
A31*	Toprak	-
1.6. ÖB. 6. MTA Kuyusu= Ömerbeyli mezarlığı yanı, Delimehmet Durağı		
A32*	Toprak	-
A33*	Toprak	-
2. Salavatlı-Yavuz köy		20.06.04
2.1. 140°C'lik MTA sıcak su sondajı		
A34'	Sediment	-
A35'	Sediment	-
2.2. MTA Kaynağı (Kaynak kuru)		
A36*	Toprak	-
A37*	Toprak	-
A38*	Toprak	-
A39*	Toprak	-
A40*	Toprak	-
A41*	Toprak	-

*; toprak örneği, ' ; sediment örneği

Çizelge 3.1 Termofilik *Bacillus* spp. izolasyonu için 6 farklı ile ait jeotermal alanlardan toplanan su, sediment ve toprak örneklerinin alındığı bölgeler ve numune özellikleri (devam)

MANİSA İLİ (B Bölgesi)

Turgutlu-Urganlı Mevkii		21.06.04
TUR-KAP Turgutlu Kaplıcaları		
No	Numune Özelliği	Sıcaklık/pH
B1	Su	70°C/pH6.7
B3	Su	45°C/pH6.7
B5'	Sediment	50°C/pH6.7
B6*	Su	-
B7*	Su	-
B8*	Su	-
B9*	Toprak	-
B10*	Toprak	-

*; toprak örneği, ' ; sediment örneği

DENİZLİ İLİ (C Bölgesi)

1. Buharkent/Sarayköy-Tekkehamam/Tekkeköy Mevkii		20.06.04
1.1. Babacık ılıcası-Kaba ağaç köyü		
No	Numune Özelliği	Sıcaklık/pH
C5'	Sediment	60°C/pH 7.5-8
C16*	Toprak	-
C17*	Toprak	-
1.2.Çavuşoğlu Kaplıcası, Çavuşoğlu mevkii		
C8	Su	75°C/pH 7.7
C9	Su	75°C/pH 7.7
C18*	Toprak	-
C19*	Toprak	-
C20*	Toprak	-
C22*	Toprak	-
C23*	Toprak	-
C24*	Toprak	-
C26*	Toprak	-
1.3.Tekkehamam-İnaaltı mevkii		
C13	Su	95°C/pH 6.5
C28'	Sediment	-
C29'	Sediment	-
C30'	Sediment	-

*; toprak örneği, ' ; sediment örneği

Çizelge 3.1 Termofilik *Bacillus* spp. izolasyonu için 6 farklı ile ait jeotermal alanlardan toplanan su, sediment ve toprak örneklerinin alındığı bölgeler ve numune özellikleri (devam)

İZMİR İLİ (D Bölgesi)

1. Balçova Jeotermal Enerji Santrali		21.06.04
No	Numune Özelliği	Sıcaklık/pH
D3'	Sediment	98°C/pH8-8.5
D6'	Sediment	-
D7*	Toprak	-
D8*	Toprak	-
D9*	Toprak	-
2. Seferhisar-Ürkmez-Doğanbey Mevkii, Karakoç kaplıcası		21.06.04
D4	Su	65°C/pH 6-7
D5'	Sediment	65°C/pH 6-7
D10'	Sediment	-
3. Seferhisar-Doğanbey Mevkii		21.06.04
D65'	Sediment	78°C/pH6.8/7
D66'	Sediment	78°C/pH6.8/7
D26*	Toprak	-
D27*	Toprak	-
D29*	Kaynak içindeki taş	-
D30*	Su	-
D31*	Su	-
4. Seferhisar-Cumalı Mevkii		21.06.04
D33*	Toprak	-
D34*	Toprak	-
5. Dikili-Zeytindalı Kaaplıcası		23.06.04
D36'	Sediment	-
D37'	Sediment	-
D38'	Sediment	-
D39*	Toprak	-
D40*	Toprak	-
6. Dikili-Çamur Ilıcası		23.06.04
D13'	Sediment	37°C/pH 8-9
D14'	Sediment	37°C/pH 8-9
D41*	Toprak	-
D42*	Toprak	-
D43*	Toprak	-
7. Dikili-Kaynarca-Kocaoba Mevkii		23.06.04
D19'	Sediment	55°C/pH 7-8
D20'	Sediment	55°C/pH 7-8
D21	Su	60°C/ pH 7-8
D22	Su	60°C/ pH 7-8
D23'	Sediment	60°C/ pH 7-8
D24	Su	50°C/ pH 7-8
D45'	Sediment	55°C pH 7-8

Çizelge 3.1 Termofilik *Bacillus* spp. izolasyonu için 6 farklı ile ait jeotermal alanlardan toplanan su, sediment ve toprak örneklerinin alındığı bölgeler ve numune özellikleri (devam)

<u>No</u>	<u>Numune Özelliği</u>	<u>Sıcaklık/pH</u>
D46'	Sediment	-
D47'	Sediment	-
D48'	Sediment	-
D49'	Sediment	-
D50'	Sediment	-
D51'	Sediment	-
D52*	Dere içindeki taş	-
D53*	Toprak	-
D54*	Toprak	-
D55*	Toprak	-
D56*	Toprak	-
D58*	Toprak	-
D59*	Toprak	-
D60'	Sediment	-
D61'	Sediment	-
D62*	Toprak	-
D63*	Toprak	-
D64*	Toprak	-

NEVŞEHİR İLİ (E Bölgesi)

1. Kozaklı Belediye Kaplıcası (Bağlıca vadisi içi)		31.07.04
<u>No</u>	<u>Numune Özelliği</u>	<u>Sıcaklık/pH</u>
E4	Su	98°C/pH 6.8-7
E5	Su	98°C/pH 6.8-7
E9'	Sediment	-
E14*	Kaynak yanındaki taş	-
E15*	Kaynak yanındaki taş	-
E16*	Toprak	-
E17*	Toprak	-
E18*	Toprak	-
E19*	Toprak	-
E20*	Toprak	-
E21*	Toprak	-
E22*	Toprak	-
2. Kozaklı Şehir Hamamı yanı-Altınsu mahallesi		31.07.04
E10	Su kaynağı	96°C/pH7.5-8
E11'	Sediment	96°C/pH7.5
E12'	Sediment	96°C/pH7.5
E13'	Sediment	96°C/pH7.5
E23'	Sediment	-
E24'	Sediment	-
E25'	Sediment	-
E26'	Sediment	-
E27'	Sediment	-
E28'	Sediment	-
E29'	Sediment	-
E30*	Toprak	-
E31*	Toprak	-
E32'	Sediment	-
E33*	Kaynak içindeki ağaç dalı	-

Çizelge 3.1 Termofilik *Bacillus* spp. izolasyonu için 6 farklı ile ait jeotermal alanlardan toplanan su, sediment ve toprak örneklerinin alındığı bölgeler ve numune özellikleri (devam)

ANKARA İLİ (F Bölgesi)

1. Kızılcahamam-KD-1 kuyusu (sondaj), İmamhatip mevkii		01.09.04
No	Numune Özelliği	Sıcaklık/pH
F2	Su	98°C/pH 7-7.5
F8*	KD-1 kuyusu dışındaki taş örneği	-
F9*	Toprak	-
2. Kızılcahamam-Güvem nahiyesi-Seyhamamı Kaplıcası		01.09.04
F5	Su	40°C/pH7.05

*; toprak örneği

3.1.3 Besiyerleri

Termal alanlara ait toprak, su ve sediment örneklerinden termofilik *Bacillus* türlerinin izolasyonu ve amilolitik aktivitelerinin belirlenmesi amacı ile *G. thermoglucosidasius* besiyeri olarak bilinen MI katı besiyeri kullanılmıştır (Suzuki *et al.* 1976a, 1976b). Tüpte yatık besiyerinde stoklanan izolatları saflaştırmak ve koloni morfolojilerini saptamak için %3 agar içeren Nutrient Agar (NA) (Merck 1.01613) besiyeri hazırlanmıştır. Mikroorganizmaların hücre morfolojilerini belirlemek için Nutrient Broth (NB) (Merck 1.05443) besiyeri kullanılmıştır. Ayrıca sporulasyonu arttırmak için 5 mg/lt $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ içeren Nutrient Broth besiyeri, şeker fermentasyon testlerinde Bazal besiyeri, Metil kırmızısı ve Voges Proskauer testi için Clark-Lubs besiyeri, üre hidrolizi için Crystensen Besiyeri ve nitrat kullanımı için Nitrat Broth besiyeri kullanılmıştır. α -Glukozidaz üreticisi *Bacillus* izolatlarını enzim üretimi için geliştirmek amacıyla MII sıvı besiyeri kullanılmıştır. Besiyeri içerikleri aşağıda sunulmuştur (Suzuki *et al.* 1976a, Claus and Berkeley 1986).

MI içeriği: %1 çözüner nişasta (Sigma S2004), % 0.5 Pepton, %0.3 Yeast extract, %0.3 Meat extract, %0.3 K_2HPO_4 , %0.1 KH_2PO_4 ve %3 oranında agar içeren katı besiyeri hazırlanmıştır. Besiyeri pH'ı 2 N NaOH ile 7.0'ye ayarlanmıştır Suzuki *et al.* 1976a, 1976b).

MII içeriği: %2 çözünür nişasta, % 2 Pepton, %0.2 Yeast extract, %0.5 Meat extract, %0.3 K₂HPO₄, %0.1 KH₂PO₄ içeren sıvı besiyeri hazırlanmıştır. Besiyeri pH'ı 2 N NaOH ile 7.0'ye ayarlanmıştır (Suzuki *et al.* 1976a,1976b).

Bazal Besiyeri: Diamonyum hidrojen fosfat 1 g, Potasyum klorür 0.2 g, Magnezyum sülfat 0.2 g, Yeast extract 0.2 g, 15ml %0.04'lük Bromkrezol moru (pH 7.0), (Claus and Berkeley 1986).

Clark-Lubs Besiyeri: Polipepton 7 g, Glukoz 5 g, K₂HPO₄ 5 g/lt (pH 6.9), (Claus and Berkeley 1986).

Crystensen Besiyeri: Pepton 1 g, NaCl 5 g, KH₂PO₄ 2 g, D-Glukoz 1 g, Üre 20 g, Fenol red 12 mg, Agar 15 g/200 ml (pH 6.8), (Claus and Berkeley 1986).

Nitrat Broth: Pepton 5 g, Beef extract 3 g, Potasyum nitrat 1 g/lt (pH 7), (Claus and Berkeley 1986).

3.1.4 Biyokimyasal ve morfolojik testlerde kullanılan kimyasallar

Amilaz aktivitesi için petrilere iyot solüsyonu (%2'lik potasyum iyodür (KI) içinde çözülmüş %0.2'lik iyot (I₂)) damlatılmıştır. Şeker fermentasyon testlerinde kullanılan şekerler (Sigma ve Merck) maltoz, D-fruktoz, laktoz, dekstroza, D-(+)-galaktoz, sakkaroz, D-(+)-ksiloz, D-(+)-mannoz, D-sorbitol, L-arabinoz, rafinoz, D-(-)-mannitoldür. Tuza toleranslarını belirlemek için NaCl kullanılmıştır. Yapılan biyokimyasal testlerde Sabouraud-2%Glukoz Agar (Merck 1.07315), Skim Milk tozu (Scharlau 06-019), Simmon's Sitrat Agar (Merck 1.02501), Triple Sugar Iron Agar (TSI, Merck 1.03915), lizozim (Sigma L7651), L-tirozin, jelatin (Merck 1.04070), metil kırmızısı, alfa naftol, potasyum nitrat, sülfanilik asit, ferrus amonyum sülfat ve çinko tozu (Merck 1.08789) kullanılmıştır. İzolatların geliştirilmesi için Shellab Shaker (Belco) marka inkübatör kullanılmıştır.

3.1.5 α -Glukozidaz aktivitesi için kullanılan kimyasallar ve aletler

p-nitrofenol'ün milimolar ekstinksiyon katsayısının belirlenmesi için *para*-nitrofenol (*p*NP, Merck 1.06798), α -glukozidaz aktivitesi ölçümü için substrat olarak *para*-nitrofenol- α -D-glukopiranozit (*p*NPG, Sigma N1377), reaksiyonu durdurmak amacı ile

de sodyum karbonat (Na_2CO_3 , Sigma S7795) kullanılmıştır. Tüm spektrofotometrik ölçümler, Unico marka UV visible 1.6 CE versiyon spektrofotometrede yapılmıştır. Enzim aktivitesi ölçümü için hazırlanan tamponlarda dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4 , Sigma P8281), potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4 , Sigma P5379), etilen diamin tetra asetik asit (EDTA, Sigma E5134), sodyum klorür (NaCl , Merck 1.06400), standart saf enzim olarak Sigma G3651 α -glukozidazı kullanılmıştır.

3.1.6 Poliakrilamid jel elektroforezde kullanılan kimyasallar ve aletler

Protein elektroforezi için sodyum dodezil sülfat (SDS), merkaptotanol, bromofenol mavisi, akrilamid-bisakrilamid monomerleri, trizma base, amonyum per sülfat (APS), tetra etil metilen diamin (TEMED), glisin, coomassie brilliant mavisi R250 (Sigma B0149), molekül ağırlık standardı (Sigma MW-SDS-200) ve gliserol, izopropil alkol, asetik asit, bütanol, hidroklorik asit (Merck) kimyasalları ile dikey elektroforez tankı ve güç kaynağı kullanılmıştır. Enzim örneklerin liyofilizasyonu için Edwards marka liyofilizatörden yararlanılmıştır. Native-Poliakrilamid Jel Elektroforezi'nden (PAGE) sonra yapılan aktivite boyamasında substrat olarak 4-metilumbelliferil α -D-glukopiranozit (4-MUG, Sigma M9766) kullanılmış ve enzim bantları Kodak Gel Logic 200 Imaging System cihazında 320 nm dalga boyunda görüntülenmiştir.

3.1.7 Optimum sıcaklık ve pH değerlerinin belirlenmesinde kullanılan kimyasallar

Sıcaklık aktivite ve stabilitesini test etmek amacı ile Clifton marka su banyosu kullanılmıştır. pH değerlerinin belirlenmesi için kullanılan tampon hazırlıklarında hidroklorik asit, sodyum hidroksit, trisodyum sitrat (Fluka 71497), HEPES (Sigma H7253), borik asit (H_3BO_3 , Sigma G4750), disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4 , Merck), sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4 , Merck) sodyum bikarbonat (NaHCO_3 , Sigma S6297) ve Ringer tableti (Merck 1.15525) kullanılmıştır.

3.1.8 Substrat spesifikliğinin belirlenmesinde kullanılan kimyasallar

Glukozidik bağ hidrolizi için; Fenil- α -D-glukozit (Glu- α -1-fenil), (Sigma P 6626), Metil- α -D-glukozit (Glu- α -1-metil), (Sigma M 9376),

Redükleyici olmayan terminal α -1,4 bağ hidrolizi için maltooligosakkaritlerden (n=2-6); Maltoz (Glu- α -1,4-Glu), (Sigma M 9171), Maltotrioz ((Glu- α -1,4)₃ n=3), (Sigma M 8378), Maltotetroz ((Glu- α -1,4)₃-Glu, n=4), (Sigma M 8253), Maltopentoz ((Glu- α -1,4)₄-Glu, n=5), (Sigma M 8128), Maltoheksoz ((Glu- α -1,4)₆, n=6), (10 mM), (Sigma M 9153),

Redükleyici olmayan terminal α -1,6 bağ hidrolizi için izomaltooligosakkaritlerden (n=2-3); İzomaltoz (Glu- α -1,6-Glu, n=2), (Sigma I 7253), İzomaltorioz ((Glu- α -1,6)₃, n=3), (Sigma I 0381), Panoz (Glu- α -1,6-Glu- α -1,4-Glu), (Sigma P 2407),

Glukoz oluşumu için ise; Turanoz (Glu- α -1,3-Fruc), (Sigma T 2754), Sakkaroz (Glu- α -1,2-Fruc), (Merck 1.07651), Kojibioz (α -D-Glu-(1,2)-D-Glu), (Sigma K 1382), Maltotiol (Glu- α -1,4-sorbitol), (Sigma M 8892), Trehaloz (Glu- α - α' -Glu), (Sigma T 9631), Laktoz (Gal- β -1,4-Glu), (Merck 1.076570), trisakkaritlerden; Raffinoz (Gal- α -1,6-Glu- α -1,2- β -Fruc), (Difco) ile polisakkaritlerden; Dekstrin ((C₆H₁₂O₆)_n), (Sigma D 4894), Amiloz ((Glu- α -1,4)_n), (Sigma A 0512) ve Çözünür nişasta ((C₆H₁₂O₆)_n), (Sigma S 2004) kullanılmıştır. Enzim aktivitesi sonucunda oluşan serbest glukoz miktarının enzimatik olarak kantitatif ölçümü için Glukoz-Oksidaz-Peroksidaz reaktifi (Sigma GAGO-20) kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Bakteri izolasyonu ve kültürlerin hazırlanması

Her bir su ve sediment örneği 5 ml'lik sıvı besiyerine 0.5 ml ve toprak örnekleri de yine 5 ml'lik sıvı besiyerine yaklaşık 0.1 g olacak şekilde doğrudan ilave edilerek 50 ve 65°C'de 200 rmp'de çalkalamalı olarak inkübe edilmiştir. 18-24 saatte bulanıklık

gösteren kültürlerin direkt, 1/2 ve 1/4 seyreltmeleri yapılmış ve agarlı katı besiyerine yayılarak 55°C’de 24 saat geliştirilmiştir. Morfolojik farklılıklar gösteren koloniler seçilerek aynı içerikli tüpte yatık besiyerine ekilmiş, saf kültürleri hazırlanarak saflık kontrolleri koloni morfolojisi ve faz kontrast mikroskopisi çalışmaları ile yapılmıştır. Tüm izolatlar 1/3 oranında steril gliserol bulunan ortama alınmış ve dondurularak -70 °C’de saklanmıştır (Claus and Berkeley 1986, Beldüz *et al.* 2003).

3.2.2 Koloni morfolojisi ve besiyerinde amilaz aktivitesinin belirlenmesi

İzolatların koloni morfolojileri 60°C’de 18 saat geliştirildikten sonra belirlenmiştir. Amilaz aktivitesi ise %1 çözünür nişasta içeren MI besiyerinde 60°C’de 24 saat geliştirilmiş kültürlerle lugol ayırıcı damlatılarak incelenmiştir. Bu işlem sonucunda koloni etrafında, nişasta parçalanması sonucu oluşan zonun büyüklüğüne göre izolatlardaki amilaz aktivitesi -, +, ++, +++, ve ++++ şeklinde değerlendirilmiş ve kolonisi etrafında 2 cm’den büyük zon oluşturan ($\geq$ ++) bakteriler yüksek amilolitik aktiviteye sahip izolatlar olarak belirlenmiştir (Claus and Berkeley 1986, Suzuki *et al.* 1976a).

3.2.3 Gram boyama ve faz kontrast mikroskopik inceleme

Nutrient Agar besiyerinde 60°C’de 18-24 saat geliştirilmiş kültürlerden hazırlanan preparatlar Gram boyama yapılarak immersiyon objektifi ile ışık mikroskopunda incelenmiştir. Hücre morfolojileri ve hareket yetenekleri, 15 saatlik sıvı kültürlerden hazırlanan preparatlar ile Olympus BX51 faz kontrast mikroskopunda incelenmiştir. Yine faz kontrast mikroskobu ile izolatların spor oluşturma özelliklerine göre spor pozisyonları ve şekilleri incelenmiştir. Spor oluşumu 60°C’de 18-24 saatlik inkübasyon süresi sonunda belirlenmiş olup spor oluşturan izolatlar; spor şekli (Oval, Elipsoidal, Yuvarlak), vejetatif hücredeki spor pozisyonu (Sentral, Subterminal, Terminal) ve şişkinlik oluşturup oluşturmaması açısından incelenmiştir (Suzuki *et al.* 1976a, Claus and Berkeley 1986, Nazina *et al.* 2001, Beldüz *et al.* 2003).

3.2.4 Biyokimyasal testlerin yapılışı

Biyokimyasal testler farklı *Bacillus* türü standart suşlar kullanılarak ve 3 paralelli olarak yapılmıştır. Şeker fermentasyon testlerinde karbohidrat solüsyonları besiyerine sterilizasyondan sonra %10 (w/v) oranında eklenmiştir. Mikroorganizmalar 60°C’ de 250 rpm’de çalkalamalı olarak 48-72 saat boyunca geliştirilmiştir. Besiyerin renginin mordan sarıya dönmesi, pozitif sonuç olarak alınmıştır. Ayrıca besiyerindeki Durham tüplerinde hava kabarcığının varlığına bağlı olarak glukozdan gaz oluşumuna bakılmıştır. Katalaz ativitesi, NA besiyerinde 60°C’de 18-24 h inkübe edildikten sonra lam üzerine süspanse edilen kültüre %3 H₂O₂ damlatılmasıyla belirlenmiş ve hava kabarcığı oluşturan izolatlar katalaz pozitif olarak yorumlanmıştır (Claus and Berkeley 1986).

Optimum sıcaklık testleri için Nutrient Broth (NB) besiyerinde 28, 37, 45, 65, 71 ve 75°C’ de 24-48 saatlik gelişimleri gözlenmiştir. 50°C ve üzerinde gelişebilen tüm izolatlar termofilik olarak kabul edilmiştir. pH’ı 6.8’e ayarlanmış NB besiyerinde ve pH 5.7’lik Sabouraud Dekstrose besiyerinde 48-72 saat inkübe edilen kültürlerin belirtilen besiyerlerinde üremeleri gözlenmiştir. Tuza toleranslarını belirlemek amacı ile NB besiyerine %1, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 ve 5 olacak şekilde NaCl eklenmiş ve. 60°C’de 24-48 saat sonundaki gelişimleri gözlenmiştir (Claus and Berkeley 1986).

İzolatların lizozime dirençlerini belirlemek amacı ile NB besiyerine 100 U/ml olacak şekilde lizozim eklenmiş ve 60°C’de 24-48 saat sonundaki üremeleri takip edilmiştir. Kazein hidrolizi, %5 oranında Skim Milk Powder içeren NA besiyerinde geliştirilmiş 48-72 saatlik kültürler kullanılarak belirlenmiştir. Jelatin hidrolizi, %0.4 jelatin içeren NA besiyerinde 3-4 gün geliştirilen kültürler üzerine Na₂SO₄ ile doyurulmuş 1 N H₂SO₄ dökülmek suretiyle belirlenmiştir. Üre hidrolizi, izolatların üre içeren Crystensen besiyerinde 48-72 saat inkübasyon süresi sonunda kırmızı-mor renk oluşumlarına bağlı olarak değerlendirilmiştir. Sitrat kullanımı, Simmon’s Sitrat Agar besiyerinde 48-72 saatlik inkübasyon süresi sonucunda prusya mavisi renk oluşumuna bağlı olarak sonuçlandırılmıştır. L-tirozin amino asitini kullanımı, NA besiyerine %0.45 L-tirozin eklenmiş besiyerlerinde izolatların 24-48 saat geliştirilmesi ile belirlenmiştir. H₂S

üretimi, izolatların TSI besiyerinde 48-72 saatlik inkübasyon süresi sonunda besiyerindeki siyahlaşmaya göre test edilmiştir (Claus and Berkeley 1986, Nazina *et al.* 2001).

Nitratın nitrite indirgenmesi ve gaz oluşumu, %0.1 oranında KNO₃ içeren ve Dürham tüpü bulunan Nitrat besiyerinde test edilmiştir. 48-72 saatlik kültürler %1'lik sülfanilik asit ve %0.6'lık α -naftilamin ayıraçları eklenmesi sonucu kırmızı renk oluşumuna bağlı olarak belirlenmiştir. Süre sonunda negatif kültürler çinko tozu eklenerek sonuçlar kontrol edilmiştir. İndol oluşumu, %1 trptofan içeren İndol besiyerinde geliştirilmiş 24-48 saatlik kültürler üzerine Kovac's ayırıcı eklenerek tayin edilmiştir. Besiyerinin üst kısmında kırmızı halka oluşumu, indol pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Metil Red ve Voges Proskauer testleri Clark-Lubs sıvı besiyerinde 48-72 saat geliştirilen kültürler ile yapılmıştır. Her iki testin ayıraçları sıvı kültür üzerine damlatılarak kırmızı renk oluşumu gözlenmiştir (Claus and Berkeley 1986, Nazina *et al.* 2001).

3.2.5 İzolatların enzim üretim koşulları

Enzim üretimi için saflıkları önceden kontrol edilen mikroorganizmalar öncelikle MI katı besiyerinde 24 h 60°C'de geliştirilmiştir. MI besiyerinden alınan bakteriler steril %0.85 NaCl varlığında absorbansları 660 nm'de 0.16-0.3 olacak şekilde süspanse edilmiştir. Bu süspansiyondan 500 μ l alınarak 5 ml'lik 3 ayrı MII sıvı besiyerine inoküle edilmiştir. Kültürler 15 h, 60°C'de 250 rpm'de çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. Ancak optimum gelişme koşulları daha düşük olan D273a, D311 ve E287 kodlu izolatların tüm üretim koşulları 50°C'de gerçekleştirilmiştir. Her bir izolatın enzim üretim miktarı, aşılana bu üç farklı tüpteki enzim üretiminden elde edilen sonuca göre 3 paralelli olarak çalışılmıştır (Suzuki *et al.* 1976a, 1987a).

15 saat sonunda bakteri kültürleri +4°C'de 6000 rpm'de 15 dak. santrifüj edilmiştir. Bundan sonraki aşamada, üst sıvı hücre dışı, pelet ise hücre içi enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Her mikroorganizmaya ait hücre içi ve hücre dışı enzim aktivitesi ölçülüp toplam enzim aktivitesi belirlenmiştir.

3.2.6 Hücre dışı enzim eldesi

Kültürün santrifüj işleminden sonra elde edilen üst sıvısının hacmi ve pH'ı ölçüldükten sonra bir erlene alınmıştır. Bakteri peleti steril 5 ml % 0.85 NaCl ile iki kere yıkanmıştır. Yıkama suları da üst sıvı üzerine ilave edilmiştir. Böylece toplam hacim 1/3 dilüsyon yapılarak 15 ml'ye tamamlanmıştır. Bu sıvı hücre dışı enzim olarak kullanılmıştır (Suzuki 1976a, 1976b).

3.2.7 Hücre içi enzim eldesi

Kültür peleti 1 ml %0.85 NaCl ile süspense edilerek daha önceden darası alınmış mikrofüj tüplerine transfer edilmiştir. +4°C'de 6000 rpm'de 15 dak. santrifüj edilmiştir. Üst sıvı dökülmüş ve peletin fazla suyu alınarak yaş ağırlığı ölçülmüştür. Hücre içi enzim kaynağı olan pelet, enzim aktivitesi bakılana kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir. Hücre içi enzimi ortaya çıkarmak için donmuş pelet 1 ml 50 mM Potasyum fosfat, 5 mM EDTA (pH 7.0) tamponunda ve buz üzerinde süspanse edilmiştir. Böylece pelet ağırlığının %20'si kadar tamponda çözülerek sonikasyon işlemine hazırlanmıştır. Sonikasyon (Vibracell Sonics sonikatör) işleminin etkinliği ve süresi, enzim aktivitesinin yüksek olduğu ve hücre parçalanmasının fazla olduğu zaman aralığı test edilerek belirlenmiştir. Buna göre sonikasyon işlemi, 30 amplitude'da 20 saniye sonikasyon, 20 saniye buzda bekleme işleminin iki kere tekrarlanması ile yapılmıştır. Sonikasyon süresi sonunda hücre parçalanması faz kontrast mikroskobu ile gözlenmiştir. Daha sonra sonikasyon sıvısı +4°C'de 6000 rpm'de 15 dak. santrifüj edilmiştir. 1 ml üst sıvı bir tüpe alınmış ve pH'ı ölçülmüştür. Parçalanmış hücre kalıntısı 1 ml 50 mM Potasyum fosfat, 5 mM EDTA (pH 7.0) tamponu ile iki kere yıkanmıştır. Yıkama suları da üst sıvı üzerine ilave edilmiştir. Böylece toplam hacim 1/3 seyreltilerek 3 ml'ye tamamlanmıştır. Bu sıvı hücre içi enzim olarak kullanılmıştır (Suzuki *et al.* 1976a, Thirunavukkarasu and Priest 1984, Kelly *et al.* 1986).

3.2.8 *p*-Nitrofenolün ekstinksiyon katsayısının hesaplanması

Enzim aktivitesinin hesaplanmasında kullanılan *p*-nitrofenol'ün milimolar ekstinksiyon katsayısının belirlenmesi için 50 mM/lit stok *p*NP dH₂O'da çözülmüştür. Bu ana stoktan, 33.3 mM potasyum fosfat tamponu (pH 6.8) kullanılarak 0.2, 0.1, 0.075, 0.05, 0.025 ve 0.0125 mM olacak şekilde seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan dilüsyonlardan 1 ml alınmış ve üzerine 1 ml 1 M Na₂CO₃ eklenerek 35 ile 95°C arasındaki farklı sıcaklıklarda 15 dakika su banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra her bir dilüsyonun 400 nm'deki optik dansitesi spektrofotometrede okutulmuştur. Böylece ekstinksiyon katsayısı, okutulan absorbansa karşı mM *p*NP konsantrasyon eğrisinin eğiminden hesaplanmıştır. Eğrinin eğimi yani *p*NP'ün pH 6.8'deki hesaplanan millimolar ekstinksiyon katsayısı, farklı sıcaklıklara göre L/mM.cm cinsinden belirlenmiştir (Suzuki *et al.* 1976b, Kelly *et al.* 1983).

3.2.9 Enzim aktivitesinin belirlenmesi

İzolatların ve standart suşların α -glukozidaz üretim kapasiteleri, *p*NPG substratını hidroliz edebilme yetenekleri açısından spektrofotometrik olarak incelenmiştir. α -Glukozidaz aktivitesi için gerekli 4 ml'lik reaksiyon karışımı; 33.3 mM potasyum fosfat tamponu (pH 6.8-7.0), substrat olarak 2 mM *p*NPG ve uygun şekilde seyreltilmiş 500 μ l enzim solüsyonu içermektedir. Enzim ilavesi sonucunda 60°C'de 10 dakika inkübe edilen karışımdaki reaksiyon 1 M Na₂CO₃ eklenerek durdurulmuştur. 400 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak *p*-nitrofenol salınımı gözlenmiştir. (Suzuki *et al.* 1976a, 1984b, 1987a, Takii *et al.* 1996, Malá ve Králová 2000).

3.2.10 Enzim ünitesinin tanımı

Bir ünite (U/ml) α -glukozidaz, dakikada 1 μ mol *p*-nitrofenolün 400 nm’de, 37°C’de veya 60°C’de pH 6.8’de oluşumu için gerekli enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Aktivite hesabı aşağıdaki formüle göre yapılmıştır:

$$\text{Ünite/ml enzim} = \frac{\Delta OD \times V_f \times df}{\epsilon_{400nm} \times t \times b \times V_e}$$

OD = Optik yoğunluk

ΔOD = OD_{400nm} Örnek- OD_{400nm} Kör

V_f = Tüpte hazırlanan toplam hacim (4 ml)

Df = Dilüsyon faktörü

ϵ_{400nm} = *p*-nitrofenolün 400 nm’deki milimolar ekstinksiyon katsayısı (pH 6.8)*

t = Reaksiyon zamanı (10 dakika)

b = Küvetin ışık geçiş yolu (1 cm)

V_e = Küvette okutulan reaksiyon karışımındaki enzim hacmi (0.5 ml)

* : Ekstinsiyon katsayısı, enzim aktivitesinde uygulanan sıcaklığa göre L/mM.cm cinsinden hesaplanmıştır (Halvorson 1966).

3.2.11 α -Glukozidaz miktarlarının izolatlara göre dizini

Amilolitik aktivite gösteren 67 adet izolat ve 4 adet standart suşun hücre içi ve hücre dışı enzim üretim miktarları “Enzim Ünitesi Tanımı” kısmında verilen formüle göre U/ml cinsinden hesaplanmıştır. Bakterinin ürettiği toplam enzim aktivitesi, hücre içi ve hücre dışı enzim aktivitesi sonuçlarının toplanması ile elde edilmiştir. Yaş ağırlığa göre enzim üretim miktarı (enzim aktivitesi/yaş ağırlık, U/ml/g) ise hücre içi ve hücre dışı enzim ünite değerinin peletin yaş ağırlığına bölünmesiyle belirlenmiştir (Suzuki *et al.* 1976a, 1976b).

İzolatların α -glukozidaz üretim değerlerini birbirleri ile kıyaslamak amacıyla toplam enzim aktivitesi/yaş ağırlık miktarı (U/ml/g) kullanılmış ve istatistik analizine

gidilmiştir. Bunun için 3 farklı tüpte tekrarlanan toplam enzim aktivitesi/yaş ağırlık miktarının aritmetik ortalaması $((n1+n2+n3)/3)$, standart sapması ($Stdev(n1:n3)$) ve standart hatası ($Stdev/sqrt(2)$) hücre dışı, hücre içi ve toplam olmak üzere Excel programında hesaplanarak t-test ($e1:e3,i1:i3;2;2$) istatistik analizi uygulanmıştır. Her bakteri için hücre içi ve hücre dışı aktiviteleri kendi içerisinde karşılaştırarak aralarındaki t-test değeri belirlenmiştir. Analiz sonucunda izolatlardaki pelet yaş ağırlığına bağlı enzim üretim değerleri sıralanmış ve bu tabloya ait grafikler standart sapma ve standart hata göz önüne alınarak çizilmiştir. t-test değerinin yüksek olması ($<10^{-5}$), hücre içi ve hücre dışı aktivite/yaş ağırlık değerleri arasındaki farkın da belirgin olarak yüksek olduğunu göstermektedir (Suzuki *et al.* 1976a).

3.2.12 İzolatların ve *G. stearothermophilus* ATCC 12980 suşunun 48 saatlik zamana bağlı α -glukozidaz üretiminin belirlenmesi

Bacillus sp. A333, A343, E134, F84a ve F84b izolatları ile *G. stearothermophilus* ATCC 12980 suşuna ait kültürlerden 48 saatlik süreyle 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 32, 40 ve 48. saatlerde alınan numuneler çalışılmıştır. Böylece 48 saat süresince; bakteri üreme eğrisi, sporulasyon zamanı, hücre içi ve dışı enzim aktivitesi ve besiyeri pH'ındaki değişim gözlenmiştir. Bu amaçla izolatlar önce 24 h 60°C'de geliştirilmiştir. Sıfırinci saatte 30 ml MII'ye petrideki tüm kültür süspanse edilmiş ve bu kültürün 15 ml'si 150 ml MII'ye aşılanmıştır. Kültür 48 h boyunca 60°C'de 250 rpm'de inkübe edilmiştir.

Her bir izolata ait kültürden 10 farklı zaman aralığında 3 adet 5'er ml'lik numuneler alınmıştır. Bu numunelerin 660 nm'deki bakteri absorbanı ve besiyeri pH'ı ölçülmüştür. Alınan kültür +4°C'de 6000 rpm'de 15 dak. santrifüj edilmiştir. Üst sıvı hücre dışı enzim kaynağı, pelet ise hücre içi enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Hücre içi ve dışı enzim eldesi daha önce bahsedildiği gibi yapılmıştır. Örneklerden 10 değişik zaman aralığında alınan numuneler ile enzim aktivitesi 3 paralelli çalışılmıştır (Suzuki *et al.* 1976a).

3.2.13 Kısmi enzim saflaştırması

Kısmi saflaştırma sonrasında yapılacak enzim karakterizasyonu için konsantre enzim elde etmek amacı ile amonyum sülfat çöktürmesi ((NH₄)₂SO₄, Merck 1.01217.5004) ve selüloz asetat diyaliz torbası (Sigma D0530) ile diyaliz işlemleri uygulanmıştır. Protein miktar tayini için Bradford Reaktifi (Sigma B6916), protein standardı olarak da Bovine Serum Albumin (Sigma A2153) kullanılmıştır. Tüm saflaştırma basamakları ve santrifüj işlemleri +4°C’de gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma denemelerinde gözönüne alınan kriterler şunlardır:

- 1- İzolatın en yüksek enzim üretim zamanı,
- 2- Sıcaklığın enzim aktivitesine etkisi,
- 3-Enzim kaynağında tuzla çöktürme sonrasında aktivitenin en yüksek fakat protein miktarının en düşük olduğu amonyum sülfat konsantrasyonu,
- 4-Her basamaktaki sıvı hacminin ölçülmesi,
- 5-Enzimin hangi fraksiyonda kaldığını belirlemek amacıyla her saflaştırma basamağından numune alınarak protein konsantrasyonunun ve α -glukozidaz aktivitesinin test edilmesi,
- 5-Çöktürme ve santrifüj işlemlerinin süresi ve
- 6-Diyaliz süresi

3.2.13.1 *Bacillus* sp. A333 izolatından α -glukozidazın saflaştırılması

Yukarıdaki kriterler göz önüne alınarak hücre dışı α -glukozidaz üreten *Bacillus* sp. A333 izolatı önce MI katı besiyerinde 18 h inkübe edildikten sonra MII sıvı besiyerine alınarak 6 saat 60°C’de 250 rpm’de üretilmiştir. Ön aktifleştirme işlemlerinden sonra MII besiyerinde, toplam 1 lt’lik hacimde, yine 60°C’de ve 250 rpm’de çalkalanarak 16 saat geliştirilmiştir. Besiyeri üst sıvısı 6000 rpm’de 15 dak. santrifüj sonrası alınarak 60°C’lik su banyosunda 30 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda tekrar 6000 rpm’de 15 dak. santrifüj yapılmıştır. Üst sıvı alınarak enzimin en iyi saflaştığı %35-60 oranında amonyum sülfat kullanılarak çöktürülmüştür. Çöktürme işlemleri sonunda enzim kaynağı 7500 rpm’de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Her aşamada pelet soğuk 50 mM potasyum

fosfat-5 mM EDTA tamponu (pH 7.0) ile çözülmüştür. Son aşamada elde edilen 136.5 ml'lik enzim fraksiyonu diyaliz torbalarına (Selüloz asetat diyaliz hortumu, Sigma D 0530) alınarak dH₂O'ya karşı bir gece diyaliz edilmiştir. Diyaliz sonunda besiyerindeki nişastayı uzaklaştırmak için tekrar 6000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapılarak üst sıvı bundan sonraki tüm deneylerde enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Enzim sıvısı 2'şer ml'lik hacimlere bölünerek -20°C'de saklanmıştır (Suzuki *et al.* 1976b, Erarslan ve ark. 2005).

3.2.13.2 *Bacillus* sp. A343 izolatından α -glukozidazın saflaştırılması

Hücre içi α -glukozidaz üreten *Bacillus* sp. A343 izolatı ön aktifleştirmeye işlemlerinden sonra MII besiyerinde, toplam 1 lt'lik hacimde, 60°C'de ve 250 rpm'de çalkalanarak 4 saat geliştirilmiştir. 4.723 g bakteri peleti 6000 rpm'de 15 dak. santrifüj sonrası alınarak 3 kere %0.85 NaCl ile yıkanmış ve -20°C'ye koyulmuştur. Bakteri peleti, hacminin %20'si olan 23.615 ml 50 mM potasyum fosfat-5 mM EDTA tamponu (pH 7.0) ile çözülerek 130 sn 30 amplitude'de, 5 cycle'da buz üzerinde sonike edilmiştir. Sonikasyon sonrası 6000 rpm'de 15 dakika santrifüj uygulanmıştır. Üst sıvı bundan sonraki işlemlerde enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Sonikasyon sıvısı 60°C'lik su banyosunda 30 dakika bekletilmiştir. 6000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek üst sıvı enzimin en iyi çöktüğü %75 amonyum sülfat fraksiyonunda çöktürülmüştür. Son aşamada elde edilen 15.5 ml'lik enzim fraksiyonu diyaliz torbalarına alınarak dH₂O'ya karşı bir gece diyaliz edilmiştir. Enzim 250'şer μ l'lik hacimlere bölünerek -20°C'de saklanmıştır (Suzuki *et al.* 1976b, Suzuki *et al.* 1987a, Erarslan ve ark. 2005).

3.2.14 Kısmen saflaştırılan α -glukozidazların elektroforetik davranışlarının belirlenmesi

Protein elektroforezi 2 amaç için yapılmıştır:

1-Amonyum sülfat ile kısmen saflaştırılan enzimlerin elektroforetik mobilitelerini saptamak için N-PAGE uygulanmış ve jele aktivite boyaması yapılmıştır.

2-Preparatif N-PAGE yapılarak aktivite gösteren enzim bantları jelden kesilerek ekstrakte edilmiştir. Ekstrakte edilen enzim bantları tekrar SDS-PAGE'e uygulanarak moleköl ağırlıkları belirlenmiştir.

3.2.15 Sodyum dodezil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezin (SDS-PAGE) yapılışı

Laemmli (1970)'e göre yapılan SDS-PAGE'de %4'lük yığma jeli ve %10'luk ayırma jeli kullanılmış, örnekler yüklendikten sonra sırası ile 25 ve 30 mA'de elektroforez işlemi yapılmış, jel bir gece Coomassie Brilliant mavisinde boyandıktan sonra dekolorize edilmiş ve fotoğrafı çekilmiştir. Protein ekstraksiyonu için; -20°C'de saklanmış 75 µl enzim örneği üzerine 25 µl 4X konsantre SDS-örnek tamponundan eklenerek, 3 dakika kaynar su banyosunda tutulmuştur. Ekstraktlardaki protein miktarının yarı kantitatif tayini için spot test yapılmıştır (Esen 1978).

3.2.16 Native-poliakrilamid jel elektroforezin (N-PAGE) yapılışı

Laemmli (1970)'e göre yapılan N-PAGE'de %4'lük yığma jeli ve %10'luk ayırma jeli kullanılmış, örnekler yüklendikten sonra sırası ile 25 ve 30 mA'de, +4°C'de elektroforez işlemi yapılmıştır. Jel pH'ını dengelemek amacı ile 50 mM potasyum fosfat-5 mM EDTA tamponunda (pH 7.0) 2 kere 1'er saat oda ısısında çalkalanarak bekletilmiştir. Aktivite boyaması jelin 1 mM 4-MUG substratını içeren 133 mM potasyum fosfat tamponunda 60°C'de 50 rpm'de 15-20 dakika inkübe edilmesiyle yapılmış ve 320 nm UV ışığı altında görüntülenmiştir (Gabriel and Gersten 1992, Berthelot and Delmotte 1999, Nashiru *et al.* 2001). Protein ekstraksiyonu için; -20°C'de saklanmış 1 ml enzim örneği liyofilize edilmiş ve daha sonra toz haline gelen konsantre enzim örneği 75 µl 50 mM potasyum fosfat-5 mM EDTA (pH 7.0) tamponunda çözölmüştür. 25 µl 4X konsantre Native-örnek tamponundan eklenmiştir. Ekstraktlardaki protein miktarının yarı kantitatif tayini için spot test yapılmıştır (Esen 1978, Wimmer *et al.* 1997). Karşılaştırma amacıyla standart α -glukozidaz (Sigma G 3651) ile 15 saatlik kültürleri liyofilize edilen *G. thermoglucosidasius* DSM 2542 hücre içi oligo 1-6 glukozidazı, *G. stearothermophilus* ATCC 7953 hücre içi α -glukozidazı ve *G. stearothermophilus* ATCC 12980 hücre içi α -glukozidazı da aynı jelde örneklenmiştir.

3.2.17 Enzimlerin molekül ağırlıklarının belirlenmesi

%4'lük yığma jeli ve %10'luk ayırma jeli kullanılarak preparatif N-PAGE yapılmıştır. Aktivite boyaması sonrası jelde aktivite gösteren enzim bantları yaklaşık 1 mm eninde kesilerek bir ependorfta iyice ezilmiştir. Difüzyonla ekstraksiyon amacı ile 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, %0.1 SDS (pH 7.5) tamponundan 250 µl eklenmiştir. 30°C'de 250 rpm'de çalkalanarak bir gece beklenmiş ve sonra santrifüj edilerek üst sıvı liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon sonrası 25 µl 4X konsantre SDS-örnek tamponundan eklenerek denature edilmiş ve SDS-PAGE yapılmıştır (Kwon *et al.* 1994). Molekül ağırlığı saptanacak enzim bantlarının R_f (oransal hız) değerleri, standart proteinlerin R_f değerleri kullanılarak Excel programında çizilen yarı logaritmik grafiğin kalibrasyon eğrisi aracılığı ile hesaplanmıştır.

3.2.18 Enzimlerin farklı sıcaklık ve pH'daki aktivite ve stabilitelerinin belirlenmesi

Enzimlerin farklı sıcaklıklardaki aktivitesinin belirlenmesi amacı ile 35-95°C arasında sıcaklık parametresi 5'er derece değiştirilerek, pNPG substratı ve 133 mM potasyum fosfat tamponu (pH 6.8) ile aktivite tayini yapılmıştır. Bu sıcaklık aralıklarında enzimin stabilizasyonu için ise 10 dakika boyunca test edilecek sıcaklıkta bekletilen enzimler hemen buz üzerine alınmıştır. Daha sonra 60°C ve pH 6.8'de aktivite tayini yapılmıştır (Suzuki *et al.* 1982, Suzuki and Tomura 1986a).

Farklı pH değerlerindeki enzim aktivitesini saptamak amacı ile pH 3 ile 11 aralıklarındaki farklı tamponlarda 60°C'de enzim aktivitesi test edilmiştir. Kullanılan tamponlar; 0.02 M sodyum-sitrat tamponu (pH 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5), 1M HEPES tamponu (pH 6, 6.5), 0.1 M borat tamponu (pH 8.5), 0.1 M sodyum fosfat tamponu (pH 7, 7.5, 8), 0.1 M sodyum karbonat-bikarbonat tamponu (pH 9, 9.5) ve Ringer tamponu (pH 10, 11)'dur. Enzimin farklı pH'larda stabilizasyonunu belirlemek için ise enzim bire bir oranında test edilecek tamponla karıştırılarak 35°C'de 15 saat muamele edilmiştir. Süre sonunda ortam pH'ını nötralize etmek için, ortam 66.7 mM potasyum fosfat tamponu (pH 6.8) ile 5 kat seyreltilmiştir. Daha sonra 60°C ve pH 6.8'de aktivite tayini yapılmıştır (Suzuki and Tomura 1986a, Suzuki *et al.* 1982).

Sıcaklığa veya pH değişikliğine tâbi tutulmamış enzim örneğinin aktivitesi %100 olarak alınmış ve diğer sonuçlar ona göre bağıl aktivite (%) cinsinden birbiriyle kıyaslanmıştır.

3.2.19 Enzim kinetiği çalışmaları

Enzim kinetiği çalışmasında önce *p*NPG substratının 7 farklı konsantrasyondaki (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 ve 5 mM) çözeltileri kullanılarak substrata doygunluk dereceleri belirlenmiş ve kinetik analizlerde bu konsantrasyonlar kullanılmıştır. Çalışmalarda kullanılan *Bacillus* sp. A333 ve A343 α -glukozidaz enzimlerinin spesifik aktiviteleri 0.02 ve 0.0113 U/mg olacak şekilde seyreltilerek denenmiştir. Kıyaslama amacı ile aynı koşullarda standart α -glukozidaz enziminin de (Sigma G 3651) kinetik çalışması yapılmıştır.

Enzimlerin maksimum hızı (V_{max}) ve Michaelis-Menten sabitinin (K_m) belirlenmesi için kinetik çalışmalarda belirtilen konsantrasyondaki *p*NPG çözeltileri (60°C, pH 6.8) kullanılmıştır. Her konsantrasyon için enzimin ilk hızı ilk 10 dakika süresince izlenmiş ve her 15 saniyede bir spektrofotometrik olarak absorbansları kaydedilmiştir. Daha sonra absorbans-zaman grafiğinin eğiminden ilk hızları ($\Delta OD/dak$) hesaplanmıştır. Bu ilk hız değerleri Lineweaver-Burk grafiğinde ($1/V$ 'ye karşı $1/[S]$) yerine konularak buradan K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır (Lineweaver and Burk 1934).

3.2.20 Substrat spesifikliğinin belirlenmesi

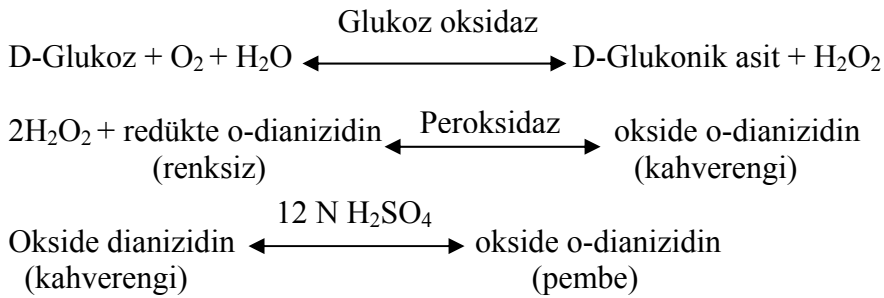
Substrat spesifikliğinin dolayısı ile enzimin etki ettiği glukozidik bağ tipinin belirlenmesi amacı ile 20 farklı substrat kullanılmıştır. Buna göre; dekstrin, amiloz ve çözünür nişastanın %1'lik, test edilen diğer tüm substratların ise 10 mM'lık konsantrasyonları kullanılmıştır.

3.2.20.1 Enzim aktivitesinin farklı substratlar kullanılarak yapılması

Değişik substratlar kullanılarak yapılan α -glukozidaz aktivitesinde, pNPG substratı ile yapılandır farklı olarak reaksiyon karışımı; 2 birim 66.7 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0), 1 birim 10 mM yada %1'lik substrat ve 1 birim enzim solüsyonu içermektedir. Deneylerde kullanılan *Bacillus* sp. A333 ve A343 α -glukozidaz enzimlerinin spesifik aktiviteleri 0.02 ve 0.0113 U/mg olacak şekilde seyreltilerek kullanılmıştır. Enzim ilavesi sonucunda 60°C'de 10 dakika inkübe edilen karışımdaki reaksiyon kaynar suda 3 dakika tutularak durdurulmuştur (Suzuki *et al.* 1979, Suzuki *et al.* 1992).

3.2.20.2 Enzim aktivitesi sonucu oluşan glukoz miktarının ölçülmesi

Enzimlerin substrata spesifikliğı ne kadar yüksek ise α -glukozidazın substratı hidrolizi sonucu oluşacak glukoz miktarı da o kadar yüksek olacaktır. Bu nedenle enzim aktivitesi sonucunda oluşan serbest glukoz miktarının enzimatik olarak kantitatif ölçümü için Glukoz-Oksidaz-Peroksidaz reaktifi kullanılmıştır. Kitin çalışma prensibi aşağıdaki şekilde özetlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış D-glukozdan standart olarak yararlanılmıştır (Bergmeyer and Bernt 1974, Suzuki *et al.* 1979).



Enzim aktivitesi sonucu oluşan glukoz miktarı ile pembe renk oluşumu arasında doğru orantı vardır ve pembe rengin absorbansı yani oluşan glukoz miktarı 540 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Sonuç μg glukoz /ml olarak hesaplanmıştır.

3.2.21 İnce Tabaka Kromatografisinin yapılışı

Hazırlanan örnekler aliminyum silica jel (Merck 1.05553.0016, 20 X 20 cm) üzerine 15'er µl yüklenmiştir. Çözücü olarak asetik asit/kloroform/dH₂O (35:30:5 v/v) kullanılmıştır. 4 saat sonunda plakalar kurutulup fenol/sülfirik asit reaktifi (fenol; 3g, H₂SO₄; 5 ml, etanol; 95 ml) spreylenecek boyanmıştır. Plakalar 110°C'de 10 dakika ısıtılmıştır. Şekerler kahverengi benekler olarak görülmüştür. Şeker standardı; glukoz (G), maltoz (G2), izomaltoz (IG2), maltotrioz (G3), maltotetroz (G4), maltopentoz (G5) ve maltoheksozun (G6) %0.1'lik konsantrasyonlarda karıştırılması ile oluşturulmuştur (Suzuki *et al.* 1984, Thirunavukkarasu ve Priest 1984).

3.2.21.1 Farklı substratların hidrolizi sonucu açığa çıkan ürünlerin İnce Tabaka Kromatografisi ile belirlenmesi

Bundan önceki aşamada yapılan substrat spesifikliği testlerinde enzimin yüksek aktivite gösterdiği substratlar belirlenmiştir. α-Glukozidazın hem 10 dakikalık reaksiyon süresinde çeşitli substratlar üzerinde oluşturduğu etki şekli hem de 2 saatlik reaksiyon süresi boyunca maltooligosakkaritlerden glukoz oluşumunu incelemek amacı ile İnce Tabaka Kromatografisi yapılmıştır.

3.2.21.2 İnce Tabaka Kromatografisinde kullanılacak enzim yıkım ürünlerinin hazırlanması

TLC'de kullanılan *Bacillus* sp. A333 ve A343 α-glukozidaz enzimlerinin spesifik aktiviteleri 0.02 ve 0.0113 U/mg olacak şekilde hazırlanmıştır. α-Glukozidazın 10 dakikalık reaksiyon süresinde substratlar üzerinde oluşturduğu etki şeklini gözlemek amacıyla 10 mM konsantrasyondaki maltooligosakkaritler (n=2-6), izomaltoz, fenil ve metil-α-D-Glukozit substratları kullanılmıştır. Enzim ile substratlar 10 dakika boyunca 60°C'de pH 6.8'de reaksiyona sokulduktan sonra enzim aktivitesi kaynar suda 3 dakika tutularak durdurulmuştur.

2 saatlik reaksiyon süresi boyunca maltooligosakkaritlerden glukoz oluşumunu incelemek amacı ile maltooligosakkaritler (n=2-6) 10 mM oranında reaksiyona sokulmuştur. Her maltooligosakkarite ait enzimatik reaksiyon 2 saat süreyle 60°C'de pH 6.8'de sürdürülmüştür. Reaksiyonun, her seferinde 0. dak, 10. dak, 30. dak, 1.h ve 2. saatlik zaman dilimlerinden örnek alınarak yine enzim aktivitesi kaynar suda 3 dakika tutularak durdurulmuştur (Suzuki *et al.* 1979, Suzuki *et al.* 1984b, Thirunavukkarasu and Priest 1984).

3.2.22 İnhibitörlerin ve metal iyonlarının α -glukozidaz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

Çeşitli inhibitörlerin ve metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi kullanılan inhibitöre bağlı olarak üç farklı yolla incelenmiştir.

3.2.22.1 Üre, SDS ve etanolün α -glukozidaz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

Bu çalışmada kullanılan inhibitörlerden ürenin (Sigma U0631) konsantrasyonu 2, 4, 6, 8 M'a, SDS'in (Sigma L3771) konsantrasyonu %0.004, %0.008, %0.01, %0.2, %0.5'e ve etanolün (Riedel-de Haën 32221) konsantrasyonu ise %10, %20, %30 ve %40'a 150 mM potasyum fosfat-5mM EDTA tamponu (pH7.0) ile ayarlanmıştır. Enzimler her bir inhibitor konsantrasyonu ile bire bir oranda karıştırılarak 25 ve 60°C'de 5'er saat bekletilmiştir. Süre sonunda buzda soğutulup 1/5 oranında 33.3 mM potasyum fosfat (pH 6.8) tamponu ile seyreltilmiş ve enzim aktivitesi tayini yapılmıştır. İnhibitörsüz ortamda 25 ve 60°C'de 5'er saat tutulan enzimlerin aktivitesi %100 olarak alınarak tüm sonuçlar bağıl aktivite (%) cinsinden hesaplanmıştır (Suzuki *et al.* 1976b, Suzuki *et al.* 1984b, Suzuki *et al.* 1987a).

3.2.22.2 *p*-CMB, EDTA ve metal iyonlarının α -glukozidaz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

Bu gruptaki inhibitörlerden EDTA 2 mM ve bir sülfidril reaktifi olan *para*-kloromerküribenzoat (*p*-CMB, Sigma C5913) ise 50 μ M oranında kullanılmıştır. Metal iyonlarından CuCl₂ (Merck 2733), HgSO₄ (Fischer Scientific), CaCl₂ (Merck 2380), FeSO₄ (Merck 1.03965), MgSO₄ (Merck 1.05882), BaCl₂ (Merck), ZnSO₄ (Scharlau C10206) ve MnSO₄ (Scharlau MA0130) 2 mM olacak şekilde 150 mM potasyum fosfat-5mM EDTA tamponu (pH 7.0) ile çözülmüştür. Enzimler bire bir oranında inhibitor çözeltileri ile karıştırıldıktan sonra 20 dak. 60°C'de bekletilmiştir. Süre sonunda buzda soğutulup 1/5 oranında 33.3 mM potasyum fosfat (pH 6.8) tamponu ile seyreltilmiş ve enzim aktivitesi tayini yapılmıştır. İnhibitörsüz ortamda 60°C'de 20 dakika tutulan enzimlerin aktivitesi %100 olarak alınarak sonuçların hepsi bağıl aktivite (%) cinsinden hesaplanmıştır (Suzuki *et al.* 1976b, Suzuki *et al.* 1984b, Suzuki and Oishi 1989).

3.2.22.3 Glukono- γ -lakton, redükte L-glutatyon, tris, histidin ve glukozun α -glukozidaz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

Bu gruptaki inhibitörlerden Glukono- γ -lakton (Sigma G 4750), Redükte L-glutatyon (Sigma G 4251) ve D-Glukoz (Merck 1.08342) 10 mM, Tris (Sigma T6066) ve Histidin (Sigma H3751) ise 5'er mM olacak şekilde enzimatik aktivitede tampon olarak kullanılacak 133 mM potasyum fosfat (pH 7.0) içerisinde çözülmüştür. İnhibitörlü bu tamponlar ile enzim aktivitesine bakılmıştır. İnhibitör ile muamele edilmemiş enzimlerin aktivitesi %100 olarak alınmış ve buna göre diğer sonuçlar bağıl aktivite (%) cinsinden hesaplanmıştır (Suzuki *et al.* 1976b, Suzuki *et al.* 1984b, Suzuki and Oishi 1989).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Termofilik *Bacillus* spp. izolatları

Tez kapsamında 6 ildeki jeotermal alanlara ait 191 toprak, su ve sediment numunesinden 134'ünde bakteriyel üreme gözlenerek izolasyon yapılmıştır. Arazi çalışmalarında örnek alınan bazı sıcak su kaynaklarının fotoğrafları şekil 4.1-4.4'de görülmektedir.



Şekil 4.1 Nevşehir ili (E) Kozaklı ilçesi Altınsu mevkiinde bulunan E10 kodlu sıcak su kaynağı (96°C)



Şekil 4.2 Nevşehir ili (E) Kozaklı ilçesi Belediye Kaplıcası'nda bulunan E4 kodlu ana sıcak su kaynağı (98°C)



Şekil 4.3 İzmir ili (D) Kocaoba mevkiinde bulunan D21 kodlu sıcak su kaynağı (60°C)



Şekil 4.4 İzmir ili (D) Doğanbey mevkiinde bulunan D30 kodlu sıcak su kaynağı (65°C)

Tüm izolatların koloni morfolojileri, Gram reaksiyonları, hücre morfolojileri, hareket yetenekleri, sıcaklık istekleri, spor oluşturma yetenekleri, katalaz ve amilaz aktiviteleri incelenmiştir. Test edilen izolatların tümü Gram (+), hareket edebilen, katalaz (+) ve spor oluşturabilen çubuk yapısındadır. İzolatlar *Bacillus* cinsinin temel karakterlerini gösterdiklerinden, *Bacillus* türleri olarak tanımlanmıştır (Claus and Berkeley 1984, Nazina *et al.* 2001, Ezeji *et al.* 2005, Nicolaus *et al.* 2004). İzolasyon çalışması sonucunda farklılık gözlenen ve saflaştırılan 516 adet izolat arasından 65'i mezofilik, 451'i de termofilik özellik göstermiştir. D273a, D311 ve E287 kodlu izolatların 50-55°C'de, diğer tüm termofilik izolatların ise 60-70°C'de üreyebildikleri saptanmıştır. İzolatların genel özellikleri ile ilgili sayısal sonuçlar çizelge 4.1'de verilmiştir. Ayrıca izolatların bölge ve örneğe göre dağılımları çizelge 4.2'de görülmekte olup sonuç olarak Aydın'dan (A) 82, Manisa'dan (B) 41, Denizli'den (C) 40, İzmir'den (D) 178, Nevşehir'den (E) 98 ve Ankara'dan (F) 12 olmak üzere toplam 451 adet termofilik izolat elde edilmiştir.

Çizelge 4.1 *Bacillus* spp. izolatlarının genel özelliklerine ait sayısal sonuçlar

Özellik	İzolat yüzdesi (%)
Gram reaksiyonu	100
Hücre şekli (Çubuk)	100
Hareket yeteneği	100
Katalaz aktivitesi	100
Amilaz aktivitesi	17
Endospor oluşumu (Sentral)	7
(Subterminal)	48
(Terminal)	45
Şişkin endospor (+)	61
(-)	39
Spor şekli (Yuvarlak)	0.6
(Oval)	11.4
(Elipsoidal)	88
Sıcaklık isteği (Mezofilik)	13
(Termofilik)	87

Çizelge 4.2 Jeotermal bölgelere göre *Bacillus* izolatlarının ve yüksek kapasitede amilolitik özellik gösteren termofilik izolatların dağılımı

İl/Bölge adı	Toplam izolat sayısı	Mezofilik izolat sayısı	Termofilik izolat sayısı	Termofilik ve amilolitik izolat sayısı
Aydın - (A Bölgesi)	92	10	82	19
Manisa - (B Bölgesi)	43	2	41	-
Denizli - (C Bölgesi)	49	9	40	4
İzmir - (D Bölgesi)	204	26	178	28
Nevşehir - (E Bölgesi)	114	16	98	14
Ankara - (F Bölgesi)	14	2	12	2
TOPLAM	516	65	451	67

Amilaz aktivitesi ve termofilik üreme özelliklerine göre yapılan bu ilk değerlendirme sonucunda Aydın'dan (A) 19, Denizli'den (C) 4, İzmir'den (D) 28, Nevşehir'den (E) 14 ve Ankara'dan (F) 2 adet olmak üzere toplam 67 adet amilaz pozitif, termofilik *Bacillus* spp. izolatu elde edilmiş olup bu isolatlar daha sonra α -glukozidaz enzim aktiviteleri yönünden incelenmiştir. Seçilen örneklerin örnek numaraları, koloni morfolojileri, hareket yetenekleri, Gram reaksiyonları, amilaz ve katalaz aktiviteleri, termofilik üreme özellikleri ve endospor oluşturmaları çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3 Amilaz aktivitesi gösteren 67 adet termofilik *Bacillus* cinsi izolatu morfolojik özellikleri

Aydın ili-(A Bölgesi)

Örnek no	İzolat no	Amilaz	Şekli	Kenar yapısı	Koloni					Endospor		
					Dikey görünümü	Yüzeyi	Mukoidliği	Rengi	Transparan/Opak	Pozisyonu	Şişkinliği	Şekli
A11 ^{sed}	A113	+++	Yuvarlak	Düz	Göbekli	Pürüzlü	-	Krem	O	Ter	+	E
A14 ^{sed}	A142	++	Yuvarlak	Düz	Göbekli	Pürüzlü	+	Krem	O	Ter	+	E
	A146	++	Yuvarlak	Düz	Göbekli	Pürüzlü	+	Krem	O	Ter	+	E
A32 ^{sed}	A3210	++	Yuvarlak	Düz	Göbekli	Pürüzlü	-	Sapsarı	O	Ter	-	E
A33 ^{sed}	A333	++	Yuvarlak	Dalgali	Basık	Kuru tozumsu	-	Krem	O	Ter	+	E
	A335	++	Yuvarlak	Dalgali	Göbekli	Düz	+	Krem	O	Ter	+	E
A34 ^{sed}	A343	+++	Yuvarlak	Düz	Göbekli	Düz	-	Sarı	O	Ter	+	E
A35 ^{sed}	A351a	++	Yuvarlak	Düz	Göbekli	Pürüzlü	-	Sarı	O	Ter	+	E
	A352b	++	Yuvarlak	Düz	Göbekli	Pürüzlü	-	Sarı	O	Ter	+	E
	A353	++	Yuvarlak	Düz	Göbekli	Pürüzlü	-	Krem	T	Ter	+	E
A37 ^{sed}	A371	++	Yuvarlak	Düz	Göbekli	Düz	-	Krem	O	Ter	+	E
A39 ^{sed}	A391a	++	Yuvarlak	Dalgali	Basık	Düz	+	Krem	O	Ter	+	E
	A392b	++	Yuvarlak	Dalgali	Basık	Düz	+	Krem	O	Ter	+	E
	A394	++	Yuvarlak	Düz	Kabarık	Düz	+	Krem	O	Ter	+	E
A40 ^{sed}	A403	++	Yuvarlak	Dalgali	Kabarık	Düz	+	Krem	O	Ter	+	Ov
	A404	++	Yuvarlak	Dalgali	Basık	Kuru tozumsu	-	Krem	O	Ter	+	Ov
A41 ^{sed}	A412b	++	Yuvarlak	Düz	Kabarık	Düz	+	Krem	O	Ter	+	Ov
	A413	++	Yuvarlak	Dalgali	Kabarık	Düz	+	Krem	O	Ter	+	E
	A414	++	Yuvarlak	Düz	Göbekli	Pürüzlü	-	Sapsarı	O	Ter	+	E

Denizli ili-(C Bölgesi)

Örnek no	İzolat no	Amilaz	Şekli	Kenar yapısı	Koloni					Endospor		
					Dikey görünümü	Yüzeyi	Mukoidliği	Rengi	Transparan/Opak	Pozisyonu	Şişkinliği	Şekli
C16 ^{sed}	C161ab	++	Yuvarlak	Düz	Konveks	Düz	-	Krem	O	St	+	E
	C163a	++	Yuvarlak	Düz	Kabarık	Düz	-	Sapsarı	O	Ter	+	E
C22 ^{sed}	C226	++	Yuvarlak	Dalgali	Kabarık	Düz	+	Krem	O	Ter	+	E
C30 ^{sed}	C304	++++	Yuvarlak	Düz	Basık	Düz	+	Krem	O	Ter	+	E

Çizelge 4.3 Amilaz aktivitesi gösteren 67 adet termofilik *Bacillus* cinsi izolatın morfolojik özellikleri (devam)

İzmir ili-(D Bölgesi)

Örnek no	İzolat no	Amilaz	Koloni							Endospor			
			Şekli	Kenar yapısı	Dikey görünümü	Yüzeyi	Mukoidliği	Rengi	Transparan/ Opak	Pozisyonu	Şişkinliği	Şekli	
D5 ^{su}	D52b	++	Yuvarlak	Düz	Göbekli	Düz	-	Sarı	O	Ter	+	E	
D9 ^{sed}	D98a	+++	Yuvarlak	Düz	Göbekli	Düz	-	Sarı	O	Ter	+	E	
D20 ^{su}	D202a	++	Yuvarlak	Düz	Göbekli	Pürüzlü	-	Sarı	O	Ter	+	E	
	D203b	++	Yuvarlak	Düz	Göbekli	Pürüzlü	-	Sarı	O	Ter	+	E	
	D204	++	Yuvarlak	Düz	Göbekli	Pürüzlü	-	Sarı	O	Ter	+	E	
	D205	++	Yuvarlak	Düz	Göbekli	Pürüzlü	-	Sarı	O	Ter	+	E	
	D21 ^{su}	D211	++	Yuvarlak	Düz	Göbekli	Düz	-	Sarı	O	Ter	+	E
D21 ^{su}	D213	++	Yuvarlak	Düz	Göbekli	Düz	-	Sapsarı	O	Ter	+	E	
	D214	++	Yuvarlak	Düz	Göbekli	Düz	-	Sapsarı	O	Ter	+	E	
	D22 ^{su}	D221a	++	Yuvarlak	Düz	Göbekli	Düz	-	Sarı	O	Ter	+	E
	D222b	+++	Yuvarlak	Düz	Göbekli	Düz	-	Sarı	O	Ter	+	E	
	D23 ^{su}	D232a	++++	Yuvarlak	Düz	Göbekli	Düz	-	Sarı	O	Ter	+	E
D24 ^{su}	D242b	++	Yuvarlak	Düz	Göbekli	Düz	-	Sarı	O	Ter	+	E	
D27 ^{sed}	D243	++	Yuvarlak	Düz	Göbekli	Düz	-	Sarı	O	Ter	+	E	
	D273a	+++	Yuvarlak	Düz	Kabank	Düz	-	Krem	O	Ter	+	E	
	D31 ^{sed}	D311	++	Yuvarlak	Düz	Basık	Kuru tozumsu	+	Krem	O	St	-	E
	D37 ^{sed}	D376b	++	Yuvarlak	Düz	Göbekli	Düz	-	Sapsarı	O	Ter	+	E
	D40 ^{sed}	D401a	++	Yuvarlak	Düz	Kabank	Düz	-	Sapsarı	O	Ter	+	E
D41 ^{sed}	D404	+++	Yuvarlak	Düz	Göbekli	Düz	-	Sarı	O	Ter	+	E	
	D413	+++	Yuvarlak	Düz	Kabank	Pürüzlü	-	Sarı	O	Ter	+	E	
	D43 ^{sed}	D433a	++	Yuvarlak	Düz	Kabank	Düz	-	Krem	T	Ter	+	E
	D46 ^{sed}	D463	++	Yuvarlak	Düz	Göbekli	Düz	-	Sarı	O	Ter	+	E
	D48 ^{sed}	D486	++	Yuvarlak	Düz	Konveks	Düz	-	Sarı	O	Ter	+	E
D50 ^{sed}	D487	++	Yuvarlak	Düz	Göbekli	Düz	-	Sapsarı	O	Ter	+	E	
	D503	++	Yuvarlak	Düz	Göbekli	Pürüzlü	-	Sapsarı	O	Ter	+	E	
	D504	+++	Yuvarlak	Düz	Kabank	Düz	-	Krem	O	Ter	+	E	
	D62 ^{sed}	D621	++++	Yuvarlak	Dalgalı	Göbekli	Pürüzlü	-	Kirlikrem	O	Ter	+	E
	D623	+++	Yuvarlak	Düz	Göbekli	Pürüzlü	+	Kirlikrem	O	Ter	+	E	

E Bölgesi-Ankara ili

Örnek no	İzolat no	Amilaz	Koloni							Endospor		
			Şekli	Kenar yapısı	Diksey görünümü	Yüzeyi	Mukoidliği	Rengi	Transparan/Opak	Pozisyonu	Şişkinliği	Şekli
E13 ^{su}	E134	++	Yuvarlak	Düz	Göbekli	Pürüzlü	-	Sarı	O	Ter	+	E
E17 ^{sed}	E173a	++	Yuvarlak	Düz	Kabank	Sarı	-	Krem	O	Ter	+	E
E18 ^{sed}	E173b	++	Yuvarlak	Düz	Kabank	Sarı	-	Açık sarı	O	Ter	-	E
	E183	++	Yuvarlak	Dalgalı	Kabank	Pürüzlü	-	Sapsarı	O	Ter	+	E
	E184aa	+++	Yuvarlak	Dalgalı	Kabank	Düz	-	Açık sarı	O	Ter	+	E
	E184ab	+++	Yuvarlak	Düz	Kabank	Düz	-	Sapsarı	O	Ter	-	E
E20 ^{sed}	E184b	++	Yuvarlak	Düz	Kabank	Pürüzlü	-	Sarı	O	Ter	+	E
	E206a	++	Yuvarlak	Düz	Kabank	Düz	+	Açık sarı	O	Ter	+	E
	E206b	++	Yuvarlak	Dalgalı	Kabank	Düz	-	Sarı	O	Ter	+	E
	E208a	++	Yuvarlak	Düz	Kabank	Düz	+	Sarı	O	Ter	+	E
	E208b	++	Yuvarlak	Düz	Göbekli	Düz	-	Sarı	O	Ter	+	E
E27 ^{sed}	E272	++	Yuvarlak	Düz	Kabank	Düz	-	Sarı	O	Ter	+	E
E28 ^{sed}	E287	+++	Yuvarlak	Düz	Kabank	Kuru tozumsu	+	Krem	O	St	-	E
E33 ^{sed}	E331	++	Yuvarlak	Düz	Göbekli	Düz	-	Sapsarı	O	Ter	+	E

Çizelge 4.3 Amilaz aktivitesi gösteren 67 adet termofilik *Bacillus* cinsi izolatın morfolojik özellikleri (devam)

Ankara ili-(F Bölgesi)

Örnek no	İzolat no	Amilaz	Şekli	Kenar yapısı	Dikey görünümü	Yüzeyi	Mukoidliği	Rengi	Transparan/Opak	Endospor		
										Pozisyonu	Şişkinliği	Şekli
F8 ^{sed}	F84a	++	Yuvarlak	Dalgali	Basık	Kuru tozumsu	-	Krem	O	Ter	+	E
	F84b	++	Yuvarlak	Dalgali	Basık	Kuru tozumsu	-	Krem	O	Ter	+	E

Standart Suşlar

Suş adı	Amilaz	Şekli	Kenar yapısı	Dikey görünümü	Yüzeyi	Mukoidliği	Rengi	Transparan/Opak	Endospor		
									Pozisyonu	Şişkinliği	Şekli
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 12980	+++	Yuvarlak	Düz	Kabarık	Düz	-	Krem	O	Ter	+	E
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 43223	+++	Yuvarlak	Düz	Kabarık	Düz	-	Krem	O	Ter	+	E
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953	+++	Yuvarlak	Düz	Kabarık	Düz	-	Krem	O	Ter	+	E
<i>Bacillus thermoglucosidasius</i> DSM 2542	+++	Yuvarlak	Düz	Kabarık	Düz	-	Sarı	O	Ter	+	E
<i>Anoxybacillus flavothermus</i> DSM 2641	+++	Yuvarlak	Düz	Göbekli	Düz	-	Sapsarı	O	Ter	+	E
<i>Anoxybacillus kestanbolensis</i> NCIB 13971	++	Yuvarlak	Düz	Göbekli	Düz	-	Sarı	O	Ter	+	E
<i>Anoxybacillus gonensis</i> NCIB 13933	++	Yuvarlak	Düz	Göbekli	Düz	-	Sarı	O	Ter	+	E
<i>Anoxybacillus ayderensis</i> NCIB 13972	++	Yuvarlak	Düz	Göbekli	Düz	-	Sarı	O	Ter	+	E
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ATCC 23350	++++	Yuvarlak	Dalgali	Basık	Kuru tozumsu	-	Krem	O	St	-	Ov
<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13	++	Yuvarlak	Düz	Kabarık	Kuru tozumsu	-	Krem	O	C	-	E

Not: ^{su}, su örneği; ^{sed}, sediment örneği; Transparan, T; Opak, O; Spor şekli: Oval, Ov; Elipsoidal, E; Yuvarlak, Y; Endospor Pozisyonu: Sentral, C; Subterminal, S; Terminal, Ter; Amilaz aktivitesi ++, +, ++++, ++++ şeklinde artmaktadır.

Suzuki ve arkadaşları (1976a) α -glukozidaz üreticisi termofilik *Bacillus* türlerini belirleyebilmek amacı ile 330 adet toprak numunesinden 523 adet izolat elde etmişlerdir. İzolatlardan MI nişastalı besiyeri ve iyot solüsyonu kullanılarak amilolitik özellikte 131 izolat seçilmiştir. Bu amilolitik izolatlardan da sadece 6 adet α -glukozidaz üreticisi *Bacillus* izolatının olduğunu belirlemişlerdir.

Arellano-Carbajal ve Olmos-Soto (2002) düşük maliyetli yüksek seviyede α -glukozidaz üreten *Bacillus* cinsi mikroorganizmaların izolasyonu için amilolitik aktivitelerini test etmişlerdir. Nişastalı besiyeri kullanılarak üretilen izolatlar iyotla boyanmış ve koloni çapının iki katı zon oluşturabilen 27 adet hücre dışı amilolitik enzim üreten izolattan 4'ünün α -glukozidaz ürettiğini belirlemişlerdir.

Nişasta ve selüloz gibi polisakkaritler sıcak su kaynaklarında az miktarda bulunduklarından bu tip ortamlardaki amilolitik aktiviteye sahip mikroorganizmaların oranları oldukça düşüktür (Rolfmeier *et al.* 1998). Yukarıda verilen örneklerle benzer şekilde bu çalışmada elde edilen 516 izolattan sadece %17'sinin (89 izolat) amilolitik enzim aktivitesine sahip olduğu görülmüştür.

4.2 *p*-Nitrofenolün Farklı Sıcaklıklardaki Ekstinksiyon Katsayıları

Enzim aktivitesinin hesaplanmasında kullanılan *p*-nitrofenol'ün milimolar ekstinksiyon katsayısının belirlenmesi için hazırlanan seyreltmelerin optik yoğunluğu 400 nm'de okunmuş ve absorbansa karşı mM *p*NP konsantrasyon eğrisi çizilerek eğrinin eğiminden ekstinksiyon katsayısı $L \cdot mM^{-1} \cdot cm^{-1}$ cinsinden hesaplanmıştır. Böylece *p*NP'ün pH 6.8'de hesaplanan millimolar ekstinksiyon katsayısı farklı sıcaklıklarda belirlenmiş ve çizelge 4.4'de gösterilmiştir (Suzuki *et al.* 1976b, Kelly *et al.* 1983).

Çizelge 4.4 *p*NP'ün pH 6.8'de ve farklı sıcaklıklarda 400 nm dalga boyundaki milimolar ekstinksiyon katsayıları

Sıcaklık	$\epsilon_{400 \text{ nm}}$ (L/mM.cm)
35°C	18,0
37°C	18,5
40°C	18,6
45°C	18,7
50°C	18,9
55°C	19,0
60°C	19,1
65°C	19,5
70°C	20,0
75°C	20,3
80°C	20,6
85°C	20,8
90°C	21,0
95°C	22,3

4.3 67 Adet Termofilik *Bacillus* İzolatının ve 4 Adet Termofilik *Bacillus* Standart Suşun Hücre İçi ve Dışı α -Glukozidaz Üretim Değerleri

Altmışyedi izolatın ve standart suşların yaş ağırlığına göre hücre dışı ve hücre içi enzim üretim değerleri üç paralelli olarak çalışılmış olup sonuçlar izole edildikleri illere göre çizelge 4.5'de verilmiştir. İzolatların toplam enzim aktivitelerinin <0.001-1.08 U/ml, standart suşların ise 0.01-0.91 U/ml arasında olduğu belirlenmiştir. En yüksek α -glukozidaz üreticisi termofilik *Bacillus* izolatının 1.08 U/ml toplam enzim aktivitesi ile E134 kodlu izolatı olduğu saptanmıştır. Standartlar arasında ise en yüksek enzim üreten, 0.91 U/ml toplam enzim aktivitesi ile *G. stearothermophilus* ATCC 12980 olarak tespit edilmiştir. En düşük enzim üretici olarak da, 0.01 U/ml toplam enzim aktivitesi ile standart suşlardan *G. stearothermophilus* ATCC 43223 ve <0.001 U/ml toplam enzim aktivitesi ile A113 numaralı izolatın olduğu belirlenmiştir. Yaş ağırlığa göre α -glukozidaz aktiviteleri de genelde yukarıdaki verilere paralellik göstermiştir.

Çizelge 4.5 67 adet termofilik *Bacillus* spp. izolatu ve 4 adet termofilik *Bacillus* standart suşun 15 saatlik hücre dışı ve içi α -glukozidaz üretim değerleri

Bakteri adı	Pelet Miktarı		Hücre Dışı Enzim Aktivitesi					Hücre İçi Enzim Aktivitesi					Toplam Enzim Aktivitesi	
	Ortalama pelet yaş ağırlığı (g)	SD ortalama pelet yaş ağırlığı (+/-)	Üst sıvı pH'ı	Ortalama enzim aktivitesi (U/ml)	SD ortalama enzim aktivitesi (+/-)	Ortalama enzim aktivitesi/yaş ağırlık (U/ml/g)	SD ortalama enzim aktivitesi/yaş ağırlık (+/-)	Sonike pelet üst sıvı pH'ı	Ortalama enzim aktivitesi (U/ml)	SD ortalama enzim aktivitesi (+/-)	Ortalama enzim aktivitesi/yaş ağırlık (U/ml/g)	SD ortalama enzim aktivitesi/yaş ağırlık (+/-)	Toplam enzim aktivite (hücre içi+hücre dışı) (U/ml)	Toplam enzim aktivite (hücre içi+hücre dışı)/yaş ağırlık (U/ml/g)
A Bölgesi														
A113	0,03	0,003	5,04	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	6,36	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
A142	0,04	0,006	5,67	0,02	0,003	0,66	0,090	6,04	0,18	0,009	5,24	0,699	0,20	5,90
A146	0,04	0,016	5,98	0,01	0,005	0,23	0,130	7,72	0,26	0,040	8,32	3,266	0,27	8,55
A3210	0,02	0,003	6,11	0,04	0,013	1,79	0,440	6,14	0,27	0,044	12,04	3,028	0,31	13,83
A333	0,02	0,003	5,9	0,66	0,043	44,11	11,10	7,34	0,06	0,023	4,53	2,481	0,72	48,64
A335	0,04	0,004	5,54	0,02	0,003	0,62	0,080	6,63	0,01	0,011	0,14	0,250	0,03	0,76
A343	0,04	0,003	5,81	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	7,17	0,45	0,077	10,79	1,977	0,45	10,79
A351a	0,05	0,020	5,90	<0,001	0,006	<0,001	<0,001	6,20	0,33	0,015	8,93	5,608	0,33	8,93
A352b	0,05	0,008	5,86	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	6,30	0,33	0,017	7,12	0,879	0,33	7,12
A353	0,04	0,007	6,32	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	6,66	0,24	0,009	5,95	0,978	0,24	5,95
A371	0,05	0,020	5,98	0,03	0,002	0,58	0,320	6,90	0,32	0,043	6,72	2,414	0,35	7,30
A391a	0,02	0,010	6,59	0,03	0,005	1,34	0,600	6,36	0,07	0,027	3,29	1,235	0,10	4,63
A392b	0,01	0,005	6,54	0,03	<0,001	2,86	0,980	6,60	0,02	0,040	1,43	2,476	0,05	4,29

Çizelge 4.5 67 adet termofilik *Bacillus* spp. izolatu ve 4 adet termofilik *Bacillus* standart suşun 15 saatlik hücre dışı ve içi α -glukozidaz üretim değerleri (devam)

Bakteri adı	Pelet Miktarı		Hücre Dışı Enzim Aktivitesi					Hücre İçi Enzim Aktivitesi					Toplam Enzim Aktivitesi	
	Ortalama pelet yaş ağırlığı (g)	SD ortalama pelet yaş ağırlığı (+/-)	Üst sıvı pH'ı	Ortalama enzim aktivitesi (U/ml)	SD ortalama enzim aktivitesi (+/-)	Ortalama enzim aktivitesi/yaş ağırlık (U/ml/g)	SD ortalama enzim aktivitesi/yaş ağırlık (+/-)	Sonike pelet üst sıvı pH'ı	Ortalama enzim aktivitesi (U/ml)	SD ortalama enzim aktivitesi (+/-)	Ortalama enzim aktivitesi/yaş ağırlık (U/ml/g)	SD ortalama enzim aktivitesi/yaş ağırlık (+/-)	Toplam enzim aktivite (hücre içi+hücre dışı) (U/ml)	Toplam enzim aktivite (hücre içi+hücre dışı)/yaş ağırlık (U/ml/g)
A394	0,02	0,006	6,01	0,03	0,007	2,46	1,050	7,72	0,03	0,001	2,02	0,679	0,06	4,48
A403	0,02	0,006	6,64	0,03	0,008	2,20	0,870	6,78	0,02	0,007	1,17	0,299	0,05	3,37
A404	0,01	0,003	6,67	0,03	0,008	2,73	0,100	7,78	0,02	<0,001	1,71	0,512	0,05	4,44
A412b	0,02	0,001	6,50	0,04	0,012	2,21	0,590	7,89	0,01	0,003	0,42	0,176	0,05	2,63
A413	0,01	0,002	6,64	0,02	0,007	2,58	1,000	6,74	0,01	0,002	1,08	0,336	0,03	3,66
A414	0,02	0,002	6,10	0,07	0,014	2,72	0,560	6,85	0,15	0,007	6,06	0,267	0,22	8,78
C Bölgesi														
C161ab	0,01	0,002	6,74	0,03	0,005	3,17	0,790	6,93	<0,001	<0,001	0,49	0,070	0,03	3,66
C163a	0,02	0,001	6,08	0,08	0,009	3,77	0,380	6,82	0,07	0,013	3,51	0,669	0,15	7,28
C226	0,05	0,001	5,75	0,04	0,007	0,93	0,170	6,89	0,02	0,010	0,44	0,229	0,06	1,37
C304	0,04	0,001	6,18	0,01	0,001	0,29	0,030	6,08	0,27	0,004	6,70	0,123	0,28	6,99
D Bölgesi														
D52b	0,03	0,002	6,14	0,07	0,006	2,96	0,360	6,76	0,06	0,006	2,27	0,360	0,13	5,23
D98a	0,04	0,006	6,40	0,02	0,002	0,44	0,030	6,68	0,25	0,030	5,93	0,132	0,27	6,37

Çizelge 4.5 67 adet termofilik *Bacillus* spp. izolatu ve 4 adet termofilik *Bacillus* standart suşun 15 saatlik hücre dışı ve içi α -glukozidaz üretim değerleri (devam)

Bakteri adı	Pelet Miktarı		Hücre Dışı Enzim Aktivitesi					Hücre İçi Enzim Aktivitesi					Toplam Enzim Aktivitesi	
	Ortalama pelet yaş ağırlığı (g)	SD ortalama pelet yaş ağırlığı (+/-)	Üst sıvı pH'ı	Ortalama enzim aktivitesi (U/ml)	SD ortalama enzim aktivitesi (+/-)	Ortalama enzim aktivitesi/yas ağırlık (U/ml/g)	SD ortalama enzim aktivitesi/yas ağırlık (+/-)	Sonike pelet üst sıvı pH'ı	Ortalama enzim aktivitesi (U/ml)	SD ortalama enzim aktivitesi (+/-)	Ortalama enzim aktivitesi/yas ağırlık (U/ml/g)	SD ortalama enzim aktivitesi/yas ağırlık (+/-)	Toplam enzim aktivitesi (hücre içi+hücre dışı) (U/ml)	Toplam enzim aktivitesi (hücre içi+hücre dışı)/yas ağırlık (U/ml/g)
D202a	0,04	0,003	5,79	0,01	0,002	0,40	0,010	6,99	0,31	0,024	8,32	0,861	0,32	8,72
D203b	0,06	0,005	5,70	0,07	0,001	1,12	0,080	6,96	0,20	0,008	3,38	0,155	0,27	4,50
D204	0,04	0,003	5,64	0,02	0,008	0,57	0,230	6,83	0,31	0,009	7,61	0,768	0,33	8,18
D205	0,05	0,005	5,60	0,02	0,002	0,50	0,010	6,50	0,30	0,043	6,48	0,726	0,32	6,98
D211	0,02	0,001	6,26	0,02	0,008	1,17	0,480	6,55	0,18	0,034	9,57	1,773	0,20	10,74
D213	0,02	0,004	6,04	0,09	0,001	4,26	0,820	6,17	0,08	0,003	3,83	0,601	0,17	8,09
D214	0,02	0,003	6,42	0,02	0,007	1,15	0,370	6,65	0,22	0,008	10,75	1,198	0,24	11,9
D221a	0,04	0,004	5,82	0,05	0,010	1,45	0,260	6,44	0,08	0,012	2,33	0,504	0,13	3,78
D222b	0,05	0,007	5,70	0,04	0,005	0,75	0,120	6,60	0,15	0,017	3,23	0,314	0,19	3,98
D232a	0,04	0,003	5,75	0,07	0,004	1,48	0,150	6,72	0,15	0,007	3,32	0,238	0,22	4,80
D242b	0,04	0,001	5,81	0,08	0,008	2,18	0,180	6,50	0,09	0,010	2,45	0,201	0,17	4,63
D243	0,03	0,001	5,91	0,09	0,005	3,10	0,220	6,51	0,03	0,006	0,91	0,222	0,12	4,01
D273a	0,03	0,013	6,80	0,02	0,004	0,71	0,560	6,60	0,10	0,008	3,91	2,450	0,12	4,62
D311	0,01	0,001	6,84	0,01	0,005	0,89	0,340	6,76	0,01	0,002	0,91	0,190	0,02	1,80

Çizelge 4.5 67 adet termofilik *Bacillus* spp. izolatu ve 4 adet termofilik *Bacillus* standart suşun 15 saatlik hücre dışı ve içi α -glukozidaz üretim değerleri (devam)

Bakteri adı	Pelet Miktarı		Hücre Dışı Enzim Aktivitesi					Hücre İçi Enzim Aktivitesi					Toplam Enzim Aktivitesi	
	Ortalama pelet yaş ağırlığı (g)	SD ortalama pelet yaş ağırlığı (+/-)	Üst sıvı pH'ı	Ortalama enzim aktivitesi (U/ml)	SD ortalama enzim aktivitesi (+/-)	Ortalama enzim aktivitesi/yaş ağırlık (U/ml/g)	SD ortalama enzim aktivitesi/yaş ağırlık (+/-)	Sonike pelet üst sıvı pH'ı	Ortalama enzim aktivitesi (U/ml)	SD ortalama enzim aktivitesi (+/-)	Ortalama enzim aktivitesi/yaş ağırlık (U/ml/g)	SD ortalama enzim aktivitesi/yaş ağırlık (+/-)	Toplam enzim aktivite (hücre içi+hücre dışı) (U/ml)	Toplam enzim aktivite (hücre içi+hücre dışı)/yaş ağırlık (U/ml/g)
D376b	0,02	0,003	5,90	0,07	0,005	3,67	0,430	6,74	0,17	0,007	9,11	1,253	0,24	12,78
D401a	0,04	0,001	6,31	0,05	0,011	1,24	0,300	6,60	0,19	0,003	4,95	0,069	0,24	6,23
D404	0,04	0,008	6,16	0,03	0,005	0,84	0,230	6,18	0,16	0,031	4,01	0,545	0,19	4,85
D413	0,04	0,007	6,22	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	6,14	0,32	0,061	7,22	0,202	0,32	7,22
D433a	0,03	0,001	5,77	0,07	0,005	2,44	0,130	6,72	0,13	0,003	4,44	1,184	0,20	6,88
D463	0,02	0,005	5,78	0,10	0,001	5,15	1,210	6,54	0,05	0,013	2,67	0,712	0,15	7,82
D486	0,03	0,002	6,27	0,00	0,003	0,15	0,080	6,41	0,25	0,016	7,25	0,771	0,25	7,40
D487	0,03	0,002	5,78	0,08	0,008	3,00	0,140	6,69	0,04	0,021	1,41	0,859	0,12	4,41
D503	0,02	0,002	5,86	0,06	0,007	2,51	0,100	6,66	0,02	0,003	1,05	0,136	0,08	3,56
D504	0,04	0,023	5,70	0,04	0,005	1,12	0,670	6,56	0,00	0,005	0,15	0,176	0,04	1,27
D621	0,05	0,005	5,73	0,04	0,015	0,71	0,260	6,10	0,23	0,003	4,65	0,530	0,27	5,36
D623	0,04	0,017	6,14	0,04	0,007	1,08	0,480	6,99	0,15	0,056	3,63	0,116	0,19	4,71
E Bölgesi														
E134	0,03	0,003	5,86	0,63	0,050	18,60	2,680	6,79	0,45	0,059	13,49	2,695	1,08	32,09

Çizelge 4.5 67 adet termofilik *Bacillus* spp. izolatu ve 4 adet termofilik *Bacillus* standart suşun 15 saatlik hücre dışı ve içi α -glukozidaz üretim değerleri (devam)

Bakteri adı	Pelet Miktarı		Hücre Dışı Enzim Aktivitesi					Hücre İçi Enzim Aktivitesi					Toplam Enzim Aktivitesi	
	Ortalama pelet yaş ağırlığı (g)	SD ortalama pelet yaş ağırlığı (+/-)	Üst sıvı pH'ı	Ortalama enzim aktivitesi (U/ml)	SD ortalama enzim aktivitesi (+/-)	Ortalama enzim aktivitesi/yaş ağırlık (U/ml/g)	SD ortalama enzim aktivitesi/yaş ağırlık (+/-)	Sonike pelet üst sıvı pH'ı	Ortalama enzim aktivitesi (U/ml)	SD ortalama enzim aktivitesi (+/-)	Ortalama enzim aktivitesi/yaş ağırlık (U/ml/g)	SD ortalama enzim aktivitesi/yaş ağırlık (+/-)	Toplam enzim aktivite (hücre içi+hücre dışı) (U/ml)	Toplam enzim aktivite (hücre içi+hücre dışı)/yaş ağırlık (U/ml/g)
E173a	0,02	0,002	5,89	0,05	0,001	2,77	0,370	6,75	0,01	0,007	0,74	0,413	0,06	3,51
E173b	0,04	0,003	5,79	0,0040	0,008	0,08	0,190	6,71	0,33	0,025	7,91	1,174	0,33	7,99
E183	0,04	0,001	6,13	0,07	0,003	1,76	0,060	6,70	0,08	0,012	2,02	0,346	0,15	3,78
E184aa	0,04	0,003	5,86	0,07	0,012	1,82	0,200	6,52	0,13	0,010	3,53	0,329	0,20	5,35
E184ab	0,04	0,005	5,98	0,06	0,005	1,53	0,310	6,72	0,04	0,004	1,14	0,034	0,10	2,67
E184b	0,03	0,004	5,85	0,06	0,006	2,17	0,430	6,79	0,08	0,007	2,83	0,479	0,14	5,00
E206a	0,04	0,001	6,07	0,22	0,009	6,23	0,450	6,66	0,07	0,008	1,83	0,269	0,29	8,06
E206b	0,03	0,001	6,15	0,25	0,001	8,34	0,280	6,85	0,06	0,013	2,06	0,381	0,31	10,4
E208a	0,02	0,002	6,21	0,06	0,006	3,03	0,350	6,69	0,09	0,012	4,50	0,586	0,15	7,53
E208b	0,02	0,001	6,06	0,09	0,019	4,97	0,900	6,75	0,08	0,017	4,16	0,987	0,17	9,13
E272	0,03	0,009	6,46	0,04	0,010	1,67	0,540	6,82	0,19	0,043	8,19	3,543	0,23	9,86
E287	0,03	0,002	6,51	0,01	0,009	0,37	0,370	6,76	0,03	0,013	1,00	0,508	0,04	1,37
E331	0,03	0,002	6,05	0,24	0,013	7,76	0,880	6,75	0,03	0,012	0,86	0,444	0,27	8,62

Çizelge 4.5 67 adet termofilik *Bacillus* spp. izolatu ve 4 adet termofilik *Bacillus* standart suşun 15 saatlik hücre dışı ve içi α -glukozidaz üretim değerleri (devam)

Bakteri adı	Pelet Miktarı		Hücre Dışı Enzim Aktivitesi					Hücre İçi Enzim Aktivitesi					Toplam Enzim Aktivitesi	
	Ortalama pelet yaş ağırlığı (g)	SD ortalama pelet yaş ağırlığı (+/-)	Üst sıvı pH'ı	Ortalama enzim aktivitesi (U/ml)	SD ortalama enzim aktivitesi (+/-)	Ortalama enzim aktivitesi/yaş ağırlık (U/ml/g)	SD ortalama enzim aktivitesi/yaş ağırlık (+/-)	Sonike pelet üst sıvı pH'ı	Ortalama enzim aktivitesi (U/ml)	SD ortalama enzim aktivitesi (+/-)	Ortalama enzim aktivitesi/yaş ağırlık (U/ml/g)	SD ortalama enzim aktivitesi/yaş ağırlık (+/-)	Toplam enzim aktivite (hücre içi+hücre dışı) (U/ml)	Toplam enzim aktivite (hücre içi+hücre dışı)/yaş ağırlık (U/ml/g)
F Bölgesi														
F84a	0,02	0,002	6,65	0,57	0,044	36,42	7,100	6,56	0,003	0,005	0,22	0,385	0,57	36,64
F84b	0,01	0,003	6,56	0,57	0,033	76,52	25,500	6,76	0,005	0,007	0,66	1,008	0,57	77,18
Standartlar														
<i>G. stearothermophilus</i> ATCC 12980	0,03	0,007	6,24	0,28	0,010	10,49	3,000	6,63	0,63	0,047	23,77	7,669	0,91	34,26
<i>G. stearothermophilus</i> ATCC 43223	0,04	0,009	4,93	0,01	0,001	0,17	0,160	6,02	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,01	0,17
<i>G. stearothermophilus</i> ATCC 7953	0,03	0,003	5,13	0,01	0,001	0,47	0,270	6,50	0,86	0,036	31,63	3,356	0,87	32,1
<i>G. thermoglucosidasius</i> DSM 2542	0,03	0,001	5,81	0,02	0,006	0,54	0,130	6,50	0,29	0,012	8,69	0,472	0,31	9,23

4.4 İzolatların α -Glukozidaz Enzim Miktarlarının Dizini

Çizelge 4.6'da 67 adet termofilik *Bacillus* spp. izolatının ve 4 adet termofilik *Bacillus* sp. standart suşun pelet yaş ağırlığı temelinde 15 saatte ürettikleri hücre içi, hücre dışı ve toplam α -glukozidaz enzim miktarları t-test ile istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve izolatlar en yüksek enzim üreten en düşüğe doğru sıralanmış olup şekil 4.5.a,d'de bu veriler histogram olarak işlenmiştir. Tablonun en sağ sütununda verilen t-test değerleri de izolat bazında hücre dışı ve hücre içi α -glukozidaz miktarları arasındaki farkın önemli olup olmadığını göstermektedir. Ayrıca hücre içi ve dışı olmak üzere toplam enzim aktivitesi içerisindeki yüzde oranları çizelgede verilmiş olup t-test değerleri ve yüzde oranları göz önüne alınarak, enzimlerin izolatlardaki hücresel yerleşimleri belirlenmiştir.

Çizelge 4.6 67 adet termofilik *Bacillus spp.* izolatu ve 4 adet termofilik *Bacillus* standart suşun 15 saatlik hücre içi, hücre dışı ve toplam α -glukozidaz aktivitesi/yaş ağırlık (U/ml/g) değerlerinin t-test dizini

Bakteri adı	Enzimi üretim şekli	Hücre dışı enzim aktivitesi (U/ml/g)							Hücre içi enzim aktivitesi (U/ml/g)							Toplam enzim aktivitesi (U/ml/g)						
		1.Paralel	2. Paralel	3. Paralel	Aritmetik ortalama	Toplamda (%)	Standart sapma	Standart hata	1.Paralel	2. Paralel	3. Paralel	Aritmetik ortalama	Toplamda (%)	Standart sapma	Standart hata	1.Paralel toplam	2. Paralel toplam	3. Paralel toplam	Aritmetik ortalama	Standart sapma	Standart hata	t-test hücre içi-hücre dışı
F84b	H. d.	48,12	84,01	97,43	76,52	99	25,5	18,03	<0,001	1,82	0,15	0,66	1	1,008	0,713	48,12	85,83	97,58	77,18	25,8	18,27	0,007
A333	H. d	35,65	39,95	56,72	44,11	91	11,1	7,875	2,43	3,89	7,26	4,53	9	2,481	1,754	38,07	43,84	63,99	48,64	13,6	9,622	0,004
F84a	H. d	33,57	44,51	31,20	36,42	99	7,1	5,019	<0,001	0,67	<0,001	0,22	1	0,385	0,272	33,57	45,17	31,20	36,64	7,48	5,288	9E-04
ATCC12980	H. i	8,29	13,91	9,27	10,49	31	3	2,12	17,45	32,30	21,55	23,77	69	7,669	5,422	25,75	46,21	30,83	34,26	10,7	7,534	0,049
ATCC7953	H. i	0,40	0,25	0,77	0,47	1	0,27	0,191	31,05	28,61	35,24	31,63	99	3,356	2,373	31,45	28,85	36,02	32,10	3,63	2,564	9E-05
E134	H.i/d	15,53	19,82	20,44	18,60	58	2,68	1,893	10,52	15,77	14,19	13,49	42	2,695	1,905	26,04	35,59	34,63	32,09	5,26	3,718	0,081
A3210	H. i	1,28	2,06	2,04	1,79	13	0,44	0,312	11,76	15,20	9,16	12,04	87	3,028	2,141	13,05	17,26	11,19	13,83	3,11	2,197	0,004
D376b	H. i	3,87	3,18	3,96	3,67	29	0,43	0,303	8,47	8,32	10,56	9,11	71	1,253	0,886	12,34	11,50	14,52	12,78	1,56	1,104	0,002
D214	H. i	1,20	0,77	1,49	1,15	10	0,37	0,258	9,50	10,86	11,89	10,75	90	1,198	0,847	10,70	11,63	13,38	11,90	1,36	0,963	2E-04
A343	H. i	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0	<0,001	<0,001	11,18	8,65	12,54	10,79	100	1,977	1,398	11,18	8,649	12,55	10,79	1,98	1,398	7E-04
D211	H. i	0,83	1,72	0,96	1,17	11	0,48	0,341	7,73	9,72	11,27	9,57	89	1,773	1,254	8,56	11,44	12,23	10,74	1,93	1,367	0,001
E206b	H. d	8,30	8,64	8,08	8,34	80	0,28	0,201	2,10	1,66	2,42	2,06	20	0,381	0,27	10,40	10,30	10,50	10,40	0,1	0,068	2E-05
E272	H. i	1,42	1,31	2,29	1,67	17	0,54	0,38	4,13	9,78	10,66	8,19	83	3,543	2,505	5,55	11,09	12,95	9,86	3,85	2,724	0,035
DSM2542	H. i	0,39	0,61	0,61	0,54	6	0,13	0,093	8,74	8,19	9,13	8,69	94	0,472	0,334	9,13	8,80	9,74	9,23	0,48	0,339	9E-06
E208b	H.i/d	4,46	4,44	6,02	4,97	54	0,9	0,639	4,91	4,52	3,04	4,16	46	0,987	0,698	9,37	8,96	9,05	9,13	0,22	0,152	0,35
A351a	H. i	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0	<0,001	<0,001	5,82	5,57	15,40	8,93	100	5,608	3,965	5,82	5,57	15,4	8,93	5,89	4,162	0,054
A414	H. i	2,16	2,71	3,29	2,72	31	0,56	0,399	5,89	6,37	5,93	6,06	69	0,267	0,189	8,05	9,08	9,22	8,78	0,64	0,452	8E-04

Çizelge 4.6 67 adet termofilik *Bacillus spp.* izolatu ve 4 adet termofilik *Bacillus* standart suşun 15 saatlik hücre içi, hücre dışı ve toplam α -glukozidaz aktivitesi/yaş ağırlık (U/ml/g) değerlerinin t-test dizini

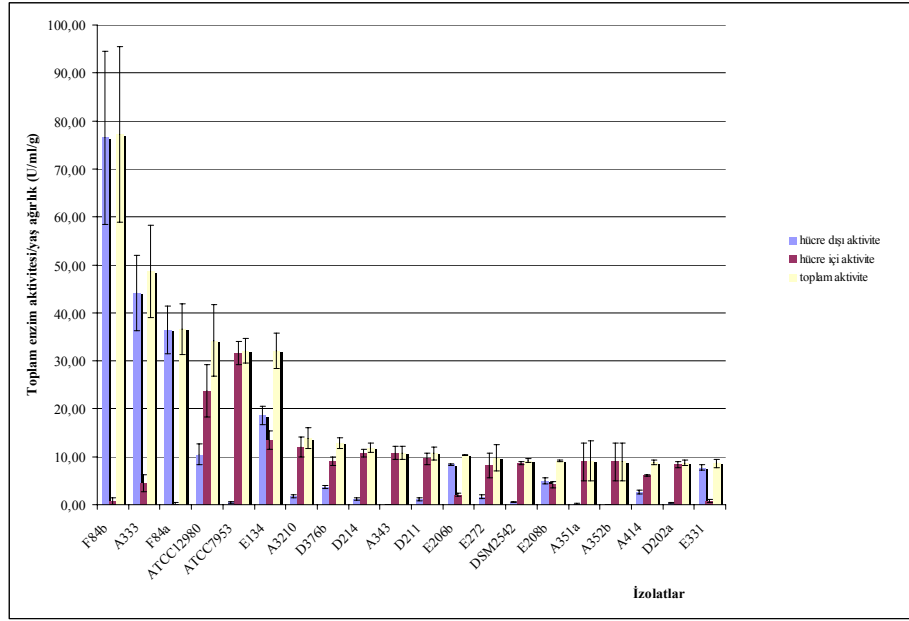
Bakteri adı	Enzimi üretim şekli	Hücre dışı enzim aktivitesi (U/ml/g)							Hücre içi enzim aktivitesi (U/ml/g)							Toplam enzim aktivitesi (U/ml/g)						
		1.Paralel	2. Paralel	3. Paralel	Aritmetik ortalama	Toplamda (%)	Standart sapma	Standart hata	1.Paralel	2. Paralel	3. Paralel	Aritmetik ortalama	Toplamda (%)	Standart sapma	Standart hata	1.Paralel toplam	2. Paralel toplam	3. Paralel toplam	Aritmetik ortalama	Standart sapma	Standart hata	t-test hücre içi-hücre dışı
D202a	H. i	0,39	0,41	0,39	0,40	5	0,01	0,007	9,26	8,13	7,57	8,32	95	0,861	0,609	9,26	8,13	7,57	8,72	0,86	0,609	9E-05
E331	H. d	8,52	6,80	7,98	7,76	90	0,88	0,621	1,37	0,56	0,64	0,86	10	0,444	0,314	9,89	7,36	8,62	8,62	1,26	0,892	3E-04
A146	H. i	0,35	0,23	0,10	0,23	3	0,13	0,089	8,93	4,80	11,24	8,32	97	3,266	2,309	9,28	5,02	11,34	8,55	3,22	2,280	0,013
D204	H. i	0,47	0,84	0,41	0,57	7	0,23	0,163	7,57	8,40	6,86	7,61	93	0,768	0,543	8,04	9,23	7,27	8,18	0,99	0,7	1E-04
D213	H.i/d	4,88	4,56	3,33	4,26	53	0,82	0,579	4,17	4,18	3,13	3,83	47	0,601	0,425	9,05	8,74	6,46	8,09	1,41	0,999	0,504
E206a	H. d	5,72	6,38	6,58	6,23	77	0,45	0,318	1,60	2,12	1,76	1,83	23	0,269	0,19	7,32	8,51	8,34	8,06	0,64	0,454	1E-04
E173b	H. i	0,01	0,05	0,30	0,08	1	0,19	0,133	9,26	7,16	7,30	7,91	99	1,174	0,83	9,27	7,11	7,60	7,99	1,13	0,802	3E-04
D463	H. d	5,69	3,76	6,00	5,15	66	1,21	0,857	3,49	2,25	2,26	2,67	34	0,712	0,503	9,17	6,01	8,26	7,82	1,63	1,152	0,038
E208a	H. i	2,85	3,43	2,81	3,03	40	0,35	0,247	4,28	4,05	5,16	4,50	60	0,586	0,414	7,13	7,49	7,97	7,53	0,42	0,299	0,02
D486	H. i	0,17	0,21	0,05	0,15	2	0,08	0,058	8,08	6,55	7,12	7,25	98	0,771	0,545	8,25	6,76	7,18	7,40	0,77	0,543	9E-05
A371	H. i	0,40	0,95	0,38	0,58	8	0,32	0,227	5,63	9,48	5,04	6,72	92	2,414	1,707	6,03	10,43	5,42	7,30	2,73	1,933	0,012
C163a	H.i/d	4,06	3,90	3,34	3,77	52	0,38	0,267	3,26	4,27	3,00	3,51	48	0,669	0,473	7,31	8,17	6,34	7,28	0,92	0,647	0,591
D413	H. i	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0	<0,001	<0,001	7,23	7,42	7,02	7,22	100	0,202	0,143	7,23	7,42	7,02	7,22	0,2	0,143	4E-07
A352b	H. i	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0	<0,001	<0,001	8,1	6,87	6,39	7,12	100	5,608	3,965	8,1	6,87	6,39	7,12	5,61	3,965	0,051
C304	H. i	0,27	0,27	0,32	0,29	4	0,03	0,019	6,62	6,84	6,63	6,70	96	0,123	0,087	6,89	7,11	6,95	6,99	0,11	0,08	1E-07
D205	H. i	0,48	0,50	0,50	0,50	7	0,01	0,007	5,70	7,13	6,61	6,48	93	0,726	0,513	6,18	7,63	7,11	6,98	0,74	0,52	1E-04
D433a	H. i	2,29	2,50	2,53	2,44	36	0,13	0,093	4,45	4,25	4,62	4,44	64	0,184	0,13	6,75	6,75	7,15	6,88	0,23	0,164	1E-04
D98a	H. i	0,47	0,45	0,41	0,44	7	0,03	0,02	6,06	5,93	5,80	5,93	93	0,132	0,093	6,53	6,38	6,21	6,37	0,16	0,112	2E-07

Çizelge 4.6 67 adet termofilik *Bacillus spp.* izolatu ve 4 adet termofilik *Bacillus* standart suşun 15 saatlik hücre içi, hücre dışı ve toplam α -glukozidaz aktivitesi/yaş ağırlık (U/ml/g) değerlerinin t-test dizini

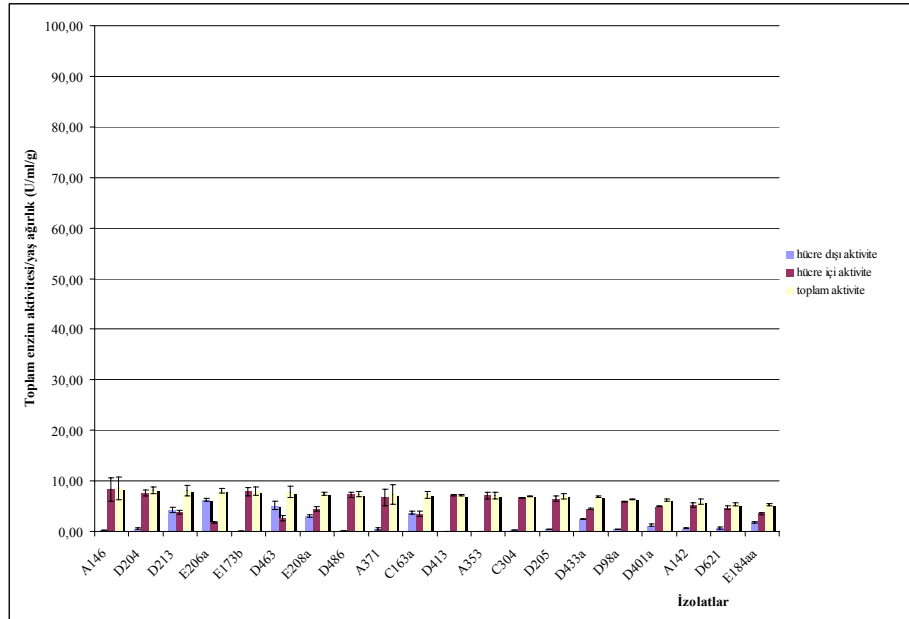
Bakteri adı	Enzimi üretim şekli	Hücre dışı enzim aktivitesi (U/ml/g)							Hücre içi enzim aktivitesi (U/ml/g)							Toplam enzim aktivitesi (U/ml/g)						
		1.Paralel	2. Paralel	3. Paralel	Aritmetik ortalama	Toplamda (%)	Standart sapma	Standart hata	1.Paralel	2. Paralel	3. Paralel	Aritmetik ortalama	Toplamda (%)	Standart sapma	Standart hata	1.Paralel toplam	2. Paralel toplam	3. Paralel toplam	Aritmetik ortalama	Standart sapma	Standart hata	t-test hücre içi-hücre dışı
D401a	H. i	0,90	1,46	1,36	1,24	20	0,3	0,21	4,90	5,03	4,92	4,95	80	0,074	0,053	5,80	6,49	6,39	6,23	0,37	0,262	3E-05
A142	H. i	0,75	0,59	0,63	0,66	11	0,09	0,061	5,98	5,14	4,60	5,24	89	0,699	0,494	6,74	5,73	5,23	5,90	0,77	0,543	4E-04
A353	H. i	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0	<0,001	<0,001	6,4	6,63	4,83	5,95	100	0,879	0,622	6,4	6,63	4,83	5,95	<0,001	0,622	1E-04
D621	H. i	0,91	0,80	0,41	0,71	13	0,26	0,186	4,06	5,09	4,81	4,65	87	0,53	0,375	4,97	5,89	5,22	5,36	0,47	0,334	3E-04
E184aa	H. i	1,91	1,96	1,60	1,82	34	0,2	0,138	3,78	3,15	3,65	3,53	66	0,329	0,233	5,69	5,11	5,24	5,35	0,3	0,214	0,002
D52b	H.i/d	3,03	3,27	2,57	2,96	57	0,36	0,252	2,25	2,65	1,93	2,27	43	0,36	0,255	5,28	5,92	4,50	5,23	0,71	0,503	0,08
E184b	H.i/d	2,31	1,69	2,52	2,17	43	0,43	0,306	3,12	2,28	3,09	2,83	57	0,479	0,339	5,43	3,97	5,61	5,00	0,9	0,638	0,153
D404	H. i	0,79	0,64	1,10	0,84	17	0,23	0,166	3,53	3,91	4,60	4,01	83	0,545	0,386	4,32	4,55	5,70	4,85	0,74	0,524	8E-04
D232a	H. i	1,65	1,42	1,37	1,48	31	0,15	0,106	3,46	3,05	3,46	3,32	69	0,238	0,168	5,11	4,47	4,83	4,80	0,32	0,227	3E-04
D623	H. i	1,16	0,56	1,52	1,08	23	0,48	0,341	3,66	3,50	3,72	3,63	77	0,116	0,082	4,82	4,06	5,24	4,71	0,6	0,422	9E-04
D242b	H.i/d	1,98	2,23	2,33	2,18	47	0,18	0,125	2,33	2,34	2,68	2,45	53	0,201	0,142	4,31	4,57	5,01	4,63	0,35	0,25	0,156
A391a	H. i	1,15	2,00	0,85	1,34	29	0,6	0,423	3,61	4,33	1,92	3,29	71	1,235	0,873	4,77	6,33	2,78	4,63	1,78	1,261	0,069
D273a	H. i	0,42	1,35	0,36	0,71	15	0,56	0,395	2,43	6,74	2,56	3,91	85	2,45	1,732	2,85	8,09	2,92	4,62	3,01	2,126	0,092
D203b	H. i	1,15	1,03	1,18	1,12	25	0,08	0,057	3,43	3,20	3,50	3,38	75	0,155	0,11	4,58	4,23	4,68	4,50	0,24	0,166	2E-05
A394	H.i/d	2,64	3,41	1,33	2,46	55	1,05	0,741	2,55	2,25	1,25	2,02	45	0,679	0,48	5,19	5,65	2,58	4,48	1,66	1,171	0,571
A404	H. d	2,67	2,68	2,85	2,73	62	0,1	0,074	2,30	1,49	1,35	1,71	38	0,512	0,362	4,97	4,16	4,21	4,44	0,45	0,32	0,028
D487	H. d	3,00	3,14	2,86	3,00	68	0,14	0,099	0,95	0,89	2,40	1,41	32	0,859	0,608	3,95	4,03	5,27	4,41	0,74	0,523	0,034
A392b	H. d	3,44	3,42	1,73	2,86	67	0,98	0,695	<0,001	<0,001	4,29	1,43	33	2,476	1,751	3,44	3,42	6,02	4,29	1,49	1,056	0,404

Çizelge 4.6 67 adet termofilik *Bacillus spp.* izolatu ve 4 adet termofilik *Bacillus* standart suşun 15 saatlik hücre içi, hücre dışı ve toplam α -glukozidaz aktivitesi/yaş ağırlık (U/ml/g) değerlerinin t-test dizini

Bakteri adı	Enzimi üretim şekli	Hücre dışı enzim aktivitesi (U/ml/g)							Hücre içi enzim aktivitesi (U/ml/g)							Toplam enzim aktivitesi (U/ml/g)						
		1.Paralel	2. Paralel	3. Paralel	Aritmetik ortalama	Toplamda (%)	Standart sapma	Standart hata	1.Paralel	2. Paralel	3. Paralel	Aritmetik ortalama	Toplamda (%)	Standart sapma	Standart hata	1.Paralel toplam	2. Paralel toplam	3. Paralel toplam	Aritmetik ortalama	Standart sapma	Standart hata	t-test hücre içi-hücre dışı
D243	H. d	2,85	3,14	3,30	3,10	77	0,22	0,158	0,74	1,16	0,83	0,91	23	0,222	0,157	3,60	4,30	4,12	4,01	0,36	0,257	3E-04
D222b	H. i	0,72	0,88	0,65	0,75	19	0,12	0,082	2,90	3,26	3,52	3,23	81	0,314	0,222	3,62	4,14	4,18	3,98	0,31	0,22	2E-04
D221a	H. i	1,66	1,52	1,17	1,45	38	0,26	0,18	2,55	1,75	2,68	2,33	62	0,504	0,356	4,21	3,27	3,85	3,78	0,47	0,335	0,055
E183	H. i/d	1,68	1,78	1,80	1,76	46	0,06	0,045	1,68	2,37	2,01	2,02	54	0,346	0,245	3,36	4,15	3,81	3,78	0,4	0,281	0,26
C161ab	H. d	3,75	2,26	3,50	3,17	87	0,79	0,562	0,55	0,41	0,49	0,49	13	0,07	0,049	4,30	2,68	4,00	3,66	0,86	0,609	0,004
A413	H. d	1,63	3,62	2,48	2,58	70	1	0,704	0,69	1,30	1,25	1,08	30	0,336	0,238	2,32	4,92	3,73	3,66	1,3	0,917	0,069
D503	H. d	2,59	2,54	2,40	2,51	71	0,1	0,068	0,94	1,00	1,20	1,05	29	0,136	0,096	3,53	3,54	3,60	3,56	0,04	0,028	1E-04
E173a	H. d	2,37	2,86	3,09	2,77	79	0,37	0,262	0,48	1,22	0,53	0,74	21	0,413	0,292	2,85	4,08	3,62	3,51	0,62	0,44	0,003
A403	H. d	1,54	1,87	3,18	2,20	69	0,87	0,614	1,08	0,92	1,5	1,17	31	0,095	0,067	2,62	2,79	4,68	3,37	0,81	0,573	0,072
E184ab	H.i/d	1,36	1,88	1,34	1,53	57	0,31	0,217	1,14	1,17	1,10	1,14	43	0,034	0,024	2,50	3,05	2,45	2,67	0,34	0,238	0,094
A412b	H. d	2,66	2,44	1,54	2,21	84	0,59	0,418	0,37	0,27	0,61	0,42	16	0,176	0,125	3,02	2,71	2,15	2,63	0,44	0,312	0,007
D311	H. i/d	1,09	1,09	0,50	0,89	50	0,34	0,24	0,93	1,09	0,71	0,91	50	0,19	0,134	2,02	2,18	1,21	1,80	0,52	0,366	0,952
E287	H. i	0,08	0,24	0,79	0,37	27	0,37	0,262	0,86	0,58	1,57	1,00	73	0,508	0,359	0,94	0,82	2,36	1,37	0,85	0,604	0,156
C226	H. d	1,11	0,77	0,90	0,93	68	0,17	0,121	0,70	0,29	0,32	0,44	32	0,229	0,162	1,81	1,07	1,21	1,37	0,4	0,28	0,041
D504	H. d	0,46	1,11	1,79	1,12	88	0,67	0,473	0,04	0,35	0,05	0,15	12	0,176	0,125	0,49	1,46	1,84	1,27	0,7	0,492	0,071
A335	H. d	0,62	0,69	0,54	0,62	81	0,08	0,054	<0,001	<0,001	0,43	0,14	19	0,25	0,177	0,62	0,694	0,97	0,76	0,19	0,133	0,035
ATCC43223	H. d	0,18	0,33	<0,001	0,17	99	0,16	0,115	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1	<0,001	<0,001	0,18	0,33	0,00	0,17	0,16	0,115	0,149
A113	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

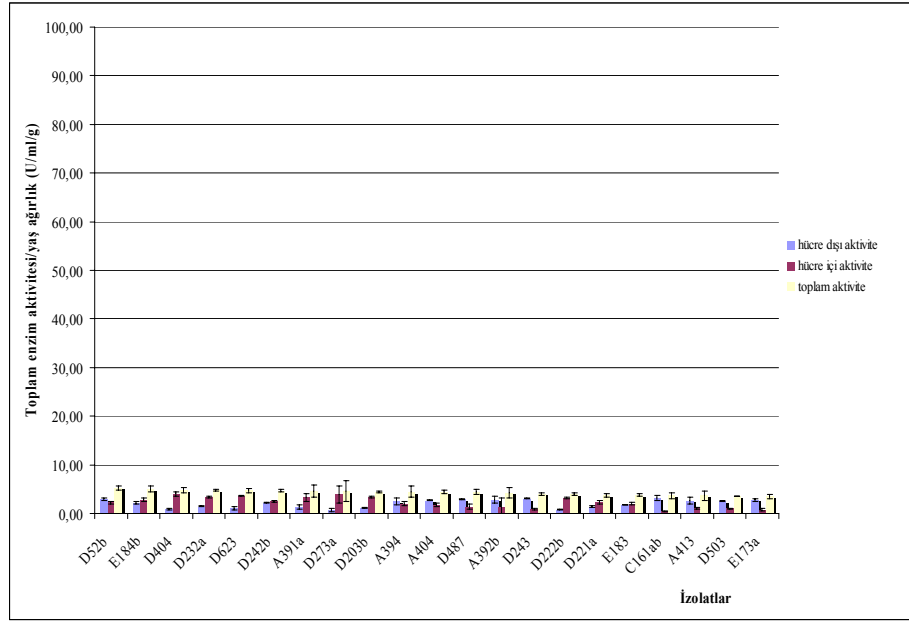


a

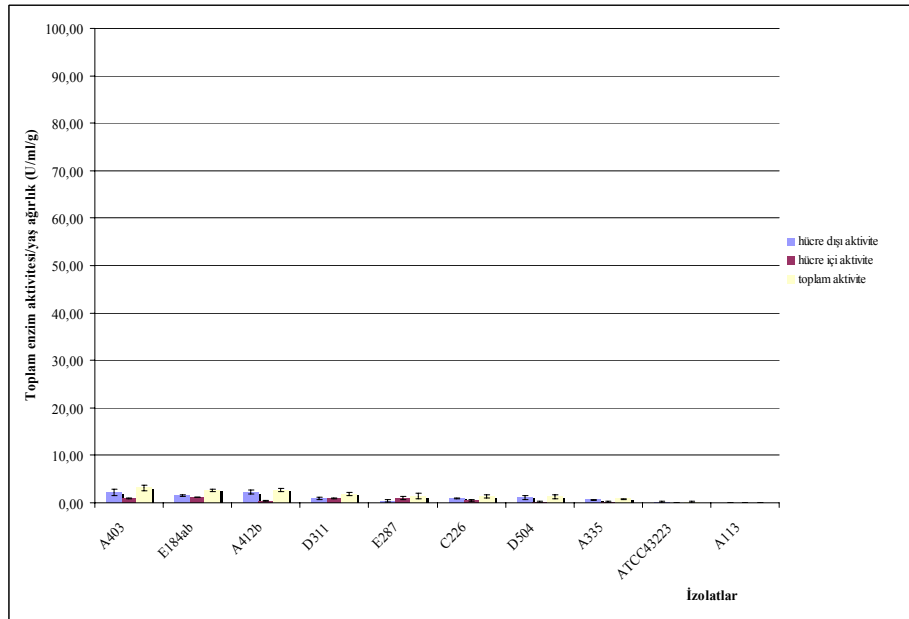


b

Şekil 4.5 67 adet termofilik *Bacillus* spp. izolatu ve 4 adet termofilik *Bacillus* standart suşun 15 saatlik hücre içi, hücre dışı ve toplam α -glukozidaz enzim aktivitesi/yaş ağırlık değerlerinin t-test istatistik analizi sonucu oluşturulan grafiği



c



d

Şekil 4.5 67 adet termofilik *Bacillus* spp. izolatu ve 4 adet termofilik *Bacillus* standart suşun 15 saatlik hücre içi, hücre dışı ve toplam α -glukozidaz enzim aktivitesi/yaş ağırlık değerlerinin t-test istatistik analizi sonucu oluşturulan grafiği (devam)

İzolatların pelet yaş ağırlığı başına düşen α -glukozidaz üretim miktarları 77.18 ile 0.001 U/ml/g arasında belirlenmiştir. İzolatlardan F84b (77.18 U/ml/g), A333, (48.64 U/ml/g), F84a (36.64 U/ml/g), ATCC 12980 (34.26 U/ml/g), ATCC 7953 (32.10 U/ml/g), E134 (32.09 U/ml/g), A3210 (13.83 U/ml/g), D376b (12.78 U/ml/g), D214 (11.9 U/ml/g), A343 (10.79 U/ml/g), D211 (10.74 U/ml/g), E206b (10.4 U/ml/g) ve E272 (9.86 U/ml/g) kodlu izolat ve standart suşların toplamda yüksek oranda α -glukozidaz ürettikleri belirlenmiştir. Bu sonuçlar, çalışma kapsamında jeotermal alanlardan izole edilen bazı termofilik izolatların standart enzim üreticisi suşlardan daha yüksek miktarda α -glukozidaz ürettiklerini göstermiştir.

Hücre içi ve hücre dışı enzim üretim miktarları arasındaki farklılıklar t-test analizi ile incelendiğinde izolatlardan %30'unun hücre dışı, %53'ünün hücre içi ve %17'sinin de hücreye bağlı enzim ürettiği görülmüştür. Yüksek oranda enzim ürettiği belirlenen standart suşlar sadece hücre içi α -glukozidaz üretirken, F84b, A333, F84a ve E206b izolatlarının bunlardan farklı olarak, hücre dışı enzim ürettikleri saptanmıştır. A3210, D376b, D214, A343, D211 ve E272 izolatlarının, standart enzimlere benzer şekilde hücre içi α -glukozidaz ürettikleri belirlenmiştir. E134'ün ise hücreye bağlı enzim ürettiği görülmüştür.

Şu ana kadar, α -glukozidaz üreticisi termofilik *Bacillus* suşlarının çoğunluğunun hücre içi enzim üreticisi oldukları rapor edilmiştir (Hung *et al.* 2005). Sadece Suzuki ve arkadaşlarının (1992) *B. thermoamyloliquefaciens* KP1071 suşu ile yaptıkları bir çalışmada, sentezlenen α -glukozidaz I enziminin hücre dışından saflaştırıldığı rapor edilmiştir. Bunun yanında hücreye bağlı α -glukozidazlar da rapor edilmiştir. Bu nedenle, tez kapsamında çalışılan izolatların şu ana kadar rapor edilenlerden farklı olarak hücre dışı termostabil α -glukozidaz üretmeleri yeni veridir.

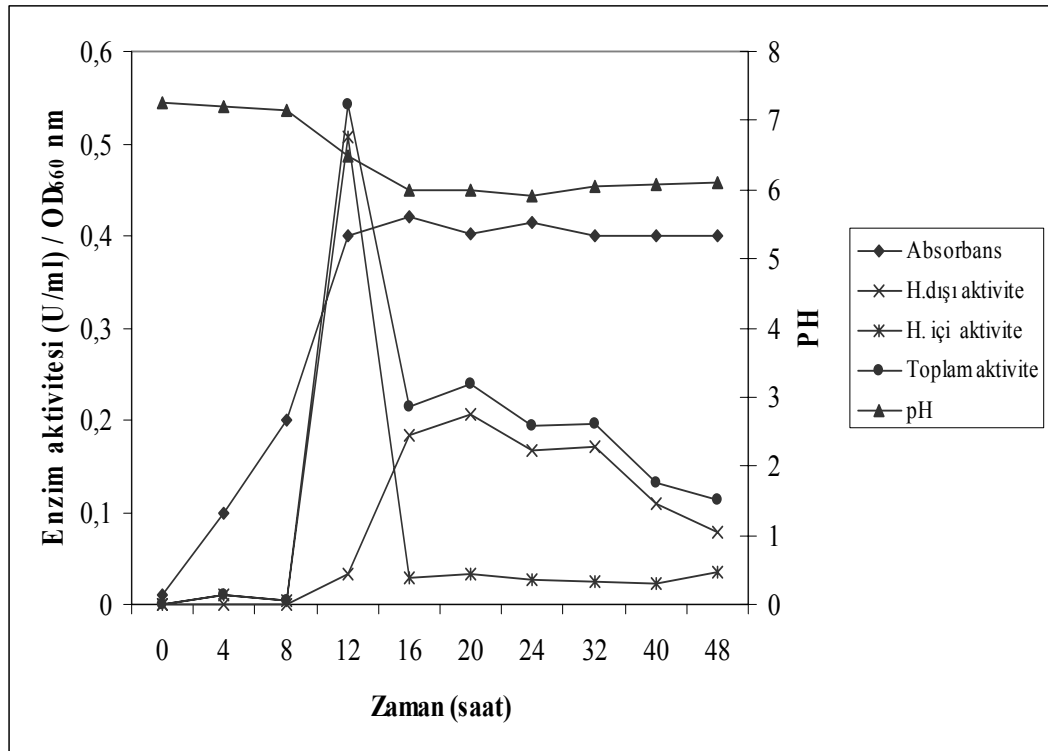
4.5 *Bacillus* spp. A333, A343, E134, F84a ve F84b İzolatlarının ve Standart *G. stearothermophilus* ATCC 12980 Suşunun 48 Saatlik Zamana Bağlı α -Glukozidaz Üretimleri

Yüksek enzim üretme kapasitesine sahip A333, A343, E134, F84a, F84b kodlu izolatlar ve ATCC 12980 kodlu standart suşun kültüründen 48 saatlik süreyle 0., 4., 8., 12., 16., 20., 24., 32., 40. ve 48. saatlerde alınan örneklerde bakteri üreme eğrisi, sporulasyon zamanı, hücre içi ve dışı α -glukozidaz aktivitesi ve besiyeri pH'ındaki değişim izlenmiştir. İzolatların α -glukozidaz üretimleri standart suş ile karşılaştırılarak belirlenmiş ve maksimum enzim üretim zamanı izolatlara göre değişiklik göstermiştir.

Bacillus sp. A333 izolatının zamana bağlı üreme eğrisi, besiyeri pH'ı ve α -glukozidaz üretimi değerleri çizelge 4.7'de gösterilmiş ve ayrıca şekil 4.6'da grafik halinde verilmiştir. *Bacillus* sp. A333 izolatı 4 saatlik bir lag fazına sahiptir. Bu bakteri 4-12. saatler arasında logaritmik üreme fazından sonra duraklama fazına girmektedir. Bakteri 20. saatin sonunda tamamen sporlanmaktadır. Metabolik üremeye bağlı olarak başlangıçta 7.3 olan besiyeri pH'ı 4. satten itibaren düşmüş ve 48. saatin sonunda 6 olarak ölçülmüştür. Bakteri lag fazı sonundaki 4. saatten itibaren hücre içinde α -glukozidaz üretimine başlamakta ve logaritmik üreme fazının sonuna kadar hücre içinde çok miktarda biriktirmekte, logaritmik fazın sonu olan 12. saatte hücre içi enzim miktarı maksimuma ulaşmaktadır. *Bacillus* sp. A333 izolatı logaritmik fazın sonu ile duraklama fazı başlangıcında hücre içindeki enzimi hücre dışına bırakmaya başlamakta, hücre dışındaki enzim miktarı duraklama fazının 16. saatinde maksimuma ulaşmakta ve bu evrede hücre içi enzim miktarı da buna paralel olarak azalmaktadır. Bu veriler ışığı altında, *Bacillus* sp. A333 izolatı, hücre içinde biriktirdiği α -glukozidaz enzimini duraklama fazı sonunda hücre dışına bırakması nedeniyle bir hücre dışı enzim üreticisi olarak tanımlanmıştır. Enzimin hücre içinde sentezlendikten sonra duraklama fazında hücre dışına bırakılması, daha önceki çalışmalarda saptandığı gibi hücre lizisi ile açıklanabilir (Suzuki *et al.* 1976a). Enzimin 16. saatten sonra hücre dışındaki aktifliği, besiyeri pH'ının ortalama 6 olduğu bu aralıkta uzun süre stabil kalabildiğini göstermektedir.

Çizelge 4.7 *Bacillus* sp. A333 izolatın zamana bağlı 48 saatlik üreme eğrisi, pH değişimi ve α -glukozidaz üretimi değerleri

İnkübasyon süresi (saat)	Bakteri absorbanı (OD ₆₀₀ nm)	Pelet yağı ağırlığı (g)	Hücre dışı sıvı pH _i	Hücre dışı enzim aktivitesi (U/ml)	Hücre içi enzim aktivitesi (U/ml)	Toplam enzim aktivitesi (U/ml)	Hücre dışı enzim aktivitesi/yağı ağırlık (U/ml/g)	Hücre içi enzim aktivitesi/yağı ağırlık (U/ml/g)	Toplam enzim aktivitesi/yağı ağırlık (U/ml/g)
0	0,010	<0,001	7,26	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
4	0,1	0,005	7,19	<0,001	0,01	0,01	<0,001	0,87	0,87
8	0,2	0,006	7,15	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,86	0,86
12	0,4	0,018	6,48	0,03	0,51	0,54	1,89	28,22	30,10
16	0,42	0,013	5,98	0,18	0,03	0,21	14,14	2,29	16,43
20	0,403	0,015	5,98	0,21	0,03	0,24	13,73	2,23	15,96
24	0,414	0,018	5,91	0,17	0,03	0,19	9,59	1,50	11,09
32	0,4	0,022	6,04	0,17	0,02	0,20	7,80	1,09	8,90
40	0,4	0,027	6,07	0,11	0,02	0,13	4,04	0,84	4,89
48	0,4	0,027	6,09	0,08	0,04	0,11	2,87	1,33	4,20

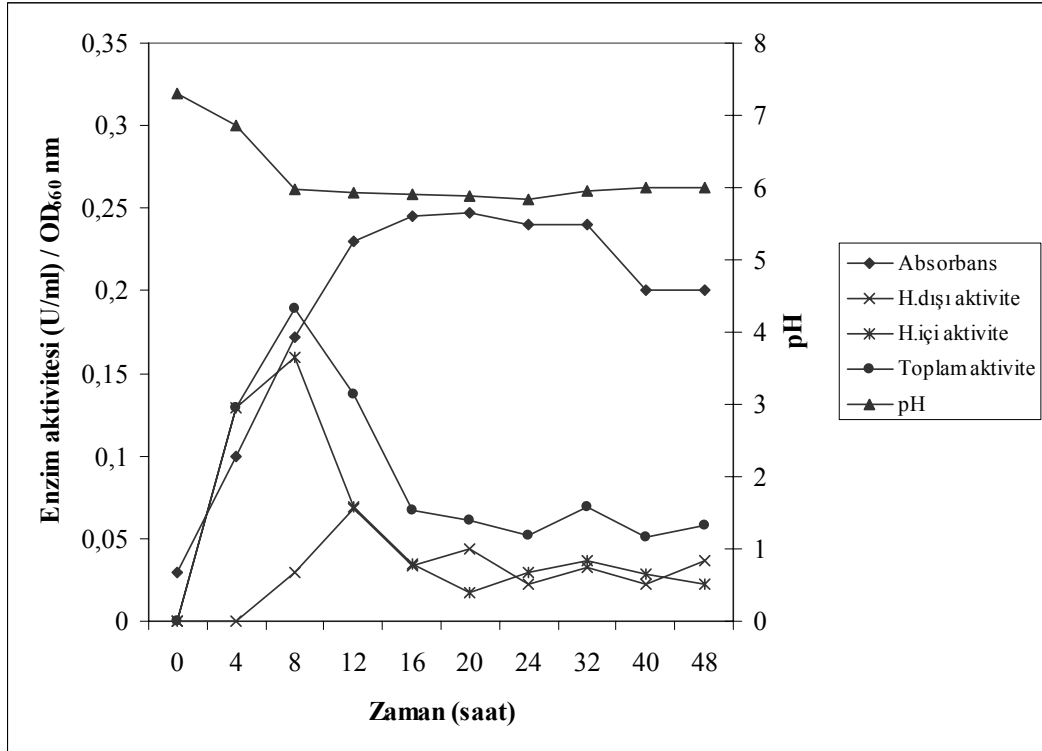


Şekil 4.6 *Bacillus* sp. A333 izolatının zamana bağlı 48 saatlik üreme eğrisi, pH değişimi ve α -glukozidaz üretimi değerleri grafiği

Bacillus sp. A343 izolatının zamana bağılı üreme eğrisi, besiyeri pH'ı ve α -glukozidaz üretimi değerleri çizelge 4.8'de verilmiş olup bu değerler ayrıca şekil 4.7'de grafik halinde gösterilmiştir. *Bacillus sp.* A343 izolatı ilk 4 saatlik lag fazından sonra 4-12. saatler arası logartimik üreme fazına, 12. saaatten sonra da duraklama fazına girmektedir. İzolat 20. saatin sonunda tamamem sporlanmaktadır. Besiyeri pH'ı başlangıçta 7.2 ölçülürken, metabolik üremeye bağılı olarak 8. saatte 5.2'ye kadar düşmektedir. *Bacillus sp.* A343 izolatında α -glukozidaz sentezi, A343 izolatından farklı olarak hücre içinde logaritmik fazın başlangıcındaki 4. saatte maksimuma ulaşmaktadır. Bu maksimum üretim zamanından sonra hücre içindeki enzim miktarı hızlıca düşüş göstermektedir. Enzim logaritmik fazın 8. saatinde bir miktar hücre dışına bırakılmakta ve bundan sonra hücre içi enzim ile hücre dışı enzim üretim miktarı 48. saat sonuna kadar azalarak devam etmektedir. Enzimin hücre içindeki miktarının, logaritmik fazın ilk 4. saattinden itibaren maksimuma ulaşması ve hücre dışına salınımının düşük olması nedeni ile *Bacillus sp.* A343 izolatı hücre içi enzim üreticisi bir bakteri olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 4.8 *Bacillus* sp. A343 izolatının zamana bağlı 48 saatlik üreme eğrisi, pH değişimi ve α -glukozidaz üretimi değerleri

İnkübasyon süresi (saat)	Bakteri absorbansı (OD ₆₀₀ nm)	Pelet yağı ağırlığı (g)	Hücre dışı üst sıvı pH ₁	Hücre dışı enzim aktivitesi (U/ml)	Hücre içi enzim aktivitesi (U/ml)	Toplam enzim aktivitesi (U/ml)	Hücre dışı enzim aktivitesi/yağı ağırlık (U/ml/g)	Hücre içi enzim aktivitesi/yağı ağırlık (U/ml/g)	Toplam enzim aktivitesi/yağı ağırlık (U/ml/g)
0	0,0293	<0,001	7,31	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
4	0,1	0,011	6,85	<0,001	0,13	0,13	<0,001	11,76	11,76
8	0,172	0,025	5,97	0,03	0,16	0,19	1,19	6,40	7,59
12	0,23	0,026	5,94	0,07	0,07	0,14	2,64	2,66	5,29
16	0,245	0,019	5,90	0,03	0,03	0,07	1,93	1,80	3,73
20	0,247	0,022	5,89	0,04	0,02	0,06	1,90	0,78	2,68
24	0,24	0,023	5,84	0,02	0,03	0,05	0,98	1,27	2,25
32	0,24	0,02	5,96	0,03	0,04	0,07	1,60	1,84	3,44
40	0,2	0,025	6,00	0,02	0,03	0,05	1,41	1,13	2,54
48	0,2	0,022	5,99	0,04	0,02	0,06	1,64	1,01	2,65

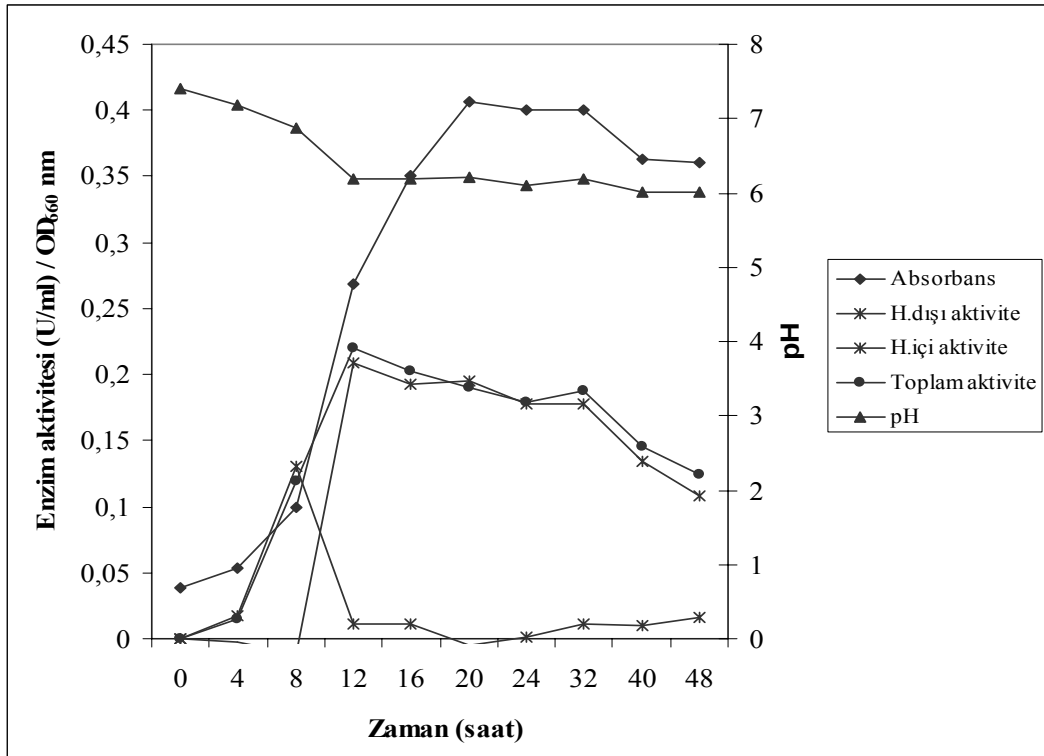


Şekil 4.7 *Bacillus* sp. A343 izolatının zamana bağlı 48 saatlik üreme eğrisi, pH değişimi ve α -glukozidaz üretimi değerleri grafiği

Bacillus sp. F84a izolatının zamana bağlı üreme eğrisi, besiyeri pH'ı ve α -glukozidaz üretimi değerleri çizelge 4.9'da gösterilmiş ve ayrıca şekil 4.8'de grafik halinde verilmiştir. *Bacillus* sp. F84a izolatı 4 saatlik bir lag faza sahiptir. Bu bakteri 8-16. saatler arasında logartimik fazdan sonra duraklama fazına girmektedir. Mikroorganizma 20. saatten sonra tamamen sporlanmaktadır. Bu süre bitiminde, metabolik faaliyetlere bağlı olarak besiyeri pH'ı 7.4'den 6.02'ye düşmüştür. Enzimin hücre içindeki sentezi, 4. saatte başlayıp lag fazının sonu ile logartimik fazın başlangıcı olan 8. saatte maksimuma ulaşmaktadır. Duraklama fazının 12. saatine kadar hücre dışında çok düşük seviyede ölçülen α -glukozidaz miktarı, 12. saatte aniden besiyerine bırakılmakta ve hücre dışında maksimum seviyeye ulaşmaktadır. Hücre dışı enzim aktivitesi duraklama fazının sonuna kadar yüksek miktarda ölçülürken, hücre içi enzim miktarı buna paralel olarak oldukça azalmaktadır. F84a izolatının α -glukozidaz üretimini 8. saatte hücre içinde başlatıp 12. saatte hücre dışına bırakması, bize bir hücre dışı α -glukozidaz üreticisi olduğunu göstermektedir. Hücre lizisine bağlı olarak hücre dışına bırakılan enzim, süre sonunda ortam pH'ının 6 civarında olmasından dolayı hücre dışındaki aktivasyonunu devam ettirebilmektedir.

Çizelge 4.9 *Bacillus* sp. F84a izolatının zamana bağlı 48 saatlik üreme eğrisi, pH değişimi ve α -glukozidaz üretimi değerleri

İnkübasyon süresi (saat)	Bakteri absorbanı (OD ₆₆₀ nm)	Pelet yaşı ağırlığı (g)	Hücre dışı üst sıvı pH'ı	Hücre dışı enzim aktivitesi (U/ml)	Hücre içi enzim aktivitesi (U/ml)	Toplam enzim aktivitesi (U/ml)	Hücre dışı enzim aktivitesi/yaşı ağırlık (U/ml/g)	Hücre içi enzim aktivitesi/yaşı ağırlık (U/ml/g)	Toplam enzim aktivitesi/yaşı ağırlık (U/ml/g)
0	0,039	<0,001	7,4	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
4	0,054	0,003	7,19	<0,001	0,02	0,02	<0,001	5,71	5,07
8	0,1	0,012	6,88	<0,001	0,13	0,12	<0,001	10,86	9,92
12	0,269	0,008	6,19	0,21	<0,001	0,22	26,06	1,44	27,50
16	0,35	0,01	6,19	0,19	0,01	0,20	19,22	1,06	20,28
20	0,407	0,015	6,2	0,19	<0,001	0,19	12,98	0,20	13,18
24	0,4	0,012	6,1	0,18	<0,001	0,18	14,80	0,10	14,90
32	0,4	0,019	6,19	0,18	0,01	0,19	9,34	0,57	9,91
40	0,363	0,022	6,02	0,13	0,01	0,14	6,12	0,47	6,58
48	0,36	0,027	6,02	0,11	0,02	0,12	4,01	0,61	4,61

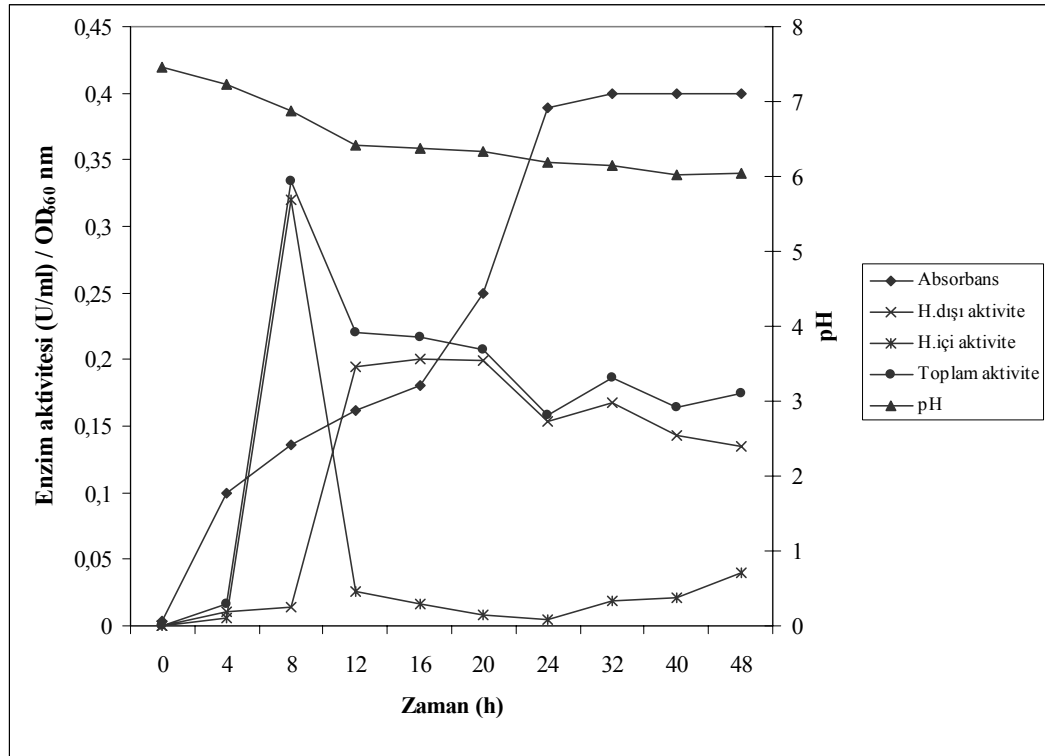


Şekil 4.8 *Bacillus* sp. F84a izolatının zamana bağlı 48 saatlik üreme eğrisi, pH değişimi ve α -glukozidaz üretimi değerleri grafiği

Bacillus sp. F84b izolatının zamana bağlı üreme eğrisi, besiyeri pH'ı ve α -glukozidaz üretimi değerleri çizelge 4.10'da gösterilmiş ve ayrıca şekil 4.9'da grafik halinde verilmiştir. *Bacillus* sp. F84b izolatı da A333 ve F84a izolatlarına benzer şekilde hücre dışı enzim üretmektedir. İzolat, 4 saatlik bir lag fazı içermektedir. Bu bakteri 8-20. saatler arasında logaritmik üreme fazından sonra duraklama fazına girmektedir. Başlangıçta 7.46 olarak ölçülen besiyeri pH'ı 6.04'e düşmektedir. İzolat 20. saatten sonra tamamen sporlanmaktadır. Logaritmik fazın başlangıcı olan 8. saatte bakterideki hücre içi α -glukozidaz miktarı maksimum seviyeye ulaşmaktadır. Logaritmik fazın 12. saatinde hücre içindeki enzim seviyesi düşerken, hücre dışında maksimuma ulaşmakta ve hücre dışındaki enzim, duraklama fazının sonuna kadar aktivitesine devam etmektedir. Bu verilere bağlı olarak F84b izolatı da hücre dışı enzim üreticisi bir bakteri olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 4.10 *Bacillus* sp. F84b izolatının zamana bağlı 48 saatlik üreme eğrisi, pH değişimi ve α -glukozidaz üretimi değerleri

İnkübasyon süresi (saat)	Bakteri absoransı (OD ₆₆₀ nm)	Pelet yağı ağırlığı (g)	Hücre dışı üst sıvı pH ₁	Hücre dışı enzim aktivitesi (U/ml)	Hücre içi enzim aktivitesi (U/ml)	Toplam enzim aktivitesi (U/ml)	Hücre dışı enzim aktivitesi/yağı ağırlık (U/ml/g)	Hücre içi enzim aktivitesi/yağı ağırlık (U/ml/g)	Toplam enzim aktivitesi/yağı ağırlık (U/ml/g)
0	0,003	<0,001	7,46	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
4	0,1	0,003	7,23	0,01	0,01	0,02	3,61	1,99	5,60
8	0,136	0,017	6,88	0,01	0,32	0,33	0,85	18,83	19,68
12	0,162	0,008	6,41	0,19	0,03	0,22	24,30	3,24	27,53
16	0,18	0,01	6,37	0,20	0,02	0,22	19,98	1,64	21,63
20	0,25	0,011	6,34	0,20	0,01	0,21	18,10	0,76	18,86
24	0,389	0,013	6,18	0,15	0,01	0,16	12,89	0,40	13,29
32	0,4	0,016	6,15	0,17	0,02	0,19	9,57	1,96	11,53
40	0,4	0,024	6,03	0,14	0,02	0,16	5,97	0,89	6,86
48	0,4	0,031	6,04	0,13	0,04	0,17	4,34	1,28	5,62

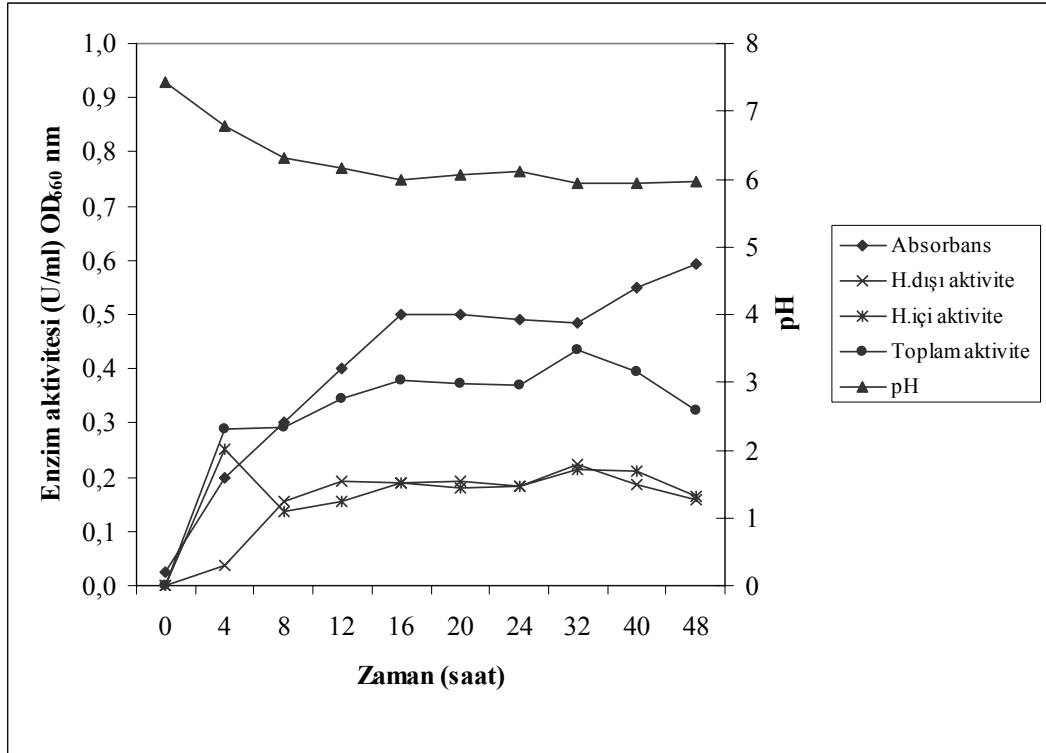


Şekil 4.9 *Bacillus* sp. F84b izolatının zamana bağlı 48 saatlik üreme eğrisi, pH değişimi ve α -glukozidaz üretimi değerleri grafiği

Bacillus sp. E134 izolatının zamana bağılı üreme eğrisi, besiyeri pH'ı ve α -glukozidaz üretimi değerleri çizelge 4.11'de gösterilmiş ve ayrıca şekil 4.10'da grafik halinde verilmiştir. *Bacillus* sp. E134 izolatı, 4. saate kadar olan lag fazından sonra 16. saate kadar logaritmik üreme fazı, 16. saatten sonra da duraklama fazına girmektedir. Mikroorganizma 20. saatten sonra tamamen sporlanmaktadır. Başlangıçta 7.44 olan besiyeri pH'ı 48 saat sonunda 5.97'ye kadar düşmüştür. Lag fazının sonundaki 4. saatte hücre içi α -glukozidaz üretimi maksimuma ulaşmakta ve logaritmik fazın 8. saatinden itibaren hücre içi enzim hücre dışına bırakılmaktadır. Fakat şu ana kadar bahsedilen diğer izolatlardan farklı olarak hücre içi ve hücre dışı enzim miktarı 8. saatten 48. saatin sonuna kadar birbirine oldukça yakın değerlerde ve daha düşük oranda azalarak devam etmektedir. Mezofilik suşlar olan *Bacillus* LMM-12 (Arellano-Carbajal and Olmos-Soto 2002) ve *B. amyloliquefaciens* (Urlaub and Wober 1978) ile yapılan çalışmalarda olduğu gibi E134 izolatının sergilediği α -glukozidaz üretimi, ne hücre içi ne de hücre dışı tanıma uymamakta, hücreye bağılı şekilde bulunmakta ve enzim lag fazı başlangıcında maksimum seviyede sentezlendikten sonra logaritmik fazda hücre içerisinde belli oranda kalırken hücre dışına yakın miktarda bırakılmaktadır. Daha önce rapor edilen termofilik *Bacillus* türlerinden sadece *G. thermodenitrificans* HR010 suşunun hücre membranı ile ilişkili olarak hem hücre içi ve hem de hücre dışı enzim ürettiği belirlenmiştir (Ezeji *et al.* 2005). Bu nedenle E134 izolatı, şu ana kadar hem hücre dışı hem de membrana bağılı α -glukozidaz ürettiği bildirilen nadir termofilik *Bacillus* izolatlarından biridir.

Çizelge 4.11 *Bacillus* sp. E134 izolatının zamana bağlı 48 saatlik üreme eğrisi, pH değişimi ve α -glukozidaz üretimi değerleri

İnkübasyon süresi (saat)	Bakteri absorbansı (OD ₆₀₀ nm)	Pelet yağı ağırlığı (g)	Hücre dışı üretilen pH ₁	Hücre dışı enzim aktivitesi (U/ml)	Hücre içi enzim aktivitesi (U/ml)	Toplam enzim aktivitesi (U/ml)	Hücre dışı enzim aktivitesi/yağı ağırlık (U/ml/g)	Hücre içi enzim aktivitesi/yağı ağırlık (U/ml/g)	Toplam enzim aktivitesi/yağı ağırlık (U/ml/g)
0	0,026	<0,001	7,44	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
4	0,198	0,014	6,78	0,04	0,25	0,29	2,75	17,96	20,71
8	0,3	0,021	6,31	0,15	0,14	0,29	7,34	6,57	13,92
12	0,4	0,025	6,16	0,19	0,15	0,35	7,68	6,15	13,83
16	0,5	0,027	5,99	0,19	0,19	0,38	6,99	7,05	14,04
20	0,5	0,028	6,05	0,19	0,18	0,37	6,89	6,47	13,36
24	0,491	0,034	6,1	0,18	0,18	0,37	5,41	5,42	10,83
32	0,485	0,039	5,95	0,22	0,21	0,44	5,70	5,47	11,17
40	0,55	0,037	5,95	0,19	0,21	0,40	5,01	5,67	10,68
48	0,594	0,036	5,97	0,16	0,16	0,32	4,44	4,56	9,00

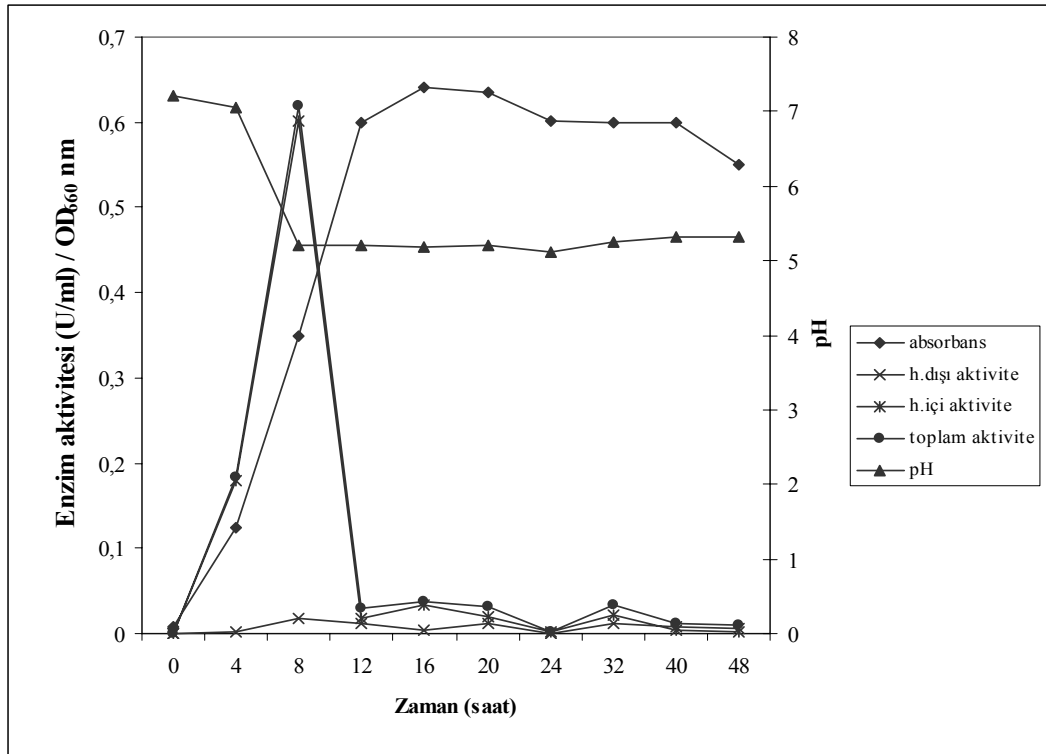


Şekil 4.10 *Bacillus* sp. E134 izolatının zamana bağlı 48 saatlik üreme eğrisi, pH değişimi ve α -glukozidaz üretimi değerleri grafiği

G. stearothermophilus ATCC 12980 suşunun zamana bağlı üreme eğrisi, besiyeri pH'ı ve α -glukozidaz üretimi değerleri çizelge 4.12'de gösterilmiş ve ayrıca şekil 4.11'de grafik halinde verilmiştir. Standart α -glukozidaz üreticisi *G. stearothermophilus* ATCC 12980 suşu hücre içi α -glukozidaz üreticisi bir bakteri olarak bilinmektedir (Suzuki *et al.* 1976b). Bu mikroorganizmanın 48 saatlik üreme eğrisine göre 4 saatlik lag fazından sonra 12. saate kadar logaritmik faza, 12. saatten sonra da duraklama fazına girmiştir. Besiyeri pH'ı başlangıçta 7.2 iken 8. saatte 5.2'ye düşmüştür. ATCC 12980 suşu, logaritmik fazın başlangıcından itibaren α -glukozidaz üretmekte olup 4. saatte enzim sentezi hücre içinde en yüksek seviyeye çıkmaktadır. Sekizinci saatten itibaren besiyeri sıvısında az miktarda enzim aktivitesi ölçülmeye başlanmıştır. İlk 4 ile 8. saatler arasında hücre içinde çok yüksek oranlarda üretilen enzim miktarı, 12. saatten itibaren hem hücre içinde hem de hücre dışında ani bir şekilde düşmüştür. Enzim 8. saatten sonra bir miktar hücre dışına bırakılsa da ortam pH'ının stabilitesini etkilemesinden dolayı, hücre dışında uzun süre stabilitesini koruyamadığından kısa sürede aktivasyonunu yitirmektedir .

Çizelge 4.12 *G. stearothermophilus* ATCC 12980 numaralı standart suşun zamana bağlı 48 saatlik üreme eğrisi, pH değişimi ve α -glukozidaz üretimi değerleri

İnkübasyon süresi (saat)	Bakteri absorbanansı (OD ₆₆₀ nm)	Pelet yaş ağırlığı (g)	Hücre dışı üst sıvı pH'ı	Hücre dışı enzim aktivitesi (U/ml)	Hücre içi enzim aktivitesi (U/ml)	Toplam enzim aktivitesi (U/ml)	Hücre dışı enzim aktivitesi/yaş ağırlık (U/ml/g)	Hücre içi enzim aktivitesi/yaş ağırlık (U/ml/g)	Toplam enzim aktivitesi/yaş ağırlık (U/ml/g)
0	0,007	<0,001	7,21	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
4	0,124	0,008	7,05	<0,001	0,18	0,18	0,26	22,54	22,80
8	0,35	0,027	5,21	0,02	0,60	0,62	0,63	22,27	22,90
12	0,6	0,024	5,21	0,01	0,02	0,03	0,50	0,74	1,23
16	0,64	0,024	5,18	<0,001	0,03	0,04	0,20	1,40	1,60
20	0,635	0,023	5,21	0,01	0,02	0,03	0,51	0,84	1,35
24	0,601	0,025	5,12	<0,001	<0,001	<0,001	0,20	0,10	0,30
32	0,6	0,021	5,25	0,01	0,02	0,03	0,53	1,04	1,57
40	0,6	0,021	5,32	0,01	0,00	0,01	0,42	0,15	0,57
48	0,55	0,023	5,32	0,01	<0,001	0,01	0,30	0,11	0,41



Şekil 4.11 *G. stearothermophilus* ATCC 12980 numaralı standart suşun zamana bağlı 48 saatlik üreme eğrisi, pH değişimi ve α -glukozidaz üretim değerleri grafiği

Standart suşun ve izolatların 48 saatlik sürede pelet yaş ağırlığı başına düşen α -glukozidaz üretimleri (U/ml/g) çizelge 4.13’de birbirleriyle kıyaslanmıştır. Buna göre *Bacillus* sp. A333 hücre dışı α -glukozidaz üreticisi olup 12. saatte enzimi hücre içinde üretip 16. saatten sonra hücre dışına bırakmaktadır. Hücre dışı enzim üreten F84a ve F84b izolatları, 8. saatte hücre içinde α -glukozidazı üretip 12. saatte hücre dışına salgılamaktadır. Şu ana kadar termofilik *Bacillus* suşları ile yapılan çalışmalarda hemen hemen hepsinin hücre içi enzim ürettiği görülmüştür. Sadece Suzuki ve arkadaşlarının *B. thermoamyloliquefaciens* KP1071 suşu ile yaptıkları bir çalışmada sentezlenen α -glukozidaz I enziminin hücre dışından saflaştırıldığı rapor edilmiştir (Suzuki *et al.* 1992). *G. thermoglucosidasius* suşu ile yapılan bir başka çalışmada oligo-1,6-glukozidaz enziminin, *Bacillus* sp. A333, F84a ve F84b izolatlarındaki α -glukozidazlar gibi hücre içinde sentezlenip, logartimik fazın sonunda lizise bağlı olarak hücre dışına bırakıldığı belirlenmiştir (Suzuki *et al.* 1976a). Bu nedenlerle, *Bacillus* sp. A333, F84a

ve F84b izolatları, termofilik *Bacillus* türleri arasında hücre dışına α -glukozidaz bırakan nadir termostabil α -glukozidaz üreticisi bakteriler olarak değerlendirilebilir.

Bacillus sp. A343'ün, ATCC 12980 numaralı standart suş gibi 4. saatte hücre içinde yüksek oranda α -glukozidaz sentezlediği saptanmış ve hücre içi enzim üreticisi olarak adlandırılmıştır. Ancak *Bacillus* sp. A343 α -glukozidazının, standart enzimden farklı olarak ortam pH'ından daha az etkilenip daha uzun süre stabil kalabildiği görülmektedir.

Hücre içi α -glukozidaz üreticisi A343 izolatı ve ATCC 12980 suşu ile hücre dışı enzim üreticisi A333, F84a ve F84b izolatlarından farklı olarak, E134 izolatının hem hücre dışı hem de hücreye bağlı α -glukozidaz ürettiği belirlenmiştir. İzolat, 4. saatte enzimi hücre içinde üretmeye başlamakta ve 8. saatte bu enzimin bir kısmını hücre dışına bırakmaya başlamaktadır. Bunun yanında *Bacillus* sp. A343 ve E134 izolatlarının, ATCC 12980 suşuna benzer şekilde gelişme evrelerinin 4. saati gibi erken bir dönemde hücre içinde maksimum α -glukozidaz üretmeleri, endüstriyel boyutta enzim üretimi için aranan bir özelliktir.

Çizelge 4.13 *Bacillus* sp. A333, A343, E134, F84a, F84b izolatlarının ve standart suşun zamana bağlı 48 saatlik kültürlerinden elde edilen hücre içi ve dışı enzim aktivitesi/yaş ağırlık (U/ml/g) sonuçları

Bakteri	Hücre içi/ dışı	4.h	8.h	12.h	16.h	20.h	24.h	32.h	40.h	48.h
A333	Hücre içi	0,87	0,86	28,22	2,29	2,23	1,50	1,09	0,84	0,96
	Hücre dışı	<0,01	<0,01	1,89	14,14	13,73	9,59	7,8	4,04	2,87
A343	Hücre içi	11,76	6,4	2,66	1,80	0,78	1,27	1,84	1,13	1,01
	Hücre dışı	<0,01	1,19	2,64	1,93	1,9	0,98	1,6	1,41	1,64
E134	Hücre içi	17,96	6,57	6,15	7,05	6,47	5,42	5,47	5,67	4,56
	Hücre dışı	2,75	7,34	7,68	6,99	6,89	5,41	5,7	5,01	4,44
F84a	Hücre içi	5,71	10,86	1,44	1,06	0,20	0,10	0,57	0,47	0,61
	Hücre dışı	<0,01	<0,01	26,06	19,22	12,98	14,8	9,34	6,12	4,01
F84b	Hücre içi	1,99	18,83	3,24	1,64	0,76	0,40	1,96	0,89	1,28
	Hücre dışı	3,61	0,85	24,3	19,98	18,1	12,89	9,57	5,97	4,34
ATCC 12980	Hücre içi	22,54	22,27	0,74	1,40	0,84	0,10	1,04	0,15	0,11
	Hücre dışı	0,26	0,63	0,5	0,2	0,51	0,2	0,53	0,42	0,3

Sonuç olarak zamana bağılı α -glukozidaz üretim değerleri belirlenen beş izolatın hücre dışı, hücre içi ve hücreye bağılı formlarda olmak üzere farklı şekillerde enzim ürettikleri görülmüştür. α -Glukozidaz üretiminde görülen farklılıklar ve özellikle hücre dışı ile hücreye bağılı enzim üretim şeklinin daha önce sadece birkaç *Bacillus* suşunda rapor edilmiş olması, bu çalışmada elde edilen *Bacillus* izolatlarının bu açıdan önemli α -glukozidaz üreticisi bakteriler olduğu söylenebilir.

Çalışmanın bu evresine kadar elde edilen veriler sonucunda, bundan sonraki α -glukozidazların kısmen saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmalarında, hücre dışı enzim üreticisi olarak *Bacillus* sp. A333 ve hücre içi enzim üreticisi olarak *Bacillus* sp. A343 izolatları seçilmiştir.

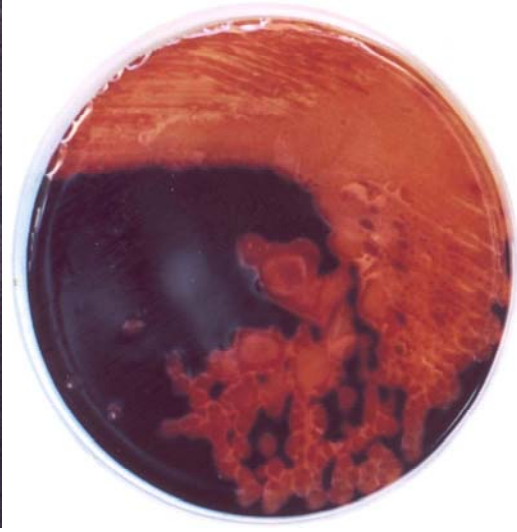
4.6 *Bacillus* sp. A333 ve A343 izolatları ve Standart Suşların Biyokimyasal ve Morfolojik Test Sonuçları

Bacillus sp. A333 ve *Bacillus* sp. A343 izolatlarının ve standart suşların cins düzeyinde farklılıklarını belirlemek amacı ile biyokimyasal ve morfolojik testleri yapılmıştır. Şekil 4.12-4.14’de sırası ile bu izolatlara ve *G. stearothermophilus* ATCC 12980 suşuna ait faz kontrast mikroskopisi, NA besiyerindeki koloni morfolojileri ve amilaz aktivitesi resimleri verilmiştir. A333 izolatının NA besiyerinde yuvarlak, dalgalı kenarlı, basık dikey görünümlü, kuru tozumsu yüzey görünümlü ve krem renkli koloni morfolojisi içerdiği, MI nişastalı besiyerinde opak amilolitik zon oluşturduğu ve terminal eliptik endosporlu basil olduğu; A343 izolatının NA besiyerinde yuvarlak, düz kenarlı, göbekli, düz yüzey görünümlü ve sarı renkli koloni morfolojisine sahip olduğu, MI nişastalı besiyerinde şeffaf amilolitik zon oluşturduğu ve terminal eliptik endosporlu basil olduğu belirlenmiştir. *G. stearothermophilus* ATCC 12980 suşunun NA besiyerinde yuvarlak, düz kenarlı, kabarık dikey görümlü, düz yüzey görünümlü ve krem renkli koloni morfolojisine sahip olduğu, MI nişastalı besiyerinde şeffaf amilolitik zon oluşturduğu ve terminal eliptik endosporlu basil olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak A343 izolatının standart *G. stearothermophilus* ATCC 12980’e amilaz aktivitesi yönünden benzerlik gösterdiği; izolatların ve standardın koloni morfolojisine ait diğer özellikler yönünden farklılaştığı görülmektedir.

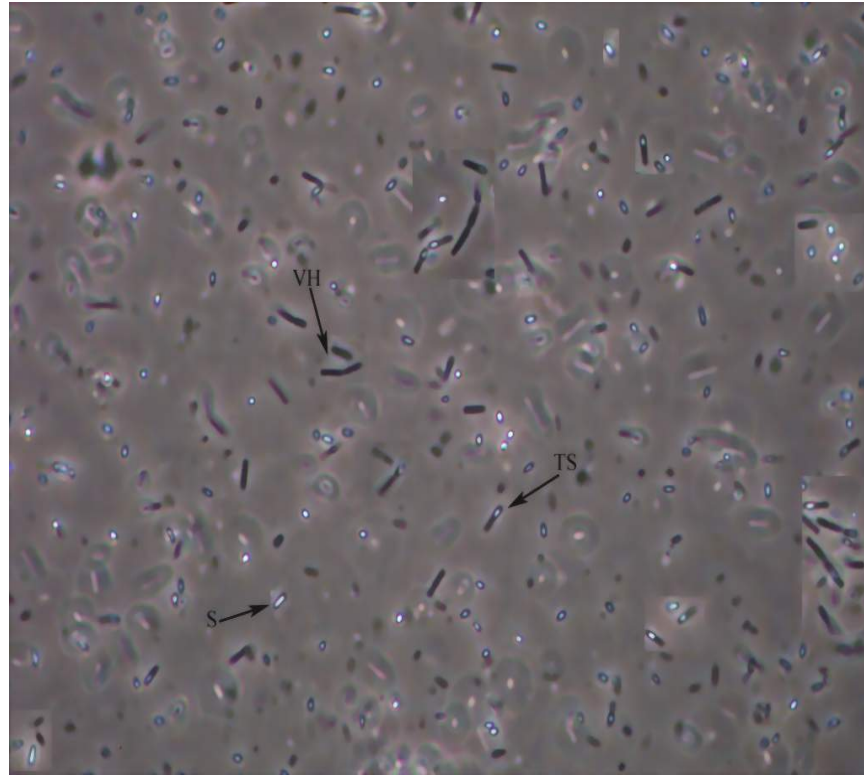
Bu izolatların ve standart suşların sıcaklık ile pH istekleri, tuza toleransları ve şeker fermentasyon testlerine ait biyokimyasal test sonuçları çizelge 4.14’de gösterilmiştir. Test sonuçlarına bakıldığında *Bacillus* cinsinin ortak karakterlerine sahip olmalarına rağmen *Bacillus* sp. A333 ve A343 izolatlarının birbirinden farklı olmalarının yanında test edilen tüm standart suşlardan farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir (Suzuki *et al.* 1976a, Claus and Berkeley 1984, Nazina *et al.* 2001, Beldüz *et al.* 2003).



a



b



c

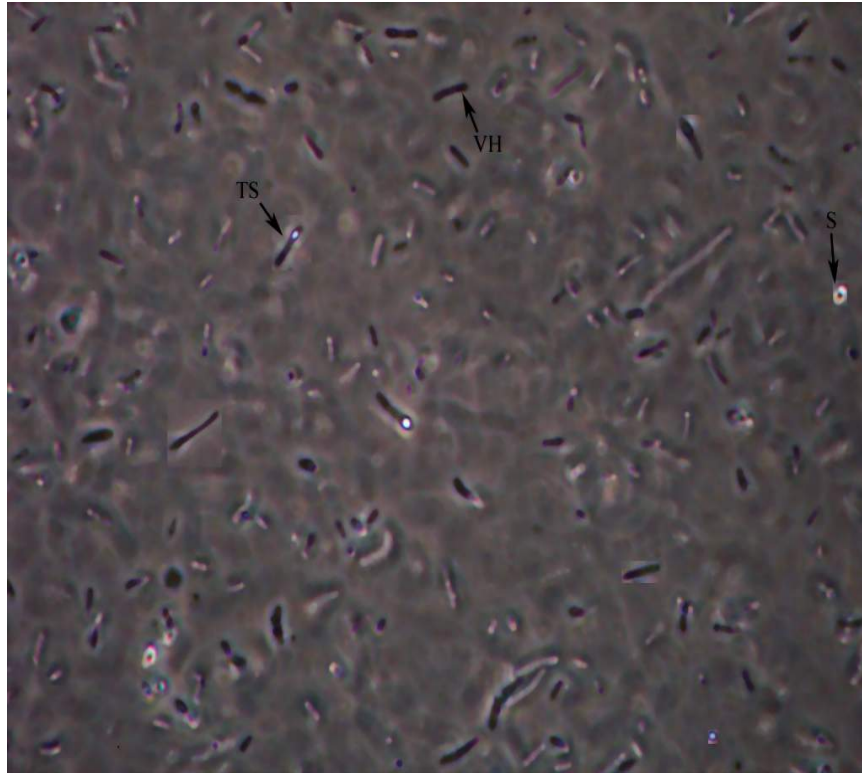
Şekil 4.12 *Bacillus* sp. A333'ün a. 18 saatlik NA besiyerindeki üremesi, b. MI besiyerinde iyot ile test edilmiş amilaz aktivitesi ve c. NB besiyerindeki 24 saatlik faz kontrast mikroskop görüntüsü (VH, vejetatif hücre; S, spor; TE, terminal endospor), (- : bar 1 μm 'yi ifade etmektedir)



a



b

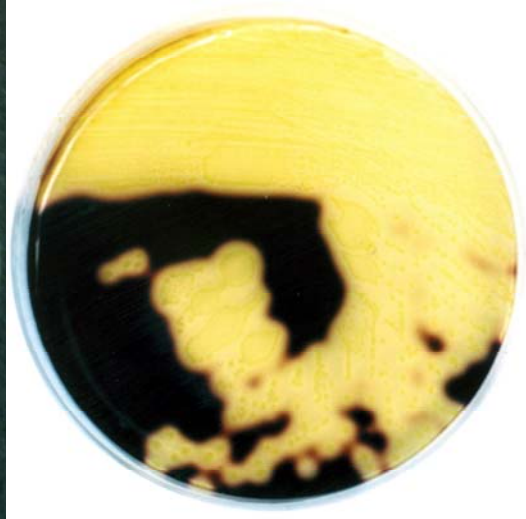


c

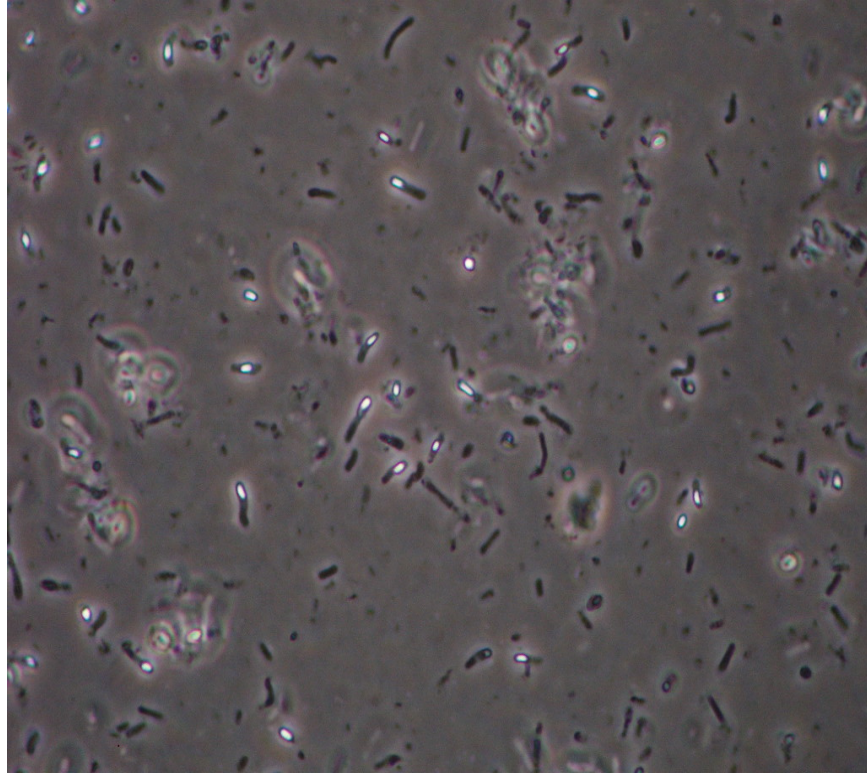
Şekil 4.13 *Bacillus* sp. A343'ün a. 18 saatlik NA besiyerindeki üremesi, b. MI besiyerindeki iyot ile test edilmiş amilaz aktivitesi ve c. NB besiyerindeki 24 saatlik faz kontrast mikroskop görüntüsü (VH, vejetatif hücre; S, spor; TE, terminal endospor), (- : bar 1 μm 'yi ifade etmektedir)



a



b



c

Şekil 4.14 *G. stearothermophilus* ATCC 12980'in a. 18 saatlik NA besiyerindeki üremesi b. MI besiyerindeki iyot ile test edilmiş amilaz aktivitesi ve c. NB besiyerindeki 24 saatlik faz kontrast mikroskop görüntüsü (- : bar 1 μm 'yi ifade etmektedir)

Çizelge 4.14 *Bacillus* sp. A333 ve A343 izolatları ile standart *Bacillus* türlerine ait biyokimyasal test sonuçları

[illegible]

Çizelge 4.14 *Bacillus* sp. A333 ve A343 izolatları ile standart *Bacillus* türlerine ait biyokimyasal test sonuçları (devam)

	<u>Bakteri numarası</u>										
<u>Test adı</u>	<i>G. str.</i> ATCC 12980	<i>G. str.</i> ATCC 43223	<i>G. str.</i> ATCC 7953	<i>G. thr.</i> DSM 2542	<i>A. fla.</i> DSM 2641	<i>A. kes.</i> NCIB 13971	<i>A gon.</i> NCIB 13933	<i>A. ayd.</i> NCIB 13972	<i>B.amyl</i> DSM 7	A333	A343
Şekerlerden asit oluşumu											
Maltoz	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
D-Fruktoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Laktoz	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
Glukoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glukoz'dan gaz oluşumu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-(+)-Galaktoz	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-
Sakkaroz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
D-(+)-Ksiloz	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
D-(+)-Mannoz	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
D-Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
L-Arabinose	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Raffinose	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
D-(-)-Mannitol	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

Not: Standart suşların tür adları; **G. str.:** *G. stearothermophilus* ATCC 12980, *G. stearothermophilus* ATCC 43223, *G. stearothermophilus* ATCC 7953, *G. thr.:* *G. thermoglucosidasius* DSM 2542, *A. fla.:* *A. flavothermus* DSM 2641, *A. kes.:* *A. kestanbolensis* NCIB 13971, *A. gon.:* *A. gonensis* NCIB 13933, *A. ayd.:* *A. ayderensis* NCIB 13972, *B. amyl.:* *B. amyloliquefaciens* DSM 7'dir.

4.7 α -Glukozidaz Saflaştırma Sonuçları

Bacillus sp. A333 izolatına ait hücre dışı α -glukozidaz enzimi besiyeri sıvısından %71 verimle ve 2.7 kat amonyum sülfat presipitasyonu ile kısmi olarak saflaştırılmış olup saflaştırma basamakları çizelge 4.15’de verilmiştir. *Bacillus* sp. A343 izolatına ait hücre içi α -glukozidaz enzimi ise sonikasyon sonrası üst sıvıdan %60 verimle 1.27 kat saflaştırılmış olup saflaştırma basamakları çizelge 4.16’de verilmiştir. Her iki enzim kıyaslandığında *Bacillus* sp. A333 α -glukozidazı hücre dışı bir enzim olması nedeniyle daha yüksek oranda saflaştırılmasına rağmen, *Bacillus* sp. A343 izolatına göre daha düşük bir spesifik aktiviteye sahiptir. Bunun tersine *Bacillus* sp. A343 α -glukozidazı hücre içi bir enzim olduğundan sonikasyon sonrası daha fazla miktarda proteinin ortama katılması nedeniyle daha düşük oranda saflaştırıldığı halde spesifik aktivitesi daha yüksek bulunmuştur.

Daha önce yapılan amonyum sülfat presipitasyonu çalışmalarında α -glukozidazlar ham ekstraktan 1 ile 4 kat arası kısmen saflaştırılabilmektedir (Suzuki *et al.* 1984, Murakami *et al.* 1998, Hung *et al.* 2005). *G. thermoglucosidasius* KP1006 suşunun oligo-1,6-glukozidaz enzimi, besiyeri sıvısından %40-75 amonyum sülfat presipitasyonu ile 1.18 kat saflaştırılmıştır (Suzuki *et al.* 1984). Murakami ve arkadaşları (1998), hücre içi bir enzim olan *B. flavocaldarius* KP1228 α -glukozidazını %20-40 amonyum sülfat presipitasyonu ile sonikasyon sonrası üst sıvıdan 2.9 kat saflaştırdıklarını rapor etmişlerdir. Bir başka araştırmada, *Geobacillus* HTA462 α -glukozidazının %60 amonyum sülfat presipitasyonu ile sonikasyon sonrası üst sıvıdan 1.5 kat saflaştırıldığı belirtilmiştir (Hung *et al.* 2005).

Çizelge 4.15 *Bacillus* sp. A333 hücre dışı α -glukozidazının amonyum sülfatla saflaştırma basamakları

Saflaştırma basamakları	Hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Toplam protein (mg)	Enzim aktivitesi (U/ml/dak)	Toplam aktivite (U)	Spesifik aktivite (U/mg)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
I- Ham ekstrakt	989	0,44	437,4	0,05	44,8	0,10	100,0	1,00
II- 60 °C üst sıvısı	970	0,40	388,2	0,05	48,3	0,12	108,0	1,22
60 °C peleti	9	0,77	6,9	0,05	0,4	0,06	1,0	0,62
III-%35 AS üst sıvısı	1020	0,50	506,4	0,08	78,1	0,15	174,5	1,51
%35 AS peleti	13	0,60	7,8	0,07	0,9	0,11	2,0	1,11
IV-%35-60 AS üst sıvısı	1010	0,25	253,5	0,01	10,1	0,04	22,6	0,40
%35-60 AS peleti	136	2,35	320,5	0,64	87,6	0,26	195,7	2,67
V- Diyaliz sonrası	280	0,41	116,0	0,11	32,0	0,27	71,5	2,70

NOT: AS: Amonyum sülfat , Saflaştırma basamakları aşağıda verilen formüllere göre hesaplanmıştır.

Toplam protein (mg) = Protein (mg/ml) X Hacim (ml)

Toplam aktivite (U) = Enzim aktivitesi (U/ml/min) X Hacim (ml)

Spesifik aktivite (U/mg) = Toplam aktivite/Toplam protein

Verim (%) = Toplam aktivite/Ham ekstraktın toplam aktivitesi

Saflaştırma katsayısı = Spesifik aktivite/Ham ekstraktın spesifik aktivitesi

Çizelge 4.16 *Bacillus* sp. A343 hücre içi α -glukozidazının amonyum sülfatla saflaştırma basamakları

Saflaştırma basamakları	Hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Toplam protein (mg)	Enzim aktivitesi (U/ml/dak)	Toplam aktivite (U)	Spesifik aktivite (U/mg)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
I- Sonik. sonrası üst sıvı	28	0,99	27,5	0,66	18,5	0,67	100	1
II- 60°C üst sıvısı	22	0,92	20,2	0,60	13,2	0,65	71,18	0,97
60°C peleti	4	0,58	2,30	0,10	0,39	0,17	2,13	0,25
III- %75 AS üst sıvısı	25	0,03	0,84	0,01	0,31	0,37	1,70	0,55
%75 AS pelet	16	0,96	14,9	0,79	12,2	0,82	66	1,22
IV- Diyaliz sonrası	33	0,39	12,9	0,34	11,1	0,85	60	1,27

NOT: AS: Amonyum sülfat , Saflaştırma basamakları aşağıda verilen formüllere göre hesaplanmıştır.

Toplam protein (mg) = Protein (mg/ml) X Hacim (ml)

Toplam aktivite (U) = Enzim aktivitesi (U/ml/min) X Hacim (ml)

Spesifik aktivite (U/mg) = Toplam aktivite/Toplam protein

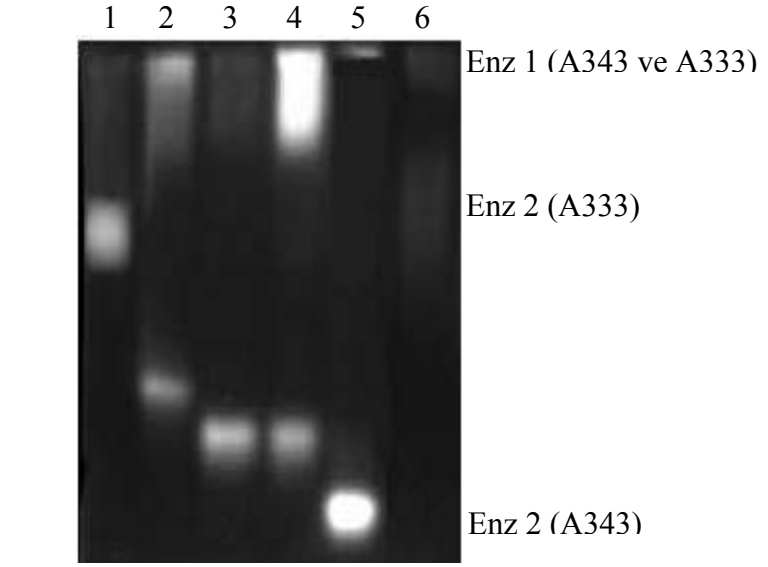
Verim (%) = Toplam aktivite/Ham ekstraktın toplam aktivitesi

Saflaştırma katsayısı = Spesifik aktivite/Ham ekstraktın spesifik aktivitesi

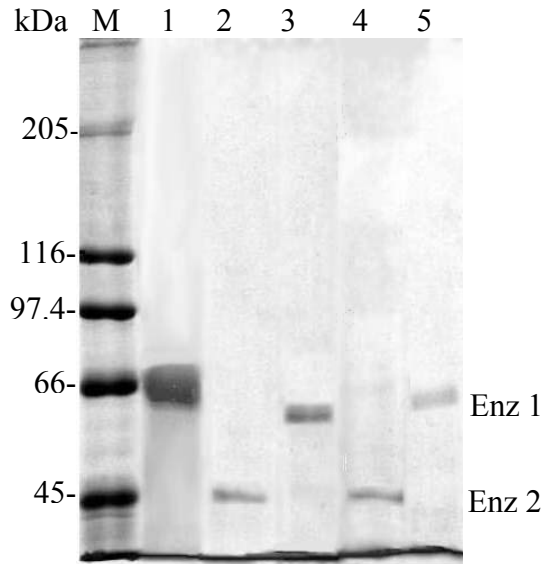
Bacillus sp. A333 α -glukozidazı %35-60, *Bacillus* sp. A343 α -glukozidazı ise %75 amonyum sülfat ile çöktürülmüştür. Bir protein çözeltisine çok miktarda tuz ilavesiyle hidrofobik kısımlar birbiriyle etkileşerek çöker. Dolayısı ile proteinin agregasyona uğrayarak çökmesi, o proteinin hidrofobisitesi ile alakalıdır. Daha fazla hidrofobik alana sahip proteinler daha az amonyum sülfat ile çöker (Erarslan ve ark. 2005). Amonyum sülfat konsantrasyonundaki bu farklılıklar *Bacillus* sp. A333 α -glukozidazının hidrofobik bölgeler yönünden diğer enzime göre daha zengin olduğunu gösterebilir.

4.8 Enzimlerin SDS ve N-PAGE'deki Elektroforetik Mobiliteleri ile Molekül Ağırlıkları

Standart saf α -glukozidazı (Sigma G3651), *G. thermoglucosidasius* DSM 2542 oligo 1-6 glukozidazı, *G. stearothermophilus* ATCC 7953 ve *G. stearothermophilus* ATCC 12980 hücre içi α -glukozidazları ile *Bacillus* sp. A343 ve A333 α -glukozidazlarının N-PAGE'deki 4-MUG substratı ile yapılan aktivite boyamaları sırasıyla Şekil 4.15.a'da; jelden ekstrakte edilen *Bacillus* sp. A333 ve A343 α -glukozidaz enzim bantlarının SDS-PAGE'de verdiği protein bantları ise Şekil 4.15.b'de görülmektedir.



a*



b**

Şekil 4.15 a. *Bacillus* sp. A333 ve A343 α -glukozidaz enzimlerinin ve standart bakteri enzimlerin N-PAGE sonrası 4-MUG substratı ile yapılan aktivite boyaması, b. *Bacillus* sp. A343 ve A333 α -glukozidazlarının preparatif N-PAGE'den ekstrakte edilen enzim bantlarının SDS-PAGE'deki protein profilleri

* Hat 1-6 sırasıyla, standart α -glukozidaz (Sigma G 3651); *G. thermoglucosidasius* DSM 2542 oligo 1-6 glukozidazı; *G. stearothermophilus* ATCC 7953 hücre içi α -glukozidazı; *G. stearothermophilus* ATCC 12980 hücre içi α -glukozidazı; *Bacillus* sp. A343 ve A333 α -glukozidazı

**Hat M; molekül ağırlık standardı (Sigma MW-SDS-6H), Hat 1-5 sırasıyla, standart α -glukozidaz (MW 66 kDa); A343'ün 2. enzim bandı; A343'ün 1. enzim bandı; A333'ün 2. enzim bandı; A333'ün 1. enzim bandı

Beklendiği gibi saf enzim tek bant vermiş (Şekil 4.15.a, Hat 1); *G. thermoglucosidasius* DSM 2542 oligo 1-6 glukozidazı, *G. stearothermophilus* ATCC 7953 ve *G. stearothermophilus* ATCC 12980 α -glukozidazlarından farklı bir profil göstermiş olup (Şekil 4.15.a, Hat 2, 3 ve 4) ikişer enzim bandına sahip olan *Bacillus* sp. A343 ve A333 α -glukozidazları (Şekil 4.15.a, Hat 5, 6) ise Enzim 2 yönünden birbirinden ve standart enzimlerden farklı bir mobilite göstermiştir. Buna karşılık Enzim 1'in tüm bakterilerde aynı pozisyonda bulunduğu görülmektedir.

Daha önce yapılan bazı çalışmalarda aynı mikroorganizmadan birden fazla α -glukozidaz enzimi izole edilmiştir (Suzuki *et al.* 1984a, Suzuki *et al.* 1992, Kashiwabara *et al.* 2000). Suzuki ve arkadaşları (1984a), jel immünodifüzyon analizlerinde *G. stearothermophilus* ATCC12016 α -glukozidaz enziminin ham ekstraktında, homolog proteinlerden oluşan ve pNPGaz aktivitesine sahip iki fraksiyon belirlemiş, her iki enzimin de benzer antijenik yapılar içerdiği rapor edilmiştir.

Ayrıca *G. thermoamyloliquefaciens* KP1071 suşunun farklı moleküler, katalitik ve immünolojik özelliklere sahip üç farklı α -glukozidaz enzimi sentezlediği belirlenmiştir (Kashiwabara *et al.* 2000). α -Glukozidaz I, 62 kDa'luk monomerik yapılı bir ekzo- α -1,4-glukozidaz olup glukozil hidrolazların 13. familyasına dahil edilmiştir. Jel filtrasyon analizi sonucunda α -Glukozidaz II enziminin 540 kDa'luk homoheksamerik bir yapıda olduğu ve hem ekzo- α -1,4-glukozidaz hem de oligo-1,6 glukozidaz aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. α -Glukozidaz III enziminin ise 530 kDa'luk homoheksamerik bir α -glukozidaz olduğu belirlenmiştir. Otuzbirinci familyaya ait bilinen tüm α -glukozidazların, hipertermofilik arkeal α -glukozidazlar hariç ökaryotik orijinli olduğu bildirilmiş ancak; *G. thermoamyloliquefaciens* KP1071 α -Glukozidaz II ve III enzimleri amino asit dizi benzerliklerine göre arkeal ve ökaryotik α -glukozidazların bulunduğu 31. familya grubuna dahil edilmişlerdir.

Bu çalışmada, N-PAG'dan ekstrakte edilen *Bacillus* sp. A333 ve A343 α -glukozidazların birinci enzim bantlarının molekül ağırlığı yaklaşık olarak 60 kDa, ikinci enzim bantlarının molekül ağırlığı ise 44 kDa civarında hesaplanmıştır (Şekil 4.15.b).

Yapılan araştırmalarda pek çok *Bacillus* cinsi suşa ait α -glukozidazların molekül ağırlığı 30 ila 102 kDa arasında değişiklik gösterdiği ve genellikle 70 kDa'un altında bulunduğu belirlenmiştir (Giblin *et al.* 1987, Piller *et al.* 1996, Albert *et al.* 1998, Murakami *et al.* 1998). Ayrıca *G. stearothermophilus* ATCC 12016 suşundan saflaştırılan standart α -glukozidazın molekül ağırlığı da Takii ve arkadaşları (1992) ile üretici firma (Sigma) tarafından 66 kDa olarak belirtilmiştir. Kullanılan standart saf enzimin SDS-PAGE analizi, molekül ağırlığını doğrular şekilde 66 kDa olarak hesaplanmıştır.

Sonuç olarak, bu çalışmada izole edilen *Bacillus* sp. A333 ve A343 izolatlarının ürettiği α -glukozidazların test edilen standart saf enzim ve standart bakterilerin α -glukozidazlarından farklı bir elektroforetik mobiliteye sahip olması ve SDS-PAGE analizleriyle her bir izolattan yakın moleküler ağırlıklarda 2 bandın görülmesi, farklı α -glukozidaz reticisi *Bacillus* sp. izolatlarının elde edildiğini göstermektedir. İleride yapılacak çalışmalarda *Bacillus* sp. A333 ve A343 izolatlarının ürettiği α -glukozidazlarının tamamen saflaştırılmasıyla daha kesin sonuçlara ulaşılacaktır.

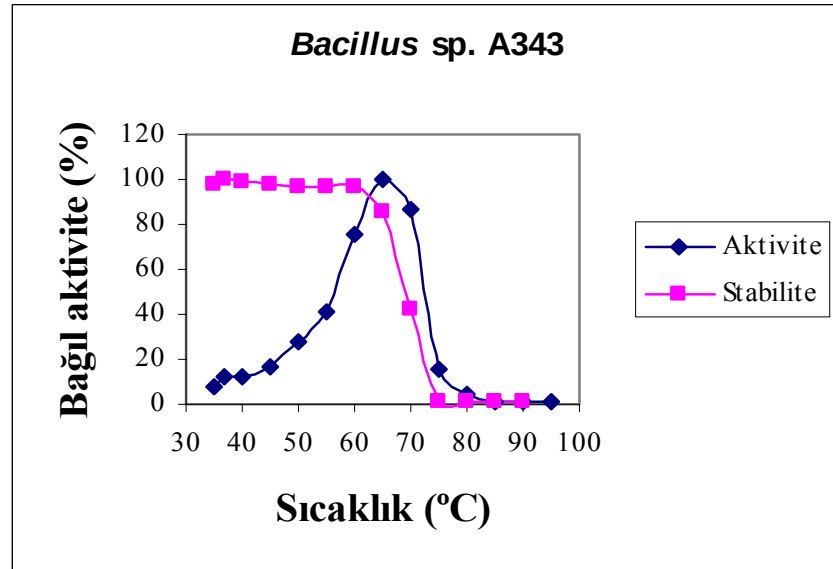
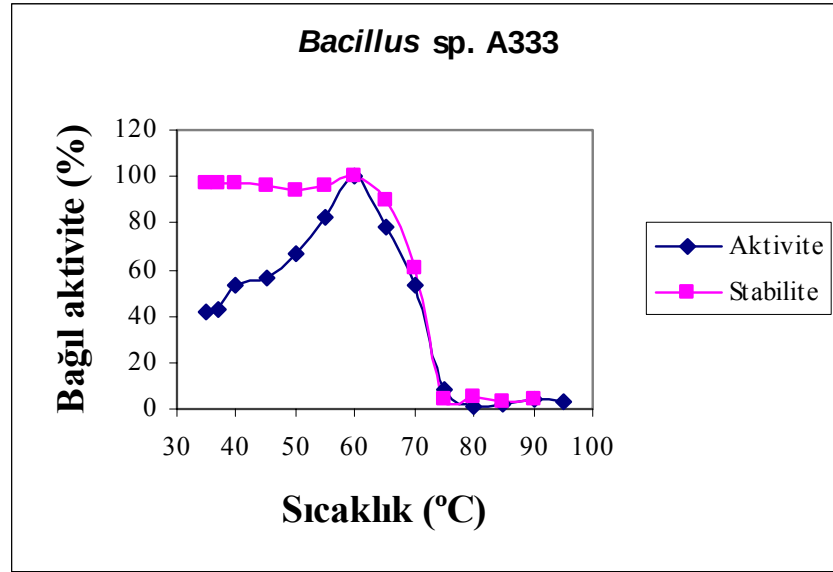
4.9 *Bacillus* sp. A333 ve A343 α -Glukozidazlarının Farklı Sıcaklık ve pH'lardaki Aktivite ve Stabiliteleri

Bir enzimin pH ve sıcaklık isteği genelde elde edildiği mikroorganizmanın yaşadığı ortamla ilişkilidir. *Bacillus* cinsi mikroorganizmalar çok çeşitli habitatlardan izole edildiğinden, α -glukozidazlarının sıcaklık ve pH optimumları da değişiklik göstermektedir. Bazı mezofilik ve termofilik *Bacillus* suşlarından izole edilen α -glukozidazların sıcaklık optimumları 37 ile 85°C arasında değişiklik göstermektedir. Yine alkali ortamlardan asidik ortamlara kadar farklı habitatlarda yaşayabilen *Bacillus* suşlarına ait α -glukozidazların pH istekleri 5 ile 9 arasında rapor edilmiştir. Termofilik enzimlerin konformasyonel stabiliteleri, yüksek sıcaklıklardaki ve geniş pH aralıklarındaki stabilitelerinin de artmasına neden olmaktadır (Suzuki *et al.* 1987a, Hung *et al.* 2005).

Bacillus sp. A333 ve A343 α -glukozidazlarının sıcaklık optimumları ve stabiliteleri çizelge 4.17’de ve şekil 4.16’da verilmiştir. *Bacillus* sp. A333 α -glukozidazının aktivitesi için optimum sıcaklık 60°C, bu sıcaklıktaki stabilitesi %100 olarak bulunurken, sıcaklık 70°C’ye yükseltildiğinde aktivite %53’e, stabilite ise %61’e düşmüştür. *Bacillus* sp. A343 α -glukozidazının ise aktivitesi için optimum sıcaklık 65°C, bu sıcaklıktaki stabilitesi %85 olarak bulunmuşken, sıcaklık 70°C’ye yükseltildiğinde aktivite %86’ya, stabilitesi ise %42’ye düşmüştür.

Çizelge 4.17 *Bacillus* sp. A333 ve A343 α -glukozidazlarının farklı sıcaklıklardaki bağlı aktivite ve stabiliteleri

Sıcaklık (°C)	A333 α -glukozidazı		A343 α -glukozidazı	
	Bağlı Aktivite (%)	Bağlı Stabilitite (%)	Bağlı Aktivite (%)	Bağlı Stabilitite (%)
95	3	-	1	-
90	4	4	1	1
85	2	3	2	1
80	1	5	5	1
75	8	4	16	2
70	53	61	86	42
65	78	89	100	85
60	100	100	75	96
55	82	96	41	97
50	67	94	28	97
45	57	96	17	98
40	53	97	12	98
37	43	97	12	100
35	42	97	8	98

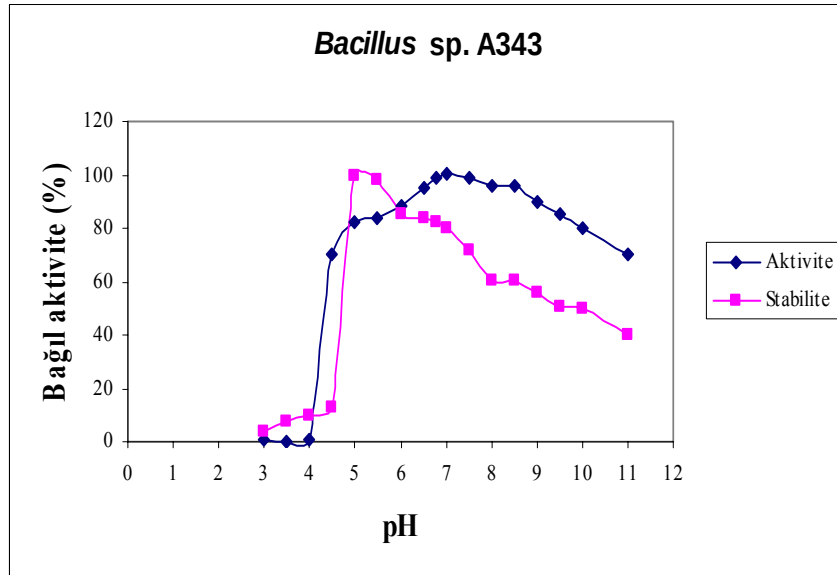
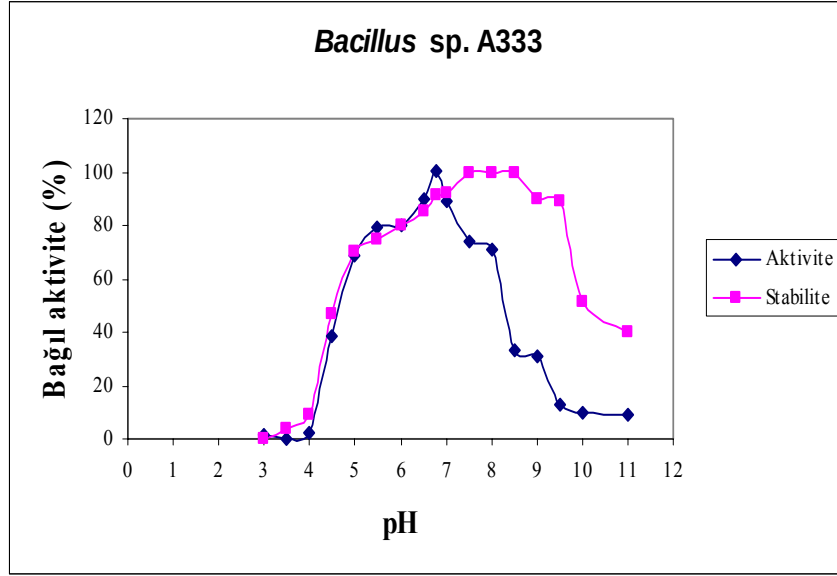


Şekil 4.16 *Bacillus* sp. A333 ve *Bacillus* sp. A343 α -glukozidaz enzimlerinin farklı sıcaklık değerlerindeki aktivite ve stabiliteleri

Bacillus sp. A333 ve A343 α -glukozidazlarının optimum pH değerleri ve farklı pH değerlerindeki stabiliteleri çizelge 4.18 ve şekil 4.17’de verilmiştir. *Bacillus* sp. A333 α -glukozidazının optimum pH’ı 6.8 ve stabilitesinin %100 olduğu pH ise 8-8.5 arasında bulunurken, *Bacillus* sp. A343 α -glukozidazı için bu değerler sırasıyla 7.0 ve 5.0 olarak tespit edilmiştir. Diğer taraftan *Bacillus* sp. A333 α -glukozidazının pH 6.8-9.5 aralığında %90 stabil olduğu; buna karşılık *Bacillus* sp. A343 α -glukozidazının ise pH 5.0-5.5 aralığında genelde stabilite gösterirken, pH’ın 5’den 4.5’a düşürülmesi ile stabilitenin bu enzimde %87 oranında kaybedildiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.18 *Bacillus* sp. A333 ve A343 α -glukozidazlarının farklı pH’lardaki bağlı aktivite ve stabiliteleri

pH	A333 α -glukozidazı		A343 α -glukozidazı	
	Bağlı Aktivite (%)	Bağlı Stabilite (%)	Bağlı Aktivite (%)	Bağlı Stabilite (%)
11,0	9	40	70	40
10,0	10	52	80	50
9,5	13	89	85	50
9,0	31	90	90	56
8,5	33	100	96	61
8,0	71	100	96	60
7,5	74	99	99	72
7,0	89	92	100	80
6,8	100	91	99	82
6,5	90	85	95	84
6,0	80	80	89	85
5,5	79	75	84	98
5,0	68	70	82	100
4,5	39	46	70	13
4,0	3	9	1	10
3,5	0	4	0	8
3,0	2	0	0	4



Şekil 4.17 *Bacillus* sp. A333 ve *Bacillus* sp. A343 α -glukozidaz enzimlerinin farklı pH değerlerindeki aktivite ve stabiliteyi

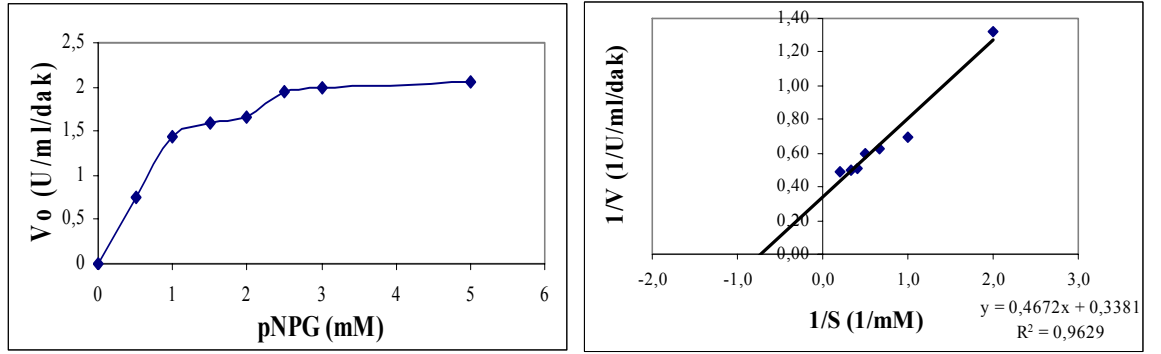
Termofilik *Bacillus* suşlarından izole edilen α -glukozidaz enzimlerinin, farklı sıcaklıklardaki aktivite ve stabiliteleri ile ilgili yapılan çalışmalardan birinde *G. stearothermophilus* ATCC 7953 suşunun 63-77°C arasındaki yüksek sıcaklıklarda aktivite gösterdiği ve optimum sıcaklığının 63°C olduğu belirlenmiştir (Albert *et al.* 1998). *B. caldovelax* DSM 411 ve *G. stearothermophilus* ATCC 12016 α -glukozidaz enzimleri sırasıyla 60°C ile 70°C’de optimal aktivite gösterdiği; *G. stearothermophilus* ATCC 12016 enziminin 70°C’de optimal aktivite gösterip bu sıcaklıkta 10 dakika bekletildiğinde aktivitenin sadece %7’sinin geri kazanabildiği rapor edilmiştir (Suzuki *et al.* 1984b). *B. caldovelax* enzimi ise daha yüksek bir termostabilite göstermekte olup, 70°C’deki yarılanma ömrü 1 saattir (Giblin *et al.* 1987). Şu ana kadar rapor edilen ve en yüksek optimum aktiviteye sahip termofilik *Bacillus* enzimi, *B. flavocaldarius* KP1228’den izole edilmiştir ve sıcaklık optimumu 78°C olan enzimin, bu sıcaklıktaki stabilitesi oldukça düşük bulunmuştur (Murakami *et al.* 1998).

Daha önce yapılan çalışmalarda en yüksek asidik pH’da optimal aktivite gösteren termofilik *Bacillus* α -glukozidazı, pH 5.1’deki aktivitesi ile *B. flavocaldarius* KP1228 (Suzuki *et al.* 1987) olarak tespit edilmiştir. En yüksek alkali ortamda optimal aktivite gösteren suş ise pH 9’daki aktivitesi ile *Geobacillus* HTA-462 (Hung *et al.* 2005) olarak belirlenmiştir. Bu alkali ve asidik ortamlardan izole edilen enzimler dışında çalışılan α -glukozidazlar, genellikle pH 6 civarında optimal aktivite gösterirler. Ayrıca standart olarak kullanılan ATCC 12016 α -glukozidazı pH 6.5’de optimal aktivite göstermiştir.

Sonuç olarak; *Bacillus* sp. A333 α -glukozidazının optimum sıcaklığı A343 α -glukozidazına göre daha düşük olmasına rağmen, yüksek stabiliteye sahip olduğu, pH stabilitesinin de aynı şekilde daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu da A333 α -glukozidazının hücre dışına bırakılan tipte olmasıyla ilgili olabilir. Bu nedenler ile özellikle *Bacillus* sp. A333 α -glukozidazının biyoteknolojik uygulamalar için stabilite yönünden daha uygun olduğu söylenebilir.

4.10 Enzim Kinetiği Sonuçları

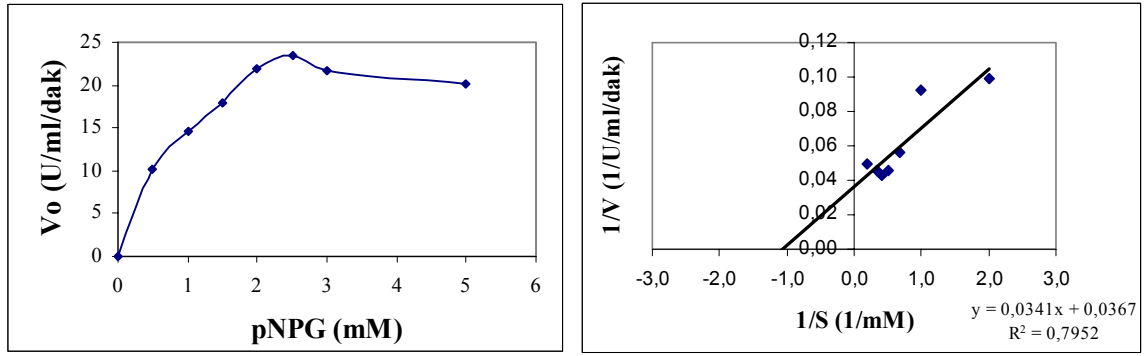
Kinetik çalışmalarda enzimin yüksek aktivite gösterdiği substrat olan *p*NPG'nin daha önce doygunluk derecesi belirlenen 0.5-5 mM'lık farklı konsantrasyonları kullanılmıştır. Enzimin kinetik parametreleri olan $V_{\max}$ ve K_m değeri Lineweaver-Burk grafiğinden belirlenmiştir. Buna göre *Bacillus* sp. A333 α -glukozidaz enzimi için K_m değeri 1.38 mM ve $V_{\max}$ değeri 2.96 U/ml/dak olarak bulunurken (Şekil 4.18), bu değerler *Bacillus* sp. A343 α -glukozidaz enzimi için sırasıyla 0.85 mM ve 27.47 U/ml/dak olarak elde edilmiştir (Şekil 4.19). Aynı koşullarda kıyaslama amacı ile test edilen standart saf α -glukozidaz enziminin (Sigma G 3651) K_m ve $V_{\max}$ değeri de sırasıyla 0.43 mM ve 30.30 U/ml/dak olarak hesaplanmıştır.



a

b

Şekil 4.18 *Bacillus* sp. A333 α -glukozidaz enziminin *p*NPG substratına göre a. Michaelis-Menten ve b. Lineweaver-Burk grafikleri



a

b

Şekil 4.19 *Bacillus* sp. A343 α -glukozidaz enziminin pNPG substratına göre a. Michaelis-Menten ve b. Lineweaver-Burk grafikleri

Bir enzimin substrata karşı olan ilgisi, K_m sabiti ile ilgili olup enzimin K_m sabiti ne kadar düşük ise substrata olan afinitesi de o derece yüksek olur. α -Glukozidazlar çok geniş substrat spesifikliğı gösterdiklerinden, α -glukozidik bağlara spesifikliklerini kolorimetrik olarak belirlemek amacı ile yapay substrat pNPG kullanılmaktadır. Değişik mikroorganizmalardan izole edilen α -glukozidazlarla yapılan kinetik çalışmalarda, pNPG substratına karşı 0.12-14.2 mM arasında değişen K_m değerleri elde edilmiştir (Murakami *et al.* 1998, Nashiru *et al.* 2001). K_m ve V_{max} değerleri karşılaştırıldığında, *Bacillus* sp. A343 α -glukozidazı, A333 enzimine göre pNPG'ye daha yüksek bir afinite göstermiştir.

4.11 Substrat Spesifikliğı

Substrat spesifikliğı denemelerinde *Bacillus* sp. A333 α -glukozidazının en yüksek aktivite gösterdiği substratlar sırasıyla maltoz> dekstrin> turanoz> maltotrioz> maltopentoz> maltotetroz> maltoheksoz> fenil- α -D-glukozit olarak belirlenmiştir. Bu enzim kullandığı substratlardaki α -1,4 ve α -1,3 glukozidik bağları hidroliz ederek D-glukoz monomerleri oluşturmaktadır. Sonuçlar *Bacillus* sp. A333 α -glukozidazının bu enzim grubunun karakteristik özelliğı olan maltooligosakkaritlerdeki α -1,4 bağlarına etki ettiğini göstermektedir (Çizelge 4.19).

A333 α -glukozidazı; pNPG, maltoz, maltooligosakkaritlere etki eden *Geobacillus* HTA-462 (Hung *et al.* 2005); maltoz, maltooligosakkaritler, nigeroz, trehaloz ve pNPG'ye etki eden *G. stearothermophilus* ATCC 7953 (Albert *et al.* 1998) ve maltoz, maltooligosakkaritler ve pNPG'ye spesifiklik gösteren *B. thermoamylolyquefaciens* KP1071 α -Glukozidaz I enzimine (Kashiwabara *et al.* 2000) substrat spesifikliği yönünden benzerlik göstermiştir. Bu nedenle *Bacillus* sp. A333 α -glukozidazı, substrat spesifikliği açısından maltooligosakkaritlere etki eden α -glukozidazlar sınıfına dahil edilebilir. Ayrıca A333 α -glukozidazı, enzim KP1071 α -glukozidazına benzer şekilde nişasta ve izomaltozun α -1,6 glukozidik bağlarına zayıf etki ettiğinden, nişastanın dallanma noktalarına gelindiğinde hidroliz etkisi azalmaktadır (Şekil 4.20, Hat 7). A333 enzimi çözünür nişasta gibi α -glukanlardan çok, düşük moleküler ağırlıklı maltoz ve maltooligosakkaritlere çok daha fazla spesifiklik göstermiştir.

Çizelge 4.19 *Bacillus* sp. A333 α -glukozidazının değişik substratlara bağlı olarak oluşturduğu glukoz miktarları (%)

Substrat	Substratın bağ tipi	Substratın Konsantrasyonu	Bağlı glukoz oluşumu (%)
Maltoz ^b	Glu- α -1,4-Glu, n=2	10 mM	100
Dekstrin ^d	(C ₆ H ₁₂ O ₆) _n	1%	67
Turanoz ^d	Glu- α -1,3-Fruc	10 mM	56
Maltotrioz ^b	(Glu- α -1,4) ₃ n=3	10 mM	44
Maltopentoz ^b	(Glu- α -1,4) ₄ -Glu, n=5	10 mM	44
Maltotetroz ^b	(Glu- α -1,4) ₃ -Glu, n=4	10 mM	33
Maltoheksoz ^b	(Glu- α -1,4) ₆ , n=6	10 mM	33
Fenil- α -D-glukozit ^a	Glu- α -1-fenil	10 mM	22
Metil- α -D-glukozit ^a	Glu- α -1-metil	10 mM	11
Maltotiol ^d	Glu- α -1,4-sorbitol	10 mM	11
Panoz ^c	Glu- α -1,6-Glu- α -1,4-Glu	10 mM	11
İzomaltoz ^c	Glu- α -1,6-Glu, n=2	10 mM	11
İzomaltorioz ^c	(Glu- α -1,6) ₃ , n=3	10 mM	11
Trehaloz ^d	Glu- α - α' -Glu	10 mM	11
Sakkaroz ^d	Glu- α -1,2-Fruc	10 mM	11
Laktoz ^d	Gal- β -1,4-Glu	10 mM	11
Raffinoz ^d	Gal- α -1,6-Glu- α -1,2- β -Fruc	10 mM	11
Amiloz ^d	(Glu- α -1,4) _n	1%	11
Çözünür nişasta ^d	(C ₆ H ₁₂ O ₆) _n	1%	11

NOT: Substratların kullanım amaçları ^{abcd} olarak gruplandırılmıştır. Buna göre ^a Glukozidik bağ hidrolizi için; ^b maltooligosakkaritler (n=2-6), redükleyici olmayan terminal α -1,4 bağ hidrolizi için; ^c izomaltooligosakkaritler (n=2-3), redükleyici olmayan terminal α -1,6 bağ hidrolizi için; ^d glukoz oluşumu için, kullanılmıştır.

Bacillus sp. A343 α -glukozidazının en yüksek aktivite gösterdiği substratlar sırasıyla dekstrin> turanoz> maltoz> fenil- α -D-glukozit> maltotrioz> maltotetroz> maltopentoz> izomaltoz> sakkaroz> kojibioz olarak belirlenmiş olup substratlardaki α -1,4, α -1,3, α -1,2 ve α -1,6 glukozidik bağları hidrolize ederek D-glukoz monomerleri oluşturmaktadır. *Bacillus* sp. A343 α -glukozidazının substrat spesifikliğı oldukça geniş olup α -glukozidazların tipik özelliğı olan maltooligosakkaritlerdeki α -1,4 bağlarının yanısıra diğerk pek çok glukozidik bağa da etki etmektedir (Çizelge 4.20).

Yapılan çalışmalarda oldukça geniş substrat spesifikliğıne sahip α -glukozidazlar rapor edilmiştir. Geniş substrat spesifikliğı gösteren α -glukozidazlar arasında; pNPG, izomaltoz, sakkaroz, maltoz, maltotrioz, trehaloz, turanoza etki edebilen *Bacillus* sp. SAM1606 enzimi (Nakao *et al.* 1994b); maltoz, izomaltoz ve pNPG'ye etki eden *B. thermoamyloliquefaciens* KP1071 α -glukozidaz II enzimi (Kashiwabara *et al.* 2000) ve α -sınır dekstrin, panoz, izomaltosakkaritler (n=2-6), pNPG, maltoz, sakkaroz, turanoz, trehaloza etki edebilen *B. flavocaldarius* KP1228 enzimi (Murakami *et al.* 1998) bulunmaktadır. *Bacillus* sp. A343 α -glukozidazı, sözedilen enzimler gibi geniş substrat spesifikliğıne sahip olması ve hem maltoz hem de izomaltoza etki edebilmesi nedeniyle maltoz ve izomaltoza etki edebilen α -glukozidazlar sınıfına dahil edilebilir. A343 α -glukozidazı, *Bacillus* sp. SAM1606 ve *B. flavocaldarius* KP1228 α -glukozidazları gibi substratlardaki α -1,4, α -1,3, α -1,2 ve α -1,6 glikozidik bağlara gösterdiği geniş substrat spesifikliğı nedeniyle, hidrolize dönük biyoteknolojik işlemler için uygun bir enzim olabilir.

Çizelge 4.20 *Bacillus* sp. A343 α -glukozidazının değişik substratlara bağıl olarak oluşturduğu glukoz miktarları (%)

<u>Substrat</u>	<u>Substratın bağ tipi</u>	<u>Substratın Konsantrasyonu</u>	<u>Bağıl glukoz oluşumu (%)</u>
Dekstrin ^d	(C ₆ H ₁₂ O ₆) _n	1%	100
Turanoz ^d	Glu- α -1,3-Fruc	10 mM	80
Maltoz ^b	Glu- α -1,4-Glu, n=2	10 mM	60
Fenil- α -D-glukozit ^a	Glu- α -1-fenil	10 mM	40
Maltotrioz ^b	(Glu- α -1,4) ₃ n=3	10 mM	40
Maltotetroz ^b	(Glu- α -1,4) ₃ -Glu, n=4	10 mM	40
Maltopentoz ^b	(Glu- α -1,4) ₄ -Glu, n=5	10 mM	40
İzomaltoz ^c	Glu- α -1,6-Glu, n=2	10 mM	40
Sakkaroz ^d	Glu- α -1,2-Fruc	10 mM	40
Kojibioz ^d	α -D-Glu-(1,2)-D-Glu	5 mM	40
Metil- α -D-glukozit ^a	Glu- α -1-metil	10 mM	20
Maltoheksöz ^b	(Glu- α -1,4) ₆ , n=6	10 mM	20
Maltotiol ^d	Glu- α -1,4-sorbitol	10 mM	20
Panoz ^c	Glu- α -1,6-Glu- α -1,4-Glu	10 mM	20
İzomaltorioz ^c	(Glu- α -1,6) ₃ , n=3	10 mM	20
Trehaloz ^d	Glu- α - α' -Glu	10 mM	20
Laktoz ^d	Gal- β -1,4-Glu	10 mM	20
Raffinoz ^d	Gal- α -1,6-Glu- α -1,2- β -Fruc	10 mM	20
Amiloz ^d	(Glu- α -1,4) _n	1%	20
Çözünür nişasta ^d	(C ₆ H ₁₂ O ₆) _n	1%	20

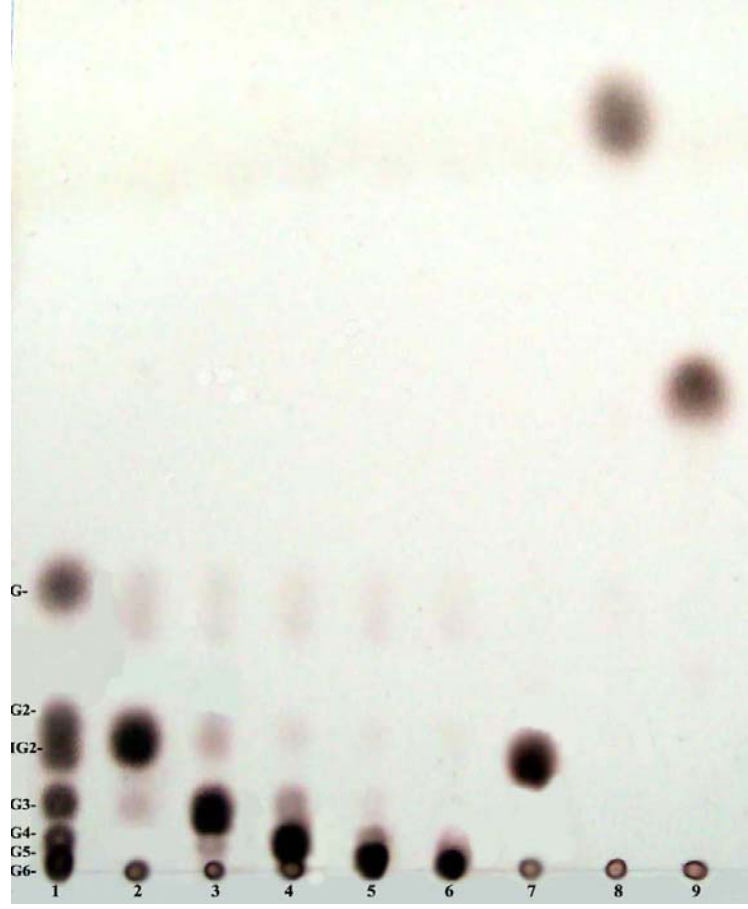
NOT: Substratların kullanım amaçları ^{abcd} olarak gruplandırılmıştır. Buna göre ^a Glukozidik bağ hidrolizi için; ^b maltooligosakkaritler (n=2-6), redükleyici olmayan terminal α -1,4 bağ hidrolizi için; ^c izomaltooligosakkaritler (n=2-3), redükleyici olmayan terminal α -1,6 bağ hidrolizi için; ^d glukoz oluşumu için, kullanılmıştır.

4.12 İnce Tabaka Kromatografisi Sonuçları

Substrat spesifikliğı testlerinde A333 ve A343 α -glukozidazlarının yüksek aktivite gösterdiği substratlar kullanılarak α -glukozidazların 10 dakikalık reaksiyon süresince çeşitli substratlara olan etki şekli ve 2 saatlik reaksiyon süresi boyunca maltooligosakkaritlerden glukoz oluşturma yetenekleri incelenmiştir.

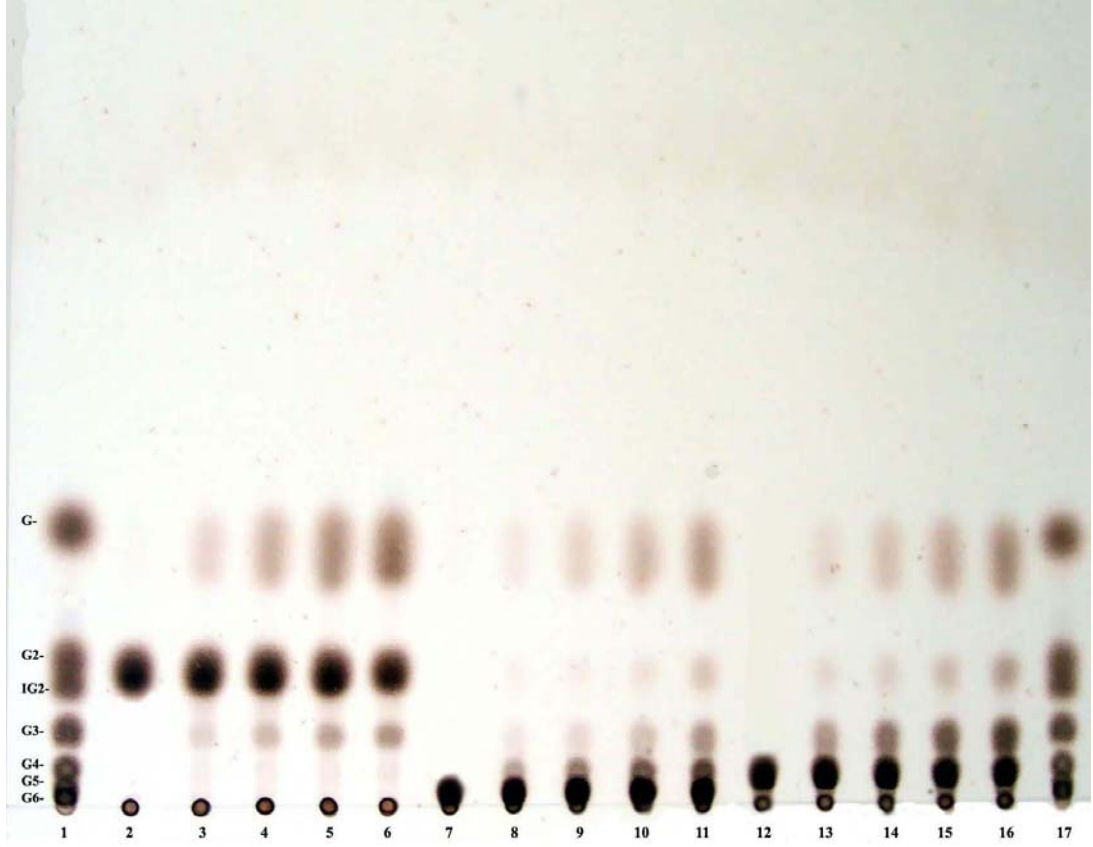
Bacillus sp. A333 α -glukozidazının ince tabaka kromatografisi sonuçları, substrat spesifikliğı sonuçlarını doğrular nitelikte olup, 10 dakikalık reaksiyon süresi sonunda; maltoz, maltotrioz, maltopentoz, maltotetroz, maltoheksoz ve fenil- α -D-glukozit'ten çok yüksek miktarda D-glukoz monomerleri oluşturduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.20). Ayrıca maltooligosakkaritlerle (n=2-6) gerçekleştirilen 2 saatlik reaksiyon süresi boyunca maltozun hidrolizi ile oluşan ana ürünün glukoz olduğu ve glukoz miktarının da zamana bağlı olarak arttığı görülmektedir (Şekil 4.21 ve 4.22). Bunun yanında, enzimin maltoz dışında eklenen tüm substratlardan son ürün olarak, substratın kendisinden bir glukoz birimi küçük yeni bir şekeri ve glukoz monomerini oluşturduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar A333 α -glukozidazının maltosakkaritlerdeki ekzo- α -1,4 glukozidik bağları parçaladığına işaret etmektedir.

Yine şekil 4.21 ve 4.22'de görüldüğü gibi, zamana bağlı olarak hidroliz sonucunda açığa çıkan glukoz ve ortama eklenen substrat, enzimin transglukozilasyon aktivitesinden dolayı substrattan bir glukoz birimi yüksek yeni bir substrat oluşturmaktadır. İki saatlik reaksiyon süresi sonunda oluşan bu yeni şeker miktarında oldukça fazla artış görülmüştür. Bu da enzimin substratları parçalarken aynı zamanda geri dönüşümlü olarak α - α glukozidik bağlar yaptığını göstermektedir. İnce tabaka kromatografisi sonuçlarına göre, enzim maltoz ve maltooligosakkaritlere (n=2-6) çok yüksek oranda spesifiklik göstermiş ve 10 mM'lık substrat konsantrasyonlarında bile oldukça güçlü bir transglukozilasyon reaksiyonu vermiştir.



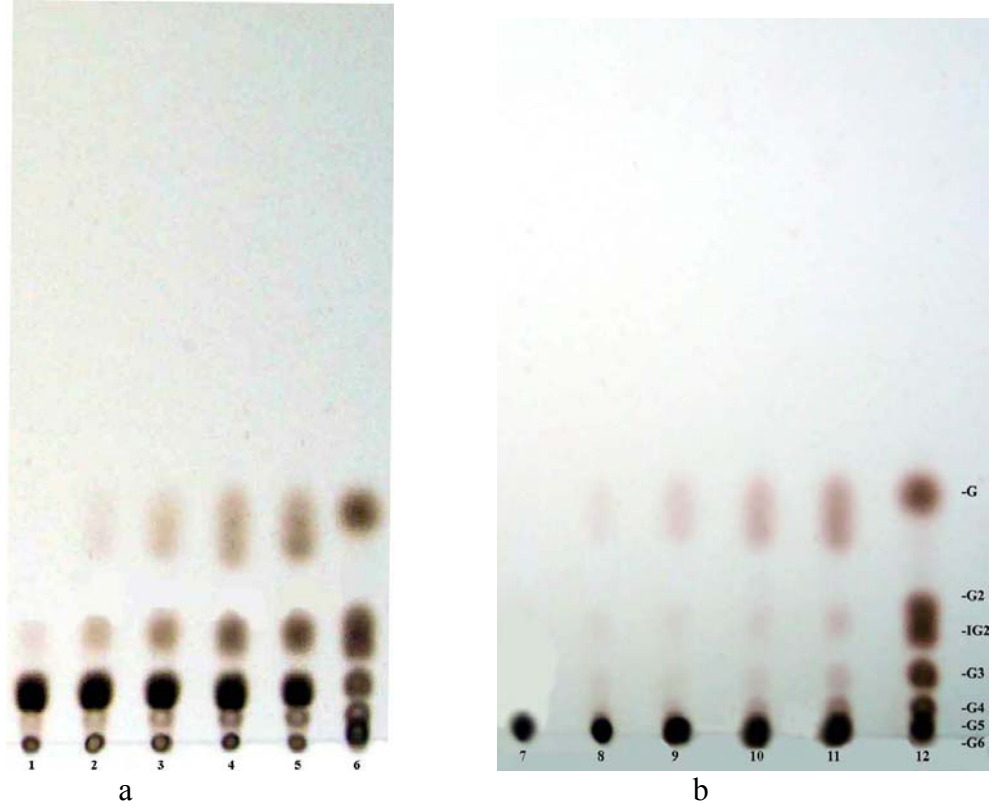
Şekil 4.20 *Bacillus* sp. A333 α -glukozidazının 10 dakikalık reaksiyon süresinde çeşitli substratlara olan etkisini gösteren ince tabaka kromatografisi

Hat 1-9 sırasıyla: Standart şeker karışımı (%0.1), (G, glukoz; G2, maltoz; IG2, izomaltoz; G3, maltotrioz; G4, maltotetroz; G5, maltopentoz; G6, maltoheksoz), maltoz, maltotrioz, maltotetroz, maltopentoz, maltoheksoz, izomaltoz, fenil- α -Dglukozit, metil- α -D-glukozit substratlarının parçalanma ürünlerini göstermektedir



Şekil 4.21 *Bacillus* sp. A333 α -glukozidazının 2 saatlik reaksiyon süresinde maltooligosakkaritlerden glukoz oluşumunu gösteren ince tabaka kromatografisi

Hat 1 ve 17: Standart şeker karışımı (%0.1), (G, glukoz; G2, maltoz; IG2, izomaltoz; G3, maltotrioz; G4, maltotetroz; G5, maltopentoz; G6, maltoheksoz); Hat 2-6: Maltoz substratının 0. dak, 10. dak, 30. dak, ile 1. saat ve 2. saatlerdeki parçalanma ürünleri; Hat 7-11: maltopentoz substratının 0. dak, 10. dak, 30. dak, ile 1. saat ve 2. saatlerdeki parçalanma ürünleri; Hat 12-16: Maltotetroz substratının 0. dak, 10. dak, 30. dak, ile 1. saat ve 2. saatlerdeki parçalanma ürünlerini içermektedir



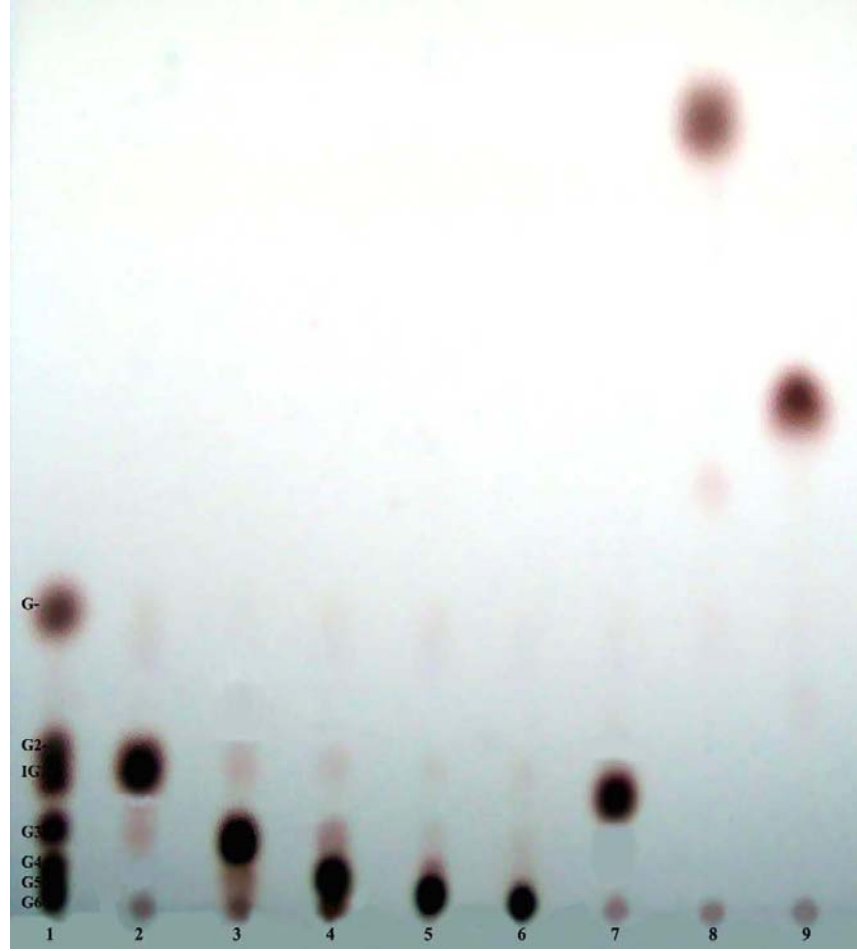
Şekil 4.22 *Bacillus* sp. A333 α -glukozidazının 2 saatlik reaksiyon süresinde maltooligosakkaritlerden glukoz oluşumunu gösteren ince tabaka kromatografisi

- a. Hat 1-5: Maltotrioz substratının 0. dak, 10. dak, 30. dak, ile 1. saat ve 2. saatlerdeki parçalanma ürünleri; Hat 6: Standart şeker karışımı (%0.1) (G, glukoz; G2, maltoz; IG2, izomaltoz; G3, maltotrioz; G4, maltotetroz; G5, maltopentoz; G6, maltoheksoz)
- b. Hat 7-11: Maltoheksoz substratının 0. dak, 10. dak, 30. dak, ile 1. saat ve 2. saatlerdeki parçalanma ürünleri; Hat 12: Standart şeker karışımını (%0.1) içermektedir)

Bacillus sp. A343 α -glukozidazının ince tabaka kromatografisi sonuçları, 10 dakikalık reaksiyon süresi sonunda; maltoz, maltotrioz, maltotetroz, maltopentoz, maltoheksoz ve izomaltoz'dan D-glukoz monomerlerinin oluştuğunu göstermektedir (Şekil 4.23).

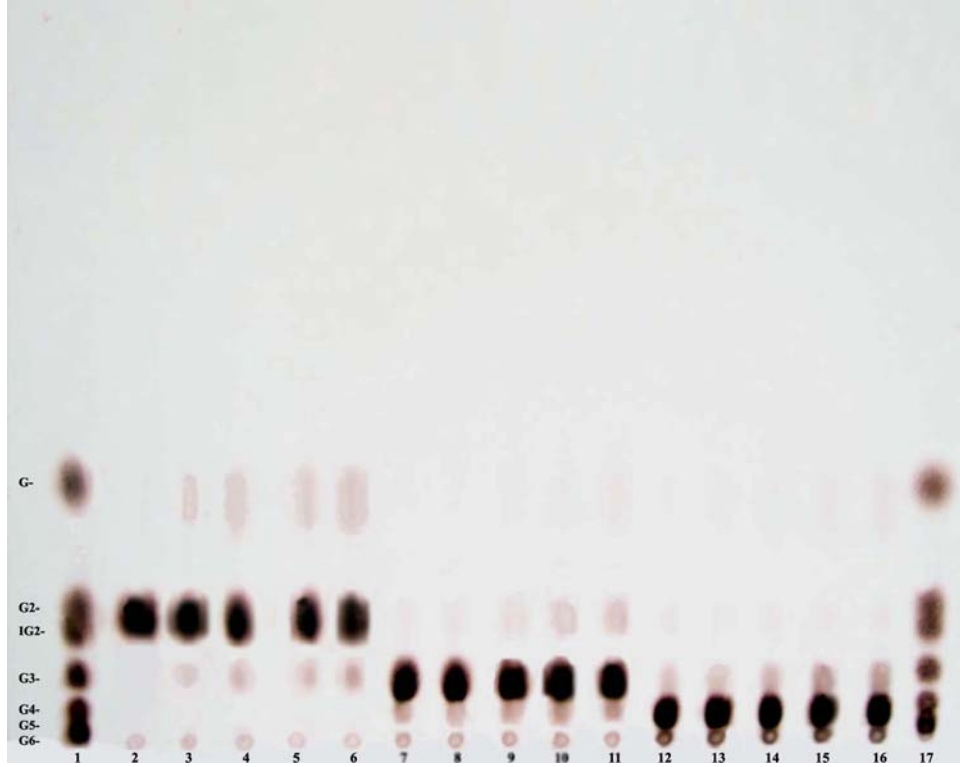
Bunun yanında *Bacillus* sp. A333 enzimi gibi bu enzimin de maltoz dışındaki tüm substratlardan son ürün olarak substratın kendisinden bir glukoz birimi küçük yeni bir şekeri ve glukoz monomerini oluşturduğu gözlenmiştir. Enzim, maltosakkaritlerdeki ekzo- α -1,4 glukozidik bağları parçalamaktadır (Şekil 4.24 ve 4.25).

Şekil 4.24 ve 4.25'de görüldüğü gibi hidroliz sonucunda açığa çıkan glukoz ve ortama eklenen substrat, enzimin transglukozilasyon aktivitesinden dolayı substrattan bir glukoz birimi büyük yeni bir şeker oluşturduğu ve reaksiyonun geri dönüşümlü olduğu belirlenmiştir. Enzim geniş substrat spesifikliğine bağlı olarak maltozu, daha yüksek molekül ağırlıklı maltooligosakkaritlere nazaran daha iyi hidrolize etmiştir. Dolayısı ile yüksek molekül ağırlıklı maltoligosakkaritler ile daha zayıf bir transglukozilasyon aktivitesi göstermiştir.



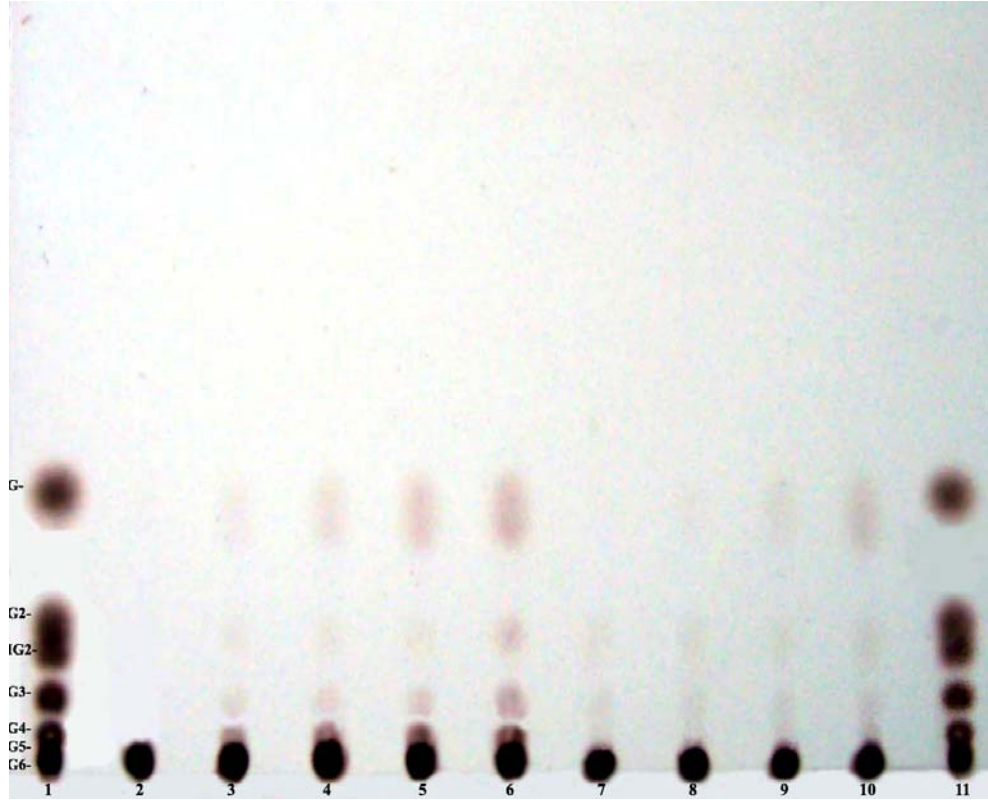
Şekil 4.23 *Bacillus* sp. A343 α -glukozidazının 10 dakikalık reaksiyon süresinde çeşitli substratlara olan etkisini gösteren ince tabaka kromatografisi

Hat 1-9 sırasıyla: Standart şeker karışımı (%0.1), (G, glukoz; G2, maltoz; IG2, izomaltoz; G3, maltotrioz; G4, maltotetroz; G5, maltopentoz; G6, maltoheksoz), maltoz, maltotrioz, maltotetroz, maltopentoz, maltoheksoz, izomaltoz, fenil- α -Dglukozit, metil- α -D-glukozit substratlarının parçalanma ürünlerini göstermektedir



Şekil 4.24 *Bacillus* sp. A343 α -glukozidazının 2 saatlik reaksiyon süresinde maltooligosakkaritlerden glukoz oluşumunu gösteren ince tabaka kromatografisi

Hat 1 ve 17: Standart şeker karışımı (%0.1), (G, glukoz; G2, maltoz; IG2, izomaltoz; G3, maltotrioz; G4, maltotetroz; G5, maltopentoz; G6, maltoheksoz); Hat 2-6: Maltoz substratının 0. dak, 10. dak, 30. dak, ile 1. saat ve 2. saatlerdeki parçalanma ürünleri; Hat 7-11: Maltotrioz substratının 0. dak, 10. dak, 30. dak, ile 1. saat ve 2. saatlerdeki parçalanma ürünleri; Hat 12-16: Maltotetroz substratının 0. dak, 10. dak, 30. dak, ile 1. saat ve 2. saatlerdeki parçalanma ürünlerini içermektedir



Şekil 4.25 *Bacillus* sp. A343 α -glukozidazının 2 saatlik reaksiyon süresinde maltooligosakkaritlerden glukoz oluşumunu gösteren ince tabaka kromatografisi

Hat 1 ve 13: Standart şeker karışımı (%0.1), (G, glukoz; G2, maltoz; IG2, izomaltoz; G3, maltotrioz; G4, maltotetroz; G5, maltopentoz; G6, maltoheksoz); Hat 2-6: Maltopentoz substratının 0. dak, 10. dak, 30. dak, ile 1. saat ve 2. saatlerdeki parçalanma ürünleri; Hat 7-11: Maltoheksoz substratının 0. dak, 10. dak, 30. dak, ile 1. saat ve 2. saatlerdeki parçalanma ürünlerini içermektedir

α -Glukozidazlar, özellikle son yıllarda transglukozilasyon aktiviteleri nedeniyle biyoaktif bileşiklerin ve oligosakkaritlerin biyosentezinde ilgi çekici hale gelmiştir. α -Glukozidazların transglukozilasyon aktiviteleri de, substrat spesifiklikleri gibi farklılık göstermektedir (Hung *et al.* 2005). Transglukozilasyon reaksiyonları ile ilgili yapılan çalışmalarda özellikle *Geobacillus* sp. HTA-462 (Hung *et al.* 2005), *Aspergillus niger* (Lee *et al.* 2001) ve *Bacillus* sp. SAM1606 (Nakao *et al.* 1994b) α -glukozidazlarının yüksek transglukozilasyon aktivitesine sahip oldukları saptanmıştır.

Geobacillus cinsine ait α -glukozidazlar %96 oranında amino asit dizi benzerliği göstermelerine rağmen, transglukozilasyon aktivitelerinde farklılıklar saptanmıştır

(Hung *et al.* 2005). *G. stearothermophilus* ATCC 12016 enzimi 10 mM'lık maltozun tamamını glukoza dönüştürmektedir. Şeker olmayan akseptörler varlığındaki transglukozilasyon ürünlerinin miktarı daha düşüktür. *Geobacillus* HTA-462 α -glukozidazı ise oluşan glukozun ancak yarısını transglukozilasyon aktivitesi ile izomaltoza dönüştürmektedir (Hung *et al.* 2005).

Yapılan İnce tabaka kromatografisi analizi sonuçlarına göre; *Bacillus* sp. A333 enzimi, A343 α -glukozidazına kıyasla maltoz ve maltooligosakkaritlere çok daha yüksek spesifiklik göstermiştir. Dolayısıyla 2 saatlik reaksiyon süresi sonunda hidroliz aktivitesi ile oluşan glukoz miktarı ve transglukozilasyon reaksiyonu ürünlerinin miktarı çok daha yüksektir. A333 α -glukozidazı, *Geobacillus* HTA-462 α -glukozidazına benzer şekilde ortama eklenen substratı tamamen glukoza dönüştürmemekte ve böylece transglukozilasyon ürünlerinin miktarı da yüksek olmaktadır. Bu tip reaksiyonlar, yüksek transglukozilasyon aktivitesi gösteren enzimlerde aranan bir özellik olup oligosakkaritler gibi bileşiklerin sentezlenmesinde biyoteknolojik öneme sahiptirler (Hung *et al.* 2005). Tüm bu nedenler ile yüksek sıcaklıklarda ve geniş bir pH aralığında aktivite gösterebilen *Bacillus* sp. A333 α -glukozidazı güçlü transglukozilasyon aktivitesi ile biyoteknolojik uygulamalarda kullanım potansiyeline sahiptir.

4.13 İnhibitörlerin ve Metal İyonlarının Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

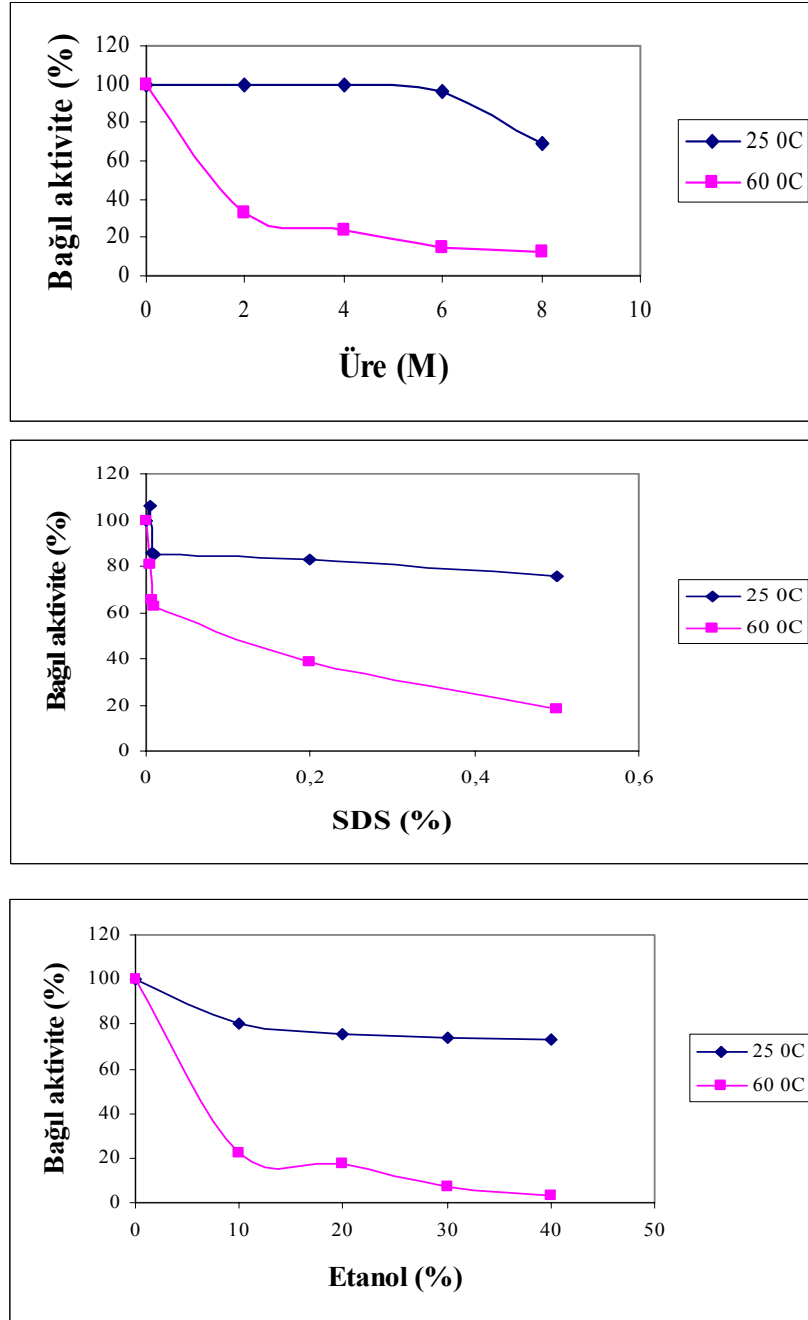
4.13.1 Üre, SDS ve etanolün enzim aktivitesi üzerine etkisi

Yirmibeş ve 60°C'de, farklı konsantrasyonlarda üre, SDS ve etanolün *Bacillus* sp. A333 ve A343 α -glukozidazları ile standart saf α -glukozidaz enzimlerinin stabilitesi üzerine etkisi çizelge 4.21'de ve şekil 4.26'da verilmiştir. Çizelge ve şekilde de görüldüğü gibi *Bacillus* sp. A333 α -glukozidazının A343 enzimine göre test edilen etanol, SDS ve üre inhibitörlerine karşı daha stabil olduğu ve farklılığın özellikle 60°C'de daha belirgin hale geldiği görülmektedir. Bu da A333 α -glukozidazının 60°C'deki termostabilitesinin A343 α -glukozidazıninkine nazaran daha yüksek olması ile ilgili olabilir (Şekil 4.16 a, Çizelge 4.17). Diğer taraftan standart saf α -glukozidazın diğer iki enzime göre daha

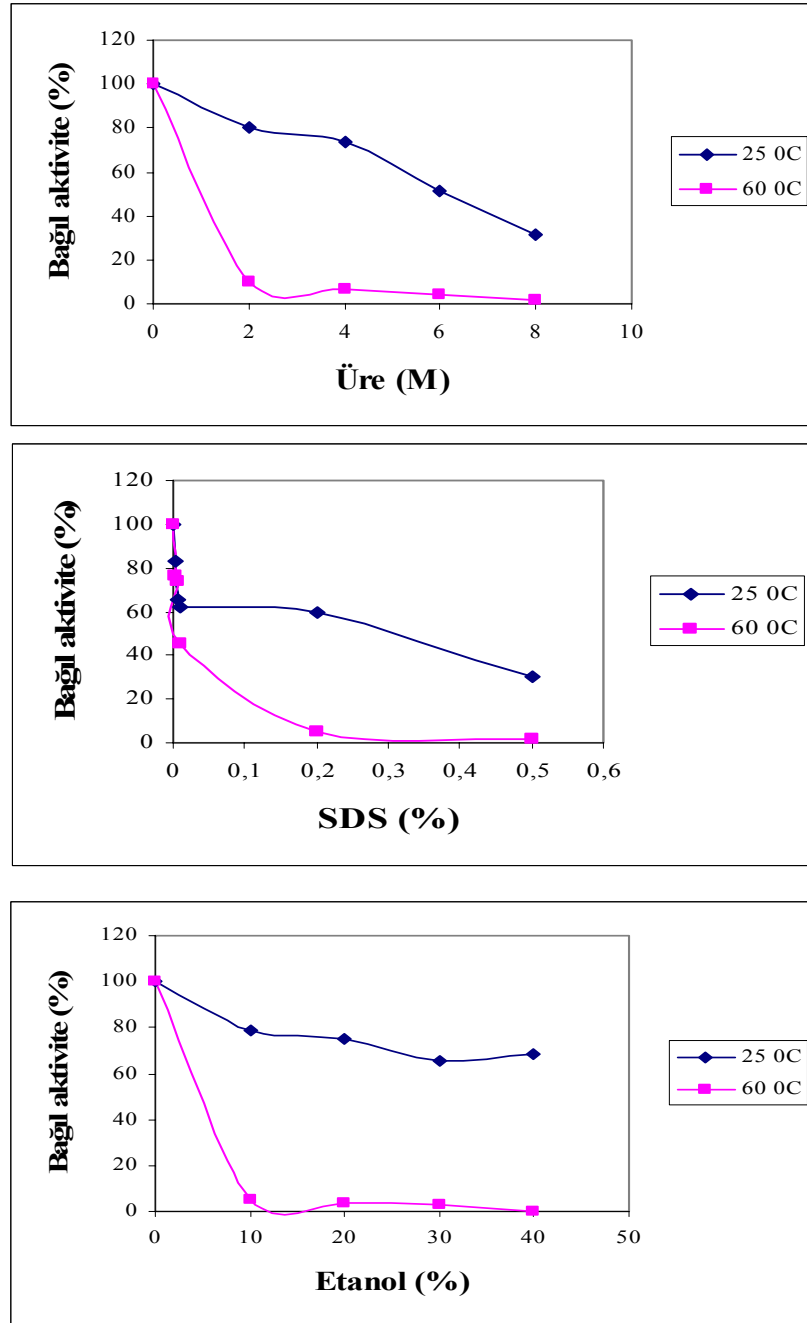
duyarlı bulunması, enzimlerin saflık dereceleri veya yapısal-işlevsel farklılıklardan kaynaklanabilir.

Çizelge 4.21 *Bacillus* sp. A333 ve A343 α -glukozidazları ile standart saf α -glukozidaz enzimlerinin stabilitesi üzerine üre, SDS ve etanolün 25 ve 60°C'deki etkisi

İnhibitör		Bağıl Aktivite (%)					
Adı	Konsantrasyonu	<i>Bacillus</i> sp. A333		<i>Bacillus</i> sp. A343		<i>G. str.</i> ATCC 12016	
		25°C	60°C	25°C	60°C	25°C	60°C
Etanol	%10	80	22	79	5	97	2
	%20	75	18	75	4	110	1
	%30	74	8	66	3	88	0
	%40	73	3	69	0	65	0
SDS	0,004%	100	81	83	76	95	1
	0,008%	86	65	65	74	90	0
	0,01%	85	63	62	45	80	0
	0,2%	83	39	60	5	0	0
	0,5%	76	18	31	1	0	0
Üre	2 M	100	33	81	10	88	10
	4 M	100	23	74	7	65	1
	6 M	96	14	52	4	65	1
	8 M	69	12	32	1	13	0



Şekil 4.26 *Bacillus* sp. A333 α -glukozidaz stabilitesi üzerine üre, SDS ve etanolün 25 ve 60°C'deki etkisi



Şekil 4.27 *Bacillus* sp. A343 α -glukozidaz stabilitesi üzerine üre, SDS ve etanolün 25 ve 60°C'deki etkisi

Üre, SDS ve etanol gibi denatüre edici ajanlar proteinlerin stabiliteleri ve katlanma özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan önemli bileşiklerdir. Bir proteindeki hidrofobik karakter arttıkça etanol gibi organik çözücülerde çözülme olasılıkları da artar. Ayrıca termostabil bir enzimin etanolde aktivite göstermesi biyokatalitik reaksiyonlarda istenilen bir özellik olup suda zor çözülen bazı substratlar yüksek sıcaklıklarda etanolde çok daha iyi çözülebilirler. Bu da özellikle transglukozilasyon reaksiyonlarındaki verimi artırır (Cid *et al.* 1982).

4.13.2 Glukono- γ -lakton, redükte L-glutasyon, tris, histidin ve glukozun enzim aktivitesi üzerine etkisi

Bacillus sp. A333, A343 ve standart saf α -glukozidaz enzimlerine glukono- γ -lakton, redükte L-glutasyon, tris, histidin ve glukozun inhibisyon oranları çizelge 4.22’de verilmiştir. Substrat analogu olarak kullanılan bu inhibitörler genellikle α -glukozidazlarda substratla aktif bölge yönünden yarışır (Kelly and Fogarty 1983). Bir amin olan Tris, *Bacillus* sp. A333 ve A343 α -glukozidazlarını sırasıyla %84 ve %87 oranında inhibe ederek en yüksek etkiyi göstermiştir. Standart saf α -glukozidazın Tris mevcudiyetinde daha az inhibe olması test edilen substrat analoglarına ilgisinin farklı olmasından kaynaklanabilir. Bunun yanında standart α -glukozidaz, kendisi için yarışmalı bir inhibitör olan glukono- γ -lakton ile %86 oranında inhibe olurken, A333 ve A343 %46 ve A343 α -glukozidazları sırasıyla %43 ve %23 oranında inhibe olmuşlardır.

Çizelge 4.22 *Bacillus* sp. A333, A343 ve *G. stearothermophilus* ATCC 12016 ait α -glukozidaz enzimlerine inhibitörlerin etkisi

İnhibitör		İnhibisyon oranı (%)		
Adı	Konsantrasyonu (mM)	<i>Bacillus</i> sp. A333	<i>Bacillus</i> sp. A343	<i>G. str</i> ATCC 12016
Glukono-gama-lakton	10	46	23	86
Redükte L-glutasyon	10	27	15	20
Tris	5	84	87	72
Histidin	5	26	27	12
Glukoz	10	39	53	23

4.13.3 *p*-CMB, EDTA ve metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi

Bacillus sp. A333 ve A343 ve standart saf α -glukozidaz enzimlerinin *p*-CMB, EDTA ve metal iyonları ile inhibisyon oranları çizelge 4.23’de verilmiştir. Bir sülfidril bileşiği olan *p*CMB %66 inhibisyon oranı ile en yüksek oranda *Bacillus* sp. A333 α -glukozidazını inhibe etmiştir. *Bacillus* sp. A343 ve standart enzim için bu oranlar sırasıyla %21 ve %4 olup, oldukça düşüktür. Suzuki ve Tomura (1986a), *B. cereus* ATCC 7064 ve *B. coagulans* ATCC 7050 oligo-1,6-glukozidaz enzimleri ile yaptıkları çalışmada enzimlerin aktif bölgenin dışında sistein kökü içermelerinden dolayı, *p*CMB ile %85 oranında etkili bir şekilde inhibe olduklarını belirlemiştir. Bu sonuçlar *p*CMB ile inhibe olan *Bacillus* sp. A333 α -glukozidazın yapısında aktif merkezine etki edebilen bir sülfidril grubunun bulunduğunu gösterebilir.

EDTA, divalent iyonların kelatör bileşiği olup metalloproteinlerin ve aktivasyonları için divalent katyonlara ihtiyaç duyan enzimlerin bir inhibitörüdür. Ayrıca metale gereksinim duyan biyolojik işlemlerle de ilişkili olabilmektedir (Zubay 1988). EDTA, *Bacillus* sp. A343 α -glukozidazı ve standart saf enzimi oldukça düşük oranda inhibe ettiği halde *Bacillus* sp. A333 enzimine herhangi bir etkisi olmamıştır. Bu sonuç, standart saf enzim için daha önce belirlendiği gibi, *Bacillus* sp. A333 ve A343 α -glukozidazlarının da metalloprotein olmadıklarını ve aktivasyon için metal iyonlarına gereksinim duymadıklarını işaret etmektedir.

Test edilen metal iyonlarından Hg^{+2} en güçlü inhibitördür. Bu ağır metal test edilen her üç enzimi %85-100 oranında inhibe etmiştir. Diğer yandan Zn^{+2} , *Bacillus* sp. A333 ve A343 α -glukozidazlarını sırasıyla %14 ve %17 gibi düşük oranlarda inhibe ederken, standart saf enzimi %100 oranında inhibe etmiştir. Bu sonuçlar aynı zamanda test edilen metal iyonlarının incelenen üç enzim tarafından kofaktör olarak kullanılmadıklarını göstermektedir.

Çizelge 4.23 *Bacillus* sp. A333, A343 ve *G. stearothermophilus* ATCC 12016 ait α -glukozidaz enzimlerine *p*-CMB, EDTA ve metal iyonlarının etkisi

Eklenenler	Konsantrasyonu	İnhibisyon oranı (%)		
		<i>Bacillus</i> sp. A333	<i>Bacillus</i> sp. A343	<i>G. str.</i> ATCC12016
<i>p</i> -kloromerküribenzoat	50 μ M	66	21	4
EDTA	2 mM	0	9	7
CuCl ₂	2 mM	38	36	98
HgSO ₄	2 mM	98	85	100
CaCl ₂	2 mM	0	18	85
FeSO ₄	2 mM	15	31	89
MgSO ₄	2 mM	13	5	55
BaCl ₂	2 mM	19	7	48
ZnSO ₄	2 mM	14	17	100
MnSO ₄	2 mM	28	8	83

Bu verilerin de ışığı altında standart termostabil α -glukozidaz ile kıyaslandıklarında; *Bacillus* sp. A333 α -glukozidazının denatüre edici ajanlara, inhibitörlere ve metal iyonlarına, *Bacillus* sp. A343 α -glukozidazının ise inhibitörlere ve metal iyonlarına belirgin şekilde daha dayanıklı oldukları söylenebilir. Enzimler, standarda göre daha fazla konformasyonel stabilizasyon göstermişlerdir.

5. SONUÇ

Tez çalışması kapsamında, Türkiye'nin 6 ilinde bulunan 19 jeotermal alana ait 46 farklı sıcak su kaynağından 78 su, 113 toprak ve sediment örneği olmak üzere toplam 191 numune toplanmış ve 134 numunede bakteriyel üreme gözlenerek bakteri izolasyonu yapılmıştır. Aydın'dan (A) 82, Manisa'dan (B) 41, Denizli'den (C) 40, İzmir'den (D) 178, Nevşehir'den (E) 98 ve Ankara'dan (F) 12 olmak üzere koloni morfolojisi yönünden farklılık gösteren toplam 451 adet termofilik izolat elde edilmiş, saflaştırılarak gliserol içeren ortama alınmıştır.

Daha sonra yüksek amilaz aktivitesi gösteren izolatlar belirlenmiş ve bunlar arasından Gram (+), katalaz (+), hareketli ve endospor oluşturabilen 67 adet *Bacillus* cinsi termofilik bakteri izolatı α -glukozidaz enzim aktivitesi açısından test etmek amacıyla seçilmiştir. Seçilen 67 adet izolatın α -glukozidaz üretim kapasiteleri hücre içi ve hücre dışı enzim aktivitelerine bakılmış ve istatistiksel olarak analiz edilerek sıralanmıştır. Dizin sonuçlarına göre en yüksek enzim üreticisi izolatlar belirlenmiştir. Yüksek oranda α -glukozidaz üreten A333, A343, E134, F84a ve F84b izolatlarının 48 saatlik zamana bağlı olarak hücre içi ve hücre dışı enzim üretimleri belirlenmiş olup maksimum enzim üretim zamanı izolatlara göre değişiklik göstererek 4, 8 ve 12 saat olarak tespit edilmiştir.

Yüksek oranda α -glukozidaz üreten izolatlar arasından *Bacillus* sp. A333 hücre dışı, *Bacillus* sp. A343 ise hücre içi enzim üreticisi izolatlar olarak belirlenmiş ve bundan sonraki çalışmalarda bu izolatlar kullanılmıştır. İzolatların biyokimyasal ve morfolojik özellikleri test edilmiştir.

Amonyum sülfatla kısmi olarak saflaştırılan *Bacillus* sp. A333 hücre dışı α -glukozidaz enzimi besiyeri sıvısından %71 verimle 2.7 kat; *Bacillus* sp. A343 hücre içi α -glukozidaz enzimi ise sonikasyon sonrası üst sıvıdan %60 verimle 1.27 kat saflaştırılmıştır. *Bacillus* sp. A343 α -glukozidazı hücre içi bir enzim olduğundan dolayı daha düşük bir saflaştırma katsayısına karşın daha yüksek spesifik aktiviteyle saflaştırılabilmektedir.

N-PAGE ve aktivite boyaması testleri *Bacillus* sp. A333 ve A343 α -glukozidazlarının standart suşlara ait enzimlerden ve standart saf enzimden farklı elektroforetik mobilitelerde olduklarını; SDS-PAGE analizleri ise *Bacillus* sp. A333 ve A343 α -glukozidazlarının yaklaşık olarak 44 kDa ve 60 kDa'luk proteinler içerdiğini göstermiştir.

Bacillus sp. A333 α -glukozidazının optimum sıcaklık isteği 60°C optimum pH değeri 6.8 olarak belirlenmiş olup 35°C'de, pH 6-9.5 arasında 15 saatlik stabilitesi %85-89 oranında bulunmuştur. *Bacillus* sp. A343 α -glukozidazının ise 65°C ve pH 7.0'de optimum aktivite gösterdiği ve 35°C'de pH 5-6.8 aralığında 15 saatlik stabilitesinin %100-82 olduğu bulunmuştur.

Bacillus sp. A333 α -glukozidaz enzimi için K_m ve V_{max} değeri sırasıyla 1.38 mM ve 2.96 U/ml/dak, *Bacillus* sp. A343 α -glukozidaz enzimi için ise 0.852 mM ve 27.47 U/ml/dak olarak belirlenmiştir.

Bacillus sp. A333 α -glukozidazının en yüksek aktivite gösterdiği substratlar sırasıyla maltoz> dekstrin> turanoz> maltotrioz> maltopentoz> maltotetroz> maltoheksoz> fenil- α -D-glukozit; *Bacillus* sp. A343 α -glukozidazının ise en yüksek aktivite gösterdiği substratlar sırasıyla dekstrin> turanoz> maltoz> fenil- α -D-glukozit> maltotrioz> maltotetroz> maltopentoz> izomaltoz> sakkaroz> kojibioz olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar *Bacillus* sp. A333 α -glukozidazının substratlardaki α -1,4 ve α -1,3 glukozidik bağlarını hidrolize ederek α -glukozidazların karakteristik bir özelliği olan D-glukoz monomerlerini oluşturduğunu; *Bacillus* sp. A343 α -glukozidazının ise substratlardaki α -1,4, α -1,3, α -1,2 ve α -1,6 glukozidik bağlarını hidrolize ederek D-glukoz monomerlerini oluşturduğunu göstermektedir. *Bacillus* sp. A343 α -glukozidazının substrat spesifikliğı oldukça geniş olup enzim, α -glukozidazların tipik özelliğı olan maltooligosakkaritlerdeki α -1,4 bağlarının yanı sıra diğer pek çok glukozidik bağa da etki etmektedir. *Bacillus* sp. A343 α -glukozidazı, A333 α -glukozidazına göre daha geniş substrat spesifikliğıne sahip olup hidroliz reaksiyonlarında kullanım potansiyeli göstermektedir.

İnce tabaka kromatografisi sonuçları, *Bacillus* sp. A333 ve A343 α -glukozidazlarının birer α -glukozidaz oldukları kesinleştirmiştir. Her iki enzim de ekzo- α -1,4 glukozidik

bağlarına etki etmektedirler. Aynı zamanda gerçekleştirdikleri reaksiyon geri dönüşümlü olup transglukozilasyon aktivitesi göstermektedirler. Kısmi olarak saflaştırılan enzimlerden özellikle *Bacillus* sp. A333 α -glukozidazı çok yüksek bir transglukozilasyon aktivitesine sahip olup bu amaçla biyoteknolojik uygulamalarda kullanım potansiyeline sahiptir.

Bacillus sp. A333 α -glukozidazı, denatüre edici ajanlara, inhibitörlere ve metal iyonlarının çoğuna yüksek oranda direnç göstermektedir. Diğer yönden *Bacillus* sp. A343 α -glukozidazı inhibitörlere ve metal iyonlarının çoğuna dirençli olarak bulunmuştur. pH ve sıcaklık stabiliteleri yanında inhibitörlere de dirençli olmaları, her iki enzimin de yüksek konformasyonel stabiliteye sahip olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada, ülkemize ait bazı jeotermal alanlardan elde edilen termofilik *Bacillus* sp. izolatları bir yandan ulusal bakteri veri tabanına katkıda bulunurken diğer yandan biyoteknolojik potansiyele sahip termostabil ekzo- α -1,4-glukozidaz üreticisi yeni bakteri izolatları belirlenmiş ve kısmen saflaştırılan enzimler karakterize edilmiştir. Daha sonra yapılacak ileri saflaştırma, amino asit dizi analizi ve üç boyutlu yapı analizleri ile enzimler daha iyi aydınlatılmış olacaktır.

KAYNAKLAR

- Albert, H., Davies, D. J. G., Woodson, L. P. and Soper, C. J. 1998. Biological indicators for steam sterilization: characterization of a rapid biological indicator utilizing *Bacillus stearothermophilus* spore-associated α -glucosidase enzyme. *Journal of Applied Microbiology*, 85; 865-874.
- Anonymous. 2004. Web sitesi: http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/fam/acc_GH.html, Cazy-Carbohydrate Active Enzymes. The Glycoside Hydrolase Family, Erişim tarihi:10.12.2006.
- Arellano-Carbajal, F. and Olmos-Soto, J. 2002. Thermostable α -1,4- and α -1,6-glucosidase enzymes from *Bacillus* sp. isolated from marine environment. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18; 791-795.
- Beldüz, A. O., Dölger, S. and Demirbağ, Z. 2003. *Anoxybacillus gonensis* sp. nov., a moderately thermophilic, xylose-utilizing, endospore-forming bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53; 1315-1320.
- Bergmeyer, H. U. and Bernt, E. 1974. Determination of glucose with glucose-oxidase and peroxidase. In: Bergmeyer, H. U. (ed.). *Methods of Enzymatic Analysis*. New York : Verlag Chemie-Academic Pres. pp. 1205-15.
- Berthelot, K. and Delmotte, F. M. 1999. Purification and characterization of an α -glucosidase from *Rhizobium* sp. (*Robina pseudoacacia* L.) Strain USDA 4280. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65; 2907-2911.
- Bill, R. M. and Flisch, S. L. 1996. Chemical and biological approaches to glycoprotein synthesis. *Chem. and Biol.*, 3; 145-149.
- Bourne, Y. and Henrissat, B. 2001. Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules. *Current Opinion in Structural Biology*, 11; 593-60015.
- Castro, G. R., Baigori, M. D. and Siñeriz F. 1995. Short Communication. Production of α -glucosidase by *Bacillus* sp. strains. *Acta Biotechnologica*, 15; 233-240.
- Chiba, S. 1997. Molecular mechanism in α -glucosidase and glucoamylase. *Biosci. Biotech. Biochem.* 61; 1233-1239.
- Cid, H., Bunster, M, Arriagada, E. and Campos, M. 1982. Prediction of secondary structure of proteins by means of hydrophobicity profiles. *FEBS Letters*, 150; 247-254.
- Claus, D. and Berkeley, C. W. 1986. The genus *Bacillus* In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 2. Sneath pHA (Ed.). Williams, Wilkins, Baltimore, 34; 1105-1139, ISBN: 0-683-07893-9.
- Constantino, H., R., Brown, S. H. and Kelly, R. M. 1990. Purification and characterization of an α -glucosidase from a hyperthermophilic archaebacterium, *Pyrococcus furious*, exhibiting a temperature optimum of 105 to 115⁰C. *J. Bacteriol.*, 172; 3654-3660.
- Demirjian, D. C., Moris-Varas, F. and Cassidy, C. S. 2001. Enzymes from extremophiles. *Curr. Oppinion Chem. Biol.*, 5; 144-151.
- Erarslan A., Kazan, D., Denizci, A., A., Öztürk, D., C. ve Karahan, N. 2005. Enzim Saflaştırmasında Temel Yöntemler. 8. Uygulmalı Eğitim Kurs Kitabı. TÜBİTAK Gen Mühendisliğı ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü, Kocaeli.

- Erişen, B., Akkuş, İ., Uygur, N. ve Koçak, A. 1996. Türkiye Jeotermal Envanteri. Maden Tetkik Arama Genel Müdürlüğü, Ankara.
- Esen, A. 1978. A simple method for quantitative, semi quantitative, and qualitative assay of protein. *Anal. Biochem.*, 89; 264-273.
- Ewalt, K. L., Hendrick, J. P., Houry, W. A. and Harti, F. U. 1997. In vivo observation of polypeptide flux through the bacterial chaperonin system. *Cell*, 90; 491-500.
- Ezeji, T. C., Wolf, A. and Bahl, H. 2005. Isolation and identification of *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10, an α -amylase and α -glucosidase producing thermophile. *Can. J. Microbiol.*, 51; 685-693.
- Gabriel, O. and Gersten, D. M. 1992. Staining for enzymatic activity after gel electrophoresis, I. *Analytical Biochemistry*, 203; 1-21.
- Giblin M., Kelly, C. T. and Fogarty, W. M. 1987. Thermostable- α -glucosidase produced by *Bacillus caldovelox* DSM 411. *Can. J. Microbiol.*, 33; 614-618.
- Haki, G. D. and Rakshit, S. K. 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*, 89; 17-34.
- Halvorson, H. and Ellias, L. 1958. The purification and properties of an α -glucosidase of *Saccharomyces italicus* Y1225. *Biochim. Biophys. Acta.*, 30; 28-40.
- Halvorson, H. 1966. *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York, Vol. 8; 559-562.
- Henrissat, B. 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.*, 280; 309-316.
- Henrissat, B. and Bairoch, A. 1993. New families in the classification of glycosyl hydrolases on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.*, 193; 781-788.
- Henrissat, B., Callebaut, I., Fabrega, S., Lehn, P., Mornon, J., and Davies, G. 1995. Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92; 7090-7094.
- Henrissat, B. and Bairoch, A. 1996. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.*, 316; 695-696.
- Henrissat, B. and Davies, G. 1997. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology*, 7; 637-644.
- Hermans, M. M. P., Kross, M. A., Beeumen, J., Oostra, B. A. and Reuser, A. J. J. 1991. Human lysosomal α -glucosidase. *J. Biol. Chem.*, 266; 13507-13512.
- Horváthová, V., Janeček, Š. and Šturdík, E. 2000. Amylolytic enzymes: their specificities, origins and properties. *Biologia, Bratislava*, 55; 605-615.
- Hough, W. D. and Danson, M. J. 1999. Extremozymes. *Current Opinion in Chemical Biology*, 3; 39-46.
- Hung V. S., Hatada, Y., Goda, S., Lu, J., Hidaka, Y., Li, Z., Akita, M., Ohta, Y., Watanabe, K., Matsui, H., Ito, S. and Horikoshi, K. 2005. α -Glucosidase from a strain of deep-sea *Geobacillus*: a potential enzyme for the biosynthesis of complex carbohydrates. *Appl. Microbial Biotechnol.*, 68; 757-765.
- Inohara-Ochiai, M., Nakayama, T., Goto, R., Nakao, M., Ueda, T. and Shibano, Y. 1997. Altering substrate specificity of *Bacillus* SAM1606 α -glucosidase by comparative site-specific mutagenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 272; 1601-1607.
- Janda, L., Pavelka, T., Tichý, P., Spižek, J. and Petříček, M. 1997. Production and properties of α -glucosidase from the thermotolerant bacterium *Thermomonospora curvata*. *J. Appl. Microbiol.*, 83; 470-476.

- Jespersen, H. M., MacGregor, A., Henrissat, B., Sierks, M. and Svensson, B. 1993. Starch- and glycogen-debranching and branching enzymes; prediction of structural features of the catalytic (β/α)₈-barrel domain and evolutionary relationship to other amylolytic enzymes. *Journal of Protein Chemistry*, 12; 791-805.
- Kashiwabara, S., Azuma, S., Tsuduki, M. and Suzuki, Y. 2000. The primary structure of the subunit in *Bacillus thermoamyloliquefaciens* KP1071 molecular weight 540,000 homohexameric α -glucosidase II belonging to the glycosyl hydrolase family 31. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64; 1379-1393.
- Kelly, C.T. and Fogarty, W. M. 1983. Microbial α -glucosidases. *Process Biochem.*, 18; 6-12.
- Kelly, C. T., O'Reilly, F. and Fogarty, W. M. 1983. Extracellular α -glucosidase of an alkalophilic microorganism, *Bacillus* sp. ATCC 21591. *FEMS Microbiology Letters*, 20; 55-59.
- Kelly, C. T., Giblin, M. and Fogarty, W. M. 1986. Resolution, purification, and characterization of two extracellular glucohydrolases, α -glucosidase and maltase, of *Bacillus licheniformis*. *Can. J. Microbiol.*, 32; 342-347.
- Kwon, K., Lee, J., Kang, H. G. and Hah, Y. C. 1994. Detection of β -glucosidase activity in polyacrylamide gels with esculin as substrate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60; 4584-4586.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227; 680-685.
- Lee, Y. E. 2000. Cloning and characterization of α -glucosidase gene from thermophilic *Bacillus* sp. DG0303. *J. Microbial. Biotechnol.*, 10; 244-250.
- Lee, S. S., He, S. and Withers, S. G. 2001. Identification of the catalytic nucleophile of the Family 31 α -glucosidase from *Aspergillus niger* via trapping of a 5-fluoroglycosyl-enzyme intermediate. *Biochem. J.*, 359; 381-386.
- Lineweaver, H. and Burk, D. 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.*, 56; 658-666.
- Lorentz, K. 2000. Routine α -amylase assay using protected 4-nitrophenyl-1,4- α -D-maltoheptoside and a novel α -glucosidase. *Clinical Chemistry*, 46; 644-649.
- Malá, S. and Králová, B. 2000. Heterooligosaccharide synthesis catalyzed by α -glucosidase from *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10; 617-621.
- Maarel, van der M. J. E. C., Veen van der B, Uitdehaag, J. C. M., Leenhuis, H. and Dijkhuizen, L. 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *J. Biotechnol.*, 94; 137-155.
- Mozhaev, V. V. 1993. Mechanism-based strategies for protein thermostabilization. *TIBTECH.*, 11; 88-95.
- Murakami, S., Yagami, M. and Suzuki, Y. 1998. Purification and some properties of an extremely thermostable trehalose-hydrolyzing α -glucosidase from *Bacillus flavocaldarius* KP1228. *Starch/Stärke*, 50; 100-103.
- Nakao, M., Nakayama, T., Kakudo, A., Inohara, M., Harada, M., Omura, F. and Shibano, Y. 1994a. Structure and expression of a gene coding for thermostable specificity from *Bacillus* sp. SAM1606. *Eur. J. Biochem.*, 220; 293-300.

- Nakao, M., Nakayama, T., Harada, M., Kakudo, A., Ikemoto, H., Kobayashi, S. and Shibano, Y. 1994b. Purification and characterization of *Bacillus* sp. SAM1606 thermostable α -glucosidase with transglucosylation activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 41; 337-343.
- Nashiru, O., Koh, S., Lee, S. and Lee, D. 2001. Novel α -glucosidase from extreme thermophile *Thermus caldophilus* GK24. *J. Biochem. and Mol. Biol.*, 34; 347-354.
- 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. and 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 J. of Systematic and Evolutionary Microb.*, 51; 433-446.
- Nicolaus, B., Lama, L., Esposito, E., Manca, M. C., Prisco, G. and Gambacorta, A. 2004. "*Bacillus thermoantarticus*" sp. nov., from Mount Melbourne, Antarctica: a novel thermophilic species. *Polar Biology*, 16; 101-104.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kähler, M. and Antranikian, G. 1999. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51; 711-729.
- Noguchi, A., Yano, M., Ohshima, Y., Hemmi, H., Inohara-Ochiai, M., Okada, M., Min, K., Nakayama, T. and Nishino, T. 2003. Deciphering the molecular basis of the broad substrate specificity of α -glucosidase from *Bacillus* sp. SAM1606. *J. Biochem.*, 134; 543-550.
- Omichi, K. and Ikenaka, T. 1985. Preparation of non-reducing-end substituted *p*-nitrophenyl α -maltopentaoside (FG5P) as a substrate for a coupled enzymatic assay for α -amylase. *J. Biochem.*, 97; 977-982.
- Piller, K., Daniel, R. M. and Petach, H. H. 1996. Properties and stabilization of an extracellular α -glucosidase from the extremely thermophilic archaeobacteria *Thermococcus* strain AN1: enzyme activity at 130°C. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1292; 197-205.
- Poonam, N. and Singh, D. 1995. Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme and Microbial Technology*, 17; 770-778.
- Rolfsmeier, M. and Blum, P. 1995. Purification and characterization of a maltase from the extremely thermophilic Crenarchaeote *Sulfolobus solfataricus*. *J. Bacteriol.*, 177; 482-485.
- Rolfsmeier, M., Haseltine, C., Bini, E., Clark, A. and Blum, P. 1998. Molecular characterization of the α -glucosidase gene (*malA*) from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J. Bacteriol.*, 180; 1287-1295.
- Rye, C. S. and Withers, S. G. 2000. Glycosidase Mechanism. *Current Opinion in Structural Biology*, 4; 573-580.
- Schön, U. and Schumann, W. 1995. Overproduction, purification and chracterization of GroES and GroEL from thermophilic *Bacillus stearothermophilus*. *FEMS Microbiology Letters*, 134; 183-188.

- Sellek, G. A. and Chaudhuri, J. B. 1999. Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles. *Enzyme and Microbial Technology*, 25; 471-482.
- Setlow, P., Cabrera, M. and Setlow, P. 2004. Mechanism of the hydrolysis of 4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside by germinating and outgrowing spores of *Bacillus* species. *J. Appl. Microbiol.*, 96; 1245-1255.
- Shirai, T., Hung, V. S., Akita, M., Hatada, Y., Ito, S. and Horikoshi, K. 2003. Crystallization and preliminary X-ray study of α -glucosidase from *Geobacillus* sp. strain HTA-462, one of the deepest sea bacteria. *Biological Crystallization*, 59; 1278-1279.
- Suzuki, Y., Kishigami, T. and Abe, S. 1976a. Production of extracellular α -glucosidase by a thermophilic *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 31; 807-812. (7)
- Suzuki, Y., Yuki, T., Kishigami, T., and Abe, S. 1976b. Purification and properties of extracellular α -glucosidase of a thermophile, *Bacillus thermoglucosidius* KP 1006. *Biochimica et Biophysica Acta*, 445; 386-397.
- Suzuki, Y., Ueda, Y., Nakamura, N. and Abe, S. 1979. Hydrolysis of low molecular weight isomaltosaccharides by a p -nitrophenyl- α -D-glucopyranoside-hydrolyzing α -glucosidase from a thermophile, *Bacillus thermoglucosidius* KP 1006. *Biochimica et Biophysica Acta*, 566; 62-66.
- Suzuki, Y., Aoki, R. and Hayashi, H. 1982. Assignment of a p -nitrophenyl- α -D-glucopyranoside-hydrolyzing α -glucosidase of *Bacillus cereus* ATCC 7064 to an exo-oligo-1,6-glucosidase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 704; 476-483.
- Suzuki, Y. and Imai, T. 1982. Abnormally high tolerance against proteolysis of an exo-oligo-1,6-glucosidase from a thermophile *Bacillus thermoglucosidius* KP 1006, compared with its mesophilic counterpart from *Bacillus cereus* ATCC 7064. *Biochimica et Biophysica Acta*, 705; 124-126.
- Suzuki, Y., Kano, Y. and Nishimura, N. 1984a. Purification of a *Bacillus thermoglucosidius* exo-oligo-1,6-glucosidase by a simple and rapid four-step method. *Starch/Stärke*, 36; 275-277.
- Suzuki, Y., Shinji, M. and Eto, N. 1984b. Assignment of a p -nitrophenyl- α -D-glucopyranosidase of *Bacillus stearothermophilus* ATCC 12016 to a novel exo- α -1,4-glucosidase active for oligomaltosaccharides and α -glucans. *Biochimica et Biophysica Acta*, 787; 281-289.
- Suzuki, Y. and Tomura, Y. 1986a. Purification and characterization of *Bacillus coagulans* oligo-1,6-glucosidase. *Eur. J. Biochem.*, 158; 77-83.
- Suzuki, Y. and Tomura, Y. 1986b. Purification and characterization of *Bacillus coagulans* oligo-1,6-glucosidase. *European Journal of Biochemistry*, 158; 77-83.
- Suzuki, Y., Fujii, H., Uemura, H. and Kyoto, M. S. 1987a. Purification and characterization of extremely thermostable exo-oligo-1,6-glucosidase from a caldoactive *Bacillus* sp. KP 1228. *Starch/Stärke*, 39; 17-23.
- Suzuki, Y., Oishi, K., Nakano, H. and Nagayama, T. 1987b. A strong correlation between the increase in number of proline residues and the rise in thermostability of five *Bacillus* oligo-1,6-glucosidases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 26; 546-551.
- Suzuki, Y. and Oishi, K. 1989. A relationship between efficiency of isomaltosaccharide hydrolysis and thermostability of six *Bacillus* oligo-1,6-glucosidases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31; 32-37.

- Suzuki, Y., Yonezawa, K., Hattori, M. and Takii, Y. 1992. Assignment of *Bacillus thermoamyloliquefaciens* KO1071 α -glucosidase I to an exo- α -1,4-glucosidase, and its striking similarity to bacillary oligo-1,6-glucosidases in N-terminal sequence and in structural parameters calculated from the amino acid composition. *Eur. J. Biochem.*, 205; 249-256.
- Takii, Y., Daimon, K. and Suzuki, Y. 1992. Cloning and expression of a thermostable exo- α -1,4-glucosidase gene from *Bacillus stearothermophilus* ATCC12016 in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 243-247.
- Takii, Y., Takahashi, K., Yamamoto, K. and Suzuki, Y. 1996. *Bacillus stearothermophilus* ATCC12016 α -glucosidase specific for α -1,4 bonds of maltosaccharides and α -glucans shows high amino acid sequence similarities to seven α -D-glucohydrolases with different substrate specificity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44; 629-634.
- Thirunavukkarasu, M. and Priest, F. G. 1984. Purification and characterization of an extracellular and a cellular α -glucosidase from *Bacillus licheniformis*. *J. General Microbiol.*, 130; 3135-3141.
- Urlaub, H. and Wober, G. 1978. Alpha-glucosidase, a membrane-bound enzyme of alpha-glucan metabolism in *Bacillus amyloliquefaciens*. Purification and partial characterization. *Biochim. Biophys. Acta.*, 522; 161-173.
- Vic, G., Hastings J. J. and Crout, D. H. G. 1996. Glycosidase-catalysed synthesis of glycosides by an improved procedure for reverse hydrolysis: Applications to the chemoenzymatic synthesis of galactopyranosyl-(1-4)-O- α -galactopyranoside derivatives. *Tetrahedron: Asymmetry*, 7; 1973-1984.
- Watanabe, K., Chishiro, K., Kitamura, K. and Suzuki, Y. 1991. Proline residues responsible for thermostability occur with high frequency in the loop regions of an extremely thermostable oligo-1,6-glucosidase from *Bacillus thermoglucosidasius* KP1006. *The Journal of Biological Chemistry*, 266; 24287-24294.
- Watanabe, K., Masuda, T., Ohashi, H., Mihara, H. and Suzuki, Y. 1994. Multiple proline substitutions cumulatively thermostabilize *Bacillus cereus* ATCC7064 oligo-1,6-glucosidase. Irrefragable proof supporting the proline rule. *Eur. J. Biochem.*, 226; 277-283.
- Watanabe, K., Kitamura, K. and Suzuki, Y. 1996. Analysis of the critical sites for protein thermostabilization by proline substitution in oligo-1,6-glucosidase from *Bacillus coagulans* ATCC 7050 and the evolutionary consideration of proline residues. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62; 2066-2073.
- Watanabe, K., Hata, Y., Kizaki, H., Katsube, Y. and Suzuki, Y. 1997. The refined crystal structure of *Bacillus cereus* oligo-1,6-glucosidase at 2.0 Å resolution: structural characterization of proline-substitution sites for protein thermostabilization. *J. Mol. Biol.*, 269; 142-153.
- Watanabe, K. and Suzuki, Y. 1998. Protein thermostabilization by proline substitutions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 4; 167-180.
- Watanabe, K., Miyake, K. and Suzuki, Y. 2001. Identification of catalytic and substrate-binding site residues in *Bacillus cereus* ATCC7064 oligo-1,6-glucosidase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65; 2058-2064.

- Watanabe, K., Fujiwara, H., Inui, K. and Suzuki, Y. 2002. Oligo-1,6-glucosidase from a thermophile, *Bacillus thermoglucosidasius* KP1006, was efficiently produced by combinatorial expression of GroEL in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 35; 35-43.
- Watt, G. M., Lowden, P. A. S. and Flitsch, S. L. 1997. Enzyme-catalyzed formation of glycosidic linkages. *Current Opinion in Structural Biology*, 7; 652-660.
- Wimmer, B., Lottspeich, F., Ritter, J. and Bronnenmeier, K. 1997. A novel type of thermostable α -D-glucosidase from *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* exhibiting maltodextrinohydrolase activity. *Biochem. J.*, 328; 581-586.
- Woese, C. R. and Wolfe, R. S., 1985. *The bacteria*, Volume VII, Academic Press, USA, ISBN: 0-12-307208-5.
- Woese, C. R. 1999. Prokaryote Systematics. The evolution of a science In: *The procaryotes. A handbook on the biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*, 3rd. Edt., (Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H. and Stackebrandth, E., Eds). Springer-Verlag, New York (electronic publication).
- Yamamoto, M. and Horikoshi, K. 1990. Purification and properties of an oligo-1,6-D-glucosidase from an alkalophilic *Bacillus* species. *Carbohydrate Research*, 197; 227-235.
- Yamamoto, K., Nakayama, A., Yamamoto, Y. and Tabata, S. 2004. Val216 decides the substrate specificity of α -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, 271; 3414-3420.
- Zubay, G. 1988. *Biochemistry*. Machmillan Publishing Company, 866 Third Avenue, New York 10022, 2nd. edition; 131-414, ISBN-0-22-432080-3.

E K L E R

EK 1 Enzim Aktivitesi'nde Kullanılan Kimyasalların Hazırlanışları ve İçerikleri

EK 2 SDS-PAGE'de Kullanılan Stoklar ve Hazırlanışları

EK 3 N-PAGE'de Kullanılan Stoklar ve Hazırlanışları

EK 4 Enzimlerin pH Stabilitesinin ve Aktivitesinin Belirlenmesinde Kullanılan
Tamponlar ve Hazırlanışları

EK 1 Enzim Aktivitesi'nde Kullanılan Kimyasalların Hazırlanışları ve İçerikleri

133 mM Potasyum Fosfat Tamponu (pH 6.8, 25°C)

133 mM K ₂ HPO ₄	4.634 g/200 ml (pH 9.13)
133 mM KH ₂ PO ₄	3.620 g/200 ml (pH 4.4)

133 mM K₂HPO₄'den 100 ml ve 133 mM KH₂PO₄'den 50 ml karıştırılmış ve yine aynı tampon içerikleri ile toplam hacim 200 ml olana kadar pH 6.8'e ayarlanmış ve steril edilmiştir.

50 mM Potasyum Fosfat-5 mM EDTA Tamponu (pH 7.0, 25°C)

50 mM K ₂ HPO ₄	1.742 g/200 ml
50 mM KH ₂ PO ₄	1.361 g/200 ml
5 mM EDTA	0.465 g/250 ml

5 mM EDTA öncelikle 20 ml dH₂O'da çözülmüştür. 50 mM K₂HPO₄'den 150 ml ve 50 mM KH₂PO₄'den 75 ml karıştırılmış ve yine aynı tampon içerikleri ile toplam hacim 250 ml olana kadar pH 7.0'ye ayarlanmış ve steril edilmiştir.

pNPG solüsyonu (16 mM)

-20°C'de saklanan pNPG'den 48.2 mg tartılarak enzim çalışılacağı zaman 10 ml dH₂O'da çözülmüş ve ışık görmemesi için alüminyum folyo ile sarılmıştır.

Na₂CO₃ Solüsyonu (1 M)

Na ₂ CO ₃	10.6 g
dH ₂ O	100 ml

EK 2 SDS-PAGE’de Kullanılan Stoklar ve Hazırlanışları

Akrilamid/Bisakrilamid çözeltisi

Akrilamid	29.2 g
Bisakrilamid	0.8 g
d.su	100 ml

Yığma Jeli (%4)

Akrilamid/Bisakrilmid	0.82 ml
dH ₂ O	2.93 ml
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	1.25 ml
APS	30 µl
TEMED	5 µl

Ayırma Jeli (%10)

Akrilamid/Bisakrilmid	5.78 ml
dH ₂ O	7.13 ml
1.5 M Tris-HCl (pH 8.6)	4.33 ml
APS	86.7 µl
TEMED	8.16 µl

Yükleme Tamponu Stoğu (pH 8.3)

Trizma base	1.65 g
Glisin	8 g
SDS	1.4 g
dH ₂ O	1100 ml

Örnek Tamponu (4X)

0.5 M Tris-HCl (pH6.8)	5.12 ml
Gliserol	8 ml
SDS	2 g
dH ₂ O	3 ml
Merkaptoetanol	4 ml
Bromofenol blue	2.10 ⁻⁴ g

EK 2 SDS-PAGE’de Kullanılan Stoklar ve Hazırlanışları (devam)

Coomassie Brilliant Blue boya çözeltisi

Coomassie Brilliant Blue R250	1.5 g
İzopropil alkol	250 ml
Glasiyel asetik asit	100 ml
dH ₂ O	650 ml

Boya giderme Çözeltisi

İzopropil alkol	250 ml
Glasiyel asetik asit	100 ml
dH ₂ O	650 ml

EK 3 N-PAGE’de Kullanılan Stoklar ve Hazırlanışları

Akrilamid/Bisakrilamid çözeltisi

Akrilamid	29.2 g
Bisakrilamid	0.8 g
dH ₂ O	100 ml

Yığma Jeli (%4)

Akrilamid/Bisakrilmid	0.82 ml
dH ₂ O	2.93 ml
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	1.25 ml
APS	30 µl
TEMED	5 µl

Ayırma Jeli (%10)

Akrilamid/Bisakrilmid	5.78 ml
dH ₂ O	7.13 ml
1.5 M Tris-HCl (pH 8.6)	4.33 ml
APS	86.7 µl
TEMED	8.16 µl

Yükleme Tamponu Stoğu (pH 8.3)

Trizma base	1.65 g
Glisin	8 g
dH ₂ O	1100 ml

Örnek Tamponu (4X)

0.5 M Tris-HCl (pH6.8)	5.12 ml
Gliserol	8 ml
dH ₂ O	3 ml
Bromofenol blue	2.10 ⁻⁴ g

EK 4 Enzimlerin pH Stabilitésinin ve Aktivitesinin Belirlenmesinde Kullanılan Tamponlar ve Hazırlanışları

0.02 M sodyum-sitrat tamponu (pH 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5)

Trisodyum sitrat	1.176 g
NaCl	0.177 g
dH ₂ O	100 ml

pH HCl ile 3-5.5 arasında ayarlanmıştır. Tampon süzülerek steril edilmiştir.

1M HEPES tamponu (pH 6, 6.5)

HEPES	11.92 g
dH ₂ O	50 ml

0.1 M borat tamponu (pH 8.5)

Borik asit	0.618 g
dH ₂ O	100 ml

10 mM NaOH ile pH 8.5'a ayarlanmış ve süzülerek steril edilmiştir.

0.1 M sodyum fosfat tamponu (pH 7, 7.5, 8)

Solüsyon A

Na ₂ HPO ₄	16.095 g
dH ₂ O	300 ml

Solüsyon B

NaH ₂ PO ₄	5.52 g
dH ₂ O	200 ml

pH 7'lik tampon için solüsyon A'dan 39 ml, solüsyon B'den 91 ml, pH 7.5'luk tampon hazırlamak için solüsyon A'dan 16 ml, solüsyon B'den 84 ml ve pH 8'lik tampon hazırlamak için ise solüsyon A'dan 5.3 ml, solüsyon B'den 97.4 ml karıştırılarak steril edilmiştir.

EK 4 Enzimlerin pH Stabilitesinin ve Aktivitesinin Belirlenmesinde Kullanılan Tamponlar ve Hazırlanışları (devam)

0.1 M sodium karbonat-bikarbonat tamponu (pH 9, 9.5)

Na₂CO₃ 0.136 g

NaHCO₃ 0.735 g

dH₂O 100 ml

pH 1 M HCL veya 1M NaOH ile 9-9.5'a ayarlanmış ve steril edilmiştir.

Ringer tamponu (pH 10, 11)

1 tablet 500 ml dH₂O'da çözülmüş ve pH 10-11'e ayarlanmış ve steril edilmiştir.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :Arzu ÇÖLERİ

Doğum Yeri :Ankara

Doğum Tarihi :10.11.1976

Medeni Hali :Bekar

Yabancı Dili :İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Özel Arı Lisesi (1991-1994)

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (1994-1998)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji ABD
(1998-2002)

Yüksek Lisans Tez Konusu

“Türkiye Kaynaklı Klinik *Enterococcus*’ların Antibiyotik Dirençliliği”

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl

Bayındır Hastanesi Kavaklıdere Laboratuvarı (Biyolog) (1998-2002)

Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (Araştırma Görevlisi) (2002-)

Yayınları

Coleri, A., Cokmus, C., Ozcan, B., Akcelik, M., and Tukul, C. 2005. Determination of antibiotic resistance and resistance plasmids in clinical *Enterococcus* species. The Journal of General and Applied Microbiology, 50;4, 213-219.

Ozcan, B., Cokmus, C., Coleri, A., and Caliskan, M. 2006. Characterization of extremely halophilic archaea isolated from saline environment in different parts of Turkey. Microbiology, 75;6, 849-856.

Ozcan, B., Ozcengiz, G., Coleri, A., and Cokmus, C. 2007. Diversity of Halophilic Archaea From Six Hypersaline Environments in Turkey. Journal of Microbiology and Biotechnology, (baskıda).