



EGE ÜNİVERSİTESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BAZI *BACILLUS* İZOLATLARINDA ALFA-L-FUKOSİDAZ AKTİVİTESİNİN
İNCELENMESİ, ENZİMİN KISMI
SAFLAŞTIRILMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

Pınar SÖZER

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 612.01.00

Sunuş Tarihi :16/09/2009

Tez Danışmanı : Prof.Dr. Rengin ELTEM

Bornova-İZMİR

2009

Sayın **Pınar SÖZER** tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “**Bazı *Bacillus* İzolatlarında Alfa-L-Fukosidaz Aktivitesinin İncelenmesi, Enzimin Kısmi Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 16.09.2009 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof.Dr. Rengin ELTEM

.....

Raportör Üye: Yrd.Doç.Dr.Sayıt SARGIN

.....

Üye : Doç.Dr.Mustafa ATEŞ

.....

ÖZET

**BAZI *BACILLUS* İZOLATLARINDA ALFA-L-FUKOSİDAZ
AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ, ENZİMİN KISMİ SAFLAŞTIRILMASI
VE KARAKTERİZASYONU**

SÖZER, Pınar

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Prof.Dr. Rengin ELTEM

16.09.2009, 135 sayfa

Çalışmamızda “Biyomühendislik Bölümü Kültür Koleksiyonu”nda yer alan 100 adet mezofilik *Bacillus* izolatı ve 60 adet endospor içeren termofilik izolat ile *Bacillus cereus*, *B.subtilis*, *B.licheniformis* NRRL-1001, *B.circulans* NRRL B-381, *B.circulans* NRRL B-378, *Paenibacillus illinoisensis* NRRL NRS-1356, *Geobacillus stearothermophilus* NRRL-1102 türlerinde α -L-fukosidaz enzim aktivitesi incelenmiştir. Temel karbon kaynağı olarak PGM (porcine gastric mucin) içeren sıvı kültür ortamında mezofilik izolatlar 30⁰C’de 72 saat, termofilik izolatlar 65⁰C’de 48 saat inkube edildikten sonra aktivite tayini mezofilik izolatlarda 37⁰C’de, termofilik izolatlarda ise hem 37⁰C, hem de 65⁰C’de ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. Buna göre, taranan 106 adet mezofilik suş ve izolatın %77,36’sında ve 61 adet termofilik suş ve izolatın %88,5’inde α -L-fukosidaz aktivitesi belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre izolatlardan en yüksek aktivite veren mezofilik ***Bacillus* Ege.B.1.d.10** ve termofilik **43** nolu izolat, ölçek büyütülerek derin kültür fermentasyon yöntemiyle üretilmiştir. Her iki organizma için fermentasyon sıvısındaki α -L-fukosidazın kısmi saflaştırılması amacıyla santrifügasyon, ultrafiltrasyon, amonyum sülfat ile çöktürme, diyaliz ve jel filtrasyon kromatografi yapılmıştır. Enzimlerin moleküler ağırlıkları SDS-PAGE ile gösterilmiştir. Her bir saflaştırma basamağında total aktivite, total protein, spesifik aktivite ve verim hesaplanmıştır. Ayrıca farklı pH ve sıcaklık aralıklarındaki enzim stabilitesi de saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: α -L-fukosidaz, *Bacillus* spp., *Geobacillus*, mezofilik, termofilik, enzim aktivitesi, kısmi saflaştırma, kısmi karakterizasyon

ABSTRACT

**EVALUATION OF THE ALPHA L-FUCOSIDASE ACTIVITY IN
THE SOME ISOLATES OF *BACILLUS*, PARTIAL PURIFICATION OF
ENZYME AND CHARACTERIZATION**

SÖZER, Pınar

Master Thesis, Bioengineering Department

Supervisor : Prof. Dr. Rengin ELTEM

16.09.2009, 135 pages

In our study, 100 mesophilic *Bacillus* spp. isolates and 60 endospore containing thermophilic isolate of the “Bioengineering Program Culture Collection” and *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* NRRL-1001, *B. circulans* NRRL B-381, NRRL B-378, *Paenibacillus illonionsis* NRRL NRS-1356, *Geobacillus stearothermophilus* NRRL-1102 strains were investigated with regard to α -L-fucosidase in the liquid culture environment containing PGM (porcine gastric mucin) as primary carbon resource, mesophilic isolates were incubated at 30°C for 72 hours, thermophilic isolates at 65°C for 48 hours, after this, activity determination was carried out at 37°C for mesophilic isolates, and both at 37°C and 65°C for thermophilic isolates. Accordingly, of the scanned 106 mesophilic strains and isolates 77.36%, and of the 61 thermophilic strains and isolates 88.5% were found to have α -L-fucosidase activity, and in consideration thereof, the highest activity producing ***Bacillus* Ege.B.1.d.10** and thermophilic **isolate No. 43**, by increasing scale and growing through deep culture fermentation method, and so produced α -L-fucosidase was subjected to centrifugation, ultrafiltration, dialysis and ammonium sulphate precipitation and partially purified thereby, and at each step, total activity, total protein, specific activity and efficiency were calculated, later at differing pH and temperature ranges, partial characterization was carried out where molecular weights were shown through SDS-PAGE.

Keywords: α -L-fucosidase, *Bacillus* spp., *Geobacillus*, mesophilic, thermophilic, enzyme activity, partial purification, partial characterization

TEŞEKKÜR...

Yüksek lisans tez çalışmam süresince, bu imkânı bana tanıyan, akademik bilginin yanı sıra hayata dair tavsiyeleriyle yolumu aydınlatan başta danışmanım sevgili **Hocam Prof.Dr. Rengin ELTEM** olmak üzere, sonsuz sevgi ve sabırlarıyla beni destekleyen **Sevgili Anne ve Babacığım**'a, yüreğimi paylaştığım ve hayatı paylaşmak üzere uzun bir yol için söz verdiğim **Burak BAHADIR**'a, dualarıyla bana hep huzur veren **Anneanneciğim**'e, proje partnerim, zor günlerin gülen yüzü sevgili dostum **İrem (LÜLECİ) GÖZÜTOK**'a ve bu süre zarfında her konuda yardımlarını esirgemeyen başta laboratuvar arkadaşlarım Yüksel Gezgin, Fulya Kolsal, Derya Maral, Zeynep Akbal, Birkan Slem, Filiz Altan ve Özlem Üstün olmak üzere tüm "**Biyomühendislik Bölümü Ailesi**"ne ve "TÜBİTAK Hızlı Destek Projesi" kapsamında bu tez çalışmasını da içeren proje ile tezimin gerçekleştirilmesinde mali desteği sağlayan **TÜBİTAK**'a teşekkürü bir borç bilirim.

Pınar Sözer

İzmir, 2009

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	V
ABSTRACT	VII
TEŞEKKÜR	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	XV
ÇİZELGELER DİZİNİ	XIX
KISALTMALAR	XXI
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	5
2.1 Biyomedikal Enzimler	7
2.1.1 Terapötik amaçlı kullanılan biyomedikal enzimlerin kullanımındaki kısıtlamalar	14
2.2 Fukosidazlar	15
2.2.1 α -L-Fukosidaz enziminin biyomedikal alanda potansiyel kullanımı	17
2.3 <i>Bacillus</i> Genusu	26
2.3.1 Hücre morfolojisi	27
2.3.2 Hücre duvarının yapısı	28
2.3.3 Sporlar	28
2.3.4 Koloni özellikleri	29
2.4 <i>Geobacillus</i> Genusu	30
2.5 Termofilik Mikroorganizmalara Ait Enzimlerin Biyoteknolojik Önemi ve Termostabil Enzimler	35
2.6 Protein Saflaştırma	38
2.6.1 Elektroforez	40
2.6.2 Diyaliz	41
2.6.3 Ultrafiltrasyon	43
2.6.4 FPLC	44
2.7 Glikoproteinler	46
2.7.1 Müsinler	47
3. MATERYAL VE METOT	48
3.1 Materyal	48

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.1.1 Çalışmada kullanılan mezofilik <i>Bacillus</i> izolatları ile endospor içeren termofilik izolatlar.....	48
3.1.2 Kullanılan besiyerleri, çözeltiler ve kimyasallar.....	50
3.1.3 Kullanılan cihazlar	57
3.2 Metot	59
3.2.1 Bazı mezofilik <i>Bacillus</i> izolatları ile endospor içeren termofilik izolatlarda α -L-fukosidaz enziminin (E.C.3.2.1.51) taranması ve enzim aktivite tayini.....	59
3.2.2 Bazı mezofilik <i>Bacillus</i> izolatları ve endospor içeren termofilik izolatlarda α -L-fukosidaz enziminin üretimi için optimum ortam koşullarının belirlenmesi.....	61
3.2.3 Seçilen mezofilik <i>Bacillus</i> izolatu ve endospor içeren termofilik izolatta α -L-fukosidaz enziminin kısmi saflaştırılması.....	62
3.2.4 Protein tayini.....	67
3.2.5 Seçilen mezofilik <i>Bacillus</i> izolatu ve endospor içeren termofilik izolatta α -L-fukosidaz enziminin kısmi karakterizasyonu	68
3.2.6 Seçilen mezofilik <i>Bacillus</i> ve termofilik bakteri izolatlarının Gram's boyaması.....	69
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	70
4.1 Bazı Mezofilik <i>Bacillus</i> İzolatları ile Endospor İçeren Termofilik İzolatlarda α -L-Fukosidaz Enziminin (E.C.3.2.1.51) Taranması ve Enzim Aktivite Tayini.....	70
4.1.1 Çeşitli mezofilik <i>Bacillus</i> izolatlarında α -L-fukosidaz enziminin (E.C.3.2.1.51) taranması ve enzim aktivite tayini.....	70
4.1.2 Endospor içeren çeşitli termofilik izolatlarda α -L-fukosidaz enziminin (E.C.3.2.1.51) taranması ve enzim aktivite tayini.....	75
4.2 Bazı Mezofilik <i>Bacillus</i> İzolatları ve Endospor İçeren Termofilik İzolatlarda α -L-Fukosidaz Enziminin Üretimi İçin Optimum Ortam Koşullarının Belirlenmesi	77

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.2.1 Farklı karbon kaynaklarının α -L-fukosidaz enzim üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi	77
4.2.2 Farklı ortam koşullarının α -L-fukosidaz üretimine etkisinin belirlenmesi	90
4.3 Seçilen Mezofilik <i>Bacillus</i> İzolatı ve Endospor İçeren Termofilik İzolatta α -L-Fukosidaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması	94
4.3.1 Santrifügasyonla ayırma	95
4.3.2 Ultrafiltrasyon ile konsantrasyon	95
4.3.3 Amonyum sülfat ile protein çöktürme	97
4.3.4 Diyaliz	99
4.3.5 FPLC-Jel filtrasyon kromatografi	100
4.3.6 SDS-PAGE	106
4.4 Seçilen Mezofilik <i>Bacillus</i> İzolatı ve Endospor İçeren Termofilik İzolatta α -L-Fukosidaz Enziminin Kısmi Karakterizasyonu	113
4.4.1 Sıcaklığın α -L-fukosidaz enziminin aktivitesine etkisi	113
4.4.2 pH'nın α -L-fukosidaz enziminin aktivitesine etkisi	115
4.5 Seçilen Mezofilik <i>Bacillus</i> ve Termofilik Bakteri İzolatlarının Gram's Boyaması	118
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	120
KAYNAKLAR DİZİNİ	124
ÖZGEÇMİŞ	133

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1 Genelleştirilmiş enzim üretim şeması, a) endüstriyel kullanıma yönelik, b) analitik ve c) terapötik enzimler	6
2.2 Fukosidazların lizozomlardaki işleyiş mekanizması	16
2.3 <i>Helicobacter pylori</i> 'nin mide mukozasına tutunması	18
2.4 Fukosidozun semptomları arasında yer alan “Anjiokerotom”lar	24
2.5 Fukosidozlu hastalar	24
2.6 α -L-Fukosidaz enziminin tespitinde kullanılmak üzere geliştirilmiş ticari tanı kiti (Diagnostik enzim olarak α -L-fukosidaz)	25
2.7 <i>Bacillus subtilis</i> 'e ait 100x'lik büyütmedeki mikroskop görüntüsü	28
2.8 <i>Bacillus cereus</i> 'a ait petride kültür görüntüsü.....	29
2.9 16S rRNA benzerliğine dayanan filogenetik ağaç	31
2.10 <i>Geobacillus stearothermophilus</i> NUB3621	31
2.11 Enzim üretimi ve alt akım proseslerinin genel şeması	39
2.12 SDS-PAGE sisteminin genel şeması	41
2.13 Diyaliz prosesi.	42
2.14 Ultrafiltrasyon sistemi. a) Sartocan® Slice 200 Paslanmaz çelik tutucu, b) Sartoflow® Slice 200 Banko üstü Çapraz-akış sistemi, c) Sartocan® Slice 200 Düşük hacimli uygulamalar için çapraz-akışlı kaset filtre.	43
2.15 FPLC (Fast-Performance Liquid Chromatography).....	45
2.16 AKTA Amersham Bioscience firmasına ait FPLC cihazı ve kısımları.....	46
2.17 a) Domuz gastrik müsinine (PGM) ait şematik görüntü, b) şemada yer alan şekillere ait açıklamalar	47
3.1 Protein miktarı standart eğri grafiği.....	68
4.1 <i>Bacillus</i> Ege.B.1.1.ka izolatının farklı temel karbon kaynakları kullanıldığında tespit edilen α -L-fukosidaz aktiviteleri (mU/ml).....	82
4.2 <i>Bacillus</i> Ege.B.1.d.2 izolatının farklı temel karbon kaynakları kullanıldığında tespit edilen α -L-fukosidaz aktiviteleri (mU/ml).....	83
4.3 <i>Bacillus</i> Ege.B.1.d.10 izolatının farklı temel karbon kaynakları kullanıldığında tespit edilen α -L-fukosidaz aktiviteleri (mU/ml).....	83

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

4.4 <i>Bacillus</i> Ege.B.24.1i izolatının farklı temel karbon kaynakları kullanıldığında tespit edilen α -L-fukosidaz aktiviteleri (mU/ml).....	84
4.5 <i>Bacillus</i> Ege.B.24.2i izolatının farklı temel karbon kaynakları kullanıldığında tespit edilen α -L-fukosidaz aktiviteleri (mU/ml).....	84
4.6 <i>Bacillus</i> Ege.B.24.4i izolatının farklı temel karbon kaynakları kullanıldığında tespit edilen α -L-fukosidaz aktiviteleri (mU/ml).....	85
4.7 43 nolu termofilik izolatın farklı temel karbon kaynakları kullanıldığında tespit edilen α -L-fukosidaz aktiviteleri (mU/ml).....	87
4.8 13 nolu termofilik izolatın farklı temel karbon kaynakları kullanıldığında tespit edilen α -L-fukosidaz aktiviteleri (mU/ml).....	87
4.9 36 nolu termofilik izolatın farklı temel karbon kaynakları kullanıldığında tespit edilen α -L-fukosidaz aktiviteleri (mU/ml).....	88
4.10 41 nolu termofilik izolatın farklı temel karbon kaynakları kullanıldığında tespit edilen α -L-fukosidaz aktiviteleri (mU/ml).....	88
4.11 24 nolu termofilik izolatın farklı temel karbon kaynakları kullanıldığında tespit edilen α -L-fukosidaz aktiviteleri (mU/ml).....	89
4.12 <i>Bacillus</i> Ege.B.1.d.2 ve <i>Bacillus</i> Ege.B.1.d.10 izolatlarında 30 °C, 180 rpm ve %0,5 PGM koşullarında farklı pH değerlerinin enzim aktivitesine etkisi	91
4.13 <i>Bacillus</i> Ege.B.1.d.2 ve <i>Bacillus</i> Ege.B.1.d.10 izolatlarında 180 rpm ve %1 PGM ve pH 6,5 koşullarında farklı sıcaklık değerlerinin enzim aktivitesine etkisi.....	91
4.14 <i>Bacillus</i> Ege.B.1.d.2 ve <i>Bacillus</i> Ege.B.1.d.10 izolatlarında 30°C, 180 rpm ve pH 6,5 koşullarında farklı %PGM değerlerinin enzim aktivitesine etkisi.....	92
4.15 Termofilik 43 nolu izolatta 65°C, 140 rpm ve %0,5 PGM koşullarında farklı pH değerlerinin enzim aktivitesine etkisi.....	93
4.16 Termofilik 43 nolu izolatta 65°C, 140 rpm ve pH 6,5 koşullarında farklı % PGM değerlerinin enzim aktivitesine etkisi.....	93
4.17 İki litrelik üretim sonrası erlenler (Organizma, <i>Bacillus</i> Ege.B.1.d.10).	94

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil	Sayfa
4.18 a) Çalışmada kullanılan Sigma 4K-15 nolu santrifüj ve her biri 250 ml'lik santrifüj kabı (c) alan 6 bölmeli rotor kısmı (b).	95
4.19 Çalışmada kullanılan ultrafiltrasyon sistemi	97
4.20 Amonyum sülfat ile protein çöktürme işlemi	97
4.21 Çalışmamızda gerçekleştirilen diyaliz prosesi.	100
4.22 Amersham Pharmacia Biotech AKTA FPLC cihazı. a) Ceket giydirilmiş kolonu ile cihazın genel görünümü, b) kırmızı ok ile gösterilen örneğin verildiği kısım ve sarı ok ile gösterilen örneğin tampona karışmak üzere beklediği enjeksiyon loop, c) otomatik fraksiyon toplayıcısı, d) çeşitli tamponlar ve atık şişeleri	101
4.23 Mezofilik <i>Bacillus</i> Ege.B.1.d.10 kodlu izolata ait FPLC sonrası toplanan fraksiyonlar. a) Toplanan tüm fraksiyonlar, b) yoğun pikin görüldüğü pembe renkli fraksiyonlar	101
4.24 Termofilik 43 nolu izolata ait FPLC sonrası toplanan fraksiyonlar	102
4.25 Mezofilik <i>Bacillus</i> Ege.B.1.d.10 kodlu izolata ait FPLC sonunda elde edilen grafik. a) Grafiğin genel görünümü, b) Ok ile işaret edilmiş, 100-120. dakikalar arasında enzim aktivitesinin görüldüğü fraksiyonlara ait piklerin yakın plan görünümü.....	103
4.26 Termofilik 43 kodlu izolata ait FPLC sonunda elde edilen grafik (Okla işaret edilen enzim aktivitesinin görüldüğü fraksiyonlara ait pik)	104
4.27 a) Brookfield LVDV-E 230 viskozimetre ile viskozite ölçümü, b) <i>Bacillus</i> Ege.B.1.d.10'a ait sırasıyla ultrafiltrasyondan çıkan, amonyum sülfatla çöktürme sonrası, diyaliz sonrası örnekler, c) Termofilik izolat 43'e ait sırasıyla ilk santrifüj sonrası, ultrafiltrasyon sonrası, amonyum sülfat ile çöktürme sonrası örnekler.	105
4.28 SDS-PAGE sisteminin görüntüleri	106
4.29 Mezofilik <i>Bacillus</i> Ege.B.1.d.10'a ait SDS-PAGE görüntüsü	107
4.30 Termofilik izolat 43'e ait SDS-PAGE görüntüsü	107
4.31 Mezofilik <i>Bacillus</i> Ege.B.1.d.10 için, 100mM sodyum sitrat tamponu- pH 6,5'de farklı inkübasyon sıcaklıklarına ait enzim aktiviteleri	113

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**Şekil****Sayfa**

4.32 Termofilik 43 nolu izolat için, 100mM sodyum sitrat tamponu- pH 6,5’de farklı inkübasyon sıcaklıklarına ait enzim aktiviteleri.....	115
4.33 Mezofilik <i>Bacillus</i> Ege.B.1.d.10 için, 100mM sodyum sitrat tamponunda, pH 4,0-8,0 aralığına ait enzim aktiviteleri	116
4.34 Termofilik 43 nolu izolata ait 100mM sodyum sitrat tamponunda, pH 4.0-8.0 aralığına ait enzim aktiviteleri	117
4.35 a) Mezofilik <i>Bacillus</i> Ege.B.1.d.10 ve b) Termofilik 43 kodlu izolatlara ait 100x büyütmedeki mikroskop görüntüleri.....	118

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
2.1 Katalizledikleri reaksiyon tiplerine göre enzimlerin sınıflandırılması	5
2.2 Diagnostik amaçlı kullanılan biyomedikal enzimler, elde edildiği organizmalar ve kullanım amaçları.....	7
2.3 Vücutta çeşitli enzimlerin eksikliği hallerinde görülen klinik belirtiler	9
2.4 Terapötik amaçlı enzim replasman tedavisinde kullanılan ve halen üzerinde çalışmalar devam eden biyomedikal enzimler	10
2.5 Terapötik amaçlı pıhtı çözücü ajan olarak kullanılan biyomedikal enzimler.	11
2.6 Terapötik amaçlı sindirim yardımcısı olarak kullanılan biyomedikal enzimler	11
2.7 Terapötik amaçlı ilaç etken maddesi olarak kullanılan biyomedikal enzimler	12
2.8 Biyomedikal enzim üreten çeşitli firmalar.	12
2.9 Çeşitli bağ tiplerine özgü, EC numaralarıyla verilen fukosidazlar	15
2.10 Kalıtsal metabolik hastalıklardan defektin lizozomda olduğu lizozomal depo hastalıkları	22
2.11 Glikoproteinazların eksikliği/hasarı nedeniyle ortaya çıkan lizozomal depo hastalıklarının klinik ve laboratuvar özellikleri.	23
2.12 <i>Bacillus</i> genusuna ait isimlendirme ve açıklamalar	27
2.13 <i>Geobacillus</i> genusuna ait açıklamalar	32
2.14 <i>Geobacillus</i> 'lara ait ürünler ve proseslere ait patentlerden bazıları	34
2.15 Endüstriyel termostabil enzimler ile termofiliklerden ve termofilik genlerin mezofilik konukçularda klonlandığı ticari enzimler.....	38
2.16 Glikoproteinlerde bulunan başlıca karbonhidratlar	46
3.1 α -L-Fukosidaz enzim üretkenliği taranan mezofilik ve termofilik izolatlar ..	48
3.2 Katı amonyum sülfat kullanılarak yapılan çöktürme işlemi için gerekli miktarlar	64
3.3. SDS-PAGE çalışmasında kullanılan markera ait renkli bantlar ve moleküler ağırlıklar (kDa)	67
4.1 Mezofilik <i>Bacillus</i> izolatlarında 72 saatlik inkübasyonun sonunda α -L-fukosidaz aktiviteleri (mUnit/ml)	72

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

Çizelge

Sayfa

4.2 Mezofilik <i>Bacillus</i> türlerinde 72 saatlik inkübasyonun sonunda aktiviteler (mUnit/ml)	73
4.3 106 adet mezofilik <i>Bacillus</i> suş ve izolatında α -L-fukosidaz enzim aktivitesi (mU/ml) dağılımı.....	74
4.4 Endospor içeren termofilik izolatlarda 48 saatlik inkübasyonun sonunda α -L-fukosidaz aktiviteleri (mUnit/ml)	75
4.5 <i>Geobacillus stearothermophilus</i> NRRL B-1102'de α -L-fukosidaz aktivitesi (mUnit/ml).....	76
4.6 Endospor içeren termofilik bakterilerde α -L-fukosidaz aktivitesinin (mU/ml) dağılımı	76
4.7 Mezofilik <i>Bacillus</i> izolatlarının L-Fukoz ve D-Arabinoz varlığındaki α -L-fukosidaz aktiviteleri (mU/ml).....	78
4.8 Altı mezofilik <i>Bacillus</i> izolatının farklı temel karbon kaynaklarına göre α -L-fukosidaz aktiviteleri (mU/ml).....	79
4.9 Endospor içeren termofilik beş izolatın farklı temel karbon kaynaklarına göre α -L-fukosidaz aktiviteleri (mU/ml)	86
4.10 <i>Bacillus</i> Ege.B.1.d.2 ve <i>Bacillus</i> Ege.B.1.d.10 izolatlarında farklı pH, sıcaklık ve PGM oranlarında tespit edilen enzim aktiviteleri	90
4.11 Termofilik 43 nolu izolatta farklı pH ve PGM oranlarında tespit edilen enzim aktiviteleri	92
4.12 Mezofilik <i>Bacillus</i> Ege B.1.d.10 ve Termofilik izolat 43 için amonyum sülfat ile çöktürme denemelerine ait veriler.....	98
4.13 Mezofilik <i>Bacillus</i> Ege B.1.d.10 ve Termofilik izolat 43'e ait her bir saflaştırma basamağında ölçülen viskoziteler.....	105
4.14 Mezofilik <i>Bacillus</i> Ege.B.1.d.10 kodlu izolata ait kısmi saflaştırma verileri	110
4.15 Termofilik 43 kodlu izolata ait kısmi saflaştırma verileri.....	111
4.16 Çeşitli organizmalarda α -L-fukosidaz enziminin, farklı karbon kaynağı içeren fermentasyon sıvılarındaki enzim aktiviteleri, total aktiviteler, total protein ve spesifik aktivite değerleri.....	112

KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar **Açıklama**

PGM	Domuz Gastrik Müsini (Porcine gastric mucine)
PNPF	<i>p</i> -nitrofenil α -L-fukopranozid
SDS-PAGE	Sodyumdodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez
EC	Enzim komisyon rakamı (Enzyme Commission number)
Fuc	Fukoz
Gal	Galaktoz
Glc-NAc	N-asetil glikozamin
NANA	N-asetil nöraminik asit
NMWCO	Moleküler ağırlık engelleme sınırı (Nominal molecular weight cut off)
RPM	Dakikadaki devir sayısı (Revolutions per minute)
FPLC	Hızlı-performans Sıvı Kromatografi (Fast-Performance Liquid Chromatography)
HPLC	Yüksek-performans sıvı kromatografi (High-Performance Liquid Chromatography)
BSA	Bovine serum albumin
mPa.s	Mili Paskal saniye
WHO	Dünya Sağlık Organizasyonu
IEF	İzoelektrik fokuslama elektroforezi

1. GİRİŞ

Biyolojik katalizör görevini üstlenen pek çok enzimin, gerek gıda sanayinde gerekse deterjan sanayindeki yaygın kullanımları bilinmektedir. Enzimlerin medikal alandaki önemlerinin tespit edilmesi, enzim teknolojisindeki araştırmaları terapötik enzimlere yöneltmiştir. Üretim proseslerinde diğer endüstrilere oranla yüksek saflık gerektiren bu sektör, birim ürün başına yüksek etiket fiyatlarına sahip olması nedeniyle de ilgi çekmektedir. Bu enzimlerin eldesinde mikroorganizmaların önemi her geçen gün artmaktadır. Biyokimyasal ve genetik analizlerle mikroorganizmaların ürettiği bu tür enzimlerin memeli enzimleriyle yüksek benzerliklerinin ortaya çıkarılması, halen tedavisi mümkün olmayan birçok hastalık için de umut teşkil etmektedir. Moleküler biyoloji, bakteriyoloji ve biyokimya alanındaki gelişmeler, mikroorganizmalardan elde edilen bazı ürünlerin anti kanser ajan olarak keşfini ve böylece kanser tedavisinde kullanımını gündeme getirmiştir. Özellikle son yıllarda yapılan çalışmalar kanser tanı ve tedavisinde mikrobiyal orijinli enzimlerden yararlanılabileceğini ortaya koymuştur (Kirk ve ark., 2002).

α -L-fukosidaz, α -1,2, α -1,3, α -1,4 veya α -1,6 bağlarından çeşitli oligosakkaritlere ve onların glikokonjugatlarına bağlanan terminal α -L-fukozil residülerini (L-Fukoz) ayırma yeteneğinde olan ekzo-glikosidaz grubundan lizozomal bir asit hidrolazdır. Glikozil hidrolaz 29 ailesi (GH29) sınıflandırma grubunda yer alan bir çeşit ekzo-glikosidaz olan α -L-fukosidaz, insan, bitki, fungus ve birçok patojenik bakteriyi de içine alan çeşitli canlılarda tespit edilmiştir. Genel tespitler, memeli dokularından ve deniz karındanbacaklılarında geniş substrat spesifitesi olduğu, fakat mikroorganizmalar ve badem gibi bitkilerdeki bu enzimin sadece belirli bağları koparabildiği yönünde iken, termofilikler ile yürütülen çalışmalar bu tür mikroorganizmaların da geniş substrat spesifitesine sahip olduğunu göstermiştir (Kochibe, 1973; Yano ve ark., 1985; Yamamoto ve ark., 1986; Tsuji ve ark., 1990; Sano ve ark., 1992; Kurimura ve ark., 1995; Ajisaka ve ark., 1998; Goso ve ark., 2001; Eneyskaya ve ark., 2001; Miura ve ark., 2005; Katayama ve ark., 2005; Cobucci ve ark., 2008).

α -L-fukosidaz enziminin medikal alandaki önemli rolü kanser tanısı çalışmalarında da önemli bir veri niteliğindedir. Tümör markırı (belirteci) olabilecek enzimler çerçevesinde oligosakkaritlerdeki fukozy zincirden ayıran lizozomal hidrolaz, α -L-fukohidrolaz (fukosidaz) aktivitesinin değerlendirilmesi, erken kolorektal (gastrointestinal malignitelerin) ve hepatosellüler kanserli hastalarda serumdaki düzeyleri incelenerek tanı koymayı sağlamaktadır (Macbeth ve ark., 1962; Tatsumura ve ark., 1977; Yogeewaran, 1983; Lopez, 1989).

Şiddetli α -L-fukosidaz enzim eksikliği/hasarı fukosidoz (fucosidosis) adı verilen bir hastalığa neden olmaktadır. Fukosidoz, periferik ve santral sinir sistemini de içine alan birçok dokunun lizozomlarında fukoillenmiş glikokonjugatların (fukolipid ve fukopolisakkaritler) letal (öldürücü) dozda birikimi ile sonuçlanan bir otozomal resesif lizozomal bir depo hastalığıdır. Şiddetli mental ve motor (duyu sinir) kaybına yol açan hızlı nörodejenerasyon ile karakterize edilir. Fukosidozun tüm tiplerinde ilerleyen semptomları durdurabilecek veya tamamiyle iyileşme sağlayacak bir tedavi henüz geliştirilmemiştir. Yalnızca kemik iliği transplantasyonu ile uygun donörden ilik nakliyle α -L-fukosidaz enzimi üreten hücrelerin nakli yapılmakta fakat bu tedavi, sorunu tamamen ortadan kaldıramamaktadır. Enzimin yerine konulmasına yönelik (enzim replasman) tedavileri geliştirmek üzere çalışmalar devam etmektedir. Enzimin çeşitli konjugatlarla (galaptin, lektin gibi) birleştirilerek enzimden yoksun dokuya verilmesi temeline dayanan hedefe yönelik ilaç tedavisi çalışmaları klinik aşamada devam etmektedir. Bu anlamda enzim üretimini gerçekleştiren tüm canlılarda bu enzimlerin karakterize edilerek memelilere en yakın formların tespiti önemlidir (Allen ve ark., 1995; www.nih.gov).

Mikrobiyal bir enzim olarak α -L-fukosidaz geniş substrat spesifitesi ile büyük miktarlarda üretilebilir ve benzer özellikteki memeli fukosidazına göre biyoteknolojik amaçlar için çok daha uygundur. Şu anda Dünya’da sürdürülen çalışmalarda, α -L-fukosidaz geleceğin terapötik enzimlerinden biri olarak görülmektedir. Lizozomal enzim bozukluklarında aralarında memeli (insan) α -L-fukosidazının da bulunduğu enzim replasman tedavisi araştırmalarında mikrobiyal kaynaklı α -L-fukosidaz enzimleri umut verici bir kaynaktır (Eneyskaya ve ark., 2001).

Daha önce yapılmış çalışmalarda α -L-fukosidazın mezofilik bakterilerde substrat spesifitesinin dar olduğu belirtilmektedir. Fakat bu konuda yapılan çalışmalar incelendiğinde az sayıda bakteri türünün incelendiği görülmektedir. Bu nedenle çalışmamızda hem termofilik hem de mezofilik çok sayıda izolatta α -L-fukosidaz enziminin taranması amaçlandığından, çalışmanın hem enzim aktivitesi hem de substrat spesifitesi açısından literatüre önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

Ekstrem çevrelerden biri olan yüksek sıcaklık derecelerindeki çevrelerde yaşama yeteneği olan canlılar, biyoteknolojinin ilgi alanına girmektedir. Termofilik kaynaklı enzimlerin kullanımına yönelik pek çok uygulama vardır ve bu enzimlerin özellikle termal stabiliteleri dikkat çekmektedir. Şu anda termofilik mikroorganizmalardan bu enzimlerin saflaştırılması ve özellikleri hakkında çok sayıda araştırma mevcuttur. Termal stabilite bu proteinlerde beklenen doğal bir özelliktir, bununla beraber bu proteinler mezofilik olanlarla kıyaslandığında katotrofik ajanlara karşı daha direçlidir. Yüksek sıcaklıklarda substrat çözünürlüğü ve enzim reaksiyon hızı artmaktadır (Kim ve ark., 2006).

Sıcak su kaynakları gibi ekstrem çevrelerde yaşayan mikroorganizmaların sahip olduğu enzimler atıkların arıtımından, gıda sanayine kadar çok sayıda alanda uygulama alanı bulmaktadır. Potansiyel kullanım alanları nedeni ile ekstrem çevresel koşullarda yaşayabilen mikroorganizmalar son yıllarda büyük önem kazanmıştır (Hough ve ark., 1999; Feitkenhauer ve ark., 2003).

Çalışmamızda “Biyomühendislik Bölümü Kültür Koleksiyonu”nda yer alan termofilik izolatlarda da enzim aktivitesinin taranması, ekstremofilikleri yakından tanımak adına önemli bir adımdır. Çünkü ekstrem çevrelerde yaşayan bütün mikroorganizmaların sahip oldukları enzimler ve metabolik yol izleri; yüksek sıcaklık, tuz konsantrasyonu gibi fiziksel koşullarla başa çıkabilecek ve bu koşullarda bulunabilen besinleri kullanabilecek şekilde optimize olmuştur. Bu nedenle ekstrem çevreler bizler için, biyoteknolojik araçlar olarak kullanım potansiyeli yüksek olan benzersiz fizyolojik özellikler sağlarlar (Bustard ve ark., 2002).

Çalışmada “Biyomühendislik Bölümü Kültür Koleksiyonu”nda yer alan çeşitli kaynaklardan izole edilmiş mezofilik *Bacillus* izolatları ile endospor içeren

termofilik bakteri izolatlarında biyomedikal olarak çok değerli olan; geniş bir glikokonjugat spesifitesi sergileyen α -L-fukosidaz enzimi (E.C.3.2.1.51) aktivitesinin taranması amaçlanmıştır. Kendi ülkemizden izole edilmiş bakteriler daha önce incelenmemiş ve yeni gen kaynakları olduklarından yeni özelliklere sahip enzimlerin bulunma ihtimali oldukça yüksektir. Bu da çalışmamıza özgünlük kazandırmaktadır. Bu çalışmanın ulusal ekonomiye sağlayacağı en önemli yararlardan bir tanesi kendi özgün gen kaynaklarımızdan yararlanarak özgün bir endüstriyel suş elde edilmesine bir adım daha yaklaşılması olacaktır.

Çalışmanın verileri ışığında geline noktanın sonra önemli olan biyomedikal sektörünün talepleri de göz önüne alınarak bu yeni gen kaynaklarında biyomedikal enzimlerle başarılı çalışmalar ortaya koyabilmektir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Endüstriyel alanda kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil olmaları ve fazla miktarda elde edilebilmeleridir (Wiseman, 1987).

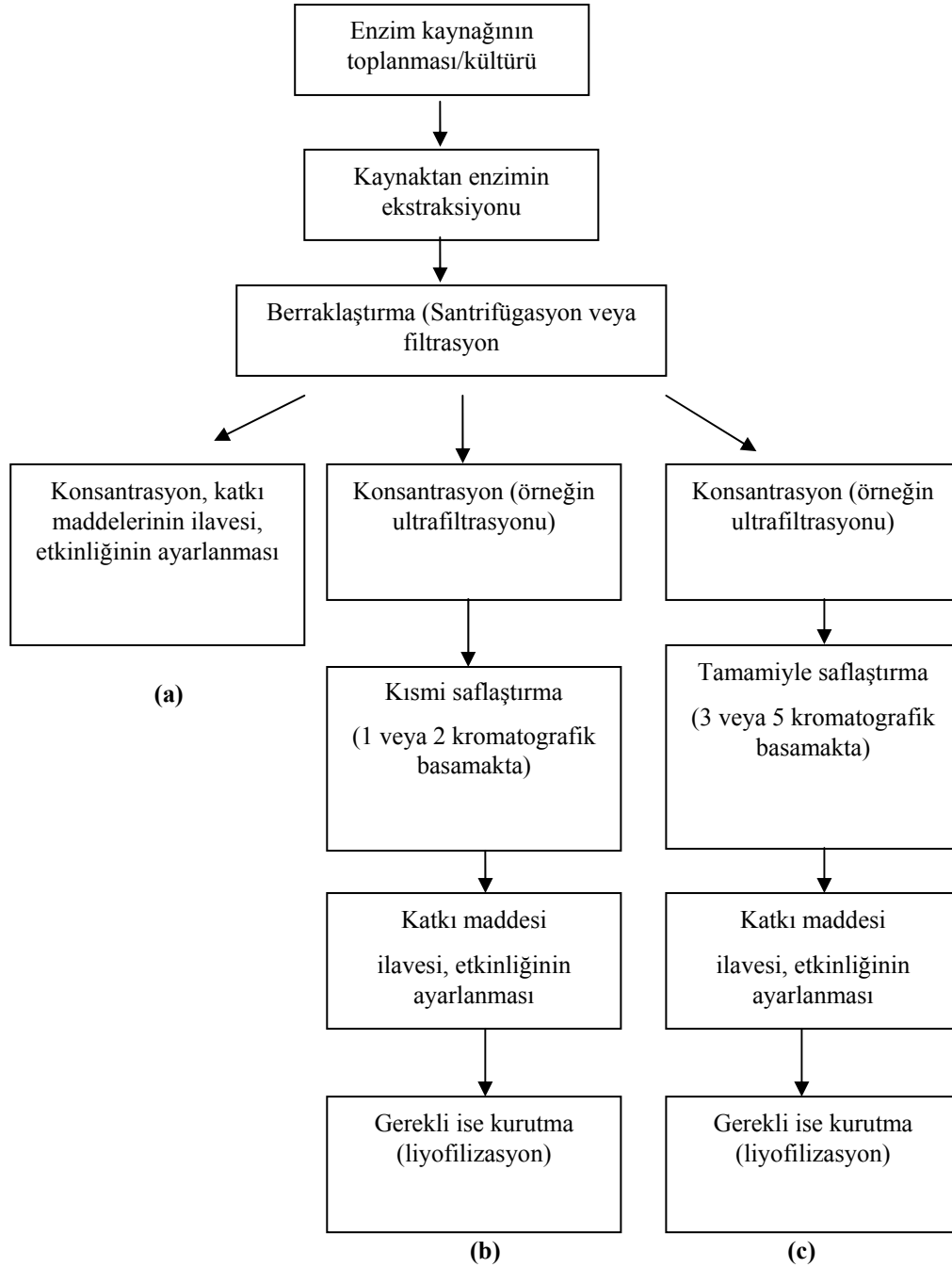
Biyoteknoloji alanında, genetik mühendisliği ve protein mühendisliğindeki ilerlemelerle farklı orjinlere sahip çok çeşitli enzimlerin büyük ölçeklerde ve ekonomik olarak üretilmesi mümkün olabilmektedir (Wiseman, 1987).

Günümüzde endüstride, sağlık alanında ve analitik ajanlar olarak yaygın kullanım alanı bulan enzimler katalizledikleri reaksiyonun tipine bağlı olarak altı ana gruba ayrılmışlardır (Çizelge 2.1). Ticari öneme sahip olan enzimlerin çoğu, hidrolazlar şeklinde tanımlanmakta olup, mikrobiyal kökenlidir.

Çizelge 2.1 Katalizledikleri reaksiyon tiplerine göre enzimlerin sınıflandırılması (Madigan ve Martinko, 2006).

Grup	Katalizlediği Reaksiyon
EC 1- Oksidoredüktazlar	$CH \rightarrow C-OH$ gibi oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarını katalizler.
EC 2- Transferazlar	Aldehit, keton, alkil, şeker, fosfor gibi çeşitli kimyasal grupların bir molekülden diğerine transferinde aracı rol oynar.
EC 3- Hidrolazlar	Reaksiyonların hidrolizini katalizler, örneğin çeşitli fonksiyonel grupları suya transfer eder.
EC 4- Liyazlar	$C=C$, $C=O$ ve $C=N$ gibi çift bağların oluşumunu veya eklenmesini katalizler.
EC 5- İzomerazlar	Rasemizasyonu da içine alan çeşitli tipteki izomerasyonları katalizler.
EC 6- Ligazlar	$C-C$, $C-O$, $C-S$ ve $C-N$ bağlarının oluşmasında aracı olur, genellikle sentetaz olarak isimlendirilir.

Üretim aşaması söz konusu olduğunda enzimler kullanılacakları yere bağlı olarak farklı proseslere ihtiyaç duyarlar. Şekil 2.1’de endüstriyel, analitik ve terapötik amaçlarda kullanılmak üzere enzimlere ait genelleştirilmiş üretim basamakları görülmektedir (Panke ve ark., 2002).



Şekil 2.1 Genelleştirilmiş enzim üretim şeması, a) endüstriyel kullanıma yönelik, b) analitik ve c) terapötik enzimler (Panke ve ark., 2002).

2.1 Biyomedikal Enzimler

Biyomedikal teknoloji, esas olarak tıpta teşhis ve tedavi amacıyla kullanılabilecek tüm madde, malzeme, aparat ve cihazların üretimi ile ilgilenen disiplinlerarası bir teknoloji dalıdır ve bu teknoloji sayesinde elde edilen enzimlere **biyomedikal enzimler** adı verilir. Biyomedikal enzimler, kullanım amaçlarına göre diagnostik (analitik) ve terapötik enzimler olarak başlıca iki gruba ayrılmışlardır (Walsh, 2002).

Diagnostik enzimler, klinik kimya alanında önemli bir yere sahiptir. Klinik kimya, klinik biyolojik örneklerdeki geniş farlılıklara sahip olan marker (belirteç) maddelerin teşhis edilmesi, gösterilmesi ve miktarının ölçülmesi ile ilgili çalışmalar yürütmektedir. Bu maddeler arasında kimyasallar: fosfat, amonyak, etanol ve asetik asit; metabolik ürünler: glukoz, kolesterol, üre, keratinin, ATP; toksik maddeler: pestisit, herbisit, ağır metaller; proteinler: viral antijenler, antikorlar, serum proteinleri, ilaçlar, vitaminler ve hormonlar sayılabilir (Burkhard-Kresse, 1995).

Diagnostik amaçla kullanılan enzimler, direkt olarak subsutrat olan hedef analitin işleyişini ortaya çıkarmak amacıyla değişiklerin genellikle spektrofotometre kullanılarak gözlemlendiği araçlardır. Sonucunda ortaya çıkan sinyalin büyüklüğü hedef analitin konsantrasyonu ile direkt olarak orantılıdır. Biyokimyasal araştırmalarla geliştirilen enzim preparatları tanı amaçlı reaktifler olarak *in vitro* klinik diagnostikleri alanında yerini almaktadır. Çizelge 2.2’de diagnostik amaçlı kullanılan biyomedikal enzimlere ait örnekler yer almaktadır (Burkhard-Kresse, 1995).

Çizelge 2.2 Diagnostik amaçlı kullanılan biyomedikal enzimler, elde edildiği organizmalar ve kullanım amaçları (Burkhard-Kresse, 1995).

Enzim	Elde Edildiği Kaynak	Kullanım Amacı
Acetyl cholinesterase	Sığır eritrositleri	Pestisitler gibi organofosforlu bileşenlerin analizinde
Alcohol dehydrogenase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Biyolojik sıvılardaki alkol seviyesinin belirlenmesinde

Çizelge 2.2 (devam)

Enzim	Elde Edildiği Kaynak	Kullanım Amacı
Alkaline phosphatase	Buzağı bağırsağı ve böbreği, rekombinant (<i>Picca spp.</i>)	Antikorlarla konjuge olur, ELİSA da indikatör olarak
α -glucosidase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Bacillus spp.</i>	α -amilaz aktivitesinin tayininde
Arginase	Sığır karaciğeri	Plazma ve üre de L-arjinin seviyesinin belirlenmesinde
Ascorbate oxidase	<i>Cucurbita spp.</i>	Askorbik asit seviyesinin belirlenmesinde
β -galactosidase	<i>E.coli</i>	Sodyum iyonları ve immünassay marker enzim
Cholesterol oxidase	Domuz pankreası, <i>Pseudomonas spp.</i> , rekombinant <i>Streptomyces spp.</i>	Serum kolesterol seviyesinin belirlenmesinde
Creatinase	<i>Pseudomonas spp.</i>	Kreatinin tayininde
Glucose oxidase	<i>Aspergillus niger</i>	Biyolojik örneklerdeki glukoz miktarının tayininde, ELİSA sistemleri için marker
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Glukoz için indükatör enzim, heksokinaz ile birleşen ATPnin belirlenmesinde
Glutamate dehydrogenase	Sığır karaciğeri	Üreazla birleşen kan üre nitrojeninin belirlenmesinde
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	<i>Aerococcus viridans</i> , <i>Tavşan kası</i>	Triaçilgliserol (Serum trigliseridleri) miktarının tayininde
Glycerol kinase	<i>Candida mycoderma</i> , <i>Arthrobacter spp.</i>	Lipazla etkileşen trigliserid seviyesinin kanda tespitinde
Hexokinase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Vücut sıvılarında glukozun belirlenmesinde
Peroxidase	<i>Armoracia lapathifolia</i>	İndikatör enzim ve immünassay marker enzim
Pyruvate oxidase	<i>Pediococcus spp.</i>	Piruvat, transaminaz aktivitesinin belirlenmesinde
Sarcosine oxidase	<i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Bacillus spp.</i>	Kreatinin tayininde
Urate oxidase (Uricase)	<i>Arthrobacter protophormise</i>	Ürik asitin belirlenmesinde
Urease	<i>Klebsiella aerogenes</i>	Ürenin tespitinde

Anahtar roldeki ürünlerin ya da substratların yetersizliği veya birikmesinden dolayı metabolik yol izlerindeki enzim aktivitelerinin eksik ya da anormal olması bazı klinik belirtiler ortaya çıkarır amaç bu semptomların oluşumunu kaynağında gidermektir. Çizelge 2.3'te vücutta çeşitli enzimlerin eksikliği hallerinde görülen klinik belirtiler yer almaktadır (Kopetzki, 1994).

Çizelge 2.3 Vücutta çeşitli enzimlerin eksikliği hallerinde görülen klinik belirtiler (Kopetzki, 1994).

Enzim	Klinik Belirtileri
Glucose-6-phosphatase	Ciddi hipoglisemi, karaciğer ve böbrek büyümesi, kanda kolesterol, trigliserid ve ürik asidin artması
Glucose-6-phosphate translocase	Kanda nötrofil lökositlerin azalması
Adenosine deaminase	Kombine bağışıklık yetersizlikleri
β -glucocerebrosidase	Gaucher's hastalığı
α -galactosidase	Fabry's hastalığı
Asit α -galactosidase	Pompe hastalığı
Phosphorylase	Karaciğer büyümesi, kandaki yağ oranı artışı
Glycogene sentetase	Hipoglisemi ve ketozisin hızlanması, glikoz birikiminden sonra laktik asit ve hipoglisemi artışı
Lactate dehydrogenase	Kas krampları, idrarda miyoglobulin, keratin kinaz artışı
Fructose 1,6 biphosphate aldolase	Hemolitik anemi
Priuvate kinase	Kas krampları, kas zayıflığı
Phosphorylase kinase	Kardiyomiyopati, kalp yetmezliği
Galactose 1-phosphate uridil transpherase	Galaktosemi (kanda şeker birikimi)
Galactokinase	Katarakt
Alcaline phosphatase	Hipofosfatazi (mineral inhibitörlerin birikimi), fosfor yetersizliği

Enzim replasman tedavisi, vücutta üretimi yetersiz olan ya da hiç bulunmayan bir enzimin yerine koyulduğu tıbbi bir tedavidir. Düzenli aralıklarla (örneğin, ayda iki kez), yaşam boyu devam eden bir tedavi şeklidir (Walsh, 2002). Çizelge 2.4'te bu amaçla kullanılan bazı terapötik enzimler yer almaktadır.

Çizelge 2.4 Terapötik amaçlı enzim replasman tedavisinde kullanılan ve halen üzerinde çalışmalar devam eden biyomedikal enzimler (Walsh, 2002).

Enzim	Terapotik Kullanımı
β -glucocerebrosidase	Gaucher's hastalığı
α -galactosidase	Fabry's hastalığı
Asit α -galactosidase	Pompe hastalığı
Urate oxidase (Uricase)	Hiperürisemi (Gut hastalığında)
α -L-iduronidase	Mukopolisakkarodosis I (MPS I)
N-Acetylgalactosamine-4-sulfactase	Mukopolisakkarodosis IV (MPS IV)
Laronidase	Mukopolisakkarodosis II (MPS II)
α -L-fucosidase	Fucosidosis hastalığı

Tromboz, kanın damar içerisinde pıhtılaşması halidir ve fibrinin kan damarı içerisindeki birikimi sonucunda oluşmaktadır. Günümüzde miyokardiyal bozukluğun ve diğer kardiyovasküler hastalıkların başlıca sebeplerinden biri trombozdur. Bir trombüs (kan pıhtısı), kan koagülasyon faktörleri, trombositler, kırmızı kan hücreleri ile damar çeperi arasındaki kademeli etkileşimler ile meydana gelmektedir. Pıhtının oluştuğu noktada ya kan akışına set çekilmekte ya da tamamen bir tıkanma gerçekleşerek bu durum akıntı yönündeki dokuların oksijensiz kalmasına neden olmaktadır. İlerleyen aşamalarda ana pıhtıdan ayrılan parçacıklar (emboli) daha küçük damarların da tıkanmasına sebebiyet vermektedir. Dünya Sağlık Organizasyonunun (WHO) 2001 yılındaki raporunda, Dünya ölüm oranının %29'unun kardiyovasküler hastalık kaynaklı olduğu ve ortalama her yıl 17 milyon insanın bu nedenle hayatını kaybettiği bildirilmektedir. Bu sorunların üstesinden gelebilmek için terapötik amaçlı, etken maddesi enzim olan, pıhtı çözücü ilaçlar kullanılmaktadır. Trombolitik ilaçlar trombüs oluşumunu yok etmeye yöneliktir ve trombüsün tekrardan meydana gelmesini minimize etmektedir. Çizelge 2.5'te bu amaçla kullanılan bazı enzimler yer almaktadır (Yong ve ark., 2005).

Çizelge 2.5 Terapötik amaçlı pıhtı çözücü ajan olarak kullanılan biyomedikal enzimler (Yong ve ark., 2005).

Enzim	Terapotik Kullanımı
Doku plazminojen aktivatörü (tPA)	Trombolitik ajan

Urokinase	Trombolitik ajan
Prourokinase/urokinase	Kalp krizlerinde pıhtı çözücü
Ancrod	Antikoagülant (pıhtı çözücü)
Streptokinase (streptococcal cysteine proteinase)	Kan pıhtılaşmasında
Hyaluronidase	Miyokardial enfarktüs, kanser tedavisi ve göz cerrahisinde anestezi, tüp bebek tedavisinde
Collagenase	Deri ülserlerinde kollajen hidrolizinde
Tripsin	Yara iyileşmesinde

Değişen beslenme alışkanlıklarının olumsuz getirisi sindirim sistemi rahatsızlıkları olarak ortaya çıkmaktadır. Biyomedikal enzim sektörü bu soruna “sindirime yardımcı enzimler” ile destek olmaktadır. Çizelge 2.6’da terapötik amaçlı sindirim yardımcısı enzimler yer almaktadır.

Çizelge 2.6 Terapötik amaçlı sindirim yardımcısı olarak kullanılan biyomedikal enzimler (Walsh, 2002).

Enzim	Terapotik Kullanımı
α -amylase	Nişasta sindirimine yardımcı olur
Cellulase	Selülozun kısmi sindirimini indükler
α -galactosidase	Flatulence faktörlerinin degradasyonunu indükler
Lactase	Laktoz intoleransını giderir
Papain, Pepsin, Bromelain	Diyetle alınan proteinin degradasyonunu artırır
Pankreatin	Diyetle alınan karbonhidrat, yağ ve proteinin degradasyonunu artırır

Çeşitli ilaçların bileşenleri arasında ilacın etkinliğinin artmasına yardımcı ajanlar olarak çok çeşitli enzimler, ilaç preparasyonu olarak geliştirilmiştir. Çizelge 2.7’de bu enzimlere örnekler verilmiştir.

Çizelge 2.7 Terapötik amaçlı ilaç etken maddesi olarak kullanılan biyomedikal enzimler (Walsh, 2002).

Enzim	Terapotik Kullanımı
Asparajinaz	Çocukluk çağı lösemi tedavisinde (Antikanser ajanı)
Glutaminase	Lösemi tedavisinde

Lysozyme	Anti-inflamatuar, antibiyotik
Alginate Lyase	Kistik fibroz tedavisinde
Creatine kinase	Kardiak ve iskelete ait bozuklukların tedavisinde
Rhodanase (thiosulphate sulfurtransferase)	Siyanür zehirlenmesi tedavisinde
Ribonuclease	Antiviral (RNA hidrolizi) ajan
β -Lactamase	Penisilin alerjisinde
Superoxide dismutase	Anti-inflamatuar ajan, Oksijen zehirlenmesi (<i>Paul Bert Etkisi</i>) tedavisinde
Papain	Anti-inflamatuar ajan

Endüstriyel olarak kullanılan enzimlerin aksine, terapötik amaçlar için kullanılan enzimlerin oldukça az miktarlarda, yüksek derecede saflık ve genellikle yüksek spesifiklikte olması istenmektedir. Bu tür enzimlerin üretileceği kaynak organizmalar herhangi bir olası uyumsuz materyal ile istenmeyen bir kontaminasyonun engellenmesi için titizlikle seçilir. Terapötik enzim preparasyonları genellikle liyofilize halde, sadece biyouyumlu tampon tuzları ve mannitol ilaveli saf preparasyonlar olarak satılmaktadır. Bu tür enzim fiyatları hala oldukça yüksek olmalarına rağmen, diğer terapötik kimyasallar ve tedavilerle karşılaştırıldığında onlarla rekabet edebilmektedir (Walsh, 2002).

Endüstriyel enzim üretimi 2009 yılı itibariyle 10 milyar dolara ulaşmıştır. Biyomedikal enzim üretimi yapan firmaları da içeren dünya genelinde enzim üretimi yapan çeşitli firmalar Çizelge 2.8’de verilmiştir.

Çizelge 2.8 Biyomedikal enzim üreten çeşitli firmalar (Walsh, 2001).

Üretici Firma	Web Sitesi URL
Altus Biologies, MA, ABD	http://www.altus.com
Amano Pharmaceutical, Nagoya, Japonya	http://www.amano-enzyme.co.jp
Asahi Chemical Industry, Tokyo, Japonya	http://www.asahi-kasei.co.jp
Biocatalysis, Pontypridd, İngiltere	http://www.biocatalysts.com

Çizelge 2.8 (devam)

Üretici Firma	Web Sitesi URL
BioCatalytics, Pasadena, CA, ABD	http://www.biocatalytics.com
Biocon India, Bangalore, Hindistan	http://www.biocon.com
Biozyme Laboratories, South Wales, İngiltere	http://www.biozyme.com

Boehringer Mannheim (Roche ile birleşti)	http://www.roche.com/diagnostics
Calbiochem-Novabiochem, San Diego, CA, ABD	http://www.calbiochem.com
Diversa, San Diego, CA, ABD	http://www.diversa.com
Fluka Chemical LLC, Buchs, İsviçre	http://www.sigma-aldrich.com
Genencor International, Rochester, NY, ABD	http://www.genencor.com
Genzyme Biochemicals, İngiltere	http://www.genzyme.com
Gist-Brocades, Avusturalya (DSM grubuna katıldı)	http://www.gist-brocedes.nl
Hoechst, Almanya (Aventis grubuna katıldı)	http://www.aventis.com
Jülich Enzyme Products, Jülich, Almanya	http://www.juelich-enzyme.com
Lee Scientific, St. Louis, MO, ABD	http://www.leescientific.com
Meito Sangyro, Tokyo, Japonya	http://www.mediagalaxy.co.jp/meito
Merck, Almanya	http://www.merck.com
Nagase and Co., Japonya	http://www.nagase.co.jp
New England Biolabs, Beverly, MA, ABD	http://www.neb.com
Novozymes, Bagsvaerd, Danimarka	http://www.novozymes.com
Promega, Madison, ABD	http://www.promega.com
Recordati, Milan, İtalya	http://www.recordati.it
Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya	http://indbio.roche.com
Röhm, Almanya	http://www.roehm.de
Sepim, Fransa	http://www.sfri.fr
Serva, Almanya (Invitrogen grubu)	http://www.serva.de
Sigma-Aldrich-Fluka, St. Louis, ABD	http://www.sigma-aldrich.com
ThermoGen, Woodridge, ABD	http://www.thermogen.com
Toyobo, Tokyo, Japonya	http://www.toyobo.co.jp
Unitica, Osaka, Japon	http://www.unitica.co.jp
Wako Pure Chemicals Industries, Osaka, Japonya	http://www.search.wako-chemical.co.jp
Worthington Biochemical, Lakewood, ABD	http://www.worthington-biochem.com

Günümüzde yüksek katma değerli protein ürünleri için rekombinant DNA teknolojisi, konvansiyonel metodlarla terapötik ürünlerin mevcut üretimini daha güvenilir, yüksek saflıkta ve çok daha ekonomik hale getirmiştir. Çizelge 2.2 - 2.7’de yer alan orjini mikrobiyal ya da memeli olan biyomedikal enzimlerin tamamı halihazırda **rekombinant DNA teknolojisi** ile mikrobiyal yolla üretilerek piyasaya sürülmektedir (Panke ve ark., 2002).

2.1.1 Terapötik amaçlı kullanılan biyomedikal enzimlerin kullanımındaki kısıtlamalar

Terapötik ajan olarak özellikle metabolik hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere ihtiyaç duyulan spesifik biyokatalizörlerin bu alanda kullanımını kısıtlayan bir takım faktörler vardır. Bunlar:

a. Vücut hücrelerinin içinde kolayca dağılabilmek için oldukça büyüktürler. Bu durum, çok sayıdaki genetik hastalık için enzimlerin neden başarılı bir şekilde uygulanamadığının temel sebebidir. Bunun üstesinden gelmek için hedefe yönlendirilmiş enzimler üzerinde birçok çalışma halen devam etmektedir. Örneğin, β -galaktosidaz enziminin hedefe spesifik monoklonal antikorlar ile birleştirilerek verildiği, bu sayede hepatositlerin hedefi olmaktan kurtarıldığı rapor edilmiştir.

b. Genellikle vücuda yabancı olan proteinlerdir. Antijeniktirler ve devamlı kullanıldıklarında hayatı tehdit eden alerjik reaksiyonlara sebep olacak çeşitli immün yanıtlar doğurabilmektedirler. Bu durumun önüne geçmek için, bazı durumlarda enzim, protein yapısında olmayan bir molekülle kovalent modifikasyon ile gizlenir. Örneğin asparajinazın, polietilen glikolün kovalent ilavesi ile modifiye edildiğinde, hiçbir immunojenisite göstermeksizin anti-tümör etkisini koruduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, toksinlerin, pirojenlerin ve diğer zararlı materyallerin terapötik enzim preparasyonunda yer alması yasaklanmıştır.

c. Dolaşımda iken etki süreleri bazen dakikalarla belirlenmektedir. Kovalent modifikasyonla gizlenerek bu sayede immünolojik problemle savaşmaları kolaylaştırılmaktadır. Ayrıca, enzimin yapay lipozomlar, sentetik mikroküreler ve hayalet kırmızı kan hücrelerinin içine hapsedilerek dolaşıma verildiği çalışmalar da yürütülmektedir. Bu metotlara rağmen uzun süre dolaşımda kalan enzim genellikle immunojenik yanıtı arttırmakta ve pıhtı oluşumuna sebep olmaktadır (Kopetzki, 1994).

2.2 Fukosidazlar

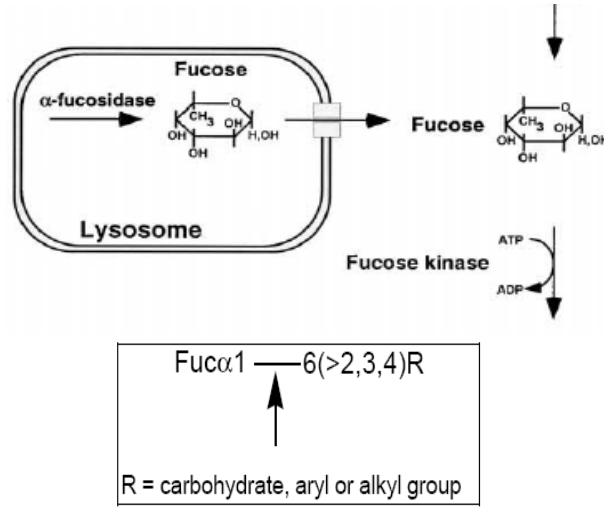
Fukosidazlar, hidrolazlar grubunda yer almaktadır ve D-fukoz veya L-fukoz residüsünü kopardığı bağ tipine göre de kendi içinde alt sınıflara ayrılmıştır. Çizelge 2.9'da çeşitli bağ tiplerine özgü fukosidozlar yer almaktadır (Yano ve

ark., 1985; Yamamoto ve ark., 1986; Tsuji ve ark., 1990; Tsuji ve ark., 1990a; Sano ve ark., 1992; Kurimura ve ark., 1995; Eneyskaya ve ark., 2001; Miura ve ark., 2005).

Çizelge 2.9 Çeşitli bağ tiplerine özgü, EC numaralarıyla verilen fukosidazlar (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/cont3aa.html>).

<u>3.-.-</u> - Hidrolazlar
<u>3.2.-.-</u> - Glikosidazlar
<u>3.2.1.-</u> - O- ve S-glikozil gruplarını hidrolize eden glikosidazlar
<u>3.2.1.38</u> - β -D-fukosidaz (β -D-fucoside fucohydrolase)
<u>3.2.1.51</u> - α -L-fukosidaz (α -L-fucoside fucohydrolase)
<u>3.2.1.63</u> - 1,2- α -L-fukosidaz (2- α -L-fucopyranosyl- β -D-galactoside fucohydrolase)
<u>3.2.1.111</u> - 1,3- α -L-fukosidaz (3- α -L-fucosyl- <i>N</i> -acetylglucosaminyl-glycoprotein fucohydrolase)
<u>3.2.1.127</u> - 1,6- α -L-fukosidaz (6-L-fucosyl- <i>N</i> -acetyl-D-glucosaminylglycopeptide fucohydrolase)

α -L-fukosidaz (E.C.3.2.1.51), α -1,2, α -1,3, α -1,4 veya α -1,6 bağlarından çeşitli oligosakkaritlere ve onların glikokonjugatlarına bağlanan terminal α -L-fucosyl residülerini (L-fukoz) ayırma yeteneğinde olan ekzo-glikosidaz grubundan lizozomal bir asit hidrolazdır (Kochibe, 1973; Yano ve ark., 1985; Yamamoto ve ark., 1986; Tsuji ve ark., 1990; Sano ve ark., 1992; Kurimura ve ark., 1995; Ajisaka ve ark., 1998; Goso ve ark., 2001; Eneyskaya ve ark., 2001; Miura ve ark., 2005; Katayama ve ark., 2005; Cobucci ve ark., 2008). Fukosidazların lizozomlardaki işleyiş mekanizması Şekil 2.2’de gösterilmiştir.



Şekil 2.2 Fukosidazların lizozomlardaki işleyiş mekanizması (Miura ve ark., 2005).

α -L-fukosidaz enzimi, bakteri, fungus, çeşitli bitkilerde ve memelilerde tespit edilmiştir. Bitkilerde α -L-fukozillenmiş oligosakkaritler, ksiloglukan yapılı hücre duvarında yer alarak, büyüme ve gelişmeyi oksin kontrolü ve asidik pH indüklemesi ile birlikte kontrol etmekte görevlidir. Bezelye epikotilleri ve *Arabidopsis* yapraklarından izole edilen α -L-fukosidazın fukozillenmiş ksiloglukanlardan α -L-fukozil residülerinin uzaklaştırılmasında işlevi olduğu tespit edilmiştir (Eneyskaya ve ark., 2001).

Memelilerle yapılan çalışmalar, insan serumu ve fare dokularından elde edilen α -L-fukosidazın geniş substrat spesifitesine sahip olduğunu ve yapay bir substrat olan *p*-nitrofenil α -L-fukopranozid (PNPF) üzerinde de etkili olduğunu ortaya koymuştur. Tsay ve Dawson (1977) yaptıkları bir çalışmada, insan karaciğer, beyin ve kültüre alınmış deri fibroblastlarından α -L-fukosidaz enzimini saflaştırarak, PNPF'ye, bazı doğal oligosakkaritlere ve glikosfingolipidlere karşı enzim aktivitesi saptamışlardır. Çalışmada saflaştırılan enzimin, Fuc α -1,2-gal, Fuc α -1,4-glcNAc ve α -1,6-glcNAc bağlarını hidrolize etme yeteneğinde olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu noktada termofilik mikroorganizmalarla yapılan çalışmalarda memelilerdekine yakın substrat spesifitesi görülmesi ve çeşitli tipte bağ konformasyonlarına sahip fukoz içeren glikoproteinlerin deglikozillenmiş formlarının üretilmesinde etkili bir araç olmaya aday gösterilmiştir (Eneyskaya ve ark., 2001).

2.2.1 α -L-Fukosidaz enziminin biyomedikal alanda potansiyel Kullanımı

2.2.1.1 Çeşitli hastalıkların patolojisinin seyrinde ve kanser tanısında kullanımı

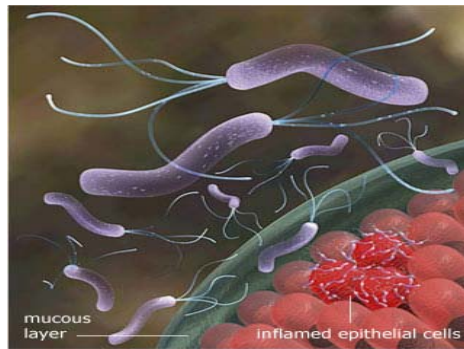
“Glikokonjugat” veya “kompleks karbonhidrat” terimi eşdeğer olup protein veya lipide kovalent olarak bağlanmış bir veya daha fazla karbonhidrat zincirinden oluşmuş moleküller için kullanılır. Glikoproteinler, proteoglikanlar ve glikolipidler bu kategoriye girerler. Genellikle her kovalent olarak bağlanmış oligosakkarit zincirinde 15 veya daha az şeker ünitesi bulunur. Zincir sentezi sırasında ucuna Fukoz veya N-asetil nöraminik asit (NANA) geldiğinde uzama sonlanır. Memelilerde plazma membran kitlesinin %10’dan az bir bölümü de lipid ve proteinlere kovalent bağlarla bağlanmış bu tip karbonhidratlardan oluşur. Bunlar genellikle membranın dış yüzünde lokalizedirler. Bu yüzden membran asimetrisinde de rol oynarlar. Plazma membranındaki glikoprotein ve glikolipidlerin oluşturduğu; hücre yüzeyinde bağlanma ve tanıma bölgeleri (hücre-hücre, virüs-hücre, bakteri-hücre), transport, antijenite, hücre yüzey reseptörleri (toksin, hormon, virüs, serotonin, interferon, fibronektin, lenfokinler vs.), adhezyon, agregasyon gibi çeşitli fonksiyonların çoğunda karbonhidrat komponentlerinin belirleyici veya yardımcı rolleri vardır (Spiro, 1969).

Hücre-hücre etkileşimine glikoprotein ve glikolipidlerin çeşitli karbonhidrat yan zincirleri katılmaktadır. Membrana bağlı glikoziltransferazlar veya glikosidazlar kendilerine uyan substratları tanıyıp, uzun karbonhidrat zincirinden son üyeyi ayırarak hücrelerin bu etkileşimlerini başlatırlar, ancak bu noktadan sonra (hücre-hücre, virüs-hücre, bakteri-hücre arasında) kesin bir bağlanmadan söz edilebilir (Menteş, 2002).

Memelilerde bulunan fukozillenmiş (fukoz bağlı) glikokonjugatlar (oligosakkaritler) birçok tanıma prosesini de içine alan biyolojik olaylarda önemli rol oynamaktadır. Bu sayede glikoprotein-hücre, hücre-hücre arasında interaksyonlar sağlanır. Bu tür glikokonjugatlar özellikle hayvanlar aleminde geniş çaplı dağılım gösterirler; karaciğer, beyin, dalak, insan amniyotik sıvısı, insan sütü ve kan gruplarında ayrımı sağlayan ABO ve Lewis kan grubu antijenleri gibi çeşitli dokularda tespit edilmişlerdir. Bu nedenle fukozillenmiş

glikokonjugatlar, immun yanıt, sinyal transdüksiyonu, patojenlerin gelişmesi ve adhezyonu gibi birçok fizyolojik ve patolojik olayda kritik rol oynamaktadırlar. Hücre yüzey oligosakkaritlerinin fukozil residüleri özellikle Fuc $\alpha 1 \rightarrow 3$ Glc-NAc (Fuc: Fukoz; Glc-NAc: N-asetil glikozamin) hücre-hücre etkileşimlerinde önemli olduğu öne sürülmektedir. Yumurta-sperm interaksyonun, erken embriyogenesizin ve apoptosisin fukozla ilişkilendirildiği rapor edilmiştir. Fukoz aynı zamanda hücre adhezyon moleküllerinden selektin ailesinin endotelyum üzerindeki lökositlerle arasında immun modülatör görevi de yapmaktadır (Kurimura ve ark., 1995; Goso ve ark., 2001; Miura ve ark., 2005).

Fukozillenmiş glikokonjugatlar içinde gastrik müninler de fukoz residüleri taşıyan birçok oligosakkarite sahiptir ve yapılarında Lewis antijenleri mevcuttur. İnsan gastrik mukozasında üretilen Le^b antijeni gastrik hastalıklardan sorumlu tutulan *Helicobacter pylori* için bağlayıcı ligand niteliğindedir (Şekil 2.3). Le^b antijeni açık ucunda D-galaktoza 1,2- α bağıyla bağlı L-fukoz residüsü içermektedir. Bu noktada 1,2- α -L-fukosidaz, *H.pylori* için Le^b antijeninin reseptör rolünü açıklamakta önemlidir. Bu tür bakteriyel enfeksiyonlarda reseptör epitopu ortaya çıkarmak için de özellikle terminal α -L-fukosidik bağlara spesifik bir α -L-fukosidazı üreten mikroorganizmaların, enzim kaynağı olarak taranması gerektiği ortaya konmuştur. Bakteriyel adhezyonu önlemek için bu tür reseptörlerin tahrip edilmesi gerekmektedir, bunun için reseptör degradesi edeci enzime ihtiyaç vardır. Bu amaçla halen *H.pylori* enfeksiyonu ve diğer gastrik hastalıklarda α -L-fukosidaz muamelesiyle gastrik epitalyal hücrelerde ilgili reseptörlerin tahribatı ve *H.pylori* adhezyonunun engellenmesi konusunda çalışmalar umut verici bir hızda devam etmektedir (Levy ve ark., 1961; Tsuji ve ark., 1990; Kurimura ve ark., 1995; Goso ve ark., 2001; Miura ve ark., 2005).



Şekil 2.3 *Helicobacter pylori* 'nin mide mukozasına tutunması (www.nature.com).

α -L-fukosidaz enziminin medikal alandaki önemli rolü kanser tanısı çalışmalarında da önemli bir veri niteliğindedir. Tümör markırı (belirteci) olabilecek enzimler çerçevesinde oligosakkaritlerdeki fukozy zincirden ayıran lizozomal hidrolaz, α -L-fukohidrolaz (fukosidaz) aktivitesinin değerlendirilmesi, erken kolorektal (gastrointestinal malignitelerin) ve hepatosellüler kanserli hastalarda serumdaki düzeyleri incelenerek tanı koymayı sağlamaktadır (Macbeth ve ark., 1962; Tatsumura ve ark., 1977; Yogeewaran, 1983; Lopez, 1989).

Malign hücrelerin kaybettikleri matür (normal) hücre özelliklerinin ve kazandıkları yeni özelliklerin pek çoğunun membranındaki çeşitli değişikliklere bağlı olduğu gerçeği, tümör markırı çalışmalarını plazma membran komponentlerine dolayısı ile glikoprotein ve glikolipitlere yöneltmiştir. Pek çok malignitede, hücre yüzeyinde ve serumdaki glikoprotein ve glikolipit fraksiyonlarında kalitatif ve kantitatif değişiklikler bildirilmiştir. Glikoprotein ve glikolipitlerin fonksiyonlarında belirleyici veya yardımcı rol oynayan oligosakkarit yan zincirlerinde yer alan çeşitli monosakkaritler de araştırılmış, özellikle zincir sonlarında yer alan iki şekerin; **fukoz** ve sialik asitin pek çok malignitede serumda artmış olduğu tespit edilmiştir. Bu artış beraberinde serumda α -L-fukosidaz aktivitesinde (fukozilasyon düzeyindeki değişikliklerde) bir artış meydana getirmektedir (Yogeewaran, 1983).

Dolaşımdaki α -L-fukosidaz diğer pek çok lizozomal enzim gibi karaciğerdeki Kupfer hücreleri tarafından dolaşımdan alınıp yıkılır. Bu hücreler enzimi moleküldeki mannoz 6-P rezidüsünden tanırlar. α -L-fukosidazın serumda artış gösterdiği bazı durumlarda bu tanıma olayında bir defekt olduğu düşünülmektedir (Yu ve ark., 1988).

Karsinomalarda glikosidazlar gibi yıkıcı enzimlerin artmasının malign hücrelerin kontakt inhibisyonu kaybetmelerinden sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür. Bu enzimler hücre yüzeyinde modifikasyonlara yol açabilir, bazal membranları yıkabilirler (Menteş, 2002).

Primer hepatik karsinomada serum α -L-fukosidaz enziminde yükselme en belirgindir. Normalden yüksek serum α -L-fukosidaza sahip metastatik karaciğer tümörlerinden ayırıcı tanı sağlayacak yüksek değerler, primer hepatik karsinoma

olgularında gösterilmiştir (Brattain ve ark., 1977; Tatsumura ve ark., 1977; Bukofzer ve ark., 1989; Leray, 1989).

Malignitede, özellikle hepatosellüler karsinomada serum α -L-fukosidaz artışı açıklamaya yönelik çeşitli teoriler üretilmiştir:

- Enzim üretiminde artış,
- Enzim yıkımında azalma,
- Tümör hücresinden ekstrasellüler ortama enzim transportu,
- Fukoz içeren glikoprotein ve glikolipid dönüşümünde artış (Yu ve ark., 1988).

α -L-fukosidaz, malignitelerden başka akut viral hepatit, kronik hepatit, alkolik hepatit, siroz gibi karaciğer hastalıklarında, hipertiroidi, toksik yağ sendromu ve diabetes mellitusta serumda yükselir. Alkoliklerde serum lizozomal enzim artışı karaciğer disfonksiyonuna bağlıdır (Shaw ve ark., 1968; Zheng ve ark., 1990).

Azalan α -L-fukosidaz aktivitesi ise, inflamasyon, ve kistik fibroz (antiserumda azalan) gibi çok sayıda patolojik durumla ilişkilendirilmiştir (Scanlin ve ark., 1981).

2.2.1.2 Fukosidoz hastalığının tedavisinde kullanılmak üzere devam eden çalışmalar

Hücre içine endositoz ile alınan proteoglikanlar, glikoproteinler ve glikolipidler lizozomal enzimlerle yıkılmaktadırlar. Endositik veziküllerle birleşen lizozomlarda bulunan lizozomal proteazlar vezikül içeriğinin protein bileşenini parçalamaktadır. Karbonhidrat bileşeni ise lizozomal glikosidazlar tarafından yıkılmaktadır. Lizozomlarda endoglikosidazlar ve ekzoglikosidazlar bulunmaktadır. Endoglikosidazlar zincirleri daha kısa oligosakkaridlere parçalanmakta, ardından her bir bağın tipine spesifik olan ekzoglikosidazlar, şeker kalıntılarını indirgen olmayan uçtan tek tek uzaklaştırmaktadır. Lizozomal glikosidazların eksikliğinde proteoglikanlar, glikoproteinler ve glikolipidlerden karbonhidratlar kısmi olarak yıkılmakta ve yıkılamayan bileşenler hücre içinde

membranla kaplı veziküllerde birirmektedir. Biriken bileşenler organın genişlemesine ve fonksiyonunun azalmasına neden olmaktadır. Sentez hızı normal olan matriks moleküllerinin (glikokonjugatların) normal yıkılımı için gerekli lizozomal enzimleri kodlayan genin mutasyonu sonucu enzim yeterli miktarda sentezlenememekte veya enzimin aktivasyonu için gerekli kritik protein bulunmamaktadır. Böyle durumlarda lizozomal enzimlerin eksikliği “**mukopolisakkaridoz**”, “**sfingolipidoz**” ve “**gangliozidoz**” gibi depo hastalıklarına yol açmaktadır (Çizelge 2.10). Yıkılamadığı için biriken lipidlerin etkilediği dokularda ağır fonksiyon kayıpları görülmektedir. Depo hastalıklarının çoğunda görülen psikomotor bozukluklar, santral sinir sisteminin etkilenmesi sonucu oluşmaktadır. Lizozomal depo hastalıkları 1:5 000 – 1:10 000 arasında değişen oranlarda görülme sıklığına sahiptir (Menteş, 2002).

Lizozomal depo hastalıklarında yenidoğan döneminde en sık görülen klinik bulgular, asit/plevral sıvı, kaba yüz görünümü, karaciğer-dalak büyüklüğü, iskelet anomalileri, kardiyomiyopati, hipo/hipertoni, konvülziyon, anjiokeratoma ve göz anomalileridir (Enns ve ark., 2007).

Lizozomal depo hastalıkları nadir olup, canlı doğumlar içinde sıklığı 14/100 000 olarak bildirilmiştir. Lizozomal enzimlerdeki eksiklik sonucu normalde lizozomlarda yıkılan maddeler beyin, karaciğer, dalak, kemik iliği gibi organlarda sürekli olarak birikir. Bunların sonucu olarak hematopoezde azalma, hipoalbüminemi, organomegali, miyokard hasarı, asit ve portal hipertansiyon gelişebilir. Lizozomal depo hastalıklarının en önemli ve değişmez karakteristik özellikleri; ilerleyici olmalarıdır. En sık görülen lizozomal depo hastalığı Gaucher hastalığıdır. (www.nih.gov; Ophanet; OMIM). Çizelge 2.10’da kalıtsal metabolik lizozomal depo hastalıkları ve Çizelge 2.11’de glikoproteinazların eksikliği/hasarı nedeniyle ortaya çıkan lizozomal depo hastalıklarının klinik ve laboratuvar özellikleri yer almaktadır.

Çizelge 2.10 Kalıtsal metabolik hastalıklardan defektin lizozomda olduğu lizozomal depo hastalıkları (Allen ve ark., 1995).

Lizozomal depolama hastalığı	Enzim hasarı/eksikliği
Fabry	α -galactosidase A
Farber	Acid ceramidase
Fucosidosis	α-L-fucosidase
Gaucher Tip I, II, III	β -glucosidase (glucocerebrosidase)
G _{M1} gangliosidosis	β -galactosidase
Hunter (Mucopolysaccharidosis, MPS I)	α -L-Iduronidase
Hunter-Scheie (MPS II)	Iduronate-2-sulfatase
Krabbe	Galactocerebrosidase
α -Mannosidosis	α -mannosidase
β -Mannosidosis	β -mannosidase
Maroteaux-Lamy	Arylsulfatase B
Metachromatic leukodystrophy	Arylsulfatase A
Morquio A	N-Acetylgalactosamine-6-sulphate sulfatase
Morquio B (MPS IV)	β -galactosidase
Niemann-Pick	Acid sphingomyelinase
Aspartyl-glycosaminuria	L-Aspartamido- β -N-acetyl-glucosamine amidohydrolase
Sialidosis	Neuraminidase
Tay-Sach's	β -hexosaminidase A ve B
MPS III	Heparan-N-sulfatase
MPS III	N-acetyl- α -D-glucosaminidase
MPS III	AcetylCoA: α -glucosaminide N-acetyltransferase
MPS III	N-acetyl-galactosamine-6-sulfatase
MPS IV	β -galactosidase
MPS VI	Arylsulfatase B
MPS VII	β -Glucuronidase

Çizelge 2.11 Glikoproteinazların eksikliği/hasarı nedeniyle ortaya çıkan lizozomal depo hastalıklarının klinik ve laboratuvar özellikleri (Menteş, 2002).

Hastalık	Enzim defekti	Klinik ve laboratuvar özellikleri
Mannosidoz	α -mannosidaz	Otozomal resesif geçiş gösterir. Şiddetli mental reterdasyon, kaba yüz, boy kısalığı, iskelet değişiklikleri ve eklemlerde hiperlaksite görülmektedir. Duyma kaybı da sık görülmektedir. İdrarda anormal oligosakkaritler saptanmaktadır.
Fukosidoz	α -fukosidaz	Otozomal resesif geçiş gösterir. Kaba yüz, iskelet değişiklikleri ve bazı vakalarda anjiokeratoma korpis diffuzum görülür. İdrarda anormal oligosakkaritler saptanmaktadır.
I-cell hastalığı (Mukolipidoz Tip III)	N-asetilglukozaminil fosfotransferaz	Otozomal resesif geçiş gösterir. Şiddetli ve hafif formları vardır. İleri derecede boy kısalığı, mental retardasyon, erken dönemde kaba yüz görünümü ve eklemlerde sertlik görülür. Serumda lizozomal enzimler artmaktadır.
Sialidozis	N-asetil nöraminidaz (sialidaz)	Otozomal resesif geçiş gösterir. Mental retardasyon, kaba yüz, iskelet displazileri görülmektedir. İdrarda anormal sialil oligosakkaritler saptanmaktadır.

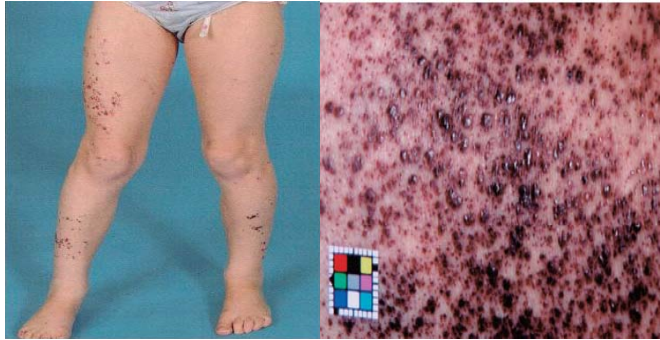
Şiddetli α -L-fukosidaz enzim eksikliği/hasarı “**fukosidoz**” (fucosidosis) adı verilen bir hastalığa neden olmaktadır. Fukosidoz, periferik ve santral sinir sistemini de içine alan birçok dokunun lizozomlarında fukozenlenmiş glikokonjugatların (fukolipid ve fukopolisakkaritler) letal dozda birikimi ile sonuçlanan bir otozomal resesif lizozomal bir depo hastalığıdır. Şiddetli mental ve motor (duyu sinir) kaybına yol açan hızlı nörodejenerasyon ile karakterize edilir. İlk defa 1966’da Durand ve ark., tarafından mental retardasyon ve nörolojik deteriorasyon semptomları ile teşhis edilmiştir. Araştırmacılar fukosidozun etnik orjine sahip olduğunu ve Avrupa, Kuzey-Güney Amerika, Asya ve Afrika’nın 20 farklı ülkesine yayılımını tespit etmiştir (Durand ve ark., 1969; Zielke ve ark., 1972; Robinson ve ark., 1973; Troost ve ark., 1976).

α -L-fukosidaz eksikliği sonucu fukoz içeren oligosakkaridlerin yanısıra dokularda fukoz içeren bir lipid (H-izoantigenik lipid) de toplanan bu hastalık, kaba yüz görünümü ve bazı diğer bulguları ile mukopolisakkaridoz sendromlarına benzerlik gösterir. Bu nedenle bir mukolipidoz olarak kabul edilirse de

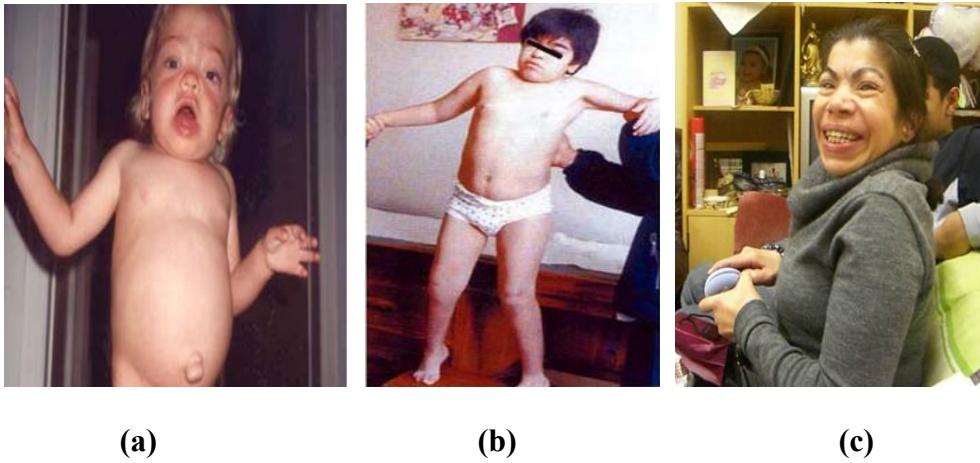
sınıflandırmada fukosidoz, **lipid depo hastalıkları** grubuna girmektedir (Zielke ve ark., 1972; Robinson ve ark., 1973; Troost ve ark., 1976).

Fukosidoz, Uluslararası Sağlık Enstitüsü (National Institutes of Health) tarafından “Nadir Hastalıklar” arasında sayılmaktadır. Bu açıklamada, Amerikan popülasyonunda α -L-fukosidaz eksikliğinin 200 000’den az insanı etkilemekte olduğu bilgisi verilmektedir. Avrupa Birliği Üye ülkelerinin kurduğu bir komisyon olan “Ophanet” de bu hastalığı “Nadir Hastalık” olarak kabul etmiş ve Avrupa da her 2000 kişiden birinde görülme olasılığı olduğunu bildirmiştir (www.nih.gov; Ophanet; OMIM).

Otozomal resesif kalıtım gösteren fukosidoz, fenotipi bakımından çeşitlilik gösterir. Büyüme ve mental (zihinsel) gelişimde gerilik, ilerleyen nörolojik gerileme, kaba yüz hatları, tekrarlayan infeksiyonlar, iskelet bozuklukları, eklem kasılmaları, iç organlarda büyüme, sağırılık ve deri anjiomları (tümörleri) fenotipe yansıyan bozukluklardır (Şekil 2.4-2.5).



Şekil 2.4 Fukosidozun semptomları arasında yer alan “Anjiokerotom”lar (Willems ve ark., 1991).



(a)

(b)

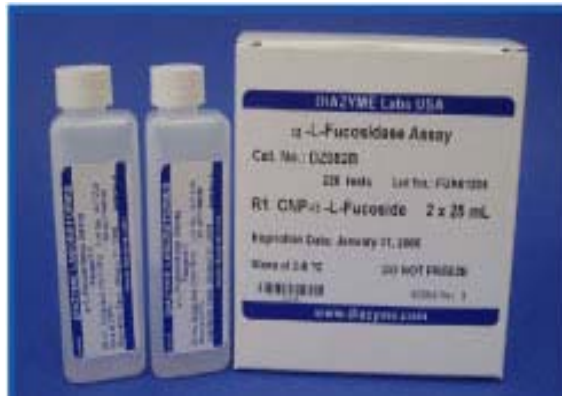
(c)

Şekil 2.5 Fukosidozlu hastalar (a), (b), (c)

(http://www.lysosomallearning.com/healthcare/about/lsc_hc_abt_fucosidosis1.asp).

Fukosidozun üç farklı tipi, başlangıç yaşları ve fiziksel /zihinsel belirtileri ile birbirinden ayrılır. Tip I fukosidoz genellikle yaşamın ilk 3-18. ayında, diğer lizozomal depo hastalıklarında olduğu gibi yüz ifadesinde kabalaşma, organlarda büyüme (karaciğer, dalak ve/veya kalp) ve X-ray ile gözlenebilen kusurlu kıkırdak gelişimi ile kendini göstermektedir. Bunun yanında zihinsel gerileme de mevcuttur. Tip II fukosidoz, yaşamın 12 ile 24. ayları arasında ortaya çıkmaktadır. Yüz hatlarındaki kabalaşma hafif olmakla birlikte, kıkırdaklarda anomali, zihinsel gerileme ve organların aşırı büyümesi gözlenmektedir. Bunlara ilaveten deride anjiokeratomlar görülmektedir. Tip I ve tip II fukosidoz hastaları için ortalama altı yıl yaşam süresi öngörülmektedir. Tip III, juvenil formu temsil eder. Bu tipte psikomotor gelişmede yavaşlama hafif seyrederken, nörolojik aktivitelerde gerileme de yavaş ve yaşam süresi diğer iki tipe göre uzundur (Zielke ve ark., 1972; Robinson ve ark., 1973; Troost ve ark., 1976).

Fukosidoz tanısında idrar testi yapılarak oligosakkarit (fukoz bağlı) miktarındaki artış değerlendirilmektedir. Bu testi, kan testi veya deri biyopsisi izlemektedir. Kan ve deri örnekleri α -L-fukosidaz enzimi için normalden düşük değerler göstermelidir. Ailelerin fukosidoz hastalığı olan çocukları varsa, genetik kökeni olan bu hastalığın, doğacak çocuk için kordosentez veya amniyosentez ile prenatal tanısı yapılabilmektedir (www.nih.gov; Ophanet; OMIM). Şekil 2.6'da α -L-fukosidaz enziminin tespitinde kullanılmak üzere geliştirilmiş ticari tanı kiti yer almaktadır.



Şekil 2.6 α -L-Fukosidaz enziminin tespitinde kullanılmak üzere geliştirilmiş ticari tanı kiti (Diagnostik enzim olarak α -L-fukosidaz) ([http://www.biocompare.com/ProductDetails/248682/alpha-L-Fucosidase-\(AFU\)-Colorimetric-Assay-Kit.html](http://www.biocompare.com/ProductDetails/248682/alpha-L-Fucosidase-(AFU)-Colorimetric-Assay-Kit.html)).

Fukosidozun tüm tiplerinde ilerleyen semptomları durdurabilecek veya tamamiyle iyileşme sağlayacak bir tedavi henüz geliştirilmemiştir. Yalnızca kemik iliği transplantasyonu ile uygun donörden ilik nakliyle α -L-fukosidaz enzimi üreten hücrelerin nakli yapılmakta fakat bu tedavi sorunu tamamen ortadan kaldıramamaktadır. Enzimin yerine konulmasına yönelik (enzim replasman) tedavileri geliştirmek üzere çalışmalar başlamıştır. Enzimin çeşitli konjugatlarla (galaptin, lektin gibi) birleştirilerek enzimden yoksun dokuya verilmesi temeline dayanan hedefe yönelik ilaç tedavisi çalışmaları klinik aşamada devam etmektedir. Bu anlamda enzim üretimini gerçekleştiren tüm canlılarda bu enzimlerin karakterize edilerek memelilere en yakın formların tespiti önemlidir (www.nih.gov).

Allen ve ark., patentini de aldıkları bir çalışmada, α -L-fukosidaz enzimi lektin ve galaptin ile ayrı ayrı konjuge edilerek fukosidozlu dokuya verilmesi ile hedefe yönelik enzim replasman tedavisi gerçekleştirilmiş, enzimin tek başına verilmesi yerine galaptin ile glikokonjuge edildiği deneme immun yanıtı tetiklemedeki düşük seviyesi ile başarılı bulunmuştur (Allen ve ark., 1995).

2.3 *Bacillus* Genusu

Bacillaceae familyasının bir üyesidir. Hücreleri çomak şekilli, düz veya hemen hemen düze yakın, çoğu olumsuz ortam koşulları için çok dirençli, tek bir endospora sahip, gram-pozitif, peritrik kamçılı, aerobik veya fakültatif anaerob bakterilerin oldukça geniş ve heterojen bir koleksiyonudur. Birçok türünde hücre duvarı çapraz bağlı mezo-diamino pimelik asitten oluşmaktadır (Gordon ve ark., 1973; Slepecky ve ark., 1991; Goto ve ark., 2000).

1930'larda yoğun çalışmalarla *Bacillus* genusunun modern taksonomisini ortaya çıkaran bilim adamları, Nathan R. Smith, Francis E. Clark ve Ruth E. Gordon'dur. Bu genusa ait bakterilerin tanımlanması geleneksel biyokimyasal tekniklerle netlik kazanmıştır (Flint ve ark., 2001). Çizelge 2.12'de *Bacillus* genusuna ait isimlendirmeler ve açıklamalar yer almaktadır.

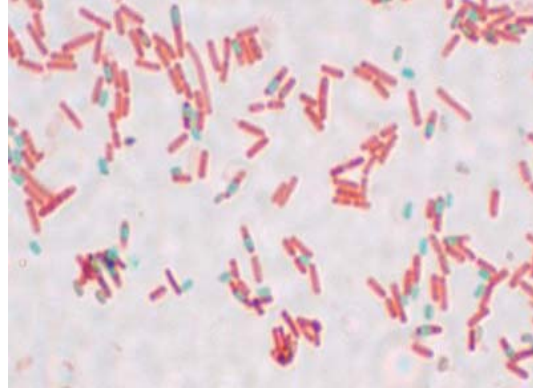
Çizelge 2.12 *Bacillus* genusuna ait isimlendirme ve açıklamalar (www.bgsc.org/Catalogs/Catpart3.pdf).

Genus	Kaynak (Literatür)	İsimlendirmenin Anlamı	Açıklama
<i>Bacillus</i>	Cohn (1872)	Küçük çubuk	Aerobik veya fakültatif anaerobik, endosporlu, çubuk şeklinde bakteri
<i>Amphibacillus</i>	Niimura ve ark., 1990	“çok yönlü” <i>Bacillus</i>	Fakültatif anaerobik
<i>Alicyclobacillus</i>	Wisotzkey ve ark., 1992	“sıklık yağ asidi” <i>Bacillus</i>	Asidofilik, ılımlı termofilik
<i>Paenibacillus</i>	Ash ve ark., 1994	<i>Bacillus</i> gibi	Fakültatif anaerobik, mezofilik
<i>Aneurinibacillus</i>	Shida ve ark., 1996	“Thiamine” <i>Bacillus</i>	Aerobik, mezofilik
<i>Brevibacillus</i>	Shida ve ark., 1996	“kısa” <i>Bacillus</i>	Aerobik, mezofilik
<i>Halobacillus</i>	Shida ve ark., 1996	“tuz” <i>Bacillus</i>	İlımlı halofilik
<i>Virgibacillus</i>	Heyndrickx ve ark., 1998	“dallanmış” <i>Bacillus</i>	Mezofilik, ılımlı halotolerant
<i>Gracilibacillus</i>	Waino ve ark., 1999	“ince-uzun” <i>Bacillus</i>	Mezofilik; bazıları ekstrem halotolerant
<i>Salibacillus</i>	Waino ve ark., 1999	“tuz” <i>Bacillus</i>	İlımlı halofilik
<i>Anoxybacillus</i>	Pikuta ve ark., 2000	“oksijensiz” <i>Bacillus</i>	Zorunlu veya fakültatif anaerobik, alkalifilik, ılımlı termofilik
<i>Thermobacillus</i>	Touzel ve ark., 2000	“sıcak” <i>Bacillus</i>	Anaerobik, termofilik
<i>Filobacillus</i>	Schlesner ve ark., 2001	“dizi” <i>Bacillus</i>	Anaerobik, alkali tolerant ve halofilik
<i>Ureibacillus</i>	Fortina ve ark., 2001	“üre” <i>Bacillus</i>	Aerobik, termofilik
<i>Geobacillus</i>	Nazina ve ark., 2001	“dünya” <i>Bacillus</i>	Aerobik veya fakültatif anaerobik termofilik

2.3.1 Hücre morfolojisi

Bacillus zincirleri tek veya çok sayıda uzun zincirler meydana getirebilmektedir. Hücreler parabazal kısım ve protein kristalleri içerebilmektedir. Ana hücrede bulunan sporun şekli ve sporogonium yeri, *Bacillus* sp. türlerinde karakteristik bir özellik göstermektedir. Endosporlar genellikle silindirik,

elipsoidal, oval ya da yuvarlaktır. Sporlar, sporogonium'un içinde merkezde, merkeze yakın, uca yakın, uçta veya lateralde bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda, sporogonium'un şişmesi ve sporun şekli üç grup altında toplanmıştır. Birinci grup; elipsoidal sporlara sahip olup sporogonium'da şişmeye neden olmamaktadır. İkinci grup ise elipsoidal sporlara sahip olup sporogoniumlar'da şişmeye neden olmaktadır. Üçüncü grup sferik sporlar ise sporogonium'un şişmesine neden olmaktadır (Madigan ve Martinko, 2006). Şekil 2.7'de *Bacillus subtilis*'in mikroskop görüntüsü verilmiştir.



Şekil 2.7 *Bacillus subtilis*'e ait 100x'lik büyütmedeki mikroskop görüntüsü
(www.steve.gb.com/bacillus_subtilis.jpg).

2.3.2 Hücre duvarının yapısı

Bacillus suşlarında yoğun halde bulunan mürein tipi direkt birbirine bağlı mezo-diamino pimelik asit şeklindedir. Bazı *Bacillus* türlerinde ise hücre duvarı teikoik asit yapısına sahiptir (Madigan ve Martinko, 2006).

2.3.3 Sporlar

Sporların şekilleri, sporogoniumdaki durumları sporogoniuma bağlı olan büyüklüğü, taksonomide kullanılmaktadır. *Bacillus* sporları çok kompleks bir yapı göstermekte olup, vejatatif hücrede kolayca görülmektedir (Madigan ve Martinko, 2006).

2.3.4 Koloni özellikleri

Bacillus suşlarının koloni yüzeylerinin görüntüsü genellikle çevresel faktörlerle değişmektedir. Bu faktörler arasında en önemlileri kültürün bağlı bulunduğu besiyerinin bileşimi ve inkübasyon sıcaklığıdır. Çevresel faktörlerin değişmesi ile kültürün kendisinde de birtakım değişiklikler olmaktadır. Yalnızca küçük koloni formlarını içeren suşların dışında koloni çapı, besiyeri ve içerisindeki agar konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir (Madigan ve Martinko, 2006). Şekil 2.8’de *Bacillus cereus*’un petride kültür görüntüsü verilmiştir.



Şekil 2.8 *Bacillus cereus*’a ait petride kültür görüntüsü
(<http://www.microbelibrary.org/microbelibrary>).

Bazı *Bacillus* türleri katı besiyerinde, inokülasyondan önce ortamdaki nem uzaklaştırılmadığı takdirde kümeler halinde bulunma eğilimi göstermektedir. Çoğu *Bacillus* suşu pigment üretmemektedir. *Bacillus megaterium* suşları özellikle kazein agarda sarı renkte pigment oluşturmaktadır. *Bacillus* türleri toprakta, suda, fekal materyalde ve çeşitli gıdalarda bulunabilmektedir (Priest ve ark., 1977).

Endüstride kullanılan 10’dan fazla mikrobiyal enzimin, *Bacillus* genusuna ait türler tarafından sentezlendiği bilinmektedir. Enzim üretimi çalışmalarında kullanılan, bu bakterilerde birçok önemli özellik saptanmıştır. Örneğin, büyük bir bölümü kemoorganotrof olduğu için besin istekleri azdır, kolayca kültüre alınabilmektedirler (Madigan ve Martinko, 2006).

2.4 *Geobacillus* Genusu

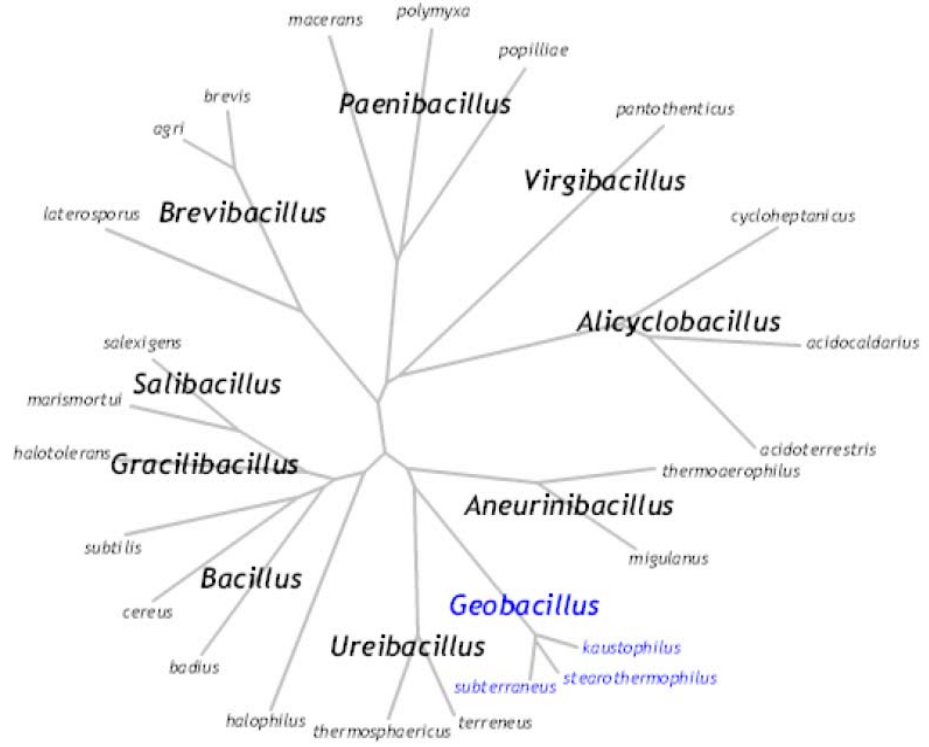
Termofilik *Bacillus* suşlarının ilk sınıflandırma çalışmaları 1949'da Gordon ve Smith ile başlamıştır. Daha önceleri *Bacillus* olarak bilinen organizmalardan çeşitli yeni genuslar tanımlanmakta, eski morfolojik ve fizyolojik tanımlamaları baz alarak *Bacillus* olarak tayin edilen diğer genuslar da yeni izolatlar ile yeniden oluşturulmaktadır.

1990'larda mikrobiyologların dünyadaki ekstrem çevreleri keşfiyle, çok sayıda yeni endosporlu, halofil, asidofil, alkalifil ve termofiller ortaya çıkarılmıştır. ss rRNA sekanslama yapıldığında, bu ekstromofiliklerin, *Bacillus*'ların yakın akrabaları olduğunu ve halen çok yeni olan genusların çekirdeğini teşkil ettiklerini göstermektedir. Yeni taksonomik çalışma ile aerobik termofilik bacilli bir genusta toplanmıştır. Termofilik, psikrofilik, asidofilik, alkalifilik ve halofilik özellikteki bir çok tür bu genusa dahil edilmiştir (Nazina ve ark., 2001).

Termofilik, aerobik, sporlu ve 45-70⁰C aralığında yaşayabilen belirli bakteriler, *Alicyclobacillus*, *Brevibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Sulfobacillus*, *Thermoactinomyces* ve *Thermobacillus* olarak genuslara ayrılmıştır. Yapılan moleküler analizler sayesinde bu tür termofilik bakterilerin çoğunlukla *Bacillus* 1 ve 5 genetik grubuna ait oldukları tespit edilmiştir (Rainey ve ark., 1994; Maugeri ve ark., 2001).

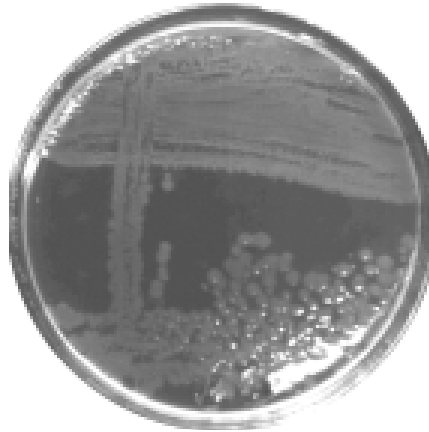
ss rRNA (16s rRNA)'ya göre 2001 yılında yapılan sınıflandırmaya göre *Bacillus* grup 5 (Thermophilic bacilli of pylogenetic group 5), termofilik *Bacillus* suşlarını kapsamaktadır. Bu grup "*Geobacillus*" olarak adlandırılan yeni bir genus başlığı altında toplanmıştır (Nazina ve ark., 2001). Bu isim, "dünya" ve "toprak" *Bacillus*'u anlamına gelmektedir. *Geobacillus stearothermophilus* (Şekil 2.10) tip kültür olarak en çok bilinen üyesidir.

Şekil 2.9'da 16S rRNA benzerliğini dayanan filogenetik ağaç ve *Geobacillus* genusunun yeri görülmektedir. Çizelge 2.13'de *Geobacillus* genusuna ait özellikler yer almaktadır.



Şekil 2.9 16S rRNA benzerliğine dayanan filogenetik ağaç (www.bgsc.org/Catalogs/Catpart3.pdf).

*Geobacillus*lar, fenotipik ve filogenetik olarak yüksek seviyede (%96.5-99.2) 16s rRNA sekans benzerliği içeren termofilik *Bacillus*’lardan oluşmaktadır (Nazina ve ark., 2001).



Şekil 2.10 *Geobacillus stearothermophilus* NUB3621 (www.bgsc.org/Catalogs/Catpart3.pdf).

Çizelge 2.13 *Geobacillus* genusuna ait açıklamalar (Nazina ve ark., 2001).

Morfoloji	
Vejetatif hücre	Çubuk şekilli hücreler, tek başına veya kısa zincirler halinde bulunur ve peritrik filajella ile hareket yeteneğine sahiptir. Hücre duvarı yapısı Gram pozitifdir fakat Gram reaksiyonu pozitif ve negatif arasında çeşitlilik gösterir.
Spor	Hücre başına bir elipsoidal veya silindirik endospor bulunur. Kısmen şişkin veya şişkin olmayan endospor uçta veya uca yakın yer alır.
Koloni	Çok çeşitli şekil ve boyutlara sahiptirler; belirli bir ortamda üretilirler.
Metabolizma	
Enerji	Kemoorganotrofik
Oksijen	Aerobik veya fakültatif anaerobik. O ₂ elektron akseptörüdür, bazı türlerde nitratla değişebilir.
Sıcaklık	Zorunlu termofilik. Büyüme sıcaklık aralığı 37-75 ⁰ C ve optimumu 55-65 ⁰ C' tir.
pH	Büyüme 6,0-8,5 pH aralığında gerçekleşir, optimum pH aralığı 6,2-7,5' tir.
Gereksinimleri	Büyüme faktörleri, vitaminler, NaCl ve KCl birçok türler için gerekli değildir.
Tanımlama Testleri	
Karbonhidratlar	Glukozdan, fruktozdan, maltozdan, mannozdan ve sükrozdan asit üretilir fakat gaz oluşumu olmaz. Birçok türleri laktozdan asit üretir.
Enzimler	Birçok tür katalaz üretir. Fenilalanin deamine olmaz, tirozin degrade olmaz, indol oluşmaz, Voges-Proskauer reaksiyonu negatiftir. Oksidaz pozitif veya negatiftir.
Biyokimyasallar	Hüresel yağ asitleri toplamın % 60'ından daha fazlasını oluşturan izo-15:0, izo-16:0 ve izo-17:0' den oluşur.
DNA karakterizasyonu	
G-C içeriği	% mol 48,2 – 58 (termal denatürasyon metodu)
16S rRNA	Bu genusun türleri arasında % 96,5'den daha yüksek sekans benzerliği vardır.
Ekoloji	
Prevalans	Birçok türü doğada geniş bir alana yayılmıştır

Geobacillus genusuna ait üyeler çok geniş bir alana yayılmış olup, tüm jeotermal alanlardan izole edilebilmektedir. Bunlar arasında, sığ denizsel sıcak su kaynakları, derin deniz hidrotermal ventleri, yüksek sıcaklıktaki petrol çıkarılan alanlar ve sıcak su boruları, ısı değiştiriciler, atık arıtma tesisleri, kömür atık

depolama alanları, biyoremediyasyon yapılan bölgeler, kompostlama alanları, gibi yapay sıcak çevreler gibi termofilik ve mezofilik jeografik alanlar sayılabilmektedir (Nazina ve ark., 2001, Maugeri ve ark., 2001).

Bugüne kadar bu genusa ait tanımlanmış üyeler 35-78⁰C aralığında farklı büyüme sıcaklıklarına sahip olan “*Geobacillus stearothermophilus*, *Geobacillus thermocatenulatus*, *Geobacillus thermoleovorans*, *Geobacillus kaustophilus*, *Geobacillus thermoglucosidasius*, *Geobacillus thermodenitrificans*, *Geobacillus subterraneus*, *Geobacillus uzenensis*, *Geobacillus caldoxylosilyticus*, *Geobacillus toebii*, *Geobacillus vulcani*, *Geobacillus lituanicus*, *Geobacillus tepidamans*, *Geobacillus gargensis*, *Geobacillus jurassicus*, *Geobacillus caldoproteolyticus*, *Geobacillus pallidus* ve *Geobacillus debilis*”tir (White ve ark., 1993; Manachini ve ark., 2000; Ahmad ve ark., 2000; Nazina ve ark., 2001, Fortina ve ark., 2001).

Henüz birçok termofilik bacilli (*Bacillus caldolyticus*, *Bacillus caldotenax*, *Bacillus coldovelox*), tanımlanmış türler arasına dahil edilmemiştir (Nazina ve ark., 2001).

Geobacillus genusunun üyeleri izo-dallanmış doymuş yağ asitleri (iso-C15:0, iso-C16:0, iso-C17:0) içermektedir. Bunlar temel yağ asitleri olup, 16s rRNA gen sekanslarında (%96.5-99.2) yüksek oranda intergenik benzerlik sergilemektedir (Nazina ve ark., 2001).

Termofilik *Bacillus* üyeleri biyoteknolojik uygulamalar için önemli bir potansiyel oluşturmaktadır. Bu bakterilerin önemi, amilaz, selüloz, glikozizomeraz, lipaz, proteaz, pullulanaz, ksilanaz ve DNA restriksiyon endonükleaz gibi termostabil enzimlerin kaynağı olduklarının ortaya çıkarılması ile daha da artmıştır (Rainey ve ark., 1994; Demirjian ve ark., 2001; Maugeri ve ark., 2001). Termal stabilite bu enzimlere, kimyasal denatürantların varlığında aktivite ve zorlu proses koşullarına karşı dayanıklılık kazandırmaktadır (Hough ve ark., 1999). Yüksek sıcaklık, viskoziteyi düşürerek organik bileşiklerin çözünürlüğünü ve bulunabilirliğini iyi yönde etkilemekte ve difüzyon katsayılarını yükseltmektedir. Bu olumlu özellikler endüstride çeşitli alanlarda termofilik enzimlerin önemini pekiştirmektedir (McMullan ve ark., 2004). Çizelge 2.14’te *Geobacillus*’lardan elde edilen çeşitli ürünler ve prosesler yer almaktadır.

Çizelge 2.14 *Geobacillus*'lara ait ürünler ve proseslere ait patentlerden (Amerika Birleşik Devletlerinde) bazıları (www.bgsc.org/Catalogs/Catpart3.pdf).

Ürün veya Proses	Patent Numarası
α -arabinofuranosidase	US05434071
Acetate kinase	US05610045
α -amylase	US05824532, US05849549
Arabino furanoside	US05491087
Sterilizasyon için biyolojik indikatör	US05073488, US05223401, US05252484, US05418167
BsrFI restriction endonuclease	US06066487
Catalase	US06022721
Cellobiose fermentasyonu	US06102690
DNA polymerase	US05747298, US05830714, US05834253, US05874282, US06013451, US06066483, US06100078, US06238905
Etanol üretimi	US05182199
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	US04331762
Nişasta sıvılaştırıcı	US05756714
Maleate dehydrogenase	US04331762
Neutral proteases	US06103512
Perillyl compounds	US05487988
Polynucleotide phosphorylase	US04331762
Prenyl diphosphate synthase	US06225096
Pyruvate kinase	US04331762
Riboflavin glucoside	US06190888
Superoxide dismutase	US05772996
Xylanase	US05434071
Xylosidase	US05489526

Geobacillus 'lardan termofilik enzimlerin yanı sıra ekzopolisakkarit üretimi gibi endüstriyel ürün üretimi konusunda çalışmalar devam etmektedir. Buna ek

olarak, *Geobacillus thermoleovorans*'ın iki suşunun büyük miktarda bakteriosin ürettiği tespit edilmiştir (Bustard ve ark., 2002). Çeşitli çevresel biyoteknolojik uygulamalar için *Geobacillus*'lar arasında hidrokarbonları metabolize eden türlerin olduğu belirlenmiştir (Bustard ve ark., 2002).

Çok yeni olmakla birlikte üzerinde çalışılan yeni bir konu da *Geobacillus*'ların herbisitleri metabolize edebilmesi üzerinedir. Tarımsal biyoteknolojide bu tür genler, potansiyel kaynak teşkil etmektedir (Bustard ve ark., 2002).

Bu genusa ait yürütülen ilginç çalışmalardan biri de belirli Gram negatif bakterilerde “quorum sensing”i tahrip edebilen *Geobacillus*'lar üzerinedir. Quorum sensing, virulens ekspresyon, koagülasyon, biyofilm formülasyonu, biyoluminesens gibi çeşitli biyolojik davranış ve fonksiyonların kontrolünü sağlamaktadır (McMullan ve ark., 2004).

2.5. Termofilik Mikroorganizmalara Ait Enzimlerin Biyoteknolojik Önemi ve Termostabil Enzimler

A. Enzimlerde Denatürasyon ve Degredasyon

Sıcaklık ile enzim inaktivasyonu uygun şeklin (enzimin kuarternal yapısının) çözülmesi (denatürasyon) ve kovalent bağların geri dönüşümsüz olarak koparılması (degredasyon) ile gerçekleşmektedir. Denatürasyonda proteinin yapısını stabilize eden non-kovalent güçlerin koparılması, proteinin şeklinin geri dönüşümlü olarak bozulmasına neden olmaktadır. Bunu genellikle geri dönüşümsüz olan bir agregasyon basamağı takip etmektedir. Yüksek sıcaklıklarda (>100°C) peptid bağlarının hidrolizi ve deaminasyon gibi geri dönüşümsüz prosesler önem kazanmaktadır (Sharp ve ark., 1992).

Degredasyondan sorumlu olan bazı reaksiyonlar polipeptid zincirden oluşan iskeletin esnekliğine ve aminoasitlerin sırasına bağlıdır. Yapılan çalışmalarda uygun koşullar altında bazı enzimlerin yarı ömrünün 125°C'de 10 dakikadan uzun olduğu saptanmıştır (Coolbear ve ark., 1992).

B. Enzim Stabilitesi

Canlıda enzim stabilitesini pek çok sayıda faktör etkileyebilir. Termofiliklerden izole edilen belli enzimler hücre dışı ekstraktlarda ya da saf halde *in vivo* olduğundan daha az aktivite göstermektedir, yüksek protein konsantrasyonu, substratlar, prostetik gruplar ve diğer gruplar gibi hücre içi ortamda bütünlük artmaktadır (Coolbear ve ark., 1992).

Aslında termofilik enzimler doğal olarak mezofilik olanlardan daha yüksek termal stabiliteye sahiptir ve bu stabilite dış faktörlerden ziyade kendi birincil yapılarından kaynaklanmaktadır. Nokta mutasyonları ve ilgili proteinlerin aminoasit dizisindeki farklılıklar üzerine yapılan çalışmalar bütün yapıdaki küçük bir değişikliğin termostabiliteyi yüksek oranda değiştirebileceğini göstermiştir. Proteinlerin stabilitesi için gerekli enerji genellikle yaklaşık olarak 30 kJmol^{-1} 'dir. Bu yüzden, stabilize edici proteinlerdeki çok küçük değişiklikler tüm stabilite üzerinde büyük etkileri olabilir. Tek bir küçük ilave interaksyon bile yaklaşık 10 kJmol^{-1} enerji sağlayabilir. Böylece, ilave birkaç tuz köprüsü, hidrofobik interaksyonlar veya hidrojen bağları farklı sıcaklık derecelerinde enzimin relatif stabilitesini arttırmak için gerekli olan stabilizasyon serbest enerjisini sağlar. 100°C 'yi aşan sıcaklıklarda hidrofobik bağlanmalar, protein yapı veya stabilitede birincil faktör değildir. Bu sıcaklıklarda artan sayıdaki internal tuz köprüleri temel stabilize edici faktördür (Coolbear ve ark., 1992).

Mezofilik enzimlerin endüstride kullanımının en büyük dezavantajının termostabilitelerinin olmaması nedeniyle çalışmalar bu enzimlerin sadece mezofilik enzimlerin protein ve genetik mühendisliği veya kimyasal anlamda stabilize edilmesi değil, aynı zamanda tamamen insan yapımı katalistlerin geliştirilmesi yönünde de devam etmektedir. Suni katalitik olarak stabilite için uygun dördüncü yapı ile aktif polipeptidlerin yapımındaki olasılıklar pek çok araştırmacı tarafından çalışılmıştır. Mezofilik enzimleri stabilize etmek için yönlendirilmiş mutasyon kullanımına yönelik çalışmalar, mutasyon için hedef bölgelerin oluşturulmasındaki zorluklar nedeni ile başarılı olamamıştır. Diğer taraftan, protein mühendisleri, aktif bölge aminoasitlerinde manipulasyonla enzimlerin spesifitesi üzerinde önemli başarılar elde etmiştir ve endüstriyel ihtiyacı karşılamak için doğal olarak termostabil enzimlerin aktif bölgelerinin

çalışılması daha verimli bir amaç olarak görülmektedir. Ekstrem termofiliklere ait enzimlerin stabilizasyonunu sağlayan faktörler, aynı zamanda, katotrofik ajanlar, iyonik kuvvet, organik solventler, deterjanlar ve hatta proteolizise karşı, muhtemelen konformasyonel sağlamlığın artışının bir avantajı olarak dayanıklılık kazandırmaktadır (Coolbear ve ark., 1992).

Enzimlerin Stabilitesini Etkileyen Faktörler:

Tersiyer Yapı

- a. Hidrojen Bağları
- b. Hidrofobik Bağlar
- c. İyonik interaksionlar
- d. Metallerin bağlanması
- e. Disülfid Köprüleri ile stabilize edilmektedir.

Yüksek Sıcaklıklarda Proteinlerin Stabilitesini Sağlayan Mekanizmalar

1. Yapıdaki tek bir aminoasitin değiştirilmesi ile: Örnek; *Escherichia coli*'nin Triptofan sentetaz enziminin termostabilitesi bir glutamatın metioninle yer değiştirmesi ile artmaktadır.
2. Büyüme sıcaklığı: Örnek; *Bacillus flavothermus*'da alanin dehidrogenazın ısıl stabilitesi büyüme sıcaklığına bağlı olarak artar.
3. Internal iyonik bağların artması yüksek sıcaklıklarda proteinlerin stabilitesinin artmasını sağlar.
4. Yüksek sıcaklıklarda sentezlenen enzimler birkaç saat için aktiftirler. Oysa termotoleransı yüksek olmayan türlerde termotoleransı oldukça yüksek olan enzimler bulunabilir. Örnek; *Bacillus licheniformis*'in maksimum büyüme sıcaklığı 55⁰C iken bu bakteriden izole edilen ve nişasta endüstrisinde kullanılan α -amilaz 90-95⁰C'de aktiftir.
5. Bazı enzimler substrat ya da efektör moleküllerle stabil hale getirilebilir. Örnek; *Bacillus stearothermophilus*'dan izole edilen glutamat sintetaz normal şartlarda 65⁰C'de inaktif iken, amonyak, glutamat ve ATP varlığında bu sıcaklık derecesinde aktif hale gelir.
6. Metaller genellikle yüksek sıcaklıklarda proteinleri stabilize eder ve pek çok durumda da aktivite için gereklidir.
7. Pek çok fungusda polihidrik alkoller, proteinlerin termostabilitesini artırır.
8. Polimerik materyallerle kovalent bağlanma ya da kimyasal ajanlarla protein yüzeyinin kimyasal modifikasyona uğratılması ile termostabilite sağlanabilir.

9. Düşük su aktivitesi

10. Yüksek substrat spesifitesi ve yüksek K_m değerlerine sahip olan termofilik bazı enzimler bu özellikleri ile mezofilik olanlardan ayrılırlar (Coolbear ve ark., 1992).

Termostabil enzimlerin aktivitesi mezofilik sıcaklıklarda genellikle düşüktür. Ancak sıcaklık artışı ile artar. Bir termostabil protein bir mezofilik proteinin düşük sıcaklık derecelerinde sahip olduğu aynı esneklik derecesine yüksek sıcaklıklarda sahip olabilir. Yüksek sıcaklıklarda termofilik protein termal dalgalanmaları karşılayabilmek için katı bir yapıya sahip olmalıdır. Ancak esneklik derecesi özellikle biyolojik aktivite gösterebilmek için konformasyonel değişikliklere ihtiyaç duyan proteinlerde önemlidir (Sharp ve ark., 1992). Çizelge 2.15'te endüstriyel termostabil enzimlerden bazıları üretildiği organizmalar ile birlikte yer almaktadır.

Çizelge 2.15 Endüstriyel termostabil enzimler ile termofiliklerden ve termofilik genlerin mezofilik konukçularda klonlandığı ticari enzimler (Kirk ve ark., 2002).

Endüstriyel Termostabil Mezofilik Enzimler			Termofillerden Üretilen Ticari Enzimler		Mezofilik Konukçularda Klonlanan Termofilik Enzimler(Genler)	
Termostabil Enzim	Mezofil Üretici	T _{opt.} °C	Termostabil Enzim	Termofil Üretici	Klonlanan Enzim	Termofilik Donör
α -Amilaz	<i>Bacillus</i>	95	Omalat dehidrogenaz	<i>T.thermophilus</i>	Termolisın	<i>B.stearotermophilus</i>
Glukoamilaz	<i>Aspergillus</i>	60	B-amilaz	<i>C.thermosulphuricum</i>	Asetil kuinaz	<i>B.stearotermophilus</i>
Pullulanaz	<i>Aerobacter</i>	60	α -amilaz	<i>B.stearotermophilus</i>	Alanine dehidrogenaz	<i>B.stearotermophilus</i>
Glukoizomeraz	<i>Actinoplanes</i>	60	DNA polimeraz	<i>P.furiosus</i>	Lösin dehidrogenaz	<i>B.stearotermophilus</i>
Pektinaz	<i>Aspergillus</i>	60		<i>P.furiosus</i>	DNA polimeraz	<i>T.aquaticus</i>
Alkalaz	<i>Bacillus</i>	60	Glutamat dehidrogenaz	<i>P.furiosus</i>	Endonükleaz	<i>T.thermophilus</i>
Lipaz	<i>Aspergillus</i>	60	Selülaz	<i>R.marinus</i>	Malat-dehidrogenaz	<i>T.flavus</i>
Asit proteaz	<i>Mucor</i>	50			B-glukanaz	<i>T.cellulyticium</i>
Laktaz	<i>Aspergillus</i>	50			B-glukosidaz	<i>C.saccharolium</i>
					Pullulanaz	<i>T.brockii</i>
					Lipaz	<i>B.stearotermophilus</i>

2.6 Protein Saflaştırma

Günümüzde ilaç ve gıda sanayinde ve bunlara bağlı diğer kollarda protein saflaştırılması son yıllardaki en popüler çalışma konularından biridir. Protein saflaştırılması beraberinde birçok spesifik problem getirmektedir (Otoliz, denatürasyon, aktivite kaybı gibi). Zaman ve giderler ideal bir saflaştırma şeması

oluşturmaya tam anlamı ile yetmemektedir. Çalışmadaki ana hedeflerden ilki, saflaştırılacak moleküle en uygun metotları seçerek ideal bir prosedür geliştirmektir. Bu konuda dikkate alınması gereken iki temel özellik vardır:

- Saflığın derecesi,
- Ürünün miktarı ve aktivitesi.

Çalışmada seçilecek metotlar proteinin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerine bağlıdır (Temizkan ve Arda, 2008).

Üretilen enzimin hücre içi veya hücre dışı olması izolasyon yönteminin seçimini belirlemektedir. Hücre içi enzimlerin izolasyonu için önce hücrenin parçalanması gerekmektedir. Enzim üretimi ve alt akım işlemlerine ait genel basamaklar Şekil 2.11’de verilmiştir.



Şekil 2.11 Enzim üretimi ve alt akım proseslerinin genel şeması (Panke ve ark., 2002).

2.6.1 Elektroforez

Belli bir elektrik yüküne sahip biyomoleküllerin elektriksel bir alanda “sahip oldukları elektrik yüküne bağlı olarak” anod veya katoda göç etmeleri prensibine **elektroforez** denir. Moleküllerin elektriksel alanda göç etmeleri moleküler ağırlık, moleküler konformasyon, ortamın pH’sı, kullanılan ayırma ortamının por çapı, sıcaklık, elektroforez zamanı, uygulanan akım şiddeti gibi çok farklı parametrelerden etkilenmektedir (Temizkan ve Arda, 2008).

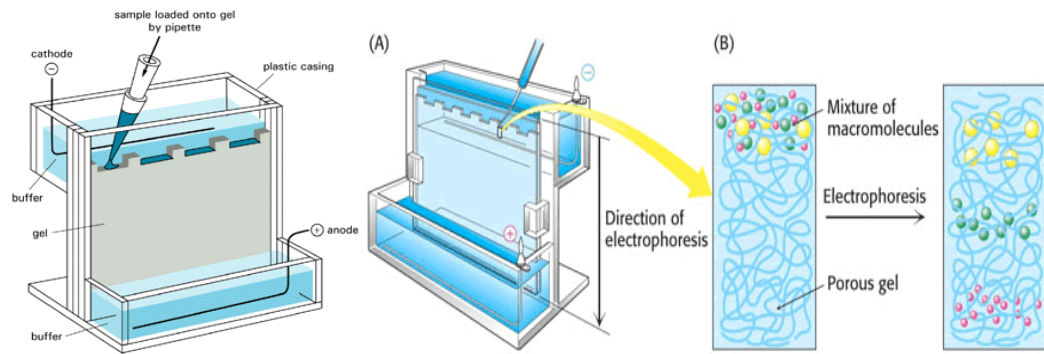
Biyolojik materyallerin separasyonu, determinasyonu, moleküler ağırlıklarının saptanması ve farklı özelliklerin ortaya konması amacıyla, SDS-PAGE (Sodium-dodecyl-sulphate polyacrylamide gel electrophoresis), IEF (Isoelectricfocusing), Agaroz jel elektroforezi (Agarose gel electrophoresis), kapiller jel elektroforezi (Capillary gel electrophoresis), Gradient-PAGE, Pulsed-Field jel elektroforezi gibi çok farklı elektroforez uygulamaları vardır (Temizkan ve Arda, 2008).

2.6.1.1 SDS-PAGE sistemi

Akrilamidin polimerizasyonuyla hazırlanan poliakrilamid jellerin elektroforetik ayrımlarda çeşitli üstünlükleri vardır. Bunlar: küçük ya da orta boydaki ($\approx 1 \times 10^6$ Da’na kadar) nükleik asitler ve proteinler için yüksek ayrıştırma gücüne sahiptir; oldukça büyük boyuttaki örnekler için uygundur; göç eden moleküllerle ayırma ortamı arasındaki etkileşim en düşük düzeydedir; ayırma ortamı fiziksel olarak oldukça kararlı ve dayanıklıdır (Dunbar, 1990; Bollag ve ark., 1996; Temizkan ve Arda, 2008).

Poliakrilamid jellerle yapılan elektroforez, örnekteki bileşenlerin daha iyi ayrılmasına yol açar, çünkü ayırım hem moleküler elekleme hem de elektroforetik harekete dayanır. PAGE’in, jel geçirgenlik kromatografisinden farkı, poliakrilamid jelde küçük moleküllerin büyük moleküllerden daha hızlı hareket etmeleridir (Dunbar, 1990). Poliakrilamid jeller akrilamid ve çapraz bağlayıcı N,N-metilen-bisakrilamid’in serbest radikal polimerizasyonu ile hazırlanmaktadır. Kimyasal polimerizasyon bir başlatıcı-katalizör sistemi (AMPS-TEMED) tarafından gerçekleştirilmektedir. Fotokimyasal polimerizasyon, UV ışını ve riboflavin kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Temizkan ve Arda, 2008).

SDS anyonik bir deterjandır ve proteinlere sıkıca bağlanarak denatüre eder ve molekülün negatif yükünü artırır. Protein molekülleri negatif yüklü olduğundan SDS-protein kompleksleri elektroforez ortamında anoda doğru göç eder. Ayrıca biyomoleküllerin çoğu negatif yüklü olduğundan elektroforez sırasında anoda doğru hareket ederler bu yüzden elektroforez genellikle bazik pH'da (8,0-8,3) gerçekleştirilir. Analiz edilecek örnek, bir izleme boyası (Brom-Phenol Blue) ile birlikte jelin üst kısmında oluşturulan kuyucuklara uygulanır ve sistemden elektrik akımı geçirilir. Örnekteki bileşenlerden daha hızlı hareket eden izleme boyası jelin bitimine ulaştığında akım kesilir, jel protein boyama karakterindeki bir boya (Coomassie-Brillant-Blue R 250, G-250, Silver Stain vb.) ile boyanır. Moleküler ağırlık hesaplamaları yapılacak uygulamalarda jeldeki kuyucuklardan birine marker protein uygulanır. Marker proteinin jelde göç ettiği mesafe, örnekler ile kıyaslanarak moleküler ağırlık Da veya kDa olarak saptanır (Temizkan ve Arda, 2008). Şekil 2.12'de SDS-PAGE'e ait temsili şema verilmiştir.

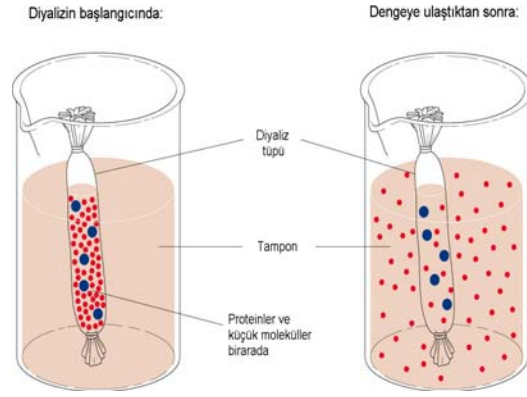


Şekil 2.12 SDS-PAGE sisteminin genel şeması

(http://www.fli-leibniz.de/~rake/Bioinformatics_WEB/gifs/sds_page1.gif).

2.6.2 Diyaliz

Biyolojik moleküllerin ayrımında kullanılan en eski yöntemlerden biri diyalizdir. Bu teknik seyreltik bir çözeltideki moleküllerin boyutlarına göre ayrılması temeline dayanır. Bu tekniğin en genel uygulaması değişik büyüklüklerdeki molekülleri içeren çözeltinin, makromolekülleri geçirmeyen fakat su vb. küçük moleküllerin geçişine izin veren, yarı geçirgen bir zardan yapılmış diyaliz tüpüne konulup düşük iyonik kuvvette uygun bir tampona (veya saf suya) daldırılması şeklinde (Şekil 2.13) gerçekleşir (Temizkan ve Arda, 2008).



Şekil 2.13 Diyaliz prosesi (Temizkan ve Arda, 2008).

Zarın porları genellikle molekül ağırlığı 10 000 Dalton'dan daha fazla olan makromoleküllerin geçişine izin vermeyecek kadar küçüktür. Bu nedenle, diyaliz tüpünün içindeki su (ve küçük iyonlar) dışarı çıkarken içeride ayırımı istenen molekülün konsantre bir çözeltisi kalır. Küçük moleküllerin çıkışı tüpün içi ile dıştaki tamponun konsantrasyonları eşit oluncaya kadar devam eder. Dengeye çalışılan hacme de bağlı olarak 4-6 saatte ulaşılır. Dengeye ulaştıktan sonra, eğer dışarıdaki solüsyon taze tamponla yenilenecek olursa, diyaliz devam etmesiyle tüpün içindeki küçük moleküllerin konsantrasyonundaki azalma devam eder. Böylece istenen ayırım tamamlanıncaya kadar diyaliz 1-2 gün sürdürülebilir (Temizkan ve Arda, 2008).

Diyaliz için kullanılan yarı geçirgen zarlar (diyaliz tüpleri) çeşitli materyallerden (kollodyon, selofan, selüloz gibi) yapılmış, 1-20 nm por çapına sahip malzemelerdir. Por çapı zardan geçecek moleküllerin büyüklüğünü belirler. NMWCO (nominal molecular weight cut off) değeri 15 000-20 000 Dalton arasında olan tipleri geniş çapta kullanılmaktadır. Çoğu tipinde, por büyüklüğünün her tarafta eşit olmasını sağlamak ve ağır metallere ileri gelen kontaminasyonu yok etmek için diyaliz tüplerinin bir ön işleminden geçirilerek hazırlanması gerekmektedir. Ancak böyle bir hazırlık gerektirmeyen, sadece tampon ile ıslatılarak kullanılan tipleri de mevcuttur (Temizkan ve Arda, 2008).

Diyaliz, iyonik olan veya olmayan, tüm küçük molekülleri yok etmek ve/veya çözeltileri konsantre etmek için basit, ucuz ve etkin bir yöntemdir. Genellikle solüsyonlardaki tuzları ve diğer küçük molekülleri ortamdan uzaklaştırmakta kullanılır. Ayrıca, biyolojik moleküllere zayıf şekilde bağlı olan

küçük iyonlar ve molekülleri (örneğin, NAD, FAD gibi kofaktörler veya metal iyonları) de bu yöntemle ortadan kaldırmak mümkündür (Temizkan ve Arda, 2008).

2.6.3 Ultrafiltrasyon

Ultrafiltrasyon, membran filtreler kullanılarak, yüksek basınç ve santrifügal kuvvet etkisi ile moleküllerin şekil, boyut ve/veya yüklerine göre ayrılmasını sağlamaktadır. Ayrımı yapılacak molekülleri içeren solüsyon dışarıdan oluşturulan bir kuvvetle yarı geçirgen bir zardan geçmeye zorlanır. Filtrelerden sıvı geçişini sağlamak için emme, basınç ya da santrifüj kuvveti gerekmektedir (Temizkan ve Arda, 2008).

Ultrafiltrasyon yöntemi de diyaliz prensibine göre çalışmaktadır. Aradaki temel fark, hidrostatik basınç veya santrifüj gibi transmembran kuvvetlerinin etkisiyle küçük moleküllerin diyalizle karşılaştırıldığında daha hızlı ve daha yüksek verimlilikte kıymetli/istenen kısımdan ayrılmasının sağlanmasıdır. Bu basınç sayesinde küçük moleküllerle birlikte bir miktar sıvı kaybedildiği için protein çok daha konsantre bir şekilde elde edilebilmektedir (Temizkan ve Arda, 2008). Şekil 2.14'te laboratuvar ölçeğinde kullanılan dikey tipteki bir çeşit ultrafiltrasyon sistemi yer almaktadır.



Şekil 2.14 Ultrafiltrasyon sistemi. a) Sartocan® Slice 200 Paslanmaz çelik tutucu, b) Sartoflow® Slice 200 Banco üstü Çapraz-akış sistemi, c) Sartocan® Slice 200 Düşük hacimli uygulamalar için çapraz-akışlı kaset filtre (www.sartorius-stedim.com.cn/).

Ultrafiltrasyonda kullanılan zarların por çapı genellikle 1-20 nm arasında değişmektedir. Kullanılacak zarın por çapı çalışılan molekülün geçmesine izin vermeyecek şekilde olmalıdır. Zarlara özgü bir değer olan NMWCO değeri zardan

geçemeyen bir molekülün ağırlığına eş değerdir. Ultrafiltrasyonda kullanılan membran filtrelerin NMWCO değerleri genelde 100-1.000.000 Dalton arasında değişmektedir (Temizkan ve Arda, 2008).

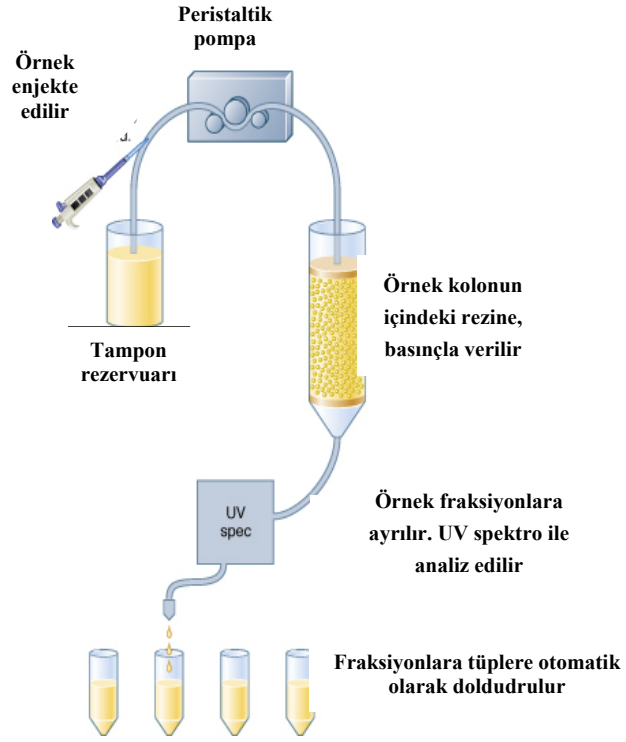
Bu filtrelerin genellikle iki tabakalı olanları tercih edilmektedir; birinci tabaka yüzeyde bulunan, ince (0,1-0,5 μm), selüloz asetat, naylon veya polivinilidinden yapılmış bir zar, ikinci tabaka kalın, inert bir destek tabanıdır. Bu tip filtreler, partiküllerin yüzeyde kalmasını sağlamaktadır (Temizkan ve Arda, 2008).

Ultrafiltrasyonun çalışma prensibinin, filtre tarafından partikül veya moleküllerin fiziksel yakalaması sonucu ayrılmalarına dayandığı kabul edilmektedir. Polikarbonat ve fiberglas filtrelerde ayırım temelde fiziksel boyuta dayanır. Diğer filtreler (selüloz nitrat, polivinildin florid gibi) porlardan geçemeyen partikülleri tutarken makromoleküllerin geçişini de adsorpsiyon yoluyla engellerler. Bu materyallerin, özellikle protein ve nükleik asitleri bağlama kapasiteleri vardır (Temizkan ve Arda, 2008).

Çeşitli saflaştırma aşamalarında elde edilen nükleik asit ve protein solüsyonları daha sonraki aşamalar için genellikle fazla seyreltiktir. Çözücünün yüksek sıcaklıkta uçurulması yoluyla konsantre edilemedikleri için, bu tip çözeltilerin hacimlerini azaltmakta daha nazik ve çok etkili bir yöntem olarak genellikle ultrafiltrasyon veya liyofilizasyondan yararlanılmaktadır (Temizkan ve Arda, 2008).

2.6.4 FPLC

Sıvı kromatografinin bir çeşidi olup, kompleks karışımlardan proteinleri ayırtmak veya saflaştırmak için kullanılan HPLC (high performance liquid chromatography)'ye benzerdir. FPLC sistemi, laboratuvar ölçeğinde proteinlerin ve diğer biyomoleküllerin kromatografik ayırımı için geliştirilmiş bir sistemdir. Bu sistemde, solvent hızı, solventlerin sabit akış hızının kontrolü için pompalarla kontrol edilmektedir. Solventler tüpün içinden dışarıdaki rezervuara akmaktadır. Tercih edilen ayırma bağı olarak çeşitli kolonlar kullanılmaktadır (Sheehan, 2003). Şekil 2.15'te FPLC sisteminin şematik görüntüsü verilmiştir.



Şekil 2.15 FPLC (Fast-Performance Liquid Chromatography)

(<http://www.gmi-inc.com/Products/PharmaciaFPLC.htm>).

FPLC genellikle biyokimya ve enzimolojide kullanılmaktadır. Bu sistem 1982’de Pharmacia tarafından geliştirilmiş ve halen pazarlanmaktadır. FPLC, HPLC’den maksimum 3-4 MPa basınçla kullanabilinen kolonları ile ayrılmaktadır. Bu nedenle eğer HPLC’de basınç sınırlanabilirse, tüm FPLC kolonları HPLC cihazında da kullanılabilir (Sheehan, 2003).

Standart bir FPLC cihazı, bir veya iki adet yüksek doğrulukta çalışan bir pompa, bir kontrol birimi, bir kolon, bir dedektör sistemi (UV spektrofotometre) ve bir fraksiyon toplayıcıdan oluşmaktadır (Şekil 2.15 ve 2.16) (Sheehan, 2003; <http://www.hhmi.umbc.edu/toolkit/aktadesign.pdf>). Pompalar tampon veya örneği bir tüp (ince kılcal boru) içerisinde kolonun içine iletmektedir. Kolondan çıkan fraksiyonlar, örneğin protein konsantrasyonunun belirlenmesi için UV spektrofotometreye iletilerek ayrılmaları sağlanmaktadır. UV spektrofotometre 280 nm’de ölçüm yaparak, proteinlerin deteksiyonunu gerçekleştirir. Şekil 2.16’da AKTA Amersham Bioscience firmasına ait FPLC cihazı ve kısımları yer almaktadır.



Şekil 2.16 AKTA Amersham Bioscience firmasına ait FPLC cihazı ve kısımları

(<http://www.hhmi.umbc.edu/toolkit/aktadesign.pdf>).

2.7 Glikoproteinler

Glikojen ve glukoz dışındaki karbonhidratlar, vücutta glikolipid ve glikoproteinlerin bir parçası olarak bulunmaktadır. Vücutta iki tip, karbonhidrat içeren protein vardır: Glikoproteinler ve proteoglikanlar. Glikoproteinler, kısa oligosakkarit (glikan) zincirlerine (1-20 şeker) sahiptir. Bu glikanlar yüksek derecede dallanmıştır ve tekrarlayan diziler içermemektedir. Proteoglikanlar ise, uzun, düz, tekrarlayan birimlerden oluşmuş disakkaritlerin bulunduğu dallanmamış glikanlar içermektedir. Glikoproteinler bakteriden insana kadar canlıların çoğunda bulunmaktadır. Farklı işlevlere sahip birçok protein, glikoprotein yapısındadır, bunların karbonhidrat içeriği %1-85 arasındadır (Elbein, 1999).

Çizelge 2.16 Glikoproteinlerde bulunan başlıca karbonhidratlar (Elbein, 1999).

Karbonhidrat	Tipi	Kısaltma	Nükleotid şeker	Bulunduğu yer
Galaktoz	Heksoz	Gal	UDPGal	N-bağlı glikoproteinlerde bulunur.
Glukoz	Heksoz	Glc	UDPGlc	N-bağlı glikoproteinlerin sentezi sırasında yer alır, oluşumunu tamamlamış glikoproteinde bulunmaz
Mannoz	Heksoz	Man	GDPMan	N-bağlı glikoproteinlerde sıkça bulunur
N-Asetil Nöraminik asit	Sialik asit	NeuAc	CMP-NeuAc	Hem N hem de O bağı glikoproteinin ucundaki karbohidrat
Fukoz	Deoksiheksoz	Fuc	GDP-Fuc	Hem N hem de O bağı glikoproteinde dışta yer alır
N-Asetil galaktozamin	Aminoheksoz	GalNAc	UDP-GalNAc	Hem N hem de O bağı glikoproteinde bulunur
N-Asetil glukozamin	Aminoheksoz	GlcNAc	UDP-GlcNAc	N bağı glikoproteinlerde Asn üzerinden bağlanır
Ksiloz	Pentoz	Xyl	UDP-Xyl	Ser'in OH' a bağlıdır

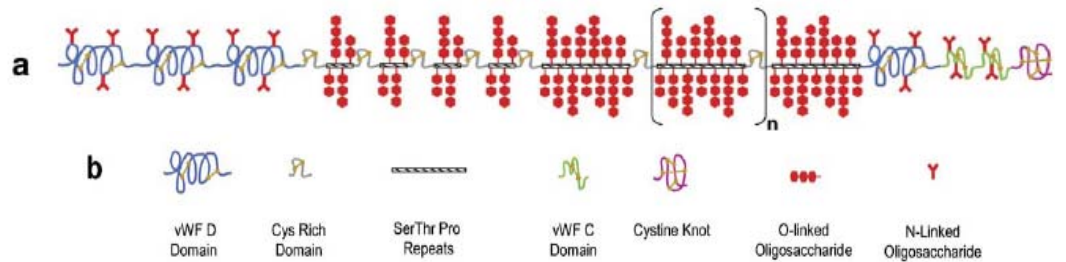
Glikoproteinler, küçük fakat yapısal olarak kompleks olan kovalen bağlı oligosakkaritler içerirler. Birçok plazma membran proteini hormonlar için reseptör olarak görev yapan veya dolaşımdaki diğer proteinler ve hücreler arası etkileşimlere aracılık eden proteinler glikoprotein yapısındadır. Endoplazmik retikulumun ve Golgi aygıtının proteinlerinin çoğu ve hücreler tarafından salgılanan serum ve mukus proteinleri de glikoprotein yapısındadır (Elbein, 1999).

Glikoproteinler polipeptid zincirleri ile oligosakkaritler arasındaki bağa göre sınıflandırılmaktadır: O-glikozid bağlı ve N-glikozid bağlı. O-glikozid bağlı oligosakkaritler müsinlerde bulunur. Sialik asit (N-Asetil nöraminik asit), galaktoz ve GalNAc (çoğu zaman GlcNAc ve fukoz) içeren kısa dallanmış yapılardır (Elbein, 1999).

2.7.1 Müsinler

Müsinler, moleküler ağırlıkları 0,5 ile 20MDa aralığında değişen, büyük, ekstrasellüler glikoproteinlerdir. Hem membrana bağlı müsinler, hem de salgılanan müsinler bir takım ortak özelliklere sahiptirler. Her iki müsin tipi de, yaklaşık %80 oranında karbonhidrat içeriğine sahip glikozillenmiş yapıdadırlar. Bu içerikteki karbonhidratların başında N-asetilgalaktosamin, N-asetilglukozamin, fukoz, galaktoz ve sialik asit (N-asetilnöramik asit) ve de iz miktarda mannoz ve sülfat içerir. Oligosakkarit zincirleri 5-15 monomerden meydana gelir. Bu zincirler dengeli bir dağılım göstererek, protein çekirdeğe O-glikozidik bağlarla serin ve tirioninin hidroksil yan zincirlerinden bağlanırlar. Bu yapı genelde “şişe fırçası” adıyla anılan protein çekirdek konfigürasyonudur.

Müsinleri büyük moleküler ağırlıkları, çözünürlükleri ve yüksek seviyedeki glikozilasyon dereceleriyle sınıflandırmak güçtür.



Şekil 2.17 a) Domuz gastrik müsinine (PGM) ait şematik görüntü, b) şemada yer alan şekillere ait açıklamalar (Bansil ve ark., 2006).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Çalışmada kullanılan mezofilik *Bacillus* izolatları ile endospor içeren termofilik izolatlar

Çalışmada “Biyomühendislik Bölümü Kültür Koleksiyonu”nda yer alan çeşitli kaynaklardan izole edilmiş 100 adet mezofilik *Bacillus* izolatı, 60 adet endospor içeren termofilik bakteri izolatı ve *Bacillus cereus*, *B. subtilis* türleri ile çeşitli mezofilik ve termofilik tip kültürler kullanılmıştır. *Bacillus licheniformis* NRRL–1001, *B. circulans* NRRL B–381, *B. circulans* NRRL B–378, *Paenibacillus illinoisensis* NRRL NRS–1356, *Geobacillus stercophilus* NRRL–1102 ARS Kültür Koleksiyonu’ndan (NRRL Collection) resmi yazışmalar ile temin edilmiştir. Çalışmamızda kullanılan tüm izolatlar ve kodları aşağıdaki Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1 α -L-Fukosidaz enzim üretkenliği taranan mezofilik ve termofilik izolatlar

Mezofilik <i>Bacillus</i> izolatları			
Sıra No	İzolat Kodu	Sıra No	İzolat Kodu
1	<i>Bacillus</i> Ege B.1.1.ka	51	<i>Bacillus</i> Ege B. 42.6
2	<i>Bacillus</i> Ege B.1.d.2	52	<i>Bacillus</i> Ege B. 24.1i
3	<i>Bacillus</i> Ege B.1.d.3	53	<i>Bacillus</i> Ege B. 24.2i
4	<i>Bacillus</i> Ege B.1.d.1	54	<i>Bacillus</i> Ege B. 24.3i
5	<i>Bacillus</i> Ege B.1.d.4	55	<i>Bacillus</i> Ege B. 24.4i
6	<i>Bacillus</i> Ege B.1.d.5	56	<i>Bacillus</i> Ege B.i.1.1
7	<i>Bacillus</i> Ege B.1.d.6	57	<i>Bacillus</i> Ege B.i.1.2
8	<i>Bacillus</i> Ege B.1.d.7	58	<i>Bacillus</i> Ege B.i.1.3
9	<i>Bacillus</i> Ege B.1.d.8	59	<i>Bacillus</i> Ege B.i.1.4
10	<i>Bacillus</i> Ege B.1.d.9	60	<i>Bacillus</i> Ege B.i.1.5
11	<i>Bacillus</i> Ege B.1.2.ka	61	<i>Bacillus</i> Ege B.i.1.6
12	<i>Bacillus</i> Ege B.1.3.ka	62	<i>Bacillus</i> Ege B.19.1i
13	<i>Bacillus</i> Ege B.1.4.ka	63	<i>Bacillus</i> Ege B.19.2i
14	<i>Bacillus</i> Ege B.1.5.ka	64	<i>Bacillus</i> Ege B.19.3i
15	<i>Bacillus</i> Ege B.1.6.ka	65	<i>Bacillus</i> Ege B.19.4i
16	<i>Bacillus</i> Ege B.1.7.ka	66	<i>Bacillus</i> Ege B.19.5i
17	<i>Bacillus</i> Ege B.1.d.10	67	<i>Bacillus</i> Ege B.19.6i
18	<i>Bacillus</i> Ege B.1.d.11	68	<i>Bacillus</i> Ege B. 1.1.P
19	<i>Bacillus</i> Ege B.1.9.2i	69	<i>Bacillus</i> Ege B. 1.2.P
20	<i>Bacillus</i> Ege B.1.9.3	70	<i>Bacillus</i> Ege B. 1.3.P
21	<i>Bacillus</i> Ege B.2.1.1i	71	<i>Bacillus</i> Ege B. 1.4.P
22	<i>Bacillus</i> Ege B.2.1.3i	72	<i>Bacillus</i> Ege B. 1.5.P
23	<i>Bacillus</i> Ege B.2.d.1	73	<i>Bacillus</i> Ege B. 1.6.P
24	<i>Bacillus</i> Ege B.2.d.8	74	<i>Bacillus</i> Ege B. 1.7.P
25	<i>Bacillus</i> Ege B.2.d.9	75	<i>Bacillus</i> Ege B. 1.8.P

Çizelge 3.1 (devam)

Mezofilik <i>Bacillus</i> izolatları			
Sıra No	İzolat Kodu	Sıra No	İzolat Kodu
26	<i>Bacillus</i> Ege B.2.d.10	76	<i>Bacillus</i> Ege B. 8.1m
27	<i>Bacillus</i> Ege B.12.2i	77	<i>Bacillus</i> Ege B. 2.5m
28	<i>Bacillus</i> Ege B.13.5i	78	<i>Bacillus</i> Ege B. 5.5m
29	<i>Bacillus</i> Ege B. 13.7i	79	<i>Bacillus</i> Ege B. 4.2i
30	<i>Bacillus</i> Ege B. 27.4	80	<i>Bacillus</i> Ege B. 14.7ix
31	<i>Bacillus</i> Ege B.4.2i	81	<i>Bacillus</i> Ege B. 1.19
32	<i>Bacillus</i> Ege B.11.4	82	<i>Bacillus</i> Ege B. 3.5m
33	<i>Bacillus</i> Ege B.34.1	83	<i>Bacillus</i> Ege B. 44.1
34	<i>Bacillus</i> Ege B.9.2	84	<i>Bacillus</i> Ege B. 14.7i
35	<i>Bacillus</i> Ege B.10.2	85	<i>Bacillus</i> Ege B. 6.1m
36	<i>Bacillus</i> Ege B.10.3	86	<i>Bacillus</i> Ege B. 10.4i
37	<i>Bacillus</i> Ege B.12.1	87	<i>Bacillus</i> Ege B. 1.23
38	<i>Bacillus</i> Ege B.12.2	88	<i>Bacillus</i> Ege B. 4.1i
39	<i>Bacillus</i> Ege B.23.3	89	<i>Bacillus</i> Ege B. 28.2
40	<i>Bacillus</i> Ege B. 38.1	90	<i>Bacillus</i> Ege B. 36.1
41	<i>Bacillus</i> Ege B. 38.2	91	<i>Bacillus</i> Ege B. 14.1i
42	<i>Bacillus</i> Ege B. 38.3	92	<i>Bacillus</i> Ege B. 5.2i
43	<i>Bacillus</i> Ege B. 38.4	93	<i>Bacillus</i> Ege B. 36.5
44	<i>Bacillus</i> Ege B. 38.5	94	<i>Bacillus</i> Ege B. 19.3
45	<i>Bacillus</i> Ege B. 25.1	95	<i>Bacillus</i> Ege B.1.1.z
46	<i>Bacillus</i> Ege B. 42.1	96	<i>Bacillus</i> Ege B. 2.1.f
47	<i>Bacillus</i> Ege B. 42.2	97	<i>Bacillus</i> Ege B.2.2.f
48	<i>Bacillus</i> Ege B. 42.3	98	<i>Bacillus</i> Ege B.2.3.f
49	<i>Bacillus</i> Ege B. 42.4	99	<i>Bacillus</i> Ege B.2.4.f
50	<i>Bacillus</i> Ege B. 42.5	100	<i>Bacillus</i> Ege B.3.1.f
Endospor içeren termofilik izolatlar			
Sıra No	İzolat Kodu	Sıra No	İzolat Kodu
1	İzolat-2	31	İzolat-16
2	İzolat-62	32	İzolat-21
3	İzolat-63	33	İzolat-22
4	İzolat-8	34	İzolat-4
5	İzolat-40	35	İzolat-15
6	İzolat-44	36	İzolat-20
7	İzolat-68	37	İzolat-57
8	İzolat-19	38	İzolat-61
9	İzolat-27	39	İzolat-1
10	İzolat-38	40	İzolat-10
11	İzolat-46	41	İzolat-11
12	İzolat-59	42	İzolat-29
13	İzolat-13	43	İzolat-43
14	İzolat-24	44	İzolat-14
15	İzolat-36	45	İzolat-28
16	İzolat-41	46	İzolat-32
17	İzolat-42	47	İzolat-47
18	İzolat-37	48	İzolat-53
19	İzolat-45	49	İzolat-18
20	İzolat-48	50	İzolat-25
21	İzolat-52	51	İzolat-34
22	İzolat-33	52	İzolat-35
23	İzolat-49	53	İzolat-54
24	İzolat-51	54	İzolat-56
25	İzolat-55	55	İzolat-12
26	İzolat-9	56	İzolat-17
27	İzolat-60	57	İzolat-23
28	İzolat-5	58	İzolat-26
29	İzolat-6	59	İzolat-30
30	İzolat-7	60	İzolat-39

3.1.2 Kullanılan besiyerleri, çözeltiler ve kimyasallar

Kullanılan tüm besiyerleri 121⁰C’de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.1.2.1 Nutrient Agar ve Nutrient Broth

Bacillus izolatlarının üretiminde ve saklanması ticari olarak hazır halde satılan Nutrient Agar (*Fluka*, N0394) ve Nutrient Broth (*Fluka*, N7519) ortamları kullanılmıştır.

Bileşenin Adı	Miktarı
Nutrient Agar	20,0 g
Distile Su	1000 ml
Bileşenin Adı	Miktarı
Nutrient Broth	8,0 g
Distile Su	1000 ml

3.1.2.2 α -L-Fukosidaz üretiminde kullanılan ortam

Enzim aktivitesinin taranması aşamasında aşağıda belirtilen oranlarda hazırlanan kompleks besiyeri 121⁰C’de, 20 dakika süre ile sterilize edilmiştir (Yamamoto ve ark., 1986; Tsuji ve ark., 1990; Tsuji ve ark., 1990a).

Bileşenin Adı	Miktarı
Pepton	5 g
Maya Ekstraktı	5 g
Sodyum Klorür	5 g
Porcine Gastric Mucine (PGM)	5 g
Distile Su	1000 ml

1 N NaOH ile pH 6,5’e ayarlanmıştır.

3.1.2.3 α -L-Fukosidaz enzim aktivite tayininde kullanılan bileşenler

Enzim aktivite tayininde kullanılan bileşenler, Yano ve ark., 1985; Yamamoto ve ark., 1986; Tsuji ve ark., 1990; Tsuji ve ark., 1990a; Sano ve ark., 1992; Kurimura ve ark., 1995; Eneyskaya ve ark., 2001; Miura ve ark., 2005’e göre hazırlanmıştır.

➤ **10 mM PNPF (*p*-nitrofenil α -L-fukopranozid)**

Bileşenin Adı	Miktarı
PNPF	0,02853 g
Distile Su	10 ml

Ortalama olarak her bir set deneme için gerekli miktar, 10 ml olarak belirlenmiştir. Taze hazırlanarak kullanılmıştır.

➤ **100 mM Sodyum Sitrat Tamponu, pH 6,5**

Bileşenin Adı	Miktarı
Sodium citrate tribasic dihydrate	2,941 g
Distile Su	100 ml

1 M HCl ile pH 6,5'e ayarlanmıştır.

Taze hazırlanarak kullanılmıştır.

➤ **200 mM Borik Asit Solüsyonu, pH 9,8**

Bileşenin Adı	Miktarı
Borik Asit	1,2366 g
Distile Su	100 ml

1 N NaOH ile pH 9,8'e ayarlanmıştır.

Taze hazırlanarak kullanılmıştır.

3.1.2.4 Gram's boyamada kullanılan çözeltiler

Gram's boyamada kullanılan solüsyonlar Atlas ve ark., (1995)'e göre hazırlanmıştır.

➤ **Kristal Viyoleto Solüsyonu**

Bileşenin Adı	Miktarı	
Kristal Viyoleto (%90 boya içeren)	2 g	} A Solüsyonu
Etanol (%95 v/v)	20 ml	
Amonyum okzalit	0,8 g	} B Solüsyonu
Distile Su	80 ml	

Kullanılan kristal violet solüsyonu; Ayrı ayrı hazırlanan A ve B solüsyonları birleştirilip, iyice karıştırılıp ve filtre edilerek hazırlanmıştır (Atlas ve ark., 1995).

➤ Gram's İyodür Solüsyonu

Bileşenin Adı	Miktarı (300 ml'de)
Potasyum iyodür	2 g
Iyot	1 g

Kullanılan Gram's iyodür solüsyonu; potasyum iyodür ve iyotun bir kap içerisinde iyice ezilerek karıştırılması ve yavaş yavaş su eklenmesi ile hazırlanmıştır. Koyu renk şişelerde muhafaza edilerek kullanılmıştır (Atlas ve ark., 1995).

➤ Safranin Solüsyonu

Bileşenin Adı	Miktarı
Safranin O	0,25 g
Etanol (%95 v/v)	10 ml
Deiyonize Su	100 ml

Safranin 10 ml etanol içerisinde iyice çözülmüş ve üzerine 100 ml distile su eklenmiştir, iyice karıştırılarak birkaç gün dinlenmesi sağlanmıştır. Kullanılmadan önce filtreden geçirilerek boyama için hazır hale getirilmiştir (Atlas ve ark., 1995).

3.1.2.5 Protein tayininde kullanılan çözeltiler

Ticari olarak hazır halde satılan Bradford Reagent (Sigma, B6916) kullanılmıştır. İçeriğinde Coomassie blue, Etanol (%95 v/v), H₃PO₄ (%85) ve distile su mevcuttur (Bradford, 1976).

3.1.2.6 Amonyum sülfat ile protein çöktürmede kullanılan bileşenler

Moleküler biyoloji çalışmalarına uygun olarak üretilmiş, yüksek saflıkta katı amonyum sülfat (Sigma, A4418) kullanılmıştır.

3.1.2.7 Ultrafiltrasyon basamağında kullanılan çözeltiler

Ultrafiltrasyon membranının temizliği için 65⁰C'de 0,5M ve 1M NaOH çözeltileri kullanılmıştır.

Bileşenin Adı	Miktarı	
NaOH	10 g	} 0,5 M
Distile Su	500 ml	
NaOH	10 g	} 1 M
Distile Su	250 ml	

3.1.2.8 Diyaliz basamağında kullanılan çözeltiler

➤ 10 mM Potasyum fosfat tamponu, pH 7,0

Bileşenin Adı	Miktarı	
K ₂ HPO ₄	6,9672 g	} A Solüsyonu
Distile Su	40 ml	
KH ₂ PO ₄	2,7218 g	} B Solüsyonu
Distile Su	20 ml	

pH 7,0 için, A solüsyonundan 30,75 ml, B solüsyonundan 19,25 ml karıştırılarak hacim 450 ml distile su ile 500 ml'ye tamamlanmıştır.

Örneklerin diyalizi için Sigma- D9527, NMWCO 12 000 Dalton olan, 43 mm genişliğe sahip, dikişsiz, ön işlem gerektirmeyen selülozdan yapılmış diyaliz membranı kullanılmıştır.

3.1.2.9 SDS-PAGE'de kullanılan çözeltiler

➤ Solüsyon-A: (Akrilamid Stok Solüsyonu)

%30 w/v akrilamid ve %0,8 w/v bisakrilamid (Dunbar, 1990; Bollag ve ark., 1996).

Bileşenin Adı	Miktarı
Akrilamid	29,2 g
Bisakrilamid	0,8 g
Distile Su	100 ml

Distile su ilave edildikten sonra akrilamid tamamen çözününceye kadar magnetik karıştırıcıda karıştırılır. Çözelti hazırlanırken çeker ocakta çalışmak ve

akrilamid bulunan şişenin ağzının parafilm ile kapalı olmasına dikkat etmek gerekir. Çözelti +4⁰C’de aylarca saklanabilir. Polimerize olmamış akrilamid deriyi irrite edici ve nörotoksik özelliğindedir. Daima eldivenle çalışmak gerekir.

- **Solüsyon-B (4X Separating Jel Tamponu- pH 8,8)** (Dunbar, 1990; Bollag ve ark.,1996).

Bileşenin Adı	Miktarı
----------------------	----------------

Tris (Trisma Base) (1,5 M)	18,15 g
----------------------------	---------

3 N HCl ile pH 8,8’e ayarlanır.

Distile Su ile hacim 100 ml’ye tamamlanır.

Çözelti +4 °C’de aylarca saklanabilir.

- **Solüsyon-C (4X Stacking Jel Tamponu- pH 6,8)** (Dunbar, 1990; Bollag ve ark., 1996).

Bileşenin Adı	Miktarı
----------------------	----------------

Tris (Trisma Base)	6 g
--------------------	-----

5 N HCl ile pH 6,8’ e ayarlanır.

Distile Su ile hacim 100 ml’ ye tamamlanır.

Çözelti +4 °C’de aylarca saklanabilir.

- **AMPS (%10 Amonyumpersulfat)**

Polimerizasyonu başlatıcı olarak kullanılmıştır (Dunbar, 1990; Bollag ve ark., 1996).

Bileşenin Adı	Miktarı
----------------------	----------------

Amonyum persülfat	0,5 g
-------------------	-------

Distile Su	5 ml
------------	------

Çözelti 1 ml hacimlere bölünerek, - 20 °C’ de aylarca saklanabilir.

- **SDS (%10 Sodyumdodesil sülfat)** (Dunbar, 1990; Bollag ve ark., 1996).

Bileşenin Adı	Miktarı
----------------------	----------------

SDS	10 g
-----	------

Distile Su	100 ml
------------	--------

- **Elektroforez Tamponu (10X Tank Buffer- pH 8,3)** (Dunbar 1990; Bollag ve ark., 1996).

Sigma, T7777 ticari olarak satılan hazır tampon (10X), 1/10 oranında seyreltilerek kullanılmıştır. İçerisinde aşağıda yer alan bileşenler, belirtilen miktarlarda mevcuttur.

Bileşenin Adı	Miktarı
Tris (Trisma Base), 25 mM	30 g
Glycine, 192 mM	144 g
SDS (%0,1)	10 g
Distile Su	1000 ml

pH=8,3

Bu çözelti oda sıcaklığında stabil değildir.

- **Örnek Tamponu (2X Sample Buffer- pH 6,8)** (Dunbar 1990; Bollag ve ark., 1996).

Bileşenin Adı	Miktarı
Tris (Trisma Base) (0,125 M)	2,5 ml
SDS (%4)	4 ml
Gliserol (%20)	2 ml
2-merkaptoetanol	1 ml
Bromfenol mavisi	0,02 g

Distile su ile 10 ml' ye tamamlanmıştır. *Kullanılacak hacimlere bölünerek, - 20 °C'de aylarca saklanabilir.*

+4 °C'de birkaç hafta, -20 °C'de birkaç ay stabildir.

- **TEMED (N, N, N', N'-tetramethylene-ethylenediamine)**

TEMED (Sigma, T9024) polimerizasyonun gerçekleşmesi için katalizör olarak kullanılmıştır.

- **SDS-PAGE Boyama Solüsyonu (Coomassie Gel Stain, Coomassie Brilliant Blue-CBB R-250)**

Elektroforezden sonra protein fragmentlerinin (bantlarının) görünür hale gelmesini sağlamak için kullanılmıştır (Dunbar 1990; Bollag ve ark., 1996).

Bileşenin Adı	Miktarı
Coomassie Blue R-250	1 g
Methanol	500 mL
Glasiyel (Asetik) Asit	100 mL
Distile Su	450 mL

Boya metanolde iyice çözüldükten sonra asetik asit ve su ilave edilmiştir. Solüsyonu hazırlandıktan sonra filtre edilerek, renkli, ağzı kapaklı şişede saklanmalıdır.

- **Boyayı Geri Alma (Destaining) Solüsyonu** (Dunbar 1990; Bollag ve ark., 1996).

Bileşenin Adı	Miktarı
Methanol	125 ml
Glasiyel (Asetik) Asit	175 ml
Distile Su	2200 ml

Oda sıcaklığında 1 ay saklanabilir.

- **İstenilen Konsantrasyonda (% X) Ayırıcı Jelin Hazırlanması** (Bollag ve ark., 1996).

Bileşenin Adı	Miktarı
Solüsyon-A	X/3 mL
Solüsyon-B	2,5 mL
Distile Su	7,5-x/3) mL
%10 Amonyum Persülfat	50 µL
TEMED	5 µL (eğer x<%8 →10 µL)

Total hacim 10 mL

Elektroforezde moleküler ağırlık tayini için, Sigma C4861-1VL Color Burst Electrophoresis Marker kullanılmıştır.

3.1.2.10 Jel filtrasyon kromatografi (FPLC)'de kullanılan çözeltiler

- **Kolon Şartlandırma ve Dengeleme Tamponu**

Bileşenin Adı	Miktarı
Sodyum fosfat	8,766 g
NaCl	5,999 g
Distile Su	1000 ml

1 N NaOH ile pH 7,2'ye ayarlanmıştır.

- **10 mM Potasyum Fosfat Tamponu (pH 7,0)**

Diyaliz basamağı için hazırlanan çözelti ile aynı şekilde hazırlanmıştır.

Kromatografi kolonunun temizliği için 0,2 M NaOH çözeltisi kullanılmıştır.

Bileşenin Adı	Miktarı	
NaOH	4 g	} 0,2 M
Distile Su	500 ml	

➤ % 20'lik Etanol Çözeltisi

Kolonun kurumaması, kullanılmadığı süre zarfında zarar görmemesi için %20' lik Etanol çözeltisi kullanılmıştır.

Tüm çözeltiler 0,22 µ por çaplı Sartorius filtrelerden geçirilerek safsızlıklarından arındırılmış ardından de-gas işlemi için sonikatörde 15 dakika süre ile bekletilmiştir.

3.1.3 Kullanılan cihazlar

3.1.3.1 Hassas terazi

Mettler toledo AL204 hassas terazi, kullanılan besiyeri ve karışımların hazırlanmasında kullanılmıştır.

3.1.3.2 pH metre

İnoLab *WTW* pH metre hazırlanan besiyeri ve diğer karışımların pH değerlerinin kontrol edilerek ayarlanması amacı ile kullanılmıştır.

3.1.3.3 Hot plate ve manyetik karıştırıcı

Heidolph MR 3001 ısıtıcılı mantetik karıştırıcı, kullanılan besiyeri ve diğer karışımların istenilen koşullarda ve istenilen özelliklerde olması için homojenizasyonun sağlanmasında kullanılmıştır.

3.1.3.4 Otoklav

Hirayama Hiclave HVE-50 marka ve model numaralı otoklav gerekli ortamların hazırlanmasında sterilizasyonun sağlanması amacı ile ayrıca işlemler sonucunda ortaya çıkan mikrobiyolojik olarak bulaşık haldeki materyalin tekrar kullanılabilir hale getirilmesi, tüm mikroorganizmaların öldürülmesi amacı ile kullanılmıştır.

3.1.3.5 İnkübatör

Nüve ES 110 ve Binder marka inkübatörler katı ortamda 37°C ve 70°C'de kültüvasyonlar için kullanılmıştır.

3.1.3.6 Çalkalamalı inkübatör

Infors Multitron marka çalkalamalı inkübatörler 30⁰C ve 65⁰C'de sıvı kültürde hücrelerin gelişiminin sağlanması amacı ile kullanılmıştır.

3.1.3.7 Mikroskop

Olympus marka CX31RTSF model numaralı dijital fotoğraf makinası takılabilen tri-oküler mikroskop, mikroskobik incelemelerde kullanılmıştır.

3.1.3.8 Santrifüj

Sigma 4K15 marka ve model numaralı santrifüj 6x250 ml'lik 121256 kod numaralı rotor ile birlikte hücre hasatı için +4 ⁰C'de kullanılmıştır.

3.1.3.9 Su banyosu

Memmert Marka su banyosu 37⁰C ve 65⁰C'de α -L-fukosidaz enzim aktivite tayininde ve 100⁰C'de SDS-PAGE için örneklerin denaturasyonu amacıyla kullanılmıştır.

3.1.3.10 Spektrofotometre

Amersham Biosciences marka Ultrospec 1100 pro (UV/Visible) model numaralı spektrofotometre α -L-fukosidaz enzim aktivitesi ve protein tayininde kullanılmıştır.

3.1.3.11 Ultrafiltrasyon sistemi

Ultrafiltrasyon amacıyla, Sartorius 17525-01 Ultrafiltrasyon cihazı, Sartorius Sartocon Slice 200 (Polyethersulfone) Ultrafiltrasyon membranı (NMWCO 30 000 Dalton) ile Easy-Load Masterflex Model 7518-00 peristaltik pompa ile birlikte kullanılmıştır.

3.1.3.12 FPLC

Amersham Pharmacia Biotech AKTA FPLC 18-1140-45 cihazı, Amersham 17-1195-01 HiPrep 26/60 Sephacryl S200 HR Jel Filtrasyonu kolonu ile birlikte kullanılmıştır. Jel filtrasyon kolonundan örneğin geçirilmesi sırasında, dışarıdan bir ceketle +4⁰C’de su geçirilmesini sağlayan sirkülatör kullanılmıştır.

3.1.3.13 SDS-PAGE sistemi

SDS-PAGE amacıyla, Sigma Aldrich Techware Dikey Mini Jel Elektroforez, Model OSP-300 Lightning Volt Power Supply, Sigma Comb 1,5mm x 12wells C-5300 taraklar kullanılmıştır.

3.1.3.14 Viskozimetre

Brookfield LVDV-E 230 viskozimetre, saflaştırma basamaklarının tümünde elde edilen örneklerin viskozitelerinin tayininde kullanılmıştır.

3.2 Metot

3.2.1 Bazı mezofilik *Bacillus* izolatları ile endospor içeren termofilik izolatlarda α -L-fukosidaz enziminin (E.C.3.2.1.51) taranması ve enzim aktivite tayini

3.2.1.1 Kültürlerin aktivasyonu

“Biyomühendislik Bölümü Kültür Koleksiyonu”nda -20⁰C’de liyofilize halde muhafaza edilen 100 adet mezofilik *Bacillus* izolatı ve 60 adet endospor içeren termofilik izolatın, saflıklarının kontrolü için nutrient agar (*Fluka*, N0394) içeren petrilere çizgi plaka yöntemi ile üretimleri gerçekleştirilmiştir. Mezofilik izolatların 30⁰C’de 24 saat, termofilik izolatların ise 70⁰C’de 24 saat inkübasyonun ardından elde edilen saf koloniler, nutrient broth (*Fluka*, N7519) içeren besi ortamına alınarak, mezofilik izolatlar ve suşlar 30⁰C’de 18 saat; termofilik izolatlar ve tip kültür ise 70⁰C’ de 24 saat süre ile aktive edilmiştir.

3.2.1.2 Kültürlerin üretimi

Saflıkları kontrol edilerek, nutrient broth içeren 10 ml sıvı besi ortamında aktive edilen 100 adet mezofilik *Bacillus* izolatu ve 60 adet termofilik bakteri izolatu ile altı adet mezofilik ve bir adet termofilik tür α -L-fukosidaz enzim üretkenliği bakımından sıvı kültürde taranmıştır.

Aktive edilen mezofilik *Bacillus* izolatları ile termofilik bakteri izolatları ve türler, %5 inokulasyon hacmi ile; temel karbon kaynağı %0,5 porcine gastric mucine (PGM) (Sigma, M2378), %0,5 NaCl (Riedel-de Haën, 13423), %0,5 pepton (Bacto Peptone™, 212677), %0,5 maya ekstraktı (Sigma, Y1625) içeren 50 ml fermentasyon ortamında, pH 6,5'e ayarlanarak, mezofilikler çalkalamalı inkübatörde 30°C'de ve 180 rpm çalkalama hızında 72 saat; termofilikler ise 65°C'de ve 140 rpm çalkalama hızında 48 saat kültüve edilmiştir (Yano ve ark., 1985; Yamamoto ve ark., 1986; Tsuji ve ark., 1990; Tsuji ve ark., 1990a; Sano ve ark., 1992; Kurimura ve ark., 1995).

3.2.1.3 Enzimin aktivite tayini

Enzim aktivite tayini için, inkübasyon sonrası fermentasyon sıvıları +4°C'de 1000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. α -L-fukosidaz enzimi hücre dışına salgılanan bir enzimdir bu nedenle enzimin aktivite tayini için santrifüj sonrası elde edilen süpernatant kullanılmıştır (Yano ve ark., 1985; Yamamoto ve ark., 1986; Tsuji ve ark., 1990; Tsuji ve ark., 1990a; Sano ve ark., 1992; Kurimura ve ark., 1995).

Aktivite tayininde, baz tampon olarak; 200 µl 0,1 M'lık Sodyum Sitrat Tamponu (Sodium citrate tribasic dihydrate, Sigma S4641)- pH 6.5, sonlandırma tamponu olarak; 1,5 ml 0,2 M'lık Borik Asit (Sigma, B0252) Solüsyonu- pH 9,8 ve substrat olarak 250 µl 0,01M'lık PNPF (*p*-nitrophenyl α -L-fucopyranoside- Sigma, N3628) solüsyonu kullanılmıştır (Yano ve ark., 1985; Yamamoto ve ark., 1986; Tsuji ve ark., 1990; Tsuji ve ark., 1990a; Sano ve ark., 1992; Kurimura ve ark., 1995; Eneyskaya ve ark., 2001; Miura ve ark., 2005).

1 unit enzim, PNPF'den, 1 dakikada 1µmol *p*-nitrofenol hidrolize eden enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. α -L-fukosidaz enzim aktivitesi yapılan

çalışmalarda **mU/ml** cinsinden hesaplanmıştır. Enzim aktivitesinin hesaplanması için gerekli katsayı (molar absorbsiyon katsayısı) 400nm için $\epsilon=1,77 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olarak alınmıştır, kullanılan formül aşağıda verilmiştir (Zielke ve ark., 1972; Tsay ve ark., 1977; Yamamoto ve ark., 1986; Tsuji ve ark., 1990; Kurimura ve ark., 1995).

$$\text{Unit} / \text{ml}_{\text{enzim}} = \frac{(A_{400} \text{Test} - A_{400} \text{Kör})(V_t)(df)}{(\epsilon)(t)(V_{\text{enzim}})}$$

V_t = aktivite tayininde kullanılan toplam hacim (ml)

df = dilüsyon faktörü

ϵ = p-nitrofenolün 400 nm'deki milimolar extinction coefficient (molar absorbsiyon katsayısı)

t = aktivite tayini süresi (dakika)

V_{enzim} = kullanılan enzim hacmi (ml)

Aktivite tayini 100µl fermentasyon sıvısı ile mezofilik *Bacillus* izolatları için 37°C'de 30 dakika; termofilik izolatlar içinse hem 37°C'de hem de 65°C'de 30'ar dakika bekletilerek gerçekleştirilmiştir. Bu optimum süreler, çeşitli deneme setleri sonucunda elde edilmiştir.

3.2.2 Bazı mezofilik *Bacillus* izolatları ve endospor içeren termofilik izolatlarda α -L-fukosidaz enziminin üretimi için optimum ortam koşullarının belirlenmesi

3.2.2.1 Farklı karbon kaynaklarının α -L-fukosidaz enzim üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi

α -L-fukosidaz enzim aktivitesi yönünden taranan mezofilik *Bacillus* izolatlarına ait aktivite sonuçlarına dayanarak, enzim aktivitesi yüksek bulunan 24 adet izolat temel karbon kaynağı olarak sırasıyla %0,5 L-Fukoz (Sigma, F2252) ve D-Arabinoz (Sigma, A9432) içeren kompleks fermentasyon ortamlarında 30°C'de, 180 rpm çalkalama hızında üretilmiştir. Fermentasyon ortamlarından santrifüj sonrası elde edilen süpernatantta enzim aktiviteleri tayin edilmiştir (Yamamoto ve ark., 1986; Tsuji ve ark., 1990; Tsuji ve ark., 1990a).

Farklı karbon kaynaklarının (substratların) α -L-fukosidaz üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla ise L-Fukoz ve D-Arabinoz ile yapılan denemelerin ardından PGM ile yapılan taramanın sonuçları da göz önüne alınarak enzim aktivitesi yüksek bulunan mezofilik ve termofilik izolatlar ait aktivite sonuçlarına göre aktivitesi yüksek bulunan izolatlar temel karbon kaynağı olarak sırasıyla; %0,5 oranında D-Glukoz (Sigma, G7528), D-Galaktoz (Sigma, G0750), D-Mannoz (Sigma, M6020), D-Fruktoz (Sigma, F2543), Maltoz (Sigma, M9171), Sakaroz (Sükroz) (Sigma, S1888), D-Laktoz (Sigma, 61339), D-Ksiloz (Sigma, X3877), N-Asetil-D-Glukozamin (Sigma, A8625) (termofilik izolatlar için L-Fukoz ve D-Arabinoz da bu denemelere dahil edilerek) içeren kompleks fermentasyon sıvılarında mezofilik izolatlar 30°C'de, 180 rpm çalkalama hızında 72 saat, termofilik izolatlar ise 65°C'de, 140 rpm çalkalama hızında 48 saatlik kültivasyonlarının ardından santrifüj sonrası elde edilen süpernatantta, enzim aktivitesi 37°C'de tayin edilmiştir (Yano ve ark., 1985; Yamamoto ve ark., 1986; Tsuji ve ark., 1990; Tsuji ve ark., 1990a; Sano ve ark., 1992; Kurimura ve ark., 1995; Miura ve ark., 2005).

3.2.2.2 Farklı ortam koşullarının α -L-fukosidaz üretimine etkisinin belirlenmesi

12 farklı karbon kaynağının (substratların) α -L-fukosidaz üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan denemelerin ardından, iki mezofilik ve bir termofilik izolatta enzim üretimlerinin optimizasyonu amacıyla farklı pH değerleri (7,0-7,5-8,0), farklı sıcaklıklar (30 ve 37°C), farklı PGM oranları (%0,5 ve %1) gibi farklı ortam koşulları denenmiştir (Yano ve ark., 1985; Yamamoto ve ark., 1986; Tsuji ve ark., 1990; Tsuji ve ark., 1990a; Sano ve ark., 1992; Kurimura ve ark., 1995; Miura ve ark., 2005). Üretimler paralelli gerçekleştirilmiştir.

3.2.3 Seçilen mezofilik *Bacillus* izolatı ve endospor içeren termofilik izolatta α -L-fukosidaz enziminin kısmi saflaştırılması

Mezofilik *Bacillus* ve endospor içeren termofilik bakteri izolatlarında enzim üretimlerini maksimum seviyelere taşıyan koşulların belirlenmesinin ardından bir

mezofilik ve bir termofilik izolat ölçek büyütülerek iki litrede (toplam hacim: 500mlx4) derin kültür fermentasyonu ile %1 PGM oranı, pH 6.5, sıcaklıklar sırasıyla 30°C ve 65°C'de, 160 rpm çalkalama hızında büyütülerek üretilen α -L-fukosidaz enzimlerinin kısmi saflaştırılması amaçlanmıştır. Bunun için sırasıyla, santrifügasyon, ultrafiltrasyon, amonyum sülfatla protein çöktürme (fraksiyonlama), diyaliz, FPLC ile jel filtrasyon kromatografi basamakları uygulanmıştır (Yano ve ark., 1985; Yamamoto ve ark., 1986; Tsuji ve ark., 1990; Tsuji ve ark., 1990a; Sano ve ark., 1992; Kurimura ve ark., 1995; Eneyskaya ve ark., 2001; Miura ve ark., 2005).

3.2.3.1 Santrifügasyon ile ayırma

İki litrelik üretimlerin santrifügasyonu, Sigma 4K15 marka ve model numaralı santrifüj ve 6x250 ml'lik 121256 kod numaralı rotor ile birlikte +4 °C'de 5100 RPM' de 10 dakikada gerçekleştirilmiştir. α -L-fukosidaz enzimi hücre dışı salgılanan bir enzim olduğundan saflaştırmaya santrifügasyondan çıkan süpernatant ile devam edilmiştir (Yano ve ark., 1985; Yamamoto ve ark., 1986; Tsuji ve ark., 1990; Tsuji ve ark., 1990a; Sano ve ark., 1992; Kurimura ve ark., 1995; Eneyskaya ve ark., 2001; Miura ve ark., 2005).

3.2.3.2 Ultrafiltrasyon ile konsantrasyon

Santrifügasyon basamağında toplanan süpernatant, Sartorius Sartocon Slice 200 (Polyethersulfone) ultrafiltrasyon membranı (NMWCO- 30 000 Dalton) ile konsantre edilerek iki litrelik hacim 200 ml'ye indirilmiştir. Enzimin denatürasyonuna engel olmak için bu basamak +4°C'de gerçekleştirilmiştir (Yamamoto ve ark., 1986; Eneyskaya ve ark., 2001).

3.2.3.3 Amonyum sülfat ile protein çöktürme (fraksiyonlama)

Ultrafiltrasyon basamağından gelen 200 ml'lik konsantre sıvı içeriğindeki proteinlerin fraksiyonlanarak ayrılmaları için katı amonyum sülfat ile çöktürülmüştür. Bu işlemde 0°C'de, manyetik karıştırıcı yardımıyla sıvıya katı amonyum sülfatın yavaş yavaş yedirilmesi yöntemi kullanılmıştır (Temizkan ve Arda, 2008).

Enzimin en etkin hangi amonyum sülfat yüzdesinde çökeleceği kesin olarak bilinmediğinden literatürlerdeki değerler olan %55, %65, %80 amonyum sülfat oranları denenmiştir. Katı halde ilave edilen amonyum sülfatın yaklaşık 30 dakika karışmasının ardından 5100 rpm’de 20 dakika santrifüjlenerek diyaliz basamağına geçilmiştir (Yano ve ark., 1985; Yamamoto ve ark., 1986; Tsuji ve ark., 1990; Tsuji ve ark., 1990a; Sano ve ark., 1992; Kurimura ve ark., 1995; Eneyskaya ve ark., 2001; Miura ve ark., 2005). Çizelge 3.2’de katı amonyum sülfat kullanılarak yapılacak çöktürme için kullanılacak miktarlar yer almaktadır.

Çizelge 3.2 Katı amonyum sülfat kullanılarak yapılan çöktürme işlemi için gerekli miktarlar (Temizkan ve Arda, 2008).

[illegible]

3.2.3.4 Diyaliz

Amonyum sülfatla çökeltilen ve santrifüjlenen süspansiyonun üstte kalan süpernatant kısımları ayrılarak, altta kalan çökeltiye stabilizasyonun devamını sağlamak için 30 ml 10 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,0) ilave edilmiştir. Bu solüsyon, NMWCO 12 000 Dalton membranda, +4⁰C’de, bir gece boyunca diyaliz membranı içindeki sıvının 20 katı hacmindeki diyalizat (600 ml) ile diyalizlenmiştir (Yano ve ark., 1985; Yamamoto ve ark., 1986; Tsuji ve ark., 1990; Tsuji ve ark., 1990a; Sano ve ark., 1992; Kurimura ve ark., 1995; Eneyskaya ve ark., 2001; Miura ve ark., 2005).

3.2.3.5 FPLC-Jel filtrasyon kromatografi

Diyalizden çıkan örnekler, jel filtrasyon ile moleküler büyüklüklerine göre ayrılmak üzere Amersham Pharmacia Biotech AKTA FPLC 18-1140-45 cihazı kullanılarak, Amersham 17-1195-01 HiPrep 26/60 Sephacryl S200 HR, Jel Filtrasyonu kolonuna uygulanmıştır. Bu amaçla kolondan ilk dengeleme için, öncelikle 480 ml distile su (kolonun 1,5 katı hacminde) 1,3 ml/dakika akış hızıyla geçirilmiş ve ardından kolon 2,6 ml/dakika akış hızı ile 640 ml (kolonun iki katı hacminde) 0,05M Sodyum fosfat ve 0,15M NaCl içeren pH 7,2 başlangıç tamponu geçirilerek dengelenmiştir. Örnekler 450 ml 10 mM potasyum fosfat tamponu ile 1,0-1,3 ml/dakika akış hızında 0,35-0,40 mPa basınçla kolondan akıtılmıştır. Kolondan fraksiyonlar 6’şar ml’lik hacimlerde otomatik fraksiyon toplayıcı ile toplanmıştır. Kromatografi sonucu software ile takip edilerek, dijital çıktısı alınmıştır (Sheehan, 2003).

Kolonun yeni bir deneme öncesi dengelenmesi için, bir kolon hacmi (320 ml) başlangıç tamponu 2,2ml/dakika akış hızında uygulanmıştır. Örneğin sıcaklıkla denaturasyonunun önlenmesi için kolonun etrafına ceket yapılmış, sirkülatör ile sıcaklık +4⁰C’ye ayarlanmıştır. Örneğin geçirilmesinin ardından kolonun temizliği için dört kolon hacmi (1280 ml) 0,5M NaOH 1,0 ml/dakika hızla geçirildikten sonra dört kolon hacmi (1280 ml) ultra saf su ile temizlik tamamlanmıştır. Kolondan en son işlem olarak %20’lik etanol geçirilmesi ise kolon dolgu materyalinin kurumasını önlemek içindir.

3.2.3.6 SDS-PAGE

Kısmi saflaştırmanın her basamağından alınan örnekler SDS-PAGE yöntemi ile görüntülenerek saflaştırılmasına çalışılan enzimin molekül ağırlığı belirlenmiş, her bir saflaştırma basamağında gerçekleştirilen ayırım ortaya konmuştur. Bu amaçla %8, %10 ve %12'lik jeller denenmiştir (Yano ve ark., 1985; Yamamoto ve ark., 1986; Tsuji ve ark., 1990; Tsuji ve ark., 1990a; Sano ve ark., 1992; Kurimura ve ark., 1995; Eneyskaya ve ark., 2001; Miura ve ark., 2005). Görüntülemenin en iyi sağlandığı % 12'lik jelin kullanılmasına karar verilmiştir.

% 12'lik jel elde etmek üzere, birinci adımda ayırımı yapacak olan jel (separating gel) dökülmüştür. 20 ml ayırıcı jel için:

- Solüsyon B (Separating Gel Buffer, pH 8,8), 10 000 µl
- Akrilamid (%40' lık), 6 000 µl
- Distile su, 2 260 µl
- SDS (%10'luk), 200 µl
- APS (%10'luk), 500 µl
- TEMED, 40 µl.

Birinci jel döküldükten sonra hava ile temasını kesmek üzere 1 ml izopropanol jelin üzerine eşit şekilde koyulmuştur. 1-2 saat beklemenin ardından, yükleme kuyucuklarını oluşturmak üzere 2. adımda yürütücü (stacking) jel dökülmüştür. 10 ml jel için:

- Solüsyon C (Stacking Gel Buffer- pH 6,8), 5 000 µl
- Akrilamid (%30'luk), 2 000 µl
- Distile su, 2 600 µl
- SDS (%10'luk), 100 µl
- APS (%10'luk), 250 µl
- TEMED, 20 µl.

Jelde yürütülecek örneklerin hazırlanması için çeşitli denemelerin ardından, 40 µl örnek, 40 µl örnek tamponu ve 20 µl saf su eppendorfa konularak, 100°C'de

10 dakika proteinlerin denatürasyonu gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan bu örnekler yeniden kullanılmak üzere -20°C 'ye kaldırılmıştır.

Örnek yüklemek amacıyla kuyucukların oluşması için tarak yerleştirilerek, jelin donması için 1-2 saat beklenmiştir. Bu süre sonunda kuyucuklar akilamid kalıntılarından temizlenmiş, marker (10 μl) ve örnekler (10-15 μl) yüklenerek, 80-150 volt arasında giderek artan elektrik akımında, yaklaşık 700 ml tank buffer varlığında 3-4 saat yürütülmüştür.

Örneklerin yürütüldüğü jel, görüntülenmek üzere boyamaya alınmıştır. Bu amaçla hacminin 3-4 katı boya çözeltisinde resiprokal hareket eden çalkalayıcı üzerinde 20-40 rpm hızla bir gece boyunca çalkalamaya bırakılmıştır. Boyamanın sonuçlarını görebilmek için ertesi gün 3-4 kez destaining solüsyonu ile boyanın giderilmesi sağlanmıştır. Boya yeterince giderildiğinde jelin fotoğrafları çekilmiştir.

Moleküler ağırlıkların tespitinde kullanılan markerın içerdiği her biri farklı bir protein olan bantlar ve %4-20'lik Tris-Glisin jelde bu bantların moleküler ağırlıkları (kDa) Çizelge 3.3'te verilmiştir.

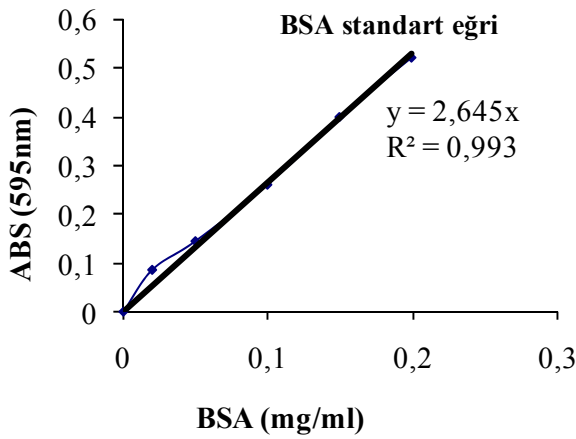
Çizelge 3.3. SDS-PAGE çalışmasında kullanılan markera ait renkli bantlar ve moleküler ağırlıklar (kDa)

	ColorBurst Marker Proteinlerinin Görünen Moleküler Ağırlıkları (kDa) ve Bant Renkleri	
	Bant Rengi	%4-20' lik Tris-Glisin Jel
	Mor	220
	Pembe	100
	Mavi	60
	Pembe	45
	Turuncu	30

3.2.4 Protein tayini

Kısmi saflaştırmanın her basamağından alınan örneklerde Bradford yöntemi ile protein tayini gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ticari olarak hazır halde satılan

Bradford Reagent (Sigma, B6916) kullanılmıştır. Bradford yöntemi ile total protein tayininde, 50 µl örnek üzerine 1,5 ml Bradford Reagent ilave edilmesinin ardından oluşan reaksiyona ait renk değişimi 595 nm dalga boyunda okunmuştur. Bovine Serum Albumine (BSA)'nin farklı konsantrasyonlarındaki (0,02 mg/ml-0,2 mg/ml) absorbansları 595 nm'de ölçülerek elde edilen standart grafiğinden elde edilen denklemde ($y=2,645x$) örneğe ait absorbanslar yerine konularak protein miktarı “mg/ml” cinsinden tayin edilmiştir (Tsuji ve ark., 1990; Tsuji ve ark., 1990a; Sano ve ark., 1992; Kurimura ve ark., 1995; Miura ve ark., 2005).



Şekil 3.1 Protein miktarı standart eğri grafiği

Spesifik enzim aktivitesi ise aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$\text{Spesifik} \cdot \text{enzim} \cdot \text{aktivitesi} = \frac{\text{toplaml.enzim.aktivitesi}(U)}{\text{toplaml.protein.miktari}(mg)}$$

Kısmi saflaştırmaya ait tüm adımlarda; enzim aktivitesi (mU/ml), total aktivite (U), total protein (mg), spesifik aktivite (U/mg), % saflaştırma verimi çizelgeler halinde verilmiştir (Çizelge 4.14 ve 4.15).

3.2.5 Seçilen mezofilik *Bacillus* izolatı ve endospor içeren termofilik izolatta α -L-fukosidaz enziminin kısmi karakterizasyonu

Mezofilik *Bacillus* ve endospor içeren termofilik bakteri izolatlarında enzim üretimlerini maksimum seviyelere taşıyan koşulların belirlenmesinin ardından bir adet mezofilik ve bir adet termofilik izolat ölçek büyütülerek iki litrede derin

kültür fermentasyonu ile %1 PGM oranı, pH 6.5, sıcaklıklar sırasıyla 30⁰C ve 65⁰C'de, 160 rpm çalkalama hızında büyütülerek üretilen α -L-fukosidaz enzimlerinin kısmi karakterizasyonu amaçlanmıştır. Bu amaçla farklı pH ve sıcaklıklarda aktivite tayinleri ile enzimlerin optimum sıcaklık ve pH aralıkları ortaya konmuştur (Yano ve ark., 1985; Yamamoto ve ark., 1986; Tsuji ve ark., 1990; Tsuji ve ark., 1990a; Sano ve ark., 1992; Kurimura ve ark., 1995; Eneyskaya ve ark., 2001; Miura ve ark., 2005).

3.2.5.1 Sıcaklığın α -L-fukosidaz enziminin aktivitesine etkisi

Mezofilik izolat için, 25- 60⁰C (25, 30, 37, 40, 45, 50, 60⁰C'ler) ve endospor içeren termofilik izolat içinse 25-90⁰C (25, 30, 37, 40, 50, 60, 65, 70, 80, 90⁰C'ler) arasında farklı sıcaklıklar denenmiştir (Yano ve ark., 1985; Yamamoto ve ark., 1986; Tsuji ve ark., 1990; Tsuji ve ark., 1990a; Sano ve ark., 1992; Kurimura ve ark., 1995; Eneyskaya ve ark., 2001; Miura ve ark., 2005).

3.2.5.2 pH'nın α -L-fukosidaz enziminin aktivitesine etkisi

Mezofilik *Bacillus* izolatı ve endospor içeren termofilik izolat için, enzim aktivite tayininde kullanılan baz tamponunun pH'sı 4,0-8,0 aralığında (pH 4,0-5,0-6,0-6,5-7,0-8,0) değiştirilerek üretilen enzimlere ait optimum pH ortaya konulmuştur (Yano ve ark., 1985; Yamamoto ve ark., 1986; Tsuji ve ark., 1990; Tsuji ve ark., 1990a; Sano ve ark., 1992; Kurimura ve ark., 1995; Eneyskaya ve ark., 2001; Miura ve ark., 2005).

3.2.6 Seçilen mezofilik *Bacillus* ve termofilik bakteri izolatlarının Gram's boyaması

Ürettikleri enzimlerin kısmi karakterizasyonu ve kısmi saflaştırılmasına karar verilen mezofilik *Bacillus* izolatı ve termofilik izolat Gram's boyamalarının ardından mikroskopta görüntülenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

α -L-fukosidaz enzimi, bakteri, fungus, çeşitli bitkilerde ve memelilerde tespit edilmiştir. Memelilerle yapılan çalışmalar, insan serumu ve çeşitli dokulardan elde edilen α -L-fukosidazın geniş substrat spesifitesine sahip olduğunu ve yapay bir substrat olan *p*-nitrofenil α -L-fukopranozid (PNPF) üzerinde de etkili olduğunu ortaya koymuştur. Bu noktada özellikle termofilik mikroorganizmalarla yapılan çalışmalarda memelilerdekine benzer substrat spesifitesi görülmesi ve çeşitli tipte bağ konformasyonlarına sahip fukoz içeren glikoproteinlerin deglikozillenmiş formlarının üretilmesinde etkili bir araç olmaya aday olarak gösterilmiştir (Eneyskaya ve ark., 2001).

Enzimin medikal alanda halen araştırmaları sürdürülen fukosidoz hastalığında enzim replasman tedavisi için bir umut teşkil etmektedir. Memelilerde α -L-fukosidaz enziminin α -1,6 bağına spesifik olduğu göz önüne alınarak çalışmamızda enzim aktivite tayininde α -1,6 bağıyla bağlı fukoz şekeri içeren PNPF (*p*-nitrofenil α -L-fukopranozid), substrat olarak kullanılmıştır. *Bacillus* genusuna ait izolatlar ile termofilik bakteri izolatlarımızda tespit edilen aktiviteler α -1,6 bağ yapısı üzerinde etkili α -L-fukosidaz enziminin saptanması açısından önem taşımaktadır.

4.1 Bazı Mezofilik *Bacillus* İzolatları ile Endospor İçeren Termofilik İzolatlarda α -L-Fukosidaz Enziminin (E.C.3.2.1.51) Taranması ve Enzim Aktivite Tayini

4.1.1 Çeşitli mezofilik *Bacillus* izolatlarında α -L-fukosidaz enziminin (E.C.3.2.1.51) taranması ve enzim aktivite tayini

Çeşitli kaynaklardan elde edilen α -L-fukosidazlar substrat spesifikliğı yönünden temel farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıklar, α -L-fukozil residülerinin farklı bağ tipleriyle yapıya dahil olduğu fukozillenmiş oligosakkaritler için spesifite ve fukoz içeren yapay substratları parçalamadaki yetenekleri nedeniyle ortaya çıkmaktadır (Eneyskaya ve ark., 2001).

Bacillus genusuna ait izolatlarla yapılan çalışmalarda çeşitli kaynaklardan izole edilen izolatlarda substrat spesifitesi farklı iki tip α -L-fukosidaz enzimi üretilmektedir. Bunlardan biri, PGM'den α -1,2 bağıyla bağlı L-fukoza ayırabilme yeteneğinde diğeri tam tersine PGM üzerinde etkili olmayıp, PNPF (*p*-nitrophenyl α -L-fucopyranoside)'deki α -1,6 fukozik bağlarını hidroliz etmektedir (Tsuji ve ark., 1990; Tsuji ve ark., 1990a; Kurimura ve ark., 1992).

α -L-fukosidaz enzimini üreten mikroorganizmalar arasında üç organizma ürettikleri 1,2- α -L-fukosidaz enzimi (E.C.3.2.1.63) ile dikkat çekmiştir. Bunlar: *Clostridium perfringens*, *Aspergillus niger* ve *Bacillus fulminans*'tır. Enzimi üretmelerine rağmen bu mikroorganizmalardan yüksek miktarda saf enzim eldesi güçtür. Çünkü *C.perfringens* anaerobik ve patojeniktir, *A.niger* α -L-fukosidaz enzimi yanında çeşitli glikosidazları da bu enzim ile birlikte üretmektedir, *B.fulminans*'da ise bu enzim hücre içinde üretilmektedir. Ayrıca *A.niger*'den elde edilen bu enzim kullanılarak eritrositlerle yapılan çalışmalarda organizma, optimal asidik pH'sı nedeniyle uygun bulunmamıştır. *C.perfringens*'in ürettiği α -L-fukosidaz sadece α -1,2 bağına değil aynı zamanda α -1,3 ve α -1,4 fukozik bağlarını da koparma yeteneğindedir. Kırmızı kan hücrelerindeki insan kan grubu antijenleri, glikoprotein ve glikolipidlerden oluşur. A, B, H(O) ve Lewis (Le) antijenleri içerdikleri glikokonjugatların terminal uçlarında yer alan şeker zincirlerinde Fuc α -1,2 bağlarına sahiptir. Bu tip karbonhidrat bağlı antijenler sadece kırmızı hücrelerde değil aynı zamanda çeşitli epitalyal dokular, organlar ve sekresyonlarda da tespit edilmiştir. Üretilcek enzimin α -1,2 bağlarında etkili olabilmesi, insan kan grubu bileşenlerinin yapısını araştırmada önemli görev alabileceği fikrini doğurmaktadır (Goso ve ark., 2001).

Bacillus suşlarıyla yapılan bir çalışmada topraktan izole edilen *B.circulans*'ın substrat spesifitesi farklı iki tip α -L-fukosidazı aynı fermentasyon sürecinde ürettiği görülmüştür. Bunlardan biri PGM den L-fukoza ayırabilen fakat PNPF ve metil α -L-fukosidaz gibi yapay substratları parçalayamazken diğeri tam tersine PGM üzerinde etkili olmayıp, PNPF'nin hidrolizinde etkili olmuştur (Tsuji ve ark., 1990).

Çalışmamızın başlangıcında temel karbon kaynağı olarak PGM içeren kültür ortamında iki farklı tip α -L-fukosidaz enziminin üretildiğini kanıtlamaya

yönelik enzim aktivitesinin her 12 saatte bir, substrat olarak hem PGM hem de PNPF'ye karşı ölçülmesi, bu sayede hangi enzimin hangi zaman aralığında üretildiğinin tespit edilmesi amaçlanmıştır (Tsuji ve ark., 1990; Miura ve ark., 2001). Çalışmamızda, PGM'den α -1,2 bağıyla bağlı L-fukozu ayırabilme yeteneğinde olan α -L-fukosidaz enziminin taranması amacıyla aktivite tayininde ayrılan L-fukozun miktarının saptanmasında kullanılacak "L-fukoz dehidrogenaz" üretimden kaldırıldığı için, α -1,2 fukozidik bağına spesifik olan enzimin taranması gerçekleştirilememiştir. Literatürlerde bu çalışma için alternatif farklı bir yöntem bulunamamıştır.

α -L-fukosidaz enziminin taranması amacıyla katı besi ortamında bir ön-eleme protokolü bulunamadığından 100 adet mezofilik *Bacillus* izolatı ve 60 adet endospor içeren termofilik izolat ile *Bacillus cereus*, *B.subtilis* türleri ve *B.licheniformis* NRRL-1001, *B.circulans* NRRL B-381, *B.circulans* NRRL B-378, *Paenibacillus illinoisensis* NRRL NRS-1356, *Geobacillus stearothermophilus* NRRL-1102 tip kültürleri temel karbon kaynağı olarak %0,5 PGM içeren kompleks fermentasyon ortamında büyütülerek bu enzimin aktivitesi tayin edilmiştir Aktivitenin tayin edilmesi için sıvı kültürde gerçekleştirilen tüm üretimler paralelli yürütülerek, elde edilen sonuçlar ortalamaları alınarak verilmiştir (Çizelge 4.1- 4.2).

Çizelge 4.1 Mezofilik *Bacillus* izolatlarında 72 saatlik inkübasyonun sonunda α -L-fukosidaz aktiviteleri (mUnit/ml)

Mezofilik <i>Bacillus</i> izolatları					
Sıra No	İzolat Kodu	Aktivite (mUnit/ml)	Sıra No	İzolat Kodu	Aktivite (mUnit/ml)
1	<i>Bacillus</i> Ege B.1.1.ka	10,667	51	<i>Bacillus</i> Ege B. 42.6	22,44
2	<i>Bacillus</i> Ege B.1.d.2	83,34	52	<i>Bacillus</i> Ege B. 24.1i	23,77
3	<i>Bacillus</i> Ege B.1d.3	1,333	53	<i>Bacillus</i> Ege B. 24.2i	24,667
4	<i>Bacillus</i> Ege B.1.d.1	-	54	<i>Bacillus</i> Ege B. 24.3i	2,22
5	<i>Bacillus</i> Ege B.1.d.4	-	55	<i>Bacillus</i> Ege B. 24.4i	19,77
6	<i>Bacillus</i> Ege B.1.d.5	-	56	<i>Bacillus</i> Ege B.i.1.1	-
7	<i>Bacillus</i> Ege B.1.d.6	1,34	57	<i>Bacillus</i> Ege B.i.1.2	5,77
8	<i>Bacillus</i> Ege B.1.d.7	0,666	58	<i>Bacillus</i> Ege B.i.1.3	3,55
9	<i>Bacillus</i> Ege B.1.d.8	-	59	<i>Bacillus</i> Ege B.i.1.4	7,55
10	<i>Bacillus</i> Ege B.1.d.9	-	60	<i>Bacillus</i> Ege B.i.1.5	4,88
11	<i>Bacillus</i> Ege B.1.2.ka	2,0	61	<i>Bacillus</i> Ege B.i.1.6	-
12	<i>Bacillus</i> Ege B.1.3.ka	1,56	62	<i>Bacillus</i> Ege B.19.1i	-
13	<i>Bacillus</i> Ege B.1.4.ka	0,888	63	<i>Bacillus</i> Ege B.19.2i	16,66
14	<i>Bacillus</i> Ege B.1.5.ka	0,666	64	<i>Bacillus</i> Ege B.19.3i	-
15	<i>Bacillus</i> Ege B.1.6.ka	-	65	<i>Bacillus</i> Ege B.19.4i	16,44
16	<i>Bacillus</i> Ege B.1.7 ka	-	66	<i>Bacillus</i> Ege B.19.5i	3,55
17	<i>Bacillus</i> Ege B.1.d.10	84,4	67	<i>Bacillus</i> Ege B.19.6i	6,44

Çizelge 4.1 (devam)

Mezofilik <i>Bacillus</i> izolatları					
Sıra No	İzolat Kodu	Aktivite (mUnit/ml)	Sıra No	İzolat Kodu	Aktivite (mUnit/ml)
18	<i>Bacillus</i> Ege B.1.d.11	-	68	<i>Bacillus</i> Ege B. 1.1.P	4,67
19	<i>Bacillus</i> Ege B.1.9.2i	0,888	69	<i>Bacillus</i> Ege B. 1.2.P	2,88
20	<i>Bacillus</i> Ege B.1.9.3	7,56	70	<i>Bacillus</i> Ege B. 1.3.P	1,56
21	<i>Bacillus</i> Ege B.2.1.1i	5,34	71	<i>Bacillus</i> Ege B. 1.4.P	8,22
22	<i>Bacillus</i> Ege B.2.1.3i	1,12	72	<i>Bacillus</i> Ege B. 1.5.P	3,33
23	<i>Bacillus</i> Ege B.2.d.1	0,222	73	<i>Bacillus</i> Ege B. 1.6.P	2,44
24	<i>Bacillus</i> Ege B.2.d.8	0,888	74	<i>Bacillus</i> Ege B. 1.7.P	-
25	<i>Bacillus</i> Ege B.2.d.9	0,777	75	<i>Bacillus</i> Ege B. 1.8.P	-
26	<i>Bacillus</i> Ege B.2.d.10	5,12	76	<i>Bacillus</i> Ege B. 8.1m	2,667
27	<i>Bacillus</i> Ege B.12.2i	38,89	77	<i>Bacillus</i> Ege B. 2.5m	0,593
28	<i>Bacillus</i> Ege B.13.5i	9,11	78	<i>Bacillus</i> Ege B. 5.5m	0,740
29	<i>Bacillus</i> Ege B. 13.7i	2,89	79	<i>Bacillus</i> Ege B. 4.2i	1,70
30	<i>Bacillus</i> Ege B. 27.4	-	80	<i>Bacillus</i> Ege B. 14.7ix	0,81
31	<i>Bacillus</i> Ege B.4.2i	-	81	<i>Bacillus</i> Ege B. 1.19	0,815
32	<i>Bacillus</i> Ege B.11.4	-	82	<i>Bacillus</i> Ege B. 3.5m	2,2
33	<i>Bacillus</i> Ege B.34.1	-	83	<i>Bacillus</i> Ege B. 44.1	1,778
34	<i>Bacillus</i> Ege B.9.2	1,33	84	<i>Bacillus</i> Ege B. 14.7i	2,2
35	<i>Bacillus</i> Ege B.10.2	0,666	85	<i>Bacillus</i> Ege B. 6.1m	2,2
36	<i>Bacillus</i> Ege B.10.3	0,444	86	<i>Bacillus</i> Ege B. 10.4i	1,333
37	<i>Bacillus</i> Ege B.12.1	-	87	<i>Bacillus</i> Ege B. 1.23	2,0
38	<i>Bacillus</i> Ege B.12.2	-	88	<i>Bacillus</i> Ege B. 4.1i	2,88
39	<i>Bacillus</i> Ege B.23.3	1,11	89	<i>Bacillus</i> Ege B. 28.2	1,778
40	<i>Bacillus</i> Ege B. 38.1	32,44	90	<i>Bacillus</i> Ege B. 36.1	4,0
41	<i>Bacillus</i> Ege B. 38.2	18,22	91	<i>Bacillus</i> Ege B. 14.1i	1,333
42	<i>Bacillus</i> Ege B. 38.3	-	92	<i>Bacillus</i> Ege B. 5.2i	7,78
43	<i>Bacillus</i> Ege B. 38.4	-	93	<i>Bacillus</i> Ege B. 36.5	0,222
44	<i>Bacillus</i> Ege B. 38.5	2,2	94	<i>Bacillus</i> Ege B. 19.3	1,333
45	<i>Bacillus</i> Ege B. 25.1	6,44	95	<i>Bacillus</i> Ege B. 1.1.z	1,556
46	<i>Bacillus</i> Ege B. 42.1	-	96	<i>Bacillus</i> Ege B. 2.1.f	2,67
47	<i>Bacillus</i> Ege B. 42.2	13,55	97	<i>Bacillus</i> Ege B.2.2.f	2,0
48	<i>Bacillus</i> Ege B. 42.3	26,22	98	<i>Bacillus</i> Ege B.2.3.f	1,56
49	<i>Bacillus</i> Ege B. 42.4	15,33	99	<i>Bacillus</i> Ege B.2.4.f	2,44
50	<i>Bacillus</i> Ege B. 42.5	13,11	100	<i>Bacillus</i> Ege B.3.1.f	0,888

-, Aktivite Saptanamadı

Çizelge 4.2 Mezofilik *Bacillus* türlerinde 72 saatlik inkübasyonun sonunda aktiviter (mUnit/ml)

Sıra No	<i>Bacillus</i> Türleri	Aktivite (mUnit/ml)
1	<i>Bacillus cereus</i> *	0,666
2	<i>Bacillus subtilis</i> *	-
3	<i>Bacillus licheniformis</i> NRRL 1001	0,888
4	<i>Bacillus circulans</i> NRRL B-378	48,72
5	<i>Bacillus circulans</i> NRRL B-381	37,66
6	<i>Paenibacillus illinoisensis</i> NRRL NRS B-1356	25,88

*, Biyomühendislik Kültür Koleksiyonu'nda yer alan tür tayini yapılmış, *Bacillus* izolatları

-, Aktivite Saptanamadı

α -L-fukosidaz aktivitesi, incelenen suş ve izolatların %22,64'ünde saptanmazken %77,36'sı pozitif bulunmuştur. α -L-fukosidaz enzimi üreten mezofilik *Bacillus* suş ve izolatlarında aktivite, 0,222 – 84,4 mU/ml aralığında değişmektedir. Mezofilik *Bacillus* suş ve izolatlarına ait α -L-fukosidaz enzim aktivitesinin dağılımı Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3 106 adet mezofilik *Bacillus* suş ve izolatında α -L-fukosidaz enzim aktivitesi (mU/ml) dağılımı

α -L-Fukosidaz Aktivitesi (mU/ml)	İzolat Sayısı	%
0,2-10	63	59,44
10-20	8	7,55
20-30	5	4,72
30-40	3	2,83
40-50	1	0,94
50-60	0	0
60-70	0	0
70-80	0	0
80-90	2	1,89
90-100	0	0

Farklı genuslara ait mikroorganizmalarda α -L-fukosidaz enzim aktiviteleri taranmıştır. *Bacillus* (*B.circulans*, *B.cereus* ve çeşitli *Bacillus spp.* izolatları), *Clostridium*, *Aspergillus*, *Streptomyces*, *Bifidobacterium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Thermus sp.*, *Thermotoga*, *Sulfolobus* genuslarına ait türlerde α -L-fukosidaz aktivitesi incelenmiş ve bakterilerin farklı içeriklere sahip fermentasyon sıvılarındaki aktivitelerin 0,2 ile 107mUnit/ml aralığında olduğu belirtilmiştir. Fakat 100 adet izolatın tarandığı bir çalışmaya literatürde rastlanamamıştır (Kochibe ve ark., 1973; Yamamoto ve ark., 1986; Tsuji ve ark., 1990, 1990a; Sano ve ark., 1992; Kurimura ve ark., 1995; Ajisaka ve ark., 1998; Iwase ve ark., 1988; Eneyskaya ve ark., 2001; Goso ve ark., 2001; Sulzenbacher ve ark., 2004; Tarling ve ark., 2003; Miura ve ark., 2005; Katayama ve ark., 2005; Cobucci ve ark., 2008).

4.1.2 Endospor içeren çeşitli termofilik izolatlarda α -L-fukosidaz enziminin (E.C.3.2.1.51) taranması ve enzim aktivite tayini

Çalışmamızda mezofilik izolatların yanı sıra endospor içeren termofilik 60 bakteri izolatının ve *Geobacillus stearothermophilus* NRRL B-1102'nin de α -L-fukosidaz aktiviteleri taranmıştır. Sıvı kültürde gerçekleştirilen tüm üretimler paralelli yürütülmüş, elde edilen sonuçlar ortalamaları alınarak Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.4 Endospor içeren termofilik izolatlarda 48 saatlik inkübasyonun sonunda α -L-fukosidaz aktiviteleri (mUnit/ml)

Endospor içeren termofilik izolatlar							
Sıra No	İzolat Kodu	Aktivite (mUnit/ml) (37 °C'de)	Aktivite (mUnit/ml) (65°C'de)	Sıra No	İzolat Kodu	Aktivite (mUnit/ml) (37 °C'de)	Aktivite (mUnit/ml) (65°C'de)
1	İzolat-2	4,444	6,88	31	İzolat-16	0,222	-
2	İzolat-62	8,888	6,667	32	İzolat-21	-	-
3	İzolat-63	2,0	0,222	33	İzolat-22	-	-
4	İzolat-8	-	-	34	İzolat-4	12,44	12,44
5	İzolat-40	-	0,666	35	İzolat-15	10,44	10,22
6	İzolat-44	-	0,666	36	İzolat-20	1,78	1,11
7	İzolat-68	-	0,888	37	İzolat-57	5,11	4,22
8	İzolat-19	4,22	1,34	38	İzolat-61	4,88	-
9	İzolat-27	2,667	0,888	39	İzolat-1	16,44	6,22
10	İzolat-38	1,340	0,222	40	İzolat-10	6,66	11,55
11	İzolat-46	-	-	41	İzolat-11	-	0,222
12	İzolat-59	-	0,888	42	İzolat-29	9,33	12,66
13	İzolat-13	42,44	-	43	İzolat-43	83,11	11,11
14	İzolat-24	24,67	-	44	İzolat-14	-	-
15	İzolat-36	28,89	-	45	İzolat-28	2,88	12,66
16	İzolat-41	24,88	-	46	İzolat-32	-	11,11
17	İzolat-42	-	-	47	İzolat-47	-	18,66
18	İzolat-37	-	5,12	48	İzolat-53	11,55	16,88
19	İzolat-45	1,340	-	49	İzolat-18	-	20,88
20	İzolat-48	-	-	50	İzolat-25	-	22
21	İzolat-52	0,444	-	51	İzolat-34	-	20,44
22	İzolat-33	2,667	0,888	52	İzolat-35	0,666	-
23	İzolat-49	1,11	-	53	İzolat-54	0,222	-
24	İzolat-51	-	0,444	54	İzolat-56	-	0,666
25	İzolat-55	3,33	2,8	55	İzolat-12	8,22	6,67
26	İzolat-9	6,88	5,11	56	İzolat-17	3,33	5,77
27	İzolat-60	10,88	4,22	57	İzolat-23	3,11	-
28	İzolat-5	1,78	-	58	İzolat-26	2,88	11,55
29	İzolat-6	3,11	-	59	İzolat-30	4,88	6,88
30	İzolat-7	9,78	-	60	İzolat-39	2,44	1,11

-, Aktivite Saptanamadı

Çizelge 4.5 *Geobacillus stearothermophilus* NRRL B-1102’de α -L-fukosidaz aktivitesi (mUnit/ml)

Termofilik Tip Kültür	Aktivite (37 ⁰ C’de) mU/ml	Aktivite (65 ⁰ C’de) mU/ml
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> NRRL B-1102	23,68	48,22

Çalışmada α -L-fukosidaz aktivitesi, incelenmiş olan 61 tane endospor içeren termofilik bakterinin yedi tanesinde aktivite saptanamazken 54 tanesi pozitif bulunmuştur. Termofilik bakterilere ait α -L-fukosidaz enzim aktivitesi dağılımı Çizelge 4.6’da verilmiştir.

Çizelge 4.6 Endospor içeren termofilik bakterilerde α -L-fukosidaz aktivitesinin (mU/ml) dağılımı

Enzim Aktivitesi (mU/ml) 37 ⁰ C	İzolot Sayısı	%	Enzim Aktivitesi (mU/ml) 65 ⁰ C	İzolot Sayısı	%
0,2-10	30	49,2	0,2-10	25	40,98
10-20	5	8,2	10-20	10	16,4
20-30	4	6,6	20-30	3	4,98
30-40	0	0	30-40	0	0
40-50	1	1,6	40-50	1	1,6
50-60	0	0	50-60	0	0
60-70	0	0	60-70	0	0
70-80	0	0	70-80	0	0
80-90	1	1,6	80-90	0	0
90-100	0	0	90-100	0	0

Çizelge 4.6’da görüldüğü üzere termofilik bakterilerde α -L-fukosidaz enzim aktivitesi, 37⁰C ve 65⁰C olmak üzere iki farklı sıcaklıkta tayin edilmiştir. 37⁰C’de gerçekleştirilen aktivite tayininde, bakterilerin %67,2’sinde 0,222 – 83,11 mU/ml; 65⁰C’de gerçekleştirilen aktivite tayininde ise %63,9’unda 0,222 – 48,22 mU/ml α -L-fukosidaz enzim aktivitesi saptanmıştır.

Endospor içeren termofilik bakterilerin α -L-fukosidaz aktivitesi yönünden tarandığı bir çalışmaya literatürde rastlanamamıştır. Eneyskaya ve ark., (2001),

Thermus sp.'den 45⁰C'de ürettikleri α -L-fukosidaz enzimi için optimum sıcaklığın 50⁰C olduğunu, bununla birlikte termal inaktivasyonun 45⁰C'nin üzerinde gözlemlendiği ve aktivitenin 60⁰C'lerde hızla düştüğü belirlenmiştir. Bu nedenle çalışmamızda termofilik *Bacillus* izolatlarına ait α -L-fukosidaz enzim aktivitesi hem 37⁰C'de hem de 65⁰C'de tayin edilerek, bu sayede izolatların ürettiği α -L-fukosidaz enziminin termostabilitesi kısmen değerlendirilebilmiştir. Bunun nedeni, ileri aşamalarda daha net ortaya konulacak olan enzimin aktif olduğu sıcaklık aralığının tespit edilebilmesidir. Eneyskaya ve ark. (2001) ayrıca PNPF substratının hidrolizinde *Thermus* sp.'den elde edilen α -L-fukosidazın insan ve diğer memeli α -L-fukosidazları ile benzer kinetik karakteristiklere sahip olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada ayrıca biyoinformatik verilerden yararlanılarak çeşitli mikroorganizmalardan izole edilen α -L-fukosidaz enzimleri arasında sekans benzerlikleri de ortaya konmuştur.

Termofilik mikroorganizmalarla yapılan çalışmada, memelilerdekine yakın substrat spesifitesi görülmesi nedeniyle, bu tür mikroorganizmalardan elde edilecek α -L-fukosidaz enziminin önemi açığa çıkarılmıştır (Sulzenbacher ve ark., 2004).

4.2 Bazı Mezofilik *Bacillus* İzolatları ve Endospor İçeren Termofilik İzolatlarda α -L-Fukosidaz Enziminin Üretimi İçin Optimum Ortam Koşullarının Belirlenmesi

4.2.1 Farklı Karbon Kaynaklarının α -L-Fukosidaz Enzim Üretimi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

4.2.1.1 Bazı mezofilik *Bacillus* izolatlarında farklı karbon kaynaklarının α -L-fukosidaz enzim üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi

α -L-fukosidaz aktivitesi yönünden taranan 100 adet mezofilik *Bacillus* izolatına ait aktivite sonuçlarına dayanarak seçilen 24 adet izolatın, literatürler referans alınarak (Yamamoto ve ark., 1986; Tsuji ve ark., 1990; Tsuji ve ark., 1990a) temel karbon kaynağı olarak %0,5 oranında L-Fukoz ve D-Arabinoz içeren fermentasyon ortamlarında 180 rpm çalkalama hızında, 30⁰C'de

gerçekleştirilen üretimlerinin ardından tayin edilen enzim aktiviteleri Çizelge 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.7 Mezofilik *Bacillus* izolatlarının L-Fukoz ve D-Arabinoz varlığındaki α -L-fukosidaz aktiviteleri (mU/ml)

Farklı Karbon Kaynaklarında α -L-Fukosidaz Aktiviteleri (mU/ml)		
İzolat Kodu	L-Fukoz	D-Arabinoz
<i>Bacillus</i> Ege.B.1.1.ka	18,0	-
<i>Bacillus</i> Ege.B.1.d.2	4,89	2,44
<i>Bacillus</i> Ege.B.1.d.10	2,88	1,33
<i>Bacillus</i> Ege.B.24.1i	10,0	-
<i>Bacillus</i> Ege.B.24.2i	0,444	-
<i>Bacillus</i> Ege.B.24.4i	4,44	4,66
<i>Bacillus</i> Ege.B.36.1	6,22	2,44
<i>Bacillus</i> Ege.B.i.1.4	9,55	-
<i>Bacillus</i> Ege.B.25.1	-	15,77
<i>Bacillus</i> Ege.B.19.4i	6,88	8,88
<i>Bacillus</i> Ege.B.42.4	-	6,67
<i>Bacillus</i> Ege.B.42.6	2,22	-
<i>Bacillus</i> Ege.B.13.5i	7,78	-
<i>Bacillus</i> Ege.B.42.2	-	4,22
<i>Bacillus</i> Ege.B.42.5	6,22	2,44
<i>Bacillus</i> Ege.B.12.2i	7,78	0,222
<i>Bacillus</i> Ege.B.19.6i	5,33	0,222
<i>Bacillus</i> Ege.B.38.2	-	7,33
<i>Bacillus</i> Ege.B.42.3	-	8,66
<i>Bacillus</i> Ege.B.i.1.2	-	8,22
<i>Bacillus</i> Ege.B.19.2i	-	3,33
<i>Bacillus</i> Ege.B.38.1	3,78	4,66
<i>Bacillus</i> Ege B. 5.2i	11,56	5,48
<i>Bacillus</i> Ege B. 1.4.P	0,888	1,22

-, Aktivite Saptanamadı

Yapılan çalışmalarda farklı mikroorganizmalarda, farklı karbon kaynaklarının α -L-fukosidaz aktivitesini değişik şekillerde etkilediği belirtilmektedir. Çalışmamızda da benzer bulgular saptanmıştır.

Kurimura ve ark. (1995)'nın yaptığı bir çalışmada, mezofilik *Bacillus* izolatları temel karbon kaynağı olarak L-Fukoz içeren kompleks fermentasyon ortamında büyütüldüğünde α -L-fukosidaz aktivitesi 48,8 mU/ml olarak saptanmıştır. Bizim mezofilik *Bacillus* izolatları ile yaptığımız çalışmada ise L-fukoz kullanıldığında 0,444-18,0 mU/ml aralığında enzim aktiviteleri elde edilmiştir.

Streptomyces sp. ile yapılan çalışmalarda α -L-fukosidaz enzim üretimi, temel karbon kaynağı olarak L-fukozun kullanıldığı sıvı kültür ortamında gerçekleştirilmiştir. Burada üretilen enzimin yapay bir substrat olan *p*-nitrofenil α -L-fukopranozidi parçalayarak L-fukozu ayırma yeteneğinde olmadığı görülmüştür. Bu organizmada üretilen enzimin aktivite tayininde substrat olarak PGM kullanılmıştır (Sano ve ark., 1992). Aynı organizmanın enzim üretiminde kullanıldığı bir başka çalışmada PGM tek karbon kaynağı olarak kullanılmış, sıvı kültürde gerçekleştirilen bu çalışmada enzimin iki farklı formu, iki farklı fazda elde edilmiştir. Bunlardan biri *p*-nitrofenil α -L-fukopranozidi parçalayarak, PGM'yi parçalayamazken diğer fazda elde edilen enzim tam tersi mekanizma ile çalışmaktadır. Enzimin iki farklı bağ tipine spesifik formları, saflaştırma basamaklarında elde edilen fraksiyonlar ile birbirinden ayrılabilmiştir. Bu çalışmada enzim aktivitesi tayininde substrat olarak hem *p*-nitrofenil α -L-fukopranozid, hem de PGM kullanılmıştır (Goso ve ark., 2001).

Farklı karbon kaynaklarının (substratların) α -L-fukosidaz enzim üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla ise L-Fukoz ve D-Arabinoz ile yapılan denemelerinin ardından PGM ile yapılan denemelerin sonuçları da göz önüne alınarak en yüksek enzim aktivitesi veren altı mezofilik izolatta, dokuz farklı temel karbon kaynağı daha denenerek α -L-fukosidaz aktivitesi tayin edilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.8'de verilmiştir. Bu veriler Şekil 4.1-4.6'da verilen grafiklerde de yer almaktadır.

Çizelge 4.8 Altı mezofilik *Bacillus* izolatının farklı temel karbon kaynaklarına göre α -L-fukosidaz aktiviteleri (mU/ml)

Farklı Karbon Kaynaklarında α -L-Fukosidaz Aktiviteleri (mU/ml)												
İzolat Kodu	PGM	L-Fukoz	D-Arabinoz	D-Glukoz	D-Laktoz	N-Asetil-D-Glukozamin	D-Fruktoz	Sakaroz	D-Maltoz	D-Ksiloz	D-Mannoz	D-Galaktoz
<i>Bacillus</i> Ege.B.1.1.ka	10,67	18,0	-	17,33	2,22	12,89	6,67	-	4,22	9,77	-	12,2
<i>Bacillus</i> Ege.B.1.d.2	83,44	4,89	3,11	10,88	8,22	6,0	-	-	-	13,6	23,11	4,89
<i>Bacillus</i> Ege.B.1.d.10	84,4	2,88	1,33	6,88	22,89	1,56	9,11	-	49,77	20,9	18,67	9,78
<i>Bacillus</i> Ege.B.24.1i	23,77	10,0	-	24,0	2,44	-	-	-	-	18,7	26,22	60,4
<i>Bacillus</i> Ege.B.24.2i	24,67	-	-	2,0	63,11	1,78	34,0	-	3,78	20,9	6,88	-
<i>Bacillus</i> Ege.B.24.4i	19,77	-	4,66	1,78	11,33	31,55	-	21,55	15,77	12,1	-	-

-, Aktivite Saptanamadı

Çizelge 4.8’de de görüldüğü gibi, farklı mikroorganizmalarda farklı karbon kaynaklarının enzim aktivitesine etkisi değişiklik göstermektedir. Temelde seçilmiş altı mikroorganizma da kompleks fermentasyon ortamlarında PGM varlığında enzim aktivitesine sahiptir. Bunlardan *Bacillus* Ege.B.1.d.2 ve *Bacillus* Ege.B.1.d.10 temel karbon kaynağı olarak PGM’yi kullanarak, gerçekleştirilen taramadaki en yüksek enzim aktivitesi değerini vermiştir. Diğer izolatlardan *Bacillus* Ege.B.24.1i ve *Bacillus* Ege.24.2i’de ise temel karbon kaynağı olarak sırasıyla D-Galaktoz ve D-Laktoz varlığında PGM ve diğer karbon kaynaklarına kıyasla yüksek aktivite değerleri saptanmıştır. Bunun nedeni, PGM gibi kompleks yapılı bileşenlerin α -L-fukosidaz enzim üretiminde daha etkili sonuç vermesinin yanında, D-laktoz, D-galaktoz, D-maltoz gibi karbonhidratların temel karbon kaynağı olduğu ortamlarda PGM’ye kıyasla yüksek enzim aktiviteleri veren organizmalar için, α -L-fukosidaz enzim üretiminin, bu glikanları (karbonhidrat yapılı bileşenleri) kullanarak meydana gelen transglikozilasyon aktivitesinden (fukoziltransferaz) kaynaklandığı düşünülmektedir (Ajisaka ve ark., 1998; Farkas ve ark., 2000; Berteau ve ark., 2004).

Ajisaka ve ark. (1998), *Penicillium multicolor*’un PNPF’yi donör olarak kullanarak transglikozilasyon reaksiyonu ile α -1,3 bağlı fukozil disakkaritlerin (α -L-fuc-(1 $\rightarrow$ 3)-D-Glc) %49’luk bir verimle üretildiğini açıklamıştır.

Tsuji ve ark. (1990a), *Bacillus circulans* ile yaptıkları çalışmada, α -L-fukosidaz aktivitesine farklı karbon kaynaklarının etkisini incelemiş ve PNPF ile gerçekleştirdikleri aktivite tayininde enzim aktivitesi, kompleks besin ortamında D-glukoz kullanıldığında 56 mU/ml, D-galaktozda 59 mU/ml, D-mannozda 81 mU/ml, D-fruktozda 72 mU/ml, D-maltozda 3 mU/ml, D-sakkaroz ve D-laktozda 8 mU/ml, L-fukozda 82 mU/ml, D-arabinozda 13 mU/ml, D-ksilozda 2 mU/ml, glukozaminde 1 mU/ml, insan sütü oligosakkaritlerinde 65 mU/ml ve PGM'de 58mU/ml olarak verilmiştir.

Kurimura ve ark. (1995), çeşitli *Bacillus* sp. izolatları (K40T, F257, F346) ve *B.aneurinolyticus*, *B.brevis*, *B.circulans*, *B.licheniformis*, *B.megaterium*, *B.pumilus*, *B.sphaericus*, *B.subtilis* ile yaptıkları çalışmada ise aktivite tayininde PNPF kullanıldığında sadece *B.circulans* türlerinde (IFO3329 ve M28) D-glukoz, L-fukoz ve PGM içeren kompleks besin ortamlarında sırasıyla *B.circulans* IFO3329'da D-glukoz için 0,2 mU/ml, L-fukoz için 18,3 mU/ml, PGM için 4,2 mU/ml; *B.circulans* M28'de D-glukoz için 5,9 mU/ml, L-fukoz için 48,8 mU/ml, PGM için 41,5 mU/ml değerleri saptanmıştır. Çalışmada kullanılan diğer türlerde ise enzim aktivitesi saptanamamıştır.

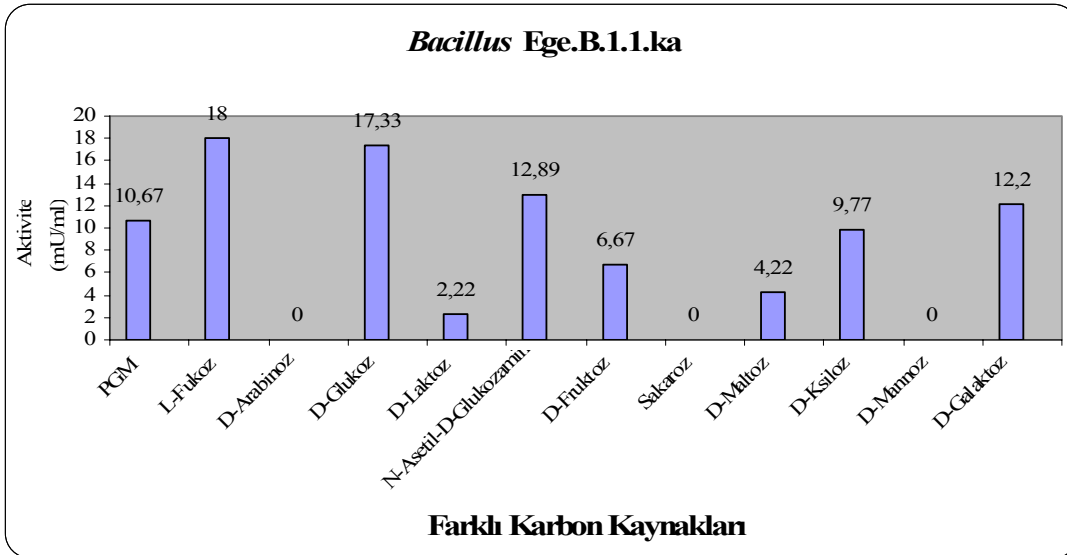
Tsuji ve ark. (1990), *Bacillus circulans* ile yaptıkları bir başka çalışmada ise temel karbon kaynağı olarak %0,5 oranında glikoz kullanılmış, dört günlük fermentasyon sonunda enzim aktivitesinin maksimum değerine ulaştığı saptanmıştır (85,8 mU/ml).

Yano ve ark. (1985), yaptıkları çalışmada *Fusarium oxysporum*'u aktif çamurda üreterek PNPF'ye karşı enzim aktivitesini 3,82 U/ml olarak tespit etmişlerdir. Bu çalışmada organizma %0,5 glukoz içeren kompleks ortamda büyütüldüğünde α -L-fukosidaz aktivitesi saptanamamıştır. Yamamoto ve ark. (1986) ise aynı organizmayı iki gün D-glukozda büyüttükten sonra %0,2 L-fukoz içeren ortama transfer ederek, L-fukozun enzim aktivitesini nasıl indüklediğini göstermişlerdir. D-glukoz içeren ortamda 36. saatin sonunda 0,7 U/ml enzim aktivitesi saptanmışken, L-fukoz içeren ortama aktarılan *Fusarium oxysporum*'da 7. günün sonunda 1,335U/ml enzim aktivite değerine ulaşılmıştır. Benzer etki D-arabinoz varlığında da yaşanmış fakat bu durumda enzim aktivitesi L-fukoz'da elde edilen değer 1/8'ine gerilemiştir. D-fukoz, L-arabinoz, D-glukoz, D-

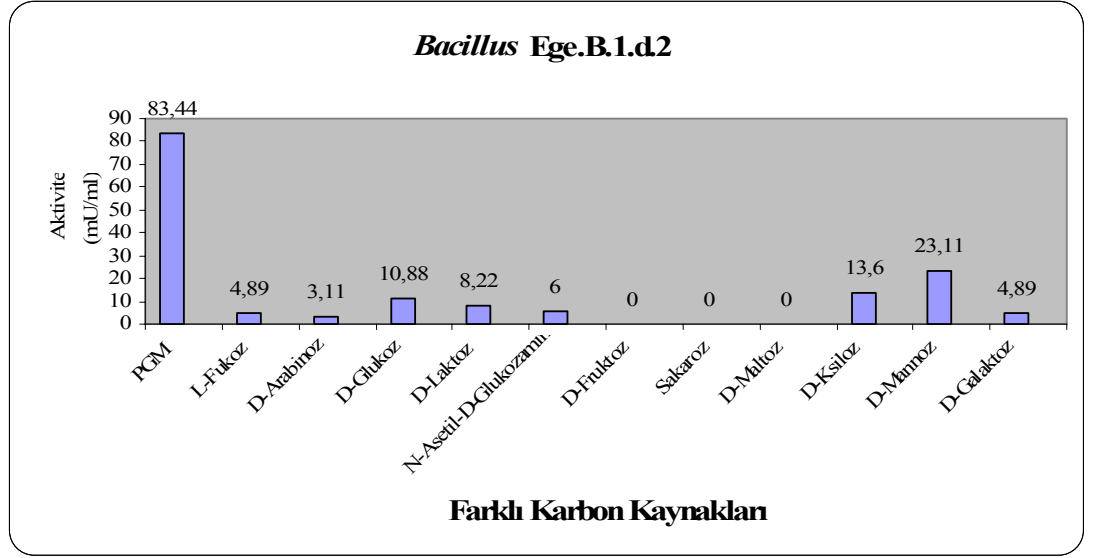
galaktoz, D-fruktoz, D-mannoz, D-ksiloz, L-ramnoz, D-glukozamin, D-galaktozamin, N-asetil-D-galaktozamin, maltoz ve sakaroz fungusun büyümesini teşvik etmesine rağmen enzim aktivitesinde olumlu bir etki yaratmamıştır. Ayrıca çeşitli denemeler sonunda, üretilen enzimin, *p*-nitrofenil α -L-fukopranozidin yanısıra, PGM ve insan tükürüğünde kan grubu bileşeninden fukoz residülerini ayırma yeteneğinde olduğu belirlenmiştir. Bu durum elde edilen enzimin geniş bir substrat spesifitesine sahip olduğunu göstermektedir. Böyle çok yönlü bir enzim için, tek bir organizmada enzimin multiformlarının üretilmesi önemli bir veridir.

Kurimura ve ark. (1995), çeşitli *Bacillus* izolatları ile yaptıkları çalışmada, yapılan serolojik testlerde bu organizmalardan üretilen enzimin PGM, insan sütü ve insan tükürüğünde de bulunan çeşitli kan grubu O(H) aktif bileşenlerini parçalayabildiği ve A-, B- ve O- eritrositlerine etki ettiği tespit edilmiştir. Enzimin çeşitli glikoprotein ve oligosakkaritlerdeki α -1,2-, 1,3- ve 1,4- L-fukosidik bağlarını kopardığı fakat 6-O- α -L-fukopiranozil-N-asetilglukozamin ve sığır thyroglobulinindeki α -1,6-L-fukosidik bağlarını hidrolize edemediği gösterilmiştir.

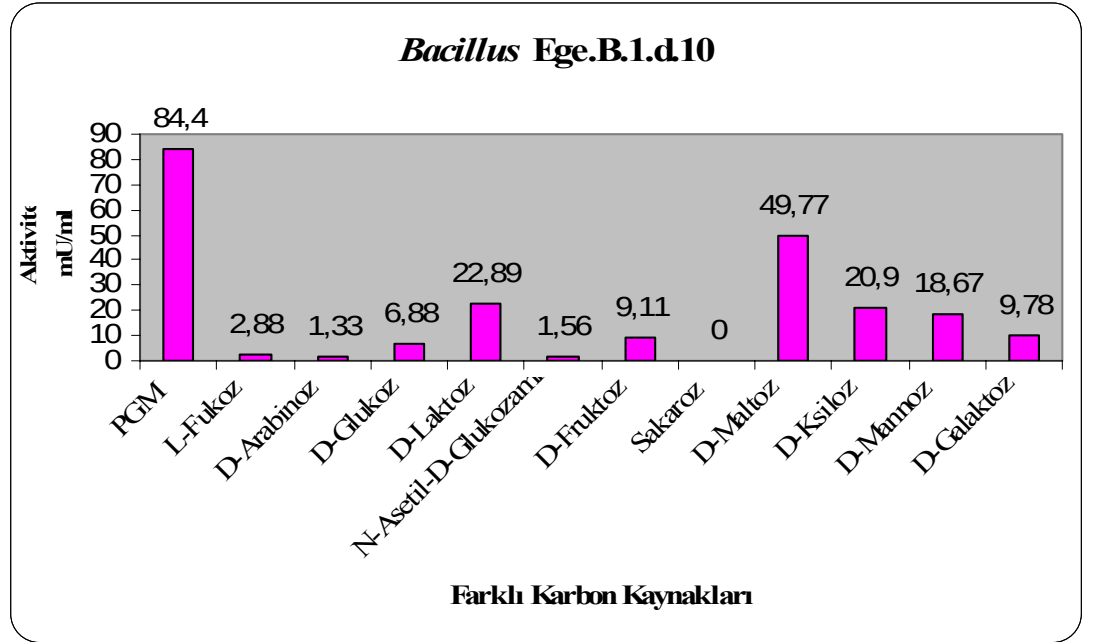
Yaptığımız bu çalışma da literatür bilgileriyle örtüşerek, α -L-fukosidaz enziminin üretiminde kompleks yapıli bileşenlerin daha etkili sonuç verdiğini kanıtlanmaktadır.



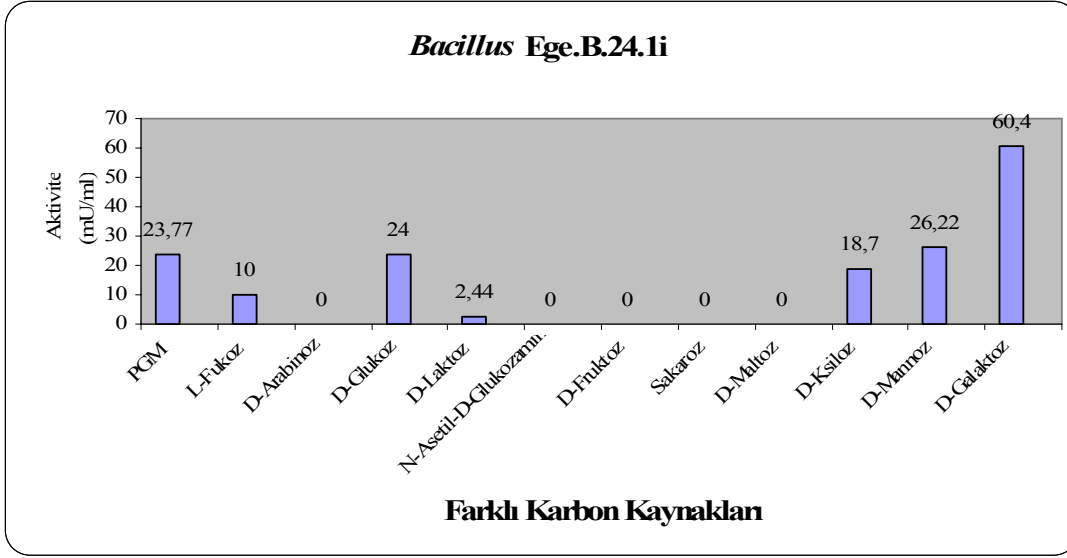
Şekil 4.1 *Bacillus* Ege.B.1.1.ka izolatının farklı temel karbon kaynakları kullanıldığında tespit edilen α -L-fukosidaz aktiviteleri (mU/ml)



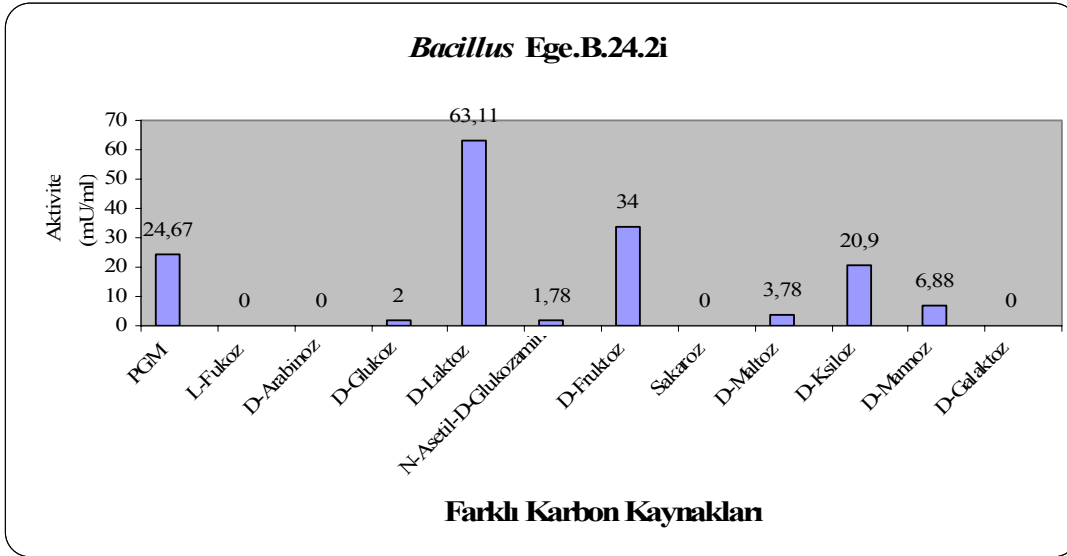
Şekil 4.2 *Bacillus Ege.B.1.d.2* izolatının farklı temel karbon kaynakları kullanıldığında tespit edilen α -L-fukosidaz aktiviteleri (mU/ml)



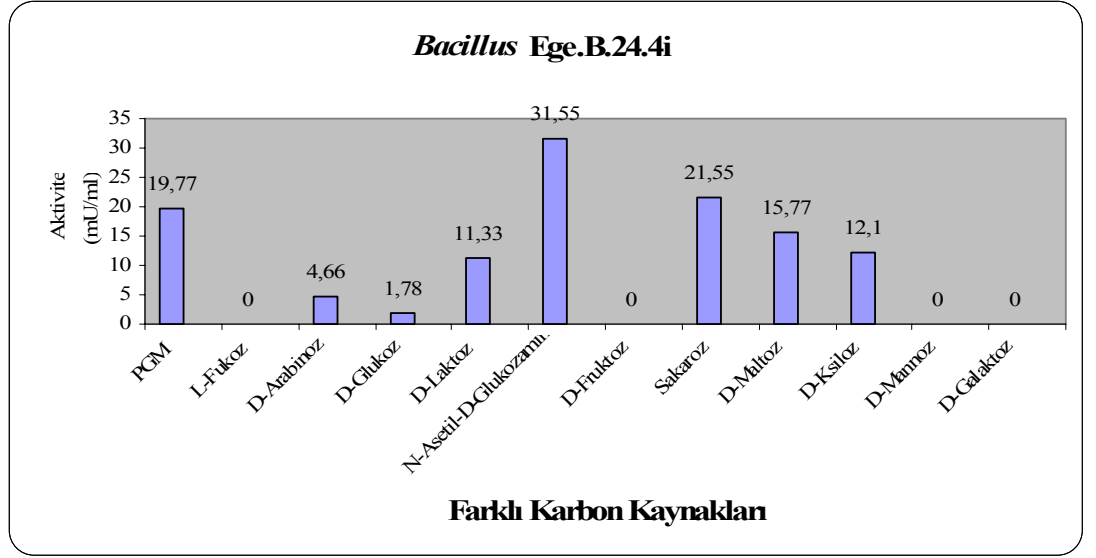
Şekil 4.3 *Bacillus Ege.B.1.d.10* izolatının farklı temel karbon kaynakları kullanıldığında tespit edilen α -L-fukosidaz aktiviteleri (mU/ml)



Şekil 4.4 *Bacillus* Ege.B.24.1i izolatının farklı temel karbon kaynakları kullanıldığında tespit edilen α -L-fukosidaz aktiviteleri (mU/ml)



Şekil 4.5 *Bacillus* Ege.B.24.2i izolatının farklı temel karbon kaynakları kullanıldığında tespit edilen α -L-fukosidaz aktiviteleri (mU/ml)



Şekil 4.6 *Bacillus* Ege.B.24.4i izolatının farklı temel karbon kaynakları kullanıldığında tespit edilen α -L-fukosidaz aktiviteleri (mU/ml)

4.2.1.2 Endospor İçeren Bazı Termofilik İzolatlarda Farklı Karbon Kaynaklarının α -L-Fukosidaz Enzim Üretimi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

α -L-fukosidaz enzim aktivitesi yönünden taranan 60 adet endospor içeren termofilik izolatına ait enzim aktivite sonuçlarına dayanarak en yüksek enzim aktivitesi veren beş izolatın, her biri %0,5 oranında 11 farklı karbon kaynağı içeren kompleks fermentasyon ortamlarında 65⁰C’de, 140 rpm çalkalama hızında 48 saatlik üretimlerinin ardından enzim aktivite tayini gerçekleştirilmiştir. Enzim aktivite tayini 37⁰C’de gerçekleştirilmiştir. Bunun nedeni, taranan 60 termofilik izolat arasında en yüksek enzim aktivitelerinin 37⁰C’de tespit edilmesidir. Yapılan ölçümlere ilişkin veriler Çizelge 4.9’da görülmektedir.

Çizelge 4.9 Endospor içeren termofilik beş izolatin farklı temel karbon kaynaklarına göre α -L-fukosidaz aktiviteleri (mU/ml)

Farklı Karbon Kaynaklarında α -L-Fukosidaz Aktiviteleri (mU/ml)												
Termofilik İzolat Kodu	PGM	L-Fukoz	D-Arabinoz	D-Glukoz	D-Laktoz	N-Asetil-D-Glukozamin	D-Fruktoz	Sakaroz	D-Maltoz	D-Ksiloz	D-Mannoz	D-Galaktoz
İzolat 43	83,11	-	7,56	48,37	13,33	-	2,67	-	79,88	1,33	-	-
İzolat 13	42,44	38,0	-	28,33	24,0	3,33	44,66	-	-	1,11	-	20,67
İzolat 36	28,89	45,33	11,77	30,44	30,67	1,56	68,76	-	-	28,89	-	29,11
İzolat 41	24,88	3,78	12,0	17,56	3,11	12,56	2,0	65,0	70,67	24,88	-	46,88
İzolat 24	24,67	-	12,88	32,78	30,88	24,44	1,78	44,88	48,88	1,78	-	32,66

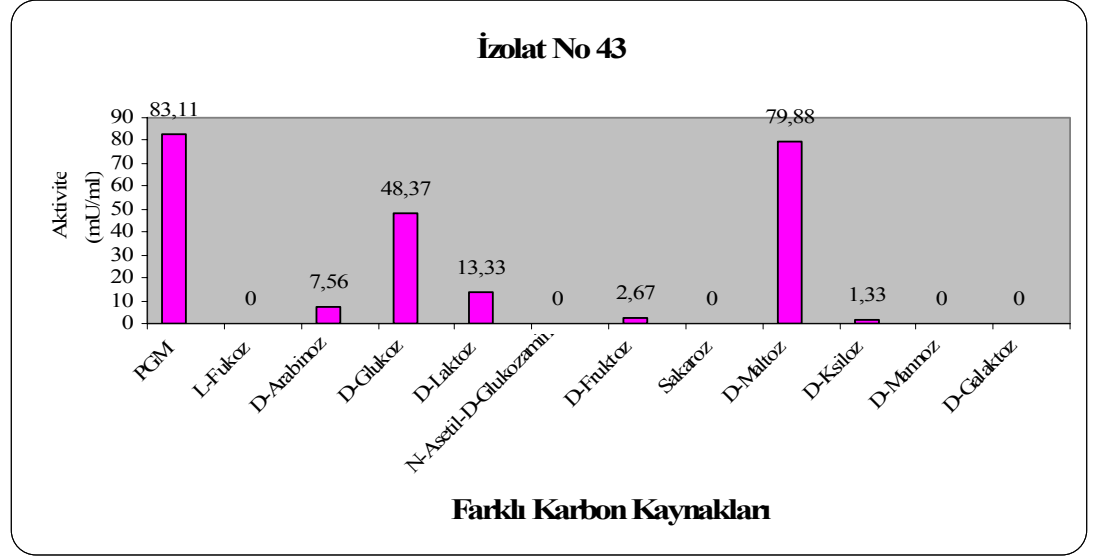
-, Aktivite Saptanamadı

Termofilik izolatlar için de mezofilik izolatlardaki gibi farklı izolatlar, besin ortamındaki farklı karbon kaynaklarının varlığında değişen α -L-fukosidaz aktivitelerine sahiptir. Çizelge 4.9 ve Şekil 4.7-4.11’de de görüldüğü gibi en yüksek değer PGM ile elde edilirken, D-maltoz, D-glukoz, D-galaktoz, fruktoz, sakaroz ve L-fukoz içeren ortamlarda göreceli olarak yüksek aktiviteler saptanmıştır. Bu veriler ışığında da α -L-fukosidaz üretilen bu enzimler için transglukozilasyon (fukoziltransferaz) aktivitesinden şüphelenmek mümkündür (Osano ve ark., 2007).

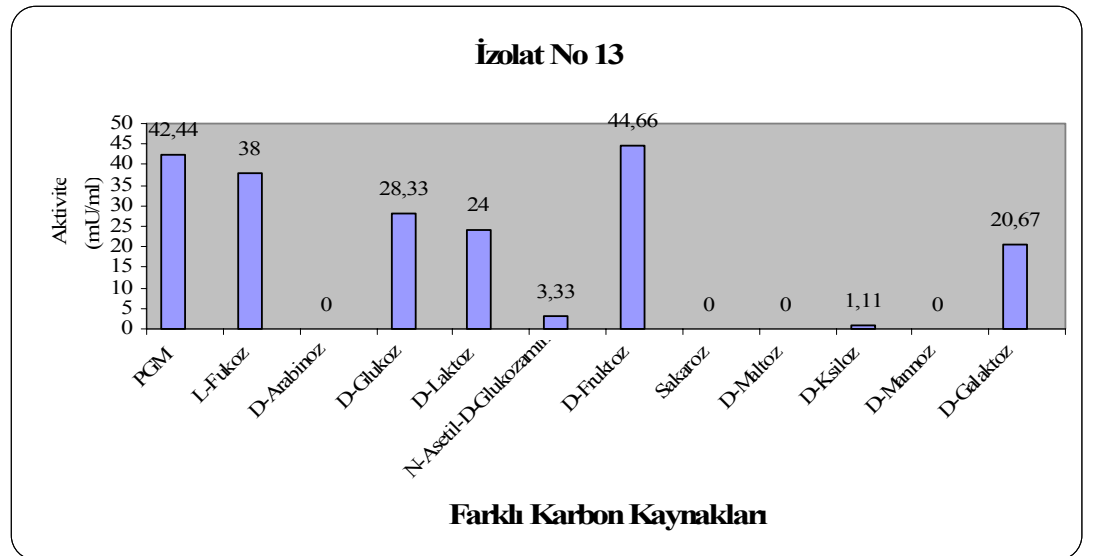
Eneyskaya ve ark. (2001), yaptıkları çalışmada temel karbon kaynağı belirtilmeyen yarı-sentetik fermentasyon ortamında 45⁰C’de gerçekleştirilen üretim sonucu PNPF’ye karşı 12 mU/ml enzim aktivitesi tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda α -L-fukosidazın glikoproteinlerden toplam α -L-fukozun %30’unu ayırabildiği (24 saatte, 1 mg substrat başına 2U α -L-fukosidaz), muamele zamanının veya konsantrasyondaki artışın bu ayrılmanın oranını değiştirmedeği gözlenmiştir.

Ayrıca Eneskaya ve ark. (2001), α -L-fukosidaz enzim aktivitesi saptadıkları *Thermus* sp. izolatu için transglukozilasyon aktivitesini de tayin ederek, bu organizmanın ürettiği enzimin PNPF’yi fukozil donörü (substrat) olarak

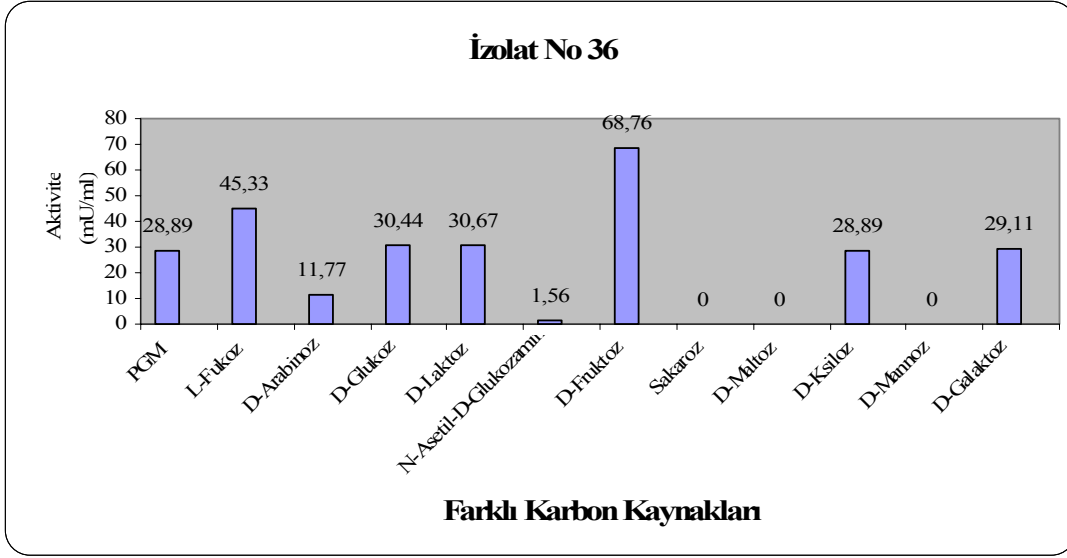
kullandığını tespit edilmiştir. *Thermus* izolatına ait α -L-fukosidazın transglikozilasyon aktivitesi, biyoteknolojinin potansiyel ilgi alanı olan fukozil içeren oligosakkaritlerin ve alkil fukosidazların enzimatik sentezi için önem taşımaktadır.



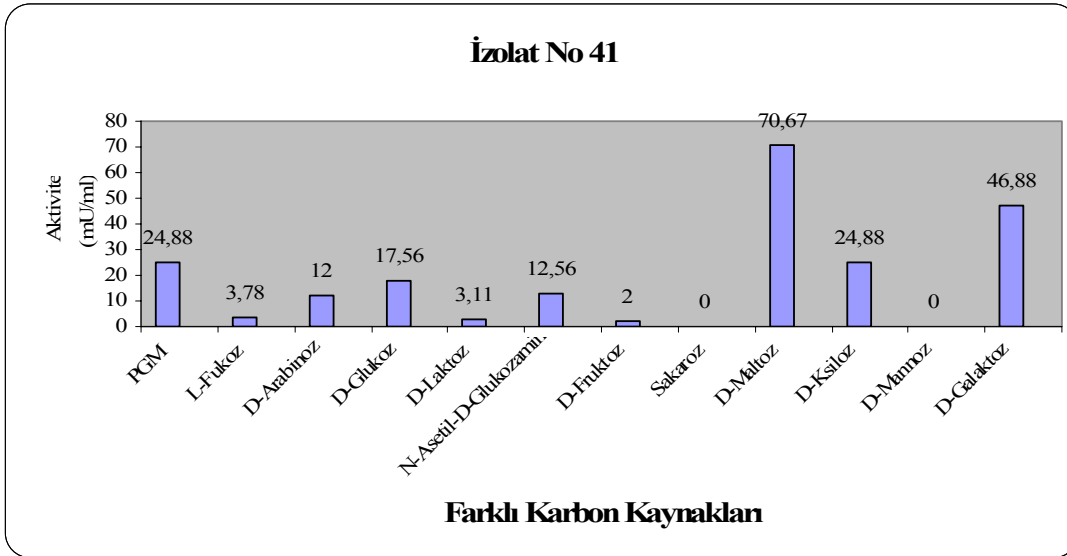
Şekil 4.7 43 nolu termofilik izolatın farklı temel karbon kaynakları kullanıldığında tespit edilen α -L-fukosidaz aktiviteleri (mU/ml)



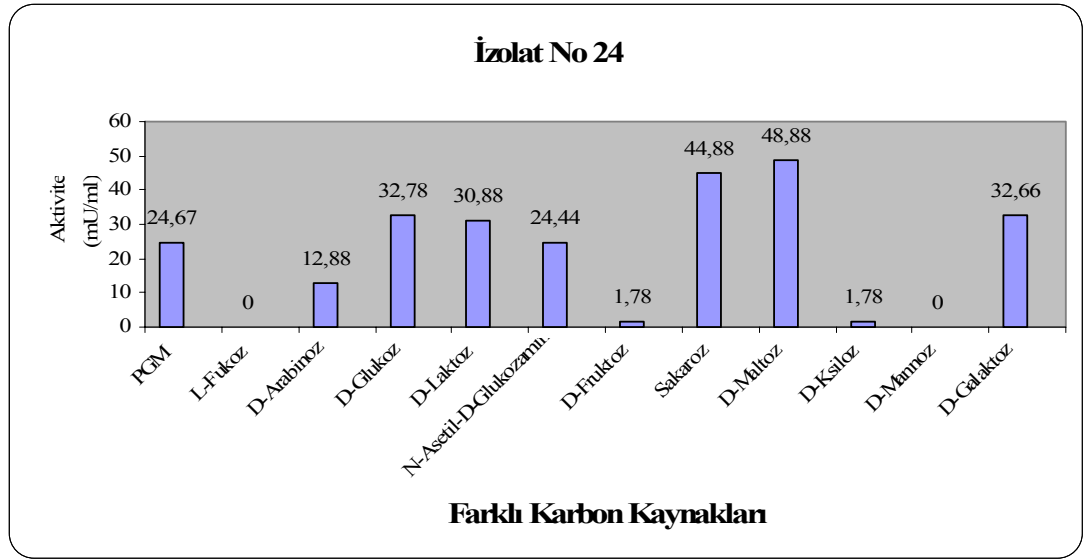
Şekil 4.8 13 nolu termofilik izolatın farklı temel karbon kaynakları kullanıldığında tespit edilen α -L-fukosidaz aktiviteleri (mU/ml)



Şekil 4.9 36 nolu termofilik izolatın farklı temel karbon kaynakları kullanıldığında tespit edilen α -L-fukosidaz aktiviteleri (mU/ml)



Şekil 4.10 41 nolu termofilik izolatın farklı temel karbon kaynakları kullanıldığında tespit edilen α -L-fukosidaz aktiviteleri (mU/ml)



Şekil 4.11 24 nolu termofilik izolatın farklı temel karbon kaynakları kullanıldığında tespit edilen α -L-fukosidaz aktiviteleri (mU/ml)

α -L-fukosidaz enzim aktivitesi yönünden endospor içeren termofilik bakterilerin tarandığı bir çalışma halen mevcut değildir.

Çizelge 4.8 ve 4.9’da görüldüğü üzere, temel karbon kaynağı olarak %0,5 PGM içeren kompleks fermentasyon ortamında α -L-fukosidaz enzim aktivitesi yönünden taranan 100 adet mezofilik ve 60 adet termofilik izolattan en yüksek enzim aktivitesi veren izolatlar teker teker değerlendirildiğinde izolatların her birinde farklı karbon kaynaklarında en yüksek α -L-fukosidaz enzim aktivitesi saptandığı görülmektedir.

Mezofilik ve termofilik izolatlar için çizelgeler (Çizelge 4.8, 4.9) genel olarak değerlendirildiğinde en yüksek α -L-fukosidaz enzim aktivitesinin substrat olarak PGM kullanıldığında elde edildiği görülmektedir.

Literatürde *Bacillus* genusuna ait bakterilerle yapılan çalışmalara ait verilere bakıldığında fermentasyon ortamında temel karbon kaynağı olarak PGM ve enzim aktivite tayininde de substrat olarak PGM kullanıldığında en yüksek enzim aktivitelerine ulaşılmıştır (Tsuji ve ark., 1990a, 107mU/ml; Kurimura ve ark., 1995, 153mU/ml). Bu noktada dikkat çekici olan enzimin farklı bağ tiplerine spesifik formlarının üretildiğidir. Yapılan bu çalışmalarda aktivite tayininde substrat olarak PNPF kullanıldığında ise, Tsuji ve ark. 1990a, 58 mU/ml; Kurimura ve ark. 1995, 41,5mU/ml; Egnund ve ark. 1969, 63,7mU/ml değerlerini

elde etmişlerdir. Çalışmamızda elde ettiğimiz verilerin bu değerlerin üzerinde olduğu görülmektedir.

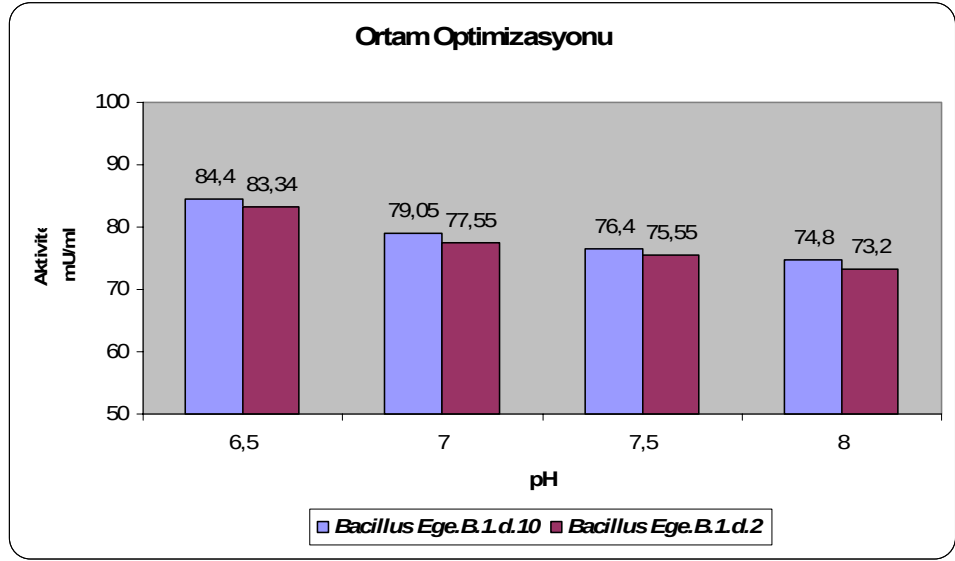
4.2.2 Farklı ortam koşullarının α -L-fukosidaz üretimine etkisinin belirlenmesi

12 farklı karbon kaynağının (substratların) α -L-fukosidaz üretimi üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan denemelerin ardından, iki mezofilik ve bir termofilik izolatta enzim üretimlerinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemeler sonucu organizmalarda enzim üretimine ait optimum ortam koşulları ortaya konulmuştur. Farklı ortam koşullarında ölçülen enzim aktiviteleri Çizelge 4.10 ve 4.11’de verilmiştir. Şekil 4.12- 4.16’da elde edilen veriler karşılaştırılmıştır.

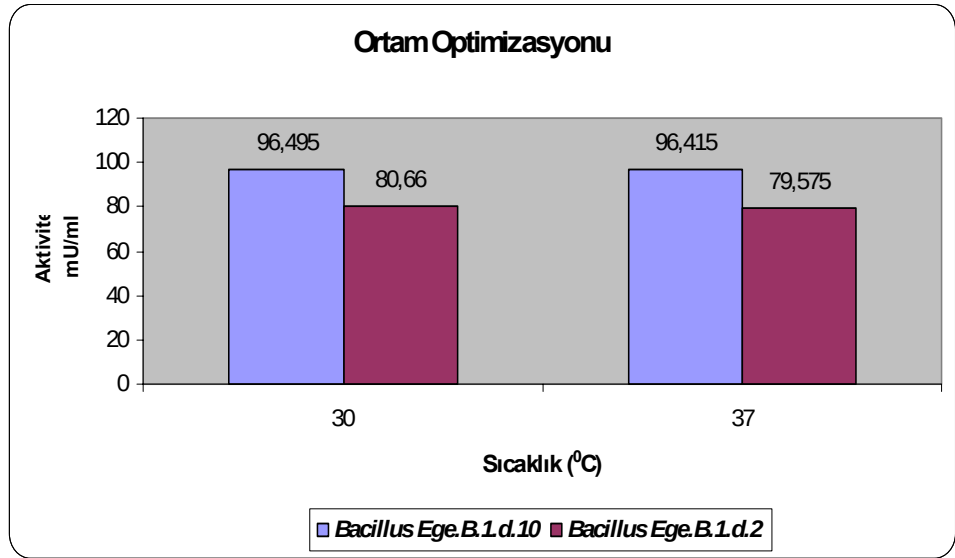
4.2.2.1 Bazı mezofilik *Bacillus* izolatlarında farklı ortam koşullarının α -L-fukosidaz enzim üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi

Çizelge 4.10 *Bacillus* Ege.B.1.d.2 ve *Bacillus* Ege.B.1.d.10 izolatlarında farklı pH, sıcaklık ve PGM oranlarında tespit edilen enzim aktiviteleri

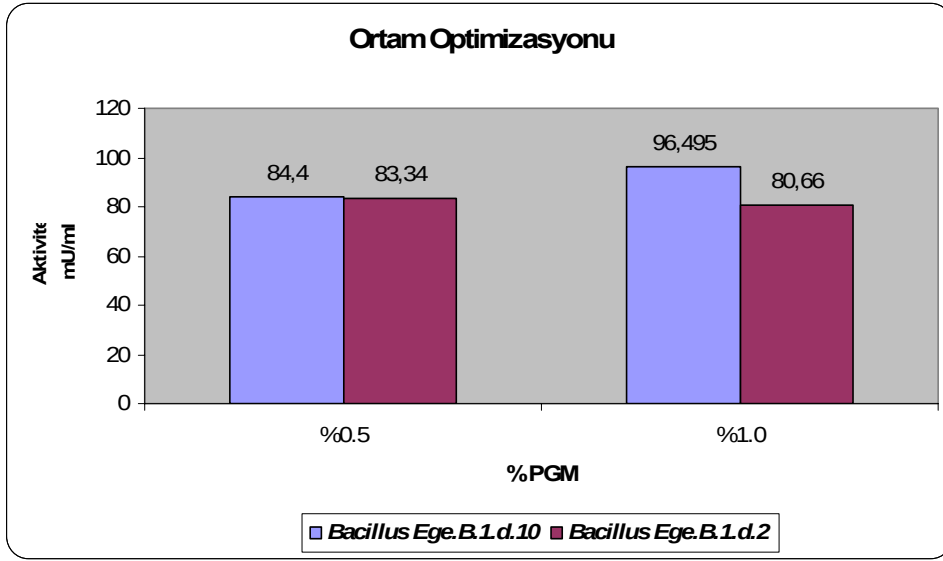
Ortam Koşulları	Aktivite (mU/ml)	
	<i>Bacillus</i> Ege.B.1.d.10	<i>Bacillus</i> Ege.B.1.d.2
30 °C, % 0,5 PGM, 180 rpm, pH 6,5	84,4	83,34
30 °C, % 0,5 PGM, 180 rpm, pH 7,0	79,05	77,55
30 °C, % 0,5 PGM, 180 rpm, pH 7,5	76,385	75,455
30 °C, % 0,5 PGM, 180 rpm, pH 8,0	74,775	73,115
30 °C, % 1 PGM, 180 rpm, pH 6,5	96,495	80,66
37 °C, % 1 PGM, 180 rpm, pH 6,5	96,415	79,575



Şekil 4.12 *Bacillus Ege.B.1.d.2* ve *Bacillus Ege.B.1.d.10* izolatlarında 30 °C, 180 rpm ve %0,5 PGM koşullarında farklı pH değerlerinin enzim aktivitesine etkisi



Şekil 4.13 *Bacillus Ege.B.1.d.2* ve *Bacillus Ege.B.1.d.10* izolatlarında 180 rpm ve %1 PGM ve pH6,5 koşullarında farklı sıcaklık değerlerinin enzim aktivitesine etkisi



Şekil 4.14 *Bacillus Ege.B.1.d.2* ve *Bacillus Ege.B.1.d.10* izolatlarında 30 °C, 180 rpm ve pH 6,5 koşullarında farklı %PGM değerlerinin enzim aktivitesine etkisi

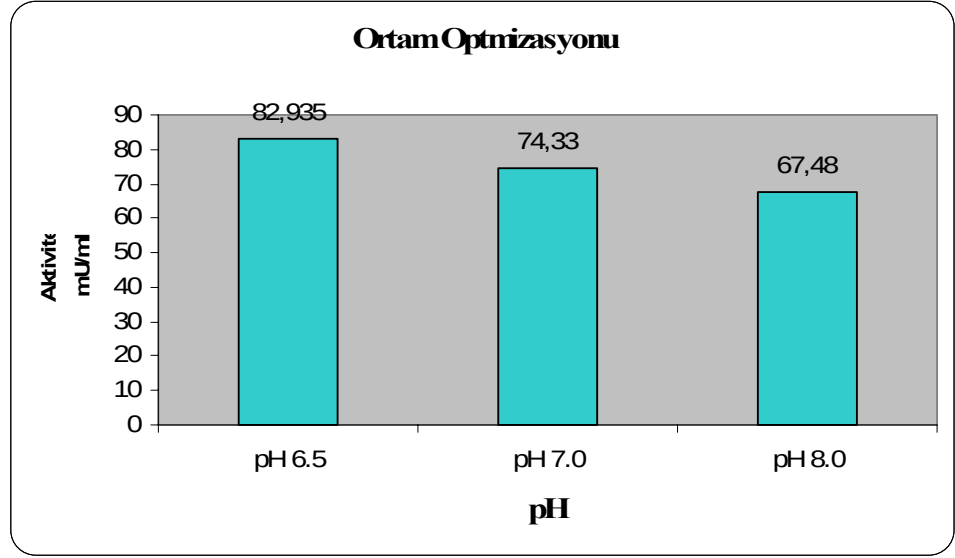
Mezofilik izolatlar için 30°C’de farklı pH değerleri (pH 6,5-7,0-7,5-8,0) incelendiğinde optimum ortam pH’sı 6,5 olarak belirlenmiştir. 30°C, 180 rpm, pH 6,5’da maksimum enzim aktivitesi ***Bacillus Ege.B.1.d.10*** için %1’lik PGM oranı ile elde edilirken ***Bacillus Ege.B.1.d.2*** için %0,5’lik PGM oranıyla elde edilmiştir. Maksimum enzim aktivitesi için kullanılan substrat konsantrasyonunun izolatlar göre değişiklik gösterebileceği saptanmıştır. 37 °C’lik sıcaklıkta, %1 PGM oranında, her iki izolatın enzim aktivitelerinde belirgin bir artış meydana gelmemiştir.

4.2.2.2 Endospor içeren termofilik izolatta farklı ortam koşullarının

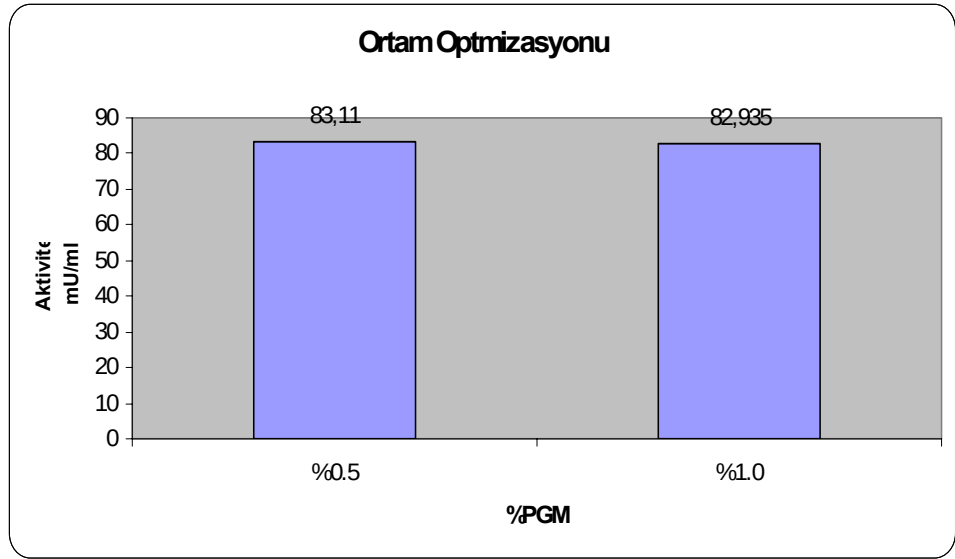
α -L-fukosidaz enzim üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi

Çizelge 4.11 Termofilik 43 nolu izolatta farklı pH ve PGM oranlarında tespit edilen enzim aktiviteleri

Ortam Koşulları	Aktivite (mU/ml)
65 °C, % 0,5 PGM, 140 rpm, pH 6,5	83,11
65 °C, % 0,5 PGM, 140 rpm, pH 7,0	74,33
65 °C, % 0,5 PGM, 140 rpm, pH 8,0	67,48
65 °C, % 1 PGM, 140 rpm, pH 6,5	82,935



Şekil 4.15 Termofilik 43 nolu izolatta 65⁰C, 140 rpm ve %0,5 PGM koşullarında farklı pH değerlerinin enzim aktivitesine etkisi



Şekil 4.16 Termofilik 43 nolu izolatta 65⁰C, 140 rpm ve pH 6,5 koşullarında farklı % PGM değerlerinin enzim aktivitesine etkisi

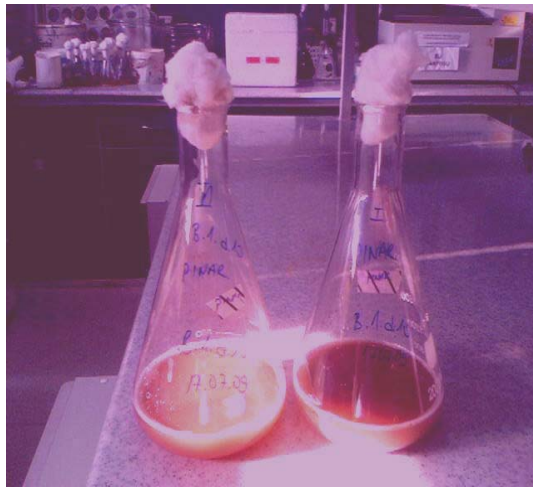
Termofilik izolat için 65⁰C’de farklı pH değerleri (pH 6,5-7,0-8,0) incelendiğinde optimum ortam pH’sı 6,5 olarak belirlenmiştir. 65⁰C, 140 rpm, pH 6,5’da maksimum enzim aktivitesi %0,5’lik PGM oranı ile elde edilmiştir. Burada elde edilen sonuç mezofilik izolat *Bacillus* Ege.B.1.d.10’un tam tersi olmuştur. Bunun nedeni, artan PGM oranının büyümeyi teşvik ederek yüksek sıcaklıkta

çözünürlüğü giderek azalan oksijenin daha da kısıtlı hale gelmesi olarak açıklanabilir.

α -L-fukosidaz enzimi ile yapılan çalışmaların büyük bir kısmı, kısmi saflaştırma ve karakterizasyon üzerinde yoğunlaştığından bizim çalışmamızdaki gibi ölçek büyütme öncesi optimum ortam koşullarının tespit edilmesine gerek duyulmamıştır.

4.3 Seçilen Mezofilik *Bacillus* İzolatı ve Endospor İçeren Termofilik İzolatta α -L-Fukosidaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması

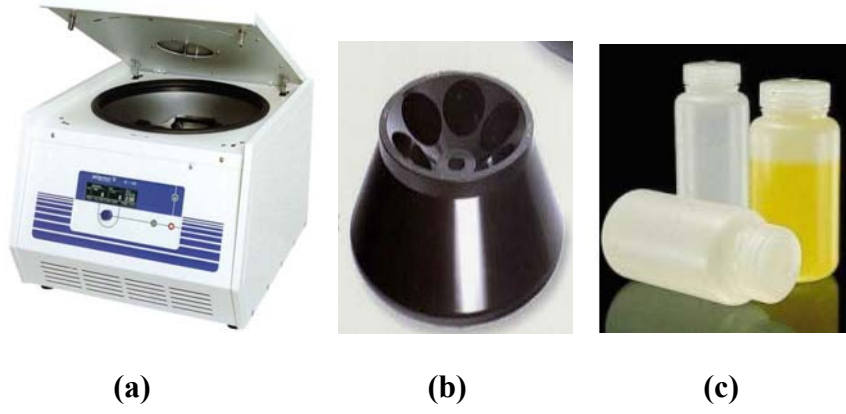
Mezofilik *Bacillus* ve endospor içeren termofilik bakteri izolatlarında enzim üretimlerini maksimum seviyelere taşıyan koşulların belirlenmesinin ardından mezofilik *Bacillus* Ege.B.1.d.10 ve 43 nolu termofilik izolat ölçek büyütülerek toplamda iki litrede (500mlx4) derin kültür fermentasyonu ile %1 PGM oranı, pH 6.5, sıcaklıklar sırasıyla 30°C ve 65°C’de, 160 rpm çalkalama hızında büyütülerek üretilen α -L-fukosidaz enzimlerinin kısmi saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla sırasıyla, santrifügasyon, ultrafiltrasyon, amonyum sülfatla protein çöktürme, diyaliz, FPLC ile jel filtrasyon kromatografi basamakları uygulanmıştır. Şekil 4.17, *Bacillus* Ege.B.1.d.10’un iki litrelik üretime aittir. Besi ortamında PGM kullanılarak yapılan bu üretimde, fermentasyon sonrası besi ortamındaki koyu pembe-kırmızı renk net olarak görülmektedir.



Şekil 4.17 İki litrelik üretim sonrası erlenler (Organizma, *Bacillus* Ege.B.1.d.10).

4.3.1 Santrifügasyonla ayırma

α -L-fukosidaz enzimi hücre dışı salgılanan bir enzim olduğundan saflaştırmaya 5100 rpm’de 10 dakika süren santrifügasyondan çıkan süpernatant ile devam edilmiştir.



Şekil 4.18 a) Çalışmada kullanılan Sigma 4K-15 nolu santrifüj ve her biri 250 ml’lik santrifüj kabı (c) alan 6 bölmeli rotor kısmı (b).

Yürütülen tüm çalışmalarda fermentasyon sonrası süpernatantın elde edilmesine yönelik santrifügasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 5000- 10 000 rpm hızla, 10 dakikalık süre uygun bulunmuştur (Yano ve ark., 1985; Yamamoto ve ark., 1986; Tsuji ve ark., 1990; Tsuji ve ark., 1990a; Sano ve ark., 1992; Kurimura ve ark., 1995; Eneyskaya ve ark., 2001; Miura ve ark., 2005).

4.3.2 Ultrafiltrasyon ile konsantrasyon

Santrifügasyon basamağında toplanan süpernatant, Sartorius 17525-01 Ultrafiltrasyon cihazı, Sartorius Sartocon Slice 200 (Polyethersulfone) Ultrafiltrasyon membranı (NMWCO- 30 000 Dalton) ve Easy-Load Masterflex Model 7518-00 peristaltik pompa kullanılarak konsantre edilmiştir. 200 cm²’lik filtrasyon alanına ve 30 000 Dalton NMWCO değerine sahip membran sayesinde, moleküler ağırlıkları 30 000 Daltonun altında olan bileşikler önemli bir miktar sıvı ile birlikte ayrılabilmiştir. Bu ayrımın etkinliği SDS-PAGE’e yüklenen örnekte 30 000 Daltonun altında protein bandı görülmemesi ile kanıtlanmıştır.

Ultrafiltrasyon basamağı ile santrifüj sonrası hücrelerden ayrılan iki litrelik çalışma hacimi 200ml'ye indirilmiştir. Enzimin denatürasyonuna engel olmak için bu basamak +4⁰C'de gerçekleştirilmiştir. Bu basamağın tek dezavantajı, 700-800 ml/dakika akış rejimi ve 1-2 bar basınçla çalışılmasına rağmen istenilen ayrımın (miktarın 1/10 oranına indirilmesi) oldukça yavaş (yaklaşık 12 saat) gerçekleşmesidir. Bu uzun sürenin bir nedeni de fermentasyon sıvısının yüksek viskoziteli yapısıdır (Çizelge 4.13).

Ultrafiltrasyon membranı olarak 30 000 Dalton NMWCO değerine sahip membranın tercih edilmesinin sebebi, literatür verilerinden yola çıkarak enzimin moleküler ağırlığının 30 000 Dalton'dan büyük olduğunun düşünülmesi ve bu büyüklükte por çapına sahip membranın ayırma gücü ile zaten oldukça kompleks olan besi ortamındaki ilave safsızlıklardan kurtulmaktır (Kurimura ve ark., 1995; Eneyskaya ve ark., 2001).

Literatürlerde ultrafiltrasyon basamağına sınırlı yer verilmiş olmasına rağmen, protein çöktürme basamağına geçişte, çalışma hacminin en kolay azaltılabildiği ve süpernantanın en etkin konsantre edildiği yöntemlerden biri olarak ultrafiltrasyon, bizim çalışmamızda önemli bir basamaktır.

Literatürlerde oldukça yüksek hacimler (Miura ve ark., 10 litre; Tsuji ve ark., 1990, 7,2 litre; Tsuji ve ark., 1990a, 7,5 litre) ile çalışılmış olmasına karşın santrifügasyon ile hücre ayrımını ardından direkt protein çöktürme basamağına geçilmiştir. Oysaki büyük ölçek için uygun kapasitedeki ultrafiltrasyon sistemleri önemli ölçüde konsantrasyon sağlayarak çalışma verimini arttırabilmektedir.

α -L-fukosidaz enziminin bu yöntemle %90 verimle başarıyla konsantre edildiği *Thermus* sp. ile gerçekleştirilen çalışmada bu basamakta 5000 ml'lik kültür filtratı 200 ml'ye indirilmiştir. 200 ml'lik konsantre sıvıda, 175 mg total protein, 55 Unit total enzim aktivitesi, 0,30 U/mg spesifik aktivite tespit edilmiştir (Eneyskaya ve ark., 2001). Kurimura ve ark. (1995)'na ait *Bacillus* sp. ile yapılan bir çalışmada ise 10 000 Da MWCO' luk ultrafiltrasyon membranı ile iyon değişim kromatografi öncesi bir litrelik hacim 232 ml'ye indirilmiştir.

Şekil 4.19'da laboratuvar ölçeğinde kullanılmak üzere geliştirilmiş, çalışmamızda kullandığımız ultrafiltrasyon sistemi yer almaktadır.



Şekil 4.19 Çalışmada kullanılan ultrafiltrasyon sistemi

4.3.3 Amonyum sülfat ile protein çöktürme

Ultrafiltrasyon basamağından gelen yaklaşık 200ml’lik konsantre sıvı içeriğindeki proteinlerin fraksiyonlanarak ayrılmaları için katı amonyum sülfat ile çöktürülmüştür. Bu işlemde yaklaşık 0°C’de, manyetik karıştırıcı yardımıyla sıvıya katı amonyum sülfatın yavaş yavaş yedirilmesi yöntemi kullanılmıştır.



Şekil 4.20 Amonyum sülfat ile protein çöktürme işlemi

Enzimin en etkin hangi amonyum sülfat yüzdesinde çökeleceği kesin olarak bilinmediğinden literatürlerdeki değerler %55, %65, %80 denenerek %65’de karar kılınmıştır (Çizelge 4.12). Çizelge 3.2’ye göre yapılan hesaplamalarla 200 ml’ye 80,8 gram katı amonyum sülfat 0°C - +4°C aralığındaki örneğe yavaş yavaş ilave edilerek, homojen dağılım için 30 dakika karışmasının ardından 5100 rpm’ de 20 dakika santrifüjlenerek diyaliz basamağına geçilmiştir.

Farklı yüzdelerdeki amonyum sülfat miktarları ile enzim (protein) çöktürme (presipitasyon) denemeleri sırasında alınan 2'şer ml'lik örneklerden enzim aktiviteleri tayin edilmiş ve spesifik aktiviteler belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.12'de verilmektedir.

Çizelge 4.12 Mezofilik *Bacillus* Ege B.1.d.10 ve Termofilik izolat 43 için amonyum sülfat ile çöktürme denemelerine ait veriler

Organizmalar		İlave Edilen Amonyum Sülfat Yüzdeleri		
		% 55	% 65	% 80
<i>Bacillus</i> Ege B.1.d.10	Aktivite (mU/ml)	70,9	112,0	15,78
	Spesifik Aktivite (U/mg)	0,338	0,604	0,056
Termofilik izolat 43	Aktivite (mU/ml)	80,64	82,22	9,76
	Spesifik Aktivite (U/mg)	0,128	0,428	0,023

%55-65 ve %80 gibi geniş aralıktaki amonyum sülfat yüzdeleri ile proteinleri çöktürmeye denemeye karar verilirken literatür verilerinden yararlanılmıştır. (Yano ve ark., 1985; Yamamoto ve ark., 1986; Tsuji ve ark., 1990; Tsuji ve ark., 1990a; Sano ve ark., 1992; Kurimura ve ark., 1995; Eneyskaya ve ark., 2001; Miura ve ark., 2005).

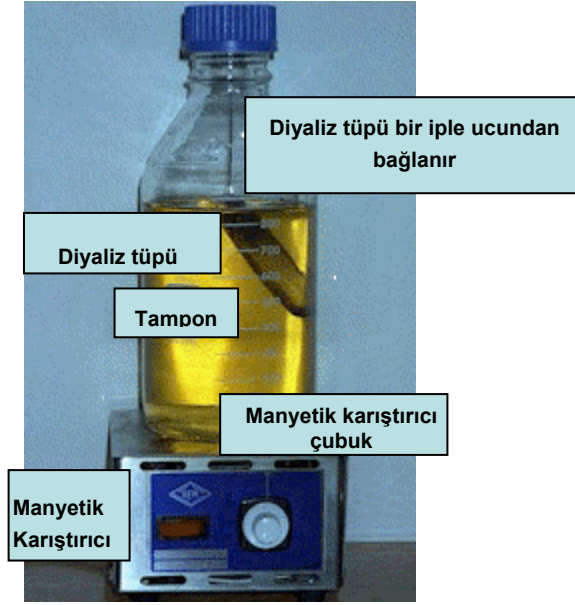
Tsuji ve ark. (1990), *Bacillus circulans* ile yürüttükleri çalışmada, organizmanın %0,5 glukoz içeren 7,2 litre kültür ortamından santrifüjle ayrılan süpernatantı %80 oranında amonyum sülfat ile bir gece çökmeye bırakılmış, ardından presipitat 10 000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenerek ayrılmış ve çökelti safsızlıklarından arındırmak üzere 10 mM potasyum fosfat tamponunda diyalize alınmıştır. Bu çöktürme basamağında total aktivite 346 Unit, spesifik aktivite 0,198 U/mg ve verim %56 olarak tespit edilmiştir. Yano ve ark. (1985), *Fusarium oxysporum* ile aktif çamurda ürettikleri α -L-fukosidazı presipite etmek amacıyla 180 ml süpernatanta %75 oranında amonyum sülfat ilave etmişlerdir. Bir gece çökeltinin oluşması için beklemenin ardından 10mM potasyum fosfat tamponu

(pH 7,0) ile diyalizlenmiştir. Amonyum sülfatla presipite edilen enzim için 3,68 Unit total aktivite ve 0,0098 U/mg spesifik aktivite hesaplanmıştır.

Tsuji ve ark. (1990a), *Bacillus circulans* ile yürüttükleri temel karbon kaynağı olarak PGM kullanılan çalışmada, amonyum sülfat ile presipitasyon işlemi iki basamakta gerçekleştirilmiştir. Birinci basamakta %35 amonyum sülfatla ilk çöktürmenin ardından santrifüjle ayrılan süpernatant %80 amonyum sülfat ile yeniden çöktürülmüştür. Bu işlemlerin ardından santrifüjle ayrılan çökelti diyalizlenmiştir. %80 ile ikinci basamaktaki çöktürmenin ardından total aktivite 1510 Unit ve spesifik aktivite 0,107 U/mg olarak hesaplanmıştır. *Streptomyces sp.* ile yapılan çalışmalarda, temel karbon kaynağı olarak PGM kullanılarak üretilen α -L-fukosidaz enziminin presipitasyonu için %80 oranında amonyum sülfat ilave edilerek, santrifügasyon sonrası presipitat 20mM potasyum fosfat tamponunda çözülerek diyalizlenmiştir (Sano ve ark., 1992). *Bacillus cereus* ile PGM kullanılarak yapılan 10 litrelik büyük ölçekli üretimde ham enzim solüsyonu, %85 oranında amonyum sülfat ile presipite edilmiş ardından diyaliz basamağına geçilmiş ve son olarak proteinin en etkin çökeleğini elde etmek için aseton fraksiyonlaması uygulanmıştır. Bu amaçla %30'dan 45'e doğru artan oranda soğuk aseton ilave edilmiştir. Amonyum sülfat ile presipitasyon sonucunda aktivite tayininde PGM substratına karşı total aktivite 501 Unit ve spesifik aktivite 0,844 U/mg olarak hesaplanmıştır (Miura ve ark., 2005).

4.3.4 Diyaliz

Amonyum sülfatla çökeltilen ve santrifüjlenen süspansiyonun üstte kalan süpernatant kısmı ayrılarak, altta kalan çökeltiye stabilizasyonun devamını sağlamak için 30 ml 10 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,0) ilave edilerek 12 000 Dalton MWCO membranda +4°C'de 1 gece diyaliz membranı içindeki sıvının 20 katı hacmindeki diyalizat (600 ml) ile diyalizlenmiştir (Şekil 4.21). Diyaliz işlemi başladıktan 3-4 saat sonra diyalizat tamponu yenilenerek, diyalizin etkinliğinin arttırılması amaçlanmıştır.



Şekil 4.21 Çalışmamızda gerçekleştirilen diyaliz prosesi.

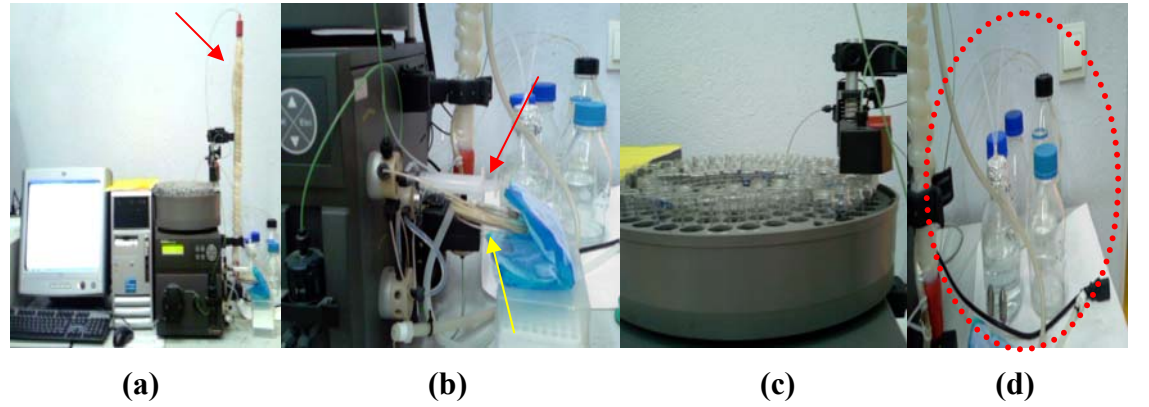
Diyaliz için kullanılan membran (Sigma, D9527), ön işlem gerektirmeyen bir membran olduğundan kullanımı oldukça kolaydır. Çeşitli *Bacillus* izolat ve suşlarıyla yapılan çalışmalarda, α -L-fukosidaz enziminin kısmi saflaştırma basamaklarını içeren çeşitli çalışmalarda diyaliz işlemi için 10 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,0) tercih edilmiştir (Tsuji ve ark., 1990; Tsuji ve ark., 1990a; Kurimura ve ark., 1995).

α -L-fukosidaz enzim üretiminde, temel karbon kaynağı olarak L-fukoz kullanılan, *Streptomyces* sp. ile yapılan çalışmada, santrifügasyonla ayrılan fermentasyon sıvısının diyalizi sonucu %82'lik geri kazanımla 6,454 Unit total aktivite ve 16900 mg proteine sahip α -L-fukosidaz enzimi bir sonraki kromatografi basamağına iletilmiştir (Sano ve ark., 1992).

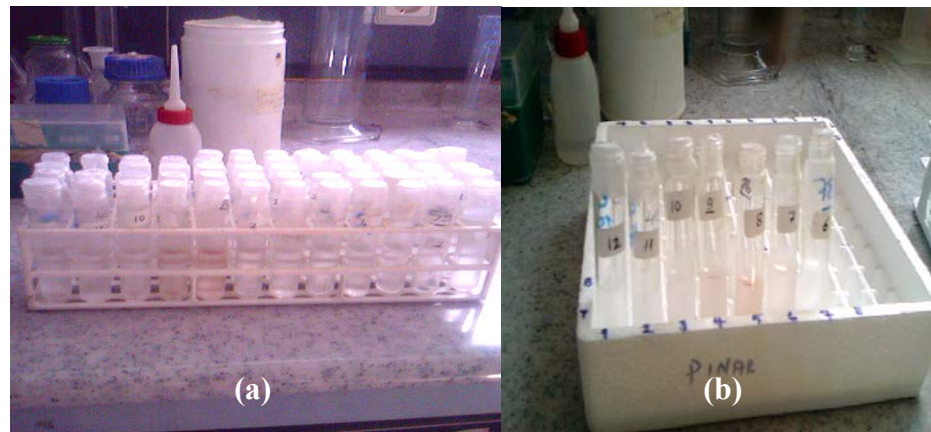
4.3.5 FPLC-Jel filtrasyon kromatografisi

Mezofilik (*Bacillus* Ege.B.1.d.10) ve termofilik (İzolat 43) mikroorganizmalarla yapılan üretimden diyaliz sonucunda elde edilen 30'ar ml'lik sıvılardan 3 kez 0,22 μ por çapına sahip filtreden geçirilen sırasıyla mezofilik örnekten 2,5 ml; termofilikten 2 ml örnek FPLC'ye verilebilmiştir. Örneklerin çok viskoz olması işlemleri zorlaştırmış ve bu nedenle FPLC jel filtrasyon kolonuna 2 – 2,5 ml kadar kısıtlı miktarda örnek verilebilmiştir. Şekil 4.22'de çalışmada kullanılan FPLC düzeneği verilmiştir.

Viskoziteye 4 günlük fermentasyon sonucu üretim ortamına salınan ekzopolisakkaritlerin neden olabileceği düşünülmektedir. Bunun yanında fermentasyon ortamında kullanılan PGM'nin de viskozitedeki bu artışa etkisi olduğu düşünülmektedir. Her bir saflaştırma basamağına ait örneklerin, viskoziteleri ölçülerek Çizelge 4.13'te verilmiştir. Bunun yanında Şekil 4.27'de açıkça görülen ve mezofilik izolatuın üretim ortamında PGM varlığında gözlenen koyu pembe renk, saflaştırma basamakları ile giderilememiş, sonuçta verilen örneğin düşük miktarına rağmen FPLC ile jel filtrasyon fraksiyonlarında bu renge rastlanmıştır (Şekil 4.23). Toplanan bu renkli fraksiyonların, (FPLC sonucu elde edilen grafikte) yoğun ve en yüksek absorbans değerinin görüldüğü piklerin elde edildiği fraksiyonlar olması bu sonucu doğrulamaktadır (Şekil 4.25).



Şekil 4.22 Amersham Pharmacia Biotech AKTA FPLC cihazı. a) Ceket giydirilmiş kolunu ile cihazın genel görünümü, b) kırmızı ok ile gösterilen örneğin verildiği kısım ve sarı ok ile gösterilen örneğin tampona karışmak üzere beklediği enjeksiyon loop, c) otomatik fraksiyon toplayıcısı, d) çeşitli tamponlar ve atık şişeleri

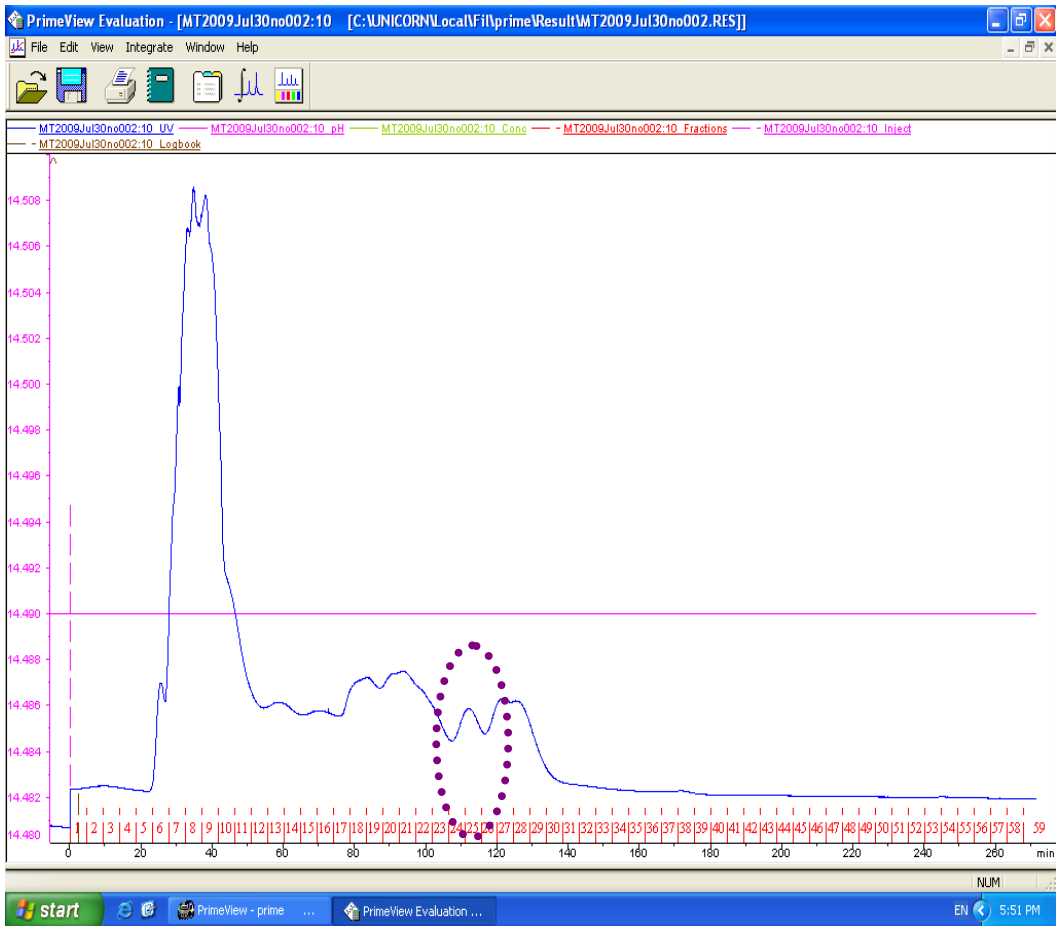


Şekil 4.23 Mezofilik *Bacillus* Ege.B.1.d.10 kodlu izolata ait FPLC sonrası toplanan fraksiyonlar. a) Toplanan tüm fraksiyonlar, b) yoğun pikin görüldüğü pembe renkli fraksiyonlar

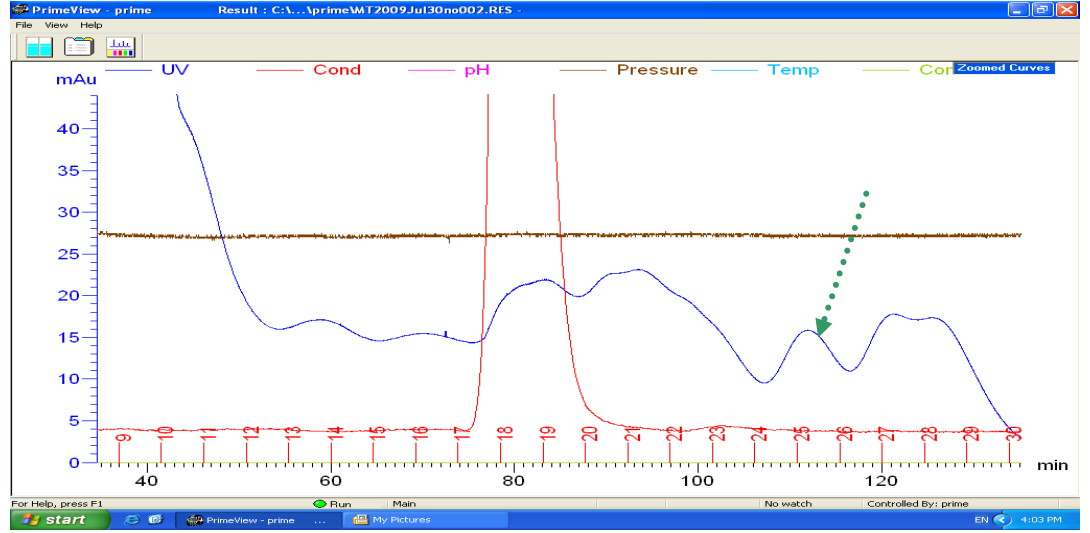


Şekil 4.24 Termofilik 43 nolu izolata ait FPLC sonrası toplanan fraksiyonlar

Kromatografi sonucu software program ile takip edilerek, dijital çıktısı alınmıştır.



(a)

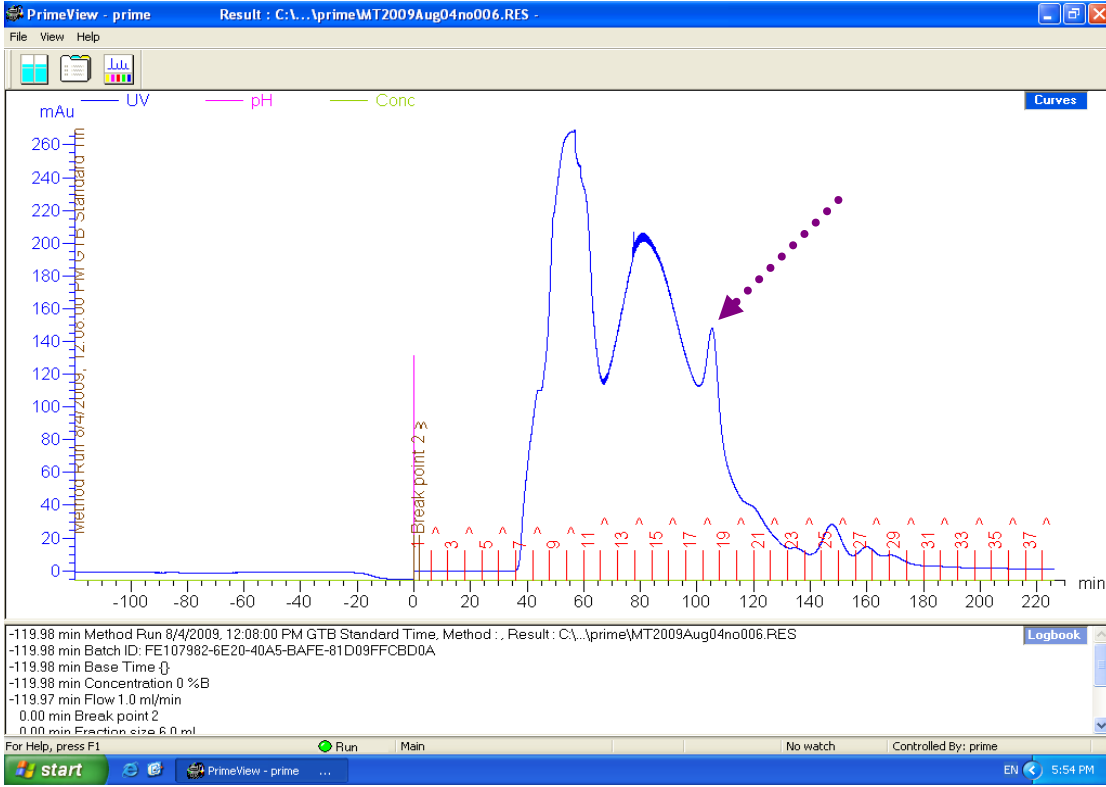


(b)

Şekil 4.25 Mezofilik *Bacillus* Ege.B.1.d.10 kodlu izolata ait FPLC sonunda elde edilen grafik. a) Grafiğin genel görünümü, b) Ok ile işaret edilmiş, 100-120. dakikalar arasında enzim aktivitesinin görüldüğü piklerin yakın plan görünümü.

Mezofilik izolata ait FPLC jel filtrasyon grafiği üzerindeki piklerden yola çıkarak; 6-12, 17-20, 24-26, 27-29 nolu fraksiyonlarda ayrı ayrı enzim aktivitesi tayini yapılmış ve sonuç olarak **24-25-26** nolu fraksiyonlarda, sırasıyla **24'**de; **20,67 mU/ml**, **25'te 32,88 mU/ml** ve **26'da 12,43 mU/ml** aktivite tespit edilmiştir.

Kurimura ve ark. (1995), *Bacillus* izolatları ile yaptıkları çalışmada moleküler ağırlığın tayini amacıyla Sephadex G-200 kolonu kullanılmış, 1ml/dakikada kolondan geçirilen örnek için birer ml'lik fraksiyonlar toplanarak 280 nmde absorbanlar ölçülmüş ve enzimin 50-60. fraksiyonlar arasında geldiği buna göre de kolona verilen kalibrasyon markerları ile moleküler ağırlığın yaklaşık olarak 200 kDa olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.26 Termofilik 43 kodlu izolata ait FPLC sonunda elde edilen grafik (Okla işaret edilen enzim aktivitesinin görüldüğü fraksiyonlara ait pik)

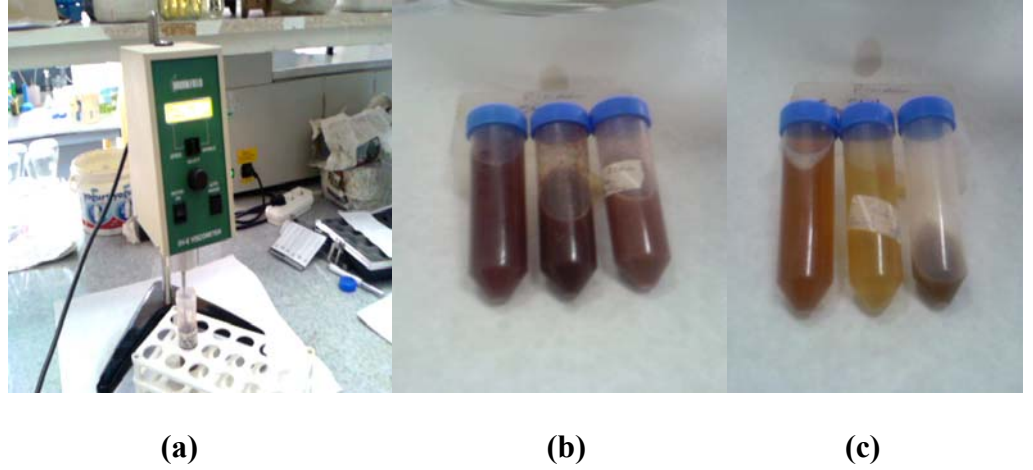
Termofilik izolata ait FPLC jel filtrasyon grafiği üzerindeki piklerden yola çıkarak; 8-11, 12-17, 18-21, 22, 23, 25-27 nolu fraksiyonlarda ayrı ayrı enzim aktivitesi tayini yapılmış ve sonuç olarak 100-120. dakikalar arasında gelen **17, 18, 19** nolu fraksiyonlarda, sırasıyla **17’de; 25,78 mU/ml, 18’de 35,88 mU/ml** ve **19’da 29,56 mU/ml** aktivite tespit edilmiştir.

İncelediğimiz her iki izolat için de fermentasyon ortamındaki santrifügasyon ve ultrafiltrasyonla dahi uzaklaştırılamayan viskoz yapının FLPC ve SDS-PAGE sonuçlarını olumsuz yönde etkilediği düşünülmektedir. Her bir kısmi saflaştırma basmağında elde edilen sıvılarda, Brookfield LVDV-E 230 viskozimetre ve 62 nolu rotor ile 50 rpm’de ölçülen viskozite (mPa.s) değerleri Çizelge 4.13’de verilmiştir.

Çizelge 4.13 Mezofilik *Bacillus* Ege B.1.d.10 ve Termofilik izolat 43'e ait her bir saflaştırma basamağında ölçülen viskoziteler

Kısmi Saflaştırma Basamakları	Viskozite (mPa.s), 24 ⁰ C	
	<i>Bacillus</i> Ege B.1.d.10	İzolat no 43
Fermentasyon Sıvısı (Ham Ekstrakt)	197	118
Ultrafiltrasyon sonrası	401	286
Amonyum Sülfat ile Presipitasyon sonrası	669	459
Diyaliz sonrası	875	678
FPLC ile Jel Filtrasyona verilen örnek	2-3 ml'lik bu örnek viskozite ölçümü için yeterli bulunmamıştır. Bu örnek, diyaliz basamağının ardından, 0,22µ por çaplı filtreden 3 kez geçirilerek hazırlanmıştır.	

Saflaştırma basamaklarına ait örneklerin viskozitelerin, aynı cihaz (Brookfield LVDV-E 230) ile ölçümü yapılan farklı örnekler için viskozite değerleri (su, 1 mPa.s; sıvı yağ, 56,4 mPa.s; konsantre domates suyu, 560 mPa.s; yoğurt, 1100 mPa.s) ile karşılaştırıldığında oldukça yüksek olduğu görülmektedir (Bailey ve Ollis, 1986; Öngen G., 2009). Şekil 4.27'de çalışmada kullanılan viskozimetre ve ölçümü alınan örneklerden bazıları görülmektedir.

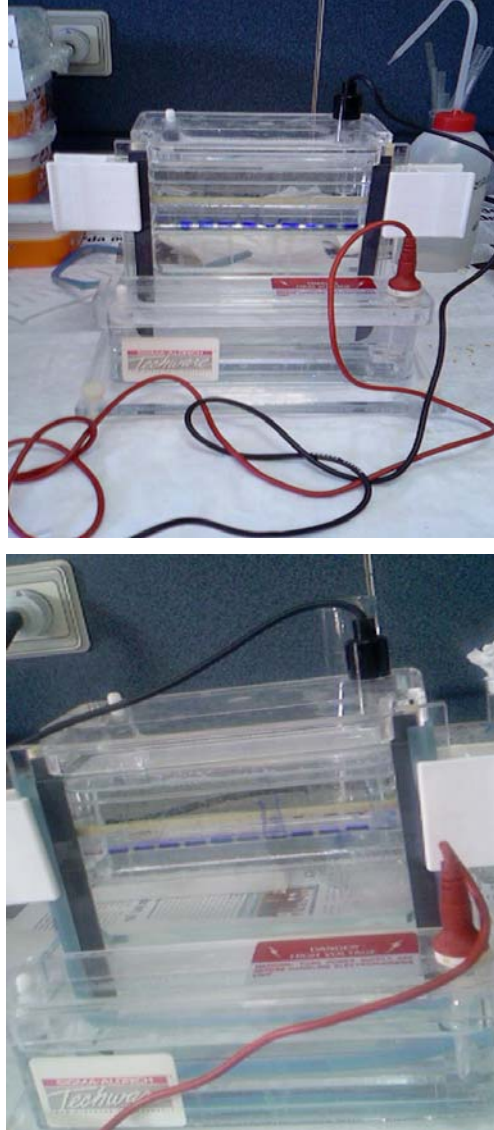


Şekil 4.27 a) Brookfield LVDV-E 230 viskozimetre ile viskozite ölçümü, b) *Bacillus* Ege.B.1.d.10'a ait sırasıyla ultrafiltrasyondan çıkan, amonyum sülfatla çöktürme sonrası, diyaliz sonrası örnekler, c) Termofilik izolat 43'e ait sırasıyla ilk santrifüj sonrası, ultrafiltrasyon sonrası, amonyum sülfat ile çöktürme sonrası örnekler.

4.3.6 SDS-PAGE

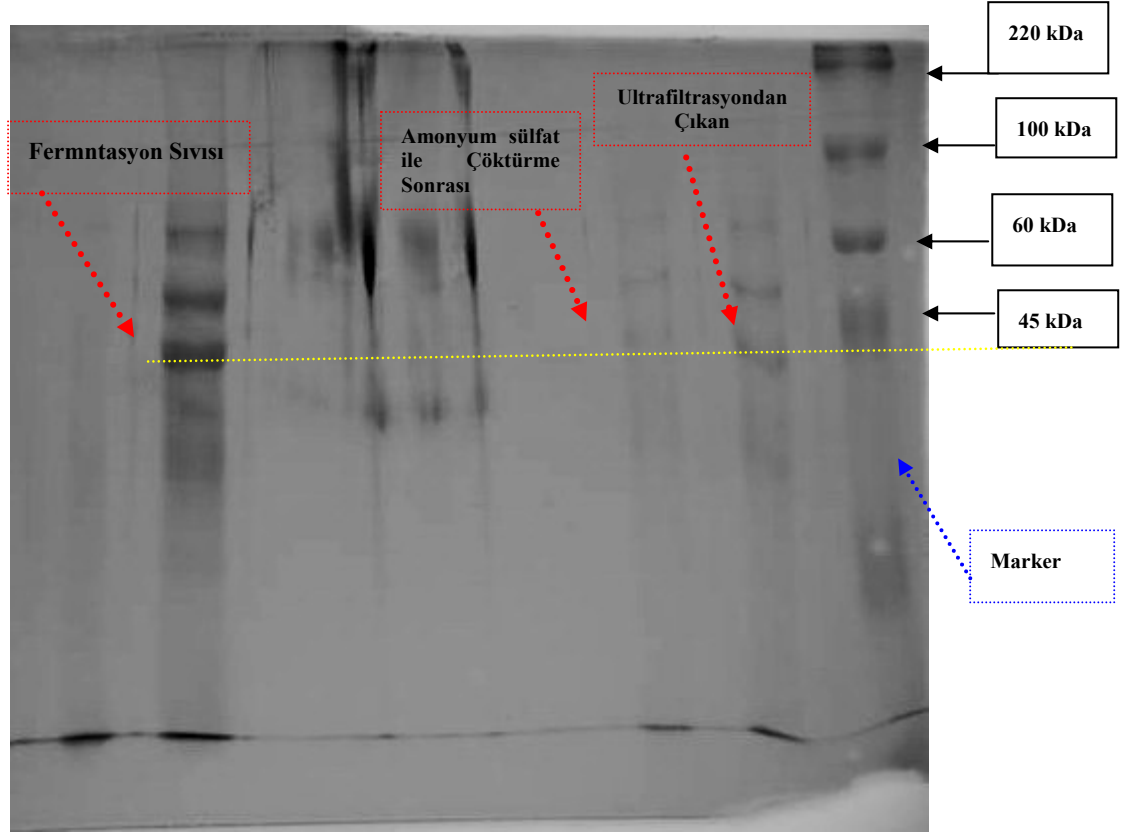
Kısmi saflaştırmanın her basamağından alınan örnekler SDS-PAGE yöntemi ile görüntülenerek enzimin moleküler ağırlığı (kDa) ve gerçekleştirilen ayırımın etkinliği ortaya konmuştur. Bu amaçla çeşitli denemelerin ardından %12'lik jelde karar kılınmıştır. %10'luk ve %8'lik jellerde bant görüntüleri belirli belirsiz gözlemlenmiştir.

Şekil 4.28'de yüklemenin ardından elektrik kaynağına bağlanmış, yürütülen örnekler görülmektedir. Şekil 4.29 ve 4.30'da sırasıyla *Bacillus* Ege.B.1.d.10 ve 43 nolu termofilik izolata ait SDS-PAGE jel görüntüleri verilmiştir.

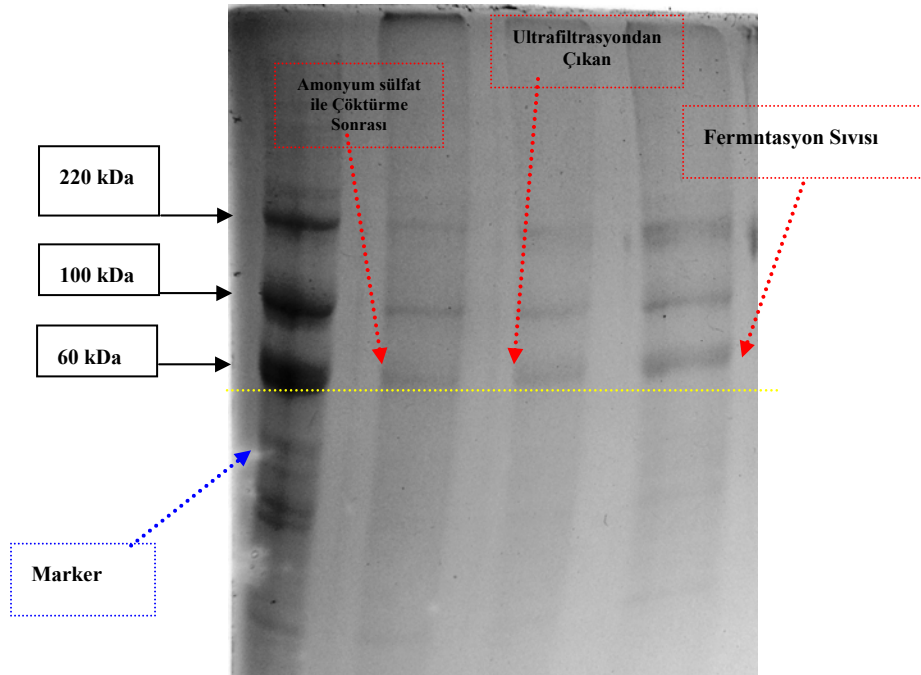


Şekil 4.28 SDS-PAGE sisteminin görüntüleri

Jel görüntüleri;



Şekil 4.29 Mezofilik *Bacillus* Ege.B.1.d.10'a ait SDS-PAGE görüntüsü



Şekil 4.30 Termofilik izolat 43'e ait SDS-PAGE görüntüsü

Üretim sonunda mikroorganizmanın metabolik yan ürünü olduğu düşünülen bir takım bileşenlerin net bantların görülmesini engellediği düşünülmektedir. Moleküler ağırlıkların tespitinde kullanılan markerın içerdiği her biri farklı bir protein olan bantlar ve %4-20'lik Tris-Glisin jelde bu bantların moleküler ağırlıkları (kDa) Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Buna göre mezofilik *Bacillus* Ege.B.1.d.10 için; solda yer alan markere (**Sigma, C4861 Molecular Weight 30 000–220 000 Da**) göre enzimin moleküler ağırlığı **45 kDa** olarak belirlenmiştir. Enzim markerın 4. bandına karşılık gelmektedir. Termofilik izolat 43 için ise, enzimin moleküler ağırlığı **60 kDa** olarak belirlenmiştir. Enzim markerın 3. bandına karşılık gelmektedir. Enzim farklı mikroorganizmalarla üretildikten sonra moleküler ağırlığın belirlendiği bir çok çalışma mevcuttur.

Eneyskaya ve ark. (2001), yaptığı araştırmada enzim kaynağı olarak *Thermus* genusuna ait bir izolat ile çalışılmıştır. Çalışmada Superose 12 jel filtrasyon kolonu ile yapılan moleküler boyut ayırımına göre saflaştırılan α -L-fukosidaz enzimi bir tetramerdir ve 240 ± 10 kDa moleküler ağırlıktadır, 4 özdeş subüniteden meydana gelmektedir (her biri $61,0 \pm 0,5$ kDa). Kurimura ve ark. (1995), *Bacillus* izolatları ile PGM içeren besi ortamında yaptıkları çalışmada ise, saflaştırılan enzimin PAGE ile molekül ağırlığı 116 kDa olarak belirlenmiştir. Enzime ait jel filtrasyon sonucu moleküler ağırlık yaklaşık 200 kDa olarak belirlenmiş, bundan da organizmanın ürettiği α -L-fukosidaz enziminin iki eş subunitten meydana geldiği sonucuna varılmıştır.

Tsuji ve ark. (1990), *Bacillus circulans* ile yürüttükleri çalışmada, organizmanın %0,5 glukoz içeren ortamda ürettiği enzime ait moleküler ağırlık SDS-PAGE yöntemi ile yaklaşık 250 kDa olarak belirtilmiştir. Tsuji ve ark. (1990a), topraktan izole edip, tanımladıkları *Bacillus circulans* ile yürüttükleri bir başka çalışmada ise, PGM içeren ortamda organizmanın ürettiği enzim SDS-PAGE'de 135 kDa'luk bir banta sahipken, TSK-jel HW 65F jel filtrasyon kromatografiye göre yaklaşık 285 kDa olarak hesaplanmıştır. Bu da bu organizmada üretilen α -L-fukosidaz enziminin iki eş subunitten meydana geldiğini göstermektedir. Cobucci ve ark. (2008)'nin yaptıkları bir çalışmada hipertermofilik bir arkea olan *Sulfolobus solfataricus*'tan *E.coli*'ye klonlanan

rekombinant α -L-fukosidaz enzimi bir nonamer olup, 57 kDa'luk subunitten oluşmaktadır. Miura ve ark. (2005), *Bacillus cereus* ile yaptıkları çalışmada enzimin SDS-PAGE sonucu moleküler ağırlığı yaklaşık 196 kDa olarak belirlenmiştir.

Yano ve ark. (1985), *Fusarium oxysporum* ile aktif çamurda ürettikleri α -L-fukosidaz için moleküler ağırlığı Sephadex G-200 jel filtrasyon kolonu ile yaklaşık olarak 80 kDa bulmuşlardır. *Fusarium oxysporum*'un L-fukoz içeren indükleyici ortam ile üretildiğinde elde edilen α -L-fukosidaza ait moleküler ağırlık, Sephadex G-200 jel filtrasyon kolonu ile 75 kDa olarak tespit edilmiştir, bunu destekler nitelikte SDS-PAGE de tek bir bant vermiştir (Yamamoto ve ark., 1986).

Streptomyces sp. ile yapılan çalışmalarda, temel karbon kaynağı olarak PGM kullanılarak üretilen α -L-fukosidaz enzimine ait SDS-PAGE sonucunda, %10'luk poliakrilamid jelde, iki faz halinde elde edilen enzimin iki ayrı formu için sırasıyla 59 kDa'luk tek bant ve 57 ve 56 kDa'luk iki bant elde edilmiştir (Goso ve ark., 2001). Temel karbon kaynağı olarak L-fukoz kullanılan, *Streptomyces* sp. ile yapılan çalışmada, üretilen α -L-fukosidaz enzimi için jel filtrasyon kromatografi sonucunda moleküler ağırlık, yaklaşık 40 kDa olarak tespit edilmiştir (Sano ve ark., 1992).

Kısmi Saflaştırmaya Ait Veriler

Bacillus Ege.B.1.d.10 kodlu izolat için, her bir saflaştırma basamağı ardından enzim aktivitesi (mU/ml), total aktivite (U), total protein (mg), spesifik aktivite (U/mg), % saflaştırma verimi hesaplanmıştır. Çizelge 4.14'te bu veriler yer almaktadır.

Çizelge 4.14 Mezofilik *Bacillus* Ege.B.1.d.10 kodlu izolata ait kısmi saflaştırma verileri

Saflaştırma Basamakları	Çalışma Hacmi (ml)	Enzim aktivitesi (mU/ml)	Total Aktivite (U)	Total Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	% Verim
Fermentasyon Sıvısı (Ham Ekstrakt)	2000	133,9	267,8	683,2	0,392	100
Ultrafiltrasyon Sonrası	200	121,6	24,32	47,78	0,509	90,8
%65 Amonyum Sülfat ile Presipitasyon Sonrası	30	112,0	3,36	5,56	0,604	83,64
Diyaliz Sonrası	35	85,48	2,6418	3,925	0,673	63,84
FPLC ile Jel Filtrasyon	3	32,88	0,09864	0,126	0,781	24,55

Mezofilik *Bacillus* Ege.B.1.d.10 için 2000 ml’lik gerçekleştirilen üretimden elde edilen α -L-fukosidaz enzimi %24,55 verimle dört basamakta kısmi olarak saflaştırılmıştır. Çizelge 4.14’te de görüldüğü gibi, saflaştırmanın ilerleyen basamaklarında enzim aktivitesi stabilite sorunu ve diğer değişkenlerin de etkisi ile giderek düşerken, konsantre edilen enzim için spesifik aktivite giderek artmıştır. Çalışmamız bu verileriyle Çizelge 4,16’da verilen literatür bilgileriyle örtüşmektedir.

Termofilik 43 kodlu izolat için, her bir saflaştırma basamağı ardından enzim aktivitesi (mU/ml), total aktivite (U), total protein (mg), spesifik aktivite (U/mg), % saflaştırma verimi hesaplanarak Çizelge 4.15’te verilmiştir.

Çizelge 4.15 Termofilik 43 kodlu izolata ait kısmi saflaştırma verileri

Saflaştırma Basamakları	Çalışma Hacmi (ml)	Enzim aktivitesi (mU/ml)	Total Aktivite (U)	Total Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	% Verim
Fermentasyon Sıvısı (Ham Ekstrakt)	2000	88,32	176,64	635,4	0,278	100
Ultrafiltrasyon Sonrası	200	86,0	17,20	56,95	0,302	97,37
%65 Amonyum Sülfat ile Presipitasyon Sonrası	30	82,22	2,467	5,76	0,428	93,09
Diyaliz Sonrası	33	48,26	1,59	3,16	0,503	54,64
FPLC ile Jel Filtrasyon Sonrası	2,5	35,88	0,0897	0,159	0,565	40,62

Termofilik 43 nolu izolat için 2000 ml’lik gerçekleştirilen üretimden elde edilen α -L-fukosidaz enzimi %40,62 verimle dört basamakta kısmi olarak saflaştırılmıştır. Çizelge 4.15’te de görüldüğü gibi, saflaştırmanın ilerleyen basamaklarında enzim aktivitesi stabilite sorunu ve diğer değişkenlerin de etkisi ile giderek düşerken, konsantre edilen enzim için spesifik aktivite giderek artmıştır. Çalışmamız bu verileriyle Çizelge 4.16’da verilen literatür bilgisiyle örtüşmektedir. Endospor içeren termofilik mikroorganizmalarla gerçekleştirilen bir çalışma literatürde yer almadığından verilerimizi bu organizma bazında karşılaştırma imkanına sahip değiliz.

Çizelge 4.16 Çeşitli organizmalarda α -L-fukosidaz enziminin, farklı karbon kaynağı içeren fermentasyon sıvılarındaki enzim aktiviteleri, total aktiviteler, total protein ve spesifik aktivite değerleri

Verilerin ait olduğu saflaştırma basamağı	Çalışmayı gerçekleştiren gruplar	Çalışmada kullanılan mikroorganizma	Kullanılan Karbon Kaynağı	Enzim aktivitesi (mU/ml)	Total Aktivite (U)	Total Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)
Fermentasyon Sıvısı (Ham Ekstrakt)	Yano ve ark., 1985	<i>Fusarium oxysporum</i>	Aktif çamur	21,22	3,82	538	0,0071
	Yamamoto ve ark., 1986	<i>Fusarium oxysporum</i>	L-fukoz	1451,087	2670	621	4,3
	Tsuji ve ark., 1990	<i>B.circulans</i>	Glukoz	85,33	618	21300	0,029
	Tsuji ve ark., 1990a	<i>B.circulans</i>	PGM	201,33	1510	55000	0,0275
	Goso ve ark., 2001	<i>Streptomyces</i> sp.	PGM	-	6,78	1124	0,00603
	Kurimura ve ark., 1995	<i>Bacillus</i> sp.	PGM	-	760	760	1,6
	Miura ve ark., 2005	<i>Bacillus cereus</i>	PGM	55,3*	553	655	0,844
	Sano ve ark., 1992	<i>Streptomyces</i> sp.	L-fukoz	-	7,875	16900	0,41
	Eneyskaya ve ark., 2001	<i>Thermus</i> sp.	-	12	60	250	0,24
	Çalışmamıza ait veriler	Mezofilik <i>Bacillus</i> Ege.B.1.d.10	PGM	133,9	267,8	683,2	0,392
	Çalışmamıza ait veriler	Termofilik izolat No 43	PGM	88,32	176,64	635,4	0,278
Ultrafiltrasyon	Eneyskaya ve ark., 2001	<i>Thermus</i> sp.	-	-	55	175	0,30
	Yamamoto ve ark., 1986	<i>Fusarium oxysporum</i>	L-fukoz	-	2815	138	20,0
	Çalışmamıza ait veriler	Mezofilik <i>Bacillus</i> Ege.B.1.d.10	PGM	121,6	24,32	47,78	0,509
	Çalışmamıza ait veriler	Termofilik izolat No 43	PGM	86,0	17,20	56,95	0,302
Amonyum Sülfat ile Presipitasyon	Tsuji ve ark., 1990a	<i>B.circulans</i>	PGM	-	1510	14100	0,107
	Yano ve ark., 1985	<i>Fusarium oxysporum</i>	Aktif çamur	20,44	3,68	376	0,0098
	Tsuji ve ark., 1990	<i>B.circulans</i>	Glukoz	48,05	346	21300	0,198
	Miura ve ark., 2005	<i>Bacillus cereus</i>	PGM	-	501	456	1,10
	Çalışmamıza ait veriler	Mezofilik <i>Bacillus</i> Ege.B.1.d.10	PGM	112,0	3,36	5,56	0,604
	Çalışmamıza ait veriler	Termofilik izolat No 43	PGM	82,22	2,467	5,76	0,428
Diyaliz	Sano ve ark., 1992	<i>Streptomyces</i> sp.	L-fukoz	-	6454	16900	0,38
	Çalışmamıza ait veriler	Mezofilik <i>Bacillus</i> Ege.B.1.d.10	PGM	85,48	2,6418	3,925	0,673
	Çalışmamıza ait veriler	Termofilik izolat No 43	PGM	48,26	1,59	3,16	0,503

*, enzim aktivite tayininde PGM substrat olarak kullanılmıştır.

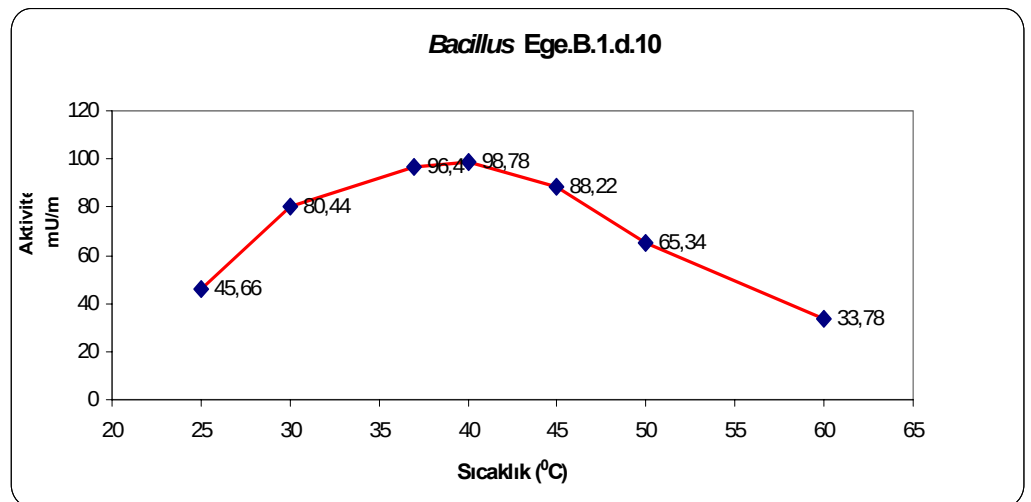
Çizelge 4.16’da görüldüğü üzere, Yamamoto ve ark. (1986), çalışmalarının başlığında “Induction and Purification of α -L-fucosidase from *Fusarium oxysporum*” da belirttikleri L-fukoz ile indüklemeye yöntemini deneyerek enzim aktivite değerini en yüksek seviyeye (1,451U/ml) taşımayı başarmışlardır. Aynı bilim adamlarının 1985’te yine *Fusarium oxysporum* ile aktif çamurun substrat olarak kullanıldığı çalışmalarına kıyasla L-fukoz ile enzim aktivitesinde indüklemeye beklenilenin üzerinde başarı sağlamıştır (Yano ve ark., 1985).

4.4 Seçilen Mezofilik *Bacillus* İzolatı ve Endospor İçeren Termofilik İzolatta α -L-Fukosidaz Enziminin Kısmi Karakterizasyonu

Mezofilik *Bacillus* ve termofilik bakteri izolatlarında enzim üretimlerini maksimum seviyelere taşıyan koşulların belirlenmesinin ardından bir adet mezofilik ve bir adet termofilik izolat ölçek büyütülerek iki litrede derin kültür fermentasyonu ile %1 PGM oranı, pH 6.5, sıcaklıklar sırasıyla 30⁰C ve 65⁰C’de, 160 rpm çalkalama hızında büyütülmüş ve üretilen α -L-fukosidaz enzimlerinin kısmi karakterizasyonu amaçlanmıştır. Bu amaçla farklı pH ve sıcaklıklarda aktivite tayinleri ile enzimlerin optimum sıcaklık ve pH aralıkları ortaya konmuştur (Şekil 4.31- 4.34).

4.4.1 Sıcaklığın α -L-fukosidaz enziminin aktivitesine etkisi

Üretilen enzimlerin maksimum aktiviteye sahip oldukları sıcaklıkların ortaya çıkarılması amacıyla, mezofilik izolat için, 25-60⁰C arasında ve termofilik izolat içinse 25-90⁰C arasında farklı sıcaklıklar denenmiştir.



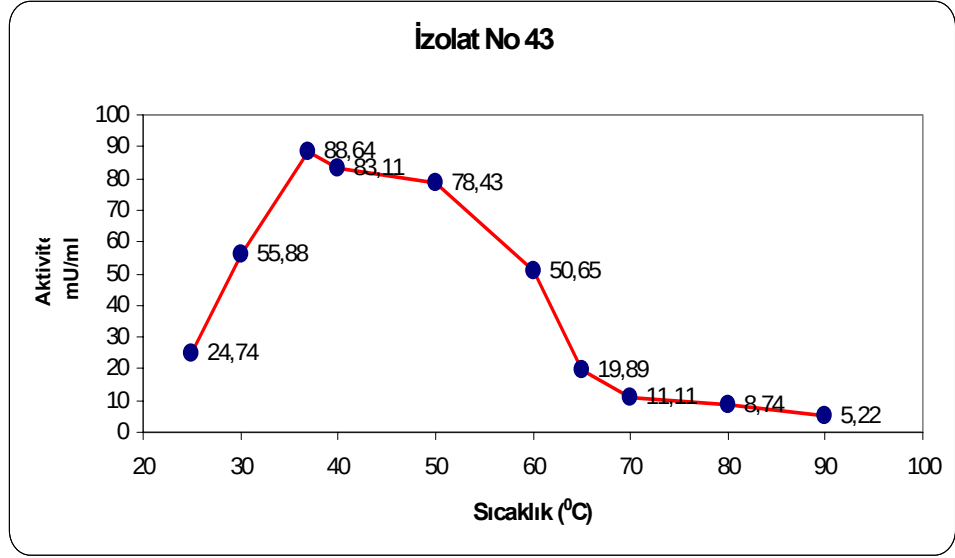
Şekil 4.31 Mezofilik *Bacillus* Ege.B.1.d.10 için, 100mM sodyum sitrat tamponu- pH 6,5’de farklı inkübasyon sıcaklıklarına ait enzim aktiviteleri

Mezofilik *Bacillus* Ege.B.1.d.10 için bu izolattan elde edilen α -L-fukosidaz enziminin **optimum sıcaklık değeri 40⁰C**'dir. Enzim aktivitesi, 45⁰C'nin üzerindeki sıcaklık değerlerinde inaktivasyona uğrayarak düşüş göstermiştir. Yine de 60⁰C'de bile halen enzim aktivitesine rastlanması mezofilik kaynaklı bir enzim için termostabilitenin yüksek olduğunun işaretidir.

Kurimura ve ark. (1995), temel karbon kaynağı olarak PGM kullanarak yaptıkları çalışmada *Bacillus* izolatına ait optimum sıcaklık 37⁰C olarak ölçülmüş, enzim 55⁰C'ye kadar termostabil kalabilmiştir. Ayrıca enzimin -30⁰C'de en fazla altı ay aktivitesini koruduğu ve dondurup çözündürme işlemlerinin enzim aktivitesine zarar vermediği de gözlenmiştir. Miura ve ark. (2005), *Bacillus cereus* ile yaptıkları çalışmada PGM substratına karşı ölçülen aktivitelere göre, enzimin optimum sıcaklık 50⁰C olduğu ve bu değer üzerindeki sıcaklıklarda aktivitenin hızla düştüğü gözlenmiştir.

Topraktan izole edilen *Bacillus circulans*'ın temel karbon kaynağı olarak %0,5 glukoz varlığında yapılan bir çalışmada standart koşullar altında (pH 7,0) optimum sıcaklık 45⁰C olarak ölçülmüş, bu değer üzerinde enzim aktivitesi hızla düşmüştür (Tsuji ve ark., 1990). Tsuji ve ark. (1990a), *Bacillus circulans* izolatı ile PGM kullanılarak yürüttükleri bir başka çalışmada ise, enzim için optimum sıcaklık 37⁰C olarak ölçülmüş, enzimin 45⁰C'ye kadar stabil olduğu saptanmıştır. Enzim dondurularak bir yıldan daha uzun süre aktivitesini kaybetmeden saklanabilmiştir.

Yano ve ark. (1985), *Fusarium oxysporum* ile sıvı aktif çamurda ürettikleri α -L-fukosidaz enziminin 45⁰C'ye kadar stabil kalabildiğini açıklamışlardır. *Fusarium oxysporum*'un L-fukoz içeren indükleyici ortam ile üretildiğinde elde edilen α -L-fukosidaz ise 45⁰C ve altındaki sıcaklıklarda stabil iken, 65⁰C'nin üzerine çıkıldığında tamamen inaktive olmuştur (Yamamoto ve ark., 1986). Temel karbon kaynağı olarak L-fukoz kullanılan, *Streptomyces* sp. ile yapılan çalışmada, üretilen α -L-fukosidaz enzimi için 50⁰C'nin altında aktivite maksimum değerine ulaşmış ve 60⁰C'ye kadar da stabil kalmıştır (Sano ve ark., 1992).



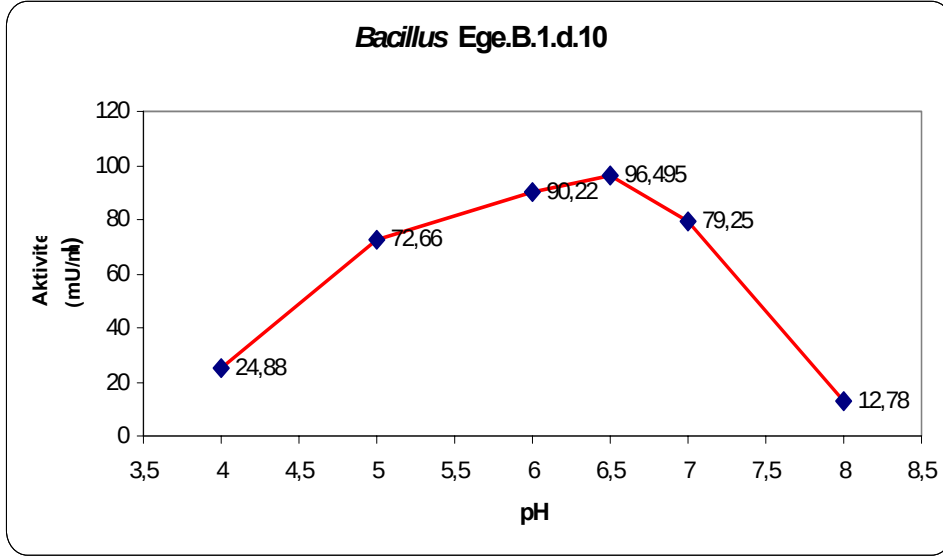
Şekil 4.32 Termofilik 43 nolu izolat için, 100mM sodyum sitrat tamponu- pH 6.5’de farklı inkübasyon sıcaklıklarına ait enzim aktiviteleri

Termofilik 43 nolu izolat için optimum sıcaklık ise, termofilik bir organizma için oldukça düşük olan 37°C olarak saptanmıştır. Bu durum, enzimin termofilikten daha çok mezofilik karaktere yakın olduğunu göstermektedir.

Eneyskaya ve ark. (2001), *Thermus* sp.’den 45°C’de ürettikleri α -L-fukosidaz enzimi için optimum sıcaklığın 50°C olduğunu, bununla birlikte termal inaktivasyonun 45°C’nin üzerinde gözlemlendiği ve aktivitenin 60°C’lerde hızla düştüğü belirtmiştir. Cobucci ve ark. (2008)’nin yaptıkları bir çalışmada hipertermofilik bir arkea olan *Sulfolobus solfataricus*’ta α -L-fukosidaz enzimi termoaktivite ve termostabilite göstermiştir. Buna göre enzimin optimal sıcaklığı 95°C’dir ve 80°C’de iki saatlik sürenin ardından enzim aktivitesinin %60’ını halen koruduğu tespit edilmiştir.

4.4.2 pH’nın α -L-fukosidaz enziminin aktivitesine etkisi

Mezofilik ve termofilik izolatlar için, enzim aktivite tayininde kullanılan baz tamponunun pH’sı 4,0 ile 8,0 aralığında değiştirilerek üretilen enzimlere ait optimum pH’lar ortaya çıkarılmıştır. Aktivite tayini standart olarak 37°C’de gerçekleştirilmiştir.



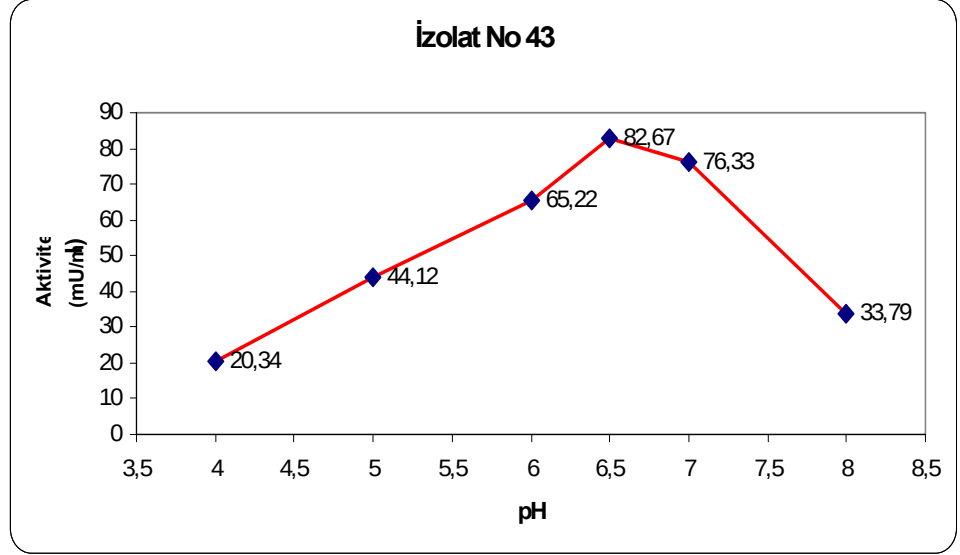
Şekil 4.33 Mezofilik *Bacillus* Ege.B.1.d.10 için, 100mM sodyum sitrat tamponunda, pH 4,0-8,0 aralığına ait enzim aktiviteleri

Bacillus Ege.B.1.d.10 için enzim **maksimum aktivite** değerine **pH 6,5**'te ulaşmıştır (Şekil 4.33). Bu değerler aşağıda sıralanan literatür verileriyle örtüşmektedir.

Kurimura ve ark. (1995), *Bacillus* izolatları ile PGM içeren besi ortamında yaptıkları çalışmada, optimum pH 5,5-6,5, stabil pH aralığı ise 6,0 ile 9,0 aralığı olarak tespit edilmiştir. Miura ve ark. (2005), *Bacillus cereus* ile yaptıkları çalışmada enzimin PGM substratına karşı maksimum aktivitesi pH 7,0'da tespit edilmiş ve pH 5,0-9,0 gibi geniş bir aralıkta stabil olduğu belirlenmiştir.

Tsuji ve ark. (1990), *Bacillus circulans* ile temel karbon kaynağı olarak glukoz kullanarak yaptıkları çalışmada maksimum enzim aktivitesinin pH 6,0-7,0 aralığında görüldüğünü ve enzimin pH 6,5-8,0 aralığında stabil olduğunu bildirmişlerdir. Tsuji ve ark. (1990a), *Bacillus circulans* izolatı ile PGM kullanılarak yürüttükleri bir başka çalışmada ise, maksimum enzim aktivitesi pH 5,5'te saptanmıştır. Enzimin stabil olduğu pH aralığı ise pH 4,5-9,0 olarak verilmiştir. Temel karbon kaynağı olarak L-fukoz kullanılan, *Streptomyces* sp. ile yapılan çalışmada, üretilen α -L-fukosidaz enzimi için aktivite pH 6,0-6,5'te maksimum değerine ulaşmış ve pH 6,0-8,5 aralığında da stabil kalmıştır (Sano ve ark., 1992).

Yano ve ark. (1985), *Fusarium oxysporum* ile sıvı aktif çamurda ürettikleri α -L-fukosidaz enziminin optimum pH'sını 4,5 ve stabil pH aralığını da 4-8 olarak tespit etmişlerdir. *Fusarium oxysporum*'un L-fukoz içeren indükleyici ortam ile üretildiğinde elde edilen α -L-fukosidaz pH 4.5-6.0 aralığında maksimum aktiviteye sahipken, pH 5,5-10,0 gibi çok geniş bir aralıkta stabilitesini koruduğu saptanmıştır (Yamamoto ve ark., 1986).



Şekil 4.34 Termofilik 43 nolu izolata ait 100mM sodyum sitrat tamponunda, pH 4.0-8.0 aralığına ait enzim aktivite verileri

Termofilik 43 nolu izolat için enzim aktivitesi, Şekil 4.34'te de görüldüğü gibi, **maksimum enzim aktivitesi pH 6,5'te** elde edilmiştir. Bu veri, termofilik organizmaya ait literatürle desteklenmektedir.

Eneyskaya ve ark. (2001), *Thermus* sp. ile yaptığı çalışmada, PNPf substratının hidrolizinde optimal pH'nın 6,5 olduğu belirtilmektedir. Ayrıca enzimin pH 5,5-7,5 aralığında bir gece boyunca stabil kaldığı ve dondurularak saklanan örneklerin yılı aşkın sürede aktivitelerini yitirmedikleri açıklanmıştır.

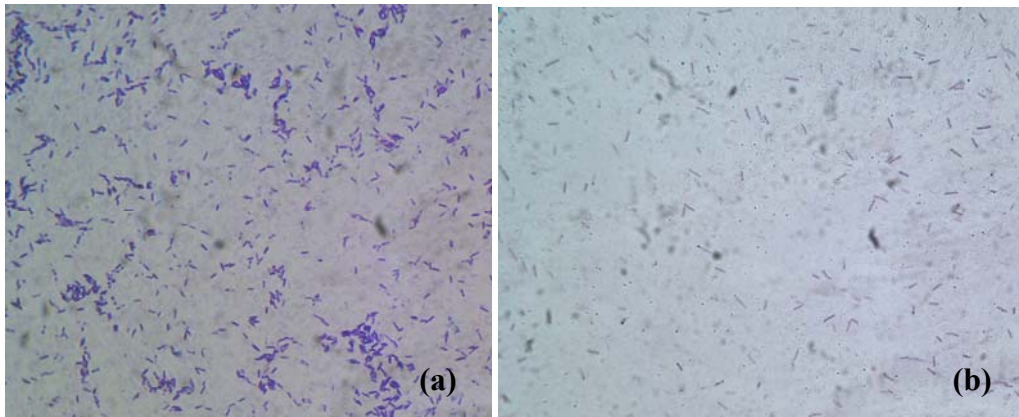
α -L-fukosidaz enzimi üzerine yürütülen çalışmalarla bu enzimin rekombinant formu geliştirilmiştir. Bu amaçla *Thermotoga maritima*'dan ilgili enzim genlerinin *E.coli*'ye aktarılmasıyla genetik mutasyonlar incelenebilmiştir (Tarling ve ark., 2003). Benzer şekilde *Streptomyces* sp.'ın rekombinant 1,3-/4- α -L-fukosidazı üretilmiştir ve ticari olarak mevcuttur. α -L-fukosidazın yapısını daha detaylı ortaya koyabilmek için *Bifidobacterium bifidum*'un 1,2- α -L-fukosidaz enzimi *E.coli*'de klonlanmış ve karakterize edilmiştir. Bu çalışma ile bu enterik

bakterinin intestinal ekosistemde fukosidaz salgılayıcısı rolü de aydınlatılmaktadır. Böylelikle intestinal ortamın sağlığı açısından olumlu etkileri kanıtlanmaktadır (Katayama ve ark., 2004).

α -L-fukosidazın fonksiyonunun moleküler seviyede anlaşılmasına yönelik olarak Sulzenbacher ve ark., *Thermotoga maritima*'da bu enzimin kristal yapısını belirlemeye yönelik çalışmıştır. *Thermotoga maritima* hipertermofilik bir bakteridir. Yakın zamanda, bu bakterinin diğer bakteriyal fukozidazlara oranla memeli fukosidaz ile %38 gibi bir oranda sekans eşdeğerliği ve %56 genel homoloji gösterdiği ortaya çıkarılmıştır. *Thermotoga maritima*'da bu enzimin stereokimyasal yapısı da açıklığa kavuşturulmuştur. *Thermotoga maritima*'ya ait α -L-fukosidaz, sahip olduğu bu yapı ile memeli enzimlerine diğer prokaryotik homologlarından çok daha yakın bulunmuştur. Bu yapının, memelilerde fukosidoz ile ilişkilendirilen genetik mutasyonları incelemeye müsait olduğu tespit edilmiştir. Bu tür enzimlerin işleyiş mekanizmasını açıklığa kavuşturmak, terapötik müdahalelere de imkan sağlayacaktır. Bir başka çalışmada, hipertermofilik Archaeon *Sulfolobus solfataricus* genomunun analiz edilmesiyle ökaryotik fukosidaza N- ve C- terminal fragmentlerinde homolog olan parçaların uzunluğuna dikkat çekmiştir (Ponzano ve ark., 2003; Sulzenbacher ve ark., 2004).

4.5 Seçilen Mezofilik *Bacillus* ve Termofilik Bakteri İzolatlarının Gram's Boyaması

Kısmi saflaştırılması ve kısmi karakterizasyonu yapılan bakteri izolatları Gram's boyamalarının ardından mikroskopta görüntülenmiştir (Şekil 4.35).



Şekil 4.35 a) Mezofilik *Bacillus* Ege.B.1.d.10 ve **b)** Termofilik 43 kodlu izolatlara ait 100x büyütmedeki mikroskop görüntüleri

Her iki izolata ait görüntülerde endospor yapısına rastlanmıştır.

Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik bilim dalında gerçekleştirilen bu çalışma, **108T310** nolu **TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Projesi** olarak kabul edilmiş ve mali olarak desteklenmiştir (Proje Başlangıç ve Bitiş: 01/09/2008-01/09/2009). Aynı zamanda Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri kapsamında **2008 MÜH-03** nolu proje kodu ile mali olarak destekleğe değer bulunmuştur.

Çalışmamız, “**Çeşitli Bakteri İzolatlarında Biyomedikal Alanda Önemli Bazı Enzimlerin Aktivitesinin İncelenmesi**” konu başlığı ile IV. Ulusal Biyomühendislik Kongresi (E.Ü. Atatürk Kültür Merkezi, İzmir- Ekim 2008)’nde **sözlü bildiri** olarak sunulmuştur.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda çeşitli kaynaklardan yapılan izolasyon çalışmaları sonunda oluşturulan “**Biyomühendislik Bölümü Kültür Koleksiyonu**”nda yer alan 100 adet mezofilik *Bacillus* izolatu ile 60 adet endospor içeren termofilik izolatta ve *Bacillus cereus*, *B.subtilis* türleri, *B.licheniformis* NRRL-1001, *B.circulans* NRRL B-381, NRRL B-378, *Paenibacillus illinoisensis* NRRL NRS-1356, *Geobacillus stearothermophilus* NRRL-1102 tip kültürlerinde α -L-fukosidaz enzim aktivitesi temel karbon kaynağı olarak PGM (porcine gastric mucin) içeren sıvı kültür ortamında taranmıştır. Çalışmada kendi ülkemizden izole edilmiş bakteriler daha önce incelenmemiş ve yeni gen kaynakları olduklarından bu durum çalışmamıza özgünlük kazandırmaktadır.

Çalışmada öncelikle termofilik ve mezofilik izolatlarda α -L-fukosidaz enzim aktivitesinin taranmasının ardından, farklı karbon kaynaklarının (substratların) enzim aktivitesine etkisinin incelenmesi amacıyla seçilen izolatların mezofilik altı izolatta (*Bacillus* Ege.B.1.1.ka, *Bacillus* Ege.B.1.d.2, *Bacillus* Ege.B.1.d.10, *Bacillus* Ege.B.24.1i, *Bacillus* Ege.B.24.2i, *Bacillus* Ege.B.24.4i) ve termofilik endospor içeren beş izolatta (**İzolat 13, İzolat 24, İzolat 43, İzolat 36, İzolat 41**) 12 farklı karbon kaynağında enzim aktivitesi tayin edilmiştir. En yüksek aktiviteler hem mezofilik, hem de termofilik izolatlar için PGM içeren besi ortamında sağlanmıştır. Farklı izolatlarda, farklı karbonhidratlarda görülen görece yüksek aktivitelerin, o organizmalardaki α -L-fukosidaz enziminin transglikozilasyon (fukoziltransferaz) aktivitesi nedeniyle olduğu düşünülmektedir.

PGM içeren besi ortamında tespit edilen en yüksek aktivite değerleri nedeniyle birbirine yakın yüksek aktivite değerine sahip iki mezofilik (*Bacillus* Ege.B.1.d.10 ve *Bacillus* Ege.B.1d.2) ve bir termofilik izolatın (**İzolat 43**) farklı pH, farklı sıcaklık ve farklı PGM konsantrasyonu konfigürasyonlarında üretim koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Optimum üretim koşulları belirlenen izolatlar için ikişer litrelik üretimlerinin ardından üretilen enzimin kısmi saflaştırmasına çalışılmıştır. Bu amaçla, laboratuvar ölçeğinde biyoproses ekipmanları ile santrifügasyon, ultrafiltrasyon,

protein presipitasyonu, diyaliz ve **FPLC** jel filtrasyon kromatografi yapılmıştır. Kullanılan tüm ekipmanlar ileri teknolojiye sahip olup, yapılan kısmi saflaştırma endüstriyel bir enzim üretimi için ar-ge çalışması niteliğindedir.

Enzimlerin medikal alandaki önemlerinin tespit edilmesi, enzim teknolojisindeki araştırmaları terapötik enzimlere yöneltmiştir. Üretim proseslerinde diğer endüstrilere oranla yüksek saflık gerektiren bu sektör, birim ürün başına yüksek etiket fiyatlarına sahip olması nedeniyle de ilgi çekmektedir.

Saflaştırmanın çok önemli olduğu bu medikal enzimde, kısmi saflaştırmanın her basamağında enzime ait, aktivite (mU/ml), total aktivite (mU), total protein (mg), spesifik aktivite (mg/ml) tayin edilmiş olup, saflaştırmanın verimi ortaya konmuştur. Mezofilik *Bacillus* Ege.B.1.d.10'dan üretilen enzim %24,55 verimle, termofilik endospor içeren İzolat 43'den üretilen α -L-fukosidaz enzimi ise %40,62 verimle, dört basamakta kısmi saflaştırılmıştır.

α -L-fukosidaz enzimi için amaçlanan kısmi karakterizasyonda ise, geniş bir sıcaklık ve pH aralığında iki farklı izolatta üretilen enzimlerin maksimum aktivitelerinin gözlendiği optimum sıcaklık değerleri ile optimum pH değerleri açığa çıkarılmıştır. Termofilik izolatta tespit edilen optimum aktivitenin tespit edildiği düşük sıcaklık (37⁰C), yüksek sıcaklıklarda (65-70⁰C) büyüyen bu organizma için beklentileri karşılamamıştır.

Son olarak enzimin her bir saflaştırma basamağından alınan örneklerle SDS-PAGE'de molekül ağırlıkları tespit edilmiştir. Bu sayede çalışmada hedeflendiği gibi özgün gen kaynaklarımız ile üretilen α -L-fukosidaz enzimine ait özellikler kısmen ortaya konarak, saflaştırmaya yönelik ilk adımlar atılmıştır.

Çalışma kapsamında incelenen literatürler ve çeşitli denemelerle medikal bir enzim için önemli bir bilgi birikimi oluşturulmuştur. Araştırmada elde edilen bulgular doğrultusunda; aşağıda belirtilen konularda yapılacak çalışmaların önemli sonuçlar sağlayacağı düşünülmektedir:

- Sınırlı süre ve mali kısıtlar nedeniyle kısmi olarak gerçekleştirilen karakterizasyonun, terapötik kullanım potansiyeli olan bir enzim için önemi büyüktür. Enzim kinetiğinin çalışılması, çeşitli inhibitör ve aktivatör bileşiklerin enzim aktivitesine etkisinin tespiti gerekmektedir.

Bu noktada, mikrobiyal enzimlerin memeli enzimlerine en yakın formlarının tespiti önemlidir.

Fukoz bağı glikoprotein ve glikolipitlerin biyolojik fonksiyonlarını anlamaya yönelik yapılan çalışmalarda, bu yapıların sahip olduğu fukosidik bağlar ve dolayısıyla fukosidaz enzimi ile ilişkilendirilmiştir.

- Çalışmada kullanılan temel karbon kaynağı PGM, kompleks yapılı bir materyaldir. Literatürlerde gerek memeli gerekse mikrobiyal kaynaklı α -L-fukosidaz enzimleri için farklı substrat spesifiteleri verilmektedir. Bu nedenle enzimin terapötik amacı göz önüne alınarak insan sütü, kan ve salgılarında da izolatlardan üretilen α -L-fukosidaz enziminin etkinliği araştırılmalıdır.
- Çalışmaya başlanırken literatürler doğrultusunda α -L-fukosidaz enzimi için *Bacillus* suş ve izolatları için aktivite tayininin α -1,2 fukozidik bağ içeren PGM ve α -1,6 fukozidik bağ içeren PNPF'ye karşı yapılması ve enzimin multiformunun üretildiği tespit edilen izolatta, enzimlerin farklı kromatografi basamaklarında ayrılması amaçlanmıştır. Fakat aktivite tayininde PGM kullanılması halinde gerekli "L-fukozdehidrogenaz" temin edilememiştir. Bu malzemenin temini ya da literatürlerdeki gibi bir başka canlıdan saflaştırılması yoluna gidilebilir.
- Mikrobiyal kaynaklı α -L-fukosidaz enziminin farklı bağ tiplerine özgü formlarının tespiti için yine "Biyomühendislik Bölümü Kültür Koleksiyonu"nda alan çeşitli fungiye (maya ve küflere) ait tip kültürler bir arada taranarak aktiviteler belirlenebilir.
- Endospor içeren termofilik izolatların *Geobacillus* genusuna ait olduğu düşünülmektedir bunun doğrulanması için tür tayini gerekmektedir.
- PGM ile gerçekleştirilen iki litrelik üretim sonucunda ortamın viskoz yapısı kısmi saflaştırmayı oldukça zorlaştırmıştır. Bunun önüne geçilebilmesi için ilave saflaştırma basamakları denenmelidir. Organizmalar yalnızca PGM varlığında bu viskoz yapıyı oluşturmaktadır bu nedenle PGM'ye alternatif kompleks yapılı bir başka bileşen ile çalışılması uygun olabilir.

- *Bacillus* Ege.B.1.d.10'nun temel karbon kaynağı olarak PGM'yi kullandıktan sonra üretim ortamına salgıladığı koyu pembe renkli pigmentin tespit edilmesi, *Bacillus* genusunda nadiren görülen bu tür pigmentler açısından, yeni bir ufuk açacaktır. Saflaştırma basamaklarında dahi ayrılmayan bu bileşenin belirlenmesi gerekmektedir.
- Medikal enzimlerin gerektirdiği yüksek saflık nedeniyle kromatografi basamağına iyon değişim kromatografi de ilave edilerek saflaştırmaya devam edilmelidir. Bu amaçla daha çok enzim üretimi gerektiğinden enzim üretiminde ölçek büyütülmeye gidilmesi, 3-4 litrelik mini reaktörden, 10 litrelik reaktörde pilot ölçekli üretimi bir **biyomühendis**in amaçlarından biri olmalıdır.
- Literatürlerde enzimin memelilere en yakın formunun tespiti için ilgili gen sekansının ortaya konduğu çalışmalar giderek artmaktadır. İzolatlarımızın ürettiği enzimlerin de uzun vadede gen sekansları ve diğer açığa çıkarılan genlerle homolojilerinin ortaya konması önemlidir. Tabi ki enzime ait genin ortaya çıkarılmasının ardından özellikle büyük ölçekte üretimdeki dezavantajları göz önüne alındığında termofilik organizmadan α -L-fukosidaz enziminin rekombinant formu çalışılmaya adaydır.

Sonuç olarak, mikrobiyal kaynaklı α -L-fukosidaz enzimleri, geniş substrat spesifikliğı, büyük miktarlarda üretilebilir oluşları ve memeli fukosidaza yakın özellikler taşımaları nedenleriyle biyoteknolojik amaçlar için çok daha uygundur. İlerleyen çalışmalarla α -L-fukosidazı geleceğın terapötik enzimlerinden biri olarak görmemiz mümkündür. Lizozomal enzim bozukluklarında aralarında memeli (insan) α -L-fukosidazının da bulunduğu enzim replasman tedavisi araştırmalarında mikrobiyal kaynaklı α -L-fukosidaz enzimleri umut verici bir kaynaktır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ahmad, S., Scopes, R.K., Rees, G. N., Patel, B.K. C., 2000**, *Saccharococcus caldoxylosilyticus* sp. nov., an obligately thermophilic, xylose-utilizing, endospore-forming bacterium. *Int J Syst Evol. Microbiol* 50, 517–523.
- Ajisaka, K., Fijimoto, H., Miyasato, M., 1998**, An α -L-fucosidase from *Penicillium multicolor* as a candidate enzyme for the synthesis of $\alpha(1\rightarrow3)$ -linked fucosyl oligosaccharides by transglycosylation, *Carbohydr Res* 309, 125–9, *Applied Microbiology*, Vol.24, 539-548.
- Allen, H., DiCioccio, R.A., 1995**, Synthesis and utilization of therapeutic agents for the treatment of lysosomal storage diseases. US Patent No: 5433946.
- Atlas, R.M., Parks, L.C., Brown, A.E., 1995**, *Laboratory Manual of Experimental Microbiology*, Mosby-Year Book, St. Louis, Missouri, ISBN: 0-8151-0324-7, 565p.
- Bailey, J.E., Ollis, D.F., 1986**, *Biochemical Engineering Fundamentals*, Second Edition, McGraw-Hill Inc. Chapter 11, 726-738pp.
- Bansil, R., Turner, B.S., 2006**, Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 11, 164 – 170.
- Berteau, O., Bielicki, J., Kilonda, A., Machy, D., Anson, D. S., Kenne, L., 2004**, Alpha-L-fucosidases: exoglycosidases with unusual transglycosylation properties, *Biochemistry* 43, 7881-7891.
- Bollag, D.M., Edelstein, J., Rozycki, M.D., 1996**, *Protein Methods*, Wiley-Liss Press. 68-71, 107-128pp.
- Bradford, M.M., 1976**, A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-54.
- Brattain, M.G, Kimball, P.M., Pretlow, T.G., 1997**, β -Hexosaminidase isoenzymes in human colonic carcinoma. *Cancer Res.* 37: 731-735.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bukofzer, S., Stass, P.M., Kew, M.C., Beer, M., Groneveld, H.T., 1989**, α -L-fucosidase as a serum marker of hepatocellular carcinoma in southern African blacks. *Br J. Cancer*; 59: 417-420.
- Burkhard-Kresse, G., 1995**, Analytical uses of enzymes, in *Biotechnology, a Multi-Volume Treatise*, 2nd ed., Vol. 9, VCH, Weinheim. 138–163pp.
- Bustard, M.T., Whiting, S., Cowan, D.A., Wright, P.C., 2002**, Biodegradation of high-concentration isopropanol by a solvent-tolerant thermophile, *Bacillus pallidus*. *Extremophiles*. 6 (4), 319–323.
- Cobucci, B., Conte, F., Rossi, M., Moracci, M., 2008**, The α -L-fucosidase from *Sulfolobus solfataricus*. *Extremophiles* (Springer). 12:61-68.
- Coolbear, T., Daniel, R. M., Morgan, H. W., 1992**, The enzymes from extreme thermophiles: bacterial sources, thermostabilities and industrial relevance. *Advance in Biochemical Engineering*. 45,58-90.
- Demirjian, D., Moris, Varas, F., Cassidy, C.S., 2001**, Enzymes from Extremophiles. *Current Opinions in Chemical Biology* 5, 144–151.
- Dunbar, B.S., 1990**, *Two-Dimensional Electrophoresis And Immunological Techniques*. 2th Ed., 165-195pp.
- Durand, P., Borrone, C., Della Cella, G., 1969**, Fucosidosis. *J. Pediatr*. 75: 665-74.
- Egnund-Mortensson, K., Schöyen, R., Howe, C., Lee, L.T., Harboe, A., 1969**, α -L-Fucosidase from a Soil Bacterium. *J. Bacteriol*. 98(3): 924-929.
- Elbein A., 1999**, *Complex Carbohydrates: Glycoproteins*. Medical Biochemistry Bynes. Mosby Publishing. 308-17pp.
- Eneyskaya, E.V., Kulminskaya, A.A., Kalkkinen, N., Nifantiev, N.E., Arbatskii, N. P., Saenko, A. I., Chepurnaya, O. V., Arutyunyan, A. V., Shabalin, K. A., Neustroev, K. N., 2001**. An α -L-fucosidase from *Thermus* sp. with unusually broad specificity. *Glycoconjugate Journal*. 18:827-834.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Enns, G.M., Steiner, R.D.,** (Çev. Akça T.), **2007**, Lizozomal depo hastalıkları. İstanbul: Güneş Kitapevi, 1007-12s.
- Farkas, E., Thiem, J., Ajisaka, K., 2000**, Enzymatic synthesis of fucose-containing disaccharides employing the partially purified α -L-fucosidase from *Penicillium multicolor*, Carbohydr. Res. 328, 293-299.
- Feitkenhauer, H., Müller, R., Markl, H., 2003**, Degredation of polycyclic aromatic hydrocarbons and long chain alkanes at 60-70 °C by *Thermus* and *Bacillus* spp., Biodegradation, 14, 367-372.
- Flint, S.H., Ward, L.H., Walker, K.M.R., 2001**, Functional Grouping of Thermophilic *Bacillus* strains using amplification profiles of the 16S-23S internal spacer region, Syst. Appl. Microbiol. J. 24 (3): 539-48.
- Fortina, M. G., Pukall, P., Schumann, D., Mora, C., Parini, P. L., Manachini, E., 2001**, *Ureibacillus* gen. nov., a new genus to accommodate *Bacillus thermosphaericus* semendation of *Ureibacillus thermosphaericus* and description of *Ureibacillus terrenus* sp. nov. Int. J. System. Evol. Microbiol. 51:447-455.
- Gordon, R. E., W. C. Haynes, C.H.N., Pang, 1973**, The Genus *Bacillus*. Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, Washington, D.C. 178-207pp.
- Goso, Y., Ishihara, K., Sugawara, S., Hotta, K., 2001**, Purification and characterization of α -L-fucosidase from *Streptomyces* sp. OH11242. Comparative Biochem. And Phys. Part B. 130:375-383.
- Goto, K., Omura, T., Hara, Y., Sadale, Y., 2000**, Application of partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus*. Journal of General Applied Microbiology. 46, 1-8.
- Hough, W.D., Danson, M.J., 1999**, Extremozymes, Current Opinion in Chemical Biology. 3, 39-46.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

[http://www.biocompare.com/ProductDetails/248682/alpha-L-Fucosidase-\(AFU\)Colorimetric-Assay-Kit.html](http://www.biocompare.com/ProductDetails/248682/alpha-L-Fucosidase-(AFU)Colorimetric-Assay-Kit.html)

<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/cont3aa.html>

http://www.fli-leibniz.de/~rake/Bioinformatics_WEB/gifs/sds_page1.gif

<http://www.gmi-inc.com/Products/PharmaciaFPLC.htm>

<http://www.hhmi.umbc.edu/toolkit/aktadesign.pdf>

http://www.lysosomallearning.com/healthcare/about/lsd_hc_abt_fucosidosis1.asp

<http://www.microbelibrary.org/microbelibrary>

<http://www.nature.com>

<http://www.sartorius-stedim.com.cn/>

http://www.steve.gb.com/bacillus_subtilis.jpg

Iwase, H., Ishii, I., Ishihara, K., Tanaka, Y., Omura, S., Hotta, K., 1988, Release of oligosaccharides possessing reducing-end *N*-acetylgalactosamine from mucus glycoprotein in *Streptomyces* sp. OH-11242 culture medium through action of endo-type glycosidase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 151, 422-428.

Katayama, T., Fujita, K., Yamamoto, K., 2005, Novel *Bifidobacterial* Glycosidases Acting on sugar Chains of Mucin Glycoproteins. *Biosci. and Bioeng.* 99(4):457-465.

Kim, Y.S., Park, C.S., Oh, D.K., 2006, Lactulose production from lactose and fructose by a thermostable α -galactosidase from *Sulfolobus solfataricus*, *Ezyme and Microbial Technology.* 39, 903-908.

Kirk, O., Borchert, T.V., Fuglsang, C.C., 2002, Industrial enzyme applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 345–351.

Kochibe, N., 1973, Purification and properties of α -L-fucosidase from *Bacillus fulminans*. *J.Biochem.* 74, 1141-1149.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kopetzki, E., 1994**, Enzymes in diagnostics: Achievements and possibilities of recombinant DNA technology, Clin. Chem. 40, 688–704.
- Kurimura, Y., Tsuji, Y., Yamamoto, K., Kumagai, H., Tochikura, T., 1995**, Efficient production and purification of extracellular 1,2- α L-fucosidase of *Bacillus* sp. K40T. Biosci. Biotech. Biochem. 59, 589-594.
- Leray, G., 1989**, Biochemical aspects of α -L-fucosidase in hepatocellular carcinoma. Hepatology. 9 (2): 249-252.
- Levy, G.A., McAllan, A., 1961**, Mammalian fucosidases. Biochemical Journal. 80: 435-439.
- Lopez, V.J., 1989**, Value of serum measurement of α -L-fucosidase in the diagnosis of hepatocarcinoma. Med. Clin (Barc); 93:241-243.
- Macbeth, R.A.L., Bekesi, J.G., 1962**, Plasma glycoproteins in various disease states including carcinoma. Cancer Res. 22:1170-1176.
- Madigan, M., Martinko, J., 2006**, Brock Biology of Microorganisms, 11th Edition, Pearson Prentice Hall Pearson Education, NJ, ISBN: 0-13-196893-9, 378,991-995pp.
- Manachini, P. L., Mora, D., Nicastro, G., Parini, C., Stackebrandt, E., Pukall, R., Fortina, M. G., 2000**, *Bacillus thermodenitrificans* sp. nov., nom. rev. Int. J. System. Evol. Microbiol. 50:1331-1337.
- Maugeri, T.L., Gugliandolo, C., Caccamo, D., Stackebrandt, E., 2001**, A polyphasic taxonomic study of thermophilic bacilli from shallow, marine vents. Systematic and Applied Microbiology. 24, 572–587.
- McMullan, G., Christie, J.M., Rahman, T.J., Banat, I.M., Ternan, N.G., Marchant, R., 2004**, Habitat, applications and genomics of the aerobic, thermophilic genus *Geobacillus*. Biochemical Society Transactions vol. 32 (2), 214-217.
- Menteş, N.K., Menteş, G., 2002**, Harper' in Biyokimyaya Bakışı, EÜTF Yayınları; Onat T. Emerk K., Sözman E. İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, 265-272s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Miura, T., Okamoto, K., Yanase, H., 2005, Purification and characterization of extracellular 1,2- α -L-fucosidase from *Bacillus cereus*. J. Biosci., Bioeng., 99(6):629-635.

National Institutes of Health; www.nih.gov/

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., 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 thermo-catenulatus*, *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*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:433-446.

OMIM; www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/

Ophanet;<http://www.orpha.net>

Osanjo, G., Dion, M., Drone, J., Solleux, C., Tran, V., Rabiller, C., Tellier, C., 2007, Directed Evolution of the α -L-Fucosidase from *Thermotoga maritima* into an α -L-Transfucosidase. Biochemistry. 46(4), 1022-1033.

Öngen G., 2009, Mühendislik Laboratuvarı Ders Notları.

Panke, S., Wubbolts, M.G., 2002, Enzyme technology and bioprocess engineering. Curr. Opin. Biotechnol. 13: 111-116.

Priest, F.G., 1977, Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. Bacteriol. Rev. 41 (3):711-753.

Rainey, F. A., Fritze, D., Stackebrandt, E., 1994, The phylogenetic diversity of thermophilic members of the genus *Bacillus* as revealed by 16S rDNA analysis. FEMS Microbiol Lett 115, 205–211.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Robinson, D., Thorpe, R., 1973**, Human liver α -L-fucosidases. Clin. Chim. Acta. 47, 403-407.
- Sano, M., Hayakawa, K., Kato, I., 1992**, Purification and characterization of α -L-fucosidase from *Streptomyces* species, J. Biol. Chem. 267, 1522–7.
- Scanlin, TF., Glick, M.C., 1981**, α -L-fucosidase in cystic fibrosis. Clin Chim Acta. 114:269-274.
- Sharp, R.J., Riley, P.W., White, D., 1992**, in Thermophilic Bacilli (Kristjansson, J.K., ed.), CRC Press, Boca Raton, FL. 19–50pp.
- Shaw, R.A., Kryston, L.J., Mills, L.C., 1968**, Plasma fucose and fucose tolerance in diabetes mellitus. Annals New York Academy of Sciences 148:787-795.
- Sheehan D., 2003**, Fast Protein Liquid Chromatography. ISBN:10.1385/1-59259-655-X:253. 244- 253pp.
- Slepecky, R.A., Hemphill, H.E., 1991**, In The genus *Bacillus*-Nonmedical. The Prokaryotes, 2nd edn ed. Ballows, A. New York: Springer Verlag. 1663–1696pp.
- Spiro, R.G., 1969**, Medical progress, Glycoproteins; Their biochemistry biology and role in human disease, New Engl. J. Med. 281: 1043-1055.
- Sulzenbacher, G., Bingon, C., Nishimura, T., Tarling, C.A., Withers, S.G., Henrissat, B., Bourne, Y., 2004**, Crystal Structure of *Thermotoga maritima* α -L-fucosidase. J. Biol. Chem. 279 (13): 13119–13128.
- Tarling, C.A., He, S., Sulzenbacher, G., Bingon, C., Bourne, Y., Henrissat, B., Withers, S.G., 2003**, Identification of the catalytic nucleophile of the family 29 α -L-fucosidase from *Thermotoga maritima* through trapping of a covalent glycosylenzyme intermediate and mutagenesis. J. Biol. Chem. 278:47394–47399.
- Tatsumura, T., Sato, H., Mori, A., Komori, Y., Yamamoto, K., Fukatani, G., 1977**, Clinical significance of fucose level in glycoprotein fraction of serum in patients with malignant tumors. Cancer Res. 37:4101-4103.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Temizkan, G., ve Arda. N., 2008**, Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. İstanbul Üniversitesi, Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİYOGE). 12-25, 42-55, 67-89s.
- Troost, J., Heijden, M.C.M., Staal, G.E.J., 1976**, Characterization of α -L-fucosidase from two different families with fucosidosis. Clin. Chim. Acta.;73;329-346.
- Tsay, G.C., Dawson G., 1977**, A sensitive spectrophotometric method for detection of L-fucose, Anal. Biochem. 78, 423–430.
- Tsuji, Y., Yamamoto, K., Tochikura, T., 1990**, Purification and some properties of a novel α -L-fucosidase capable of acting on α -(1→6)-L-fucosidic linkages from *Bacillus circulans* M28, J. Biochem. 108, 235–40.
- Tsuji, Y., Yamamoto, K., Tochikura, T., Seno, T., Ohkubo, Y., Yamaguchi, H., 1990a**, Purification and characterization of α -L-fucosidase from *Bacillus circulans* grown on porcine gastric mucin. J. Biochem. 107, 324-330,
- Walsh, G., 2001**, Proteins: Biochemistry and Biotechnology, John Wiley & Sons, Chichester, UK, 158-195, 352-375pp.
- Walsh, G., 2002**, Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology, John Wiley & Sons, Chichester, UK, 18-27, 121-138pp.
- White, D., Sharp, R. J., Priest, F. G., 1993**, A polyphasic taxonomic study of thermophilic bacilli from a wide geographical area. Antonie Leeuwenhoek 64:357-386.
- Willems, P.J., Gatti, R., Darby, J.K., 1991**, Fucosidosis revisited: a review of 77 patients. Am. J. Med. Genet. 38:111–131.
- Wiseman, A., 1987**, The application of enzymes in industry. Handbook of enzyme biotechnology. Second Edition. Chapter 3. 274-373pp.
- Yamamoto, K., Tsuji, Y., Kumagai, H., Tochikura, T., 1986**, Induction and Purification of α -L-fucosidase from *Fusarium oxysporum*. Agric. Biol. Chem. 50(7):1689-1995.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yano, T., Yamamoto K., Kumagai, H., Tochikura, T., Yokoyama T., Seno, T., Yamaguchi, H., 1985,** Purification and Characterization of a Novel α -L-fucosidase from *Fusarium oxysporum* Grown on Sludge. Agric. Biol. Chem. 49(11):3179-3187.
- Yogeeswaran, G., 1983,** Cell surface glycolipids and glycoproteins in malignant transformation. Adv. Cancer Res. 38:289-350.
- Yong P., Xiaojuan, Y., Yizheng, Z., 2005,** Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity *in vivo*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 69: 126–132.
- Yu, Z.W., Duan, F.L., Yang, X.W., 1988,** Diagnostic significance of the determination of serum α -L-fucosidase in primary hepatocellular carcinoma. World Chinese Journal of Digestology, 28 (7): 394-396, 442.
- Zheng, T., Ren, Z.Y., 1990,** Activities of serum enzymes in patients with viral hepatitis B, posthepatitic cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Chin. Med. J. 103:729-734.
- Zielke, K., Okada, S., O'Brien, J. S., 1972,** Fucosidosis: diagnosis by serum assay of a-L-fucosidase. J. Lab. Clin. Med. 79, 164-169.

ÖZGEÇMİŞ

PINAR SÖZER

Kişisel Bilgiler

Doğum Tarihi: 13.01.1983

Doğum Yeri: Edirne- Uzunköprü

Cinsiyet: Kadın

Uyruk : T.C.

Medeni Durum : Bekar

Ehliyet: Var (B sınıfı)

Eğitim Bilgileri

•1994- 1997 Malatya Anadolu Lisesi

•1997- 2001 Elazığ Anadolu Lisesi, Diploma Notu: 4.61 Peki

•2002- 2006 Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi,
Biyomühendislik Bölümü
Mezuniyet Notu: 78.43

•2005- 2008 Anadolu Üniversitesi Açık Öğretim Fakültesi **Sağlık Kurumları İşletmeciliği (İkinci Üniversite)**

•2008-...Anadolu Üniversitesi Açık Öğretim Fakültesi **İktisat (İkinci Üniversite)**

•2006-...Ege Üni. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik
Böl.**Yüksek Lisans Öğr.**

Bildiği Diller/ Bilgisayar Bilgisi

İngilizce (Seviyesi: İyi), Almanca (Başlangıç seviyesi)

- Microsoft Office Programları (Word, Excel, Power Point),
- Matlab Programlama Dili ve Mühendislik Uygulamaları (6.5)

Etkinlikler (Seminerler, Sempozyum, Kurslar)

- 03/2005 2. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Genetik Kış Okulu, İstanbul Üniversitesi,
- 03/2005 2. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Genetik Kış Okulu Genetik Kriminalistik Çalıştayı, İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü,
- 03/2005 Gıdalarda Biyoteknoloji Uygulamaları, Ege Üniversitesi,
- 03/2005 Adli Bilimlerde Güncel Gelişmeler, Ege Üniversitesi,
- 09/2005 BIOMED' 05 International Biomedical Science and Technology Symposium, Ege Üniversitesi,
- 04/2006 3. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Genetik Kış Okulu, İstanbul Üni.,

- 06/2006 Temel Hücre Kùltürleri ve Molekùler Uygulamaları Kursu, Ege Üni.,
- 02/2007 4. Ulusal Molekùler Biyoloji ve Genetik Kış Okulu, İstanbul Üni.,
- 12/2007 Biyoremediasyon Temel Esasları ve Uygulamaları, Ege Üni.,
- 12/2007 Inno-Venture 2007, Proje Pazarı- Ege Üni.,
- 02/2008 HACCP (TS EN ISO 22000), EBİLTEM& Kırmacı Müh. ve Danışmanlık Tic.Ltd. Şti.
- 03/2008 ISO 9001:2000 Kalite Yönetim Sistemi Eğitimi, OPTİMAL End. Müh. Müş. Ltd. Şti.
- 03/2008 Kuruluş İçi Kalite Tetkikçisi Eğitimi (Başarı Notu:77), OPTİMAL End. Müh. Müş. Ltd. Şti.
- 03/2008 YETENEK YÖNETİMİ, Yenibiriş & Ege Üni. İktisadi ve İdari Bilimler Fakùltesi
- 05/2008 Müşteri Memnuniyeti Eğitimi, OPTİMAL End. Müh. Müş. Ltd. Şti.
- 05/2008 Etkin Satış ve Pazarlama Teknikleri Eğitimi, OPTİMAL End. Müh. Müş. Ltd. Şti.
- 10/2008 IV. Ulusal Biyomühendislik Kongresi (Uluslararası Katılımlı), [Organizasyon Komitesinde Görevli]

Yaptığı Stajlar

- **Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakùltesi, Biyomühendislik Bölümü (İZMİR)**

Staj Tarihi: 19. 07. 2004 – 03. 09. 2004

Yapılan Çalışmalar: Endüstriyel ürünlerde mikrobiyolojik analizler

Bölümü: Endüstriyel Mikrobiyoloji Laboratuvarı

- **DEPA İlaç Aktif Maddeleri ve Pazarlama A.Ş [DEVA Holding] (İzmit / KOCAELİ)**

Staj Tarihi: 04. 07. 2005- 29. 07. 2005

Yapılan Çalışmalar: Biyoproses Mühendisliği bilgilerinin pekiştirilmesi, alt akım ve üst akım prosesin takibi

- **Gülhane Askeri Tıp Akademisi - GATA - TIBBİ GENETİK BİLİM DALI (ANKARA)**

Staj Tarihi: 01. 08. 2005 – 29. 08. 2005

Yapılan Çalışmalar: Sitogenetik İncelemeler, Moleküler İncelemeler, Preimplantasyon Genetik Tanı, Hematolojik Malignitelerde Moleküler Genetik Tanı, Moleküler Sitogenetik Tanı, Moleküler Genetik, Tek Gen Hastalıklarında Moleküler Tanı Çalışmaları.

Sözlü Bildiriler

Pınar Sözer, İrem Lüleci, Rengin Eltem (2008). Çeşitli Bakteri İzolatlarında Biyomedikal Alanda Önemli Bazı Enzimlerin Aktivitesinin İncelenmesi IV. Ulusal Biyomühendislik Kongresi E.Ü. Atatürk Kültür Merkezi, İzmir.

Üniversitede Yapılan Çalışmalar

Proses Tasarımı I-II: Sitrik Asit Üretimi Endüstriyel Ölçekli Proses Dizaynı

Lisans Bitirme Tezi: Yapay Damar ve Kalp Kapakçığı Çalışmaları, Doku Mühendisliği (Teorik) ,

Tez Değerlendirmesi: 100 [**Prof.Dr. İsmet Deliloğlu-GÜRHAN**]

Yüksek Lisans Semineri: 29.05.2008- Rekombinant Enzimler

Tübitak 108T310 nolu Hızlı Destek Projesi, Bursiyer (Çeşitli *Bacillus* suş ve izolatlarında medikal alanda önemli α -L-fukosidaz enziminin taranması ve enzimin kısmi karakterizasyonu)

Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi **2008 MÜH-03** (*Bacillus* suşlarında ve izolatlarında biyomedikal alanda önemli α -L-fukosidaz enziminin taranması ve enzim aktivitelerinin belirlenmesi)

Üye Olduğu Topluluklar

- TMMOB Kimya Mühendisleri Odası -Oda Sicil No: 19573
- Ege Üniversitesi Bilim Teknoloji Topluluğu- EBİLTET,
- İstanbul Üniversitesi Genetik Kulübü – İUGEN.