

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

156155

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Anoxybacillus gonensis D-GLUKOZ (D-KSİLOZ) İZOMERAZ GENİNİN
KLONLANMASI, İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Biyolog Hakan KARAOĞLU

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
“Yüksek Lisans (Biyoloji)”
Ünvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 09.08.2004
Tezin Savunma Tarihi : 01.09.2004

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Ali Osman BELDÜZ

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Asım KADIOĞLU

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Saadettin GÜNER

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Yusuf AYVAZ

Trabzon 2004

156155

ÖNSÖZ

A. gonensis G2^T ye ait glukoz izomeraz (GI) geninin klonlanması, gen ürününün izolasyonu ve karakterizasyonunun incelendiği bu araştırma, kısmen KTÜ Araştırma Fonu 2003.111.004.6 numaralı araştırma projesinden sağlanan imkanlarla KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında, Biyoloji bölümü, Moleküler Biyoloji laboratuvarında yapılmıştır.

Araştırma konusunun seçiminde, verilerin değerlendirilmesi ve sonuçlandırılmasında değerli eleştiri ve önerileri ile yol gösteren hocam Doç.Dr Ali Osman BELDÜZ'e, biyokimyasal çalışmalarda değerli eleştiri ve önerilerini esirgemeyen hocam Doç.Dr. Saadettin GÜNER'e ve laboratuvar imkanlarını sunumunda her türlü kolaylığı gösteren Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ'a çok teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmaları esnasında bilgi ve tecrübelerini esirgemeyerek yol gösterici olan Dr. Sabriye DÜLGER ÇANAKÇI'ya ve Öğr. Gör. Barbaros DİNÇER'e teşekkür etmeyi bir borç bilirim. Ayrıca, laboratuvar çalışmalarında yaşanan sıkışık ve zor anlarda yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Aykut SAĞLAM'a, Arş. Gör. Fatih Şaban BERİŞ'e, ve Arş. Gör. Cemal SANDALLI'ya, tez yazımı esnasında bilgi ve eşsiz yardımlarını esirgemeyen sevgili Ali Adem BAHAR ve Bülent AKAR'a çok teşekkür ederim.

Ayrıca öğrencilik hayatım boyunca benden maddi-manevi hiçbir desteğini esirgemeyen biricik nişanlım Arş. Gör. Handan ONAY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tüm bunlara ek olarak sevgi ve destekleriyle her zaman bana güç veren aileme ve akrabalarımın minnetlerini sunarım.

Hakan KARAOĞLU

Trabzon, 2004

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET	VI
SUMMARY.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ	IX
SEMBOLLER DİZİNİ	X
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. GİRİŞ	1
1.2. Glukoz İzomerazın Önemi	3
1.2.1. Kimyasal İzomerizasyona Karşı Enzimatik İzomerizasyon	4
1.2.2. High Fructose Corn Syrup Üretimi	4
1.2.3. Tatlandırıcı Olarak HFCS Kullanımının Avantajları	5
1.2.4. Etanol Üretimi	6
1.3. Mikroorganizma Kaynakları	7
1.4. Glukoz İzomeraz Üretimi	9
1.4.1. Verimin Arttırılması	9
1.4.2 Fermentasyon Ortamının Optimizasyonu	10
1.4.2.1. İndükleyici	11
1.4.2.2. Azot kaynağı	11
1.4.2.3. Metal İyon Gereksinimi	12
1.5. Glukoz İzomerazın Saflaştırılması	12
1.6. Glukoz İzomerazın Özellikleri	13
1.6.1. Substrat Özgünlüğü	13
1.6.2. Metal İyonu Gereksinimi ve İnhibitörler	13
1.6.3. Alt Ünite Yapısı	14
1.6.4. Optimum Sıcaklık ve pH	14
1.6.5. Aktif Bölge Çalışmaları	15

1.7.	Rekombinant DNA Teknolojisi ve Glukoz İzomeraz	15
1.8.	Çeşitli Glukoz İzomerazların Baz Dizilimi Benzerliği	15
1.9.	Glukoz İzomerazın Çalışma Mekanizması	16
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR	18
2.1.	<i>Anoxybacillus gonensis</i> G2 ^T 'te Glukoz İzomeraz Aktivitesinin Tespiti	18
2.1.1.	Petri Deneyi	18
2.1.2.	Aktivite Deneyi	18
2.2.	Moleküler Çalışmalar	19
2.2.1.	Glukoz İzomeraz Geninin PCR Yöntemi ile Belirlenmesi	19
2.2.1.1.	Dejenere Primer Sentezi	19
2.2.1.2.	Genomik DNA izolasyonu	19
2.2.1.3.	PCR Reaksiyonu ile GI Gen Parçasının Çoğaltılması ve Klonlanması.....	20
2.2.1.4.	Ters PCR (Inverse PCR) İle Genin Kalan Kısımlarının Yakalanması ve Klonlanması	21
2.3.	Biyokimyasal Çalışmalar	22
2.3.1.	Protein Tayini	22
2.3.2.	Biyokimyasal İncelemelerde Kullanılan GI Aktivite Deneyi.....	23
2.3.3.	Reaksiyonlarda Kullanılacak Hücre Özütü Miktarının Belirlenmesi.....	23
2.3.4.	Optimum Sıcaklık.....	23
2.3.5.	Optimum pH.....	24
2.3.6.	Enzim Kinetiği.....	24
2.3.7.	pH Kararlılığı.....	24
2.3.8.	Isıl Kararlılığı ve Co ⁺² , Mn ⁺² ve Mg ⁺² nin Isıl Kararlılığa Etkisi	25
2.3.9.	Aktivatör Etkisi.....	25
2.3.10.	İnhibitör Etkisi	25
2.3.11.	Doğal ve SDS Poliakrilamid Jel Elektrophorezi	26
2.3.12.	Glukoz İzomerazın Saflaştırılması	26
3.	BULGULAR	27
3.1.	<i>Anoxybacillus gonensis</i> G2 ^T 'de Glukoz İzomeraz Aktivitesinin Tespiti	27
3.1.1.	Petri Deneyi	27
3.1.2.	Glukoz İzomeraz Aktivitesi.....	27
3.2.	Moleküler Çalışmalar	28
3.2.1.	Glukoz İzomeraz Geninin PCR Yöntemi ile Belirlenmesi.....	28

3.2.1.1.	Dejenere Primer Sentezi	28
3.2.1.2.	PCR Reaksiyonu ile GI Gen Parçasının Çoğaltılması ve Klonlanması.....	28
3.2.1.3.	Ters PCR (Inverse PCR)	31
3.3.	Biyokimyasal Çalışmalar.....	31
3.3.1.	Doğal ve SDS Poliakrilamid Jel Elektrophorezi	31
3.3.2.	Reaksiyonlarda Kullanılacak Hücre Özütü Miktarının Belirlenmesi.....	32
3.3.3.	Optimum Sıcaklık.....	33
3.3.4.	Optimum pH.....	34
3.3.5.	Kinetik İncelemeler	34
3.3.6.	Glukoz İzomerazın pH ve Isıl Kararlılığı	35
3.3.7.	Aktivatör Etkisi.....	36
3.3.8.	İnhibitör Etkisi	37
3.3.9.	Metal İyonlarının Enzimin Isıl Kararlılığı Üzerine Etkisi.....	38
4.	TARTIŞMA.....	40
5.	SONUÇLAR.....	45
6.	ÖNERİLER	46
7.	KAYNAKLAR.....	47
8.	EKLER	57
8.1	Bazı Tip 1 GI'ların baz dizilimlerinin Clustal W ile karşılaştırılması	57
8.2	Bazı Tip 1 GI'ların Amino Asit Dizilimlerinin Clustal W ile Karşılaştırılması	63
	ÖZGEÇMİŞ.....	65

ÖZET

Glukoz izomeraz, büyümek için karbon kaynağı olarak ksilozu kullanabilme yeteneğine sahip ve birçok bakteride bulunan hücre içi bir enzimdir. Glukoz izomeraz, *D*-ksilozun *D*-ksiluloza dönüşümünü katalizlediği gibi aynı zamanda *D*-glukozun *D*-fruktoza dönüşümünü de katalizlemektedir. Bu ikinci özelliği High Fructose Corn Syrup (HFCS; yüksek içerikli fruktoz şurubu) üretiminde endüstriyel alanda kullanılmaktadır. HFCS büyük oranda meşrubat, fırın, şeker ve konserve gibi sanayi ürünlerinde kullanılmaktadır. Glukoz izomeraz, hücre içi bir enzim olması ve glukozu olan düşük K_m değeri karşılamak için yüksek miktarlarda ihtiyaç duyulması sebebiyle pahalı bir enzim olarak dikkate alınabilir. Termofilik bir bakteri olan *Anoxybacillus gonensis* G2^T, glukoz izomeraz aktivitesine ve bu aktiviteyi sağlayan enzimin genine sahiptir.

Bu çalışma; *Anoxybacillus gonensis* G2^T glukoz izomeraz geninin klonlanması, gen ürününün izolasyonu ve karakterizasyonunu içermektedir. Çalışmada glukoz izomerazı kodlayan *xylA* geninin 530 bp lik bir parçası klonlandı ve baz dizilimi belirlendi. Maksimum aktivite 85°C'de pH 6,5'da gözlemlendi. Hücre özütünün 30 dakika, 85°C'de inkübe edilmesi sonucunda, glukoz izomeraz aktivitesi % 50 oranında azaldı. pH 5-9,5 aralığında 4°C'de 300 dakika bekletilen enzimin bu pH değerlerinde kararlılığını koruduğu tespit edildi. Glukoz için olan 15,24 mM K_m değeri ile diğer glukoz izomerazlardan daha düşük bir K_m değerine sahip olduğu belirlendi. Enzimin 85°C'deki ısı kararlılığını Co^{+2} 'nin artırdığı, Mg^{+2} 'nin değiştirmediği, Mn^{+2} 'nin ise azalttığı gözlemlendi. Glukoz izomeraz aktivitesi için Co^{+2} , Mg^{+2} ya da Mn^{+2} bivalent metal iyonlarından en az birini gerekli olduğu bulundu ve en yüksek aktivitenin Co^{+2} metal katyonu varlığında olduğu belirlendi. Cd^{+2} , Ca^{+2} , Sn^{+2} , Hg^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} veya Cu^{+2} gibi bivalent metal katyonları ile gerçekleştirilen denemeler, bu bivalent metal katyonlarının enzim aktivitesini inhibe ettiği gözlemlendi. Elektroforetik deneyler, *Anoxybacillus gonensis* G2^T GI'nin alt birimlerinin moleküler ağırlıklarının 43 kDa civarında olduğunu gösterdi.

Elde edilen veriler; *Anoxybacillus gonensis* G2^T GI'nin ısı ve pH kararlı bir enzim olduğunu ve pH 6 gibi asidik ortamlarda aktivitesinin yüksek olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar ve diğer biyokimyasal verilerle, *Anoxybacillus gonensis* G2^T GI'nin önemli bir endüstriyel izomeraz olabileceği söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: *Anoxybacillus gonensis*, Glukoz İzomeraz, Ksiloz İzomeraz, HFCS

SUMMARY

Cloning, Isolation and Characterization of *D*-Glucose (*D*-Xylose) Isomerase Gene from *Anoxybacillus gonensis*

Glucose isomerase (*D*-xylose ketol isomerase; EC 5.3.1.5) is an intracellular enzyme found in a number of bacteria that utilize xylose as carbon substrate for growth. Glucose isomerase converts *D*-xylose to *D*-xylulose *in vivo* and also catalyzes the conversion of *D*-glucose to *D*-fructose *in vitro*. The latter activity is used in industry for the production of high fructose corn syrup (HFCS). The major uses of HFCS are in the beverage, baking, canning, and confectionery industries. The use of glucose isomerase is expensive, because it is an intracellular enzyme and large quantities are needed to compensate for the high K_m for glucose. Therefore, it is important to immobilize glucose isomerase for its industrial applications. *Anoxybacillus gonensis* G2^T has glucose isomerase gene and activity.

This work describes the cloning, isolation, and characterization of the glucose isomerase (E.C 5.3.1.5) from *Anoxybacillus gonensis* G2^T. A 530 bp part of the *xylA* gene coding for glucose isomerase from *Anoxybacillus gonensis* G2^T was cloned and sequenced. The glucose isomerase optimal temperature was 85°C and maximal activity was observed in pH 6,5.. It was found that the enzyme was stable in the range of pH 5-9,5 at 4°C for 300 hours. After incubation at 4°C and 30°C for 300 hours, the enzyme saved 80 % of its activity. It was determined that the enzyme had a lower K_m (15,24 mM) for glucose than most of the glucose isomerases. It was observed that the enzyme thermostability at 85°C increased in the presence of metallic cation Co^{+2} and decreased by the effect of Mn^{+2} , while it was not affected by Mg^{+2} . It was found that at least one of the divalent metallic cations Co^{+2} , Mg^{+2} or Mn^{+2} is essential for glucose isomerase activity. Also, it was recorded that the maximum activity of the glucose isomerase was in the presence of metallic cation Co^{+2} . The experiment conducted with the metallic cations Cd^{+2} , Ca^{+2} , Sn^{+2} , Hg^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} , and Cu^{+2} shown that these divalent metallic cations inhibited the activity of the enzyme. The weights of subunits of molecule were calculated as approximately 43.000 Daltons.

In the light of all data it has been suggested that the enzyme's biocatalytic properties proved to be one of the important industrial enzymes.

Key Words: *Anoxybacillus gonensis*, Glucose Isomerase, Xylose Isomerase, HFCS

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. <i>D</i> -glukozun <i>D</i> -fruktoza, <i>D</i> -ksilozun da <i>D</i> -ksiluloza GI aracılığıyla dönüşümlü izomerizasyonu	2
Şekil 2. GI'nın çalışma mekanizması.	17
Şekil 3. <i>E.coli</i> HB101 ve <i>A. gonensis</i> G2 ^T 'de fruktoz izomereaz aktivitesinin tespiti	27
Şekil 4. Dejenerat primer kombinasyonlarından beklenen DNA parçaları	29
Şekil 5. Dejenerat primer kombinasyonları ile <i>A. gonensis</i> G2 ^T ve <i>Saccharococcus caldxylosilyticus</i> genomik DNA'larından PCR yoluyla çoğaltılan GI genine ait DNA parçaları	29
Şekil 6. F2-R3 dejenerat primerleri kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltılan <i>A. gonensis</i> G2 ^T 'ye ait 530 nükleotidlik GI gen parçasının baz dizilimi.....	30
Şekil 7. Doğal poliakrilamid jel elektroforezi	31
Şekil 8. SDS poliakrilamid jel elektroforezi.....	32
Şekil 9. Toplam hücre proteini miktarı – GI aktivite grafiği	32
Şekil 10. Sıcaklık- GI aktivite grafiği.....	33
Şekil 11 pH - GI aktivite grafiği	34
Şekil 12. Glukoz için Michaelis- Menten eğrisi	35
Şekil 13. Glukoz için Lineweaver-Burk eğrisi	35
Şekil 14. GI'nın pH ve ısı kararlılık- zaman grafiği	36
Şekil15. Co ⁺² , Mg ⁺² ve Mn ⁺² bivalent katyon iyonlarının GI aktivitesi üzerine olan aktivatör etkisi.....	37
Şekil 16. Cd ⁺² , Ca ⁺² , Sn ⁺² , Hg ⁺² , Ni ⁺² , Zn ⁺² , Fe ⁺² ve Cu ⁺² bivalent metal iyonlarının GI aktivitesi üzerine olan inhibitör etkisi.....	38
Şekil 17. Metal iyonlarının enzimin 85°C'deki ısı kararlılığı üzerine etkisi	39

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Glukoz izomeraz üreten mikroorganizmalar	8
Tablo 2. Ticari öneme sahip Glukoz izomerazları üreten bazı mikroorganizmalar ve ürünlerinin (Glukoz izomeraz) ticari adları	9
Tablo 3. Çeşitli mikroorganizmalardan elde edilen glukoz izomerazların verimliliği	10
Tablo 4. Tasarlanan dejenere primerler	21
Tablo 5. <i>A. gonensis</i> G2 ^T , <i>Saccharococcus caldxylosilyticus</i> ve <i>E.coli</i> HB101 suşunda glukoz izomeraz aktivitesi	28
Tablo 6. Çeşitli mikroorganizmaların glukoz için K_m değerleri	42



SEMBOLLER DİZİNİ

GI	: Glukoz İzomeraz
HFCS	: Yüksek İçerikli Fruktoz Şurubu (High Fructose Corn Syrup)
FDA	: Yiyecek ve İlaç Denetim Kurumu (Food and Drug Administration)
NAD	: Nikotin amid adenindinükleotit
<i>xyIA</i>	: Glukoz İzomeraz Geni
UV	: Ultraviyole
G2 ^T	: G2 İzolatı Tip Suşu
TE	: Tris- EDTA Tamponu
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
dNTP	: Deoksinükleotittrifosfat
BSA	: Sığır Serum Albumini
MOPS	: 3-(N-morfolino) propanosülfonik asit
HEPES	: 4-(2-hidroksietil) piperazin-1-etanosülfonik asit
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat

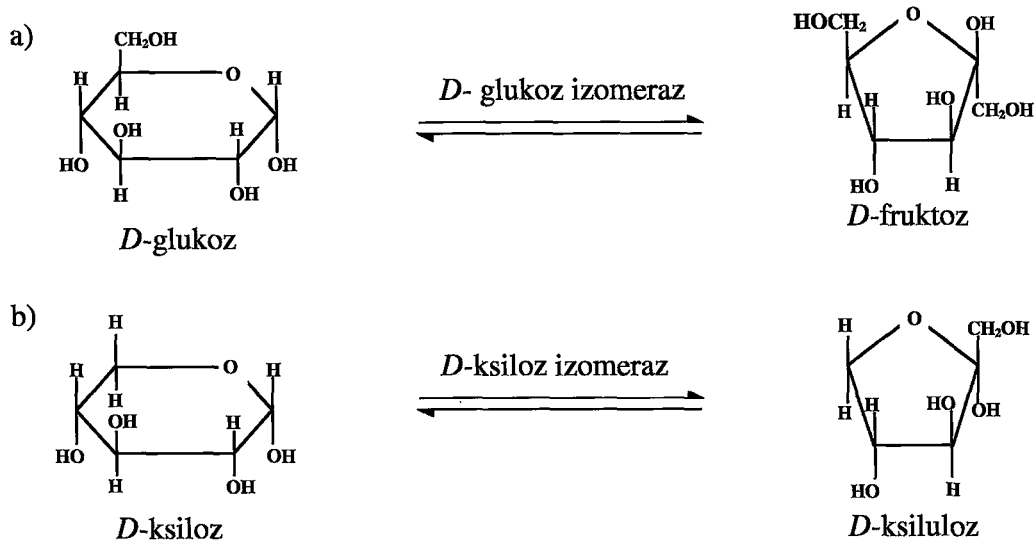
1. GENEL BİLGİLER

1.1. GİRİŞ

Yaygın olarak glukoz izomeraz (GI) olarak bilinen *D*-glukoz/ Ksiloz izomeraz (EC 5.3.1.5), amilaz ve proteaz ile birlikte dünyanın en yüksek tonajlı üç enziminden biridir (Bhosale ve ark,1996). GI; *D*-glukozun *D*-fruktoza, *D*-ksilozun da *D*-ksiluloza dönüşümlü izomerizasyonunu katalizler (Şekil 1). Ksilozun ksiluloza dönüştürülmesi, özellikle çürüyen bitki materyali üzerinde rahatlıkla büyüyüp çoğalabilen saprofilik bakterilerde, beslenmeyle ilgi bir ihtiyaçtır ve aynı zamanda hemiselülozun etanole dönüşümde rol oynar. Glukozun fruktoza izomerizasyonu yüksek fruktoz içerikli hububat şurubu (High Fructose Corn Syrup) üretiminde ticari bir öneme sahiptir. Şeker kamışı (%60) ve şeker pancarından (%30) elde edilen sukroz, 1976 yılına kadar yiyeceklerde tatlandırıcı ana madde olarak kullanılmaktaydı. Glukoz izomeraz kullanarak HFCS üretiminin ilk kez Japonya'da daha sonra da U.S.A' da gerçekleştirilmesi ve 1958 yılındaki Küba Devrimi'nden sonra meydana gelen sakkaroz yokluğu sonucu, GI ticari bir önem kazanmış ve bu güne kadar önemini kaybetmeden en önemli endüstriyel enzimlerden biri olarak dünya pazarındaki yerini almıştır (Bhosale ve ark., 1996).

Fruktoz şuruplarının endüstriyel uygulamalarda başarıyla uygulanabilmesinin altında yatan sebep GI'nın keşfi olmuştur. Ülkemizde ve AB mevzuatında fruktoz şuruplarının tanımı yer almamaktadır. A.B.D. Yiyecek ve İlaç Denetim Kurumuna (FDA,2000) göre fruktoz şurupları; % 42 veya 55 fruktoz içeren tatlı, besleyici sakkarit karışımı olup, mısır nişastası glukozunun glukoz izomeraz enzimi kullanılarak fruktoza dönüştürülmesi ile elde edilen bir üründür. Ayrıca % 90 fruktoz içeren üçüncü bir tip de bulunmakta olup, dünyada sınırlı kullanıma sahiptir (Bucke ve ark., 1983). Fruktoz şurupları tatlı (Dahl ve ark., 1994), düşük viskozite ve daha az kristallenme gibi özellikleri sebebiyle kullanıcıya depolama ve taşıma işlemleri sırasında avantaj sağlayan (Briggs ve ark., 1984) çok işlevli ürünlerdir.

Bugün fruktoz şuruplarının endüstriyel alanlarda başarıyla kullanılmasının altında yatan en önemli olay, GI enziminin keşfi olmuştur. 1957 yılında Marshall ve Kooi'nin *Pseudomonas hydrophyla*'dan elde ettikleri enzimin GI kapasitesi şeker kamışı şekerinin yerine HFCS kullanımında bu enzimin değerlendirilmesinde başlangıç noktasını



Şekil 1. *D*-glukozun *D*-fruktoza, *D*-ksilozun da *D*-ksiluloza GI aracılığıyla dönüşümlü izomerizasyonu

oluşturmuştur. Bu enzimin, büyüme ortamında ksiloza ihtiyaç duyduğu ve üretimin arsenat varlığıyla arttırılabildiği gösterilmiştir (Chaing ve ark., 1981a). Daha sonraları ksilozdan bağımsız olarak, GI aktivitesi *Escherichia intermedia*'da bulunmuştur (Chen ve ark., 1979b). Takasaki ve Tanabe, *Bacillus megaterium*'dan NAD-bağımlı ve glukozu özgü bir GI'ı (EC 5.3.1.18) izole etmişlerdir (duPreez ve ark., 1987; duPreez ve ark., 1985). Glukoz ve mannozun fruktoza izomerizasyonunu yapan benzer bir GI, *Paraclobacterium aerogenoides*'den izole edilmiştir (duPreez ve ark., 1983, Dworschack ve ark., 1972). Bütün bu aktiviteleri gösteren GI'lardan EC (5.3.1.5) numaralı enzimler, ticari uygulamalarda kullanılmaya en uygun enzimdir. Enzimatik olarak glukozun izomerizasyonu ilk kez endüstriyel bir oranda 1957 yılında Amerika'da Clinton Corn Processing Co. tarafından başarılmıştır. 1974 yılına gelindiğinde immobilize edilmiş GI artık ticari olarak elde edilebilir halde gelmiştir. Yiyecek endüstrisinde HFCS'ye olan talep her geçen gün artmış ve 1980'e kadar batı dünyasındaki bütün şekerlerle uğraşan büyük şirketler GI teknolojisine başvurmaya başlamıştır. Bugün enzim, yiyecek endüstrisinde en büyük marketlerde yerini almıştır (Amore ve ark., 1989). Sahip olduğu endüstriyel önemden dolayı bugüne kadar bir çok organizmanın GI enzimi incelenmiş (Barker ve ark., 1983; Batt ve ark., 1985; Callens ve ark., 1988a; Drocourt ve ark., 1988) ve bir çok bakterinin *xylA* geni genbankasındaki yerini almıştır (Albery ve ark., 1976; Armbruster ve ark., 1973; Barker, 1976; Barker ve ark., 1983; Beck ve ark., 1988;

Bengston ve ark., 1973; Carrell ve ark., 1989; Carrell ve ark., 1994; Carrell ve ark., 1984; deRaadt ve ark., 1994; Gaikwad ve ark., 1992c).

HFCS üretiminde mezofilik organizmalardan elde edilen GI, immobilize edilmiş bir şekilde 55-65°C'de pH 7,5 ile 8,5 aralığında kullanılmaktadır (Drazic ve ark., 1980). Bu şartlar altında enzim ile %40-42 oranında fruktoz üretilebilmektedir. Fakat endüstriyel uygulamalarda kullanılan HFCS'de % 55 fruktoz içeriği aranmaktadır. Dolayısı ile bu oran kromatografik olarak %55 seviyelerine getirilir. Fakat bu işlem üretim maliyetini arttırmaktadır (Bejar ve ark., 1994). Sıcaklığın artmasıyla fruktoz-glukoz dengesi fruktoz tarafına kaymakta böylece pahalı olan kromatografik saflaştırmaya gerek kalmamaktadır (Amore ve ark., 1989; duPreez ve ark., 1986). Bu sebeple bu uygulamalarda yüksek sıcaklıklarda çalışan termofilik mikroorganizmalardan elde edilen enzimler tercih edilmektedir (Blacklow ve ark., 1988). Fakat yüksek pH değerlerinde yüksek sıcaklık uygulamaları; istenmeyen mannoz, psikoz ve diğer asidik yan ürünlerin oluşumuna sebep verdiği için düşük pH değerlerinde çalışan bir enzime ihtiyaç bulunmaktadır (Bartfay, 1960). Bu ihtiyaçlardan dolayı bugüne kadar birçok termofilik ve asidik karakterli bakterilerin GI'ı araştırılmıştır.

Bunun yanı sıra mevcut enzimler üzerinde mutasyonlar meydana getirilerek, enzimin özelliklerinin geliştirilmesi için araştırmalar yapılmıştır. Bu kapsamda, bölge özgün mutasyonlarla çeşitli mikroorganizmalara ait birçok GI'ı; ısı kararlılığının artırılması, optimum pH değerinin düşürülmesi, substrat tercihinin değiştirilmesi, çeşitli aminoasitlerin molekül içerisindeki fonksiyonunun belirlenmesi ve alt üniteler arasındaki etkileşimlerin ortaya çıkarılması yönünde birçok endüstriyel ve bilimsel öneme sahip çalışma gerçekleştirilmiştir (Amore ve ark., 1989).

1.2. Glukoz İzomerazın Önemi

GI, termofilik enzimlerin yapısı ve işlevleri arasındaki ilişkiyi ileri biyokimya ve genetik mühendisliği teknikleriyle araştırmak için bir model oluşturmaktadır. Enzim, akademik öneminin yanı sıra, hemiselülozdan etanol üretilmesindeki potansiyel uygulamaları ve HFCS üretimindeki kullanımı açısından endüstriler tarafından artan bir ilgiye sahiptir.

1.2.1. Kimyasal İzomerizasyona Karşı Enzimatik İzomerizasyon

Glukozun fruktoza kimyasal olarak dönüşümü geçen 100 yıldır bilinen bir reaksiyondur ve Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein transformasyonu olarak bilinen bir grup reaksiyondan oluşmaktadır. Bu reaksiyonlar genellikle yüksek sıcaklık ve pH değerlerinde gerçekleşmektedir. Glukozdan fruktoz üretme ihtimali Barker ve arkadaşları tarafından çalışılmıştır (Barker ve ark., 1973). Fakat bu reaksiyon özgün değildir ve psikoz gibi metabolik olmayan şekerler ve arzu edilmeyen diğer bazı renkli ürünlerin oluşmasına sebep olur. Bu metodu kullanarak fruktoz içeriğini % 40'ın üzerinde tutmak çok zordur. Üstelik kimyasal olarak üretilen fruktoz lezzet bakımından düşük ve az tatlılığa sahiptir ve bu durum kolay bir şekilde düzeltilemez. Bu durum kimyasal olarak üretilen fruktozun ticari olarak kullanılmasına bir engeldir. Diğer taraftan fruktozun glukozdan enzimatik olarak elde edilmesinin bir takım avantajları vardır ki bunlar: reaksiyon özgünlüğü, pH ve sıcaklık şartlarını çevreleyen gereksinim ve yan ürün oluşturmamadır. Bu sebeplerden dolayı, fruktozun glukozu enzimatik izomerizasyonu kimyasal izomerizasyonuna tercih edilmektedir ve bugün GI'ı kapsayan işlemler endüstriyel marketlerde hatırı sayılır bir artışa maruz kalmıştır.

1.2.2. High Fructose Corn Syrup Üretimi

Marketlere HFCS'nin girmesi, soft içecek üreticileri tarafından sakkaroz yerine HFCS ve zenginleştirilmiş HFCS'nin (% 55 fruktoz içeriğine sahip) kullanılmasıyla, dereceli olarak gerçekleştirildi. U.S.A.'da, HFCS üretiminde en çok kullanılan ham materyal ıslak öğütme işlemiyle imal edilen mısır nişastasıdır. Nişastadan HFCS üretimi üç ana işlemi kapsamaktadır. Bunlar; α -amilaz kullanarak nişastanın sıvılaştırılması, amiloglukozidaz ve bir debranching enzim ile nişastanın şekere dönüştürülmesi ve GI ile glukozun fruktoza dönüştürülmesidir. Oluşan son ürün glukoz ve fruktozdan oluşan bir karışım şurubudur ve bu sebeple sakkarozdan daha fazla bir tatlılığa sahiptir. Buğday, tapyoka ve pirinç gibi diğer nişasta kaynakları dünyanın diğer kısımlarında küçük bir oranda kullanılmaktadırlar. 1995 yılı itibarıyla dünyadaki yıllık HFCS kullanımı kuru ağırlık olarak 10 milyon tona ulaşmıştır (deRaadt ve ark., 1994).

1.2.3. Tatlandırıcı Olarak HFCS Kullanımının Avantajları

Şekerin saflaştırılmasına olan artan talebin yanında, üretim maliyetinin yüksek olması ve sakkarozun insan sağlığının üzerindeki kötü etkilerinin bilinmesi, sakkarozun yerini alabilecek uygun bir ürünün bulunması için çalışmalar yapılmasına gereksinim olduğunu göstermektedir. Bugüne kadar düşük kalori değerine sahip ve karbohidrat yapısında olmayan birçok yapay tatlandırıcı bulunmuş; örneğin sakkarin, siklamat, acesulfame-K, aspartam ve taumatin gibi, fakat bunlar, insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri ve diğer bir takım sebeplerden dolayı gözden çıkarılmıştır. HFCS fruktoz ve glukozun bire bir karışımından oluşur ve sakkarozdan 1,3 glukozdan ise 1,7 kat daha tatlılık veren bir üründür. Glukoz sakkarozun sahip olduğu tatlılığın %70-75'ine sahipken fruktoz ise sakkarozla göre iki kat daha fazla tatlılığa sahiptir. HFCS tatlı olmayan nişastadan imal edilmektedir. Tatlandırma gücü temel alındığında HFCS sakkarozdan %10-20 daha ucuzdur. Aynı zamanda HFCS sakkarozda olduğu gibi kristallenme problemi meydana getirmediğinden dolayı yiyecek endüstrisinde tercih edilmektedir. Üstelik, *D*-fruktoz diyabetik bir tatlandırıcı olarak rol oynamaktadır çünkü sadece fruktoz midede çok yavaş bir şekilde tekrar absorbe edilir ve kandaki glukoz seviyesine bir etki yapmaz. Fruktoz şuruplarının önemli özellikleri; nemi tutarak kurumayı önlemeleri (Pomeranz, 1985), lezzeti geliştirici özellikleri (CRA. 1994), ozmotik basınçlarının yüksek olması (Hobbs, 1986) ve fermente edilebilir şekerler açısından zengin olmalarıdır (Henry , 1976). Bu özellikleri sebebiyle fruktoz şurupları, sıklıkla gazlı ve gazsız içecekler, fırın ürünleri, çeşitli hububat ürünleri, süt mamulleri ve işlenmiş gıdalarda kullanılabilmektedir (Wulff ve ark., 1987). Mayonez ve salata sosları gibi ürünlerde fruktoz şuruplarının kullanımı ile emülsiyon kararlılığı artmakta (Inglett, 1974) ve enerji değeri de düşürülebilmektedir (Reeder, 1978). Fruktoz şuruplarının su aktivitesini azaltıcı özelliğinden yararlanılmakta ve salamurla ürünlerde kullanılabilmektedir (Hobbs, 1986). Ayrıca fruktoz şuruplarının sebze, çorba, domates sosları ve meyve gibi konserve ürünlerde de kullanımı yaygınlaşmaktadır (Nabors ve ark., 1991; Hebeda, 1987; Anon, 1993). Dondurma viskozitesi değişimleri üzerinde yapılan çalışmalar fruktoz şuruplarının kullanımıyla bu ürünlerin viskozitesinin arttığını göstermiştir. Fruktoz şurubu, dondurmaya eriyebilirlik, dokuda pürüzsüzlük ve hacim kazandırmaktadır (Anon, 1979). Fruktoz şurupları; ekmek, bisküvi, kek, kurabiye, tart dolguları ve jölelerde kullanılabilir (Pomeranz, 1985). Ekmekte fruktoz şurupları fermente edilebilir substrat olup, kabuk

rengine ve lezzete katkıda bulunmakta ve raf ömrünü uzatmaktadır (Kulp ve ark., 1991) İndirgen şekerler içerisinde en iyi bisküvi rengi fruktoz şurupları ile elde edilmiştir (Manohar ve ark., 1997). Keklerde sakkaroz yerine fruktoz şurupları kullanımı içerdiği yüksek indirgen şekerler sebebiyle esmerleşmeyi arttırmakta ve kekin tazelik süresini uzatmaktadır (Johnson ve ark., 1989). Fruktoz şurupları tatlı tat verme özelliklerinin yanı sıra gıdalarda lezzetin gelişmesinde de rol oynar. Fruktoz şurupları tatlı tat verme özelliklerinin yanı sıra gıdalarda lezzetin gelişmesinde de rol oynar. Fruktozun dil üzerinde algılanma yoğunluğu sakkarozla göre çok daha yüksektir ve hissedilme süresi kısadır. Bu sebeple fruktoz şurupları gıdalarda karakteristik lezzet özelliklerinin algılanmasını zenginleştirmede etkilidir (Howling, 1992).

1.2.4. Etanol Üretimi

GI, ksiloz ve glukozun her ikisinin de izomerizasyonunu katalizler. Enzimin bu özelliği ksilozun, en nihayetinde mayalar tarafından fermente edilebilen ksiluloza izomerizasyonunda kullanılmaktadır. Yenilenebilir biyolojik artıkların fermente edilebilen şekerlere ve etanole biyolojik olarak dönüşümü, fosil yakıtların hızlı tüketimi göz önüne alındığında önemlidir. Bu biyolojik artıklar % 40 selüloz ve %30 ligninden oluşmaktadır. Biyolojik artıkların kullanımının ekonomik yapılabilirliği selüloz ve hemiselülozun ksiloz ve glukozla hidrolizine ve takiben mayalarla etanole fermente edilmesine bağlıdır. Lignoselüloz ve tarımsal artıkların biyodönüşümünün etkili bir şekilde çalışmasının temel olarak biyolojik artık bileşenlerinin etkili kullanımına bağlı olduğunun anlaşılmasıyla dünya çapında tüm ilginin birden bire hemiselülozu fermente etme üzerine değiştiği görüldü. $\beta(1,4)$ bağlarıyla birbirine bağlı ksiloz ünitelerinden oluşan ksilan hemiselülozun en büyük ana birimini oluşturmaktadır. *D*-ksiloz çok kolay bir şekilde ksilanın asidik veya enzimatik hidrolizinden elde edilebilir. *Saccharomyces cerevisiae* gibi endüstriyel maya suşları, genel olarak heksozları etkili bir şekilde fermente edebilirler fakat *D*-ksilozu kullanamazlar. *Pachysolen tannophilus*, *Pichiastipitis*, *Candida utilis* ve *Candida shehatae* gibi bazı maya türleri pentozları oksidoredüktatif bir yolla kullandıkları bilinmektedir fakat fermentasyon oranı oldukça düşüktür (duPreez ve ark., 1985; duPreez ve ark., 1983; Slininger ve ark., 1985; Tomoyeda ve Horitsu, 1964). Bunun yanı sıra, bu mayaların düşük etanol toleransı ve oksijen varlığındaki etanol katabolizması ticari uygulamalarda kullanılmalarını sınırlamaktadır (duPreez ve ark., 1983; duPreez ve ark., 1985; Ligthelm

ve ark., 1986, duPreez ve ark., 1987). *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* ve *Candida tropicalis* gibi ticari mayalar vasıta ile ksilozun fermente edilebilmesi için GI, ksilozun ksiluloza izomerizasyonunda da kullanılmaktadır (Chaing ve ark., 1981b; Chan ve ark., 1989; Gong ve ark., 1981; Schneider ve ark., 1981; Wang ve ark., 1980b). D-ksilozdan etanol üretiminde düşük fermentasyon oranı gözlenmesine ve düşük ürün verimliliği elde edilmesine rağmen şu anda ksilozun izomerizasyonunu ve etanole fermentasyonunu eş zamanda sağlamak amacıyla GI geninin mayalara transfer edilmesi çalışmaları hızla artmaktadır.

1.3. Mikroorganizma Kaynakları

GI, prokaryotik mikroorganizmalarda geniş bir şekilde bulunmaktadır (Tablo 1). *Pseudomonas hydrophila*' da bulunmasından sonra birçok bakteri ve *Actinomycetes* türünde GI aktivitesi saptanmıştır. Heterolaktik asidik bakteriler arasında *Lactobacillus brevis*'ten elde edilen GI, düşük pH değerlerinde aktif haldedir fakat yüksek sıcaklıklarda ise kararlı değildir. Bu yüzden de ekonomik olarak bu mikroorganizmadan yararlanmaya elverişli değildir.

GI'nın hücre dışına salgılanmasına ait raporlar yaygın değildir. *Streptomyces glaucescens* (Weber, 1976) ve *S. flavogriseus* (Chen ve ark., 1979a) türlerinde elde edilen GI'nın hücre dışı bir enzim olduğu olduğu rapor edilmiştir. Burada enzimin hücre içerisinden dışarı salınmasının hücre duvarının geçirgenliğindeki bir değişiklik ve hücrenin kısmi parçalanması ile meydana geldiği kabul edilmiştir. *Chainia* sp. ve (Srinivasan ve ark., 1983; Vartak ve ark., 1984.) alkalotermofilik bir tür olan *Bacillus* sp (Chauthaiwale ve Rao, 1994)'den elde edilen hücre dışı GI'lar, jel filtrasyon, iyon değişimi kromatografisi ve poliakrilamid jel elektroforezi gibi yaygın saflaştırma teknikleri ile homojen bir şekilde saflaştırılmışlardır. *Streptomyces* spp. türlerinin yanı sıra *Bacillus* türleri de iyi miktarlarda GI üretmektedirler. *Candida utilis* (Wang ve ark., 1980a) ve *Candida boidinii* (Vongsuvanlert, ve Tani, 1988) gibi birkaç mayada da GI varlığı tespit edilmiştir. Çimlenmiş arpada (Bartfay, 1960) ve buğday tohumunda da (Pubols ve ark., 1963) GI'nın var olduğu gösterilmiştir. GI üreten ve ticari olarak önemli olan birkaç organizmanın isimleri Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 1. Glukoz izomeraz üreten mikroorganizmalar

<i>Actinomyces olivocinereus</i> ,	<i>Paracolobacterium</i>
<i>A. phaeochromogenes</i>	<i>aerogenoides</i>
<i>Actinoplanes missouriensis</i>	<i>Pseudonocardia</i> spp.
<i>Aerobacter aerogenes</i> ,	<i>Pseudomonas hydrophila</i>
<i>A. cloacae</i> ,	<i>Sarcina</i> spp.
<i>A. levanicum</i>	<i>Staphylococcus bibila</i> ,
<i>Arthrobacter</i> spp.	<i>S. flavovirens</i> ,
<i>Bacillus stearothermophilus</i> ,	<i>S. echinatus</i>
<i>B. megabacterium</i> ,	<i>Streptococcus acromogenes</i> ,
<i>B. coagulans</i>	<i>S. phaeocromogenes</i> ,
<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>S. fracliae</i> ,
<i>Birevibacterium incertum</i> ,	<i>S. roseochromogenes</i> ,
<i>B. pentosoaminoacidium</i>	<i>S. olivaceus</i> ,
<i>Chainia</i> spp.	<i>S. californicos</i> ,
<i>Corynebacterium</i> spp.	<i>S. venuceus</i> ,
<i>Cortobacterium helvolum</i>	<i>S. virginial</i>
<i>Escherichia freundi</i> ,	<i>Streptomyces</i>
<i>E. intermedia</i> ,	<i>olivochromogenes</i> ,
<i>E. coli</i>	<i>S. venezaelie</i> ,
<i>Flavobacterium arborescens</i> ,	<i>S. wedmorensis</i> ,
<i>F. devorans</i>	<i>S. griseolus</i> ,
<i>Lactobacillus brevis</i> ,	<i>S. glaucescens</i> ,
<i>L. Buchneri</i> ,	<i>S. bikiniensis</i> ,
<i>L. Fermenti</i> ,	<i>S. rubiginosus</i> ,
<i>L. mannitopoeus</i> ,	<i>S. achinatus</i> ,
<i>L. gayonii</i> ,	<i>S. cinnamomensis</i> ,
<i>L. fermenti</i> ,	<i>S. fradiae</i> ,
<i>L. plantarum</i> ,	<i>S. albus</i> ,
<i>L. lycopersici</i> ,	<i>S. griseus</i> ,
<i>L. Pentosus</i> ,	<i>S. hivens</i> ,
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>S. matensis</i> .
<i>Microbispora rosea</i>	<i>S. nivens</i> ,
<i>Microellbosporia flavea</i>	<i>S. platensis</i>
<i>Micromonospora coerula</i>	<i>Streptosporangium album</i> ,
<i>Mycobacterium</i> spp.	<i>S. oulgare</i>
<i>Nocardia asteroides</i> ,	<i>Thermopolyspora</i> spp.
<i>N. corallia</i> ,	<i>Thermus</i> spp.

GI'nın büyük bir ticari önemi olmasından dolayı enzimi üreten birçok yeni organizma ve bu enzimin kullanımında geliştirilen birçok yöntem hakkındaki bilgi patentlenmiştir (Boguslawski ve Rynski, 1982; Hafner, 1985; Hafner ve Jackson, 1985; Iuzuka ve ark., 1971; Lee, 1976; Miles Laboratories Inc. 1972; Outtrup, 1974; Shieh, 1977; Weber, 1976).

Tablo 2. Ticari öneme sahip glukoz izomerazları üreten bazı mikroorganizmalar ve ürünlerinin (Glukoz izomeraz) ticari adları

Organizma	Ticari Adı	Üretici
<i>Actinoplanes missousriensis</i>	Maxazyme	Gsit Brocades and Anheuser-Busch Inc.
<i>Bacillus coagulans</i>	Sweetzyme	Novo-Nordisk
<i>Streptomyces rubiginosus</i>	Optisweet Spezyme	Miles Kali-Chemie Finnsugar
<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>	Swetase	Nagase
<i>Arthrobacter sp.</i>		Reynold tobacco
<i>Streptomyces olivaceus</i>		Miles Laboratories Inc.

1.4. Glukoz İzomeraz Üretimi

Enzimin endüstriyel uygulamalardaki değerlendirmesinde üretim maliyeti önemli bir faktörü oluşturmaktadır. Ekonomik olarak teknolojiye uygulanabilir hale getirmek amacıyla, GI üretiminde fermentasyon şartlarını kararlı hale getirmek için yoğun çalışmalar yapılmıştır. Araştırmalar 3 ana yönde odaklanmıştır. Bunlar; GI enziminin verimliliğinin artırılması, ksilozun yerine kullanılabilecek daha ucuz ve Co^{+2} - gereksinimini azaltacak bir madde ile fermentasyon şartlarının kararlı hale getirilmesi ve enzimin immobilize edilmesidir.

1.4.1 Verimin Arttırılması

Çeşitli mikroorganizmalardan elde edilen GI'nın verimliliği Tablo 3'te gösterilmiştir. Bu enzimler 1000 U ile 35000 U litre⁻¹ arasında olacak şekilde sıralanmışlardır. Rekombinant DNA teknolojisi ve geleneksel mutasyon yöntemleri kullanılarak suşların geliştirilmesi ve böylece enzimin özelliklerinin ve veriminin artırılması sağlanmıştır.

Enzim seviyesinde yükselme meydana getirebilmek için ticari olarak önem arz eden birkaç suş mutasyona maruz bırakılmıştır. *Streptomyces wedmorensis* etilenamin ve N-metil-N-nitro-N-nitrozguanidin ile birlikte mutasyona uğratarak enzim seviyesinde %60'lara varan bir artış sağlanmıştır (Bengston ve Lamm, 1973). *Streptomyces olivochromogenes*'in UV'ye maruz bırakılmasıyla oluşturulan mutant suшта %70'lik bir aktivite artışı gözlenmiştir (Suekane ve Iizuka, 1982). *Bacillus coagulans*'da meydana

Tablo 3. Çeşitli mikroorganizmalardan elde edilen glukoz izomerazların verimliliği

Organizma	Verim (U/litre)	Deneme Sıcaklık pH (C°)		Kaynaklar
<i>Actinoplanes missouriensis</i>	2,500-35,200	75	7,0	Anheuser-Busch Inc., 1974
<i>Bacillus licheniformis</i>	10,500	70	-	Boguslawski ve Rynski, 1982
<i>Streptomyces wedmorensis</i>	560-2500	70	7,2	duPreez ve ark., 1987
<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	4,800-11,440	60	7,5	Armbruster ve ark., 1973

getirilen bir mutasyonda aktivite 2 kat kadar artmış ve mutasyonlu türlerin seçilmesi onların 2-deoksiglukoza olan dirençlerine göre yapılmıştır. Mutasyonlarla 2 kat daha fazla verim elde edilen mutanların en yüksek verimi laktozda verdiği ve bunlardan sadece birinin ksiloza nazaran glukozda daha fazla aktivite gösterdiği Lee tarafından gösterilmiştir (Lee, 1976). *Streptomyces acidodurans*'a çoklu UV ışınlarla muamele edilmesiyle yüksek GI verimli mutantlar elde edilmiştir (Bok ve ark., 1984). Etil metan sülfonat mutasyonu ile oluşturulan mutantlardan birisi yalnızca glukoz ortamında büyütüldüğünde 1500 U ml⁻¹ verim verdiği, oysaki mutasyona uğramamış ana suştaki bu oran benzer koşullar altında 10 U ml⁻¹ olduğu gösterilmiştir. (Hafner, 1985; Hafner ve ark., 1985).

1.4.2 Fermentasyon Ortamının Optimizasyonu

GI üretimi için, ekonomik olarak uygun bir fermentasyon ortamının sağlanması üzerine bir çok çalışma yapılmıştır. Bu konu üzerinde yapılan çalışmalar; ksiloz yerine pahalı olmayan başka bir indükleyicinin kullanılması, enzim verimi üzerinde daha ucuz azot kaynaklarının etkilerinin değerlendirilmesi, enzim üretimi için maksimum pH ve sıcaklığın belirlenmesi ve fermentasyon ortamında Co⁺² iyonu yerine başka bir bivalet metal iyonunun kullanılması yönünde olmuştur. Farklı organizmalardaki enzimin işlevinin en iyi şekilde elde edilmesi için somut bir ortam bileşimi bulunmamaktadır. Her bir organizma veya suş maksimum enzim üretimi için kendine özgü bir büyüme ortamı bileşimine sahiptir (Takasaki ve Tanabe, 1966).

1.4.2.1. İndükleyici

GI üreten organizmaların çoğu enzim üretimini tetiklemek için ksiloza ihtiyaç duyarlar. Oysaki ksiloz oldukça pahalıdır ve ekonomik olarak kullanımı pratik değildir. Nişasta, glukoz, sorbitol veya gliserol, ksilozun sağladığı etkinin %75'i bir etkiyle kullanılabilir (Drazic ve ark., 1980). *Streptomyces* YT-5 suşunun, mısır koçanı ve buğday kepeği gibi ksilan yada ksilan ihtiva eden diğer materyaller içeren ortamlarda büyüebildiği, Takasaki ve Tanabe tarafından gösterilmiştir (Takasaki ve Tanabe, 1966). Bugün, *Actinoplanes*, *Bacillus coagulans* ve *Streptomyces olivochromogenes* gibi çeşitli suşların ksiloz yerine glukozu kullanabilme yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir. Mutasyonlarla, temelde indükleyici olarak ksiloza ihtiyaç duymayan GI üretebilen bakterilerin elde edilebildiği yaklaşımlar da bulunmaktadır. *Actinoplanes missouriensis*'in mutant olmayan tiplerinden bir tanesi Gist Brocades tarafından ticari olarak GI üretiminde kullanılmaktadır (Anheuser-Busch Inc. 1974). Diğer bir yaklaşım ise doğal *xylA* geninin güçlü bir *Streptomyces* promotörü önüne klonlanmasıdır.

1.4.2.2. Azot kaynağı

Azot kaynağı, her bir enzim için optimize edilmesi gereken kritik bir faktördür. Genel olarak, kompleks azot kaynaklarının glukoz izomeraz üretiminde kullanılmasına rağmen azot ilavesi organizmadan organizmaya farklılık göstermektedir. *Bacillus coagulans* için pepton, maya özütü ve amonyum tuzları kullanılabildiği; fakat üre ve nitratın uygun olmadığı belirtilmiştir (Yoshimura ve ark., 1966). Mısır suyu, bazı araştırmacılar tarafından ucuz ve uygun bir azot kaynağı olarak kullanılmıştır (Anheuser-Busch Inc. 1974; Bucke, 1981; Hafner ve ark., 1985). Fakat kullanımı sezonluk olması sebebiyle kullanımı kısıtlanmıştır. Mısır suyu yerine geçebilecek uygun bir azot kaynağı bulmak için hala çeşitli araştırmalar yapılmaktadır. Soya fasulyesi unu, mısır suyundan %50 daha yüksek verim vermektedir (Shieh, 1977). Belli aminoasitlerin ilavesi *Streptomyces violaceoruber*'de üretilen enzim miktarını arttırmaktadır (Vaheri ve Kauppinen, 1977; Vandamme ve ark., 1981). *Streptomyces coelicolor*'de meydana getirilen bir mutasyonla bakterinin mısır suyundan, maya özütüne oranla daha fazla yararlanması sağlanmıştır (Hafner ve ark., 1985).

1.4.2.3. Metal İyon Gereksinimi

Optimum GI üretiminde, bivalent katyonlar besiyeri içerisinde bulunmalıdır. Bununla birlikte, özel metal iyonlarına olan gereksinim enzim kaynağına bağlıdır. Mn^{+2} veya Mg^{+2} , *Streptomyces* YT-5 suşunda GI üretmek için gerekli iken *Bacillus coagulans*'da gerekli değildir (Outtrup, 1974; Yoshimura ve ark., 1966). Genel olarak, Co^{+2} tuzları mezofilik *Streptomyces* türlerinde bivalent katyon olarak kullanılabilir. Fakat bu durum termofilik *Streptomyces* türleri için geçerli değildir. *Arthrobacter* spp., *Streptomyces olivaceus* (Reynolds, 1973) ve *Streptomyces olivochromogenes* (Anheuser-Busch Inc. 1974) türleri gibi bazı mikroorganizmalar optimum enzim üretimi için Co^{+2} ilavesine ihtiyaç duymazlar. HFCS'nin insanlar tarafından tüketileceği ve çevresel kirlenme problemleri göz önüne alındığında Co^{+2} ilavesinin azaltılması son derece önem arz etmektedir.

1.5. Glukoz İzomerazın Saflaştırılması

Ticari kullanımda enzimin ucuz ve etkili olduğu immobilize edilmiş hali kullanılır ki bu durumda enzimin yoğunlaştırılmasına ve saflaştırılmasına gerek kalmaz. Bu sebeple GI'nın saflaştırılması, kimyasal modifikasyon üzerindeki çalışmalara ve yapı-işlev ilişkisi gibi konulara açıklık kazandırabilmesi yönüyle akademik açıdan önem arz etmektedir. Enzim üretiminin hücre dışı olduğu birkaç durum haricinde GI hücre içi üretilen bir enzimdir. Enzim hücreden, hücrenin mekanik olarak parçalanmasıyla (Örneğin; sonifikasyon, öğütme yada homojenizasyon gibi) veya hücrenin toluen, katyonik deterjanlar veya lizozim ile lizisi sonucunda çıkarılabilir. Mikrobiyal kaynaklardan enzimin saflaştırılması sıcaklık muamelesi, amonyum sülfat - aseton - Mg^{+2} ve Mn^{+2} ile çöktürme, iyon değişimi kromatografisi veya jel filtrasyon gibi klasik saflaştırma işlemleri ile saflaştırılabilir (Chen, 1980b). Benzer kromatografik metotlar ile enzimin saflaştırılması literatürde mevcuttur (Bhosale ve ark., 1996).

1.6. Glukoz İzomerazın Özellikleri

Çeşitli mikroorganizmalardan izole edilen GI'ların enzimatik ve biyokimyasal özellikleri yoğun bir şekilde çalışılmıştır. Enzimin pH ve ısıl karalılığı, metal iyon gereksinimi, substrat özgünlüğü gibi özellikleri hakkındaki bilgiler enzimin inhibe olmasını engellemek için ve HFCS üretiminde ticari olarak uygulanabilirliğini değerlendirmek açısından önemlidir.

1.6.1. Substrat Özgünlüğü

GI'nın pentoz, heksoz, şeker alkoller ve şeker fosfatları gibi geniş çeşitteki substratları izomerize etme yeteneği birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir. Farklı organizmalardan elde edilen enzimlerin substrat özgünlüğü organizmadan organizmaya değişiklik göstermektedir. GI'nın en yaygın substratları ksiloz ve glukozdur. *D*-riboz, *L*-arabinoz, *L*-ramnoz, *D*-alloz ve 2-deoksiglukoz gibi şekerlerin de GI'nın birer subastratı oldukları tespit edilmiştir. Glukoz ve ksilozda olduğu gibi ekvatorial pozisyonundaki 3. ve 4. karbon atomlarında hidroksil grubu bulunduran substratlarla maksimum izomerleşme gözlenmiştir. İster immobilize edilmiş olsun ister olmasın, çeşitli mikroorganizmalardan elde edilen GI'nın katalizlediği *D*-glukozun *D*-fruktoza dönüşümü %29 ile %59 arasında değişiklik göstermektedir. *D*-glukoz ve *D*-ksiloz için K_m değeri ise sırasıyla 0.086 ile 0,920 M ve 0,005 ile 0,093 M arasında değişiklik göstermektedir. (Chen, 1980a).

1.6.2. Metal İyonu Gereksinimi ve İnhibitörler

GI maksimum aktivite için Co^{+2} , Mg^{+2} ve Mn^{+2} gibi bivalent katyonlara veya bunların kombinasyonuna ihtiyaç duymaktadır. Co^{+2} ve Mg^{+2} aktivite için gerekli olmasına rağmen, her ikisi de farklı bir görevde rol oynarlar. Mg^{+2} , Co^{+2} 'ye nazaran daha etkin bir aktivatör iken, Co^{+2} istenilen konformasyonu sağlayarak (özellikle quarterner yapının sağlanmasında) enzimin kararlı hale gelmesinden sorumludur (Callens ve ark., 1988b; Callens ve ark., 1986; Gaikwad ve ark., 1992a). *Bacillus coagulans*'dan elde edilen GI üzerinde direkt metal iyonunun bağlanma çalışmaları Danno tarafından

gerçekleştirilmiştir (Danno, 1971). Kasumu ve arkadaşları ise her bir tetramer için 4 Co^{+2} 'nin varlığını tespit etmişlerdir (Kasumi ve ark., 1982).

GI'nin katalitik aktivitesi; Ag^+ , Hg^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Ni^{+2} ve belli bir oranda da Ca^{+2} ile inhibe olmaktadır. GI'nin bazı diğer inhibitörleri; ksilitol, arabitol, sorbitol, mannitol, liksoz ve TRİS'tir (Bucke, 1983; Smith ve ark., 1991).

1.6.3. Alt Ünite Yapısı

GI'nin sedimentasyon sabitleri ve moleküler ağırlıkları sırasıyla 7,55 ile 11,45 arasında ve 52.000 ile 191.000 arasında değişiklik göstermektedir (Chen, 1980a). GI'nin altünite ve aminoasit yapısına bakıldığında, molekül birbirine benzer veya aynı 4 yada 2 alt ünitelerden meydana gelmektedir. Alt üniteler birbirlerine kovalent olmayan etkileşimlerle bağlıdır ve alt üniteler arasında disülfür bağları bulunmamaktadır. *Bacillus sp.*'den elde edilen ekstrasellüler GI üç alt birimden meydana gelmektedir (Chauthaiwale ve Rao, 1994). Basuki ve arkadaşlarının *Streptomyces phaeochromogenes*'te varlığını gösterdikleri GI'nin izoenziminin birbirinin aynı olmayan 4 alt birimden meydana geldiği gösterilmiştir. *Arthrobacter* ve *Streptomyces* türlerinde yapılan çalışmalarda molekülün biyolojik aktivitesinde rol oynayan birimin dimer yada tetramerler olduğu ve monomer ünitelerin tek başlarına herhangi bir biyolojik aktiviteye sahip olmadıkları gösterilmiştir. (Gaikwad ve ark., 1992a; Rangarajan ve ark., 1992b).

1.6.4. Optimum Sıcaklık ve pH

GI'nin optimum sıcaklığı çeşitli organizmalarda 60°C ile 80°C arasında değişiklik göstermektedir ve bu değerler Co^{+2} varlığı ile artış göstermektedir. Optimum pH değerleri ise genel olarak 7.0 ile 9.0 arasında değişiklik göstermektedir. Bununla birlikte endüstriyel olarak arzu edilen düşük pH değerlerinde çalışabilen enzimler de bulunmaktadır. Örneğin *Lactobacillus brevis* 'ten elde edilen GI, pH 6 ile 7 arasında optimum aktivite göstermektedir. *Streptomyces spp.*, *Bacillus spp.*, *Actinoplanes missouriensis* ve *Thermus thermosulfurogenes*'e ait GI'lar yüksek sıcaklıklarda kararlı enzimler oldukları halde *Lactobacillus* ve *Escherichia spp.*'ye ait GI'lar yüksek sıcaklıklara az kararlıdır.

1.6.5. Aktif Bölge Çalışmaları

GI'n aktif bölgesi ve bu bölgeye yakın kısımlardaki aminoasit içeriğini belirlemek maksadıyla X-ışını kristallografisi gibi bir takım çalışmalar gerçekleştirilmiş ve özellikle histidin ve karboksilat gruplarının bu bölgedeki gerekliliği ortaya konmuştur (Callens ve ark., 1988a; Gaikwad ve ark., 1988; Ghatge ve Deshpande, 1993). GI, ksiloz ve glukozun izomerizasyonunu gerçekleştirmektedir. GI'n ksiloz ve glukoz için tek bir aktif bölgeye sahip olduğu Keleti ve arkadaşları tarafından gösterilmiş olmasına rağmen (Keleti ve ark., 1987) bu substratlar için enzimin iki farklı aktif bölgeye sahip olup olmadığı hakkında kesin bir bilgi bulunmamaktadır.

1.7. Rekombinant DNA Teknolojisi ve Glukoz İzomeraz

Genin izolasyonunun yapılması ve arzu edilen proteinin sağlanmasında rekombinant DNA teknolojisi büyük imkanlar sağlamaktadır. Endüstriyel olarak kullanılan enzimlerin % 50'sinden fazlasının geni modifikasyona uğratılmıştır (Hodgson, 1994). GI'ı yüksek miktarlarda üretme yollarından birisi de onu kodlayan geni belirleyerek *lac*, *tac*, veya *pL* promotorları gibi güçlü promotorlar içeren çok kopyalı ekspresyon vektörlerine klonlamaktır. Bugüne kadar bir çok mikroorganizmaya ait *XylA* geni; enzimin fazla üretilmesini sağlamak, mayalar vasıtasıyla ksilozun etanole doğrudan dönüşümünü sağlamak ve enzime endüstriyel olarak arzu edilen özellikleri kazandırmak amacıyla modifikasyona uğratılmıştır. GI'n moleküler olarak klonlanması ve ekspresyonu homolog, heterolog birçok konak mikroorganizmada ve mayalarda gerçekleştirilmiştir (Bhosale ve ark., 1996).

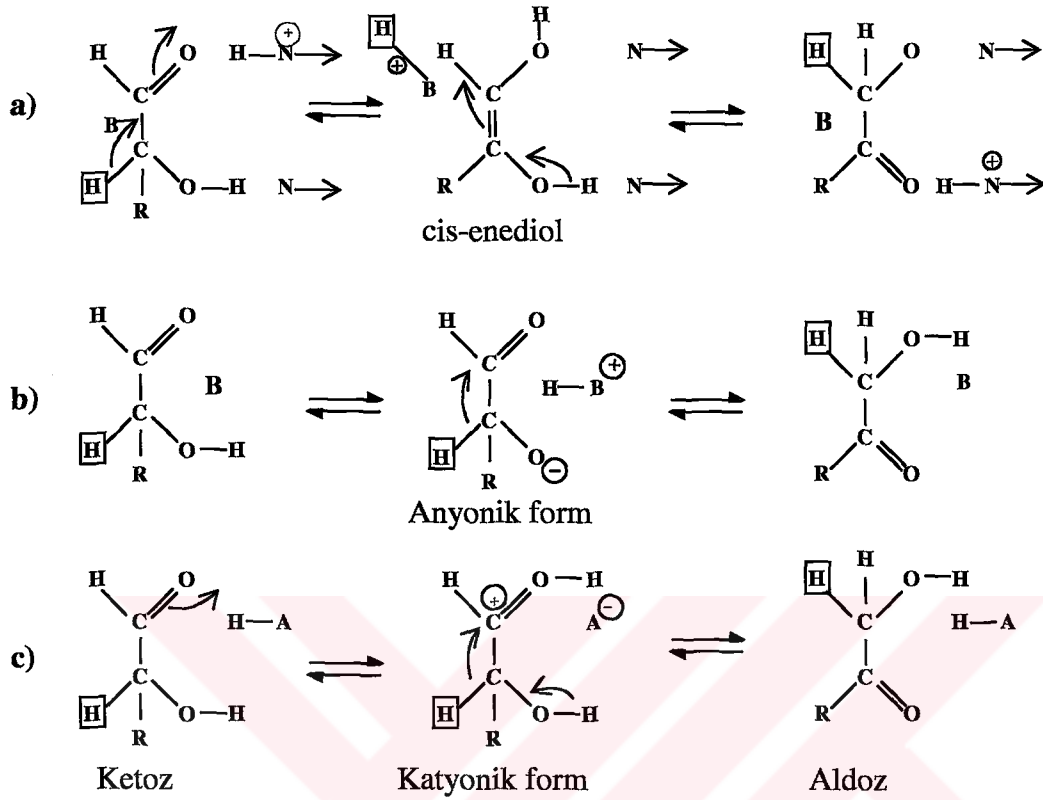
1.8. Çeşitli Glukoz İzomerazların Baz Dizilimi Benzerliği

GI'n yapısı ve işlevi arasındaki ilişkiyi açıklamak için bir çok organizmanın *XylA* geni araştırılıp baz dizilimleri birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Birçok mikroorganizmadan elde edilen GI'n baz dizilimi ve aminoasit dizilimi belirlenmiş ve gen bankasındaki yerini almıştır. GI'lar aminoasit dizilimlerine göre iki grup altında sınıflandırılırlar (Vangrype ve ark., 1988). Birinci grupta bulunan GI'ların, bu grup enzimlere *B.subtilis*

ve *E.coli* GI'ları örnek verilebilir, N-ucunda 30 ila 40 aminoasitlik bir fazlalık bulunmaktadır ve bu enzimler birbirlerine aminoasit dizilimi bakımından oldukça benzerlerdir. *Actinoplanes*, *Ampullariella* ve *Streptomyces* enzimlerini de kapsayan ikinci grup GI'lar böyle bir aminoasit eklentisine sahip değildir ve bu gruba dahil enzimlerin aminoasit dizilimleri birbirlerine az benzerler. *Clostridium thermosulfurogenes*, *Lactobacillus pentosus* ve *B. subtilis* GI'ları baz dizilimi bakımından birbirlerine oldukça benzerdir ve yaklaşık olarak 440 aminoasitten meydana gelirler. *S. violaceoniger*, *S. griseofuscus*, *A. missouriensis* ve *Ampullariella* spp. GI'ları birbirlerine aminoasit ve baz dizilimi bakımından benzerdir ve yaklaşık 390 aminoasitten meydana gelmişlerdir (Bhosale ve ark., 1996). Genel olarak ısıya duyarlı ve dirençli olmak üzere iki tip GI bulunmaktadır. *B.subtilis* ve *E.coli* GI'ları ısıl olarak kararsız iken *Streptomyces* türlerine ait GI'lar ise kararlıdır (Lee ve ark., 1990a). Mezofilik ve termofilik organizmalardan elde edilen GI'ların aminoasit içerikleri incelendiğinde, aktif bölgede genel olarak D → E, Q → H ve G → P aminoasit değişikliklerinin bulunduğu görülmüştür (Volkin ve Klivanov, 1989; Volkin ve Klivanov, 1983). DNA'nın G+C içeriği ve fizikokimyasal özellikleri bakımından GI'lar iki grup altında toplanırlar. Dört *Streptomyces* türü, *Thermus thermophilus*, *Actinoplanes missouriensis*, *Ampullariella* spp ve *Arthrobacter* spp'den elde edilen GI'lar yüksek G+C içeriğine sahipken, üç *Bacillus* türü, *Staphylococcus xylosus*, iki *Lactobacillus* türü, *E.coli* ve *Klebsiella pneumoniae*'ye ait GI'lar düşük G+C içeriğine sahiptirler. *Streptomyces*, *Bacillus* ve *E.coli*'ye ait GI'lar düşük aminoasit benzerliğine sahip olmasına rağmen, enzimin substrata bağlanmasında ve metal iyonlarına bağlanmasında rol oynayan aminoasitler oldukça korunmuştur. Çalışılan bütün GI'larda, enzimin aktif bölgesinde kararlı bir yapının oluşmasında rol oynayan bitişik glutamik asit ve prolin aminoasitleri arasında gerçekleşen *cis* peptid bağı oldukça korunmuştur. Bu açıdan bütün GI'ların aktif bölgesindeki yapı benzerdir (Bhosale ve ark., 1996).

1.9. Glukoz İzomerazın Çalışma Mekanizması

Büyük bir ticari öneme sahip olmasına rağmen GI'nın yapısal özellikleri ve katalizlediği reaksiyonun mekanizması hakkında çok az bir bilgi bulunmaktadır. Enzimin katalitik mekanizması araştırmacılar için büyük bir ilgi uyandırmaktadır. İlk zamanlar, GI'nın şeker fosfat isomerazlara benzer bir şekilde en-diol mekanizması ile işlev gördükleri sanılmaktaydı (Rose ve ark., 1969). Fakat yapılan son çalışmalarla enzim



Şekil 2. GI'nın çalışma mekanizması. a) cis-enediol. b) Proton transfer. c) Hidrid-shift. Kutular stereospesifik olarak transfer edilen hidrojen atomlarını göstermektedir.

hidrit-kayması mekanizması ile çalıştığı anlaşılmıştır. Enzimin yapısı ve işlevi arasındaki ilişkiyi açıklayabilmek için onun aktif kısmının konformasyonunu bilmek son derece önemlidir. Enzimin aktif kısmını çalışmak ve işlev mekanizmasını anlamak için kimyasal modifikasyon, X-ışını kristallografisi ve izotop değişimi gibi farklı yaklaşımlar denemiştir. GI'nın katalitik mekanizması substrat halkasının açılması, hidritin C-1'den C-2'ye kaydırılması ve halkanın kapanması şeklinde cereyan etmektedir.

2.YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. *Anoxybacillus gonensis* G2^T'de Glukoz İzomeraz Aktivitesinin Tespiti

2.1.1. Petri Deneyi

Genel olarak izomeraz sınıfı enzimlerin katalizlediği reaksiyonlar dönüşümlüdür. *Anoxybacillus gonensis* G2^T'nin GI aktivitesi gösterdiği belirtilmiştir (Belduz, 2002). Bu bakterinin GI enzimini ürettiği ve dolayısı ile fruktoz izomeraz aktivitesine sahip olduğu yapılan petri deneyi ile gösterildi. Petri deneyi Lee ve arkadaşlarının (1990b) geliştirdikleri yöntemle göre gerçekleştirildi. *A. gonensis* G2^T ve GI mutanı *E.coli* HB101 bakterisi % 1'lik ksiloz içeren LB agar üzerine bir gece inkübe edilerek büyütüldü. % 2'lik fruktoz, 5 mM MgSO₄, 0,5 mM CoCl₂, 20 U/ml glukoz oksidaz, 4 U/ml peroksidaz, 0,4 mg/ml benzidin içerecek şekilde 100 mM MOPS (pH: 7) içerisinde bir reaksiyon karışımı çözeltisi hazırlandı ve 50°C'ye kadar soğutulmuş (%0,7'lik) yumuşak agar ile karıştırılarak önceden büyütülen bakterilerin üzerini tamamen kaplayacak şekilde döküldü ve 5-6 gün *E.coli* HB101 37°C'de, *A. gonensis* G2^T ise 55°C'de inkübe edildi. Fruktoz izomeraz aktivitesi bakteri üzerinde oluşan kararma ile belirlendi.

2.1.2. Aktivite Deneyi

A. gonensis G2^T, *E.coli* HB101 suşu ve *Saccharococcus caldoolyolyticus* % 0,5 ksiloz içeren LB besiyerinde bir gece büyütüldükten sonra 13.000 rpm'de 5 dak. santrifüjlenerek hücreler çöktürüldü. Çöktürülen hücreler mililitresinde 0,2 mg lizozim, 5 µg DNaz ve %0,1 oranında Triton X-100 ihtiva eden 25 mM fosfat tamponu (pH 7) içerisinde çözüldükten sonra 3-4 saat bir sallayıcı üzerinde bekletilerek patlatıldı. Ardından + 4°C'de 15.000 rpm'de 30 dak. santrifüjlenerek süpernatant alındı. Elde edilen hücre özütleri GI aktivitesini belirlemek üzere kullanıldı. GI aktivitesi, Lee ve arkadaşlarının (1990b) geliştirdiği yöntemle göre gerçekleştirildi.

0,5 M glukoz, 10 mM MgSO₄, 1 mM CoCl₂ ve 10 µg hücre özütü pH'sı 7 olan 100 mM MOPS tamponu içerisinde, son hacim 1ml olacak şekilde, 55°C'de 30 dak. inkübe

edildi. Reaksiyon, inkübasyon süresi sonunda, 0,5 M perklorik asit ilavesi ile sonlandırıldı. Oluşan fruktoz miktarı Dische ve arkadaşlarının (1951) geliştirdikleri sistein-karbozol-sülfirik asit metoduyla belirlendi. Reaksiyon çözeltisi 10 kat sulandırıldıktan sonra bu karışımın 100 µl'si üzerine 100 µl %1,5'lik sistein hidroklorür ve hemen ardından 100 µl etil alkolde çözülmüş %0,12'lik karbozol ilave edildi. Karışım vortekslendikten sonra üzerine 1,8 ml %70'lik sülfirik asit ilave edildi ve tekrar vortekslendi. 10 dakika 60°C'de inkübe edildikten sonra spektrofotometrede 560 nm dalga boyunda ölçümler gerçekleştirildi. Fruktoz miktarı hazırlanan fruktoz kalibrasyon eğrisine göre hesaplandı. Bu yöntemi ile *A. gonensis* G2^T, *E.coli* HB101 suşu ve *Saccharococcus caldoolyolyticus* bakterilerinde glukoz izomeraz aktivitesinin varlığı tespit edilmeye çalışıldı. Enzimin kinetik özellikleri ve biyokimyasal özelliklerinin incelendiği denemelerde deney şartları değiştirilmiş ve kullanılan bu yöntem Bölüm 2.3.1'de belirtilmiştir.

2.2. Moleküler Çalışmalar

2.2.1. Glukoz İzomeraz Geninin PCR Yöntemi ile Belirlenmesi

2.2.1.1. Dejenere Primer Sentezi

Aminoasit ve nükleotid dizilimi önceden belirlenmiş ve gen bankasındaki yerini almış olan 10 adet tip I ve 9 tip II olmak üzere 19 adet bakterinin (özellikle *Bacillus* türlerinin) glukoz izomeraz geni Clustal W Multiple Sequence Alignment programı yardımıyla aminoasit ve nükleotid sırası bakımından karşılaştırıldı. Aminoasit ve nükleotid dizilimi açısından korunmuş olan bölgeler tespit edilerek 2 adet forward 3 adet reverse dejenere primer dizayn edildi (Tablo 4).

2.2.1.2. Genomik DNA izolasyonu

A. gonensis G2^T'ye ait genomik DNA'sı bakterinin LB besiyerinde bir gece 55°C'de inkübe edilmesinden sonra Jones ve Barnet'in geliştirmiş oldukları yonteme göre izole edildi (Maldy, 1990). Çoğaltılan hücreler 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve hücreler 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek çöktürüldü. Süpernatant atılarak

pellet üzerine 467 µl TE tamponu ilave edildi ve hücreler pipetleme yöntemiyle çözüldü. Üzerine 30 µl %10'lık SDS ve 3 µl proteinaz K (20 mg/ml) ilave edilerek karıştırıldı ve 1 saat 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası üzerlerine 500 µl fenol/kloroform (1:1) karışımı ilave edildi ve tek bir faz oluşuncaya kadar tüpler alt üst edildi. Hemen sonrasında 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüjlendi. Oluşan üst faz pipet yardımıyla yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alındı ve fenol/kloroform ile temizleme işlemi bir kez daha tekrarlandı. Yeni bir tüpe alınan üst faz üzerine 1/10 hacimde sodyum asetat ilave edildi. Üzerine 600 µl izopropanol ilave edilerek tüpler DNA iplik yumağı gibi gözle görülünceye kadar nazik bir şekilde alt üst edildi. Sonrasında tüpler 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek DNA çöktürüldü. Üzerine 500 µl %70'lik etanol ilavesi ile DNA temizlendi ve 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Supernatant dökülerek pellet 37°C'de 15 dakika kurutulduktan sonra 100 µl TE tamponunda çözüldü. DNA miktarı spektrofotometrede 260 nm'de yapılan ölçümler ile hesaplandı. DNA'lar %0,7 lik 0,5 µg/ml etidyum bromür içeren agaroz jelde yürütüldü ve BioDocAnalyze sistemi kullanılarak görüntülendi.

2.2.1.3. PCR Reaksiyonu ile GI Gen Parçasının Çoğaltılması ve Klonlanması

Tablo 2'de gösterilen F2, F3, R1, R2 ve R3 dejenere primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR reaksiyonu, 200 µl'lik ince duvarlı PCR tüpleri içerisinde 50 µl'lik son hacimde gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı 1X PCR tamponu, 200 µM dNTP, 2,5 mM MgCl₂, her bir primerden 25 pmol, 10-40 ng kalıp genomik DNA ve 1 U *Taq* DNA polimeraz içerecek şekilde hazırlandı. Reaksiyon Biometra Personal Cyclex PCR cihazı kullanılarak; 95°C'de 1 dakikalık ilk denatürasyon basamağı ardından 37 döngü 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 55°C'de 30 saniye bağlanma (annealing) ve 72°C'de 1 dakika uzama (extension) ve son olarak da 72°C'de 5 dakika olacak şekilde son uzamaya tabi tutularak gerçekleştirildi. PCR sonucunda oluşan DNA fragmentleri, 0,5 µg/ml etidyum bromür ihtiva eden % 1,4'lük agaroz jelde yürütülerek, BioDocAnalyze jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi.

PCR reaksiyonu ile çoğaltılan parçalar, pGEM-T Easy Klonlama Kiti kullanılarak pGEM-T Easy klonlama vektörüne, firmanın öngördüğü konsantrasyonlar ve şartlar gerçekleştirilerek klonlandı. Klonlama sonunda oluşan kolonilerden rekombinant

plazmitler, Maniatis ve ark. (1982) geliştirdiği plazmit izolasyon yöntemine göre izole Daha sonra izole edilen bu plazmitlerin hangilerinin istenilen parçayı taşıdığı belirlendi.

Tablo 4. Tasarlanan dejenere primerler (M: A ve C, R: A ve G, W: A ve T, S:C ve G, Y:C ve T, V :A ve C ve G, H :A ve C ve T, D :A ve G ve T, B :C ve G ve T, N :A ve C ve G ve T)

Pirmer	
F2 (Forward)	5'-GTVYTB TGGGGYGGVMGHGARGG -3'
F3 (Forward)	5'-ATHGARCCNAARCCNAWRGARCC -3'
R1 (Reverse)	5'- GGRAAYTCRTCBGTRTCCCAKCC -3'
R2 (Reverse)	5'- NGCRTCRAARTTBANNCCDCC -3'
R3 (Reverse)	5'- SYRTCCATBSMDSCDAYRTG -3'

Aktarılan fragmentlerin baz diziliminin belirlenmesinden sonra, VecScreen programı kullanılarak bu sıralarda vektör kontaminasyonunun olup olmadığı kontrol edildi. Baz sıralarının kontrolünden sonra, Genbank kullanılarak diğer GI genleri ile karşılaştırılması yapıldı ve doğru parçanın klonlanıp klonlanmadığı belirlendi.

2.2.1.4. Ters PCR (Inverse PCR) İle Genin Kalan Kısımlarının Yakalanması ve Klonlanması

Gen bankasındaki karşılaştırmalar sonucunda tespit edilen 530 baz çiftlik gen parçasının diğer kısımlarının da yakalanması için ters PCR (Inverse PCR) alışması gerçekleştirildi. Bu sebeple, elde edilen bu gen parçasına ait baz dizilimi kullanılarak u kısımlarından dış taraflara doğru olacak şekilde, 2 adet primer dizayn edildi. Daha sonra *A. gonensis* G2^T ait genomik DNA; *EcoRI*, *BamHI*, *HinfI*, *HindIII*, *BglI*, *BglII*, *SacI*, *PstI*, *Sau3AI*, *BclI*, *NarI*, *SalI*, *XhoI* ve *XbaI* restriksiyon endonkleazlarıyla bir gece boyunca kesilerek her bir kesimin kendi üzerine yapışması (self-ligasyon) sağlandı ve DNA fragmentleri halkalaştırıldı. Self ligasyon reaksiyonu, 2,5 µg kesilmiş DNA, 40 µl 10X tampon, 1 U T4 DNA ligaz enzimi iercek şekilde 400 µl son hacimde 16°C'de bir gece boyunca gerçekleştirildi. Ligasyon sonrası DNA'lar etanol çöktürmesi ile çöktürülerek 20 µl TE tamponu içerisinde çözüldükten sonra PCR reaksiyonlarında kullanıldı.

Dizayn edilen IF1 (5'-AGACGCGGTTTCGTTTGAACC-3') ve IR1 (5'-GCATAGTCAACCGCCATATGC-3') primerleri kullanılarak yapılan PCR reaksiyonu 200 µl'lik ince duvarlı PCR tüpleri içerisinde, 50 µl'lik son hacimde gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı 1X PCR tamponu, 200 µM dNTP, 2,5 mM MgCl₂, her bir primerden 25 pmol, 10-40 ng kalıp genomik DNA ve 1 U *Taq* DNA polimeraz içerecek şekilde hazırlandı. Reaksiyon şartları, 95°C'de 1 dakika ön denatürasyon sonrasında, 35 döngü olacak şekilde; 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 56°C'de 30 saniye bağlanma, 72°C'de 1,5 dakika uzama ve döngü sonunda 72°C'de 5 dakika son uzama safhası şeklinde gerçekleştirildi. Sonuçlar % 1,4'lük agaroz jel elektroforezinde yürütülerek sonuçlar görüntüldü. Elde edilen parçalar, baz dizilimini belirlenmek üzere, pGEM-T Easy klonlama vektörüne daha önce belirtilen şekilde klonlandı.

2.3. Biyokimyasal Çalışmalar

2.3.1. Protein Tayini

Bölüm 2.1.1'de anlatılan şekilde elde edilen ham hücre özütlerindeki protein miktarının tayini Bradford'un (1976) geliştirmiş olduğu metoda göre gerçekleştirildi. 100 ml boya çözeltisi hazırlamak için 10 mg Commasie Brilliant Blue G-250, 5 ml %95'lik etanol içerisinde iyice çözülerek üzerine 10 ml %85'lik fosforik asit ilave edildi ve 100 ml'ye saf su ile tamamlandı. Hazırlanan çözelti filtre kağıdı ile süzülerek temizlendi.

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

2.3.2. Biyokimyasal İncelemelerde Kullanılan GI Aktivite Deneyi

Biyokimyasal incelemelerde kullanılan GI aktivitesi tayini metodu Belfaqui ve arkadaşları (2000) tarafından geliştirilmiştir. 50 mM glukoz, 10 mM MgSO₄, 1 mM CoCl₂ ve 5 µg enzim özütü, pH'sı 7 olan 100 mM MOPS tamponu içerisinde, son hacim 100 µl olacak şekilde, 55°C'de 30 dakika inkübe edildi. Reaksiyon, inkübasyon süresi sonunda, buz üzerine alınarak sonlandırıldı. Oluşan fruktoz miktarı Dische ve arkadaşlarının (1951) geliştirdikleri sistein-karbozol-sülfirik asit metoduyla belirlendi. Reaksiyon çözeltisi üzerine 40 µl %1,5'lik sistein hidroklorür ve hemen ardından 40 µl etil alkolde çözülmüş %0,12'lik karbozol ilave edildi. Karışım vortekslendikten sonra üzerine 1,2 ml %70'lik sülfirik asit ilave edildi ve tekrar vortekslendi. 15-20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra, spektrofotometrede 560 nm dalga boyunda ölçümler gerçekleştirildi. Fruktoz miktarı hazırlanan fruktoz kalibrasyon eğrisine göre hesaplandı. Enzim aktivitesi reaksiyon sonrası oluşan fruktoz miktarına göre µmol/dakika cinsinden hesaplandı. Reaksiyonda kullanılan şartlar (kullanılan hücre özütü miktarı, reaksiyonun gerçekleştiği sıcaklık ve pH, substrat konsantrasyonu v.s.) enzimin biyokimyasal özellikleri belirlendikçe yeniden düzenlenmiştir.

2.3.3. Reaksiyonlarda Kullanılacak Hücre Özütü Miktarının Belirlenmesi

Reaksiyonlarda kullanılacak enzim miktarı, yapılan ön çalışmalar sonucunda, 1, 2, 3, 5, 7,5 ve 10 µg protein içeren hücre özütü ile gerçekleştirilen bir dizi reaksiyon serisi sonucunda belirlendi. Reaksiyonlar yukarıda belirtilen şartlarda gerçekleştirildi. Oluşturulan protein miktarı - aktivite grafiği yardımı ile ileriki çalışmalarda (optimum pH, optimum sıcaklık v.s) kullanılacak olan enzim miktarı belirlendi.

2.3.4. Optimum Sıcaklık

A. gonensis G2^T GI'nin en iyi çalıştığı optimum sıcaklık değeri, 50 mM substrat konsantrasyonu ve pH'sı 7 olan MOPS tamponunda 2,5 µg protein içeren hücre özütü ile 40, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 ve 100°C'ye ayarlanmış su banyolarında 30 dakika boyunca gerçekleştirilen bir seri reaksiyon ile belirlendi. Bu reaksiyon serisinde enzimin

en iyi çalıştığı sıcaklık değeri daha sonraki çalışmalarda kullanılacak olan reaksiyon sıcaklığı olarak belirlendi.

2.3.5. Optimum pH

GI aktivitesine pH'nın etkisi, 50 mM asetat tamponunda pH 4 - 5; 50 mM fosfat tamponunda pH 5,5 - 7,5 ve Tris-HCL tamponunda pH 8 - 9,5 değerlerinde, 50 mM glukoz konsantrasyonunda, 85°C'de 30 dakikalık reaksiyon şartlarında incelendi. Gözlenen optimum pH değeri daha sonra yapılacak olan pH ve ısı kararlılığı, inhibitör ve aktivatör maddelerin etkisi ve kinetik parametrelerin belirlenmesi gibi çalışmalarda reaksiyon pH'sı olarak belirlenmiştir.

2.3.6. Enzim Kinetiği

A. gonensis G2^T GI'nın glukoz için olan kinetik verileri, yapılan ön çalışmalar sonucunda belirlenen, 2 ve 50 mM arasındaki substrat konsantrasyonları ile gerçekleştirilen bir seri reaksiyon ile belirlendi. GI aktivitesi, 2,5 µg protein içeren hücre özütü ile 85°C'de, pH'sı 6,5 olan 50 mM MOPS tamponu içerisinde 30 dakikalık reaksiyon süresi sonunda oluşan fruktoz miktarındaki artışa göre belirlendi. Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerleri hazırlanan Lineweaver-Burk eğrisinde x ve y eksenleri kestiği noktalara karşılık gelen değerlerin tersi olarak belirlendi (Lineweaver ve Burk, 1934). Michaelis-Menten grafiği çizilerek elde edilen 25 mM substrat konsantrasyonu daha sonra yapılacak olan çalışmalarda kullanılacak substrat konsantrasyonu olarak belirlendi.

2.3.7. pH Kararlılığı

GI'nın pH kararlılığı belirlemek için enzimi içeren hücre özütü, pH'sı 5 olan 50 mM asetat tamponunda; pH'sı 6 ve 7 olan 50 mM fosfat tamponlarında ve pH'sı 8 ve 9 olan Tris-HCl tamponlarında, +4°C'de inkübe edildi. 50, 100, 200, 300 saat inkübasyon sonrasında kalan aktivite; 25 mM substrat konsantrasyonu, optimum pH ve sıcaklıkta 30

dakikalık bir reaksiyon sonucunda oluşan fruktoz miktarı ölçülerek enzimin en kararlı olduğu pH değeri belirlendi.

2.3.8. Isıl Kararlılığı ve Co^{+2} , Mn^{+2} ve Mg^{+2} nin Isıl Kararlılığa Etkisi

GI'nın optimum çalışma sıcaklığı olan 85°C 'deki kararlılığı ve bu kararlılığa Co^{+2} , Mn^{+2} ve Mg^{+2} bivalent katyonlarının etkisi belirlendi. Bunun için herhangi bir metal iyonu içermeyen hücre özütü, 1 mM Co^{+2} içeren hücre özütü, 2 mM Mg^{+2} içeren hücre özütü, 1mM Mn^{+2} içeren hücre özütü ve 1 mM Co^{+2} ile 2 mM Mg^{+2} içeren hücre özütü bir su banyosunda 85°C 'de yaklaşık 5 saat inkübe edildi. Çeşitli zamanlarda bu hücre özütlerinden gerekli miktarlar alınarak optimum şartlarda GI aktivitesi belirlendi.

Ayrıca $+4$ ve 30°C 'de enzimin göstermiş olduğu ısı kararlılığı da, metal iyonlarının etkisine bakılmaksızın, bu sıcaklıklarda inkübe edilen hücre özütlerinden belirli zaman aralıklarında yapılan GI aktivitesi ölçümleriyle belirlendi.

2.3.9. Aktivatör Etkisi

Genel olarak, Co^{+2} , Mn^{+2} ve Mg^{+2} bivalent metal iyonlarının GI'lar için aktivatör oldukları bilinmektedir (Bhosale ve ark.,1996). Çeşitli konsantrasyonlardaki bu metal iyonlarının GI aktivitesi üzerine olan etkisi optimum reaksiyon şartlarında (25 mM substrat konsantrasyonu, pH 6,5, 85°C 'de 30 dakika) incelendi. Her bir metal iyonu reaksiyon karışımında 0; 0,1; 0,5; 1; 2; 4; 10; 20; 50; 100 mM olacak şekilde kullanılarak en etkin oldukları konsantrasyon belirlendi.

2.3.10. İnhibitör Etkisi

GI aktivitesi üzerine metal iyonlarının inhibitör etkisi; Cd^{+2} , Ca^{+2} , Sn^{+2} , Hg^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} ve Cu^{+2} bivalent metal iyonlarının klorür ve sülfat tuzları ile gerçekleştirildi. Reaksiyonlar, enzimin çalıştığı optimum şartlarda, 0,1; 1; 5 ve 10 mM inhibitör metal iyonu içerecek şekilde gerçekleştirildi.

2.3.11. Doğal ve SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrez

Protein jel elektrofrezleri, Hoeffer SE 600 marka elektrofrezde % 12'lik jel kullanılarak 15 mA'lık akım altında gerçekleştirildi.

A. gonensis G2^T GI'nın moleküler ağırlığını hesaplamak amacıyla; *A. gonensis* G2^T ve *Saccharococcus caldoolyolyticus* hücre özütleri ile saflaştırılan *A. gonensis* G2^T GI'ı, moleküler ağırlığı belli olan bir protein markırı ile SDS poliakrilamid jel elektrofrez yöntemi ile her bir örnekten 100 µg protein kullanılarak yürütüldü. Her bir örnek üzerlerine eşit miktarlarda muamele (0,15 M Tris-HCl pH 6,8; % 4 SDS; %20 Gliserol; % 6 β-merkaptotanol), tamponu ilave edildi ve sonrasında 99°C'de 4 dakika bekletilerek ve Maniatis ve arkadaşları (1982) tarafından tanımlanan %12'lik sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jeline (SDS-PAGE) yüklendi ve 15 mA akım altında, yürütme boyası jelden çıkana kadar yürütüldü. Yürütme işlemi sonrasında jel, Commasie Brilliant Blue (% 0,125 Commasie Brilliant Blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit) boyası ile 2- 4 saat boyandı ve hemen ardından yıkama çözeltisinde (%36 Metanol, %9 Asetik asit) 3-4 saat yıkanarak bir bilgisayar tarayıcısı ile fotoğraflandı.

GI enzimin saflaştırılması amacıyla; *A. gonensis* G2^T'den elde edilen hücre özütü, 1000 µg protein içerecek şekilde preparatif taraklara yüklenerek % 12'lik 1 mm kalınlığındaki doğal poliakrilamid jelinde 15 mA akımda +4°C'de yürütüldü ve GI'nın oluşturduğu bant jelden izole edildi.

2.3.12. Glukoz İzomerazın Saflaştırılması

GI enzimi, yukarıda anlatıldığı gibi yürütüldüğü doğal poliakrilamid jelden Mini Whole Gel Eluter cihazı kullanılarak saflaştırıldı. Jel, 15 dakika kadar eluter tamponunda (43 mM imidazol, 35 mM HEPES pH 7,4) bekletildi. Jel içerisindeki bantların jel yüzeyinden cihazın 14 ayrı ayırma kuyucuğunda bulunan eluter tamponuna geçmesi, doğal poliakrilamid jel elektrofrezinde kullanılan akım yönüne 90 derecelik bir açıda, 30 dakika boyunca 75 mM akım verilerek gerçekleştirildi. Elde edilen 14 fraksiyonda GI aktivitesi incelendi. Enzimi içeren ve dolayısı ile aktivite gösteren fraksiyon doğal ve SDS poliakrilamid jel elektrofrezinde tekrar yürütüldü.

3. BULGULAR

3.1. *Anoxybacillus gonensis* G2^T'de Glukoz İzomeraz Aktivitesinin Tespiti

3.1.1. Petri Deneyi

A. gonensis G2^T'nin GI aktivitesine sahip olduğu yapılan petri deneyi ile gösterildi. Genel olarak izomeraz sınıfı enzimlerin katalizlediği reaksiyonlarının dönüşümlü olma özelliğinden faydalanılarak, bakterinin fruktozu glukozla dönüştürme aktivitesine sahip olup olmadığı araştırıldı. Deneyde kontrol olarak glukoz izomeraz negatif *E.coli* HB101 suşu kullanıldı. 5-6 günlük bir inkübasyon süresi sonunda *E.coli* HB101 suşunun fruktoz izomeraz aktivitesi göstermediği, *A. gonensis* G2^T'in ise fruktozu glukozla dönüştürdüğü gözlemlendi. Fruktoz-glukoz dönüşümü bakteri üzerinde oluşan kararma ile belirlendi (Şekil3).



Şekil 3. *E.coli* HB101 ve *A. gonensis* G2^T'de fruktoz izomereaz aktivitesinin tespiti

3.1.2. Glukoz İzomeraz Aktivitesi

A. gonensis G2^T, *Saccharococcus caldoolyolyticus*, ve *E.coli* HB101 suşunda GI aktivitesi, Lee ve arkadaşlarının geliştirmiş (1990b) oldukları yöntemle göre incelendi. GI

aktivitesi reaksiyon sonucunda oluşan fruktoz miktarının $\mu\text{mol/dak}$ cinsinden spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle belirlendi. İncelemeler sonucunda, *A. gonensis* G2^T ve *Saccharococcus caldoxylolyticus*'nin GI aktivitesine sahip olduğu, GI mutanlığı olan *E.coli* HB101 suşunun GI aktivitesi göstermediği tespit edildi (Tablo 5).

Tablo 5. *A. gonensis* G2^T, *Saccharococcus caldoxylolyticus* ve *E.coli* HB101 suşunda glukoz izomeraz aktivitesi

Bakteri	Aktivite ($\mu\text{mol/dak}$)
<i>A. gonensis</i> G2 ^T	0,004479
<i>Saccharococcus caldoxylolyticus</i>	0,00152
<i>E.coli</i> HB101	0

3.2. Moleküler Çalışmalar

3.2.1. Glukoz İzomeraz Geninin PCR Yöntemi ile Belirlenmesi

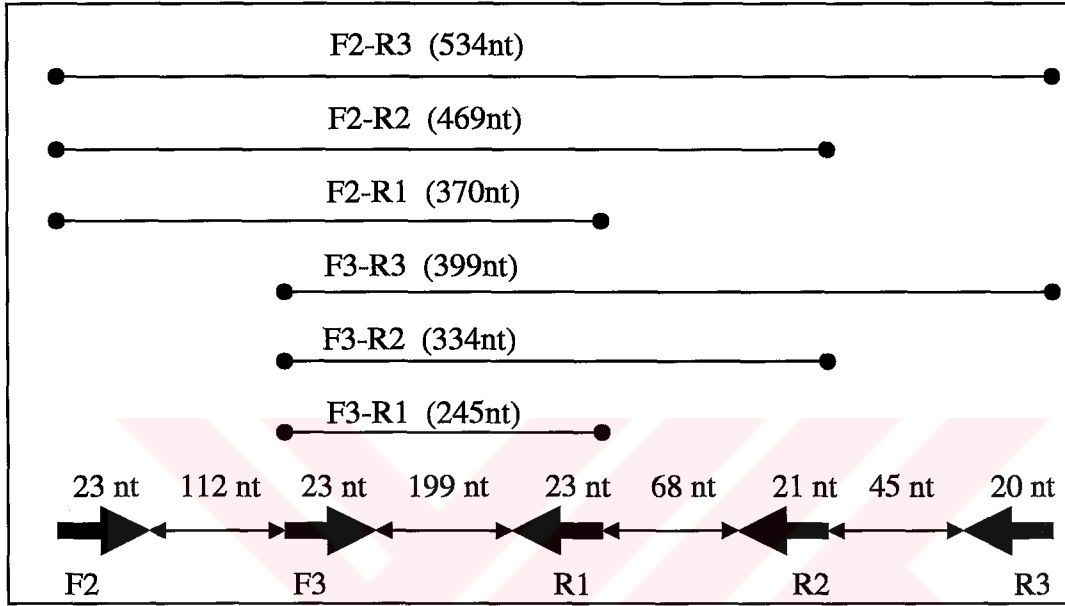
3.2.1.1. Dejenere Primer Sentezi

Bacillus türlerini de içerisine alan 10 bakteriye ait (*Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus licheniformis*, *Thermotoga maritima*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Xanthomonas axonopodis*, *Bifidobacterium longum*, *Pirellula* sp) yaklaşık 1320 baz çiftlik oluşan GI'ların baz dizilimleri ve aminoasit dizilimleri genbankasından alınarak Clustal W Multiple Sequence Alignment programı vasıtasıyla birbirleriyle karşılaştırıldı ve korunmuş bölgeler belirlenerek Tablo 2'de gösterilen 2 adet forward ve 3 adet reverse dejenere primer tasarlandı. Baz dizilimlerine ait Clustal W analiz sonuçları Ek 1'de gösterilmiştir.

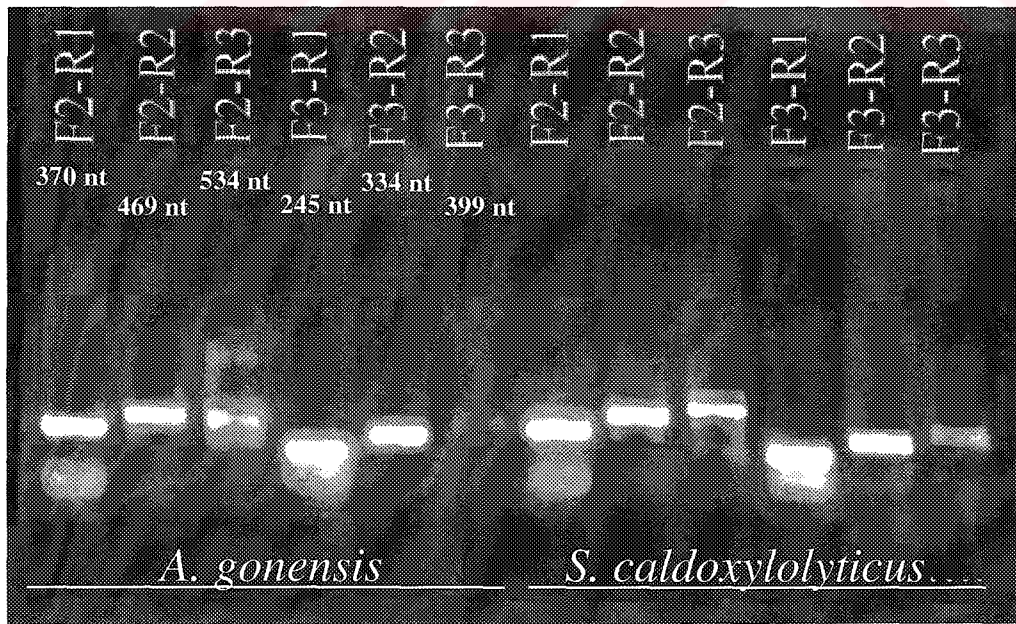
3.2.1.2. PCR Reaksiyonu ile GI Gen Parçasının Çoğaltılması ve Klonlanması

A. gonensis G2^T GI genini yakalamak amacıyla, bu bakterinin genomik DNA'sı kalıp olarak kullanılarak tasarlanan primerlerden F2-R1, F2-R2, F2-R3, F3-R1, F3-R2 ve F3-R3 kombinasyonları ile PCR yapıldı. Pozitif kontrol olarak, GI genine sahip olduğu bilinen *Saccharococcus caldoxylolyticus* genomik DNA'sı kullanılarak aynı primer

kombinasyonları ile PCR reaksiyonları gerçekleştirildi. Primer çiftlerinden beklenen DNA parçalarının uzunlukları Şekil 4’de gösterilmiştir. PCR sonuçları 0,5mg/ml etidyum bromür içeren %1,4’lük agaroz jelde yürütülmüş ve sonuçlar BioDocAnalyze jel görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir (Şekil 5).



Şekil 4. Dejenere primer kombinasyonlarından beklenen DNA parçaları



Şekil 5. Dejenere primer kombinasyonları ile *A. gonensis* G2^T ve *Saccharococcus caldoxylolyticus* genomik DNA’larından PCR yoluyla çoğaltılan GI genine ait DNA parçaları

A. gonensis G2^T genomik DNA'sından elde edilen en büyük DNA parçası F2-R3 primerleri kullanılarak gerçekleştirildi. Çoğaltılan DNA parçalarının GI genine ait olduğunu teyit etmek amacıyla; yaklaşık 530 bp olması beklenen en büyük DNA parçasının kalıp olarak kullanıldığı ve diğer primer kombinasyonlarının denendiği PCR sonucunda internal parçaların hepsi tekrar elde edildi. F2-R3 primerleri kullanılarak elde edilen DNA parçası p-GEM-T Easy klonlama vektörüne klonlandı ve klonlanan parçanın baz dizilimi, doğru klonun agaroz jelde incelenerek teyit edilmesinden sonra, Davis Sequencing LLC (A.B.D.) aracılığıyla belirlendi. Baz dizilimi Şekil 4 'te gösterilen 530 baz çiftlik DNA parçası, genbank'ta bulunan diğer bakterilere ait GI genleriyle karşılaştırılarak klonlanan parçanın GI genine ait olduğu teyit edildi. Yapılan bu karşılaştırma sonucunda klonlanan parçanın; *B. stearothermophilus* GI'1 ile % 81, *B. megaterium* GI'1 ile % 79, *B. licheniformis* GI'1 ile % 82 ve *B. subtilis* GI'1 ile %81 benzerlik gösterdiği ve ayrıca *Thermoanaerobacter yonsei*, *Tetragenococcus halophilus*, *S. xylosus*, *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Thermoanaerobacterium* sp, *Clostridium thermohydrosulfuricum*, *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*, *C. thermosaccharolyticum* ve *C. thermosulfurogenes* GI'ları ile bazı bölgelerde %70'in üzerinde benzerlik gösterdiği belirlendi.

GTA CTT TGG GGC GGG CGT GAA GGC TAT GAA ACG TTG TTA AAT
 ACA AAT ATG AAG CTC GAA CTG GAC AAT TTA GCC CGC TTT TTG
 CAT ATG GCG GTT GAC TAT GCG AAA GAA ATT GGC TTT GAC GGG
 CAA TTT TTA ATT GAG CCA AAA CCA AAA GAA CCA ACG AAG CAT
 CAA TAC GAC TTT GAT GTT GCA ACA GCA TTA GCG TTT CTA CAG
 ACG TAT GGA CTA AAA GAT TAT TTC AAA TTC AAC ATT GAA GCA
 AAC CAT GCG ACA TTG GCA GGT CAT ACA TTT GAA CAT GAA CTT
 CGC GTA GCG CGC ATT CAC GGA ATG CTC GGT TCG GTC GAT GCC
 AAC CAA GGC GAC CCG TTG CTT GGC TGG GAT ACC GAC GAA TTC
 CCA ACA GAC TTG TAT TCT ACT ACT CTT GCG ATG TAC GAA ATT
 TTA CAA AAT GGC GGA CTC GGA AAA GGC GGA TTG AAC TTT GAT
 GCG AAA GTA AGA CGC GGT TCG TTT GAA CCA GAA GAC TTA TTC
 TAC GCC CAT ATA GCA GCC ATG GAC AG

Şekil 6. F2-R3 dejenere primerleri kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltılan *A. gonensis* G2^T'ye ait 530 nükleotidlik GI gen parçasının baz dizilimi

3.2.1.3. Ters PCR (Inverse PCR)

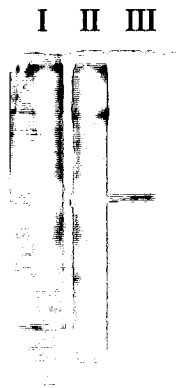
Klonlanan ve baz dizilimi belirlenen 530 bazlık DNA parçasının uç kısımlarından IF1 (5'-AGACGCGGTTCGTTTGAACC-3') ve IR1 (5'-GCATAGTCAACCGCCAT ATGC-3') primerleri dizayn edildi. Yapılan ters PCR sonucu *Sa3AI* ve *Hinfi* kesimlerinden sırasıyla yaklaşık olarak 400 ve 500 baz çiftlik DNA parçaları elde edildi ve parçalar pGEM-T Easy klonlama vektörüne klonlandı.

3.3. Biyokimyasal Çalışmalar

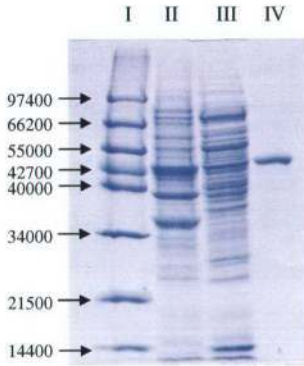
A. gonensis G2^T'de, GI geninin ve bu gene ait aktivitenin var olduğu yapılan petri ve aktivite deneyleri ile ispatlanmış ve ayrıca bu gene ait 530 bazlık bir parça klonlanarak baz dizilimi belirlenmiştir. Daha sonrasında bu enzimin biyokimyasal özellikleri (optimum pH ve sıcaklık, inhibitör aktivatör etkisi, kinetik parametreleri v.s.) belirlendi. Bu bölüm altında yapılan tüm çalışmalar üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

3.3.1. Doğal ve SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrez

Bulunduğu hücre özütünden Mini Whole Gel Eluter cihazı yardımıyla saflaştırılan *A. gonensis* G2^T GI'ı doğal ve SDS-poliakrilamid jelinde tek bant olarak gösterildi (Şekil 7-8). Enzimi oluşturan alt ünitelerin moleküler ağırlıkları 43.000 dalton olarak hesaplandı.



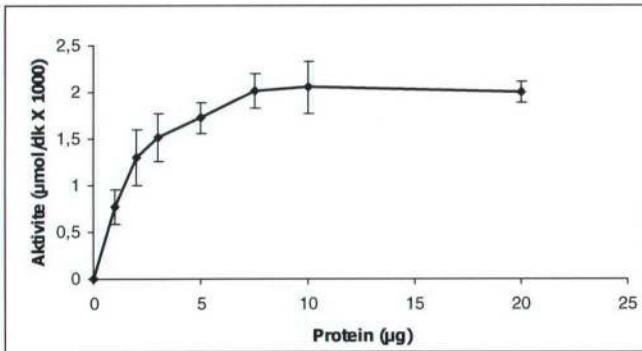
Şekil 7. Doğal poliakrilamid jel elektrofrez. I: *Saccharococcus caldxylolyticus* , II: *A. gonensis* G2^T, III: Saflaştırılan *A. gonensis* GI'ı



Şekil 8. SDS poliakrilamid jel elektroforezi. , I: Protein markır, II: *A. gonensis*, III: *Saccharococcus caldxylolyticus* , IV: Safılaştırılan *A. gonensis* GI'ı

3.3.2. Reaksiyonlarda Kullanılacak Hücre Özüü Miktarının Belirlenmesi

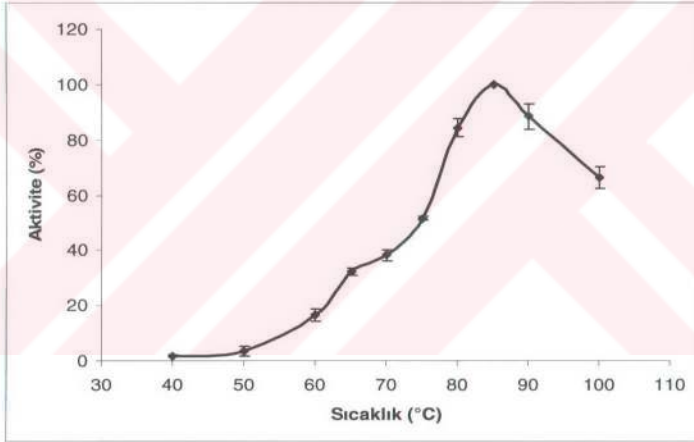
Yapılan alışmalar sonucunda reaksiyonlarda kullanılacak enzim miktarı, 2,5 µg protein özüü olarak belirlendi. Şekil 9'da da görüldüğü gibi 2,5 µg protein içeren hücre özüü miktarının, toplam hücre protein miktarı-aktivite grafiğinde logaritmik artışın olduğı bölgeye denk geldiğı ve böylece bu miktarın GI aktivite deneylerinde kullanılabilircek uygunlukta olduğı belirlendi.



Şekil 9. Toplam hücre proteini miktarı – GI aktivite grafiğı

3.3.3. Optimum Sıcaklık

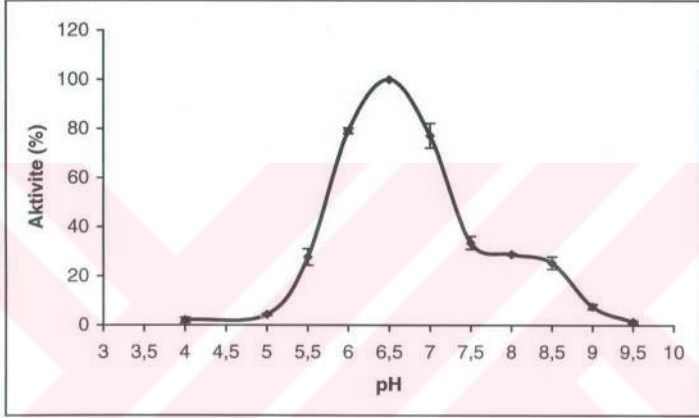
GI aktivitesine sıcaklığın etkisi 40, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 ve 100°C'lerde incelendi. Sonuçlar Şekil 10'da gösterilmiştir. Bulunan bu sonuçlara göre GI enzimi en yüksek aktiviteyi 85°C'de göstermektedir. Enzim; 100°C gibi yüksek sıcaklıkta bile % 66,4 + 3,9 aktivite gösterirken, *A. gonensis* G2^T'nin optimum büyüme sıcaklığı olan 55°C'de ise %10'luk bir aktivite göstermektedir. 40°C ve aşağı sıcaklıklarda ise herhangi bir GI aktivitesi gözlenmemiştir. Yapılan bu çalışma ile *A. gonensis* G2^T GI'nın çalıştığı optimum sıcaklık 85°C olarak belirlenmiştir. Deney üç kez tekrarlanmış ve tekrarlanan sonuçların birbiri ile hemen hemen aynı olduğu görülmüştür.



Şekil 10. Sıcaklık- GI aktivite grafiği

3.3.4. Optimum pH

pH'nın GI aktivitesi üzerine etkisi pH 4 - 9,5 aralığındaki tamponlarda gerçekleştirilen bir seri reaksiyon ile incelendi. Şekil 11'de de görüldüğü üzere GI aktivitesi en yüksek 6,5 pH'ya sahip tamponda gözlenmiştir. pH 6,5'tan aşağı ve yukarı pH değerlerine gidildikçe GI aktivitesinde bir düşüş gözlenirken pH 7,5 ile 8,5 değerleri

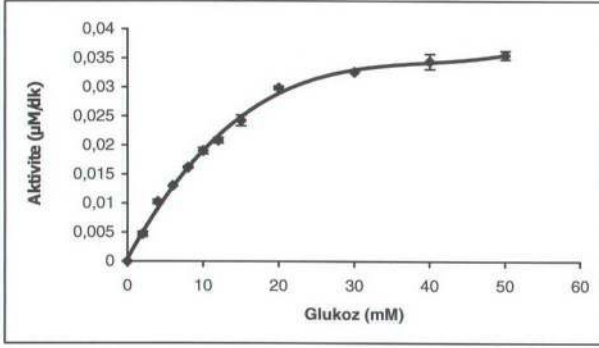


Şekil 11. pH - GI aktivite grafiği

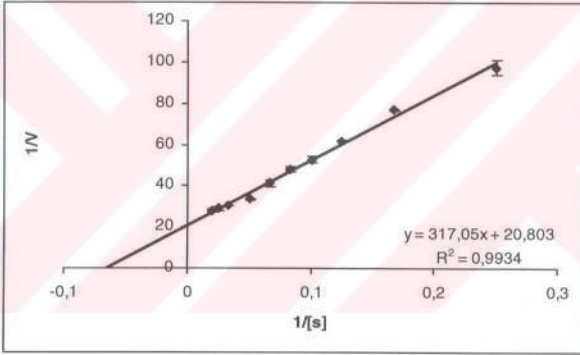
arasında aktivite % 20-30'luk bir etkiyle korunmuştur. pH 4,5'ten daha aşağı ve pH 9,5'ten daha aşağı pH'larda gerçekleştirilen reaksiyonlarda ise her hangi bir aktivite gözlenmemiştir.

3.3.5. Kinetik İncelemeler

A. gonensis $G2^T$ GI'sının substrat olarak glukoz varlığında substrat-aktivite grafiği çizilerek enzimin basit Michaelis- Menten kinetiğine uyduğu tespit edildi (Şekil 12). Substrat olan glukoz için çizilen Lineweaver-Burk eğrilerinin oluşturduğu doğrunun x-eksenini kestiği nokta $-1/K_m$ 'ye eşitlenerek K_m değeri 15,24 mM, y-eksenini kestiği nokta ise $1/V_{max}$ 'a eşitlenerek V_{max} değeri 0,04807 $\mu\text{M}/\text{dak}$ olarak hesaplandı (Şekil 13).



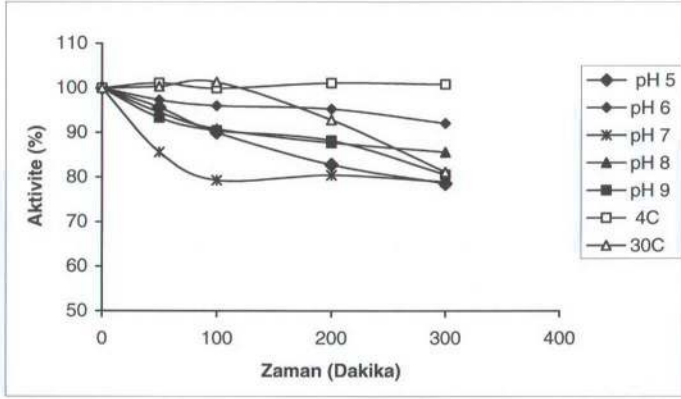
Şekil 12. Glukoz için Michaelis- Menten eğrisi



Şekil 13. Glukoz için Lineweaver-Burk eğrisi

3.3.6. Glukoz İzomerazın pH ve Isıl Kararlılığı

A. gonensis G2^T GI'sının pH kararlılığı, enzimin; pH 5, 6, 7, 8 ve 9 olan tamponlarda, ısıl kararlılığı ise + 4 ve 30°C'de inkübe edilmesiyle belirlendi (Şekil 14) Enzimin, 4°C'de 300 saat bekletilmesi sonunda aktivitesinde herhangi bir azalmanın olmadığı gözlemlendi. 30°C'de 100 saat bekletilen enzimin aktivitesini kaybetmediği, fakat 100 saat sonrasında enzim aktivitesinde hafif bir azalmanın olduğu belirlendi. Değişik pH

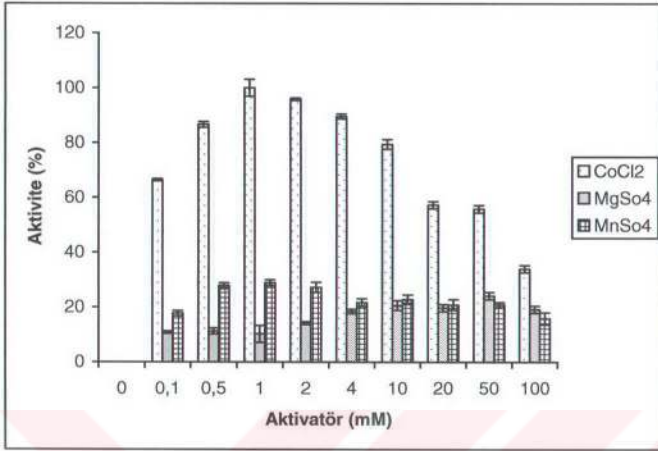


Şekil 14. GI'nın pH ve ısıl kararlılık- zaman grafiği

değerlerine 300 saat maruz bırakılmış enzimin, süre sonunda % 5 ila 20 aktivite kaybettiği belirlendi. Enzimin 85°C'de olan ısıl kararlılığı Şekil 14'da gösterilmiştir.

3.3.7. Aktivatör Etkisi

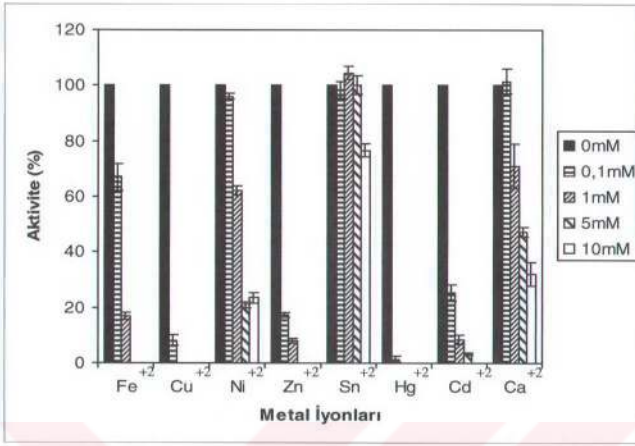
Co^{+2} , Mg^{+2} ve Mn^{+2} bivalent katyon iyonlarının GI aktivitesi üzerine olan etkisi, 0; 0,1; 0,5; 1; 2; 4; 10; 20; 50; 100 mM konsantrasyonlarda metal iyonu varlığında bir dizi reaksiyon ile belirlendi (Şekil 15). Hiçbir metal iyonunun kullanılmadığı apoenzimle yapılan reaksiyonlarda herhangi bir GI aktivitesi görülmeydi. En yüksek aktivite 1 mM CoCl_2 varlığında gözlenirken, 1 mM'dan daha yüksek konsantrasyonlardaki CoCl_2 kullanımının aktivite kaybına sebep olduğu belirlendi. Diğer metal iyonlarıyla yapılan çalışmalarda, CoCl_2 'nin sağlamış olduğu etkiye kıyasla, oldukça az miktarlarda aktivite olduğu tespit edildi.



Şekil 15. Co^{+2} , Mg^{+2} ve Mn^{+2} bivalent katyon iyonlarının GI aktivitesi üzerine olan aktivatör etkisi

3.3.8. İnhibitör Etkisi

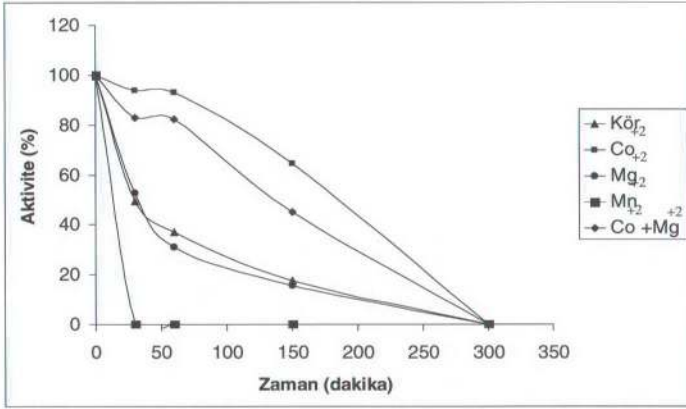
GI aktivitesi üzerine metal iyonlarının inhibitör etkisi; Cd^{+2} , Ca^{+2} , Sn^{+2} , Hg^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} ve Cu^{+2} bivalent metal iyonlarının klorür ve sülfat tuzlarının 0,1; 1; 5 ve 10 mM konsantrasyonlarında gerçekleştirilen bir seri reaksiyon ile belirlendi (Şekil 16). Etkisi incelenen metal iyonlarından Sn^{+2} haricindeki diğer metal iyonlarının GI aktivitesi üzerinde inhibitör etkisinin olduğu belirlendi. 1 mM Sn^{+2} metal iyonu GI aktivitesi üzerinde %5'lik bir artış meydana getirirken 10 mM konsantrasyonda inhibitör etkide bulunduğu belirlendi. Cu^{+2} , Zn^{+2} ve Cd^{+2} , metal iyonlarının düşük konsantrasyonlarda dahi yüksek inhibitör özellikleri gösterdiği tespit edildi. En yüksek inhibitör etkiyi; 0,1 mM'lık düşük konsantrasyonda %99, daha yüksek konsantrasyonlarda %100 etki ile Hg^{+2} metal iyonu sağladı. 10 mM konsantrasyonda gerçekleştirilen inhibitör metal iyonu uygulamalarından sadece Ni^{+2} , Sn^{+2} ve Ca^{+2} ile GI aktivitesi gözlenirken diğer metal iyonları bu konsantrasyonda GI aktivitesini tamamen durdurduğu saptandı.



Şekil 16. Cd^{+2} , Ca^{+2} , Sn^{+2} , Hg^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} ve Cu^{+2} bivalent metal iyonlarının GI aktivitesi üzerine olan inhibitör etkisi

3.3.9. Metal İyonlarının Enzimin Isıl Kararlılığı Üzerine Etkisi

GI'nın optimum çalışma sıcaklığı olan 85°C 'deki kararlılığı ve bu kararlılığa Co^{+2} , Mn^{+2} ve Mg^{+2} bivalent metal iyonlarının etkisi belirlendi (Şekil 17). GI aktivitesinin; enzimin hiçbir metal iyonu ilave edilmeden 85°C 'de bekletilmesiyle; 30 dakika sonunda %50, 60 dakika sonunda %63, 150 dakika sonunda %83 ve 300 dakika sonunda ise tamamen kaybedildiği görüldü. Mg^{+2} katyonunun enzimin 85°C 'deki ısı kararlılığı üzerinde herhangi bir etkisinin bulunmadığı görüldürken, Mn^{+2} katyonunun enzimi bu sıcaklıktaki ısı kararlılığını oldukça düşürdüğü görüldü. Öyle ki 30 dakika sonunda yapılan ilk ölçümde enzimin tüm aktivitesini kaybetti tespit edildi. Co^{+2} katyonunun ise enzimin bu sıcaklıkta olan kararlılığını oldukça artırdığı görüldü. Co^{+2} katyonu varlığında GI aktivitesinin, 150 dakika sonunda, % 50'nin üzerinde korundu belirlendi. Enzimin ısı kararlılığı üzerine Co^{+2} ve Mg^{+2} katyonlarının ortak etkisine bakıldığında; yalnız Co^{+2} 'nin kullanıldığı incelemelere göre daha az olmasına rağmen, bu katyonların ortak kullanımının enzimin ısı kararlılığını artırdığı görüldü. İnkübasyon ortamında metal iyonu ihtiva etsin ya da etmesin, 85°C 'de 300 dakika inkübe edilen enzimin, bütün aktivitesini yitirdiği belirlendi.



Şekil 17. Metal iyonlarının enzimın 85°C’deki ısıl kararlılığı üzerine etkisi

4. TARTIşMA

Bu alışmada Gnen kaplıcalarından izole edilen *A.gonensis* G2^T'ye ait GI enzimi kodlayan genin klonlanmasına ve enzimin biyokimyasal özelliklerinin ve kinetik parametrelerinin ortaya konulmasına çalışılmıştır.

Bakteride GI aktivitesinin varlığı yapılan petri deneyi ve aktivite deneyi ile gstertilmiştir. Lee ve arkadaşlarının (1990b) geliştirdikleri yönteme göre yapılan petri deneyi sonucu glukozun, glukoz oksidaz ve peroksidaz enzimleri muamelesi sonucu ortaya çıkan bakteri üzerindeki kararma, belirtilenin (1 gün) aksine 5 gün sonra ortaya çıkmıştır. Bu farklılığın sebebi reaksiyonun *A. gonensis* G2^T'nin büyüme sıcaklığı olan 55°C'de gerçekleştirilmiş olmasıdır. Daha sonradan yapılan çalışmalarda, GI enziminin optimum çalışma sıcaklığının 85°C olduğu ve 55°C'de enzimin %10'luk bir aktivite gösterdiği bulunmuştur. %10'luk bir aktivite ile reaksiyon sresinin bu derecede uzaması olağandır. Deney sonucunda *A. gonensis* G2^T hücrelerinin üzerinde meydana gelmesi üretilen bakterinin, fruktoz izomeraz dolayısı ile GI ativitese sahip olduğunu göstermektedir. *A. gonensis* G2^T hücre özütünde GI aktivitesi Lee ve arkadaşlarını (1990b) geliştirdiği yönteme göre yapılmış ve deneyde *E.coli* HB101 suşu negatif kontrol, *Saccharococcus caldoxylolyticus* bakterisi ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. *E.coli* HB101 suşunda hiçbir aktivite gözlenmezken *A. gonensis* G2^T ve *Saccharococcus caldoxylolyticus* bakterisinde GI aktivitesi gözlenmiştir. Gözlenen bu aktiviteler arasında yapılan karşılaştırmada *A. gonensis* G2^T GI'sının *Saccharococcus caldoxylolyticus* GI'sına göre % 66 daha fazla aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. Fakat Lee ve arkadaşlarının (1990b) geliştirdiği bu metotda kullanılan 0,5 M glukoz konsantrasyonu, reaksiyon sonucunda üretilen fruktoz miktarının, Dische ve arkadaşlarının (1951) geliştirdiği sistein-karbozol-sülfirik asit metoduyla spektrofotometrik olarak belirlenmesinde sorun oluşurmaktadır. Metotda belirtildiği üzere; reaksiyon sonunda 1 g fruktozun vermiş olduğu pembe renk 100 g glukozun verdiği renkten fazladır ve glukoz konsantrasyonu 100 g fazla olduğunda önemli derecede pembe renk oluşumuna sebep olmaktadır. Bu problem aşmak için enzimatik reaksiyonun sonlandırılmasından sonra örneklerin 10 ila 50 kat sulandırılması gerekmektedir. Bu durum ise ölçümlerdeki hassasiyeti azaltmaktadır. Ayrıca sülfirik asit ilavesinden sonra örneklerin 60°C'de 10 dakika bekletilmesi renklenme reaksiyonunu oldukça hızlandırmakta ve fazla renk oluşumuna sebep

oluşumuna sebep olmaktadır. Bu problemlerden ötürü hassas incelemeler gerektiren biyokimyasal çalışmalarda, GI aktivite deneyleri, Belfaqui ve arkadaşlarının (2000) geliştirmiş oldukları metoda göre gerçekleştirilmiştir.

GI'lar aminoasit dizilimlerine göre iki grup altında sınıflandırılırlar (Bhosale ve ark.,1996). Tip1 GI'lar N-Terminal ucunda 30 ila 40 aminoasitlik bir fazlalık parça bulunmaktadır ve bu enzimler birbirlerine aminoasit dizilimi bakımından oldukça benzerdir. *A. gonensis* G2^T'ye yakın türlerin GI genlerinin Tip1 GI sınıfına girmesinden dolayı *A. gonensis* G2^T GI'sını yakalamak için tasarlanan dejenere primerler Tip1 GI genine sahip bakterilerde yapılan karşılaştırmalar sonucu belirlenmiştir. *A. gonensis* G2^T'den, bu primerler kullanılarak gerçekleştirilen PCR reaksiyonu sonucu elde edilen parçanın baz diziliminin diğer organizmalara ait GI'lar ile karşılaştırılması ile bu parçanın Tip1 GI'lara yüksek benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Elde edilen parçanın, *B. stearothermophilus* GI'ı ile % 81, *B. megaterium* GI'ı ile % 79, *B.licheniformis* GI'ı ile % 82 ve *B.subtilis* GI'ı ile %81 benzerlik gösterdiği göz önüne alındığında *A. gonensis* G2^T GI'sının Tip1 GI sınıfına girdiği anlaşılmaktadır.

F2-F3 primer kombinasyonundan elde edilen gen parçası kalıp olarak kullanılarak diğer primerler ile PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve *A. gonensis* G2^T genomik DNA'sının kullanıldığı PCR reaksiyonu ile üretilen küçük parçaların tekrar elde edilmesine çalışılmıştır. En büyük parçadan küçük parçaların başarılı bir şekilde elde edilmesi, primer kombinasyonlarından elde edilen bütün parçaların aynı gene ait olduğunu göstermektedir.

Bölüm 2.2.1.4.'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilen ters PCR reaksiyonu sonucunda *Sau3AI* ve *HinfI* kesimlerinden sırasıyla yaklaşık olarak 400 ve 500 baz çiftlik DNA parçaları elde edilmiştir. Deney çok sayıda restriksiyon enzimleriyle denenmiş olmasına rağmen bu denemelerden sonuç alınamamıştır. Bu durum, 6'lı tanıma bölgeleri ile kesim yapan bu enzimlerin oluşturduğu parçaların uzun olması ve *Taq* DNA polimerazın bu uzunluktaki parçaları PCR reaksiyonda sentezleyememesinden veya ligasyon şartlarından olabilir.

GI, ksilozdan etanol üretiminde endüstriyel olarak kullanılmaktadır. *D*-ksilozdan etanol üretiminde düşük fermentasyon oranı gözlenmesine ve düşük ürün verimliliği elde edilmesine rağmen, şu anda ksilozun izomerizasyonunu ve etanole fermentasyonunu eş zamanda sağlamak amacıyla GI geninin mayalara transfer edilmesi çalışmaları hızla artmaktadır (Chaing ve ark., 1981; Chan ve ark., 1989; Gong ve ark., 1981; Schneider ve

ark., 1981; Wang ve ark., 1980b). Fakat böylesi bir çalışma, mayaların büyüme sıcaklıkları düşünüldüğünde, optimum çalışma sıcaklığı 85°C olan *A. gonensis* G2^T GI'sı için uygun değildir.

Yapılan kinetik incelemelerde, *A. gonensis* G2^T GI'nın glukoz için düşük K_m değerine sahip olduğu, dolayısı ile enzimin glukozla olan ilgisinin oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Tablo 6'da da görüldüğü üzere, *A. gonensis* G2^T GI'sının K_m değerinin birçok mikroorganizmanın K_m değerine göre düşük olduğu belirlendi.

Tablo 6. Çeşitli mikroorganizmaların glukoz için K_m değerleri

Mikroorganizma	K_m (mM)	Kaynaklar
<i>A. gonensis</i> G2 ^T	15,24	-
<i>Streptomyces flavogriseus</i>	0.24	Chen ve Anderson, 1979b
<i>Streptomyces albus</i>	86	Sanchez ve Smiley, 1975
<i>Arthrobacter</i> sp.	86	Smith ve ark., 1991
<i>Bacillus coagulans</i>	90	Danno, 1970
<i>Thermoanaerobacterium saccharolyticum</i>	120	Liu ve ark., 1996
<i>Clostridium thermosulfurogenes</i>	130	Lee ve ark, 1990a
<i>Bacillus</i> sp.	142	Chauthaiwale ve Rao, 1994
<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	250	Suckane ve ark., 1978
<i>Actinoplanes missouriensis</i>	290	Jenkins ve ark., 1992
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	298	Kawai ve ark., 1994
<i>Streptomyces</i> sp.	400	Inyang ve ark., 1995
<i>Lactobacillus brevis</i>	920	Yamanaka, 1975

GI'nın optimum sıcaklığı, genel olarak çeşitli organizmalarda 60°C ile 80°C arasında değişiklik göstermektedir (Bhosale ve ark., 1996). *A. gonensis* G2^T GI'sı optimum 85°C'de aktivite gösterdiği bulunmuştur. Benzer şekilde *Streptomyces* sp. (Inyang ve ark., 1995) ve *Bacillus* sp. (Chauthaiwale ve ark., 1994) türlerine ait GI'in optimum çalışma sıcaklıklarının da 85°C olduğu gösterilmiştir. *Thermotoga neapolitana* GI'sının ise optimum 95°C'de çalıştığı gösterilmiştir (Hess ve ark., 1998). Bu GI'lar haricindeki diğer GI'lar genel olarak optimum 60°C ile 80°C arasında aktivite

göstermektedirler. Bu verilere dayanılarak , 85°C'lik optimum çalışma sıcaklığı ile *A. gonensis* G2^T GI'sının oldukça termofilik bir enzim olduğu söylenebilir. *A. gonensis* G2^T GI'sının, bakterinin optimum büyüme sıcaklığı olan 55°C'de %10'luk bir aktivite göstermesi oldukça ilginçtir.

Thermoanaerobacterium sp.(Liu ve ark., 1996), *Actinoplanes missouriensis* (Van Tillbeurgh ve ark., 1992), *Lactobacillus brevis* (Yamanaka, 1975) ve *Thermus aquaticus* (Lehmbacher, 1990a) GI'ları haricindeki diğer GI'ların optimum pH değeri 6,5'ten yukarıdır. *A. gonensis* G2^T GI'sının optimum pH değeri 6,5 olarak bulunmuştur. Bu özelliği ile enzim özellikle endüstriyel olarak arzu edilen asidik pH değerlerine, birçok mikroorganizmanın GI'sına göre, daha yakındır.

A. gonensis G2^T GI'sının pH ve ısı kararlılığına bakıldığında enzimin oldukça kararlı bir yapıya sahip olduğu görülmektedir. +4 °C'de 300 saat bekletilen enzimin aktivitesinde bir azalma olmadığı gözlenmiştir. Özellikle enzimin saklanma koşullarının belirlenmesi açısından bu oldukça önemli bir özelliktir. 85°C'de enzimin yarım saat içerisinde aktivitesini % 50 oranında kaybettiği görülmektedir. Ayrıca Co⁺², Mn⁺² ve Mg⁺² bivalent metal iyonlarının enzimin ısı kararlılığına etkisi araştırılmıştır. Co⁺²'nin molekülün ısı kararlılığını oldukça arttırdığı, Mg⁺²'nin ise ısı kararlılığına az miktarda etki ettiği gösterilmiştir. Mn⁺²'nin, molekülün ısı kararlılığını azalttığı tespit edilmiştir. Bu durum bivalent katyon iyonlarının molekülün kararlı haldeki üç boyutlu yapısını oluşturmada rol oynadığını göstermektedir.

Co⁺², Mn⁺² ve Mg⁺² bivalent katyonlarının, GI için birer aktivatör oldukları bilinmektedir. Hiçbir metal iyonu içermeyen reaksiyonlarda GI aktivitesine rastlanılmamıştır. Bu durumdan, GI aktivitesi için, en az bir bivalent metal iyonunun gerekli olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır. *A. gonensis* G2^T GI'sı en iyi şekilde Co⁺² varlığında çalıştığı belirlenmiştir. Benzer olarak *Bacillus coagulans* (Danno, 1970; Danno, 1971), *Bacillus* sp. (Kwon, 1987; Chauthaiwale ve ark., 1994), *Thermus aquaticus* (Lehmbacher ve ark., 1990b), *Streptomyces violaceoruber* GI'ları Co⁺² ile yüksek seviyede aktive oldukları gösterilmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda, *A. gonensis* G2^T GI'na , Co⁺², Mn⁺² ve Mg⁺² bivalent katyonlarının etkisi, Vieille (2001) ve arkadaşlarının *Bacillus licheniformis* GI'sında yapmış olduğu incelemelerde çıkan sonuçlarla hemen aynıdır.

Cd⁺², Ca⁺², Sn⁺², Hg⁺², Ni⁺², Zn⁺², Fe⁺² ve Cu⁺² bivalent metal iyonlarının, *A. gonensis* G2^T GI aktivitesi üzerinde inhibitör etkisi gösterdiği belirlenmiştir. Benzer

olarak; Ca^{+2} 'nin inhibitör etkisi *Thermus aquaticus* (Lehmbacher ve ark., 1990a) ve *Arthrobacter* sp. (Rangarajan ve ark., 1992a; Smith ve ark., 1991) GI'larında, Sn^{+2} 'nin inhibitör etkisi *Geobacillus stearothermophilus* (Suekane ve ark., 1978) GI'sında, Hg^{+2} 'nin inhibitör etkisi *Streptomyces flavogriseus* (Chen ve ark., 1979b) GI'sında, Fe^{+2} ve Ni^{+2} 'nin inhibitör etkisi *Thermus aquaticus* (Lehmbacher ve ark., 1990a) GI'sında, Zn^{+2} 'nin inhibitör etkisi *Bacillus* sp. (Kwon ve ark., 1987) GI'sında ve Cu^{+2} 'nin inhibitör etkisi *Streptomyces olivochromogenes* (Suekane ve ark., 1978) GI'sında gösterilmiştir. Sn^{+2} bivalent metal iyonunun düşük konsantrasyonlarda GI'üzerine zayıf bir şekilde aktivatör rolü oynadığı tespit edilmiştir.

Yapılan incelemeler sonucunda *A. gonensis* G2^T GI'sının alt birimlerinin moleküler ağırlığı 43.000 olarak hesaplandı.

Glukoz izomeraz kullanımı oldukça pahalıdır. Çünkü bu enzim hücre içi bir enzimdir ve glukozla ilgisinin düşük olması sebebiyle (yüksek K_m), reaksiyonlarda çok yüksek miktarlarda enzim kullanımına ihtiyaç vardır. HFCS üretiminde mezofilik organizmalardan elde edilen glukoz izomeraz, immobilize edilmiş bir şekilde 55-65°C'de pH 7,5 ile 8,5 aralığında kullanılmaktadır (Schenck, 2000). Bu şartlar altında enzim ile %40-42 oranında fruktoz üretilabilmektedir. Fakat endüstriyel uygulamalarda kullanılan HFCS'de % 55 fruktoz içeriği aranmaktadır. Dolayısı ile bu oran kromatografik olarak %55 seviyelerine getirilir. Fakat bu işlem üretim maliyetini arttırmaktadır (Douglas ve Jay, 1999). Sıcaklığın artmasıyla fruktoz-glukoz dengesi fruktoz tarafına kaymakta böylece pahalı olan kromatografik saflaştırmaya gerek kalmamaktadır (Tewari ve Goldberg, 1984). Bu yüzden bu uygulamalarda yüksek sıcaklıklarda çalışan termofilik mikroorganizmalardan elde edilen enzimler tercih edilmektedir (Hartley ve ark., 2000). Fakat yüksek pH değerlerinde yüksek sıcaklık uygulamaları, istenmeyen mannoz, psikoz ve diğer asidik yan ürünlerin oluşumuna sebep verdiği için düşük pH değerlerinde çalışan bir enzime ihtiyaç bulunmaktadır (Bucke, 1983). Bu ihtiyaçlardan dolayı bugüne kadar birçok termofilik ve asidik karakterli bakterilerin glukoz izomerazı araştırılmıştır (Bhosale ve ark., 1996). Termofilik bir bakteri olan *A. gonensis* G2^T GI'sı üzerinde yapılan bu çalışmada enzimin endüstriyel uygulamalarda arzu edilen; glukoz için düşük K_m değerine sahip olma, düşük pH değerlerinde ve yüksek sıcaklıklarda yüksek aktivite ile çalışabilme ve yüksek ısıl ve pH kararlılığı gibi biyokimyasal özelliklere sahip olduğu tespit edildi. Bu özellikler göz önüne alındığında, *A. gonensis* G2^T GI'sının endüstriyel kullanım için ideal bir enzim olduğu sonucu açığa çıkmaktadır.

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada *A. gonensis* G2^T ye ait GI geninin bir parçası klonlandı ve bu genin kodladığı GI'nin optimum pH, optimum sıcaklık, pH ve ısıl kararlılığı, inhibitör ve aktivatörleri ve kinetik parametreleri gibi biyokimyasal özellikleri araştırıldı.

Bakterinin GI genine ve bu genin kodladığı GI sahip olduğu petri ve aktivite deneyleri ile gösterildi. Bakterinin oldukça yüksek glukoz izomeraz aktivitesi sergilediği saptandı.

Bakterinin GI genine ait 530 baz çiftlik DNA parçası tasarlanan dejenere primerler yardımıyla çoğaltıldı ve p-GEMT Easy klonlama vektörüne klonlanarak baz dizilimi belirlendi. Yakalanan parçadan tasarlanan primerler kullanılarak ters PCR reaksiyonu ile 400 ve 500 baz çiftlik parçalar elde edildi. Elde edilen parçalar p-GEMT Easy klonlama vektörüne klonlandı.

A. gonensis G2^T hücre özütü kullanılarak yapılan incelemelerde, GI'nin optimum pH değerinin 6,5, optimum çalışma sıcaklığının ise 85°C olduğu tespit edildi. Enzimin substratı olarak glukoz ile ilgili kinetik parametreleri incelendi ve bu substrat için K_m değeri 15,24 mM ve V_{max} değeri 0,04807 μ M/dak olarak belirlendi. Enzimin 0 ve 30°C'deki ısıl kararlılığının oldukça yüksek olduğu, 85°C'de ise yarım saat sonunda aktivitenin yarıya düştüğü tespit edildi. Ayrıca değişik pH'larda beklenen GI'nin pH kararlılığının oldukça yüksek olduğu belirlendi.

Co⁺², Mn⁺² ve Mg⁺² bivalent katyonlarının en az birinin GI aktivitesi için gerekli olduğu ve en yüksek aktivatör etkisinin Co⁺² bivalent katyonu ile gerçekleştiği belirlendi. Co⁺²'nin GI üzerinde aktivatör etkisinin yanı sıra molekülün ısıl kararlılığını da arttırdığı tespit edildi. Cd⁺², Ca⁺², Sn⁺², Hg⁺², Ni⁺², Zn⁺², Fe⁺² ve Cu⁺² bivalent metal iyonlarının GI aktivitesini inhibe ettiği belirlendi.

A. gonensis G2^T GI bulunduğu hücre özütü saflaştırıldı ve sahip olduğu alt ünitelerin moleküler ağırlıkları 43.000 dalton olarak hesaplandı

6.ÖNERİLER

Bu çalışmada *A. gonensis* G2^T Gİ'sinin biyokimyasal özellikleri ve kinetik parametreleri hücre özütünde incelenmiştir. Biyokimyasal özelliklerin daha hassas bir şekilde ortaya koyulabilmesi için enzimi kodlayan genin tamamının bir ekspresyon vektörüne klonlanarak uygun bir konak içerisinde aşırı derecede üretilmesi ve üretilen enzimin saflaştırılması gerekmektedir. Bu şekilde saflaştırılan enzimle yapılan biyokimyasal ve kinetik incelemeler daha kesin sonuçlar verecektir. Ayrıca bu çalışmada hücre özütünde çalışılmasından dolayı detaylı bir şekilde incelenmemiş olan aktivatör ve inhibitörlerin etkisinin; zaman, konsantrasyon, sıcaklık ve pH gibi parametrelerle ilişkili olarak, saf enzim ile detaylı olarak incelenmesin gerekli olduğu görüşündeyiz.

Enzim endüstriyel açıdan arzu edilen; yüksek optimum sıcaklık, düşük pH, glukoz için düşük K_m değeri gibi özellikler taşımaktadır. Enzimi kodlayan gen üzerinde çeşitli mutasyonlar gerçekleştirmek suretiyle; bu biyokimyasal özelliklerinin daha geliştirilmesi ve endüstriyel uygulamalarda daha kullanışlı ve arzu edilen bir enzimin oluşturulmasına gereksinim bulunmaktadır.

Glukoz izomeraz kullanımı oldukça pahalıdır. Çünkü bu enzim hücre içi bir enzimdir ve glukozla ilgisinin düşük olması sebebiyle (yüksek K_m), reaksiyonlarda çok yüksek miktarlarda enzim kullanımına ihtiyaç vardır. Glukoz izomeraz üretiminin maliyetini azaltma yollarından birisi de, enzimi kullanımdan sonra yeniden kullanılmaya uygun hale getirip, tekrar tekrar kullanmaktır. Bu amaç doğrultusunda özellikleri iyice belirlendikten ve geliştirildikten sonra enzimin immobilize edilmesi gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

- Albery, W. J. and J. R. Knowles. 1976. Free Energy Profile of The Reaction Catalyzed By Triose Phosphate Isomerase. *Biochemistry* 15:5627–5631.
- Amore, R., M. Wilhelm, and C. P. Hollenberg. 1989. The Fermentation of Xylose—An Analysis of The Expression of *Bacillus* and *Actinoplanes* Xylose Isomerase Genes in Yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30, 351–357.
- Amore, R., M. Wilhelm. and C. P. Hollenberg., 1989. The Fermentation of Xylose—An Analysis of The Expression of *Bacillus* and *Actinoplanes* Xylose Isomerase Genes in Yeast, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 30, 351–357.
- Anheuser-Busch Inc. April 1974. Method of Making Glucose Isomerase and Using Same to Convert Glucose to Fructose, U.K. Patent, 1, 399, 408.
- Anon 1979. New Applications Expand Hfcs Markets Increase Demand and Tighten Supplies. *Food Product Development*. 13, 12, 38.
- Anon. 1993. Multifunctional Sweeteners. *Baking and Snack*. 15, 4, 31–34.
- Armbruster, F. C., Heady, R. E. and Cory, R. P. (Cpc International Inc.), March 1973. Xylose (Glucose)-Isomerase Enzyme Compositions. *Ger. Offen*, 2, 245, 402.
- Barker, S. A., Somers, P. J. and Hatt B. W. (Boehringer Mannheim GmbH), 1973. Fructose, *U.S. Patent*, 3, 875, 140.
- Barker, S. A., 1976. Pure Fructose Syrups., *Process Biochem.* 11, 20–25.
- Barker, S. A., Pelmore, H. and Somers, P. J., 1983. Effect of Oxyanions on The *D*-Glucose Isomerase Catalyzed Equilibrium. 2. Effect of Germanate on The Equilibrium of *D*-Glucose and *D*-Fructose with Immobilized *D*-Glucose Isomerase, *Enzyme Microb. Technol.*, 5, 121–124.
- Bartfay, J. 1960. Glucose Isomerase in Barley Malt, *Nature (London)*, 185, 924.
- Batt, C. A., Bodis, M. S., Picataggio, S. K., Claps, M. C., Jamas, S. and A. J. Sinskey. 1985. Analysis of Xylose Operon Regulation By Mud (Apr, Lac) Fusion: Trans Effect of Plasmid Coded Xylose Operon, *Can. J. Microbiol.* 31, 930–933.
- Batt, C. A., O'Neill, E., Novak, S. R., Ko, J. and Sinskey, A., 1986. Hyperexpression of *Escherichia Coli* Xylose Isomerase, *Biotechnol. Prog.*, 2, 140–144.
- Beck, C. F., and Warren. R. A. J., 1988. Divergent Promoters, a Common Form of Gene Organization, *Microbiol. Rev.*, 52, 318–326.
- Bejar, S., Belghith, K., Gargouri, R. and R. Ellouz., 1994. Construction of a New Strain of *Streptomyces violaceoniger*, Having Strong, Constitutive and Stable Glucose Isomerase Activity, *Biotechnol. Lett.* 16, 1259–1264.

- Belduz, A. O., Dulger, S., Demirbag, Z. 2003. *Anoxybacillus gonensis* sp. nov., a Moderately Thermophilic, Xylose-Utilizing, Endospore-Forming Bacterium. Int J Syst Evol Microbiol. 53(Pt 5):1315-20.
- Belfaqui, N. and Penninck M. J., 2000. a Bifunctional B-Xylosidase-Xylose Isomerase from *Streptomyces* Sp. Ec 10. Enzyme and Microbial Tech. 27, 114–121
- Bengston, B. L., and Lamm. W. R., 1973. Procède Du Isomerisation Du Glucose Et Du Fructose, French Patent, 2, 172, 882.
- Bhosale, S. H., Rao, M. B. and Deshpande, V. V., 1996. Molecular and Industrial Aspects of Glucose Isomerase, Microbiol. Rev., 60, 280-300.
- Blacklow, S. C., Raines, R. T., Lim, W. A., Zamore, P. D. and Knowles, J. R., 1988. Triosephosphate Isomerase Catalysis is Diffusion Controlled, Biochemistry, 27, 1158–1167.
- Boguslawski, G., and Rynski, M. J., 1982. Novel Strain of *Bacillus licheniformis* Useful in Production of Glucose Isomerase and Method of Screening *Bacillus* Mutants for The Ability to Produce Glucose Isomerase in The Absence of Xylose, U.S. Patent, 4, 355, 103.
- Bok, S. K., Seidman, W. and Wopat, P. W., 1984. Selective Isolation of Acidophilic *Streptomyces* Strains for Glucose Isomerase, Appl. Environ. Microbiol, 47, 1213–1215.
- Bradford, M.M., 1976. Rapid and Sensitive Method for The Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilising The Principle of Protein Dye Binding, Anal. Biochem., 72, 248-254
- Briggs, K. A., Lancashire W. E. and Hartley, B. S., 1984. Molecular Cloning, DNA Structure and Expression of The *Escherichia Coli* D-Xylose Isomerase. EMBO J., 3, 611–616.
- Bucke, C., 1981. Industrial Glucose Isomerase, P. 147–171. In A. Wiseman (Ed.). topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology, Vol. 1. Industrial Glucose Isomerase, Ellis Horwood, Chichester, United Kingdom.
- Bucke, C. 1983. Glucose Transforming Enzymes, P. 93–127. In W. Fogarty (Ed.), Microbial Enzymes and Biotechnology, Applied Science Publishers, London.
- Callens, M., Kersters-Hilderson, H.; Van Opstal, O. and Debruyne C. K., 1986. Catalytic Properties of D-Xylose Isomerase from *Streptomyces Violaceoruber*, Enzyme Microb. Technol., 8, 696–700.

- Callens, M., Kersters-Hilderson, H.; Vangrysperre, W. and Debruyne, C. K., 1988a. *D*-Xylose Isomerase from *Streptomyces Violaceoruber*: Structural and Catalytic Roles of Bivalent Metal Ions, Enzyme Microb. Technol., 10:695–700.
- Callens, M., tomme, P., Kersters-Hilderson, H., Cornelis, R., Vangrysperre, W., and Debruyne, C. K., 1988b. Metal Ion Binding to *D*-Xylose Isomerase from *Streptomyces Violaceoniger*, Biochem. J. 250, 285–290.
- Carell, H. L., Rubin, B. H., Hurley, T. J. and Glusker, J. P., 1984. X-Ray Crystal Structure of *D*-Xylose Isomerase At 4 Å Resolution, J. Biol. Chem. 259, 3230–3236.
- Carell, H. L., Glusker, J. P., Burger, V., Manfre, F., Tritsch, D. and Biellman, J. F., 1989. X-Ray Analysis of *D*-Xylose Isomerase At 1.9 Å: Native Enzyme in Complex with Substrate and with a Mechanism-Designed Inactivator, Proc. Natl. Acad. Sci., 86, 4440–4444.
- Carell, H. L., Hoeir, H. and Glusker, J. P., 1994. Modes of Binding Substrates and Their Analogues to The Enzyme *D*-Xylose Isomerase, Acta Crystallogr., Sect. D, 50, 113–123.
- Chaing, L. C., Gong, C. S., Chen, L. F. and Tsao, G. T., 1981a. *D*-Xylulose Fermentation to Ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*, Appl. Environ. Microbiol., 42, 284–289.
- Chaing, L. C., Hsiao, H. Y., Ueng, P. P., Chen, L. F. and Tsao, G. T., 1981b. Ethanol Production from Xylose By Enzymic Isomerisation and Yeast Fermentation, Biotechnol. Bioeng. Symp., 11, 263–274.
- Chan, E., Ueng, P. P. and Chen, L. F., 1989. Metabolism of *D*-Xylose in *Schizosaccharomyces pombe* Cloned with a Xylose-Isomerase Gene, Appl. Microbiol. Biotechnol., 31, 524–528.
- Chauthaiwale, J. V., and Rao, M. B., 1994. Production and Purification of Extracellular *D*-Xylose Isomerase from an Alkaliphilic, Thermophilic *Bacillus* sp, Appl. Environ. Microbiol., 60, 4495–4499.
- Chen, W. P., Anderson, A. W. and Han, Y. W., 1979a. Production of Glucose Isomerase by *Streptomyces flavogriseus*. Appl. Environ. Microbiol., 37, 324–331.
- Chen, W.P. and Anderson, A.W., 1979b. Purification, Immobilization, and Some Properties of Glucose Isomerase from *Streptomyces flavogriseus*, Appl. Environ. Microbiol., 38, 1111–1119.
- Chen, W. P., 1980a. Glucose Isomerase, Process Biochem., 15, 30–35.
- Chen, W. P., 1980b. Glucose Isomerase, Process Biochem., 15, 36–41.
- Cra. 1994. Corn Refining, The Process, The Products. Corn Refiners Association Inc.

- Dahl, M. K., Degenkolb, J. and Hilen, W., 1994. Transcription of The Xyl Operon is Controlled in *Bacillus subtilis* by Tandem Overlapping Operators Spaced by Four Base Pairs, J. Mol. Biol., 243, 413–424.
- Danno, G., 1970. Studies on The *D*-Glucose-Isomerizing Enzyme from *Bacillus coagulans*, Strain Hn-68. Part V. Comparative Study on The Three Activities of *D*-Glucose, *D*-Xylose and *D*-Ribose Isomerization of The Crystalline Enzyme, Agric. Biol. Chem., 34, 1805–1814.
- Danno, G. 1971. Studies on *D*-Glucose Isomerizing Enzyme from *Bacillus coagulans*, Strain Hn-68. VI. The Role of Metal Ions on The Isomerization of *D*-Glucose and *D*-Xylose by The Enzyme, Agric. Biol. Chem., 35, 997–1006.
- deRaadt, A., Ebner, M., Ekhart, C. W., Fechter, M., Lechner, A., Strobl, M. and Stutz, A. E., 1994. Glucose Isomerase (Ec 5.3.1.5) as a Reagent in Carbohydrate Synthesis: Success and Failures with The Isomerisation of Nonnatural Derivatives of *D*-Glucose Into The Corresponding 2-Ketoses, Catalysis today., 22, 549–561.
- Dische, Z. and Borenfreund, E., 1951. A New Spectrophotometric Method for The Detection and Determination of Ketosugars and Trioses., J. Biol. Chem., 192, 583–587.
- Douglas, C. W., Jay, K .S. 1999. Commodity Scale Production of Sugars from Starches, Current Opinion in Microbiology. 2:252–256.
- Drazic, M., Golubic, Z. and Czimek, S., 1980. Isomerization of Glucose to Fructose Using Microbial Enzymes, Period. Biol., 82, 481–484.
- Drocourt, D., Bejar, S., Calmels, T., Reynes, J. P. and Tiraby, G., 1988. Nucleotide Sequence of The Xylose Isomerase Gene from *Streptomyces violaceoniger*, Nucleic Acids Res., 16, 337.
- duPreez, J. C., and Vanderwalt, J. P., 1983. Fermentation of *D*-Xylose to Ethanol By a Strain of *Candida Shehatae*, Biotechnol. Lett., 5, 357–362.
- duPreez, J. C. and Prior, B. A., 1985. A Quantitative Screening of Some Xylose Ermenting Yeast Isolates, Biotechnol. Lett., 7, 241–246.
- duPreez, J. C., Bosch, M. and Prior, B. A., 1986. Xylose Fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: Effects of Ph, Temperature and Substrate Concentration, Enzyme Microb. Technol., 8, 360–364.
- duPreez, J. C., Bosch, M. and Prior, B. A., 1987. Temperature Profiles of Growth and Ethanol Tolerance of The Xylose Fermenting Yeasts *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 25, 521–525.
- Dworschack, R. G., Chen, J. C., Lamm, W. R. and Davis, L. G., 1972. Microbiologically Producing Glucose Isomerase, U.K. Patent 1,284,218.

- Gaikwad, S. M., More, M. W., Vartak, H. G. and Deshpande, V. V., 1988. Evidence for The Essential Histidine Residue At The Active Site of Glucose/ Xylose Isomerase from *Streptomyces*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 155, 270–277.
- Gaikwad, S. M., and Deshpande, V. V., 1992a. Immobilization of Glucose Isomerase on Indion 48-R, Enzyme Microb. Technol., 14, 855–858.
- Gaikwad, S. M., Rao, M. B. and Deshpande, V. V., 1992b. D-Glucose/Xylose Isomerase from *Streptomyces*. Differential Roles of Magnesium and Cobalt Ions, Enzyme Microb. Technol., 4, 317–320.
- Gaikwad, S. M., Rao, M. and V. Deshpande, 1992c. Structure-Function Relationship of Glucose/Xylose Isomerase from *Streptomyces*: Evidence for The Occurrence of Inactive Dimer, Enzyme Microb. Technol., 15, 155–157.
- Ghatge, M. S., and Deshpande, V. V., 1993. Evidence for Specific Interaction of Guanidine Hydrochloride with Carboxy Groups of Enzymes/Proteins, Biochem. Biophys. Res. Commun., 193, 979–984.
- Gong, C. S., Chen, L. F., Flickinger, M. C., Chiang, L. C. and Tsao, G. T., 1981. Production of Ethanol from D-Xylose by Using D-Xylose Isomerase and Yeasts, Appl. Environ. Microbiol., 41, 430–446.
- Hafner, E. W. November 1985a. Constitutive Mutant of a Thermostable Glucose Isomerase, U.S. Patent 4, 551, 430.
- Hafner, E. W., and Jackson, D. M., 1985b. Constitutive Glucose Isomerase Producer. U.S. Patent 4, 532, 208.
- Hartley, B. S., Hanlon, N., Jackson, R. J., Rangarajan, M., 2000. Glucose Isomerase: Insights into Protein Engineering for Increased Thermostability. Biochim Biophys Acta, 1543, 294-335.
- Hebeda, R.E. 1987. Corn Sweeteners. In: Watson, S.A. and Ramstad, P.E. (Eds) "Corn Chemistry and Technology". Aacc, Inc. St. Paul, Mn. 501-534.
- Henry, E. R. 1976. High Fructose Corn Syrup: New Sweetener for The Baker, Baker's Digest, 50, 2, 25.
- Hess, J.M., Tchernajenko, V., Vieille, C., Zeikus, J.G., and Kelly, R.M., 1998. *Thermotoga neapolitana* Homotetrameric Xylose Isomerase is Expressed as Catalytically Active and Thermostable Dimer in *Escherichia coli*, Appl. Environ. Microbiol., 64, 2357-2360
- Hobbs, L. 1986. Corn Syrups. Cereal Foods World, 31, 12, 852, 854, 856, 858.

- Hodgson, J. 1994. The Changing Bulk Biocatalyst Market: Recombinant DNA Techniques Have Changed Bulk Enzyme Production Dramatically, Bio/Technology, 12, 789–790.
- Howling, D. 1992. Glucose Syrup: Production, Properties and Applications. In: Schenck, F.W. and R.E. Hebeda (Eds), "Starch Hydrolysis Products", VCH Publ. Inc. New York, 277-316.
- Inglott, G.E. 1974. Sweeteners. The Avi Publ. Co., Westport, Connecticut.
- Inyang, C.U., Gebhart, U., Obi, S.K.C., and Bisswanger, H., 1995. Isolation and Characterization of A *D*-Glucose/Xylose Isomerase from A New Thermophilic Strain *Streptomyces* sp. (Plc) Appl. Microbiol. Biotechnol., 43, 632-638.
- Iizuka, H., Ayukawa, Y., Suekane, S. and Kano, M., (Cpc International). 1971. Production of Extracellular Glucose Isomerase by *Streptomyces*. U.S. Patent 3, 622, 463.
- Jenkins, J., Janin, J., Rey, F., Chiadmi, M., Van Tilbeurgh, H., Lasters, I., De Maeyer, M., Van Belle, D., Wodak, S.J., Lauwereys, M., Stanssens, P., Mrabet, N.T., Snauwaert, J., Matthysens, G. and Lambeir, A.M., 1992. Protein Engineering of Xylose (Glucose) Isomerase from *Actinoplanes missouriensis*. 1. Crystallography and Site-Directed Mutagenesis of Metal Binding Sites, Biochemistry, 31, 5449-5458
- Johnson, J.M., Harris, C.H., and Barbeau, W.E. 1989. Effects of HFCS Replacement for Sucrose on Browning, Starch Gelatinization and Sensory Characteristics of Cakes, Cereal Chem., 66, 3, 155 - 157.
- Kasumi, T., Hayashi, K., and Tsumura, N., 1982. Role of Cobalt in Stabilizing The Molecular Structure of Glucose Isomerase from *Streptomyces griseofuscus* S-41, Agric. Biol. Chem., 46, 21–30.
- Kawai, Y., Konishi, H., Horitsu, H., Sakurai, H., Takamizawa, K., Suzuki, T. and Kawai, K., 1994. Purification and Characterization of *D*-Xylose Isomerase from *Bifidobacterium adolescentis*, Biosci. Biotechnol. Biochem., 58, 691-694 Cv
- Keleti, T., Leocini, R., Pagani, R. and Marinello, E., 1987. A Kinetic Method for Distinguishing Whether an Enzyme Has One or Two Active Sites for Two Different Substrates: Rat Liver *L*-Threonine Dehydratase Has A Single Active Site for Threonine and Serine, Eur. J. Biochem., 170, 179–183.
- Kulp, K., Lorenz, J.K. and Stone, M. 1991. Functionality of Carbohydrate Ingredients in Bakery Products, Food Technology, 45, 3, 136, 138-140, 142.

- Kwon, H.J., Kitada, M., and Horikoshi, K., 1987. Purification and Properties of The *D*-Xylose Isomerase from Alkalophilic *Bacillus* No. Kx-6, Agric. Biol. Chem., 51, 1983-1989.
- Lee, C. K. October 1976. Preparation and Use of Glucose Isomerase, U.S. Patent 4, 061, 539.
- Lee, C., Bagdasarian, M., Meng, M. and Zeikus, J. G., 1990a. Catalytic Mechanism Xylose (Glucose) Isomerase from *Clostridium thermosulfurogenes*, J. Biol. Chem., 265, 19082-19090.
- Lee, C., Bhatnagar, L., Saha, B.C., Lee, Y., Takagi, M., Imanaka, T., Bagdasarian, M. and Zeikus, J. G., 1990b. Cloning and Expression of The *Clostridium thermosulfurogenes* Glucose Isomerase Gene in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, American Society for Microbiology, 56, 2638-2643
- Lehmbacher, A., and Bisswanger, H., 1990a. Isolation and Characterization of an Extremely Thermostable *D*-Xylose Isomerase from *Thermus aquaticus* HB8, J. Gen. Microbiol., 136, 679-686.
- Lehmbacher, A., and Bisswanger, H., 1990b. Comparative Kinetics of *D*-Xylose and *D*-Glucose Isomerase Activities of The *D*-Xylose Isomerase from *Thermus aquaticus* HB8, Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 371, 527-536.
- Ligthelm, M. E., Prior, B. A. and Dupreez, J. C., 1988. The Oxygen Requirements of Yeasts for The Fermentation of *D*-Xylose and *D*-Glucose to Ethanol, Appl. Microbiol. Biotechnol., 28, 63-68.
- Lineweaver, H., and Burk, D., 1934. The Determination of Enzyme Dissociation Constant, Journal of American Chemical Society, 56, 658-661.
- Liu, S.Y., Wiegel, J. and Gherardine, F.C., 1996. Purification and Cloning of A Thermostable Xylose (Glucose) Isomerase with an Acidic pH Optimum from *Thermoanaerobacterium* strain JW/SL-YS 489, J. Bacteriol., 178, 5938-5945
- Maldy, S. R., 1990. Experimental Techniques in Bacterial Genetics: Jones & Bartlet Pub. University of Illinois, Urbana, U.S.A.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J., 1982. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor, Newyork.
- Manohar, R. S. and Rao, P.H. 1997. Effects of Sugars on The Rheological Characteristics of Biscuit Dough and Quality of Biscuits, Journal of The Science of Food and Agriculture, 75, 383-390.
- Miles Laboratories Inc., 1972. Production of Glucose Isomerase, U.K. Patent 1, 376, 787, 123.

- Nabors, L. O. and Gelardi, C. R., 1991. Alternative Sweeteners, 2nd Ed. Marcel Dekker, Inc., N.Y.
- Outtrup, H., 1974. New Glucose Isomerase by Fermentation, German Patent Application, 2,400,323.
- Pomeranz, Y. 1985. Functional Properties of Foods, Academic Press Inc., Orlando, Florida, 536 S.
- Pubols, M. H., Zahnley, J. C. and Axelrod, B., 1963. Partial Purification and Properties of Xylose and Ribose Isomerase in Higher Plants, Plant Physiol., 38, 457–461.
- Rangarajan, M., Asboth, B. and Hartley, B. S., 1992a. Stability of *Arthrobacter D*-Xylose Isomerase to Denaturants and Heat, Biochem. J., 285: 889–898.
- Rangarajan, M. and Hartley, B.S., 1992b. Mechanism of *D*-Fructose Isomerization by *Arthrobacter D*-Xylose Isomerase, Biochem. J., 283, 223–233.
- Reeder, C. F., 1978. Light Foods Appease Weight Conscious Americans, Food Product Development., 12, 3, 35–36, 40.
- Reynolds, J. H., 1973. Precipitated Nylon as an Enzyme Support: A-Galactosidase Reactor, P. 63–70. In A. C. Olsen and C. L. Cooney (Ed.), Immobilised Enzymes in Food and Microbial Processes, Plenum Press, New York.
- Rose, I. A., O'connell, E. L. and Mortlock, R. P., 1969. Stereochemical Evidence for A *cis*-Eenediol Intermediate in Mn-Dependent Aldose Isomerases, Biochim. Biophys. Acta., 178, 376.
- Sanchez, S. and Smiley, K.L., 1975. Properties of *D*-Xylose Isomerase from *Streptomyces albus*, Appl. Microbiol., 29, 745–750
- Schenck, F. W., 2000. High Fructose Corn Syrups- A Review . Int. Sugar J., 102, 285–288
- Schneider, H., Wang, P. Y. and Johnson, B. F., 1981. Current Developments in Yeast Research, P. 81–85. Pergamon Press, Toronto.
- Shieh, K. K., 1977. Media Containing Molasses and Soy Flour for Producing Glucose Isomerase and Method, U.S. Patent 4, 003, 793.
- Slininger, P. J., Bothast, R. J., Okos, M. R. and Ladisch, M. R., 1985. Comparative Evaluation of Ethanol Production by Xylose Fermenting Yeasts Presented High Xylose Concentrations, Biotechnol. Lett. 7, 431–436.
- Smith, C. A., Rangarajan, M. and Hartley, B. S., 1991. *D*-Xylose (*D*-Glucose) Isomerase from *Arthrobacter* strain NRRL B3728, Biochem. J., 277, 255–261.

- Srinivasan, M. C., Vartak, H. G., Powar, V. K. and Khire, J. M., 1983. High Activity Extracellular Glucose/(Xylose) Isomerase from *A. Chainia* Species, Biotechnol. Lett., 5, 611–614.
- Suckane, M., Tamura, M. and Tomimura, C. H., 1978. Physico-Chemical and Enzymatic Properties of Purified Glucose Isomerases from *Streptomyces olivochromogenes* and *Bacillus stearothermophilus*, Agric. Biol. Chem., 42, 909-917.
- Suckane, M. and Iizuka, H., 1982. Production of Glucose Isomerase by Genus *Streptomyces*, Z. Allg. Mikrobiol., 22, 577.
- Takasaki, Y. and Tanabe, O., 1966. Studies on Sugar Isomerisation Enzyme. Production and Utilization of Glucose Isomerase from *Streptomyces* spp, Agric. Biol. Chem., 30, 1247–1253.
- Tewari, Y.B., Goldberg, R.N., 1984. Thermodynamics of The Consersion of Aqueous Glucose to Fructose., J Solut Chem, 13, 523-547.
- Tomoyeda, M. and Horitsu, H., 1964. Pentose Metabolism by *Candida utilis*. I. Xylose Isomerase, Agric. Biol. Chem., 28, 139–143.
- Vaheri, M. and Kauppinen, V., 1977. Improved Microbial Glucose Isomerase Production, Proc. Biochem., 12, 5–8.
- Van Tillbeurgh, H., Jenkins, J., Chiadmi, M., Janin, J., Wodak, S.J., Mrabet, N.T., and Lambeir, A.M., 1992. Protein Engineering of Xylose (Glucose) Isomerase from *Actinoplanes missouriensis*. 3. Changing Metal Specificity and The Ph Profile by Site-Directed Mutagenesis, Biochemistry, 31, 5467-5471.
- Vandamme, E. J., Delaporte, A., De Vocht, M. and Van Hoe, L., 1981. Production of D(1) Xylose Isomerase by *Streptomyces violaceusruher* Abh. Akad. Wiss. Ddr. Abt., Math. Naturwiss. Technol., P. 193–208.
- Vangrýsperre, W., Callens, M., Kersters-Hilderson, H. and De Bruyne, C. K., 1988. Evidence for an Essential Histidine Residue in *D*-Xylose Isomerases, Biochem. J., 250, 153–160.
- Vartak, H. G., Srinivasan, M. C., Powar, V. K., Rele, M. V. and Khire, J. M., 1984. Characterisation of Extracellular Substrate Specific Glucose and Xylose Isomerases of *Chainia*, Biotechnol. Lett., 6:493–494.
- Vieille C., Epting K. L., Kelly R. M., and J. Zeikus G. 2001. Bivalent Cations and Amino-Acid Composition Contribute to The Thermostability of *Bacillus licheniformis* Xylose Isomerase, Eur. J. Biochem., 268, 6291–6301
- Volkin, D. B. and Klibanov, A. M., 1983. Immobilized Cells as Practical Catalysts, Science, 219, 722–727.

- Volkin, A. M. and Klivanov, A. M., 1989. Mechanism of Thermoinactivation of Immobilized Glucose Isomerase, Biotechnol. Bioeng., 33, 1104–1111.
- Vongsuvanlert, V. and Tani, Y., 1988. Purification and Characterization of Xylose Isomerase of a Methanol Yeast, *Candida boidinii*, Which is Involved in Sorbitol Production from Glucose, Agric. Biol. Chem., 52, 1817–1824.
- Wang, P. Y., Johnson, B. F. and Schneider, H., 1980a. Fermentation of Dxylose by Yeasts Using Glucose Isomerase in The Medium to Convert D-Xylose to D-Xylulose, Biotechnol. Lett., 2, 273–278.
- Wang, P. Y., Shopsis, C. and Scheider, H., 1980b. Fermentation of a Pentose by Yeasts, Biochem. Biophys. Res. Commun., 94, 248–254.
- Weber, P. November 1976. Fructose by Isomerisation of Glucose, U.K. Patent 1, 496, 309.
- Wulff, S.M. and Helgeson, D.L. 1987. Preliminary Economic Feasibility Analysis of HFCS Processing in Us with Emphasis on North Dakota, Agricultural Economics Report, No. 229. Dept. Agric. Econ. Ndsu, Fargo, Nd.
- Yamanaka, K., 1975. D-Xylose Isomerase from *Lactobacillus brevis*, Methods Enzymol., 41b, 466–471.
- Yoshimura, S., Danno, G. and Natake, M., 1966. Studies on D-Glucose Isomerizing Activity of D-Xylose Grown Cells from *Bacillus coagulans* Strain Hn-68. Agric. Biol. Chem., 30, 1015–1023.

8.EKLER

8.1 Bazı Tip 1 GI'ların Baz Dizilimlerinin Clustal W ile Karşılaştırılması

```
Bacillus_megaterium          -----ATGGTCCAAACTAGTACTAATAAAAT 26
Bacillus_subtilis            -----ATGGCTCAATCTCATTCAGTTCAAT 26
Bacillus_stearothermophilus  -----AT 2
Bacillus_halodurans          -----AT 2
Bacillus_licheniformis      -----
Thermotoga_maritima          -----ATGGC 5
Bradyrhizobium_japonicum     -----GTGAACGTGTTCAGC 14
Xanthomonas_axonopodis       -----GTGTGATCGCGCGGAAAGA 20
Bifidobacterium_longum       -----ATGGGTCTGT 10
Pirellula_sp.                TTGACTTGCCCTTTTACCTCGCAGCCACACACGGAATCCGTTTGATGAC 50
```

```
Bacillus_megaterium          TAATCATTTTGAAAGCGCAAAAGTTTATACGAAGGTAAGAT-TCT 75
Bacillus_subtilis            CAACTATTTTGGAGCGCAAAAGTGGTTTACGAAGGGAAAGAT-TCG 75
Bacillus_stearothermophilus  GCCTTATTTTGACAACATCAGCACCCTCGCTATGAAGGACCGCGC-TCT 51
Bacillus_halodurans          GACATTTTTAATGATGTAGAAAAGGTACAATTAATGAAGGACCGAGA-TCT 51
Bacillus_licheniformis      -ATGTTTTTTAGAAATATCGGAATGATTGAGTATGAAGGGCCGAT-TCG 48
Thermotoga_maritima          AGAATTTTCCCAAGAAATCCCAAGAGTTTCAGTTTGAAGGTAAAGAA-AGC 54
Bradyrhizobium_japonicum     CAAATTCCTTCGAGGAAAGCAGCCTGTGCGCTTCGCGCGCAAGATGCCG 64
Xanthomonas_axonopodis       ATATTTCCCGGCATCGGCAAG--ATTCGGTTTTCGAAGGCCCGGAT-TCG 66
Bifidobacterium_longum       GGGAT--GTTGACAAGATCGAGTACGTCGCGCGCG--CCAAAGGACCG 54
Pirellula_sp.                CGCTTTCGCCGATGTTCCCGTC--ATTACGATCGAAGGCCCTCAG-TCC 96
```

```
Bacillus_megaterium          AAAAAATCCTTTAGCTTTTAAATACATAAACCTTGAAGAAGTAGTAGGCGG 125
Bacillus_subtilis            ACTAATCCTTTAGCATTTTAAATATTATAATCCTCAAGAAGTAATCGGCGG 125
Bacillus_stearothermophilus  AAAAAATCCGCTTGCCTTTAAGTTTACAAATCCGGAAGAAAAGTCGGCGA 101
Bacillus_halodurans          ACCAATCCATATGATCATTAAATATTACAACCTCGAGGAGATTGTGCGAGG 101
Bacillus_licheniformis      GAAAAATCCTTACGCATTAAATATTACAACCTCGATGAATTTGTCGGCGG 98
Thermotoga_maritima          ACGAATCCGCTGCGCTTCAGGTTCTAGATCGGAACGAGGTGATCGATGG 104
Bradyrhizobium_japonicum     GACCAGC-GCCCGCTTCCGCTGATACGAAGGACCGCTTCCTGCATCG 113
Xanthomonas_axonopodis       GACAAACCGCTCGCGTTCAAGGTTCTACGAGCGCAACAGACCATTGCGGA 116
Bifidobacterium_longum       AAGGAAGACTTCGCTTCCATTACTAGATGCGGACAGAGTCGTTGCGGG 104
Pirellula_sp.                GACAAATCCGCTTGCCTTCCGCTGATCAACCCCGCAGGATCATCGAAGG 146
```

5- 'GCDTYYAARTWYTAAYCKS-3' (F1)

```
Bacillus_megaterium          TAAAACGATGAAGATCAGCTGCGTTTTCTGTTGCTTACTGGCACCAGT 175
Bacillus_subtilis            AAAAAAGCTGAAAGAGCATTTCGCGATTTTCTATTGCTATTGGCATAAT 175
Bacillus_stearothermophilus  TAAAACAAATGAAGAGCATTTCGCGTTTTCTGTTGCTATTGGCATAAT 151
Bacillus_halodurans          CAAAACAATGGCCGAACACCTTCGCTTTTCCATCGCTATTGGCATAAT 151
Bacillus_licheniformis      CAAAACGATGAAGGAACACCTTCGCTTCGCTGTTGCTATTGGCATAAT 148
Thermotoga_maritima          GAAGCCCTCAAGGATCATCTGAAGTTTTCGCTGCGCTTCTGGCACACT 154
Bradyrhizobium_japonicum     CGCGCGCTCGAGGATCAGCTGCGCTTTCGCGTTCTGCTACTGGCACCT 163
Xanthomonas_axonopodis       CAAGACCATGAAGGATTGGCTGCGCTTCGCGCTTTCGCTGCTGTCACCT 154
Bifidobacterium_longum       CAAGAAGATGAAGGATTGGCTGCGCTTCGCGCTTTCGCTGCTGTCACCT 154
Pirellula_sp.                AAAAAACGATGAAGGACCATGCGGTTGAGCATGCTCTACTGGCACAGT 196
```

```
Bacillus_megaterium          TTACAGCAGATGGGTACGGATCCTTTTGGCGCAGCTACTATGCAAGATCT 225
Bacillus_subtilis            TTACTGCTGATGGTACAGAGCTTTTGGAGCAGCTACGATGCAAGACCA 225
Bacillus_stearothermophilus  TTACAGGAGATGGATCAGATCGGTTTGGGCGTGGCAATATGATCCGTCCA 201
Bacillus_halodurans          TTGTCGGTATGGCTCAGACCCATTTCGTTTGAAGCATGACGCTCCA 201
Bacillus_licheniformis      TTGATCGGACGGGAAGAGCCCTTCGCGCAGGGACGATGTTCCGGGG 198
Thermotoga_maritima          TCGTAACGAGGGAAGAGATCCGTTTGGAGATCCAACCGCTGAACGCCCA 204
Bradyrhizobium_japonicum     TCTGCTGGCGGGCGCGATCCCTTCGCGCGGACAGCTTCTCGGACCC 213
Xanthomonas_axonopodis       TCTGCGGCAATGGCGCGGATCCGTTTCGCGCGGACGCGTGTGATCCG 216
Bifidobacterium_longum       TCAACAGAACTGGTTGATCCCTTCGCGCACCGCACCGCACCGCCG 204
Pirellula_sp.                TCCGGAAGAACGGTGACAGCCATTTCGCGCGGAAACGCGGTTTCGGCT 246
```


Bacillus megaterium	TGGGATAGATATGATGGAA---TGGATTAGCAAAAGCGAGATTGAGGC	272
Bacillus subtilis	TGGGATCACTATAAAGGCA---TGGATCTAGCGCAAGATGAGAGTAGAAGC	272
Bacillus stearothermophilus	TGGAACAAATACAGCGGAA---TGGATTGGCCAAAGCGCGTGTGGAAGC	248
Bacillus halodurans	TGGGATCAATATTCCGGTA---TGGATTAGCGAAAGCTTCGAGTGGGAAGC	248
Bacillus licheniformis	TGGAACCGGCTGACACATCCTTTGGATAAAGCGAAAGCCAGGGCGGGAAGC	248
Thermotoga maritima	TGGAACAGGTTCTCCGATCCCATGGACAAAGCTTTTGAACAGTTGGACGC	254
Bradyrhizobium japonicum	TGGCATCAGCGCACCGATGCGATGGCGCAGGCAGCGGGCCAGGCTGTATGT	263
Xanthomonas axonopodis	TGGGATGTGGCGGATACCGGCTTGAACCGTGCAGGACCCAGGCGCATGC	266
Bifidobacterium longum	TACTACAAGTACACCGATCCGATGACACAGGCTCTGGCCAAAGTTCGACTA	254
Pirellula_sp.	TGGGACAACGGATCTGAAAGCGTGGAAACGACAAAGCGTGCCGTCGT	296
	* * * * *	
Bacillus megaterium	AGCTTTTCAACTTTTGAACATTAAATGTGCCATTCTTCGCATTTCATG	322
Bacillus subtilis	AGCATTTGAGATGTTTGA AAACTAGATGCACCACTTTCTTGCTTTTCATG	322
Bacillus stearothermophilus	TGCTTTTGAGTTTTTGA AAAATTAATATTCCTATTTTCTGTTTCCATG	298
Bacillus halodurans	AGCTTTTGAATTTTGAAGATTTAAACGTTCCGTACTTCTGCTTTCATG	298
Bacillus licheniformis	GGCTTTTGAATTTTGA AAAAGCTCGCGCTGCCCTATTTCTGTTTTCATG	298
Thermotoga maritima	TCTCTTCGAGTTCTCGGAAAGGCTCAACATCGAGTACTTCTGTTTCCAG	304
Bradyrhizobium japonicum	CGCTTTCGAGCTGTTCCGGCTGCTGGACGTACCTCTTCACTCCGACG	313
Xanthomonas axonopodis	GGCGTTCGAGTTCTTCAACAAAGCTCGCGCTGCGGTACTACTGCTTTCAG	316
Bifidobacterium longum	CGCTTTCGAGCTGTTCCAGAAAGCTGGGTGTTGGAGTACTTCTGTTCCAG	304
Pirellula_sp.	TGCTTTTGAGTTTTCACCAAACTCGAGGCTCCTTACTACGCGTGGACG	346
	* * * * *	
Bacillus megaterium	ATCGAGACATTGCTCCGAGGGCAGTACGTTACAAGAAACAAATAAAAAAT	372
Bacillus subtilis	ACCGGATATTGCAACGAGAGGAGTACGCTAAAAGAGACAAACCAAAAT	372
Bacillus stearothermophilus	ATGTGGATATTGCCCGAGAGGAGAAACATTAAGAAGAACTATAAAAAAT	348
Bacillus halodurans	ATGTAGATGTGGCACTGAAGGGGAGACGTTGGCAGACACTATATAAAAC	348
Bacillus licheniformis	ATGTTGATATTGCGATGAAGGAGCAACATTCGCTGAAATTTCAACGTAT	354
Thermotoga maritima	ACAGAGACATCGCTCCGAAAGGAAAGCGCTCAGAGAGACAAACAGATA	348
Bradyrhizobium japonicum	ACGTCGATGCGCGCGCGAGGGGGCTTCGCTCGGGAGTGCCTGCGCCAAC	366
Xanthomonas axonopodis	ACATCGACCTGTCGCGGATGCGCGATGACATCATCTAGTACGAGAGCAAC	363
Bifidobacterium longum	ATCGTGACATCGCCCCGAGGCGACACTTCGCGAGACCAACGCGCAAC	354
Pirellula_sp.	ACCGCGATGTGGCCCCGAGGAGGCACTTCGAGAGAACCCACGCGAAT	396
Bacillus megaterium	CTTGATGTTATCGTCACTATGATCAAAGAATACATGCAAAAGTAACGT	422
Bacillus subtilis	TTAGATATGATCATGGCGATGATTAAGATTTACATGAGATATACGGCGGT	422
Bacillus stearothermophilus	TTAGATATTATCGTAGACATGTTGAGGAAATATATGA AAAACAGCAAAAAC	398
Bacillus halodurans	CTAGACGAAATCGTGTTAATGATCAAGGATTAATGAAACAGGATGAAGC	398
Bacillus licheniformis	TTGATCAAAATGTCGTCTTTCTCAAAGAAATGATGGAGACAAGCCATGT	398
Thermotoga maritima	CTGGACAAGATGGTGGAAAGAAATTAAGAAAGAAATGAAGGACAGCAAGT	404
Bradyrhizobium japonicum	CTCAACGCGATCGCGCACTGTTTGAAGGCGAAGATGGCTTCGCGCAAAAT	413
Xanthomonas axonopodis	CTCAAGCACATGGTGGCGGTTGCCAGGCAGCGCCAGGCGCACACGGCAT	416
Bifidobacterium longum	CTCGACAAGGTCTGCGACAAGATCGAGGAGAACATGAATCCACCGCGGT	404
Pirellula_sp.	CTCGACGCGGTGCGGATGTGCTGGAAGAACAGCAAAAAGCGACCGCGGT	446
	* * *	
Bacillus megaterium	AAAGTTATTATGGAACACAGCGAATATGTTTACAAATCCCGGTTCTGTTT	472
Bacillus subtilis	TAAGCTATTATGGAATACAGCAAAACATGTTTACGAATCCCGGTTTCGTTC	472
Bacillus stearothermophilus	GAACTGCTTTGGAATACGGCAACTTATTACCACTCTCGCTTTGTCC	448
Bacillus halodurans	GAAATTGCTATGGAATACGGCAAAACATGTTTACCACTCCGCGTTGGATCC	448
Bacillus licheniformis	TCAGCTGCTTTGGAATACGGCAAAATGTTTACGCTACCGAGATATGTCC	448
Thermotoga maritima	GAAATCTCTTGGGGAACGGCGAAATCTGTTCTCCACCCGAGGTACATGG	454
Bradyrhizobium japonicum	CCGGCTGCTTGGGGAACGGCGAAATCTGTTTACGCTACCGGCTACATGG	463
Xanthomonas axonopodis	CAAGCTGCTTGGGGAACGGCGCAACTGTTCTCGCATCCGCGCTACATGA	466
Bifidobacterium longum	CAAGCTGCTTGGGGAACCGCTCTCCCTGTTTACCAACCCGCGCTCTGTTG	454
Pirellula_sp.	GAAATTGCTTGGGGAACCGCGCAACTGTTTACGACCAACCGCTCTGATGC	496
	* * * * *	
Bacillus megaterium	ATGGTGCGAGTACTTCTTGAATGCAGATGATTTTGCTTATGCGCGGCT	522
Bacillus subtilis	ATGGTGCGCGGACTTCTTGAATGCAGATGATTTTGCTTATGCGGTGACGA	522
Bacillus stearothermophilus	ATGGCGCGGCACTTCTTGAACCGCGATGTTTTCGCTTATGCGAGCGCC	498
Bacillus halodurans	ATGGTGCTGCGAGCTACCAAAATGTTGATGTGACGCGTATGACAGCAGC	498
Bacillus licheniformis	ACGGGGCGGCACTTCTTGAATGCAGAGCTCTATGCTTATGCGAGCTGCA	498
Thermotoga maritima	ACGGCGCGGCGAGACATGCGAGTGGATGTTTTCGCTACGCGCGCGCC	504
Bradyrhizobium japonicum	CGGGCGCGGCGACCAATCCGACCTTGACATCTTCACTTATGCGCGCGCG	513
Xanthomonas axonopodis	ATGGTGCTTGCACCAACCGGACTTCAATGCTGTTGGTGGTGGCGCGGTG	516
Bifidobacterium longum	CCGGCGCGGCGCACTCCCGCTTCGCGGACATCTACGCTTACGCGCGCGC	504
Pirellula_sp.	ACGGTGCGCGGACGCTGCAACGCGGAGCTGTTCGCTTACGCGCGGTGCT	546
	* * * * *	

Bacillus_megaterium	CAAGTAAAAAGGGGTTGAAACAGCAAAAGAACTAGGCGCAGAAAAATTA	572
Bacillus_subtilis	CAAGTAAAAAGGGTTAGAAACAGCAAAAGAGCTTGGCGCTGAGAACTA	572
Bacillus_stearothermophilus	AAAGTAAAAAGGGTTGGAATTTGCGAAGCGGCTAGGAGCGGAAAACTA	548
Bacillus_halodurans	AAAGTAAAAAGGGTTGGAGATTTGGGAAGAGCTTGGCGCAGAAAACTA	548
Bacillus_licheniformis	AAAGTAAAAAGGGCTGGACATCGCCAAAGAGCTTGGAGCGGAAAACTA	548
Thermotoga_maritima	CAGGTCAAGAAGGCCCTCGAGATCACAAGAAGACTAGGAGGAGAAGGCTA	554
Bradyrhizobium_japonicum	CAGGTCCGCGCGCGCTGGAGGTGAACACACCGCTCGGCGCGCAGAACTA	563
Xanthomonas_axonopodis	CAGGTCAAGGCCCGCATCGATGCCACGGTGGCGCTGGCGCGCGGAGAACTA	566
Bifidobacterium_longum	CAGCTCAAGAAGAGCTGGAGATTCGCAAGCGCTTGGCGCGCGGAGAACTA	554
Pirellula_sp.	CAAGTCAAAAAGGCTTTGGAAGTCAACCAAGCTTCGGCGCGCGAAAACTA	596
	* * * * *	
Bacillus_megaterium	TGTATTCTGGGCGGCGCTGAGGGATATGAAACACTGCTTAAACAAATTT	622
Bacillus_subtilis	TGTATTCTGGGCGGCGCTGAAGGATATGAAACACTTGTATAATACCGATT	622
Bacillus_stearothermophilus	CGTATTTTGGGCGGCGACGAAGGGTATGAAACACTATTAAATACCGATA	598
Bacillus_halodurans	CGTATTTTGGGCGGCGACGGAAGGATATGAAACACTTCTAAACGGAACA	598
Bacillus_licheniformis	TGTGTTCTGGGCGGGAAGAGAGGTTATGAAACACTGCTGAATACAGATA	598
Thermotoga_maritima	CGTCTTCTGGGCTGGAAGAGAAGGCTATGAAACACTCTCAACACAGATC	604
Bradyrhizobium_japonicum	CGTGTCTGGGCGGCGCGCGAGGCTACAGAGACGCTGTCTCAGAACCGATC	613
Xanthomonas_axonopodis	CGTGTCTGGGCGGCGCGAGGCTATGCGCTGCTGCAACACGCGAGA	616
Bifidobacterium_longum	TGTGTTCTGGGCTGGCGCGGAAGGCTACGAGAACTTGGGAACCTCGAGA	604
Pirellula_sp.	TGTGTTCTGGGCGGCGCGAGGTTACCAAACTTTTACCAACACCGACA	646
	* * * * *	
	GTACTTTGGGCGGCGCTGAAGGCTATGAAACCTTGTATAATACAAATA	
	5'-GTVYTBGGGGYGGVMGHGARGG-3' (F2)	
Bacillus_megaterium	TACAGTTAGAGTTAGATAACTTAGCCAGATTTATGCATATGGCTGTAGAT	672
Bacillus_subtilis	TAAAATTTGAGCTTGATGATTTGGCTAGATTTATGCATATGGCAGTGGAT	672
Bacillus_stearothermophilus	TGAAACTTGAGCTGGACAACCTTGGCCGCTTCTGCATATGGCGGTGAT	648
Bacillus_halodurans	TGAAGCTAGAGTTAGATAACCTTGGCCGCTTTTGCATATGGCTGTGAT	648
Bacillus_licheniformis	TGAAGCTTGAGCTCGAAAACTTGCTTTCATTTTATAGAATGGCAGTTGAG	648
Thermotoga_maritima	TCGGGCTGGAACCTGAAAACTTCGCGAGATTTCTCAGAATGGCAGTTGAG	654
Bradyrhizobium_japonicum	TCAAGCGCGAGCTCGACAGCTTCGGCGCTTCGTCTGCTGCTGCTGCTGAG	663
Xanthomonas_axonopodis	TGAAGCGGAGCAGGACAACATGGCGGCTTCTCACCCTGGCGCGAGC	666
Bifidobacterium_longum	TGAAGCGGAGACCGACCACTCGCCAAAGTTCTTCCACATGTGCGCAGAT	654
Pirellula_sp.	TGAAGCGAGAAGTGGACCAATTTGGCCAAAGTTCTTCCACATGGCAGTCGAC	696
	* * * * *	
	TGAAGCTCGAAGTGGACAATTTAGCCCGCTTTTGTGATATGGCGTTGAC	
Bacillus_megaterium	TACGCAACCGAAATTTGGATATACGGGGCAGTTTTTAAATGAGCTAAACC	722
Bacillus_subtilis	TATGCGAAGGAATCGGGTACACAGGGCAGTTTTTGAATGAGCCAAAACC	722
Bacillus_stearothermophilus	TATGCGAAGGAATCGGGTTTGAACGGGCAATTTTTTAAATGAGCCGAAGCC	698
Bacillus_halodurans	TATGCGAAGGAGATTGGATTGCAACGCCCAATTTTTTAAATGAAACAAAACC	698
Bacillus_licheniformis	TATGCGGCTGAAATCGGTTTGAACGGCAATTTTTTAAATGAGCCGAAGCC	698
Thermotoga_maritima	TACGCAAGAAGATCGGCTTCAACGGGACGATTCCTCATAGAACCCAAAGCC	704
Bradyrhizobium_japonicum	CACAAGCACAAAGATCGGCTTCAACGGGCGGATCTGATCGAGCCGAAGCC	713
Xanthomonas_axonopodis	TACGGCCGACGATCGGCTTCAAGGGCAACTTCTGATCGAGCCGAAACC	716
Bifidobacterium_longum	TACGCCAAGGAATCGGCTTGAAGGCCAGTTCTGATCGAGCCGAAGCC	704
Pirellula_sp.	TACGCCAAGTCGATCGGATTGACGGTCAGTTTCTGATCGAGCCCAAACC	746
	* * * * *	
	TATGCGAAGGAATTTGGCTTTGACGGGCAATTTTTTAAATGAGCCAAAACC	
	5'-ATHGARCNAARCC	
Bacillus_megaterium	TAAAGAGCCTACGACACATCAGTATGATACCGATGCAGCAACAACTATT	772
Bacillus_subtilis	AAAAGAGCCGACCGCCATCAATACGATACAGATGCAGCAACAACTATT	772
Bacillus_stearothermophilus	GAAAGAGCCGACGAAACCAATATGACTTTGATGTTTGGCAGCAGATTGG	748
Bacillus_halodurans	GAAAGAGCCAAACAAACATCAATACGACTTTCGATGTGGCAACCGGATCG	748
Bacillus_licheniformis	GAAGGAGCCGACGAAGCAACATACGATTTTGAATGCAGCCCAACGATCG	748
Thermotoga_maritima	GAAAGAACCCACCAAGCACCAATGAGTTTTCGATGTGGCAACCGGCTACG	754
Bradyrhizobium_japonicum	GAAGGAGCCGACCAAGCATCAATATGATTTTCGAGGTGCGCAACTGCTACG	763
Xanthomonas_axonopodis	CATGGAGCCGATGAAGCACCAAGTATTTGATAGGCGCACCGTGCATCG	766
Bifidobacterium_longum	GAAGGAGCCGACGTGCACCAAGTACGACTTTCGATGCGCCGACCGGATCG	754
Pirellula_sp.	GAAAGAGCCTACCAAGCACCAAGTACGACAGCGCGGCGGCTGCATGA	796
	* * * * *	
	AAAAGAACCAACGAAGCATCAATACGACTTTGATGTTGCAACAGCATTAG	
	NAWRGARC-3' (F3)	

Bacillus megaterium	CATTTTAAAGACAATACGGATTAGATAAACTCTCAAACCTTAATCTAGAA	822
Bacillus subtilis	CTTTTGAAGCAATATGGCTTAGACAATCATTTTAAATTAATCTTGAA	822
Bacillus stearothermophilus	CATTTTGAACAATACGGACTGAAAGATTACTTTAAAGTTCAATATTGAA	798
Bacillus halodurans	CATTCCTAAAAACGATGGACTTGAAGTAACTTTCAAATTCACATCTGAA	804
Bacillus licheniformis	CTTTTGAAGAACTACGGTTTAAAGACCACTTTTAACTTAACTCTTGAG	798
Thermotoga maritima	CTTTCCTGAAGAACACGGCTCTTGATGACTCTCAAGTCTCAACATGGAA	804
Bradyrhizobium japonicum	GCTTCCTCGCGCTACGACCTCTCAAGGACGCTCAAGCTCAACATCGAG	813
Xanthomonas axonopodis	GCTTCCTCGCTCAGCATGGCTGGACGAGGACTCTCAAGCTCAACATCGAG	816
Bifidobacterium longum	AGTTCTCGCAACGACGACTGACCGGACGCTCTCAAGCTGAACTGGAA	804
Pirellula_sp.	ACTTCTCGGAGCTACGATCTGGATTTCGCACTCTCAAGCTCAACATCGAA	846
	* * * * *	
	CGTTCTACAGACGATGGAATAAAGATTATTTCAAATTCACATGGAA	
Bacillus megaterium	GCTAACCAACGCAACGTTAGCTGGGCATACATTTGAACACGAATTACGAGT	872
Bacillus subtilis	GCCAATCATGCCACATTAGCCGGGCATACATTCGAACATGAATTACGCAT	872
Bacillus stearothermophilus	GCGAACCATGCAACGCTGGCGGGATACAGTTTGAACATGAATTGCGGGT	848
Bacillus halodurans	GCGAACCATGCGACGCTTGCAGGTCTACAGTTTGAACATGAGTTACATCT	848
Bacillus licheniformis	GCGAACCATGCGACATTTGGCCGGGATACATTTGAGCATGAATTAAGGT	848
Thermotoga maritima	GCGAACCAACGCGACACTTGGCCGGTACACACTTCCAGCAGCAATGAGGAT	854
Bradyrhizobium japonicum	CAGAACCACGCCATCTCGCCGGCTTCCITCCATCAGAGGTTGCGCT	863
Xanthomonas axonopodis	GCCAACCACGCCACCTTGTGCGGCCATAGCTTCCAGCAGCAATCTGAGT	866
Bifidobacterium longum	GGCAACCACGCCAACCTGGCCGGCCACACTTACGACGACGAGATCCGCT	854
Pirellula_sp.	ACCAACCACGCCAGCTTGGCGGGTACACGATGATGCACGAGCTCGATTA	896
	* * * * *	
	GCAAACCATGCGACATTTGGCAGGTCTACATATTTGAACATGAATCTCGCT	
Bacillus megaterium	AGCTAGAGTACAAGGCTTATTAGGCTCAGTGGATGCAAAACCAAGGTGACC	922
Bacillus subtilis	GGCAAGAGTACATGGTCTGCTTGGCTCTGTTGACGCAAAACCAAGGTGACC	922
Bacillus stearothermophilus	AGCGCGCATTCATGGCATGTTAGGCTCTGTTGACGCAAAACCAAGGAGATA	898
Bacillus halodurans	TGCCCGTATTCTGACATGTTGGGATCGTGGATGCAAAACCAAGGGGATA	898
Bacillus licheniformis	GGCTGCTTGCACGATATGCTGGGTCTCATTTGCGCAACCAAGGGCGATT	898
Thermotoga maritima	GGCAAGGATCTCGGAAACTTGAAGCATGCGCGCAACCAAGGGGAGATC	904
Bradyrhizobium japonicum	CGCCGAGCGCTCGGTGCTTTCGCTCGCTCGCATGCTCAACCGCGGCGACG	913
Xanthomonas axonopodis	GGCATCCGATCGCGGCTCTCGGCAGCATCGATGCCAACCGCGGTAAACG	916
Bifidobacterium longum	GGCCCGGAGTCCGGCTTCTCGGCTTCCCTCGACGCGCAACCAAGGGCGACA	904
Pirellula_sp.	CGCGGCGATACAAGGTGGATGGGACGATCGGCGCAACCAAGGGGTGATT	946
	* * * * *	
	AGCGCGCATTCACGGAATGCTCGGTTTCGTCGATGCCAACCAAGGGGACC	
Bacillus megaterium	CTCTTTTAGGCTGGGATACAGATGAATTCACACGGATTTATATTCTACA	972
Bacillus subtilis	CTCTTTTAGGCTGGGACACGGATGAATTCGCGAGGATTTATATTCTACG	972
Bacillus stearothermophilus	TGTTGTTAGGATGGGATACGGACGAATTCGCGACAGACTTATATTCTACG	948
Bacillus halodurans	CATTGCTTGGCTGGGATACCGATGAATTCGCGACAGACTTATACACAAG	948
Bacillus licheniformis	TGCTCTTGGCTGGGATACCGATGAGTTTCGCGACGATCTGATTTCTGCG	948
Thermotoga maritima	TCCTGCTCGGCTGGGACACGACAGTTCGCAACGACATCTACGACACA	954
Bradyrhizobium japonicum	ATCTGCTCGGCTGGGACACGACAGTTCGCGATGAACTGTC-CGGAAC	962
Xanthomonas axonopodis	CGCAGAACGGCTGGGACACGACAGTTCGCGACGATCTGACGACACC	966
Bifidobacterium longum	AGCTCATCGGCTGGGATAGGACAGTTCGCGACGATCTGACGAGACC	954
Pirellula_sp.	TGTTTGTGGGTTGGGACACGACCAATTCGCAACGATTAACCTGACC	996
	* * * * *	
	CGTTGCTTGGCTGGGATACCGAGATTCGCAACGACTTGTATTCTACT	
	3'-CCKACCCCTRTGBCRTCTYAAAGG-5' (R1)	
Bacillus megaterium	ACGCTAGCAATGTAT-GAAATTTGCAAAAATGGAGGGCTGGGCGAG---CG	1018
Bacillus subtilis	ACATTTAGCAATGTAT-GAAATCTGCAAAAATGGCGGCTTGGGAAG---CG	1018
Bacillus stearothermophilus	ACTTTGGCAATGTAT-GAAATTTTGA AAAACGGCGGCTTGGCCG---TG	994
Bacillus halodurans	ACACTTGCAATGTAT-GAAATTTTGA AAAATGATGGCTTAGGGGAA---GG	994
Bacillus licheniformis	GTTCTGGCGATGTAT-GAAATTTTGA AAGCAGGCGGCTTTAAAC---CG	994
Thermotoga maritima	ACACTTGCAATGTAT-GAAGTGATAAAGCAGGAGGATTCACAAA---GG	1000
Bradyrhizobium japonicum	CGCTTGGTGTTCACGAGATCTGAACCGCGGCTTCAAGCTC-CG	1009
Xanthomonas axonopodis	GTCGGCGCATGCTG-GTGCTGCTCGGCGAGGCGGGCTGGCACC---GG	1012
Bifidobacterium longum	GTCGCGCATGTGG-GAAGTCTGTCAGGCGGCTTCCATCGGACTTCACG	1003
Pirellula_sp.	ACCCAAACCATGCTG-ATGATTCTGAAGCAGGCGGATGCGGAC---CG	1042
	* * * * *	
	ACTCTTGGCATGTAC-GAAATTTTGA AAAATGGCGGACTGGGAAAAGGGC	
	3'-G	

<i>Bacillus megaterium</i>	GAGGATTAACTTTGATGCTAAAGTACGCAAGGTTCTTTTGAAACAAGAC	1068
<i>Bacillus subtilis</i>	CGGGATTAACTTTGACGCGAAGGTAGAAAGATCTCTTCGAGCCTGAT	1068
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	CGCGTTTGAATTTTGATGCGAAGGTAGAAAGAGGATCGTTTGAGCCGGAA	1044
<i>Bacillus halodurans</i>	CGGTTTGAATTTGATGCGAAGGTAGAAAGGGCTCTTTGAAAGCAAAAC	1044
<i>Bacillus licheniformis</i>	CGGCGATCAACTTCGATGCTAAAGTAAAGCGCCCGTCATTTCGCGATGAG	1044
<i>Thermotoga maritima</i>	GTGGCTCAACTTCGACGCGAAGGTGAGGAGGGCTCTCTACAAGGTAGAA	1050
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	CGGGCTCAACTTCGACGCGCAAGATCCGCGCTCAGTCGATCGAACCCGAC	1059
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	CGGCTTGAACCTTCGATGCCAAGGTGCGTCGCGAATCGTCCGACCCGAC	1059
<i>Bifidobacterium longum</i>	GTGGCTGAACTTCGACGCGCAAGGTGCGTCGTAATCTTCGAGCCCATC	1053
<i>Pirellula_sp.</i>	GTGGCGTGAACCTTCGACGCGCAAGGTGCGTCGTAATCTTCGAGCCCATC	1092

	GGGATTGAACCTTTGATGCGAAGGTAGAACGCGGTTCTGTTTGAAACAGAA	
	CDCCNNABTTAARACTRCGN-5' (R2)	
<i>Bacillus megaterium</i>	GATTTACTCTATGCTCATGTAGCAGGAATGGATGCGTTTGGCTCGAGGATT	1118
<i>Bacillus subtilis</i>	GATCTAATATATGCCCATATTCGACGGATGGATGATTTCGCAAGAGGATT	1118
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	GATTTGTTCTATGCCCATATTCGCGGGATGGACGATTTTTCGAGTTGGATT	1094
<i>Bacillus halodurans</i>	GACCTTTTCCATGCCCATATTCGCGGGATGGACAGCTTTTCGAGTTGGATT	1094
<i>Bacillus licheniformis</i>	GACTTGTTCACGCTCATATCGCGGATGGACAGCTTCGCGCCGCGCTT	1094
<i>Thermotoga maritima</i>	GATCTCTTCACTCGGTCACATCGCAGGAATGGACACCTTCGCGCTCGGCTT	1100
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	GACCTGATCCACGCGCATATCGGCTCGATGGATGCTTCGCGCCGCGCTT	1109
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	GACCTGTCTTCCGCGCATATCGCGGATGGACGCGCTTCGCGCCGCGCTT	1112
<i>Bifidobacterium longum</i>	GACCTGTCTCCGCTCCACATCGCGGATGGACGCGCTTCGCGCCGCGCTT	1103
<i>Pirellula_sp.</i>	GATTTGTTCACGCTCATATCGCGGAATGGACGCGCTTCGCGAAGGTTT	1142
	**	
	GACTTATTCTACGCCCATATATGACGCCATGGACAG	
	3'-GTRYADCSDMSBTACCTRY-5' (R3)	
<i>Bacillus megaterium</i>	GAAAGTAGCACATAAAATAGTAGAAGATCGTGTTTTCGAAAATGTTATTA	1168
<i>Bacillus subtilis</i>	GAAAGTGGCCACAAATTAATCGAAGATCGTGTTTTCGAAAGTGTGATT	1168
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	AAAAGTAGCCCATCGGTTAATAGAAGACCGGTTTTCGATGAGTTTATG	1144
<i>Bacillus halodurans</i>	AAAAGTGGCTAATCAATTCGTTGAAGATCGGTCCTTGAAGATGTGATTG	1144
<i>Bacillus licheniformis</i>	GAAAGTGCTTCCGCTCTGCTTGAAGATGAAGCGCTCGATCAGGTTATCG	1144
<i>Thermotoga maritima</i>	GATGATAGCGTACAAATCTCGCGAAGACGAGTGTTCGACAGTTCATCG	1150
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	CCTTGGCGCTGCGCATGCTTGTATGCGCGGCGCTTCACGCGCGCTCG	1159
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	GGAAGTGGCCACGCGCTCTGACGCGCTTCGCGCGCTGCGACAGTGGCGCG	1162
<i>Bifidobacterium longum</i>	GCTGGTTGCCGACAGATGAACAGGACGGCTTCATCCAGAACTTTCAGG	1153
<i>Pirellula_sp.</i>	GAAGATCGCTGCTCGGATTCGTCGACGCGCGAATTCGCGGATTCGTCGA	1192
	**	
<i>Bacillus megaterium</i>	ACGAGCGCTACAGCAGCTTTAAAGAAGGAATGGGCTTGAGATTGTGAA	1218
<i>Bacillus subtilis</i>	AACATCGTTACCGCAGCTTTACTGAAGGGATTTGCTTGAATATATAGAA	1218
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	AAGAACGCTACAAAGTTATACAGAAGGAATTTGGCCGGGAAATCGTCGAA	1194
<i>Bacillus halodurans</i>	ACAAATCGATACAAATCTTCAACTTCGGCATCGGCCAAAGATTGCAAAAC	1194
<i>Bacillus licheniformis</i>	AAGAACGTTATGAGAGCTATACGAAGGGATCGGGCTTGAAATCAAGAA	1194
<i>Thermotoga maritima</i>	AGGAAAAATACAGAAGCTTCAAGAAGGATTCGGAAGAGATCGTAGAA	1200
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	ACAAGCGCTACGAAGATGGGCGGCGCCGAGGGCGCGCCATTCTCGGC	1209
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	CGAGCGTTACGCCAGCTTCGACAGCTCGGCGCGCGCGGCTTTGCGCA	1212
<i>Bifidobacterium longum</i>	CCGAGCGCTACAGCTCTTACGACTCGGATCGGCAAGGACATCGACGAG	1203
<i>Pirellula_sp.</i>	AGAACCCTACTCGACTTGGGATTCGCGAATCGGTCGCAAGATCGAAGCC	1242
	*	
<i>Bacillus megaterium</i>	GGAAAAGCTAACTTCCATACACTGGAGCAGTACGCGTTTAAAAATCCGAA	1268
<i>Bacillus subtilis</i>	GGAAAGGCTAATTTCCACACACTTGAAGCAATATGCGCTTAATACATAATC	1268
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	GGAAAGGCTAATTTCCACAAATAGAGCAGATGCTTTTACAATAGGGGA	1244
<i>Bacillus halodurans</i>	AATGATACGAATTTGAAAGAGCTAGAGGCATACGCTCTATCTTTCGGGA	1244
<i>Bacillus licheniformis</i>	GGCCGACCGGATCTGAAAAAGCTTCGCGCTTACGCTCTTGAAAAACGACCA	1244
<i>Thermotoga maritima</i>	GGAAAAACCGATTTCGAAAAACTCGAAGAGTATATAATAGACAAAGAAGA	1250
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	GGAACGCGCTCGCTCGCGCATCTCGCGATCGTGGCGCTCGGC - CCGG -	1256
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	GGCAAGCACCATTTGGCGGATCTGGCCAGCATCGCGCGCGCA - ATGC -	1259
<i>Bifidobacterium longum</i>	GGCAACGTCACCTTTGGCGGACTTCGAAGCTACAGCTTCGCAAGCCGCA	1253
<i>Pirellula_sp.</i>	GGTGAAGTCGGCTTCGCGAATCGGAAGCTTACATGCTCGAAGAGGCGGA	1292
	*	

```

Bacillus_megaterium      TATTGCGAAT-----AAATCAGGAAG-ACAA--GAACGTTTAAAGT 1306
Bacillus_subtilis        AATTAAAAAC-----GAATCTGGAAG-ACAG--GAGAAATTAAG 1306
Bacillus_stearothermophilus AATC AAAAAT-----CAATCGGGCAG-ACAA--GAACGGCTGAAA 1282
Bacillus_halodurans      AATCAAAACAT-----TCTTCTGGACA-ACAA--GAACGAATCAAG 1282
Bacillus_licheniformis   TATTGAAAAT-----CAGTCAGGCCG-CCAA--GAACGGCTGAAG 1282
Thermotoga_maritima      TATCGAACTT-----CCATCTGGAAA-GCAG--GAGTAGCTGAAA 1288
Bradyrhizobium_japonicum TTTGCAACCG--CAGCCACGCTCGGGACG-GCAG--GAATATCTGGAAT 1300
Xanthomonas_axonopodis   GCCCCAGCAGATCAGCGGCCGCAAGAGCGTAT--GAAAACTG--AT 1304
Bifidobacterium_longum   GTCCGAGCTCATCGCCGCCACCAAGTCCGATCACTCGAGCACATGATCA 1303
Pirellula_sp.            CGTCGACGCAAAACCAAGCGGCCGCAAGAGTACCTCGAGCACATGATCA 1342
                               *      **      *

Bacillus_megaterium      CCATTTTAAATCAATATATTTTAGAAG-TTTAA----- 1338
Bacillus_subtilis        CGATATTGAACCAATACATTTTAGAAG-TATAA----- 1338
Bacillus_stearothermophilus CATTGCTTAACCAATATTTGCTTGAAG-TTTCGCAGCCCGTTAA----- 1326
Bacillus_halodurans      CAACGTTAAATCAATATTTGCTAAGGG-TAAACGAATATTAA----- 1323
Bacillus_licheniformis   CGACCGTTAACCGTTACTTATTGAACGCTTTCGCGAAGCGCCGGCAGGA 1332
Thermotoga_maritima      GCCTGCTCAACAGGTACATAGTGAAGCAATAGCAGAAGTCTGAGGTGA-- 1335
Bradyrhizobium_japonicum CCCTGCTCAACCGGTATGTC--TGA----- 1323
Xanthomonas_axonopodis   CAATCAGTATCTGACGCGT--TGA----- 1326
Bifidobacterium_longum   CCACCATCAACAACTACATCATTGATGCCCTGGCTGAGGTGAGGTGA-- 1350
Pirellula_sp.            ATAAGTACATCGATCGCGTT--TGA----- 1365
                               *      *

Bacillus_megaterium      -----
Bacillus_subtilis        -----
Bacillus_stearothermophilus -----
Bacillus_halodurans      -----
Bacillus_licheniformis   AAGGAGACACACTAG 1347
Thermotoga_maritima      -----
Bradyrhizobium_japonicum -----
Xanthomonas_axonopodis   -----
Bifidobacterium_longum   -----
Pirellula_sp.            -----

```

8.2 Bazı Tip 1 GI'ların Amino Asit Dizilimlerinin Clustal W ile

Karşılaştırılması

```

Bacillus_megaterium      -----MVQTSNKNHFSANKVLYEG--KDSKNFLAFKYYNPREEVVG 41
Bacillus_subtilis        -----MAQSHSSINYPGSANKVYVEG--KDSNPLAFKYYNPQVEVIG 41
Bacillus_stearothermophilus -----MPYPDNISTAIYEG--PASKNPLAFKYYNPPEEVVG 33
Bacillus_halodurans      -----MTFFNDVEKVQYEG--PRSTNPYAFKYYNPPEEIVA 33
Bacillus_licheniformis   -----MPFFNIGMIEYEG--ADSNPFAFKYYNPDEFVVG 32
Thermotoga_maritima      -----MAEFPPEIPKIQFEG--KESTNPLAFRFYDNEVID 34
Bifidobacterium_longum   -----MGLWDVDKIRYVGRAGKPKDFAFHYDDADKVVA 34
Pirellula_sp.            MTCPPHLAATHGIRLMTAPPDVPVVIQYEG--PQSDNPLAFRWYNPDEVIE 48
Xanthomonas_axonopodis   -----MYIGAKEYFFPKICKIQFEG--RDSNPLAFKYYNDANKTIG 38
Bradyrhizobium_japonicum -----MNVSAKFFPEESTFVAFAG--QDAGPAPAFRWYDKDRLVH 37

```

```

Bacillus_megaterium      GKTMDKQLRFSVAYNHQFTADGTDPFGAATMQRSDWDRYDG-MDLAKARVE 90
Bacillus_subtilis        GKTLKEHLRFSIAYWHTFTADGTDVFGAATMQRPDWDRYDG-MDLAKARVE 90
Bacillus_stearothermophilus DKTMEEHLRFSVAYWHTFTGDGSDPFGAGNMIRPWKNYKSG-MDLAKARVE 82
Bacillus_halodurans      GKTMAEHLRFSIAYWHTFVGDSDPFGVGTMQRPDWQYKSG-MDLAKARVE 82
Bacillus_licheniformis   GKTMDKQLRFSVAYWHTFADGKDPFGDGTMFRAWNLTHPLDKAKARAE 82
Thermotoga_maritima      GKPLKDHLRFSVAVWHTFVNRGRDPFGDPTAERPNWRFSDPMDKAFARVD 84
Bifidobacterium_longum   GKMKMDLRFSGVAVWHTFNGEIVDPFGGTGAHRFPYKYTFDPMQDALAKVD 84
Pirellula_sp.            GKTMDKMDHMRFSIVYWHTFPGTGADPFGPGTAVRPWNDSSESVNAQKRAV 98
Xanthomonas_axonopodis   DKTMAEHLRFAVAYWHSFCNGADPFGPGTRAYPVDVGDALNRAKAD 88
Bradyrhizobium_japonicum GRRLDHLRFAVCYWHSLCWPGGDPFGGTFRLRPMWHGTDMARAKAD 87

```

```

Bacillus_megaterium      AAFQLFETLNVPFFAFPHDRDIAPEGSTLQETNKLNLDIVITMIKEYMQTSN 140
Bacillus_subtilis        AAFEMFEKLDAPFFAFPHDRDIAPEGSTLQETNKLNLDIMGMIMKDYMRNSG 140
Bacillus_stearothermophilus AAPEFFPEKLNIPFFCFHDDVDIAPEGSTLQETNKLNLDIVIMIEYMKTSK 132
Bacillus_halodurans      AAPEFFPEKLNVPFFCFHDDVDIAPEGSTLQETNKLNLDIVIMIEYMKTSK 132
Bacillus_licheniformis   AAPEFFPEKLVVPFFCFHDDVDIVDBGATLRETFYTLQMSFLKRMETSHTS 132
Thermotoga_maritima      ALPEFCEKLNIEYCFHDDVDIAPEGSTLQETNKLNLDIVIMIEYMKTSK 134
Bifidobacterium_longum   YAFELFQKLGVVEYFCFPHDRDIAPEGSTLQETNKLNLDIVIMIEYMKTSK 134
Pirellula_sp.            YAFELFTKLQAPYIAWHRDVAPEGANLRETHANLDAVADVLEQQKATG 148
Xanthomonas_axonopodis   AAPEFFFTKLGVVPYFCFHDIDLSPDADDITYESNLKHMVGVARQADTG 138
Bradyrhizobium_japonicum YAFELFRLLDVPFFTFHDDVDAPEGASLAESVANLNIAIDLFRAKMASAK 137

```

```

Bacillus_megaterium      VKLLWNTANMFTNPRFVHGAATSCNADVFYAAAQVKKGLETAKELGAEN 190
Bacillus_subtilis        VKLLWNTANMFTNPRFVHGAATSCNADVFYAAAQVKKGLETAKELGAEN 190
Bacillus_stearothermophilus TKLLWNTANLPTHPRFVHGAATSCNADVFYAAAQVKKGLETAKELGAEN 182
Bacillus_halodurans      TKLLWNTANMFTNPRFVHGAATSCNADVFYAAAQVKKGLETAKELGAEN 182
Bacillus_licheniformis   VQLLWNTANMFTNPRFVHGAATSCNADVFYAAAQVKKGLETAKELGAEN 182
Thermotoga_maritima      VKLLWNTANLFSHPRYMHGAATSCNADVFYAAAQVKKALEITKELGGEG 184
Bifidobacterium_longum   VKLLWNTSSLPNTNPRFVHGAATSPADIIYAAQVKKLSLEIKRGLGAEN 184
Pirellula_sp.            VKLLWNTANMFTNPRFVHGAATSCNADVFYAGAQVKKALEITKELGGEG 198
Xanthomonas_axonopodis   IKLLWNTANLFSHPRYMHGAATSPADIIYAAQVKKLSLEIKRGLGAEN 188
Bradyrhizobium_japonicum VRLWNTANLPTHRRYMAGAATNPDPIIFTYAAQVKKALEITKELGGEG 187

```

```

Bacillus_megaterium      VYFWGGREGYETLLNTNLQLELDNLARFPHMAVDAVYAKEIGFDQGLIEPK 240
Bacillus_subtilis        VYFWGGREGYETLLNTDLKLELDNLARFPHMAVDAVYAKEIGYTGQGLIEPK 240
Bacillus_stearothermophilus VYFWGGREGYETLLNTDMKLELDNLARFPHMAVDAVYAKEIGFDQGLIEPK 232
Bacillus_halodurans      VYFWGGREGYETLLNTNMKLELDNLARFPHMAVDAVYAKEIGFDQGLIEPK 232
Bacillus_licheniformis   VYFWGGREGYETLLNTDMKLELDNLARFPHMAVDAVYAKEIGFDQGLIEPK 232
Thermotoga_maritima      VYFWGGREGYETLLNTDLGLELDNLARFPHMAVDAVYAKEIGYTGQGLIEPK 234
Bifidobacterium_longum   VYFWGGREGYENLWNTDMKRETDHIAKFPFHMAVDAVYAKEIGFDQGLIEPK 234
Pirellula_sp.            VYFWGGREGYQNLNTDMKRELDHIAKFPFHMAVDAVYAKEIGFDQGLIEPK 248
Xanthomonas_axonopodis   VYFWGGREGYACLNHTQMKREQDNMARFLTLARQDYAKSIFGKGNFLIEPK 238
Bradyrhizobium_japonicum VYFWGGREGYETLLNTDLKRELDHIAKFPFHMAVDAVYAKEIGFDQGLIEPK 237

```

```

**:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
VYFWGGREGYETLLNTNMKLELDNLARFPHMAVDAVYAKEIGFDQGLIEPK

```


Bacillus megaterium	PKEPTTHQYD TDAATTISFLRQYGLDKYFKNLNLANHATLAGHTFEHEL	290
Bacillus subtilis	PKEPTAHQYD TDAATTIAFLKQYGLDNHFKNLNLANHATLAGHTFEHEL	290
Bacillus stearothermophilus	PKEPTKHQYD FVDVATRLAFLQTYGLKDYFKFNI LANHATLAGHTFEHEL	282
Bacillus halodurans	PKEPTKHQYD FVDVATGIAFLKTHGLDEHFKFNI LANHATLAGHTFEHEL	282
Bacillus licheniformis	PKEPTKHQYD FDAATTAFLQTYGLKDYFKFNI LANHATLAGHTFEHEL	282
Thermotoga maritima	PKEPTKHQYD FVDVATAYAFKTHGLDEYFKFNI LANHATLAGHTFEHEL	284
Bifidobacterium longum	PKEPTLHQYD FDAATAIEFLRNHDLTVQFKNLNLANHATLAGHTFEHEL	284
Pirellula sp.	PKEPTKHQYD SDAACMNFLRAYDLDSHFKNLNLANHATLAGHTFEHEL	298
Xanthomonas axonopodis	PMFPMKHQYD FDSATVIGFLRQHLQDQFKNLN LANHATLAGHTFEHEL	288
Bradyrhizobium japonicum	PKEPTKHQYD FVDVATCYGFLARYDLKDKVNLN LANHATLAGHTFEHEL	287
	* *	
	PKEPTKHQYD FVDVATALAFQTYGLKDYFKFNI LANHATLAGHTFEHEL	
Bacillus megaterium	VARVQGLLGSVDANQGD PLLGWD TDEFPDLYSTTLAMYELQNGGLG-S	339
Bacillus subtilis	MARVHGLLGSVDANQGH PLLGWD TDEFPDLYSTTLAMYELQNGGLG-S	339
Bacillus stearothermophilus	VARIHGMLGSVDANQGD MLGWD TDEFPDLYSTTLAMYELQNGGLG-R	331
Bacillus halodurans	LARIHMLGSVDANQGD TLLGWD TDEFPDLYSTTLAMYELQNGGLG-K	331
Bacillus licheniformis	VAALHMLGSVDANQGD LLLGWD TDEFPDLYSAVLAMYELQNGGLG-T	331
Thermotoga maritima	MARILGKLGSVDANQGD LLLGWD TDEFPDLYSTTLAMYELQNGGLG-K	333
Bifidobacterium longum	VARESGFLGSVDANQGD KLLGWD TDEFPDLYETVAMMEVLQAGSIGPH	334
Pirellula sp.	YAGIQGGLGSVDANTQD LLLGWD TDEFPDLYETVAMMEVLQAGSIGPH	347
Xanthomonas axonopodis	VASDAGLLGSVDANRQNAQNGWD TDEFPDLYETVAMMEVLQAGSIGPH	337
Bradyrhizobium japonicum	LAELGVGFLGSVDNRGDD LLLGWD TDEFPDLYETVAMMEVLQAGSIGPH	336
	* *	
	VARIHGMLGSVDANQGD PLLGWD TDEFPDLYSTTLAMYELQNGGLG K	
Bacillus megaterium	GGLNFDKAVRRGSFEPQD LLYAHVAGMDAFARGLKVAHKLVEDRVFENVI	389
Bacillus subtilis	GGLNFDKAVRRGSFEPD LLYAHVAGMDAFARGLKVAHKLVEDRVFENVI	389
Bacillus stearothermophilus	GGLNFDKAVRRGSFEPD LLYAHVAGMDAFARGLKVAHKLVEDRVFENVI	381
Bacillus halodurans	GGLNFDKAVRRGSFEPD LLYAHVAGMDAFARGLKVAHKLVEDRVFENVI	381
Bacillus licheniformis	GGLNFDKAVRRGSFEPD LLYAHVAGMDAFARGLKVAHKLVEDRVFENVI	381
Thermotoga maritima	GGLNFDKAVRRGSFEPD LLYAHVAGMDAFARGLKVAHKLVEDRVFENVI	381
Bifidobacterium longum	GGLNFDKAVRRGSFEPD LLYAHVAGMDAFARGLKVAHKLVEDRVFENVI	383
Pirellula sp.	GGLNFDKAVRRGSFEPD LLYAHVAGMDAFARGLKVAHKLVEDRVFENVI	384
Xanthomonas axonopodis	GGLNFDKAVRRGSFEPD LLYAHVAGMDAFARGLKVAHKLVEDRVFENVI	397
Bradyrhizobium japonicum	GGLNFDKAVRRGSFEPD LLYAHVAGMDAFARGLKVAHKLVEDRVFENVI	387
	GGLNFDKAVRRGSFEPD LLYAHVAGMDAFARGLKVAHKLVEDRVFENVI	386
	* *	
	GGLNFDKAVRRGSFEPD LLYAHVAGMDAFARGLKVAHKLVEDRVFENVI	
Bacillus megaterium	NERYSFKEGIGLEIVEGKANFHTLEQYAFKFNPN --- IANKSQRQERLK	435
Bacillus subtilis	QHYRSFTEGIGLEIVEGKANFHTLEQYAFKFNPN --- IANKSQRQERLK	435
Bacillus stearothermophilus	BERYKSYTEGIGREIVEGADPHKLEAHALQLE --- IQNQSQRQERLK	427
Bacillus halodurans	DNRYSYQSGIGQKIANNDNLKLEAYALSLE --- IKHSSQQRQERLK	427
Bacillus licheniformis	BERYESYTKGIGLEIVEGKRTDLKLAAYALENDH --- IENQSQRQERLK	427
Thermotoga maritima	EKYSFKEGIGLEIVEGKTDPEKLEEYI IKDKD --- IELPSQQRQERLK	429
Bifidobacterium longum	AERYSSYDSGIGKIDEGNVTLADLEAYSLDKPQSELIATKSDHLESVK	434
Pirellula sp.	KNYSTWDSGIGAKIEAGEVGFAELAYMLEKGD --- VDNQSGRQERLK	444
Xanthomonas axonopodis	AERYASFDGAGADFAAGKTTLADLAKHAAGNAP --- QQISGRQERLK	432
Bradyrhizobium japonicum	DKRYEGWAGPEGRALGGQRLADLADRALGPGFD --- PQPSRQERLK	433
	. 2 * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Bacillus megaterium	SILNQYILEV-----	445
Bacillus subtilis	AILNQYILEV-----	445
Bacillus stearothermophilus	TLLNQYILLECAAR-----	441
Bacillus halodurans	ATLNQYILLRVNEY-----	440
Bacillus licheniformis	ATVNRYYLLNALREAPAGKETH	448
Thermotoga maritima	SLLSNYIVKTI AELR-----	444
Bifidobacterium longum	ATINNYI IDALAEVE-----	449
Pirellula sp.	HMINKYIDRV-----	454
Xanthomonas axonopodis	NLINQYLYTR-----	441
Bradyrhizobium japonicum	SLVNRVY-----	440
	: * * :	

ÖZGEÇMİŞ

29.3.1976 tarihinde Rize’de doğdu. İlk öğrenimini İstanbul Yavuz Selim İlkokulunda, orta ve lise öğrenimini ise Ahmet Rasim Lisesi’nde tamamladı. 1995 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde lisans öğrenimine başladı ve 2000 yılında “Biyolog” ünvanı ile mezun oldu. Aynı yıl Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda Doç. Dr. Ali Osman BELDÜZ danışmanlığında yüksek lisans öğrenimine başladı. 2001-2002 yılları arası Fen Bilimleri Enstitüsü’nde Araştırma Görevlisi olarak çalıştı.