

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Anoxybacillus flavithermus WK1 afcda Geninin Klonlanması,
Ekspresyonu, Saflaştırılması ve Biyokimyasal Karakteriasyonu

Ayşenur EMİNOĞLU

Doç.Dr. Cemal SANDALLI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

RİZE 2012

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Anoxybacillus flavithermus* WK1 afcda Geninin
Klonlanması, Ekspresyonu, Saflaştırılması ve Biyokimyasal
Karakteriasyonu**

Ayşenur EMİNOĞLU

Yüksek Lisans

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 12/06/2012

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 20/06/2012

Tez Danışmanı : Doç.Dr. Cemal SANDALLI

Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr. Elif SEVİM

Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr. Hakan KARAOĞLU

Enstitü Müdür: Doç.Dr. Fatih YILMAZ

Rize, 2012



ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezi olarak hazırlanan bu çalışma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı'nda, Doç. Dr. Cemal SANDALLI danışmanlığında gerçekleştirilmiştir.

Gerek yüksek lisans gerekse tez çalışmalarım sırasında iyi bir bilim insanı olmam yolunda beni zorlayan, değerli bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren ve en kısıtlı zamanlarında bile onu ne kadar bunaltsam da bana sabırla zaman ayırarak özellikle laboratuvar çalışmalarımda ilgisini hiçbir zaman esirgemeyen ve bu tezin sonuçlanmasını sağlayan çok değerli hocam Doç. Dr. Cemal SANDALLI'ya,

Çalışmalarım sırasında enzim kinetiği deneylerinde benden yardımını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Serdar ÜLKER'e,

Yoğun tez çalışmalarım süresince karşılaştığım problemlerde manevi destekleri ile beni yalnız bırakmayan Yrd. Doç. Dr. Neslihan SARUHAN GÜLER'e, Yrd. Doç. Dr. Emine AKYÜZ TURUMTAY'ya ve çok sevgili arkadaşım Arş. Gör. Zuhal YAĞMUR'a,

Yüksek lisans çalışmalarım sırasında yanımda olamayan ancak uzakta da olsa sıkıntılı zamanlarımda duaları ile beni yalnız bırakmayan, bana olan sonsuz güveni ile yoluma devam etmeme vesile olan ve yaşamım boyunca tek başına maddi ve manevi her türlü desteği ile yanımda olan sevgili annem Birnaz EMİNOĞLU'na en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayşenur EMİNOĞLU

Rize 2012

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET.....	VI
SUMMARY.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
TABLOLAR DİZİNİ.....	IX
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	X
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. GİRİŞ	1
1.2. Karbonhidrat Esterazlar (CE).....	3
1.3. Karbonhidrat Esteraz 4 Ailesi (CE4)	4
1.4. Kitin Polisakkariti	6
1.5. Kitin Deasetilaz (EC 3.5.1.41)	8
1.5.1. Katalitik Mekanizma	10
1.5.2. Çoklu Atak Mekanizması.....	10
1.5.3. Çoklu Zincir Mekanizması.....	12
1.6. CDA Genleri	13
1.7. Kitin Deasetilaz Aktivitesinin Gösterilmesi.....	15
1.8. CDA'ların Biyokimyasal Özellikleri	16
1.9. Ksilan	17
1.9.1. Ksilinolitik Enzimler	18
1.10. Karboksil Esterazlar	19
1.10.1. Asetil Ksilan Esteraz (EC 3.1.1.72)	19
1.10.2. Asetil Ksilan Esteraz Substratları ve Deneyleri	20
1.10.3. Protein Olarak Özellikleri	22
1.10.4. Substrat Özgünlüğü	23
1.10.5. Reaksiyon Mekanizması	24
1.11. Mikrobiyal Enzimler	24
1.12. Termostabil Enzimler.....	25
1.13. CDA ve AcXE' ların Endüstriyel Önemi.....	26
1.14. Anoxybacillus flavithermus WK1.....	27
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	28
2.1. Materyal, Bakteri Suşları ve Çözümler	28

2.1.1. Kimyasallar	28
2.1.2. Enzimler	28
2.1.3. Substratlar	28
2.1.4. Bakteri Suşları ve Genel Özellikleri.....	28
2.1.5. Besiyerleri	29
2.1.6. Kitler ve Vektörler	29
2.1.7. Primerler.....	29
2.1.8. Çözeltilerinin Hazırlanması.....	29
2.1.9. Enzim Aktivite Tayininde Kullanılan Tampon Çözeltilerin Hazırlanması	30
2.1.10. SDS-PAGE Çözeltilerinin Hazırlanması.....	30
2.2. Yöntem.....	31
2.2.1. <i>Afla</i> Bakterisinin Büyütülmesi	31
2.2.2. <i>afcd</i> a Geninin Baz Diziliminin Analizi.....	32
2.2.3. Nükleotid ve Aminoasit Sıralarına Dayalı Filogenetik Analiz.....	32
2.2.4. <i>afcd</i> a Geninin PZR ile Çoğaltılması	34
2.2.5. <i>afcd</i> a Geninin Aracı Vektöre Klonlanması	34
2.2.6. Kompetent Hücrelerin Hazırlanması.....	34
2.2.7. <i>afcd</i> a Genini Taşıyan Rekombinant pGEM-T Easy Vektörüne <i>E.coli</i> DH 5 α Hücrelerine Transformasyonu ve Pozitif Hücrelerin Seçimi.....	35
2.2.8. <i>afcd</i> a Geninin pET-15b Ekspresyon Vektörüne Klonlanması	35
2.2.9. <i>afcd</i> a Genini taşıyan Rekombinant pET-15b Vektörünün <i>E.coli</i> BL21 Hücrelerine Transformasyonu ve Ekspresyonun Belirlenmesi.....	36
2.2.10. Saflaştırma.....	36
2.2.11. Saf Proteinin Diyalizi	37
2.2.12. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi	37
2.2.13. <i>AfCDA</i> Enziminin Karakterizasyonu	37
3. BULGULAR	42
3.1. <i>afcd</i> a Genlerinin Nükleotid Dizilimi.....	42
3.2. Nükleotid ve Aminoasit Sıralarına Dayalı Filogenetik Benzerliğin Araştırılması.....	42
3.3. Korunmuş Aminoasit Dizilişlerinin Karşılaştırılması	45
3.4. <i>afcd</i> a Geninin PZR ile Çoğaltılması ve pET-15b Ekspresyon Vektörüne Klonlanması.....	46
3.5. <i>E.coli</i> BL21 Hücrelerinde Ekspresyonun Gözlenmesi ve <i>AfCDA</i> Enziminin <i>E.coli</i> BL21 Hücrelerinden Saflaştırılması.....	47
3.6. Enzim Aktivitesinin Gösterilmesi	48
3.6.1. <i>AfCDA</i> Enziminde Ksilanaz ve Asetil Ksilan Esteraz Aktivitesinin Araştırılması	48
3.6.2. Biyokimyasal Karakterizasyon	49

4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	53
5. ÖNERİLER	56
6. KAYNAKLAR.....	57
ÖZGEÇMİŞ.....	71

ÖZET

Karbohidrat esteraz 4 ailesi kitin, asetil ksilan ve peptidoglikan gibi polimerik substratları deasetile ederler. Son zamanlarda bu enzimlerden bazıları enzimolojik olarak karakterize edilmiştir. Termofilik bakterilerden ise bu aileye ait enzimlerle yapılmış sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu ailenin tüm üyeleri NodB'ye homolog domain adı verilen ortak korunmuş bir domain içermeleri ile karakterize edilirler.

Termofilik *Anoxybacillus flavithermus* WK1 bakterisi genom projesi 2008 yılında tamamlanmıştır. Tüm genom karbonhidrat deasetilaz aday genleri için tarandığında iki adet gen belirlenmiştir. Bunlardan bir tanesi 762 baz çifti uzunluğuna sahiptir ve 253 amino asitlik bir protein kodlamaktadır. Bu gen, standart PZR primerleri ile çoğaltılarak histidin kuyruk içerecek şekilde pET-15b ekspresyon vektörünün *NdeI* bölgesine klonlandı. Rekombinant plazmit *E. coli* (*Escherichia coli*) BL21 (DE3)pLysS ekspresyon hücrelerine transforme edilerek ekspres edildi. Rekombinant protein Ni-afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırıldı ve saflığı Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile belirlendi. Enzim aktivitesi için substrat olarak α -naftil asetat kullanıldı ve aktivite SDS-PAGE'de Fast Red boyaması ile gösterildi. AfCDA proteininin biyokimyasal özellikleri spektrofotometrik yöntemle kromojenik substrat olarak *p*-nitrofenil asetat kullanılarak belirlendi. Optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 50 °C ve optimum pH değeri 7,5 olarak belirlendi. Kinetik karakterizasyon çalışmalar substrat olarak *p*-nitrofenil asetat kullanılarak araştırıldı ve K_m değeri 4,33 μ M, V_{max} değeri ise 3333,33 U/mg olarak hesaplandı.

Anoxybacillus flavithermus WK1 geninin nükleotid ve aminoasit dizilimi kullanılarak diğer türlerle olan akrabalık dereceleri incelendi. Filogenetik dendogramda *A. flavithermus* WK1 bakterisinin diğer *Bacillus* türlerinden açıkça ayrıldığı gözlemlendi. *afcda* geni aminoasit sırası, CE-4 ailesinin bilinen üyelerinin aminoasit sıraları karşılaştırılarak ClustalW programı ile korunmuş motifleri bulmak için kullanıldı. Toplam beş motiften dördünün korunmuş olduğu ve motif 2'nin ise tamamen farklı olduğu belirlendi.

Anoxybacillus flavithermus WK1 AfCDA enziminin her hangi bir metal iyonuna bağımlı olmadan aktivite gösterdiği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Kitin deasetilaz, asetil ksilan esteraz, *Anoxybacillus flavithermus* WK1, Klonlama, Ekspresyon, Biyokimyasal karakterizasyon.

SUMMARY

Cloning, Expression, Purification and Enzymatic Characterization of *afcda* Gene From *Anoxybacillus flavithermus* WK1

Family 4 carbohydrate esterases deacetylate polymeric carbohydrate substrates such as chitin, acetyl xylan and peptidoglycan. Although some of these enzymes have recently been enzymologically characterized, they have been limited number of study thermophilic bacteria. All members of this enzyme family have a characteristic homolog domain into NodB.

The genome project of *Anoxybacillus flavithermus* WK1 was determined in 2008. When the all genome was screened for carbohydrate deacetylase gene, two genes were determined as candidate. One of these genes is 762 bp long and encodes a protein of 252 aminoacids in length. This gene was amplified by standard PCR to clone into *Nde*I site of pET-15b expression vector to express with six histidine residues. Recombinant plasmid was transformed into *E. coli* (*Escherichia coli*) BL21 (DE3)pLysS cell and expressed. The recombinant protein was purified by nickel affinity chromatography and its purity was visualized on SDS-PAGE. Activity of recombinant enzyme was shown on SDS-PAGE by using α -naphthyl acetate as a substrate and Fast Red. The enzyme was characterized by spectrophotometrically using chromogenic substrate-*p*-nitrophenyl acetate. Optimum temperature and pH were determined 50 °C and 7,5 respectively. K_m and V_{max} were determined 4,33 μ M and 3333,33 U/mg respectively.

Phylogenetic similarity of *Anoxybacillus flavithermus* WK1 to other species was investigated by using nucleotide and amino acids sequences. Phylogenetic dendogram clearly demonstrated that *Anoxybacillus flavithermus* WK1 is different from the other species. *afcda* gene aminoacid sequences were used to find conserved motifs with comparison of other known members of CE-4 family. Five conserved motifs were investigated and all motifs were found as conserved except motif 2.

It was shown that the *Af*CDA enzyme from *Anoxybacillus flavithermus* WK1 does not need any metal ions to show activity.

Key Words: Chitin deasetylase, Acetyl xylan esterase, *Anoxybacillus flavithermus*WK1, Cloning, Expression, Biochemical characterization

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Karbonhidrat metabolizması üzerinde aktif enzimler.....	2
Şekil 2. CE-4 ailesi tarafından tanınan substratlar ve gerçekleştirilen reaksiyonlar.....	6
Şekil 3. Kitinin kimyasal yapısı.....	8
Şekil 4. Kitinin deasetillenmesi ile elde edilen kitosan.....	9
Şekil 5. Kitin deasetilazın katalitik etkisi.....	10
Şekil 6. <i>M.rouxii</i> kitin deasetilazının etki şekli.....	12
Şekil 7. CDA'ların katalitik mekanizması.....	14
Şekil 8. Ksilan üzerinde etkili olan enzimler.....	20
Şekil 9. <i>afcda</i> genine ait nükleotid ve amino asit diziliminin şematik görüntüsü.....	42
Şekil 10. <i>Bacillus</i> cinsine CE-4 ailesi genlerinin nükleotid dizilimleri kullanılarak oluşturulan benzerlik ağacı.....	43
Şekil 11. <i>Bacillus</i> cinsine CE-4 ailesi proteinlerin amino asit dizileri kullanılarak oluşturulan benzerlik ağacı.....	44
Şekil 12. Farklı mikroorganizmalar arasında CDA proteinlerinde korunmuş 5 adet motifin şematik gösterimi.....	46
Şekil 13. <i>afcda</i> geninin pET-15b ekspresyon vektörüne klonlama basamaklarını gösteren %0,8'lik agaroz jelde analizi.....	47
Şekil 14. Saf AfCDA enziminin (% 12'lik) SDS-PAGE.....	48
Şekil 15. AfCDA proteininin SDS-PAGE (%12)'de gerçekleştirilen zimogram analizinin sonucu.....	49
Şekil 16. Enzime ait pH' ya bağlı bağlı aktiviteyi gösteren grafik.....	50
Şekil 17. AfCDA enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığa ait grafik.....	50
Şekil 18. Michealis-Menten grafiği.....	51
Şekil 19. Lineweaver-Burk grafiği.....	52
Şekil 20. <i>p-NPA</i> 'ın deasetillenmesi sonucu oluşan <i>p-NP</i> için standartı grafiği.....	52

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Tez kapsamında kullanılan tüm primerleri ve kullanım amaçlarını gösteren tablo.....	30
Tablo 2. Filogenetik analizde kullanılan organizmalar ve Gen Bank numaraları.....	34
Tablo 3. Biyokimyasal karakterizasyon çalışmalarında kullanılan substratlar ve enzim aktivitesi sonucu oluşacak ürünler.....	39
Tablo 4. CE-4 ailesine ait korunmuş amino asit dizi sıraları.....	45

SEMBOLLER ve KISALTMALAR

a.a	Amino Asit
<i>Afla</i>	<i>Anoxybacillus flavithermus</i> WK1
α	Alfa
Asp	Aspartik asit
β	Beta
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
dk	Dakika
DMSO	Dimetil sülfoksit
EC	Enzim Komisyonu
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etilen daimin tetra asetik asit
GlcNAc	N-asetil glikozamin
GlcN	N-glikozamin
His	Histidin
IPTG	izopropiltiyo- β -galaktozid
LB	Lauria-Bertani
LBA	Lauria-Bertani Agar
L	Litre
mL	Mililitre
mM	Milimolar
μ L	Mikro litre
4-MUA	4-Metilumbelliferil Asetat
NaCl	Sodyum klörür
NaOH	Sodyum hidroksit
ng	Nanogram
Ni	Nikel
p-NPA	Paranitrofenil Asetat
p-NP	Para nitrofenol
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
rpm	Revolutions per minute
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu

pI	Protein İzoelektrik Noktası
RE	Restriksiyon enzimi
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
[S]	Substrat Derişimi
sn	Saniye
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	Tetrametiletilendiamid
Tris	Tris(hidroksimetil)aminometan
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	Sodyumdihidrojen fosfat.dihidrat
Na ₂ HPO ₄	Disodyumhidrojen fosfat
OD	Optic Density (Optik yoğunluk)

1. GENEL BİLGİLER

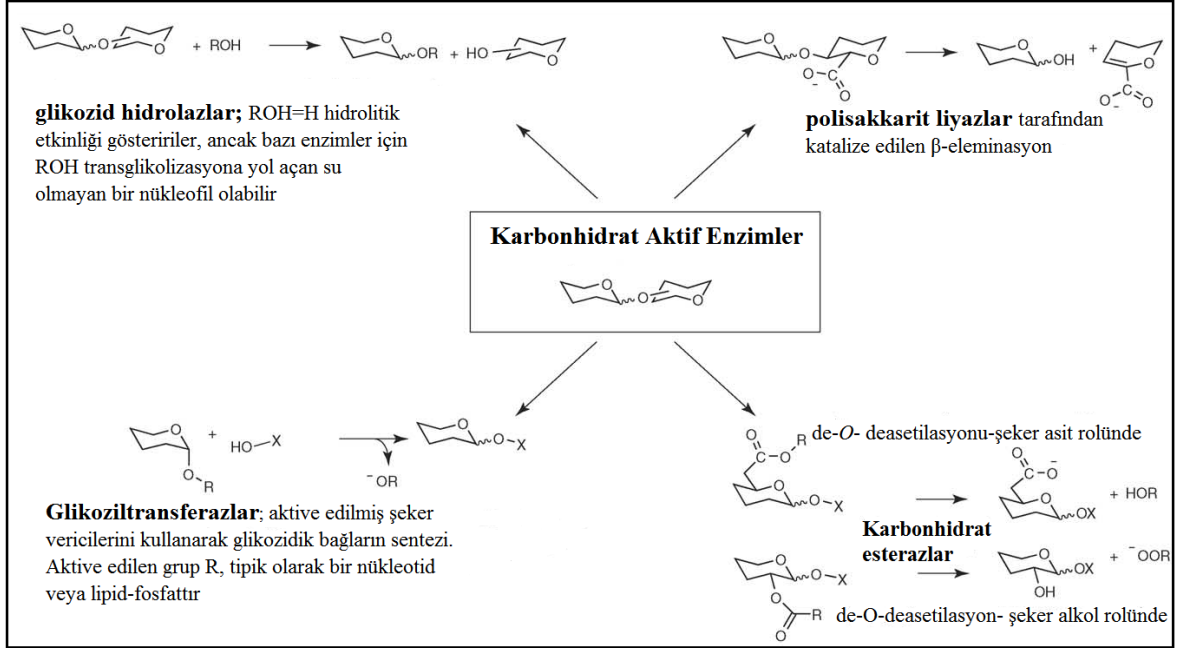
1.1. GİRİŞ

Karbonhidratlar biyolojik sistemlerde önemli rol oynayan organik bileşiklerdir. Karbonhidrat metabolizması tüm yaşam formları için kritik önemdedir ve bu nedenle şekerlerin dönüşümlerini etkileyen enzimler tüm canlı organizmalarda zorunlu olarak bulunur. İki şeker ya da bir şekerle başka bir grup arasındaki enzimatik oluşum ve yıkım serbest şeker oluşturan hidroliz olayı ile meydana gelir.

Glikoprotein, glikoipid ve polisakkarit formundaki karbonhidratlar hücre fizyolojisi ve mikroorganizmaların, bitkilerin ve hayvanların gelişiminde de temel role sahiptirler. Karbonhidrat metabolizması üzerinde aktif enzimler glikokonjugatlar, oligosakkaritler ve polisakkaritlerdeki glikozidik bağları kesen ve yapan, doğada yapısal olarak en çok çeşitlilik gösteren substratlar üzerinde etkili olan bir grup enzimi kapsarlar. Bu karbonhidrat aktif enzimler aminoasit dizi benzerliğine dayalı olarak birkaç aileye ayrılmışlardır (Coutinho ve Henrissat, 1999). CAZy veri tabanı tarafında ortaya konan (URL-1) karbonhidrat aktif enzimleri dizi benzerliğine dayalı bu sınıflandırma, genom dizi analizi sırasında, açık okuma çerçevelerinin (ORF) genel işlevlerinin tahmini, katlanma ve mekanizmaları gibi konularda tam bir bilgi vermede yeterli bir araç sağlamaktadır (Davies vd., 2005).

Glikozid bağlarının oluşumunda, modifikasyonunda ve kırılmasında pek çok enzim etkilidir. Karbonhidrat aktif enzimler, enzimin üzerine eklenmiş katalitik olmayan bir modülle beraber modüler bir yapı gösterdiklerinden, CAZy veri tabanı karbonhidrat mekanizmasında etkili enzimleri iki modül şeklinde tanımlar. Bunlardan ilki glikokonjugatlar, oligosakkaritler ve polisakkaritlerin kırılmasını, biyosentez ve/veya modifikasyonlarını katalize eden katalitik modül yani enzimlerdir. Diğerisi ise katalitik modüle bağlı olduğu bulunan birleşmiş (ortak) modüldür. Bu tanımlamalara göre katalitik modüller; Glikozid hidrolazlar (GH), glikoziltransferazlar (GT), polisakkarit liyazlar (PL) ve karbonhidrat esterazlar (CE) olarak dört aileye ayrılmıştır. Katalitik modüle bağlı olan ve karbonhidrata bağlanan birleşmiş modül ise karbonhidrat bağlanma modülü (Carbohydrate Binding Module - CBM) olarak tanımlanır (Davies vd., 2005).

Glikozid Hidrolazlar (GH); glikozidaz ve transglikozidazları içerirler (Henrissat, 1991; Henrissat ve Bairoch, 1993; Henrissat ve Bairoch, 1996).



Şekil 1. Karbonhidrat metabolizması üzerinde aktif enzimler. Glikozid hidrolazlar; glikozidik bağların hidrolizinden sorumludur. Glikoziltransferazlar; şeker vericilerinden türeyen enerjiyi kullanarak glikozidik bağ sentezini yürütürler. Karbonhidrat esterazlar/deasetilazlar; asetilenmiş şekerlerin -O ve -N asetilasyonunu gerçekleştirirler ve polisakkarit liyazlar; üronik asit glikozidleri üzerinde β -eliminasyon reaksiyonlarını katalize ederler (Davies vd., 2005).

Disakkaritler, oligosakkaritler ve polisakkaritler üzerinde etkili tartışmasız en iyi karakterize edilmiş enzimlerdir (Davies vd., 2005). Bu enzimler glikozidik bağların hidrolizi ve/veya transglikolizasyonundan sorumlu 113 protein ailesinden meydana gelmektedir. GH kodlayan genler, CAZy'de sınıflandırılan enzimlerin büyük çoğunluğunun -neredeysse yarısının (yaklaşık %47'si)- genomuna ilişkin olarak verilmektedir. Biyoteknolojik ve biyomedikal uygulamalardaki yaygın öneminden dolayı GH'lar günümüzde şimdiye kadar CAZy veri tabanında sunulan enzim grupları içerisinde en iyi şekilde karakterize edilmiş enzimleri oluştururlar (Cantarel vd., 2009).

Glikoziltransferazlar (GT); fosfo-aktive olmuş verici bir şekerin uygun bir alıcıya (başka bir şekere, lipide, proteine veya küçük bir moleküle) transferini katalize ederler. (Davies vd., 2005). CAZy'de dizi benzerliğine dayalı 90'dan fazla aile oluşturan ve hemen hemen her organizmada bulunan enzimleri oluştururlar (Cantarel vd., 2009).

Polisakkarit Liyazlar (PL); β -eliminasyon mekanizması kullanarak polisakkarit içeren üronik asitteki glikozidik bağları keserler (Yip vd., 2006). CAZy'de 19 aile ile temsil edilirler (Coutinho ve Henrissat, 1999). Pek çok PL biyoteknolojik ve biyomedikal uygulama alanlarına sahiptir ve az sayıda olmalarına rağmen CAZy veri tabanında

kimyasal olarak en yüksek oranda karakterize edilen örneklerdir.

Karbonhidrat bağlanma modülleri (KBM); kendiliğinden katlanan ve işlevsel olarak kendi başlarına hiçbir enzimatik aktivitesi olmayan ancak yukarıda tanımlanan pek çok enzimin aktivitesini substratı hedefleyerek ve substrat ile uzun bir etkileşimi teşvik ederek etkili hale getirdikleri bilinen protein fragmentleridir (Cantarel vd., 2009).

1.2. Karbonhidrat Esterazlar (CE)

Biyolojik olarak bu enzimler karbonhidratlardaki *-O* (ester) veya *-N* (asetil) gruplarının uzaklaştırılmasını katalize ederler, böylece GH'lerin karmaşık polisakkaritler üzerindeki aktivitelerini kolaylaştırırlar (Cantarel vd., 2009). Aslında şeker deasetilazları daha klasik peptidaz ve esterazlar tarafından sergilenen benzer katalitik özelliği gösterirler. Gerçekte karbonhidrat esterazlarla diğer esterazlar arasında ki özgünlük bariyeri oldukça düşüktür, dizi benzerliğine dayalı sınıflandırma büyük olasılıkla bazı enzimleri karbonhidrat olmayan esterler üzerinde de etkili olabileceği şeklinde dahil edebilir (Cantarel vd., 2009). Üç boyutlu kristalize yapıları ortaya konan CE-1 (bakteriyel ferulat esterazlar), CE-5 (asetil ksilan esterazlar), CE-7 (çok fonksiyonlu ve ksilooligosakkarit deasetilazlar (Vincent vd., 2003), CE-10 ailesinden enzimlerin çoğunluğu, '85C antijeni' mikoliltransferaz ve sınıflandırılmamış fungal ferulat esterazlar (Hermosa vd., 2004) gibi yapısı bildirilen karbonhidrat esteraz/deasetilaz' ların büyük çoğunluğu klasik bir $\beta/\alpha/\beta$ 'serin proteaz' mekanizması kullanırlar (Jenkins vd., 2001). Bu enzimler şekerlerin 'R' grubundan ziyade asiti oluşturmasıyla da biraz olağandışı kabul edilebilirler.

Bazı şeker deasetilazların yapıları ise hem tek hem de çift metal iyonu katalitik merkezi ortaya koyarlar. Dikkati çeken örnekler arasında klasik çinko hidrolaz bölgesi üzerinde orijinal bir α/β çerçevesi sunan CE-11 ailesinden LpxC çinko-bağımlı UDP-3-*O*-asetil-*N*-asetilglukozamin (Whittington vd., 2003; Coggins vd., 2003); tek çinkolu CE-14 *N*-asetil-1-*D*-myo-inozitol-2-amino-2-deoksi- α -*D*-glukopirenozid deasetilaz (Maynes vd., 2003); üyeleri başka şeylerin yanında peptidoglukan, kitin, rizobiyal Nod faktörü ve ksilanın deasetilasyonuna katılan 'NodB homologu' olarak isimlendirilen CE-4 ailesi deasetilazlar ve çift metalli üreaz-benzeri CE-9 ailesi *N*-asetilglukozamin-6-fosfat deasetilazlar gösterilebilir (Vincent vd., 2004).

CAZy sınıflandırması; karbonhidrat esterazlar/deasetilazlar'ı 16 farklı aileye ayırmıştır. Bu ailelerden CE4 ailesi Henrissat'ın sınıflandırmasına göre (Coutinho ve Henrissat, 1999; Coutinho ve Henrissat, 2002) kitin deasetilazları (EC 3.5.1.41), rizobial

NodB kitooligosakkarit deasetilazları (EC 3.5.1.-) (John vd., 1993), peptidoglikan *N*-asetilglikozamin deasetilazları (EC 3.1.1.-) (Psylinakis vd., 2005), asetil ksilan esterazları (EC 3.1.1.72) (Taylor vd., 2006), peptidoglikan deasetilazları (EC 3.1.1.-) (Gilmore vd., 2004; Vollmer ve Tomasz, 2000) ve ksilanaz A, C, D, E (EC 3.2.1.8) (Zhao vd., 2011b)'yi kapsar. Bu ailenin bu beş üyesi de sırasıyla kitin, NodB faktörü, peptidoglikan ve asetil ksilan denilen substratların, hem *N*-asetilglikozamin kalıntılarında *N*-bağlı asetil gruplarının (kitin deasetilazlar, rizobial NodB kitooligosakkarit deasetilazlar ve peptidoglikan *N*-asetilglikozamin deasetilazlar) hem de *O*-asetilksiloz kalıntılarında *O*-bağlı asetil gruplarının (asetil ksilan esterazlar ve ksilanaz A, C, D, E) hidrolizini katalize ederler (Caufrier vd., 2003).

1.3. Karbonhidrat Esteraz 4 Ailesi (CE4)

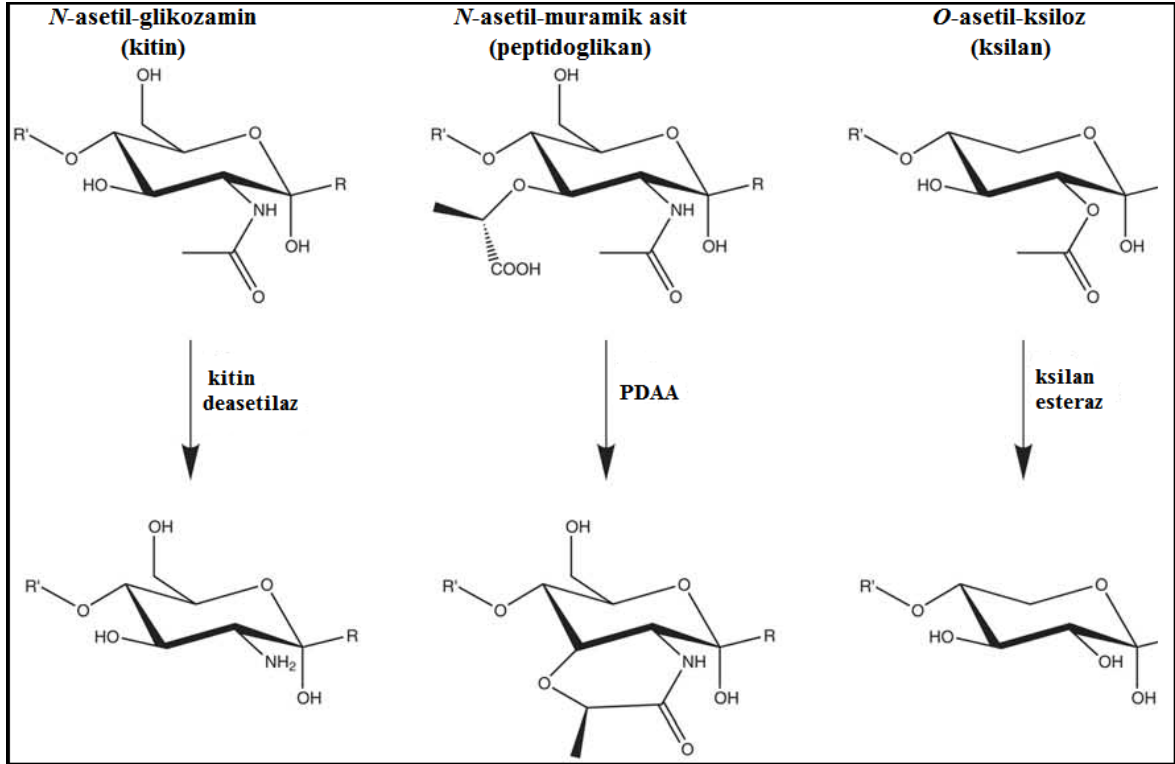
Karbonhidrat esteraz 4 ailesi asetillenmiş poli/oligosakkaritlerin geniş bir kesiminin deasetillenmesini sağlarlar (Caufrier vd., 2003) (Şekil 2). Kitin deasetilaz; bir β (1,4) bağlı *N*-asetilglikozamin polimeri olan kitini, bir fungal hücre duvarı/spor kabuğu bileşeni olan kitosana deasetile eder (Kafetzopoulos vd., 1993a; Tokayasu vd., 2000). NodB; baklagiller ve nitrojen fikse eden bakteriler arasındaki simbiyotik ilişkiyi düzenleyen kitinimsi bir lipopolisakkarit olan Nod faktörlerini deasetile eden rizobial bir proteindir (Long, 1989; John vd., 1993). Asetil ksilan esterazlar; bitki hücre duvarının anahtar bir bileşeni olan *O*-asetillenmiş ksilanın deasetillenmesini sağlarlar (Caufrier vd., 2003). Peptidoglikan deasetilazlar *N*-asetil muramik asit ve *N*-asetil glikozamin birimlerinin bakteriyal peptidoglikanlarda tekrarlayan di-şekerlerini de-*N*-asetillerler (Vollmer ve Tomasz, 2000; Fukushima vd., 2002). Bu enzimlerin hepsi birtakım korunmuş aspartik asit ve histidin birimleri içeren birkaç dizi motifini paylaşırlar.

CE-4 esterazların dizi karşılaştırmaları sayesinde bu enzimlerin “polisakkarit deasetilaz domaini” (Psylinakis vd., 2005) veya “NodB homoloğu domain” denilen korunmuş bir katalitik çekirdek içerdikleri ortaya konmuştur. (Kafetzopoulos vd., 1993a; Caufrier vd., 2003). NodB proteinleri, Nod faktörleri denilen bakteriyal nodulasyon sinyallerinin biyosentezi için elzem olan kitooligosakkarit deasetilazlardır (Denarie vd., 1996) ve baklamsı bitkilerle simbiyotik ilişkiyi düzenleyen bakteriyal sinyal molekülleri olan Nod faktörlerinin sentezinde GlcNAc birimlerini deasetile eden CE-4 ailesinden detaylı şekilde tanımlanan ilk enzimleridir (Long, 1989). Değişik rizobial türlerden Nod faktörleri ortak bir temel yapı paylaşırlar: hepsi indirgen olmayan uç biriminde bulunan bir

N-açıl ile yer değiştirmiş *N*-asetilglikozamin oligomerleridir. Bu *N*-açıl yer değiştirmeleri, *N*-asetilglikozamin oligomerlerinin konak bitkide herhangi bir nodulasyona özel yanıt oluşturmada başarısız olmalarından dolayı tüm Nod faktörlerinin biyolojik aktiviteleri için gereklidir. NodB proteinleri *N*-asetil gruplarını *N*-asetilglikozamin oligomerlerinin indirgen olmayan uç terminal biriminden özel bir şekilde uzaklaştırır. Böylece sıradaki *N*-açılamayı için gerekli olan serbest amino gruplarını sağlarlar (Jhon vd., 1993). *Cellulomonas fumi* ve *Clostridium thermocellum* ksilanazlarında bulunan NodB homoloğu domainin fonksiyonel olduğu, ksilana karşı deasetilaz aktivite sergilediği ve böylece asetillenmiş ksilanın ksilanazlar tarafından yeterli şekilde hidrolizine katkıda bulunduğu bulunmuştur (Laurie vd., 1997; Fernandes vd., 1999).

CE-4 ailesi enzimleri, çarpık bir silindirik (α/β)₈ katlanmasına sahiptirler (Oberbarnscheidt vd., 2007). CE4 1000'in üzerinde açık okuma çerçevesi ile karbonhidrat esterazların gelmiş geçmiş en geniş ailesidir (Oberbarnscheidt vd., 2007). Bu aile üyeleri sadece genişliğinden dolayı değil aynı zamanda çoğu üyesinin metal iyonu bağımlı olmasından dolayı da dikkat çekicidir. Dahası CE4 ailesi; hem, asetil ksilan esteraz gibi, klasik de-*O*-asetilaz aktivitesi hem de aynı zamanda kitin (Hekmat vd., 2003), kitooligosakkarit rizobial Nod-faktörleri ve peptidoglikanı (Psylinakis vd., 2005; Blair 2005) içine alan çeşitli *N*-asetilglikozamin temelli substratların degradasyonuna ve/veya yeniden biçimlendirilmesine katılan “NodB süperailisi” gibi de-*N*-asetilaz aktivitesine sahip üyeleri kapsar (Taylor vd., 2006) (Şekil 3). Bu enzimlerin aktivitelerinin divalent kasyonu eklenmesiyle arttığına dair birkaç çalışma olmakla beraber (Martinou vd., 2002; Caufrier vd., 2003), hiçbir metal iyonu ilavesi olmaksızın tam bir aktiviteyi ortaya koyan (Hekmat vd., 2003) başka çalışmalar da mevcuttur (Blair vd., 2005). Metal iyonu bağımlı olanların bir çoğu Zn⁺² hidrolazda gözlemlendiği gibi tek divalent (tipik olarak Zn⁺² veya Co⁺²) metal iyonu aktif merkezine sahiptirler (Hernick vd., 2005). Metal iyonu; metal iyonu koordinasyonunu tamamlayan iki histidin ve bir aspartik asit ile su için Lewis asiti nükleofilik atak desteği yapmaktadır (Taylor vd., 2006).

CE-4 ailesinden ilk kez detaylı yapısı ortaya konan enzim NodB proteinidir. Gram-pozitif bakteri genomlarında, muhtemel polisakkarit deasetilazları kodlayan çok sayıda açık okuma çerçevesi tanımlanmıştır (Psylinakis vd., 2005). *Bacillus cereus* ATCC 14579 genomunun analizi 11 polisakkarit deasetilaz homoloğunun varlığını ortaya koymaktadır (Ivanova vd., 2003).



Şekil 2. CE-4 ailesi tarafından tanınan substratlar ve gerçekleştirilen reaksiyonlar (Caufrier vd., 2003)

1.4. Kitin Polisakariti

Kitin ve kitosan polimerik zincirleri; kitin için GlcNAc veya kitosan için GlcN üniteleri ağırlıklı olmak üzere, β -(1,4) glikozidik bağlarıyla bağlı *N*-asetil-D-glukozamin (GlcNAc) ve D- glukozamin (GlcN) ünitelerinden oluşan ortak polimerlerdir. Kitin uzun zaman kullanılmamış bir doğal kaynakken, son yıllarda eşsiz biyolojik bozunabilirlikleri, biyolojik geri dönüşebilirlikleri, biyolojik uyumlulukları, fizyolojik stabilite ve hidrofilik karakterlerinden ötürü kitosan ve kitooligosakkaritlere (COS) olan ilgi artmıştır. Bu özelliklere dayanarak kitosan ve COS'e tarım, kozmetik, su arıtma, gıda sanayi, farmosötik ve tıbbi biyoloji gibi çeşitli sahalarda geniş ve artan bir şekilde başvurulmaktadır. Gerçekte kitosanın çoğu biyolojik aktivitesi polimerin moleküler büyüklüğünü tanımlayan polimerizasyon derecesine (PD), yük yoğunluğunu tanımlayan asetilasyon derecesine (AD) ve kitosan içindeki GlcNAc ve GlcN payını tanımlayan asetilasyon motifine (AM) dayanmaktadır (Zhao vd., 2011b).

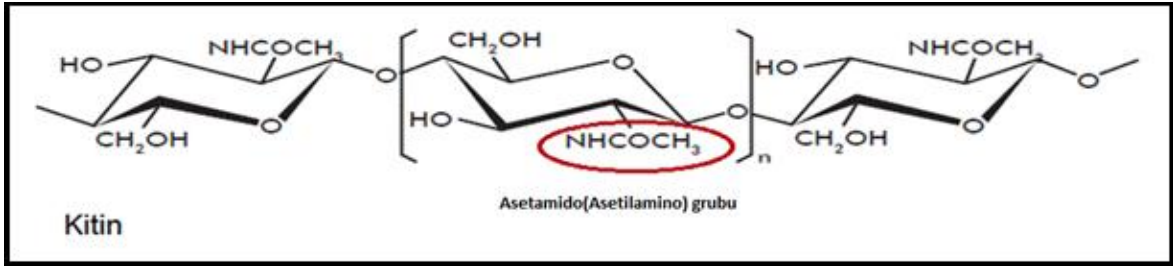
Kitin; selüloza benzer şekilde β -(1-4)-bağıyla bağlı *N*-asetil-D-glukozamin ünitelerinden oluşan, selülozdan sonra en çok bulunan, kolayca elde edilebilir ve yenilenebilir doğal bir homopolimerdir (Tsigos vd., 2000). Bu polimeri Henri Braccanot

1811’de fungal türler olan *Agaricus*, *Hydnum* ve *Boletus*’da keşfetmiş ve “Fungin” olarak isimlendirmiştir. Odier ise 1823’te bu polimeri böcek kütikülünde bulmuş ve Yunanca gömlek/zarf anlamına gelen “Kitin” adını vermiştir. Doğada her yıl 10 gigaton kitin sentezlenmekte ve degrade edilmektedir (Ghormade vd., 2010). Pek çok omurgasız hayvanın dış iskeletinde veya kütikulasında ve çoğu fungusun hücre duvarında ortak olarak bulunur (Austin vd., 1981). Yüksek düzeyde kristalize yapısından dolayı kitin sulu çözeltilerde ve organik çözücülerde çözülebilir değildir (Hirano, 1996). Kitinin kolayca çözünebilir olmaması endüstriyel uygulamalarını kısıtlamaktadır (Kurita, 1986). Kitin polimeri %0,9 asetilasyon derecesi, %7 azot içeriği gösterir ve azot/karbon oranı 0.146’dır (Deshpande, 2005).

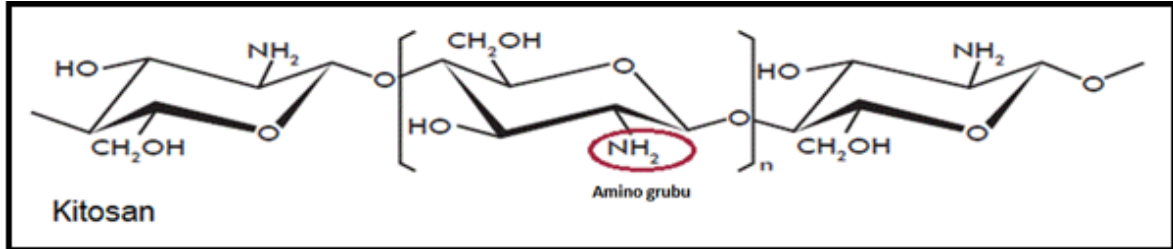
Kitinin deasetile olmuş formuna “kitosan” denir (Şekil 4 ve 5) ve kitosan kitine kıyasla daha kolay çözünebilir. Kitosanın asetilasyon derecesi % 0,4’ten daha az ve nitrojen içeriği %7’dir (Patil vd., 2000). Kitosan doğal olarak oluşan ve kitinin *N*-deasetilasyonu ile elde edilen polikasyonik bir biyopolimerdir. Kitosan adı özgün bir şekilde tanımlanan bir içerikten ziyade asetillenmiş ünitelerin çeşitli kısımlarıyla beraber bulunan bir ortak polimer ailesini ifade eder (Tsigos vd., 2000).

Kitosan; biyolojik olarak degrade edilebilir, hayvanlar için toksik olmayan, asitli çözeltilerde çözünebilir, çeşitli fiziksel formları bulunan ve kitinden daha kolay işlenebilir bir polimerdir (Hirano, 1996; Dodane ve Vilivalam, 1998). Bu nedenle kitosan pek çok endüstriyel uygulama için büyük potansiyeli olan özellikler sunmaktadır (Tsigos vd., 2000). Bugün büyük çoğunluğu Japonya’da bulunan birkaç şirket karides ve yengeç kabuklarından her yıl 100 milyar tondan fazla kitosan üretmektedir. Başlıca uygulama alanları arasında su arıtma, biyomedikal uygulamalar (yara kapatma ve yapay deriyi içine alan) ve kişisel bakım ürünleri yer almaktadır (Hirano, 1996; Koide, 1998). Bunlara ek olarak kitin ve kitosan oligomerleri de dikkate değer ölçüde ilgi çekmektedir. Çünkü bunların antitümör ve antimikrobiyal aktivite gibi, belirli ilginç fizyolojik aktiviteler (Shahidi vd., 1999; Shigemasa ve Minami, 1996), ve bitkiler için uyarıcı aktivite sergiledikleri bildirilmiştir (Shahidi vd., 1999). Dahası kitin ve kitosan oligomerleri sulu çözeltilerde çözünebilir ve çeşitli analitik işlemlerle kolayca karakterize edilebilirler. Bugün ticari olarak kitosan, yüksek sıcaklıklarda konsantre NaOH veya KOH (%40-50)’ın kullanıldığı heterojen bir işlemle yoğun termokimyasal süreçler yoluyla üretilmektedir. Bu süreç çevresel olarak güvenli olmayan ve kolayca kontrol edilemeyen, çok geniş ve heterojen çeşitlilikte ürünlerin oluşumuna neden olmak gibi farklı kimyasal prosedürlerin

çoğu dezavantajını paylaşmaktadır (Chang vd., 1997). Benzer olarak kitosan oligomerleri kitosan polimerlerinin asitle kısmen hidrolizi yoluyla hazırlanmaktadır. Spesifik kitosan oligomerlerinin hazırlanmasında lizozim ve tri-*N*-asetilkitotrios türevlerinin substrat olarak kullanıldığı kimyasal enzimatik bir metotda bildirilmiştir (Akiyama vd., 1995). Ancak her iki yöntemle meydana gelen ürünler farklı polimerizasyon derecelerinde rastgele karıştırılmış kitosan oligomerleridir (Tsigos vd., 2000). Kitosan polimer ve oligomerlerinin hazırlanmasında kitin deasetilazın kullanımı potansiyel olarak tüm bu olumsuzlukların çoğunun üstesinden gelebilecek enzimatik bir süreci gündeme getirmektedir.



Şekil 3. Kitinin kimyasal yapısı. poli- $[\beta$ -(1,4)-2-amino-2-deoksi- β -D-glukopiranoz] şeklindedir. Kitin ve kitosan polisakkaridleri, kimyasal olarak selüloza benzemekle birlikte kendi aralarında birtakım farklılıklar göstermektedir. Selülozda, ikinci karbon atomuna bağlı hidroksil (-OH) grubu bulunurken, kitinde asetamid (-NHCOCH₃), kitosanda ise amino (-NH₂) grubu bulunmaktadır (Demir ve Seventekin, 2009).



Şekil 4. Kitinin deasetillenmesi ile elde edilen kitosan

1.5. Kitin Deasetilaz (EC 3.5.1.41)

Kitin deasetilazlar (CDA; EC 3.5.1.41) kitin ve kitosanın *N*-asetilglukozamin ünitelerinin asetamido gruplarını hidroliz ederler, böylece glukozamin ve asetik asit oluştururlar (Zhao vd., 2011b). Kitin deasetilaz enzimi CAZy (URL-1) veri tabanında tanımlandığı şekilde karbonhidrat esteraz 4 ailesi (CE-4) üyelerinden birisidir (Coutinho ve Henrissat, 1999) Günümüze kadar CDA kodlayan genleri belirlenen veya *in vitro* CDA aktivitesinin tanımlandığı CDA üreten az sayıda mikroorganizma bildirilmiştir (Ghormade vd., 2010). Bunlar arasında denizel bakteriler, birkaç böcek ve çeşitli funguslar vardır.

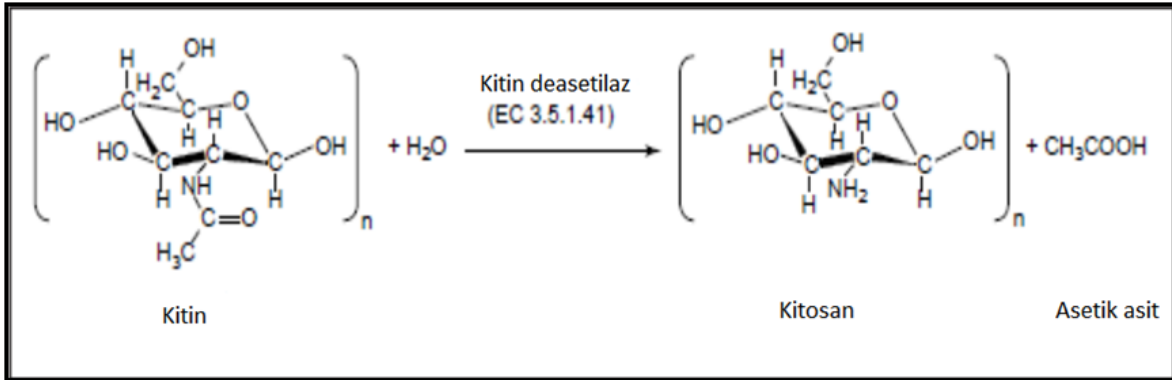
(Zhao vd., 2010). Buna zıt olarak çoğu çevresel organizma, henüz keşfedilmemiş ancak biyoteknolojik uygulamalar için eşsiz özellikte CDA'ların bulunması yönünden güçlü potansiyele sahiptir.

Kitin deasetilaz ilk kez *Mucor rouxii* ekstraktından izole edildi (Araki ve Ito, 1975) ve daha sonra enzimin ham kitini kitosana dönüştürerek hücre duvarı sentezine katıldığı bulundu (Davis ve Bartnicki-Garcia 1984). O zamandan bu yana değişik fungusların (*Mucor rouxii* (Kafetzopoulos vd., 1993b), *Absidia coerulea* (Gao vd., 1995) *Aspergillus nidulans*, *Colletotrichum lindemuthianum* gibi) miselyum ekstraktlarından izole edilerek kitin deasetilazların biyokimyasal karakterizasyonu yapılmıştır (Zhao vd., 2010). Bunların arasında *Colletotrichum lindemuthianum* kitin deasetilazı biyokimyasal özelliklerini (Tokuyasu vd., 1996; Blair vd., 2006), katalitik mekanizmasını (Tokuyasu vd., 2000; Hekmat 2003) ve biyolojik rolünü (Kauss vd., 1983) içerecek şekilde üzerinde en iyi çalışılmış olanıdır. Bir seri kinetik çalışma sonucunda *C. lindemuthianum*'daki kitin deasetilazın deasetilasyon modelinin *M. rouxii*'ninkinden tamamen farklı olduğu bulunmuştur. Böylece işlevsel olarak birbirinden farklı enzimlerin anlaşılmasına dayanarak enzimatik deasetilasyon ürününün sadece deasetilasyon derecesinin (DA) değil asetilasyon modelinin (PA) de kitinin kitin oligomerlerinden kitosana ya da kitosan oligomerlerine enzimatik dönüşümü sırasında da kontrol edilebilir (Zhao vd., 2011b).

Değişik kaynaklara ait CDA'ların aktivite, kararlılık, özgünlük ve verimlilik yönünden birbirinden farklı olabileceği artık bilinmektedir. Değişik kaynaklara ait CDA'lar kullanılarak iyi tanımlanmış kitooligosakkarit (COS) ürünleri belirlenmiş ve karakterize edilmiştir (Zhao, vd. 2011b). Örnek olarak *C. lindemuthianum*'un CDA'sı (Tokuyasu vd., 1997) ve *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 (Tanaka vd., 2004) özellikle GlcNAc-GlcNAc'yi GlcN-GlcNAc'ye dönüştürebilir. Bunun yanı sıra *C. lindemuthianum* GlcN-GlcN'den GlcNAc-GlcN'nin enzimatik sentezi için kullanılabilir (Tokuyasu vd., 1999) ve *T. kodakaraensis* KOD1'de aynı şekilde GlcNAc'yi GlcN'ye dönüştürebilir (Tanaka vd., 2004). *M. rouxii* ve *Absidia corulea* CDA'ları GlcNAc-GlcNAc'i hiçbir şekilde deasetile edemezken (Gao vd., 1995; Kafetzopoulos vd., 1993a), *Vibrio cholerae* CDA'sı özellikle GlcNAc'yi GlcNAc-GlcN'ye dönüştürebilir (Li vd., 2007) .

Tüm bunların yanısıra yeni CDA'ların keşfi CDA'ların biyolojik rolünün anlaşılmasına yardımcı olabilir (Zhao, vd. 2011b). CDA'ların uygun spor oluşumu (Matsua vd., 2005; 1996; Christodoulidou vd., 1999), hücre duvarı bütünlüğü (Baker vd., 2007) ve olgunlaşmamış kitinin kitosana dönüşümü süresince kendi kendini korumada (El

Gueddari vd., 2002; Blair vd., 2006) ihtiyaç duyulan elzem enzimler oldukları biyolojik olarak doğrulanmıştır (Zhao, vd., 2011b).



Şekil 5. Kitin deasetilazın katalitik atkisi; kitin kitosan ve asetat oluşturmak üzere kitin deasetilaz enzimi tarafından desetiltenir (Tsigos vd., 2000)

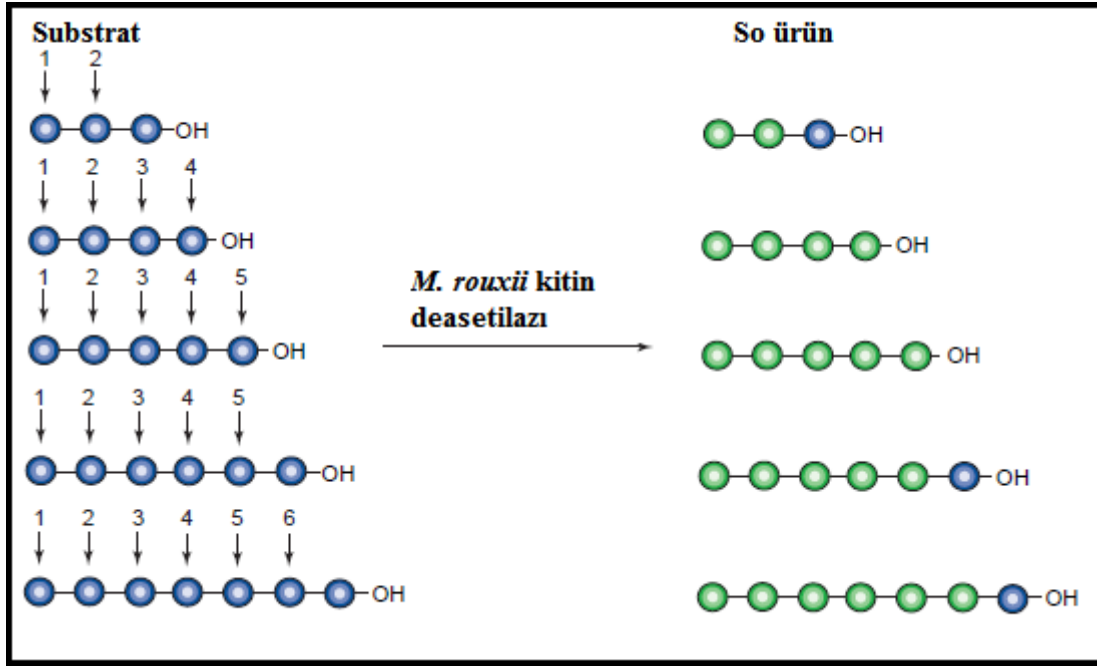
1.5.1. Katalitik Mekanizma

CDA'ların substrat özgünlükleri ile ilgili değişik uzunlukta ve deasetilasyon derecesinde farklı substratlarla yapılan pek çok çalışma mevcuttur (Ghormade vd., 2010) ve çoğu CDA'nın sadece suda çözülebilir kitin substratlarını tercih ettikleri bulunmuştur (Zhao vd., 2011b). Hatta *M. rouxii* CDA'sının ve *Streptomyces lividans*'ın hem doğal hem de kesilmiş asetil ksilan esterazının, peptidoglikan substratları üzerinde inaktif durumdayken; glikol kitin, ksilan, kitin-50 ve (GlcNAc)₄ susbstratları üzerinde aktif olduklarını bildiren Caufrier ve arkadaşları tarafından çalışılmış olan seçilmiş birkaç enzimin substrat özgünlükleri Karbonhidrat Esteraz 4 ailesi altında sınıflandırılmıştır (Caufrier vd., 2003). Kıyaslandığında CDA'ların katalitik mekanizması üzerine az sayıda bilgi bulunmaktadır. Güncel olarak katalitik mekanizması iyi şekilde karakterize edilmiş sadece iki CDA bulunmaktadır (Zhao vd., 2011b). Bunlardan *M. rouxii* CDA'sının “çoklu atak”, *C. lindemuthianum* CDA'sının ise “çoklu zincir” mekanizmasına göre etki ettiği belirlenmiştir.

1.5.2. Çoklu Atak Mekanizması

Çoklu atak mekanizmasında CDA'nın kitin zincirine bağlanmasını takiben deasetilasyon gerçekleşir ve daha sonra sıradaki zincire bağlanarak deasetilasyona devam eder (Şekil 6). Örnek olarak *M. Rouxii* 'den CDA'nın etki şekli özellikle *N*-asetillenmiş kitosan (Martinou vd., 1998) ve *N*-asetilkitooligosakkarit (Tsigos vd., 1999) substratları üzerinde çalışılmıştır. *M. rouxii* CDA'sının etki şekli polimerizasyon derecesi ortalama 30

olan, % 32 oranında gelişi güzel deasetile olmuş suda çözülebilir kitosan substratı üzerinde araştırılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda ekzo tip enzimin, hem kitosan polimerleri hem de kitin oligomerleri substratlarının asetil gruplarını, sıralı bir şekilde takip eden deasetilasyonun ardından, çoklu atak derecesi üç olacak şekilde (Tsigos vd., 2000) başka bir zincire bağlandığı, çoklu atak mekanizmasına göre hidroliz ettiği bulunmuştur (Şekil 7A.) (Zhao vd., 2011b). Aynı substratta ardarda gelen *N*-asetil-D-glkozamin birimlerinin maksimum sayısı üç olduğundan dolayı bu, enzim tarafından gerçekleştirilebilecek en yüksek deasetilasyon miktarıdır (Martinou vd., 1998). Aynı şekilde *M. rouxii* CDA'sının kitin oligosakkaritleri (DP 2-7) üzerindeki etkisi de çalışılmıştır (Tsigos vd., 1999). Yapılan çalışmada oligomerin uzunluğunun da enzimin etkisi üzerinde etkili olduğu gözlenmiştir (Şekil 6). Enzim sadece deasetilasyon derecesi ikiden daha yüksek olan kitin oligomerlerini etkili şekilde deasetile edebilmekte ve ilk deasetilasyon oligomerin indirgeyici olmayan uç biriminde gerçekleşmektedir. İlave olarak deasetilasyonun kapsamı substratın uzunluğuna bağlıdır. Polimerizasyon derecesi 1-7 arasında olan kitin oligomerleri test edildiğinde (GlcNAc)₄ ve (GlcNAc) tamamen deasetile olurken, (GlcNAc)₃, (GlcNAc)₆ ve (GlcNAc)₇'nin indirgeyici uç birimleri bilinmeyen bir nedenden dolayı her zaman sağlam kalmaktadır (Tsigos vd., 1999) (Şekil 6). Tetra-*N*-asetilkitotetraoz ve penta-*N*-asetilkitopentoz enzim tarafından tamamen deasetile edilirken, tri-*N*-asetilkitotrioz, hekza-*N*-asetilkitoheksoz ve hepta-*N*-asetilkitoheptaoz'da indirgeyici uç kalıntısı bozulmaz. Dahası enzim önce ikiden fazla polimerizasyon derecesine sahip kitin oligomerlerinin tümünün indirgeyici olmayan ucundan bir asetil grubunu uzaklaştırır ve daha sonra ilerleyerek diğer asetamido (asetilamino) grubunun hidrolizini katalize eder (Tsigos vd., 2000). Bu mekanizma enzimin etkinliğini polimerik substratlar üzerinde gösterdiğini andırmaktadır (Martinou vd., 1998). Değişik kaynaklardan kitin deasetilazlar, kitin substratları üzerinde farklı enzimatik aktivite modelleri göstermişlerdir. *M. rouxii* CDA'sının etki şekli özellikle *N*-asetile olmuş kitosan (Martinou vd., 1998) ve *N*-asetilkitooligosakkarit (deasetilasyon derecesi 1-7) (Tsigos vd., 1999) substratları üzerinde çalışılmıştır.



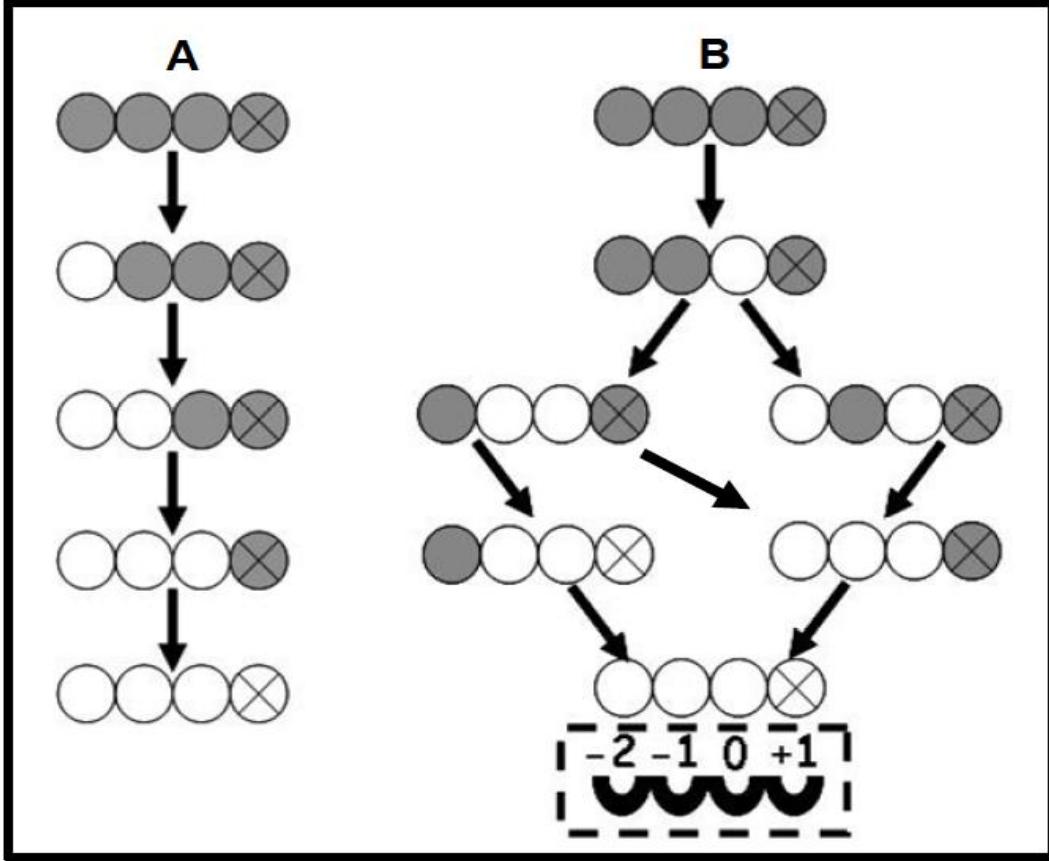
Şekil 6. *M.rouxii* kitin deasetilazının etki şekli. Mavi küreler *N*-asetil-D-glikozamin birimlerine karşılık gelmektedir. Yeşil küreler deasetile olmuş karşılıklardır (D-glikozamin). Rakamla gösterilen oklar deasetilasyonun düzenine ve bölgesine işaret etmektedir. Enzim ilk başta oligomerlerin indirgen olmayan son uç birimlerinden deasetilasyonu başlatır ve daha sonra kademeli bir düzende bir sonraki asetilamino grubunun hidrolizini katalize eder. Tetra-*N*-asetilkitotetraoz ve penta-*N*-asetilkitopentaoz tamamen deasetile olurken tri-*N*-asetilkitotrioz, hekza-*N*-asetilkitoheksoz ve hepta-*N*-asetilkitoheptaoz'da indirgen son uç birimleri bozulmamış olarak kalır.

1.5.3. Çoklu Zincir Mekanizması

M. rouxii CDA'sı ile kıyaslandığında, *C. lindemuthianum*'un CDA'sı ile ilgili daha geniş araştırmalar yapılmıştır. *M.rouxii* CDA'sından farklı olarak, *C. lindemuthianum*'un ekstrasellüler CDA'sı asetil gruplarını enzimin bir aktif enzim-polimer kompleksi oluşturduğu ve ayrılarak yeni bir aktif kompleks oluşturmadan önce sadece bir asetil grubunun hidrolizini katalizlediği, çoklu zincir mekanizmasına göre hidroliz etmektedir (Zhao vd., 2010b). Enzim (GlcNAc)₃ ve (GlcNAc)₄'ü tamamen deasetile edebilmekte ancak (GlcNAc)₂'nin indirgen uç birimi deasetile edilememektedir (Tokuyasu vd., 1997)

Reaksiyon mekanizmasını daha iyi anlayabilmek için enzimin dört alt bölgeye (-2,-1,0 ve +1) sahip olduğu öngörülmüş (Şekil 7B.) (Zhao vd., 2010b). Enzim dört GlcNAc biriminin dizisini güçlü şekilde tanır ve 0 alt bölgesinde bulunan *N*-asetil gruplarının GlcNAc birimlerini özel bir şekilde deasetile eder. Asetilasyon değeri -1 veya +1 alt bölgelerinin GlcNAc birimi yerine GlcN birimiyle işgal edilmesinden etkilenmezken, dört

alt bölgeden yalnızca -2, substratın GlcNAc birimlerinin *N*-asetil gruplarını güçlü şekilde tanır (Tokuyasu vd., 2000). Substratın indirgen olmayan ucundan indirgen ucuna doğru GlcNAc birimleriyle etkileşim içindeki dört enzim alt bölgesinin varlığı deneysel olarak doğrulanmıştır. Turnover sayısı *n* den bağımsızdır ve 0 alt bölgesindeki asetamido gruplarının hidrolizinin gerçek sabit oranını verir (Hekmat vd., 2003).



Şekil 7. Şekil A, Gri ve açık daireler GlcNAc ve GlcN'leri temsil etmektedir. İndirgen uç birimleri X içeren dairelerle gösterilmektedir. Oklar deasetile edilen (GlcNAc) dizilerine işaret etmektedir. (GlcNAc)₄ *M.rouxii* kitin deasetilazı tarafından indirgen olmayan uç birimlerinden kademeli çoklu atak modunda deasetile edilmektedir. Şekil B, (GlcNAc)₄ *C. lindemuthianum* kitin deasetilazı tarafından çoklu zincir modunda deasetile edilmektedir. -2, -1, 0, +1 ile temsil edilen dört alt bölgeden yalnızca 0 katalizden sorumludur.

1.6. CDA Genleri

Kitin deasetilazlar çeşitli fungus ve böcekten klonlanmış ve karakterize edilmiştir (Shrestha vd., 2004; Tokuyasu vd., 1999; Luschnig vd., 2006; Wang vd., 2006; Yamada vd., 2008; Toprak vd., 2008; Kafetzopoulos vd., 1993a; Gauthier vd., 2008; Jeraj vd., 2006; Mishra vd., 1997; Matsuo vd., 2005; Guo vd., 2005; Dixit vd., 2008).

Enzimler yüksek derecede homologturlar, dahası asetil ksilan esterazlar, ksilanazalar, peptidoglikan deasetilazlar ve *Bacillus sp.*'de birkaç karakterize edilmemiş açık okuma çerçevesinde (ORF) bulunan belirli bir bölge olan, rizobiyal nodulasyon proteinleri (NodB proteinleri) ile belirgin ve kayda değer bir benzerlikte olan evrensel bir korunmuş bölge sergilerler. Bu korunmuş domain NodB homologu domain olarak adlandırılır (Tsigos vd. 2000; Coutinhove Henrissat, 1999).

Kitin deasetilaz ailesinin çoklu dizi karşılaştırmaları, dizinin CE-4 ailesinde deasetilaz domainini oluşturan aktif bölge olan beş iyi korunmuş katalitik motif içerdiğini göstermiştir (Blair vd. 2006). Bu beş katalitik motif, *Strptococcus pneumoniae* peptidoglikan deasetilazı ve *Streptomyces lividans* asetil ksilan esterazı gibi CE-4 ailesinin diğer üyelerinde de benzer şekilde gözlenen birkaç histidin ve aspartik asit kalıntısı içerir (Blair vd., 2005).

Motif 1 (TFDD) iki aspartik asit birimi içerir; bir tanesi çinko veya kobalt ile etkileşime girer ve substrattan salınan asetata bağlanır. Motif 2 (HSWSHP) metal iyonuna bağlanan iki histidin ve ilmeği dengede tutmak için ikinci histidinle bağlanan bir hidrojen meydana getiren bir serin veya tireonin içerir. Motif 3 (RPPY) aktif bölge yarığının bir kısmını oluşturur ve asetata bağlanma, çinkoya bağlanma ya da katalitik aspartat birimlerini koordine etmeyi içeren farklı rollere sahiptir. Tirozin birimi asetatla birlikte hidrojen bağına dahil olur ve bu birimin alanine mutasyonu *S. pneumoniae* peptidoglikan deasetilazını inaktive etmiştir. Motif 4 (DSLWD) en kritik birim olan triptofanla birlikte aktif bölge yarığının diğer kısmını meydana getirir (Zhao vd., 2011b). Motif 5 (GSIVLMH) asetilin metil grubuna bağlanan hidrofobik bir cep meydana getiren bir lözin ve bir histidin birimi ile ürün olan asetatla birleşen bir hidrojen bağı meydana getiren bir histidin içerir (Blair vd., 2005; Blair vd., 2006).

Blair ve arkadaşları tarafından CE-4 ailesinin diğer iki üyesi olan *S. pneumoniae* peptidoglikan deasetilaz (Blair vd., 2005) ve *Bacillus subtilis* peptidoglikan deasetilaz ile karşılaştırılarak ilk kez üç boyutlu yapısı tanımlanan kitin deasetilaz *C. lindemuthianum* CDA' dır (Blair 2004). Enzimlerin TIM silindirik yapısına benzer şekilde, $(\beta/\alpha)_8$ katlanması içeren bir üçüncül yapısı varsayılmaktadır (Zhao vd., 2011b). İlave olarak *C. lindemuthianum* kitin deasetilazının kristal yapısı, diğer CE-4 ailesi üyelerinde de birkaç istisna ile korunmuş olan iyi karakterize edilmiş bir çinko-bağlanma motifi (His-His-Asp ortaya koymaktadır (Blair vd., 2005; Blair vd., 2006). Gözlenen iki tarafı yüklü zincir çifti, kofaktör olan çinkoyla sıkı şekilde birleşmiş nükleofil olan bir su molekülü kullanarak

asit/baz katalizini gerçekleştiren korunmuş bir Arg142 ile bağlı katalitik baz (Asp49) ve korunmuş bir Asp172 ile bağlı katalitik asit (His206) ten oluşur (Blair vd., 2005).

1.7. Kitin Deasetilaz Aktivitesinin Gösterilmesi

CDA aktivitesini ölçmek için farklı deasetilazon derecesine sahip farklı substratlar kullanılmıştır. Bunları glikol kitin, koloidal kitin, toz haline getirilmiş kitin, kullanıma hazır sınıf kitin (BDH), yengeç kitini, Katakura kitini, Sigma- α kitini, kitin CHA-2, γ -kitin, karboksimetil kitin, α -1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 6-*N*-asetilglukozamin galaktan, *N*-asetilglukozamin ve (GlcNAc)₂₋₆ kapsar (Arakı ve Ito, 1975; Hunt vd., 2008; Gauthier vd., 2008; Tokuyasu vd., 1996; Matsuo vd., 2005).

M. rouxii'de kitin deasetilaz aktivitesinin belirlenmesi için *N*-asetil grupları radyoaktif işaretlenmiş *O*-hidroksillenmiş kitin (glikol kitin) in substrat olarak kullanıldığı radyoaktif bir yöntem bildirilmiştir (Arakı ve Ito, 1988). Yöntem hassas olmasına rağmen ticari glikol kitinde *O*-hidroksillenmiş grupların türevleşmesinin derecesinin ve dağılımının belirlenmesi ve türevleşmenin enzim aktivitesi üzerindeki etkilerinin tayin edilmesi zordu. Dahası bu yöntem radyoaktif olarak işaretlenmemiş doğal substratların deasetilasyon sürecini gözlemlemede kullanılamazdı (Ghormade vd., 2010). Kauss ve Bausch (Kauss Bauch, 1988) etilen glikol kitinin NaNO₂ ile depolimerizasyonu için nitrik asit ve 3- metil-2-benzotiazolin hidrazon (MBTH) ve MBTH ile salınan glükozaminin tayinini için kolorimetrik yöntem kullandılar (Ghormade vd., 2010). CDA aktivitesi hekza-*N*-asetilkitohexozdan enzimatik bir yöntem olan Bergmayer'in üç çiftli enzim reaksiyonu kullanılarak asetat salınımı ile de ölçüldü (Martinou vd., 1995).

CDA'nın izozimleri PAGE jeldeki enzimlerin etilen glikol içeren jelle difüzyonu ile transferini içeren aktivite boyama yöntemiyle tayin edildi (Trudel ve Asselin, 1990). Doğal (native) PAGE'in bir floresan parlatici (Calcofluor white M2R) kullanılarak farklılaştırıcı boyama ile boyanması araştırıldı. Calcofluor white M2R jelle gömülü olan kitinden daha çok kitosan ile etkileşime girer ve uzatılmış bir boya giderme işleminden sonra bile UV altında daha çok floresan ışımaya gösterir. Bunun da yanı sıra, CDA aktivitesi kitosanın nitrik asit ile depolimerizasyonu sonucu aynı bandı non-floresan hale getirmesi ile de tespit edilebilir (Ghormade vd., 2010). En son olarak proteinin elektroblotlama ile transferinin aktivite boyaması için CDA'nın kitin içeren jelle hızlı bir şekilde geçişini sağladığı gösterilmiştir (Toprak vd., 2008).

1.8. CDA'ların Biyokimyasal Özellikleri

Bugüne kadar çeşitli organizmalardan izole edilen saf kitin deasetilazların moleküler kütleleri, optimum pH ve sıcaklıkları, metal iyonlarının etkisi ve substrat özgünlükleri gibi özellikleri araştırılmıştır.

C. lindemuthianum DSM 63144'de bulunan CDA 'ın 150 kDa büyüklüğünde olmasına rağmen, çoğu kitin deasetilazın moleküler ağırlığının 25-80 kDa aralığında olduğu açıkça görülmüştür. Daha önce bildirilen çoğu kitin deasetilazlar glikoproteindirler ve N-glikozillenmiş (% 20-70) formda bulunurlar (Ghormade vd., 2010). Çoğunlukla çoklu izoformlar halindedirler. Örneğin, bakla pas mantarı olan *Uromyces viciae-fabae*'de kitin deasetilazın 12.7 ile 48.1 kDa arasında değişen beş izoformu üretilmektedir (Deising ve Siegrist, 1995). Ancak bugüne kadar kitin deasetilazların bu çoklu izoformlarının mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır.

Yapılan çalışmalara göre çoğu ekstrasellüler kitin deasetilazın optimum pH'sı nötr ya da 7-12 aralığında alkalidir. Optimum sıcaklığı ise hemen her enzim için 50-60 °C'dir (Ghormade vd., 2010).

Cufrier vd., *M. rouxii* 'den kitin deasetilaz ve *S. lividans* asetil ksilan esterazının hem doğal hemde kesilmiş formları için asetil ksilan, peptidoglikan ve çözünebilir kitini substrat olarak denemişlerdir. Denenen tüm enzimlerin peptidoglikan üzerinde inaktif iken asetil ksilan ve çözünebilir kitin üzerinde aktif olduğu tespit edildi. Bu da kitin deasetilazların sadece kitinin değil asetil ksilanın da üstesinden gelebildiği anlamına gelir (Caufreir vd., 2003). Bu hem kitin deasetilazın hem de asetil ksilan esterazın peptidoglikan deasetilazdan farklı olan benzer bir katalitik domaine sahip olmalarını açıklayabilir (Ghormade vd., 2010). Dizi karşılaştırmalarıyla birlikte en son bildirilen yapısal analizler bakteriyel *S. pneumoniae* peptidoglikan deasetilaz ve *Bacillus subtilis* peptidoglikan deasetilazında bulunmayan, N-terminal ve C-terminal sonuna bağlanmış bir disülfid bağının *M. rouxii* kitin deasetilaz ve *C. lindemuthianum* kitin deasetilaz ve *S. lividans* asetil ksilan esterazda korunmuş olduğunu öne sürmektedir (Blair vd., 2006; Blair vd., 2005; Taylor vd., 2006) .

Kitin deasetilazların metalloenzim oldukları ve katalitik kabiliyetlerinin divalent katyonlarından yüksek derecede etkilendikleri öne sürülmüştür. Önceki çalışmalarda kitin deasetilazın enzim aktivitesinin Zn^{2+} (1 mM), Ca^{2+} (1 mM) ve Co^{2+} (1 mM) varlığında artabildiği bulunmuştur (Kim vd., 2008; Tokuyasu vd., 1996; Yamada vd., 2008). Dahası,

N-glikolizasyon *S. cerevisiae*'den Cda2p'nin enzim aktivitesinin tamamen kaybedilmesi ile sonuçlanırken, 1 mM Co²⁺ ilavesi ile aktivitenin yenilenebildiği ancak Mg²⁺ ve Mn²⁺'in aynı canlandırıcı etkilerinin olmadığı kanıtlanmıştır (Martinou vd., 2002). Benzer şekilde bir bazidiomiset olan *Flammulina velutipes*' de toplam kitin deasetilaz aktivitesi EDTA ilavesi ile elimine olurken, Co²⁺ 'nın (1 mM) eş zamanlı ilavesi enzim aktivitesini tamamen yeniden canlandırabildi (Yamada vd., 2008) . Bununla beraber başka bir çalışma farklı bir açıklama ortaya koymaktadır; klorür tuzu olarak denenen Co²⁺'nin varlığında hem *M. rouxii* kitin deasetilazı hem de *S. lividans* asetil ksilan esterazı tüm çözünebilir kitinimsi substratlar üzerinde artan bir aktivite sergilerken, ksilan substrat olarak kullanıldığında artan bir aktivite göstermezler (Caufrier vd., 2003). Divalent katyonlarının kataliz üzerine etkisinin bir yerde denenen substrata bağlı olduğu görülüyor. Zn²⁺ kitin deasetilazlar için önemli bir metal iyonu olduğu kanıtlanmıştır (Ghormade vd., 2010).

1.9. Ksilan

Ksilan; bitki hücrelerinin en temel yapısal polisakkaritidir ve dünya üzerinde ki tüm yenilenebilir organik karbon kaynaklarının üçte birini oluşturan doğada en çok bulunan ikinci polisakkarittir (Prade, 1995). Ksilan hemiselülozun temel yapısal elemanıdır. Hemiselüloz; ksilan, ksiloglukan, (bir D-ksiloz ve D-glukoz heteropolimeri), glikomannan (bir D-glukoz ve D-mannoz heteropolimeri), galaktoglikomannan (D-galaktoz, D-glukoz ve D-mannoz heteropolimeri) ve arabinogalaktan (bir D-galaktoz ve arabinoz heteropolimeri) içeren polimerik karbonhidratlardan oluşan bir kompleksdir. (Shallom and Shoham, 2003). Selüloz (1,4- β -glukan) ve ligninle (polifenolik bileşimli bir kompleks) birlikte bitki hücre duvarının temel polimerik bileşenidir (Kulkarni vd., 1999).

Ksilan tek yıllık bitkilerde olduğu gibi (< % 30) angiosperm sert odununda (hücre duvarı içeriğinin %15-30'u), gimnosperm yumuşak odununda (%7-10) geniş oranlarda bulunur (Singh, S. 2003). Hayli dallanmış bir heteropolisakkarit kompleksi olan ksilanın yapısı farklı bitki türleri arasında değişim gösterir ve 1,4-bağlı- β -D-ksiloprenozil ünitelerinden oluşan homopolimerik omurga zinciri glikopirenozil, 4-O-metil-D-glikopirenozil, α -L-arabinofuranozil, asetil, feruloil ve/veya *p*-kumoroil yan zincir gruplarıyla değişen derecelerde yerdeğiştirebilir (Singh vd., 2003, Wong vd., 1988; Collins vd., 2004).

Ksilanlar çeşitli bitkilerde kısmen asetillenmiş bir yapıda bulunurlar. Ksilozil birimlerinin C-2 ve C-3 pozisyonlarında bulunan asetil grupları ksilanazları inhibe ederek

asetil ksılanın tamamen yıkımını muhtemelen sterik olarak engellerler. Bu nedenle asetil ksılan esteraz ve ksılanazların sinerjik etkisi asetil ksılanın tamamen hidrolizi için elzemdir (Kulkarni vd., 1999).

Sert odun ksılanı yüksek derecede asetillenmiştir (ör: huş ağacı ksılanı 2 mol ksiloz başına 1 mol'den fazla asetik asit içerir). Bu asetil gruplarının bulunuşu ksılanın suda kısmen çözünebilir olmasından sorumludur (Beg vd., 2001).

1.9.1. Ksilinolitik Enzimler

Ksılanın karmaşık yapısı tamamen hidrolizi için farklı enzimler gerektirir. Endo-1,4- β -ksılanazlar (1,4- β -D-ksılanohidrolaz, EC 3.2.1.8), ksılan omurgasını rastgele hidroliz ederek ve 1,4- β -D-ksilozidazlar (1,4- β -D-ksılan ksilohidrolaz EC 3.2.1.37) küçük oligosakkaritleri kırarak depolimerize ederler. Ksilanda bulunan yan gruplar α -L-arabinofuranosidaz, α -D-glukuronidaz, galaktosidaz ve asetil ksılan esteraz ile serbest hale geçirilirler (Subramaniyan ve Prema, 2002) (Şekil 8).

Ksılan omurgasındaki iç glikozidik bağları rastgele kıran (kesen) β -1,4-endo-ksılanazlar (1,4- β -D-ksılanohidrolaz, EC 3.2.1.8); ksılanın depolimerizasyonu için kilit enzimlerdir (Gilbert ve Hazlewood, 1993).

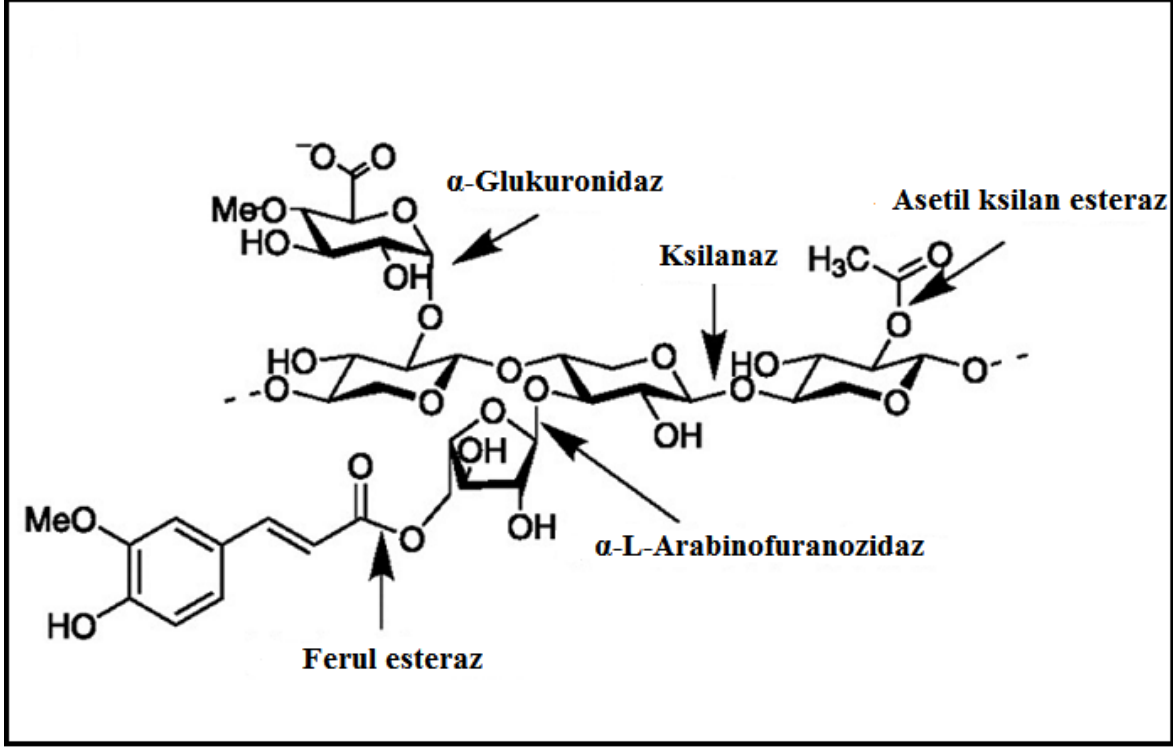
Ekso-1,4- β -D-ksilozidazlar (EC 3.2.1.37); indirgen olmayan uçtan D-ksiloz birimlerinin sırası ile uzaklaştırılması yoluyla 1,4- β -D-ksilo-oligosakkaritlerin hidrolizini katalize ederler (Subramaniyan ve Prema, 2002).

α -L-arabinofuranosidazlar (α -L-arabinofuranozid arabinofuranohidrolaz, EC 3.2.1.55); arabinanlar, arabinoksilanlar ve arabinogalaktanların indirgen olmayan uç terminalinde bulunan α -L-arabinofuranozil gruplarını hidroliz eden ekzo-enzimlerdir ve rabinoksilanların tamamen yıkımı için gerekli olan, mikrobiyal ksilinolitik sistemin bir parçasıdır (Bachmann ve McCarthy, 1991; Lee ve Forsberg, 1987; Greve vd., 1984; Poutanen, 1988; Saha ve Bothast 1999).

α -D-glukuronidazlar (EC 3.2.1.1); ksiloz üniteleri ile D-glukoronik asit veya onun metil eter bağları arasındaki α -1,2-glikozidik bağların hidrolizi için gereklidirler (Subramaniyan ve Prema, 2002).

Doğal glukuronaksılanın hidrolizi, asetik veya fenolik asit bağlarının uzaklaştırılması için esterazları gerektirir. Esterazlar, arabinoz yan zincir üniteleri ile ferulik asit (ferulik asit esterazlar, EC 3.1.1.73) ve arabinoz yan zincir üniteleri ile p-kumarik asit ve ksilozla asetik asit arasındaki bağları kırarlar. Ksilandan asetil, ferul ve p-

kumaril gruplarının kırılması ligninin uzaklaştırılmasına yardımcı olur. Bu şekilde lignin ve hemiselüloz arasındaki bağları kırmakla ligninin çözünürlüğüne katkıda bulunuyor olabilirler. Eğer kağıt hamurunun ağartılmasında ksilanazlar ve ksilan yıkan enzimlerle birlikte kullanılırlarsa esterazlar hücre duvarı yapısını kısmen bozabilir ve açabilirler (Subramaniyan ve Prema, 2002).



Şekil 8. Ksilan üzerinde etkili olan enzimler (Taylor vd., 2006).

1.10. Karboksil Esterazlar

Esterazlar (EC 3.1.1.x); ester bağlarının kırılması ve oluşumunu katalize eden, hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda geniş dağılım gösteren hidrolazların farklı bir grubudur.

1.10.1. Asetil Ksilan Esteraz (EC 3.1.1.72)

Asetil ksilan esterazlar (AcXE) 1985'te ilk tanımlandığından bu yana mikrobiyal ksilanolitik ve selüloolitik sistemin ortak bileşenlerinden birisi olarak tanınmaktadır. Ksilan zincirindeki D-ksilopiranozil birimlerinin 2. veya 3. pozisyonundaki asetil ester gruplarını uzaklaştırma yeteneğindedirler (Christov vd., 1993; Biely vd., 2003; Poutanen vd., 1990; Kormelink vd., 1993; Biely ve Cote, 2005). Enzimin asetillenmiş polimerik substratlar üzerindeki etkisi, ksilan ana zinciri üzerinde endo- β -1,4-ksilanazlarla birlikte ürün

oluşturucu bağlanmaya müsait yeni esterden yoksun bölgeler meydana getirir. Bu etki iki enzimin asetil ksilanın yıkımı süresince açık bir işbirliği şeklinde yansıyan enzim sinerjisine tipik bir örnektir (Poutanen vd., 1990; Kormelink vd., 1993; Biely vd., 1986). Asetil ksilanın endoksilanazlarla yıkımı, AcXE da hâlihazırda ortamda bulunduğu, çok daha hızlı ve daha yüksek derecede ilerler (Biely vd., 1986). Polimerik substratların yanı sıra AcXE'lar kısmen asetilenmiş ksilooligosakkaritleri de deasetile ederler (Poutanen vd., 1990). Ksilooligosakkaritlerin deasetilasyonu bu bileşikleri β -ksilozidazların etkisine tamamen elverişli bir hale getirir. Asetillenmiş indirgen olmayan ksilopirenozil uç birimlerine sahip ksilooligosakkaritler β -ksilozidaz substratı olarak hizmet etmezler (Biely vd., 1985). Bu 4-nitrofenil β -D-ksilopirenozidazların 2-, 3- ve 4-mono-*O*-asetil türevleri kullanılarak doğrulanmıştır (Biely ve Cote, 2005). Bu monoasetatların tümü *Aspergillus niger*'in β -ksilozidazına karşı dirençlidirler (Biely ve Cote, 2005).

AcXE'ların bitki kalıntılarının biyoyıkımıyla bağlantılı fizyolojik rolü artık açıktır. AcXE kodlayan genler ksilanaz ve selüloz genleriyle birlikte ortak olarak ifade edilirler (Biely vd., 1998; Poutanen vd., 1987; Egaña vd., 1996) ve *Streptomyces*'te ksilanaz kodlayan genlerle birlikte kümelenmişlerdir (Shareck vd., 1995). Bazı bakterilerde AcXE'ların katalitik modülü, AcXE'in yanı sıra endoksilanaz katalitik modülünde bulunduran çok domainli veya bifonksiyonel bir enzimin parçasıdır (Biely, 2003).

Polisakkaritlerde asetil birimlerinin bulunması fiziko-kimyasal gereksinimlerini etkiler. Asetil ksilan asetillenmemiş eşdeğeri ile kıyaslandığında suda çözünebilir. Polisakkarit ana zinciri üzerindeki asetil grupları moleküllerin çökmesini (vaya kristalleşmesini) önler. Deasetilasyon ister kimyasal ister enzimatik olsun azalmış çözünürlüğe yol açar (Biely, 1998; Poutanen vd., 1990; Biely ve Cote, 2005)

1.10.2. Asetil Ksilan Esteraz Substratları ve Deneyleri

Doğal substratı temelde *O*-asetil-4-*O*-metil-D-glukurono-D-ksilan olan asetil ksilan bitki materyallerinden veya alkali ekstraktlarından kolayca elde edilemez. Bununla beraber bitki hücre duvarında bulunan en çok benzeyen polisakkarit, sert odunun toplam selülozundan, örneğin; huş ağacı ya da kayın kerestesinin toplam selülozundan dimetilsülfoksit (DMSO) ekstaksiyonuyla elde edilebilir (Hägglund vd., 1956; Bouveng 1960). Daha düşük dereceli polimerizasyona sahip (ortalama DP değeri yaklaşık 25) ve asetil içeriği %13 olan analog bir polisakkarit ve suda çözülebilir selülozik olmayan bir polimerin diyaliz edilebilir olmayan bir fraksiyonu huş ağacı ksilanının 200 °C'de 10

dakika buharlaştırılmasıyla elde edilebilir (Poutanen vd., 1987). Sert oduna su ile termokimyasal bir muamele, daha yüksek asetil içeriği ile benzer bir materyal meydana gelmesine yol açar (Khan vd., 1990). Bu substratların hiçbirisi ticari olarak mevcut olmadığından ve izolasyonları tamamen yorucu ya da özel bir ekipmanın varlığına dayalı olduğundan dolayı, bazı araştırmacılar doğal asetil ksilanla kimyasal olarak deasetillenmiş polisakkariti yer değiştirmişlerdir. Ksilanların kimyasal asetilasyonunda geniş şekilde kullanılan yöntemlerden birisi Johnson vd. tarafından yayınlandı (Johnson vd., 1988; Biely ve Cote, 2005). Kimyasal olarak tamamen asetillenmiş sert odun ksilanı da AcXE substratı olarak kullanılmaktadır (Halgasová vd., 1994; Debrassi vd., 1998). Bunların yanı sıra aşağıda açıklandığı gibi, AcXE'lerin çoğunluğu (ama hepsi değil) hemiselüloolitik olmayan asetil esterazlar ve lipazlar ve genelde esterazlar için substrat olarak kullanılan çeşitli aril esterazlarla da denenebilirler (Biely ve Cote, 2005).

DMSO ile ya da odunun buharlaştırılmasıyla ekstrakte edilmiş sert odun asetil ksilanı AcXE deneylerinde kullanılan en özel substrattır. Bitki hücre duvarından ekstrakt edilen doğal asetil ksilan kimyasal olarak asetillenmiş ksilanla değiştirilebilir. Endo-ksilanazların bulunduğu durumlarda bu her iki tip polisakkaritte substrat olarak asetillenmiş ksilooligosakkaritleri tercih eden enzim için elverişli substratlardır. Asetik asit salınım miktarı kromatografik olarak HPLC veya enzimatik olarak ticari kitlerle tespit edilebilir. HPLC ile asetik asit tespiti için hemen hemen tüm üreticilerden bir ışık kırıcı indeks dedektörü ile bağlantılı, 0,01 N H₂SO₄ ile ayrıştırılmış bir Bio-Rad (Richmond, A) Aminex HPX-87H kolonu tedarik edilebilir. Dahili standart olarak çoğunlukla gliserol kullanılır. AcXE deneyleri için sağlanan koşullar çeşitlilik gösterir. Substrat konsantrasyonu %0,2-10 aralığında, pH 5,0-7,0 aralığında ve sıcaklık 30-70 °C aralığında değişir.

Çoğu AcXE genelde asetil esteraz aktivitesi gösterdiğinden (CE-4 ailesinde bulunan istisna hariç (Biely vd., 1999) bunların aktiviteleri 4-nitrofenil asetat, α veya β -naftil asetat ya da 4-metilumbelliferil asetat gibi kromojenik veya florojenik asetilesteraz substratları kullanılarak tayin edilebilir (Biely ve Cote, 2005).

AcXE deneyleri için kullanılan substratlardan bazıları enzimin jelde tespiti için de kullanılabilir. AcXE'lerin polimerik asetil ksilan kullanılarak tayini, deasetilasyondan dolayı polisakkaritin çökelemesi prensibine dayanır (Biely vd., 1988; Biely ve Cote, 2005). Bu yaklaşım sadece jelde bulunan AcXE deasetillenmiş polimeri hidroliz edebilecek ve böylece çökmesine engel olacak endo-ksilanazlardan yoksun olduğu zaman uygulanabilir

(Biely ve Cote, 2005).

Diğerlerinden daha ziyade CE4 ailesine ait AcXE üreten mikroorganizmaların ve transformantların seçimi α - veya β -naftil asetat ve 4-metilumbelliferil asetat gibi kromojenik ve florojenik aril esterazların kullanımını temel alabilir (Biely, 2003). Alternatif bir yöntem ise, penta-*O*-asetil-D-glukoz gibi çözülebilir olmayan per-*O*-asetillenmiş karbonhidratları içeren katı besiyerlerinde şeffaf zonlar oluşturan enzim üretimini gözlemlemektir (Lee vd., 1987; Rosenberg vd., 1975; Biely ve Cote 2005).

1.10.3. Protein Olarak Özellikleri

Amino asit dizi benzerliklerine dayanarak (çoğunlukla gen dizileri temel alınarak ortaya konan), AcXE'lar şimdiye kadar tanımlanmış 16 karbonhidrat esteraz ailesinden 7'sine atanmıştır (Henrissat ve Coutinho, URL-1) Bu AcXE 'ların, mikrobiyal ksilinolitik sistemlerin tüm bileşenleri arasında moleküler organizasyonun en büyük çeşitliliğini gösterdiğini ortaya koymaktadır (Biely ve Cote 2005).

Aspergillus, *Penicillium*, *Schizophyllum* ve *Trichoderma* türlerinde fungal AcXE'lar karbonhidrat esteraz ailesi 1 ve 5'te büyük çoğunluğu tek bir bifonksiyonel asetil ksilan yıkıcı enzim katalitik domaini içeren bakteriyal AcXE' larla beraber bulunurlar. Anaerobik fungus *Neocallimastix patriciarum* (Dalrymple vd., 1997) 'un çeşitli AcXE'ları CE-2, 3 ve 6 aileleri içerisinde bulunabilir. *Streptomyces* tarafından üretilen AcXE, bifonksiyonel benzer bakteriyal AcXE modülleri ile birlikte CE-4 ailesi içerisinde gruplandırılır. Dizileri *Rhizobium* cinsinin nodulasyon proteinleri (NodB) ve kitooligosakkarit ve kitin deasetilaz olarak tanımlanan bazı maya enzimleri ile homologtur (Biely ve Cote 2005).

Termofilik anaerobik bakterilerden bazı AcXE'lar daha küçük alt ünitelerin oligomerleri olarak meydana gelirken, fungal AcXE'lar ve bazı bakteriyal enzimler tipik olarak monomerik enzimlerdir (Shao vd., 1995). *Pseudomonas fluorescens* (Ferreira vd., 1993) veya *Trichoderma reesei* (Margolles-Cark vd., 1996)'nin ki gibi bazı AcXE' lar katalitik domaininden bir linker bölge ile ayrılmış selüloz bağlanma domainleri içerirler. *S. lividans*'ın ki gibi diğerleri bir ksilan bağlanma domaini içerirler (Dupont vd., 1996). AcXE'a bağlı endo-ksilanazların birçok kombinasyonu tarafından temsil edilen iki katalitik modül yapısı, özellikle bifonksiyonel asetil ksilan yıkıcı enzim üreten ruminal anaerobik bakterilerde oldukça sık görülür (Hazlewood vd., 1993). Böyle bifonksiyonel enzimlerin AcXE domainleri karbonhidrat esteraz ailesi 1, 2, 3 ve 4'te bulunabilir.

Clostridium thermocellum (Fernandes vd., 1999) veya *Clostridium cellulovorans* (Kosugi vd., 2002)'ın bifonksiyonel endoksilanaz-AcXE proteinlerinin iki katalitik domaininin asetil ksilanın yıkımında sinerjik olarak hareket ettikleri gösterilmiştir. Bu gözlemler hem dallanmayı kaldırma esterleşmeyi kaldıran hem de depolimerizasyon aktivitelerine sahip bir enzim üretiminin, karbon kaynakları için birbirinden ayrı özgün enzim bileşenleri kullanan mikroorganizmalarla yarışan mikroorganizmalar için büyük bir avantaj olduğunu akla getirmektedir.

AcXE'lar tek domainli, 23-48 kDa arasında moleküler ağırlığa ve asidik ya da nötr pI değerlerine sahip enzimlerdir. Bu enzimlerin CE aileleri içerisinde atanmaları ile bu iki parametre arasında özel bir ilişki var gibi görünmemektedir (Biely ve Cote, 2005).

1.10.4. Substrat Özgünlüğü

AcXE'ların substrat özgünlüğü bu ksilinolitik bileşenlerin en az açıklığa kavuşturulan yönüdür. Özellikle AcXE 'ların yerleştirildiği yedi değişik ailenin bulunduğu göz önüne alındığında yapı-işlev ilişkisi üzerine oldukça sınırlı bilgiler mevcuttur. Bu durum, ksilinolitik sistemin bir bileşeni olarak göz önüne alınamayacak ancak ksilooligosakkaritlerin deasetillenmesi gibi asetil ksilan yıkımının daha sonraki evrelerine katılabilen esterazların varlığıyla daha karmaşık bir hale gelebilir. Örneğin hemiselülitik olmayan esteraz ve lipazlar düşük moleküler ağırlıklı asetillenmiş substratlar üzerinde tamamen yeterli şekilde etkili olmaktadır (Sweers vd., 1986; Shaw vd., 1987; Biely vd., 1999; La Ferla vd., 2002; Biely ve Cote, 2005).

Bir dizi araştırma, polimerik ve olimerik substratlara karşı nisbi afinitelerine göre birbirlerinden ayrılan, asetil ksilan yıkımına katılan iki önemli asetil esterazın olduğunu ileri sürmektedir (Poutanen vd., 1990; Kormelink vd., 1993). Polimerik substratlar üzerinde etkili performans gösteren ve deasetile olmasından dolayı solusyonda ksilanın çökmesine neden olma kabiliyetinde olan enzimler tipik olarak asetil ksilan esterazlardır (Poutanen vd., 1990; Biely vd., 1988). Bu özellikle daha çok asetil ksilan için özgül olduğu ortaya çıkan ve α -naftil-, 4-nitrofenil- veya 4-metilumbelliferil asetat gibi düşük molekül ağırlıklı substratları hidrolize uğratmayan CE-4 ailesinden AcXE'ler için oldukça karakteristiktir (Biely vd., 1999; Dupont vd., 1996; Tenkanen vd., 2003). Diğer ailelerden enzimler de genel asetil esterazlara benzer özellikler sergilerler. AcXE'lar çeşitli sentetik aril asetat ve açil üzerinde etkilidirler (Biely vd., 1999; Tenkanen vd., 2003; Tenkanen vd., 1998). Bununla beraber lipazların aksine, asetil ksilan esteraz asetil ksilanı solusyonlarda

çöktürür ve sentetik esterlere olan afiniteleri esterdeki yağ asitlerinin karbon sayılarının artması ile azalır (Biely vd., 1999; Tenkanen vd., 2003; Biely ve Cote, 2005)

1, 4 ve 5 ailelerinin AcXE'leri ile son yapılan karşılaştırmalı çalışmalar AcXE'lerin farklı polisakkaritleri deasetile etme yeteneklerinin değiştiğine dikkat çekmektedir. CE-1 ailesi AcXE'leri asetil ksilanı ve asetil galaktomannanı deasetile ederler. Sadece asetil ksilanı deasetile eden CE-4 ve 5 ailesi AcXE'leri ihtiyaç duydukları polisakkarit tipine daha özgündürler. Substrat özgünlükleri metil 2,3,4,6-tetra-*O*-asetil- β -D-mannopiranozid gibi düşük molekül ağırlıklı substratlar üzerinde çok katı değildir (Tenkanen vd., 2003), bununla beraber CE-4 ailesine ait AcXE'lerin bu glikozide ilgisi yoktur (Biely vd., 1996; Tenkanen vd., 2003; Biely ve Cote, 2005).

1.10.5. Reaksiyon Mekanizması

Tipik ksilanlarda ksiloz birimleri 2. ve/veya 3. konumda asetillenmişlerdir ve asetil grupları az veya çok tam olarak bu konumlarda dağılım gösterirler. İkinci asetil grubu, 2. veya 3. konumdaki asetil gruplarından herhangi birindeki ilk asetil grubunun uzaklaştırılmasının hemen ardından salınır.

AcXE'lerin fenil metan sülfanil florid ile inaktivasyonu (Margolles-Cark vd., 1996 ; Tenkanen vd., 2003) ve AcXE'lerin aktif bölgelerinde GX SXG sein dizisinin varlığı (Williamson vd., 1998), AcXE'lerin lipaz ve serin proteazlara benzer bir katalitik mekanizma kullandığı fikrini ortaya atmaktadır. Bu mekanizmaya iki temel element katılır: bir nükleofilik serin ve genellikle histidin olan bir genel asit baz katalisti. Tüm AcXE tiplerinin katalitik bölgelerinde serin motifi (GX SXG) içerip içermedikleri araştırılmaktadır. *Trichoderma reesei* ve *Penicillium purpurogenum*'un enzimleri olan CE-5 ailesinden iki AcXE'in üç boyutlu yapısı bu esterazların serin tipi yapısını doğrulamaktadır. Buna zıt olarak son yapılan araştırmalar CE-4 ailesi AcXE'nin serin tipi esterazlar olmadıklarını öne sürmektedirler. Bu araştırmalar, mutasyonu ve enzim içinde serin birimlerinin değiştirilmesini temel almaktadır (Biely ve Cote, 2005).

1.11. Mikrobiyal Enzimler

Enzimler, hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalize eden protein yapısında moleküllerdir. Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere günlük ve ekonomik hayata girmiştir (Wiseman, 1987). Enzimlerin pek çok süreçteki önemli rolü uzun süredir bilinmektedir. Varlıkları fırıncılıkta, mayalamada,

alkol ve peynir üretiminde kullanıldıkları antik Yunan tarihi ile ilişkilendirilmektedir. Bu alandaki artan bilgiler ve enzimlerin saflaştırılması ile gerçekleştirilen pek çok uygulama katlanarak artmaktadır ve termostabil enzimlerin kullanılabilirliği ile endüstriyel işlemler için birkaç yeni olasılık ortaya çıkmıştır (Haki vd., 2003). Son yıllarda endüstride kullanılan çoğu kimyasal süreçlerin çevre dostu oldukları öne sürülemez. Bu nedenle özellikle son yıllarda çevre kirliliğini önlemeye yönelik endişeler, daha çevre dostu, bir başka deyişle biyolojik süreçleri gündeme getirmektedir (Couto vd., 2006; Hüner, 2007). Enzimatik süreçler sadece çevre dostu değil aynı zamanda substrata özgünlüklerinden dolayı ürün ve uygulamanın kalitesini de arttırabilirler (Hüner, 2007).

Son yıllarda sentetik kimya alanında ki en büyük gelişmelerden birisi kimyasal tepkimeler için biyolojik sistemlerin kullanımınıdır. Enzimler veya enzim sistemleri tarafından katalize edilen reaksiyonlar organik reaksiyonların geleneksel formundan çok daha büyük bir özgünlük ortaya koymaktadır (Yamada ve Shimizu, 1988; Koeller ve Wong, 2001; Schmid vd., 2001; Ogawa ve Shimizu, 2002).

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir (Eren Kıran vd., 2006). Bunun nedeni mikrobiyal kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleridir (Wiseman, 1987). Bu mikroorganizmalar yalnızca enzim üretme yeteneklerine göre değil, mikroorganizmaların toksik ve patojen olmamasına göre de seçilmiştir. Bugün endüstride kullanılan birçok enzim mikrobiyal kökenli olduğu için, endüstriyel enzimlerin kullanımında, mikroorganizma kullanımını arttırmıştır (Demain ve Solomon, 1981;)

1.12. Termostabil Enzimler

Termostabil enzim ve mikroorganizmalar son 20 yıldır çok daha fazla araştırmanın konusu haline gelmiştir. Ancak termofiller ve proteinlerinin nasıl yüksek sıcaklıklarda işlev gösterebildiğine olan asıl ilgi 1960'larda Brock ve meslektaşlarının öncü çalışmalarıyla başlamıştır (Brock ve Freeze, 1969). Moleküler biyoloji tekniklerinin kullanımı ve gelişmesi, genetik analizlere olanak vermiş ve rekombinant ürünler elde etmek için gen klonlama 1990'lar boyunca termostabil enzimler alanında çarpıcı bir aktivite artışına neden olmuştur. Bu, enzimatik biyoproses uygulamaları için enzimlere ulaşma adına termal çevrelerden mikroorganizmaların izolasyonunu arttırmıştır (Turner vd., 2007).

Mikroorganizmalar optimum büyüme sıcaklıklarına göre üç ana gruba ayrılırlar; psikrofiller (20 C'nin altında), mezofiller (20-45 °C) ve termofiller (45 C'nin üstündeki sıcaklıklar (Brock, 1986).

Sıcak su kaynaklarında ve diğer termal ortamlarda bulunan ve optimum gelişme sıcaklığı 45-80 °C olan organizmalar termofil olarak adlandırılır. Bunların enzim ve diğer proteinlerinin sıcaklığa dayanıklılığı mezofillerinkinden daha fazladır. Bu organizmalar yüksek sıcaklıklarda optimum düzeylerde işlevseldirler. Enzim yapılarında sadece birkaç noktadaki kritik aminoasit değişikliği, bu enzimin sıcaklığa dayanıklı üç boyutlu yapı kazanmalarını sağlamaktadır. Termofiller sitoplazmik zarlarının yüksek sıcaklıklarda kararlı ve işlevsel kalmasına olanak verecek şekilde doymuş yağ asitleri bakımından zengin lipidlere sahiptirler (Madigan ve Martingo, 2008).

Yüksek sıcaklıklarda biyoteknolojik işlemleri gerçekleştirmek pek çok fayda sağlamaktadır. Sıcaklığın artırılması organik bileşiklerin çözünürlüğü ve biyolojik olarak kullanılabilme açısından önemli etkilere sahiptir. Sıcaklığın artması beraberinde viskositenin düşmesini ve organik bileşiklerin difüzyon katsayısının artmasını da beraberinde getirmektedir. Sonuç olarak küçük alanlarda yüksek reaksiyon hızı gerçekleştirilmektedir (Niehaus vd., 1999). Enzimler ile katalizlenen reaksiyonlarda 0 – 40 °C arasında reaksiyon hızı yükselir. Fakat 40 °C de enzim zarar görmeye başlar. Böylece reaksiyon yavaşlar ve 60 °C de enzim tamamen bozular. 40 °C bu enzim için optimum ısıdır (Bhat, 2000). Bu noktada çözüm olarak mikroorganizmalardan elde edilen enzimler büyük ilgi çekmektedir (Kıran vd., 2006).

1.13. CDA ve AcXE' ların Endüstriyel Önemi

C. lindeuthianum'dan CDA *E.coli*'de ekspres edilmiş ancak enzimin inklüzyon cisimlerinden geri dönüşümü düşük aktivite göstermiştir (Felipe vd., 2005). Rekombinant CDA *Streptomyces lividans*'ın sinyal sekansı kullanılarak oldukça aktif bir formda *E.coli*'de kültür ortamında üretilmiştir (Tokuyasu vd., 1999a; Tokuyasu vd., 1999b). Kitin deasetilazların klonlanması ve yüksek düzeyde ekspres edilmesi enzimin ticari kullanımı açısından geniş bir uygulama alanına sahiptir. *Aspergillus nidulans*'taki CDA'nın endüstriyel kullanım için *E.coli* 'de ekspresyonu yeterli bir düzeyde değildir (Wang vd., 2010). *Pichia pastoris* gibi diğer ökaryotik ekspresyon sistemleri CDA'nın ekspresyonu için kullanışlı olabilir. *C. lindeuthianum*'dan rekombinant kitin deasetilaz *Pichia*

pastoris'te ekspreslenmiş ve Co^{2+} ile önemli ölçüde aktive olmuştur (Wang vd., 2010).

CDA böceklerin biyolojik kontrolü için kullanışlı bir araç olabilir. Zararlı böceklerin biyolojik kontrolünde kitin deasetilazın insektisit olarak potansiyel bir hedef olduğu kanıtlanmıştır. Kitin deasetilaz, beslenme sırasında böcek barsağının peritrofik matriksinden salgılanan başlıca proteindir, kitin bileşenini barsağı parazit istilasından koruyacak şekilde modifiye edebilir ve lektin gibi toksinleri önleyebilir (Hegedus vd., 2009). Bundan dolayı bu enzimin inhibisyonu zararlı böceklerin kontrolü için potansiyel bir yol olabilir (Ghormade vd., 2010).

Denizel bakteri olan *Vibrio vulnificus*, şiddetli ve hızlı bir patolojik süreçle, kabuklularda oldukça ölümcül zehirlenmelere ve yıkıcı yara enfeksiyonlara yol açar. Lee ve arkadaşları, bir kısmı depolarize olmuş kitosanın *V. vulnificus* tarafından oluşturulan enfeksiyonu önlediği ve onardığını göstermişlerdir (Zhao vd., 2011b).

CDA'nın en ilginç kullanımlarından biri, transgenikler olabilir. Bitkilerde endüstriyel kullanım için hücre duvarını başkalaştırmak ve hastalık direncini arttırmak için kitin ve kitosanın ekspresyonu ile genetik manüplasyonlar gerçekleştirilebilir. Son zamanlarda kağıt ve tekstil sanayinde kitin:kitosan ve kitosan:selüloz karışımlarının geliştirilmesine karşı bir ilgi var. Kitin ve kitosan bitkilerde kitin sentaz ve CDA geninin ekspresyonu ile üretilebilir ve böyle transgenik bitkiler selüloz, kitin ve kitosan için tek kaynak olarak kullanılabilir (Dhugga vd., 2000).

1.14. *Anoxybacillus flavithermus* WK1

Anoxybacillus cinsi Gram-pozitif bakteriler aerobik, fakültatif anaerobik spor oluşturan bakteriler olarak tanımlanmışlardır. Uzun süre zorunlu veya fakültatif aerobların temsilcileri olduklarına inanılan *Bacillaceae* ailesinin üyesidirler. Bununla beraber *B. subtilis* ve birkaç diğer basillerin anaerobik büyüme yeteneğinde oldukları gösterilmiştir (Nakano vd., 1997; Nakano vd., 1998; Cruz Ramos vd., 2000). Jeotermal sıcak su kaynakları, gübre, jelatin gibi işlenmiş gıdalarda, çeşitli orta derecelerde yüksek sıcaklıklarda bulunurlar (Pikuta vd., 2000; Heinen vd., 1982; De Clerck vd., 2004). *Anoxybacillus flavithermus* süt tozunun başlıca kontaminantıdır (Rueckert vd., 2003).

A. flavithermus WK1 suşu Yeni Zelanda Wairakei jeotermal güç istasyonunda ki atık su drenejanından izole edilmiştir (Mountain vd., 2003). "*flavithermus*" ismi kolonilerin hücre zarında biriken karatenoid pigmentlerinin neden olduğu koyu sarı rengi yansıtmaktadır. Gram-pozitif, çomak şekilli, spor oluşturan fakültatif anaerob bakterilerdir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal, Bakteri Suşları ve Çözeltiler

2.1.1. Kimyasallar

Agar-Agar (Sigma), Agaroz (Sigma), akrilamid (Sigma), bisakrilamid (Sigma), amonyum persülfat (AppliChem), asetik asit (Sigma), glasiyel asetik asit (Sigma), gliserol (Sigma), glisin (AppliChem), dNTP (Fermentas), brom fenol mavisi (BioRad), coomassie brillant mavi-R 250 (Sigma), coomassie brillant blue G (Bio Rad), Fast Red TR Salt (Sigma), Congo Red, Triton 100-X (Merck), Etidyum Bromür (BioRad), amfisilin (USB), metanol (Sigma), Etanol (Sigma), TEMED (BioRad), SDS (Merck), NaCl (J.T.Baker), Tris base (Merck), EDTA (Merck), Agar (Merck), Tripton (Biolab), Yeast Extract (Acumedia), IPTG (vivantis), X-Gal (Sigma), CaCl₂ (Merck), Tris HCl (Merck), Gliserol (sigma), İmidazol, β -merkaptotanol, NaH₂PO₄·2H₂O (Merck), Na₂HPO₄ (Merck), DMSO (merck), Aseton (Birpa), Sodyum pirofosfat (Sigma), Sodyum asetat (Merck), HCl (Merck), NaOH (Merck), NaCl (Merck), Sitrik asit (Sigma), 4-nitrophenol (Sigma).

2.1.2. Enzimler

Lizozim (Sigma), RNaz A (Sigma), *Taq* DNA polimeraz (Fermentas), *NdeI* (Fermentas), T4 DNA ligaz (Biolab).

2.1.3. Substratlar

Huş ağacı ksilanı, α -naftil asetat, 4-metilumbelliferil asetat, *p*-nitrofenil asetat, 4-metilumbelliferil- β -D-ksiloprenozid.

2.1.4. Bakteri Suşları ve Genel Özellikleri

Çalışmada kullanılan *Anoxybacillus flavithermus* WK1 (*Afla*) bakterisi ile *E.coli* DH5 α (F⁻, ϕ 80*dlacZ* Δ M15, Δ (*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rK⁻, mK⁺), *phoA*, 16 *supE44*, λ ⁻, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*) ve *E.coli* BL21 (pLysS (F⁻, *ompT*, *hsdSB*(rB⁻, rB⁻), *dmc*, *gal*, l(DE3), pLysS, Cmr) bakteri hücreleri Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarından temin edildi. *Afla* karbonhidrat deasetilaz (*afcd*) geninin klonlanması amacıyla genomik DNA temini için kullanıldı. *E. coli* DH5 α hücreleri ara klonlamaların transformasyonu için ve *E. coli* BL21 (DE3) hücreleri ise rekombinant *afcd* geninin ekspresyonu amacıyla kullanıldı.

2.1.5. Besiyerleri

Afla bakterisi ve diğer bakteri suşları Maniatis ve arkadaşlarına göre (1989) hazırlanan LB (Lauria-Bertain) besiyerleri üzerinde büyütüldü. LB besiyeri; 5 g maya özütü, 10 g tripton ve 5 g NaCl 1 litre suda çözülerek hazırlandı. LBA ise; 1 litre LB besiyerine 15 g agar ilavesi ile hazırlandı. Besiyerleri 121°C’de 20 dakika otoklavlanarak steril edildi ve kullanıldı. Transformasyon için kullanılacak LBA besiyeri 45-50 °C’ye kadar soğutuldu ve daha sonra uygun konsantrasyonda amfisilin eklenerek petrilere döküldü.

2.1.6. Kitler ve Vektörler

Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), pGEM-T Easy Vector TA Cloning Kit (Promega), GeneElute Gel Extraction Kit (Sigma), GeneJET PCR Purification Kit (Fermentas) Hislink Protein Purification Resin (Promega) ve pET-15b (Novagen).

2.1.7. Primerler

Çalışmada kullanılan tüm primerler IDT (Integrated DNA Technologies) firmasına sentezlettirildi. Çalışmada ekspresyon vektörü oluşturmak amacı ile dizayn edilen primerlerin baz dizin bilgileri ve kullanım amaçları Tablo 1’deki gibidir.

Tablo 1. Tez kapsamında kullanılan tüm primerleri ve kullanım amaçlarını gösteren tablo.

Primer adı	Baz sırası (5’→3’)	Baz sırası (5’→3’)
<i>afda</i> _FwNS	<u>GCATATGATGAAGTTTTTTTATATACTCG</u> <i>NdeI</i>	<i>Afda</i> geninin ekspresyon vektörüne klonlanması için dizayn edilmiştir.
<i>afda</i> _Rw	<u>CGGATCCTCATTATTTCTTTACTTTTTATATG</u> AGC <i>BamHI</i>	

2.1.8. Çözeltilerinin Hazırlanması

Proteinin saflaştırılması ve diyalizi aşamalarında kullanılan tampon çözeltileri ve hazırlanışları şu şekildedir:

- **Ni-Bağlanma Tamponu:** 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 200 mM NaCl, 5 mM.
- **Ni-Yıkama Tamponu:** 20 mM Tris-HCl (pH7,5), 200 mM NaCl, (Stok 14,7 M), 20 mM imidazol.

- **Ni-Elüsyon Tamponu** : 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 200 mM NaCl, (Stok 14,7 M), 500-600 mM imidazol.
- **Sodyum Fosfat Tamponu**: Çözelti A (0,2 M monosodyum fosfat dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) saf su ile hazırlandı) ve çözelti B (0,2 M disodyum fosfat anhidrat (Na_2HPO_4) saf su ile hazırlandı) istenilen pH'ya göre son konsantrasyon 0,1 M olacak şekilde belirli bir miktar karıştırılması ile hazırlandı.
- **Diyaliz Membranının Hazırlanmasında Kullanılan Çözelti** : % 2 Gliserol ve 1 mM EDTA son hacim 250 ml olacak şekilde saf su ile hazırlandı.

2.1.9. Enzim Aktivite Tayininde Kullanılan Tampon Çözeltilerin Hazırlanması

Afcda rekombinant proteinin biyokimyasal özelliklerinin araştırılması amacıyla pH: 5,0 için sodyum asetat , pH: 6,0-8,0 aralığında sodyum fosfat ve pH: 8,5-9,0 aralığında ise sodyum-pirofosfat tamponları kullanıldı. Tamponlar şu şekilde hazırlandı:

- **Sodyum asetat tamponu (pH:5,0)**: 0,2 M asetik asit ve 0,2 M sodyum asetat çözeltileri saf su ile hazırlandı. Daha sonra her iki çözelti istenilen pH'ya göre son konsantrasyon 0,1 M olacak şekilde belirli bir miktar karıştırıldı.
- **Sodyum fosfat tamponu (pH:6,0-8,0)**: Çözelti A (0,2 M monosodyum fosfat dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) saf su ile hazırlandı) ve çözelti B; 0,2 M disodyum fosfat anhidrat (Na_2HPO_4) saf su ile hazırlandı) istenilen pH'ya göre son konsantrasyon 0,1 M olacak şekilde belirli bir miktar karıştırılması ile hazırlandı.
- **Sodyum pirofosfat tamponu (pH:8,5-9,0)**: 0,2 M sodyum pirofosfat çözeltisi saf su ile hazırlandı. HCl ile istenilen pH'ya ayarlandı.

2.1.10. SDS-PAGE Çözeltilerinin Hazırlanması

Sodyum dodesil-sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan tüm çözeltiler deiyonize saf su ile hazırlandı ve filtre edilerek kullanıldı. Hazırlanan tamponlar otoklavlandı. Sodyum dodesil-sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan tüm çözeltilerin hazırlanışı aşağıda verilmiştir.

- **%30' luk Akrlamidin hazırlanışı**: 100 gr akrilamid ve 2,65 gr bisakrilamid tartıldı. Saf su ile 250 mL' ye tamamlandı. 4 °C' de karanlıkta saklandı.

- **%10 SDS' nin hazırlanışı:** 10 g SDS tartıldı ve saf su ile 100 ml'ye tamamlandı. Karanlıkta oda sıcaklığında saklandı.
- **%10 APS' nin hazırlanışı:** 5 g amonyum persülfat tartıldı ve üzeri deiyonize su ile 50 ml'ye tamamlandı. 4 °C' de saklandı.
- **4X Ayırma Jeli Tamponunun Hazırlanışı (1,5 M Tris, pH 8,8) :** 36,3 g Tris-base tartıldı ve biraz saf su eklendi. pH'sı HCl ile 8,8' e ayarlandı. Deiyonize su ile 200 ml'ye tamamlandı. 4 °C' de saklandı.
- **4X Yığma Jeli Tamponu Hazırlanışı (0,5 M Tris, pH 6,8):** 15,1 g Tris tartıldı. HCl ile pH 6,8'e ayarlandı. Deiyonize su ile 50 ml'ye tamamlandı.
- **2X Örnek Yükleme Boyasının Hazırlanışı:** 2,5 ml 4X Yığma jel tamponu (pH:6,8) , 2 ml %20 'lik gliserol, 40 µl % 0.02 Bromofenol mavisi ve 5,5 ml saf su karıştırılarak hazırlandı.
- **Yürütme Tamponunun Hazırlanışı:** 28,8 g glisin ve 6 g Tris-Base tartıldı. Karışım 1,5 ml suda çözüldükten sonra 10 ml %10 SDS eklenerek son hacim deiyonize su ile 2 litreye tamamlandı. Bu karışımın pH' sı yaklaşık 8,3'e ayarlandı.
- **Boyama Solusyonunun Hazırlanışı:** 0,25 g Coomassie Brilliant Blue R250, 125 ml metanol, 25 ml glasiyal asetik asit ve 100 ml deiyonize su eklenerek karışım hazırlandı. Boyanın metanolde çözülmesinin ardından asit ve su eklendi.
- **Yıkama Solusyonunun Hazırlanışı:** 50 ml etanol, 10 ml glasiyal asetik asit ve 40 ml deiyonize su karıştırılarak elde edildi (Temizkan vd., 2008)

2.2. Yöntem

2.2.1. *Afla* Bakterisinin Büyütülmesi

Afla bakterisi 3 ml LB broth besiyerine gliserol stoktan 1/10 oranında ekim yapılarak 55 °C'de 200 rpm' de çalkalanarak 16 saat büyütüldü daha sonra LBA besiyerine ekilerek yine 55 °C'de 24 saat inkübe edildi. Tek bir koloni seçilerek tekrar 3 ml LB besiyerinde 55 °C'de bir gece büyütüldü. 1,5 ml gece kültürü 12.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek hücreler toplandı ve DNA izolasyonu için kullanıldı. DNA izolasyonu Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) kullanılarak üreticinin verdiği protokole uygun şekilde yapıldı. İzole edilen DNA'nın kalitesi % 0,8'lik agaroz jel kullanılarak kontrol edildi ve Nanodrop spektrofotometre (Spectrophotometer 2000) kullanılarak yoğunluğu belirlendi. DNA örnekleri kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

2.2.2. *A. flavithermus* WK1 Genomunda *afcd*a Geninin Baz Diziliminin Bulunması

Afla bakterisinin sahip olduğu *afcd*a genlerinin baz dizilimleri bu bakterinin genomu taranarak bulundu (NCBI). *afcd*a aday genin 762 baz çifti uzunluğunda olan gen 253 a.a uzunluğunda bir proteini kodladığı ve genom üzerinde sporulasyon aktivatörü histidin kinaz KinB integral membran proteini geni ile 16S ribozomal RNA geni arasındaki bölgede lokalize olduğu görüldü.

Ekspresyon vektörüne klonlamak amacı ile primer dizayn etmek için sinyal peptid sıraları SignalP programı kullanılarak belirdi. Sinyal sırası uzaklaştırılacak şekilde ekspresyon primerleri dizayn edildi (Tablo 1). Primerlerin 5' ucuna PZR ürününün vektöre ligasyonunu kolaylaştırmak amacıyla yapışkan uç açığa çıkacak şekilde restriksiyon endonükleaz tanıma bölgesi ilave edildi. Bu amaçla genlerin baz dizisi restriksiyon endonükleaz enzimleri için kesim bölgesi yönünden incelendiğinde *afcd*a aday geninin içerisinde *NdeI* ve *BamHI* RE enzimleri için RE enzimi için tanıma bölgesi bulunmadığı görüldü ve *afcd*a geni için dizayn edilen ileri primerlerinin (Fw) 5' ucuna *NdeI* RE enzimine ait tanıma dizisi, reverse primerinin (Rw) 5' ucuna ise *BamHI* RE enzimine ait tanıma dizisi eklendi.

2.2.3. Nükleotid ve Aminoasit Sıralarına Dayalı Filogenetik Analiz

*afcd*a genine ait nükleotid sırası ve aminoasit sıraları kullanılarak Tablo 2'de listelenen bakterilerin benzer genlerine ait nükleotid ve aminoasit sıraları kullanılarak mikroorganizmalar arasında CE-4 ailesi genlerine ait bilgilerin filogenetik ilişkiyi araştırmak için kullanılabilirliği araştırıldı. Filogenetik ilişki için hem nükleotid hem de aminoasit verileri kullanıldı. Tüm veriler NCBI veri tabanından (URL-2) alındı. Filogenetik ağaç BioEdit ve Mega5 programlarının yardımı ile oluşturuldu.

Tablo 2. Filo genetik analizde kullanılan organizmalar ve Gen Bank numaraları (URL-2).

Organizma	Nükleotid Gen Bank No	Amino asit Gen Bank No
<i>Anoxybacillus flavitehermus</i>	CP000922.1	ACJ32529.1
<i>Bacillus thuringiensis serovar israelensis</i> ATCC	AAJM01000827.1	EAO51363.1
<i>Bacillus anthracis str. Ames</i>	AE016879.1	AAP24203.1
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10987	AE017194.1	AAS39086.1
<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13	AE017333.1	AAU39149.1
<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168</i>	AL009126.3	CAB11933.1
<i>Geobacillus sp. C56-T3</i>	CP002050.1	ADI25220.1
<i>Geobacillus sp. WCH70</i>	CP001638.1	ACS23091.1
<i>Geobacillus thermoglucosidasius C56-YS93</i>	CP002835.1	AEH46230.1
<i>Bacillus cereus AH603</i>	ACMP01000004.1	EEL72935.1
<i>Geobacillus kaustophilus HTA426</i>	BA000043.1	BAD74433.1
<i>Geobacillus thermodenitrificans NG80-2</i>	CP000557.1	ABO65531.1
<i>Bacillus cereus AH1273</i>	ACMT01000011.1	EEL95753.1
<i>Bacillus cereus Rock3-44</i>	ACML01000015.1	EEL52540.1
<i>Bacillus cereus Rock3-28</i>	ACMI01000017.1	EEL36601.1
<i>Bacillus mycoides</i> DSM 2048	ACMU01000004.1	EEM01481.1
<i>Bacillus megaterium</i> WSH-002	CP003017.1	AEN91921.1
<i>Bacillus licheniformis</i>	AB646664.1	BAL45999.1
<i>Bacillus megaterium</i> DSM 319	CP001982.1	ADF37115.1
<i>Bacillus weihenstephanensis KBAB4</i>	CP000903.1	ABY41414.1
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM 7	FN597644.1	CBI41283.1
<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i> RO-NN-1	CP002906.1	AEP89226.1
<i>Bacillus atrophaeus</i> 1942	CP002207.1	ADP34797.1
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	AE016877.1	AAP07251.1
<i>Bacillus sp. BT1B_CT2</i>	ACWC01000026.1	EFV69593.1
<i>Bacillus cereus R309803</i>		
<i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii</i> ATCC 6633	ADGS01000034.1	EFG90666.1
<i>Bacillus pseudomycooides</i> DSM 12442	ACMX01000004.1	EEM19009.1
<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032	CP000813.1	ABV60847.1
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IT-45	AGVQ01000001.1	EHM07375.1
<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061	ABRX01000007.1	EDW20348.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> IBL 200	ACNK01000003.1	EEM98522.1
<i>Bacillus citotoxicius</i> NVH 391-98	CP000764.1	ABS20518.1
<i>Desmospora sp. 8437</i>	AFHT01000099.1	EGK09788.1
<i>Bacillus coagulans</i> 2-6	CP002472.1	AEH52221.1
<i>Paenibacillus polymyxa</i> SC2	CP002213.1	ADO58679.1
<i>Brevibacillus laterosporus</i> GI-9	CAGD01000029.1	CCF16457.1

2.2.4. *afcd* Geninin PZR ile çoğaltılması

afcd geni sinyal sıraları ihmal edilerek PZR yöntemi ile çoğaltıldı. Tüm PZR reaksiyonları toplam hacim 50 µl olacak şekilde sırası ile, 1X *Taq* polimeraz tampon (Fermentas), 5 mM MgCl₂, 0,2 mM her bir dNTP, 300 ng her bir primer, 50 ng *Afla* genomik DNA ve 2 ünite High Fidelity *Taq* pol I enzimi (Fermentas) kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon, termal cyclus'da (Eppendorf) aşağıdaki program kullanılarak yapıldı:

- 94 °C'de 3 dk 1 döngü;
 - 94 °C'de 45 s
 - 52 °C'de 1 dk
 - 72 °C'de 1 dk 20 s
- } 30 döngü
- ve 72 °C'de 5 dk 1 döngü.

PZR ürününün büyüklüğü 1 kb DNA ladder (Biolab) standart olarak kullanılarak %1'lik agaroz jelde doğrulandı.

2.2.5. *afcd* Geninin Aracı Vektöre Klonlanması

PZR oğaltılması sonucu oluşan *afcd* geni, TA (pGEM-T easy vector) klonlama sistemi kullanılarak aracı vektöre klonlandı. Ligasyon reaksiyonu toplam 10 µl hacimde 1 µl pGEM-T, 5 µl ligasyon tamponu, 1 µl T4 DNA ligaz ve 3 µl PZR ürünü kullanılarak 16 °C'de 16 saat olarak gerçekleştirildi.

2.2.6. Kompetent Hücrelerin Hazırlanması

Çalışma kapsamında kullanılan *E.coli* DH5α ve BL21(DE3)pLysS suşlarına ait komponent hücreler kalsiyum klorür metodu takip edilerek hazırlandı (Maniatis vd.,1989). *E. coli* DH5α ve BL21(DE3) pLysS suşlarından seçilen tek koloniler bir gece önceden 3 mL LB besiyeri içeren tüplere ekilerek 37 °C'de gece boyu 200 rpm'de çalkalanarak inkübe edildi. Hazırlanan gece kültürünün optik yoğunluğu spektrofotometre cihazında (Cole Permer 1100 RS) 600 nm'de ölçüldü ve bu kültürden 30 ml LB besiyerine optik yoğunluğu 0,1 olacak şekilde yeniden ekim yapıldı. Hücreler 37 °C'de 200 rpm'de çalkalanarak büyümeye bırakıldı ve 1-1.5 saat sonra 600 nm'de 0,4-0,5 arasında optik yoğunluğa ulaşan kültür 4 °C'de 4000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti 10 ml 0,1 M CaCl₂ eklenerek çözdürüldü ve 30 dakika buz içerisinde bekletildi. Sonrasında 4 °C'de 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi

ve pellet 2 ml 0,1 M CaCl₂ çözeltisinde süspansiyeye edilerek 200 µl hacimlerde steril mikrosantrifüj tüplerine bölünerek kullanıldı.

2.2.7. *afcd*a Genini Taşıyan Rekombinant pGEM-T Easy Vektörüne *E.coli* DH5a

Hücrelerine Transformasyonu ve Pozitif Hücrelerin Seçimi

PZR ürününü taşıyan pGEM-T easy vektörü hazırlanan kompetent hücrelerine kimyasal yöntemle transforme edildi (Sambrook, 1987). Bunu için; hazırlanan amfisilinli petrilere sırasıyla 40 µl IPTG ve 40 µl X-Gal cam bagetle yayıldı. Ligasyon ürününü taşıyan kompetent hücreler 37 °C’ de 1.5 saat boyunca 200 rpm’ de çalkalanarak büyütüldü. 1 dk 5000 rpm’de çöktürüldükten sonra dipte 100 µl kalacak şekilde süpernatantın geri kalan kısmı uzaklaştırıldı. Daha sonra pellet kalan süpernatantla süspansiyeye edildi ve önceden IPTG ve X-Gal yayılan amfisilinli petrilere cam bagetle kuruyana kadar yayıldı. Transformasyon ürününü taşıyan petrilere mavi-beyaz koloni oluşumu için 37 °C’de 16 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Mavi-beyaz koloni oluşan petrilere belirli sayıda beyaz koloni ve bir adet mavi koloni seçilerek bunlardan plazmit izole edildi. Beyaz kolonilerden izole edilen plazmitler öncelikli olarak *NdeI* RE ile kesildi. Kesim reaksiyonu; 100 µl toplam hacimde 10 µl 10X *NdeI* tampon (NEB 4), 10 µl *NdeI* RE enzimi (10U/µl), 40 µl rekombinat pGEM-T easy vektörü ve 40 µl dH₂O olmak üzere toplam 10 µL hacimde olacak şekilde 37 °C’de gece boyu gerçekleştirildi. PZR ürünü ve mavi koloniden izole edilen plazmitin kesim ürünü ile yan yana %1’lik agaroz jelde yürütüldü. Burada bazı vektörlerin hem genin 5’ ucuna eklenen *NdeI* RE tanıma bölgesi içerisinde hem de pGEM-T easy vektöründe bulunan aynı enzime ait tanıma dizisi içerisinde kesildiği ve genin ikinci enzim olan *BamHI* RE ile kesilmesine gerek kalmadan vektörden ayrıldığı görüldüğünden *BamHI* RE ile kesim yapılmaksızın gene ait parça GeneElute Gel Extraction Kit (Sigma) kullanılarak %1’lik agaroz jelden temizlendi ve ekspresyon vektörüne aktarılmak üzere -20 °C’de saklandı. Ekspresyon için pET15b ekspresyon vektörü seçildi ve *NdeI* RE ile kesilerek *afcd*a fragmenti ile aynı basamaklar takip edilerek hazırlandı.

2.2.8. *afcd*a Geninin pET-15b Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

*afcd*a geni ekspresyon için pET-15b vektörünün *NdeI* bölgesine histidin kuyruk içerecek şekilde ligasyonu sağlandı. Ligasyon reaksiyonu toplam 10 µl hacimde, 1 µl 10X T4 DNA ligaz tamponu (Fermentas), 1µl T4 DNA ligaz (10 U/µl), 2 µl ekspresyon vektörü

ve 5 µl gen ürünü kullanılarak 16°C’de 16 saat olarak gerçekleştirildi. Ligasyon ürünü *E.coli* DH5α hücrelerin transforme edildi. Amfisilinli petrilere yayılarak büyütüldü. Belli sayıda DH5α hücresi seçilerek plazmit izole edildi (Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System, Promega). Plazmitler *NdeI* RE ile kesilerek *afcda* PZR ürünü ile birlikte yürütüldü ve pozitif vektörler belirlendi.

2.2.9. *afcda* Genini taşıyan Rekombinant pET-15b Vektörünün *E.coli* BL21 Hücrelerine Transformasyonu ve Ekspresyonun Belirlenmesi

afcda genini içeren pET-15b vektörü *E. coli* BL21 (DE3)Lys hücrelerine transforme edildi ve rastgele tek bir koloni seçildi ve ekspresyon için kullanıldı. Ekspresyon için seçilen tek bir koloni 5 ml LB besiyerinde 37 °C’de gece boyunca büyütüldü ve daha sonra 0,1 OD olacak şekilde 200 ml amfisilinli LB besiyeri içeren bir erlene yeniden ekildi. 37 °C’ de 3 saat inkübe edildikten sonra (~0.6 OD) son hacim 1 mM olacak şekilde IPTG (izopropil β-D-1-tiyogalaktopiranozit) ile indüklendi ve 3 saat daha inkübasyona devam edildi. İnkübasyon sonrası hücre kültürü 5 dakika buzda bekletildikten sonra 6000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi. Pellet 2 mg/ml lizozim içeren 10 ml Ni-bağlanma tamponu ile çözdürüldükten sonra -20 °C’de saflaştırma aşamasına kadar bekletildi.

Saflaştırma için protein pelleti buz üzerinde çözüldü ve sonikatörle (Bandelin Sonoplus) 10 saniye birer dakika aralıklarla 5 kez parçalanma işlemine tabi tutuldu. Sonrasında 7000 rpm’de 20 dk santrifüj edildikten sonra üst faz yeni bir tüpe alındı ve %12lik SDS-PAGE analizi ile ekspresyon belirlendi.

2.2.10. Saflaştırma

Ekspresyonun tespiti sonrası rekombinant olarak üretilen *afcda* enzimi HisLink Protein Purification Resin (Promega) kullanılarak üretici firmanın protokolü doğrultusunda saflaştırıldı.

Saflaştırma işlemi şu aşamalarda gerçekleştirildi;

- Protein örneğini içeren süpernatant 10 ml Ni-bağlanma tamponu ile birlikte kolona yüklendi. Bu sırada gelen fraksiyonların tümü toplandı.
- Daha sonra kolon sırasıyla; 4 ml 20 mM ve 15 ml 200 mM imidazol içeren Ni-yıkama tamponu ile yıkandı. Bu sırada gelen fraksiyonlarda Bradford boyası ile protein tayini yapıldı ve fraksiyonlar ayrı ayrı tüplere toplandı.

- Son aşamada kolon 10'ar ml Ni-elüsyon tamponu ile 5 kez yıkandı ve gelen elüsyonlar ayrı ayrı 10'ar ml halinde tüplere toplandı.

Saflaştırma işleminin kontrolü için her aşamada elde edilen fraksiyonlardan 30 µl alınarak 10 µl yükleme boyası birlikte 95 °C'de 5 dk. kaynatmanın ardından SDS-PAGE 'de analiz edildi.

2.2.11. Saf Proteinin Diyalizi

Saf protein örneği imidazolün ortamdan uzaklaştırılması amacı ile 1 litre diyaliz çözeltisinde (50 mM sodyum fosfat (pH: 7,5), 50 mM NaCl ve 1 mM DTT) gece boyunca manyetik karıştırıcı yardımıyla buz içerisinde diyaliz edildi. Daha sonra aynı miktar diyaliz tamponu içerisinde 5 saatlik 2. bir diyalizin ardından diyaliz edilen protein örneği filtreli santrifüj tüplerine (Amicon Ultra-4) aktarılarak 20 dk. 7000 rpm'de konsantre edildi. Daha sonra elde proteinin diyaliz sonrası konsantrasyonu SDS-PAGE ile kontrol edildi.

2.2.12. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

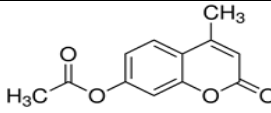
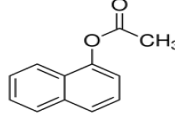
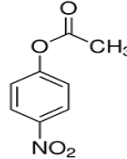
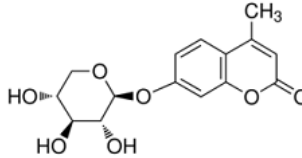
Protein konsantrasyonu Nano Drop (Spectrophotometer 2000) cihazı kullanılarak belirlendi. Kör olarak enzimin diyaliz tamponu kullanıldı. Diyaliz tamponundan 2 µl alınarak yapılan ilk ölçümün ardından saflaştırılan protein örneğinden de 2 µl alınarak 280 nm'de konsantrasyon belirleme ölçümü gerçekleştirildi.

2.2.13. AfCDA Enziminin Karakterizasyonu

2.2.13.1. AfCDA Proteininin Enzim Aktivitesinin Belirlenmesinde Kullanılan Substratlar

AfCDA aday enziminin aktivite deneyleri ve karakterizasyonu 7 farklı substrat kullanılarak gerçekleştirildi. Bu kapsamda proteinde *p*-nitrofenil asetat, α -naftil asetat, 4-metilumbelliferil asetat, huş ağacı ksilanı ve 4-metilumbelliferil- β -D-ksiloprenozid substratları kullanılarak; ksilanaz, asetil ksilan esteraz ve kitin deasetilaz aktiviteleri araştırıldı. Deneyler her bir substrat ile ayrı ayrı koşullarda gerçekleştirildi.

Tablo 3. Biyokimyasal karakterizasyon çalışmalarında kullanılan substratlar ve enzim aktivitesi sonucu oluşacak ürünler

Substratlar	Substratların kimyasal yapısı	Oluşan Ürün
4-Metilumbelliferil asetat		4-Metilumbelliferon+ Asetat
1 (α)-Naftil asetat		1(α)-Naftol+Asetat
<i>p</i> -Nitrofenil asetat		<i>p</i> -Nitrofenol+Asetat
4-metilumbelliferil- β -D-ksiloprenosid		4-metilumbelliferon+ β -D-Ksilopiranoz

2.2.13.2. Zimogram Analizleri

Zimogram analizleri ksilanaz aktivitesi için huş ağacı ksilanı ve 4-metilumbelliferil- β -D-ksiloprenozid substratları kullanılırken, asetil ksilan esteraz aktivitesi için ise substrat olarak α -naftil asetat kullanıldı ve deneyler SDS-PAGE (%12) jelde gerçekleştirildi. Örneklerin yüklenmesinde β -merkaptoetanol içermeyen doğal yükleme boyası kullanıldı.

A/CDA proteininde ksilanaz aktivitesinin zimogram analizleri SDS-PAGE (%12) kullanılarak şu şekilde gerçekleştirildi; %0,1 oranında huş ağacı ksilanı polimerleşmeden önce jele eklendi. Native boya ile hazırlanan protein örneği jelde yürütüldükten sonra % 2,5'lük 20 ml Triton X-100 ile oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi. 30 dk 20 ml 50 mM fosfat tamponu ile yıkandıktan sonra tekrar aynı tamponla 10 dk 37 C'de inkübe edildi. En son olarak yine aynı tamponla 55 °C'de 5 dk inkübasyonun ardından 20 ml %0,1'lik Kongo kırmızısı ile 15 dk boyanmaya bırakıldı. Boyamanın ardından bantların görünür hale gelmesi amacıyla 1M NaCl ile oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyonun ardından jel %

5'lik asetik asit ile yıkandı (Kacagan vd., 2008).

AfCDA proteininde ksilanaz aktivitesinin araştırılması amacıyla kullanılan bir diğer substratta 4-metilumbelliferil- β -D-ksiloprenozidtir. SDS-PAGE (%12) elektroforezinin ardından protein örneğini içeren jel 0,1 M sodyum fosfat (pH 6,5) tamponu ile önce 5 mL'de 5 dk 37 °C'de, daha sonra tekrar aynı tamponla 10 ml'de 5 dk 55 °C'de inkübe edildi. Daha sonra tampon jelden uzaklaştırılarak, 30 μ l (1 mM) 4-metilumbelliferil- β -D-ksiloprenozid içeren 5 ml (20 mM) Na-fosfat tamponu (pH 7,5) ile 2 dk 55 °C'de bekletildi. İnkübasyonun ardından UV ışığı altında bantların görünür hale gelip gelmedikleri gözlemlendi.

Asetil ksilan esteraz aktivitesinin zimogram analizi substrat olarak 0,1 M α -naftil asetat ve 4-metilumbelliferil asetat kullanılarak gerçekleştirildi.

α -naftil asetat ile aktiviteyi göstermek için protein örneği SDS-PAGE 'de (%12) yürütüldü. 2mL asetonda çözülen α -naftil asetat (0,1 mM), son hacim 20 ml olacak şekilde 0,1 M Tris-HCl (pH: 7,5) tamponuna eklendi. Fast Red tuzu (Sigma) ise; 20 mg Fast Red tuzunun 20 ml 0,1 M Tris-HCl (pH: 7,5) tamponunda çözülmesi ile hazırlandı. Deney, aynı tampon ile hazırlanmış olan substrat çözeltisinin boya çözeltisi ile aynı anda jelin üzerine dökülmesi ile gerçekleştirildi. 37 °C'de 15 dk boyanması sağlanan jel, bant görünür hale geldikten sonra görüntülendi (Faiz vd., 2007).

4-metilumbelliferil ile aktiviteyi göstermek için protein örneği SDS-PAGE elektroforezinde yürütüldü, jel 0,1 M 5 ml Tris-HCl (pH 7,5) ile yıkandı ve hemen ardından 10 ml tampon eklendi ve 37 C'de 5 dk inkübe edildi. Sonra etüvden alınarak üzerine son hacmi 2 mM olacak şekilde 2 ml DMSO'da çözülen 4-metilumbelliferil (0,1 M) yavaş yavaş eklendi. 1 dk beklemenin ardından UV ışığı altında incelendi.

2.2.13.3. Enzimin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

AFCDA enziminin optimum pH, optimum sıcaklık, ısıl kararlılığı ve kinetik deneyleri 96-kuyucuklu plaka ile substrat olarak diğer aromatik yapıları sentetik substratlara nazaran daha kararlı bir yapısı olduğu gözlenen *p*-nitrofenil asetat (*p*-NPA) kullanılarak 405 nm'de *p*-nitrofenol salınımının ölçülmesi şeklinde spektrometrik yöntemle (Molecular Device, SpectraMax M5) gerçekleştirildi. Reaksiyonlar substrat eklenmesi ile başlatıldı. Bu şekilde aktivite tayininin substratın kendiliğinden bozunma oranından en az şekilde etkilenmesi amaçlandı. Yine aynı nedenle özellikle optimum pH belirleme reaksiyonları, yüksek alkali tamponlarda ve sıcaklıklarda kendiliğinden bozunma oranı artan *p*-NPA daha uzun süre kararlı olduğu belirlenen farklı tampon çözeltilerde gerçekleştirildi. Bu tampon

çözeltileri ve yoğunluklarını belirlemek amacıyla *p*-nitrofenil asetat ile her bir tampon çözeltisinin ayrı ayrı 2 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM ve 50 mM konsantrasyonlarında kendiliğinden bozunma-aktivite oranları belirlendi. Daha sonra aktivite tayini kendiliğinden bozunmanın en az olduğu tampon çözelti konsantrasyonları göz önüne alınarak toplam reaksiyon hacmi 400 µl olacak şekilde son hacimde 2 mM *p*-NPA ve 5 mM tampon kullanılarak sitrik asitle sonlandırma metodu (Shao ve Wiegel, 1995) modifiye edilerek reaksiyon süresi 90 sn olacak şekilde gerçekleştirildi.

Spektrofotometrik yöntemle gerçekleştirilen tüm aktivite belirleme deneylerinde, kör olarak kullanılan reaksiyon ortamında enzim yerine aynı miktar diyaliz tamponu kullanıldı.

2.2.13.4. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi 20 µg enzim ve 2 mM *p*-NPA substrat olarak kullanılarak toplam 400 µl hacimde 90 saniye reaksiyon süresi olarak gerçekleştirildi. pH: 5,0-9,0 aralığında gerçekleştirildi. 50 °C'de yapılan ölçümlerde; pH: 5,0 sodyum asetat (5 mM), pH: 6-8 aralığında sodyum fosfat (5 mM), pH: 8,5-9 aralığında sodyum pirofosfat (5mM) tampon çözeltileri kullanıldı. Sonuçlar 405 nm dalga boyunda ölçülerek belirlendi ve grafiğe dönüştürüldü. En fazla absorbansın ölçüldüğü pH değeri optimum olarak kabul edildi.

2.2.13.5. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisinin belirlenmesine yönelik çalışmalar 96-kuyucuklu plate kullanılarak 405 nm'de *p*-nitrofenil asetatın *p*-nitrofenol salınımının spektrometrik yöntemle ölçülmesi ile belirlendi. Farklı sıcaklık derecelerinde, 2 mM Na-fosfat (pH: 7,5) tamponu kullanılarak 20-90 °C aralığında gerçekleştirilen ölçümlerde enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri elde edilen net aktivite ölçümlerinin değerlendirilmesi ile belirlendi. En fazla absorbansın ölçüldüğü sıcaklık değeri optimum olarak kabul edildi.

2.2.13.6. Enzimin K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi

AfCDA proteinine ait asetil ksilan esteraz aktivitesinin çeşitli kinetik verilerle ifade edilmesi amacı ile sabit enzim konsantrasyonunda 0,5-7 mM konsantrasyonlarda *p*-NPA kullanılarak K_m ve V_{max} parametreleri belirlendi.

p-NPA 0,5-7 mM konsantrasyonlarında hazırlandı ve reaksiyonlar bu substratla 50 °C' de 90 sn (su banyosunda) sitrik asitle sonlandırma yöntemi ile gerçekleştirildi (Shao ve Wiegel, 1995). Spektral yöntemle absorbans değerleri elde edildi. Elde edilen absorbans değerleriyle, Michealis-Menten eşitliğinden elde edilen Lineweaver-Burk eşitliği kullanılarak *Vmax* ve *Km* değerleri hesaplandı. Daha sonra bu veriler grafiğe dönüştürüldü (Şekil 18 ve 19).

2.2.13.7. Kinetik Deneylerinde Oluşan Ürüne Ait Standart Grafiğinin Çizilmesi

Enzim kinetiği deneylerinde standart olarak, substrat olarak kullanılan *p*-NPA'nın deasetillenmesi sonucunda açığa çıkan *p*-nitrofenol kullanıldı. 1-20 mM yoğunluklarda su ile hazırlanan *p*-nitrofenol'ün 405 nm'de gösterdiği absorbans 96-kuyucuklu plakada spektrometre ile ölçüldü. Elde edilen veriler daha sonra grafiğe dönüştürüldü (Şekil 20).

3. BULGULAR

3.1. *afcd* Genlerinin Nükleotid Dizilimi

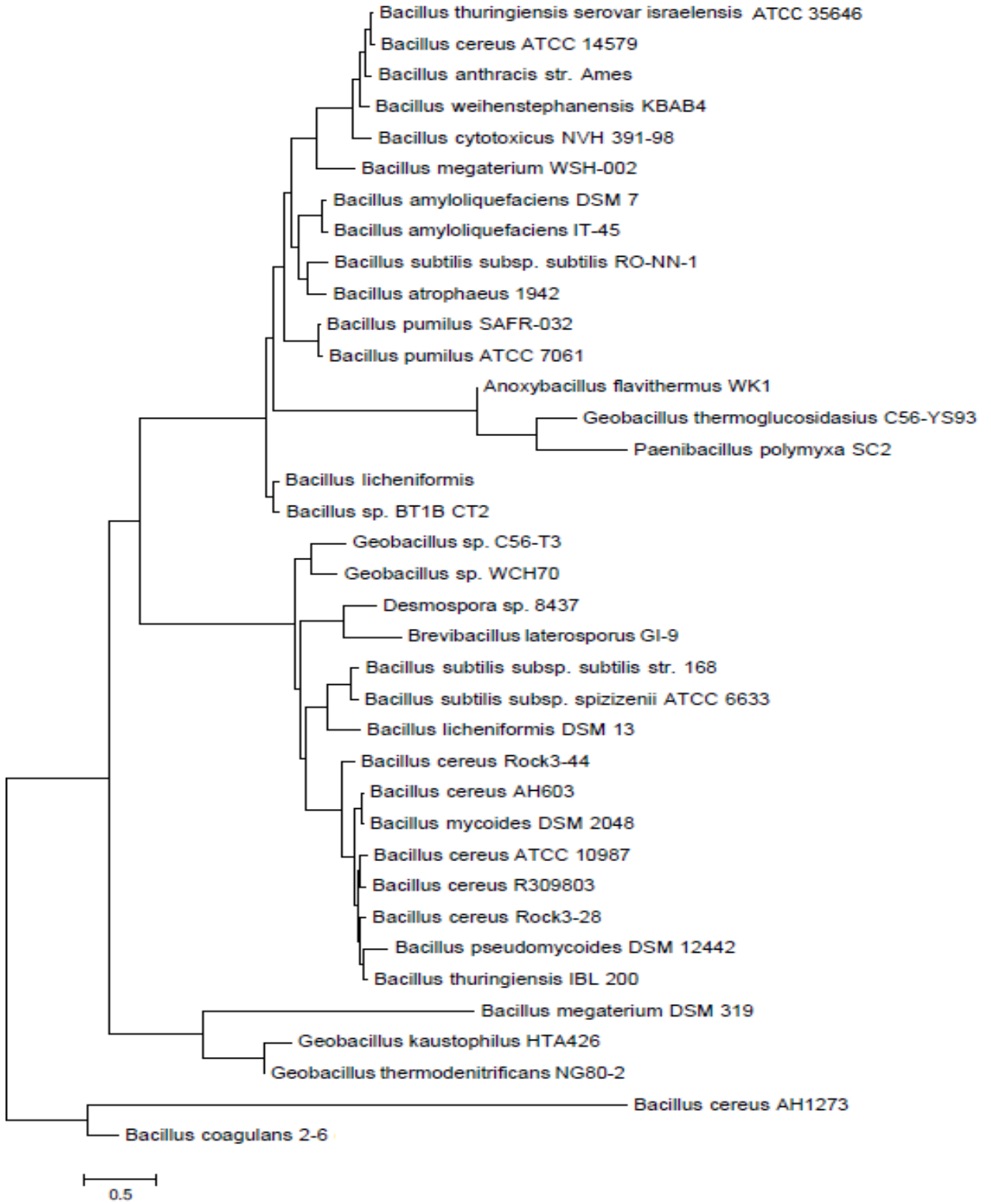
Genom dizilimi 2008 yılında tamamlanan *A. flavithermus* WK1' bakterisine ait *afcd* geninin nükleotid ve aminoasit dizilimi *A. flavithermus* genomunda belirlenmiştir (URL-3). Genin 762 nükleotitten oluştuğu ve ClustalW programı ile nükleotid dizilimi amino asit dizilimine dönüştürüldüğünde genin 253 amino asitlik bir proteini kodladığı belirlenmiştir. Gene ait nükleotid dizilimi Şekil 9'da verilmiştir.

```
TTGAAGTTTTTTTATATACTCGACGGAAAAGAAATAAAAAAATGGCTTCTCATCATCTCAATTGCCTTCGTACAGCTTCGATTTTTTAC
M K F F Y I L D G K E I K K W L L I I S I A F V T A S I F Y
ATTCAACAGCTTGAAGTGAGTTGTATTTCCACTGACCCTGGACCGAAAGCCATTTACAAAGTCGAAAATAAAAAACAATGAGCTCGCA
I Q Q L A S E F V F S T D P G P K A I Y K V E N K N N E L A
TTGACATTTGATATTAGTTGGGGAGAAACAAATGCGATACCTGTTTTAAACGTGCTAAAAAACATGGAGTGAAAGCTACATTTTTTCTA
L T F D I S W G E T N A I P V L N V L K K H G V K A T F F L
TCTGCTTCTTGGGCTGAACGTCACCCACGCATCGTAAAAAATCGCAGATGATGGACACGAGATCGGGAGTATGGGCTATGAGTACAAA
S A S W A E R H P R I V K K I A D D G H E I G S M G Y E Y K
AACTATACTGAACTAGAGAGAGGGAAAATTATTCGTGACTTAGCTCAAGCTAAAAAAGTGTTTAATACGTTAGGCATTAACATACCCCT
N Y T E L E R G K I I R D L A Q A K K V F N T L G I K H T P
TTCCTACGCGTACCGACAGGAAATTTAATAAAAACGTTTTGAAAGTTGTTTCATTCTTTTGGTCATACTGTTGTTTCATTGGAGTGTGAT
F L R V P T G N F N K N V L K V V H S F G H T V V H W S V D
TCAAAAGACTGGCTTAATCCTGGCGCAAATGCCATTGTTGAAATGTGACAAAAACGCAAAGGGCGGAGATATTGTGTTACTTCATGCA
S K D W L N P G A N A I V E N V T K N A K G G D I V L L H A
TCAGACTCAGCGAAGCAAACCGCTCATGCATTAGAGCAAATTATCGTTTGGATGAAAAAAGAAGGATATAAAAGTGTGACCATATCCGAT
S D S A K Q T A H A L E Q I I V W M K K E G Y K S V T I S D
CTTGTCATAACGCTCATATAAAAAGTAAAGAAATAAAATGA
L V N N A H I K S K E I K -
```

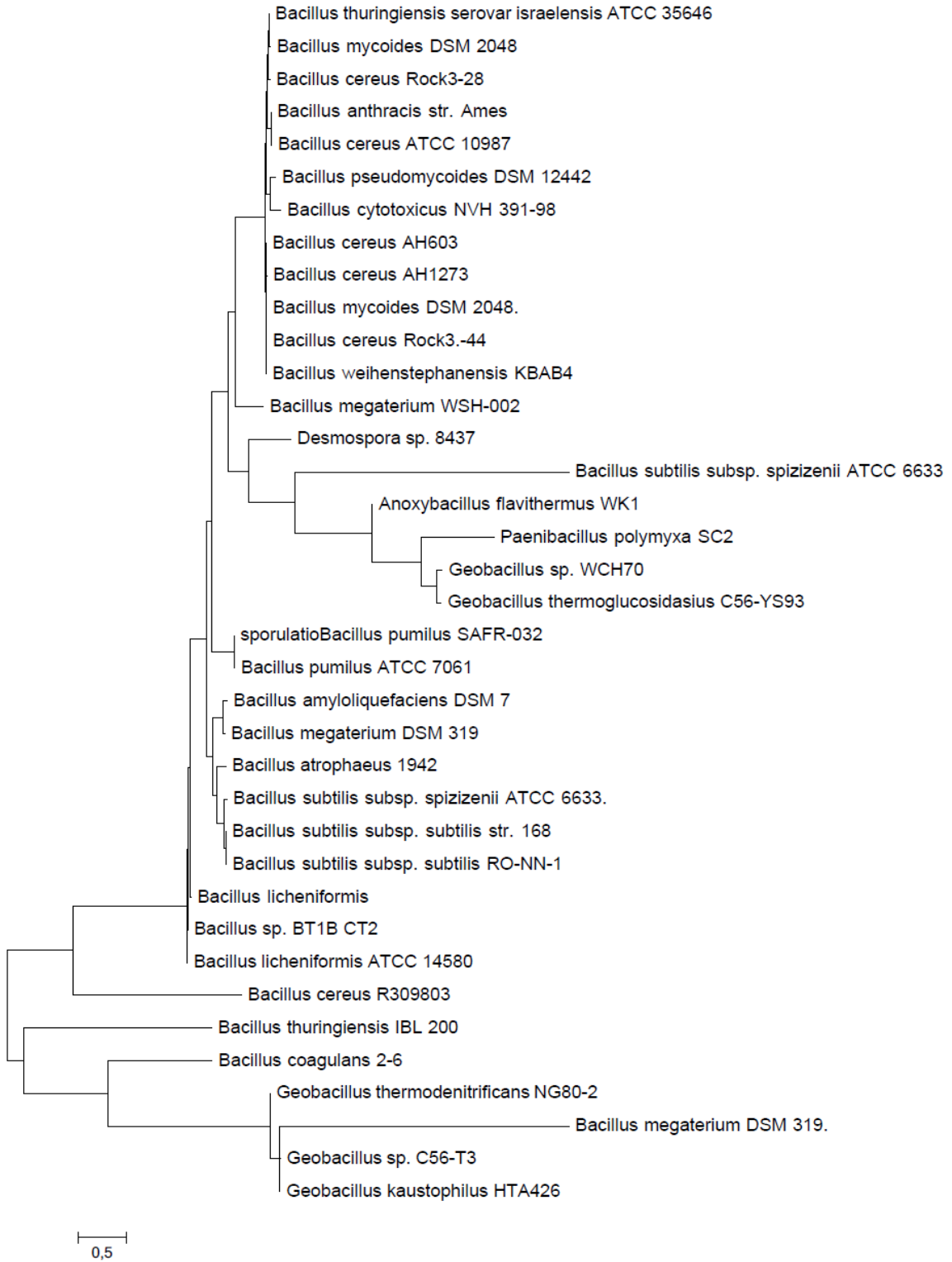
Şekil 9. *afcd* genine ait nükleotid ve amino asit diziliminin şematik görüntüsü. Toplam 762 nükleotid olan genin TTG başlama kodunu ile başladığı gözlenmiştir.

3.2. Nükleotid ve Aminoasit Sıralarıya Dayalı Filogenetik Benzerliğin Araştırılması

Dendogramlar *A. flavithermus* WK1 suşunun en çok *Anoxybacillus flavithermus* türüne benzediğini göstermiştir ve çok net bir şekilde hem nükleotid verileri ile hem de amino asit verileri ile yapılan karşılaştırmalarda *Anoxybacillus* cinsinin diğer cinslerden çok net bir şekilde ayrıldığı gözlemlendi.



Şekil 10. *Bacillus* cinsine CE-4 ailesi genlerinin nükleotid dizilimleri kullanılarak oluşturulan benzerlik ağacı. Nükleotid verileri BioEdit programı kullanılarak oluşturulmuş ve MEGA5 programı kullanılarak dendograma dönüştürülmüştür. Karşılaştırmada kullanılan tüm nükleotid verileri NCBI veri tabanından temin edilmiştir.



Şekil 11. *Bacillus* cinsine CE-4 ailesi proteinlerin amino asit dizileri kullanılarak oluşturulan benzerlik ağacı. Amino asit verileri BioEdit programı kullanılarak oluşturulmuş ve MEGA5 programı kullanılarak dendograma dönüştürülmüştür. Karşılaştırmada kullanılan tüm nükleotid verileri NCBI veri tabanından temin edilmiştir.

3.3. Korunmuş Aminoasit Dizilişlerinin Karşılaştırılması

afcd genin kodladığı CDA enzimin amino asit diziliminin CE-4 ailesi enzimlerinin bilinen üyelerinin amino asit dizilimleri ile karşılaştırılması sonucu CE-4 ailesine ait korunmuş aminoasit motiflerinin *A. flavithermus* WK1 bakterisinden elde edilen AfCDA enzimi ile büyük oranda benzerlik gösterdiği görüldü (Tablo 3). Karşılaştırmalı analizler ve kristal yapı aydınlatma çalışmaları CE-4 ailesi üyelerinde beş korunmuş motifin bulunduğunu göstermektedir (Tablo 3) verilmiştir. Toplam 5 motifden, motif 2'nin en fazla farklılık taşıdığı belirlenmiştir.

Tablo 4. CE-4 ailesine ait korunmuş amino asit dizi sıraları. *Bcsub* (*Bacillus subtilis*); *Bcanth* (*Bacillus anthracis*); *Spneu* (*Streptococcus pneumoniae*); *Collind* (*Colletotrichum lindemuthianum*); *Stliv* (*Streptomyces lividans*); *Mroux* (*Mucor rouxii*); *Aflv* (*Anoxybacillus flavithermus*).

Mikroorganizmalar	Motif 1	Motif 2	Motif 3	Motif 4	Motif 5	Referanslar
<i>Bcsub</i>	TXDX	HXXXHP	XPXX	XXDWX	XHX	(Barbe, 2009)
<i>Bcanth</i>	66-69	124-129	164-167	182-186	221-223	(Oberbarnscheidt, 2007)
<i>Spneu</i>	55-58	113-118	153-156	170-175	210-212	(Vollmer, 2000)
<i>Collind</i>	250-253	297-312	297-350	259-363	398-400	(Shrestha, 2004)
<i>Stliv</i>	46-49	103-108	143-146	166-170	205-207	(Shareck, 1991)
<i>Mroux</i>	45-48	102-107	142-145	165-169	204-206	(Kafetzopoulos, 1993b)
<i>Aflv</i>	156-159	213-218	253-256	280-284	319-321	(Saw, 2008)
	57-60	114-119	154-157	169-173	208-210	

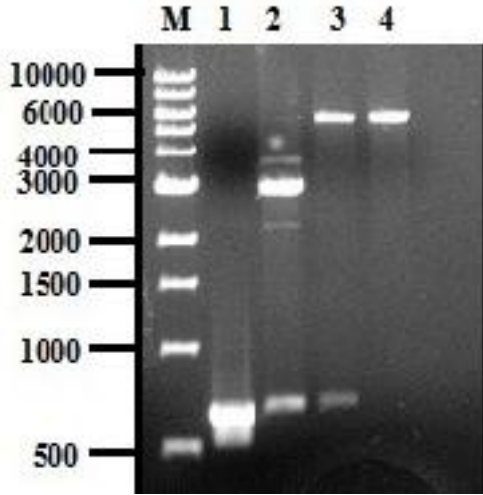
Korunmuş motifler bireysel aminoasitlerin korunmuşluğu yönünden incelendiğinde, motif 1'de en korunmuş amino asitlerin triptofan ve aspartik asit amino asitlerinin olduğu ve üç boyutlu yapı analizlerinin bu motifte aspartik asit amino asitinin katalitik aktivite için gerekli olduğunu göstermiştir (Şekil 12). Motif 2 korunmuş a.a'ler yönünden incelendiğinde her bir a.a biriminin %100 korunmuş olmadığı gözlemlendi. Bu motifte en korunmuş aminoasitler olarak 2 adet histidin ve 1 adet prolin aminoasitinin *Afla* CDA proteininde değişken olduğu belirlenmiştir. Motif 3, motif 4 ve motif 5'te ise en korunmuş amino asitlerin sırası ile prolin, aspartik asit ve histidin olduğu belirlendi.

	MT1	MT2	MT3	MT4	MT5
Bcsub	TFDN...	HSFHHP...	PPRG...	FVDWK...	LHT
Bcanth	TFDN...	HSWSHP...	PPRG...	FLDWK...	LHA
Spneu	TFDD...	HSWSHP...	PPYG...	SLDWK...	MHD
Collind	TYDD...	HTYAHP...	APYL...	TKDYE...	SHD
Stliv	TFDD...	HSYTHP...	PPYG...	SQDWN...	MHD
Mroux	TYDD...	HTWSHP...	PPYG...	TDDWS...	THE
Aflv	TFDI...	MGYEEK...	VPTG...	SKDWL...	LHA

Şekil 12. Farklı mikroorganizmalar arasında CDA proteinlerinde korunmuş 5 adet motifin şematik gösterimi. Motif 2 CDA ailesi üyeleri içerisinde en değişken motif olarak belirlendi. Diğer motiflerin her birinde ise korunmuşluk oranı yüksek olarak belirlendi.

3.4. *afcda* Geninin PZR ile Çoğaltılması ve pET-15b Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

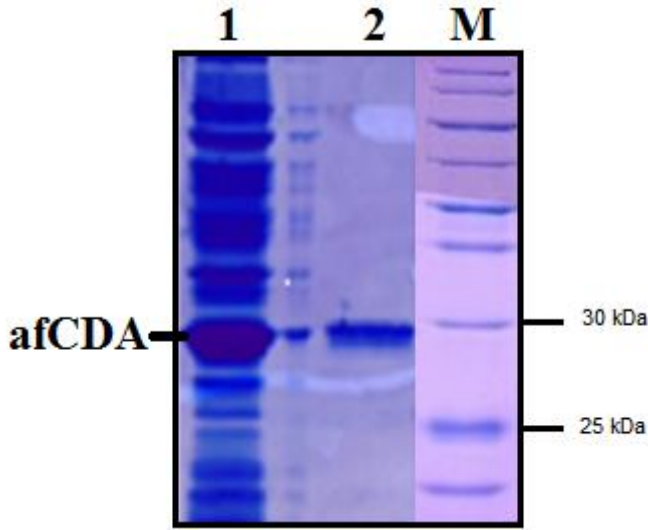
afcda geni *afcda_FwNS* ve *afcda_Rw* primerleri ile sinyal sırası ihmal edilerek çoğaltıldı ve 762 baz çifti uzunluğunda olduğu bilinen gene ait PZR ürünü moleküler ağırlık standartı kullanılarak % 0,8'lik agaroz jelde yürütülerek doğrulandı (Şekil 13, sütun 1. sütun). pGEM-T easy vektörüne klonlanan PZR ürünü daha sonra *NdeI* RE ile kesildi ve (Şekil 13, 2. sütun) ekspres edilmek üzere HisTag kuyruğu içerecek şekilde pET-15b ekspresyon vektörüne klonlandı ve *afcda/pET15b* olarak isimlendirildi. Klonlamanın doğrulanması amacıyla boş pET-15b vektörü ve rekombinant plazmit *NdeI* RE ile kesildi. Şekil 13'de 3 nolu sütun rekombinant plazmitin 4 nolu sütun ise boş pET-15b vektörünün *NdeI* RE ile kesim sonucunu göstermektedir.



Şekil 13. *afcda* geninin pET-15b ekspresyon vektörüne klonlama basamaklarını gösteren %0,8'lik agaroz jelde analizi. M: moleküler ağırlık standartı, 1: PZR ürünü, 2: *afcda* genini taşıyan pGEM-T easy vektörün *NdeI* RE ile kesimi, 3: rekombinant pET-15b vektörünün *NdeI* RE ile kesimi, 4: boş pET-15b vektörünün *NdeI* RE ile kesim sonucu

3.5. *E.coli* BL21 Hücrelerinde Ekspresyonun Gözlenmesi ve AfCDA Enziminin *E.coli* BL21 Hücrelerinden Saflaştırılması

pET-15b ekspresyon vektörüne klonlanan *afcdal* geni *E. coli* BL21(DE3)pLysS suşunda ekspres edildi. IPTG ile indükleme sonucu elde edilen ham protein özütünde (Şekil 14, 1. sütun) bulunan AfCDA proteini, ekspresyon vektörüne klonlama stratejisi gereği N-ucunda 6 tane histidin içerdiğinden Ni-afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırıldı. Proteini kodlayan gene eklenen histidin birimlerinin azotları, nikel parçacıkları ile etkileşerek AfCDA proteininin diğer proteinlerden ayrılmasını sağlamaktadır (Faiz vd., 2008). *E. coli*'den gelen proteinler ise nikel afinite göstermedikleri için liganda bağlanamadılar. Böylelikle bağlanma aşamasında uzaklaştırılmış oldular. Nikel liganda bağlanan AfCDA proteini ise yıkama işlemiyle imidazol yardımıyla kolondan çıkarıldı. Daha sonra saflaştırılan protein örneğinden 20 µl alındı ve 10 µl yükleme boyası ile % 12'lik SDS-PAGE jeline yüklenerek elektroforez gerçekleştirildi. Elektroforez jelinin Coomassie Brilliant Blue R250 ile boyanıp fazla boyanın uzaklaştırılması sonucunda AfCDA enziminin *E.coli*'de ekspres edildiği ve kullanılan kit ile etkili bir biçimde saflaştırıldığı tespit edildi (Şekil 14, 2. sütun). 200 ml kültürle yapılan indüklemelerde 0,015 mg/ml ile 1,2 mg/ml arasında değişen konsantrasyonlarda protein izole edildi.



Şekil 14. Saf AfCDA enziminin (% 12'lik) SDS-PAGE analizi. 1: ekspresyon sonucu elde edilen ham protein özütü, 2: saf AfCDA enzimi, M: moleküler markır (Fermentas Broad Range Unstained Protein Ladder).

3.6. Enzim Aktivitesinin Gösterilmesi

Farklı özellikte substratlar kullanılarak AfCDA enziminin ksilanaz ve asetil ksilan esteraz aktiviteleri araştırıldı. *p*-NPA ile gerçekleştirilen spektrofotometrik aktivite belirleme deneylerinde bu substratın reaksiyon ortamındaki aktivite tamponu içerisinde kendiliğinden bozunması ile verdiği absorbans göz önüne alındı. Bu miktarın enzim aktivitesi olarak ölçülen absorbanstan çıkarılması sonucu net aktivite belirlendi.

p-NPA, 4-MUA, α -naftil asetat substratları ile yapılan aktivite deneyleri sonucunda enzimin substratların ester bağlarında ki *O*-asetil gruplarını uzaklaştıran asetil ksilan esteraz aktivitesine sahip olduğu belirlendi. Ancak huş ağacı ksilanı ve 4-metilumbelliferil- β -D-ksiloprenosid ile aktivitesinin olmadığı belirlendi.

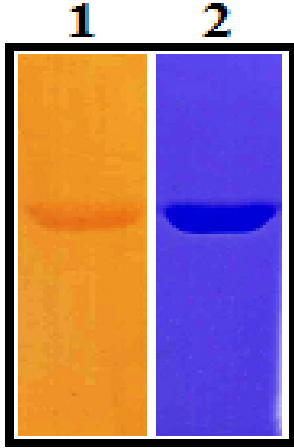
3.6.1. AFCDA Enziminde Ksilanaz ve Asetil Ksilan Esteraz Aktivitesinin Araştırılması

3.6.1.1. Zimogram Analizleri

AfCDA enziminin ksilanaz aktivitesinin belirlenmesi amacı ile % 0,2' lik huş ağacı içeren (% 12'lik) SDS-PAGE'de doğal boya kullanılarak gerçekleştirilen aktivite deneyinde kongo kırmızısı ile boyanan jelde ksilanaz aktivitesi sonucu görülmesi beklenen aydınlık bantlar gözlenmedi. Florojenik bir substrat olan 4-metilumbelliferil- β -D-ksiloprenosid ile gerçekleştirilen deneyde de AfCDA proteinini içeren jelde ksilanaz aktivitesi araştırıldı. UV ışığı altında görüntülenen jelde herhangi bir floresan parlaklık

gözlenmedi.

Asetil ksilan esteraz aktivitesini belirlemek amacıyla protein örneğini içeren jelin Fast Red tuzu ile boyanması sonrası, jelde esteraz enzimlerinin α -naftil asetat ile aktivite vermeleri sonucu oluşan kırmızı bant gözlendi (Şekil 15). 4-MUA ile yapılan zimogram deneyinde ise aktivitenin olmadığı belirlendi.



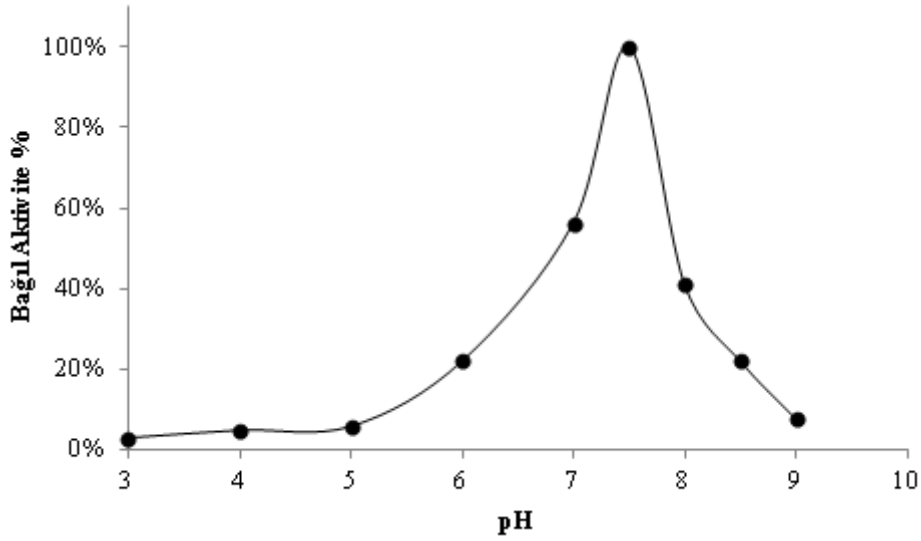
Şekil 15. AfCDA proteininin SDS-PAGE (%12)'de gerçekleştirilen zimogram analizinin sonucu. 1: α -naftil asetat ile aktivite gösteren esteraz enzimlerine özgü kırmızı bant. 2: AfCDA proteinini içeren jelin coomassie brillant mavi-R 250 ile boyanması sonucu gözlenen bant.

3.6.2. Biyokimyasal Karakterizasyon

AfCDA proteininin biyokimyasal karakterizasyonu asetil ksilan esteraz aktivitesine bağlı olarak gerçekleştirildi. Karakterizasyonda kullanılan substratlar ve oluşan ürünler Tablo 3'deki gibidir.

3.6.2.1. Optimum pH

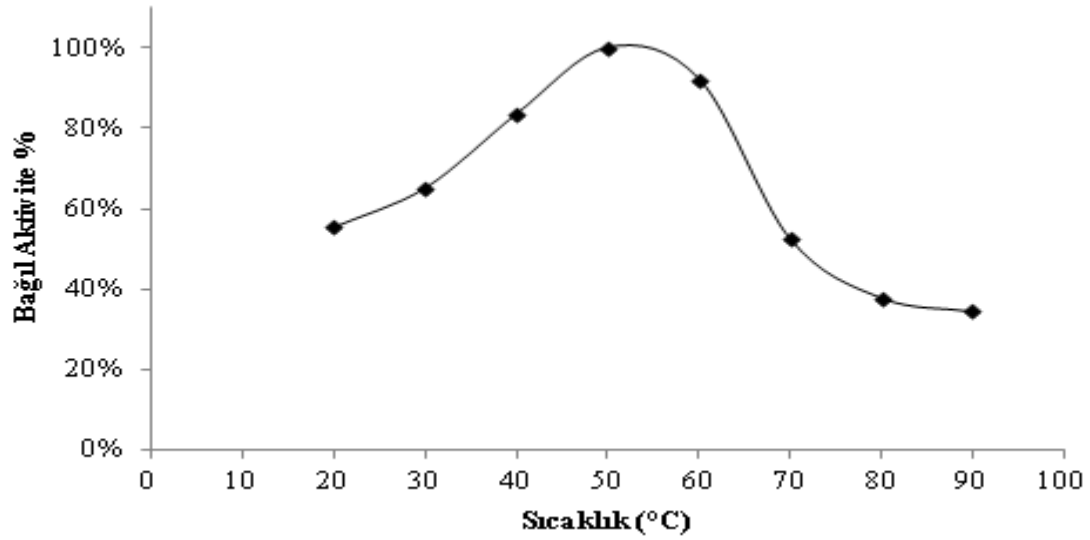
Enzim aktivitesi üzerine pH etkisinin belirlenmesine yönelik çalışmalar sonucunda AfCDA enziminin pH 5-9 arasında geniş bir aralıkta aktif olduğu, ancak optimum pH değerinin 7,5 civarı olduğu belirlendi (Şekil 16).



Şekil 16. Enzime ait pH'ya bağlı bağlı aktiviteyi gösteren grafik

3.6.2.2. Optimum Sıcaklık

Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisinin belirlenmesi amacı ile 30-80 °C aralığında spektrofotometrik yöntem ile gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda AfCDA enziminin optimum 50 °C' de aktivite gösterdiği belirlendi (Şekil 17).



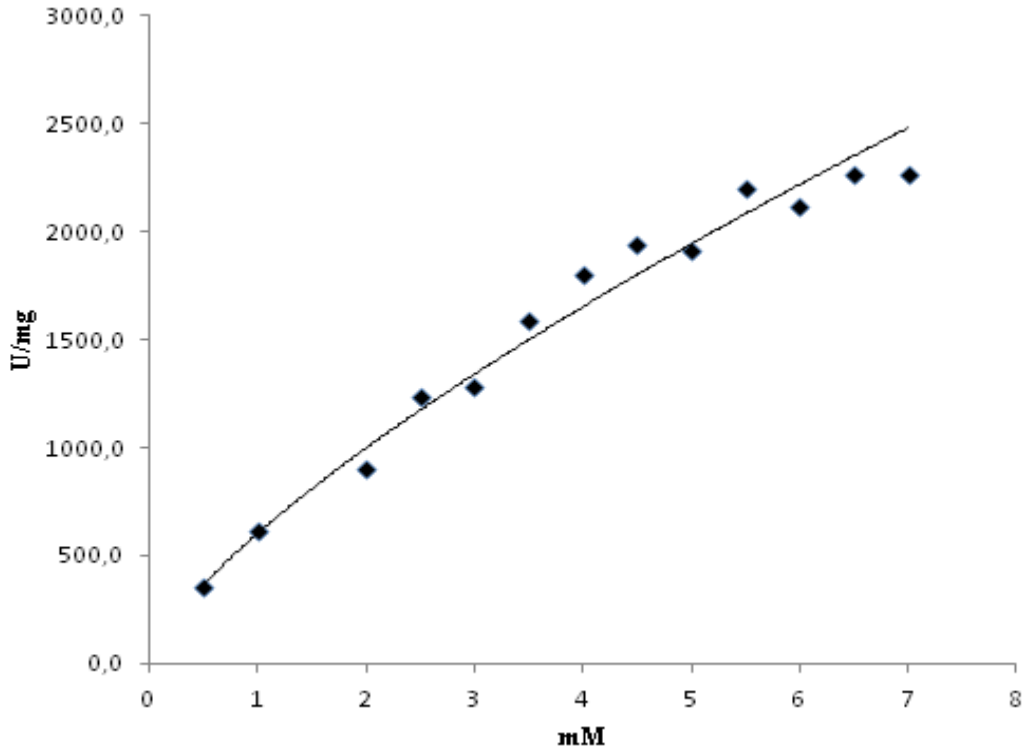
Şekil 17. AfCDA enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığa ait grafik.

3.6.2.3. Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi

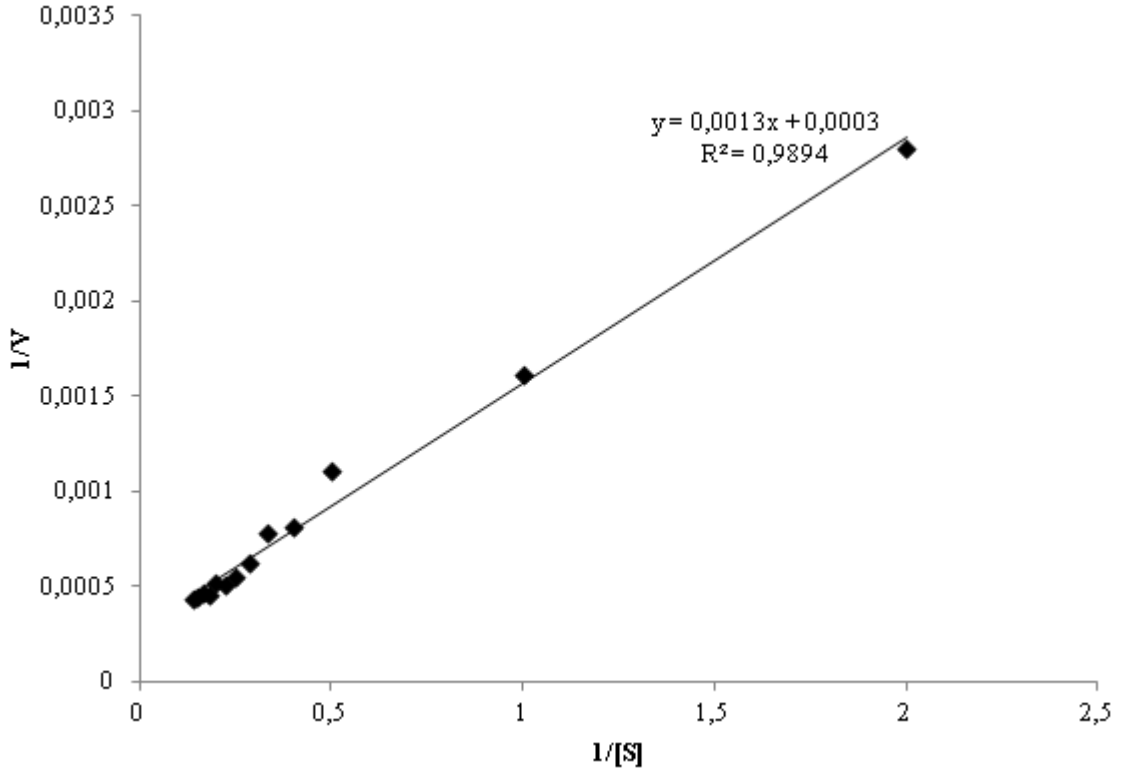
Bir enzimin aktivitesi, o enzimin katalizlediği reaksiyonun hızıdır. Uluslararası Biyokimya Birliği Enzim Komisyonunun tanımladığı aktivite birimi “Uluslararası Birim”

Unite (U) dir. Uluslararası Birim, standart koşullar altında dakikada bir mikromol (μmol) substratı dönüşüme uğratan enzim miktarıdır. Spesifik aktivite ise bir mg enzim tarafından dakikada dönüşüme uğratılan substratın mikromol miktarıdır (Unite/mg) (Yıldırım vd., 2007).

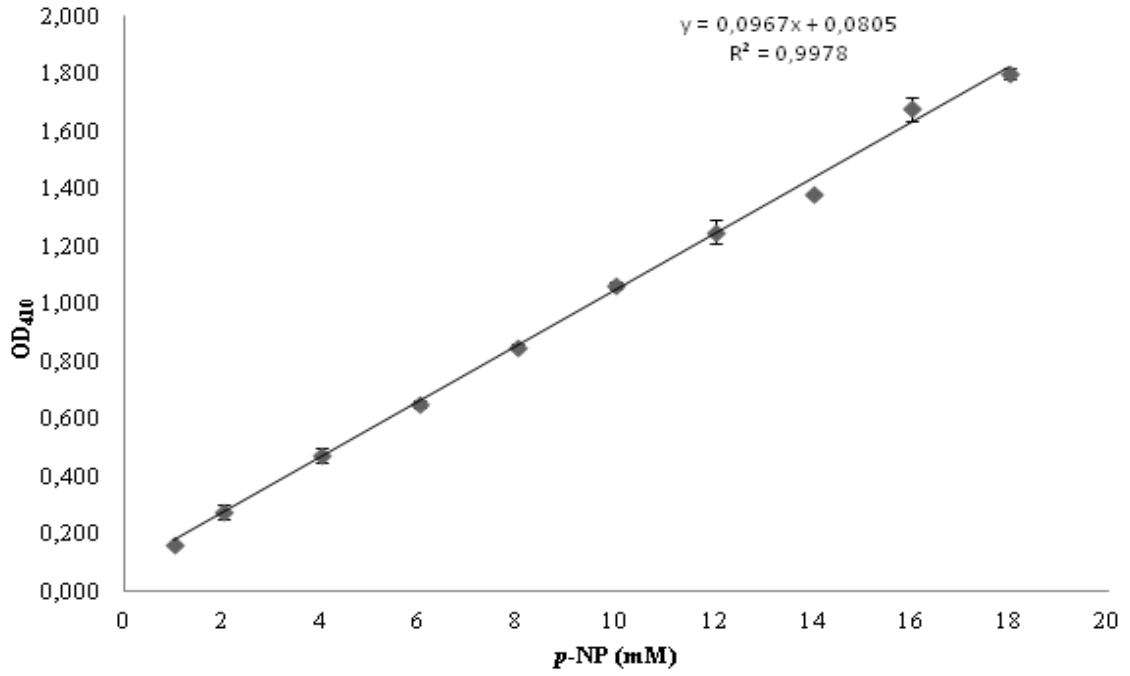
A/*C*D*A* enziminin kinetik parametrelerinin belirlenmesi amacı ile sabit enzim konsantrasyonunda (0,75 μg), 0,5-7 mM konsantrasyonlarda *p*-NPA ile gerçekleştirilen aktivite deneyleri sonucunda elde edilen veriler Lineweaver-Burk (Şekil 19) grafiğine dönüştürüldü. Lineweaver-Burk grafiği Michealis-Menten eşitliğinin (Şekil 18) her iki tarafının tersinin alınması ile elde edilen doğrusal bir grafikdir. Kinetik ölçümler sonucunda *A*/*C*D*A* enzimine ait V_{max} değeri 3333,33 U/mg, K_m değeri 4,33 μM olarak bulunmuştur. Kinetik deneyleri sırasında *p*-NP standart olarak kullanılmıştır (Şekil 20).



Şekil 18. Michealis-Menten Grafiği



Şekil 19. Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 20. p -NPA'nın deasetillenmesi sonucu oluşan p -NP için standart grafiği.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Termofilik organizmaların hücresel elemanları da (enzimler, proteinler ve nükleik asit) termostabildir (Haki vd., 2003). Termofilik mikroorganizmalardan izole edilen termostabil enzimler, sahip oldukları tamamen doğal kararlılıktan dolayı bir çok ticari uygulama alanı bulmaktadırlar (Demirijian vd., 2001). Bu bağlamda *Anoxybacillus flavithermus* WK1 *afcd*a geninin rekombinant üretimi ve biyokimyasal karakterizasyonu konulu yüksek lisans tezi kapsamında gerçekleştirilen çalışmada termofilik *Aflv* WK1 bakterisine ait, karbonhidrat metabolizması üzerinde etkili *AfCDA* enzimi rekombinant olarak üretilmiş ve saflaştırılarak biyokimyasal karakterizasyonu yapılmıştır. Biyokimyasal karakterizasyon öncesi genin kodladığı proteine ait a.a. dizilimi biyoinformatik analize tabi tutulmuş ve sahip olduğu olası aktiviteler belirlenmiştir. Karbonhidrat metabolizması çoğu yaşam formu için çok önemlidir ve şekerlerin değişimini etkileyen enzimlerin de tüm yaşayan organizmalar için elzem oldukları bildirilmiştir (URL 4).

Kitinin endüstriyel uygulamalarda daha kullanılabilir türevi olan kitosana dönüşümünü katalize eden kitin deasetilaz enzimleri bu güne kadar pek çok mantardan, böcekten ve denizel bakterilerden izole edilerek karakterize edilmesine rağmen, literatürde aerobik termofilik bakterilerde böyle bir çalışmanın yapıldığına dair fazla bilgi bulunmamaktadır.

NCBI veri tabanından elde edilen veriler doğrultusunda, 762 baz çifti uzunluğundaki *afcd*a geninin CE-4 ailesi enzimleri ile benzer olarak NodB homoloğu domain içerdiği bilgisinden yola çıkılarak gen ve aminoasit dizisinin, bu ailenin bilinen üyelerinin gen ve amino asit dizileri ile karşılaştırılması sonucunda, genin NodB domaini içerdiği ve korunmuş beş motiften özellikle motif 2'nin en çok farklılık gösteren motif olduğu belirlenmiştir. Bu motif CE- 4 ailesi üyelerinde metal iyonuna bağlanan iki histidin ve ilmeği dengede tutmak için ikinci histidinle bağlanan bir hidrojen bağı meydana getiren bir serin veya tireonin içerir. *SlivAcXE*'da motif 2' de bulunan iki histidin birimi ile motif 1'de bulunan aspartik asit katalitik bölgeyi oluşturmaktadır.

CE-4 ailesi üyesi olan *afcd*a geninin nükleotid ve aminoasit dizilimi kullanılarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur. *Bacillus* (28 tür), *Geobacillus* (5 tür), *Paenibacillus* (1 tür) ve *Desmospora* (1 tür) cinslerine ait toplam 35 türün aynı genine ait bilgiler bu dendogram çizilirken kullanılmıştır. CE-4 ailesi genlerinin aminoasit dizileri kullanılarak oluşturulan filogenetik benzerlik ağacı *A. flavithermus*'un *B. subtilis*, *Paenibacillus polymyxa*,

Geobacillus sp ve *Geobacillus thermoglucosidasius* ile gruplanarak diğer tüm türlerden ayrıldığını göstermiştir. Nükleotid verileri ile aynı dendrogram oluşturulduğunda ise *A. flavithermus*'un daha az sayıda tür kapsayacak şekilde sadece *Paenibacillus polymyxa*, ve *Geobacillus thermoglucosidasius* ile birlikte diğer tüm türlerden ayrıldığı gözlenmiştir. Bu sonuç, *afcda* nükleotid ve aminoasit diziliminin 16S rRNA gen dizilimi gibi *A. flavithermus* ve diğer türlerin moleküler sınıflandırılmasında kullanılabileceğini göstermiştir.

Bir enzimin aktivitesi o enzimin katalizlediği reaksiyonun hızıdır. Bir enzimin kataliz yeteneğini ve etkinliğini sayısal olarak ifade etmek için onun kinetiğini araştırmak gerekir. Enzim kinetiği bir reaksiyonun hızını belirleyen etmenleri inceler (Temizkan vd., 2008). Enzimatik reaksiyonun hızı yani aktivitesi sıcaklık, pH,enzim ve substrat konsantrasyonu, iyon şiddeti, aktivatör ve inhibitörlerin varlığı gibi pek çok faktörden etkilenmektedir (Yıldırım vd., 2007). *AfCDA* proteininin asetil ksilan esteraz aktivitesinin optimum pH ve optimum sıcaklık parametreleri *p-NPA* ile gerçekleştirilen spektrofotometrik ölçümler sonucunda elde edildi. Optimum pH deneyleri dışında tüm aktivite deneyleri tampon olarak Na-fosfat (pH 7,5) kullanılarak gerçekleştirildi.

AfCDA'ya ait optimum pH değeri pH: 5-9 aralığında belirlendi. Substrat olarak kullanılan *p-NPA*'ın alkali reaksiyon şartlarında kendiliğinden bozunma hızının yüksek olması nedeni ile 10,0-11,0 aralığında aktivite deneyleri gerçekleştirilemedi. Aynı nedenden dolayı reaksiyonlar farklı pH aralıklarında farklı tamponlar kullanılarak gerçekleştirildi. pH: 5-6 aralığında Na-asetat, pH: 6-8 aralığında Na-fosfat ve pH: 8,5-9 aralığında sodyum pirofosfat tamponları ile gerçekleştirilen aktivite deneyleri sonucunda enzimin asetil ksilan esteraz aktivitesine ait optimum pH değeri 7,5 olarak belirlendi. CE-4 ailesinden kitin deasetilaz enzimlerinin optimum pH değerleri 7-12 aralığındadır (Zhao vd., 2011b). Bu aileden tanımlanan *S. lividansın* asetil ksilan esterazının optimum pH'sı ise 7,5 olarak belirlenmiştir (Dupont vd., 2000). *AfCDA* proteininin asetil ksilan esteraz aktivitesine ait optimum sıcaklık değeri 30-80 °C aralığında gerçekleştirilen aktivite deneyleri sonucunda 50 °C olarak belirlendi. Kitin deasetilaz enzimlerinin optimum aktivite sıcaklıkları 50-60 °C yakınlarındadır (Zhao vd., 2011b). *Sliv* AcXE'ı ise optimum 70 °C'de aktivite göstermektedir (Dupont vd., 2000).

AfCDA proteininin asetil ksilan esteraz aktivitesinin reaksiyon hızının deneysel parametrelerdeki değişimlerle nasıl değiştiğinin incelenmesi amacıyla gerçekleştirilen enzim kinetiği çalışmaları sonucunda enzimin asetil ksilan esteraz aktivitesine ait yaklaşık

V_{max} değeri 3333,33 U/mg K_m değeri 4,33 μ M olarak belirlendi. Bir enzimin substrata olan ilgisi arttıkça K_m değeri o kadar küçülür. K_m değeri yükseldikçe enzimin substrata ilgisi azalacağından, dönüşüm sayısının değeri de azalacaktır. Literatür incelendiğinde *Bacillus pumilis* AcXE'nin substrat olarak α -naftil asetat kullanılarak gerçekleştirilen kinetik deneylerinde (Degrassi vd., 1997) V_{max} değeri 360 μ mol dk⁻¹ mg⁻¹, K_m değeri ise 1,54 mM olarak verilmektedir.

5. ÖNERİLER

Moleküler biyolojideki hızlı gelişmeler neticesinde her gün değişik kaynaklardan enzimlerin saflaştırılması ve karakterizasyonuna ilaveten, var olan enzimlerin birçok yeni özellikleri ortaya çıkarılmaktadır. Yeni tanımlanan enzimler ve bunlara ait özelliklerin bilinmesi, bu verileri iyi bir amaca dönüştürmek için ilk önemli adımdır.

Bu çalışma, genom projesi 2008 yılında tamamlanan ve iki adet karbonhidrat deasetilaz geni taşıyan termofilik *Anoxybacillus flavithermus* bakterisinin *cda* geni pET-15b vektörüne klonlanıp *Escherichia coli*'de (*E. coli*) ekspres edilmesi açısından önem arz etmektedir. Bundan sonra planlanacak çalışmalarda aşağıdaki maddeler önerilebilir:

1- Aynı gen kopyasının nükleotid dizilimi diğer *Anoxybacillus* türlerinden dejenerat primerler yardımı ile tanımlanabilir. Belirlenen nükleotid dizilimi ekspresyon vektörlerine klonlanarak rekombinant proteinler üretilebilir ve optimum pH, sıcaklık ve kinetik parametreler yönünden tüm cinsin üyeleri karşılaştırılabilir.

2- Katalitik aktiviteden sorumlu olan aminoasitler tespit edilebilir. Toplam 5 korunmuş motiften dördü üzerinde (motif 2 hariç) en korunmuş aminoasitler değiştirilerek enzimin aktivitesindeki değişiklikler araştırılabilir.

3- Çok daha fazla sayıda sentetik veya doğal substrat kullanılarak diğer substratlar için enzimin kinetik değerleri belirlenebilir.

4- Metal iyonların enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırılabilir.

5- Proteinin diğer aktiviteleri araştırılabilir.

6. KAYNAKLAR

- Akiyama K, Kawazu K and Kobayashi A. 1995. A novel method for chemo-enzymatic synthesis of elicitor-active chitosan oligomers and partially N-deacetylated chitin oligomers using N-acylated chitotrioses as substrates in a lysozyme-catalyzed transglycosylation reaction system. *Carbohydr Res.*, 279:151–60.
- Alfonso C, Nuero O, Santamaria F and Reyes F. 1995. Purification of a heat stable chitin deacetylase from *Aspergillus nidulans* and its role in cell wall degradation. *Curr. Microbiol.*, 30:49–54
- Araki Y and Ito E. 1975. A pathway of chitosan formation in *Mucor rouxii*: enzymatic deacetylation of chitin. *Eur. J. Biochem.*, 189:249–253
- Araki Y and Ito E. 1988. Chitin deacetylase. In: Wood WA, Kellogg ST, eds. *Methods in Enzymology*. CA, San Diego: Academic Press, 161: 511-514
- Austin PR, Brine CJ, Castle JE and Zikakis JP. 1981. Chitin: New Facets of Research' in *Science*, 212:749-7
- Bachmann SL, McCarthy AJ. 1991. Purification and Cooperative Activity of Enzymes Constituting the Xylan-Degrading System of *Thermomonospora fusca*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57:2121-2130.
- Beg QK, Kapoor M, Mahajan L and Hoondal GS. 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56:326–338.
- Barbe V, Cruveiller S, Kunst F, Lenoble P, Meurice G, Sekowska A, Vallenet D, Wang T, Moszer I, Medigue C and Danchin A. 2009. From a consortium sequence to a unified sequence: the *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later *Microbiology Reading, Engl.*, 155 (PT 6):1758-1775.
- Bhat MK. 2000. Cellulases and Related Enzymes in Biotechnology. *Biotechnology Advances* 18: 355-383.
- Biely P, Puls J and Schneider H. 1985. Acetylxylan esterases in fungal cellulolytic systems. *FEBS Lett.*, 186:80–84.
- Biely P, MacKenzie CR, Puls J and Schneider H. 1986. Cooperativity of esterases and xylanases in the enzymatic degradation of acetyl xylan. *Bio/technology*, 4:731–733.
- Biely P, MacKenzie CR and Schneider H. 1988. Production of acetylxylan esterase by *Trichoderma reesei* and *Schizopyllum commune*. *Can J Microbiol* 34:767–772.
- Biely P, Côté GL, Kremnicky' L, Greene RV, Dupont C and Kluepfel D. 1996. Substrate specificity and mode of action of acetylxylan esterase from *Streptomyces lividans*. *FEBS Lett.*, 396: 257–260.

- Biely P, Côté GL, Kremnicky L and Greene RV. 1999. Differences in catalytic properties of acetylxylan esterases and non-hemicellulolytic esterases. In: HJ Gilbert, GJ Davies, B Henrissat, B Svensson, eds. *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, pp.73–81.
- Biely P. 2003. Xylanolytic enzymes. In: JR Whitaker, AGJ Voragen, DWS Wong, eds. *Handbook of Food Enzymology*. New York and Basel: Marcel Dekker, pp. 879–915.
- Biely P and Cote GL. 2005. Microbial hemicellulolytic carbohydrate esterases. In: C.T. Hou, editors. *Handbook of Industrial Biocatalysis*. Chapter 21. Taylor & Francis. p. 21-24.
- Blair DE and van Aalten DMF. 2004. Structures of *Bacillus subtilis* PdaA, a family 4 carbohydrate esterase, and a complex with N-acetyl-glucosamine. *FEBS Lett.*, 570:13- 19.
- Blair DE, Schuettelkopf AW, MacRae JI and van Aalten DM. 2005. Structure and metal-dependent mechanism of peptidoglycan deacetylase, a streptococcal virulence factor *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:15429–15434.
- Blair DE, Hekmat O, Schuttelkopf AW, Shrestha B, Tokuyasu K, Withers SG and van Aalten DMF. 2006. Structure and mechanism of chitin deacetylase from the fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Biochemistry*, 45:9416–9426.
- Brock TD and Freeze H. 1969. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *Journal of Bacteriology*, 98:289-297.
- Brock TD. 1986. Introduction, an overview of the thermophiles. In *Thermophiles: General, Molecular and Applied Microbiology* Edited by: Brock TD. New York: John Wiley & Sons, 1-16.
- Bornscheuer UT. 2002. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol. Rev.*, 26:73–81.
- Bouveng HO, Garegg PJ and Lindberg B. 1960. Position of O-acetyl groups in birch xylan. *Acta Chem Scand* 14: 742–748.
- Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V and Henrissat B. 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res.*, 37:D233–D238.
- Caufrier F, Martinou A, Dupont C and Bouriotis V. 2003. Carbohydrate esterase family 4 enzymes: substrate specificity. *Carbohydr. Res.* 338:687–692.
- Chang KLB, Tsai G, Lee J and Fu WR. 1997. Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution. *Carbohydr Res.*, 303:327-332.
- Christov LP and Prior BA. 1993. Esterases of xylan-degrading microorganisms: Production,

- properties, and significance. *Enzyme Microb Technol.*, 15: 460–474.
- Christodoulidou A, P Briza, A Ellinger and V. Bouriotis. 1999. Yeast ascospore wall assembly requires two chitin deacetylase isozymes. *FEBS Lett.*, 460: 275–279.
- Cruz Ramos H, Hoffmann T, Marino M, Nedjari H, Presecan-Siedel E, Dreesen O, Glaser P and Jahn D. 2000. Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expression. *J Bacteriol.*, 182:3072-3080.
- Coggins BE, Li X, McClerren AL, Hindsgaul O, Raetz CRH and Zhou P. 2003. Structure of the IpxC deacetylase with a bound substrate analog inhibitor. *Nat Struct Biol.*, 10:645-651.
- Collins T, Gerday C and Feller G. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 29 (1): 3-23.
- Coutinho PM and Henrissat B. 1999. Carbohydrate-active enzymes: An integrated database approach. in Gilbert, H. J., Davies, G., Hendrich, B. and Svensson, B. (ed.), *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp.3-12.
- Coutinho PM and Henrissat B. 2002. Carbohydrate-Active Enzymes server at URL: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>.
- Couto S and Herrera JL, 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances*, 24:500–513.
- Dalrymple BP, Cybinski DH, Layton I, McSweeney CS, Xue G-P, Swadling YJ and Lowry JB. 1997. Three *Neocallimastix patriciarum* esterases associated with the degradation of complex polysaccharides are members of a new family of hydrolases. *Microbiology*, 143: 2605–2614.
- Davis LL, Bartnicki-Garcia S. 1984. Chitosan synthesis by the tandem action of chitin synthetase and chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. *Biochemistry*, 23:1065–1073.
- Davies GJ, Gloster TM & Henrissat B. 2005. Recent structural insights into the expanding world of carbohydrate-active enzymes., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 15:637-645.
- Debrassi G, Okeke BC, Bruschi CL, Venturi V. 1998. Purification and characterization of an acetyl xylan esterase from *Bacillus pumillus*. *Appl Environ Microbiol* 64:789–792.
- De Clerck E, Vanhoutte T, Hebb T, Geerinck J, Devos J and De Vos P. 2004, Isolation, characterization, and identification of bacterial contaminants in semifinal gelatin extracts. *Appl Environ Microbiol.*, 70:3664-3672.
- Demain AL and Solomon NA. 1981. In *Industrial Microbiology and the Advent of Genetic Engineering*. Scientific American, Freeman and Comp., San Francisco. pp:3-14.
- Demir A ve Seventekin N . 2009. “Kitin, Kitosan ve Genel Kullanım Alanları” *Tekstil*

- Teknolojileri Elektronik Dergisi, 3(2):92-103.
- Demirijian D, Moris-Varas F, Cassidy C, 2001. Enzymes from extremophiles. *Curr. Opin. Chem. Boil.* 5:144–151.
- Dénarié J and Debelle F. 1996. Rhizobium lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu Rev Biochem.*, 65:503-535.
- Deising H and Siegrist J. 1995. Chitin deacetylase activity of the rust *Uromyces viciae-fabae* is controlled by fungal morphogenesis. *FEMS Microbiol. Lett.*, 127:207–212.
- Deshpande MV. 2005. Chitosan in fungi. Chitin and chitosan-opportunities a nd challenges. India, Contai, Midnapur: SSM International publication, 59-68.
- Dhugga KS, Anderson PC and Nichols SE. 2000. Expression of chitin synthase and chitin deacetylase genes in plants to alter the cell wall for industrial uses and improved disease resistance, WO 00/09729.
- Dixit R, Arakane Y, Specht CA, Richard C, Kramer KJ, Beeman RW and Muthukrishnan S. 2008. Domain organization and phylogenetic analysis of proteins from the chitin deacetylase gene family of *Tribolium castaneum* and three other species of insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38:440–451.
- Dodane V and Vilivalam V. 1998. Pharmaceutical applications of chitosan. *Pharm. Sci. Technol. Today*, 1:246–253.
- Dupont C, Daigneault N, Shareck F, Morosoli R and Kluepfel D. 1996. Purification and characterization of an acetyl xylan esterase produced by *Streptomyces lividans*. *Biochem. J.*;319:881–886.
- Egaña L, Gutiérrez R, Caputo V, Peirano A, Steiner J and Eyzaguirre J. 1996. Purification and characterization of two acetyl xylan esterases from *Penicillium purpurogenum*. *Biotechnol Appl Biochem.*, 24: 33–39.
- El Gueddari NE, Rauchhaus U, Moerschbacher BM and Deising HB. 2002. Developmentally regulated conversion of surface-exposed chitin to chitosan in cell walls of plant pathogenic fungi. *New Phytol.*, 156. 103-112.
- Faiz Ö, Colak A, Saglam N. 2007. Determination and characterization of thermostable esterolytic activity from a novel thermophilic bacterium *Anoxybacillus gonensis* A4. *J Biochem Mol Biol.*, 40: 588-594.
- Faiz Ö. 2008. Termofilik *Geobacillus caldoolitoliticus* TK4 Suşundan Glukoz İzomeraz Geninin Klonlanması, Ekspresyonu ve Karakterizasyonu. Doktora Tezi. K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü. Trabzon.
- Felipe MSS, Andrade R, Arrares F, Nicola AM, Maranhao AQ, Torres FAG, Silva-Perreira I, Pocas-Fonseca MJ, Campos EG, Moraes LMP, Andrade PA, Tavares AHFP, Silva SS, Kyaw CM, Souza DP, Pereira M, Jusuino RSA, Andrade EV, Parente JA,

- Oliveira GS, Barbosa MS, Martins NF, Fachin AL, Cardoso RS, Passos GAS, Almeida NF, Walter MEMT, Soares CMA, Carvalho MJA and Brigido MM. 2005. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells, *The Journal of Biological Chemistry*, 280: 24706-24714.
- Fernandes AC, Fontes CM, Gilbert HJ, Hazlewood GP, Fernandes TH and Ferreira LMA. 1999. Homologous xylanases from *Clostridium thermocellum*: evidence for bi-functional activity, synergism between xylanase catalytic modules and the presence of xylan-binding domains in enzyme complexes. *Biochem. J.*, 342:105–10.
- Ferreira LMA, Wood TM, Williamson G, Faulds CB, Hazlewood GP and Gilbert HJ. 1993. A modular esterase from *Pseudomonas fluorescens subsp. cellulosa* contains a non-catalytic binding domain. *Biochem. J.*, 294: 349–355, 32.
- Fukushima T, Yamamoto H, Atrih A, Foster SJ and Sekiguchi J. 2002. A polysaccharide deacetylase gene (pdaa) is required for germination and for production of muramic deltalactam residues in the spore cortex of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 184:6007–6015.
- Gao X, Katsumoto T and Onodera K. 1995. Purification and characterization of chitin deacetylase from *Absidia coerulea*. *J. Biochem.*, (Tokyo) 117:257–263.
- Gauthier C, Clerisse F, Dommes J, Jaspar-Versali MF. 2008. Characterization and cloning of chitin deacetylases from *Rhizopus circinans*. *Protein Expr. Purif.*, 59:127–137.
- Ghormade V, Kulkarni S, Doiphode N, Rajamohanan PR and Deshpande MV. 2010. Chitin deacetylase: A comprehensive account on its role in nature and its biotechnological applications, *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology A*. Mendez-Vilas (Ed.) Vol. 2 ISBN 13: 978-84-614-6195-0.
- Gilbert HJ and Hazlewood GP. 1993. Bacterial cellulases and xylanases. *Journal of General Microbiology*, 139:187-194.
- Gilmore ME, Bandyopadhyay D, Dean AM, Linnstaedt SD and Popham DL. 2004. Production of muramic delta-lactam in *Bacillus subtilis* spore peptidoglycan. *J. Bacteriol.*, 186:80–89.
- Greve LC, Labavitch JM and Hungate RE. 1984. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47:1135-1140.
- Guo W, Li G, Pang Y and Wang P. 2005. A novel chitin-binding protein identified from the peritrophic membrane of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35:1224–1234.
- Hägglund E, Lindberg B and McPherson J. 1956. Dimethylsulfoxide, a solvent for hemicelluloses. *Acta Chem. Scand.*, 10: 1160–1164.
- Haki GD and Rakshit SK. 2003. Developments in industrially important thermostable

- enzymes: a review. *Bioresour Technol.*, 89:17–34.
- Halgasová N, Kutejová E and Timko J. 1994. Purification and some characteristics of the acetylxylylan esterase from *Schizophyllum commune*. *Biochem J.*, 751–755.
- Hazlewood GP and Gilbert HJ. 1993. Molecular biology of hemicellulases. In: MP Coughland, GP Hazlewood, eds. *Hemicellulose and Hemicellulases*. London and Chapel Hill: Portland Press., pp. 103–126.
- Hegedus D, Erlandson M, Gillott C and Toprak U. 2009. New Insights into Peritrophic Matrix Synthesis, Architecture, and Function. *Annual Review of Entomology*. 54: 285–302.
- Heinen W, Lauwers AM and Mulders JW. 1982. *Bacillus flavithermus*, a newly isolated facultative thermophile. *Antonie van Leeuwenhoek*, 48:265-272.
- Hekmat O, Tokuyasu K and Withers SG. 2003. Subsite structure of the endo-type chitin deacetylase from a Deuteromycete, *Colletotrichum lindemuthianum*: An investigation using steady-state kinetic analysis and MS. *Biochem. J.*, 374:369–380.
- Henrissat B. 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.*, 280 (Pt 2):309–316.
- Henrissat B and Bairoch A. 1993. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.*, 293 (Pt 3): 781–788.
- Henrissat B and Bairoch A. 1996. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.*, 316 (Pt 2):695–696.
- Hernick M and Fierke CA. 2005. The mechanisms of zinc-deacetylases. *Arch. Biochem. Biophys.*, 433:71–84.
- Hermoso JA, Sanz-Aparicio J, Molina R, Juge N, Gonzalez R and Faulds CB. 2004. The crystal structure of feruloyl esterase a from *Aspergillus niger* suggests evolutive functional convergence in feruloyl esterase family. *J Mol Biol.*, 338:495-506.
- Hirano S. 1996. Chitin biotechnology applications. *Biotechnol. Annu. Rev.*, 2: 237–258.
- Hunt DE, Gevers D, Vahora NM and Polz MF. 2008. Conservation of the chitin utilization pathway in the *Vibrionaceae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74:44–51.
- Hüner P. 2007. Purification and characterization of Laccase From *Coriopsis polyzona* İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. İstanbul.
- Ivanova N, Sorokin A, Anderson I, Galleron N, Candelon B, Kapratral V, Bhattacharyya A, Reznik G, Mikhailova N, Lapidus A, Chu L, Mazur M, Goltsman E, Larsen N, D'Souza M, Walunas T, Grechkin Y, Pusch G, Haselkorn R, Fonstein M, Ehrlich S D, Overbeek R and Kyrpides, 2003. Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature.*, 423: 87-91.
- Jenkins J, Mayans O, Smith D, Worboys K and Pickersgill RW. 2001. Threedimensional

- structure of *Erwinia chrysanthemi* pectin methyl esterase reveals a novel esterase active site. *J Mol Biol.*, 305:951-960.
- Jeraj N, Kunič B, Lenasi H and Breskvar K. 2006. Purification and molecular characterization of chitin deacetylase from *Rhizopus nigricans*. *Enzyme Microb. Technol.*, 39:1294–1299.
- John M, Röohrig H, Schmidt J, Wieneke U and Schell J. 1993. *Rhizobium* NodB protein involved in nodulation signal synthesis is a chitooligosaccharide deacetylase. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 90:625-629.
- Johnson KG, Fontana JD, MacKenzie CR. 1988. Measurements of acetylxyylan esterase in *Streptomyces*. *Methods Enzymol*, 160: 551–560.
- Kcagan M, Canakçı S, Sandallı C, Inan K, Colak DK and Belduz AO. 2008 Characterization of a xylanase from a thermophilic strain of *Anoxybacillus pushchinoensis* A8. *Biologia*, 63:599-606.
- Kafetzopoulos D, Martiniou A and Bouriotis V. 1993a. Bioconversion of chitin to chitosan: purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2564–2568.
- Kafetzopoulos D, Thireos G, Vournakis JN and Bouriotis V. 1993b. The primary structure of a fungal chitin deacetylase reveals the function for 2 bacterial gene-products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90:8005–8008.
- Kauss H, Jeblick W and Young DH. 1983. Chitin deacetylase from the plant pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Plant Sci.*, 28:231–236.
- Kauss H and Bauch B. 1988. Chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. In: Wood WA, Kellogg ST eds. *Methods in Enzymology*. CA, San Diego: Academic Press, 161: 518-523.
- Khan AW, Lamb KA and Overend RP. 1990. Comparison of natural hemicellulose and chemically acetylated xylan as substrates for the determination of acetyl-xylan esterase activity in *Aspergilli*. *Enzyme Microb Technol.* 12: 127–131.
- Kıran EÖ, Çölekçioğlu U ve Dostbil N. 2006. *KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9(1).
- Kim, YJ, Zhao Y, Oh KT, Nguyen VN and Park RD. 2008. Enzymatic deacetylation of chitin by extracellular chitin deacetylase from a newly screened *Mortierella sp.* DY-52. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 18:759–766.
- Koeller KM and Wong CH. 2001. Enzymes for chemical synthesis. *Nature*, 409:232-240.
- Koide SS. 1998. Chitin–chitosan: properties, benefits and risks. *Nutr. Res.*, 18: 1091–1101.
- Kormelink FJM, Lefebvre B, Strozyk F and Voragen AGJ. 1993. Purification and

- characterization of an acetyl xylan esterase from *Aspergillus niger*. J Biotechnol., 27: 267–282.
- Kosugi A, K Murashima and RH Doi. 2002. Xylanase and acetyl xylan esterase activities of XynA, a key subunit of the *Clostridium cellulovorans* cellulosome for xylan degradation. Appl Environ Microbiol., 68: 6399–6402.
- Kulkarni N, Shendye A and Rao M. 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. FEMS Microbiol. Rev., 23:411–456.
- Kurita K. 1986. Chemical modification of chitin and chitosan. In: Muzzarelli R, Jeuniaux C, Gooday GW, eds. Chitin in nature and technology. USA, New York: Plenum Press, 287-293.
- La Ferla B. 2002. Lipases as useful tools for stereo- and regioselective protection and deprotection of carbohydrates. Monatshefte für Chemie 133: 351–368.
- Laurie JI, Clarke JH, Ciruela A, Faulds CB, Williamson G, Gilbert HJ, Rixon JE, Millward-Sadler J and Hazlewood GP. 1997. The NodB domain of a multidomain xylanase from *Cellulomonas fimi* deacetylates acetylxylan. FEMS Lett. 148:261–264.
- Lee SF and Forsberg CW. 1987. Purification and characterization of two endoxylanases from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Can. J. Microbiol., 33:1011-1016.
- Lee H, RJB To, K Latta, P Biely and H Schneider. 1987. Some properties of extracellular acetylesterase produced by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*. Appl Environ Microbiol., 53: 2831–2834.
- Li X, Wang LX, Wang X and Roseman S. 2007. The chitin catabolic cascade in the marine bacterium *Vibrio cholerae*: characterization of a unique chitin oligosaccharide deacetylase. Glycobiology, 17:1377-1387.
- Long, SR. 1989. Rhizobium-legume nodulation – life together in the underground. Cell, 56:203–214.
- Luschnig S, Bätz T, Armbruster K and Krasnow MA. 2006. serpentine and vermiform encode matrix proteins with chitin binding and deacetylation domains that limit tracheal tube length in *Drosophila*. Curr. Biol., 16:186–194.
- Madigan MT and Martingo JM, 2008. Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi, Palme Yayınevi, Ankara s. 992.
- Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J, 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York,.
- Margolles-Cark E, M Tenkanen, H Söderlund and M Penttilä. 1996. Acetyl xylan esterase from *Trichoderma reesei* contains an active site serine and a cellulose binding domain. Eur J Biochem., 237: 553–560.

- Martinou A, Kafetzopoulos D and Bouriotis V. 1995. Chitin deacetylation by enzymatic means: monitoring of deacetylation process. *Carbohydrate Research.*, 273: 235–242.
- Martinou A, Bouriotis V, Stokke BT and Vårum KM. 1998. Mode of action of chitin deacetylase from *Mucor rouxii* on partially N-acetylated chitosans. *Carbohydr. Res.*, 311:71–78.
- Martinou A, Koutsioulis D and Bouriotis V. 2002. *Protein Expr. Purif.* 24:111–116.
- Matsuo Y, Tanaka K, Matsuda H and Kawamukai M. 2005. *cda1+*, encoding chitin deacetylase is required for proper spore formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett.*, 579:2737–2743.
- Maynes JT, Garen C, Cherney MM, Newton G, Arad D, Av-Gay Y, Fahey RC and James MNG. 2003. The crystal structure of 1-D-myoinosityl- 2-acetamido-2-deoxy-alpha-D-glucopyranoside deacetylase (MshB) from *Mycobacterium tuberculosis* reveals a zinc hydrolase with a lactate dehydrogenase fold. *J. Biol. Chem.*, 278:47166-47170.
- Mishra C, Semino CE, McCreath KJ, Vega HDL, Jones BJ, Specht CA and Robbins PW. 1997. Cloning and expression of two chitin deacetylase genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 13:327–336.
- Mountain BW, Benning LG and Boerema JA. 2003. Experimental studies on New Zealand hot spring sinters: rates of growth and textural development. *Can J Earth Sci.*, 40:1643-1667.
- Nakano MM, Dailly YP, Zuber P and Clark DP. 1997. Characterization of anaerobic fermentative growth of *Bacillus subtilis*: identification of fermentation end products and genes required for growth. *J Bacteriol.*, 179:6749-6755.
- Nakano MM and Zuber P. 1998. Anaerobic growth of a "strict aerobe" (*Bacillus subtilis*). *Annu Rev Microbiol.*, 52:165-190.
- Niehaus F, Bertoldo C, Kahler M and Antranikian G. 1999. Extremophiles As a Source of Novel Enzymes For Industrial Application. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 51: 711-729.
- Oberbarnscheidt L, Taylor EJ, Davies GJ and Gloster TM. 2007. Structure of a carbohydrate esterase from *Bacillus anthracis*, *Proteins* 66:250-252.
- Ogawa and Shimizu. 2002. Industrial microbial enzymes: their discovery by screening and use in large-scale production of useful chemicals in Japan, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13:367-375.
- Patil RS, Ghormade V and Deshpande MV. 2000. Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme and Microbial Technology*, 26:473–483.
- Pikuta E, Lysenko A, Chuvilskaya N, Mendrock U, Hippe H, Suzina N, Nikitin D, Osipov

- G and Laurinavichius K. 2000. *Anoxybacillus pushchinensis* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of *Anoxybacillus flavithermus* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 50:2109-2117.
- Prade RA. 1995. Xylanases: from biology to biotechnology. *Biotech. Genet. Eng. Rev.* 13:100–131.
- Poutanen, K. 1988. An p-L-arabinofuranosidase of *Trichoderma reesei*. *J. Biotechnol.*, 7,:271-282.
- Poutanen K, Rätto M, Puls J and Viikari L. 1987. Evaluation of microbial xylanolytic systems. *J Biotechnol.*, 6: 49–60.
- Poutanen K, Sundberg M, Korte H and Puls J. 1990. Deacetylation of xylans by acetyl esterases of *Trichoderma reesei*. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 33: 506–510.
- Psylinakis E, Boneca IG, Mavromatis K, Deli A, Hayhurst E, Foster SJ, Vårum KM and Bouriotis V. 2005. Peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylases from *Bacillus cereus*, highly conserved proteins in *Bacillus anthracis*. *J. Biol. Chem.*, 280:30856-30863.
- Rajulu, S. Aruchami A and Gowri N. 1986. Natural deacetylation of chitin to chitosan in the abdominal cuticle of the physogastric queen of *Macrotermes estherae*. In *Chitin in Nature and Technology* (Muzzarelli, R. et al., eds), pp. 263–268, Plenum Press.
- Rosenberg M, V Roegner and FF Becker. 1975. The quantitation of rat serum esterases by densitometry of acrylamide gels stained for enzyme activity. *Anal Biochem.*, 66: 206–212.
- Rueckert A, Ronimus RS and Morgan HW. 2005. Development of a rapid detection and enumeration method for thermophilic bacilli in milk powders. *J Microbiol Methods.*, 60:155-167.
- Saha BC and Bothast RJ. 1999. Enzymology of xylan degradation. In: Imam, S.H., Greene, R.V., Zaidi, B.R. (Eds.), *Biopolymers: Utilizing Nature's Advanced Materials*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 167–194.
- Saw JH, Mountain BW, Feng L, Omelchenko MV, Hou S, Saito JA, Stott MB, Li D, Zhao G, Wu J, Galperin MY, Koonin EV, Makarova KS, Wolf YI, Rigden DJ, Dunfield PF, Wang L and Alam M. 2008. Encapsulated in silica: genome, proteome and physiology of the thermophilic bacterium *Anoxybacillus flavithermus* WK1 *Genome Biol.*, 9 (11),R161
- Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolt M and Witholt B. 2001. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 409:258-268.
- Shahidi F, Arachchi JKV and Jeon Y. J. 1999. Food application of chitin and chitosans.

- Trends Food Sci. Technol., 10: 37–51.
- Shao W and Wiegel J. 1995. Purification and characterization of two thermostable acetyl xylan esterases from *Thermoanaerobacterium* sp. strain JW/SL-YS485. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61:729-733.
- Shallom D and Shoham Y. 2003. Microbial hemicellulases. *Curr. Opin. Microbiol.*, 6:219–228.
- Shareck F, Biely P, Morosoli R and Kluepfel D. 1995. Analysis of DNA flanking the xlnB locus of *Streptomyces lividans* reveals genes encoding acetylxylan esterase and the RNA component of ribonuclease P. *Gene*, 153: 105–109.
- Shigemasa Y and Minami S. 1996. Applications of chitin and chitosan for biomaterials. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 13:383–420.
- Singh S, Madlala AM and Prior BA. 2003 *Thermomyces lanuginosus*: properties of strains and their hemicellulases. *FEMS Microbiol. Rev.*, 27:3–16.
- Shaw J-F and AM Klivanov. 1987. Preparation of various glucose esters via lipase-catalyzed hydrolysis of glucose pentaacetate. *Biotechnol Bioeng.*, 29: 648–651.
- Shrestha B, Blondeau K, Stevens WF and Hegarat FL. 2004. Expression of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum* in *Pichia pastoris*: purification and characterization. *Protein Expr. Purif.*, 38:196-204.
- Subramaniyan S and Prema P. 2002. "Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology, and Application". *Critical Reviews in Biotechnology* 22 (1): 33–64.
- Sweers HM and C-H Wong. 1986. Enzyme-catalyzed regioselective deacetylation of protected sugars in carbohydrate synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, 108: 6421–6422.
- Tanaka T, Fukui T, Fujiwara S, Atomi H and Imanaka T. 2004. Concerted action of diacetylchitobiose deacetylase and exo-beta-D-glucosaminidase in a novel chitinolytic pathway in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *J. Biol. Chem.*, 279:30021-30027.
- Taylor EJ, Gloster TM, Turkenburg JP, Vincent F, Brzozowski AM, Dupont C, Shareck F, Centeno MSJ, Prates JAM, Puchart V, Ferreira LMA, Fontes CMGA, Biely P and Davies GJ. 2006. Structure and activity of two metal ion independent acetylxylan esterases involved in plant cell wall degradation reveals a close similarity to peptidoglycan deacetylases. *J. Biol. Chem.*, 281:10968-10975.
- Temizkan G, Yılmaz S, Öztürk M, Arı Ş, Ertan H, Sarıkaya TA, ve Arda N. 2008. *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemleri, Nobel Tıp Kitapevleri, Ankara.*
- Tenkanen M. 1998. Action of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus oryzae* esterases in the deacetylation of hemicelluloses. *Biotechnol Appl Biochem* 27: 19–24.
- Tenkanen, M, Eyzaguirre, J, Isoniemi, R, Faulds, CB and Biely, P. 2003. Comparison of

catalytic properties of acetyl xylan esterases from three carbohydrate esterase families. In SD Mansfield and JN Saddler, eds.: Applications of Enzymes to Lignocellulosics. American Chemical Society, Washington, DC., , pp. 211–229.

- Trudel J, and Asselin A. 1990. Detection of chitin deacetylase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry.*, 189: 249-253.
- Tokuyasu K, Ohnishi-Kameyama M, and Hayashi K. 1996. Purification and characterization of extracellular chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*, *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, 60:1598-1603
- Tokuyasu K, Ono H, Ohnishi-Kameyama M, Hayashi K and Mori Y. 1997. Deacetylation of chitin oligosaccharides of dp 2-4 by chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *Carbohydr. Res.* 303.:353-358.
- Tokuyasu K, Kaneko S, Hayashi K and Mori Y. 1999a. Production of recombinant chitin deacetylase in the culture medium of *Escherichia coli* cells. *FEBS Letters.*, 458: 23-26.
- Tokuyasu K, Ono H, Kitagawa Y, Ohnishi-Kameyama H, Hayashi K and Mori Y. 1999b. Selective N - deacetylation of p-nitrophenyl N,N'-diacetyl-D-chitobioside and its use to differentiate the action of two types of chitinases. *Carbohydrate Research.*; 316:173-178.
- Tokuyasu K, Mitsutomi M, Yamaguchi I, Hayashi K and Mori Y. 2000. Recognition of chitooligosaccharides and their N-acetyl groups by putative subsites of chitin deacetylase from a Deuteromycete, *Colletotrichum lindemuthianum*. *Biochemistry* 39:8837–8843.
- Toprak U, Baldwin D, Erlandson M, Gillott C, Hou X, Coutu C and Hegedus DD. 2008. A chitin deacetylase and putative insect intestinal lipases are components of the *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae) peritrophic matrix. *Insect Mol. Biol.*, 17: 573–585.
- Tsigos I, Zydowicz N, Martinou A, Domard A and Bouriotis V. 1999. Mode of action of chitin deacetylase from *Mucor rouxii* on N-acetylchitooligosaccharides. *Eur. J. Biochem.*, 261:698–705.
- Tsigos I, Martinou A, Kafetzopoulos D and Bouriotis V. 2000. Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology, *Trends Biotechnol.*, 18:305–312
- Turner P, Mamo G and Karlsson EN. 2007. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microb Cell Fact.*, 6:9.

URL-1 <http://www.cazy.org/>

URL-2 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/> (11.06.12 10:45)

- URL-3 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7036344> (11.06.12 12:44)
- URL-4 http://www.cazypedia.org/index.php/Carbohydrate-active_enzymes (11.06.2010 10:33).
- Vincent F, Charnock SJ, Verschueren KHG, Turkenburg JP, Scott DJ, Offen WA, Roberts S, Pell G, Gilbert HJ and Davies GJ. 2003. Multifunctional xylooligosaccharide/cephalosporin C deacetylase revealed by the hexameric structure of the *Bacillus subtilis* enzyme at 1.9Å^o resolution. *J Mol Biol.*, 330:593-606.
- Vollmer W and Tomasz A. 2000. The *pgdA* gene encodes for a peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylase in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.*, 275:20496–20501.
- Wang S, Jayaram SA, Hemphälä J, Senti KA, Tsarouhas V, Jin H and Samakovlis C. 2006. Septate-junction-dependent luminal deposition of chitin deacetylases restricts tube elongation in the *Drosophila* Trachea. *Curr. Biol.*, 16:180–185.
- Wang Y, Song JZ, Yang Q, Liu ZH, Huang XM and Chen Y. 2010. Cloning of a heat-stable chitin deacetylase gene from *Aspergillus nidulans* and its functional expression in *Escherichia coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162:843–854.
- Williamson G, PA Kroon and CB Faulds. 1998. Hairy plant polysaccharides: a close shave with microbial esterases. *Microbiology* 144: 2011–2023.
- Wiseman, A., 1987. *Handbook of Enzymes Biotechnology*. Second Edition. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry, p: 274-373.
- Whittington DA, Rusche KM, Shin H, Fierke CA and Chistianson DW. 2003. Crystal structure of LpxC, a zinc-dependent deacetylase essential for endotoxin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 100:8146-8150.
- Wong KKY, Tan LUL. and Saddler JN. 1988. Multiplicity of beta-1,4-xylanases in microorganisms: functions and applications. *Microbiol. Rev.*, 52,:305–317.
- Yamada M, Kurano M, Inatomi S, Taguchi G, Okazaki M and Shimosaka M. 2008. Isolation and characterization of a gene coding for chitin deacetylase specifically expressed during fruiting body development in the basidiomycete *Flammulina velutipes* and its expression in the yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 298:130–137.
- Yıldırım A, Bardakçı B, Karataş M ve Tanyolaç B. 2007. Moleküler Biyoloji; Protein sentezi ve yıkımı. 1. Baskı. Nobel Yayın Dağıtım. Yenişehir Ankara s:264.
- Yip VL and Withers SG. 2006. Breakdown of oligosaccharides by the process of elimination. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 10:147–155.
- Zhao Y, Park RD and Muzzarelli RA. 2010. Chitin deacetylases: properties and applications. *Mar Drugs*, 8(1):24-46.

Zhao Y, Ju WT, Jo GfH, Jung WJ, and Park RD. 2011b. Perspectives of Chitin Deacetylase Research. *Biotechnology of Biopolymers*, Magdy Elnashar (Ed.), ISBN: 978-953-307-179-4.

ÖZGEÇMİŞ

20.07.1979 tarihinde Konya'da doğdu. İlk öğrenimini Konya Mehmet Hasasn Sert İlkokulunda, lise Öğrenimini ise Konya Atatürk Kız Lisesinde tamamladı. 2003 yılında Selçuk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2003-2004 yılları arasında Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde Tezsiz Yüksek Lisans Eğitimini tamamladı. 2011 yılında Rize Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji Anabilim Dalına Araştırma görevlisi olarak atandı.