ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

BAZI *Thermoanaerobacter* SUŞLARI İLE SİKLODEKSTRİN GLİKOZİLTRANSFERAZ (SGTaz) ENZİMİ ÜRETİMİ, KARAKTERİZAYONU ve SİKLODEKSTRİN ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU

Ayşe AVCI

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2010

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

BAZI *Thermoanaerobacter* SUŞLARI İLE SİKLODEKSTRİN GLİKOZİLTRANSFERAZ (SGTaz) ENZİMİ ÜRETİMİ, KARAKTERİZASYONU VE SİKLODEKSTRİN ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU

Ayşe AVCI

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sedat DÖNMEZ

Bu çalışmada ülkemizdeki çeşitli ekstrem bölgelerden izole edilen bazı termofilik anaerobik bakterilerin siklodekstrin glikoziltransferaz (SGTaz) üretimleri araştırılmış, bu enzimi ürettiği belirlenen iki bakterinin SGTaz üretim koşulları belirlendikten sonra, enzimi saflaştırılmış ve bu enzim ile siklodekstrin üretimi gerçekleştirilmiştir.

Bazı morfolojik, biyokimyasal ve 16S rDNA dizi analizlerine göre, *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K olarak isimlendirilen izolatların *Thermoanaerobacter* cinsine ait yeni türler olduğu ve genetik benzerliklerinin sırası ile % 91.5-98.3 ve % 91-97 arasında değiştiği belirlenmiştir.

Thermoanaerobacter sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşları 30 g/L patates nişastasından, 65ºC'de ve başlangıç pH 7.5-8.0, azot kaynağı olarak kazein ve maya özütü içeren ortamda en yüksek SGTaz'ı ürettikleri saptanmıştır. Enzim, amonyum sülfat ile çöktürme ve afinite kromatografisi ile iki aşama da saflaştırılmıştır. *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K'nın saflaştırılan SGTaz'larının spesifik aktiviteleri sırası ile 157.2 ve 373.1 U/mg protein; saflaştırma verimleri ise % 11 ve % 5 olarak belirlenmiştir. *Thermoanaerobacter* sp. P4 suşunun SGTaz'ının molekül ağırlığı 68.7 kDa, *Thermoanaerobacter* sp. 5K'nın ise 70.6 kDa ve optimum sıcaklıklarının 80-90 ^{o}C, pH'larının ise 7.0 olduğu belirlenmiştir.

Thermoanaerobacter sp. P4 suşunun SGTaz'ı paselli SA2'den 80 ^{o}C'de, *Thermoanaerobacter* sp. 5K'nın SGTaz'ı ise patates nişastasından, 80-85 ^{o}C'de en yüksek oranda siklodekstrinleri üretmişlerdir. *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının SGTaz'ları ile 40 g/L patates nişastasından 80 ºC'de üretilen α-SD ile β-SD ve γ-SD'lerin oranı sırası ile % 38:% 62 ve % 60:% 40 olarak belirlenmiştir.

2010, 139 sayfa

Anahtar Kelimeler: Termofilik anaerobik bakteri, *Thermoanaerobacter*, siklodekstrin glikoziltransferaz, siklodekstrin, enzim saflaştırma.

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE (CGTase) BY SOME *Thermoanaerobacter* STRAINS AND THE OPTIMIZATION OF CYCLODEXTRIN PRODUCTION

Ayşe AVCI

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Sedat DÖNMEZ

In this study, cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) productions of thermophilic anaerobic bacteria, isolated from different extreme areas in Turkey, were investigated and two of the isolates were determined as CGTase producers. CGTase production conditions of these strains were determined and after the purification of the enzymes cyclodextrin productions were performed.

According to some morphological, biochemical and 16S rDNA analysis, the strains were identified as the members of genus *Thermoanaerobacter*. The similarities of *Thermoanaerobacter* sp P4 and *Thermoanaerobacter* sp. 5K with the strains of genus *Thermoanaerobacter* are 91.5-98.3 % and 91-97 %, respectively.

It was detected that both *Thermoanaerobacter* sp. P4 and *Thermoanaerobacter* sp. 5K strains produced maximum amount of CGTase from 30 g/L potato starch, using yeast extract and casein as nitrogen sources, with an initial pH of 7.5-8.0 at 65 ^{o}C. The enzyme was purified in two steps including ammonium sulfate precipitation and sepharose 6B affinity chromatography. Specific activities of the purified CGTases of *Thermoanaerobacter* sp. P4 and *Thermoanaerobacter* sp 5K were found as 157.2 and 373.1 U/mg protein and the purification yields as 11 % and 5 %, respectively. Molecular weights of *Thermoanaerobacter* sp. P4 and *Thermoanaerobacter* sp. 5K were determined as 68.7 kDa and 70.6 kDa, respectively. Optimum pH and the temperatures of the CGTases from both strains were detected as 7.0 and 80-90 ^{o}C, respectively.

CGTase from *Thermoanaerobacter* sp P4 produced maximum amounts of CDs by using 40 g/L paselli SA2 at 80^{o}C, and that from *Thermoanaerobacter* sp. 5K produced maximum amount of CDs with 40g/L potato starch at 80-85^{o}C. The ratios of α-CD and β-CD+γ-CD produced by CGTases of *Thermoanaerobacter* sp. P4 and *Thermonanerobacter* sp. 5K from 40 g/L potato starch at 80^{o}C were found as 38 %:60 % and 60 %:40 %, respectively.

2010, 139 pages

Key Words: Thermophilic anaerobic bacteria, *Thermoanaerobacter*, cyclodextrin glycosyltransferase, cyclodextrin, enzyme purification.

TEŞEKKÜR

Tez konusunun belirlenmesinde ve çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Sedat DÖNMEZ'e (Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü), araştırma süresince yaptıkları değerli öneri ve katkılarından dolayı Tez İzleme Komitesi üyeleri hocalarım Prof Dr. Filiz ÖZÇELİK (Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü) ve Prof Dr. Zümrüt Begüm ÖGEL'e (Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü), Her zaman manevi desteğini gördüğüm Prof. Dr. Kamuran AYHAN'a, çalışmalarım sırasında her zaman destek olan arkadaşlarım Gıda Yük. Müh. Leyla ALPAN, Araş. Gör. Evrim GÜNEŞ ALTUNTAŞ (Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü), Gıda Yük. Müh. Aylin AKOĞLU ve çeşitli yardımlarını gördüğüm Gıda Müh. Naciye YAKAR ve Aybike BEREKETOĞLU'na, SDS-PAGE analizleri sırasında desteklerini gördüğüm Araş Gör İlker AKOĞLU, Araş. Gör. Mehmet TOKATLI ve Gıda Müh. Nurdan ARSLANKOZ'a (Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü), HPLC analizleri sırasında laboratuvarlarını kullanma olanağı sağlayan Prof Dr. Nevzat ARTIK, Doç Dr. Ender S. POYRAZOĞLU ve Araş. Gör. Emre BAKKALBAŞI'na (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü), PCR analizleri sırasında laboratuvarlarını kullanma olanağı sağlayan Doç Dr. Sümer ARAS ve öğrencileri ile Araş Gör. Dr. Nur KOÇBERBER KILIÇ ve Biyolog Nalan Oya SAN'a (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Bölümü) ve ayrıca iyi kötü her anımda beni destekleyen ve yanımda olan aileme teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından TOVAG 106 O 319 no'lu proje ile desteklenmiştir.

Ayşe AVCI

Ankara, Şubat 2010

İÇİNDEKİLER

ÖZET……..... i
ABSTRACT…….. ii
TEŞEKKÜR…….. iii
SİMGELER DİZİNİ…..…….. viii
ŞEKİLLER DİZİNİ…….. ix
ÇİZELGELER DİZİNİ…….... xii
1. GİRİŞ……. 1
2. KURAMSAL TEMELLER……..…….. 4
2.1 Siklodekstrinlerin Yapısı ve Özellikleri ……4
2.1.1 Yapısı ……..... 4
2.1.2 Özellikleri ……. 5
2.1.2.1 Modifiye siklodekstrinler…….. 6
2.1.2.2 Siklodekstinlerin inklüzyon kompleksi ……...8
2.2 Siklodekstrin Glikoziltransferaz (SGTaz) Enzimi ……...9
2.2.1 SGTaz'ların yapısı ……... 11
2.2.2 SGTaz'ların katalizlediği reaksiyonlar ……..12
2.2.2.1 İntramoleküler transglikozilasyon reaksiyonu ……..... 13
2.2.2.2 İntermoleküler transglikozilasyon reaksiyonları ……...13
2.2.3 Siklodekstrin glikoziltransferaz enziminin üretimi…….....15
2.2.4 Siklodekstrin glikoziltransferaz enziminin özellikleri ……..16
2.3 Siklodektsrinlerin Üretimi…….. 20
2.3.1 Solventli proses……..20
2.3.2 Solventsiz proses …….. 22
2.4 Siklodekstrinlerin Endüstriyel Kullanım Olanakları …….……23
2.4.1 Eczacılık……23
2.4.2 Kozmetik, kişisel bakım ve temizlik ürünleri ……25
2.4.3 Gıda ve aromalar ……27
2.4.4 Diğer kullanım alanları ……... 29
3. MATERYAL ve YÖNTEM …….…… 32

3.1.Materyal……32
3.1.1 Mikroorganizmalar …….. 32
3.1.2 Besiyerleri ……32
3.1.2.1 DSMZ 144 besiyeri ……... 32
3.1.2.2 Besiyeri 1 ve besiyeri 2 ……. 34
3.2 Yöntem ……35
3.2.1 Ekstrem termofilik anaerobik bakterilerin izolasyonu ve tanımlanması……... 35
3.2.1.1 Mikroorganizmaların morfolojik ve çeşitli biyokimyasal özellikleri ……... 36
3.2.1.2 Mikroorganizmaların moleküler tanımlanması…..…… 37
3.2.2 Enzim üretimi ve üretimin optimizasyonu ……39
3.2.2.1 Optimum pH ve sıcaklığın belirlenmesi…….. 39
3.2.2.2 Optimum substrat konsantrasyonunun belirlenmesi …… 39
3.2.2.3 Çeşitli karbon kaynaklarının enzim üretimine etkisinin belirlenmesi……... 39
3.2.2.4 Çeşitli azot kaynaklarının enzim üretimine etkisinin belirlenmesi……... 40
3.2.2.5 Enzim aktivitesinin belirlenmesi ……. 40
3.2.2.5.1 β-SGTaz aktivitesi (fenol fitalein yöntemi) ……. 40
3.2.2.5.2 α-SGTaz aktivitesinin belirlenmesi (metil oranj yöntemi) ……41
3.2.3 Enzimin saflaştırılması …… 41
3.2.3.1 Amonyum sülfat ile çöktürme ……. 42
3.2.3.2 Diyaliz …… 42
3.2.3.3 Afinite kromatografisi ile enzimin saflaştırılması…….. 43
3.2.3.3.1 Kolonun hazırlanışı ……... 43
3.2.3.3.2 Afinite kromatografisi …….. 43
3.2.3.4 Protein tayini ……44
3.2.4 Saflaştırılan enzimin özelliklerinin belirlenmesi …….. 44
3.2.4.1 SDS PAGE ile enzim molekül ağırlığının saptanması …….. 44
3.2.4.2 Enzimin optimum pH ve sıcaklığının belirlenmesi ……47
3.2.4.3 Enzimin pH ve termal stabilitesinin belirlenmesi……47

3.2.4.4 Çeşitli metallerin enzim aktivitesine etkisi ……. 48
3.2.4.5 Enzimin hidroliz aktivitesi ……... 48
3.2.4.6 SGTaz'ın birleştirme (Coupling) aktivitesinin belirlenmesi …..... 49
3.2.5 Siklodektrin üretimi …… 49
3.2.5.1 Oluşan siklodekstrinlerin belirlenmesi ……..……50
4. BULGULAR ve TARTIŞMA …….. 52
4.1 İzolatların SGTaz Aktivitelerinin Belirlenmesi…… 52
4.2 İzolatların Morfolojik, Biyokimyasal ve Genetik Özellikleri…….. 52
4.2.1 Morfolojik ve biyokimyasal özellikleri ……..… 53
4.2.2 İzolatların moleküler tanımlaması……..…57
4.3 Siklodekstrin Glikoziltransferaz Enziminin Üretimi ……..…… 58
4.3.1 Enzim üretiminin optimum pH ve sıcaklığı …….……..… 59
4.3.2 Çeşitli azot kaynaklarının SGTaz üretimine etkisi ……..…… 65
4.3.3 Substrat konsantrasyonunun SGTaz üretimine etkisi ……..……. 67
4.3.4 Çeşitli karbon kaynaklarının SGTaz üretimine etkisi ……..……. 68
4.4 İzolatların α- SGTaz aktiviteleri ……..…… 71
4.5 Enzimin Saflaştırılması ……..…… 72
4.5.1 Amonyum sülfat ile çöktürme ……...…. 73
4.5.2 Afinite kromatografisi……...……..…… 73
4.6 Saflaştırılan Enzimin Özellikleri……...…….79
4.6.1 Molekül ağırlığı ……..…. 79
4.6.2 Optimum pH ve sıcaklık …….... 81
4.6.3 pH stabilitesi ……... 84
4.6.4 Termal stabilite ……..…. 85
4.6.5 Enzim aktivitesine çeşitli metallerin etkisi ……...…….87
4.6.6 Enzimin hidroliz aktivitesi ……..……89
4.6.7 Enzimin birleştirme (coupling) aktivitesi …….91
4.7 Siklodektrinlerin Üretimi ……..… 92
4.7.1 Substrat konsantrasyonun siklodekstrin üretimine etkisi ……...… 97
4.7.2 Enzim konsantrasyonunun siklodekstrin üretimine etkisi ……..… 100
4.7.3 Çeşitli substratlardan siklodekstrin üretimi ……..… 103
4.7.4 Sıcaklığın siklodekstrin üretimine etkisi ……..…. 106

5. SONUÇ……..…… 110

KAYNAKLAR …….…… 114

EKLER……..…….…... 126

EK 1 Fenol fitalein ile SGTaz aktivite tayininde renkte oluşan değişim…….. 127

EK 2 β-Siklodekstrin glikoziltransferaz enzim aktivitesi tayini için hazırlanan β-Siklodekstrin standart eğrisi……....128

EK 3 α-Siklodekstrin glikoziltransferaz enzim aktivitesi tayini için hazırlanan α-Siklodekstrin standart eğrisi……..…..129

EK 4 Süpernatanttaki proteinlerin amonyum sülfatla çöktürülmesi sonucundaki görünümü…….….. 130

EK 5 Amonyum sülfatla çöktürülen proteinlerin 15000 rpm'de 15 dakika santrifüjenmesi ile oluşan protein çökeltisi…….……. 131

EK 6 0.01 M sodyum asetat tamponuna (pH 5.5) karşı diyaliz edilen protein örneği……132

EK 7 Peristaltik pompa, afinite kolonu, spektrofotometre ve fraksiyon toplayıcıdan oluşan protein saflaştırma sistemi…….. 133

EK 8 Lowry protein miktarı tayini için hazırlanan sığır serum albümini (BSA-Bovine Serum Albumin) standart eğrileri…….….. 134

EK 9 Enzimin hidroliz aktivitesi tayini için hazırlanan glikoz standart eğrisi…….….. 135

EK 10 Siklodekstrinin 6 g/L konsantrasyondaki standart kromatogramları, (a) α-SD, (b) β-SD, (c) γ-SD……... 136

EK 11 α-, β-, ve γ-Siklodekstrinlerin HPLC ile hazırlanan standart eğrileri……..... 137

ÖZGEÇMİŞ……... 138

SİMGELER DİZİNİ

SGTaz	Siklodekstrin glikoziltransferaz
SD	Siklodekstrin
α-SD	Alfa siklodekstrin
β-SD	Beta siklodekstrin
γ-SD	Gama siklodekstrin
C	Karbon
TIM	Trioz fosfat izomeraz
Asp	Aspartik asit
Trp	Triptofan
B.	*Bacillus*
TBE	Tris-borik asit-EDTA
EDTA	Etilen Daimin Tetraasetik Asit
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
U	Ünite
MWCO	Moleküler ağırlık engelleme sınır
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez
BSA	Sığır serum albümini
rpm	devir/dakika
DNS	3,5- Dinitro salisilik asit
PVDF	Polivinilidenflorid
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
RID	Refraktif indeks dedektörü
UV	Ultraviyole
OD	Optik yoğunluk

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 α, β ve γ-siklodekstrinlerin kimyasal yapısı……..….. 4

Şekil 2.2 Siklodekstrinlerin 3 boyutlu yapıları……... 5

Şekil 2.3 *p*-ksilen ve bir SD molekülünün inklüzyon kompleksi oluşumunun şematik gösterimi..... 9

Şekil 2.4 *Bacillus circulans* 251, SGTaz'ının üç boyutlu görünümü…….… 12

Şekil 4.1 Ülkemizin çeşitli ekstrem bölgelerinden izole edilen termofilik anaerobik bakteri izolatlarının SGTaz aktiviteleri…….…. 52

Şekil 4.2.a. *Thermoanaerobacter* sp. P4, b. *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının ışık mikroskobundaki görüntüleri …… 53

Şekil 4.3 NaCl'ün *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının gelişmesine etkisi …….….56

Şekil 4.4 MEGA4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) software version 4.0 kullanılarak oluşturulan *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının 16S rDNA baz dilizimlerine *Thermoanaerobacter* cinsi bakterileri ile oluşturulan filogenetik ağaç……..... 58

..

Şekil 4.5 *Thermoanaerobacter* sp. P4 suşunun 65 ^{o}C'de, başlangıç pH'sı 6.0-9.0 olan besiyeri 1'deki gelişme eğrileri (OD_{600}'e göre) ve gelişme süresince pH'daki değişimi ……..…… 60

Şekil 4.6 6.0-9.0 arasındaki pH'larda besiyeri 1'de, 65 ^{o}C'de geliştirilen *Thermoanaerobacter* sp. P4 suşunun SGTaz aktivitesindeki gelişme süresine bağlı değişim…… 61

Şekil 4.7 *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşunun besiyeri 1'de ve 65 ^{o}C'de, pH 4.0-10.0'daki gelişme eğrileri (OD_{600}'e göre) ve gelişme süresince pH'daki değişimi …….. 62

Şekil 4.8 4.0-10.0 arasındaki pH'larda besiyeri 1'de, 65 ^{o}C'de geliştirilen *Thermoanaerobacter* sp. 5K4 suşunun SGTaz aktivitesindeki gelişme süresine bağlı değişimleri…….. 64

Şekil 4.9 *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının değişik patates nişastası konsantrasyonlarındaki SGTaz aktivitelerinin süreye bağlı değişimi…… 68

Şekil 4.10 *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K'nın besiyeri 2'de, çeşitli karbon kaynaklarındaki SGTaz aktiviteleri……..69

Şekil 4.11 Bazı izolatların besiyeri 2'de 65 ^{o}C'de 24 saat gelişmeleri sonunda elde edilen α-SGTaz aktiviteleri……...72

Şekil 4.12 *Thermoanaerobacter* sp. P4 suşunun afinite kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlarında ölçülen enzim aktiviteleri ve protein miktarları…….. 75

Şekil 4.13 *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşunun afinite kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlarında ölçülen enzim aktiviteleri ve protein miktarları…….. 76

Şekil 4.14.a. *Thermoanaerobacter* sp. P4, b. *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının SDS-PAGE'deki yapılan protein bantlarının görünümleri…… 80

Şekil 4.15 *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının SGTaz'larının pH 4-11 arasındaki tamponlar kullanılarak ölçülen bağıl aktivite değerleri ……81

Şekil 4.16 *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının 40-95 ^{o}C sıcaklıklardaki bağıl SGTaz aktiviteleri……..... 82

Şekil 4.17 *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının SGTaz'larının pH 4-11 arasındaki tampon çözeltilerde bir saat bekletildikten sonra ölçülen aktivitelerinin bağıl değerleri……. 84

Şekil 4.18 *Thermoanaerobacter* sp P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının 80, 90 ve 100 ^{o}C sıcaklıklarda 4 saat bekletildiklerinde aktivitelerinde oluşan kayıpların bağıl değerleri…… 86
….

Şekil 4.19.a. *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının SGTaz'larının hidroliz aktivitelerinin optimum sıcaklıkları, b. optimum pH'ları…… 90

Şekil 4.20 HPLC'de α-,β- ve γ-SD'lerin standart kromatogramı……. 93

Şekil 4.21.a. *Thermoanaerobacter* sp. P4, b. *Thermoanaerobacter* sp. 5K'nın SGTazları ile üretilen SD'lere ait kromatogramlar …… 94

Şekil 4.22 *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının SGTaz'larının, 80 ^{o}C'de değişen inkübasyon süresinde oluşturduğu SD oranları…….. 96

Şekil 4.23 *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının farklı nişasta konsantrasyonlarındaki SD üretim miktarları…… 98

Şekil 4.24 *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının SD üretim oranlarına enzim konsantrasyonunun etkisi…….. 101

Şekil 4.25 *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının farklı çeşitli substratlarda SD üretimleri …… 105

Şekil 4.26 *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının SGTaz'larının farklı sıcaklıklardaki SD üretim miktarları……107

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Siklodekstrinlerin özellikleri……..…...…… 6

Çizelge 2.2 Glikozlu substratlara etki eden α-amilaz ailesi enzimlerin EC numaları, temel bölgeleri ve temel substratları..……...…. 10

Çizelge 2.3 Çeşitli mikroorganizmaların ürettikleri SGTaz'ların bazı özellikleri ……...….. 18

Çizelge 2.4 Siklodekstrinlerin kullanıldığı bazı ticari gıda ürünleri……29

Çizelge 4.1 *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının bazı biyokimyasal özelliklerinin çeşitli *Thermoanaerobacter* suşları ile karşılaştırması…….…....55

Çizelge 4.2 *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının besiyeri 2'de farklı gelişme sıcaklıklarındaki SGTaz aktiviteleri……..... 65

Çizelge 4.3 *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K'nın çeşitli azot kaynakları içeren besiyerindeki enzim aktiviteleri ……... 66

Çizelge 4.4 *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K'nın bazı karbon kaynakları ile besiyeri 2'de 65 ^{o}C'de 24 saat geliştirilmesi ile elde edilen SGTaz aktiviteleri……...….71

Çizelge 4.5 *Thermoanaerobacter* sp. P4 suşunun SGTaz enzimin saflaştırılması için uygulanan yöntemler ve elde edilen toplu sonuçlar……77

Çizelge 4.6 *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşunun SGTaz enzimin saflaştırılması için uygulanan yöntemler ve elde edilen toplu sonuçlar……77

Çizelge 4.7 Bazı metallerin SGTaz aktivitesine etkisi. …….. 88

Çizelge 4.8 *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K'nın SGTaz'larının spesifik birleştirme (coupling) aktivitesi…….. 92

Çizelge 4.9 *Thermoanaerobacter* sp P4 ve *Thermoanaerobacter* sp 5K suşlarının SGTaz'ları ile farklı substrat konsantrasyonlarında elde edilen SD'lerin miktarları, SD verimi ve SD'lerin oranları…….99

Çizelge 4.10 *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının değişen konsantrasyonlardaki SGTaz'ları ile elde edilen SD'lerin miktarları……... 102

Çizelge 4.11 *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K SGTaz'larının çeşitli substratlardan oluşturdukları SD'lerin miktarları, verimi ve oranları…….. 105

Çizelge 4.12 *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının SGTaz'larının çeşitli sıcaklıklarda oluşturdukları SD'lerin miktarları, SD verimi ve SD'lerin oranları……..... 108

1. GİRİŞ

Doğada yaygın olarak çeşitli bitki ve tohumlarının stoplazmasında büyük granüller şeklinde depolanan nişasta, birçok mikroorganizma tarafından karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır (Bertoldo ve Antranikian 2002, Qi ve Zimmermann 2005). Amiloz ve amilopektin olarak bilinen iki polisakkaritten oluşan nişastanın amiloz kısmı, α-1,4 bağlı D-glukopiranoz ünitelerinden oluşan doğrusal bir polisakkarittir. Amilopektin ise amilozdan farklı olarak ve α-1,4 bağlı D-glukopiranoz ünitelerinin yanında her 17-26 glikoz ünitesinde α-1,6 glikozidik bağları ile dallanmış bir yapıya sahiptir (Hamilton vd. 2000, Bertoldo ve Antranikian 2002). Mikroorganizmalar, nişastayı parçalayıp karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilmek için çeşitli hücredışı enzimler üretirler. α-1,4 ve/veya α-1,6 glikozidik bağları parçalayarak nişastayı hidrolize eden çok çeşitli enzimler tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Reaksiyon özellikleri bakımından birbirinden farklı olan bu enzimler α-amilaz, β-amilaz, amiloglikozidaz, pullulanaz ve siklodekstrin glikoziltransferaz gibi enzimlerdir (Hamilton vd. 2000).

Siklodekstrin glikoziltransferazlar (SGTaz; EC 2.4.1.19), nişasta ve türevlerini parçalayarak siklodekstrinleri (SD) oluşturan α-amilaz ailesine ait yegane enzimlerdir (Tonkova 1998). SGTaz'lar α-amilaz ailesi enzimleri olmalarına karşın, katalizlediği reaksiyonlar bakımından bunlardan farklılık göstermektedirler. α-amilaz ailesi enzimleri genellikle hidroliz reaksiyonlarını katalizlerken SGTaz'lar glikozil residülerinin akseptör olarak kullanılarak siklodektrinlerin oluştuğu transglikozilasyon reaksiyonlarını katalizlemektedirler (Rahman vd. 2006). SGTaz'lar çok fonksiyonlu enzimlerdir ve siklizasyon reaksiyonun dışında birleştirme (coupling, SD halkasının açılarak, oluşan maltooligosakkaritin akseptör moleküllere transfer edilmesi), disproporsiyonasyon (lineer maltooligosakkaritlerin akseptör moleküllere transferi) ve hidroliz reaksiyonlarını da katalizlemektedirler (Tonkova 1998).

SGTaz'ların *Bacillus macerans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus circulans*, *Bacillus steaothermophilus*, *Bacillus obhensis*, *Bacillus alkalophilus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* ve *Micrococcus* sp. gibi pek çok mezofilik aerobik bakteri tarafından

üretildiği belirlenmiştir. Bunların yanında termofilik anaerobik *Thermoanaerobacter* ve *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1'in de SGTaz ürettikleri ve bunların enzimlerin 80-90 ^{o}C sıcaklıklarda optimum aktivite gösterdikleri belirlenmiştir (Wind vd. 1995). Endüstriyel SD üretiminde ilk işlem nişastanın sıvılaştırılmasıdır, mezofilik bakterilerin SGTaz'ları ile yapılan SD üretiminde nişasta önce yüksek sıcaklıklarda termostabil α-amilazlarla sıvılaştırılmakta ve reaksiyon sıcaklığına soğutulmaktadır. Termofilik anaerobik bakterilerden elde edilen SGTaz'ların nişasta sıvılaştırılma sıcaklığında stabil oldukları ve endüstride uygulanan bu işlemin elimine edilip tek enzim ve sıcaklıkla SD'lerin üretiminin mümkün olacağı belirlenmiştir (Wind vd. 1998a). Endüstriyel prosesleri yüksek sıcaklıklarda uygulamanın birçok polimerik substratların çözünürlüğünün artması ve buna bağlı olarak viskozitenin düşmesi, reaksiyon hızının artması ve kontaminasyon riskinin de azalması gibi birçok avantajları da bulunmaktadır (Gomes ve Steiner (2004).

SGTaz'ların temel reaksiyonu siklizasyondur ve bu reaksiyonu ile α(1-4) glikozidik bağlı glikoz ünitelerinden oluşan SD'leri oluşturmaktadır. Yapısındaki glikoz ünitesinin sayısına göre genel olarak α (6), β (7) ve γ (8) olmak olarak isimlendirilen 3 tip SD bulunmaktadır (Loftsson ve Brewstler 1996, Uitdehaag vd. 2002). Geometrik olarak 3 boyutlu konik silindir biçiminde olan SD'lerin kavite denen iç kısmı hidrofobik dış yüzeyi ise hidrofiliktir. Bu yapısal özelliklerinden dolayı çok çeşitli katı, sıvı ve gazlarla konakçı-konuk tipinde kristal inklüzyon kompleksi oluşturabilme yeteneğindedirler (Starnes 1990). SD'lere olan ilginin temel sebebi inklüzyon kompleksi oluşturabilmeleridir (Del Valle 2004). İnklüzyonla konuk molekülün çözünürlük, ısı, ışık ve uçuculuk gibi çeşitli fiziksel ve kimyasal özellikleri iyileştirilebilmektedir. Bu özelliklerinden dolayı eczacılık, gıda, kozmetik, kimya, tarım ve tekstil gibi endüstriyel alanlarda kullanılabilmektedir (Singh vd. 2002).

SD'ler hakkındaki ilk yazılı belge Fransız bilim adamı Villier'e aittir (1891) (Szejtli 2004). Villier nişastadan *Bacillus amylobacter* ile ilk SD'leri üretmiş ve bunlara selülozin adını vermiştir. 1903'de Shardinger bunların siklik yapılarını belirleyerek; bulduğu iki farklı SD'e α ve β dekstrinleri ismini vermiştir (Loftsson ve Duchene 2007). 1948'de SD'lerin inklüzyon kompleksi oluşturabilme yetenekleri belirlenmiştir,

1970'lerde endüstriyel olarak Japonya ve Macaristan'da üretilmeye başlanmıştır (Starnes 1990, Del Valle 2004). SD'ler üst bağırsak sisteminde absorbe edilemezler ve kalın bağırsak mikroflorası tarafından tamamen metabolize edilen toksik olmayan nişasta türevleridir (Irie ve Uekama 1997, Szente ve Szejtli 2004). α, β ve γ-SD'ler gıda katkı maddesi olarak kullanılmak üzere GRAS listesine alınmıştır (Astray vd. 2009). Endüstriyel üretimlerde genellikle alkalofilik *Bacillus* (özellikle *Bacillus macerans*) kullanılmaktadır. Her 3 siklodektrinde endüstriyel olarak üretilebilmektedir (Biwer ve Heinzle 2004). SD üretimi 1990 yılında 850 ton civarında, 1998'de 6000 ton iken günümüzdeki üretimi 10000 tonun üzerindedir (Starnes 1990, Biwer ve Heinzle 2004, Loftsson ve Duchene 2007). Dünyada en fazla üretim ve tüketim oranına sahip olan Japonya'da 2000 yılındaki SD kullanımının 1800 ton olduğu bildirilmiş ve bu ülkede modifiye nişasta olarak kabul edilmektedirler (Starnes 1990, Hashimoto 2002). Ülkemizde endüstriyel olarak henüz üretilmemektedir.

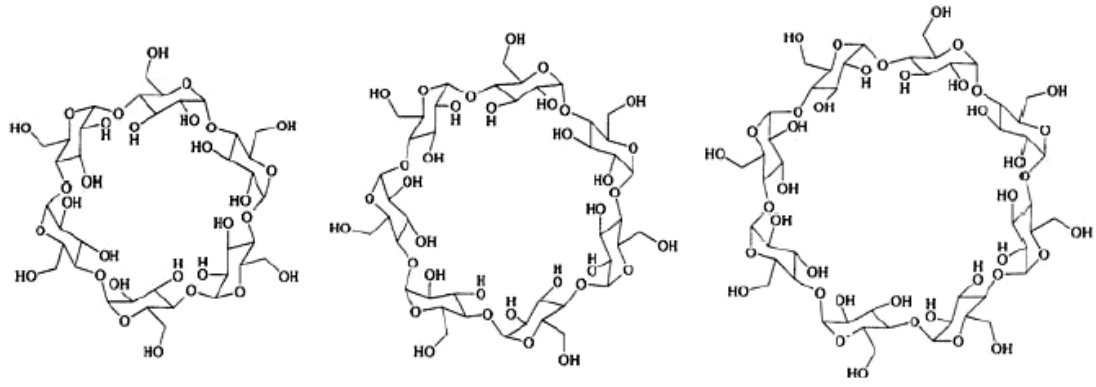
Bu çalışmada ülkemizin çeşitli bölgelerindeki petrol kuyuları, sıcak su kaynakları ve nişasta fabrikalarından alınan örneklerden izole edilen termofilik anaerobik bakterilerin siklodekstrin glikoziltransferaz üretimleri araştırılmış, enzim üretiminin optmizasyonu yapılarak, enzim saflaştırılmış, özellikleri belirlenmiş ve siklodekstrin üretiminin optimizasyonu yapılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Siklodekstrinlerin Yapısı ve Özellikleri

2.1.1 Yapısı

Siklodekstrinler (SD), nişasta ve türevlerinin siklodekstrin glikoziltransferaz (SGTaz) enzimi ile parçalanmasıyla üretilen α(1-4) glikozidik bağlı, indirgen olmayan, siklik maltooligosakkaritlerdir (van der Veen vd. 2000a, Singh vd. 2002). Bunlar aynı zamanda, sikloamilozlar, siklomaltozlar ve Schardinger dekstrinleri olarak da isimlendirilmektedirler (van de Manakker vd. 2009). 6-12 glikoz ünitesinden oluşan SD'lerin bulunduğu belirlemiştir, ancak bunlardan sadece α, β ve γ-SD olarak isimlendirilen sırası ile 6, 7 ve 8 glikoz ünitelerinden oluşan SD'ler endüstriyel olarak üretilmekte ve kullanılmaktadır (Şekil 2.1) (Crini ve Morcellet 2002, Harada 2001, Uitdehaag vd. 2002). 6 glikoz ünitesinden daha az glikoz içeren SD'lerin üretiminin sterik olarak mümkün olmadığı bildirilmiştir (Loftsson ve Brewster 1996, Crini ve Morcellet 2002).

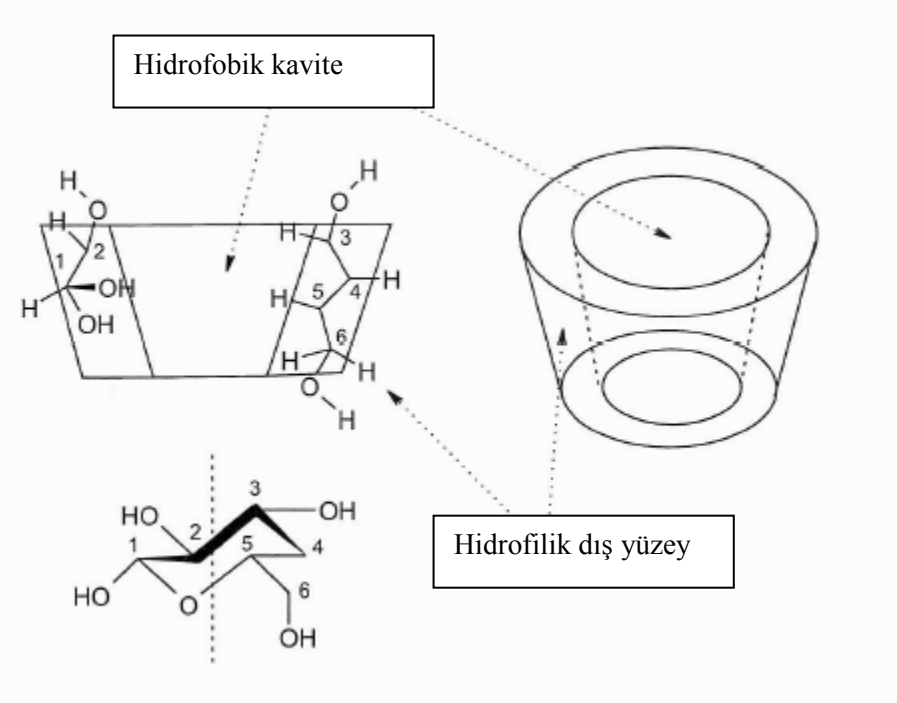


α-SD β-SD γ-SD

Şekil 2.1 α, β ve γ-siklodekstrinlerin kimyasal yapısı (Szejtli 2004)

Yapısındaki glikopiranoz ünitelerinin $^4C_1$ sandalye formunda olmasından dolayı SD'lerin 3 boyutlu yapılarının konik silindir biçiminde olduğu belirlenmiştir (Magnusdottir vd. 2002). Sandalye formu ile bütün hidroksil grupları molekülün dış

yüzeyinde toplanmıştır (van de Manakker vd. 2009, Crini ve Morcellet 2002). Bunlarda sekonder hidroksil grupları (C2 ve C3) halkanın geniş kenarında, primer hidroksil (C6) grupları ise diğer kenarda bulunmaktadır (Del Valle 2004, van de Manakker vd. 2009). Bu özellik SD'lerin suda çözünmesini (hidrofilik) sağlamaktadır (van de Manakker vd. 2009). Kavitenin iç kısmında ise C3 ve C5 hidrojen atomları ile glikozidik oksijen köprüleri bulunmakta ve böylece kaviteye hidrofobik (apolar) bir özellik kazandırmaktadır (Şekil 2.2), (van der Veen vd. 2000a, Song vd. 2009).



Şekil 2.2 Siklodekstrinlerin 3 boyutlu yapıları (Zhang ve Rees 1999)

Kavitenin apolar özelliğinden dolayı SD'ler birçok hidrofobik moleküllerle konakçı konuk tipinde inklüzyon (inclusion) kompleksleri oluşturabilmektedir (Del Valle 2004). Kavitenin polaritesinin etanolün polaritesine yakın olduğu saptanmıştır (Magnusdottir vd. 2002, Loftsson vd. 2005).

2.1.2 Özellikleri

α-SD, β-SD ve γ-SD'lerin çeşitli özellikleri Çizelge 2.1'de verilmiştir. β-SD'nin suda çözünürlüğü (% 1.85), α-SD (% 14.5) ve γ-SD'e (% 23.2) göre oldukça düşüktür

(Szejtli 1998, Zhang ve Rees 1999). SD molekülünde bir glikopiranoz ünitesinin C2 hidroksil gruplarının bitişiğindeki C3 hidroksil grupları ile hidrojen bağları oluşturabildiği ve bu hidrojen bağları ile molekülde sekonder bir hidrojen kemerinin oluştuğu ve bunun da β-SD'e oldukça sağlam bir yapı kazandırdığı belirtilmiştir. β-SD'nin çözünürlüğünün düşük olmasının bu molekül içi hidrojen bağlarından kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Szejtli 2004). Bu hidrojen bağları β-SD'nin ortamda bulunan su molekülleri ile hidrojen bağı oluşturabilme yeteneğini azaltmaktadır (Loftsson ve Duchene 2007). Bu özelliğinden dolayı β-SD sulu çözeltide kolaylıkla çöktürülüp ayrılabilmekte ve en ucuz, en çok bulunan ve kullanılan SD'dir (Starnes 1990, Del Valle 2004).

Çizelge 2.1 Siklodekstrinlerin özellikleri (Del Valle 2004)

Özellik	α-siklodekstrin	β-siklodekstrin	γ-siklodekstrin
Glikoz ünitesi sayısı	6	7	8
Molekül ağırlığı (g/mol)	972	1135	1297
25 ºC'de Suda çözünürlük (% ağ/h)	14.5	1.85	23.2
Dış çap (A)	14.6	15.4	17.5
Kavite çapı (A)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Yüksekliği (A)	7.9	7.9	7.9
Kavite hacmi (A^3)	174	262	427

α-SD'lerde ise bu hidrojen kemeri tamamlanmamış durumdadır, çünkü moleküldeki bir glikopiranoz ünitesi bükülmüş durumdadır. Buna bağlı olarak 6 yerine ancak 4 hidrojen bağı oluşabilmektedir. γ-SD ise oldukça esnek bir yapıya sahip olduğunda çözünürlüğü en yüksek olan SD'dir (Szejtli 1998).

2.1.2.1 Modifiye siklodekstrinler

SD'lerin suda çözünürlükleri aynı glikoz ünitesine sahip olan doğrusal dekstrinlere göre oldukça düşüktür (Magnusdottir vd. 2002). Bu nedenle suda çözünen SD türevleri elde

edebilmek için SD'ler modifiye edilebilmektedir (Loftsson ve Duchene 2007). SD'lerde her bir glikopiranoz ünitesinde fonksiyonları ve reaktiviteleri birbirinden farklı olan 3 serbest hidroksil grubu bulunmaktadır. Örneğin, bir β-SD molekülünde 21 hidroksil grubu aminasyon, esterifikasyon ve eterifikasyon gibi yöntemlerle çeşitli fonksiyonel grupların bağlanması ile modifiye edilebilmektedir (Eastburn ve Tao 1994, Rajewksi ve Stella 1996, Loftsson ve Duchene 2007). Örneğin, bir bazik çözeltide çözündürülmüş β-SD'nin propilen oksitle muamele edilmesiyle, 2-hidroksipropil β-SD'ler oluşmakta ve böylece çözünürlüğü % 1.85'ten % 60'a (ağ/h) çıkarılabilmektedir (Loftsson ve Duchene 2007, Del Valle 2004).

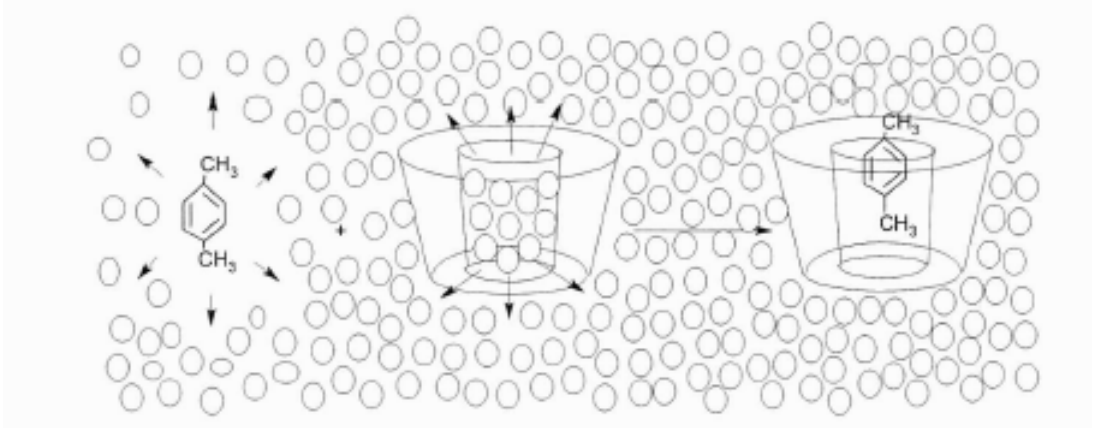
SD'lerin modifikasyonları, genellikle fonksiyonel grupların moleküldeki hidroksil gruplarına rastgele yerleştirilmesi ile kısmi olarak yapılmaktadır. Hidroksil gruplarının tamamına fonksiyonel grupların yerleştirilmesiyle elde edilen modifiye SD'lerin çözünürlüklerinin kısmi olarak modifiye edilenlere göre daha düşük olduğu belirtilmiştir (Loftsson ve Duchene 2007). SD'lerin kimyasal modifikasyonları ile çözünürlüklerinin arttırmasının yanında ışık ve oksijene dayanıklılığı da arttırmakta ve konuk molekülün kimyasal aktivitesinin kontrolüne yardımcı olmaktadır (Singh vd. 2002). Günümüzde, çeşitli modifikasyonlarla 1500 farklı SD türevi yapılmış ve literatürde tanımlanmıştır, bunların 100'den fazlası saf kimyasal olarak pazarlanmaktadır. Ancak, bunların toksikolojik değerlendirmeleri çok pahalı ve zaman alan süreçler olduğu için, sadece birkaç modifiye SD'nin endüstriyel uygulamalarına izin verilmektedir. Yeni modifiye edilmiş SD'ler aslında kullanılanlardan daha iyi özelliklerde olmadığından bunların kullanım alanlarının çok yavaş artacağı veya gelişeceği belirtilmiştir (Loftsson ve Duchene 2007). Endüstriyel olarak kullanılan modifiye SD'ler: RAMEB (rastgele metillenmiş β-SD), HPBCD (hidroksipropil β-SD), HEBCD (hidroksietil β-SD), DIMEB (heptakis (2,6-dimetil) β-SD), TRIMED (heptakis (2,3,6 trimetil) β-SD), EPC-CD (epiklorhidrin ile çapraz bağlamış SD)'dir (Singh vd. 2002).

2.1.2.2 Siklodekstinlerin inklüzyon kompleksi

İnklüzyon kompleksleri, bir konakçı molekülün konuk bir molekülü herhangi bir kovalent bağ oluşturmaksızın kavitesinde tutması ile oluşan bileşiklerdir (Hedges 1998, Gornas vd. 2009, Astray vd. 2009). İnklüzyon kompleksi oluşturabilen organik maddeler (konuk) taç eterleri ve siklodektrinlerdir (Crini ve Morcellet 2002). SD'lerin sulu çözeltilerinde kavitedeki su molekülleri ile kavite arasında apolar polar etkileşim olduğundan ortamın entalpisi yüksektir. Ortama apolar bir bileşik (konakçı) ilave edildiğinde su molekülleri kaviteden ayrılır konakçı moleküller kavite ile apolar-apolar etkileşim sağlayarak kavitenin zorlanması azalır ve daha stabil ve düşük enerjili bir yapı oluşur (Szejtli 1997, Szejtli 1998, Singh vd. 2002). Kompleks oluşumunun temel itici gücünün entalpice zengin su moleküllerinin kaviteden ayrılmasının olduğu belirtilmiştir (Szejtli 2004), (Şekil 2.3).

SD'lerin 3 boyutlu yapı ve şekilleri, hidrofobik bileşikler veya fonksiyonel gruplarla kompleks oluşturmalarında önemli bir parametredir (Del Valle 2004). Bu yapısal özellikleri bunların pek çok ve çeşitli katı sıvı ve gazlarla kristal inklüzyon kompleksi oluşturmalarına olanak sağlar (Starnes 1990). İnklüzyon kompleksleri oldukça stabildirler ve ortamdan kristalizasyonla kolayca ayrılabilmektedir (van der Veen vd. 2000a). Konuk moleküllerin SD'e bağlanması sabit veya kalıcı değildir, ancak, dinamik bir dengededir. Bağlanma gücü konakçı-konuk moleküllerin birbirlerine uygunluğuna ve yüzey atomları arasındaki lokal özgül etkileşime bağlıdır. Kompleksler hem çözelti hem de kristal halde oluşabilmekte ve çözücü olarak genellikle su kullanılmaktadır (Singh vd. 2002).

Her 3 tip SD'nin de kavite yükseklikleri aynı olduğu için, glikoz ünitesi sayısı sadece kavitenin çap ve hacmini belirlemektedir. Bu boyutlara göre α-SD'ler tipik olarak düşük moleküllü moleküllerle veya alifatik yan zincirli bileşiklerle, β- SD'ler aromatik ve heterosiklik bileşiklerle, γ- SD ise makrosiklik ve steroidler gibi daha büyük moleküllerle kompleks oluşturabilmektedirler (Del Valle 2004).



Şekil 2.3 *p*-ksilen ve bir SD molekülünün inklüzyon kompleksi oluşumunun şematik gösterimi (Astray vd. 2009)

SD'lerle inklüzyon kompleksleri oluşturulurken, konuk moleküller konakçı kavitesinde geçici olarak hapsedildiği veya kilitlendiği için, konuk moleküllerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinde önemli değişiklikler oluşur (Rajewski ve Stella 1996, Singh vd. 2002). SD'lerin kompleks oluşumu ile en önemli kullanım amacı çözünürlüğü az olan bileşiklerin sudaki çözünürlüğünü arttırmaktır (Mourtzinos vd. 2008). Bunun yanında moleküllerin ısı, ışık ve oksidasyonun yıkıcı etkileri karşı koruyarak ürünlerin raf ömrünün uzatılması, istenmeyen koku tatların maskelenmesi gibi pek çok amaçla da kullanılabilmektedir (Singh vd. 2002, van der Veen vd. 2002b).

2.2 Siklodekstrin Glikoziltransferaz (SGTaz) Enzimi

Siklodekstrin glikozil transferaz [1,4-α-D-glukan; 4-α-D-(1,4- α-D-glucano)-transferase, EC 2.4.1.19], nişasta ve türevlerinin (amiloz, amilopektin) parçalanmasını katalize ederek indirgen olmayan SD'leri oluşturan ekstraselüler bir enzimdir (Choe vd. 2003, Cao vd. 2005, Blackwood ve Bucke 2000). Bu enzimler ayrıca, siklomaltodekstrin glikoziltransferaz veya siklomaltodekstrin glukanotransferaz olarak da isimlendirilmektedir (Qi ve Zimmermann 2005).

Aminoasit dizi benzerliğine göre yapılan sınıflandırmaya göre, SGTaz'ların glikozil hidrolazların α-amilaz ailesine ait (13. aile) enzimler olduğu belirlenmiştir (Henristat 1991, van der Maarel vd. 2002). Bu sınıflandırmaya göre, nişastayı parçalayan

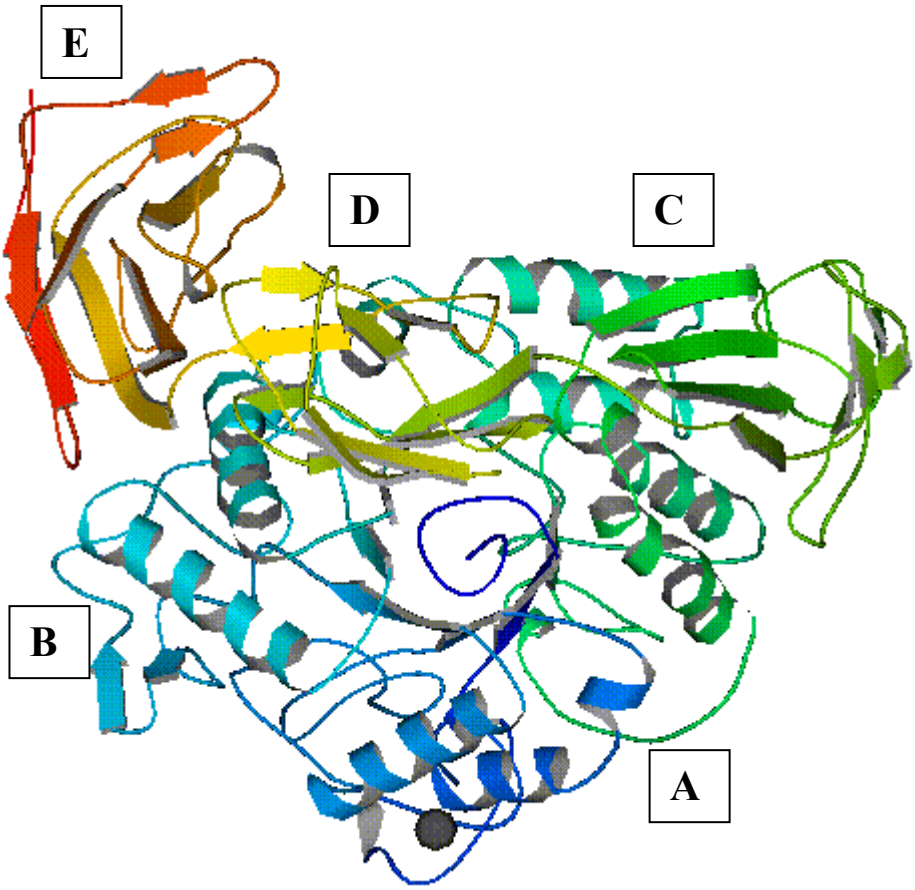
enzimlerin çoğu bu aileye aittir ve bu enzimlerin genel özellikleri: (i) α-glikozidik bağlara etki ederek, α-anomerik mono-veya oligosakkaritleri oluşturur (hidroliz), α(1-4) ve/veya α(1-6) glikozidik bağları oluşturur (transglikozilasyon), (ii) katalitik bölgelere sahip $(\beta/\alpha)_8$ veya TIM fıçı yapısı gösterir, (iii) primer yapılarında, katalitik bölgedeki aminoasitler ve korunmuş TIM fıçı topolojisinin stabilitesi için gerekli aminoasitleri içeren yüksek derecede korunmuş 4 adet bölge bulunmaktadır. Yukarıda belirtilen özellikleri taşıyan α-amilaz ailesine ait enzimlerin bazı özellikleri Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.2 Glikozlu substratlara etki eden α-amilaz ailesi enzimlerin, EC numaları, temel bölgeleri ve temel substratları (van der Maarel vd. 2002)

Enzim	**EC numarası**	**Bölgeler**	**Temel substratı**
Amilosukraz	2.4.1.4		Sakkaroz
Sakaroz fosforilaz	2.4.1.7		Sakkaroz
Siklodekstrin glikoziltransferaz	2.4.1.19	A,B,C,D,E	Nişasta
amilomaltaz	2.4.1.25	A,B1,B2	Nişasta glikojen
A-amilaz	3.2.1.1	A,B,C	Nişasta
Oligo-1,6-glikozidaz	3.2.1.10	A,B	Amilopektin
a-glikozidaz	3.2.1.20		Nişasta
amilopullulanaz	3.2.1.41 veya 3.2.1.1	A,B,H,G,1	Pullulan
siklomaltodekstrinaz	3.2.1.54	A,B	Siklodekstrinler
İzopullulanaz	3.2.1.57		Pullulan
izoamilaz	3.2.1.68	A,B,F,7	Amilopektin
glukodekstranaz	3.2.1.70		Nişasta
neopullulanaz	3.2.1.135	A,B,G	Pullulan

2.2.1 SGTaz'ların yapısı

α- amilaz ailesi enzimleri katalitik bölgeleri ile birlikte 3 etki bölgesi (A,B ve C) içermekte, SGTaz'lar da bu bölgeleri içermekle birlikte, bunlarda α- amilazlardan farklı olarak iki yapısal bölgenin (D ve E) daha olduğu belirlenmiştir (Şekil 2.4) (Uitdehaag vd. 2002, van der Maarel vd. 2002). SGTaz'lar ve α- amilazlardaki A,B ve C bölgeleri yapısal olarak büyük benzerlikler göstermektedir (van der Veen vd. 2000c). A bölgesi $(\beta/\alpha)_8$ veya TIM fıçı olarak adlandırılan, protein yapısının çekirdeğini oluşturan 8 α-heliks yapısıyla çevrelenmiş 8 adet paralel β-yaprak formunda ve katalitik bölgedir (van der Veen vd. 2000a, Pryzlas vd. 2000). Bu bölgede 300-400 aminoasit bulunmakta ve proton donörü olarak Glu257 Asp 229 Asp 328 görev yapmaktadır. B bölgesi, katalitik bölgeye yakın, 44-133 aminoasitten oluşmakta ve bu bölge substrat bağlama görevini yapmaktadır (van der Veen vd. 2000a). A ve C bölgelerinin aksine bu bölgedeki aminoasit sayısı ve dizisi enzime ve kaynağına göre büyük farklılıklar göstermektedir (Pryzlas vd. 2000). C bölgesi ise, antiparalel β-sandviç yapısında, 100 aminoasitten oluşmaktadır. *Bacillus circulans* strain 251'in SGTaz'ında, C bölgesinde bir maltoz bağlama bölgesi olduğu ve bu bölgenin substrat bağlamada görev yaptığı belirlenmiştir. D bölgesi, immunoglobulin yapısında, yaklaşık 90 aminoasitten oluşmakta ve sadece SGTaz'larda bulunduğu bildirilen bu bölgenin fonksiyonu henüz bilinmemektedir (Leemhius vd. 2010). E bölgesi, yaklaşık 110 aminoasitten oluşmakta ve nişasta granüllerinin adsorbsiyonunu sağlamaktadır (van der Veen vd. 2000a). Bu bölgede bulunan Trp^{616}, Trp^{662} ve Trp^{633} aminoasitlerinin ham nişastayı bağlamada kritik öneme sahip oldukları bildirilmiştir (Hamilton vd. 2000). *B. circulans* 251 CGTaz'ının E bölgesinde iki adet maltoz bağlama bölgesinin (MBS-maltose binding site) olduğu belirlenmiş ve MBS1'in ham nişastanın bağlanmasında görev aldığı, MBS2'nin ise substratın (nişasta) aktif bölgeye taşınmasını sağladığı belirlenmiştir. MBS2'nin ayrıca SD'leri de bağlayarak CGTaz'ın ürün inhibisyonunda önemli rol aldığı belirtilmiştir (Penninga vd. 1996, Wind vd. 1998b).



Şekil 2.4 *Bacillus circulans* 251, SGTaz'ının üç boyutlu görünümü. A bölgesindeki, $(\beta/\alpha)_8$ fıçı yapısı siyah yuvarlak ile belirtilmiştir (www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes, 2009)

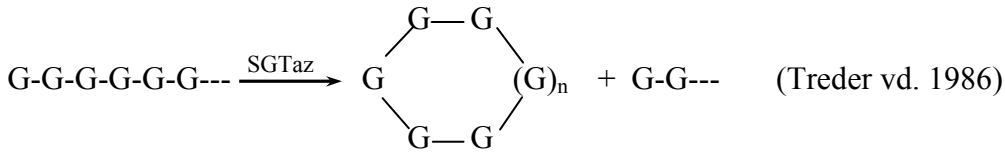
2.2.2 SGTaz'ların katalizlediği reaksiyonlar

SGTaz'lar aminoasit dizilimi bakımından α-amilazlara benzemekle birlikte, katalizlediği reaksiyonlar bakımından α-amilazlardan oldukça farklıdırlar. α-amilazlar genellikle su molekülünü akseptör olarak kullanarak hidroliz reaksiyonlarını katalizlerken, SGTaz'lar hem intermoleküler (iki molekül arasında) hem de intramoleküler (tek molekül üzerinde) transglikozilasyon reaksiyonlarını katalize eden çok fonksiyonlu enzimlerdir (Mahat vd. 2004, van der Veen vd. 2000b). SGTaz'ların temel reaksiyonu, glikozil residülerininin akseptör olarak kullanılıp transglikozilasyon reaksiyonlarının katalizleyerek SD'lerin oluşturulmasıdır (Rahman vd. 2006).

2.2.2.1 İntramoleküler transglikozilasyon reaksiyonu

a) Siklizasyon

Doğrusal (lineer) yapıdaki oligosakkarit (nişasta) molekülün α-1-4 glikozidik bağları kırılarak yeni oluşan indirgen uçlu şekerlerin aynı zincir üzerindeki indirgen olmayan uca transfer edilmesi ile SD'ler oluşmaktadır (Rashid vd. 2002, van der Maarel vd. 2002). Siklizasyon rekasiyonu uzun zincirli substratların varlığında olmaktadır (Starnes 1990) ve bunun için ortamda en az 7 ve daha fazla glikoz ünitesinden oluşan maltooligosakkaritlerin bulunması gerekmektedir (Tonkova 1998). Eğer ortamda kısa zincirli maltooligosakkaritler varsa birleştirme (coupling) reaksiyonu gerçekleşmektedir (Starnes 1990).



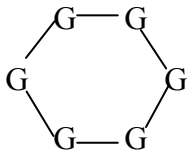
α-,β-,γ- Siklodekstrin (n=1,2,3)

2.2.2.2 İntermoleküler transglikozilasyon reaksiyonları

İntermoleküler transglikozilasyon reaksiyonlarında glikoz, ksiloz, sorboz, inositol, sakkaroz, maltoz, laktoz, steviosid, hesperidin ve askorbik asit gibi çeşitli karbonhidratlar, glikozidler, şeker alkolleri, vitaminler ve flavanoidler akseptör olarak görev yapabilmektedirler (Tonkova 1998, Park vd. 1998). Transglikozile edilmiş olan mono- ve oligo- glikozid residülerinde tatlılığın ve suda çözünürlüğün artması, *Bifidobacteria*'nın gelişiminin teşvik etmesi ve kimyasallara karşı direncin artması gibi önemli iyileşmeler gözlenmiştir (Park vd. 1998). Bu nedenle, siklizasyon ile SD'lerin üretimi dışında, SGTaz'ların birleştirme (coupling) ve disproporsiyonasyon reaksiyonları ile endüstriyel uygulama alanı bulabildiği bildirilmiştir. Örneğin, *Stevia rebaudiana* bitkisinden elde edilen bir tatlandırıcı olan doğal steviosidin glikozilasyonunda SGTaz'ın kullanılarak, acılığı azaltılıp çözünürlüğü de arttırılabilmektedir (Uitdehaag vd. 2002).

a) Birleştirme (coupling) reaksiyonu

Siklizasyon reaksiyonunun tersi olarak bilinen (Uitdehaag vd. 2002) bu reaksiyonda, SD halkası açılarak akseptör olan başka bir lineer maltooligosakkarite transfer edilmektedir (Rashid vd. 2002). Birleştirme reaksiyonu şematik olarak aşağıdaki gibi gösterilmiştir.



$$\xrightarrow{\text{SGTaz}}$$ G-G-G-G-G-G-A (Treder vd. 1986)

A=akseptör

b) Disproporsiyonasyon (disproportionation)

Lineer bir maltooligosakkarit parçalanmakta ve oluşan yeni indirgen uçlu şeker, akseptör olarak görev yapan başka bir maltooligosakkarite aktarılmaktadır. Disproporsiyonasyon reksiyonu, SGTaz'ın substratla reaksiyonunun başında, eğer ortamda uzun zincirli nişasta molekülleri varsa gerçekleşmekte ve bu reaksiyonun SD oluşumunu etkilememektedir (Starnes 1990). Bu reaksiyon aşağıdaki gibi oluşmaktadır:

$$G_m + G_n \xrightarrow{\text{SGTaz}} G_{m+x} + G_{n-x}$$ (Treder vd. 1986)

c) Hidroliz

SGTaz'lar lineer oligosakkaritlerin bir parçasını bir su molekülüne aktararak hidroliz reaksiyonunu yaparlar. α- amilazların aksine SGTaz'ların hidroliz aktivitelerinin düşük olduğu bildirilmiştir (Uitdehaag vd. 2002).

Genel olarak SGTaz'ların zayıf hidroliz aktivitesine sahip oldukları belirtilmektedir. *Bacillus circulans* 251 suşunun 3.0 U/mg, *Bacillus stearothermophilus*'un 1.88 U/mg hidroliz aktivitesine sahip oldukları, *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1

(Tabium) SGTaz'ının hidroliz aktivitesinin ise oldukça yüksek (30 U/mg) olduğu belirlenmiştir (Alcalde vd. 1999).

2.2.3 Siklodekstrin glikoziltransferaz enziminin üretimi

SGTaz enzimleri çoğunlukla bakteriler tarafından üretilmektedir (Mahat vd. 2004) ve bu enzimi ürettiği saptanan ilk bakteri *Bacillus macerans*'tır. Daha sonra, birçok bakterinin bu enzimi ürettiği ve günümüzde *Bacillus, Klebsiella*, *Brevibacterium*, *Thermoanaerobacterium*, *Thermoanaerobacter* ve *Micrococcus* cinsine ait bakterilerin üretimde kullanıldığı bildirilmiştir (Rahman vd. 2006). Bakterilerin yanında *Thermococcuc* ve *Pyrococcus* cinslerine ait çeşitli arke türlerinin de SGTaz ürettikleri belirlenmiştir. Günümüzde, endüstriyel SGTaz üretiminde en çok kullanılan mikroorganizmalar aerobik ve alkalofilik *Bacillus* türleridir (Mahat vd. 2004).

SGTaz'lar mikroorganizmaların çoğunda hücredışı olarak üretilmektedirler ve üretilen SD'lerin miktarı ve türü her mikroorganizmada farklılık göstermektedir (Tonkova 1998, Savarage vd. 2008). SGTaz'ların endüstriyel üretimleri diğer enzim üretim proseslerine benzer şekilde yapılmaktadır. Endüstriyel üretimlerde hem doğal suşların hem de genetik modifiye suşların kullanıldığı ve bunların oranının % 50 olduğu belirtilmiştir (Qi ve Zimmermann 2005).

SGTaz üretimi genellikle kesikli kültür ile yapılmaktadır, ancak yarı kesikli ve sürekli kültür ile yapılan çalışmalar da bulunmaktadır. Enzim üretimin hücre gelişimi sırasında olduğu belirlenmiştir (Tonkova 1998). Maksimum enzim konsantrasyonuda logaritmik fazın sonlarında veya durağan fazda, 24-48. saatlerde ulaşılmaktadır (Stefanova vd. 1999, Martins ve Hatti Kaul 2002, Mahat vd. 2004).

SGTaz üretiminde substrat olarak nişasta (patates, mısır, pirinç, buğday tapyoka, cassava) kullanılır. SGTaz üreticisi bütün mikroorganizmalar tüm nişasta türlerinden enzim üretebilmektedirler, ancak enzim miktarı nişastanın kaynağına göre farklılık göstermektedir (Wang vd. 2006). Yapılan çeşitli çalışmalarda, *Bacillus licheniformis* (Bonilha vd. 2006), *B. alkalophilic* CGII (Freitas vd. 2004), *Bacillus agaradhaerans*

(Martins ve Hatti Kaul 2002) patates nişastası ile, *Bacillus circulans* DF 9R (Rosso vd. 2002) cassava ve pirinç nişastası ile, *Bacillus macorous (*Wang vd. *2006)* ve *Bacillus firmus* (Gawande vd. 1998) mısır nişastası ile, *Bacillus* G1 (Ibrahim vd. 2005) ise tapyoka nişastası ile en yüksek oranda SGTaz'ı üretmişlerdir. SGTaz üreticisi mikroorganizmaların çoğu basit şekerlerden enzimi üretemezler ancak birkaç istina bulunmaktadır, örneğin *Bacillus cereus* en yüksek SGTaz'ı ortamda ksiloz varlığında üretmektedir. *Bacillus* G1'in ise glikoz, fruktoz, laktoz, ve ksilozdan SGTaz üretebildiği belirlenmiştir (Ibrahim vd. 2005).

SGTaz üretiminde genellikle maya özütü, pepton, kazein, mısır ıslatma şurubu gibi organik azot kaynakları kullanılmaktadır ve yapılan çalışmaların çoğunda inorganik azot kaynaklarının varlığında SGTaz üretimi gözlenmemiştir (Tonkova 1998). Ancak, Rosso vd. (2002) *Bacillus circulans* DF 9R'nin amonyum tuzları varlığında yüksek oranda SGTaz ürettiklerini ve organik azot varlığında enzim üretiminin düştüğünü belirlemişlerdir.

Alkali SGTaz üreticisi bakterilerin gelişebilmesi ve enzimi üretebilmesi için Na_2CO_3, $NaHCO_3$, $CaCO_3$ gibi karbonat tuzlarının ortamda bulunasının zorunlu olduğu bildirilmiştir (Tonkova 1998).

2.2.4 Siklodekstrin glikoziltransferaz enziminin özellikleri

Son 30 yılda, pek çok araştırmacı tarafından bakteriyel SGTaz'ların saflaştırılması ve karakterizasyonu üzerine çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda, elde edildikleri kaynağına göre enzimlerin sıcaklık, pH, molekül ağırlığı, ve ürettikleri ürünlere göre oldukça farklılıklar gösterdikleri belirtilmiştir (Tonkova 1998). Bazı SGTaz enzimlerinin özellikleri Çizelge 2.3'de verilmiştir.

Bacillus macerans'ın SGTaz'ı üzerinde pek çok araştırıcı tarafında çalışmalar yapılmış ve özellikleri belirlenmiştir (Kim vd. 1995, Tonkova 1998). Stavn ve Granum (1979) tarafından saflaştırılan *Bacillus macerans* SGTaz'ının molekül ağırlığının 67 kDa, optimum pH ve sıcaklığının ise sırası ile 5.4-5.8 ve 60 ^oC olduğu, pH 6.0 ve 50 ^oC'de

enzimin stabil kaldığı, ancak 60 ^{o}C'de 30 dakikada aktivitesinin % 80'ini kaybettiği bildirilmiştir.

Bacillus sp. G1'in SGTaz'ının molekül ağırlığının 79 kDa, optimum pH ve sıcaklığının 6.0 ve 60 ^{o}C, ancak pH 7.0-9.0 arasında 60 ^{o}C'de stabilitesini koruyabildiği, bununla birlikte 20 mM Ca^{2++} varlığında termal stabilitesinin 70 ^{o}C'ye çıktığı belirlenmiştir. $ZnSO_4$, $CuSO_4$, $CoCl_2$, $FeSO_4$, $FeCl_3$ ve EDTA ilavesi ile enzimin tamamen inhibe olduğu ve 60 ^{o}C'de 24 saat inkübasyon sonunda 0.11:0.79 oranında γ- ve β-SD oluşturduğu anlaşılmıştır (Sian vd. 2005).

Bacillus sp. TS1-1'in SGTaz'ının 721 aminoasit içerdiği, molekül ağırlığının 75 kDa olduğu, optimum pH ve sıcaklığının sırası ile 6.0 ve 60 ^{o}C olduğu, pH 7.0-9.0 arasında 70 ^{o}C'ye kadar stabil olduğu bildirilmiştir. 60 ^{o}C'de, K_m ve V_{max} değerlerinin de 0.52 mg/mL ve 54.35 mg β-SD/mL/dak olduğu bildirilmiştir. Patates nişastasından 60 ^{o}C'de 24 saatlik inbübasyon sonunda % 86 oranında β-SD, % 14 de γ-SD ürettiği belirlenmiştir (Rahman vd. 2006).

Cao vd. (2005), alkali *Bacillus* sp.277'nin SGTaz'ını saflaştırmışlar ve molekül ağırlığını 67 kDa, optimum pH'sını 8.5, sıcaklığı ise 60 ^{o}C olarak belirlemişlerdir. Enzimin pH 6-10 arasında ve 70 ^{o}C'nin altındaki sıcaklıklarda stabil olduğunu, enzimin $MgCl_2$, $ZnCl_2$, $CuSO_4$, $Al_2(SO4)_3$, $CoCl_2$, $AgNO_3$, $FeSO_4$ ilavesi ile tamamen inhibe edildiği anlaşılmış, % 10'luk patates nişastasının, % 34'ünün SD'lere dönüştürüldüğü, oluşan α-, β- ve γ-SD'lerin oranının ise 0.26:1.0:0.86 olduğunu belirlemişlerdir.

Martins ve Hatti-Kaul (2002), bir soda gölünden izole ettikleri alkali *Bacillus agaradhaerens*'in SGTaz'ının molekül ağırlığının 110 kDa olduğunu ve bunun en büyük molekül ağırlığına sahip SGTaz olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırıcılar, bu enzimin en iyi aktivite gösterdiği pH'nın 9.0; sıcaklığın 55 ^{o}C ve pH 5.0-11.0 arasında stabil olduğunu belirlemişlerdir. $CaCl_2$'ün enzim aktivitesini sitümüle, $CuCl_2$, $FeCl_2$, $HgCl_2$ ve Fe $(ClO_4)_3$'ün ise tamamen inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Enzimin nişastadan % 89 oranında β-SD ve % 11 oranında da α-SD ürettiğini de saptamışlardır.

Çizelge 2.3 Çeşitli mikroorganizmaların ürettikleri SGTaz'ların bazı özellikleri

Mikroorganizma	Optimum sıcaklık	Optimum pH	Molekül ağırlığı	Üretilen temel SD	Kaynak
Arkeler					
Pyrococcus furiosus DSM 3638	95	5.0	65	β-SD	(Lee vd. 2007)
Thermococcus kodakaraensis KOD1	80	5.5	77	β-SD	(Rashid vd. 2002)
Thermococcus sp B1001	85	7.0	83	α-SD	(Tachibana vd. 1999)
Bakteriler					
Alkali *Bacillus* sp. 7-12	60	8.5	69	β-SD	(Cao vd. 2005)
Alkali *Bacillus* sp. G1	60	6.0	79	β-SD	(Sian vd. 2005)
Alkali *Bacillus* sp. G-825-6	50-55	9.0	78.2	γ-SD	(Hirano vd. 2006)
Alkali *Bacillus* sp. TS1-1	60	6.0	75	β-SD	(Rahman vd. 2006)
Anaerobranca gottschalkii	55-70	9.0	78	β-SD	(Thiemann vd. 2004)
Bacillus sp. 1070	60	7.2		β-SD	(Volkova vd. 2000)
Bacillus sp. PS302	55	5.0-8.5	76		(Suntinanolert vd. 1997)
Bacillus agaradhaerens LS-3C	55	9.0	110	β-SD	(Martins ve Hatti Kaul 2002)
Bacillus alkalophilic CGII	55	8.0	-		(Freitas vd. 2004)
Bacillus amyloliquefaciens AL 35	60	9.0		α-SD	(Yu vd. 1988)
Bacillus circulans DF9R	56	6.4		α-SD	(Szerman vd. 2007)
Bacillus brevis CD162	55	8.0	75	β-SD	(Kim vd. 1998)
Bacillus licheniformis	55	6.0-9.0	85.2		(Bonilha vd. 2006)
Bacillus macerans	60	5.4-5.8	67	α-SD	(Stavn ve Granum 1979)
Bacillus stearothermophilus	9.0	60			(Stefanova vd. 1999)
Klebsiella pneumoniae AS-22	35-50	5.5-9.0	75	α-SD	(Gawande ve Patkar 2001)
Paenibacillus sp F8	50	7.5	72	β-SD	(Larsen vd. 1998)
Paenibacillus pabuli US132	65	6.5	70	β-SD	(Jemli vd. 2007)
Thermoanaerobacter sp. ATCC 53627	95	5.0	75.5	β-SD	(Norman ve Jorgensen 1992)
Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes EM1	85	5.5	68	β-SD	(Wind vd. 1995)

Paenibacillus sp. F8'in SGTaz'ının, 72 kDa molekül ağırlığında, pH 7.5 ve 55 ^{o}C'de optimum aktivite gösteren bir enzim olduğu belirlenmiştir. $CaCl_2$'ün enzim aktivitesini stabilize ettiği ve enzimin patates nişastasından 24 saatlik inkübasyonla 0.09:1:0.25:0.14 oranında α-,β-,γ- ve δ-SD'leri ürettiği bildirilmiştir (Larsen vd. 1998).

Paenibacillus pabuli US132'nin SGTaz'ının 70 kDa molekül ağırlığında, 10 mM $CaCl_2$ varlığında 65 ^{o}C'de maksimum aktivite gösterdiği ve pH 5.5-9.0 arasında stabil ve pH 6.5'de en yüksek aktiviteye sahip bir enzim olduğu belirlenmiştir (Jemli vd. 2007).

Klebsiella pneumonia AS-22'nin SGTaz'ının molekül ağırlığının 75 kDa, pH 6.0-9.0 arasında stabil ve 45 ^{o}C'de optimum aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Bu enzimin 35 ^{o}C'nin üzerindeki sıcaklıklarda substratsız koşullarda inkübe edildiğinde aktivitesini hızla kaybettiği, enzimin patates nişastasından 81:12:7 oranında α-,β-ve γ-SD ürettiği belirlenmiştir (Gawande ve Patkar 2001).

Norman ve Jorgensen (1992) tarafından karakterize edilen *Thermoanaerobacter* sp ATCC 53627'nin SGTaz'ının 683 aminoasit residüsünden oluştuğu, 75 kDa molekül ağırlığında, pH 5.0 ve 95 ^{o}C'de optimum aktivite gösterdiği, 75 ^{o}C'de, 1 saatte aktivitesinin % 95-100'ünü koruyabilen termostabil bir SGTaz olduğu bildirilmiştir. Bu enzimin aminoasit diziliminin *Bacillus* SGTaz'larıyla benzerliğinin % 58, *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*'in SGTaz'ı ile benzerliğinin ise % 89 olduğu belirlenmiştir, bu enzimin yüksek sıcaklıklarda aktivitesini koruyabildiği için, endüstriyel jet-pişirme prosesine dayanıklı olduğu bildirilmiştir.

Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes EM1'in SGTaz'ının, 68 kDa molekül ağırlığında pH 4.5-7.0 arasında ve 80-85 ^{o}C'de optimum aktivite gösterdiği, ayrıca hidroliz akivitesi de olan termostabil bir enzim olduğu, enzimin patetes nişastasından % 38 verimle sırası ile % 33, % 54 ve % 13 oranında α-,β-ve γ-SD ürettiği belirlenmiştir (Wind vd. 1995).

Bir arke olan *Thermococcus* sp. B1001'in SGTaz'ının molekül ağırlığının 83 kDa, 80 ^{o}C'de optimum aktivite gösterdiği ve bu sıcaklıkta 40 dakika stabilitesini koruduğu belirlenmiştir (Yamamoto vd. 1999). Termoalkali *Anaerobranca gottschalkii*'nin SGTaz'ının ise 78 kDa molekül ağırlığında, 65 ^{o}C'de ve pH 6.0-9.0 arasında optimum aktivite gösteren bir enzim olduğu, enzimin pH 5.0-10 arasında da aktivite gösterebildiği anlaşılmıştır (Thiemann vd. 2004).

Bacillus sp. G-825-6'nın SGTaz'ının bir γ-SGTaz olduğu, bu enzimin 671 aminoasit içerdiği, molekül ağırlığının 78.2 kDa ve % 10'luk patates nişastasından pH 8.0-10 arasında optimum olarak γ-SD ürettiği ve optimum sıcaklığının da 50-55 ^{o}C olduğu belirlenmiştir (Hirano vd. 2006).

2.3 Siklodektsrinlerin Üretimi

Günümüzde bilinen bütün SGTaz enzimleri α, β, ve γ- SD'leri farklı oranlarda üretmektedirler (Rosso vd. 2002, Martins ve Hatti Kaul 2003), SD oranı reaksiyon koşulları ve enzimin özelliklerine bağlı olarak değişmekle birlikte (Rahman vd. 2006, Mahat vd. 2004) genel olarak, α-ve β-SD'lerin oranı daha fazla, γ- SD oranı ise daha azdır (Tonkova 1998). En çok oluşan SD'nin türüne bağlı olarak enzimler α, β, ve γ-STaz'lar olarak da isimlendirilebilmektedir (Wind vd. 1995). SD'lerin sentez mekanizması üzerindeki birçok enerjetik çalışma yapılmasına karşın, üretilen SD'nin boyutunun hangi mekanizma ile belirlendiği açıklanamamış ve tek bir tip SD üretiminin zor olduğu belirtilmiştir (Hirano vd. 2006).

Endüstriyel boyutlarda SD üretiminde genel olarak solventli ve solventsiz proses olarak isimlendirilen 2 tip üretim prosesi bulunmaktadır. Solventli proseste organik bir kompleks ajanı kullanılarak üretim ortamından tek bir tip SD çöktürülüp ayrılmaktadır. Solventsiz prosesde ise kompleks ajanı kullanılmamakta ve ortamdaki bütün SD'lerin karışımı alınmaktadır (Szejtli 1998, Biwer vd. 2002, Li vd. 2007).

2.3.1 Solventli proses

Endüstriyel üretimlerde SD'lerin hemen hepsi solvent prosesiyle üretilmekte ve ortama eklenen solvent ile istenilen SD alınmaktadır (Biwer vd. 2002). β-SD üretiminde toluen, α-SD için 1-dekanol ve γ-SD için de siklohakzadekanol kullanılmaktadır (Szejtli 1998, Biwer vd. 2002, Biwer ve Heinzle 2004). Bunlardan başka birçok solvent ajanın da kullanılabileceği ve solvent seçiminin toksisite, fiyat, patlayıcılık özelliklerine de bağlı olduğu; en önemli özelliğinin ise oluşan kristal son üründen solventin ayrılabilme özelliğinin olduğu bildirilmiştir (Szejtli 1998, Li vd. 2007).

SD üretiminde hammadde olarak nişasta (% 20-30 konsantrasyonda) kullanılmaktadır. Nişasta bileşenlerinden hem amiloz hem de amilopektinden SD oluşabildiği, ancak amilopektinle daha yüksek verimle SD üretilebildiği belirtilmiştir. Patates nişastasının amilopektin içeriği buğday ve mısır nişastalarından daha yüksek olduğu için endüstriyel üretimlerde patates nişastası tercih edilmektedir (Biwer vd. 2002).

Endüstriyel SD üretiminde ilk aşama nişastanın sıvılaştırılmasıdır. Sıvılaştırma işlemi, sıcaklığa dayanıklı α-amilaz, HCl gibi asitler, jet pişirme, mekanik yollarla parçalama veya termostabil SGTaz ile yapılmaktadir (Li vd. 2007). Bazı α-amilazlar bu işlem sırasında kalsiyum iyonlarına gerek duyarlar. Enzim kullanıldığında sıvılaştırma işlemi sonrasında, enzimin yüksek sıcaklıkta inaktive edilmesi gerekmektedir (Starnes 1990, Biwer ve Heinzle 2004).

Sıvılaştırma işlemi sonrasında oluşan nişasta çözeltisi reaksiyon sıcaklığına soğutulmakta ve çözeltiye SGTaz ve kompleks ajanı ilave edilmektedir. SD'ler bu karışımda enzimatik olarak üretilmekte ve istenilen SD kompleks ajanı ile kompleks oluşturarak çökmektedir. Reaksiyon sıcaklığı 20-75 ^{o}C, pH ise 4.5-8.5 arasında tutulmakta ve işlem süresi 10 saatten birkaç güne kadar sürebilmektedir. İşlem süresince etkili bir karıştırma yapılması gerektiği ve maksimum verimin başlangıçta kullanılan nişastanın % 50'si kadar olduğu bilinmektedir (Biwer vd. 2002).

Üretim gerçekleştirildikten sonra, ortamdaki SD-kompleks ajanı santrifüj veya filtrasyon ile ayrılmakta, kalan çözelti, kullanılmayan nişasta, lineer dekstrinler, glikoz, maltoz, SGTaz, kullanılmayan kompleks ajanı, diğer bazı yan ürünler ve su içermektedir. Ayrılan kompleks daha sonra yıkanarak filtrat daha çok kompleks ajanı kazanmak için destile edilir (Szejtli 1998, Biwer vd. 2002, Biwer ve Heinzle 2004, Li vd. 2007).

Bir sonraki aşamada, SD-kompleks ajanı suda ısıtılarak ayrıldıktan sonra kompleks ajanı buhar distilasyon yöntemiyle ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Distilasyonla ayrılamayan bazı kompleks ajanlarının ayrılmasında ise sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi kullanılmaktadır Ürün çözeltisi vakum distilasyon yöntemiyle konsantre edilmekte, bazı

durumlarda çözelti aktif karbonla muamele edilerek temizlenmektedir. Kristalizasyon aşamasında, SD çöktürülerek, filtre edilir, yıkanır ve kurutulur (Szejtli 1998, Biwer vd. 2002, Biwer ve Heinzle 2004). Endüstriyel olarak üretilen SD'lerin hepsi beyaz, kristal, higroskopik olmayan, homojen yapıdadırlar ve saflıkları da % 99'un üzerindedir (Szejtli 1998, Szente ve Szejtli 2004).

2.3.2 Solventsiz proses

Solvent kullanılmayan SD üretim prosesi, ilk defa β-SD üretimi için geliştirilmiş ve endüstriyel olarak Japonya'da uygulanmıştır. Çözünürlüğü çok düşük olduğu için, β-SD'lerin kristalizasyon ile daha kolay saflaştırılabildiği anlaşılmış ancak, α ve γ-SD'lerin saflaştırılmasında kompleks ajanının veya saflaştırmada pahalı kromatografik tekniklerin gerektiği bildirilmiştir. Kompleks ajanı kullanılmadan üretilen SD'lerin, solventli prosesin aksine, gıda endüstrisinde kullanımına herhangi bir sınırlama olmadığı belirtilmiştir (Biwer vd. 2002).

β-SD üretiminin, solventli proseste olduğu gibi nişastanın sıvılaştırılması ve sonra enzim uygulaması ile başlamakta ancak, kompleks ajanı kullanılmadan enzimatik reaksiyonun sonunda SGTaz inaktive edilmekte, pH düşürülmekte ve daha sonra glikoamilaz ilave edilmektedir. Glikoamilaz, SD'lerin saflaştırma işlemlerinde sorun yaratabilecek olan kullanılmayan nişasta ve diğer lineer dekstrinleri glikoz ve maltoza dönüştürerek temizlenmektedir. Daha sonra, çözelti aktif karbon kullanılarak berraklaştırılmakta; filtre edilmekte ve düşük basınç altında, % 60 (ağ/h) çözünmüş katı partikül içerecek şekilde konsantre edilmekte, bazı durumlarda aktif karbon uygulamasından önce deiyonizasyon gerekebilmektedir. Kristalizasyon ve geri kristalizasyondan sonra, çöken β-SD'ler alınmakta, yıkanıp santrifüjlenerek kurutulmaktadır. Glikoz, maltoz α ve γ-SD'lerden oluşan kalan çözelti gıda katkı maddesi olarak da kullanılabilen bir şurup şeklinde konsantre edilerek kullanılabilmektedir (Biwer vd. 2002).

2.4 Siklodekstrinlerin Endüstriyel Kullanım Olanakları

Benzersiz yapısal özellikleri SD'lerin pek çok alanda kullanımını sağlamaktadır. SD ile kompleks oluşturan herbir konuk molekül, bir SD tarafından çevrelendiği için, mikroskobik görünüş açısından kompleks molekülü mikrokapsül olarak düşünülmektedir. Bu durum, konuk moleküllerin fiziksel ve kimyasal özellikleri üzerinde çok olumlu pek çok değişiklikler oluşturmaktadır. Konuk molekülde oluşan değişiklikler aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- Işık veya oksijene duyarlı maddelerin stabilizasyonu,
- Konuk moleküllerin kimyasal reaksiyon özelliklerinin modifikasyonu,
- Çok uçucu bileşiklerin fiksasyonu, uçuculuğun azalması,
- Bileşiklerin çözünürlüğünün arttırılması,
- Sıvı bileşiklerin toz haline getirilierek modifiye edilmesi,
- Bazı bileşiklerin mikroorganizmalar tarafından bozulmalarına karşı korunması,
- Kötü koku ve tatların maskelenmesi veya tutularak giderilmesi,
- Bileşiklerin pigment ve renklerinin maskelenmesi,
- Konuk moleküllerle SD'ler ile oluşan kompleks molekülün katalitik aktivitelerinin artmasıdır (Del Valle 2004).

Bu yapısal özelliklerinin yanında SD'ler toksik olmayan ve biyolojik olarak parçalanabilen moleküller olduğu için, analitik kimya, tarım, eczacılık, gıda ve kozmetik v.b. alanlarda kullanılmaktadır (Szejtli 1997, Zhang ve Rees 1999).

2.4.1 Eczacılık

SD'lerin en önemli kullanım alanlarında biri eczacılıktır (Szente ve Szejtli 2004). İlaç formülasyonlarında eczacılık endüstrisi hem yeni geliştirilen ilaçların aktif maddelerinin fiziksel özelliklerini iyileştirmek hem de mevcut ilaçların yeniden düzenlenmesinde yardımcı maddelere sürekli ihtiyaç duymaktadır (Singh vd. 2002). SD'ler ilaç etken maddeleri ile inklüzyon kompleksi oluşturarak bunların hücrelere alımının sağlanması, çözünürlük ve stabilitenin arttırılması, uçuculuğun azaltılması, raf ömrünün uzatılması,

yan etkilerinin azaltılması gibi birçok özelliklerinin iyileştirilmesinde yardımcı maddeler olarak önemli avantajlar sağlamaktadırlar (Szejtli 1997, Zhang ve Rees 1999, Redenti vd. 2001). Ayrıca, SD'ler gastrointestinal ilaç iritasyonunun azaltılmasında, sıvı ilaçların mikrokristal veya amorf toz haline gelirilmesinde ve ilaç-ilaç etkileşiminin önlenmesi amacı ile de kullanılabilmektedir (Loftson vd. 2005). Bugün dünyada 30-40 farklı ilaç yapımında SD'ler ticari olarak kullanılmaktadır (Loftsson ve Duchene 2007).

Bir ilaç bileşeninin hücre membranlarından taşınabilmesi için su içerisinde belirli düzeyde çözünebilmesi, ancak hücre membranından pasif difüzyonla geçebilmesi için de yeteri derecede lipofilik olması gerekmektedir (Loftsson vd. 2005). SD'lerin önemli özelliklerinden biri de biyolojik membranlardan ilaç geçişini arttırabilmesidir (Del Valle 2004). Yapılan çalışmalar sonucunda, SD'lerin lipofilik ilaç moleküllerini sulu çözelti içinde tutarak membranlardan geçmesini sağlayan birer taşıyıcı olarak görev yaptıkları belirtilmiştir (Loftsson ve Stefannson 2002, Loftsson vd. 2005). Lipofilik yapıdaki hücre membranının hidrofilik SD'lere olan afinitesi düşük olduğundan, SD'ler tükrük ve gözyaşı gibi sulu dış membranda kalmaktadırlar (Loftsson ve Stefannson 2002, Del Valle 2004). Alkol ve yağ asitleri gibi geleneksel penetrasyon arttırıcı bileşikler biyolojik membranların lipit tabakalarına zarar vermektedir. Öte yandan SD'ler, biyolojik bariyerlerden ilacın geçişini sağlayarak penetrasyon arttırıcıları gibi görev yapmaktadırlar; örneğin, SD'ler ağız yıkama çözeltileri, burun damlaları ve bazı göz damlalarında başarılı olarak kullanılabilmektedir (Del Valle 2004).

İlaç aktif maddelerinin büyük çoğunluğu suda yeterince çözünmezler ve çözünmeyen ilaçlar için günümüzde uygulanan geleneksel yöntem, organik çözücüler, surfaktanların kullanımı ve ekstrem pH koşullarının bunlar ile kombinasyonundan oluşmaktadır. Bu tür uygulamalar çoğunlukla tahriş ve diğer olumsuz reaksiyonlara sebep olmakta, ancak SD'ler tahriş edici olmadıkları için ilaç aktif maddelerinin stabilizasyonu, ilaç moleküllerinin uçuculuğunun azaltılması ve kötü koku ve acı tadın maskelenmesi gibi avantajlar da sunmaktadır (Del Valle 2004). Örneğin, sıvı bir ilaç olan Sporanox, yapısında 10mg/mL suda çözünmeyen antifungal itracozanole içermektedir. Itracozanole çeşitli kosolventler yardımı ile çözünür hale getirilebilmekte ancak, bu formda iken midede çökmekte ve absorbe edilememektedir (Hedges 1998).

Hidroksipropil β-SD kullanımı bunun midede çökmesini önlemekte ve enjeksiyon ile kullanımının yanında ağız yolu ile kullanımını mümkün kılmaktadır (Hedges 1998, Szejtli 2004).

Yapılan pek çok çalışmada, steroid esterleri, çeşitli antikanser ajanları, prostaglandin gibi çeşitli ilaç bileşiklerinin formülasyonlarında SD'lerin kullanılması ile stabilitelerinin arttırıldığı bildirilmiştir. Çalışmaların çoğunun sulu formlu ilaçlarda yapılmasına karşın SD'lerin katı formlu ilaçlarda da önemli oranda stabilizasyon sağladığı belirlenmiştir. SD kompleksi ile inklüzyon bileşiğinin ışık absorbsiyon özellikleri ve primer ve sekonder fotokimyasal reaksiyonlarının etkilendiği bunun yanında uçucu bileşiklerin buharlaşmasının önemli oranda azaltıldığı belirlenmiştir (Loftsson vd. 2005).

SD'lerin eczacılıktaki bir diğer uygulama alanı acılığın azaltılmasıdır (Szejtli ve Szente 2005). Pediyatrik bir ilaç olan Dextramethorphan bromide sıvı halde ve süspansiyon şeklinde kullanılması gerekmektedir. Ancak oldukça acı bir tadı olan bu ilacın acılığının azaltılmasında SD'ler kullanılmaktadır. Anti-alerjik bir ilaç olan Cetirizine'nin formülasyonunda da β-SD kullanılarak acılığı önemli oranda azaltılarak çiğneme tableti şeklinde ilaç yapılmıştır (Szejtli 2004).

SD'lerin suda çözünmeyen bileşikler ile oluşturdukları, inklüzyon kompleksleri aynı zamanda uçucu bileşiklerin tutulmasını kolaylaştırarak bunların tablet formunda ilaç yapımı gibi çeşitli ilaç düzenlemelerinde kullanılmasını sağlamaktadır (Del Valle 2004).

2.4.2 Kozmetik, kişisel bakım ve temizlik ürünleri

Bazı kozmetik ürünlerinin hazırlanmasında inklüzyon komplekslerinden yararlanılmaktadır (Singh vd. 2002). Bu sektörde, SD'ler, stabilizasyon, koku kontrolü ve sıvı bileşenlerin katı forma dönüştürülmesi, aroma bileşenlerinin korunması, yağların suda çözünürlük ve termal stabilitelerinin arttırılması, aktif maddelerin deriye alınımının arttırılması, uçuculuğun azaltılması amacı ile kullanılmaktadır (Citernesi ve Sciacchitano 1995, Szejtli 1997, Szejtli 2004). Bu amaçlarla, parfüm, güneş losyonları,

oda spreyleri, diş macunu, cilt kremleri, sıvı ve katı yumuşatıcılar, kağıt havlular, kağıt mendiller ve deodorantlarda da SD'ler kullanılmaktadır (Szejtli 1998, Singh vd. 2002).

Parfümler SD'ler ile enkapsüle edilerek uçucu bileşiklerin SD ile etkileşimi sonucu, uçuculuk önlenerek parfümlerin kalıcılığını sağlamaktadır (Hedges 1998, Bushmann ve Schollmeyer 2002). Güzel koku molekülü SD tarafından tutulmakta ve oluşan inklüzyon bileşiğin kalsiyum fosfat ile kompleks oluşturarak bazı banyo preparatlarının üretiminde kullanıldığı bildirilmiştir (Del Valle 2004).

SD'ler kozmetik ürünlerlerinde kullanılan çeşitli bileşiklerin ısı ve ışık gibi etkenlere karşı stabilizasyonu amacı ile de kullanılmaktadır (Citernesi ve Sciacchitano 1995, Hedges 1998). Örneğin, kozmetik ürünlerinde kullanılan ve antimikrobiyel bir madde olan çay çiçeği yağının bileşimindeki terpenler ısı ve ışığın etkisi ile cildi tahriş eden p-simene dönüşmektedir. SD'lerin yardımı ile çay çiçeği yağının ısı ve ışığa karşı stabilizasyonu arttırılmakta, ayrıca kompleks oluşumunun bu bileşiğin antimikrobiyal özelliklerini etkilemediği de belirtilmiştir. Cilt kremlerinde kullanılan hidrokinon ve kojik asit gibi bileşiklerin pH, ışık ve ısıya karşı stabilizasyonu sağlamak için çeşitli kozmetik üreticileri tarafından SD'ler kullanılmaktadır (Bushmann ve Schollmeyer 2002).

Bitkisel yağlar, hidrokarbonlar, yağ asitleri ve bunların esterleri, vitaminler, hormonlar gibi pek çok kozmetik bileşiği suda çözenmezler. Bu bileşiklerin çoğu SD'ler ile kompleks oluşturabilmekte, çözünürlükleri önemli oranda arttırılabilmektedir. Örneğin, yaşlanmayı geciktirici ürünlerin formülasyonunda kullanılan retinol SD'ler ile kompleks oluşturduğunda çözünürlüğü arttırılmakta ve ayrıca bu bileşiğin UV ışık ve oksijen karşı stabilizasyonu da sağlanabilmektedir (Bushmann ve Schollmeyer 2002).

Toz SD preparatları talk pudraları, çocuk bezleri ve kağıt havlular v.b ürünlerde koku kontrolü için ayrıca, saç bakım ürünlerinde kokulu merkaptanların uçuculuğunun azaltılmasında da kullanılmaktadır (Hedges 1998). Bazı silika-bazlı diş macunlarında kullanılan SD'lerin, macunda antimikrobiyal olarak kullanılan triklosanın etkisini 3 kat arttırdığı belirlenmiştir. SD'lerin güneş losyonlarında 1:1 oranında kullanıldığı

bildirilmiştir. Bu tip ürünlerde kullanılan SD'nin kavitesinin, cilt ile UV filtresi arasındaki etkileşimi sınırlandırdığı ve preparatın yan etkilerini de azalttığı belirtilmiştir (Del Valle 2004).

2.4.3 Gıda ve aromalar

SD'lerin gıda endüstrisinde pek çok uygulama alanı bulunmaktadır (Eastburn ve Tao, 1994, Gornas vd. 2009). SD'lerin kullanım oranlarının her yıl % 20-30 arasında arttığı ve bunların da % 80-90'ının gıda endüstrisinde kullanıldığı bildirilmiştir (Astray vd. 2009). Genellikle vitaminler, doymamış yağlar, aroma ve renk maddelerinin moleküler enkapsülasyonunda taşıyıcı olarak kullanılarak ürünün raf ömrünün uzatılmasını sağlamaktadırlar (Gornas vd. 2009, Astray vd. 2009). Doğal ve yapay aromaların çoğu uçucu yağlar ve sıvılardır. Bunların SD'ler ile kompleks oluşturulması sonucu, aroma bileşenlerinin korunması uygulanan geleneksel kapsülleme tekniklerine bir alternatif oluşturulmaktadır. (Del Valle 2004).

SD'ler, dondurma-çözme ve mikrodalga gibi sert uygulamalarda aroma bileşenlerinin korunmasında, moleküler kapsülleme görevi yaparak etkili olmaktadır. β-SD'ler moleküler bir kapsül gibi davranarak, diğer kapsüllere oranla, aroma kalitesi ve miktarının daha uzun süre korunmasını sağlamaktadır (Reineccius vd. 2004, Mourtzinos vd. 2008, Astray vd. 2009). Japonya'da 20 yılı aşkın süredir, taze gıdaların kokularının maskelenmesi ve balık yağlarının stabilizasyonu gibi uygulamalarda, SD'ler modifiye nişasta olarak kullanılmaktadır (Del Valle 2004).

Acı tat birçok gıda ürününün reddedilmesindeki en önemli nedenlerden biridir. SD'ler istenmeyen bileşiklerin uzaklaştırılmasında veya maskelenmesinde kullanılabilmektedir (Astray vd. 2009). Acı tat bileşiği ile kompleks oluşturarak bunların dilimizdeki tat alma cisimcikleri ile etkileşimini engellediği açıklanmıştır (Szejtli ve Szente 2004, Gornas vd. 2009). Aspartam yapımında SD'ler kullanılarak hem tadını iyileştirmekte hem de stabilizasyonu sağlamaktadır (Del Valle 2004, Astray vd. 2009). Stevioside ve rubusiside gibi tatlandırıcıların yapımında da SD'ler kullanılarak bunlardaki acılığın giderildiği bildirilmiştir (Singh vd. 2002, Del Valle 2004, Szejtli ve Szente 2005, Astray

vd. 2009). Ayrıca meyve suları, kahve ve alkollü içecek gibi ürünlerde acılığın azaltılması amacı ile de kullanılabilmektedir (Szente ve Szejtli 2004). Portakal ve greyfurt sularında narinjin ve limoninden ileri gelen acılık β-SD kullanılarak azaltılabilmektedir (Del Valle 2004, Szejtli ve Szente 2005).

SD'lerin gıda endüstrisinde en önemli uygulama alanlarından biri de yumurta, süt, dondurma, krema, peynir gibi hayvansal ürünlerden kolesterolün ayrılmasıdır (Szente ve Szejtli 2004, Kim vd. 2008, Ha vd. 2010). β-SD yardımı ile bu ürünlerde bulunan kolesterolün % 80-90'ının ayrılabildiği belirlenmiştir (Del Valle 2005, Ha vd. 2010).

Meyve ve sebze sularında enzimatik kararmaya neden olan fenolik bileşikler SD ile muamele edilerek ayrılabilmekte ve polifenol oksidaz SD ile kompleks oluşturarak ortamdan uzaklaştırılabilmektedir (Del Valle 2004).

SD'ler, bazı toz haldeki aroma bileşenleri ve kaplama maddelerinin kontrollü olarak salınımı için kullanılmakta, ayrıca bazı cikletlerde aromanın uzun süre korunması SD uygulaması ile mümkün olmaktadır (Del Valle 2004). Çizelge 2.4'de SD kullanılan bazı ticari gıda ürünleri verilmiştir. Birçok ülkede ve birçok gıdada çeşitli amaçlar için SD kullanılmaktadır.

Çizelge 2.4 Siklodekstrinlerin kullanıldığı bazı ticari gıda ürünleri (Szente ve Szejtli 2004)

Ticari İsmi	**Ürün türü**	**SD'nin rolü**
Nutual (Fransa)	Düşük kolesterollü peynir	Kolesterolü düşürmek
Cyroma-line (Macaristan)	Fırıncılık için aromalandırılmış şeker	Pişirmeyle aromayı korumak
Balade (Belçika)	Düşük kolesterollü tereyağı	Kolesterolü düşürmek
Simply eggs (ABD)	Düşük kolesterollü yumurta	Kolesterolü düşürmek
FlavorAktive Standart Kit (İngiltere)	Bira aroma standartları	Aroma standartlarını korumak
Flavono (Japonya)	Ciklet	Aromayı stabilize etmek
Choco Bar (Japonya)	Çikolata	Emülsüfikasyon
Poder Tea (Japonya)	İnstant yeşil çay	Renk stabilizasyonu
Gymet (Japonya)	Diyet lifli içecek	Tadın maskelenmesi
Stick Lemon (Japonya)	İnstant çay içeceği	Aromayı korumak

2.4.4 Diğer kullanım alanları

SD'ler herbisitler, insektisitler, fungusitler, böcek kovucular, feromonlar ve üreme düzenleyicileri gibi birçok kimyasal ile kompleks oluşturabilmekte ve bu nedenle tarımda tohumların çimlenmelerini geciktirmek amacıyla v.b pek çok alanda kullanılmaktadır. β- SD ile muamele edilen tohumlarda, nişastayı parçalayan bazı amilazların inhibe edildiği bildirilmiştir (Del Valle 2004).

Kimya endüstrisinde enantiyomerlerin birbirlerinden ayrılmasında, çeşitli reaksiyonları katalize etmekte ve atık maddelerin ayrılmasında veya detoksifiye edilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Del Valle 2004). Küçük hidrofobik moleküllerle inklüzyon kompleksleri oluşturabilme yetenekleri nedeni ile bazı izomerleri, fonksiyonel grupları ve enantiyomerleri ayırmada SD'ler kullanılmaktadır. Sıvı kromatografisi ile enantiyomerlerin ayrılmasında, kolonun durgun fazında immobilize SD

kullanılmaktadırlar. SD'ler ve/veya modifiye SD'lerin şiral bileşikleri ayırma işlemlerinde kullanımları da en önemli uygulama alanlarından biridir. Ayrıca, jel elektroforez, kapiler bölge elektroforezi, izotakoforez, kapiler gaz kromatografisi, elektrokinetik kromatografi, mikrodiyaliz, iyon değiştirici afinite kromatografisi ve ince tabaka kromatografisinde de kullanılmaktadırlar (Singh vd. 2002)

SD'ler çeşitli zararlı bileşiklerin detoksifikasyonu amacı ile de kullanılabilmektedir. Oldukça zehirli ve kristal yapıda bir insektisit olan Triklorfon'un üretimi sırasında kristal halde elde edilen triklorfon ortamdan ayrıldıktan sonra ortam sıvısı önemli miktarlarda kristalize olmayan toksik triklorfon içermektedir. Bunun dekompozisyonu alkali ortamda bir molekül HCl'in yapısından uzaklaştırılması ile gerçekleşir ve yine çok toksik ve uçucu bir bileşik olan Diklorovos oluşur. Bu işlem sırasında ortama β-SD ilave edildiğinde hemen kristal Diklorovos- β-SD kompleksi oluşur ve ortamdan kristal halde uzaklaştırılabilir. Böylece üretim sırasındaki atık suyun çevreye zararı azaltılmış olur ve Diklorovos- β-SD kompleksi de insektisit olarak kullanılmaktadır. Bir diğer detoksifikasyon amaçlı uygulama alanı ise sinir gazları olarak bilinen soman ve sarin gazlarının inaktivasyonudur. β-SD kullanılarak bu gazların önemli ölçüde detoksifiye edildiği belirlenmiştir. Bunun acil tıbbi yardımlarda ve kaza ile soman gazı salındığında çevrenin de detoksifiye edilmesinde kullanılabileceği belirtilmiştir (Szejtli 1997).

SD'ler, çevre uygulamalarında, organik kontaminantların çözünürlüğünün arttırılmasında, organik kirleticiler ve ağır metallerin toprak hava ve sudan uzaklaştırılmasında, atıksu arıtımında kontaminantların adsorbsiyon ve kapsüllenmesinde de kullanılmaktadır. Toksik maddeler atık sulardan SD'ler ile inklüzyon kompleksleri oluşturularak uzaklaştırılabilmekte, özellikle, fenol ve p-klorofenol gibi çevreye zararlı aromatik bileşikler, β-SD ile kompleks oluşturarak uzaklaştırılabilmektedirler (Del Valle 2004).

Son yıllarda tekstil endüstrisinde de SD uygulamaları yaygınlaşmaktadır. Tekstil ürünlerine tutuklanan boş SD'ler ile bunlara yeni fonksiyonlar kazandırılabilmektedir (Voncina vd. 2009). SD'ler kullanılarak üretilen çamaşır ve çoraplarda vücuttaki ter vb istenmeyen kokular maskelenebilmektedir. Perdelerde tutuklanan SD'ler sigara v.b

kokuların ortamdan uzaklaşmasını sağlamaktadır (Buschmann vd. 2001). Bu kumaşların yıkanması sırasında SD'lere hapsedilmiş olan istenmeyen kokular kaviteden uzaklaşmaktadır (Szejtli 2003). Ayrıca, kumaş boyamada boyanın kumaş tarafından alımını arttırmak ve atık sudaki boya miktarını azaltmak için kullanılmaktadır (Szejtli 1997, Hedges 1998).

Paketleme endüstrisinde, yağlı antimikrobiyel ve uçucu bileşikler içeren SD kompleksi su absorbe eden bir kağıt üzerine kaplanarak taze ürünlerin kaplanmasında kullanılmaktadır. SD ile etilen tetrasiklo-3-dodekan kopolimeri ile kaplanan ambalajda oda sıcaklığında bir hafta saklanan bir gıda maddesinde koku oluşumu gözlenmemiş ve antimikrobiyel kalitesinde de önemli değişiklik olmadığı gözlenmiştir (Singh vd. 2002).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1 Mikroorganizmalar

Bu çalışmada Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonunda bulunan ülkemizdeki çeşitli ekstrem bölgelerden alınan toprak ve su örneklerinden izole edilmiş 16 adet bakteri, bir *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW200 ve bir *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricum* (DSMZ 2247) ile çalışma sırasında Kızılcahamam (Ankara)'daki bazı kaplıcalar, Adana'da bulunan 2 nişasta fabrikası ve Romanya'daki bir termal alandan izole edilen 18 adet ekstrem termofil anaerobik bakterinin SGTaz aktiviteleri araştırılmıştır.

3.1.2 Besiyerleri

3.1.2.1 DSMZ 144 besiyeri

Mikroorganizmaların geliştirilmesinde DSMZ 144 besiyeri kullanılmıştır (www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/dsmz144, 2006). Aşağıda bileşimi verilen besiyerinin pH'sı sterilizasyon öncesi, 2N NaOH ile 7.2-7.4'e ayarlanmıştır. Hazırlanan besiyerinde kullanılan redoks indikatöründen (resazurin) ileri gelen mavi renk, pembe renge dönüşene kadar kaynatılmış, soğutulmuş ve 20 mL'lik Hungate tüplerine (Bellco Inc 2047-16000) 10 mL dağıtılarak tüpler N_2 atmosferi altında kapatıldıktan sonra 121 ^{o}C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

DSMZ 144 Besiyeri (g/L saf su)	
NH_4Cl	0.9
NaCl	0.9
$MgCl_2.H_2O$	0.4
KH_2PO_4	0.75
K_2HPO_4	1.5

$FeSO_4.7H_2O$ (1g/L)	1 mL
Resazurin (1mg/mL)	1 mL
$Na_2S.9H_2O$	1.0
Maya özütü (yeast extract)	3.0
Tripton	10.0
Glikoz	5.0
Vitamin çözeltisi	5 mL
Mineral çözeltisi	9 mL

Vitamin çözeltisi (g/L saf su)

Biyotin	2.0
Folik asit	1.0
Pridoksin-HCl	10.0
Tiyamin-HCl.$2H_2O$	5.0
Riboflavin	5.0
Nikotinik asit	5.0
D-kalsiyum pantotenat	5.0
Vitamin B_{12}	0.1
p-aminobenzoik asit	5.0
Lipoik asit	5.0

İz element çözeltisi bileşimi (g/L saf su)

$FeCl_2.7H_2O$	1.0
Nitriloasetik asit	1.5
$MgSO_4.7H_2O$	3.0
$MnSO_4.2H_2O$	0.5
NaCl	1.0
$CoSO_4.7H_2O$	0.18
$CaCl_2.2H_2O$	0.1
$ZnSO_4.7H_2O$	0.18
$CuSO_4.5H_2O$	0.01

$KAl(SO_4).12H_2O$	0.02
H_3BO_3	0.01
$NaMoO_4.2H_2O$	0.01
$NiCl_2.6H_2O$	0.025
$Na_2SeO_3.5H_2O$	0.3

İz element çözeltisi hazırlanırken nitriloasetik asit, belirli miktarda saf suda çözülmüş ve pH'sı 1 N KOH ile 6.5'e ayarlanmış, daha sonra diğer mineraller de eklenerek, pH'sı KOH ile 7.0'ye ayarlanmıştır. Vitamin ve iz element çözeltileri 45 μm membran filtre (Sartorius) kullanılarak sterile edilmiştir.

Mikroorganizma gelişmesi 600 nm'de (Shimadzu UV-1208 spektrofotometre) optik yoğunluk ve pH (EDT Instruments, GP 353) ölçümü yapılarak izlenmiştir.

3.1.2.2 Besiyeri 1 ve besiyeri 2

Bu besiyerleri SGTaz üretiminde kullanılmıştır. Uygun bakteri izolatı ile çalışmalara besiyeri 1 ile başlanmış, optimizasyon sonrası ise enzim üretimleri besiyeri 2 ile gerçekleştirilmiştir.

Besiyeri 1 (g/L saf su)

Çözünür patates nişastası	5
Maya özütü	5
Pepton	5
K_2HPO_4	1.5
$MgSO_4.7H_2O$	1
$Na_2S.9H_2O$	1
Resazurin (1mg/mL)	1 mL

Besiyeri 2 (g/L saf su)

Çözünür patates nişastası	30
Maya özütü	5
Kazein	5
K_2HPO_4	1.5
$MgSO_4.7H_2O$	1
$Na_2S.9H_2O$	1
Rezasurin (1mg/mL)	1 mL

Besiyerinin başlangıç pH'sı 2N NaOH veya 1N HCl kullanılarak 7.5-8.0'e ayarlanmıştır. Hazırlanan besiyerinde redoks indikatöründen (resazurin) ileri gelen mavi renk, pembe renge dönüşene kadar kaynatılmış, soğutulduktan sonra 20 mL'lik Hungate tüpleri, 100 mL ve 1000 mL'lik serum şişelerine sırası ile 10, 50 ve 750 mL olarak dağıtılmış ve N_2 atmosferi altında tüpler kapatıldıktan sonra 121 ^oC'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Ekstrem termofilik anaerobik bakterilerin izolasyonu ve tanımlanması

Çeşitli ekstrem kaynaklardan alınan toprak ve su örnekleri, içerisinde 10 mL DSMZ 144 besiyeri bulunan 20 mL'lik Hungate tüplerine alınmış ve anaerobik koşullarda 65 ^oC'de inkübe edilmişlerdir. Gelişme gözlenen tüpler anaerobik koşullarda (Labconco glovebox), içerisinde agarlı DSMZ 144 bulunan petrilere ekilmiş ve petriler anaerobik jar (Oxoid) içerisine alınarak 65 ^oC'de 2-4 gün inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda oluşan koloniler sıvı besiyerine alınmış ve anaerobik koşullarda ve 65 ^oC'de geliştirilmiştir. Saf koloni elde etmek amacı ile bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır. Gelişme olan tüpler haftada iki kez yeni besiyerine alınıp, aynı koşullarda inkübe edilerek canlı tutulmuştur. Bakterilerin uzun süreli saklanmaları % 50'lik gliserin içerisinde -80 ^oC'de gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.1 Mikroorganizmaların morfolojik ve çeşitli biyokimyasal özellikleri

Bakterilerin morfolojik özellikleri ışık (Nikon) ve faz kontrast mikroskop ile saptanmış, Gram özellikleri Hucker metodu ile belirlenmiştir (Doetsch 1981).

Mikroorganizmaların substratları kullanabilme yeteneğini belirlemek için DSMZ 144 besiyeri glikoz ilave edilmeden yukarıda açıklandığı şekilde hazırlanmış ve sterilizasyon sonrası 5 g/L olacak şekilde sakaroz, laktoz, rafinoz, ksiloz, melezitoz galaktoz, fruktoz, maltoz, seliboyoz, seluloz, melibiyoz, riboz, mannoz, dekstroz, arabinoz, seluloz, pektin, ksilan trehaloz ve nişasta eklenmiş ve mikroorganizmalar 65 ^{o}C'de 1-4 gün geliştirilmiştir. Bu substratlar ayrı olarak steril edilmiş ve inokulasyonun hemen öncesinde DSMZ 144 besiyerine aseptik koşullarda ilave edilmiştir. İnkubasyon sonunda mikroorganizma gelişmesi optik yoğunluk (600 nm) ve pH ölçümü ile belirlenmiştir.

H_2S oluşumu DSMZ 144 besiyerine $FeSO_4$.7H2O ilavesi ile belirlenmiştir. Gelişme ile birlikte sıvı besiyerinde siyah renk oluşumu gözlenerek H_2S varlığı belirlenmiştir (Kim vd. 2001).

Mikroorganizmaların NaCl dirençlerini belirlemek için, DSMZ 144 besiyerine % 0-6 konsantrasyonlarında NaCl ilave edilmiş 65 ^{o}C'de 1-4 gün geliştirilen mikroorganizmaların bu süre sonunda optik yoğunluk ve pH'ları ölçülmüştür.

Fermentasyon ürünleri Avci ve Dönmez (2006)'e göre hazırlanan besiyerinde yapılmıştır. Oluşan ürünler gaz kromatografisi ile belirlenmiştir (Shimadzu GC-14B). Kromatografi koşulları aşağıda verilmiştir:

Kolon sıcaklığı	:160 ^{o}C
Enjeksiyon sıcaklığı	: 220 ^{o}C
Dedektör sıcaklığı	: 250 ^{o}C
Taşıyıcı gaz	: Azot
Örnek miktarı	: 1 µL

3.2.1.2 Mikroorganizmaların moleküler tanımlanması

İzolatların tanımlanmasında moleküler yöntemler kullanılmış ve bu amaç için genomik DNA izolasyonu DNA izolasyon kitleri (Macherey Nagel) ile yapılmış, elde edilen DNA örnekleri -18 ºC'de saklanmıştır.

DNA örneklerinin saflık kontrolleri agaroz jel elektoforezi ile yapılmıştır. Bunun için 50 mL 1X TBE (tris-borik asit-EDTA) tamponu içerisindeki % 1 lik agaroz mikrodalga fırında çözülmüş ve yaklaşık 50 ^{o}C'ye soğutulduktan sonra içerisine 2µL etidyum bromid eklenerek 12 cm x 12 cm boyutlarındaki elektroforez tankına dökülerek taraklar yerleştirilerek ve soğumaya bırakılmıştır. Jel soğuduktan sonra, taraklar çıkartılmış ve içerisinde 1x TBE tamponu bulunan tanka yerleştirilmiş ve 5 µL örnek ile 5 µL örnek yükleme tamponu temiz bir parafilm üzerinde karıştırıldıktan sonra jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir. Elektroforez işlemi, 80 voltta 30 dakika süreyle yapılmış, marker boyanın jel sistemini terk etmesinden sonra elektrik akımı kesilmiş ve ortamdan alınan jeller UV ışık altında incelenmiştir (Temizkan ve Arda 2004).

16S rDNA bölgesinin PCR (Biometre thermocycler) ile çoğaltılmasında Bact8F (forward) 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' ve 1520R (reverse) 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' primerleri (Fermentas) kullanılmıştır (Xue vd. 2001). PCR karışımı aşağıdaki bileşenler kullanılarak hazırlanmıştır.

PCR karışımı oranları (µL)

Genomik DNA	5
Forward primer	4 (100 pmol/µL)
Reverse primer	4 (100 pmol/µL)
dNTP karışımı (Fermentas)	5 (10 µM)
$MgCl_2$ (Fermentas)	1.5 (25 mM)
Taq DNA polimeraz	0.5 (5 U/µL)
Deiyonize su	30
Toplam hacim	50

PCR koşulları, 94 ^{o}C'de 1 dakika (denatürasyon), 55 ^{o}C'de 1dakika (primerlerin bağlanması- annealing), 72 ^{o}C'de 1 dakika (uzama- extention) olacak şekilde toplam 30 döngü; final uzama (final extention) ise 72 ^{o}C'de 5 dakika olarak yapılmıştır.

PCR'da çoğaltılan 16S rDNA'ların saflıkları, % 1 agaroz içeren agaroz jel elektoforezi ile kontrol edilmiştir. DNA dizi analizleri A.Ü. Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı tarafından yapılmıştır.

Dizi analizi yapılan DNA'lar, GenBank veritabanındaki (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLASTN, 2008) tüm baz dizilimleri ile karşılaştırılmıştır. *Thermoanaerobacter* sp.P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarına yakın benzerlik gösteren mikroorganizmaların dizileri referans olarak alınarak CLUSTAL W 1.8 (çoklu dizi hizalama yöntemi) programı ile birbirleri ile hizalanmışlardır. Genetik çeşitlilik ve genetik uzaklık verileri kullanılarak türler arasındaki genetik çeşitlilik ve farklılaşmanın derecesi belirlenmiştir (Tamura vd. 2004). Dizideki bütün boşluklar ve eksik veriler elimine edilmiştir (complete deletion options) ve son dizi verisinde 800 adet baz bulunmaktadır. Filogenetik analizler MEGA4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis software version 4.0) paket programı kullanılarak yapılmıştır (Tamura vd. 2007).

Filogenetik dendogram oluşturulurken referans olarak seçilen bakteriler ve geçiş (accession) kodları: *Thermoanaerobacter kivui* DSM 2030, L09160; *Thermoanaerobacter ethanolicus* ATCC 31550, L09162; *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* DSM 567, L09161; *Thermoanaerobacter wiegelii*, X92513; *Thermoanaerobacter siderophilus*, AF120479; *Thermoanaerobacter italicus* DSM 9252, AJ250846; *Thermoanaerobacter finnii* DSM 3389, L09166; *Thermoanaerobacter brockii* DSM 1457, L09165; *Thermoanaerobacter thermocopriae* IAM 13577, L09167; *Thermoanaerobacter mathranii*, Y11279; *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* ATCC 33743 l09171(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLASTN, 2008).

3.2.2 Enzim üretimi ve üretimin optimizasyonu

Enzim üretimini çalışmalarına besiyeri 1 ile başlanmış ve optimizasyon çalışmaları sonunda en yüksek enzim aktivitesinin elde edildiği besiyeri 2 ile sürdürülmüştür.

3.2.2.1 Optimum pH ve sıcaklığın belirlenmesi

Mikroorganizmaların, optimum enzim üretim pH'sını belirlemek için, besiyerinin başlangıç pH'sı 2 NaOH veya 1 N HCl ile 4.0-10.0 arasında çeşitli pH'lara ayarlanmış ve 50 mL besiyeri içeren serum şişeleri anaerobik koşullarda besiyeri ilave edildikten sonra kapatılmış, 121 ^{o}C'de 15 dakika steril edilmiştir. Şişeler 24 saatlik kültür ile % 5 oranında inoküle edilerek 65 ^{o}C'de 72 saat inkübe edilmişlerdir. Şişelerden belli aralıklarla alınan örneklerde optik yoğunluk, pH ve enzim aktivitesi ölçülmüştür.

Optimum sıcaklığın belirlenmesi için, yukarıda açıklanan anaerobik koşullarda, başlangıç pH'sı 7.5-8.0 olacak şekilde ayarlanan besiyerlerine % 5 oranında bakteri inokulasyonu yapılmış; izolatlar, 60-80 ^{o}C sıcaklıklarda geliştirilmiş ve optik yoğunluk ve enzim aktiviteleri ölçülmüştür.

3.2.2.2 Optimum substrat konsantrasyonunun belirlenmesi

Üretimde besiyerinde substrat olarak kullanılan çözünür patates nişastasının konsantrasyonu 5-40 g/L olacak şekilde, başlangıç pH'sı 7.5-8.0 olan besiyerleri hazırlanmış ve % 5 oranında *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşları ile aşılanıp 65 ^{o}C'de 48 saat geliştirilmiş ve farklı sürelerde alınan örneklerde optik yoğunluk ve enzim aktiviteleri belirlenmiştir.

3.2.2.3 Çeşitli karbon kaynaklarının enzim üretimine etkisinin belirlenmesi

Çeşitli karbon kaynaklarının enzim üretimine etkisini belirlemek için, besiyeri 2'ye son konsantrasyonu 10 g/L olacak şekilde çözünür patates nişastası, mısır nişastası, Paselli SA2, maltoz, maltodekstrin, glikoz ve fruktoz ilave edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan

besiyerleri % 5 oranında bakteriler ile aşılanmış ve 65 ^{o}C'de 48 saat geliştirilerek, belli aralıklarla alınan örneklerde mikroorganizmaların gelişmeleri (optik yoğunluk, pH) ve enzim aktiviteleri belirlenmiştir.

3.2.2.4 Çeşitli azot kaynaklarının enzim üretimine etkisinin belirlenmesi

Besiyeri 2'ye son konsantrasyonu 5 g/L olacak şekilde maya özütü, kazein, pepton ve amonyum sülfat ilave edilerek mikroorganizma çoğalması ve enzim üretimine etkisi belirlenmiştir. Optimum kazein konsantrasyonunu belirlemek için besiyerine farklı oranlarda ilave edilen kazein ile enzim aktiviteleri belirlenmiştir.

3.2.2.5 Enzim aktivitesinin belirlenmesi

SGTaz aktivitelerini belirlemek için çeşitli besiyerlerinde geliştirilen kültürlerden alınan örnekler 10000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendikten sonra elde edilen süpernatantta enzim aktiviteleri araştırılmıştır.

3.2.2.5.1 β-SGTaz aktivitesi (fenol fitalein yöntemi)

β-SD, fenol fitalein ile inklüzyon kompleksi oluşturarak yüksek pH'larda fenol fitaleinden gelen pembe rengi indirgemektedir. Renkte oluşan bu açılma spektrofotometrik olarak ölçülerek buna göre enzim aktivitesi belirlenmiştir (EK 1).

SGTaz enzim aktivitesinin ölçümü için, 0.1-0.5 mL enzim çözeltisi, % 2'lik jelatinize edilmiş çözünür nişasta çözeltisine (50 mM pH 6.0 sodyum asetat tamponu içerisinde) 0.1- 0.5 mL enzim çözeltisi ilave edilerek ve 80 ^{o}C'de 10 dak. inkübe edilmiştir. Süre sonunda, ortama 3.5 mL 30 mM NaOH ilave edilerek reaksiyon durdurulmuş, daha sonra 0.5 mL fenol fitalein çözeltisi [5 mM Na_2CO_3 içinde % 0.02 (ağ/h) fenol fitalein] eklenmiş ve oda sıcaklığında 15 dak. bekletilmiştir. Süre sonunda 550 nm'de absorbans ölçülmüş ve 1 ünite (U) enzim aktivitesi, 1 dakikada 1 μmol β-SD üreten enzimin miktarı olarak belirlenmiştir (Shim vd. 2004).

Enzim aktivitesinin hesaplanması için standart eğrilerin hazırlanmasında 0- 0.1 µmol arasında değişen β-SD (Sigma) çözeltileri kullanılmıştır (EK 2). Hazırlanan standart eğrilerden SD miktarı hesaplanmış ve renkteki % 5'lik bir azalmanın 0.01 enzim ünitesine eşit olduğu saptanmıştır (Shim vd. 2004).

Bu çalışmada yapılan SGTaz aktivitelerinin hepsi (başka bir şekilde ifade edilmediği takdirde) β-SGTaz aktivitesini ifade etmektedir.

3.2.2.5.2 α-SGTaz aktivitesinin belirlenmesi (metil oranj yöntemi)

pH 5.5, 50 mM sodyum asetat tamponu içinde çözündürülmüş % 5'lik çözünür nişasta çözeltisinden 600 µL, pH 5.5, 50 mM sodyum asetat tamponu içinde çözündürülmüş 1 mM metil oranj çözeltisinden 105 µL alınıp, bunun üzerine 1795 µL pH 5.5 50 mM sodyum asetat tamponu ve 500 µL enzim çözeltisi eklenerek hazırlanan reaksiyon karışımı (toplam 3 mL) 80 ^{o}C'de 5 dak. inkübe edilmiştir. Süre sonunda, ortama 150 µL 6N HCl (16 ^{o}C) ilave edilerek reaksiyon durdurulmuş ve çözeltinin absorbansı 505 nm'de ölçülmüştür (Yamamoto vd. 1999). Enzim aktivitesinin hesaplanması için, standart eğrilerin hazırlanmasında reaksiyon koşullarına göre substrat olarak ortama konsantrasyonu 0- 0.5 µmol arasında değişen α-SD (Sigma) ilave edilmiştir. Renkteki azalmaya göre SD miktarı hesaplanmış ve absorbanstaki % 1.80'lik bir azalmanın 0.1 enzim ünitesine eşit olduğu belirlenmiştir (EK 3).

1 ünite enzim aktivitesi (1U): 1 dakikada 1µmol α-SD oluşturan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Yamamoto vd. 1999).

3.2.3 Enzimin saflaştırılması

Besiyeri 2 içerisinde hazırlanan ve 65 ^{o}C'de geliştirilen *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının 30 ve 24 saatlik kültürleri 4 ^{o}C'de 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatant ham enzim sıvısı olarak, saflaştırma işlemlerinde kullanılmıştır. Süpernatantta bulunan tüm proteinler amonyum

sülfat ile çöktürülüp diyaliz edildikten sonra afinite kromatografisi yardımı ile enzim saflaştırılmıştır.

3.2.3.1 Amonyum sülfat ile çöktürme

Santrifüjleme ile elde edilen süpernatanttaki proteinlerin amonyum sülfatla çöktürülmesi için katı amonyum sülfat (Merck) kullanılmıştır. Mikroorganizmalardan ayrılmış berrak süpernatanta 4 ^{o}C'de, manyetik karıştırıcı ile, sürekli olarak karıştırılarak ve yavaş yavaş katı amonyum sülfat ilave edilerek, proteinlerin çökmesi sağlanmış ve bu işlem 6-8 saat içerisinde tamamlanmıştır (EK 4). Kullanılan amonyum sülfat oranını belirlemek üzere % 20-70 arasında değişen faklı konsantrasyonlarda amonyum sülfat ile çalışmalar yapılmıştır. Çöktürme işleminden sonra, amonyum sülfatlı süpernatant 1 gece 4 ^{o}C'de bekletilmiş ve daha sonra 4 ^{o}C'de, 15000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenerek oluşan peletler pH 5.5, 10 mM sodyum asetat tamponu ile çözündürülmüş ve ortamdaki amonyum sülfatın uzaklaştırmak için pH 5.5 10 mM sodyum asetat tamponuna karşı diyaliz edilmiştir (EK 5).

3.2.3.2 Diyaliz

Diyaliz işleminde 10000 MWCO (Sigma) diyaliz tüpleri kullanılmıştır.

Diyaliz tüplerinin hazırlanması: Uygun boyutlarda kesilen diyaliz tüpleri % 2 $NaHCO_3$ ve % 0.05 EDTA içeren çözeltide 10 dakika kaynatılmış, bu süre sonunda tüpler tekrar destile su içine alınarak 10 dakika kaynatılmış ve bu işlem iki kez tekrarlanmıştır. Diyaliz tüpleri, soğutulduktan sonra, kullanılana kadar kontaminasyonun önlenmesi için % 20'lik etil alkol içinde, 4 ^{o}C'de saklanmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

Diyaliz işlemi: pH 5.5, 0.01 M asetat tamponu içinde çözündürülen protein örnekleri, diyaliz tüpüne alınıp tüpün iki ucu iyice bağlanmış ve pH 5.5, 0.01 M sodyum asetat tamponuna karşı 4 ^{o}C'de 48 saat diyaliz edilmiş ve tampon çözelti günde iki kez yenilenmiştir (EK 6).

3.2.3.3 Afinite kromatografisi ile enzimin saflaştırılması

3.2.3.3.1 Kolonun hazırlanışı

Afinite kromatografisi ile, enzim proteininin saflaştırılmasında, kolon dolgu materyali olarak, 10 g dondurularak kurutulmuş epoksi aktif Sepharose 6B kullanılmıştır. Dolgu materyali, sinterlenmiş cam filtre de 1000 mL destile su ile yıkanmış ve daha sonra, 40 mL birleştirme (coupling) çözeltisine (700 mg α-SD içeren 0.1 M NaOH) aktarılmış ve 45 ^{o}C'de 16 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, tekrar destile su ile 1 saat yıkanmış ve 1M etanolamin (pH 8.0) çözeltisine aktarılıp, burada 50 ^{o}C'de 24 saat inkübe edilerek reaksiyona girmeyen epoksi gruplarının bloke edilmesi sağlanmıştır. Daha sonra, 0.5 M NaCl içeren pH 4.0, 0.1M asetat tamponu ile ve hemen arkasından 0.5 M NaCl içeren pH 8.0, 0.1 M Tris-HCl tamponu ile yıkanmıştır. Bu işlem üç kez tekrarlanmış ve bu işlemler sonunda oluşan jel 15 mm x 200 mm boyutundaki cam kolona (Pharmacia) doldurularak pH 5.5, 0.01 M asetat tamponu ile dengelenmiştir (Sian vd. 2005).

3.2.3.3.2 Afinite kromatografisi

Diyaliz işleminden sonra elde edilen, protein çözeltisi bir peristaltik pompa (Heidolph pumpdrive 5001) yardımı ile kolona verilmiştir (EK 7). Proteinler kolona verildikten sonra kolon, pH 5.5, 0.01 M sodyum asetat tamponu ile 36 mL/h akış hızında 4-6 saat yıkanarak SGTaz dışındaki proteinlerin kolondan ayrılması sağlanmıştır. Yıkama işlemi sonrasında kolonda tutulan enzimin elüsyonu % 1 α-SD içeren aynı tamponla gerçekleştirilmiştir. Bir fraksiyon toplayıcı (Spectra/Chrom CF-1 Fraction Collector) yardımı ile 3 mL'lik fraksiyonlar halinde toplanmış ve her fraksiyonda enzim aktivitesi ve protein miktarları ölçülmüştür. Bütün saflaştırma işlemleri 4 ^{o}C'de gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.4 Protein tayini

Protein saflaştırma işlemlerinin bütün aşamalarında, örneklerdeki protein miktarları Lowry'ye göre yapılmıştır (Lowry vd. 1951).

Kullanılan çözeltiler

Lowry A: % 2 Na_2CO_3 ve 0.1 M NaOH
Lowry B: % 1 $CuSO_4$
Lowry C: % 2 sodyum potasyum tartarat ($NaKC_4H_4O_6.\ 4H_2O$)

Lowry stok çözeltisi: 49 mL Lowry A, 0.5 mL Lowry B, 0.5 mL Lowry C'den oluşmaktadır.

Folin Ciocalteu çözeltisi: 2N Folin – Ciocalteau (Sigma) reaktantı kullanılmadan hemen önce destile su ile 1:1 oranında seyreltilmiştir.

Tüplerdeki 1 mL Lowry stok çözeltisine 100 µL örnek eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiş ve bu süre sonunda 100 µL Folin rektantı ilave edilerek tekrar oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra 595 nm ışıkta absorbans ölçülmüştür. Protein standart eğrisinin hazırlanmasında 0.01- 0.1 mg/mL ve 0.001-0.01 mg/mL arasında BSA (Bovine Serum Albumin) içeren iki standart eğri hazırlanmış ve protein miktarı bu eğriler ile mg/mL protein olarak hesaplanmıştır (EK 8).

3.2.4 Saflaştırılan enzimin özelliklerinin belirlenmesi

3.2.4.1 SDS PAGE ile enzim molekül ağırlığının saptanması

Enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile Laemmli (1970) tarafından önerilen yönteme göre yapılmıştır.

SGTaz'ların molekül ağırlıkları KODAK Molecular Imaging Software V.4.5.1 kullanılarak hesaplanmıştır.

Örneklerin hazırlanması

Saflaştırılmış enzim örnekleri ultrafiltrasyon tüplerinde (Vivaspin-20 30000 MWCO PES) 6000 rpm'de 10 dak. santrfüjlenerek yoğunlaştırılmıştır. Elde edilen yoğunlaştırılmış protein örneğinden 30 µL alınıp üzerine10 µL örnek uygulama tamponu eklenmiş ve su banyosunda 5 dakika kaynatılarak bir mikropipet ile SDS-PAGE jeline 20 µL yüklenmiştir.

SDS-PAGE yönteminde kullanılan çözeltiler

Örnek uygulama tamponu

2-β-merkaptoetanol	0.8 mL
% 0.05 bromfenol mavisi	0.4 mL
0.5 M Tris HCl, pH 6.8	1 mL
% SDS	1.6 mL
Gliserol	0.8 mL
Su	3.8 mL

Monomer (akrilamid/bis) çözeltisi

Akrilamid	29.2 g
Bis	0.8 g

Destile su ile 100 mL'ye tamamlanır

SDS (% 10)

SDS	10 g
Destile su	100 mL

Ayırma jeli tamponu (1.5 M Tris HCl, pH 8.8)

Tris	18.15 g
Destile su	100 mL

3N HCl ile pH 8.8'e ayarlanır

Yükleme jeli tamponu (0.5 M Tris HCl, pH 6.8)

Tris	3 g
Destile su	50 mL

5N HCl ile pH 6.8'e ayarlanır

% 10 amonyum persülfat (polimerizasyon başlatıcı)

Amonyum persülfat	0.5 g
Destile su	5 mL

5x tank tamponu

Tris	15 g
Glisin	72 g
SDS	5 g

Destile su 1 L'ye tamamlanır

İşlem: Dikey elektroforez sisteminde 10x10cm boyutunda 2 adet elektroforez kaseti kullanılmıştır. % 70'lik etanol ile yıkanıp kurutulan jel kasetleri küvete yerleştirildikten sonra % 10'luk ayırma jeli kasete üstten 2 cm boşluk kalacak şekilde hava kabarcığı oluşmayacak şekilde doldulmuştur. Jelin yüzeyini düzgünleştirmek için üst boşluğa % 70'lik etanol doldurulmuştur. Jelin polimerizasyonu için yaklaşık 1 saat beklendikten sonra üst boşluktaki etanol dökülmüş ve yerine % 7.5'lik yükleme jeli eklenerek taraklar yerleştirilmiş ve yaklaşık 30 dakika beklenerek polimerizasyonun gerçekleşmesi sağlanmıştır. Daha sonra taraklar kuyucukların bozulmamasına dikkat edilerek yavaşça çıkarılmış ve cepler saf su ile yıkanmıştır.

Küvetin üst kısmına 4:1 oranında destile su ile sulandırılmış tank tamponu doldurulmuş ve cepler de bu tamponla yıkandıktan sonra yukarıda açıklandığı gibi hazırlanan örnekler ve standart protein karışımı (Fermantas) ceplere yüklenmiştir. Örnek miktarı 20 µL olacak şekilde ayarlanmıştır.

Sistem güç kaynağına bağlanmış ve gerilimi 70 volt olacak şekilde ayarlanmıştır. Proteinlerin jeldeki hareketini izlemeyi sağlayan boyaya ait bant yükleme jelinden çıkıp

ayırma jeline girdiğinde gerilim 100 volt yapılmış ve işlem sonuna kadar bu değerde devam edilmiştir. Mavi bant jelin alttan 0.5 cm kalana kadar yürüdükten sonra (yaklaşık 3 saat) işlem durdurulmuştur.

3.2.4.2 Enzimin optimum pH ve sıcaklığının belirlenmesi

Enzimin optimum pH ve sıcaklığı Sian vd. (2005)'nde açıklandığı gibi belirlenmiştir. Bu amaçla 50 mM sodyum asetat (pH 4.0-6.0), 100 mM tris HCl (pH 7.0-8.0) ve 100 mM glisin-NaOH (pH 9.0-10.0) tamponları kullanılarak SGTaz aktivitesi daha önce açıklandığı şekilde 80 ^{o}C'de ölçülmüş ve bağıl aktiviteler hesaplanmıştır. *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K izolatlarının süpernatant ve saflaştırılan enzim örneklerinde optimum pH belirlenmiş, bu amaçla yapılan uygulamada süpernatanttan 200 µL, saf enzimden ise 100 µL örnek kullanılmıştır.

Enzimin optimum çalışma sıcaklığı 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 ve 95 ^{o}C'lerde aktivite ölçümü ile belirlenmiştir.

3.2.4.3 Enzimin pH ve termal stabilitesinin belirlenmesi

Enzimin pH stabilitesi Rahman vd. (2006)'e göre süre ve sıcaklık değiştirilerek yapılmıştır. Bunun için, enzim örnekleri pH 4.0-11.0 aralığındaki substrat içermeyen ve yukarıda belirtilen tamponlarda 80 ^{o}C'de 1 saat bekletilmiş ve bu süre sonunda aktivitesi ölçülerek, enzim aktivitesinde başlangıç enzim aktivitesine göre oluşan değişim hesaplanmış ve sonuçlar bağıl aktivite olarak hesaplanmıştır.

Enzimlerin termostabiliteleri Wind vd. (1995)'e göre aşağıdaki koşullarda yapılmıştır: Enzim çözeltisi, substrat içermeyen 50 mM sodyum asetat tampon (pH 6.0) içinde 80-100 ^{o}C aralığındaki sıcaklıklardaki yağ banyosunda 4 saat bekletilmiş ve her saat alınan örneklerde enzim aktivitesi ölçülerek, başlangıçtaki enzim aktivitesine göre enzim aktivitesindeki değişme oranı hesaplanmıştır.

3.2.4.4 Çeşitli metallerin enzim aktivitesine etkisi

Cao vd. (2005)'nde açıklandığı şekilde aşağıdaki koşullarda yapılmıştır: Enzim çözeltilerine son konsantrasyonu 1 ve 10 mM olacak şekilde $AlCl_3.6H_2O$ $AgNO_3$, $CoCl_3$, $CuSO_4.5H_2O$, $MgSO_4.7H_2O$, $MnCl.4H_2O$, $FeCl_2.4H_2O$, $BaCl_2.2H_2O$, KCl, $ZnSO_4.7H_2O$, $HgSO_4$, $CaCl_2$ 50 mM sodyum asetat (pH 6.0) tamponuna eklenmiş ve 25 ^oC'de 1 saat bekletildikten sonra SGTaz aktivitesi ölçülmüştür. Bu çalışmada, metal içermeyen enzim çözeltisi kontrol olarak kullanılmış ve buna göre, bağıl aktiviteler hesaplanmıştır.

3.2.4.5 Enzimin hidroliz aktivitesi

SGTaz'ın hidroliz aktivitesi, DNS (Dinitro salisilik asit) metodu kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla, % 0.3 oranında çözünür patates nişastası içeren 800 µL, 50 mM pH 6.0 sodyum asetat tampon çözeltisine 200 µL enzim çözeltisi ilave edilerek 80 ^oC'de 20 dakika inbübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda enzimin etkisi ile oluşan indirgen şeker miktarı DNS yöntemi ile belirlenmiştir (Martins ve Hatti-Kaul 2003).

DNS yöntemi ile şeker tayini (Forouchi ve Gunn 1983)

Kullanılan çözeltiler

DNS (dinitro salisilik asit): 10 g NaOH, 10 g DNS (Sigma D-1510) destile suda çözündürülüp litreye tamamlanmıştır. Bu çözeltinin 100 mL'sine kullanılmadan önce 1 mL % 10'luk sodyum sülfit ilave edilmiştir.

Rachelle tuz çözeltisi: 400 g sodyum potasyum tartarat (Merck) 1 L destile suda çözündürülmüştür.

İşlem: Bir tüp içinde bulunan ve yeterli oranda seyreltilmiş 1 mL örnek üzerine 2 mL DNS ilave edilerek 90 ^oC'deki su banyosunda 15 dakika bekletildikten sonra 1 mL Rachelle tuzu çözeltisi ilave edilip karıştırılmıştır. Tüpler oda sıcaklığına soğutulduktan

sonra 5 mL demineralize su ilave edilip karıştırılmış ve spektrofotometrede (Shimadzu UV-1208) 575 nm'de absorbans değeri, tanığa karşı okunmuştur.
Değerlendirme: 0.1 g/100mL glikoz çözeltisi hazırlanıp bundan 0.1-1 mL örnekler alınarak DNS ile absorbans değerlerine göre standart eğri çizilmiş ve hesaplamalarda bu eğri kullanılmıştır (EK 9).

1 ünite enzim aktivitesi (1U): 1 dakikada 1 µmol indirgen şeker (glikoz) oluşturan enzim miktarı olarak hesaplanmıştır.

3.2.4.6 SGTaz'ın birleştirme (Coupling) aktivitesinin belirlenmesi

Saflaştırılan SGTaz'ın birleştirme (coupling) aktivitesini belirlemek amacıyla α ve β-SD'ler (Sigma) donör, methyl-α-D-glucopyranoside (Sigma) ise akseptör molekül olarak kullanılmıştır. Sitrik asit tamponunda (10 mM, pH 6.0) α ve β-SD'lerin 25 mM, methyl-α-D- glucopyranoside'in ise 100 mM konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlanmıştır. Bir tüpe 0.5 mL SD 0.5 mL methyl-α-D- glucopyranoside ve 1 mL enzim çözeltisi alınarak 80 ^{o}C'de 10 dak. inkübe edilmiş ve sürenin sonunda 100 µL örnek alınmıştır. Örneklere reaksiyonu durdurmak amac ile buz banyosu içerisinde 20 µL 1.2 M HCl ilave edilmiş ve ortamı nötralize etmek için de 20 µL 1.2 M NaOH ilave edilmiştir. Daha sonra 167 mM pH 4.5 sodyum asetat tamponu içinde seyreltilmiş olan 60 µL (1U) amiloglikozidaz (Amyloglucosidase from *Aspergillus niger*, Sigma) enzimi ilave edilerek 37 ^{o}C'de 30 dakika bekletilmiştir. Ortamdaki serbest glikoz miktarı DNS yöntemi ile belirlenmiştir (Alcalde vd. 1999, Martins ve Hatti-Kaul 2003).

1 ünite enzim aktivitesi: 1 dakikada 1 µmol SD'i indirgen şekere dönüştüren enzim miktarı olarak hesaplanmıştır.

3.2.5 Siklodektrinlerin üretimi

Saflaştırılan SGTaz enzimi ultrafiltrasyon tüpleri (Sartorius Vivaspin 20 30000 MWCO PES) yardımı ile 6000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek konsantrasyonu arttırıldıktan sonra SD'lerin üretilmesi çalışmasında kullanılmıştır. Substrat olarak çözünür nişastası

kullanılmış, substrat konsantrasyonu ve enzim konsantrasyonunun optimizasyonu çalışmalarının dışında substrat konsantrasyonu 40 g/L, enzim miktarı ise her gram substrat için 1 U olacak şekilde ayarlanmıştır. İçerisinde çözünür patates nişastası bulunan sodyum sitrat tamponuna (10mM, pH 6.0) SGTaz ilave edilerek çalkalamalı su banyosunda belirli süre ve sıcaklıklarda SD üretimi gerçekleştirilmiştir. Belirli aralıklarda alınan 0.5 mL örnekler, 10000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve yüzeydeki sıvı bir şırınga ile 0.45 µm PVDF membran filtreden (Millex-HV) geçirilerek HPLC'de analizi yapılmıştır.

SD üretiminin optimizasyonu için yapılan diğer çalışmalarda ise 65, 70, 80, 85, 90 ve 95 ^{o}C sıcaklıklarda % 4'lük nişastaya gram substat için 1U enzim ilave edilmiş ve 6 saat sonunda örnekler alınarak oluşan SD'lerin konsantrasyonu ve oranları belirlenmişir.

Çeşitli substratlardan SD üretim oranını belirlemek için Paselli SA2, mısır nişastası, maltodekstrin, maltozun da sitrik asit tamponu içindeki % 4 lük çözeltilerine gram substrat başına 1 U enzim ilave edilip 80 ^{o}C çalkalamalı su banyosunda inkübe edilmiş ve 6 saat sonunda örnek alınmıştır.

Enzim konsantrasyonunun SD üretimine etkisini belirlemek için gram substrat başına 0.5, 1, 2, 3 ve 4 U enzim eklenerek SD üretimi yapılmıştır.

3.2.5.1 Oluşan siklodekstrinlerin belirlenmesi

Enzimin etkisi ile oluşan SD'lerin miktarının belirlenmesinde yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) (Shimadzu) cihazı kullanılmıştır. Kullanılan HPLC sistemi; binary (ikili) pompa, refraktif indeks dedektörü (RID-10A), termostatlı kolon fırını (CTO-10AS), Degazör (DGU-14A) ve sistem kontrol ünitesinden (SCL-10A) oluşmaktadır. Elde edilen kromatogramlar ClassVP5 yazılım programı ile değerlendirilmiştir. Örnekler, 10000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendikten 0.45µm PVDF membran ile filtre edildikten sonra kolona 20µL örnek enjeksiyon yapılmıştır. HPLC koşulları aşağıda verilmiştir:

Kolon: Macherey Nagel-Nucleogel SUGAR Na (300x7.8mm)

Refraktif indeks dedektörü: RID-10A

Hareketli faz (Mobil faz) : su (Merck)

Akış hızı: 0.3 mL/dakika

Kolon sıcaklığı: 80 ^{o}C

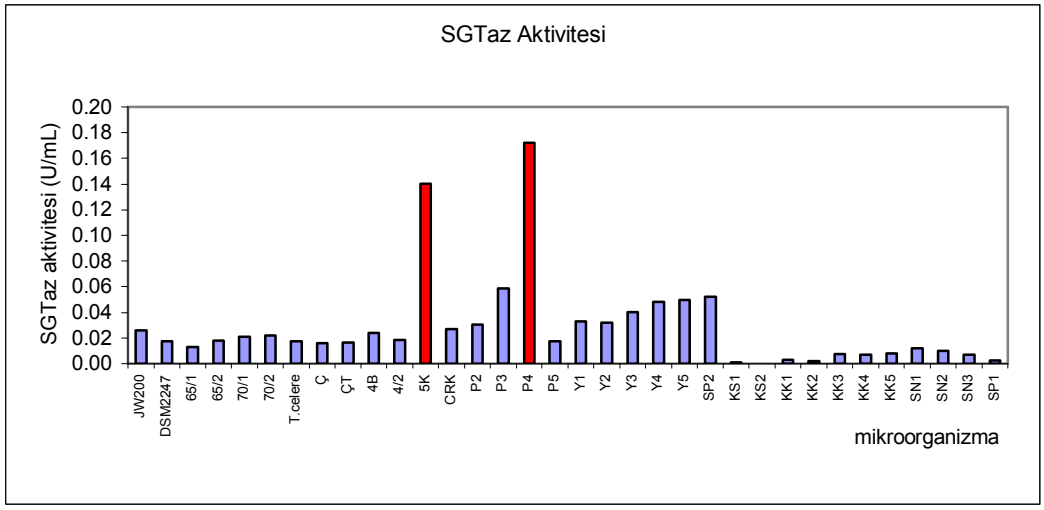
Enjeksiyon miktarı 20 μL

Kromatogramlarda elde edilen SD pikleri geliş süresi (retention time) ve RID dedektöründe elde edilen UV spektrumların karşılaştırılmasıyla tanımlanmıştır. Örneklerdeki SD miktarları α-, β- ve γ-SD'lerin standart maddelerinin her biri için oluşturulan standart eğrilerden hesaplanmıştır (EK 10-11).

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 İzolatların SGTaz Aktivitelerinin Belirlenmesi

Toplam 34 adet termofilik anaerobik bakteri izolatının SGTaz aktivitesi ölçülmüş ve bir petrol kuyusundan (Raman, Adıyaman) izole edilmiş olan *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K izolatlarında diğerlerine göre önemli oranda yüksek aktivite olduğu saptanmıştır (Şekil 4.1). Tüm izolatların aktiviteleri farklı zamanlarda ve farklı besiyerlerinde 4 farklı koşulda ölçülmüş ve her koşulda benzer sonuçlar elde edilmiştir. Buna göre, SGTaz üretim çalışmalarında *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşları kullanılmıştır. SGTaz aktivitesi ölçümünde ve değerlendirmesinde, β-SGTaz aktivitesi referans olarak alınmıştır.



Şekil 4.1 Ülkemizin çeşitli ekstrem bölgelerinden izole edilen termofilik anaerobik bakteri izolatlarının SGTaz aktiviteleri

4.2 İzolatların Morfolojik, Biyokimyasal ve Genetik Özellikleri

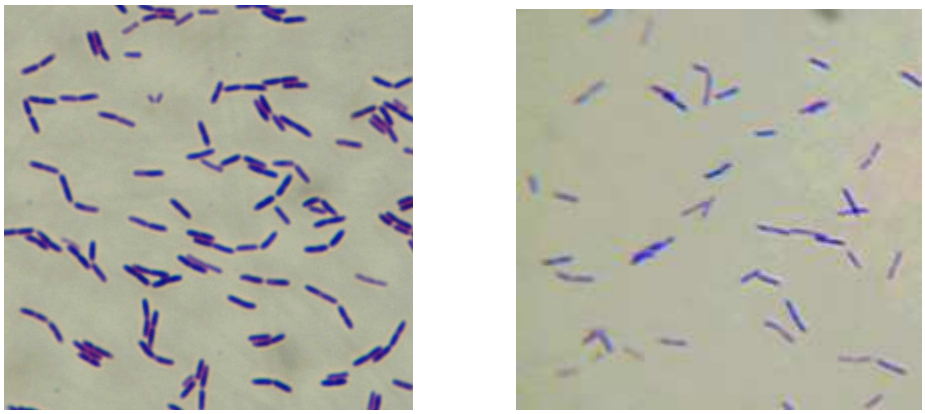
Yüksek SGTaz aktivitesi gösteren *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K izolatlarının bazı morfolojik biyokimyasal ve genetik özellikleri belirlenerek kısmen karakterizasyonları yapılmıştır.

4.2.1 Morfolojik ve biyokimyasal özellikleri

Thermoanaerobacter sp. P4 suşunun gram pozitif, sporsuz, hareketsiz, çubuk şeklinde olduğu (Şekil 4.2.a), *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşunun ise gram değişken özellik gösteren, çubuk şeklinde ve sporsuz bir bakteri olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2.b). Günümüzde yapılan çalışmalarda, *Thermoanaerobacter* cinsine ait bakterilerin çubuk şeklinde, genel olarak gram değişken özellik gösterdikleri bildirilmiştir (Lee vd. 1993, Kim vd. 2001). Hücreler tek bulunabildiği gibi, ikili veya uzun zincir şeklinde de hücrelerinde bulunmaktadır (Kozianovski vd. 1997). *Thermoanaerobacter* cinsine ait türlerin çoğunun terminal endospor oluşturabildiği, *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *T. subterraneus*, *T. acetoethylicus*, *T. wiegelii*, *T. kivui*, *T. sulforophilus* ve *T.tengcongensis*'in spor oluşturmadıkları bildirilmiştir (Ben Bassat ve Zeikus 1981, Schmid vd. 1986, Bonch-Osmolovskaya vd. 1997, Fardeau vd. 2000, Xue vd. 2001).

Thermoanaerobacter cinsine ait türlerin gram negatif, gram pozitif veya hem gram negatif hem de gram pozitif özellikler gösteren bakteriler olduğu belirlenmiştir. *T. ethanolicus*, *T. finnii, T. mathranii* ve *T. thermohydrosulfuricus*'un gram değişken özellik gösterdikleri açıklanmıştır (Schmid vd. 1986, Larsen vd. 1997, Fardeau vd. 2000).

(a) (b)



Şekil 4.2.a. *Thermoanaerobacter* sp. P4, b. *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının ışık mikroskobundaki görüntüleri

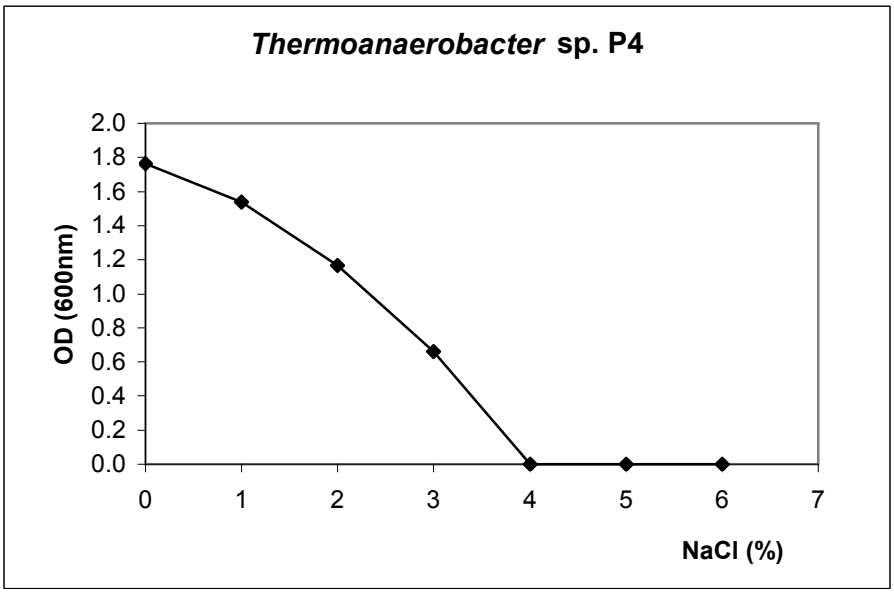
Çizelge 4.1'de *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının çeşitli biyokimyasal özellikleri ile bazı *Thermoanaerobacter* suşlarının özellikleri verilmiştir. *Thermoanaerobacter* sp. P4 glikoz, fruktoz, maltoz, mannoz, dekstroz ve nişasta bulunan ortamlarda gelişmiş, bunların dışındaki substratların varlığında gelişmemiştir. *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşunun substrat kullanımının ise daha geniş olduğu gözlenmiştir. Bu suş glikoz, fruktoz, galaktoz, selobiyoz, riboz, ksiloz, maltoz, mannoz, arabinoz, trehaloz, dekstroz ve nişastayı substrat olarak kullanabilmektedir. Diğer *Thermoanaerobacter* suşları ile karşılaştırıldıklarında, bu cins içindeki bakterilerin hepsinin substrat kullanımlarının farklılık gösterebildiği anlaşılmaktadır.

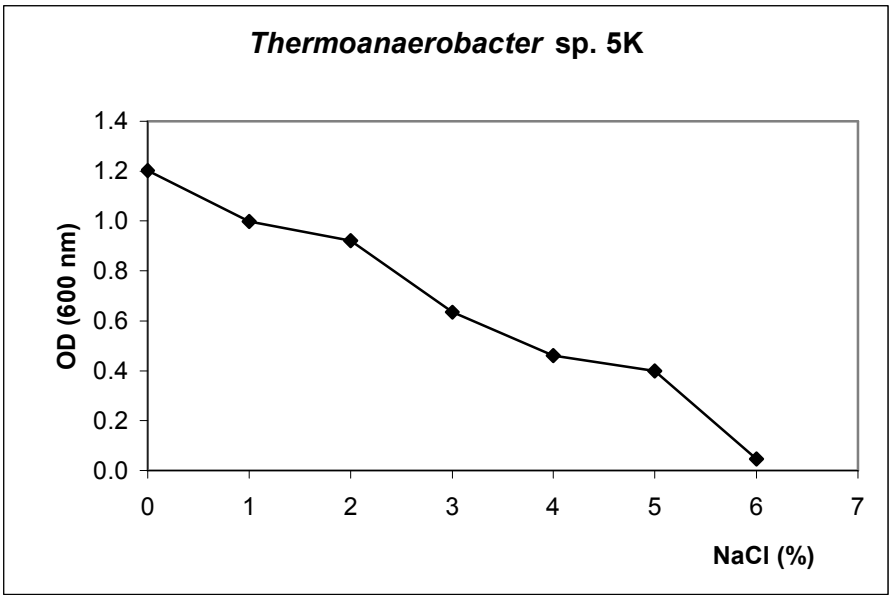
Anlaşılacağı gibi *Thermoanaerobacter* cinsine ait bakteriler morfolojik ve biyokimyasal olarak birbirlerinden farklı özelliklere sahiptir ve bu özellikler yardımı ile mikroorganizmaların sınıflandırması oldukça zordur. Ancak tiyosülfatın, H_2S'ye indirgenmesinin *Thermoanaerobacter* cinsine ait bütün bakterilerin karakteristik bir özelliğinin olduğu bildirilmiştir (Lee vd. 1993). Bu çalışmada yapılan testlerde hem *Thermoanaerobacter* sp. P4 hem de *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının tiyosülfatı H_2S'e indirgedikleri belirlenmiştir.

Çizelge 4.1 *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının bazı biyokimyasal özelliklerinin çeşitli *Thermoanaerobacter* suşları ile karşılaştırması 1 *Thermoanaerobacter* sp. P4, 2 *Thermoanaerobacter* sp. 5K,3 *Thermoanaerobacter kivui,* 4 *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus,* 5. *Thermoanaerobacter ethanolicus,* 6. *Thermoanaerobacter brockii sp. brockii,* 7. *Thermoanaerobacter brockii sp. Finii,* 8. *Thermoanaerobacter mathranii*

Özellik	1	2	3	4	5	6	7	8
Gelişme sıcaklığı	45-75	45-75	50-72	40-78	37-78	35-85	40-75	47-78
Optimum sıcaklık	65	65	66	68	70	65-70	64-66	70-75
Gelişme pH aralığı	5-10	5-9	5,3-7,3	5-9	4.4-9.9	5.5-9.5	X	4.7-8.8
Optmum pH	7.5-8.0	7.5-8.0	6.4		6-8	7.5	6.5-6.8	6.8-7.8
Substrat kullanımı								
Glikoz	+	+	+	+	+	+	+	+
Fruktoz	+	+	+	+	+	X	+	+
Sakaroz	-	-	-	+	+	+	+	+
Laktoz	-	-	-	X	+	+	+	+
Galaktoz	-	+	-	+	+	X	+	-
Rafinoz	-	-	-	+	-	X	X	+
Selobiyoz	-	+	-	+	+	+	+	X
Melibiyoz	-	-	-	X	-	X	X	+
Melezitoz	-	-	-	X	-	X	X	+
Riboz	-	+	-	+	+	X	+	+
Ksiloz	-	+	-	X	+	-	+	+
Maltoz	+	+	-	+	+	+	+	+
Mannoz	+	+	+	+	+	-	+	+
Arabinoz	-	+	-	+	X	-	X	+
Trehaloz	-	+	-	+	-	X	X	+
Dekstroz	+	+	-	X	X	X	X	X
Nişasta	+	+	-	-	+	+	X	X
Pektin	-	-	-	X	X	-	X	-
Selüloz	-	-	-	X	-	-	X	-
Ksilan	-	-	-	+	X	X	X	+
Fermentasyon ürünleri	Asetik asit	etanol	Asetik asit	Etanol, laktik asit, formik asit	Etanol laktik asit	Etanol laktik asit	Etanol laktik asit	Etanol laktik asit
Kaynak			Leigh vd. 1981	Wiegel ve Ljungdahl 1979	Wiegel ve Ljungdahl 1981	Zeikus vd. 1979	Schmid vd. 1986	Larsen vd. 1997

\+ : Kullanabiliyor
\- : Kullanamıyor
X : Belirlenmedi





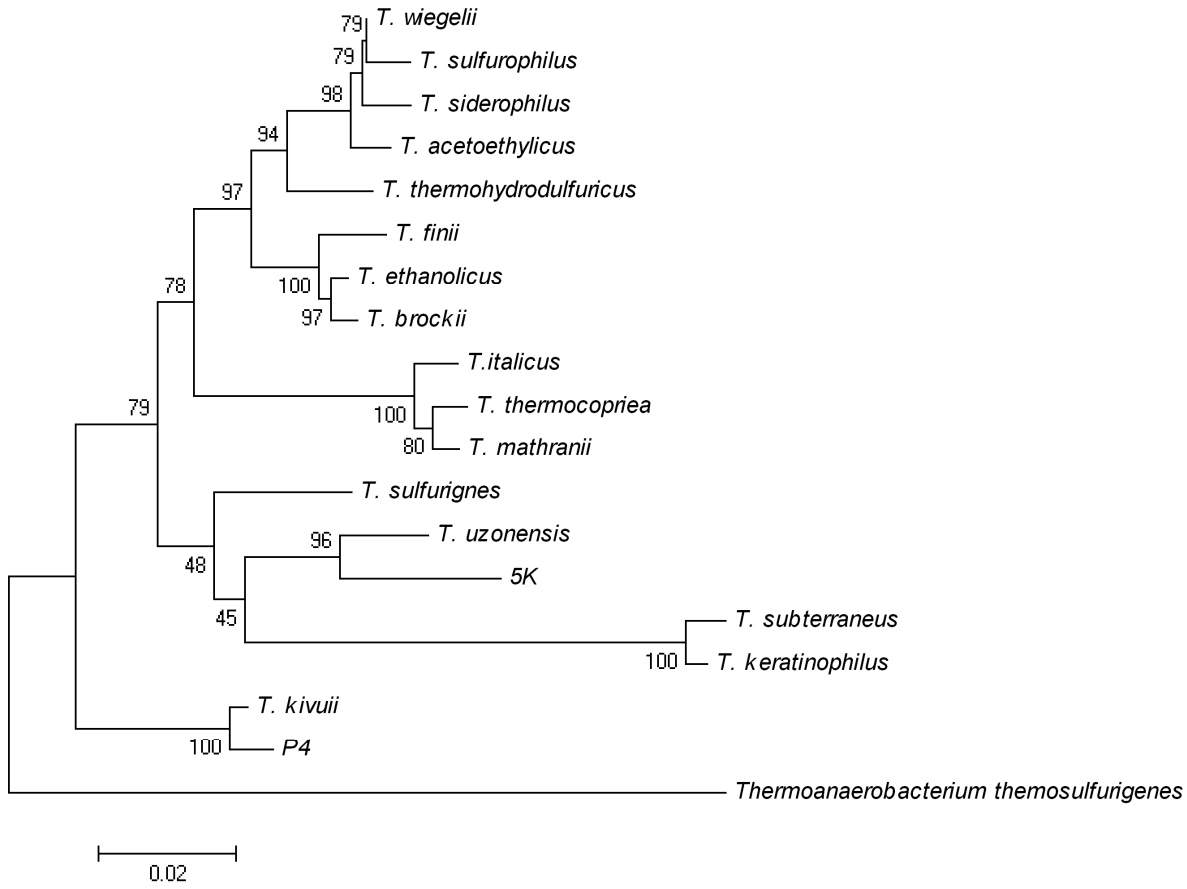
Şekil 4.3 NaCl'ün *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının gelişmesine etkisi

Şekil 4.3'de *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp 5K suşlarının % 0-6 oranlarında NaCl içeren DSMZ 144 besiyerindeki 72 saat geliştirilmeleri sonucunda ölçülen optik yoğunlukları verilmiştir. Her iki suş da tuz içermeyen ortamda daha iyi gelişme göstermiş, NaCl konsantrasyonu arttıkça gelişmelerinde de azalma gözlenmiştir. *Thermoanaerobacter* sp P4 % 3'den yüksek konsantrasyonlarda gelişmemiş, *Thermoanaerobacter* sp. 5K ise % 5'e kadar NaCl'e direnç

gösterebilmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda NaCl içeren ortamlarda gelişme 48. saatten sonra başlamıştır.

4.2.2 İzolatların moleküler tanımlaması

Yapılan çalışmalarda, 11-1506 *E. coli* universal numaralandırmasına göre *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp.5K suşlarının 16S rDNA'larından sırası ile 934 ve 858 nükleotit belirlenmiştir. Bu diziler esas alınarak yapılan filogenetik analizlere göre, P4 ve 5K suşlarının *Thermoanaerobacter* cinsine ait türler olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.4). *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının *Thermoanaerobacter* cinsine ait bakteriler ile benzerlikleri sırası ile % 91.5-98.3 ve % 91-97 arasında değişmiştir. Şekil 3.4'te verilen filogenetik ağaçtan anlaşılacağı gibi, *Thermoanaerobacter* sp P4 suşuna en yakın suş olan *Thermoanaerobacter kivuii* ile benzerliğin % 98.3, *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşuna en yakın suş olan *Thermoanaerobacter uzonensis* arasındaki benzerliğin % 97 olduğu belirlenmiştir. Cins bazında karşılaştırma yapmak için *Thermoanaerobacter* cinsine en yakın cins olan *Thermoanaerobacterium* cinsine ait *Thermoanarobacterium thermosulfurigenes* referans olarak alınmış ve bu tür ile *Thermoanaerobacter* sp.P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K'nın benzerliklerinin sırası ile % 87.6 ve % 88.3 olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.4 MEGA4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) software version 4.0 kullanılarak oluşturulan *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının 16S rDNA baz dilizimlerine *Thermoanaerobacter* cinsi bakterileri ile oluşturulan filogenetik ağaç (Tamura vd. 2007)

Yapılan çalışmalarda *Thermoanaerobacter* sp. P4 suşu filogenetik dendogramdaki en yakın tür olan *Thermoanaerobacter kivui* ile nişasta kullanımı açısından farklılık göstermiş, *Thermoanaerobacter* sp. P4 nişasta ve türevlerini kullanabilirken *Thermoanaerobacter kivuii'*nin nişasta ve türevlerini kullanamadıkları bildirilmiştir (Leigh vd. 1979). Yapılan analizlere göre P4 ve 5K suşlarının *Thermoanaerobacter* cinsine ait yeni türler olduğu düşünülmektedir.

4.3 Siklodekstrin Glikoziltransferaz Enziminin Üretimi

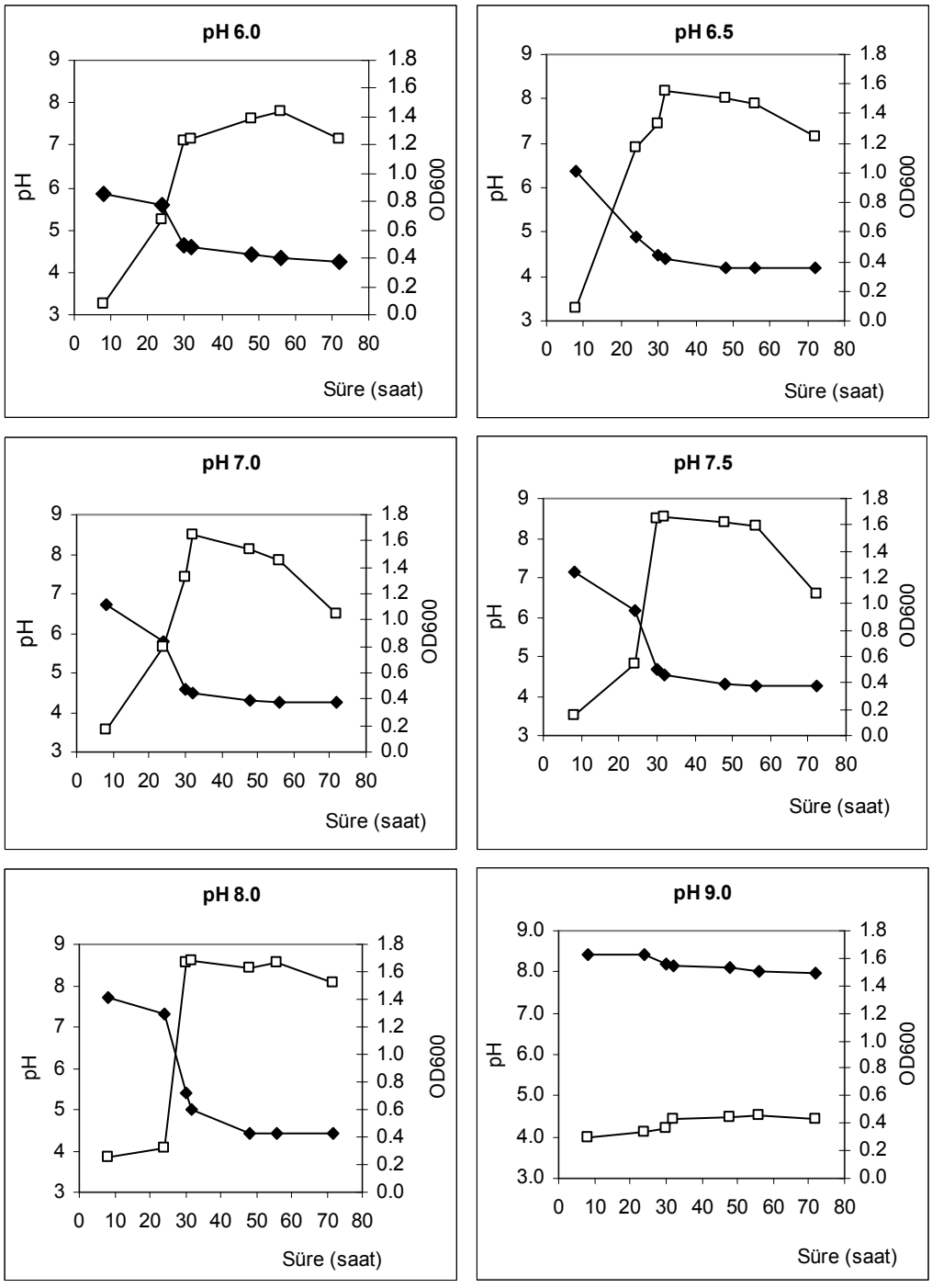
Thermoanaerobacter sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşları ile besiyeri 1 üzerinde SGTaz üretimi çalışmaları yapılmış ve bu ortamda optimum pH, sıcaklık,

substrat konsantrasyonunun ve çeşitli substrat ve azot kaynaklarının SGTaz üretimine etkisi saptanarak optimum besiyeri bileşimi ve mikroorganizmaların gelişme koşulları belirlenmiştir.

4.3.1 Enzim üretiminin optimum pH ve sıcaklığı

Bu amaçla *Thermoanaerobacter* sp. P4 65 ^{o}C sıcaklıkta ve başlangıç pH'ları 6.0-9.0 arasında değişen besiyeri 1'de *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşu ise aynı sıcaklıkta ve başlangıç pH'ları 4.0-10.0 arasında değişen aynı besiyerinde geliştirilmiş ve belli aralıklarla alınan örneklerde optik yoğunluk (OD_{600}), pH ve SGTaz aktiviteleri belirlenmiştir.

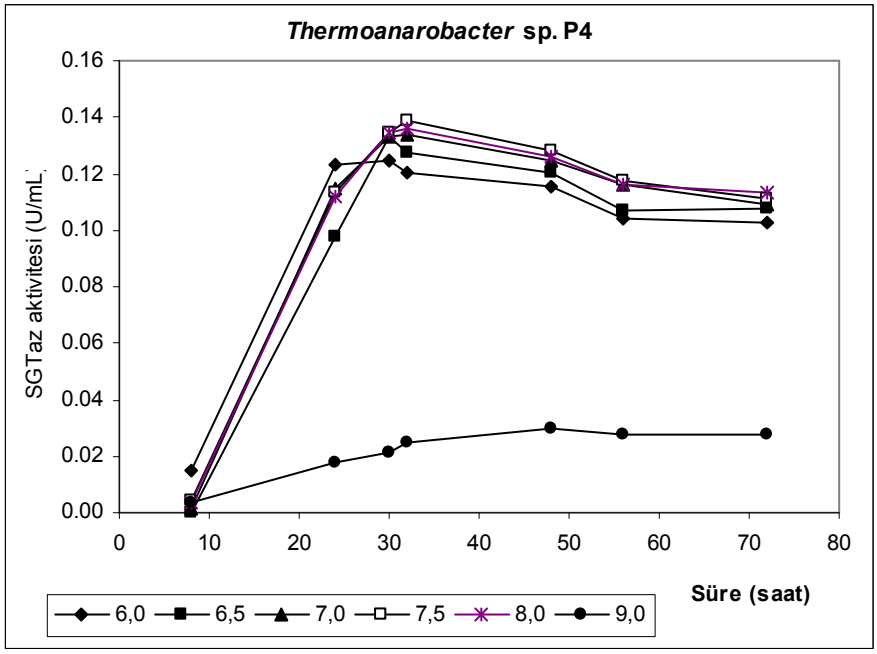
Şekil 4.5'te *Thermoanaerobacter* sp. P4 suşunun farklı pH'lardaki gelişme eğrileri ve pH değişimi, Şekil 4.5'te ise bu pH'larda aynı sürelerde ölçülen SGTaz aktiviteleri verilmiştir. Görüldüğü gibi, *Thermoanaerobacter* sp. P4 suşunun pH 6-8 arasında SGTaz ürettiği (Şekil 4.6), pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 ve 8.0'de 30. saatteki SGTaz aktiviteleri 0.125, 0.132, 0.133, 0.134 ve 0.136 U/mL olarak belirlenmiştir. pH 7.5 ve 8.0'de ölçülen enzim aktivitelerinin diğer pH'larda ölçülen aktivitelerden daha yüksek olduğu anlaşılmış ve bu pH'larda mikroorganizma gelişmesinin de daha iyi olduğu ve gelişme ile enzim üretimi arasında doğrusal bir ilişki olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.5 *Thermoanaerobacter* sp. P4 suşunun 65 ^{o}C'de, başlangıç pH'sı 6.0-9.0 olan besiyeri 1'deki gelişme eğrileri (OD_{600}'e göre) ve gelişme süresince pH'daki değişimi, (□, $OD_{600;}$ ◆, pH)

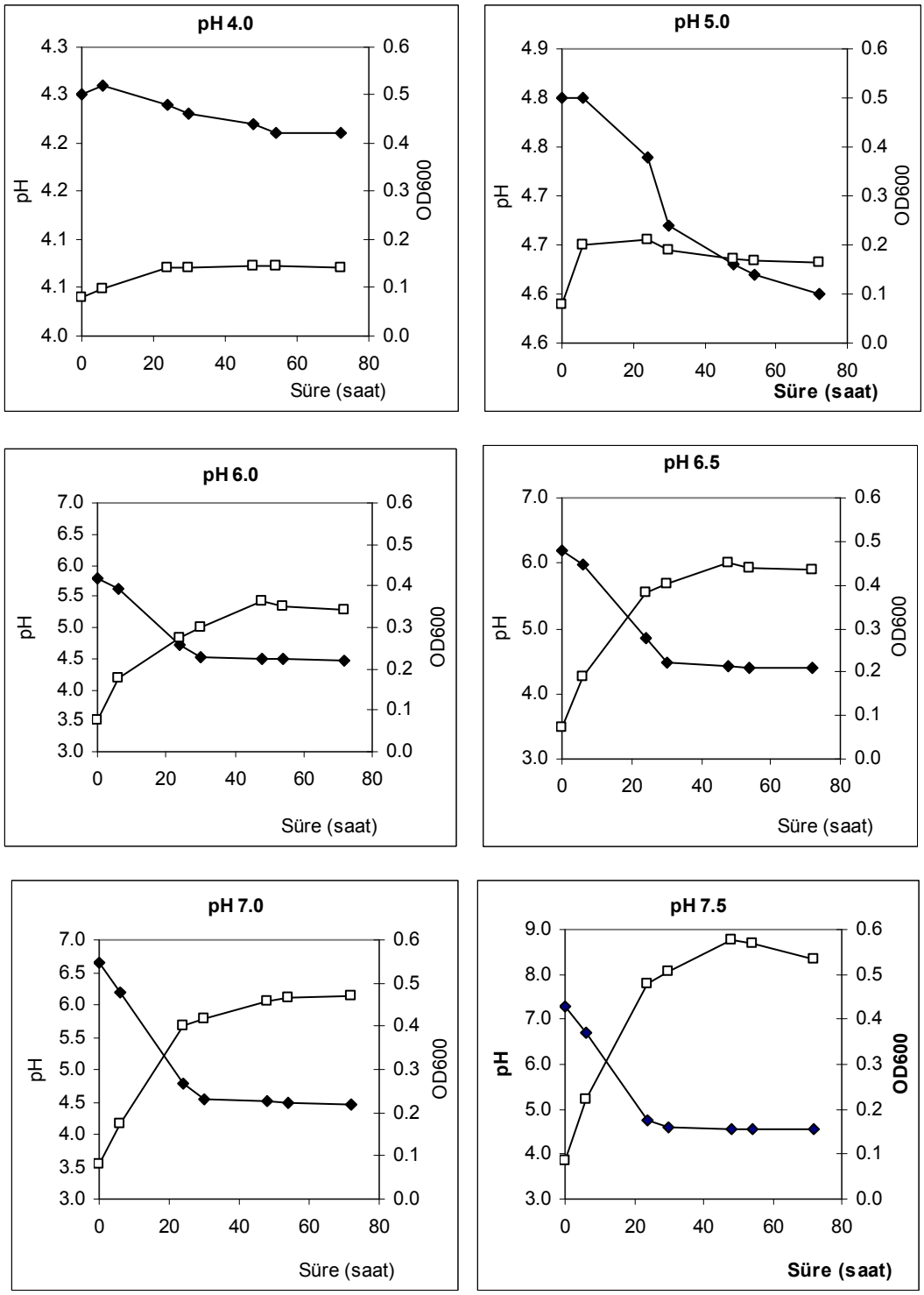
SGTaz üretimi için en uygun pH'nın 7.5-8.0 aralığında olduğu, pH 9.0'da ise mikroorganizma gelişmesinin çok az olduğu ve buna bağlı olarak SGTaz üretiminin de

olmadığı anlaşılmıştır. Şekil 4.6'da görüldüğü gibi, *Thermoanaerobacter* sp. P4 suşunun maksimum enzim aktivitesinin ise gelişmenin durağan faza geçtiği anda olduğu gözlenmiştir.

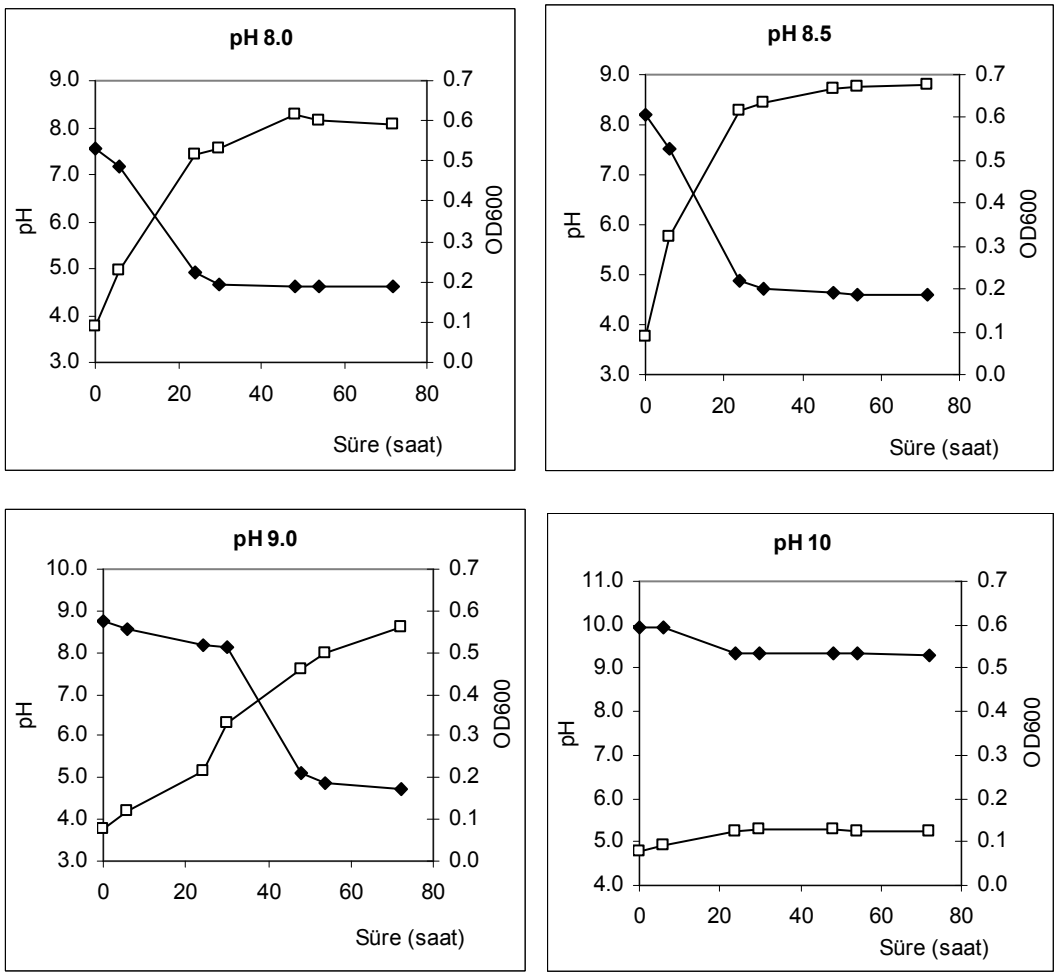


Şekil 4.6 6.0-9.0 arasındaki pH'larda besiyeri 1'de, 65 ^{o}C'de geliştirilen *Thermoanaerobacter* sp. P4 suşunun SGTaz aktivitesindeki gelişme süresine bağlı değişim

Thermoanaerobacter sp. 5K suşunun hem gelişmesi hem de enzim aktivitesinin *Thermoanaerobacter* sp. P4 suşuna göre daha düşük olduğu anlaşıldığından *Thermoanaerobacter* sp. 5K'nın daha geniş bir pH aralığındaki (pH 4.0-10) gelişmesi ve SGTaz aktivitesi araştırılmıştır. *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşunun da *Thermoanaerobacter* sp. P4 suşuna benzer şekilde pH 7.5'de en iyi hücre gelişimi ve enzim aktivitesine sahip olduğu anlaşılmıştır. (Şekil 4.7- Şekil 4.8). Çalışmalarda genel olarak maksimum enzim aktivitesine gelişmenin 24. saatinde ulaşılmış ve bu saatte alınan örneklerde pH 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 ve 9.0 da enzim aktiviteleri sırası ile 0.0085, 0.040, 0.044, 0.051, 0.062, 0.053, 0.042 ve 0.0092 U/mL olarak bulunmuş, pH 4.0 ve 10.0'da gelişme ve enzim üretimi saptanamamıştır.

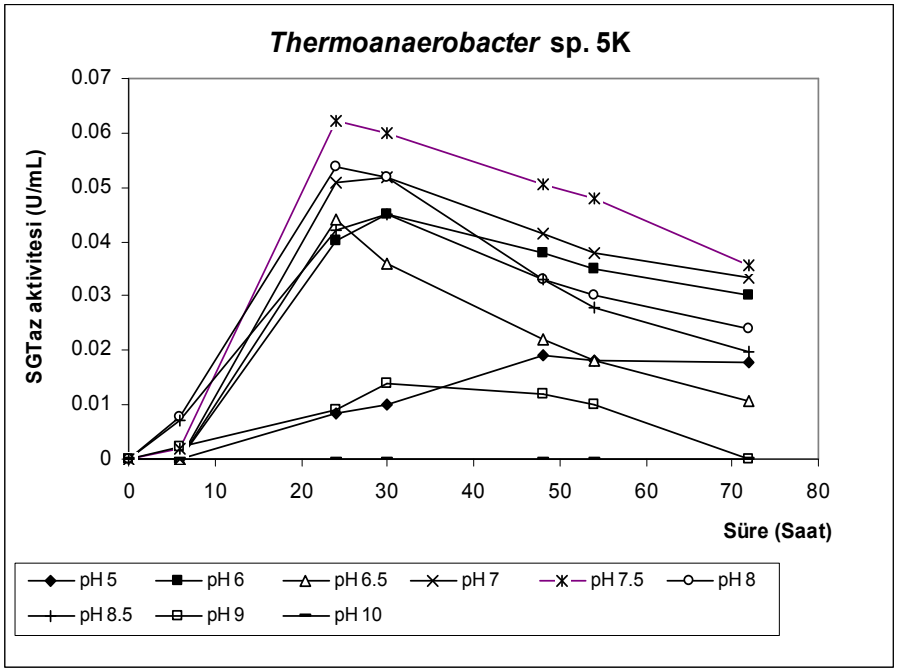


Şekil 4.7 *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşunun besiyeri 1'de ve 65 ^{o}C'de, pH 4.0-10.0'daki gelişme eğrileri (OD_{600}'e göre) ve gelişme süresince pH'daki değişimi (□ , OD_{600}; ◆ , pH)



Şekil 4.7 *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşunun besiyeri 1'de ve 65 ^{o}C'de, pH 4.0-10.0'daki gelişme eğrileri (OD_{600}'e göre) ve gelişme süresince pH'daki değişimleri (devamı), (□, OD600;◆, pH)

Şekil 4.8'den anlaşılacağı gibi, bütün pH'larda *Thermoanaerobacter* sp. 5K'nın SGTaz aktivitesinin, gelişmenin 24. saatinden sonra hızlı bir şekilde düştüğü gözlenmiştir. Pishtiyski ve Zhekova (2006), *Bacillus megaterium* ile yaptıkları çalışmada 44. saatteki SGTaz aktivitesinin 22. saate göre daha düşük olduğunu belirlemişler ve bu durumun enzimin birleştirme (coupling) aktivitesinden kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir (Terada vd. 2001).



Şekil 4.8 4.0-10.0 arasındaki pH'larda besiyeri 1'de, 65 ^{o}C'de geliştirilen *Thermoanaerobacter* sp. 5K4 suşunun SGTaz aktivitesindeki gelişme süresine bağlı değişimleri

Suşların, optimum gelişme sıcaklığının belirlenmesi amacıyla *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşları 60, 65, 70 ve 75 ^{o}C'lerde besiyeri 1'in modifiye edilmesiyle oluşturulan besiyeri 2'de geliştirilmiş ve alınan örneklerde enzim aktiviteleri ölçülmüştür (Çizelge 4.2). Elde edilen verilere göre, en iyi gelişme ve enzim aktivitesinin her iki bakteride de 65 ^{o}C'de olduğu ve *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının SGTaz aktivitelerinin sırası ile 0.163 ve 0.123 U/mL olduğu belirlenmiş, 75 ^{o}C'de ise aynı koşullarda çok yavaş gelişme ile birlikte enzim aktivitesi de oldukça düşük bulunmuş, 80 ^{o}C'de ise gelişme gözlenmemiştir.

Çizelge 4.2 *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının besiyeri 2'de farklı gelişme sıcaklıklarındaki SGTaz aktiviteleri

Sıcaklık (^{o}C)	*Thermoanaerobacter* sp. P4	*Thermoanaerobacter* sp. 5K
	Bağıl aktivite (%)	Bağıl aktivite (%)
60	69	72
65	100	100
70	67	75
75	16	14

4.3.2 Çeşitli azot kaynaklarının SGTaz üretimine etkisi

Bu amaçla, 20 g/L nişasta içeren besiyeri 1'de pepton yerine % 0.5 oranında maya özütü, kazein, tripton, amonyum sülfat ve aynı oranlarda hem kazein hem de pepton ilave edilerek bunların enzim üretime etkisi araştırılmış, elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3'de verilmiştir. Bütün çalışmalarda ortamdaki maya özütü konsantrasyonu değiştirilmemiş (ilave edilmediğinde besiyerinde resazurinden ileri gelen renk değişimi gözlenemediğinden), bu koşullarda en yüksek enzim aktivitesine kazein içeren besiyerinde ulaşılmış ve bu koşullarda *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K'nın enzim aktiviteleri sırası ile 0.167 ve 0.129 U/mL olarak bulunmuştur. Besiyeri 1'de kullanılan pepton yerine azot kaynağı olarak kazein kullanımının daha iyi sonuçlar verdiği saptandığından besiyerinde kullanılan azot kaynakları % 0.5 kazein ve % 0.5 maya özütü olacak şekilde modifiye edilmiştir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlardan ve daha önce bu konuda yapılan çalışmalardan SGTaz üretimi için farklı bakterilerin azot gereksinimlerinin farklılık gösterebileceği anlaşılmıştır. Tonkova (1998), SGTaz üretimi için temel olarak organik azot kaynaklarının kullanıldığını bildirmiştir. Yapılan bir çalışmada, *Bacillus* türlerinde SGTaz üretiminin genel olarak amonyum tuzları tarafından baskılandığı (Thatai vd.

1999), ancak Rosso vd. (2002)'un *Bacillus circulans* DF 9R ile yaptıkları çalışmada ortamda azot kaynağı olarak sadece amonyum tuzları bulunduğunda SGTaz üretiminin arttığını, tripton ve mısır ıslatma suyu gibi organik azot kaynakları ilave edildiğinde ise bakteri gelişmesinin yüksek ancak SGTaz üretiminin düşük olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada da, *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının SGTaz üretimi için organik azot kaynaklarına gereksinim duyduğu anlaşılmış, azot kaynağı olarak kazein yerine amonyum sülfat kullanıldığında *Thermoanaerobacter* sp. P4'ün aktivitesinde % 59, *Thermoanaerobacter* sp. 5K'da ise % 23'lük bir azalma belirlenmiştir.

En yüksek SGTaz aktivitesini oluşturan kazein oranını belirlemek için % 0.5, 0.8, 1, ve 1.5 oranlarında kazein içeren besiyeri 1'de 65 ^{o}C'de *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K'nın sırası ile 30 ve 24 saatlik inkübasyonu sonucunda SGTaz aktiviteleri ölçülmüş ancak, önemli bir artış gözlenmemiş, bu sonuçlara göre besiyerine ilave edilen % 0.5 oranındaki kazeinin SGTaz üretimi için yeterli olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Çizelge 4.3 *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K'nın çeşitli azot kaynakları içeren besiyerindeki enzim aktiviteleri *

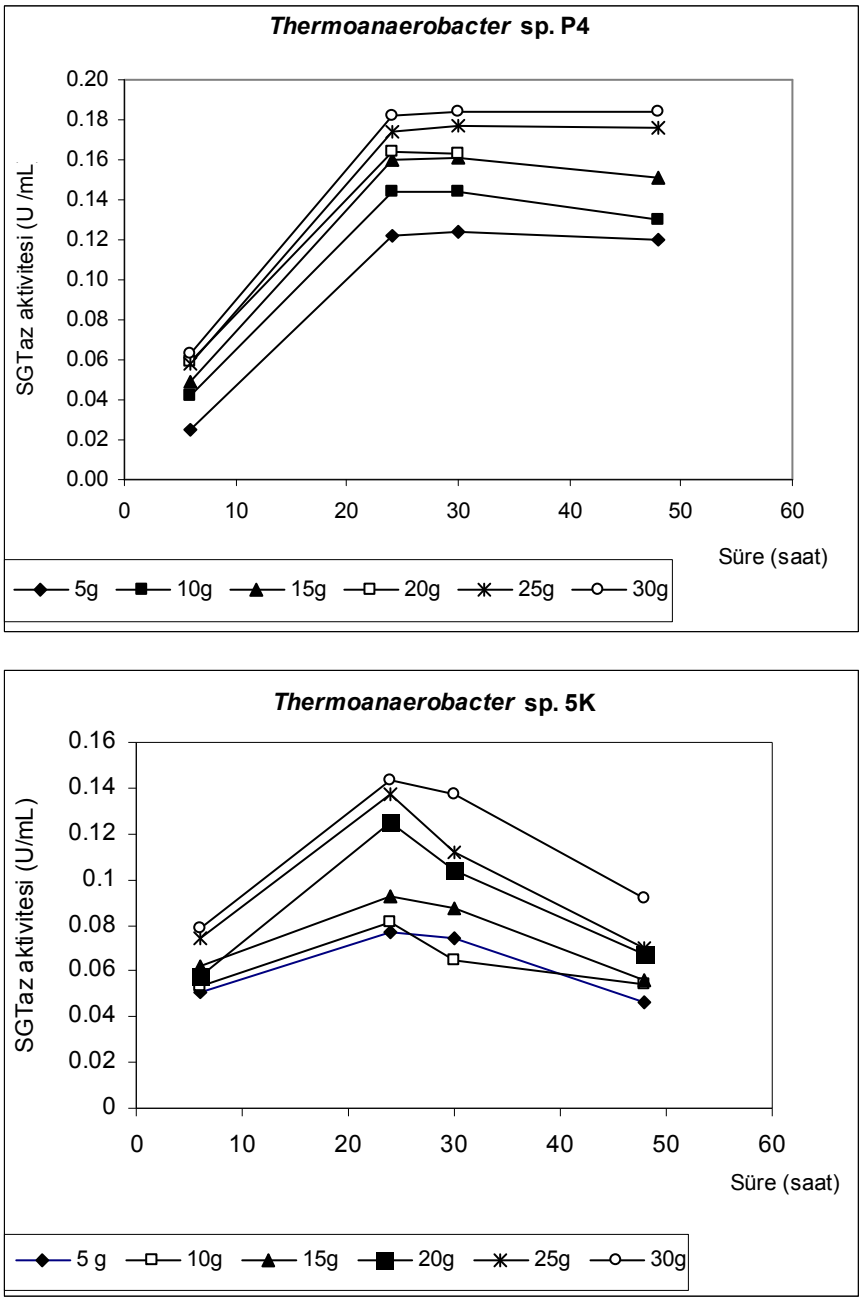
Azot Kaynağı	Bağıl aktivite (%)	
	Thermoanaerobacter sp.P4	*Thermoanaerobacter* sp. 5K
Maya özütü	91	91
Pepton	96	94
Tripton	95	73
Kazein	100	100
Amonyum sülfat	41	77
Maya özütü+pepton+kazein	95	93

*Bütün azot ortamlarda % 0.5 oranında maya özütü bulunmaktadır.

4.3.3 Substrat konsantrasyonunun SGTaz üretimine etkisi

Besiyerindeki optimum substrat konsantrasyonunu belirlemek için 5, 10, 15, 20, 25, 30 g/L çözünür patates nişastası içeren, başlangıç pH'sı 7.5-8.0 olan ve azot kaynağı olarak % 0.5 oranında kazein kullanılan besiyerleri hazırlanmış ve aktif *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarından % 5 oranında aşılanarak 65 ^{o}C'de inkübe edilmiştir. Çoğalma sırasında belli aralıklarla alınan örneklerde, mikroorganizmaların gelişmeleri, pH değişimleri ile SGTaz aktiviteleri ölçülmüştür. Şekil 4.9'da verilen sonuçlarda, zamanla enzim aktivitesindeki değişim görülmektedir (optik yoğunluk ve pH değişimleri verilmemiştir). Şekil 4.9'den anlaşılacağı gibi, her iki suşda da, besiyerindeki nişasta oranı arttıkça enzim aktivitesinde de artış gözlenmiştir. 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 g/L nişasta konsantrasyonlarında *Thermoanaerobacter* sp. P4'ün gelişmenin 30. saatindeki SGTaz aktiviteleri sırası ile 0.124, 0.144, 0.161, 0.164, 0.177 ve 0.187 U/mL; *Thermoanaerobacter* sp. 5K'nın ise 24. saatte sırası ile 0.077, 0.081, 0.093, 0.125, 0.137 ve 0.143 U/mL olarak belirlenmiştir. Buna göre, 20 ve 30 g/L konsantrasyonlarda (5 g/L konsantrasyona göre) *Thermoanaerobacter* sp. P4'te sırası ile % 32 ve % 51, *Thermoanaerobacter* sp. 5K'da ise % 62 ve % 86 oranında artış olduğu hesaplanmıştır.

Benzer bir çalışmada, Rosso vd. (2002), *Bacillus circulans* DF 9R suşu için optimum substrat konsantrasyonunu 15 g/L, Makale vd. (1990) *Bacillus circulans* var *alkolophilus* için 10 g/L, Gawande vd. (1998) *Bacillus firmus* için 20 g/L, Freitas vd. (2004) ise *Bacillus alkalophilic* CGII suşu için 15 g/L olarak belirlemişlerdir. Buna göre verilen sonuçlar literatür sonuçları ile uyum göstermektedir.

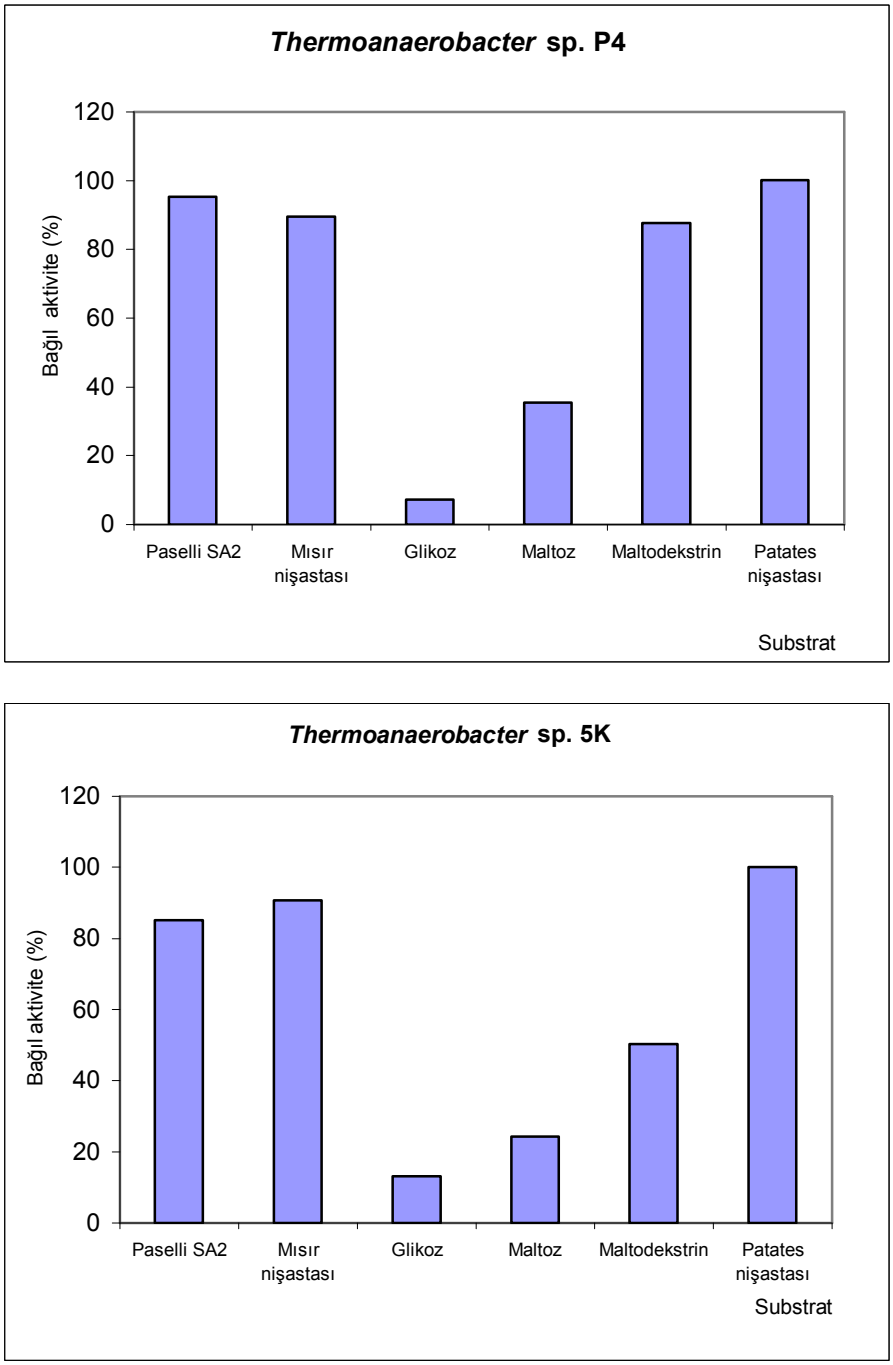


Şekil 4.9 *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının değişik patates nişastası konsantrasyonlarındaki SGTaz aktivitelerinin süreye bağlı değişimi

4.3.4 Çeşitli karbon kaynaklarının SGTaz üretimine etkisi

Bu amaçla, besiyeri 2'ye çözünür patates nişastas yerine Paselli SA2, mısır nişastası, glikoz, maltoz ve maltodekstrin ilave edilerek *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve

Thermoanaerobacter sp. 5K'nın gelişmeleri ve SGTaz aktiviteleri izlenmiştir. Şekil 4.10'da *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K'nın bu substratlarda 24. saatteki bağıl aktiviteleri verilmiştir.



Şekil 4.10 *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K'nın besiyeri 2'de, çeşitli karbon kaynaklarındaki SGTaz aktiviteleri

Bu koşulda, bakteriler test edilen tüm substratlarda gelişme göstermiş ancak, SGTaz üretiminin sadece nişasta ve türevlerini içeren koşullarda gerçekleştiği saptanmıştır. En yüksek SGTaz aktivitesinin çözünür patates nişastası ilave edilen ortamda oluştuğu, Paselli SA2, mısır nişastası ve maltodekstrinin de SGTaz üretimi için uygun substratlar olduğu anlaşılmıştır. *Thermoanaerobacter* sp. P4 suşunun, çözünür patates nişastası, Paselli SA2, mısır nişastası, maltodekstrin ve maltoz içeren besiyerinde 30. saatte sırası ile 0.159, 0.158, 0.142, 0.143, ve 0.085 U/mL; *Thermoanaerobacter* sp 5K suşunun ise aynı besiyerlerinde 24. saatte sırası ile 0.120, 0.102, 0.109, 0.060 ve 0.029 U/mL SGTaz aktivitesi gösterdiği saptanmıştır. Farklı karbon kaynakları ile maksimum aktiviteye *Thermoanaerobacter* sp. P4 suşu 24 veya 30. saatlerde, *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşu ise 24. saatte ulaşmıştır. Aynı besiyerinde, glikoz substrat olarak kullanıldığında ile gelişme çok iyi olmasına karşın SGTaz aktivitesi gözlenmemiştir. Yapılan bütün çalışmalarda *Thermoanaerobacter* sp. P4'de 30. saatten sonra *Thermoanaerobacter* sp. 5K'da ise 24. saatten sonra SGTaz aktivitesinde düşme gözlenmiş, ancak *Thermoanaerobacter* sp. 5K'daki düşüş *Thermoanaerobacter* sp. P4'e oranla oldukça fazla olmuştur.

Substrat olarak, belirtilen nişasta türevleri dışında sakaroz, fruktoz, ksiloz, laktoz ve galaktoz kullanılarak da SGTaz aktiviteleri araştırılmış, ancak glikoz da olduğu gibi kullanılan mono ve disakkaritlerden hem *Thermoanaerobacter* sp. P4 hem de *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının SGTaz aktivitesi göstermediği anlaşılmış ve sonuçlar Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Yapılan çalışmalardan anlaşılacağı gibi, her iki suşun da SGTaz üretiminin gerçekleştirebilmesi için ortamda nişasta kaynaklarının bulunması gerekmektedir. Karbon kaynağının SGTaz sentez oranını belirleyen en önemli faktörlerden birisi olduğu, SGTaz'ın ticari olarak üretiminde karbon kaynağı olarak da nişasta kullanıldığı bildirilmiştir (Tonkova 1998). Bununla birlikte, yapılan başka çalışmalarda farklı karbon kaynaklarının SGTaz üretimini etkilediği belirlenmiştir (Rosso vd. 2002). Gawande vd. (1998) *Bacillus firmus*'un mısır nişastasından, Jin-Bong vd. (1990) *Bacillus stearothermophilus*'un çözünür patates nişastasından, Sreenivasan vd. (1991)

Bacillus macerans'ın tapyoka nişastasından, Rosso vd. (2002) ise *Bacillus circulans* DF R9'un cassava ve pirinç nişastasından en yüksek SGTaz ürettiklerini belirlemişlerdir.

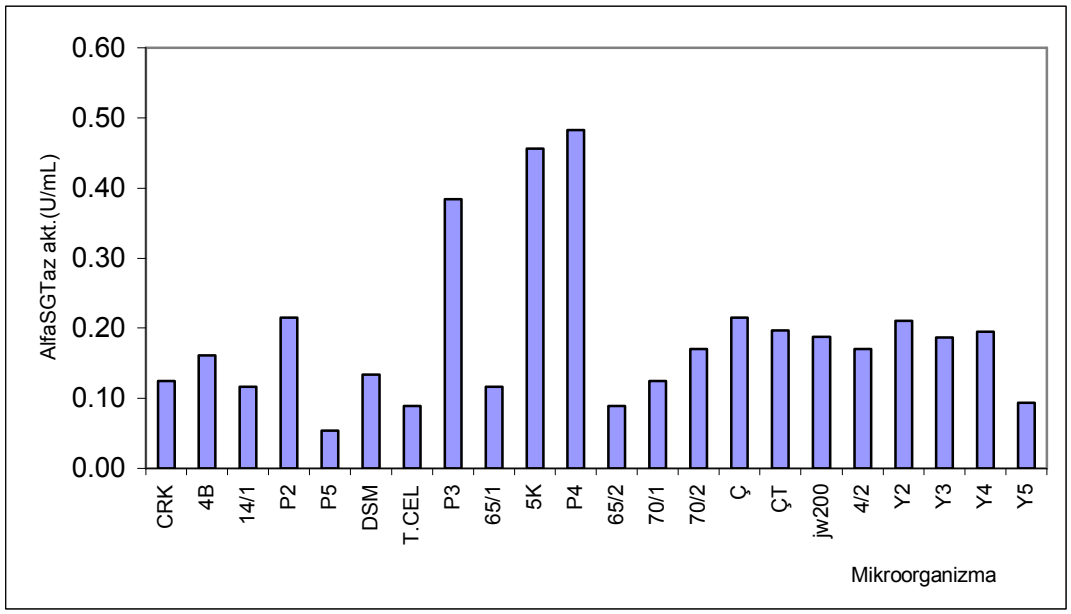
Çizelge 4.4 *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K'nın bazı karbon kaynakları ile besiyeri 2'de 65 ^{o}C'de 24 saat geliştirilmesi ile elde edilen SGTaz aktiviteleri

Substrat	SGTaz aktivitesi (U/mL)	
	Thermoanaerobacter sp. P4	*Thermoanaerobacter sp.5K*
Fruktoz	0.010	0.008
Ksiloz	0.00	0.00
Galaktoz	0.017	0.027
Laktoz	0.054	0.00
Sakaroz	*0.034*	0.00

Rosso vd. (2002), yaptıkları çalışmada, *Bacillus circulans* DF 9R'nin nişasta dışındaki substratlardan SGTaz üretiminin olmadığını saptamışlardır. *Bacillus firmus* ve *Bacillus obhensis*'un ortamda sadece nişasta varlığında SGTaz ürettiklerini belirlenmiştir (Gavande vd. 1998, Nishida vd. 1997). Buna karşın, Stefanova vd. (1999) *Bacillus stearothermophilus* için en iyi SGTaz üretim kaynağının glikoz olduğunu, Jamuna vd. (1993) ise *Bacillus cereus*'un SGTaz üretimi için en iyi substratın glikoz ve ksiloz olduğunu bildirmişlerdir.

4.4 İzolatların α- SGTaz Aktiviteleri

Besiyeri 2'de 65 ^{o}C'de 24 saat geliştirilen izolatların α-SGTaz aktiviteleri metil oranj yöntemi ile saptanmış ve sonuçlar Şekil 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.11 Bazı izolatların besiyeri 2'de 65 ^{o}C'de 24 saat gelişmeleri sonunda elde edilen α-SGTaz aktiviteleri

Saptanan aktivite değerleri rakamsal olarak β-SGTaz aktiviteleri ile kıyaslandığında oldukça yüksek, ancak renkte oluşan azalma fenol fitalein kullanılarak yapılan (β-SGTaz) aktivite analizine göre oldukça düşük olarak saptanmıştır. Fenol fitalein ile yapılan ölçümde % 5'lik azalma 0.01 U/mL enzim aktivitesine eşit iken, metil oranj yönteminde % 1.8'lik azalmanın 0.1 U/mL enzim aktivitesine eşit olduğu görülmüştür. Ayrıca, fenol fitalein ile renkte oluşan açılma gözle görülebilirken metil oranj yönteminde renkteki azalma gözle gözlenememiş, bu nedenle α-SGTaz aktivite ölçümünde hata payının daha yüksek olduğu düşünülmüş ve α-SGTaz aktiviteleri ölçümüne devam edilmemiştir.

4.5 Enzimin Saflaştırılması

SGTaz'ın saflaştırılmasında 100 mL ve 1000 mL'lik serum şişelerinde geliştirilen *Thermoanaerobacter* sp P4 ve *Thermoanaerobacter* sp 5K suşlarının 10000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendikten sonra elde edilen süpernatantlar kullanılmış, berrak sıvıda önce SGTaz aktiviteleri ölçülmüş ve sonrasında amonyum sülfatla çöktürme işlemi gerçekleştirilmiştir. Enzim saflaştırma işleminin bütün aşamaları 4 ^{o}C'de gerçekleştirilmiştir.

4.5.1 Amonyum sülfat ile çöktürme

Enzim proteininin amonyum sülfatla çöktürerek ayrılması için gereken uygun amonyum sülfat konsantrasyonunu saptamak için 50 mL'lik hücresiz süpernatanta, bir manyetik karıştırıcıda düşük devirde sürekli karıştırılarak son konsantrasyonu % 20, 30, 40, 50, 60, 70 olacak şekilde katı amonyum sülfat eklenmiş ve proteinlerin çökmesi sağlanmıştır. İşlem sonunda 15000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenerek süpernatant ayrılmış ve dibe çöken kısım pH 5.5, 10 mM sodyum asetat tamponunda çözülerek enzim aktivitesi ve protein miktarı ölçülmüştür. Bu uygulamada, amonyum sülfat ilavesi ile çökelti oluşumu gözle de izlenmiş ve elde edilen sonuçlara gören uygun amonyum sülfat konsantrasyonunun % 55-60 olduğu belirlenmiştir. Bu uygulamada, kullanılan amonyum sülfatın, ortama yavaş yavaş ilave edilmesi gerektiği anlaşılmış ve işlem sonunda süpernatantın 4 ^{o}C'de bir gece bekletilmesi ile çökmenin daha iyi olduğu gözlenmiştir.

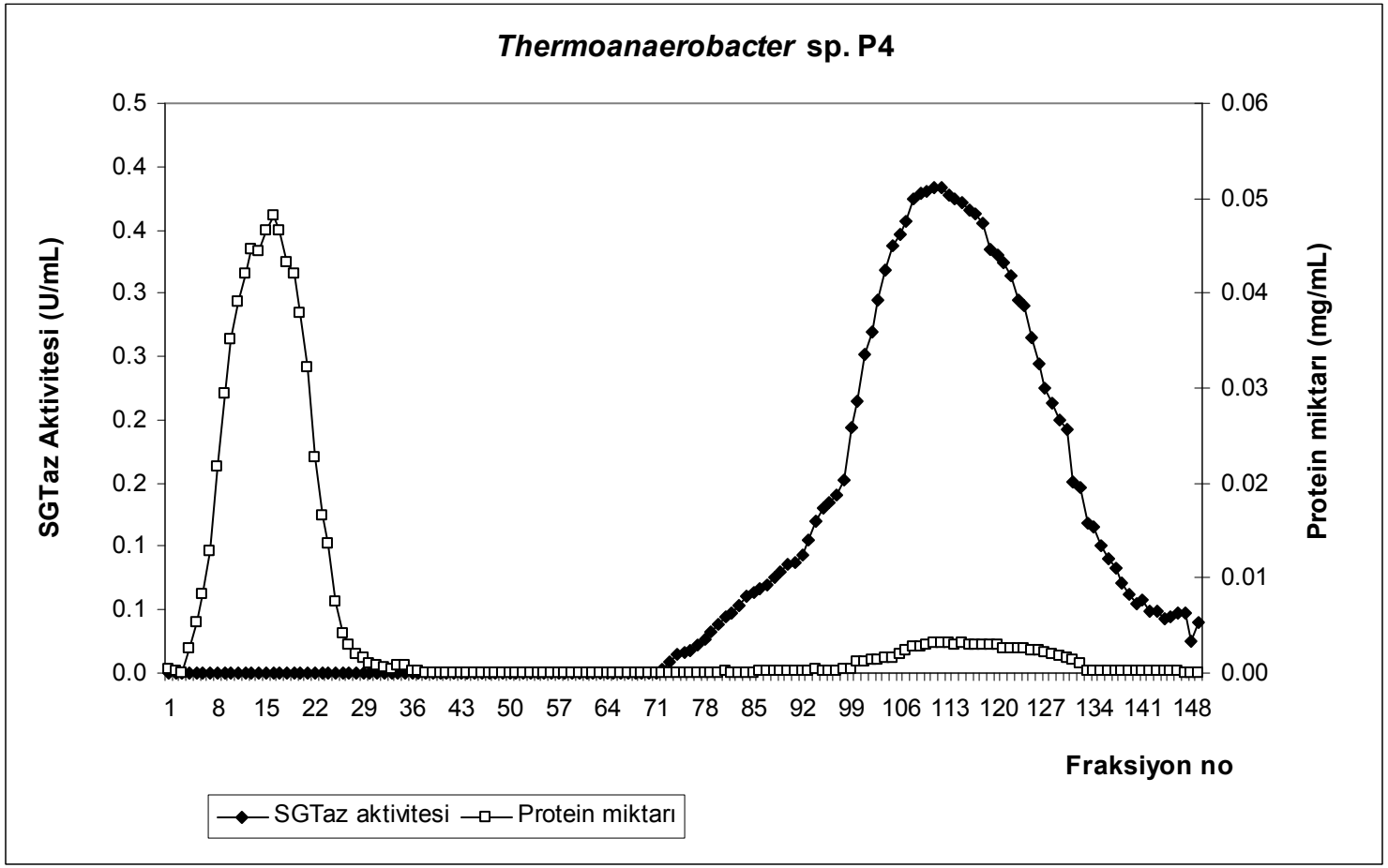
Büyük oranlardaki sıvıdan protein çöktürme işlemleri için 1000 mL'lik veya 100 mL'lik serum şişelerinde geliştirilen kültürlerin daha önce açıklandığı gibi elde edilen süpernatantları kullanılmış, amonyum sülfatla çöktürme ve diyaliz işlemleri gerçekleştirilmiş ve diyaliz ile tuzu ayrılan örnekler afinite kromatografisinde kullanılmak üzere -18 ^{o}C'de saklanmıştır.

4.5.2 Afinite kromatografisi

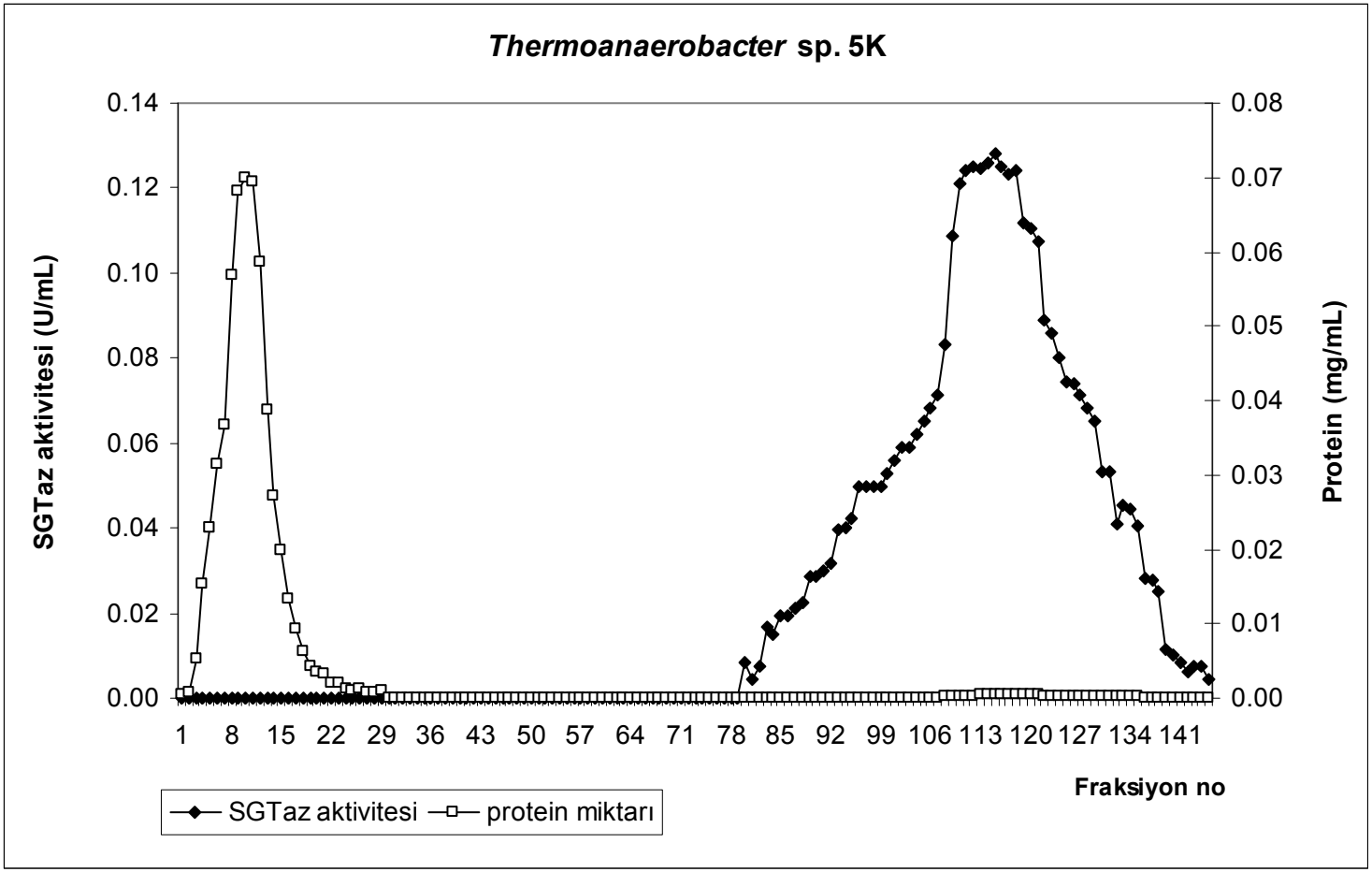
Thermoanaerobacter sp. P4 suşundan 2.2'L lik, *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşundan ise 2L fermentasyon sıvısındaki proteinler, amonyum sülfat ile çöktürülüp diyaliz edildikten sonra afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Bütün saflaştırma işlemlerinde kolondan geçen sıvı akış hızı 36 mL/saat olacak şekilde ayarlanmıştır. Diyaliz edilmiş protein çözeltisi bir peristaltik pompa ile daha önce hazırlanan kolona verilmiş ve daha sonra 10 mM pH 5.5 sodyum asetat tamponu ile kolon 6 saat yıkanarak ortamdaki SGTaz dışındaki proteinlerin uzaklaşması sağlanmıştır. Bu süre sonunda, % 1 α-SD içeren 10 mM pH 5.5 olan 250 mL sodyum asetat tamponu ile elüsyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen her fraksiyonda SGTaz aktivitesi ve protein ölçümü yapılmış ve sonuçlar Şekil 4.12 (*Thermoanaerobacter* sp. P4) ve Şekil 4.13'de

(*Thermoanaerobacter* sp. 5K) verilmiştir. Örnekler afinite kromatografisi kolonuna verildikten sonra yıkama tamponu ile birlikte fraksiyonlar alınmıştır.

Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'de görüldüğü gibi, yıkama tamponunun kolona verilmesiyle birlikte her fraksiyonda ölçülen protein miktarları yüksek bulunmuş, ancak SGTaz aktivitesi saptanamamıştır. Bu sonuçlardan SGTaz'ın kolonda tutulduğu ve SGTaz olmayan proteinlerin kolondan tutulmadan uzaklaştırıldığı anlaşılmıştır. Yıkama tamponunun kolona verilmesiyle birlikte 20-25 fraksiyon sonunda ortamda SGTaz dışında hiçbir proteinin kalmadığı anlaşılmıştır. Yıkama süresi uzun tutularak ortamdaki proteinlerin tamamen uzaklaştırılması ve saf SGTaz elde edilmesi amaçlanmış, 73. fraksiyondan sonra ortama α-SD içeren elüsyon tamponu verilmiş ve bu fraksiyondan sonra SGTaz aktivitesi gözlenmiştir. Elüsyon işlemine ortamdaki SGTaz'ın tamamen alınmasına kadar devam edilmiştir.



Şekil 4.12 *Thermoanaerobacter* sp. P4 suşunun afinite kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlarında ölçülen enzim aktiviteleri ve protein miktarları



Şekil 4.13 *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşunun afinite kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlarında ölçülen enzim aktiviteleri ve protein miktarları

Çizelge 4.5 *Thermoanaerobacter* sp. P4 suşunun SGTaz enzimin saflaştırılması için uygulanan yöntemler ve elde edilen toplu sonuçlar

	Hacim (mL)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite (U)	Spesifik aktivite (U/mg protein)	Verim (%)[a]	Saflaştırma katsayısı[b]
Süpernatant	2200	363	367	1.0	100	1
Diyaliz	34	4.35	55.8	12.8	15	12.8
Afinite kromatografisi	172	0.25	39.3	157.2	11	157.2

Çizelge 4.6 *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşunun SGTaz enzimin saflaştırılması için uygulanan yöntemler ve elde edilen toplu sonuçlar

	Hacim (mL)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite (U)	Spesifik aktivite (U/mg protein)	Verim (%)[a]	Saflaştırma katsayısı[b]
Süpernatant	2000	446	208	0.5	100	1
Diyaliz	25	5.9	44.3	7.5	21	15
Afinite kromatografisi	135	0.03	11.2	373.1	5	746.2

[a] (toplam aktivite/ süpernatant toplam aktivitesi)x100
[b] spesifik aktivite/süpernatant spesifik aktivitesi

SGTaz saflaştırılmasında α-SD afinite kromatografisi, pek çok araştırıcı tarafından kullanılmıştır (Hamilton vd. 2000). Wind vd. (1995) *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1'in SGTaz'ında C-terminal nişasta bağlama motifinin bulunduğunu ve bu durumda SGTaz'ın α-SD afinite kolonuna bağlanmasında direkt olarak nişasta bağlanma bölgesinin sorumlu olduğunu bildirmişlerdir. Aynı şekilde, *Bacillus circulans* 251'in SGTaz'ının da nişasta bağlama bölgesine SD'lerin sıkı bir şekilde bağlandığı belirlenmiştir (Knegtel vd. 1995, Penninga vd. 1996). Bu çalışmada

da α-SD'in enzimin bağlanma bölgesi ile sıkı bir interaksiyon gösterdiği anlaşılmıştır. SGTaz'ın α-SD'e olan afinitesinin α-SD'in yapısal olarak aktif bölgesine bağlanmaya afinite gösterdiği açıklanmıştır (Penninga vd. 1996).

Çizelge 4.5'de, *Thermoanaerobacter* sp. P4 suşunun saflaştırma sonuçları verilmiştir, burada toplam SGTaz aktivitesi 367 U ve toplam protein içeriği 363 mg olan 2200 L süpernatatın amonyum sülfatla çöktürülüp diyaliz edilmesi ile toplam 55.8 U SGTaz ve toplam 4.35 mg protein elde edilmiştir. Amonyum sülfat ile çöktürme ve diyaliz işlemleri ile toplam enzim aktivitesinin % 15'i geri kazanılmıştır. Afinite kromatografisi sonrasında ise elde edilen saf SGTaz'ın toplam aktivitesi 39.3U, toplam protein miktarı 0.25 mg ve spesifik aktivite de 157.2 olarak belirlenmiştir. Afinite kromatografisi ile saflaştırma sonucunda süpernatanttaki enzimin % 11'inin geri kazanıldığı ve saflaştırma katsayısının da 157.2 olduğu belirlenmiştir. Bu aşamada elde edilen düşük verimin yüksek hacimle çalışırken amonyum sülfat ilavesinin düzenli olarak yapılamamasından kaynaklandığı sanılmaktadır.

Thermoanaerobacter sp. 5K suşunun toplam SGTaz aktivitesi 208 U ve toplam protein içeriği de 446 mg olan 2000 L süpernatantının amonyum sülfat ile çöktürülüp diyaliz edilmesiyle 44.3 U enzim aktivitesi ve 5.9 mg protein elde edilmiştir (Çizelge 4.6) Bu aşamada diyaliz sonrası süpernatantaki toplam SGTaz aktivitesinin % 21'inin kazanıldığı hesaplanmıştır. Afinite kromatografisi ile saflaştırma sonucunda toplam SGTaz aktivitesinin 11.19 U'ye, toplam protein miktarının ise 0.03 mg'a düştüğü belirlenmiştir. Saflaştırma sonrasında SGTaz aktivitesi ile birlikte protein miktarı da çok düşük bulunmuş, spesifik aktivite ise 373.1 olarak hesaplanmıştır. Afinite kromatografisi sonrasında toplam verim % 5, saflaştırma katsayısı da 746 olarak olarak hesaplanmıştır.

Yukarıda açıklanan SGTaz saflaştırma işlemleri dışında *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp.5K suşlarının SGTaz'ları 3'er kez daha saflaştırılmış ve elde edilen SGTaz'lar enzim özelliklerinin belirlenmesi ve SD üretimi çalışmalarında kullanılmıştır ve bütün çalışmalarda benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Sian vd. (2005), *Bacillus* sp G1 ile yaptıkları bir saflaştırma çalışmasında amonyum sülfat ile çöktürme sonucunda, % 39.57 ve afinite kromatografisi uygulaması ile % 4.18 verime ulaşmışlardır. Bu sonuçlarla karşılaştırıldığında, bu çalışmada elde edilen sonuçlarda amonyum sülfat çöktürmesi ile verim kaybının daha yüksek, ancak saflaştırma sonrasında ulaşılan verimin daha yüksek olduğu anlaşılmışır.

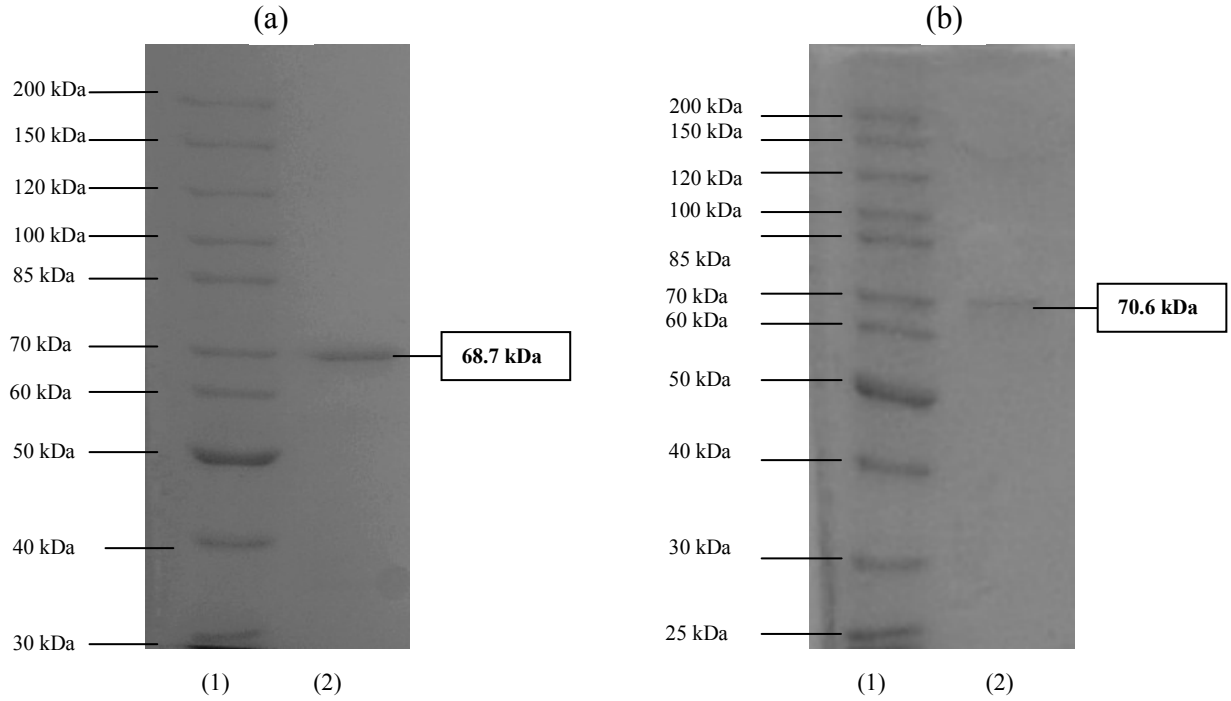
Wind vd. (1995) *Themoanaerobium thermosulfurigenes* EM1'in SGTaz genini E. coli'ye klonlayarak yaptıkları çalışmada 3 L'lik fermentörden toplam 324 U enzim aktivitesi ve 130 mg protein düzeyine ulaşmışlar, elde ettikleri süpernatantı direkt olarak afinite kolonundan geçirerek saflaştırmışlar ve bunun sonucunda da 225 U SGTaz aktivitesi ve 2.9 mg protein değerlerine ulaşmışlardır. Thiemann vd. (2004) ise *Anaerbranca gottschalkii* ile yaptıkları bir çalışmada 16 L'lik süpernatanttan toplam 273 U SGTaz aktivitesi ve 14.38 mg protein elde etmişler, saflaştırma sonrası da toplam aktiviteyi 37 U, protein miktarını da 0.12 mg, verimi ise % 13.5 olarak bildirmişlerdir.

Larsen vd. (1998) ise, *Paenibacillus* sp F8'in 1875 mL'lik süpernatantındaki SGTaz'ı β-SD Sepharose 6B ve jel filtrasyonu ile iki aşamada saflaştırmışlar ve 56.2 U toplam enzim aktivitesine sahip süpernatantın saflaştırma sonucunda % 30'unu geri kazanmışlar ve amonyum sülfatla çöktürme sonucunda ise % 33 verim elde etmişlerdir.

4.6 Saflaştırılan Enzim Özellikleri

4.6.1 Molekül ağırlığı

Şekil 4.14'te *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının saflaştırılmış enzimlerinin SDS-PAGE sonucunda oluşan bantları görülmektedir. Anlaşıldığı gibi, her bir enzim örneği SDS-PAGE jel elektroforezinde tek bir protein bandı oluşturmuştur. Buna göre, afinite kromatografisi ile elde edilen SGTaz'ın saf olduğu ve kullanılan kromatografik yöntemin SGTaz saflaştırmada etkili olduğu anlaşılmıştır. Kodak Molecular Imaging Software V.4.5.1 kullanılarak enzimlerin molekül ağırlıkları hesaplanmış ve *Thermoanaerobacter* sp. P4'ün SGTaz'ının 68.7 kDa *Thermoanaerobacter* sp. 5K'nın SGTaz'ının molekül ağırlığı ise 70.6 kDa olarak belirlenmiştir.



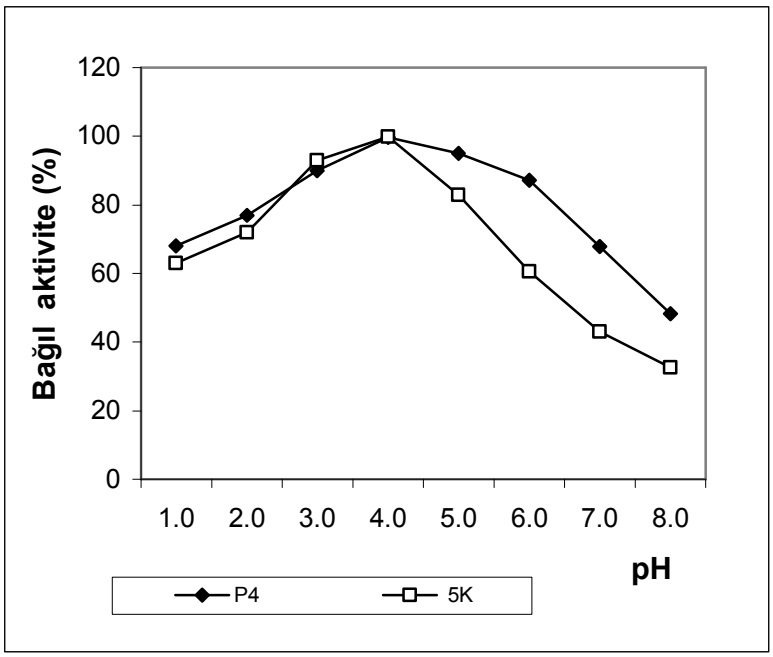
Şekil 4.14.a. *Thermoanaerobacter* sp. P4, b. *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının SDS-PAGE'deki yapılan protein bantlarının görünümleri
(1), Standart proteine (Fermentas) ait bant; (2), enzim proteinine ait bant

SGTaz enzimleri üzerinde, bugüne kadar yapılan çalışmalarda, farklı bakterilerden elde edilen SGTaz'ların molekül ağırlıklarının da, 55-110 kDa arasında değişkenlik gösterdiği belirtilmiştir. *Thermoanaerobacter* sp. ATCC 53627 (Norman ve Jorgensen 1992), *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1 (Wind vd. 1995), alkali termofilik *Anaerobranca gottschalkii* (Theimann vd. 2004), hipertermofilik arke *Thermococcus* sp B1001 (Tachibana vd. 1999), *Thermococcus kodakaraensis* (Rashid vd. 2002) ve *Pyrococcus furiosus*'un (Lee vd. 2007) SGTaz'larının molekül ağırlıkları sırası ile 75.5, 68, 78, 83, 67 ve 65 kDa olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen SGTaz'ların molekül ağırlıkları daha önce çalışılan termofilik anaerobik bakterilerin SGTaz'ları ile benzerlik göstermiştir. *Bacillus* türlerine ait SGTaz'ların ise genel olarak 68-88 kDa arasında olduğu saptanmış ancak bu aralığın dışında molekül ağırlığına sahip SGTaz'ların da olduğu bildirilmiştir. 38 kDa molekül ağırlığına sahip *Bacillus* türlerinin de olduğu belirlenmiştir (Tonkova 1998). Martins ve Hatti-Kaul (2002) ise *Bacillus agaradhaerens*'in SGTaz'ının molekül ağırlığını 110 kDa olarak belirlemişlerdir. Elde edildiği kayanağa göre SGTaz'ların molekül ağırlıkları farklılıklar göstermektedir.

4.6.2 Optimum pH ve sıcaklık

SGTaz enziminin optimum pH'sı 4-11 aralığında hem süpernatantta hem de saflaştırılan enzimde SGTaz aktivitesi ölçülerek belirlenmiş ve süpernatant ve saf SGTaz'ın optimum pH sıcaklıklarının aynı olduğu anlaşılmıştır. Şekil 4.15'te *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının saf SGTaz'larının değişen pH'larda ölçülen bağıl aktiviteleri görülmektedir.

Her iki bakteride de en yüksek enzim aktivitesine pH 7.0'de ulaşılmış, *Thermoanaerobacter* sp. P4 suşunun yüksek pH'lardaki aktivitesinin *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşuna göre daha iyi olduğu da anlaşılmıştır (Şekil 4.15).

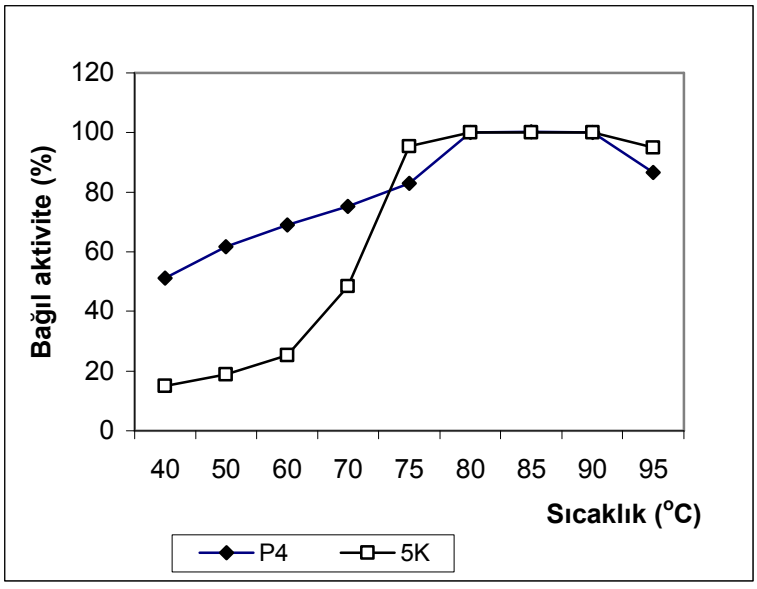


Şekil 4.15 *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının SGTaz'larının pH 4-11 arasındaki tamponlar kullanılarak ölçülen bağıl aktivite değerleri

Wind vd. (1995) *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1 ile yaptıkları çalışmada bu bakterinin SGTaz'ının pH 4.5-7.0 aralığında optimum aktiviteye sahip olduğunu saptamışlardır. Bir arke olan *Thermococcus kodakaraensis* KOD1'de ise pH 5.5-6.0 arasında optimum aktivite göstermiştir (Rashid vd. 2002).

Bacillus türlerinden elde edilen SGTaz'ların çoğunun pH 5.0 ile 8.0 arasında optimum aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Stavn ve Granum 1979, Martins ve Hatti-Kaul 2003, Sian vd. 2005, Rahman vd. 2006). *Kebsiella pneumoniae* AS-22'nin SGTaz'ı pH 7.0-7.5'de, *Paenibacillus* sp. F8'in SGTaz'ının pH 7.5'de optimum aktiviteye sahip olduklari belirlenmiştir (Larsen vd. 1998, Gawande ve Patkar 2001). *Bacillus agaradhaerens* ve *Brevibacterium* sp. No.9605'in, alkali pH'larda (pH 9.0 ve 10.0) optimum SGTaz aktivitesi gösterdikleri belirlenmiştir (Mori vd. 1994, Martins ve Hatti-Kaul 2003).

SGTaz enziminin optimum sıcaklığı 40-95 ^{o}C'lerde SGTaz aktiviteleri ölçülerek belirlenmiş ve bağıl aktiviteler hesaplanmıştır. Şekil 4.16'dan anlaşıldığı gibi her iki bakteri de 80-90 ^{o}C arasında maksimum aktivite göstermiş, daha yüksek sıcaklıklarda da enzim aktivitesinin yüksek olduğu görülmüştür. *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K'nın 95 ^{o}C'deki SGTaz aktiviteleri sırası ile % 13 ve % 5 oranında azalmıştır. *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşu 75 ^{o}C'nin altındaki sıcaklıklarda *Thermoanaerobacter* sp. P4'e göre oldukça düşük aktivite göstermiştir.



Şekil 4.16 *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının 40-95 ^{o}C sıcaklıklardaki bağıl SGTaz aktiviteleri

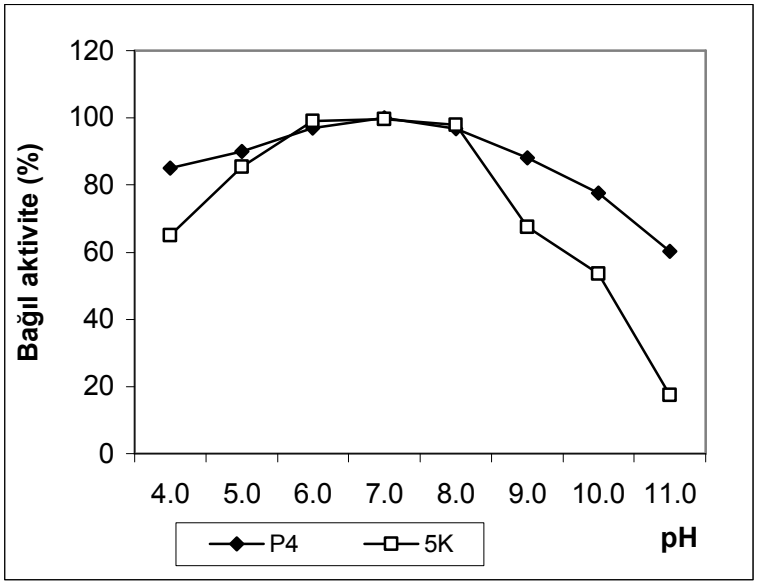
Buna göre, *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının optimum sıcaklık profilleri *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1 ve *Thermococcus* k*odakaraensis* KOD1'in SGTaz'larına yakınlık göstermektedir. *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1 SGTaz'ının optimumu 80-85 ^{o}C (Wind vd. 1995), *Thermococcus kodakaraensis* SGTaz'ının optimum sıcaklığı ise 80 ^{o}C olarak bildirilmiştir (Rashid vd. 2002). Bunların yanında daha yüksek sıcaklıklarda aktif olan SGTaz'lar da bulunmaktadır. Norman ve Jorgensen (1992) tarafından karakterize edilen *Thermoanaerobacter* sp. ATCC 53627'nin SGTaz'ının optimum sıcaklığı 92-95 ^{o}C, *Thermococcus* sp B1001'in 90-100 ^{o}C (Tachibana vd. 1999) ve *Pyrococcus furiosus*'un (Lee vd. 2007) ise 95 ^{o}C olduğu bildirilmiştir.

Termofil kaynaklı SGTaz'lar ile karşılaştırıldıklarında mezofilik kaynaklı SGTaz'ların optimum aktivite gösterdiği sıcaklıklar oldukça düşüktür. *Klebsiella pneumoniae* AS-22'nin SGTaz'ının, 45 ^{o}C'de optimum aktivite gösterdiği, 50 ^{o}C'nin üzerinde ise aktivitesini tamamen kaybettiği belirlenmiştir (Gawande ve Patkar 2001). *Bacillus agaradhaerens* LS-3C'nin SGTaz'ı ise 55 ^{o}C'de en yüksek aktiviteye ulaştığı ve 80 ^{o}C'de ise tamamen inhibe olduğu bildirilmiştir (Martins ve Hatti Kaul 2002). *Paenibacillus* sp. F8'in SGTaz'ı 50 ^{o}C'de (Larsen vd. 1998), *Bacillus* sp. 7-12 (Cao vd. 2005), *Bacillus macerans* (Stavn ve Granum 1979), *Bacillus* sp. TS1-1 (Rahman vd. 2006), *Bacillus stearothermophilus* (Ahn vd. 1990) ve *Bacillus* sp. G1'ın (Sian vd. 2005) 60 ^{o}C'de optimum aktivite gösterdikleri ve 80 ^{o}C ve üzerindeki sıcaklıklarda tamamen inhibe oldukları bildirilmiştir.

Thermoanaerobacter sp.P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının yüksek sıcaklıklarda optimum aktivite göstermesi bunların endüstriyel olarak önemini arttırmaktadır. Günümüzde endüstriyel üretimlerde *Bacillus* cinsine ait türlerin SGTaz'ları kullanılmaktadır, ancak bunların nişasta sıvılaştırma sıcaklığında aktif ve termostabil olmamaları, termofilik SGTaz'ların ise sıvılaştırma sıcaklığında aktif olmaları, endüstriyel kullanım açısından daha avantajlı kılmaktadır.

4.6.3 pH stabilitesi

Saf enzimin pH stabilitesi, pH 4-11 arasındaki tamponlara % 50 oranında saf SGTaz ilave edilerek ve 80 ^{o}C'de 1 saat bekletildikten sonra, kalan SGTaz aktivitesini ölçerek belirlenmiştir. Başlangıçtaki enzim aktivitesi üzerinden bağıl aktiviteler hesaplanarak pH stabilitesi belirlenmiş ve sonuçlar Şekil 4. 17'de verilmiştir.



Şekil 4.17 *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının SGTaz'larının pH 4-11 arasındaki tampon çözeltilerde bir saat bekletildikten sonra ölçülen aktivitelerinin bağıl değerleri

Şekil 4.17'de de görüldüğü gibi, *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp.5K suşlarının SGTaz'ları pH 6.0-8.0 arasında stabil olmuşlar, pH 9.0'un üzerindeki pH'larda özellikle *Thermoanaerobacter* sp. 5K aktivitesini önemli oranda kaybetmiştir. *Thermoanaerobacter* sp. P4'ün SGTaz'ı, pH 4.0'de aktivitesinin % 85'ini, pH 11.0'de ise % 60'ını koruyabilmiştir. Buna karşın *Thermoanaerobacter* sp 5K pH 4.0'de aktivitesinin % 65'ini pH 11.0'de ise ancak % 17'sini koruyabilmiştir. Farklı pH'larda, *Thermoanaerobacter* sp P4'ün *Thermoanaerobacter* sp. 5K'ya göre daha stabil olduğu ve ekstrem pH'ların özellikle endüstriyel çalışmalar için *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşunun SGTaz'ından daha uygun olduğu anlaşılmıştır.

Thermoanaerobacter sp. P4'e benzer şekilde *Paenibacillus* sp F8 SGTaz'ının pH 6-9 arasında 1 saat bekletildiğinde stabilitesini koruyabildiği bildirilmiştir (Larsen vd. 1998). Martins ve Hatti Kaul (2002) ise *Bacillus agaradhaerens* SGTaz'ı ile yaptıkları çalışmada enzimi 25 ^{o}C'de 1 saat beklettikten sonra pH 5.4 ile 11.0 arasında aktivitenin % 100'ünün korunduğunu belirlemişlerdir. Cao vd. (2005) *Bacillus* sp. 277 suşunun SGTaz'ının pH 6-10 aralığında stabil olduğunu, bu aralıkların dışında ise aktivitede hızlı bir düşme olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde, *Klebsiella pneumoniae*'nın SGTaz'ının da pH 6.0-9.0 aralığında aktif olduğu bildirilmiştir (Gawande ve Patkar 2001).

Bacillus sp. TS1-1 ve *Bacillus* sp. G1'in SGTaz'larının pH 7.0-9.0 aralığında stabil olduğu ancak bunların dışındaki pH'larda aktivitesinin önemli oranda düşme gösterdiği belirlenmiştir (Sian vd. 2005, Rahman vd. 2006).

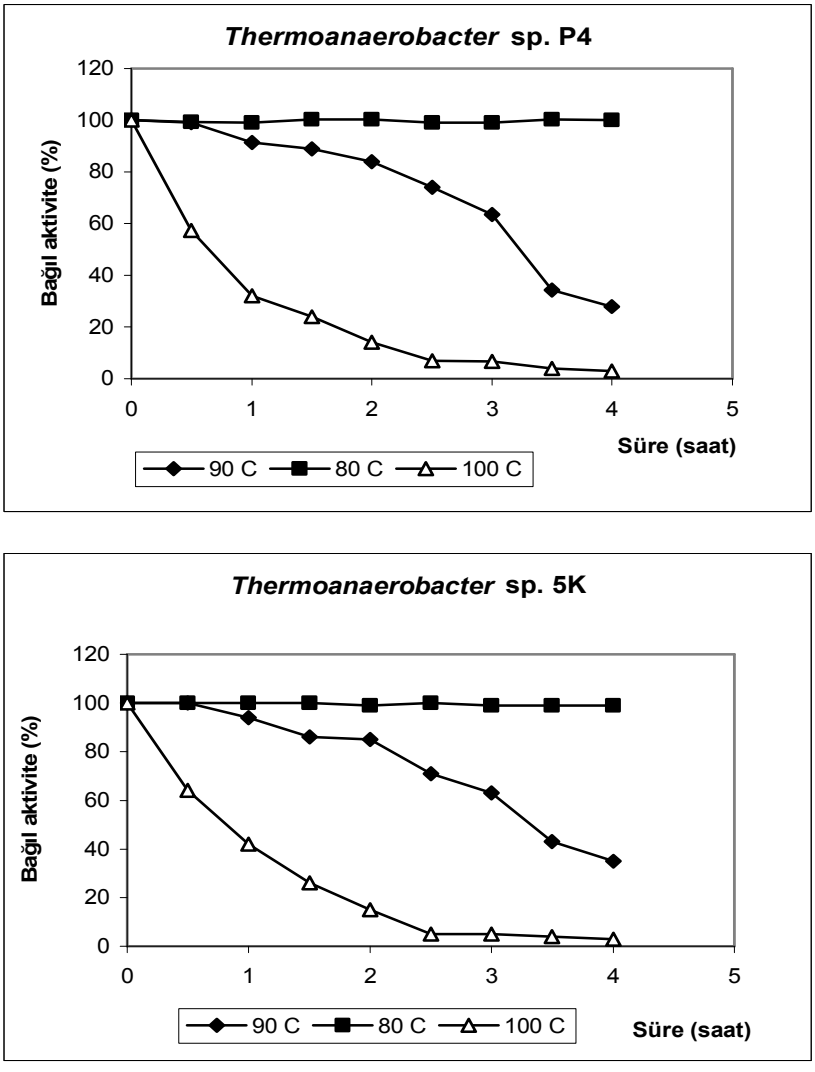
4.6.4 Termal stabilite

SGTaz'ların termal stabilitelerini belirlemek için, enzim çözeltileri 50 mM pH 6.0 sodyum asetat tamponu içinde 80, 90 ve 95 ^{o}C'lerde 4 saat bekletilmiş ve her 30 dakikada örnek alınarak enzim aktiviteleri ölçülmüş ve başlangıçtaki enzim aktivitesine göre bağıl aktiviteleri hesaplanmıştır. Elde edilen bulguların verildiği Şekil 4.18'de görüldüğü gibi, 80 ^{o}C'de 4 saat bekletildiğinde *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K'nın SGTaz aktivitelerinde herhangi bir değişiklik olmamış ve başlangıçtaki aktivitelerinin % 100'ünü koruyabilmişlerdir.

Thermoanaerobacter sp. P4 suşunun SGTaz'ı 90 ^{o}C'de 1,2,3 ve 4. saatlerde toplam aktivitesinin sırası ile % 91, 84, 63 ve 28'ini, *Thermoanaerobacter* sp 5K ise % 94, 85, 63 ve 35'ini koruyabilmiştir. 100 ^{o}C'de ise 1 saat içinde *Thermoanaerobacter* sp. P4'ün SGTaz aktivitesinin % 32'si, *Thermoanaerobacter* sp 5K suşunun ise % 42'si korunmuştur.

Wind vd. (1995) *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1'in SGTaz enzimi ile yaptıkları çalışmada enzimde 70 ^{o}C'de 5 saat sonunda aktivite kaybı gözlenmediğini,

aktivitenin sabit kaldığını, 80 ^{o}C'de % 10, 90 ^{o}C'de % 40, 100 ^{o}C'de ise 2 saat sonunda % 75 aktivite kaybettiğini bildirmişlerdir. Wind vd. (1995), bu çalışmayı ortamda nişasta varlığında yapmışlar, ortamda enzimle birlikte nişasta bulunduğunda termal stabilitenin arttığını bildirmişlerdir. Nişasta olmayan ortamda 30 dakika içinde aktivite kaybının % 90'ın üzerinde ve nişastalı koşullarda ise yaklaşık % 5 olduğunu belirlemişlerdir.



Şekil 4.18 *Thermoanaerobacter* sp P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının 80, 90 ve 100 ^{o}C sıcaklıklarda 4 saat bekletildiklerinde aktivitelerinde oluşan kayıpların bağıl değerleri

Bu çalışmada nişastanın SGTaz stabilitesine etkisi belirlenmemiştir. Wind vd. (1995)'in aynı koşullarda belirledikleri *Thermoanaerobacterium* EM1'in 90 ^{o}C'de 30 dakikadaki

stabilitesi (% 5) ile karşılaştırıldığında *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp 5K'nın termal stabilitelerinin (sırası ile % 99 ve % 100) oldukça iyi olduğu anlaşılmaktadır.

Günümüzde endüstride kullanılan enzimlerin çoğu mezofilik bakterilerden elde edilmektedir, bunların pek çok avantajı olmasına karşın yüksek sıcaklıklarda stabil olmamalarından dolayı, uygulamada dezavantajları bulunmaktadır (Gomes ve Steiner 2004). Termofilik bakterilerin enzimlerinin en büyük avantajları yüksek sıcaklıklarda aktivite göstermeleri ve termostabilitelerinin mezofilik enzimlere göre oldukça yüksek olmasıdır. Mezofilik enzimler 60 ^{o}C'nin üzerindeki sıcaklıklarda aktivite gösteremezlerken, termofiller aktiftir. Sian vd. (2005) *Bacillus* sp. G1'in 60 ^{o}C'de 30 dakika stabilitesini koruyabildiğini, 70 ^{o}C'de ise 30 dakikada aktivitesinin % 50'sini 80 ^{o}C'de % 86'sını kaybettiğini, 90 ^{o}C'ise tamamen inhibe olduğunu belirlemişlerdir. *Klebsiella pneumoniae*'nin ise 40 ^{o}C'nin üzerindeki sıcaklıklarda 20 dakikada stabilitesini kaybettiği bildirilmiştir (Gawande ve Patkar 2001). *Bacillus* sp. 7-12'nin SGTaz'ı da 80 ^{o}C'de 30 dakika içinde aktivitesinin % 86'sını kaybetmiştir (Cao vd. 2005). *Bacillus agaradhaerens*'in SGTaz'ının da 40 ^{o}C'nin üzerindeki sıcaklıklarda stabil olmadığı belirlenmiştir (Martins ve Hatti- Kaul 2002).

4.6.5 Enzim aktivitesine çeşitli metallerin etkisi

Thermoanaerobacter sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının SGTaz'larına bazı metallerin 1 mM ve 10 mM konsantrasyonlarının etkisi Çizelge 4.7'de gösterilmiştir. Anlaşılacağı gibi, çeşitli metallere *Thermoanaerobacte*r sp. P4 suşunun SGTaz'ının *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşuna göre daha dayanıklıdır. 1 mM konsantrasyonlarda *Thermoanaerobacter* sp. P4 suşu, sadece $HgSO_4$ ve $AgNO_3$'tan önemli oranda (sırası ile % 41 ve % 75) etkilenmiş, bu metallerin 10 mM konsantrasyonları enzimi tamamen inhibe etmiştir. *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşunun SGTaz'ı ise bu metallerin hem 1 mM hem de 10 mM konsantrasyonlarında inhibe olmuştur.

Çeşitli metallerin SGTaz aktivitesine etkileri bazı araştırıcılar tarafından belirlenmiş ve aynı metallerin farklı bakterilerin SGTaz aktivitesine etkilerinin farklılık gösterdiği anlaşılmıştır. Sian vd. (2005) *Bacillus* sp. G1'in SGTaz'ının aktivitesini 1 mM $FeCl_2$'ün % 189 oranında arttırdığını bildirmişler, buna karşın *Bacillus agaradhaerens*'in SGTaz'ını aynı konsantrasyondaki $FeCl_2$'ün % 89.8 oranında inhibe ettiği belirlenmiştir (Martins ve Hatti-Kaul 2002). Cao vd. (2005) $CuSO_4$, $AgNO_3$, $CoCl_3$, $MgSO_4$, $ZnSO_4$ ve $FeSO_4$'ın 1 mM konsantrasyonlarının *Bacillus* sp.277'nin SGTaz'ını önemli oranda inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

Çizelge 4.7 Bazı metallerin SGTaz aktivitesine etkisi

	Bağıl Aktivite (%)			
	Thermoanaerobacter sp. P4		*Thermoanaerobacter* sp. 5K	
	1 mM	10 mM	1 mM	10 mM
Kontrol	100	100	100	100
$AlCl_3.6H_2O$	89	76	89	74
$AgNO_3$	75	0	15	0
$CoCl_3$	86	75	76	50
$CuSO_4.5H_2O$	90	67	78	41
$MgSO_4.7H_2O$	96	83	58	23
$MnCl.4H_2O$	96	67	76	35
$FeCl_2.4H_2O$	94	64	91	43
$BaCl_2.2H_2O$	96	78	92	42
KCl	95	75	82	33
$ZnSO_4.7H_2O$	98	75	100	61
$HgSO_4$	41	10	35	0
$CaCl_2$	107	102	105	100

Metallerin SGTaz enzimlerine olan inhibitör etkisinin enzim aktif merkezinde siklizasyon reaksiyonu için gerekli olan aminoasit residülerini okside etmelerinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Martins ve Hatti-Kaul 2002). Bu aminoasitlerden en önemlilerinin triptofan ve siklizasyon reaksiyonunda önemli rolleri olan spesifik tirozin ve histidin residülerinin olabileceği bildirilmiştir (van der Veen vd. 2000a, van der Veen vd. 2000b).

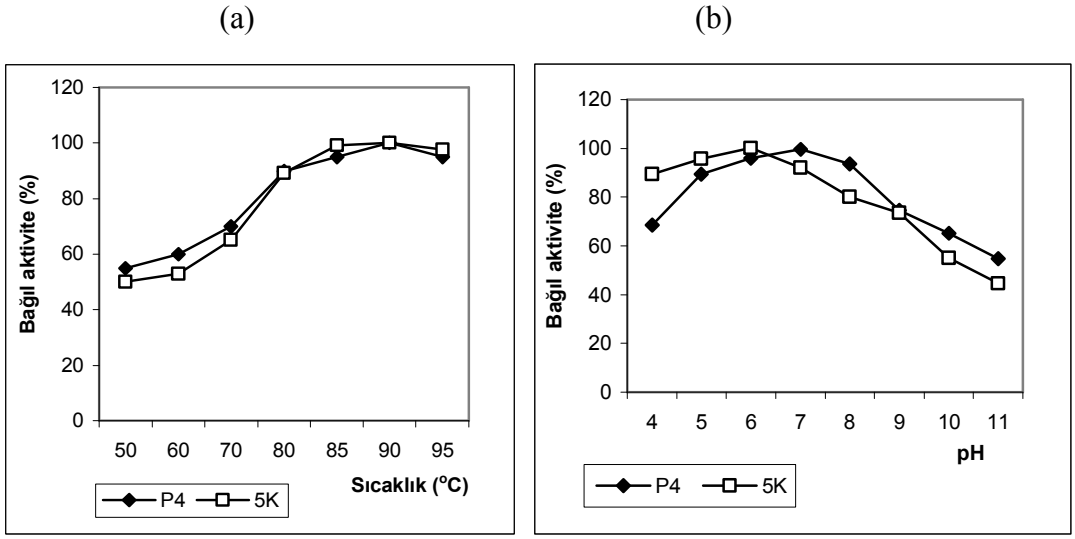
Bu çalışmada kullanılan metallerden sadece Ca^{2+} enzim aktivitesini arttırmıştır. 1 mM $CaCl_2$ varlığında *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K'nın SGTaz'larında sirası ile % 7 ve % 5 oranlarında artış olmuştur. $CaCl_2$'ün SGTaz aktivitesini stabilize ettiği, pek çok araştırıcı tarafından belirlenmiştir. *Bacillus* sp. G1 (Sian vd. 2005), *Bacillus agaradhaerens* (Martins ve Hatti-Kaul 2002), *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1 (Wind vd. 1995), *Klebsiella pneumoniae* AS-22 (Gawande ve Patkar 2001) ve *Anaerobranca gottschalkii*'nin (Theiman vd. 2004) SGTaz'larının $CaCl_2$ varlığında daha yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Buna karşın $CaCl_2$'ün, *Bacillus* sp. 277'nin SGTaz'larına herhangi bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Cao vd. 2005). SGTaz aktivisindeki bu artışın Ca^{2+} veya Cl^- iyonlarının tüm α-amilaz ailesi enzimlerinde aktif merkezlerdeki aminoasitlerle etkilişiminden kaynaklanabileceği bildirilmiştir. α-amilaz ailesine ait bazı enzimlerde Cl^- iyonlarının katalitik bölgenin aktivasyonu ve konformasyonel değişimleri indüklemesindeki görevleri belirlenmiş, ancak bunun SGTaz üzerine etkileri henüz belirlenmemiştir (Martins ve Hatti-Kaul, 2003).

4.6.6 Enzimin hidroliz aktivitesi

Enzimatik yöntemler ile SD üretimindeki ilk işlem, nişastanın sıvılaştırılmasıdır. *Bacillus* SGTaz'ları ile SD üretiminde, sıvılaştırma işlemi, sıcaklığa dayanıklı α-amilaz, HCl gibi asitler veya mekanik yollarla yapılmaktadır. *Bacillus* SGTaz'larının hem hidroliz aktiviteleri düşük, hem de yüksek sıcaklıklara dayanıklı olmadığı bilinmektedir. Buna karşın, termofilik bakterilerden elde edilen SGTaz'lar hem *Bacillus*'lardan daha yüksek hidroliz aktivitesine sahip hem de yüksek sıcaklıklarda aktif olduklarından

bunlarla çalışıldığında endüstriyel üretimlerde, nişastanın sıvılaştırma aşaması elemine edilebilmektedir (Uitdehaag vd. 2002, Alcalde vd. 2001).

Thermoanaerobacter sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının her ikisinin de hidroliz aktivitesine sahip olduğu ve 90 ^{o}C'de maksimum aktivite gösterdikleri saptanmıştır (Şekil 4.19). *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının SGTaz'larının 80 ^{o}C'deki hidroliz aktiviteler sırası ile 55.3 ve 40.4 U/mg protein olarak belirlenmiştir. *Thermoanaerobacter* sp. ATCC 53627'nin SGTaz'ının hidroliz aktivitesinin 82 U/mg, *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1'in ise 30 U/mg olduğu bildirilmiştir (Norman ve Jörgensen 1992, Wind vd. 1995). Bu çalışmada elde edilen değerler, bu iki termofilik anaerobik bakterinin hidroliz aktivitelerine benzerlik göstermektedir. Buna karşın, aerobik mezofilik bakterilerden elde edilen SGTaz'ların olarak düşük hidroliz aktivitesine sahip oldukları bildirilmiştir (Alcalde vd. 2003). Örneğin, *Bacillus stearothermophilus* ve *Bacillus agaradhaerens*'in SGTaz'larının hidroliz aktiviteleri sırası ile 1.9 ve 7.5 U/mg protein olarak belirlenmiştir (Stefanova vd. 1999, Martins ve Hatti-Kaul 2003).



Şekil 4.19.a. *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının SGTaz'larının hidroliz aktivitelerinin optimum sıcaklıkları, b. optimum pH'ları

Wind vd. (1995), *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1'in SGTaz optimum siklizasyon aktivitesinin 80-85 ^{o}C, hidroliz aktivitesini ise optimum 90-95 ^{o}C'de belirlemişlerdir. *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının SGTazları da, 80-85 ^{o}C'de maksimum siklizasyon, 90 ^{o}C'de maksimum hidroliz aktivitesi göstermesi bu değerlerin literatür bilgisi ile örtüştüğünü göstermektedir.

4.6.7 Enzimin birleştirme (coupling) aktivitesi

SGTaz'ların birleştirme aktivitesi, SD halkasının açılarak doğrusal dekstrin akseptör olan başka bir linear maltooligosakkarite transfer edilmesidir (Rashid vd. 2002) ve genel olarak bu işlem siklizasyon reaksiyonunun tersi bir işlemdir (Uitdehaag vd. 2002). SGTaz enziminin katalizlediği birleştirme reaksiyonları 14C'lu indirgen uçlu maltodekstrinlerin sentezlenmesinde, metil α- ve β-maltodekstrin glikozitlerinin sentezlenmesinde, salisin analogları oluşturmak için glikozillenmiş salisil alkol sentezinde, 9-25 D-glikopiranoz uniteleri içeren yüksek moleküllü siklomaltodekstrinlerin sentezinde kullanılmaktadır (Yoon ve Robyt 2006).

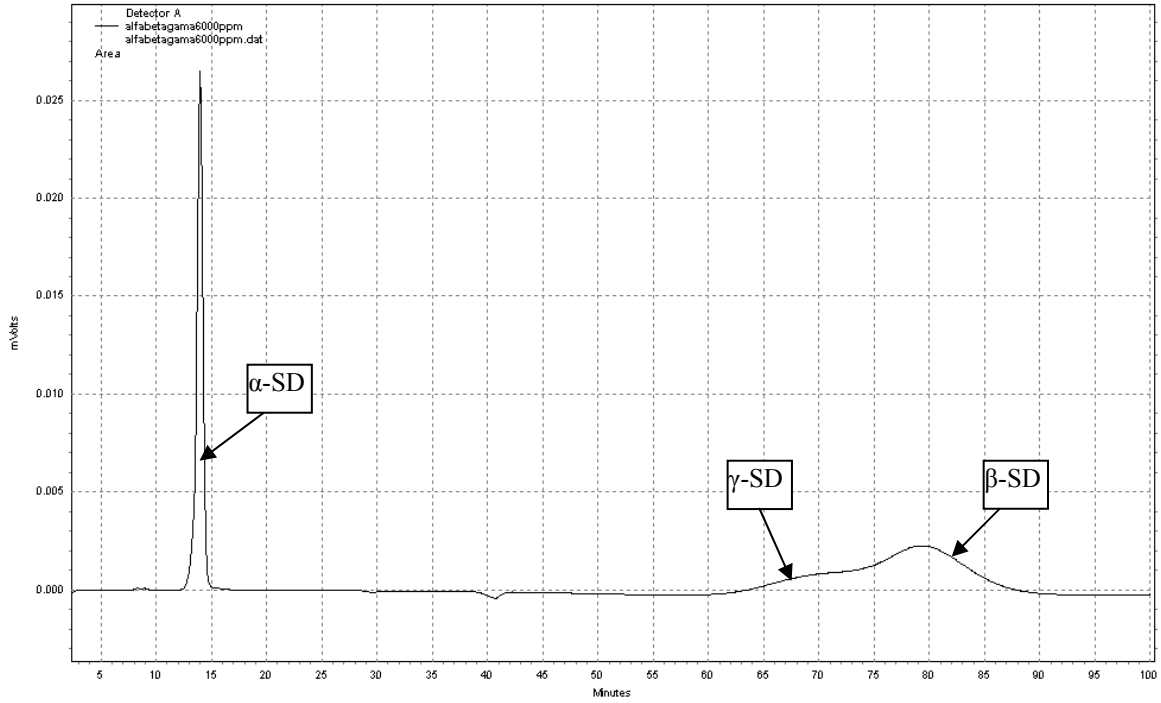
Themoanaerobacter sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının saflaştırılmış enzimlerinin birleştirme aktiviteleri Çizelge 4.8'de verilmiştir. Çizelge'den anlaşılacağı gibi *Thermoanaerobacter* sp 5K'nın SGTaz'ının birleştirme aktivitesi *Thermoanaerobacter* sp P4'ün SGTaz'ından daha yüksektir. Enzim üretim çalışmalarında *Thermoanaerobacter* sp 5K'nın SGTaz aktivitesinde 24-30. saatlerden sonra gözlenen hızlı düşmenin (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9) yüksek birleştirme aktivitesinden kaynaklandığı anlaşılmıştır.

Çizelge 4.8 *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K'nın SGTaz'larının spesifik birleştirme (coupling) aktivitesi

Mikroorganizma	Spesifik birleştirme aktivitesi (U/mg protein)	
	α-SD	β-SD
Thermoanaerobacter sp. P4	398.7	237.8
Thermoanaerobacter sp. 5K	515.5	422.8

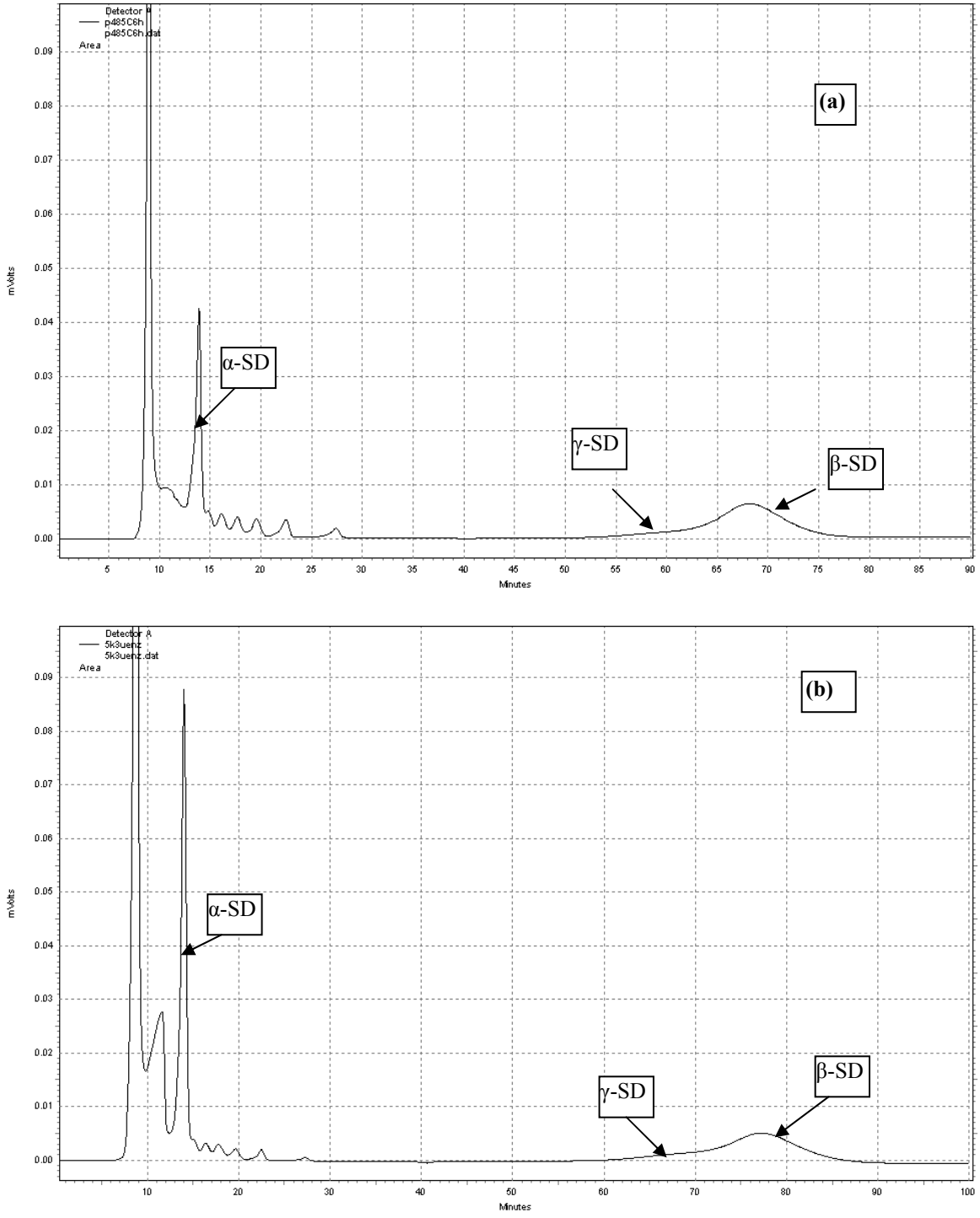
4.7 Siklodektrinlerin Üretimi

Thermoanaerobacter sp P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K şuslarının SGTaz'larının 80 ^{o}C'de yapılan SD üretim çalışmasında, 40 g/L çözünür patates nişastası ve 1 g substrat için 1 U enzim ilave edilmiş ve belirli aralıklarla alınan örneklerde HPLC ile oluşan SD'ler belirlenmiştir. HPLC'de kullanılan kolon sıcaklığı 80 ^{o}C, kolon akış hızı 0.3 mL/dak olarak ayarlanmıştır. α-,β- ve γ-SD'lerin ayrı ayrı standart eğrileri hazırlanmış, ayrıca her üç SD'nin de standart çözeltileri birlikte kolona verilmiştir. Elde edilen sonuçlarda β ve γ-SD'lerin kolonda kalış süreleri birbirine çok yakın olduğu, bu iki standardın piklerinin birbirinden ayrılamadığı gözlenmiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20 HPLC'de α-,β- ve γ-SD'lerin standart kromatogramı. Standart çözeltilerin herbirinin konsantrasyonu 6 g/L olacak şekilde hazırlanmıştır

Şekil 4.21'de görüldüğü gibi, SGTaz ile üretilen SD örneklerinde yapılan HPLC analizlerinde de aynı durum gözlenmiş, β- ve γ-SD'ler HPLC kolonunda birbirinden ayrılamamış ve bu nedenle β- ve γ-SD'ler miktarları toplam olarak birlikte hesaplanmıştır. Oluşan pik alanları standartlarda elde edilen alanların ortalaması alınarak hesaplamalar yapılmıştır. Şekil 3.21'den de anlaşılacağı gibi β-SD'nin miktarı, γ-SD'den daha fazladır, ayrıca pikler birbirine girdiği için gerçek alanlar da hesaplanan alanlardan daha fazla ve gerçek üretilen β- ve γ-SD'lerin miktarları da bu raporda verilen miktarlardan daha fazla olduğu anlaşılmıştır.



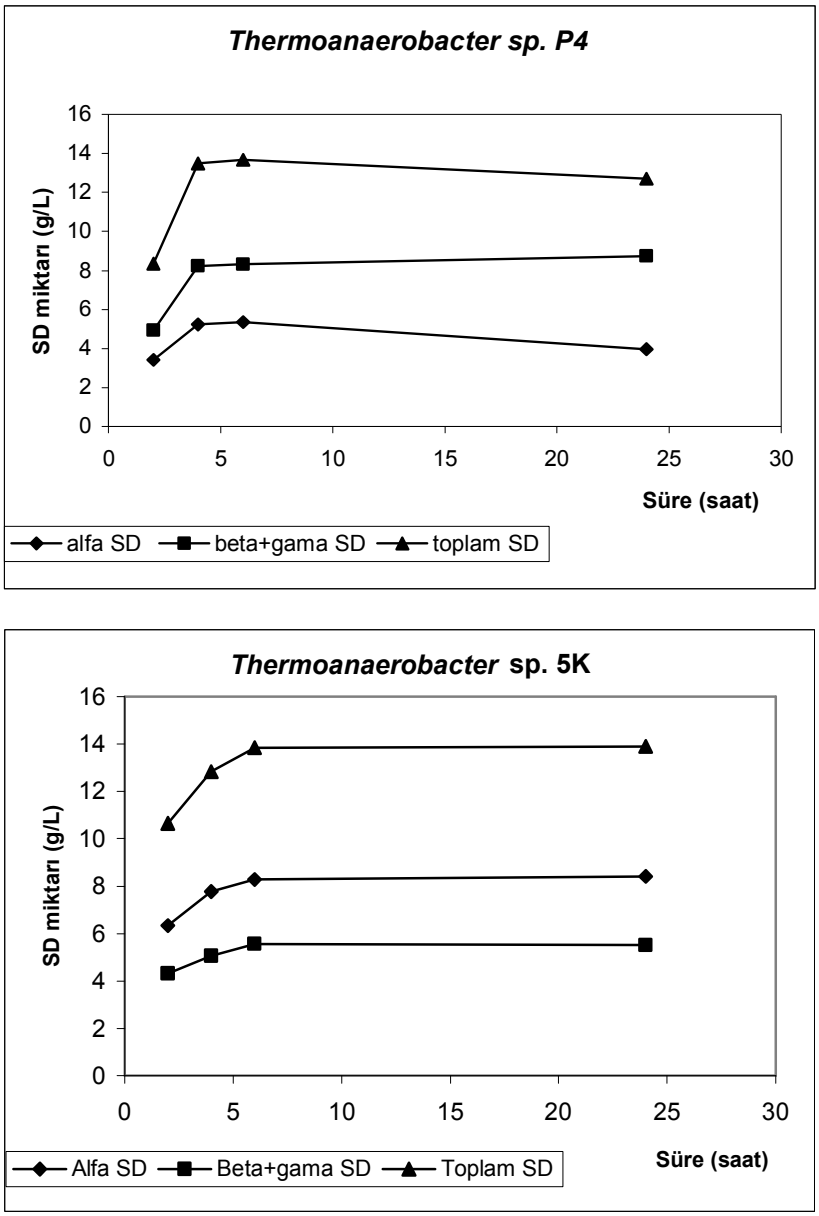
Şekil 4.21.a. *Thermoanaerobacter* sp. P4, b. *Thermoanaerobacter* sp. 5K'nın SGTazları ile üretilen SD'lere ait kromatogramlar

Ayrıca, β-SD'in molekül ağırlığının γ-SD'den küçük olmasına karşın kolonda daha uzun süre tutulmasının nedeninin β-SD'in suda çözünürlüğünün (% 1.85), γ-SD'e (% 23.2) göre daha az olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Şekil 4.22'de 80 ^{o}C'de *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp 5K'nın SGTaz'ları ile üretilen SD miktarları verilmiştir. *Thermoanaerobacter* sp P4 SGTaz'ının inkübasyonun 2, 4, 6 ve 24. saatlerinde sırası ile 3.4, 5.3, 5.3, 4.0 g/L α-SD; 4.9, 8.2, 8.3 ve 8.8 g/L β- ve γ-SD üretmişlerdir. Bu sürelerdeki toplam SD verimi ise sırası ile % 20.8, % 33.7, % 34.2 ve % 31.7 olarak hesaplanmıştır. Enzim ve substratın inkübasyonunun 6. saatinden sonra α-SD oranında azalma β- ve γ-SD oranlarında ise bir artış olduğu gözlenmiştir. İnkübasyonun 6. saatinde oluşan toplam SD'lerin % 39 α-SD, % 61 ise β- ve γ-SD olarak hesaplanmıştır.

Thermoanaerobacter sp 5K suşunun SGTaz'ı da aynı sürelerde sırası ile 6.3, 7.8, 8,3, 8,2 g/L α-SD; 4.3, 5.1, 5.6, 5.5 g/L β- ve γ-SD oluşturmuştur. Bu sürelerdeki verim ise, sırası ile % 26.6, % 32, % 34.6, % 34.8 olarak hesaplanmıştır. Her iki suşun SGTaz'ı ile üretimde 4-6 saat inkübasyon sonunda SD üretiminin en yüksek düzeye ulaştığı anlaşılmış, 6. saatte üretilen toplam SD'lerin % 60 α-SD; % 40 ise β- ve γ-SD olduğu saptanmıştır.

Çeşitli araştırıcılar tarafından yapılan çalışmalarda, farklı kaynaklardan elde edilen SGTaz'ların α-, β- ve γ-SD karışımını oluşturduğu ve karışımda en çok bulunan SD'e göre α-, β- ve γ-SGTaz olarak da isimlendirildiği bildirilmektedir (Pishtiyski ve Zhekova 2006). Günümüzde bilinen SGTaz'ların çoğunun daha çok β-SD oluşturduğu, α- ve γ-SD oluşturan SGTaz'ların oldukça az olduğu, *Klebsiella pneumoniae* M 5, *Bacillus macerans* IAM 1243, *Klebsiella pneumonia* AS-22 ve *Klebsiella oxytoca* 19-1 türleri α-SGTaz üreticisi, *Bacillus* sp. AL-6, *Bacillus* sp. G-825-6 ve *Brevibacterium* sp. No.9606 ise γ-SGTaz oluşturan türler olarak bilinmektedir (Gawande ve Patkar 2001, Hirano vd. 2006).



Şekil 4.22 *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının SGTaz'larının, 80 ^{o}C'de değişen inkübasyon süresinde oluşturduğu SD oranları

Bu çalışmada tanımlanan, *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşunun SGTaz enziminin ağırlıklı olarak α-SD (% 60) ürettiği ve bu nedenle enzimin bir α-SGTaz olarak isimlendirilebileceği anlaşılmıştır. *Thermoanaerobacter* sp P4'ün ise % 40 oranında α-SD ürettiği ancak, β- ve γ-SD'lerin miktarları ayrı ayrı hesaplanamadığından bunun ağırlıklı olarak hangi SD'i ürettiğini belirlemek mümkün olmamıştır.

SD üretiminde, enzim aktivitesi için tüm optimum koşullar ve enzim aktivitesi sağlansa bile nişastanın SD'lere tamamen dönüşümünün olanaksız olduğu bildirilmiş ve bunun nedeninin SGTaz'ın nisaştanın yapısında bulunan amilopektindeki α-1,6 bağlarına etki edememesinden kaynaklandığı açıklanmıştır (Rendleman 1996). Bu çalışmada elde edilen bulgularla da nişastanın büyük kısmının SD'lere dönüştürülemediği görülmüştür.

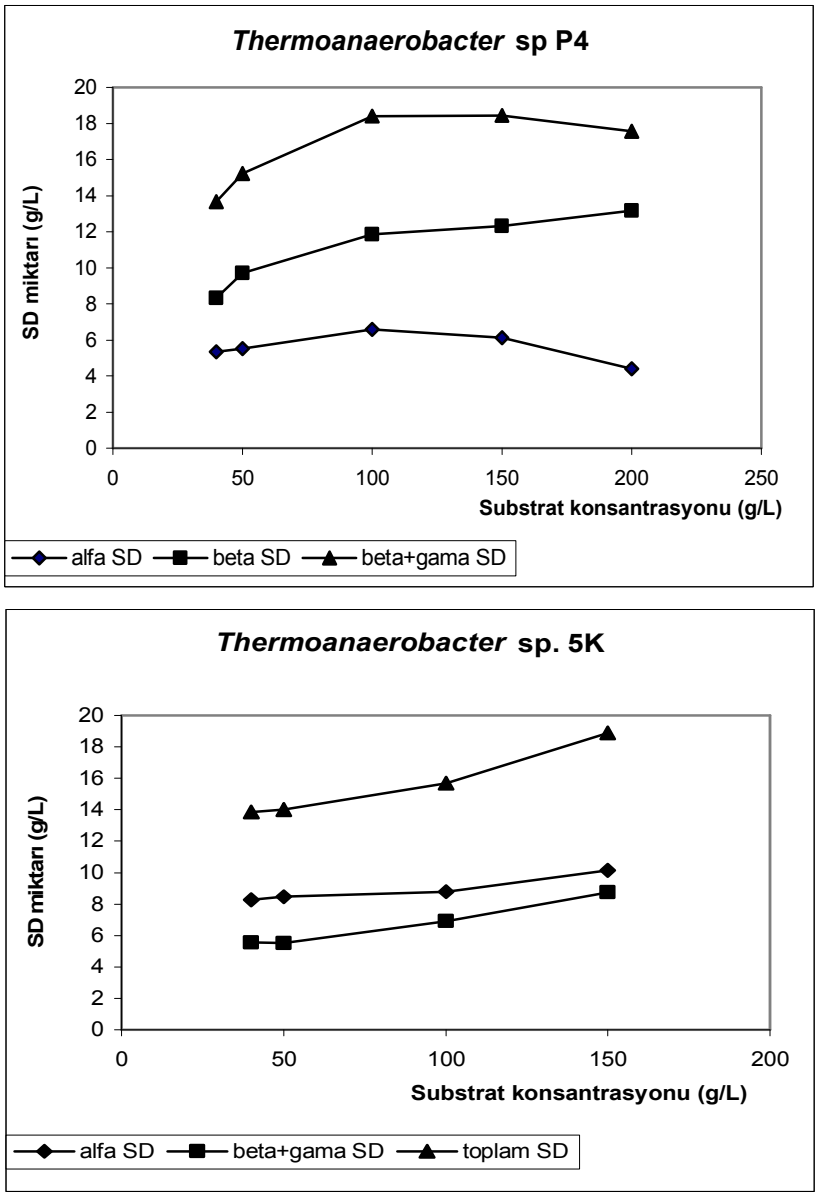
SD üretimindeki temel problemin, ortamdaki yüksek viskoziteden kaynaklanan yetersiz karıştırma ve bu nedenle enzim substratın etkileşiminin engellenmesi olduğu, bu nedenle fiziksel, kimyasal veya enzimatik yollarla nişastanın parçalanmasının gerektiği bildirilmiştir (Biwer ve Heinzle 2004). Endüstriyel üretimlerde kullanılan mezofilik bakterilerin SGTaz'ları ile ön işlem uygulamadan SD üretiminin mümkün olmadığı açıklanmıştır (Wind vd. 1995). Bununla birlikte, SD üretiminde termostabil SGTaz'ların kullanılması ile günümüzde uygulanan üretim yöntemindeki nişastanın hidrolizi aşaması elimine edilerek tek bir enzim ile SD'lerin üretimi mümkündür. Bu çalışmada, hem *Thermoanaerobacter* sp. P4 hem de *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının SGTaz enzimlerinin jelatinizasyon, asit veya α-amilaz ile hidroliz gibi ön işlemler uygulamadan nişastayı parçalayıp SD'leri oluşturduğu belirlenmiştir.

4.7.1 Substrat konsantrasyonun siklodekstrin üretimine etkisi

Substrat konsantrasyonunun SD üretimine etkisini belirleme çalışmalarında, pH 6.0, 10 mM sodyum sitrat tamponu içerisinde konsantrasyonları 40, 50, 100, 150 ve 200 g/L olacak şekilde çözünür patates nişastası hazırlanmış ve bu çözeltiye gram substrat için 1 U enzim ilave edilerek, 80 ^{o}C'de 6 saat boyunca inkübe edilmiştir. Şekil 4.23'te *Thermoanaerobacter* sp P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K'nın SGTaz'ları ile bu çalışmada elde edilen sonuçlar verilmiştir. Şekil 4.23'ten anlaşılacağı gibi, hem *Thermoanaerobacter* sp. P4 hem de *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının SGTaz'ı ile üretilen α-SD oranı artan nişasta konsantrasyonun ile birlikte artmış, ancak *Thermoanaerobacter* sp. 5K'daki artış daha fazla olmuştur.

Thermoanaerobacter sp P4 SGTaz'ı 40, 50, 100, 150 ve 200 g/L nişasta konsantrasyonunda sırası ile 5.3, 5.5, 6.8, 6.1 ve 4.4 g/L α-SD, 8.3, 9.7, 11.9, 12.3 ve

13.2 g/L β- ve γ-SD oluşturmuştur (Çizelge 4.9). Substrat konsantrasyonu arttıkça, SD miktarlarında da artış olduğu gözlenmiş, ancak artan substrat konsantrasyonu ile birlikte verimin de düştüğü gözlenmiştir. 40, 50, 100, 150 ve 200 g/L substrat konsantasyonlarındaki verimler sırası ile % 34.4, 30.4, 18.4, 12.3 ve 8.8 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.9).



Şekil 4.23 *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının farklı nişasta konsantrasyonlarındaki SD üretim miktarları

Thermoanaerobacter sp. 5K suşunun SGTaz'ının 40, 50, 100 ve 150 g/L nişastalı koşullardaki SD üretimi sırası ile 8.3, 8.5, 8.8, 10.2 g/L α-SD; 5.6, 5.5, 6.9, 8.7 g/L β- ve γ-SD olmuştur (Çizelge 4.9). *Thermoanaerobacter* sp. P4 suşunda olduğu gibi bu suşun SGTaz'ında da 40 g/L nişastalı ortamda en yüksek verim elde edilmiş, artan substrat konsantrasyonlarında verim düşmüştür.

Çizelge 4.9 *Thermoanaerobacter* sp P4 ve *Thermoanaerobacter* sp 5K suşlarının SGTaz'ları ile farklı substrat konsantrasyonlarında elde edilen SD'lerin miktarları, SD verimi ve SD'lerin oranları

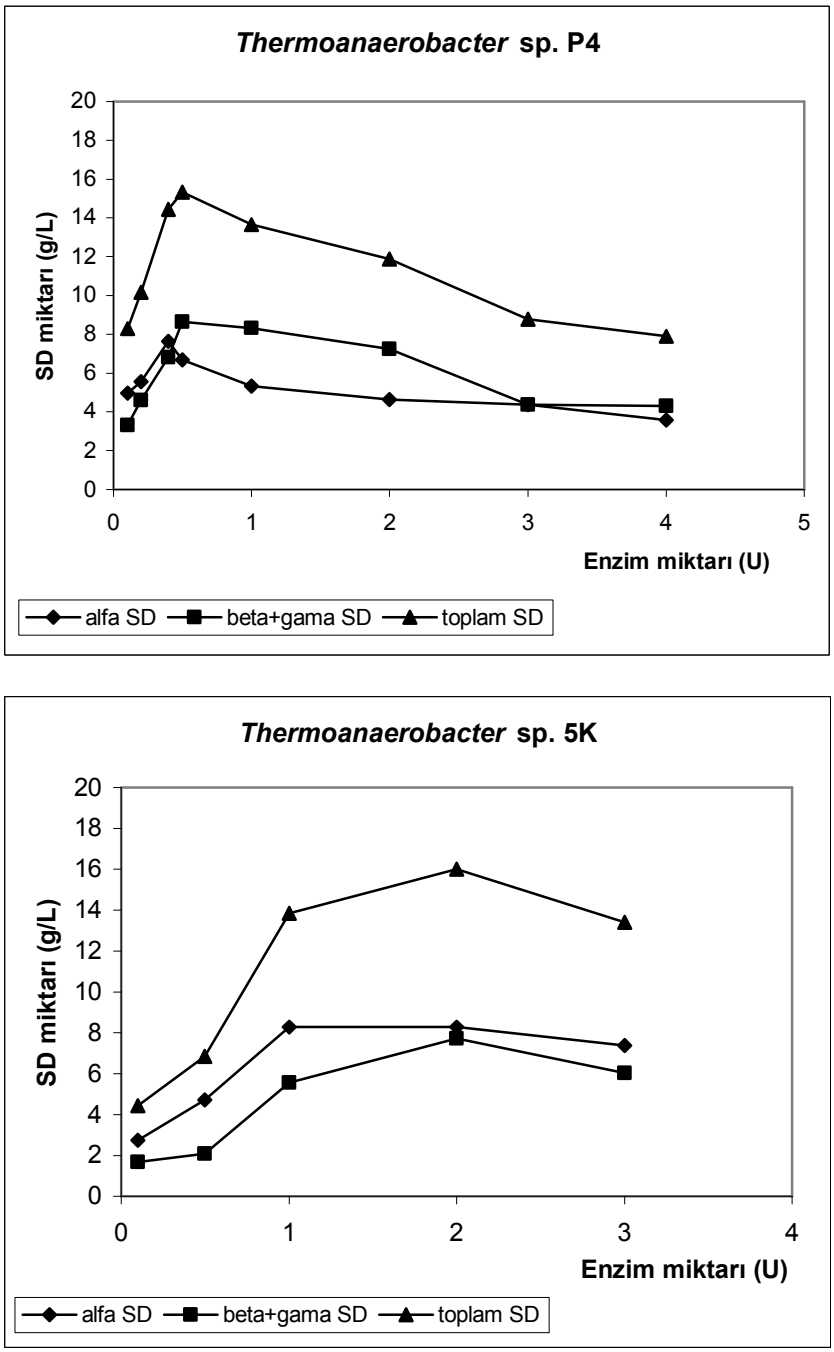
	Substrat kons. (g/L)	α-SD (g/L)	β+γ-SD (g/L)	Toplam SD miktarı	Verim %	% α-SD	% β+γ-SD
Thermoanaerobacter sp. P4	40	5.3	8.3	13.7	34.2	39	61
	50	5.5	9.7	15.2	30.4	36	64
	100	6.6	11.9	18.4	18.4	36	64
	150	6.1	12.3	18.4	12.3	33	67
	200	4.4	13.2	17.6	8.8	25	75
Thermoanaerobacter sp. 5K	40	8.3	5.6	13.8	34.6	60	40
	50	8.5	5.5	14.0	28.0	61	39
	100	8.8	6.9	15.7	15.7	56	44
	150	10.2	8.7	18.9	12.6	54	46

Başlangıçtaki 40, 50, 100, 150 ve 200 g/L substrat konsantrasyonlarda *Thermoanaerobacter* sp. P4 SGTaz'ı ile elde edilen α-SD ile β- ve γ-SD'lerin oranı 39:61, 36:64, 33:67, 33:67 ve 25:75 olarak belirlenmiştir. Yüksek substrat konsantrasyonlarında β- ve γ-SD'lerin oranlarının arttığı anlaşılmış, *Thermoanaerobacter* sp 5K'nın 40, 50, 100 ve 150 g/L substrat konsantrasyonlarında α-SD ile β- ve γ-SD'lerin oranı sırası ile 59:41, 61:39, 56:44 ve 54:56 olarak hesaplanmış ve bunda da β- ve γ-SD oranlarında bir artış olmuştur.

Substrat konsantrasyonunun SD üretimine etkisi çeşitli araştırıcılar tarafından da belirlenmiştir. Örneğin, Gawande ve Patkar (2001), *Klebsiella pneumoniae* AS-22 için optimum substrat konsantrasynunun 100 g/L olduğunu, bu konsantrasyonda SD veriminin % 21 olduğunu bildirmişlerdir. Kim vd. (1995) ise, *Bacillus macerans*'ın SGTaz'ı ile en yüksek SD veriminin, % 7.5 substrat konsantrasyonunda gerçekleştiğini ve bu koşuldaki verimin de % 25 olduğunu belirlemişlerdir. Sian vd. (2005), *Bacillus* sp. G1 ile en yüksek SD üretiminin, % 5'lik tapyoka nişastası ile olduğunu ve veriminde % 16 olduğunu belirlemişlerdir.

4.7.2 Enzim konsantrasyonunun siklodekstrin üretimine etkisi

SD üretimi için en uygun enzim konsantrasyonunu belirlemek için substrat çözeltisine gram substrat için 0.1-4.0 U arasında enzim ilave edilerek SD üretimi gerçekleştirilmiş ve SD üretiminin enzim konsantasyonu ile değişimi Şekil 4.24'te verilmiştir. Anlaşılacağı gibi, *Thermoanaerobacter* sp. P4 suşunda en yüksek SD üretimi, enzim konsantrasyonu 0.5 U olduğunda gerçekleşmiş, bu koşulda 6.7 g/L α-SD, 8.7 g/L β-ve γ-SD oluşmuştur (Çizelge 4.10). 1 U enzim konsantrasyonunda ise, 5.3 g/L α-SD, 8.3 g/L β-ve γ-SD üretilmiş, daha yüksek enzim konsantrasyonlarında SD üretiminin önemli oranda azaldığı gözlenmiştir. Ortamdaki gram substrat başına, 4 U enzim kullanıldığında ise, 3.6 g/L α-SD, 4.3 g/L β-ve γ-SD üretilmiş, SD verimi, 0.5 U enzim bulunduğunda % 38.4 iken, 4U enzim ile % 19.7'ye azalmıştır. Yapılan çalışmalarda, ayrıca, enzim konsantrasyonunun üretilen SD'lerin miktarı yanında oranlarını da etkilediği anlaşılmış, 0.1-0.4 U enzim kullanıldığında oluşan α-SD'nin oranı artmış, gram substrat başına 0.1, 0.2, 0.4 ve 0.5 U enzim konsantrasyonlarında α-SD/ β-ve γ-SD'lerin oranları sırası ile 60:40, 55:45, 53:47, 44:66 olarak hesaplanmıştır. Gram substrat başına 3 ve 4 U enzim kullanıldığında ise α-SD/ β-ve γ-SD miktarları birbirine yakın değerlerde kalmıştır.



Şekil 4.24 *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının SD üretim oranlarına enzim konsantrasyonunun etkisi

Thermoanaerobacter sp. 5K suşunun SGTaz'ının ise en fazla SD'i 2 U enzim ile ürettiği, 1 U'nin altındaki enzim konsantrasyonlarında SD üretiminin oldukça düşük olduğu anlaşılmıştır. 1 U ve 2 U enzim konsantrasyonlarında sırası ile % 35 ve % 40 SD verim değerine ulaşılırken, 0.1 ve 0.5 U enzim konsantrasyonunda sırası ile % 11 ve %

17 verim ile SD'ler elde edilmiştir. Düşük enzim konsantrasyonlarında *Thermoanaerobacter* sp. P4 suşunda olduğu gibi α-SD oranı daha fazla olmuş, enzim konsantrasyonu arttıkça α-SD ve β-ve γ-SD'lerin miktarları arasındaki farkın azaldığı, ancak yukarıda da açıklandığı gibi *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşunun ağırlıklı olarak α-SD ürettiği saptanmıştır.

Çizelge 4.10 *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının değişen konsantrasyonlardaki SGTaz'ları ile elde edilen SD'lerin miktarları

	SGTaz miktarı (U)	α-SD (g/L)	β+γ-SD (g/L)	Toplam SD miktarı (g/L)	Verim %	% α-SD	% β+γ-SD
Thermoanaerobacter sp. P4	0.1	5.0	3.3	8.3	20.7	60	40
	0.2	5.6	4.6	10.2	25.4	55	45
	0.4	7.6	6.8	14.4	36.1	53	47
	0.5	6.7	8.6	15.3	38.4	44	56
	1.0	5.3	8.3	13.7	34.2	39	61
	2.0	4.6	7.2	11.9	29.7	39	61
	3.0	4.4	4.4	8.8	21.9	50	50
	4.0	3.6	4.3	7.9	19.7	45	55
Thermoanaerobacter sp. 5K	0.1	2.8	1.7	4.4	11.1	62	38
	0.5	4.7	2.1	6.8	17.1	69	31
	1.0	8.3	5.6	13.8	34.6	60	40
	2.0	8.3	7.7	16.0	40.0	52	48
	3.0	7.4	6.0	13.4	33.5	55	45

Bu sonuçlara göre, SD üretiminde enzim konsantrasyonunun önemli olduğu anlaşılmıştır. *Klebsiella pneumoniae* AS-22'nin SGTaz'ı ile yapılan bir çalışmada da, enzim konsantrasyonu 10 U olduğunda en yüksek SD veriminin elde edildiği ve daha

yüksek enzim konsantrasyonlarının SD üretimini arttırmadığı belirlenmiştir (Gawande ve Patkar 2001). *Bacillus agaradhaerens* ile yapılan bir çalışmada da, yüksek enzim konsantrasyonlarında SD üretiminin önemli oranda düştüğü belirtilmiştir (Martins ve Hatti-Kaul 2002). Buna karşın, Jemli vd. (2007), *Paenibacillus pabuli* US132 suşunun SGTazı ile yaptıkları çalışmada artan enzim konsantrasyonlarında SD oranlarında önemli bir değişim olmadığını açıklamışlardır.

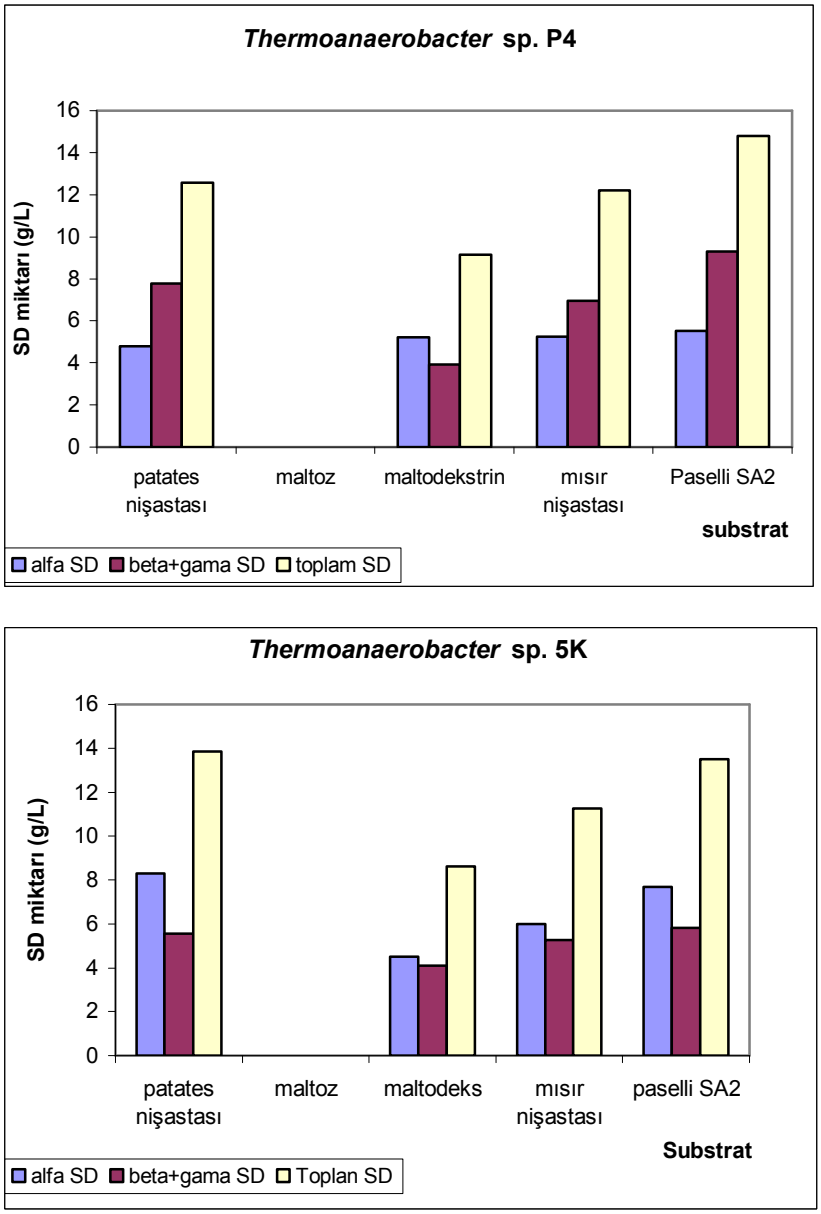
4.7.3 Çeşitli substratlardan siklodekstrin üretimi

Thermoanaerobacter sp P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının SGTaz'larının çözünür patates nişastası ile birlikte mısır nişastası, paselli SA2, maltodekstrin ve maltozdan SD üretimleri araştırılmıştır. Ortamda 40 g/L substrat ve gram substrat için 1U enzim kullanılarak yapılan üretim denemelerinde substratların SD üretimine etkisi Şekil 4.25'de verilmiştir. Şekilde anlaşılacağı gibi, her iki suş da sadece maltozdan SD üretememişler, *Thermoanaerobacter* sp. P4 suşunun SGTaz'ının en yüksek SD'i paselli SA2 ile ürettiği belirlenmiştir. Paselli SA2, çözünür patates nişastası, mısır nişastası ve maltodekstrin ile sırası ile 5.5, 4.8, 5.3, 5.2 g/L α-SD, 9.3, 7.8, 6.9, 3.9 g/L β- ve γ-SD üretmiştir. SD verimleri ise sırası ile % 37, % 31, % 30 ve % 23 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.11).

Maltodekstrinden üretilen α-SD/ β- ve γ-SD oranları 57:43 olarak bulunmuş, maltodekstrin ile α-SD üretimi yüksek olmasına karşın β- ve γ-SD üretimleri düşük olmuş, bunun maltodekstrinin düşük zincirli oligosakkaritleri içermesinden kaynaklandığı sonucuna varılmıştır.

Thermoanaerobacter sp. 5K suşunun SGTaz'ı çözünür patates nişastası, paselli SA2, mısır nişastası ve maltodekstrinden ile sırası ile 8.3, 7.7, 6.0 ve 4.5 g/L α-SD, 5.6, 5.8, 5.3 ve 4.1 g/L β- ve γ-SD üretmiştir (Çizelge 4.10). Yukarıda belirtilen substratlar ile, elde edilen verim değerleri ise sırası ile % 35, % 34, % 28 ve % 22 olarak hesaplanmıştır. *Thermoanaerobacter* sp P4'nin SGTaz'ı paselli SA2 ve patates nişastasından daha yüksek oranda SD oluşturmasına karşın, *Thermoanaerobacter* sp. 5K'nin SGTaz'ı her iki substrattan da hemen hemen aynı oranlarda SD üretmiştir.

Thermoanaerobacter 5K'nın SGTaz'ının patates nişastası ile yapılan bütün çalışmalarda olduğu gibi, diğer substratlardan da daha çok α-SD oluşturduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.25 *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının farklı çeşitli substratlarda SD üretimleri

Bu çalışmada elde edilen bulgular, literatür bulguları ile benzeşmektedir, örneğin, Grull ve Stifter (2001), SD verim ve çeşidinin SGTaz'ın yapısına ve substrat çeşidine bağlı olduğunu belirtmiştir. SD üretiminde kullanılan en yaygın substratın nişasta olduğu ve

bütün nişasta fraksiyonlarının (amiloz ve amilopektin) SD üretiminde ham madde olarak kullanılabildiği, ancak, nişastanın amilopektin kısmının daha yüksek oranda SD ürettiği belirlenmiştir. Günümüzde, SGTaz üretiminde substrat olarak amilopektin içeriği daha fazla olduğu için patates nişastasının tercih edildiği belirtilmiştir (Biwer vd. 2002). Bu çalışmada da patetes nişastası ve kısmi olarak hidrolize edilmiş patates nişastası türevi paselli SA2 ile en yüksek verim değerlerine ulaşılmıştır.

Çizelge 4.11 *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K SGTaz'larının çeşitli substratlardan oluşturdukları SD'lerin miktarları, verimi ve oranları

	Substrat	α-SD (g/L)	β+γ-SD (g/L)	Toplam SD miktarı	Verim %	% α-SD	% β+γ-SD
Thermoanaerobacter sp. P4	Patates nişastası	4.8	7.8	12.6	31.4	38	62
	Maltoz	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0
	Maltodekstrin	5.2	3.9	9.1	22.9	57	43
	Mısır nişastası	5.3	6.9	12.2	30.5	43	57
	Paselli SA2	5.5	9.3	14.8	37.0	37	63
Thermoanaerobacter sp. 5K	Patates nişastası	8.3	5.6	13.8	34.6	60	40
	Maltoz	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0
	Maltodekstrin	4.5	4.1	8.6	21.5	52	48
	Mısır nişastası	6.0	5.3	11.2	28.1	53	47
	Paselli SA2	7.7	5.8	13.5	33.7	57	43

Gawande ve Patkar (2001), *Klebsiella pneumoniae* SA2'nin SGTaz'ı ile yaptıkları çalışmada, en yüksek SD üretiminin çözünür patates nişastası ile olduğunu, ancak SGTaz uygulamadan önce nişastanın jelatinize edilmesinin gerektiğini belirlemişlerdir. Martins ve Hatti-Kaul (2002), ise *Bacillus agaradhaerens*'in SGTaz'ı ile maltodekstrinlerden SD üretmişler ve % 5'lik maltodekstrin konsantrasyonunun % 10'unun SD'lere dönüştürüldüğünü bildirmişlerdir.

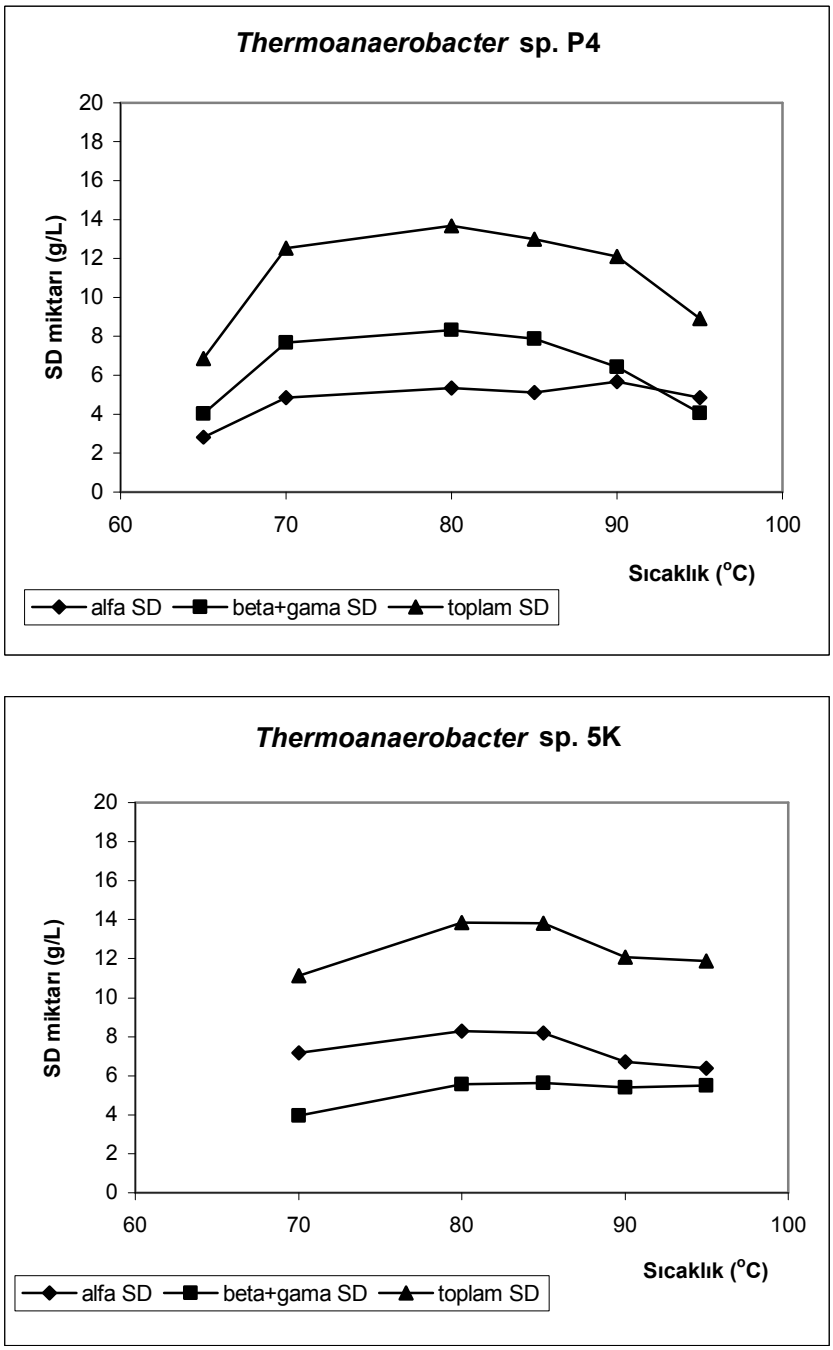
Pishtiyski ve Zhekova (2006) *Bacillus megaterium* SGTaz'ı ile çeşitli substratlardan SD üretimi üzerine bir çalışma yapmışlar ve bu çalışmada kullandıkları nişasta kaynaklarına SD üretimi öncesi α-amilaz ve pullulanaz ilave ederek ön işlem uygulamışlar, % 5'lik patates, buğday ve mısır nişastaları ile sırası ile % 47.2, % 47.3 ve % 46.5 verim elde etmişlerdir. Aynı araştırıcılar ayrıca, glikoz ve maltozdan da SD üretimini araştırmışlar ve bunların SD üretimi için uygun substratlar olmadığını bildirmişlerdir.

Slominska ve Sobkowiak (1997), substrat olarak patates, buğday, mısır ve tapyoka nişastaları ile SD üretiminde kullanıldığında verim değerlerinin çok farklılıklar gösterdiğini, ancak, α-,β- ve γ-SD oranlarının sabit kaldığını belirlemişlerdir. Sian vd. (2005), ise *Bacillus* sp. G1'in SGTaz'ı ile çözünür patates, pirinç, mısır, sago ve tapyoka nişastalarından SD üretmişler en yüksek SD miktarının tapiaco nişastası ile olduğunu bildirmişlerdir.

4.7.4 Sıcaklığın siklodekstrin üretimine etkisi

Thermoanaerobacter sp. P4 suşunun SGTaz'ının 65-95 ^{o}C, *Thermoanaerobacter* sp. 5K'nın ise 70-95 ^{o}C aralığındaki sıcaklıklardaki SD üretimleri araştırılmış ve sonuçlar Şekil 4.26'da verilmiştir. Her iki bakterinin SGTaz'ı da çalışılan tüm sıcaklıklarda SD oluşturmuşlar, ancak en yüksek SD üretiminin *Thermoanaerobacter* sp. P4 SGTaz'ı ile 80 ^{o}C, *Thermoanaerobacter* sp. 5K'nın SGTaz'ının da 80-85 ^{o}C'de olduğu belirlenmiştir.

Thermoanaerobacter sp. P4 suşunun SGTaz'ı 65, 70, 80, 85, 90 ve 95 ^{o}C sıcaklıklarda sırası ile 2.8, 4.9, 5.3, 5.1, 5.7 ve 4.8 g/L α-SD, 4.1, 7.8, 8.3, 7.9, 6.4 ve 4.1 g/L β- ve γ-SD üretmiştir. Bu değerlerden hesaplanan SD verimleri de sırası ile % 17, % 31, % 34, % 33, % 30 ve % 22 olarak hesaplanmış ve 85-90 ^{o}C sıcaklıklarda bile enzimin aktivitesini önemli oranda koruduğu anlaşılmıştır (Çizelge 4.12). 90 ve 95 ^{o}C'ler de α-SD üretim oranının arttığı gözlenmiştir. 80 ^{o}C'de α-SD/ β- ve γ SD oranı 39:61 iken 90 ve 95 ^{o}C'ler de bu oran sırası ile 47:53 ve 54:46 olmuştur.



Şekil 4.26 *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının SGTaz'larının farklı sıcaklıklardaki SD üretim miktarları

Thermoanaerobacter sp. 5K suşunun SGTaz'ı en yüksek SD'i 80 ve 85 ^{o}C'lerde oluşturmuş ve daha yüksek sıcaklıklarda da SD üretiminin yüksek olduğu anlaşılmıştır. 70, 80, 85, 90 ve 95 ^{o}C'lerde sırasıyla 7.2, 8.3, 8.2, 6.7 ve 6.4 g/L α-SD, 4.0, 5.6, 5.6, 5.4 ve 5.5 g/L β- ve γ-SD oluşturmuş, buna göre, SD verimleri de sırası ile % 28, % 35,

% 35, % 30 ve % 30 olarak hesaplanmıştır. *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşunun 95 ^{o}C'de *Thermoanaerobacter* sp P4 suşundan daha verimli olduğu, sıcaklık arttıkça α-SD/ β- ve γ-SD oranının düştüğü gözlenmiş ve bu oranlar sırası ile 64:46, 60:40, 60:40, 55:45, 54:46 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12 *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının SGTaz'larının çeşitli sıcaklıklarda oluşturdukları SD'lerin miktarları, SD verimi ve SD'lerin oranları

	Sıcaklık (^{o}C)	α-SD (g/L)	β+γ-SD (g/L)	Toplam SD miktarı	Verim %	% α-SD	% β+γ-SD
Thermoanaerobacter sp. P4	65	2.8	4.0	6.9	17.2	41	59
	70	4.9	7.7	12.5	31.3	39	61
	80	5.3	8.3	13.7	34.2	39	61
	85	5.1	7.9	13.0	32.5	39	61
	90	5.7	6.4	12.1	30.2	47	53
	95	4.8	4.1	8.9	22.3	54	46
Thermoanaerobacter sp. 5K	70	7.2	4.0	11.1	27.8	64	36
	80	8.3	5.6	13.8	34.6	60	40
	85	8.2	5.6	13.8	34.5	59	41
	90	6.7	5.4	12.1	30.2	55	45
	95	6.4	5.5	11.9	29.7	54	46

Başka araştırıcılar tarafından *Thermoanaerobacter* ve *Thermoanaerobacterium* cinslerine ait SGTaz enzimleri tanımlanmıştır. Norman ve Jörgensen (1992) tarafından karakterize edilen *Thermoanaerobacter* SGTaz'ının % 10'luk mısır nişastasının, % 30'unu SD'lere (% 36 α-SD, % 44 β-SD, % 20 γ-SD) dönüştürdüğü belirlenmiştir. Wind vd. (1995), *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1'in SGTaz'ı ile % 10 (ağ/h)'luk paselli SA2'den SD üretmişler, 48 saatlik inkübasyonun 8. saatinde en yüksek SD verimine ulaşmışlardır. Bu koşulda toplam substratın % 38'inin SD'lere dönüştürüldüğünü ve oluşan SD'lerin oranlarının da % 33 α-SD, % 54 β-SD ve % 13 γ-SD olduğunu bildirmişlerdir. Bir arke olan *Thermococcus* sp. B1001'in SGTaz'ı ile

yapılan çalışmada ise % 2.5'lik nişastadan 90 ^{o}C'de 24 saatte % 30 oranında SD'ler üretilmiştir (Tachibana vd. 1999).

Thermoanaerobacter sp P4'ün SGTaz'ı ile SD üretiminde 90 ^{o}C'de, 80 ^{o}C'ye göre % 11 verim kaybı, *Thermoanaerobacter* sp. 5K'nın SGTaz'ı ile de 95 ^{o}C'de sadece % 14 verim kaybının olduğu belirlenmiştir. Tanımlanan bu suşların SGTaz'ları nişasta sıvılaştırma sıcaklığında (90 ^{o}C) aktif olduklarından, endüstriyel üretimlerde kullanımları için oldukça önemli avantaja sahip olabilecekleri düşünülmektedir. Termofilik bakterilerden izole edilen SGTaz'ların endüstriyel SD üretiminde kullanılması ile geleneksel SD üretim yönteminde kullanılan α-amilaz gibi enzimlere gereksinim kalmayacağı ve tek bir enzim ile SD üretiminin gerçekleştirilebileceği belirlenmiştir (Biwer vd. 2002). Ayrıca, yüksek sıcaklık uygulamasının kontaminasyon riskinin azalması, enzimatik dönüşüm hızının artması, viskozitenin düşmesi ve substratların çözünürlüğünün artması gibi çok önemli avantajları da bulunmaktadır. Bunun yanında, mezofilik enzimlerde nişasta sıvılaştırılma işleminden sonra gerekli olan, soğutma işleminine de gerek kalmayacağı bildirilmiştir (Biwer vd. 2002).

5. SONUÇ

Bu çalışma kapsamında ülkemizin çeşitli ekstrem bölgelerinden izole edilen termofilik anaerobik bakterilerin SGTaz enzimleri araştırılmıştır. Çeşitli kaynaklardan elde edilen 34 bakteri üzerinde yapılan çalışmada ülkemizdeki bir petrol kuyusundan izole edilmiş olan iki termofil anaerobik bakterinin (*Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K) bu enzimi yüksek oranda ürettikleri ve enzim özelliklerinin de çok önemli ve değerli olduğu anlaşılmıştır.

Yapılan çeşitli morfolojik, biyokimyasal analizler ve 16S rDNA moleküler tanımlama çalışmalarına göre, bu iki bakterinin *Thermoanaerobacter* cinsine ait türler olduğu belirlenmiştir. Bunlardan, *Thermoanaerobacter* sp. P4'ün gram pozitif, sporsuz, çubuk şeklinde, *Thermoanaerobacter* sp. 5K'nın ise gram değişken özellik gösteren, sporsuz ve çubuk şeklinde bakteriler oldukları anlaşılmıştır. Yapılan filogenetik analizlere göre *Thermoanaerobacter* sp. P4'ün *Thermoanaerobacter* cinsine ait diğer türlerle olan benzerliğinin % 91.5-98.3, *Thermoanaerobacter* sp. 5K'nın ise % 91-97 arasında değiştiği belirlenmiştir. *Thermoanaerobacter* cinsine genetik olarak en yakın cins olan *Thermoanaerobacterium* cinsi bakterilerden *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* ile *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K'nın benzerliklerinin sırası ile % 87.6 ve % 88.3 olduğu anlaşılmıştır. Yapılan filogenetik çalışmalar ve bazı biyokimyasal özelliklere göre, bu iki bakterinin *Thermoanaerobacter* cinsine ait iki yeni tür olduğu düşünülmektedir.

Thermoanaerobacter sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının optimum olarak 65 ^{o}C'de, başlangıç pH'sı 7.5-8.0 olan besiyerinde SGTaz ürettikleri anlaşılmıştır. *Thermoanaerobacter* sp P4'ün gelişmesinin 30. saatinde, *Thermoanaerobacter* sp. 5K'nın ise gelişmesinin 24. saatinde maksimum SGTaz aktivitesine ulaştıkları belirlenmiştir. % 30'luk patates nişastasından, azot kaynağı olarak maya özütü ve kazein içeren besiyerinde bu iki bakterinin de en yüksek SGTaz aktivitesine ulaştıkları belirlenmiştir. Patates nişastası, paselli SA2, mısır nişastası ve maltodekstrinden her iki bakterinin de SGTaz üretebildiği, ancak glikoz, fruktoz, sakaroz ve laktoz gibi mono ve disakkaritlerden SGTaz üretiminin olmadığı anlaşılmıştır.

SGTaz üretimi sırasında 24. saatten sonra *Thermoanaerobacter* sp. 5K'nın SGTaz aktivitesi hızla düştüğü *Thermoanaerobacter* sp. P4 ile ise daha yavaş bir düşme olduğu gözlenmiştir. Bu durumun *Thermoanaerobacter* sp. 5K'nın yüksek birleştirme (coupling) aktivitesinden kaynaklandığı anlaşılmıştır.

Thermoanaerobacter sp. P4 suşunun 2.2 L *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşunun ise 2 L'lik süpernatantlarıındaki proteinleri amonyüm sülfat ile çöktürüp diyaliz edildikten sonra epoksi aktiflemiş α-SD sepharose 6B kolonu yardımı ile saflaştırılmıştır. Amonyum sülfat ile çöktürme işleminde geri kazanılan protein miktarı çeşitli araştırıcılar tarafından yapılan çalışmalar ile kıyaslandığında oldukça düşük bulunmuştur. Bu durumun amonyum sülfat ile çöktürme işlemi sırasında amonyum sülfatın ortama ilave ediliş şeklinden kaynaklandığı varsayılmıştır.

Saflaştırma sonrası *Thermoanaerobacter* sp. P4 suşunun SGTaz'ının spesifik aktivitesinin 157.2 U/mg, *Thermaoanarobacter* sp. 5K suşunun SGTaz'ının ise 373.1 U/mg olarak belirlenmiştir. Bu iki bakterinin SGTaz'larının saflaştırma katsayıları ise sırası ile 157.2 ve 746.2 olarak belirlenmiştir. *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşunun spesifik aktivitesi ve saflaştırma katsayılarının *Thermoanaerobacter* sp. P4 suşunun SGTaz'ına göre oldukça yüksek olmasına karşın, *Thermoanaerobacter* sp. P4 ile elde edilen SGTaz miktarı daha fazladır. Bunların yüksek olması, saflaştırma sonrası *Thermoanaerobacter* sp. 5K'nın SGTaz'ının protein miktarının çok düşük olmasından kaynaklanmaktadır. *Thermoanaerobacter* sp. P4 ile saflaştırma sonrası başlangıçtaki SGTaz miktarına göre % 11 verim elde edilirken *Thermoanaerobacter* sp. 5K ile elde edilen verim sadece % 5 olarak hesaplanmıştır.

Saflaştıran SGTaz'ların SDS-PAGE ile yapılan analizlerinde her iki bakterinin SGTaz enzimi ile de tek bir protein bandı elde edilmiş ve buradan saflaştırma işleminin başarı ile yapıldığı anlaşılmıştır. SDS-PAGE ile yapılan analizde *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanarobacter* sp. 5K suşlarının SGTaz'larının molekül ağırlıkları sırası ile 68.7 ve 70.6 kDa olarak belirlenmiştir.

Her iki bakterinin de optimum SGTaz aktivitelerinin optimum pH 7.0 ve optimum sıcaklığının 80-90 ^{o}C olduğu belirlenmiştir. 95 ^{o}C'de aktivitelerinde çok az bir düşme gözlenmiş ve bunun enzimlerin endüstriyel üretimlerde yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilen nişasta sıvılaştırma işlemine dayanıklı olacağı sonucu ortaya çıkmıştır. 80 ^{o}C'de 4 saat bekletildiklerinde her iki bakterinin SGTaz'ının da aktivitelerinde hiçbir kayıp gözlenmemiştir. *Thermoanaerobacter* sp. P4 suşunun SGTaz'ının düşük ve yüksek pH'lara *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşunun SGTaz'ından daha dayanıklı olduğu ancak, *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşunun termal stabilitesinin *Thermoanaerobacter* sp. P4 suşunun SGTaz'ından daha yüksek olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca *Thermoanaerobacter* sp. P4'ün SGTaz'ının çeşitli metallere dayanıklılığının daha iyi olduğu da anlaşılmıştır. $AgNO_3$ ve $HgSO_4$ her iki SGTaz için de inhibitör etki yapmıştır.

Thermoanaerobacter sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp. 5K suşlarının SGTaz'ları, mezofilik bakterilere göre oldukça yüksek hidroliz aktivite göstermişlerdir. Ayrıca, bunların 90 ^{o}C gibi yüksek sıcaklıklarda aktif olmaları, endüstriyel önemlerini arttırmaktadır. Endüstriyel uygulamalarda gerekli olan ve mezofilik bakteri SGTaz'ları ile çalışıldığında genellikle α-amilaz uygulaması ile gerçekleştirilen nişasta hidrolizinin *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanaerobacter* sp 5K'nın SGTaz'ları ile α-amilaz uygulaması gerektirmeden tek bir sıcaklık derecesi ve enzim ile SD üretimi gerçekleştirilebilmektedir.

Saflaştırılan SGTaz ile yapılan SD üretimi çalışmalarında, sıcaklık substrat konsantrasyonu, substrat çeşidi ve özellikle de enzim konsantrasyonunun SD verim ve çeşidini etkilediği belirlenmiştir. Genel olarak, *Thermoanaerobacter* sp. P4'ün SGTaz'ının daha fazla β-ve γ-SD'leri ürettiği (% 60 oranında), *Thermoanaerobacter* sp. 5K'nın SGTaz'ının ise % 60 oranında α-SD üreten bir α-SGTaz olduğu belirlenmiştir. *Thermoanaerobacter* sp. P4 suşunun SGTaz'ının en fazla SD'i paselli SA2 ile 40 g/L substrat ve gram substrat için 0.5 U enzim konsantrasyonlarında 80 ^{o}C'de, *Thermoanaerobacter* sp. 5K'nın ise çözünür patates nişastası ile 40 g/L substrat ve 2 U enzim konsantrasyonu ile 80-85 ^{o}C'de ürettikleri belirlenmiştir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre *Thermoanaerobacter* sp. P4 ve *Thermoanarobacter* sp. 5K'nın SGTaz üreten iki önemli *Thermoanaerobacter* türü ortaya çıkmıştır. Yapılan genetik ve bazı biyokimyasal testlere göre yeni türler olduğu anlaşılan bu iki bakterinin endüstriyel üretimlerde kullanılabilecek önemli bakteriler olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Ahn, J.H., Hwang J.B. and Kim, S.H. 1990. Cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus*. Purification by affinity chromatography and its properties. Korean Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, 18(6),585-590.

Alcalde, M., Plou, F.J., Andersen, C., Martin, M.T., Pedersen, S. and Ballesteros, A. 1999. Chemical modification of lysine side chains of cyclodextrin glycosyltransferase to α-amylase specificity, FEBS Letters, 445, 333-337.

Alcalde, M., Plou, F.J., Martin, M.T., Valdes, I., Mendez, E. and Ballesteros, A. 2001. Succinylation of cyclodextrin glycosyltransferase from *Thermoanaerobacter sp*. 501 enhances its transferase activity using starch as donor, Journal of Biotechnology, 86, 71-80.

Alcalde, M., Plou, F.J., Boada, M.P., Arellano, H.G., Valdes, I., Mendez, E. and Ballesteros, A. 2003. Chemical modification of carboxylic residues in a cyclodextrin glucanotransferase and its implication in the hydrolysis/transglycosylation ratio of the α-amylase family, Journal of Molecular catalysis, 26, 57-67.

Astray, G., Barreioro, C.G., Mejuto, J.C., Otero, R.R. and Gandara, J.S. 2009. A review on the use of cyclodextrins in foods, Food Hydrocolloids, 23, 1631-1640.

Avci, A. and Dönmez, S. 2006. Effect of zinc on ethanol production by two *Thermoanaerobacter* strains, Process Biochemistry, 41,984-989.

Ben-Bassat, A. and Zeikus, J. G. 1981. *Thermobacteriosides acetoethylicus* gen. nov. sp. nov, a new chemoorganotrophic, anaerobic, thermophilic bacterium. Archives of Microbiology, 128, 365-370.

Bertoldo, C. and Antranikian, G. 2002. Starch-hydrolysing enzymes from thermophilic archaea and bacteria, Current opinion in Chemical Biology, 6, 151-160.

Biwer, A., Antranikian, G. and Heinzle, E. 2002. Enzymatic production of cyclodextrins, Applied Microbiology and Biotechnology, 59, 609-617.

Biwer, A. and Heinzle, E. 2004. Process modeling and simulation can guide process development: case study α-cyclodextrin, Enzyme and Microbial Technology, 34, 642-650.

Blackwood, A.D. and Bucke, C. 2000. Addition of polar organic solvents cab improve the product selectivity of cyclodextrin glycosyltransferase: Solvent effects on CGTase, Enzyme and Microbial Technology, 27, 704-708.

Bonch-Osmolovskaya, E.A., Miroshnichenko, M.L., Chernykh, N.A., Kostrikina, N.A., Pikuta, E.V. and Rainey, F.A. 1997. Reduction of elemental sulfur by moderateley Thermophilic organotrophic Bacteria and the description of *Thermoanaerobacter sulfurophilus* sp. nov., Microbiolgy 66,581-587.

Bonilha, P. R.M., Menocci, V., Goulart, A.J., Polizeli, M.L.T.M. and Monti, R. 2006. Cyclodextrin glycosyltransferase from Bacillus licheniformis: optimization of production and its properties, Brazilian Journal of Microbiology, 37,317-323.

Buschmann, H.J., Knittel, D. and Schollmeyer, E. 2001. New textile applications of cyclodextrins. Journal of Inclusion Ohenomena and Macrocyclic Chemistry, 40, 169-172.

Buschmann, H.J. and Schollmeyer, E. 2002. Applications of cyclodextrins in cosmetic products: A review. Cosmetics Science, 53, 185-191.

Cao, X., Zhengyu, J., Wang, X. and Chen, F. 2005. A novel cyclodextrin glycosyltransferase from an alkalophilic *Bacillus* species: purification and characterization, Food Research International, 38, 309-314.

Choe, H.W., Park, K.S., Labahn, J., Granzin, J., Kim, C.J. and Büldt, J. 2003. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of α-cyclodextrin glucanotransferase isolated from Bacillus macerans. Acta Crystallographica Section D, Biological Crytallography, D59, 348-349.

Citernesi, U. and Sciacchitano, M. 1995. Cyclodextrins in Functional Dermocosmetics. Cosmetics and Toiletries, 110.

Crini, G. and Morcellet, M. 2002. Synthesis and applications of adsorbents containing cyclodextrins, Journal of Seperation Science, 25,789-813.

Del Valle, E.M.M. 2004. Cyclodextrins and their uses, Process Biochemistry, 39, 1033-1046.

Doetsch, R.N. 1981. Determinative methods of light microscopy, In: Gerhardt P, Murray RGE, Costilow R.N, Nester E.W, Wood W.A, Krieg N.R, Philips GB. Editors. Manual of Methods for General Bacteriology, Washington DC: American Society for Microbiology.

Eastburn, S.D. and Tao, B.Y. 1994. Applications of modified cyclodextrins, Biotechnology Advances, 12, 325-339.

DSMZ-The German Resource Centre for Biological Material, 2006. Web sitesi. www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/dsmz144. Erişim Tarihi: 10/9/2006.

Fardeau, M. L., Magot, M., Patel, B. K. C., Thomas, P., Garcia, J. L. and Ollivier, B. 2000. *Thermoanaerobacter subterraneus* sp. nov., a novel thermophile

isolated from oilfield water. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50, 2141-2149.

Forouchi, E. and Gunn, D. J. 1983. Some effects of metal ions on the estimation of reducing sugars in biological media. Biotechnology and Bioengineering. 25, 1905-1911.

Freitas, T.L., Monti, R. and Contiero, J. 2004. Production of CGTase by a *Bacillus alkolophilic* CGII strain isolated from wastewater of a manioc flour industry, Brazilian Journal of Microbiology, 35,255-260.

Gawande, B.N, Singh, R.K, Chauhan, A.K., Goel, A. and Patkar, A.Y. 1998. Optimization of cyclomaltodextrin glucanotransferase production from *Bacillus firmus,* Enzyme and Microbial Technology, 22,288-291.

Gawande, B.N and Patkar, A.Y. 2001. Purification and properties of a novel raw starch degrading-cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* AS-22. Enzyme and Microbial Technology, 28,735-743.

Gomes, J. and Steiner, W. 2004. The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes, Food Technology and Biotechnology, 42, 223-235.

Gornas, P., Neunert, G., Baczynski, K. and Polewki, K. 2009. Beta-cyclodextrin, complexes with chlorogenic and caffeic acids from coffee brew: Spectoscopic, thermodynamic and molecular modelling study, Food Chemistry, 114,190-196.

Grull, D. and Stifter, U. 2001. Process for the production of cyclodextrins, US patent 6 235 505.

Ha, H.J., Lee, J.E., Chang, Y.H. and Kwak, H.S. 2010. Entrapment of nutrients during chloesterol removal from cream by crosslinked β-cyclodextrin, International Journal of Dairy Technology, 63(1),119-126.

Hamilton, L.M., Kelly, C.T. and Fogarty, W.M. 2000. Review: Cyclodextrins and their interaction with amylolytic enzymes. Enzyme and Microbial Technology, 26, 561-567.

Harada, A. 2001. Cyclodextrin-based molecular machines, Accounts of Chemical Research, 34, 456-464.

Hashimoto, H. 2002. Present status of industrial application of cycdextrins in Japan, Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 44, 57-62.

Hedges, A.R. 1998. Industrial applications of cyclodextrins, Chemical Reviews, 98,2035-2044.

Henristat, B. 1991. A classification of glycosyl hydrollases based on amino acid sequence similarities. Bichemistry Joural, 280,309-316.

Hirano, K., Ishihara, T., Ogasawara, S., Maeda, H., Abe, K., Nakajima, T. and Yamagata, Y. 2006. Molecular cloning and characterization of a novel γ-CGTase from alkalophilic *Bacillus* sp., Applied Microbiology and Biotechnology, 70, 193-201.

Ibrahim, H.M., Yusoff, W.M.W., Hamid, A.A., Illias, R.M., Hassan, O. and Omar, O. 2005. Optimization of medium for the production of β-cyclodextrin using Central Composite Design (CCD), Process Biochemistry, 40, 753-758.

Irie, T. and Uekama, K. 1997. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation, Journal of Pharmaceutical Sciences, 86(2), 147-162.

Jamuna, R., Saswathi, N., Sheela, R. and Ramakrishna, S.V. 1993. Syntesis of cyclodextrin glycosyltransferase by *Bacillus cereus* for the production of cyclodextrins, Applied Biochemistry and Biotechnology, 43,163-176.

Jemli, S., Messaoud, B., Zouari, D.A., Naili, B., Khemakhem, B. and Bejar, S. 2007. A β-cyclodextrin glycosyltransferase from a newly isolated *Paenibacillus pabuli* US132 strain: Purification, properties and potential use in bread-making, Biochemical Engineering Journal, 34,44-50.

Jin-Bong, H., Kim, S.H., Lee, T.K. and Yang, H.C. 1990. Production of maltodextrin fom *Bacillus stearothermophilus,* Korean Journal of Applied Biotechnology,18, 381-385.

Kim, T.J., Kim, B.C. and Lee, H.S. 1995. Production of cyclodextrins using moderately heat-treated cornstarch, Enzyme and Microbial Technology, 17,1057-1061.

Kim, M.H., Sohn, C.B. and Oh, T.K. 1998. Cloning and squencing of a cyclodextrin glycosyltransferase gene from *Brevibacillus brevis* CD162 and its expression in *Escherichia coli,* FEMS Microbiology Letters, 164, 411-418.

Kim, B.C., Grote, R., Lee, D.W., Atranikian, G. and Pyun, Y.R. 2001. *Thermoanaerobacter yonseiensis* sp. nov., a novel extremely thermophilic, xylose-utilizing bacterium that grows at up to 85 ^{o}C, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51,1539-1548.

Kim, S.Y., Bae, H.Y., Kim, H.Y., Ahn, J. and Kwak, H. S. 2008. Properties of cholesterol-reduced Camembert cheese made by crosslinked β-cyclodextrin, Society of Dairy Technology, 61, 364-371.

Knegtel, R.M.A., Strokopytov, B., Penninga, D., Faber, O.G., Rozeboom, H.J. and Kalk, K.H. 1995. Crystallographic studies of the interaction of cyclodextrin glycosyltransferase from Bacillus circulans strain 251 with natural substrates and products, Journal of Biology and Chemistry, 270(49),29256-29264.

Kozianovski, G., Canganella, F., Rainey, F.A., Hippe, H. and Antranikian, G. 1997. Purification and characterization of thermostable pectate-lyases from a newly isolated thermophilic bacterium, *Thermoanaerobacter italicus* sp. nov., Extremophiles,1,171-182.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature, 277,680-685.

Larsen, L., Nielsen, P. and Ahring, B.K. 1997. *Thermoanaerobacter mathranii* sp. nov., an ethanol producing, extremely thermophilic anaerobic bacterium from a hot spring in Iceland, Archives of Microbiology, 168,114-119.

Larsen, K.L., Olesen, L.D., Christensen, H.J.S., Mathiesen, F., Pedersen, L.H. and Zimmerman, W. 1998. Purification and characterisation of cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus sp.*F8, Carbohydrate Research, 310,211-219.

Lee, T. E., Jain, M.K., Lee, C., Lowe, S.E. and Zeikus, J. G. 1993. Taxonomic distinction of saccharolytic anarobes: description of *Thermoanaerobacterium xylanolyticum* gen. nov., sp. nov., and *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* gen. nov., sp. nov.; reclassification of *Thermoanaerobium brockii, Clostridium thermohydrosulfurigenes* and *Clostridium thermohydrosulfuricum* E100-69 as *Thermoanaerobacter brockii* comb. nov., *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* comb. nov., and *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* comb. nov., respectively; and transfer of *Clostridium thermohydrosulfuricum* 39E to *Thermoanaerobacter ethanolicus*. International Journal of Systematic Bacteriology, 43, 41-51.

Lee, M.H., Yang, S.J., Kim, J.W., Lee, H. S., Kim, J.W. and Park, K. H. 2007. Charactesization of a thermostable cyclodextrin glucanotransferase from *Pyrococcus furiosus* DSM3638. Extremophiles, 11,537-541.

Leigh, J., Mayer, F. and Wolfe, S.R. 1981. *Acetigenum kivui*, a new thermophilic hydrogen oxidixing, acetogenic bacterium, Archives of Microbiology,129,275-280.

Leemhuis, H., Kelly, R. M. and Dijkhuizen, L. 2010. Engineering of cyclodextrin glucanotransferases and impact for biotechnological applications, Applied microbiology and Biotechnology, 85, 823-835.

Li, Z., Wang, M., Wang, F., Gu, Z., Du, G., Wu, J. and Chen, J. 2007. γ-Cyclodextrin: a review on enzymatic production and applications, Applied Microbiology and Biotechnology, 77, 245-255.

Loftsson, T. and Brewster, M.E. 1996. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization, Journal of Pharmaceutical Sciences, 85 (10), 1017-1025.

Loftsson, T. and Stefansson, E. 2002. Cyclodextrins in eye drop formulations: enhanced topical delivery of corticosteroids to the eye, Acta Ophthalmologica Scandinavica, 80, 144-150.

Loftsson, T., Jarho, P., Masson, M. and Jarvinen, T. 2005. Cyclodextrins in drug delivery, Expert Opinion in Drug Delivery, 2(2), 1-17.

Loftsson, T. and Duchene, D. 2007. Cyclodextrins and their pharmaceutical application. International Journal of Pharmaceutics, 329,1-2,1-11.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent, Journal of Biology and Chemistry, 193, 265-275.

Magnusdottir, A., Mason, M. and Loftsson, T. 2002. Cyclodextrins, Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 44, 213-218.

Mahat, M.K., Illias, R.M., Rahman, R.A., Rashid, N.A.A., Mahmood, N.A.N., Hassan, O., Aziz, S.A. and Kamaruddin, K. 2004. Production of cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) from alkalophilic *Bacillus* sp. TS1-1: media optimization using experimental design, Enzyme and Microbial Technology, 35, 467-473.

Makale, M.J., Paavilainen S.K. and Korpela T.K. 1990. Growth dynamics of cyclodextrin glucanotransferase producing Bacillus circulans var. Alkolophilus, Canadian Journl of Microbiology, 36, 176-182.

Martins, R.F. and Hatti-Kaul, R. 2002. A new cyclodextrin glycosyltransferase from an alkaliphilic Bacillus agaradhaerens isolate: purification and characterisation, Enzyme and Microbial Technology, 30,116-124.

Martins, R.F. and Hatti-Kaul, R. 2003. *Bacillus agaradhaerens* LS-3C cyclodextrin glycosyltransferase: activity and stability features, Enzyme and Microbial Technology, 33, 819-827.

Mori, S., Hirose S., Oya T. and Kitahata S. 1994. Purification and properties of cyclodextrin glucanotransferase from *Brevibacterium* sp. 9605. Biscience, Biotechnology and Biochemistry, 56,207-210.

Mourtzinos, I., Kalogeropoulus, N., Papadakis, S.E., Konstantinou, K. and Karathanos V.T. 2008. Encapsulation of nutraceutical monoterpens in β-cyclodextrin and modified starch, Journal of Food Science, 73(1), 89-94.

MRC Laboratory of Molecular Biology, 2009. Web sitesi. www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes. Erişim Tarihi: 26/10/2009.

National Center for Biotechnology Information, 2008. Web sitesi. www.ncbi.nlm.nih.gov/BLASTN. Erişim Tarihi: 21/2/2008.

Nishida, T., Nakamura, A., Masaki, H. and Uozumi, T. 1997. Regulation of cyclodextrin glucanotransferase synthesis in *Bacillus obhensis,* FEMS Microbiology Letters, 149:221-226.

Norman, B.E. and Jorgensen, S.T. 1992. *Thermoanaerobacter* sp. CGTase its properties and application., Danpun Kagaku, 39,101-108.

Park, D.C., Kim, T.K. and Lee, Y.H. 1998. Characteristics of transglycosylation reaction of cyclodextrin glucanotransferase in the heterogeneous enzyme reaction system using extrusion starch as a glucosyl donor, Enzyme and Microbial Technology, 22, 217-222.

Penninga, D., van der Veen, B., Knegtel, R.M.A., Van Hijum, S.A.F., Rozeboom, H.J. and Kalk, K.H. 1996. The raw starch binding domain of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251. Journal of Biology and Chemistry, 271(51),32777-32784.

Pistiyski, I. and Zhekova, B. 2006. Effect of different substrates and their preliminary treatment on cyclodextrin, World J. Of Microbiology and Biotechnology, 22, 109-114.

Przylas, I., Tomoo, K., Terada, Y., Takada, K.F., Saenger, W. and Strater, N. 2000. Crystal structure of amylomaltase from Thermus aquaticus, a glucosyltransferase catalyzing the production of large cyclic glucans. Journal of Molecular Biology, 296, 873-886.

Qi, Q. and Zimmermann, W. 2005 Cyclodextrin glucanotransferase: from gene to applications, Applied Microbiology and Biotechnology, 66,475-485.

Rahman, K., Illias, R.M., Hassan, O., Mahmood, N.A.N. and Rashid, N.A.A. 2006. Molecular cloning of a cyclodextrin glucanotransferase gene from alkolophilic *Bacillus* sp. TS1-1 and characterization of the recombinant enzyme, Enzyme and Microbial Technology, 39, 74-84.

Rajewski, R.A. and Stella, V. J. 1996. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery, Journal of Pharmaceutical sciences, 85(11),1142-1169.

Rashid, N., Cornista, J., Ezaki, S., Fukui, T., Atomi, H. and Imanaka, T. 2002. Characterization of an archeal cyclodextrin glucanotransferase with a novel C-terminal domain, Journal of Bacteriology, 184(3), 777-784.

Redenti, E., Szente, L. and Szejtli, J. 2001. Cyclodextrin complexes of salts of acidic drugs. Thermodynamic properties, structural features, and pharmaceutical applications, Journal of Pharmaceutical Sciences, 90 (8), 979-986.

Reineccius, T.A., Reineccius, G.A. and Peppard, T.L. 2004. Utilization of β-cyclodextrin for improvewd flovor retention in thermally processed foods, Food Chemistry and Toxicology, 69(1),58-62.

Rendleman, J.A. 1996. Influence of saccharides as inhibitors of cyclodextrin production. Biotechnology and Applied Biochemistry, 24-121-127.

Rosso, A.M., Ferrarotti, S.A., Krymkiewicz, N. and Nudel, B.C., 2002. Optimisation of batch culture conditions for cyclodextrin glucanotransferase production from *Bacillus circulans* DF9R. Microbial Cell Factories, http:/www.microbialcellfactories.com/content/1/1/3. Erişim Tarihi: 12/08/2006.

Saverage, L. S., Dhule, S. S., Jogdand, V.V., Nene, S.N. and Gadre, R. V. 2008. Production and single step purification of cyclodextrin glycosyltransferase from alkalophilic Bacillus firmus by ion exchange chromatography, Biochemical Engineering Journal, 39,510-515.

Schmid, U., Giesel, H., Schobert, S.M. and Sahm, H. 1986. *Thermoanaerobacter finnii* spec. Nov, a new ethanologenic sporogenous bacterium. System, Aplied Microbiology,8,80-85.

Shim., J.H, Kim, Y.W, Kim, T.J, Chae, H.Y, Park, J.H., Cha, H., Kim, J.W., Kim, Y.R., Schaefer, T., Spendler, T., Moon, T.W. and Park, K.H. 2004. Improvement of cyclodextrin glucanotransferase as an antistaling enzyme by error-prone PCR, Protein Engineering Desing & Selection, 17, 205-211.

Sian, H.K., Said, M., Hassan, O., Kamaruddin, K., Ismail, A.F., Rahman, R.A., Mahmood, N.A.N. and Illias, R.M. 2005. Purrification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from alkolophilic *Bacillus* sp. G1, Process Biochemistry, 40, 1101-1111.

Singh, M., Sharma, R. and Banerjee, U.C. 2002. Biotechnological applications of cyclodextrins. Biotechnology Advances, 20, 341-359.

Slominska, L. and Sobkowiak, B. 1997. Studies on cyclodextrin synthesis a novel cyclodextrin glycosyltransferase, Starch, 49(7/8),301-305.

Song, L.X., Bai, L., Xu, X.M., He, J. and Pan, S.Z. 2009. Inclusion complexation, encapsulation interaction and inclusion number in cyclodextrin chemistry, Coordination Chemistry Reviews, 253,1276-1284.

Starnes, R.L. 1990. Industrial potential of cyclodextrin glycosyl transferases. Cereal Foods World, 35(11), 1094-1099.

Stavn, A. and Granum, P.E. 1979. Purification and physicochemical properties of an extracellular cycloamylose (cyclodextrin) glucanotransferase from *Bacillus macerans,* Carbohydrate Research, 75,243-250.

Stefanova, M.E., Tonkova A.I., Miteva V.I. and Dobreva E.P. 1999. Characterization and cultural conditions of a novel cyclodextrin gluconotransferase-producing

Bacillus stearothermophilus strain, Journal of Basic Microbiology, 39(4), 257-263.

Sreenivasan, S., Samant, S.K. and Pai, J.S. 1991. Preparation of cycloamylose glycosyltransferase (CGTase) from *Bacillus macerans*, Indian Journal of Microbiology, 31,381-385.

Suntinanalert, P., Petmaneechote, J., Damnian, N. and Towatana, N.H. 1997. Purification and properties of cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) from an alkaline-tolerant *Bacillus* sp. PS304, Journal of the Science Society of Thailand, 23, 381-388.

Szejtli, J. 1997. Utilization of cyclodextrins in industrial products and processes, Journal of Materials Chemistry, 7(4), 575-587.

Szejtli, J. 1998. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. Chemical Reviews, 98, 1743-1753.

Szejtli, J. 2003. Cyclodextrins in the textile industry, Starch, 55, 191-196.

Szejtli, J. 2004. Past, present, and future of cyclodextrin research, Pure and Applied Chemistry, 76, 1825-1845.

Szejtli, J. and Szente, L. 2005. Elimination of btter, disgusting tastes of drugs and foods by cyclodextrins, European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics, 61, 115-125.

Szente, L. and Szejtli, J. 2004. Cyclodextrins as food ingredients, Food Science and Technology, 15, 137-142.

Szerman, N., Schroh, I., Rossi, A.L., Rosso, A.M., Krymkiewics, N. and Ferrarotti, S.A. 2007. Cyclodextrin production by cyclodextrin glycosyltransferase from Bacillus circulans DF 9R, Bioresource Technology, 98(15),2886-2891.

Tachibana, Y., Karamura, A., Shirasaka, N., Suzuki, Y., Yamamoto, T., Fujiwara, S., Takagi, M. and Imanaka, T. 1999. Purification and characterization of an extremely thermostable cyclomaltodextrin glocanotransferase from a Newly Isolated hyperthermophilic Archeon, a *Thermococcus* sp. Applied and Environmental Microbiology, 65, 1991-1997.

Tamura, K., Nei, M. and Kumar, S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. PNAS, 101,11030-11035.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0, Molecular Biology ang Evolution;10:1093/molbev/msm092.

Temizkan, G. ve Arda, N. 2004, Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, Nobel Tıp Kitabevleri. s.186.

Thatai, A., Kumar, M. and Mukherjee K.J. 1999. A single step purification process for cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus cereus* for the production of cyclodextrins, Preparative Biochemistry and Biothecnology, 29, 35-45.

Theimann, V., Dönges, C., Prowe, S.G., Sterner, R. and Atranikian, G. 2004. Characterisation of a thermoalkali-stable cyclodextrin glycosyltransferase from the anaerobic thermoalkaliphilic bacterium *Anaerobranca gottschalkii,* Archives of Microbiology,182,226-235.

Tonkova, A. 1998. Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. Enzyme and Microbial Technology, 22, 678-686.

Treder, W., Thiem, J. and Schlingmann, M. 1986. Enzymatic synthesis of cyclodextrins with α-glucosylfluoride as a substrate for cyclodextrin-α(1-4) glucosyltransferase, Tetrahedron Letters, 27(46), 5605-5608.

Uitdehaag, J.C.M., van der Veen, B.A., Dijkhuizen, L. and Dijkstra, B. W. 2002. Catalytic mechanism and product specificity of cyclodextrin glycosyltransferase, a prototypical transglycosylase from the α-amylase family, Enzyme and Microbial Technology, 30, 295-304.

van de Manakker, F., Vermonden, T., van Nostrum, C.F. and Hennink, W.E. 2009. Cyclodextrin-based polymeric materials: synthesis, properties, and pharmaceutical/biomedical applications, Biomolecules, 10(12),3157-3175.

van der Maarel, M.J.E.C., van de Ween, B., Uitdehaag, J.C.M., Leemhuis, H. and Dijkhuizen, L. 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α-amylase family. Journal of Biotechnology, 94, 137-155.

van der Veen B.A., Uitdehaag, J.C.M., Dijkstra, B.W. and Dijkhuizen, L. 2000a. Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity, Biochimica et Biophysica Acta, 1543, 336-360.

van der Veen, B.A., Uitdehaag, J.C.M., Penninga, D., van Alebeek, G.J.W.M., Smith, L.M., Dijkstra, B.W. and Dijkhuizen, L. 2000b. Rational design of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 to increase α-cyclodextrin production, Journal of Molecular Biology, 296, 1027-1038.

van der Veen, B.A., Uitdehaag, J.C.M., Dijkstra, B.W. and Dijkhuizen, L. 2000c. The role of arginine 47 in the cyclization and coupling reactions of cyclodextrin glycosyltransferase from Bacillus circulans strain 251. European Journal of Biochemistry, 267, 3432-3441.

Volkova, D.A., Lopatin, S.A. and Varlamov, V.P. 2000. One-step purification of cyclodextrin glucanotransferase from Bacillus sp. 1070, Biocatalysis-2000: Fundamentals and applications, 41(6), 67-69.

Voncina, B., Vivod, V. and Chen, W.T. 2009. Surface modification of PET fibers with the use of β-cyclodextrin, Journal of Applied Polymer Science, 113, 3891-3895.

Wang, F., Du, G., Li, Y. and Chen, J. 2006. Regulation of CCR in the γ-CGTase production from *Bacillus macorous* by the spesific cell growth rate control, Enzyme and Microbial Technology, 39,1279-1285.

Wiegel, J., Ljungdahl, L.G. and Rawson, J.R. 1979. Isolation from soil and properties of the extreme thermophilic *Clostridium thermohydrosulfuricum,* Journal of Bacteriology, 139(3), 800-810.

Wiegel, J. and Ljungdahl, L.G. 1981. *Thermoanaerobacter ethanolicus* gen. nov., sp. nov., a new extreme thermophilic, anaerobic bacterium, Archives of Microbiology,128,343-348.

Wind, R.D., Liebl, W., Buitelaar, R.M., Penninga, D., Spreinat, A., Dijkhuizen, L. and Bahl, H. 1995. Cyclodextrin formation by the thermostable α-amylase of *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1 and reclassification of enzyme as a cyclodextrin glycosyltransferase, Applied and Environmental Microbiology, 61(4), 1257-1265.

Wind, R.D., Uitdehaag, J.C.M., Buitelaar, R.M., Dijkstra, B.W. and Dijkhuizen, L. 1998a. Engineering of cyclodextrin product specificity and pH optima of the thermostable cyclodextrin glycosyltransferase from *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1, The Journal of Biological Chemistry, 273(10), 5771-5779.

Wind, R.D., Buitelaar, R.M. and Dijkhuizen, L. 1998b. Engineering of factors determining α-amylase and cyclodextrin glycosyltransferase specificity in the cyclodextrin glycosyltransferase from *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1, European Journal of Biochemistry, 253,598-605.

Xue, Y., Xu, Y., Liu, Y., Ma, Y. and Zhou, P. 2001. *Thermoanaerobacter tengcongensis* sp. nov., a novel anaerobic, saccharolytic, thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Tengcong, China, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,51,1335-1341.

Yamamoto, T., Shiraki, K., Fujiwara, S. and Takagi, M. 1999. In Vitro Heat Effect on Functional and Conformational Changes of Cyclodextrin Gluconotransferase from Hyperthermophilic Archea, Biochemical and Biophysical Research Communication, 265, 57-61.

Yoon, S.H. and Robyt, J.F. 2006. Optimized synthesis of spesific sizes of maltodextrin glycosides by coupling reactions of *Bacillus macerans* cyclomaltodextrin glucanyltransferase, Carbohydrate Research, 341,210-217.

Yu, E.K.C., Aoki, H. and Misawa, M. 1988. Spesific alpha-cyclodextrin production by a novel thermostable cyclodextrin glycosyltransferase, Applied Microbology and Biotechnology, 28,377-379.

Zeikus, J.G. and Hegge, P.W. 1979. Anderson MA. *Thermoanaerobium brockii* gen. Nov., a new chemoorganotrophic, caldoactive, anaerobic bacterium, Archives of Microbiology, 122,41-48.

Zhang, M.Q. and Rees, D. 1999. A review of recent applications of cyclodextrins for drug discovery. Expert Opinion on Therapeutic Patents, 9(2), 1697-1717.

EKLER

EK 1 Fenol fitalein ile SGTaz aktivite tayininde renkte oluşan değişim

EK 2 β-Siklodekstrin glikoziltransferaz enzim aktivitesi tayini için hazırlanan β-Siklodekstrin standart eğrisi

EK 3 α-Siklodekstrin glikoziltransferaz enzim aktivitesi tayini için hazırlanan α-Siklodekstrin standart eğrisi

EK 4 Süpernatanttaki proteinlerin amonyum sülfatla çöktürülmesi sonucundaki görünümü

EK 5 Amonyum sülfatla çöktürülen proteinlerin 15000 rpm'de 15 dakika santrifüjenmesi ile oluşan protein çökeltisi

EK 6 0.01M sodyum asetat tamponuna (pH5.5) karşı diyaliz edilen protein örneği

EK 7 Peristaltik pompa, afinite kolonu, spektrofotometre ve fraksiyon toplayıcıdan oluşan protein saflaştırma sistemi

EK 8 Lowry protein miktarı tayini için hazırlanan sığır serum albümini (BSA-Bovine Serum Albumin) standart eğrileri

EK 9 Enzimin hidroliz aktivitesi tayini için hazırlanan glikoz standart eğrisi

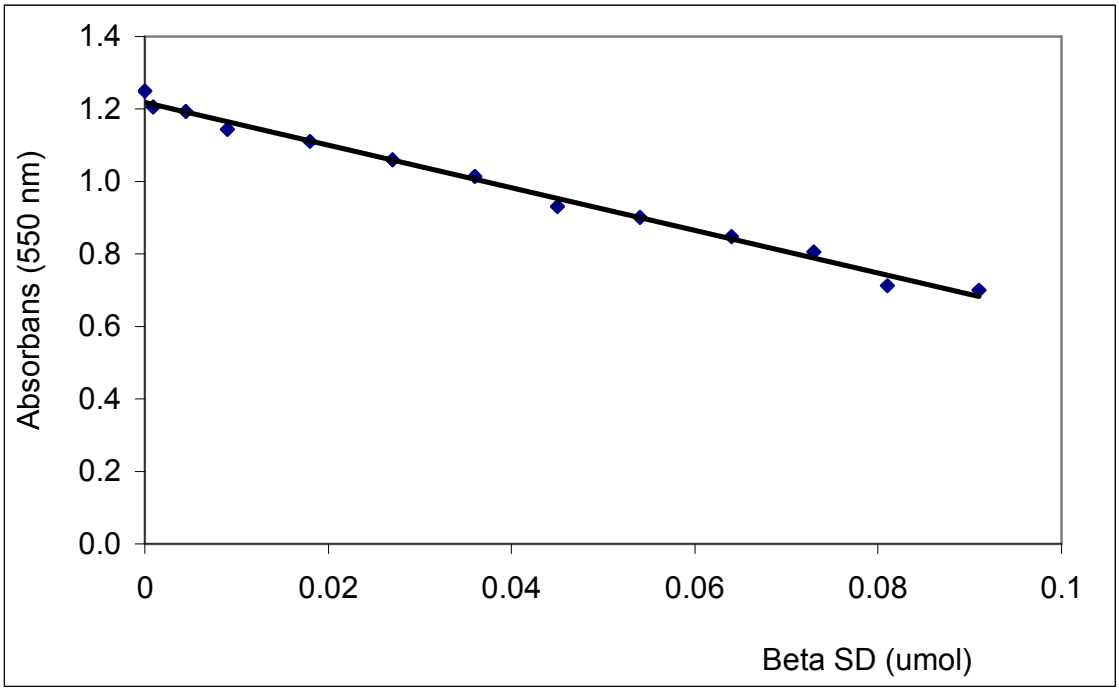
EK 10 Siklodekstrinin 6g/L konsantrasyondaki standart kromatogramları, a. α-SD, b. β-SD, c. γ-SD

EK 11 α-, β-, ve γ-Siklodekstrinlerin HPLC ile hazırlanan standart eğrileri

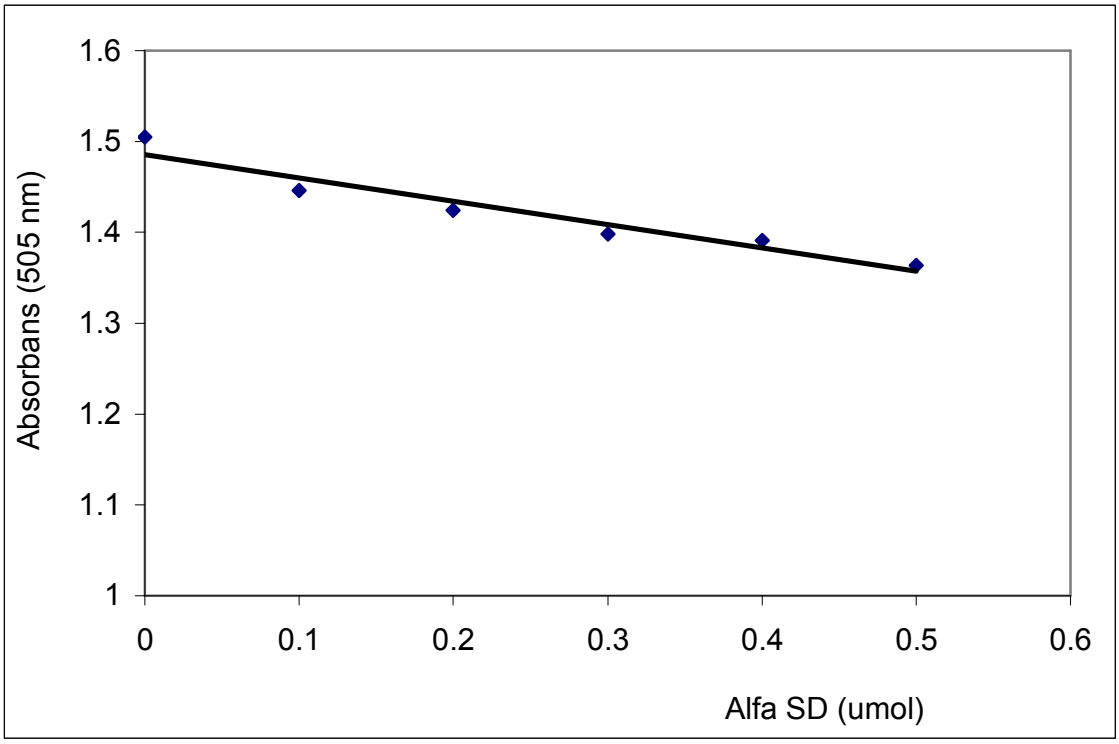
EK 1 Fenol fitalein ile SGTaz aktivite tayininde renkte oluşan değişim



EK 2 β-Siklodekstrin glikoziltransferaz enzim aktivitesi tayini için hazırlanan β-Siklodekstrin standart eğrisi



EK 3 α-Siklodekstrin glikoziltransferaz enzim aktivitesi tayini için hazırlanan α-Siklodekstrin standart eğrisi



EK 4 Süpernatanttaki proteinlerin amonyum sülfatla çöktürülmesi sonucundaki görünümü



EK 5 Amonyum sülfatla çöktürülen proteinlerin 15000 rpm'de 15 dakika santrifüjenmesi ile oluşan protein çökeltisi



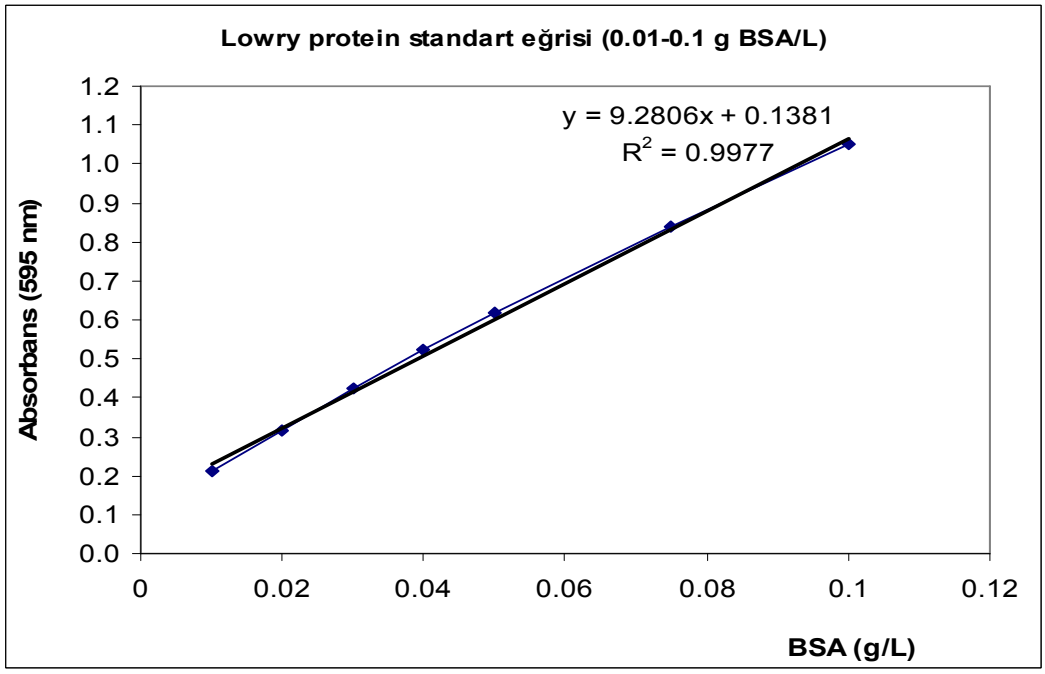
EK 6 0.01 M sodyum asetat tamponuna (pH 5.5) karşı diyaliz edilen protein örneği

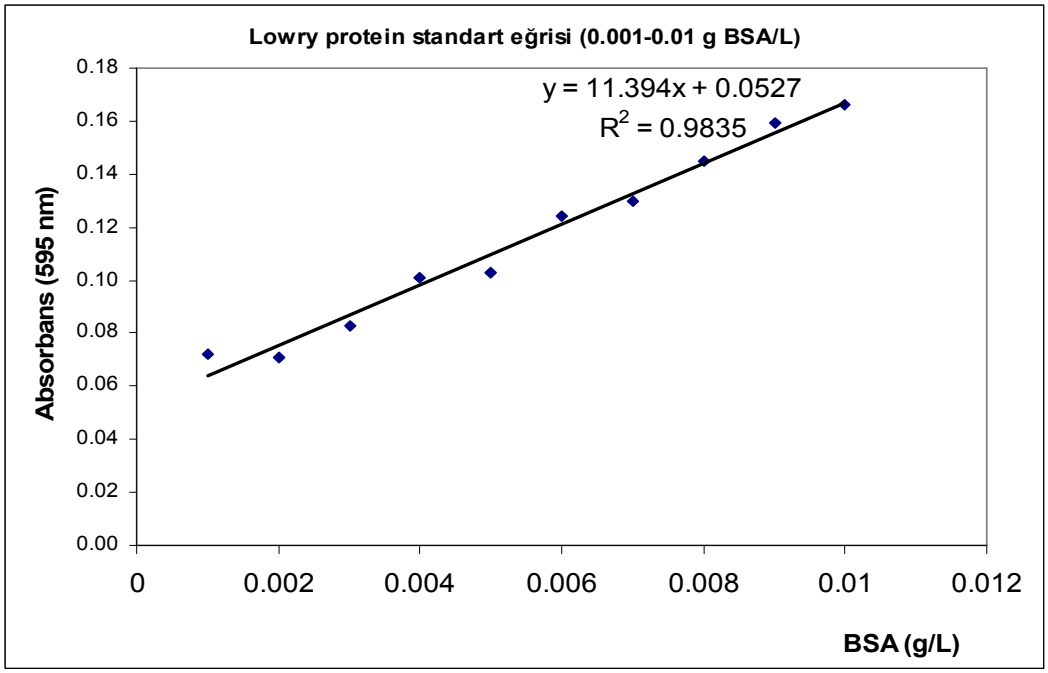


EK 7 Peristaltik pompa, afinite kolonu, spektrofotometre ve fraksiyon toplayıcıdan oluşan protein saflaştırma sistemi

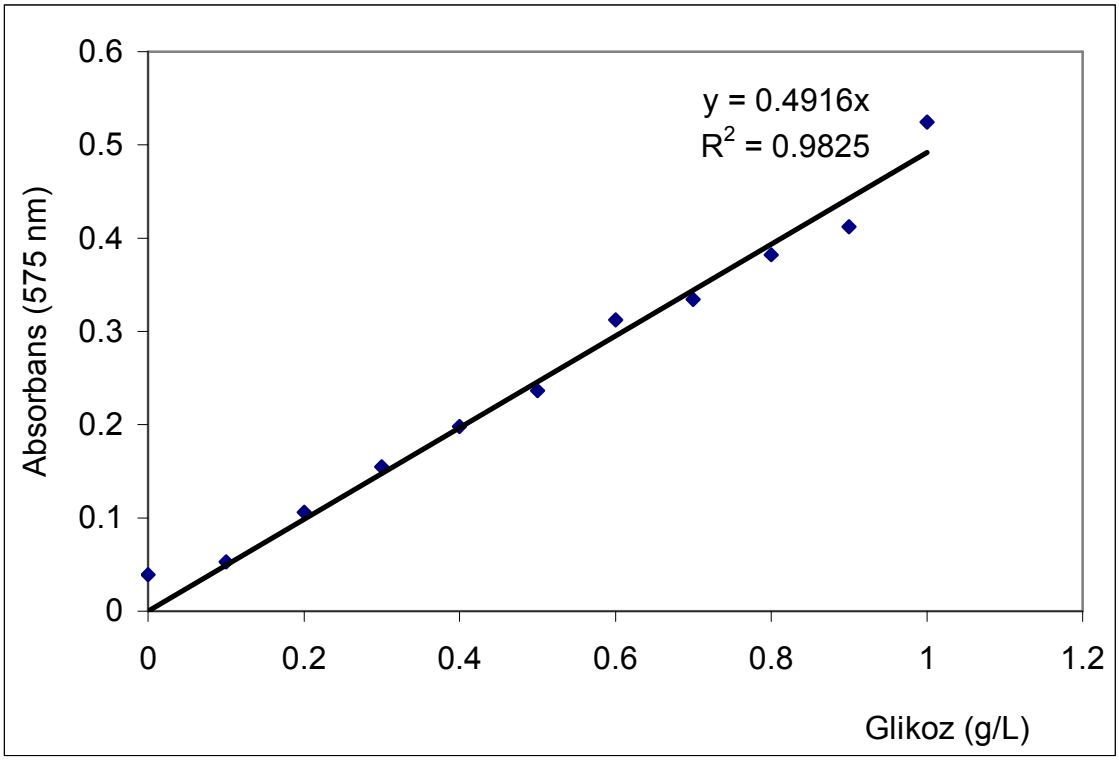


EK 8 Lowry protein miktarı tayini için hazırlanan sığır serum albümini (BSA-Bovine Serum Albumin) standart eğrileri

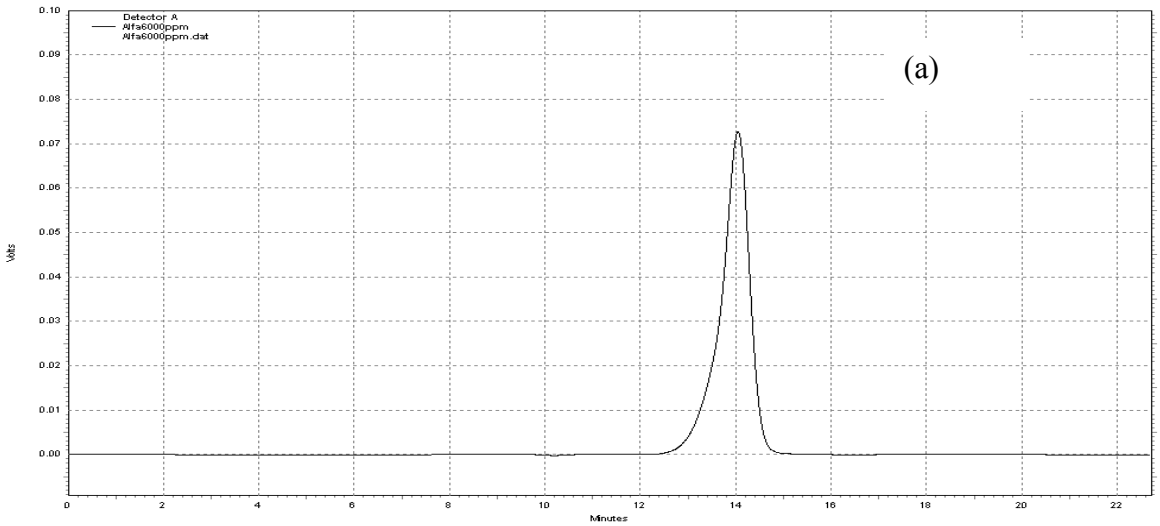


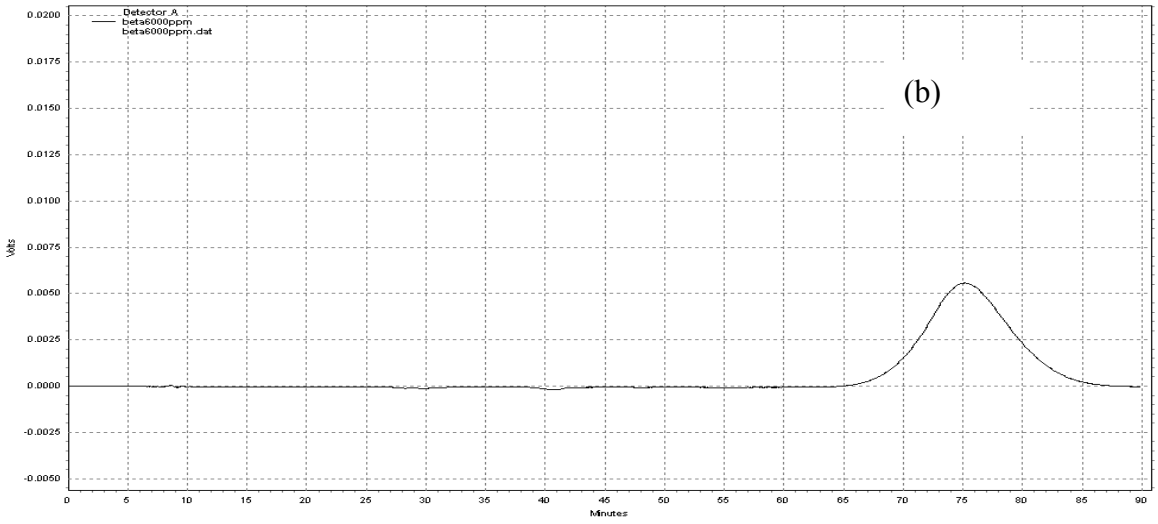


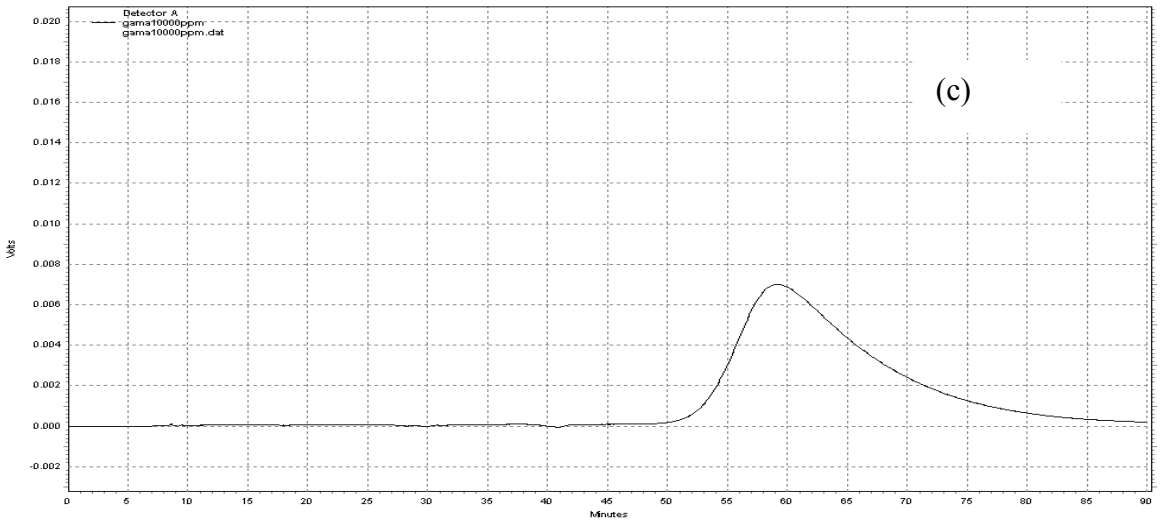
EK 9 Enzimin hidroliz aktivitesi tayini için hazırlanan glikoz standart eğrisi



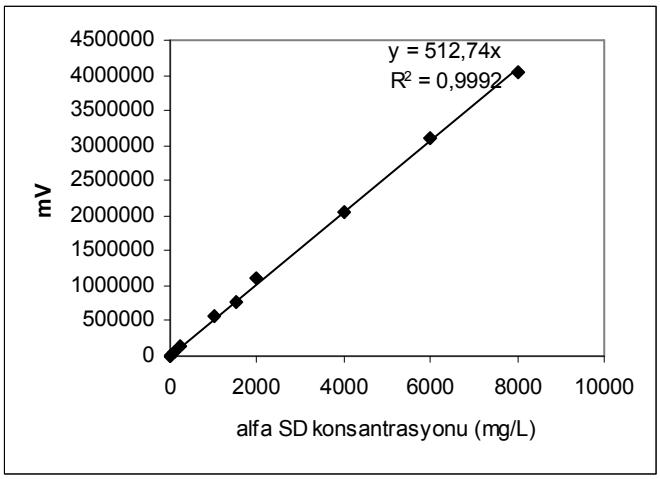
EK 10 Siklodekstrinin 6g/L konsantrasyondaki standart kromatogramları, a. α-SD, b. β-SD, c. γ-SD

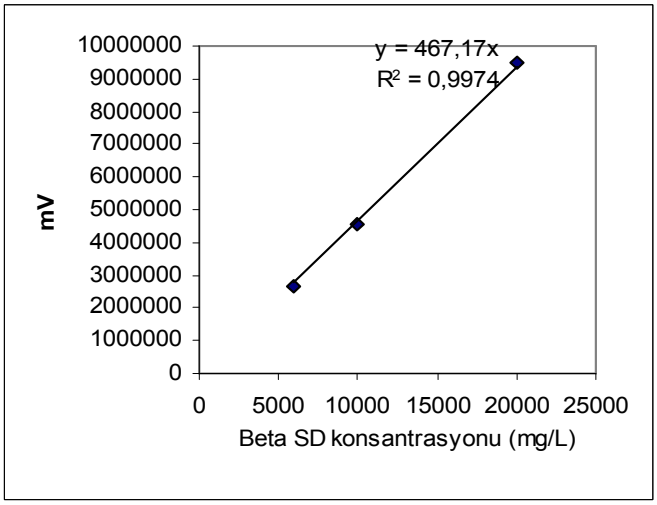


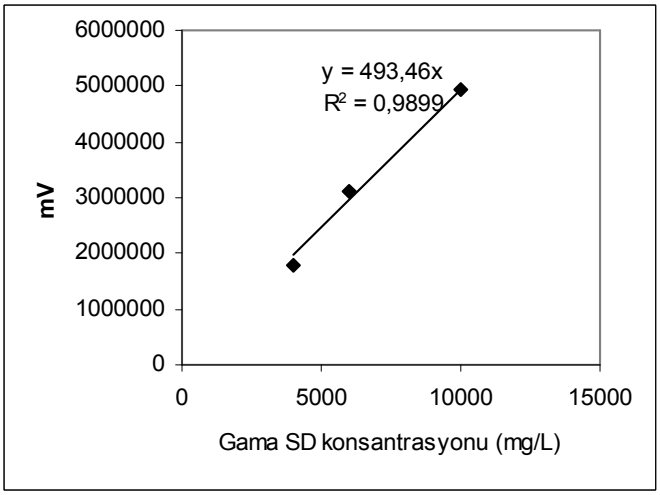




EK 11 α- β- ve γ-Siklodekstrinlerin HPLC ile hazırlanan standart eğrileri







ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ayşe AVCI

Doğum Yeri : Erbaa

Doğum Tarihi :1970

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Erbaa Lisesi (1986)

Lisans : Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Müh. Bölümü (1991)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Müh. Anabilim Dalı (2004)

Çalıştığı Kurumlar

1991-1992 : Erbaa Coşkun Önder Lisesi, Erbaa Ortaokulu- İngilizce Öğretmeni.

1992-1998 : Safmaya Sanayi A.Ş., Amasya- Fermentasyon Şefi

1998-1999 : SC. Rompak SRL, Iaşi, Romanya- Üretim Müdürü.

Yayınları

SCI Kapsamındaki Dergilerde Yayınlanan Araştırma Makaleleri

1. **Avci, A.** and Dönmez, S. 2009. Novel thermophilic anaerobic bacteria producing cyclodextrin glycosyltransferase, Process Biochemistry, 44, 36-42.

2. **Avci, A.** and Dönmez, S. 2006. Effect of zinc on ethanol production by two *Thermoanaerobacter* strains. Process Biochemistry, 41, 984-989.

Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildirileri

1. **Avci, A.**, Bereketoğlu, A. ve Dönmez, S. Patatesten aseton bütanol etanol (ABE) üretimi üzerine bir çalışma. 6. Gıda Mühendisliği Kongresi, 6-8 Kasım 2009. Antalya, s. 107 (Sözlü sunum).

2. **Avci A**. ve Dönmez, S. Ekstremofiller ve ekstremozimler. 6. Gıda Mühendisliği Kongresi, 6-8 Kasım 2009. Antalya, s. 207 (Poster).

3. **Avci, A.** ve Dönmez, S. Bazı termofilik anaerobik bakteriler ile siklodekstrin glikoziltransferaz üretimi. 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran 2008, Trabzon, s. 102 (Sözlü sunum).

4. **Avcı, A.** ve Dönmez, S. Siklodekstrinle ve Endüstriyel uygulama alanları. Türkiye 10. Gıda Kongresi, 21-23 Mayıs 2008, Erzurum, s. 841 (Poster).

5. **Avcı, A.** ve Dönmez. Bazı *Thermoanaerobacter* türlerinin etanol üretin oranlarına metallerin etkisi, 16. Ulusal Biyoloji Kongresi,20-24 Haziran 2004, Adana, (Sözlü sunum).

6. Karaağaç, S., **Avcı A.** ve Dönmez, S. Bir *Thermoanaerobacter* türünün etanol üretim oranının belirlenmesi, 13. Biyoteknoloji Kongresi, 25-29 Ağustos 2003, Çanakkale, s. 280 (Sözlü sunum).

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildirileri

1. **Avci, A.** and Dönmez, S. Production and purification of cyclodextrin glycosyltransferase by two newly isolated *Thermoanaerobacter* strains. XII. International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, 5-9 August 2008, İstanbul, p.221 (Poster)

2. **Avci, A.** and Dönmez, S. Purification and Characterisation of CGTase Produced by a Novel Thermophilic Anaerobic bacteria: *Thermoanaerobacter* sp. 5K. ISAM 2009, 6th International Symposium of Anaerobic microbiology, 18-20 June, 2009, Liblice, Czech Republic, p. 18. (Sözlü sunum).

3. **Avci, A.** and Dönmez, S. Some Specifications of CGTase of Thermophilic Anaerobic Bacteria. ISAM 2009, 6th International Symposium of Anaerobic microbiology, 18-20 June, 2009, Liblice, Czech Republic, p 117 (Poster).

4. **Avci, A.** Poyrazoğlu, E.S. and Dönmez S. Effects of Different Substrates on Cyclodextrin Production by a Thermostable CGTase. BIOTECH METU2009, International Symposium on Biotechnology: Developments and Trends, 27-30 September, 2009, Ankara, p. 79 (Poster).

5. **Avci, A.**, Bereketoğlu, A. and Dönmez S. Isolation and Identification of Aceton Butanol Ethanol (ABE) Producing *Clostridium* Strains. BIOTECH METU2009, International Symposium on Biotechnology: Developments and Trends, 27-30 September, 2009, Ankara, p 59 (Poster).