

Glikoz İzomeraz Üreticisi Dört *Geobacillus* Suşunun İzolasyonu ve Moleküler Metotlar Kullanarak Tanımlanması

Isolation of Four Glucose Isomerase Producing Strains of Geobacillus and Their Identification Using Molecular Methods

Kadriye İNAN BEKTAŞ*

Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 61080, Trabzon

• Geliş tarihi / Received: 06.06.2017 • Düzeltilek geliş tarihi / Received in revised form: 28.02.2018 • Kabul tarihi / Accepted: 27.03.2018

Öz

Türkiye'nin batısındaki iki kaplıca, termofilik mikroorganizmaların mevcudiyetine göre araştırıldı ve iki termal kaplıcadan, 23 termofilik bakteri izole edildi. İzolatlardan, 4 tanesinin glikoz izomeraz üretimi açısından pozitif olduğu belirlendi. BT5, CT6SARI ve CT1.2 izolatlarının glikoz izomerazları, pH 6.5'te optimum büyüme gösterdi; buna karşılık izolat BT1 enzimi, pH 7.5'te optimal aktivite gösterdi. Bu enzimler arasında BT1 izolatının optimal büyüme sıcaklığı 75 °C olarak belirlenirken, diğer üç izolatın enzimleri ise 80 °C'de optimal büyüme gösterdi. 16S rRNA gen dizi analizleri ile 4 izolatın, *Geobacillus* cinsine ait türler oldukları belirlendi. *recN* dizisi benzerlik analizine dayanarak, izolat CT6SARI'nın, *G. thermodenitficans*'a; izolat BT1'in de, *G. stearothermophilus*'a ait suşlar oldukları belirlendi. BT5 ve CT1.2 izolatlarının kesin tür tayinleri yapılamadı.

Anahtar kelimeler: *Geobacillus*, Glikoz izomeraz, *recN*, 16S rRNA

Abstract

Two hot springs located in west of Turkey were investigated with respect to presence of thermophilic microorganisms. 23 thermophilic bacteria were isolated from two hot springs. Among these, 4 strains were found positive for glucose isomerase production. The glucose isomerases of strains BT5, CT6SARI and CT1.2 showed optimal growth at pH 6.5, whereas the enzyme of strain BT1 represented optimal activity at pH 7.5. The strain BT1 had the lowest temperature optima (75 °C) among these strains whereas the other three strains showed optimal growth at 80 °C. On the basis of the 16S rRNA gene sequence analysis, the 4 isolates are members of the genus *Geobacillus*. Based on *recN* sequence similarity analysis, the isolate CT6SARI is a strain of *G. thermodenitficans*. The isolate BT1 is a strain of *G. stearothermophilus*. The species identity for the isolates BT5 and CT1.2 are uncertain.

Keywords: *Geobacillus*, Glucose-isomerase, *recN*, 16S rRNA

* Kadriye İNAN BEKTAŞ; kadriyensis@gmail.com; Tel: (0462) 377 35 72; orcid.org/0000-0002-5909-588X

1. Giriş

Geobacillus cinsi, *Bacillus* cinsinden ayrılmış olup, tip türü *Geobacillus stearothermophilus*'tur. Termofilik, asidofilik, alkalifilik ve halofilik özelliklere sahip birçok tür bu cinse dâhil edilmiştir (Nazinavd., 2001). Bu türlerin geleneksel biyokimyasal tekniklerle tanımlanması, kesin olmayan ve zaman alıcı bir işlemdir. Prokaryotik organizmalar boyunca oldukça korunan 16S rRNA gen dizilerinin analizleri, filogenetik ilişkileri belirlemek için en yaygın şekilde kullanılmaktadır (Meintanisvd., 2008). Bununla birlikte, 16S rRNA geninin sıklıkla, yakından ilişkili bazı türler arasındaki filogenetik ilişkilerin çözülmesi için yetersiz olduğu da kanıtlanmıştır (La Ducvd., 2004). Bu nedenle, pek çok teknik mevcut olsa da, DNA-DNA hibridizasyon değerlerinin analizi bakteri türlerini tanımlamak için "altın standart" olarak kabul edilmektedir (Stackebrandt ve Goebel 1994; Stackebrandt vd., 2002; Zeigler, 2003). Ancak, hibridizasyon yöntemleri çoğunlukla özel ekipman ve çok fazla zaman gerektirdiği için, laboratuvarlar arasındaki hibridizasyon değerlerinin gerekli hassasiyetle tekrarlanabilmesi zor olmaktadır. Sonuç olarak; sistematik, DNA dizilerinin özellikle protein kodlayan gen dizilerinin karşılaştırılmasına giderek daha fazla güvenilir sonuçlar elde etmeye başlamıştır (Stackebrandt ve Goebel, 1994). Son zamanlarda, bakteriyel sistematiğe kullanılabilen otuzdan fazla gen tespit edilmiş olup; bunların arasında DNA onarımı ve genetik rekombinasyon protein (*recN*) geni, genom benzerlik tahmini için en güçlü adaylardan biridir (Zeigler, 2005). *recN* dizi benzerlik skorları, iki organizma tarafından paylaşılan bütün genom dizisi benzerliğini yüksek bir doğruluk derecesinde tahmin edebilir. İncelenen türler için, *recN* analizi ile öngörülen genom benzerlik skorları doğrudan genomik hizalanmalarda ölçülenlerden sadece % 4.4 oranında farklıdır. *Geobacillus* cinsi için, *recN*, 16S rRNA geninden açıkça üstün olup, tür düzeyinde çok daha büyük bir çözünürlük gücü vardır. Böylece *recN*, Stackebrandt vd.'lerinin (2002) gereksinimlerini karşılamaktadır ve *Geobacillus* cinsi içindeki türlerin tayini için başarıyla kullanılmaktadır (Zeigler, 2005).

Endüstriyel açıdan önemli termostabil enzim kaynakları olmaları nedeniyle, *Bacillus* cinsi termofilik endospor oluşturan bakteriler, son yıllarda önemli bir çalışma alanı olmuştur (Beg vd., 2000; Touzel vd., 2000). Proteazlar, amilazlar, pullulanazlar, peroksidaz, glukozizomerazlar, lipazlar, ksilanlar ve DNA kesim

enzimleri gibi endüstriyel açıdan önemli pek çok termostabil enzimlerin kaynağı olma potansiyelleri nedeniyle bu termofilik basillerin önemi artmıştır. Glikoz izomerazlar, gıda, yem, tekstil endüstrisi, hemiselülozdan etanol üretimi ve atık arıtımı gibi pek çok endüstri alanında geniş olarak kullanılmaktadır. Bu işlemlerin çoğu, yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirildiği için, termostabil enzimler büyük avantaj sağlamaktadır (Bhosale vd., 1996; Brosius vd., 1978; Calik vd., 2009; Canakci vd., 2007).

Glukozun fruktoza, ksilozun ksiluloza isomerizasyonunu katalizleyen ve ksiloz izomeraz olarak da adlandırılan glukoz izomeraz (D-xyloseketol-isomerase E.C 5.3.1.5) birçok mikroorganizmada bulunmaktadır. Bu enzim, hem hemiselülozdan etanol üretimine yardımcı olduğu için hem de fruktoz şurubu diğer adıyla HFCS (High Fructose Corn Syrup) üretiminde kullanıldığı için büyük endüstriyel öneme sahiptir. Özellikle glukozu fruktoza dönüştürerek HFCS üretiminde kullanımı ile glukoz izomeraz, gıda endüstrisinde en çok kullanılan enzimlerden biri haline gelmiştir (Calik vd., 2009). Fruktoz şurubu; % 42 veya 55 fruktoz içeren tatlı, besleyici sakkarit karışımı olup, mısır nişastası glukozunun GI enzimi kullanılarak fruktoza dönüştürülmesi ile elde edilen bir üründür (Bandlish vd., 2002; Mu vd., 2012). HFCS'nin başlıca kullanım alanları içecek, fırıncılık, konserve ve şekerleme endüstrileridir (Bhosalevd.,1996).

HFCS sürecinde, fruktoz:glukoz dengesinin nihai konsantrasyonu, sıcaklıklara bağlıdır. HFCS üretiminde mezofilik organizmalardan elde edilen glukoz izomeraz enzimleri ile %40-42 oranında fruktoz üretilebilmektedir. Fakat endüstriyel uygulamalarda kullanılan HFCS'de % 55 fruktoz içeriği aranmaktadır. Dolayısı ile bu oran kromatografik olarak %55 seviyelerine getirilir. Fakat bu işlem üretim maliyetini arttırmaktadır. Sıcaklığın artmasıyla fruktoz-glukoz dengesi fruktoz tarafına kaymakta böylece pahalı olan kromatografik saflaştırmaya gerek kalmamaktadır (Bhosale, 1996; Karaoğlu vd., 2013; Xu vd., 2014). Bu yüzden bu uygulamalarda yüksek sıcaklıklarda çalışan termofilik mikroorganizmalardan elde edilen enzimler tercih edilmektedir (Hartley vd., 2000; Yanmis vd., 2014). Fakat yüksek pH değerlerinde yüksek sıcaklık uygulamaları, istenmeyen mannoz, psikoz ve diğer asidik yan ürünlerin oluşumuna sebep verdiğinden düşük pH değerlerinde çalışan bir enzime ihtiyaç bulunmaktadır (Karaoğlu vd., 2013; Xu vd., 2014). Ayrıca, ticari olarak glukoz izomeraz uygulaması, nişasta sıvılaştırma ve

glikoz izomerleşmesinin tek bir aşamada gerçekleştirilebilmesini mümkün kılmak için asidik bir optimum pH'ya ihtiyaç duymaktadır. Elde edilebilir en yüksek fruktoz seviyesini arttırmak için termostabil ve asidik ortamda aktif glikoz izomerazlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle bu özelliklere sahip glikoz izomeraz üretebilen yeni mikroorganizmaları bulmak endüstriyel açıdan oldukça önem arz etmektedir (Calik vd., 2009).

Bu çalışmada, Hisarköy Kaplıcası (Balıkesir) ve Hıdırlar Kaplıcasından (Çanakkale) izole edilen bazı termofilik *Geobacillus* suşları üzerinde moleküler tanımlama çalışmaları yapıldı. Bu suşların glikoz izomeraz aktiviteleri araştırıldı ve endüstriyel kullanım potansiyelleri belirlendi.

2. Araç ve Yöntemler

2.1. Örneklem ve İzolasyon

Bu çalışmada, Hisarköy Kaplıcası (Balıkesir) ve Hıdırlar Kaplıcası'ndan (Çanakkale) toplanan çamur ve su örneklerinden, termofilik bakteriler izole edilmiştir. Bu kaplıcaların su sıcaklığı 70 - 130 °C arasındadır. Kaplıcaların çamur ve su örnekleri 4° C'de laboratuvara getirilmiş ve bu numuneler hemen Luria-Bertani (LB) besiyerinde 60 °C'de zenginleştirme için kullanılmıştır. Bir günlük zenginleştirme kültürlerinin, 10 ml'de Luria-Bertani sıvı ortamında alt kültürleri yapıldı ve Triptik Soy Agar petrilere çizgi ekim gerçekleştirildi. Birbirlerinden farklı koloni morfolojisine sahip olduğu düşünülen koloniler seçildi ve izole edildi. İzolasyon için kullanılan yöntem daha önceki çalışmamızda detaylı bir şekilde açıklanmıştır (Inan vd., 2011). İzolatların saflığı ve koloni morfolojisi mikroskop ile kontrol edildi.

2.2. Glikoz İzomeraz Aktivitesi

Tüm izolatlar, LB besiyerinde 60 °C'de bir gece çoğaltıldılar. Gece kültürlerinden, optik yoğunluk (O.D.) 0.1 olacak şekilde taze LB besiyerlerine yeniden ekim yapıldı ve O.D. 0.6 oluncaya kadar 60 °C'de çalkalamaya bırakıldılar. Glikoz izomerazın ekspresyonu için O.D. 0.6'da (600 nm)son konsantrasyon % 0.5 olacak şekilde D-ksiloz ile indüklendiler ve 4 saat daha 60 °C'de çalkalandılar. Hücreler, 11.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek toplandı ve çöken hücreler ve 50 mM MOPS (pH6.5) tamponu ile çözüldüler. Ardından hücre içi proteinleri salmak için Sartorius Labsonic marka sonikatör ile hücreler patlatıldı. Hücre kalıntılarını gidermek için 14.800

rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Pellet kısmı atıldı ve sıvı kısmı oluşturan hücre özütü, enzim kaynağı olarak glikoz izomeraz aktivitesi bakıldı.

Glikoz izomeraz aktivitesi, Belfaqui ve arkadaşları (2000) tarafından geliştirilen metod ile tayin edildi. 10 mM MgSO₄, 1 mM CoCl₂, 0.1 M glikoz ve farklı hacimlerde enzim özütü, 50 mM MOPS tamponunda (pH 7.0) 100 µl tepkime hacminde 30 dakika boyunca 85 °C'de inkübe edildi. Üzerine 100 µl 0.5 M perklorik asit ilave edilerek reaksiyon durduruldu. Enzim reaksiyonundan sonra oluşan fruktoz miktarı, sistein-karbazol-sülfürik asit yöntemi (Dische ve Borenfreund, 1951) ile tayin edildi. Reaksiyon çözeltilisi üzerine, 40 µl % 1.5 sistein hidroklorür ve 40 µl % 0.12 karbosol eklendi ve vorteksledi. Üzerine 1.2 ml % 70 sülfürik asit ilave edilip, tekrar vorteks yapıldı ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Spektrofotometrede 560 nm dalga boyunda ölçümler gerçekleştirildi.

Sıcaklığın glikoz izomeraz aktivitesine etkisi, 250 mM glukoz varlığında MOPS tamponunda (pH 6.5) belirlendi. Glikoz izomerazın en iyi çalıştığı optimum sıcaklık değeri 25, 37, 45, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ve 100 °C'de ayarlanmış ısıtıcı bloklarda gerçekleştirilen seri reaksiyonlar sonucu belirlendi.

Glukoz izomeraz aktivitesine pH'ın etkisi farklı pH aralığındaki çeşitli tamponlarda, 250 mM glukoz konsantrasyonunda, 85 °C'de 30 dakikalık reaksiyon şartlarında incelendi. Asetat tamponu pH 5 – 5.5; fosfat tamponu pH 6 – 7.0; Tris-HCl tamponu pH 7.5 – 9.0 ve glisin tamponu pH 9.5–10.0 aralığında kullanıldı.

2.3. Glikoz İzomeraz Üreten İzolatların Morfolojik Karakterizasyonu

Glikoz izomeraz üreten izolatların hücre morfolojisi ve hareketi, logaritmik fazdaki sıvı kültürlerin faz-kontrast mikroskopunda (Nikon Eclipse E600; Olympus) incelenmesiyle belirlendi. Kolonilerin morfolojisi ve pigmentasyonu, 60 °C'de 1 günlük inkübasyondan sonra Triptik Soy Agar üzerinde gözlemlendi.

Ardından izolatların hücre duvarı özelliklerinin ortaya çıkarılması amacıyla Gram boyama yapıldı ve bu yöntemle göre izolatların Gram boyama tipleri belirlendi (Dussault, 1955; Powers, 1995). İzolatların spor yapılarını oluşturup oluşturmadığının ve sporun hücre içerisindeki pozisyonunun belirlenmesi amacıyla, spor boyamalar yapıldı (Smibert ve Krieg, 1994).

2.4. 16S rRNA ve *recN* Gen Dizilerinin PCR Amplifikasyonu ve Klonlanması

16S rRNA genleri, izole edilen genomik DNA'dan, bakteriyel 16S rRNA genlerinin 5' ve 3' bölgelerindeki korunmuş bölgelere bağlanacak şekilde tasarlanmış oligonükleotit primerler kullanılarak seçici olarak çoğaltıldı. İleri primer, UNI16S-L (5'-ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTTCA), *Escherichia coli* 16S rRNA'nın 11-26 pozisyonlarına karşılık gelirken; geri primer, UNI16S-R (5'-ATGGTACCGTGTGACGGGCGGTGTTGTA), *E. coli* 16S rRNA'nın 1411 ila 1393 pozisyonlarının tamamlayıcısı şeklinde dizayn edilmiştir (Brosius vd., 1978). PCR reaksiyonlarının şartları Beffa ve arkadaşlarına (1996) göre oluşturuldu. PCR reaksiyonu ile çoğaltılan 16S rRNA genleri, pGEM-T Easy Klonlama Kiti kullanılarak, pGEM-T Easyklonlama vektörüne firmanın öngördüğü konsantrasyonlar ve şartlar gerçekleştirilerek klonlandı.

recN genleri, *Geobacillus spoIVB* ve *ahrC* genlerinin (Zeigler, 2003) 5' ve 3' bölgelerindeki korunmuş bölgelere bağlanacak şekilde tasarlanmış oligonükleotit primerler kullanılarak, izole edilen genomik DNA'dan PCR yardımı ile çoğaltıldı. F1-2- (5'-CGA TTT GCG GCG ACG ATA C-3') ileri primeri ve R1-1- (5'-TAC ACC ATG CAA AAA CGG TTA C-3') geri primeri olarak kullanılmıştır. PCR reaksiyonlarının şartları Zeigler'e (2003) göre oluşturuldu ve elde edilen *recN* dizileri pGEM-T Easy vektör sistemi kullanılarak klonlama yapıldı.

Klonlanan 16S rRNA ve *recN* genlerinin baz dizin analizi, otomatik dizi analizatörleri aracılığı ile (Macrogen, Hollanda) belirlendi. *recN* geninin yaklaşık 1600 nt ve 16S rRNA geninin de yaklaşık 1400 nt'lik baz dizileri belirlendi. Bu diziler, BLAST araması (Altschul vd., 1990) kullanılarak GenBank'ta var olan diğer bakteriyel dizilerle karşılaştırıldı ve aralarındaki benzerlik oranları belirlendi (Benson vd., 1999).

16S rRNA ve *recN* gen dizileri, çoklu hizalama programı olan CLUSTAL W programı kullanılarak hizalandı (Thompson vd., 1994). Kimura'nın iki parametre modeli (Kimura, 1980) kullanılarak evrimsel uzaklıklar hesaplandı ve filogenetik analizler neighbour-joining yöntemi ile gerçekleştirildi (Sharmavd., 2008). Filogenetik ağaçlar, MEGA4 paket programı (Felsenstein 1985; Tamuravd., 2007) kullanılarak oluşturuldu.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. Bakteri İzolasyonu ve Glikoz İzomeraz Aktivitesinin Belirlenmesi

Glikoz izomeraz, glukozu fruktoza izomerize etmesi sebebiyle endüstriyel alanda, özellikle HFCS üretiminde ticari bir öneme sahiptir. Glikoz izomeraz, sahip olduğu bu endüstriyel önem nedeniyle bugüne kadar birçok bilim insanı tarafından çalışılmış olup, farklı glikoz izomeraz üreticilerinin tipik olarak orta dereceli mezofilikler olduğu bilinmektedir (Abdel-rassol vd., 2012; Karaoğlu vd., 2013). HFCS üretiminde sıcaklığın artmasıyla fruktoz-glukoz dengesi fruktoz tarafına kaymakta böylece pahalı olan kromatografik saflaştırmaya gerek kalmamaktadır (Bhosale, 1996; Xu vd., 2014). Bu yüzden bu uygulamalarda yüksek sıcaklıklarda çalışan termofilik mikroorganizmalardan elde edilen enzimler tercih edilmektedir.

Bu ihtiyaçlardan dolayı bizde bu çalışmada, pek çok araştırmacı gibi termofilik karakterli bakterilerin glikoz izomerazlarını araştırdık. Bu çalışma kapsamında Hisarköy Kaplıcasından (Balıkesir) 10 ve Hıdırlar Kaplıcasından (Çanakkale) 13 izolat olmak üzere toplam 23 termofilik bakteri izole edildi. 23 izolatanın glikoz izomeraz aktiviteleri araştırıldı ve sadece 4 izolatanın (BT1, BT5, CT6SARI ve CT1.2) glikoz izomeraz aktivitesine sahip olduğu belirlendi. Bu izolatların ürettikleri glikoz izomerazların, optimum sıcaklık ve pH değerleri belirlendi. Sıcaklığın glikoz izomeraz aktivitesi üzerine etkisi, 25-100 °C aralığında spektrofotometrik olarak test edildi. İzolatlar arasında, BT1'in glikoz izomerazının en düşük optimum sıcaklığa (75 °C) sahip olduğu, diğer 3 izolatanın (BT5, CT6SARI ve CT1.2) enzimlerinin ise optimum sıcaklıklarının 80 °C olduğu belirlendi (Tablo 1).

HFCS üretiminde mezofilik organizmalardan elde edilen glikoz izomerazlar, ticari olarak immobilize edilmiş bir şekilde 55-65 °C'de pH 7.5 ile 8.5 aralığında kullanılmaktadır (Schenck, 2000; Xu vd., 2014). Termofilik *A. gonensis* glikoz izomerazının optimum 85 °C'de aktivite gösterdiği bulunmuştur (Karaoğlu vd., 2014). Benzer şekilde *Streptomyces* sp. (Inyang vd., 1995) ve *Bacillus* sp. (Chauthaiwale vd., 1994) türlerine ait glikoz izomerazların optimum çalışma sıcaklıklarının da 85°C olduğu gösterilmiştir. *Thermotoganea politana* glikoz izomerazının ise optimum 95°C'de çalıştığı gösterilmiştir (Hess vd., 1998).

Tablo 1. İzolatların ürettikleri glikoz izomerazların sıcaklık-aktivite (%) tablosu.

Sıcaklık (°C)	Aktivite (%)			
	BT1	BT5	CT6SARI	CT1.2
25	5	10	12	8
37	9	15	15	13
45	14	20	21	20
55	23	36	34	35
60	43	40	41	39
65	75	51	50	47
70	95	80	85	78
75	100	89	95	89
80	85	100	100	100
85	71	90	94	88
90	65	78	84	80
95	41	70	55	68
100	23	40	25	51

Bu glikoz izomerazlar haricindeki diğer glikoz izomerazlar genel olarak optimum 60°C ile 80°C arasında aktivite göstermektedirler. Bu verilere dayanılarak, 80°C'lik optimum çalışma sıcaklığı ile BT5, CT6SARI ve CT1.2 glikoz izomerazlarının termofilik enzimler olduğu söylenebilir.

Ticari olarak glikoz izomeraz uygulaması, nişasta sıvılaştırma ve glikoz izomerleştirme işlemlerinin tek bir aşamada gerçekleştirilmesini sağlamak için, optimum asidik bir pH istemektedir. Düşük pH'ta izomerizasyon avantajından dolayı, ticari olarak glukoz izomeraz uygulamaları için asidik pH'lar arzu edilir. (Karaoğlu vd., 2013; Xu vd., 2014). Bununla birlikte, endüstride kullanılan mevcut glikoz izomerazların optimum pH aralığı ise genellikle pH 7.0 ile 9.0 arasındadır (Benson vd., 1999, Karaoğlu vd., 2013). Bu nedenle, asidik ortamda yüksek aktivite gösteren glikoz izomerazlar endüstride aranan enzimlerdir ve araştırmacılar sanayide hâli hazırda kullanılanlardan daha fazla asidik ve termostabil

enzim üretebilen mikroorganizmaları izole etmeye yönelik çalışmalar yapmaktadırlar.

Bu çalışma kapsamında izole edilen glikoz üreticisi 4 bakterinin glikoz izomerazın aktivitesi, 5.0 ila 10.0 arasındaki pH aralığında test edildi. BT5, CT6SARI ve CT1.2 izolatlarının ürettikleri glikoz izomerazların, pH 6.5'te optimum aktivite gösterdikleri; BT1 izolatının glikoz izomerazının ise, pH 7.5'te optimum aktivite gösterdiği belirlendi (Tablo 2).

Birçok glikoz izomeraz enziminin optimum aktiviteleri genel olarak pH 7.0 ila 9.0 arasında değişen 6.5'den yüksek pH'larda gözlenmiştir (Karaoğlud., 2013). *Thermoanaerobacterium* sp. (Liu vd., 1996), *Lactobacillus brevis* (Yamanaka, 1975), *Thermus aquaticus* (Lehmbacher, 1990), *Anoxybacillus gonensis* (Karaoğlu vd., 2013) glikoz izomerazları haricindeki diğer glikoz izomerazların optimum pH değeri 6.5'ten yukarıdır.

Tablo 2. İzolatların ürettikleri glikoz izomerazların pH-aktivite (%) tablosu

pH	Aktivite (%)			
	BT1	BT5	CT6SARI	CT1.2
5	6	5	8	4
5.5	28	30	26	39
6	45	70	80	79
6.5	69	100	100	100
7	90	80	76	90
7.5	100	50	43	60
8	78	30	32	43
8.5	56	19	12	34
9	43	10	8	16
9.5	23	4	4	0
10	18	0	0	0

Streptomyces sp., *T. thermophilus* ve *Clostridium thermosulfurogenes*'ten elde edilen glikoz izomerazların optimum pH'ları 7.0'dir (Karaoğlu vd., 2013). Tablo 2, dört termofilik izolatın 85 °C'de 30 dakika sonra ölçülen enzim aktivitesinin pH bağımlılığını gösterir. BT5, CT6SARI ve CT1.2 glikoz izomerazları pH6.5'da en yüksek aktivite göstermektedir. Bu özelliği ile enzimler, özellikle endüstriyel olarak arzu edilen asidik pH değerlerine, birçok mikroorganizmanın glikoz izomerazına göre, daha yakındır. Bu enzimler, 6.0 ile 7.0 arasında daha düşük bir pH'ya sahip *Lactobacillus brevis* gibi endüstriyel uygulamalar için uygun oldukları ve yüksek kullanım potansiyeline sahip oldukları düşünülmektedir.

3.2. Glikoz İzomeraz Üreten İzolatların Morfolojik Karakterizasyonu

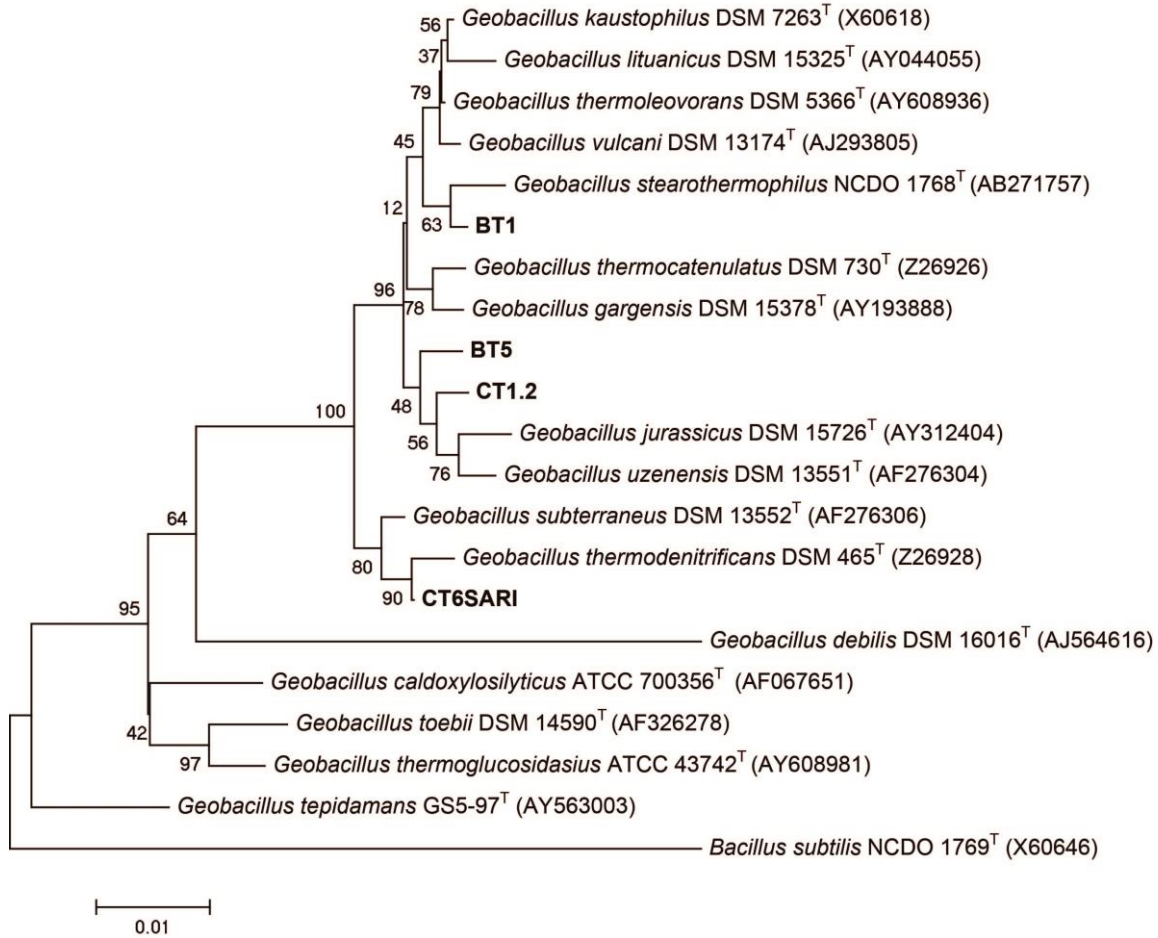
Yapılan boyamalar ve mikroskop incelemeler sonucunda, dört izolat hücrenin çubuk şeklinde, Gram pozitif ve endospor oluşturan bakteriler oldukları belirlendi. Olgun sporlar, aerobik olarak yetiştirilen kültürlerde bol miktarda gözlemlendi.

Tüm izolatlarda sub-terminal sporlar gözlemlendi, ancak CT6SARI ve BT1 izolatlarının ayrıca merkezi sporlara da sahip oldukları belirlendi. Sporulasyon, tüm izolatlarda 60 °C'de 18 saat inkübasyon sonrası gözlemlendi.

3.3. 16S rRNA Gen Dizisi Analizi

Dört izolatın 16S rRNA gen dizileri hizalandı ve ilgili bakterilerin dizileri ile karşılaştırıldı. Filogenetik ağaç, neighbour-joining yöntemi ile MEGA4 paket programı kullanılarak oluşturuldu (Şekil 1). 16S rRNA gen dizisi analizine dayanarak, dört izolatın *Geobacillus* cinsine ait türlere \geq % 97 benzerlik gösterdiği ve *Geobacillus* cinsinin üyeleri oldukları belirlendi.

Stackebrandt ve Goebel (1994), % 97'den daha az 16S rRNA gen dizilimi benzerliği gösteren aynı cins ait suşların, farklı bir türün üyeleri olarak değerlendirilmesi gerektiğini belirledi. Bununla birlikte literatürde, 16S rRNA dizilerinin analizinin yakından ilişkili bazı türleri ayırt etmek için yetersiz olduğu da belirtilmektedir.



Şekil 1. Filogenetik ağaç, dört termofilik izolat ve diğer ilgili organizmaların 16S rRNA gen sekansı verilerine dayanarak neighbour-joining yöntemi ile oluşturuldu.

16S rRNA gen dizisi verileri cins seviyesinde bakterilerin tanımlanması için oldukça faydalı olmasına rağmen, tür seviyesinde genellikle yeterli olmadığı bilinmektedir. Bu nedenle, sekans verileri, tür seviyesinde bakterileri ayırt etmek için daha güçlü ve güvenilir yaklaşım olduğu düşünülen diğer genomik yöntemlerle desteklenmelidir.

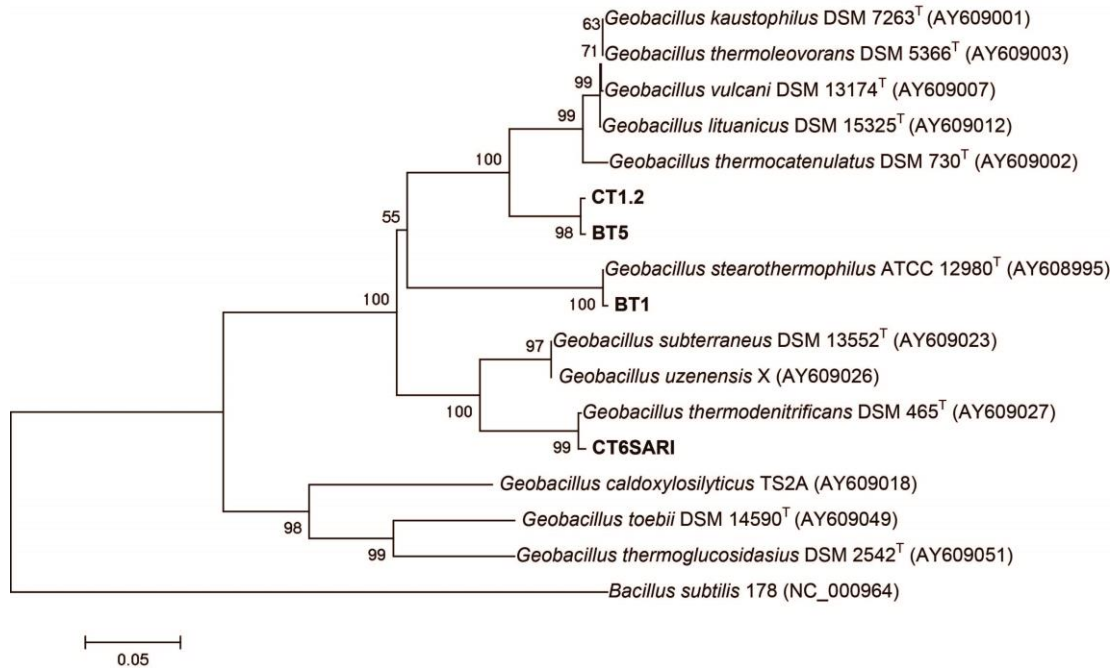
3.4. *recN* Gen Dizisi Analizi

16S rRNA dizilerinin sonuçlarına dayanarak, dört izolatu, *Geobacillus* cinsinin üyeleri olduğu tespit edildi. Dört izolatu *recN* gen dizileri belirlendi, hizalandı ve ilgili bakterilerin dizileri ile karşılaştırıldı. Filogenetik ağaç, neighbour-joining yöntemi kullanılarak oluşturulmuştur (Şekil 2). *recN* gen dizilerinin benzerlikleri incelendiğinde, CT6SARI izolatu *recN* dizisinin, *G. thermodenitrificans* *recN* dizisine % 99; BT1 *recN* dizisinin, *G. stearothermophilus* *recN* dizisine % 99; BT5 ve CT1.2 *recN* dizilerinin, Grup 3 *recN* dizilerine (*G. termoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. vulcani*, *G. lituanicus*, *G. stearothermophilus* ve *G. thermocatenulatus*) % 91 oranında benzerlik gösterdikleri ortaya çıkarıldı.

Zeigler (2003), *recN* dizi karşılaştırmalarının, *Geobacillus* cinsi için genom benzerliklerini doğru bir şekilde ölçebileceğini ve eğer iki bakteri izolatu için *recN* DNA dizileri % 84'ten daha az benzer ise, genom dizilerinin % 70 aynı olduğunu ve bakterilerin farklı türlere ait olduğunu ortaya koydu. *recN* DNA sekansları % 96'dan fazla

benzer ise, % 95 eminlikle bakterilerin aynı türe ait oldukları belirlenebilir. Eğer *recN* dizileri % 84 ile % 96 arasında benzerlik gösteriyor ise, genom dizilimi özdeşliğinin % 70'den büyük ya da daha düşük olup olmadığı sorgulanabilir, bu da bu bakterilerin tür kimliklerini belirsiz hale getirir. Zeigler (2005), *Geobacillus* türlerini, dokuz homoloji grubu (Grup 1A, 1B, 2, 3, 4A, 4B, 5, 6A, 6B) içerisine yerleştirdi. Gruplar 1A, 2, 4A, 5 ve 6A sırasıyla, *G. termodenitrificans*, *G. stearothermophilus*, *G. thermoglucosidarius*, *G. toebii* ve *G. caldxylosilyticus* türlerini içermektedir. Hâlihazırda tanınan türler ile diğer dört homoloji grubunun (1B, 3, 4B ve 6B) tanımlanması biraz daha zordur.

recN dizisi benzerlik analizi sonuçlarına dayanarak, izolat CT6SARI izolatu, *G. termodenitrificans*'a; izolat BT5'in de, *G. stearothermophilus*'a ait yeni birer suş oldukları belirlendi. BT5 ve CT1.2 izolatlarının kesin tür tayinleri ise mevcut analizler sonucunda belirlenemedi. BT5 ve CT1.2 izolatlarının *recN* dizileri yukarıda tartışılan *Geobacillus* türlerine % 91 oranında benzerlik gösterdiği için, *recN* dizi analizi tür analizi için kesin sonuç verememektedir ve daha fazla analize ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışma kapsamında, *Geobacillus* cinsine ait glikoz izomeraz üreten dört yeni termofilik bakteri izole edildi, sistematik çalışmaları yapıldı ve dört izolatu glikoz izomeraz aktiviteleri incelendi.



Şekil 2. Filogenetik ağaç, neighbour-joining yöntemi kullanarak dört *Geobacillus* izolatu ve diğer ilgili organizmaların *recN* gen dizi verilerine dayanarak oluşturulmuştur.

Sonuç olarak izole edilen bakterilerin, literatürde mevcut glikoz izomerazlara kıyasla daha iyi özelliklere sahip glikoz izomerazlara sahip oldukları ve bu enzimlerin endüstrinin ihtiyaçlarını karşılayabilecek potansiyele sahip oldukları düşüncesindeyiz.

4. Sonuç

Asidik pH ve yüksek sıcaklıkta optimum aktiviteye sahip olan bir glikoz izomeraz, renkli karbonil bileşiklerinin oluşumunu azaltır ve daha düşük iyon değişimi ve karbon temizleme maliyetine yol açar. Bu nedenle, daha yüksek sıcaklıklarda ve asidik ortamda faal olarak aktif olan glikoz izomerazlar, endüstriyel uygulamalar için arzu edilen enzimlerdir.

Bu nedenle bu çalışmanın amacı, farklı iki kaplıcadan termofilik bakterilerin izole edilip, glikoz izomeraz aktivitelerinin araştırılması, enzimlerin optimum sıcaklık ve pH değerlerinin belirlenip yüksek sıcaklık ve düşük pH'larda aktif olan ve endüstriyel kullanım potansiyeline sahip enzimlerin bulunması, enzim üretici bakterilerin 16S rRNA ve *recN* analizlerinin yapılarak tanımlanmaları ve sınıflandırılmasıdır. Bu sebeple izole edilen 23 termofilikizolatın glikoz izomeraz aktiviteleri tarandı ve glikoz izomeraz aktivitesine sahip dört izolat (BT1, BT5, CT6SARI ve CT1.2) bulundu. Bu dört izolatın ürettikleri glikoz izomerazlarının optimum sıcaklık ve pH aralıkları belirlendi. BT5, CT6SARI ve CT1.2 glikoz izomerazları pH 6.5'da ve 80 °C'de en yüksek aktivite gösterdikleri, BT1'in ise pH 7.5'da ve 75 °C'de optimum aktivite gösterdiği belirlendi.

Sonuç olarak bu bağlamda, özellikle BT5, CT6SARI ve CT1.2 izolatlarının ürettikleri glikoz izomerazlarının, biyoteknolojik uygulamalar için iyi birer aday olabilecekleri düşünülmektedir ancak bunun için daha ileri araştırmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Kaynaklar

Abdel-rassol, T.M.A., Badr, S.A. ve Omran, H.T., 2012. Glucose (xylose) isomerase production from thermotolerant and thermophilic bacteria, African Journal of Biotechnology, 11, 15798-15801.

Altschul, S.F., Gish, W. ve Miller, W., 1990. Basic local alignment search tool, Journal Molecular Biology, 215, 403-410.

Bandlish, R.K., Michael, H.J., Epting, K.L., Vieille, C. ve Kelly, R.M., 2002. Glucose-to-fructose conversion at high temperatures with xylose (glucose) isomerases from *Streptomyces murinus* and two hyperthermophilic *Thermotoga* species. Biotechnology Bioenergy, 80, 185-194.

Beffa, T., Blanc, M., Lyon, P.F., Vogt, G., Marchiani, M., Fischer, J.L. ve Aragno, M., 1996. Isolation of *Thermus* strains from hot compost (60 to 80 °C). Applied and Environmental Microbiology, 62, 1723-1727.

Beg, O.K., Bhushan, B., Kapoor, M. ve Hoondal, G.S., 2000. Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from *Streptomyces* sp. QG-11-3, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 24, 396-402.

Benson, D.A., Boguski, M.S., Lipman, D.J., Oulette, B.F.F., Rapp, B.A. ve Wheeler, D.L., 1999. GenBank, Nucleic Acids Research, 27, 12-17.

Bhosale, S.H., Rao, M.B. ve Deshpande, V.V., 1996. Molecular and industrial aspects of glucose isomerase, Microbiological Reviews, 60, 280-300.

Brosius, J., Palmer, M.L., Kennedy, P.J. ve Noller, H.F., 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States, 75, 4801-4805.

Calik, P., Angardi, V. ve Isik, N., 2009. Glucose isomerase production on a xylan-based medium by *Bacillus thermoantarcticus*, Biochemical Engineering Journal, 43, 8-15.

Canakci, S., Inan, K., Kacagan, M. ve Belduz, A.O., 2007. Evaluation of Arabinofuranosidase and Xylanase Activities of *Geobacillus* spp. Isolated from Some Hot Springs in Turkey, Journal of Microbiology and Biotechnology, 17, 1262-1270.

Chauthaiwale, J.V. ve Rao, M.B., 1994. Production and purification of extracellular xylose isomerase from an alkaliphilic, thermophilic *Bacillus* sp, Applied Environmental Microbiology, 60, 4495-4499.

- Dische, Z. ve Borenfreund, E., 1951. A new spectrophotometric method for the detection and determination of ketosugars and trioses, *The Journal of Biological Chemistry*, 192, 583-587.
- Dussault, HP., 1955. An improved technique for staining red halophilic bacteria. *Journal Bacteriology*, 70, 484-485.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap, *Evolution*, 39, 783-791.
- Hartley, B.S., Hanlon, N., Jackson, R.J., Rangarajan, M., 2000. Glucose isomerase: insights into protein engineering for increased thermostability. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1543, 294-335.
- Hess, J.M., Tchernajenko, V., Vieille, C., Zeikus, J.G. ve Kelly, R.M., 1998. *Thermotoga neapolitana* Homotetrameric Xylose Isomerase is Expressed as a Catalytically Active and Thermostable Dimer in *Escherichia coli*, *Applied Environmental Microbiology*, 64, 2357-2360.
- Inan, K., Canakci, S., Belduz, A.O. ve Sahin, F., 2011. *Brevibacillus aydinogluensis* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium isolated from Karakoc hot spring in Turkey. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, 849-855.
- Inyang, C.U., Gebhart, U., Obi, S.K.C. ve Bisswanger, H., 1995. Isolation and characterization of a d-glucose/xylose isomerase from a new thermophilic strain *Streptomyces* sp. (Plc), *Applied Microbiology Biotechnology*, 43, 632-638.
- Karaoğlu, H., Yanmis, D., Sal, F.A., Celik, A., Canakci, S. ve Belduz, A.O., 2013. Biochemical characterization of a novel glucose isomerase from *Anoxybacillus gonensis* G2^T that displays a high level of activity and thermal stability. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 97, 215-224.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences, *Journal of Molecular Evolution* 16, 111-120.
- La Duc, M.T., Satomi, M. ve Agata, N., 2004. *gyrB* as a phylogenetic discriminator for members of the *Bacillus anthracis-cereus-thuringiensis* group, *Journal of Microbiological Methods*, 56, 383-394.
- Lehmbacher, A. ve Bisswanger, H., 1990. Isolation and characterization of extremely thermostable D-xylose isomerase from *Thermus Aquaticus* Hb8, *Journal Genom Microbiology*, 136, 679-686.
- Liu, S.Y., Wiegel, J. ve Gherardine, F.C., 1996. Purification and cloning of a thermostable xylose (glucose) isomerase with an acidic pH optimum from *Thermoanaerobacterium* strain Jw/SI-Ys 489, *Journal Bacteriology*, 178, 5938-5945.
- Meintanis, C., Chalkou, K.I. ve Kormas, K.A., 2008. Application of *rpoB* sequence similarity analysis, REP-PCR and BOX-PCR for the differentiation of species within the genus *Geobacillus*, *Letters in Applied Microbiology*, 46, 395-401.
- Mu, W., Wang, X., Xue, Q., Jiang, B., Zhang, T. Ve Miao, M., 2012. Characterization of a thermostable glucose isomerase with an acidic pH optimum from *Acidothermus cellulolyticus*. *Food Research International*, 47, 364-367.
- Nazina, T.N., Tourova, T.P., Poltarau, A.B., Novikova, E.V., Grigoryan, A.A., Ivanova, A.E., Lysenko, A.M., Petrunyaka, V.V., Osipov, G.A., Belyaev, S.S. ve Ivanov, M.V., 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 433-446.
- Powers, E.M., 1995. Efficacy of the Ryu nonstaining KOH technique for rapidly determining Gram reactions of food-borne

- and waterborne bacteria and yeasts, *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3756–3758.
- Schenck, F., 2000. High fructose syrups - a review, *Indian Sugar*, 50, 281–287.
- Sharma, A., Pandey, A, ve Shouche, Y.S., 2008. Characterization and identification of *Geobacillus* spp. isolated from Soldhar hot spring site of Garhwal Himalaya, India, *Journal Basic Microbiolgy*, 48, 1-8.
- Smibert, R.M. ve Krieg, N.R. 1994, Phenotypic characterization. In *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A. and Krieg N.R. (eds.), Washington, DC: American Society for Microbiology. pp. 607–654.
- Stackebrandt, E. ve Goebel, B.M., 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44, 846-849.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W. ve Garrity, G.M., 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 1043-1047.
- Tamura, K., Dudley, J. ve Nei, M., 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0, *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596–1599.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. ve Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Research*, 22, 4673–4680.
- Touzel, J.P., O’donohue, M. ve Debeire, P., 2000. *Thermobacillus xylanilyticus* gen. nov., sp. nov., a new aerobic thermophilic xylan-degrading bacterium isolated from farm soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 315-320.
- Yamanaka, K., 1975. D-Xylose isomerase from *Lactobacillus brevis*, *Methods Enzymology*, 41, 466-471.
- Yanmış, D., Karaoğlu, H., Çolak, D.N., Sal, F.A., Çanakcı, S. ve Belduz A.O., 2014. Characterization of a novel xylose isomerase from *Anoxybacillus gonensis* G2^T. *Turkish Journal of Biology*, 38, 586-592.
- Xu, H., Shen, D., Wu, X.Q., Liu, Z.W. ve Yang, Q.H., 2014. Characterization of a mutant glucose isomerase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*, *Journal Indian Microbiology Biotechnology*, 41, 1581-1589.
- Zeigler, D.R., 2003. Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1893-1900.
- Zeigler, D.R., 2005. Application of a *recN* sequence similarity analysis to the identification of species within the bacterial genus *Geobacillus*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 1171-1179.