

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Anoxybacillus gonensis* G2^T GLUKOZ İZOMERAZININ ISIL
KARARLILIĞININ K111R-L313I-V101R-A353G/F/W VE T428E/S
BÖLGE SPESİFİK MUTASYONLARI İLE GELİŞTİRİLMESİ**

SEYHAN RAKICI

TEZ DANIŞMANI
DR. ÖĞR. ÜYESİ HAKAN KARAOĞLU

TEZ JÜRİLERİ
DOÇ. DR. FATİH ŞABAN BERİŞ
DR. ÖĞR. ÜYESİ DERYA EFE

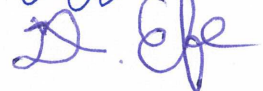
YÜKSEK LİSANS TEZİ
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

RİZE-2019
Her Hakkı Saklıdır

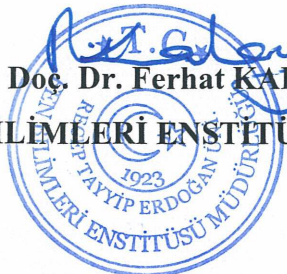
T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Anoxybacillus gonensis G2^T GLUKOZ İZOMERAZININ ISIL
KARARLILIĞININ K111R-L313I-V101R-A353G/F/W VE T428E/S BÖLGE
SPESİFİK MUTASYONLARI İLE GELİŞTİRİLMESİ

Dr. Öğr. Üyesi Hakan KARAOĞLU danışmanlığında, Seyhan RAKICI tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 05/07/2019 tarihinde Su Ürünleri Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı Adı Soyadı	İmzası
Başkan	: Dr. Öğr. Üyesi Hakan KARAOĞLU	
Üye	: Doç. Dr. Fatih Şaban BERİŞ	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Derya EFE	


Doç. Dr. Ferhat KALAYCI
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ



ÖNSÖZ

“*Anoxybacillus gonensis* G2^T glukoz izomerazının ısıl kararlılığının K111R-L313I-V101R-A353G/F/W ve T428E/S bölge spesifik mutasyonları ile geliştirilmesini” konu alan bu araştırma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı programında moleküler biyoloji ve genetik laboratuvarında “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Bu çalışmayı hazırladığım süreçte yardımlarıyla ve katkılarıyla beni yönlendiren danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Hakan KARAOĞLU’na teşekkür ederim. Çalışmalarımı yürüttüğüm ve tamamladığım moleküler genetik laboratuvarı çalışanlarından Zeynep Dengiz BALTA, Züleyha AKPINAR arkadaşlarıma, sabrı ve engin bilgileri sayesinde bilmediğim herşeyi sorup tartışabildiğim; kalender kişiliğine, çalışkanlığına çok saygı duyduğum, Öğretim Görevlisi İsmail AKSU’ya, proje ekibinde yer alan Doç. Dr. Fatih Şaban BERİŞ’e ve Prof. Dr. Yusuf BEKTAŞ’a teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatım boyunca gerek maddi gerekse manevi desteğini hiç eksik etmeyen, motivasyonumun asıl mimari canım aileme sonsuz teşekkür ederim.

Hazırlanan bu Yüksek Lisans tezi TÜBİTAK tarafından 115Z352 nolu proje ile desteklenmiştir.

Seyhan RAKICI

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “*Anoxybacillus gonensis* G2^T Glukoz İzomerazının Isıl Kararlılığının K111R-L313I-V101R-A353G/F/W ve T428E/S Bölge Spesifik Mutasyonları ile Geliştirilmesi” başlıklı bu tezin, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim.
27/05/2019



Seyhan RAKICI

Uyarı: Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

***Anoxybacillus gonensis* G2^T GLUKOZ İZOMERAZININ ISIL KARARLILIĞININ K111R-L313I-V101R-A353G/F/W VE T428E/S BÖLGE SPESİFİK MUTASYONLARI İLE GELİŞTİRİLMESİ**

Seyhan RAKICI

**Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi
Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Hakan KARAOĞLU**

Glukoz izomeraz hücre içi bir enzim olup birçok termofilik ve mezofilik bakteri ve çeşitli mantarlar tarafından üretilen bir enzimdir. Asıl ismi ksiloz izomeraz olmasına rağmen, D-Glukozu D-Fruktoza çevirebilme yeteneği sebebiyle özellikle endüstriyel alanda HFCS üretiminde yoğun olarak kullanıldığı için, yaygın ismi glukoz izomeraz olarak bilinmektedir. Bu enzim, hem hemisellülozdan etanol üretimine yardımcı olduğu için hem de fruktoz şurubu diğer adıyla HFCS (High Fructose Corn Syrup) üretiminde kullanıldığı için büyük endüstriyel öneme sahiptir. Bu çalışma kapsamında ekibimiz, daha önce genetik manipülasyonlarla kinetik özellikleri geliştirilmiş olan *A. Gonensis* G2^T glukoz izomerazının yine aynı yöntemler ile ısı kararlılığını arttırmayı amaçlamaktadır. Bu amaçla yaban tip enzim üzerinde V101R, K111R, L313I, A353G, A353F, A353W, T428S ve T428E bölge özgün mutasyonları ile enzimin ısı kararlılığının artırılması çalışılmıştır. V101R ve K111R mutasyonları yaban tip enzimin yarılanma ömrünü 19 günden sırasıyla 31 ve 37 güne çıkarmıştır. Enzimin yarılanma ömründe artışa yol açan bu mutasyonlar ikili olarak birlikte uygulanmış ve bu amaçla V101R- K111R, çiftli mutasyonu gerçekleştirilmiştir. İki mutasyon birlikte uygulandığında enzimin ısı kararlılığı 19 günden 11,5 güne düşmüştür. Ayrıca V101R ve K111R, mutasyonları katalitik etkinliği yaklaşık 9 kat arttırılmış olan W137F –V184S mutant enziminde de tekrarlanmıştır. Bu çalışmalardan W137F – V184S – K111R üçlü mutasyonları ile düşük K_m , yüksek V_{max} ve katalitik etkinliğe sahip mutant enzim elde edilmiştir.

2019, 145 sayfa

Anahtar Kelimeler: Glukoz İzomeraz, HFCS, Isıl Kararlılık, Mutasyon

ABSTRACT

IMPROVEMENT THERMAL STABILITY OF GLUCOSE ISOMERASE FROM *Anoxybacillus Gonensis* G2^T BY SITE DIRECTED MUTAGENESIS K111R-L313I- V101R-A353G/F/W AND T428E/S

Seyhan RAKICI

Recep Tayyip Erdogan University
Graduated School of Natural and Applied Sciences
Department of Fisheries
Master Thesis
Supervisor: Assist. Prof. Dr. Hakan KARAOĞLU

Glucose isomerase is an intracellular enzyme that can be produced by thermophilic and mesophilic bacteria and various fungus. Even though the enzyme is named as xylose isomerase it is commonly known as glucose isomerase since it can catalyze the isomerization of glucose to fructose and it is mainly used in the production of fructose syrup or HFCS. This enzyme has great industrial importance for both ethanol production from hemicellulose and for being used in the production of fructose syrup or HFCS (high fructose corn syrup). In this study, we aim to improve the thermal stability of *A.gonensis* G2^T glucose isomerase with previously improved kinetic properties by genetic manipulations. To this end, we tried to improve the thermal stability of the wild-type enzyme by using V101R, K111R, L313I, A353G, A353F, A353W, T428S and T428E site-specific mutations. V101R, K111R mutations increased the half-life of the wild-type to 31 and 37 days respectively from 19 days. These mutations were used together to create V101R – K111R double mutation. The double mutation decreased thermal stability of the enzyme to 11,5 days from 19 days. Moreover, V101R, K111R mutations were repeated in W137F – V184S mutant enzyme that has 9 times more catalytic efficiency. These trials resulted in an enzyme with W137F – V184S – K111R triple mutation which have low *K_m*, high *V_{max}* and catalytic efficiency.

2019, 145 pages

Keywords: Glucose Isomerase, HFCS, Thermal stability, Mutation

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	II
ÖZET	III
ABSTRACT.....	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ	XV
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ	XVI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. Glukoz İzomeraz (GI).....	4
1.2.1. Glukoz İzomerazın Genel Özellikleri.....	6
1.2.2. Optimum Sıcaklık ve pH	6
1.2.3. Substrat Spesifikliğı.....	6
1.2.4. Metal İyonu Gereksinimi ve İnhibitörler.....	7
1.2.5. Alt Ünite Yapısı.....	8
1.2.6. Glukoz İzomerazların DNA Dizi Benzerliğı ve Reaksiyon Mekanizması.....	9
1.2.7. Biyoteknolojik Açıdan Termofilik Organizmaların Önemi	15
1.2.8. Termofilik Enzimlerin Yapısal Farkları	16
1.3. Glukoz İzomerazın Önemi ve Endüstriyel Kullanım Alanları	17
1.3.1. HFCS Üretimi.....	19
1.3.2. Etanol Üretimi	22
1.4. GI Üretebilen Kaynak Mikroorganizmalar.....	23
1.5. GI'nın Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin Bölge Özgün Mutasyonlar ile Geliştirilmesi	26
1.6. Çalışmanın Amacı ve Önemi	30
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	32
2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar, Enzimler ve Kitler	32
2.2. Çalışmada Kullanılan Hücre ve Plazmitler.....	32
2.3. Mutasyon Çalışmaları.....	33
2.3.1. Mutasyon Bölgelerinin Tasarlanması	33
2.3.2. Primerlerin Dizaynı	34
2.3.3. Plazmit İzolasyonu	36

2.3.4.	Long PCR	37
2.3.5.	<i>DpnI</i> Kesim Reaksiyonu.....	39
2.3.6.	Kompetent Hücre Hazırlanması	40
2.3.7.	Transformasyon	40
2.4.	Enzim Üretimi	41
2.4.2.	Isı Dejenerasyonu Uygulaması	42
2.4.3.	İyon Değişim Kromatografisi	42
2.4.4.	Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi.....	43
2.5.	Biyokimyasal Çalışmalar.....	45
2.5.1.	Protein Miktarının Belirlenmesi	45
2.5.2.	Glukoz İzomeras Aktivite Deneyi	46
2.5.3.	Enzimlerin Optimum Sıcaklıkları.....	47
2.5.4.	Enzimlerin Optimum pH'sı	47
2.6.	Enzimlerin Kinetik Parametreleri	48
2.7.	Mutasyonların Isıl Kararlılığı Üzerine Etkisi	48
2.8.	SDS Poliakrilamid Jel Elektrophorezi (SDS-PAGE).....	48
3.	BULGULAR	51
3.1.	AgoGI (Rekombinant Olarak Üretilen Yaban Tip Enzim) Saflaştırması ve Karakterizasyonu).....	51
3.1.1.	Kaba Ekstrakt	51
3.1.2.	Isı Dejenerasyonu Uygulaması	52
3.1.3.	İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması.....	52
3.1.4.	Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması	54
3.1.5.	AgoGI'nın Saflaştırma Tablosu	55
3.1.6.	AgoGI'nın Saflaştırılmasına Ait SDS-PAGE Analizi.....	56
3.1.7.	Optimum Sıcaklık.....	56
3.1.8.	Optimum pH	57
3.1.9.	Kinetik Çalışmalar	57
3.2.	K111R Mutant Enziminin Saflaştırması ve Karakterizasyonu.....	58
3.2.1.	Kaba Ekstrakt	58
3.2.2.	Isı Dejenerasyonu Uygulaması	58
3.2.3.	İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması.....	59
3.2.4.	Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması	60
3.2.5.	K111R'nin Saflaştırma Tablosu	61
3.2.6.	K111R Mutant Enziminin Saflaştırılmasına Ait SDS-PAGE Analizi.....	62

3.2.7.	Optimum Sıcaklık.....	62
3.2.8.	Optimum pH.....	63
3.2.9.	Kinetik Çalışmalar	63
3.3.	L313I Mutant Enziminin Saflaştırması ve Karakterizasyonu	64
3.3.1.	Kaba Ekstrakt	64
3.3.2.	Isı Dejenerasyonu Uygulaması.....	64
3.3.3.	İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması.....	65
3.3.4.	Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması	66
3.3.5.	L313I'nın Saflaştırma Tablosu.....	67
3.3.6.	L313I Mutant Enziminin Saflaştırılmasına Ait SDS-PAGE Analizi	68
3.3.7.	Optimum Sıcaklık.....	68
3.3.8.	Optimum pH.....	69
3.3.9.	Kinetik Çalışmalar	69
3.4.	V101R Mutant Enziminin Saflaştırması ve Karakterizasyonu.....	70
3.4.1.	Kaba Ekstrakt	70
3.4.2.	Isı Dejenerasyonu Uygulaması.....	71
3.4.3.	İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması.....	71
3.4.4.	Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması	72
3.4.5.	V101R'nin Saflaştırma Tablosu	73
3.4.6.	V101R Mutant Enziminin Saflaştırılmasına Ait SDS-PAGE Analizi.....	74
3.4.7.	Optimum Sıcaklık.....	74
3.4.8.	Optimum pH.....	75
3.4.9.	Kinetik Çalışmalar	75
3.5.	A353G Mutant Enziminin Saflaştırması ve Karakterizasyonu	76
3.5.1.	Kaba Ekstrat	76
3.5.2.	Isı Dejenerasyonu Uygulaması.....	77
3.5.3.	İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması.....	77
3.5.4.	Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması	79
3.5.5.	A353G'nin Saflaştırma Tablosu.....	80
3.5.6.	A353G Mutant Enziminin Saflaştırılmasına Ait SDS-PAGE Analizi	81
3.5.7.	Optimum Sıcaklık.....	81
3.5.8.	Optimum pH.....	82
3.5.9.	Kinetik Çalışmalar	82
3.6.	A353F ve A353W Mutasyonları	83

3.7.	T428E Mutant Enziminin Saflaştırması ve Karakterizasyonu	84
3.7.1.	Kaba Ekstrakt	84
3.7.2.	Isı Dejenerasyonu Uygulaması	84
3.7.3.	İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması.....	85
3.7.4.	Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması	86
3.7.5.	T428E'nin Saflaştırma Tablosu.....	87
3.7.6.	T428E Mutant Enziminin Saflaştırılmasına Ait SDS-PAGE Analizi	87
3.7.7.	Optimum Sıcaklık.....	88
3.7.8.	Optimum pH	88
3.7.9.	Kinetik Çalışmalar	89
3.8.	T428S Mutant Enziminin Saflaştırması ve Karakterizasyonu	90
3.8.1.	Kaba Ekstrakt	90
3.8.2.	Isı Dejenerasyonu Uygulaması	90
3.8.3.	İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması.....	91
3.8.4.	Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması	92
3.8.5.	T428S'nin Saflaştırma Tablosu	93
3.8.6.	T428S Mutant Enziminin Saflaştırılmasına Ait SDS-PAGE Analizi	93
3.8.7.	Optimum Sıcaklık.....	94
3.8.8.	Optimum pH	94
3.8.9.	Kinetik Çalışmalar	95
3.9.	V101R- K111R Mutant Enziminin Saflaştırması ve Karakterizasyonu.....	96
3.9.1.	Kaba Ekstrakt	96
3.9.2.	Isı Dejenerasyonu Uygulaması	96
3.9.3.	İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması.....	97
3.9.4.	Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması	98
3.9.5.	V101R- K111R'nin Saflaştırma Tablosu	99
3.9.6.	V101R- K111R'nin Saflaştırılmasına Ait SDS-PAGE Analizi	100
3.9.7.	Optimum Sıcaklık.....	100
3.9.8.	Optimum pH	101
3.9.9.	Kinetik Çalışmalar	101
3.10.	W137F–V184S–K111R Mutant Enziminin Saflaştırması ve Karakterizasyonu	102
3.10.1.	Kaba Ekstrakt	102
3.10.2.	Isı Dejenerasyonu Uygulaması	103
3.10.3.	İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması.....	103

3.10.4. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması	105
3.10.5. W137F – V184S – K111R'nin Saflaştırma Tablosu	106
3.10.6. W137F–V184S–K111R Mutant Enziminin Saflaştırılmasına Ait SDS-PAGE Analizi.....	107
3.10.7. Optimum Sıcaklık.....	107
3.10.8. Optimum pH	108
3.10.9. Kinetik Çalışmalar	108
3.11. W137F–V184S–V101R Mutant Enziminin Saflaştırması ve Karakterizasyonu	109
3.11.1. Kaba Ekstrakt	109
3.11.2. Isı Dejenerasyonu Uygulaması	109
3.11.3. İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması.....	110
3.11.4. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması	111
3.11.5. W137F–V184S–V101R'nin Saflaştırma Tablosu	112
3.11.6. W137F–V184S–V101R Mutant Enziminin Saflaştırılmasına Ait SDS-PAGE Analizi.....	113
3.11.7. Optimum Sıcaklık.....	114
3.11.8. Optimum pH	114
3.11.9. Kinetik Çalışmalar	115
4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR	116
4.1. K111R Mutasyonunun Değerlendirilmesi.....	117
4.2. L313I Mutasyonunun Değerlendirilmesi.....	119
4.3. V101R Mutasyonunun Değerlendirilmesi.....	120
4.4. A353G, A353F ve A353W Mutasyonlarının Değerlendirilmesi.....	122
4.5. T428E ve T428S Mutasyonlarının Değerlendirilmesi.....	123
4.6. V101R – K111R Mutasyonunun Değerlendirilmesi	125
4.7. W137F–V184S–K111R Mutasyonunun Değerlendirilmesi.....	126
4.8. W137F–V184S–V101R Mutasyonunun Değerlendirilmesi.....	127
5. ÖNERİLER	129
KAYNAKLAR	131
ÖZGEÇMİŞ	145

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	D-glukozun D-fruktoza, D- ksilozun da D- ksiluloza GI vasıtasıyla dönüşümlü izomerizasyonu	4
Şekil 2.	Sınıf I ve Sınıf II'nin GI'ların yapıları..	10
Şekil 3.	GI aracılığıyla katalizlenen reaksiyonun oluşumu..	13
Şekil 4.	GI için önerilmiş reaksiyon mekanizması	14
Şekil 5.	A) <i>Geobacillus stearothermophilus</i> GI B) <i>Anoxybacillus gonensis</i> G2 ^T GI	33
Şekil 6.	AgoGI'nın kaba ekstraktında protein ve GI aktivitesi tayini	51
Şekil 7.	AgoGI'nın ısı dejenerasyonu sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini.....	52
Şekil 8.	AgoGI'ya ait iyon değişim kolon kromatografisi uygulaması grafiği	52
Şekil 9.	AgoGI'ya ait iyon değişim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini.....	53
Şekil 10.	AgoGI'ya ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulaması grafiği	54
Şekil 11.	AgoGI'ya ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini	55
Şekil 12.	AgoGI'nın saflaştırılmasına ait SDS-PAGE analizi	56
Şekil 13.	AgoGI'nın Optimum Sıcaklık Grafiği	56
Şekil 14.	AgoGI'nın Optimum pH Grafiği.....	57
Şekil 15.	AgoGI'ya ait Michaelis-Menten eğrisi.....	57
Şekil 16.	K111R'nin kaba ekstraktında protein ve GI aktivitesi tayini.....	58
Şekil 17.	K111R'nin ısı şoku sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini	58
Şekil 18.	K111R'ye ait iyon değişim kolon kromatografisi uygulaması grafiği.....	59
Şekil 19.	K111R'ye ait iyon değişim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini.....	59
Şekil 20.	K111R'ye ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulaması grafiği.....	60
Şekil 21.	K111R'ye ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini.....	61
Şekil 22.	K111R'nin saflaştırılmasına ait SDS-PAGE analizi	62
Şekil 23.	K111R'nin Optimum Sıcaklık Grafiği	62
Şekil 24.	K111R'nin Optimum pH Grafiği	63
Şekil 25.	K111R mutant enzimine ait Michaelis-Menten eğrisi	63

Şekil 26.	L313I'nın kaba ekstraktında protein ve GI aktivitesi tayini.....	64
Şekil 27.	L313I'nın ısı şoku sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini	64
Şekil 28.	L313I'ya ait iyon değişim kolon kromatografisi uygulaması grafiği.....	65
Şekil 29.	L313I'ya ait iyon değişim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini.....	65
Şekil 30.	L313I'ya ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulaması grafiği.....	66
Şekil 31.	L313I'ya ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini	66
Şekil 32.	L313I'nın saflaştırılmasına ait SDS-PAGE analizi.....	68
Şekil 33.	L313I'nın Optimum Sıcaklık Grafiği.....	68
Şekil 34.	L313I'nın Optimum pH Grafiği	69
Şekil 35.	L313I mutant enzimine ait Michaelis-Menten eğrisi	69
Şekil 36.	V101R'nin kaba ekstraktında protein ve GI aktivitesi tayini.....	70
Şekil 37.	V101R'nin ısı şoku sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini	71
Şekil 38.	V101R'ye ait iyon değişim kolon kromatografisi uygulaması grafiği.....	71
Şekil 39.	V101R'ye ait iyon değişim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini.....	72
Şekil 40.	V101R'ye ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulaması grafiği.....	72
Şekil 41.	V101R'ye ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini	73
Şekil 42.	V101R'nin saflaştırılmasına ait SDS-PAGE analizi	74
Şekil 43.	V101R'nin Optimum Sıcaklık Grafiği	74
Şekil 44.	V101R'nin Optimum pH Grafiği	75
Şekil 45.	V101R mutant enzimine ait Michaelis-Menten eğrisi	75
Şekil 46.	A353G'nin kaba ekstraktında protein ve GI aktivitesi tayini.....	76
Şekil 47.	A353G'nin ısı şoku sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini	77
Şekil 48.	A353G'ye ait iyon değişim kolon kromatografisi uygulaması grafiği.....	77
Şekil 49.	A353G'ye ait iyon değişim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini.....	78
Şekil 50.	A353G'ye ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulaması grafiği.....	79
Şekil 51.	A353G'ye ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini	79

Şekil 52.	A353G'nin saflaştırılmasına ait SDS-PAGE analizi.....	81
Şekil 53.	A353G'nin Optimum Sıcaklık Grafiği.....	81
Şekil 54.	A353G'nin Optimum pH Grafiği	82
Şekil 55.	A353G mutant enzimine ait Michaelis-Menten eğrisi	82
Şekil 56.	A353F ve A353W mutasyonlarının kaba ekstraktlarına ait SDS-PAGE analizi.....	83
Şekil 57.	T428E'nin kaba ekstraktında protein ve GI aktivitesi tayini	84
Şekil 58.	T428E'nin ısı şoku sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini	84
Şekil 59.	T428E'ye ait iyon değişim kolon kromatografisi uygulaması grafiği	85
Şekil 60.	T428E'ye ait iyon değişim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini.....	85
Şekil 61.	T428E'ye ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulaması grafiği.....	86
Şekil 62.	T428E'ye ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini	86
Şekil 63.	T428E'nin saflaştırılmasına ait SDS-PAGE analizi.....	87
Şekil 64.	T428E'nin Optimum Sıcaklık Grafiği.....	88
Şekil 65.	T428E'nin Optimum pH Grafiği.....	88
Şekil 66.	T428E mutant enzimine ait Michaelis-Menten eğrisi	89
Şekil 67.	T428S'nin ısı şoku sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini	90
Şekil 68.	T428S'nin ısı şoku sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini	90
Şekil 69.	T428S'ye ait iyon değişim kolon kromatografisi uygulaması grafiği.....	91
Şekil 70.	T428S'ye ait iyon değişim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini	91
Şekil 71.	T428S'ye ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulaması grafiği.....	92
Şekil 72.	T428S'ye ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini	92
Şekil 73.	T428S'nin saflaştırılmasına ait SDS-PAGE analizi.....	93
Şekil 74.	T428S'nin Optimum Sıcaklık Grafiği.....	94
Şekil 75.	T428S'nin Optimum pH Grafiği	94
Şekil 76.	T428S mutant enzimine ait Michaelis-Menten eğrisi	95
Şekil 77.	V101R- K111R'nin kaba ekstraktında protein ve GI aktivitesi tayini.....	96

Şekil 78.	V101R-K111R'nin ısı şoku sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini.....	96
Şekil 79.	V101R- K111R'ye ait iyon değişim kolon kromatografisi uygulaması grafiği.....	97
Şekil 80.	V101R-K111R'ye ait iyon değişim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini	97
Şekil 81.	V101R- K111R'ye ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulaması grafiği	98
Şekil 82.	V101R-K111R'ye ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini	99
Şekil 83.	V101R- K111R'nin saflaştırılmasına ait SDS-PAGE analizi	100
Şekil 84.	V101R- K111R'nin Optimum Sıcaklık Grafiği	100
Şekil 85.	V101R- K111R'nin Optimum pH Grafiği	101
Şekil 86.	V101R- K111R mutant enzimine ait Michaelis-Menten eğrisi.....	101
Şekil 87.	W137F–V184S–K111R'nin kaba ekstraktında protein ve GI aktivitesi tayini	102
Şekil 88.	W137F – V184S – K111R'nin ısı dejenerasyonu sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini.....	103
Şekil 89.	W137F – V184S – K111R'ye ait iyon değişim kolon kromatografisi uygulaması grafiği	103
Şekil 90.	W137F – V184S – K111R'ye ait iyon değişim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini.....	104
Şekil 91.	W137F–V184S–K111R'ye ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulaması grafiği.....	105
Şekil 92.	W137F – V184S – K111R'ye ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini ..	105
Şekil 93.	W137F – V184S – K111R'nin saflaştırılmasına ait SDS-PAGE analizi ...	107
Şekil 94.	W137F – V184S – K111R'nin Optimum Sıcaklık Grafiği.....	107
Şekil 95.	W137F – V184S – K111R'nin Optimum pH Grafiği	108
Şekil 96.	W137F – V184S – K111R mutant enzimine ait Michaelis-Menten eğrisi	108
Şekil 97.	W137F – V184S – V101R'nin kaba ekstraktında protein ve GI aktivitesi tayini.....	109
Şekil 98.	W137F–V184S–V101R'nin ısı dejenerasyonu sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini.....	109
Şekil 99.	W137F–V184S–V101R'ye ait iyon değişim kolon kromatografisi uygulaması grafiği	110
Şekil 100.	W137F–V184S–V101R'ye ait iyon değişim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini.....	111

Şekil 101. W137F–V184S–V101R’ye ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulaması grafiği.....	111
Şekil 102. W137F–V184S–V101R’ye ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini .	112
Şekil 103. W137F–V184S–V101R’nin saflaştırılmasına ait SDS-PAGE analizi.....	113
Şekil 104. W137F–V184S–V101R’nin Optimum Sıcaklık Grafiği.....	114
Şekil 105. W137F–V184S–V101R’nin Optimum pH Grafiği	114
Şekil 106. W137F–V184S–V101R mutant enzimine ait Michaelis-Menten eğrisi	115
Şekil 107. K111R mutasyonuna ait üç boyutlu modelleme	117
Şekil 108. K111R mutasyonu sonrası R111-N412 amino asitleri arasındaki etkileşim ve bu noktaların enzim üzerindeki koordinasyonu	118
Şekil 109. K111R’nin ısı kararlılık grafiği.....	118
Şekil 110. L313I mutasyonuna ait üç boyutlu modelleme	119
Şekil 111. L313I ısı kararlılık grafiği.....	119
Şekil 112. V101R mutasyonuna ait üç boyutlu modelleme	120
Şekil 113. GI’nin aktif bölgesinde V101R mutasyonun gösterimi	121
Şekil 114. V101R’nin ısı kararlılık grafiği.....	121
Şekil 115. A353G mutasyonuna ait üç boyutlu modelleme	122
Şekil 116. A353G’nin ısı kararlılık grafiği.....	123
Şekil 117. T428S ve T428E mutasyonlarına ait üç boyutlu modelleme	124
Şekil 118. T428S ve T428E’nin ısı kararlılık grafiği	124
Şekil 119. V101R-K111R’nin ısı kararlılık grafiği.....	125
Şekil 120. W137F-V184S-K111R’nin Isıl Kararlılık Grafiği	127
Şekil 121. W137F-V184S-V101R’nin Isıl Kararlılık Grafiği.....	128

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.	Türkiye’de ithal edilen total enzim miktarları ve tazmin edilen para değerleri	2
Tablo 2.	GI üretebilen bazı mikroorganizmalar	25
Tablo 3.	Endüstriyel öneme sahip GI’ları üreten bazı mikroorganizmalar ve ürünlerinin ticari adları	26
Tablo 4.	<i>A. Gonensis</i> GI’sında gerçekleştirilecek mutasyonların, mezofilik ve termofilik karakterli Tip 2 GI’larının amino asit dizileri ile karşılaştırılması.	34
Tablo 5.	<i>E. Coli</i> genlerinin üretilmesi için seçilen kodon kullanımı.....	35
Tablo 6.	Mutasyon primerleri.....	36
Tablo 7.	SDS- poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler ve bileşenleri.....	49
Tablo 8.	AgoGI’nın saflaştırma basamaklarına ait saflaştırma tablosu	55
Tablo 9.	K111R’nin saflaştırma basamaklarına ait saflaştırma tablosu.....	61
Tablo 10.	L313I’nin saflaştırma basamaklarına ait saflaştırma tablosu.....	67
Tablo 11.	V101R’nin saflaştırma basamaklarına ait saflaştırma tablosu.....	73
Tablo 12.	A353G’nin saflaştırma basamaklarına ait saflaştırma tablosu.....	80
Tablo 13.	T428E’nin saflaştırma basamaklarına ait saflaştırma tablosu	87
Tablo 14.	T428S’nin saflaştırma basamaklarına ait saflaştırma tablosu.....	93
Tablo 15.	V101R- K111R’nin saflaştırma basamaklarına ait saflaştırma tablosu.....	99
Tablo 16.	W137F – V184S – K111R’nin saflaştırma basamaklarına ait saflaştırma çizelgesi.....	106
Tablo 17.	W137F–V184S–V101R’nin saflaştırma basamaklarına ait saflaştırma tablosu	112
Tablo 18.	AgoGI ve mutant enzimlerin kinetik parametreler açısından karşılaştırılması	116
Tablo 19.	V101R – K111R mutasyonunun değerlendirilmesi	125
Tablo 20.	W137F–V184S–K111R mutasyonunun değerlendirilmesi	126
Tablo 21.	W137F – V184S – V101R mutasyonunun değerlendirilmesi	127

SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AgoGI	Rekombinant Olarak Üretilen Yaban Tip GI
pETG2GI	Ekspresyon Vektörü İle Üretilen <i>Anoxybacillus Gonensis</i> GI
bp	Baz Çifti
BSA	Bovine Serum Albümin
CaCl ₂	Kalsiyum Klorür
ddH ₂ O	Çift Destile Su
DEAE	Dietil Aminoetil
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksi Nükleotid Trifosfat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	Etilendiamin Tetraasetikası
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu
HCl	Hidroklorik Asit
HFCS	Yüksek Fruktöz İçerikli Mısır Şurubu
IPTG	İzopropil B-D-1- Tiyogalaktopiranosid
GI	Glukoz İzomeraz
K_m	Michaelis-Menten Sabiti
LB	Luria-Bertani
mM	Milimolar
RT	Reaksiyon Tamponu
MOPS	3-(N-Morfolino) Propansülfonik Asit
NAD ⁺	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
nm	Nanometre
OD	Optik Yoğunluk
PZR	Polimer Zincir Reaksiyonu
pH	Hidrojen İyonu Konsantrasyonu
RNA	Ribonükleik Asit
Rnaz	Ribonükleaz
rpm	Dakikadaki Dönüş Sayısı
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
X-ray	Röntgen Radyasyonu

<i>XylA</i>	Glukoz/Ksiloz İzomeraz Geni
TEMED	N, N, N, "N"-Tetrametiletildiamin
U	Ünite
U/mg protein	Ünite/Miligram Protein
V_{maks}	Maksimum Hız
α	Alfa
β	Beta
γ	Gamma
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Enzimler, katalitik RNA moleküllerinin (ribozimler) küçük bir grubu hariç büyük bir kısmı protein yapısında olan (Ünal, 2002) ve hücre içerisinde gerçekleşen binlerce sayıda reaksiyonun hızını ve spesifiğini düzenleyen biyokatalizörlerdir. Proteinlerin en büyük ve en çok özelleşmiş grubunu teşkil ederler. Bazı enzimler kataliz etkinliklerini protein yapısıyla başarırken kimi enzimlerde protein olmayan moleküllere yani kofaktörelere gereksinim duyabilirler. Aktif kofaktör (holoenzim) bir metal iyonunun olması mümkün olabileceği gibi, koenzim denilen kompleks bir organik bileşik olması da mümkündür (Mojsov, 2012). Substratları ürün denen maddelere çeviren enzimlerin canlı hücrelerde reaksiyonları genellikle 0–50°C; genellikle ise 20–42°C arasında gerçekleşir. Belirtilen sıcaklıklarda reaksiyonların meydana gelebilmesi biyokatalizör olarak bilinen enzim ya da fermente işlemleriyle gerçekleştirilir. Bu etkinliğin gerçekleşmesi ise aktivasyon enerjisinin azaltılması yoluyla sağlanır (URL-1).

Bugüne değin tanımlanmış 3000 civarında enzim bulunmasına rağmen ancak 150-170 civarında bir kısmının ticari olarak üretilip kullanıldığı bilinmektedir (Naidu vd., 2013). Kimyasal proseslerin ise sadece %5’lik bir kısmı biyoteknolojik yöntemlerle üretimi yapılmaktadır. Günümüzde ticari olarak piyasada üretilen enzimlerin dağılımı incelediğinde %17’si deterjan katkısı olarak, %17’si gıda üretimi ve yem katkısı olarak, %17’si deri ve kâğıt endüstrisinde, %8’i tekstil endüstrisinde ve %41’i ilaç sanayisinde kullanıldığı görülmektedir (Iyer ve Ananthanarayan, 2008).

Endüstrinin bütün alanlarında kullanılmak üzere genellikle mikrobiyal kaynaklı enzimler tercih edilmektedir. Enzim üretiminin bitkisel ve hayvansal kaynaklı mikroorganizmalardan tercih edilmesinin nedenleri ve avantajları; katalitik aktivitelerinin çok yüksek ve kararlı olması, çevre koşullarının kontrol altına alınabilmesi, istenmeyen yan ürün meydana getirmemeleri, maliyetlerinin düşük olması (Wiseman, 1987; Telefoncu, 1997; Baltaş, 2012), doğru suşların seçilmesiyle üretim potansiyelinin yüksek olması (Topal, 1988) miktar sınırlamasının ortadan kalkması ve fermentasyon metotlarının gelişmesidir. Ayrıca mikroorganizmalar bitki ve hayvanlara

nazaran genetik değişimlere tabii tutulabilmeleri ister in vivo ister in vitro koşullarda olsun, binlerce kata varıncaya kadar üretimi artırarak yapıları ve aktiviteleri bütünüyle değiştirip yeni ürün elde etmek gibi avantajı vardır (Baredo, 2005).

Endüstriyel olarak değerli olan birçok enzim, mikroorganizmalar tarafından hücre dışına salınabilme yeteneğine sahiptirler. Bu yetenek sayesinde hücrenin parçalanmasına da gerek kalmaksızın enzim elde edilebilir (Walsh, 2002). Bahsi geçen enzimler ekstraselüler enzimler olarak adlandırılırlar ve protein, selüloz, nişasta, vb. gibi suda çözünme yeteneği olmayan polimerleri parçalama özelliğine sahiptirler. Yıkım sonucunda meydana gelen ürünler, organizmanın ihtiyaçlarını karşılamak amacıyla hücre içine alınırlar (Madigan ve Martinko, 2010). Endüstride daha büyük önem teşkil eden ekstraselüler bu enzimlerin (Smith, 2004) bir kısmı tekstil, gıda ve ilaç sanayisinde değerlendirilip kullanılır ve mikrobiyal sentez aracılığıyla çok miktarda üretimleri yapılmaktadır. (Bennet and Klich, 1992; Crabb and Shetty, 1999; Maheshwari vd., 2000; Pandey vd., 2000; Van der Maarel vd., 2002; Gupta vd., 2003; Eltem, 2002).

Tablo 1. Türkiye’de ithal edilen total enzim miktarları ve tazmin edilen para değerleri (Dış Ticaret Müsteşarlığı, 2007)

Yıl	Miktar (kg)	Dolar değeri
2004	6.749.850	55.909.914 \$
2005	8.006.471	62.372.989 \$
2006 (Ocak)	1.604.874	11.891.902 \$

Enzim tüketiminin hacminin gittikçe artmasına rağmen Türkiye’de enzim üretimini gerçekleştiren tek kuruluş bulunmaktadır (Orba A. Ş.). Bu işletme orta ölçekli olup araştırma ve geliştirme odaklı tasarımı ile hayata geçirilmiştir. Kuruluşun gıda ve tekstil sanayi için amilaz enzimini ürettiği bildirilmektedir. Ayrıca son zamanlarda deri ve deterjan sektörü için alkalin fosfataz üretimini kapsayan TTGV destekli bir araştırma projesi tamamlanmış ve bu enzimin de üretimine başlanmıştır. Orba A. Ş.’nin yanı sıra enzim üretimi yaparak immobilize enzim teknolojisini kullanan iki kuruluşumuz daha bulunmaktadır (Fako A.Ş. ve Unifar A. Ş.). Bu kuruluşlar immobilize penisilin asilazı yurt dışından hem ithal etmekte hem de ithal ettikleri penisilini hidrolizleyerek 6-aminopenisillanik asit (6-APA) üretmektedirler ve üretilen 6-APA'ya farklı yan zincir

moleküller bağlayarak semisentetik penisilinlerin sentezinde kullanılmaktadırlar (URL-2, URL-3).

Ticari enzim piyasasının 2010 yılında dünya ölçeğinde 2 milyar \$ olduğu ve yıllık ortalama %3,3 büyüme göstereceği tahmin edilmektedir (Naidu, M. A. ve Saranraj, P., 2013).

In vitro koşullarda katalitik aktivite gösteren ve mikroorganizmalar tarafından büyük miktarda üretilen enzimler izole edildikten sonra türlü endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır. Endüstriyel süreçlerde enzimlerin kullanılması enzim teknolojisi şeklinde tanımlanmaktadır. Enzimlerin fermentasyon yardımıyla üretimlerini (büyük çapta üretim amacıyla ortam koşulları, besiyeri vb. düzeylerde optimizasyonların yapılması), izolasyonlarını, katalitik etkinliklerinin artırılması amacıyla üç boyutlu yapısının değiştirilmesini (protein mühendisliği) saflaştırma ile enzimlerin çözünmüş ve immobilize formlarının (destek materyaller sayesinde enzimlerin suda çözünmeyen forma sokulması) faaliyetleri enzim teknolojisini kapsamaktadır (URL-4).

Biyoteknolojik uygulamalarla enzimlerin biyokimyasal yöntemlerle ifadesinin ortaya çıkarılması, enzimlerin bulundukları dokuların veya hücre bölümlerinin belirlenmesi, etki mekanizmalarının ortaya çıkarılması, kinetik özelliklerinin tüm detaylarıyla incelenmesi için enzimlerin saflaştırılarak elde edilmesi ve sanayiye sunulması büyük önem taşımaktadır (Iyer, P. V. ve Ananthanarayan, L., 2008). Üretim teknolojilerinin kullanılmasıyla enzim teknolojisinin gelişmesi, ürünlerin kullanım alanları açısından çeşitli olması, ekonomik değerlerin çok yüksek olması gibi sebeplerle piyasanın gelişmesi ve araştırmaların büyüklüğü biyoteknolojik açıdan önem arz etmektedir (Gözükara, 2009).

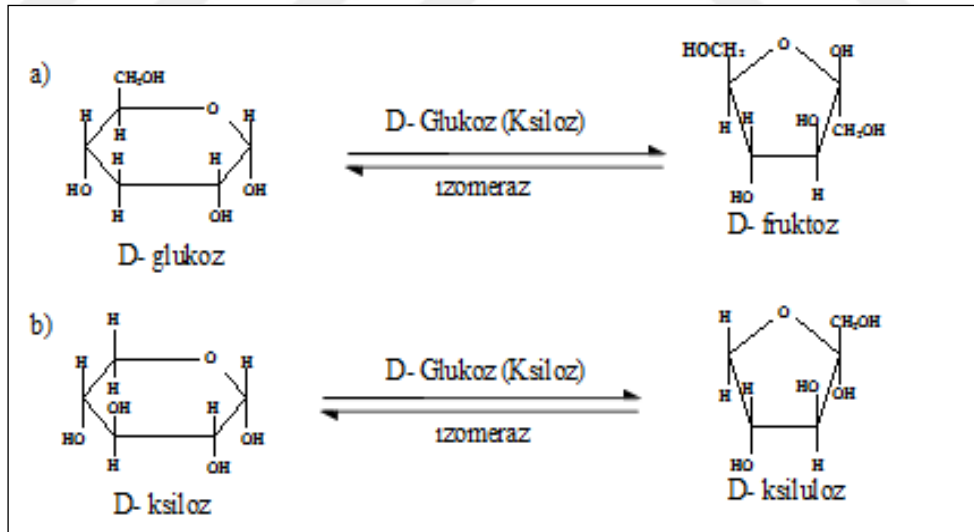
Enzimler üretim, depolama ve endüstriyel süreçlerinde birtakım denatürasyon tepkimelerine uğrarlar. Denatürasyonun etkisiyle enzimin tersiyer yapısı bozulur ve bu formda enzimin aktif merkezini meydana getiren veya tezgensel (katalitik) işlevi için lüzumlu olan amino asit etkileşimleri yok olur. Endüstride enzimlerin kullanımının avantajları arasında enzimlerin özgünlükleri (moleküler veya kiral), yüksek katalitik etkinlikleri ile yüksek turnover sayıları ve biyo-bozunur olmaları sayılabilir. Fakat

enzimlerin endüstriyel uygulamaları, üretim ve saflaştırma maliyetlerinin yüksek olmasından dolayı oldukça sınırlı olduğu bilinmektedir (Iyer ve Ananthanarayan., 2008).

Endüstriyel enzimlerin kullanılmasında karşılaşılan sorunlardan bir diğeri de kararlılığıdır çünkü endüstriyel süreçler enzimlerin aktif ve kararlı olduğu doğal ortamlarından çok değişiktir. Birçok durumda enzimler substratın yüksek konsantrasyonlu olmasından dolayı inhibe olur veya enzimin devamlı süreçlerde uzun süre ve tekrarlı kullanımı aktivitelerini kaybetmelerine yol açar (Naidu, M. A. ve Saranraj, P., 2013).

1.2. Glukoz İzomeraz (GI)

İzomeraz sınıfı D-glukoz / ksiloz izomeraz (D-ksiloz ketol izomeraz; EC 5.3.1.5) enzimi birçok mikroorganizma tarafından sentezlenen, hücre içi bir (intraselüler) enzimdir. (Bhosale vd., 1996; Chen, 1980c). GI; D-ksilozun, D-ksiluloza ve D-glukozun, D-fruktoza izomerizasyonunu katalizler (Çolak vd., 2011).



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

Bununla birlikte D-riboz, L-arabinoz, L-ramnoz ve D-allozun bu enzimin düşük izomerizasyon oranına sahip birer substratı oldukları çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Moses ve Cape, 1994; Pastine vd., 1999; Pastinen vd., 1999; Sanchez ve Smiley, 1975; Yamanaka, 1968). Bugüne değin glukoz izomeraz toprak, deniz ve tatlı sularda

yaşayabilen aerobik ve anaerobik birçok mikroorganizmada incelenmiştir. Birçok mikroorganizma tarafından yüksek verimlilikte sentezlenebilen glukoz izomerazlara *Actinomyces phaeochromogenes*, *Aerobacter aerogenes*, *Actinoplanes missourienses*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus stearothermophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Pseudomonas hydrophila*, *Streptomyces phaeochromogenes*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces bikiniensis* türleri örnek verilebilir (Chen vd., 1979). Bunlardan özellikle, *Arthrobacter*, *Bacillus* ve *Streptomyces* türleri endüstriyel öneme sahiptirler (Scaliet vd., 1974).

Termofilik ve termostabil glukoz izomerazlar, *Thermus thermophilus*, *Thermus aquaticus*, *Thermotoga maritima* ve *Thermotoga neapolitana* organizmalarından elde edilmektedir (Vieille ve Zeikus, 2001). Ökaryotik canlılardan *Hordeum vulgare*'de glukoz izomerazın varlığı tespit edilmiştir (Kristo vd., 1996).

Glukoz izomeraz üreten mikroorganizmaların genellikle termofilik ve mezofilik karakterler gösterdiği ve enzim üretiminin, bakteri üremesinin idofaz (*Streptomyces* türleri) ile triofaz (*Bacillus* türleri) safhasında yüksek oranda sentezlendiği saptanmıştır (Sanchez and Smiley, 1975). Enzimin pH'nın 7,0-8,5 ve büyüme sıcaklığı ile aynı orantıda optimum çalışma sıcaklığını 28-30°C olduğu saptanmıştır (Park ve Thoma, 1974). Buna rağmen tüm glukoz izomerazların bazı benzer özellikleri, tetramer veya dimerlerden oluşmaları ve moleküler ağırlıklarının yaklaşık 173.000 dalton civarında olmasıdır (Carell, 1989).

İki çeşit glukoz izomeraz tanımlanmıştır. Glukoz izomerazlardan birinin amino ucunda yaklaşık 50 amino asitlik bir bölge bulunurken diğerinde ise bu bölge bulunmamaktadır (Hartley vd., 2000). Enzimin kristal yapısı birçok mikroorganizmada açıklanmıştır, enzimin tersiyer yapısının hayli kararlı olduğu belirlenmiştir (Henrik vd., 1989). Bu organizmalara; *Arthrobacter* (Henrik vd., 1989), *Actinoplanes missouriensis* (Rey vd., 1988), *Streptomyces rubiginosus* (Whitlow vd., 1991), *Streptomyces murinus* (Rasmussen vd., 1994) örnek olarak verilebilir.

1.2.1. Glukoz İzomerazın Genel Özellikleri

1.2.2. Optimum Sıcaklık ve pH

Glukoz izomerazın optimum çalışma sıcaklığı onu üreten mikroorganizmaya ve Co^{+2} varlığına bağlı olarak (Karaoğlu, 2010) 60-110°C arası değişim göstermektedir (Ayna, 2016). *Actinoplanes missouriensis*, *Bacillus spp.*, *Streptomyces spp.* ve *Thermus thermosulfurogenes* gibi termofilik türlerden izole edilen GI'lar, *Lactobacillus* ve *Escherichia spp.* gibi mezofilik türlerden elde edilenlerle karşılaştırıldığında, yüksek sıcaklıklarda daha iyi stabiliteye sahip oldukları görülmektedir (Bhosale vd., 1996; Brown vd., 1993). *Streptomyces spp.*, *Arthrobacter sp.* ve *Actinoplanes missouriensis* yaklaşık 30°C'de yaşar (Anheuser-Busch Inc. 1974). Termofilik mikroorganizmalardan *Bacillus spp.*'ler 50-60°C sıcaklıklarda yaşarlar (Brownell, C. E., 1982).

Optimum pH değeri ise azot kaynaklarının doğasına bağlı olarak 6,5 ve 9,0 aralığında değişiklik göstermektedir (Ayna, 2016). Bununla birlikte endüstriyel alanda istenilen düşük pH değerlerinde çalışabilen enzimler de bulunmaktadır. Örneğin *Lactobacillus brevis*'den elde edilen GI, pH 6 ile 7 arasında optimum aktivite göstermektedir. *Anoxybacillus gonensis*'den elde edilen GI ile ilgili yapılan çalışmada optimum sıcaklığının Co^{+2} 'nin artırılmasıyla 85°C ve pH'ının ise 6,5 olduğu belirlendi (Karaoğlu, 2004;2010).

Geobacillus thermodenitrificans TH2'den izole edilen D-glukoz substratı varlığında enzimin optimum sıcaklık ve pH'sı sırasıyla 80 °C ve 7,5 olarak bulunmuştur (Konak, 2011).

1.2.3. Substrat Spesifikliği

Farklı mikroorganizmalardan elde edilen GI'lar farklı substrat spesifikliği gösterirler. Glukoz izomeraz aktivitesi, farklı birçok şeker ve şeker türevi için incelenmiştir. Elde edildiği mikroorganizmalara göre enzim; D-riboz, L-arabinoz, L-ramnoz, D-alloz ve 2-deoksiglukoz gibi birçok şekeri substrat olarak kullanabilir (Hausler and Stutz, 2001). Enzimin maksimum izomerizasyon gerçekleştirdiği

substratlar, glukoz ve ksiloz gibi ekvatorial düzlemindeki 3. ve 4. karbonlarında hidroksil grubu taşıyan substratlardır (Bhosale vd., 1996).

Farklı mikroorganizmalardan çözülmüş veya immobilize formda bulunan GI'ların D-glukozu D-fruktoza dönüştürme oranı %26-59 arasında değişiklik gösterir. Enzimin K_m değeri D-glukoz için 0,086 ile 0,920 M arasında, D-ksiloz için 0,005 ile 0,093 M arasında dağılım gösterir (Chen, 1980b).

1.2.4. Metal İyonu Gereksinimi ve İnhibitörler

Aldo formundaki (glukoz) basit şekerleri keto formuna (fruktoz) izomerize eden glukoz izomeraz enzimi, katalitik aktivite ve bunun yanı sıra kararlılığı için Mg^{2+} Mn^{+2} ve Co^{+2} gibi divalent katyonlar ile değişik kombinasyonlardaki kullanımına gereksinim duyar (Callens vd., 1988; Gaikwad vd., 1992). Co^{+2} ve Mg^{+2} aktivite için gerekli olmasına rağmen, her ikisinin farklı görevleri vardır. Mg^{+2} , Co^{+2} 'ye nazaran katalitik aktivite için daha etkin bir aktivatör iken, Co^{+2} sıcaklığa karşı dayanıklılığı artırarak istenilen konformasyonu sağlayarak (özellikle quarterner yapının sağlanmasında) enzimin kararlı hale gelmesinden sorumludur (Callens vd.,1988; Gaikwad vd., 1992; Takasaki, 1973). *Bacillus coagulans*'tan elde edilen GI üzerinde doğrudan metal iyonu bağlanma çalışmalarını Danno yapmıştır (Danno, 1971). Her bir tetramer için 4 Co^{+2} 'nin varlığını Kasumi ve arkadaşları tespit etmişlerdir (Kasumi vd., 1982). GI'nın katalitik aktivitesi Ag^+ , Hg^{2+} , Cu^{+2} , Zn^{+2} ve Ni^{+2} ve yüksek oranda kullanıldığında Ca^{+2} ile inhibe olmaktadır. Diğer bilinen GI inhibitörleri ksilitol, arabitol, sorbitol, mannitol, liksoz ve Tris'tir (Bucke, 1983; Smith vd., 1991).

Anoxybacillus gonensis G2^T bakterisinden elde edilen glukoz izomerazının Co^{+2} 'nin kullanımıyla 85°C'deki ısı kararlılığını artırdığı, Mg^{+2} 'nin kullanımıyla değişimin olmadığı, Mn^{+2} kullanımının ise azalttığı belirlendi. Glukoz izomeraz aktivitesi için divalent metal iyonlarından Co^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} en az birine ihtiyaç olduğu ve en yüksek aktivitenin Co^{+2} metal katyonu varlığında olduğu saptandı. Ca^{+2} , Cd^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+2} , Hg^{+2} , Ni^{+2} , Sn^{+2} ve Zn^{+2} gibi bivalent metal katyonları ile gerçekleştirilen denemeler sonucunda bu bivalent katyonların enzim aktivitesini inhibe ettiği gözlemlendi (Karaoğlu, 2004).

Geobacillus thermodenitrificans TH2'den izole edilen GI aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek amacıyla; Mg^{+2} , Mn^{+2} , Co^{+2} , Hg^{+2} , Zn^{+2} , Ca^{+2} , Ni^{+2} , Fe^{+2} ve Cu^{+2} metal iyonlarının denenmiştir. Çalışma sonucunda, Mg^{+2} , Mn^{+2} ve Co^{+2} iyonları varlığında enzim aktivitesinde ciddi artışlar meydana gelirken, diğer metal iyonlarının aktiviteyi farklı seviyelerde inhibe ettiği saptanmıştır (Konak, 2011).

Geobacillus caldxylosilyticus'den elde edilen GI'nın yüksek enzim aktivitelerinin genel olarak Co^{+2} , Cu^{+2} ve Mn^{+2} varlığında olduğu gözlenmiş ve bazı metal iyonlarının inhibisyonuna karşı daha dirençli hale gelmiştir (Ayna, 2016).

1.2.5. Alt Ünite Yapısı

GI'nın sedimantasyon sabitleri ve moleküler ağırlıkları sırasıyla 7,55-11,45 arasında ve 52.000-191.000 dalton arasında değişmektedir (Chen, 1980a). GI'nın alt ünite ve amino asit yapısıyla ilgili çalışmalarda, molekül birbirine benzer veya aynı 4 ya da 2 alt ünitelerden meydana geldiği görülmüştür. Alt üniteler birbirlerine nonkovalent bağlarla bağlıdır ve alt üniteler arasında disülfid bağları bulunmamaktadır. *Bacillus sp.*den izole edilen hücre dışı (ekstraselüler) GI üç alt birimden meydana gelmektedir (Chauthaiwale ve Rao, 1994). Basuki ve arkadaşlarının *Streptomyces phaeochromogenes*'den izole ettikleri GI'nın birbirinden farklı olan (izoenzimleri) rapor etmişlerdir (Bhosale vd., 1996). Keşfedilen GI izoenzimleri, N-terminal aminoasitleri ve tripsin, *Achromobacter* proteaz I ve siyanür bromid ile sindirilebilen peptid içerikleri bakımından farklıdır. İzoenzimlerinin her birinin 4 farklı alt ünitelerden meydana geldiğini bildirmişlerdir (Yanmış, 2008).

Arthrobacter ve *Streptomyces spp.*den izole edilen GI'larda üre, guanidin hidroklorid, SDS, gibi denatüranların ve ısıtmanın aktiviteye etkisi çalışılmıştır (Gaikwad ve ark., 1992; Rangarajan ve ark., 1992). *Streptomyces sp.* NCIM 2730 suşundan katlanmamış yapıda çözülmüş tetramerik GI göstermiştir ki; enzimin tetramer ve dimer bölgeleri aktif, monomer yapısı ise inaktiftir. GI'nın tam katlanma yolunda tam katlanmış (moltenglobule) ara bir şeklinin olduğu ilk defa gösterilmiştir (Ghatge, 1994). Bozulmamış tersiyer yapı biyolojik aktivite açısından sekonder yapıdan daha etkin ve gereklidir. Özetle *Arthrobacter* ve *Streptomyces* türlerinde yapılan çalışmalarda

molekölün biyolojik aktivitesinde rol oynayan birimin dimer ya da tetramerler olduğu ve monomer ünitelerin tek başlarına herhangi bir biyolojik aktiviteye sahip olmadıkları anlaşılmıştır.

Anoxybacillus gonensis G2^T bakterisinin GI'nın alt birimlerinin moleküler ağırlıkları 43 kDa olduğu saptanmıştır (Karaoğlu, 2004).

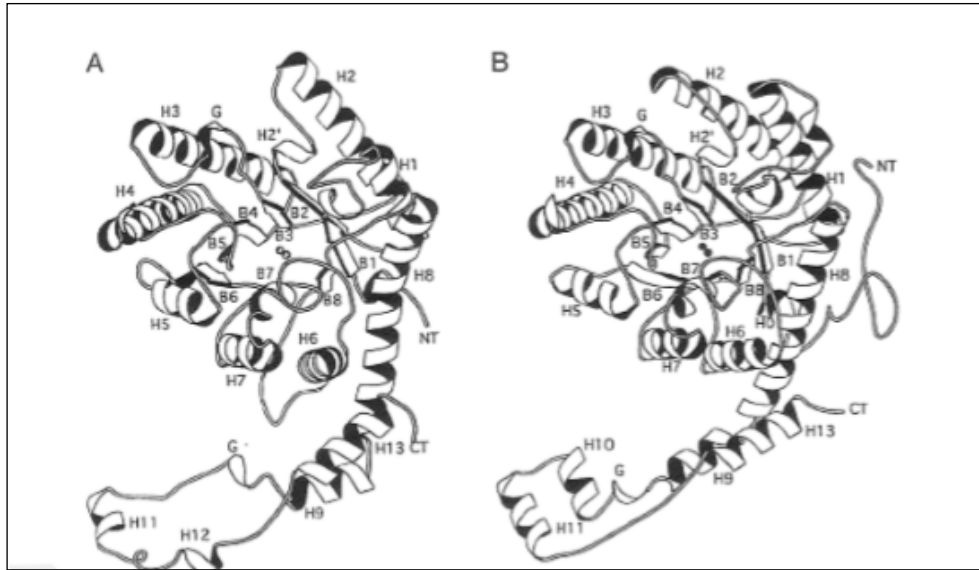
1.2.6. Glukoz İzomerazların DNA Dizi Benzerliğı ve Reaksiyon Mekanizması

Çeşitli organizmadan elde edilen GI (XylA) genlerinin amino asit dizilimleri, GI'ların yapı ve işlevleri arasındaki ilişkiyi analiz etmek için karşılaştırılmıştır. Yapılan karşılaştırmalar sonucunda enzimin N-terminal ucunda 40-50 amino asitlik bir bölgenin olup olmamasına göre GI'lar 2 sınıfa ayrılmışlardır (Vangrysterre vd., 1988). Birinci sınıf GI'lar 390 amino asit içererek yüzeysel birimlerde birkaç sekans farklılığı ile beraber kendi aralarında yüksek homoloji gösterirler (Şekil 2), (Bhosale vd., 1996). *Streptomyces olivochromogenes* (Farber vd., 1987), *Arthrobacter strain B3728* (Henrick vd., 1989), *Actinoplanes missouriensis* (Jenkins vd., 1992), *Ampullariella sp.* (Saari vd., 1987) ve *Thermus thermophilus* (Dekker vd., 1991) gibi GI üreten organizmalar bu sınıfa örnek olarak verilebilir. İkinci sınıf GI'lar ise 440 aminoasitten meydana gelmiş N-terminal ucunda 40-50 amino asitlik bir bölgeye sahiptirler. Genellikle 8 sarmal ile çevrelenmiş birbirine paralel 8 β -levhadan ve diğer monomerlerle ilişkide bulunan uzamış bir kuyruktan oluşmaktadır (Şekil 2). Bu gruba dahil enzimlerin amino asit dizilimleri birbirlerine benzerliğı azdır (Bhosale vd., 1996). İkinci sınıf GI'ya sahip mikroorganizmalara örnek olarak *Escherichia coli*, *Bacillus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Lactococcus spp.*, *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*, *Thermotoga spp.* (Hess vd., 1998) ve *Anoxybacillus gonensis* (Karaoğlu, 2004) türleri örnek verilebilir.

Enzimin aktif bölgesi açık bir fiçı şeklinde bir cepten oluşur, cebin alt tarafında, genel olarak Mg²⁺, Mn²⁺ ve Co²⁺ gibi divalent katyonlar ile hidrofobik amino asitlerle birlikte görev alan glutamik asit, aspartik asit ve histidin gibi amino asitler yer almaktadır (Whitlow vd., 1991).

Birinci Sınıf GI'lar kendi aralarında yüksek homoloji göstermenin yanında benzer katalitik aktivite ve optimum sıcaklık sergilerlerken, ikinci sınıf GI'lar, geniş aralıkta sekans homolojisi, değişken aktivite ve optimum sıcaklık sergilemektedirler (Hartley vd., 2000). Birinci ve ikinci sınıf GI'lar arasında aminoasit dizilimleri açısından büyük farklılıklar görülmesine rağmen; substrat ile ilişkide H100, T140, E231, K233, D338, metal iyonunun bağlanmasında E231, E267, H270, D295, D306, D308, D338 ve katalitik işlemlerde ise H100, D103, D338'in büyük ölçüde korunduğu görülmektedir. Birbirlerine uzak olan türlerin karşılaştırmalarında bile enzimin aktif bölgesine ait içeriğin oldukça yakın olduğu görülebilmektedir (Hess vd., 1998).

Anoxybacillus gonensis G2^T GI'sının *B. stearothermophilus*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* gibi II. sınıf glukoz izomeraz organizmalarıyla karşılaştırılmaları sonucu benzerlik oranlarının sırasıyla; %81, %79, %82, %81 olduğu göz önüne alındığında *Anoxybacillus gonensis* G2^T GI'sının II. sınıf glukoz izomerazlara dahil olduğu anlaşılmıştır (Karaoğlu, 2004).



Şekil 2. Sınıf I ve Sınıf II'nin GI'ların yapıları. (A). I. Sınıf GI *Arthrobacter*, (B). II. Sınıf GI *T. thermosulfurogenes*. H1=α-heliksler, G=3/10 heliksler B=βlevha, CT=C- ucu, NT=N- ucu (Hartley vd., 2000).

Önceleri, GI'nın çalışma mekanizmasının şeker fosfat izomerazlara benzer ene-diol mekanizması ile işlev gördükleri düşünülüyordu (Rose vd., 1969). Benzerliğin nedeni GI'nın ve fosfat izomerazların üç boyutlu yapıları α-helikslerle bağlanmış 8 paralel uzanmış β-katlanmalarına sahip olmaları ve her iki enzimde aktif bölgeleri β-

levhalarının sonunda C terminal ucunda olmasıdır. Fakat GI'da α ve β katlanmaları çok daha fazla uzundur ve GI'nın üçüncü β -katlanması trioz fosfat izomerazlarda birinci β -katlanmasına denk gelince süper pozisyon meydana gelir. Böylece iki enzimin birbirinden oldukça farklı olduğu; fosfat izomerazların substratlarının açık zincirli oluşundan dolayı kofaktöre gereksinimi olmazken GI'ların kapalı şekerlere bağlanması ve halkalarının açılmasını katalizlediklerinden dolayı aktiviteleri için iki metal kofaktöre gereksiniminin olduğu belirlendi. Glukoz izomerazın çalışma gücü fosfat izomerazdan 5 kat daha düşüktür (Blacklow vd., 1988). Fosfat izomerazlar bir enediol mekanizmasıyla çalışırken GI hidrit-sift (hidrür kayması) mekanizmasıyla çalışır (Karaoğlu, 2010).

Enzimin yapısı ve fonksiyonu arasındaki ilişkiyi deşifre edebilmek için aktif bölgesinin konformasyonunu bilmek oldukça önemlidir. Bunun için kimyasal modifikasyon, X-Ray kristallografisi ve izotop değişimi gibi farklı yaklaşımlarla çalışmalar yapılmıştır (Yanmış, 2008).

X-ray kristallografisi metoduyla proteinlerin üç boyutlu yapıları, enzimlerin substratları ve inhibitörleriyle meydana getirdikleri komplekslerin asıl görüntüleri elde edilir. *Actinomyces*, *Arthrobacter*, *Actinoplanes* ve *Bacillus* türleri enzimin çalışma mekanizmasının belirlenmesi için metal iyonlarının, inhibitörlerin varlığında ve yokluğunda farklı düzeyde çözünürlüklerde X-ışını kristallografisi metoduyla çalışılmıştır. GI, tek substrat enzim olduğu için sahip olduğu K_m 'den yüksek bir substrat konsantrasyonunda Michaelis kompleksini doğrudan gözlemlemeyi mümkün kılmaktadır. *Streptomyces*'in birçok türünden izole edilmiş olan GI yapıları eksiksiz olarak bilinmektedir. Bu enzimlerin tümünün aktif bölgeleri birbirine oldukça benzerdirler. *Streptomyces rubiginosus*'dan izole edilen GI'da şekerlerin büyüklüğüne dayanarak substrat ve inhibitörlerin farklı şekillerde bağlandığını açıklanmıştır. GI'nın yapısı 4 Å çözünürlükte belirlenmiştir. Enzimin trioz-fosfat izomerazlarda belirlendiği gibi sekiz β -iplik- α -heliks $[(\alpha/\beta)_8]$ ünitesinden oluştuğu tespit edilmiştir (Carell ve ark., 1984).

X-ışınları kristallografisiyle yapılan bir diğer çalışmayla *S. olivochromogenes* türünün metalle aktive edilmiş GI'sının izomerizasyonu iki metal kofaktörle ve bu

kofaktörlerin hidrür kaymasını gerçekleştirmek için glutamat kalıntısı üzerinden köprü oluşturmasıyla katalizlendiği görülmüştür. Her aktif bölgede gerekli olan Mg iyonundan, Mg^{+2} 1,8 Å aracılığıyla ayrılmış iki farklı konumda görülmüştür. Substratın varlığında gözlemlenen metal iyonlarının hareketleri substrat bağlanmasından sonra izomerizasyon aşamasından önce meydana gelmiştir (Lavie ve ark., 1994). Enzimin ve metal kofaktörlerin etkileşimi lineer ve genişletilmiş formlardaki substratlarla belirlenmiştir. Ayrıca *Bacillus coagulans* türünün GI'sının da kristallografi çalışmaları yapılmıştır (Rasmussen, 1994).

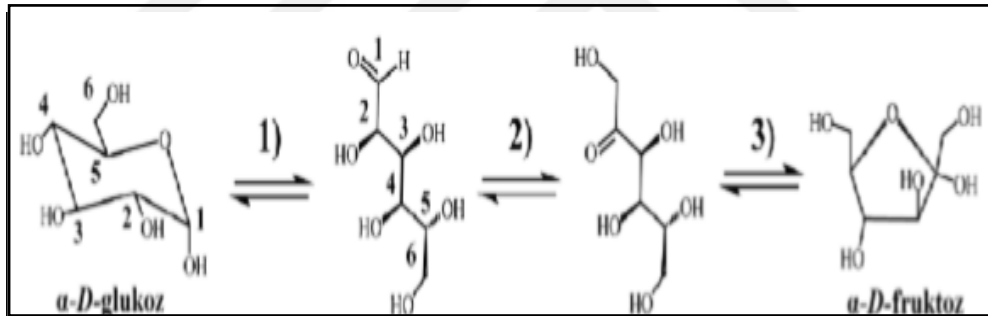
İzotopik değişim metodu kullanılarak, Van Bastelaere ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada *Actinoplanes missouriensis*'den izole edilen yaban tip ve mutant tip D-ksiloz izomeraz ile yapılan çalışmalar, açık ve genişletilmiş aldöz ürününde 2-OH'dan O-1'e proton aktarmasında su molekülünün, W690'ın, N255'in ve E186'nın hayati önemini ortaya koymuşlardır (Van Bastelaere vd., 1995).

GI'nın aktif bölgesi ve bu bölgeyi saran bölümlerdeki amino asit dizilimi X ışını kristallografisi ile tayin edilmiştir. Önceki çalışmalarda GI'nın özellikle histidin ve karboksilat gruplarının aktif bölgedeki gerekliliği ortaya konulmuştur (Callens vd., 1988; Gaikwad vd., 1988; Ghatge ve Deshpande, 1993). GI'nın amino asit diziliminin bilinmesi enzimin katalitik etkinliğini arttırmayı planlama açısından önemli bir bilgidir. *E. coli* GI'sının aktif bölgesinde yapılan bölge spesifik mutasyonların etkisi saptanmıştır (Batt vd., 1990) ve iki korunmuş histidin bölgesinin H101 and H271) katalitik etkinlik için gerekli olduğu bildirilmiştir.

GI'nın kataliz mekanizmasının aydınlatılması için X-ray kristallografisi metodu kullanılarak *Arthrobacter* ve *Streptomyces* GI'ları üzerinde de çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Farber vd, 1989; Collyer vd., 1990). Enzimin biyokimyasal özelliklerine ait verileri saptamak için *Thermoanaerobacterium thermosulfirigenes*'in *XylA* geninde aktif bölgede spesifik mutasyon (site-directed) müdahaleleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre aldözün ketoza izomerizasyonu KI aracılığıyla olmuştur. Substrat halka form içine bağlanır, substrat halka açılır, linear ara ürünün izomerizasyonu gerçekleşir, halka kapanır ve ürün serbest bırakılır. Bu aşamalar metal iyon destekli hidrit kayması mekanizması olarak adlandırılır. (Collyer vd., 1990; Farber

vd., 1989; Henrick vd., 1989; Lee vd., 1990a). Oran belirleyici aşamanın halka açılması değil izomerizasyon aşaması olduğu saptanmıştır (Lee vd., 1990a). Bunun yanında D-glukoz ve D-ksilozun atomik yapılandırılmaları glukoz molekülündeki $-CH_2OH$ grubu dışında birbirine benzer olduğu için hidroksimetil grubunun glukoz ve ksiloz izomerazın katalitik aktivitesindeki farklılığın nedeni olduğu tahmin edildiği belirtilmiştir (Erbaş, 2008).

Sonraki yıllarda Meilleur ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda hidrojen atomlarının enzim üzerindeki lokalizasyonu ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışma ile izomerizasyon reaksiyonunun, asit katalizli halka açılmasının takip ettiği His-53 amino asidinin çift proton ile protonlanması ile başlatıldığı ortaya konulmuştur (Meilleur vd., 2006). Kovalevsky ve arkadaşları (2010), çalışmalarında tersinir izomerizasyon reaksiyonunun üç aşamadan oluştuğunu bildirmişlerdir (Şekil 3): halka açılması, izomerizasyon ve halka kapanması (Kovalevsky vd., 2010).



Şekil 3. GI aracılığıyla katalizlenen reaksiyonun oluşumu. (1) halka açılması, (2) izomerizasyon ve (3) halka kapanması (Kovalevsky vd., 2010).

Bu modele göre (Şekil 3), reaksiyonun başlangıcı ve devamında birçok kritik amino asidin sayesinde enzimin aktif bölgesinde konformasyonel değişiklikler meydana gelir. İlk aşamada, GI'nın aktif bölgesi ve halkasal aktif şeker substratı birbirine bağlanır. Burada farklı sistemde su moleküllerinin varlığı, substrat ile GI'nın bağlanmasının doğru yönde olmasına avantaj sağlar. Sonraki evrede, His-53 protonunu geçici olarak O5'e verir ve C1-O5 bağı kırıldıktan sonra verdiği protonu geri alır ve halka açılır. Halka açıldığı esnada, nötral Lys-289 protonlanır ve bir protonunu Asp-257'ye transfer eder. Ardından O1, Lys-183'ün sayesinde izomerizasyonun meydana gelmesi için doğru bir biçimde konumlanır. İkinci basamakta izomerizasyon gerçekleşerek basamak boyunca, proton, C2'den C1'e ve O2'den O1'e transfer edilir.

14

1.2.7. Biyoteknolojik Açıdan Termofilik Organizmaların Önemi

Termofilik organizmalar adaptasyonları gereği yüksek sıcaklıklarda etkin ve ısı kararlı olmalarından ötürü araştırmacılar için önemli bir konudur. Bu türlü mikroorganizmalardan izole edilen enzimlerin, yüksek sıcaklıklarda kararlı olmanın yanı sıra, ekstrem pH'larda aktif olma, deterjanlar, organik çözücüler gibi kimyasal denatüre edici ajanlara karşı dirençli olma gibi özgün özellikleri vardır. (Arıkan, 2008). Biyoteknolojik açıdan termofilik organizmaların cezbedici özellikleri, termofilik enzim üretme yetenekleridir (Albayrak, 2018).

Termofilik bakterilerin sahip oldukları enzimlerin pH değişikliklerine ve yüksek sıcaklıklara karşı dayanıklı olması, bu enzimlerin endüstriyel yönden tercih edilmelerine sebep olmuştur. Ayrıca bu enzimler, mikroorganizmaların optimum büyüme sıcaklığından daha yüksek bir sıcaklıkta da (termostabil) hala kararlı ve etkin olma özelliğindedirler. Yüksek sıcaklıklarda ve yüksek substrat konsantrasyonlarında aktif olarak çalışabilen proteolize dayanıklı bu enzimler reaksiyon anında oluşabilecek kontaminasyon riskini önemli derecede düşürür, çünkü biyolojik sistemde kontaminasyona neden olan bakterilerin çoğu mezofilik karakterlidir (Burg, 2003). Aynı zamanda çalışma ortamının da diğer mikrobiyal kontaminasyonlardan etkilenme ihtimali bir hayli düşüktür. Bu enzimler, mezofilik bir organizma içerisinde sentezlenebildikleri için enzimin saflaştırma işlemlerinde de avantajlıdır. Termofilik mikroorganizmalardan izole edilen enzimler, mezofilik ve psikrofilik mikroorganizmalardan izole edilen enzimlere göre daha stabil olduklarından endüstriyel ürünlerin ve özellikle de besinlerin raf ömrünün uzatılmasında avantaj sağlarlar. Yüksek sıcaklıklarda reaksiyona dahil olan maddelerin difüzyon hızları ve çözünürlükleri hayli artar, bu sıcaklıklarda suyun yüzey geriliminin ve viskozitesinin azalması, özellikle büyük fermentörlerde havalandırma için daha az enerjinin kullanılmasına (İnan, 2011), ürünün ise daha fazla oluşunu sağlamaktadır (Mozhaev, 1993; Kumar ve Swati, 2001).

DNA polimerazlar, amilazlar, ksilanazlar, kitinazlar, selülazlar, proteazlar, lipazlar, gıda ve kimya endüstrilerinde DNA'yı modifiye edebilen enzimler örnek olarak verilebilmektedir. Bu enzimler moleküler biyoloji uygulamalarında (*Taq* DNA polimeraz), nişasta endüstrisinde (α -amilaz, glukoz izomeraz) ve yüksek kararlılık

isteyen organik ürünlerin sentezi, teşhis ve tanı işlemleri, petrol endüstrisi, kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrisi ve hayvanların beslenmelerinde kullanılan ürünlerin sentezi gibi pek çok endüstri kolunda yoğun olarak kullanılmaktadır (Vieille vd., 1996).

Son yıllarda ortaya çıkan, prokaryotlardan elde edilen ekstrem çevrelerde “ekstremozimler” yeni bir terim olarak enzim terminolojisine kazandırılmıştır. Ekstremozimler, ekstrem açıdan düşük ya da yüksek sıcaklıkta ve oldukça yüksek asit ya da alkalik pH’larda yaşamını sürdüren “ekstremofiller” olarak adlandırılan mikroorganizmalardan elde edilmişlerdir. Ekstremofillerin çok sayıda üretilmesi için mikrobiyal kaynakların doğadan izole edilmesi için türlü metotlar kullanılmakta olup, yeni mikrobiyal kaynakların incelenmesi ise sürekliliği olan bir konudur. Bu noktada biyo çeşitlilik konusu önem arz ederek türlü ve ekstrem çevreler izole edilen mikroorganizmalar mühim enzim kaynaklarıdır. (Lin vd., 1998; Eltem, 2002; Petrova vd., 2000). Ülkemiz, su sıcaklığının kaynama noktasına ulaştığı değerlerde bile mikrobiyal yaşamın var olduğu önemli ekstrem çevreler olarak bilinen termal kaynaklarca (kaplıcalar) oldukça zengin durumdadır. Aynı zamanda ekstrem çevrelerden; tuz gölleri, soda gölleri vb. lerine sahip olduğumuz dikkate alındığında, bu çevrelerdeki biyoçeşitliliğin biyoteknolojik öneme sahip termofilik enzimlerin saptanarak ortaya konması ülkemiz için oldukça önemli bir konu haline gelmiştir. (Eltem R, 2002, URL-5). Günümüzde ise yapılan çalışmalar ile ekstrem koşullarda yaşayan bu canlıların ancak %1’lik kısmı kültüre elde edilebilmiştir. Termofilik mikroorganizmaların izolasyon ve identifikasyon (tanımlama) işlemleri öteki mikroorganizma gruplarından oldukça farklı olmakla birlikte çok hassas uygulamalar gerektirmektedir (Akkaya ve Kıvanç, 2008).

1.2.8. Termofilik Enzimlerin Yapısal Farkları

Termofilik enzimlerin gösterdiği yüksek kararlılık ve aktivitenin nedeninin belirlenmesi için mezofilik enzimlerle aminoasit sıralarının ve yapılarının karşılaştırılması yapılmıştır. Bu karşılaştırmalar sonucunda termofilik ve mezofiliklerin benzer sekonder ve tersiyer yapıda olmalarının yanı sıra aminoasit içerikleri ve yan zincir etkileşimleri düşük olsa da farklı oldukları apaçık görülmüştür.

Termofilik enzimlerin farkının, termal dejenerasyondan korunmak amacıyla bazı ek yapısal özelliklerden (bazı amino asitlerden) kaynaklandığı belirlenmiştir (Vieille ve Zeikus, 2001). Termofilik enzimler fazla sayıda yüklü ve hidrofobik aminoasit içerirler (Fujiwara, 2002) ve hücre membranlarındaki çok sayıda doymuş yağ asitlerinin varlığının hücre için hidrofobik bir ortam meydana getirdiği ve hücreyi yüksek sıcaklıklarda hayatını sürdürebilmesi için hücreyi daha sağlam duruma getirdikleri ortaya çıkmıştır (Herbert and Sharp, 1992). Aynı şekilde birçok hipertermofilik ihtiva eden arkelerin de hücre duvarlarında eter bağı ile bağlı yağ asitlerinin olmasıyla bu yapı doymuş yağ asitleri ihtiva eden membranlara göre daha yüksek sıcaklıklarda dahi bozulmadan etkinliğini sürdürebilmektedir (De Rosa vd., 1994).

Termofilik enzimlerin DNA'larının pozitif süper sarmallar meydana getiren ters DNA giraz ihtiva ettiği ve bu yapıyla, DNA'nın erime noktasını yükselterek daha yüksek sıcaklıklarda mikroorganizmayı sağlam hale getirdiği belirlenmiştir. Denatüre edici ortamlara gösterdikleri direnç baz alındığında termofilik enzimlerin oldukça duyarlı bir yapıda olduğu tahmin edilir, yapılarına bakıldığında da bilhassa aktif bölgede rolü olan amino asitlerin oldukça korunmuş olduğu görülmüştür (Veronese vd., 1984; Wrba vd., 1990; Kanaya ve Itaya, 1992). Ayrıca termofilik enzimler, mezofil benzerlerine nazaran daha kısa yüzey loplarına sahiptir (Wintrobe vd., 2001) ve termal kararlılığı sağlamak için disülfür bağları, hidrofobik etkileşimler, hidrojen bağları, tuz köprüleri ve metal koordinasyonu kullanılır. (Sauve ve Sygusch, 2001).

1.3.Glukoz İzomerazın Önemi ve Endüstriyel Kullanım Alanları

GI, protein ve genetik mühendisliği, ileri biyokimya teknikleri için yapısı ve işlevi bakımından arasındaki ilişkinin dikkat çekmesiyle akademik çalışmalar için ilginç model olmuştur. Bunun yanında hemiselülozlardan etanol üretim potansiyeli, glukozun fruktoza dönüşümünü katalizlediği için ticari alanda özellikle yüksek fruktoz içerikli şurup (High Fructose Corn Syrup; HFCS) üretiminde kullanımıyla ticari bir öneme sahiptir.

Endüstriyel uygulamalarda *Pseudomonas hydrophila*'dan (Marshall ve Koi, 1957) elde edilen GI'nın keşfi neticesinde şeker kamışından tatlandırıcı üretiminin yerini

HFCS üretiminin almıştır. Gerek ülkemizde ve gerekse AB yasalarında fruktoz şurupları henüz tanımlanmamıştır. FDA (2000)'e göre; %42- 55 fruktoz içerikli bu şuruplar, tatlı ve besleyici sakkarit karışımı olup mısır nişastası glukozunun GI enzimi kullanılarak fruktoza izomerize edilmesiyle üretilen bir üründür. Ayrıca %90 gibi büyük bir oranda fruktoz içerikli üçüncü bir tipi de mevcut olmakla birlikte dünyada kullanımı sınırlı olduğu bildirilmiştir (Knorr, 1987).

GI'nın, çoğalma aşamasında ksiloza ihtiyacının olduğu ve arsenat varlığıyla üretiminin arttırılabildiği saptanmıştır (Marshall ve Kooi, 1957). Daha sonraları ksilozdan bağımsız olarak, *Escherichia intermedia*'da glukoz aktivitesi görülmüştür. (Natake ve Yoshimura, 1964). Başka bir çalışmada *Bacillus megaterium*'den NAD⁺ bağımlı ve glukozu özgü bir glukoz izomeraz (EC 5.3.1.18) izole edilmiştir (Takasaki ve Tanabe, 1962; Takasaki ve Tanabe, 1963). Glukoz ve mannozun fruktoza izomerize eden benzer bir glukoz izomeraz *Paracolobacterium aerogenoides* türünden izole edilmiştir (Takasaki ve Tanabe, 1964; 1966).

Tüm bu aktiviteleri gösteren glukoz izomerazlardan EC (5.3.1.5) numaralı enzimlerin, Clinton Corn Processing Co. tarafından endüstriyel sahada ilk uygulaması 1967 yılında ABD'de yapılmıştır. 1974 yılında, immobilize edilmiş GI artık ticari olarak kullanılmaya başlanmıştır. Glukoza ilgisi ksilozdan 160 kat daha düşük olan GI, buna rağmen, sahip olduğu özellikler sayesinde ticari olarak önemli olan enzimler arasında yerini almıştır (Natake ve Yoshimura, 1964). 1980'e kadar batı dünyasındaki tüm şekerlerle ilgilenen büyük şirketler glukoz izomeraz teknolojisine başvurmaya başlamıştır. Düşük maliyeti ve ürün kalitesi fonksiyonelliğinden dolayı glukoz izomeraz, bilhassa 1980'den sonra da işlenmiş gıdalarda mühim seviyede sakkarozun yerine tercih edilmeye başlanmıştır. Glukoz izomeraz enzimi fırıncılık, meşrubat, şekerleme endüstrisinde ve konserve yapımında pazar payı makro derecede olan bir enzim olmuştur (Bhosale vd., 1996).

1.3.1. HFCS Üretimi

Yüksek fruktozlu mısır şurubu (HFCS) genel olarak mısır nişastasının, enzimatik hidroliz ve kimyasal yöntemlerden yararlanarak sıvılaştırma aşamasından başlayarak ardından parçalama ve son aşamada olarak izomerizasyon işlemleri ile üretilerek elde edilir (Parker vd., 2010). HFCS üretimi için mısır nişastasının şekerler glukoz ve fruktoz basit şekerlerine izomerize edilmesinde üç farklı enzim kullanılır ve üretimi üç aşamada gerçekleşir (Ruiz-Matute vd., 2010). (i) Ön aşama, alfa amilaz enzimi aracılığıyla elverişli ortamda nişasta granüllerinin hidrolizi sonucu sıvılaştırılması (ii) Glukoamilaz ve parçalayıcı enzim kullanılarak nişastanın dekstrin zincirlerinin bireysel dekstrin moleküllerine ayrılarak şekerlendirilmesi (iii) Glukoz izomeraz kullanılarak glukozun fruktoza dönüştürülmesi (Poyrazoğlu, 2007). Ön aşamadaki hidroliz ile muamele işlemi, asit kullanılarak da gerçekleştirilebilmektedir (Parrish, 2010). Kompleks damıtma ve kombine bir sürecin ardından farklı oranlarda fruktoz (%42, %55 ve %90) şurupları da üretilmektedir. Başlangıçta dekstrozun enzimler ile izomerleştirilmesiyle %42'lik bir fruktoz şurubu elde edilir. Sonrasında elde edilen şurup fruktozu tutan kolonlardan geçirildikten sonra oranı %90 olan yüksek fruktozlu şurup ve tekrardan %42'lik şurup ile karışımı sağlanarak %55 fruktozlu mısır şurubu üretilmektedir. Aynı zamanda mevcut olan bu şuruptan kristalizasyon prosedürü aracılığıyla kristalize fruktoz da elde edilebilmektedir (Özcan, 2009). Gıda endüstrisinde, natürel tadın bozulmadığı orta derecede tatlılığın arandığı gıdalar ile konservelerde %42, dondurmalar, tatlılar ve alkolsüz içeceklerde %55 ve az miktarda olan bir tatlandırıcı ile yüksek şeker tadının arzu edildiği gıdalarda %90 oranlarında fruktoz şurubunun kullanımı mevcuttur (Karaoğlu, 2010; URL-6).

GI'nın keşfi, 1958 yılındaki Küba devrimi sonrası meydana gelen sukroz yokluğu, fruktoz şuruplarının kullanımında etkin sebepler olmuştur (Bhosale vd., 1996). Daha sonraları gıda endüstrisinde HFCS'ye olan talep daha da artmıştır. HFCS tüketimi 1970'den 1990'yılına kadar %1000'den daha fazla artış göstermiştir. Dünyada üretilen yıllık HFCS miktarının 1995'te kuru ağırlık olarak 10 milyon tona ulaştığı düşünülmektedir (De Raadt vd., 1994). Amerika'da HFCS kullanımı neredeyse sukrozun yerini tamamen almıştır. Buna mukabil insanların günlük tükettiği fruktoz miktarı önemli seviyede artış göstermiştir. Öyle ki Amerika Bileşik Devletleri'nde

günlük olarak fruktoz miktarının yaklaşık 55 gr'nın çocuklar tarafından 73 gr'nın ise gençler tarafından tüketildiği sonuçlarına ulaşılmıştır (Vos vd., 2008). Tüm tatlandırıcılar içindeki kullanım oranı yaklaşık %40 olarak yer bulmuştur (Ross vd., 2009; Bocarsly vd., 2010). 1970'li yıllarda Batı ülkelerinde yıllık tüketim miktarı, kişi başına takriben 0,5 kg civarındayken 2000'li yıllarda bu rakam 35 kg'ı geçtiği görülmüştür. 2009 yılında ise gıda ürünlerinin %40'ından fazlasında HFCS nin varlığı bildirilmiştir (Le Blanc vd., 2009).

Glukoz ve fruktozun dengede olduğu HFCS'nin diğer tatlandırıcı ürünlere göre üstün özellikleri vardır. HFCS tamamen tatsız olan nişastadan elde edildiği için sukrozdan yaklaşık %10-20 daha ucuzdur. Fruktoz içeriği yüksek bu şurup, sukrozdan 1,3 kat, glikozdan da 1,7 kat daha tatlıdır. Glukozun tatlandırma oranı sukrozun %70-75'i kadarken, fruktozun tatlandırma oranı sakkarozun yaklaşık iki katıdır (Barker, 1976). İyi bir çözünürlüğe sahip olup sukroza nazaran stabilitesi daha yüksektir. Ayrıca insülin müdahalesi olmadan metabolize edildiği ve midede emilimi glukozu göre daha yavaş olduğu için daha az kalorilidir. Bunların yanında ozmotik basınçlarının yüksek olması (Hobbs, 1986), lezzeti (CRA., 1994), rengi, viskoziteyi ve higroskopik (nemi hapsederek kurumayı önlemeleri (Pomeranz, 1985) gibi özellikleri geliştirebilme yeteneğine sahiptir. Tatlı, sıvı formda ve daha az kristalleşme özelliklerine sahip olması kullanıcı açısından taşınmasını ve depolanmasını kolaylaştırmaktadır. Asidik karakterli olması ona koruyuculuk özelliği kazandırarak kullanıldığı bileşenlerin koruyuculuk miktarını düşürebilmektedir (Nigar, 2005; Parker vd., 2010).

Ürünlerin lezzet ve tüketim kalitesini artıran, tüketimi 1970'lerden günümüze kadar önemli derecede artan zenginleştirilmiş HFCS'nin (%55 fruktoz) meşrubat üreticileri tarafından sukrozun yerine tercih edilerek kullanılmasıyla HFCS pazarı, aşamalı olarak büyümüştür. Bazı gıdalara arzu edilen özellikleri kazandıran HFCS, daha az kristallenme özelliğinden dolayı başlıca kullanım alanları; gazlı içecekler olmak üzere gazsız meyveli içecekler, şekerleme, kek, çikolata, jöle, reçel, marmelat, dondurma, süt mamülleri, çeşitli hububat ürünleri ve konserve ürünleri gibi birçok işlenmiş üründe yaygın olarak kullanılmaktadır (Misset vd., 1991; Korkmaz, 2008).

Fruktozun dilde algılanma yoğunluğu sukroza nazaran epey yüksek olup tadı kısa süre hissedilir. Bu nedenle fruktoz şurupları gıdaların karakteristik tatlarının algılanmasını zenginleştirmede tesiri vardır (Howling, 1992). Tadını fruktozdan alan yiyecek ve içecekleri tüketen insanlarda, doyumluk hissini geciktirerek daha çok miktarda tüketilmesine sebebiyet vermekle birlikte ikinci bir acıkma hissi uyandırmaktadır (Korkmaz, 2008).

HFCS içeriğindeki yüksek indirgen şekerlerin varlığıyla fırıncılık ürünlerinden kekte esmerleşmeyi ve tazelik süresini arttırmakta (Johnson, 1989), ekmeğin kabuk rengine ile tadına katkılarda bulunarak, aynı zamanda raf ömrünü de uzatmaktadır (Kulp vd., 1991). ABD’de %42 oranında fruktoz içeren şuruplar en çok beyaz tava ekmeklerinde kullanılmaktadır. Bu şurup bisküviye en iyi rengi veren indirgen şuruptur (Manohar ve Rao, 1997). Fermente edilebilir şeker açısından zengin bir ürün olan HFCS aynı zamanda kurabiye, tart dolguları (Pomeranz, 1985), galeta, çörekler, hamburger, sandviç ve tost ekmekleri, baklava dahil tüm hamur işi ürünlerinde kullanılmaktadır (Le Blanc vd., 2009).

Fruktoz şuruplarının salata sosları ve mayonez gibi ürünlerde kullanımı emülsiyon stabilitesi arttırarak (Inglett, 1974), enerji değerini de düşürmektedir (Reeder,1978). HFCS’nin su aktivitesini azaltıcı özelliğinden yararlanılarak (Hobbs,1986) salamura ürünlerde yaygın kullanılmaktadır. Fruktoz şurupları hücre duvarına kolay nüfuz etme özelliğine sahip olduğundan dolayı tatlı turşularda kullanılmakta ve sebze, çorba, domates sosları ve meyve gibi konserve ürünlerde de kullanımı gittikçe artmaktadır (Nabors ve Gelardi, 1991; Hebeda, 1987; Anon, 1993).

Süt ürünlerinden yoğurtta ve dondurmada fruktoz şuruplarının kullanımı gibi son yıllarda önemli derecede artış göstermiştir. Ayrıca dondurmaya eriyebilirlik hacim ve dokuda pürüzsüzlük (Anon, 1979) özellikleri kazandırmakla beraber viskoziteyi artırır. Bu artışta fruktoz şuruplarının suyla farklı bir bağ oluşturduğu düşünülmektedir. Mevcut durum HFCS’nin dondurmanın kalitesi açısından sakkarit içeriğinin yüksek olmasıyla ilgilidir. Fruktoz şurubunun yoğurtta da kullanımıyla viskozitenin düştüğü görülmüştür. Fruktoz şurupları içeren yoğurtlarda aseton miktarı az bulunmuştur (URL_5). HFCS hafif bir tatlandırıcı olduğundan ve doğal tatları maskeleyen

tatlandırma özelliğine sahip olduğu için aromalı gıdalarda ve baharatlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Nigar, 2005; Parker vd., 2010).

Günümüzde kullandığımız gıdaların %40'ından fazlasında HFCS bulunabilmektedir (LeBlanc vd., 2009). HFCS'nin kullanıldığı diğer bazı gıdalar: her çeşit cips, soya, makarna, barbekü sosu, ketçap, balla tatlandırılmış hardal, sirke, salça, krakerler, süzme peynir, buzlu barlar, çikolata, gofret, lokum, fındık, fıstık ve badem ezmesi gibi kuru meyve ezmeleri, elma püresi, yulaf ezmesi, krem çikolatalar, kahvaltılık tahıl gevrekleri ve ezmeleri, gazoz, kolalı içecekler, spor enerji içecekleri, konsantre meyve suları, limonata, hazır kahveler, çikolata sosları ve farmasötük endüstride öksürük şurupları (URL_5).

1.3.2. Etanol Üretimi

GI hem hücre içinde ksilozun izomerizasyonunu hem de hücre dışında glukozun izomerizasyonunu katalizlediği için saprofilik bakteride beslenme isteği uyandırır. Enzimin bu özelliği hem çürümüş bitki materyallerinin parçalanarak bozunmasını hem de hemiselülozun etanole dönüşmesini sağlar (Erbaş, 2008). Mayalar tarafından alkole fermente edilebilen ksilulozun ksilozdan üretilmesi için kullanılır.

Biyokütle, %30 hemiselüloz %40 selüloz ve %30 ligninden oluşmaktadır. Lignoselülozik ham maddenin %10-40'ı, dominant kısmı ksiloz olmak üzere pentozlardan meydana gelmektedir (Hahn-Hagerdal vd., 2001). Yenilenebilir biyokütlenin (biyolojik atıklar) fermentasyon yolu ile alkol üretiminin ham maddesi olabilecek şekerlere ve etanole dönüşümü hızla tüketilen fosil yakıtlar için önemli bir gelişmedir. Ayrıca hemiselülozlardan üretilen etanolün likit yakıtlara karşı artan küresel talebi karşılamak için kullanılması, yakılması sera gazı etkisine neden olmadığı için iyi bir alternatif oluşturması endüstriyel açıdan ilgi görmesine neden olmaktadır (Tükel ve Alagöz, 2008). Biyoetanolün ekonomik açıdan üretimi, hemiselüloz ve selülozun glukoz ve ksiloza (yüksek oranlarda) hidrolizi ardından mayalarla etanole fermente edilmesi şeklinde gerçekleştirilebilir. Mantar türlerine; *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* ve *Candida tropicalis* (Chan vd., 1989; Chiang vd.,

1981b; Chiang vd., 1981a; Gong vd., 1981; Schneider vd., 1981; Wang vd., 1980a; Wang vd., 1980b) örnek olarak verilebilir.

Ayrıca yapılan çalışmalarla lignoselülozun biyolojik dönüşümünün verimli ve hızlı olduğu gösterilmiştir. Ziraı artıkların değerlendirip ve hemiselüloz içeren biyokütlelerin etkili bir biçimde kullanılarak hemiselülozun fermantasyonunun sağlanması konusu tüm dünyanın ilgisini çekmektedir (Wang vd., 1980a; Wang vd., 1980b).

Hemiselülozun ana birleşeni olan ksilan, ksiloz ünitelerinin β -(1,4) bağlanmasıyla oluşur. Ksilanın D-ksiloz üniteleri, enzimatik veya asidik metotlarla ksilanın basit bir şekilde hidrolizinin gerçekleştirilmesiyle ortaya çıkmaktadır. Endüstriyel maya türlerinden *Saccharomyces cerevisiae* gibi türler özellikle heksozları verimli şekilde mayalayabilir, ancak D-ksiloz bu fermentasyon sonucunda üretilmemiş olur. Oksidoredüktatif yöntemlerle birkaç maya türü; *Candida utilis* ve *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* ve *Pachysolen tannophilus* pentozlar üretebilirler. Ancak bu organizmaların mayalanma miktarları oldukça azdır (Dupreez ve Prior, 1985). Bunların yanında bu mayaların etanole olan düşük toleransı ve oksijenin varlığında etanolü katabolize etmeleri, endüstriyel uygulamalarda kullanılmalarını engeller (Du Preez vd., 1987). Yukarıda bahsedilen mayaların ksilozun etanole fermente süreçlerinde birtakım engellerle karşı karşıya kalınmaktadır. Bu sebepten ötürü GI'nın kullanılarak ksilozun ksiluloza izomerizasyonu sağlanmasının ardından ksiluloz etanole kolayca fermentesi gerçekleşmektedir (Chiang vd., 1981a).

Bugünlerde bilimsel araştırmalarda GI enzimi ile ksilozun alkole kendiliğinden fermantasyonunun sağlanması konusunda çalışmalar hızla artmaktadır.

1.4. GI Üretebilen Kaynak Mikroorganizmalar

Endüstriyel uygulamalar için ihtiyaç duyulan enzim miktarı oldukça fazladır. Bu nedenle, biyolojik yöntemlerle elde edilen bir enzimin ticari işlemlerde kullanılabilmesi için, enzimin hangi kaynaktan nasıl izole edileceği son derece önemlidir. Bu

kaynakların ticari olarak kullanılabilmelerinin koşulları maliyetleri ve elde edilebilmelerinin kolaylığı ve toplumda kabul görmeleridir (Faiz, 2005).

Endüstriyel açıdan önem arz etmesi nedeniyle yeni GI'ların geliştirilmesi için çeşitli çalışmalar yapılmış ve enzimin kararlılığı, indüksiyonu ve saflaştırılması üzerine yoğunlaşmıştır (Quax, 1993). GI, birçok prokaryotik mikroorganizmada yaygın olarak bulunmaktadır (Tablo 2).

Pseudomonas hydrophila'da keşfinden sonra birçok bakteri ve arsenat yokluğunda *Actinomyces* türünde GI aktivitesi saptanmıştır. Heterolaktik asidik bakteriler arasında *Lactobacillus brevis*'ten, GI oldukça fazla miktarda üretiliyordu. Elde edilen GI, düşük pH değerlerinde aktif halde olmasına rağmen yüksek sıcaklıklarda ise kararlı olamamaları ekonomik açıdan uygun değildi (Bhosale vd.,1996).

GI'nın hücre dışına salgılanması ender rastlanan bir durumdur. Bununla birlikte *Streptomyces glaucescens* ve *S. flavogriseus* türleri tarafından izole edilen enzimin ekstrasellüler olduğu bildirilmiştir (Batt vd., 1986; Beck vd., 1988). Bahsi geçen mikroorganizmalarda enzimin hücrenin dışına salınması, hücre duvarının kısmi lizisi ve hücre duvarı geçirgenliğinin değişmesiyle gerçekleşmiştir. Birçok *Bacillus spp.* ve *Streptomyces spp.* türleri GI üretmektedirler. Hücre dışı olan GI *Chania sp.* (Bejar vd., 1994) ve bir alkalotermofilik olan *Bacillus sp.*den (Chauthaiwale ve Rao,1994) izole edilen hücre dışı GI'lar iyon-değişimi kromatografisi, jel filtrasyonu kromatografisi ve preparatif poliakrilamid jel elektroforezi gibi bir dizi saflaştırma tekniğiyle homojen olarak saflaştırılmışlardır.

GI aynı zamanda *Candida utilis* ve *Candida boidinii* gibi birkaç mayada da tespit edilmiştir (Blacklow vd., 1988; Collyer ve Blow, 1990). GI aktivitesine sahip organizmalardan *Aspergillus oryza* bildirilen tek mantardır. Tüm aerobik organizmalarda var olan GI malt, çimlenmiş arpada (Bartfay, 1960) ve buğday tohumunda da saptanmıştır (Blow vd., 1992; Bogumil vd., 1993).

Tablo 2. GI üretebilen bazı mikroorganizmalar (Bhosale, 1996)

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

GI üreten ve ticari olarak önemli olan birkaç mikroorganizma Tablo 3’de verilmiştir. Ticari olarak oldukça önemli olan GI üreten birçok yeni organizma ve geliştirilen yöntemler hakkındaki bilgiler patentlenmiştir. (Boguslawski vd., 1982; Bok vd., 1984; Bor vd., 1992; Briggs vd., 1984).

Tablo 3. Endüstriyel öneme sahip GI'ları üreten bazı mikroorganizmalar ve ürünlerinin ticari adları (Bhosale vd., 1996).

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

1.5. GI'nın Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin Bölge Özgün Mutasyonlar ile Geliştirilmesi

Geçtiğimiz yüzyıldan bu yana glukozun fruktoza enzimatik dönüşümü bilinmekte olup, Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein olarak tanımlanan reaksiyonlar ile gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyonların gerçekleşmesi ise yüksek sıcaklık ve pH'da olmaktadır. Glukozdan kimyasal olarak fruktoz üretmek için adım atılmış fakat bu reaksiyonun özgün olmadığı sonucuyla karşılaşılmıştır. Aynı zamanda, yüksek sıcaklık ve pH değerlerinde çalışıldığında psikoz gibi metabolize edilemeyen şekerler ve renkli ürünler meydana gelmektedir. Bu yöntem ile %40'dan daha yüksek konsantrasyonda fruktoz ürünü elde etmek de oldukça güçtür, üretilen fruktoz lezzetli olmayıp tadı daha acıdır. Bu sebeple ticari olarak kullanımı uygun değildir. Diğer yandan glukozun fruktoza enzimatik dönüşümü, reaksiyon spesifikliği, arzu edilen pH ve sıcaklıkta dönüşüm ve yan ürünlerin oluşmaması gibi kazanımları vardır. Tüm bu sebeplerden ötürü enzimatik dönüşüm yeğlenmekte ve GI içeren süreçler endüstriyel uygulamalarda giderek artarak yerini almaktadır (Barker, 1976; Marshall ve Kooi, 1957). Bunların

yanında enzimler üzerinde mutasyonlar yapılarak enzimin özelliklerinin geliştirilmesi için araştırmalar mevcuttur. Bu boyutta spesifik bölge mutasyonları uygulanarak türlü mikroorganizmalara ait birçok glukoz izomerazın; substrat seçiminin değiştirilmesi, ısı kararlılığının artırılması, optimum pH değerinin düşürülmesi, türlü aminoasitlerin molekül içerisindeki fonksiyonlarının belirlenmesi ve alt üniteler arasındaki etkileşimlerin ortaya çıkarılması yönünde birçok bilimsel ve endüstriyel olarak önemli çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Bhosale vd., 1996).

Bu çalışmalara örnek olarak; *C. thermosulfurogenes* enzimindeki dört farklı pozisyondaki histidin rezervleri mutasyon yapılarak değiştirildi. H101'in fenilalanin ile değiştirilmesi, enzim aktivitesini tamamen ortadan kaldırırken, diğer histidin kalıntılarının fenilalanin ile ikame edilmesinin enzim aktivitesi üzerinde hiçbir etkisi olmamıştır. H101 E, Q, N veya D amino asitleri ile değiştirildiğinde, yaban tip enzim aktivitesi mutant enzimler tarafından %10-16 korunur. Q101 mutant enzimi, yaban tip enzimi tamamen inaktive eden dietilpirokarbonat inhibisyonuna karşı dirençlidir; bu durum, H101'in doğrudan enzim katalizinde rol alan tek esansiyel histidin rezervinin olduğunu gösterir. Q101, E101, N101 ve D101 mutant enzimlerinin 5,0-8,5 pH aralığındaki sabit V_{max} değerleri, His101 protonasyonunun, pH 6,5'teki yaban tip enzimin V_{max} değerlerinin düşürülmesinden sorumlu olduğunu göstermektedir (Lee vd., 1990b).

Anoxybacillus gonensis G2^T glukoz izomeraz geninin bazı biyokimyasal özelliklerinin geliştirilmesi için yapılan çalışmada bölge özgün mutasyon yöntemiyle, klonlanan glukoz izomeraz üzerinde W137F, V184T, V184S, H99Q, H99N, H99D, H99E ve H99L mutasyonları yapıldı. Yaban tip enzimin optimum sıcaklığı 85°C ve optimum pH'sı 6,5 olduğu saptandı. Yapılan mutasyonlardan W137F mutantının enzimin K_m değerinde düşüş meydana getirdiği gözlemlendi. V184S, V184T mutasyonları enzim kinetik parametrelerinde önemli bir değişiklik görülmemiştir. H99 ile yapılan mutasyonlar sonucunda enzimin K_m değerinde bir artış V_{max} değerinde ise düşüş gözlemlenmiştir. W137F/V184S ve W184T mutasyonları ile K_m değeri düşürülmüştür (Karaoğlu, 2010).

Farklı mikroorganizmalardan elde edilen GI'ların aktif bölgelerinde aromatik amino asitlerin varlığı tespit edilmiş, bu amino asitlerin arasındaki hidrofobik

etkileşimlerin monomerleri ile aktif dimerlerin birleşimini sağlayacak kadar önemli bir etkilerinin olduğu tahmin edilmiştir. Enzimin substrat olan glukozla ilgisinin artırılması için *C. thermosulfurogenes* glukoz izomerazı üzerinde yapılan W139F mutasyonu sonucunda K_m değerinde düşüş ve k_{cat} değerinde artış meydana gelmiştir. Aynı enzimde W139F-V186S ve W139F/V186T mutasyonları yapılarak enzimin katalitik etkinliğinde sırasıyla 2 ve 5 kat artışlar olmuştur (Meng vd., 1991). Isıl kararlılığın artırılması maksadıyla *Clostridium thermosulfurogenes* türüne ait GI üzerinde yapılan bir diğer çalışmada W15R mutasyonu gerçekleştirilerek enzimin 80 °C'deki ısı kararlılığı %60 (Meng vd., 1993), yarılanma ömrü ise %30 arttırılmıştır (Quax vd., 1991).

Meng vd., (1993) yaptıkları çalışmada *Thermoanaerobacterium thermosulfigenes* GI'sında kofaktör olarak Co^{+2} iyonu içeren ısı kararlılığa sahip aromatik aminoasitler (W48, F59, W138, F144 ve W187) tespit etmiştir. Bu mutantlardan W187H ve F144K'nin 75°C'de sıcaklık uygulamasında enzimin aktivitesini kaybettiği yani dayanıksız olduğu gözlenmiştir. Bu durumla birlikte yüksek sıcaklıklarda enzim yapısının korunmasında W187 ve F144 aminoasitlerinin hidrofobik karakterlerinin etkin olduğu anlaşılmıştır. Bunun yanında W138 aminoasidinin daha küçük hidrofobik amino asitlerle sübtütasyonu enzimin ısı kararlılığını aktiviteyi etkilemeden 85°C ye çıkardığı görülmüştür. W138'deki indol grubu enzimin aktif bölgesine doğru bir çıkıntı yaptığından dolayı bu amino asidin F, M veya A amino asitleri ile yer değişimi enzimin aktif bölge alanında bir daralma sağlamış ve böylelikle enzimin ısı kararlılığı üzerinde %60 oranında bir neden olmuştur. W48R mutasyonunda enzimin aktivitesinde bir değişiklik olmazken ısı kararlılığını %60 oranında artış olmuştur. Bu mutantta R48 amino asidi N338 amino asidi ile hidrojen bağı oluşturma vazifesini yapmış ve enzimin aktif bölgesinde bir değişikliğe sebebiyet vermemiştir. F59H mutasyonu ise yaban tip enzime ısı kararlılığının ve ömrünün daha az olduğu belirlendi (Cha vd., 1994).

Enzim aktivitesi ve ısı kararlılığı etkilerinin araştırıldığı çalışmada *Streptomyces rubiginosus* GI'sı üzerinde His219 aminoasidi üzerinde bölge spesifik mutasyonları gerçekleştirilmiştir (Cha vd., 1994). Bu aminoasit hemen hemen tüm GI'larda bulunmakta olup bu aminoasidin S, E ve N aminoasitleri ile değiştirilmesi neticesinde enzimin k_{cat} değerinde sadece %0,3–0,5 artış görülürken, K_m değerinde 30-40 kat artış gözlenmiştir. Isıl kararlılık çalışmaları neticesinde kararlılık açısından H219S ve H219N

mutant enzimlerinin 5-8 °C'de daha az kararlı oldukları anlaşılrken H219E ve H219K mutant enzimlerinin 13-24 °C'de daha az kararlı olduğu saptanmıştır.

Thermus thermophilus'den izole edilen GI izeriden yapılan E372G, V379A E372G, F163L ve E372G mutasyonları sonucu optimum pH 7,0 bulunmuş olup mutantların termal stabilitesi zayıflattığı belirlendi (Lonn vd., 2002).

Mutasyon işlemleri ile enzim aktivitesi izerinde sıcaklık değişiminin araştırıldığı mevcut çalışmalardan; *Thermotoga neapolitana* GI'sı izerine yapılan P58Q, P62A ve P58Q/P62A ve W138F mutasyonları ile *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* GI'sı izerine yapılan A62P ve Q58P/A62P mutasyonları ısı kararlılıkta 10°C'lik bir azalmaya sebebiyet vermiştir. Diğer yandan *Thermotoga neapolitana* GI'sı izerine yapılan V185T ve W138F/V185T mutasyonları sonucu optimum sıcaklıkta 2°C'lik bir artış olmuş; W138F, V185T/L282P ve V185T/L282P/F186S mutasyonları sonucunda enzimin daha kararlı hale geldiği gözlemlenmiştir (Sriprapundh vd., 2000, 2003).

Optimum pH değerinin azaltılması için *Actinoplanes missouriensis* GI'sında E186Q mutasyonu yapılmıştır. Bu alışma ile optimum pH değerı 7,5'ten 6,5'e düşürülmüştür (Tilbeurgh vd., 1992). Sriprapundh ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptıkları çalışma sonucu elde edilen mutant enzimlerin pH değerlerinde bir değeriklik meydana gelmemiştir.

K252R mutasyonu ile *Thermus thermophilus* GI'sının ısı kararlılığında artış gözlenmişken (Hartley vd., 2000), D256R mutasyonu sonucunda ısı kararlılıkta düşüş gözlenmiştir (Patel vd., 2012).

Actinoplanes missouriensis elde edilen GI izerinde K253R mutasyonu ile enzimin ömrü %30 arttırılmıştır. Aynı organizmada l olarak gerçekleştirilen G70S / A73S / G74T mutantında en iyi stabilite görülmüştür (Quax vd.,1991).

Streptomyces sp. SK GI'sı izerine yapılan mutasyon çalışmaları, enzimin K_m değerinde artışa, V_{max} ve k_{cat} / K_m değerlerinde düşüşe yol açmıştır. (Hajer vd., 2014).

Streptomyces sp. GI'sı üzerine yapılan W16H mutasyonu nihayetinde enzimin optimum pH değeri 6,5'ten 6,0'a düşmüştür (Hajer vd., 2014).

Glukoza mukabiliyet açısından ilgisinin, pH'sının ve ısıl kararlılığının yüksek olduğu bir glukoz izomerazın elde edilmesi için *Geobacillus caldoxylosilyticus* TK4GI geninin üzerinde özgün bölgelerde mutasyonlar; D102N, H99Q, V184T ve H99Q/D102N yapılmıştır. Mutasyon çalışmaları sonucunda optimum sıcaklık ve K_m değerinde artış, optimum pH ile V_{max} değerinde ise azalmalar olduğu saptanmıştır. Enzimin optimum sıcaklığında 80 °C'den 85 °C'ye, 5°lik bir yükselme meydana gelmiştir. Ayrıca mutant enzimlerin 80- 90 °C'de aktivite göstermesi dolayısıyla bu sıcaklıklarda da aktivite tayininin yapılabileceği tespit edilmiştir. Rekombinant enzimle kıyas edildiğinde özellikle pH 6,0'daki pH kararlılığında artış görülmüştür. Literatürdeki ısıl kararlılık çalışmalarıyla karşılaştırıldığında, özellikle depolama sıcaklığı olan 4 °C'de bir miktar artış saptanmıştır (Ayna, 2016).

Anoxybacillus gonensis G2^T glukoz izomeraz enziminin biyokimyasal özellikleri, kinetik parametrelerinin geliştirilmesi için glukoz izomeraz üzerinde G33D, N138G, T144S, V293I, V32I, E373K ve V380I mutasyonları yapıldı. Yapılan çalışmalar sonucunda G33D, V293I, V32I, E373K ve V380I mutasyonları ile yaban tip enzimin biyokimyasal özelliklerinde ve kinetik parametrelerinde önemli bir değişiklik meydana gelmemiştir. N138G ve T144S mutantlarının V_{max} , k_{cat} ve katalitik etkinlik değeri olan k_{cat} / K_m 'sinde artış gözlemlendi. Yaban tip enzime göre G33D, T144S mutantlarında hafif bir artış gözlemlendi (Bak, 2017).

1.6. Çalışmanın Amacı ve Önemi

Enzimlerin endüstriyel uygulamaları gittikçe yaygınlaşmakla beraber katalitik potansiyellerinin analitik amaçlarının yanı sıra sentetik amaçlar ve modifikasyonlar için de değerlendirilmektedir. Bu anlamda enzimlerden başta gıda sektörü olmak üzere, kimya, deri ve tekstil, farmasötik gibi birçok sanayi dallarında yararlanabilmeyi mümkün kılmaktadır.

Endüstriyel uygulamalar için sıcaklık en önemli unsurlardan biridir. Sıcaklığın önem arz etmesinden ötürü endüstride kullanım için yüksek sıcaklıklarda aktif olarak çalışabilen enzimler seçilir. Son yıllarda enzimlere, ekstrem sıcaklıklarda ve pH'larda, organik çözücülerde olduğu gibi farklı koşullarda kararlılık ve iyi bir performans kazandırabilmek veya enzimlerin substrat spesifikliklerini değiştirerek, yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin geliştirilmesi için mutasyon çalışmaları yürütülmektedir. Yapılan çalışmalarla yaban tip proteinde olmayan nitelikleri proteine taşıyarak endüstriyel olarak kullanımlarına uygun nitelikte enzimler yakalamak mümkündür.

Bu seçimlerden ötürü birçok termofilik ve asidik karakterde olan organizmaların GI'ları araştırılmış ve biyokimyasal parametreleri çeşitli mutasyonlarla özellikleri geliştirilmeye çalışılmıştır.

Endüstriyel uygulamalarda yeni üretilen glukoz izomerazlarda; glukozu ilgisi daha yüksek K_m ve optimum pH değeri düşük, yüksek sıcaklıklarda yüksek aktivite ve kararlılık gibi biyokimyasal özellikler aranmaktadır. Termofilik bir bakteri olan *A. gonensis* G2^T GI'sının özellikleri göz önüne alındığında, endüstriyel kullanım için ideal bir enzim olduğu sonucu açığa çıkmaktadır. *A. gonensis* G2^T GI'sının optimum sıcaklığı 85°C'dir. Isıl kararlılığı bozmadan optimum sıcaklığı 60°C'ye düşürecek mutasyonlarla geliştirilerek daha iyi potansiyele sahip enzim haline getirmek endüstriyel kullanımlar için çok yararlı olacaktır.

Bu amaçla Tübitak 1001 Projesi (115Z352) destekli bu çalışmada vektör olarak pET-28a(+) vektörüne klonlanmış olan *Anoxybacillus gonensis* G2^T GI geni (*XylA*) üzerinde K111R-L313I-V101R-A353G/F/W Ve T428E/S bölge spesifik mutasyonları yapılarak enzimin ısıl kararlılığı geliştirilmeye çalışılmış ve mutant enzimler kolon kromatografi yöntemiyle saflaştırılarak, biyokimyasal karakterizasyonları yapılmıştır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar, Enzimler ve Kitler

Trypton (Fluka VCBN7396V), Yeast Ekstrakt (Merck VM445253224), NaCl (Sigma SZBE1470V), CaCl₂ (Sigma C5670), CoCl₂, MgSO₄ (Merck K45872982 441), D-Glukoz (Sigma SZBA1790V), D-Fruktoz (Bioshop 5D38250412), MOPS (Fisher scientific 154054), Lizozim (Bioshop 6C42679), Etil Alkol (Smyras 305041016060), Kanamisin (Fisher 134473), IPTG (Bioshop 6C42892), Commassie Brilliant Blue G-250 (Panreac 5M014937), Commassie Brilliant Blue R-250, Etanol, Fosforik Asit (Carlo erba 304062), BSA (NEB), DEAE-Sefaroz (Sigma MKBT1646V) , Fenil Sefaroz 6 Fast Flow (Sigma), Amonyom sülfat (Merck A0296217 201), Sodyum asetat (Merck AM0793468550), Tris (Fisher scientific149456A), K₂HPO₄ (Merck A0435601 442), Glisin (Fluka50052), HCl (Sigma aldrich 82670), NaOH (Applichem 8Z011622), dNTP seti (BioLabs), Glycerol(G2025) T4 DNA ligaz (Thermo Fisher Scientific), Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Thermo Scientific), *DpnI* (New England Biolabs), Amonyum persülfat (A3678), TEMED (T7024), Akrilamid (A8887), N,N,metilen bis akrilamid (3874)), GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific).

2.2. Çalışmada Kullanılan Hücre ve Plazmitler

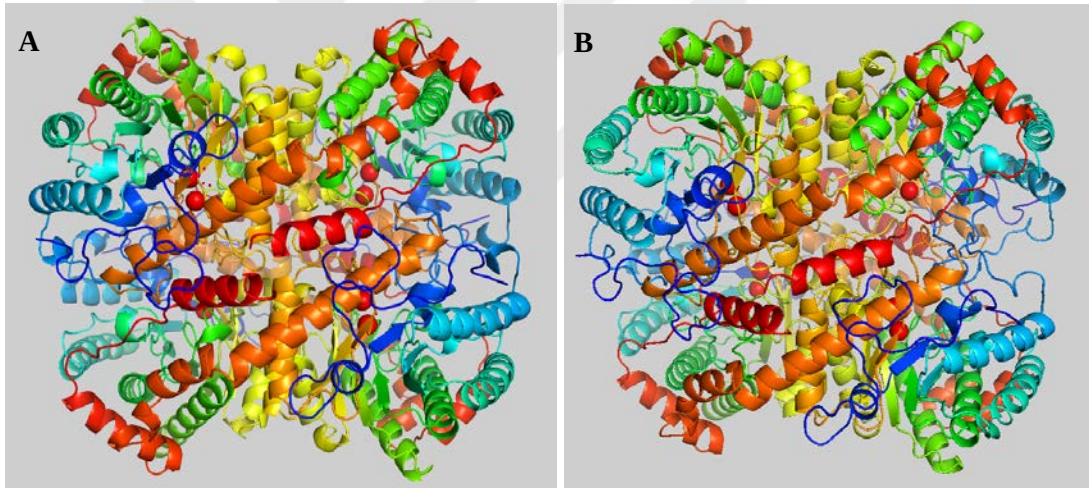
Glukoz izomeraz geninin kaynağı olarak *Anoxybacillus gonensis* G2^T bakterisi kullanılmıştır. *A. gonensis* G2^T GI'nı kodlayan 1326 bp *XylA* geni pET28a(+) vektörü içerisinde klonlanmıştır ve plazmite de pETG2GI ismi verilmiştir. pETG2GI, konak hücre olan *E. coli* BL21(DE3) suşu içerisine CaCl₂ transformasyon metodu ile aktararak ekspreslenmiştir. Bu dizge *E. coli* BL21(DE3)/pETG2GI olarak isimlendirilerek laboratuvarında stoklanmıştır. Çalışmalarımızın amacı doğrultusunda mutasyonları gerçekleştirebilmek için pETG2GI içerisinde bulunan *XylA* geni kullanılmıştır.

2.3. Mutasyon Çalışmaları

Bu çalışmada enzim üzerinde 5 farklı bölgede toplam 8 farklı mutasyon yapıldı. Bu tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar ve bu aşamalarda kullanılan yöntemler aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

2.3.1. Mutasyon Bölgelerinin Tasarlanması

Anoxybacillus gonensis G2^T ve *Geobacillus stearothermophilus* glukoz izomerazlarının üç boyutlu yapılarının ve amino asit dizilerinin karşılaştırılması yapılmıştır. Şekil 5’de görüldüğü gibi, enzimlerin sekonder, tersiyer ve kuartern yapıları birbirine benzemektedir.



Şekil 5. A) *Geobacillus stearothermophilus* GI B) *Anoxybacillus gonensis* G2^T GI

Mezofilik ve termofilik karakterli birçok organizmanın GI’lerinin ait amino asit dizilimleri birbirleriyle ve *A. gonensis* GI’sı ile karşılaştırılmasıyla Tablo 4 elde edilmiştir. Glukoz izomerazların aminoasit sıraları mukayese edildiğinde var olan α-heliks ve β-levha tabakaların hangi amino asitlerden oluştukları gösterilmiştir.

Mutasyon noktalarına bakıldığında *A. gonensis* glukoz izomerazının bazı noktalarda mezofilik karakterdeki GI’lara benzediği görülmektedir. Örneğin Tablo 4 dikkatlice incelenecek olursa *A. gonensis* GI’nın 101 amino asidi olan valininin bir çok mezofilik organizmada da valin olarak yer adığı fakat özellikle termofilik organizmlarda bu

noktada arjinin amino asidinin tercih edildiği gözükmemektedir. Yine *A. gonensis* GI'nın 111 amino asidi olan lizin termofilik karakterli GI'larda arjinin olarak tercih edilmiştir. Bu sebeple V101R ve K111R mutasyonlarının planlanarak bu noktalarda *A. gonensis* GI'nın termofilik karakterli GI'lara benzetilmesi amaçlanmıştır. Aynı şekilde, 313. amino asit olan lösinin, izolösine dönüştürülmesiyle gerçekleşecek olan (L313I) enzimin termofilik karakterinde bir artışa sebep olacağı apaçık görülmektedir. Bu şekilde tüm amino ait dizilimi incelenerek ısı kararlılığı geliştirebileceğimizi düşündüğümüz 8 kritik noktada (V101R, K111R, L313I, A353G, A353F, A353W, T428E, T428S amino asitler) mutasyon çalışmaları yapılmıştır.

Tablo 4. *A. gonensis* GI'sında gerçekleştirilecek mutasyonların, mezofilik ve termofilik karakterli Tip 2 GI'larının amino asit dizileri ile karşılaştırılması

Mezofilik Tip2 GI'lar													Termofilik Tip2 GI'lar										
A.gonensis G2 ^T GI'da hedeflenen mutasyon noktaları																							
	B.subtilis	B.megaterium	B.licheniformis	E.coli	K.pneumoniae	H.influenzae	L.lactis	R.flavesciens	T.halophilus	S.xylosus	L.pentosus	L.brevis	A.gonensis G2 ^T	C.thermosulfurogenes	T.saccharolyticum	C.thermohydrosulfuricum	C.thermosaccharolyticum	T.aquaticus	T.neopalitana	T.maritima	α-heliks ve βlevha tabakalar)		
V101R	R	R	V	V	V	V	I	R	V	V	R	R	V	R	R	R	R	R	R	R		R	H2
K111R	K	Q	R	K	K	R	K	K	K	K	R	R	K	R	R	R	R	R	R	R	R	H2	
L313I	L	L	L	V	V	V	V	I	I	V	L	L	L	I	I	I	I	I	I	V	I	H7	
A353G	A	A	A	G	G	A	A	S	A	T	G	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G	H8	
A353F	A	A	A	G	G	A	A	S	A	T	G	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G	H8	
A353W	A	A	A	G	G	A	A	S	A	T	G	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G	H8	
T428S	P	S	A	N	N	N	S	S	S	S	E	E	T	S	S	S	Q	S	S	S	S	H13	
T428E	P	S	A	N	N	N	S	S	S	S	E	E	T	S	S	S	Q	S	S	S	S	H13	

2.3.2. Primerlerin Dizayını

Spesifik bölge mutasyonuna yönelik biri Forward (ileri) diğeri Reverse (geri), en az 25-30 baz uzunlukta oligonükleotitlerden tasarlanmış iki primere ihtiyaç vardır. Modifiye edilecek amino asidi kodlayan dizi primerin tam ortasında bulunmalıdır. İlgilenilen mutasyon bölgelerindeki amino asidi kodlayan baz dizisinin konak hücrenin (*E.coli* BL21(DE3)) kodon kullanımına göre seçilmesi gereklidir.

Tablo 5. *E. coli* genlerinin üretilmesi için seçilen kodon kullanımı (Maloy vd., 1996)

	Codon	Amino acid ²	% ³	Ratio ⁴	Codon	Amino acid	%	Ratio	Codon	Amino acid	%	Ratio	Codon	Amino acid	%	Ratio	
U	UUU	Phe (F)	1.9	0.51	UCU	Ser (S)	1.1	0.19	UAU	Tyr (Y)	1.6	0.53	UGU	Cys (C)	0.4	0.43	U
	UUC	Phe (F)	1.8	0.49	UCC	Ser (S)	1.0	0.17	UAC	Tyr (Y)	1.4	0.47	UGC	Cys (C)	0.6	0.57	C
	UUA	Leu (L)	1.0	0.11	UCA	Ser (S)	0.7	0.12	UAA	STOP	0.2	0.62	UGA	STOP	0.1	0.30	A
	UUG	Leu (L)	1.1	0.11	UCG	Ser (S)	0.8	0.13	UAG	STOP	0.05	0.09	UGG	Trp (W)	1.4	1.00	G
C	CUU	Leu (L)	1.0	0.10	CCU	Pro (P)	0.7	0.16	CAU	His (H)	1.2	0.52	CGU	Arg (K)	2.4	0.42	U
	CUC	Leu (L)	0.9	0.10	CCC	Pro (P)	0.4	0.10	CAC	His (H)	1.1	0.48	CGC	Arg (K)	2.2	0.37	C
	CUA	Leu (L)	0.3	0.03	CCA	Pro (P)	0.8	0.20	CAA	Gln (Q)	1.3	0.31	CGA	Arg (K)	0.3	0.05	A
	CUG	Leu (L)	5.2	0.55	CCG	Pro (P)	2.4	0.55	CAG	Gln (Q)	2.9	0.69	CGG	Arg (K)	0.5	0.08	G
A	AUU	Leu (L)	2.7	0.47	ACU	Thr (T)	1.2	0.21	AAU	Asn (N)	1.6	0.39	AGU	Ser (S)	0.7	0.13	U
	AUC	Leu (L)	2.7	0.46	ACC	Thr (T)	2.4	0.43	AAC	Asn (N)	2.6	0.61	AGC	Ser (S)	1.5	0.27	C
	AUA	Leu (L)	0.4	0.07	ACA	Thr (T)	0.1	0.30	AAA	Lys (K)	3.8	0.76	AGA	Arg (K)	0.2	0.04	A
	AUG	Met (M)	2.6	1.00	ACG	Thr (T)	1.3	0.23	AAG	Lys (K)	1.2	0.24	AGG	Arg (K)	0.2	0.03	G
G	GUU	Val (V)	2.0	0.29	GCU	Ala (A)	1.8	0.19	GAU	Asp (D)	3.3	0.59	GGU	Gly (G)	2.8	0.387	U
	GUC	Val (V)	1.4	0.20	GCC	Ala (A)	2.3	0.25	GAC	Asp (D)	2.3	0.41	GGC	Gly (G)	3.0	0.40	C
	GUA	Val (V)	1.2	0.17	GCA	Ala (A)	2.1	0.22	GAA	Glu (E)	4.4	0.70	GGA	Gly (G)	0.7	0.09	A
	GUG	Val (V)	2.4	0.34	GCG	Ala (A)	3.2	0.34	GAG	Glu (E)	1.9	0.30	GGG	Gly (G)	0.9	0.13	G
	U				C				A				G				

Bahsedilen mutasyonların gerçekleştirilmesi için gerekli olan uygun primerler tasarlanarak Macro Gen Şirketi'nde sentez ettirildi.

Tablo 6. Mutasyon primerleri

Adı	DNA Sırası 5'-3'	Nt	Tm
V101R-F	5' - CTGCTTCCACGAT CGC GATATTGCCCCAG - 3'	29	66,2
V101R-R	5' - CTGGGGCAATATC GCG ATCGTGGAAGCAG - 3'	29	66,2
K111R-F	5' - GAAGGAGCGACGTTA AGA GAAACGTATCAAAAC - 3'	33	60,5
K111R-R	5' - GTTTTGATACGTTT TCT TAACGTCGCTCCTTC - 3'	33	60,5
L313I-F	5' - CGAATTCCCAACAGAC ATC TATTCTACTACTCTTGC - 3'	36	60,6
L313I-R	5' - GCAAGAGTAGTAGAATA GAT GTCTGTTGGGAATTCG - 3'	36	60,6
A353G-F	5' - GAAGACTTATTCTAC GGC CATATTGCCGGAATGG - 3'	34	63,0
A353G-R	5' - CCATTCCGGCAATATG GCC GTAGAATAAGTCTTC - 3'	34	63,0
A353F-F	5' - GAAGACTTATTCTACT TTC CATATTGCCGGAATGG - 3'	34	60,0
A353F-R	5' - CCATTCCGGCAATATG GAA GTAGAATAAGTCTTC - 3'	34	60,0
A353W-F	5' - GAAGACTTATTCTACT TGG CATATTGCCGGAATGG - 3'	34	61,6
A353W-R	5' - CCATTCCGGCAATATG CCA GTAGAATAAGTCTTC - 3'	34	61,6
T428S-F	5' - CAAGAACGTCTGAAAT TCT TTTGCTTAACCAATATTTAC - 3'	37	58,0
T428S-R	5' - GTAAATATTGGTTAAGCAA AGA TTTCAGACGTTCTTG - 3'	37	58,0
T428E-F	5' - CAAGAACGTCTGAAAG GAG TTTGCTTAACCAATATTTAC - 3'	37	59,0
T428E-R	5' - GTAAATATTGGTTAAGCAA CTC TTTCAGACGTTCTTG - 3'	37	59,0

2.3.3. Plazmit İzolasyonu

Mutasyonlar, *A. gonensis* glukoz izomeraz enzimini kodlayan geni (*Xyla*) taşıyan pET28(a)+ ekspresyon vektörü (pETG2GI) kalıp olarak kullanılarak gerçekleştirileceği için pETG2GI'nin bulunduğu konak hücreden (*E.coli* BL21) izolasyonu gereklidir. Bunun için ilgili plazmitleri taşıyan hücreler 10 ml kanamisinli LB besiyerinde, 37°C'de 150 devir/dk. hızda 1 gece boyunca üretildi. Mutant plazmitlerin ve pETG2GI'nin bulundukları hücreden izolasyonları PureYield™ Plasmid Miniprep System plazmit izolasyon kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Üretici firmanın önerdiği aşağıdaki prosedür izlenmiştir.

- Bir gecelik pETG2GI kültüründeki hücreler steril ependorf tüplerinde iki kez olmak üzere 11000 g'de 30 sn santrifüj yapılarak çöktürüldü.
- Süpernatant kısmı uzaklaştırılıp bakteri peltasinin üzerine A1 (Resuspensiyon) solüsyonundan 250 µl eklendi ve pipet ucu yardımıyla iyice karıştırıldı.
- Üzerine 250 µl A2 (Lysis Buffer) solüsyonundan eklenerek yavaş bir şekilde 10 kez alt üst edildi.
- Oda sıcaklığında 5 dk. bekletildikten sonra A3 (Neutralization Buffer) solüsyonundan 300 µl eklenerek 10 kez alt üst edildi.
- Elde edilen bakteriyel lizat 11000 g'de 10 dk santrifüj edilerek çöktürüldü.
- Süpernatant spin kolon tüplerine alınarak 11000 g'de 1 dk santrifüj edildi ve pellet atıldı.
- Toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırılıp üzerine 500 µl AW (Wash Buffer) solüsyonundan eklendi ve 11000 g'de 2 dk santrifüj yapıldı.
- Spin kolona A4 (Wash Buffer) çözeltisinden 600 µl ilave edilerek 11000 g'de oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edildi.
- Yıkanan DNA'nın toplama tüpündeki sıvı kısmı uzaklaştırıldı ve tekrar 11000 g'de 2dk santrifüj yapıldı.
- Spin kolon, kapakları kesilen steril eppendorf tüpüne yerleştirildi ve spin kolon içine 50 µl AE (Elution Buffer) solüsyonu ilave edildi. Oda sıcaklığında 2 dk bekletildikten sonra 11000 g'de 1 dakika santrifüj edilerek plazmit DNA çözeltisi elde edildi.
- Elde edilen plazmit temiz tüpe alınarak %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülüp görüntülendi.

2.3.4. Long PCR

Bütün DNA polimerazlar, bazen örülen DNA iplikçiğine yanlış bir nükleotiti sokarak, DNA sentezi esnasında hatalar yaparlar. Ancak çoğu polimerazlar yanlış olana geri dönerek bu hataları düzeltebilirler. Bu özellik “doğru okuma” işlevi olarak ifade edilir ve polimerazın 3' yönünden 5' yönüne ekzonükleaz aktivitesine sahip olmasına bağlıdır. *Taq* polimeraz bu doğru okuma işlevinden yoksun görünmektedir ve sonuç olarak hataları düzeltemez. Bu durum *Taq* polimerazla sentezlenen DNA'nın, kalıp

molekölün her zaman bir kopyası olmadığı anlamına gelmektedir. Hata oranı sentezlenen her 9000 nükleotit DNA için 1 yanlış olarak hesaplanmıştır ki bu neredeyse önemsiz görünebilir fakat 30 döngü sonunda elde edilen PZR ürünlerinin her 300 bp'sine bir hata sokmaktadır. Bunun nedeni PZR'ın kopyalarından kopya yapmayı gerektirmesidir, böylece polimeraz kaynaklı hatalar kademeli olarak birikir, bir PZR'ın sonunda üretilen parçalar, daha erken hatalarla birlikte sentezin son aşaması sırasında yapılan hataları da kapsar. Bundan dolayı mutasyon çalışmalarında kalıp DNA görevi üstlenecek olan pETG2GI'nın *Taq* DNA polimeraz ile çoğaltılması mümkün görünmemektedir. Onun yerine çalışmalarda yüksek doğruluğa sahip 25 kb' ye kadar zincir sentezleyebilen “Phusion High-Fidelity DNA polymerase” (Thermo Scientific) kullanıldı. pETG2GI'nın kalıp DNA olarak kullanıldığı, mutasyonlar ve mutasyon primerlerinin 50 µl nihai hacimde reaksiyon karışım hazırlandığı PZR işlemi gerçekleştirildi. PZR yapılacak her bir örnek için bileşenler ve miktarları aşağıdaki gibidir.

- 0,5 µl Enzim (Stok)
- 10 µl Buffer (Stok)
- 5 µl dNTP (deoksiniükleotidtrifosfatlar: dATP, dGTP, dCTP, dTTP 10 mM)
- 1 µl Mutasyon primeri (Forward)
- 1 µl Mutasyon primeri (Reverse)
- 31,5 µl ddH₂O
- 1µl Palzmid DNA (PetG2GI)

PZR programı;

- 98°C'de 2 dakika (Ön denatürasyon)
 - 98°C'de 30 saniye (Denatürasyon)
 - Uygun TM'de 20 saniye (Primerlerin bağlanması)
 - 72°C'de 3 dakika 30 saniye (Extentin, zincirlerin uzaması)
 - 98°C'de 20 saniye (Denatürasyon)
 - Uygun TM'de 20 saniye (Annealing)
 - 72°C'de 3 dakika 2 saniye (Extentin)
 - 72°C'de 10 dakika (Lost Extentin)
- 10 Döngü
- 30 Döngü

PCR işlemi sonrasında örnekler agaroz jel elektroforezinde 90 voltta 30 dk yürütüldü. Plazmid DNA bantları jel elektroforez sisteminde görüntülendi.

2.3.5. *DpnI* Kesim Reaksiyonu

Kalıp DNA olarak ilgili vektörün (pETG2GI) kullanıldığı Long-PCR’da, vektörün kendisi hücreden izole edildiği için metillenmiş durumda olup, sentezlenen yeni zincirler metillenmemiş durumdadır. PZR esnasında vektörün her iki zinciri de kalıp görevi görmektedir. Bu nedenle, kalıp olarak kullanılan yabancı tip geni içeren vektörü ortamdan uzaklaştırmak amacıyla, PZR ürününün restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilmesi gereklidir. *DpnI* de metillenmiş DNA’yı, GATC dizisini tanıdığı yerden A’nin metillenmiş zincirini tanıyıp kesen bir enzimdir.

Çalışmamızda da *DpnI* enziminin kullanılmasıyla PZR ürünü içerisindeki metillenmiş pETG2GI’ya ait tüm zincirler parçalanarak ortamdan uzaklaştırılmış oldu. Geriye *In vitro* oluşan mutant plazmitleri için yeni sentezlenmiş zincirler kaldı. Nihayetinde *DpnI* enzimi kullanılarak metillenmiş olan kalıp DNA’yı yeni sentezlenmiş DNA’dan ayırma işlemi gerçekleştirildi.

Kalıp DNA’nın ortamdan uzaklaştırılması için, *DpnI* (New England Biolabs) enzimi ile 37°C’de 2 saatlik bir reaksiyon sonucunda kesim gerçekleştirildi. Reaksiyon şartları son hacimde 50 µl olacak şekilde aşağıdaki gibidir.

- 1 µl Restriksiyon enzimi
- 5 µl Buffer
- 20 µl Long PCR ürünü
- 24 µl Steril distile su

Kesim reaksiyonu sona erdikten sonra 30 dakika 37°C’de ardından 20 dakika 80°C’de inkübasyona bırakılarak *Dpn I* enzimi denatüre edildi. Inkübasyon sonrası kesim ürünü herhangi bir ligasyon işlemine tabi tutulmaksızın direkt olarak seçilen mutant DNA kendini onarması (çentiklerin tamamlanması) için kompetent *E. coli* DH5α suşuna transforme işlemine geçildi.

2.3.6. Kompetent Hücre Hazırlanması

Kompetent hücre hazırlanması için 0,1 M CaCl₂ kullanıldı. İlk olarak 10 ml LB besiyerine *E. coli* DH5 α suşundan tek koloni seçilip ekim yapıldı ve 37°C’de çalkalamalı etüvde bir gece inkübe edildi. Daha sonra 16 saat çoğalan kültürden 100 ml LB içine OD₆₀₀ 0,1 olacak şekilde ekilerek OD₆₀₀ değeri 0,4 ile 0,55 arasına gelinceye kadar çalkalamalı etüvde 37°C’de yaklaşık 1 saat inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyonun ardından biyogüvenlik kabini içerisinde üretilen hücreler 50 ml’lik 2 tane falkon tüplerine aktarıldı. 4400 rpm’de 5 dakika soğuk santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü. Sıvı kısmı dökülen hücrelerin üzerine 10 ml 0,1M soğuk CaCl₂ ilave edilerek pellet çözüldü ve buz üzerinde 30 dakika bekletildi. Sonrasında hücreler tekrar 4400 rpm’de 5 dakika çöktürülerek süpernatant uzaklaştırıldı. Pelletin üzerine 2 ml 0,1 M soğuk CaCl₂ ile çözülerek en az 2 saat +4°C’de buzdolabında saklandı. Böylece *E.coli* DH5 α suşu kompetent olarak hazır hale getirildi.

2.3.7. Transformasyon

Transformasyon işlemi için öncelikle *E. coli* DH5 α suşu 10 ml LB besiyeri içerisine ekildikten sonra 1 gece boyunca 37°C’de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra biyogüvenlik kabin içerisinde, bu kültürden alınıp steril ependorf tüplerine 200 μ l konuldu ve üzerlerine mutasyonlar içim kesim ürünlerinden 5, 10, 15, 20 μ l ve de pETG2GI’nın da çoğaltılması için plazmitten 1 μ l eklenerek buz üzerinde 30 dk bekletildi. Daha sonra hücreler 43°C’de 1,5 dk inkübe edilerek, ısı şoku uygulanarak indüklendi. Hücrelerin üzerine 200 μ l LB besi yeri ilave edildi ve 37°C’de 2 saat etüvde inkübe edildi. Yapılan işlemlerle pETG2GI’nın *E.coli* DH5 α suşu içerisine transformasyonu gerçekleştirilmiş oldu. Süre sonunda hücreler 0,05 mg/ml kanamisinli katı LB agar besiyeri üzerine drigalski spatülü ile yayıldı ve bir gece 37°C’de petrilerde inkübasyona bırakıldı. Transformasyon sonrası büyüyen kolonilerden seçilip her birinden kültürler atıldı ve kit ile plazmid izolasyonları yapıldı.

2.4. Enzim Üretimi

E.coli BL21/pETG2GI sistemi ile üretilen tüm mutant enzimler kolon kromatografi yöntemleri kullanılarak saflaştırılmaya çalışıldı. Bu yöntemde; ısı dejenerasyonu, iyon değişim ve hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi aşamaları gerçekleştirildi.

2.4.1. *E. coli* BL21/pETG2GI ve Mutant Plazmitlerin Rekombinant Üretimi

Biyogüvenlik kabini içerisinde *E. coli* BL21/pETG2GI stoğundan tek koloni seçilip 0,5 mM konsantrasyonlu 60 µl kanamisin eklenen 60 ml'lik sıvı LB'ye ekim yapılarak 37°C'de bir gün boyunca çalkalamalı inkübatörde çoğalmaya bırakıldı. Bu kültürden yeni kültür hazırlamak için 2 litrelik erlene, LB besiyerinden 400 ml (O.D₆₀₀'si 0,1 olacak şekilde) son hacimde olmak üzere taze ekim yapıldı. Yeni hücreler yaklaşık bir saat kadar 37°C'de O.D₆₀₀'si 0,6-0,8 oluncaya kadar inkübe edildi. Sonrasında hücreler üzerine, filtrasyonla steril edilmiş olan IPTG den son konsantrasyonu 0,1 mM olacak şekilde ilave edilerek enzim üretimi indükledi. IPTG ile uyarıldıktan sonra hücreler 4 saat kadar 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonunda hücreler yüksek devirli ve soğutmalı santrifüj cihazında 50 ml'lik falkon tüplerine konularak 6000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Böylece istenen hücre pelleti elde edilerek istenmeyen süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Çöken hücrelerin üzerine 1 mM CoCl₂ ve 10 mM MgSO₄ içeren 100 mM ve pH'sı 6,5 olan MOPS tampon çözeltisinden 2 ml konularak, vortekslenip homojen hale getirildi. Homojen hale getirilen hücrelerin üzerine son konsantrasyonu 1 µg/ml olacak şekilde lizozim eklenerek 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Sonraki aşamada ultra sonikatör (Sonics-Vibra cell) ile 2 dakikada 1 devir %20 güç ile hücreler patlatıldı. Uygulanan sonik dalgalar ve sürtünme nedeniyle açığa çıkan ısıyı yok etmek için falkon tüpü buzda muhafaza edildi. Parçalanmış hücreler 14.800 rpm de 15 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı yani hücre özütü temiz bir tüpe alınarak pellet kısmı atıldı. Hücre özütünden, GI aktivite kontrolü yapıldıktan sonra, protein miktarı, GI aktivitesi ve SDS-PAGE analizleri için 500 ml kadarı stoklandı. Geri kalan enzim özütü ile saflaştırma işlemleri geçildi.

2.4.2. Isı Dejenerasyonu Uygulaması

Glukoz izomeraz oldukça termofilik karakterli bir enzimdir. *E. coli* BL21/pETG2GI sistemi ile üretilen GI ve mutant enzimler termofilik karakter taşımaktadır. Ekspresyon sonrası elde edilen hücre özütündeki AgoGI haricindeki *E. coli* /BL21 hücresine ait proteinlerin büyük bir bölümü mezofilik karakterde olduklarından dolayı kısa süreli bir ısı şoku uygulandığında bu proteinlerin çoğu denatüre olmaktadır. Termofilik karakterli GI ise ısı bu uygulamadan çok fazla etkilenmemektedir.

Saflaştırmanın birinci aşamasında, kaba ekstrat 70°C’de 15 dakika ısı şokuna maruz bırakılarak mezofilik karakterdeki proteinler denatüre edildi. Denatüre olan proteinler 14.800 rpm’de 15 dk santrifüj edilip uzaklaştırıldı. Isı dejenerasyonu ile üretilen enzimden protein miktarı, GI aktivitesi ve SDS-PAGE analizleri için 500 ml ayrıldı. Enzimin geri kalan kısmı özüt olarak kullanılmak üzere iyon değişim kromatografisi aşamasına geçildi.

2.4.3. İyon Değişim Kromatografisi

Bu kromatografi tekniğinin kullanımıyla proteinleri izoelektrik yük dengesine göre ayırmak amaçlanmıştır. İyon değişim kromatografisi için 30 cm uzunluğunda ve 1,5 cm çapında dikey konumda cam bir kolon kullanıldı. Adsorban (kolon dolgu maddesi) olarak pH’sı 6,5 olan DEAE-Sepharose fast flow (Sigma) tercih edildi. Negatif yüklü proteinler bu bileşiğe bağlanırken diğer proteinler kolon maddesinden ayrılır. Kolon maddesi ve eşliğinde tüm deney tamponlarının gazı vakum pompası (KNF) kullanılarak alındı. Gazı alınarak degaze edilmiş kolon malzemesi pastör pipeti yardımıyla yavaşça kolona dolduruldu ve kolondan 100 ml saf su geçirilerek temizlenmesi sağlandı. Tampon çözelti olarak pH’ı 6,5 olan ve 1 mM CoCl₂ ve 10 mM MgSO₄ içeren 100 mM MOPS kullanılmıştır. Kolonun temizlenmesinin ardından 100 ml de tampon çözelti geçirildi. Akabinde kolonun tahliye hortumundan çıkan tamponun pH’sı kontrol edilerek kolonun dengeye (tampon çözeltinin pH’ı 6,5’e) gelip gelmediği kontrol edildi.

İyon değişim kromatografisi deneyi için Biologic Lp System (Bio-Rad) cihazı kullanıldı. Cihazda şu şekilde bir program yazılarak kromatografik yol izlendi;

- 50 ml kolunun dengeye getirilmesi,
- 20 ml enzim özütünün kolona aktarılması,
- 20-25 ml tutunmayan proteinlerin temizlenmesi,
- 100 ml (0–0,6 M) NaCl gradient köprüsü,
- 20 ml 1M NaCl ile kolonun temizlenmesi.

Sıcaklık uygulamasından sonra elde edilen enzim özütünün kolondan akış hızı 1 ml/dk olacak şekilde ayarlandı. Enzim içeren örnek kolona yüklendikten sonra tutunmayan proteinlerin kolondan uzaklaştırılması için 20-25 ml tampon çözelti kolondan geçirildi. Ardından kolonun NaCl konsantrasyonu içeriği 0 M'dan başlayarak 0,6 molar kadar yükseltildi. Bu amaçla cihazdan tampon çözelti içinde 100 ml daha 0–0,6 M NaCl gradient köprüsü kurularak karışım geçirildi. Son olarak 20 ml 1M NaCl ile kolondan geçirilip kolon temizlendi. Fraksiyon toplayıcı ile 3 ml olarak tüplerde toplanarak yük dengesine göre ayrılan proteinlerin glukoz izomeras aktivite taraması yapıldı. GI aktivitesi bulunan fraksiyonlar birleştirildi. Birleştirilme neticesinden oluşan enzim özütünden 500 ml kadarı protein miktarı, GI aktivitesi ve SDS-PAGE analizleri için ayrıldı. Geri kalan hücre özütü ile hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulamasına geçildi.

2.4.4. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi

Bu yöntemde durgun faz (matrikse bağlı hidrofobik yan zincirler) ile protein moleküllerinin oluşturduğu hidrofobik etkileşimlerden yararlanılır. Durgun olan faz hidrofilik özellik gösteren bir polimere bağlı küçük non-polar grupları içermektedir. Hidrofobik etkileşim kromatografisi proteinleri değişen hidrofobisitelerine göre ayırmayı hedefler. Bu yüzden etkileşim derecesine göre farklı proteinler farklı zamanlarda kolonu terk ederler.

Hidrofobik kolon kromatografisi deneyi için Biologic Lp System (Bio-Rad) cihazı kullanıldı. Hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi için 1,5x30 cm silindir cam bir

kolon kullanıldı. Glukoz izomerazın hidrofobik etkileşim kromatografisi ile ayrıştırılmasında dolgu maddesi olarak Pheynl Sepharose 6 (Sigma) kullanılmıştır. Kolon malzemesi ve tamponların gazları ve saf suyun gazı vakum pompası (KNF) ile alındı. Gazı alınarak degaze edilmiş kolon malzemesi pastör pipetiyle kolona dikkatli bir şekilde dolduruldu. Tamponu çözelti olarak (1 mM CoCl_2 ve 10 mM MgSO_4 ve 1,3 M amonyum sülfat içeren 100 mM MOPS (pH:6,5) tamponu kullanıldı ve 100 ml kolondan geçirildi.

İyon değişim kromatografisinden elde edilen enzim, 2,6 M amonyum sülfat içeren tampon çözelti ile bire bir oranında karıştırıldı ve böylece enzimin amonyum sülfat içeriği 1,3 M olarak ayarlanmış oldu.

Hidrofobik kolon kromatografisi deneyi için Biologic Lp System (Bio-Rad) cihazı kullanıldı. Cihazda şu şekilde bir program yazılarak akış gerçekleştirildi;

- 50 ml kolunun dengeye getirilmesi,
- 20 ml enzim özütünün kolona aktarılması,
- 20 ml tutunmayan proteinlerin temizlenmesi,
- 100 ml 1,3M–0 M Amonyum sülfat gradient köprüsü,
- 20 ml tampon ile kolonun temizlenmesi.

Enzim özütünün kolondan yüklenmesi ile yüksek amonyum sülfat konsantrasyonunda proteinlerin kolon malzemesine bağlanması sağlandı. Bu işlemten sonra kolonun amonyum sülfat içeriği 1,3 M'dan 0 M'a indirildi. Bu amaçla toplam hacmi 100 ml olan amonyum sülfat gradient köprüsü (1,3 M–0 M) kuruldu. Tamponun akış hızı 1 ml/dk olacak şekilde ayarlandı ve kolondan çıkan fraksiyonlar ise her bir reaksiyon tüpü içerisinde 3 ml olacak şekilde toplandı. Kolondan geçirilerek toplanan enzim özütlerinin 280 nm'deki absorbands değerleri cihazdan alınarak glukoz izomeraz aktivitelerine bakıldı. GI aktivitesi bulunan enzim özütleri birleştirilerek saflaştırma tablosu için gerekli olan analizler (protein miktarı, GI aktivitesi, SDS-PAGE vb.) için 500 ml ayrıldı. Daha sonra karakterizasyon çalışmaları aşamalarına geçildi.

2.5. Biyokimyasal Çalışmalar

2.5.1. Protein Miktarının Belirlenmesi

Proteinlerin nicel olarak tayini tüm deneyler için proteinin ve örnekteki diğer bileşiklerin yapısına ve deneyin hassasiyetine uygun olarak Bradford yöntemine göre belirlendi. Bu yöntem Coomassie Brilliant Blue G250 boyasının proteinlere bağlanması esasına dayalı bir yöntemdir. Negatif yüklü Coomassie Brilliant Blue G250 boyası yükünden dolayı kırmızı renkli olup maksimum absorbanası 470 nm'dir. Bu boya pozitif yük taşıyan gruplara bağlandığı sırada mavi forma dönüşür ve maksimum absorbanası 595 nm'de gösterir. Bradford yönteminin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford 1976).

1 lt boya çözeltisi hazırlamak için, 100 mg Coomassie Brilliant Blue (parlak mavisi) G-250 50 ml %95'lik etanol içerisinde iyice çözündürülerek üzerine %85'lik fosforik asitten (H_3PO_4) 100 ml yavaşça eklendi ve boya çözeltisinin hacmi distile su ile 1000 ml'ye tamamladı. Elde edilen Bradford stok çözeltisi, karanlık bir ortamda filtre kâğıdından süzülerek temizlendi. Boyanın içeriğinin güneş ışığından etkilenip bozulmaması için boya çözeltisi karanlık bir ortamda ve kahverengi bir cam şişesi içerisinde +4°C'de saklandı.

Protein standardı grafiği oluşturmak için BSA (Sığır Serum Albümin) kullanılarak, 1 mg/ml' lik stok çözeltisi hazırlandı. Standart çözeltiler için bu çözeltiden 1-10-100µg/ml olacak biçimde üç stok, ultra saf su ile seyrelmesi sağlanarak hazırlandı. Seyreltilen stoklardan kalibrasyon eğrisi için ayrı tüplere 1, 2, 4, 8, 15, 30, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500 µg şeklinde dağıtılarak saf su ile tüplerin hacmi 100 µL'ye tamamlandı, köre ise 100 µL saf su konuldu. Bütün tüplere 5:1 oranında hazırlanan renklendirme reaktifi boyasından, 5'er mL ilave edilerek vortekslendi. 15 dakika oda sıcaklığında bekledikten sonra Xmark Microplate Spectrophotometer (BioRad) cihazı ile 595 nm dalga boyunda köre karşı absorbanası okundu. Elde edilen absorbanas değerleri ile BSA çözeltilerinin absorbanaları karşılaştırılarak dilüsyon faktörü de göz önüne alınarak, µg protein miktarı hesaplanarak standart grafik haline getirilerek kaydedildi.

Protein tayini yapılan örnekler için BSA yerine tüplere 2, 4, 6, 8, 15, 20, 30, 50 hücre özütü konularak absorbans ölçümü ve zamanlama faktörleri için aynı yöntem uygulanarak standart grafikten miktar tayini yapıldı.

2.5.2. Glukoz İzomeraz Aktivite Deneyi

Glukoz izomeraz aktivitesi tayini için yapılan tüm çalışmalarda kimyager Theodor Seliwanoff (1887)'un tasarladığı Seliwanoff metodu kullanıldı. Seliwanoff testi, aldozlar ve ketoz şekerleri arasından ayırım yapmayı sağlayan kimyasal bir testtir. Ketozlar, keton/aldehid fonksiyonları ile ayırt edilirler. Şeker bir keton grubu içeriyorsa ketoz, bir şeker bir aldehit grubu içeriyorsa aldozdur. Bu test asit ortamda ısıtıldığında ketozların aldozlardan hassas oldukları için daha hızlı bir şekilde dehidre olma prensibine dayanır. Ketoz (fruktoz) içeren bir çözeltiye eklendiğinde, hızlı bir şekilde pozitif testi gösteren kırmızı renk oluşur. Aldoz içeren bir çözeltiye eklendiğinde, daha geç dönüşüm yaparak açık pembe gözlenir. Seliwanoff ayırıcı için reaktifler resorsinol ve hidroklorik asitten oluşur.

Martin Schenk and Hans Bisswanger (1998) tarafından Seliwanoff reaksiyonu ile fruktoz tayininin, daha kararlı olup sonuçların da daha tutarlı olduğu, reaksiyonun kısa bir süre içerisinde sabitlenip devam etmediği belirtilmiştir. Teknik olarak 1000 mL seliwanoff çözeltisi hazırlamak için %0,05 (w/v) 1 g resorsinol 330 mL 3N HCl içerisine konularak bar yardımıyla çözüldü ve saf suyla 1000 mL'e tamamlanarak koyu renkli bir şişede saklandı. Reaksiyonlar; 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30, 50 ve 75 µl enzim özütü kullanılarak, 25 µl glukoz (0,5 mM) varlığında, pH'sı 6,5 olan tampon çözeltide (1 mM CoCl₂, 10 mM MgSO₄, 100 mM MOPS,) 250 µl son hacimde ve 85°C'de 30 dakika boyunca, TS-100C (Biosan) thermo shaker cihazı kullanılarak 1000 rpm'de gerçekleştirildi. Reaksiyon sonrası, reaksiyonun durdurulması için örnekler buz üzerine alındı. Reaksiyon özütü örneklerinden yeni Eppendorf tüplerine 50 µl konuldu üzerlerine 600 µl Seliwanoff ayırıcı eklendi. Bunu takiben örnekler vorteks yapılarak 80°C'de 40 dk boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler buza alınıp soğutulduktan sonra Xmark Microplate Spectrophotometer (BioRad) cihazı kullanılarak 480 nm dalga boyunda ölçümleri yapıldı. Reaksiyonlarda açığa çıkan fruktoz miktarını hesaplayabilmek için önceden hazırlanmış fruktoz standardı kullanıldı. Enzim aktivitesi

reaksiyonlar sonucunda oluşan fruktoz miktarına göre $\mu\text{mol/dakika}$ cinsinden hesaplanarak tanımlandı.

85°C’de optimum şartlarda 1dk’da 1 μmol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarı ünite olarak kabul edildi.

2.5.3. Enzimlerin Optimum Sıcaklıkları

E. coli BL21/ pETG2GI sistemi ile üretilen mutant enzimlerin optimum sıcaklıkları 0,5 mM konsantrasyonlu substrat olan glukoz ve pH’sı 6,5 olan tampon çözeltide (1 mM CoCl_2 , 10 mM MgSO_4 , 100 mM MOPS) gerçekleştirildi. Enzimin en yüksek sıcaklık optimumunu belirlemek için 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ve 100°C’de 5°C’lik sıcaklık artışlarıyla 30 dakikalık bir seri reaksiyon gerçekleştirildi. Reaksiyonların glukoz izomeraz aktivite deneyleri Seliwanoff yöntemiyle ölçülerek Sıcaklık- Aktivite (%) grafiği çizildi ve mutantların optimum sıcaklık değeri belirlendi.

2.5.4. Enzimlerin Optimum pH’sı

Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği optimum pH değerini belirlemek amacıyla farklı pH aralıklarındaki tamponları;

- 100 mM Sodyum asetat tamponu pH (5- 5,5),
- 100 mM MOPS tamponu pH (6- 6,5- 7,0- 7,5),
- 100 mM Tris-HCl tamponu pH (8- 8,5- 9,0),
- 100 mM Glisin tamponu pH (9,5- 10) değerlerinde hazırlandı.

Glukoz izomeraz aktivitesine pH’nın etkisi için hazırlanan tamponlar, bütün pH aralıkları için 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30, 50, 75 μl alınarak 0,5 mM konsantrasyonlu glukoz ile son hacmi tampon çözeltiyle 250 μl ’ ye tamamlanarak reaksiyon hazırlandı. Reaksiyon 85°C’de 30 dk süren şartlarda gerçekleştirildi ve aktivite tayinleri yapıldı. Seliwanoff yöntemiyle ölçülerek elde edilen veriler kullanılarak pH- Aktivite (%) grafiği çizildi ve enzimlerin optimum pH değeri belirlendi.

2.6. Enzimlerin Kinetik Parametreleri

Mutant enzimlerin K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenebilmesi için enzim miktarı sabit tutularak aktivite tayinleri yapıldı. Bunun için 0-1000 mM aralığındaki glukoz konsantrasyonları, pH'sı 6,5 olarak hazırlanan tampon çözelti (1 mM CoCl_2 , 10 mM MgSO_4 , 100 mM MOPS,) ile tamamlanarak 85°C'de aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Glukoz izomeraz aktivitesi için açığa çıkan fruktoz miktarı $\mu\text{mol/dk}$ cinsinden hesaplanarak belirlendi. Ölçümler sırasında glukozdan kaynaklanan interferans sorunu için aynı glukoz içeren körler kullanılarak sorun ortadan kaldırıldı. Optimum substrat konsantrasyonu, Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerleri, turnover sayısı ve katalitik etkinlik değerleri OriginPro 8.1 isimli analiz programı kullanılarak hesaplandı.

2.7. Mutasyonların Isıl Kararlılığı Üzerine Etkisi

E. coli BL21/ pETG2GI ve yapılan mutasyonların ısı kararlılığını belirlemek için saflaştırılan enzim özütleri 60°C'de inkübe edildi. Belirli zaman aralıklarında örneklerden enzim alınarak, optimum çalışma şartlarında pH'sı 6,5 olan tampon çözeltide 0,5 mM glukoz varlığında 250 μl nihai hacimde ve 85°C'de 30 dk reaksiyon gerçekleştirildi. Sonrasında GI aktivite tayini yapıldı ve enzimin kalan aktivitesi hesaplandı. Aynı şartlar altında 0. günde 60°C'de inkübe edilmemiş enzimlerin aktivitesi %100 kabul edilerek İnkübasyon Zamanı-Kalan aktivite (%) grafiği çizildi.

2.8. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

SDS-PAGE ile proteinlerin ağırlığı ve saflığının kontrolü belirlenmeye çalışıldı. SDS poliakrilamid jel elektroforezi %12'lik ayırma jeli ve %5'lik yükleme jeli olarak iki kısımlı olarak gerçekleştirildi. SDS-PAGE'te poliakrilamid jel hazırlanmasında kullanılan çözeltiler bileşenleri Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. SDS- poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler ve bileşenleri

Bileşenler	Ayırma jeli (5 mL %12'lik)	Yükleme jeli (2mL)
H ₂ O	1600 µl	1400 µl
%30 Akrilamid	2000 µl	330 µl
1.5 M Tris -HCl, pH 8.8	1800 µl	-
1 M Tris -HCl, pH 6.8	-	250µl
%10'luk SDS	50µl	20µl
%10 Amonyum persülfat	50 µl	20 µl
TEMED	2 µl	2 µl

SDS-PAGE yöntemi için jel kaseti hazırlandıktan sonra, ayırma jeli için %30'luk akrilamid kullanılmıştır. Cam plakların arasına önce ayırma jeli dökülerek, üzerine jelin yüzeyini düzgünleştirmek için distile su eklendi. Karışımın polimerize olması için 30 dk beklendi. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra, distile su uzaklaştırılarak alt jelin üzerine ayırma (yoğunlaştırma) jeli dökülerek, kuyucukların oluşması için tarak takılmıştır (Bio-Rad miniprotean). Üst jelin de polimerizasyonu gerçekleştirildikten sonra tarak çıkarılarak, plaklar elektroforez tankı içine yerleştirildi. İç ve dış hazneye gerekli hacimde tampon doldurulduktan sonra örnekler yükleme jelindeki kuyucuklara yüklenmiştir.

SDS yürütme tamponu için, 7,2 gr glisin 1,5 gr Tris Base, 500ml saf su, 5 ml %10 oranında SDS kullanıldı. Örnekler yüklenmeden önce yürütme boyasıyla karıştırıldı. Yürütme boyası 400 µl %10'luk SDS, 150 µl TrisHCl, 250 µl gliserol, 60 µl β-merkaptetanol, 140 µl bromofenol blue kullanılarak hazırlandı. Protein içeren örneklerden 25 µl, yürütme boyasından 15 µl alınıp bir mikrosantrifüj tüpünde hafifçe karıştırıldıktan sonra 95 °C'de 5 dk ısıtıcı blokta bekletildi. Ardından örneklerden 20 µl alınarak jeldeki ceplere yükleme yapıldı. Daha sonra sistem güç kaynağına bağlanarak 50 Ma, 100 W'da 110V sabit voltaja ayarlanıp 1,5 saat yürütüldü. Elektrik akımı kesildikten sonra kapak çıkartılarak elektrot bağları kesilir. Jel kasetlerini tutan kollar dikkatlice çıkarıldı ve boyama aşamasına geçildi. Protein bantlarını belirleyebilmek amacıyla jel, Coomassie Brilliant Blue G-250 boyama çözeltisi içinde 1 saat bekletildi. Boyanın jelden uzaklaşması için yıkama solüsyonu I'den (100 ml asetik asit, 50 ml

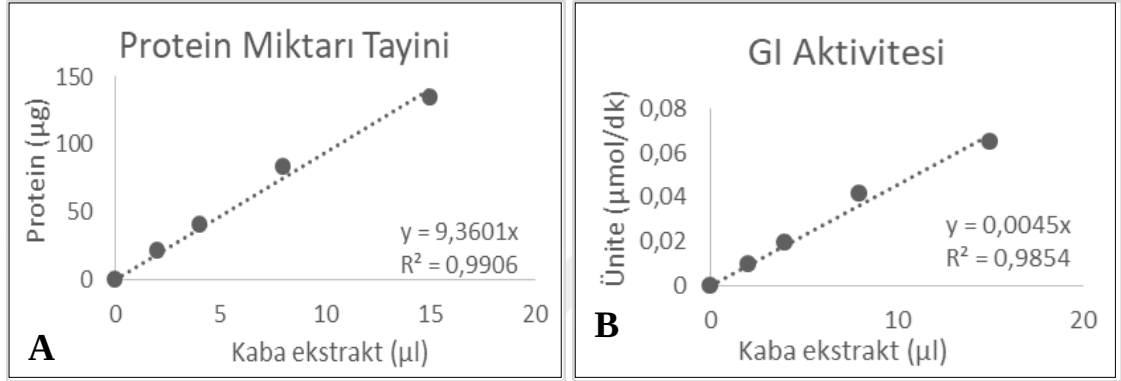
metanol, 40 ml distile su) dökölüp 1 saat karanlık bir ortamda bekletildi. Süre sonunda jelin tekrar yıkanması için solüsyonu 2 (10 ml asetik asit, 8 ml metanol, 82 ml distile su) ile muamele edilerek 16-20 saat karanlık ortamda bekletildi.



3. BULGULAR

3.1. AgoGI (Rekombinant Olarak Üretilen Yaban Tip Enzim) Saflaştırması ve Karakterizasyonu

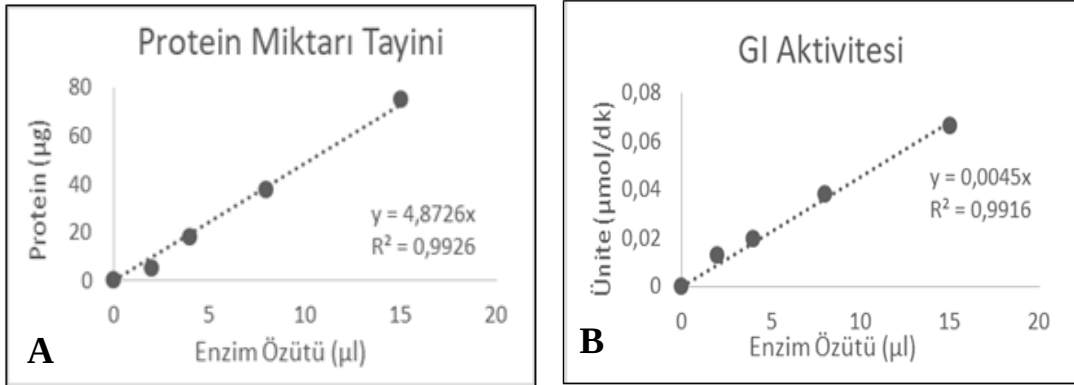
3.1.1. Kaba Ekstrakt



Şekil 6. AgoGI'nın kaba ekstraktında protein ve GI aktivitesi tayini (A: Protein Miktarı Tayini, B: GI Aktivitesi)

Yabanıl olarak üretilen enzim olan AgoGI'nın kaba ekstraktının protein miktarı 20 kat sulandırılarak 9,3601 µg/µl olarak hesaplandı (Şekil 6). Burada enzim tarafından üretilen fruktoz miktarı çok fazla olduğundan dolayı çok fazla renk meydana gelmekte ve spektrofotometrenin okuma aralığını geçmektedir. 20 kat seyreltilen enzimle reaksiyonlar gerçekleştirilip elde edilen değerlerin 20 ile çarpılması ile enzimin 1 µl'sinin ürettiği fruktoz miktarı hesaplanabilir. Kaba ekstraktın GI Aktivitesi $0,0045 \times 20 = 0,09$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı. Enzim 20 kat sulandırıldığında bile 30 ve 50 µl enzimle yapılan aktivite sonrası ölçümler "out of range" hatası vermektedir.

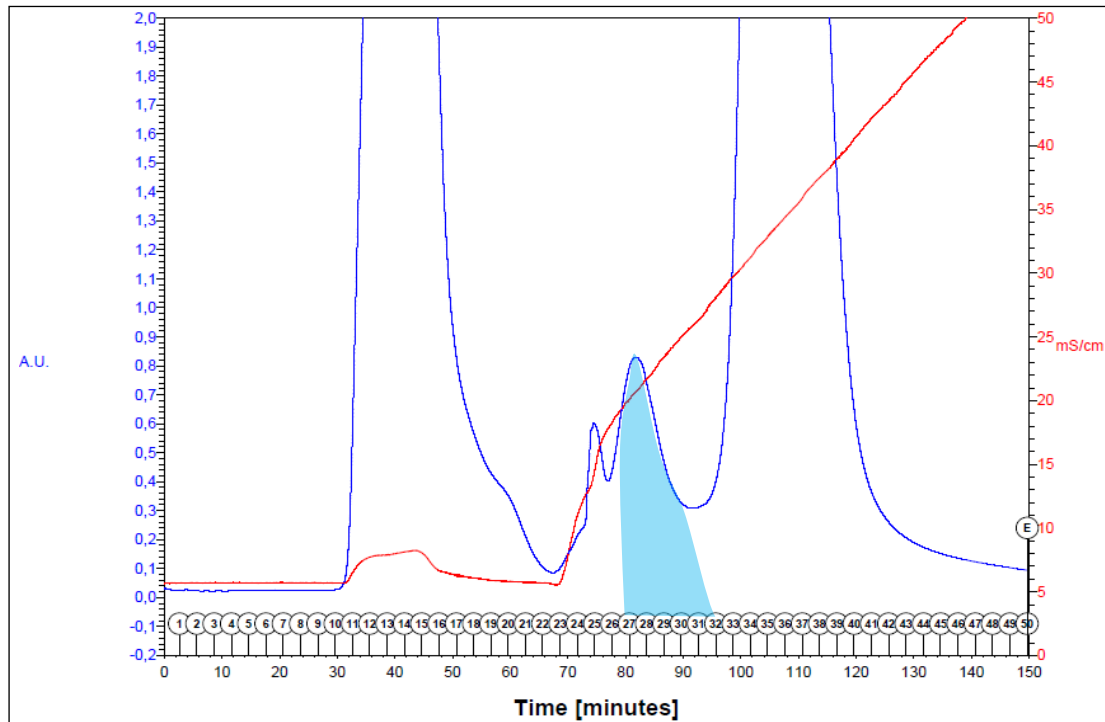
3.1.2. Isı Dejenerasyonu Uygulaması



Şekil 7. AgoGI'nın ısı dejenerasyonu sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini (A: Protein Miktarı Tayini, B: GI Aktivitesi)

Isı dejenerasyonu uygulaması sonrası AgoGI'ya ait enzim özütündeki protein miktarı 4,8726 µg/µl olarak hesaplandı. 20 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite sonucu ise $0,0045 \times 20 = 0,09$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı (Şekil 7).

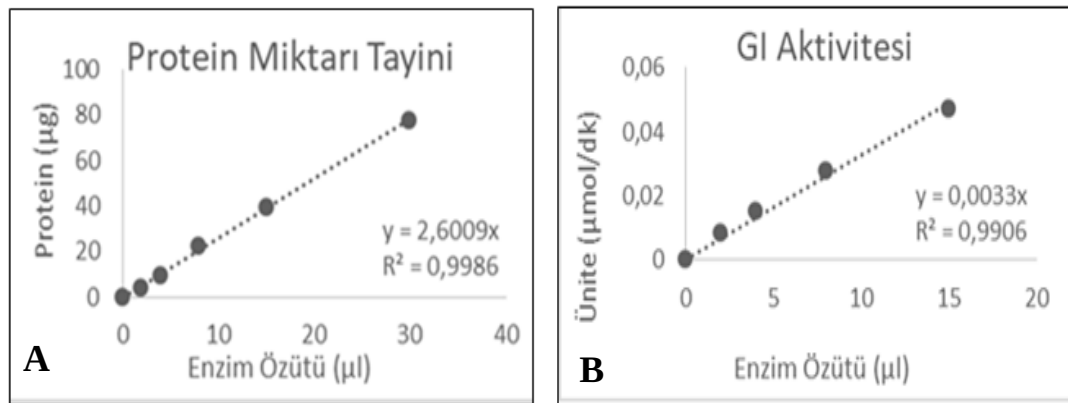
3.1.3. İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması



Şekil 8. AgoGI'ya ait iyon değişim kolon kromatografisi uygulaması grafiği

DEAE-Sepharose kullanılarak BioLogic LP cihazında gerçekleştirilen iyon değişim kolon kromatografisi grafiği Şekil 9'da verilmiştir. Grafikte mavi renkte görülen çizgi kolondan çıkan protein miktarını (295 nm'de absorbans değerleri) göstermektedir. Yuvarlak içerisinde görülen sayılar her birinin içerisinde 3 ml kolondan çıkan çözelti bulunan tüp numaralarını göstermektedir. Kırmızı renkte görülen çizgi ise NaCl konsantrasyonunu göstermektedir. Mavi renk takip edilecek olursa 10-22 tüpler arasında yüksek miktarlarda protein kolondan çıkmıştır. Burada kolondan çıkan proteinler kolona tutunmayan proteinlerdir. Kırmızı renkli çizginin yani NaCl konsantrasyonunun artmaya başladığı 23 tüpten itibaren artan iyonik güçle birlikte çeşitli proteinlerin farklı tüplere ayrıldığı gözükmemektedir. Tüm tüplerde GI aktivitesi tarandı ve 27-32. tüpler arasında GI aktivitesi tespit edildi. Hem 10-22 tüpler arasında hem de GI enziminin kolondan ayrıldıktan sonra 32 ve 42. tüpler arasında gelen yüksek miktarda protein gözlenen fraksiyonlarda GI aktivitesi bulunmamaktadır. Cihazın 295 nm'de maksimum ölçüm aralığı 2.0 absorbans olduğundan bazı piklerin tepe noktaları grafikte görülememektedir. GI aktivitesi görülen pikin anlaşılır olabilmesi için pik üzerine Word programı ile mavi tabaka koyularak belirginleştirilmiştir.

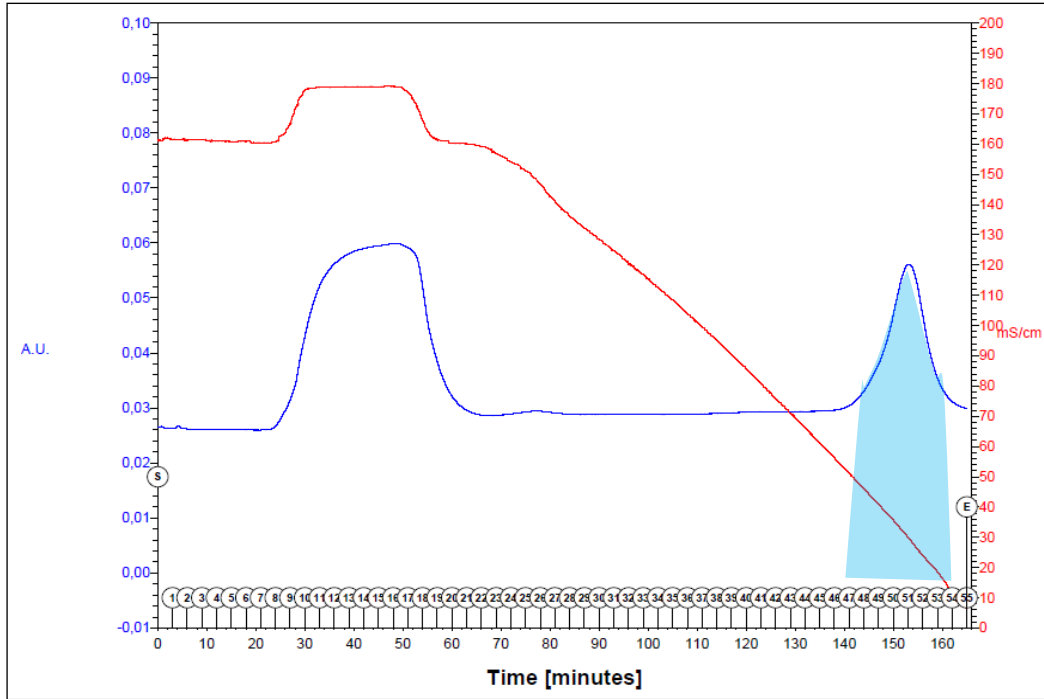
İyon değişim kolon kromatografisi uygulaması ardından enzim özütünün protein miktarı 2,6009 µg/µl olarak hesaplandı. 20 kat sulandırılarak gerçekleştirilen GI aktivite deneyi sonucunda, 1µl enzim özütünde GI Aktivitesi $0,0033 \times 20 = 0,066$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı (Şekil 9).



Şekil 9. AgoGI'ya ait iyon değişim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini (A: Protein Miktarı Tayini, B: GI Aktivitesi)

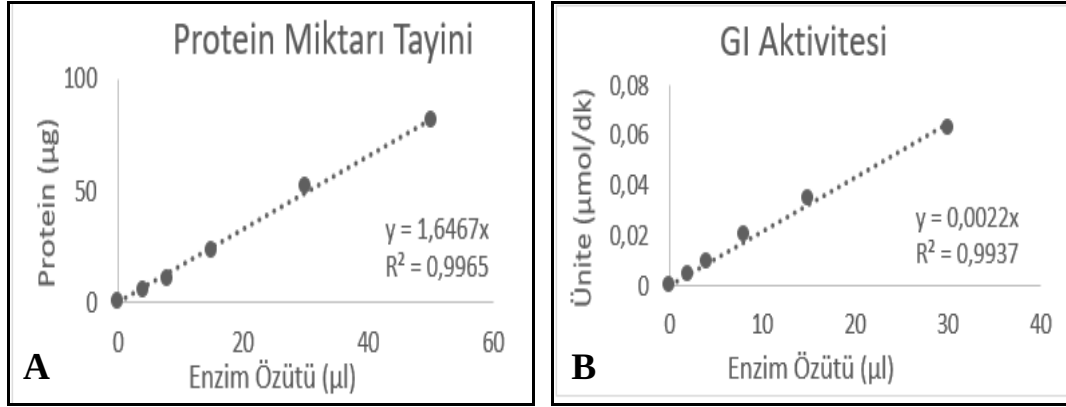
3.1.4. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması

Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (Sigma) kullanılarak BioLogic LP cihazında gerçekleştirilen hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi grafiği Şekil 11’de görülmektedir. Mavi çizgi 295 nm’de absorbans değerini, kırmızı renkli çizgi ise Amonyum sülfat konsantrasyonunu göstermektedir. Görüldüğü üzere 2 noktada kolondan protein çıkışı olmuştur. 8-20. tüpler arasında çıkan protein ya da proteinler kolona tutunamayan proteinlerdir. 48-53. tüpler arasında GI enzimi, düşen Amonyum sülfat konsantrasyonu ile birlikte kolondan ayrılmıştır. Yapılan GI aktivite çalışmaları sonrasında sadece 48-53 nolu tüplerde aktiviteye rastlanmıştır. 48-53 arası tüplerdeki enzim özütleri birleştirilerek total protein ve aktivite çalışmalarına geçilmiştir.



Şekil 10. AgoGI'ya ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulaması grafiği

Hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulaması ardından enzim özütünün protein miktarı 1,6467 µg/µl olarak hesaplandı. 20 kat sulandırılarak gerçekleştirilen GI aktivite deneyi sonucunda, 1 µl enzim özütünde GI aktivitesi $0,0022 \times 20 = 0,044$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı (Şekil 10).



Şekil 11. AgoGI'ya ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini (A: Protein Miktarı Tayini, B: GI Aktivitesi)

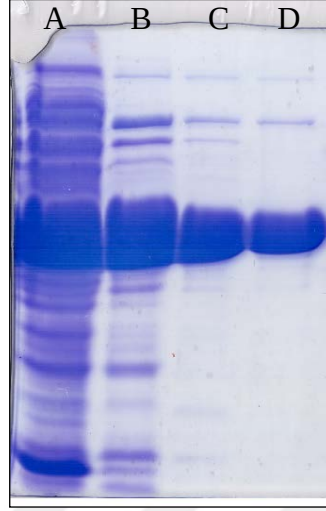
3.1.5. AgoGI'nın Saflaştırma Tablosu

Tablo 8. AgoGI'nın saflaştırma basamaklarına ait saflaştırma tablosu

Saflaştırma Basamakları	T.Hacim (ml)	Protein (mg/ml)	T.Protein (mg)	Aktivite (µmol/dk/µl)	T.Aktivite (µmol/dk)	S.Aktivite (µmol/dk/mg protein)	Verim	Saflaştırma katı
Kaba Ekstrakt	16,3	9,36	152,57	0,090	1467,00	9,615	100,0	1
Isı Şoku	15,1	4,87	73,58	0,090	1359,00	18,471	92,6	1,92
İyon Değişim	16,5	2,60	42,91	0,066	1089,00	25,376	74,2	2,64
Hidrofobik Etkileşim	20	1,65	32,93	0,044	880,00	26,720	60,0	2,78

Tablo 8'deki verilerden de görüleceği üzere tüm saflaştırma uygulamaları başarılı olmuştur. Enzimin özgün aktivitesi saflaştırmanın ardından 9,615'ten 26,720 µmol/dk/mg protein'e yükselirken enzim %60 verim ile 2,78 kat saflaştırıldı. Hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulamasının ardından bir araya getirilerek birleştirilen fraksiyonlar karakterizasyon çalışmalarında saf enzim özütü olarak kullanıldı.

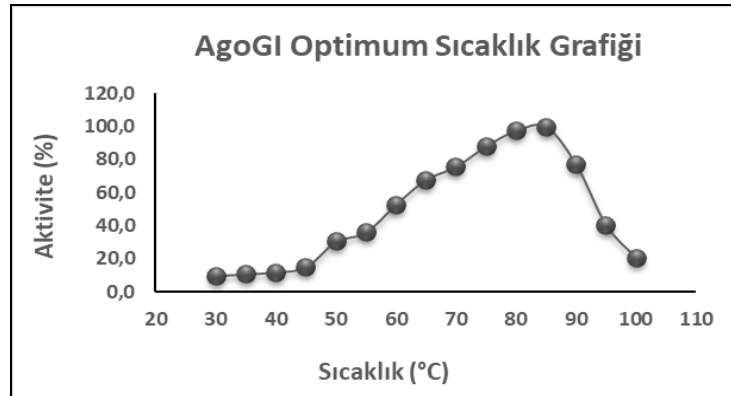
3.1.6. AgoGI'nın Saflaştırılmasına Ait SDS-PAGE Analizi



Şekil 12. AgoGI'nın saflaştırılmasına ait SDS-PAGE analizi

AgoGI'nın saflaştırılması sonrası, saflaştırma pratiklerinin ardından SDS-PAGE metodu için elde edilen özütlerinden 20 µl kadar alınarak jele yüklenerek yürütme işlemi gerçekleştirildi. Şekilde 12'de de GI'nın büyük oranda saflaştırıldığı görülmektedir (A: Kaba ekstrakt, B: Işı Şoku uygulaması sonrası enzim özütü, C: İyon değişim kolon kromatografisi sonrası enzim özütü, D: Hidrofobik kolon kromatografisi sonrası enzim özütü).

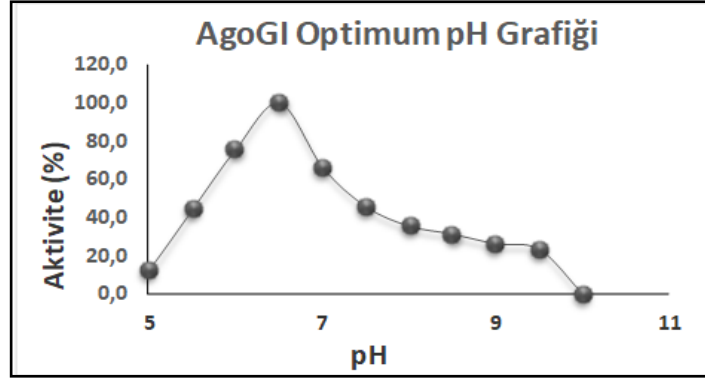
3.1.7. Optimum Sıcaklık



Şekil 13. AgoGI'nın Optimum Sıcaklık Grafiği

AgoGI'nın en iyi çalıştığı sıcaklık değeri, Şekil 13'te de görüleceği üzere 85°C olarak bulunmuştur.

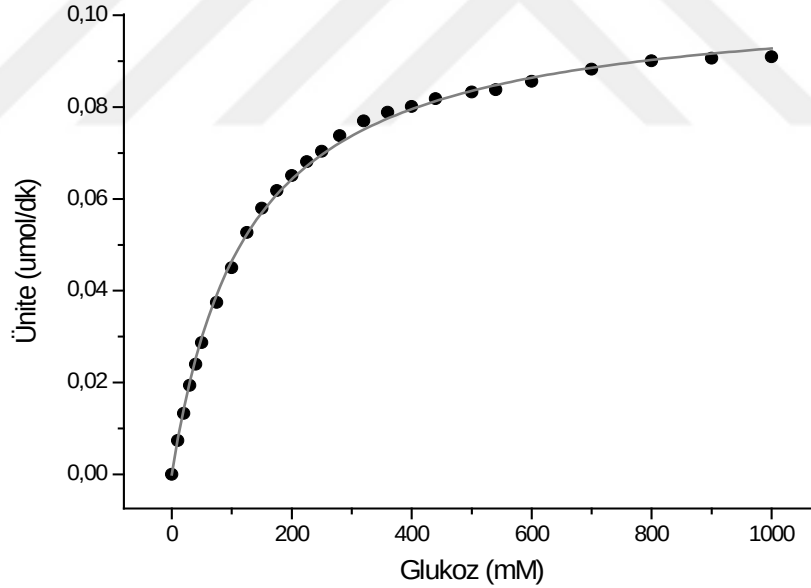
3.1.8. Optimum pH



Şekil 14. AgoGI'nin Optimum pH Grafiği

AgoGI'nin en iyi çalıştığı pH, grafikten de görüleceği üzere 6,5'tir (Şekil 14).

3.1.9. Kinetik Çalışmalar

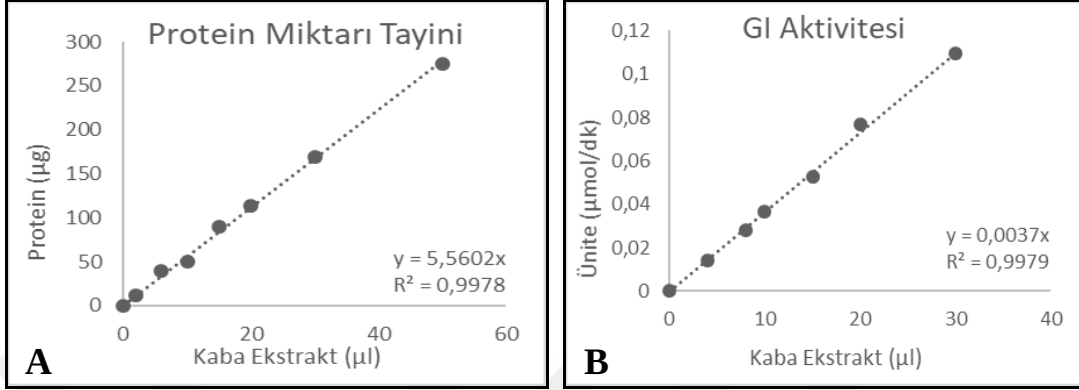


Şekil 15. AgoGI'ya ait Michaelis-Menten eğrisi

Gerçekleştirilen reaksiyonlarda 1,5 µl saf enzim özütü (2,475 µg protein) varlığında analizleri yapıldı. OriginPro 8.1 analiz programı kullanılarak çizilen Michaelis-Menten eğrisine göre; enzimin K_m değeri $124,45 \pm 2,99$ mM, V_{max} değeri ise $39,6 \pm 0,79$ µmol/dk/mg protein olarak hesaplandı (r^2 : 0,99821). Bu veriler kullanılarak k_{cat} değeri 33,03 1/sn olarak hesaplandı. Katalitik etkinlik değerini belirten k_{cat}/K_m 'nin de hesaplanmasıyla 0,266 değerine ulaşıldı (Şekil 15).

3.2. K111R Mutant Enziminin Saflaştırması ve Karakterizasyonu

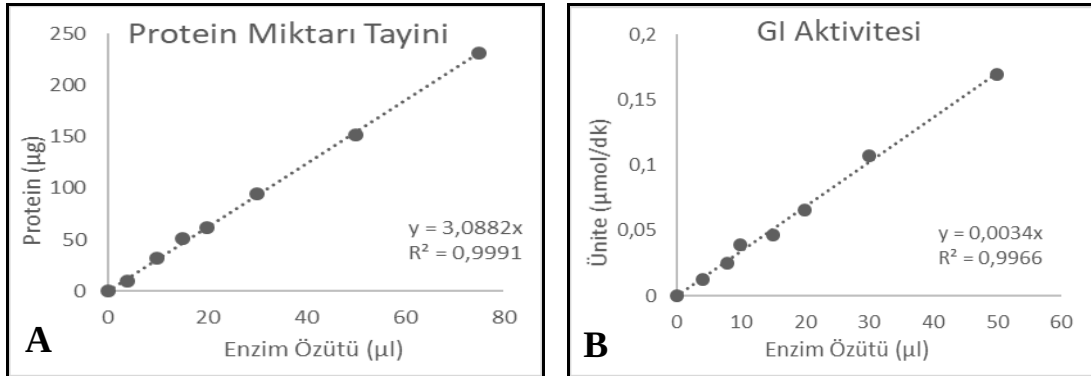
3.2.1. Kaba Ekstrakt



Şekil 16. K111R'nin kaba ekstraktında protein ve GI aktivitesi tayini (A: Protein Miktarı Tayini, B: GI Aktivitesi)

Mutant enzimlerden K111R'nin kaba ekstraktının protein miktarı 5,5602 µg/µl olarak bulundu. GI aktivite deneyi 10 kat sulandırılarak yapıldı ve deney sonucunda GI aktivitesi 1 µl enzim özütünde 0,0037 x 10 = 0,037 µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı (Şekil 16).

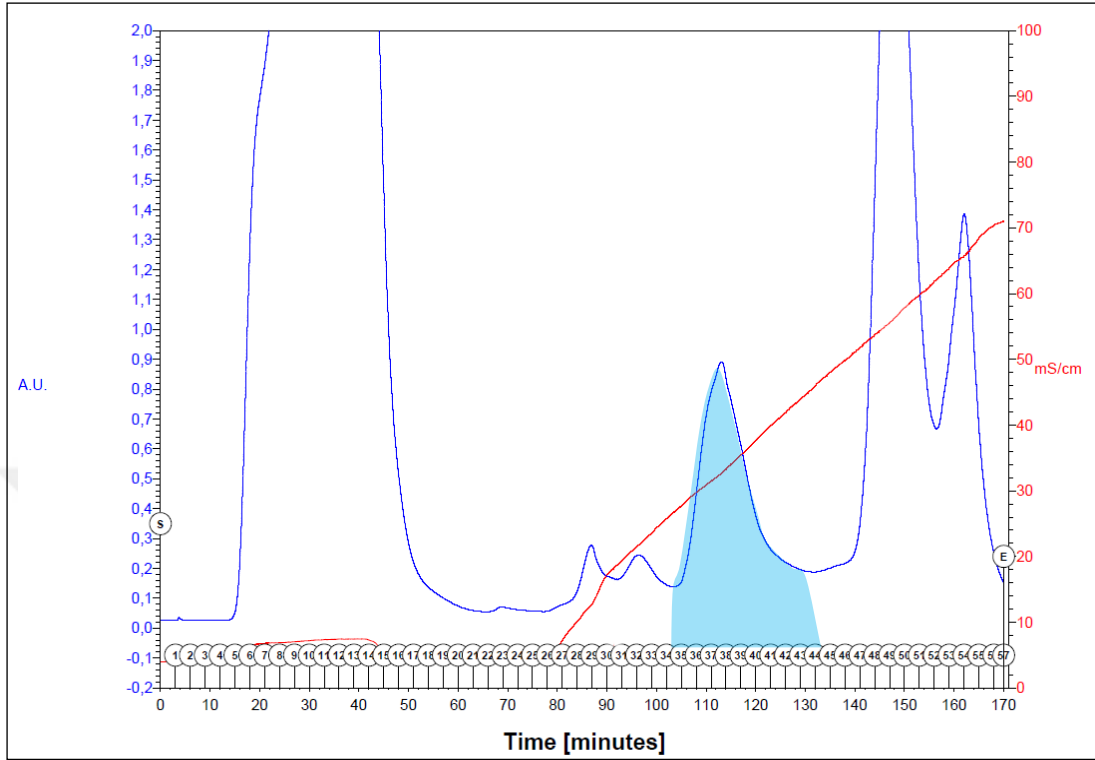
3.2.2. Isı Dejenerasyonu Uygulaması



Şekil 17. K111R'nin ısı şoku sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini (A: Protein Miktarı Tayini, B: GI Aktivitesi)

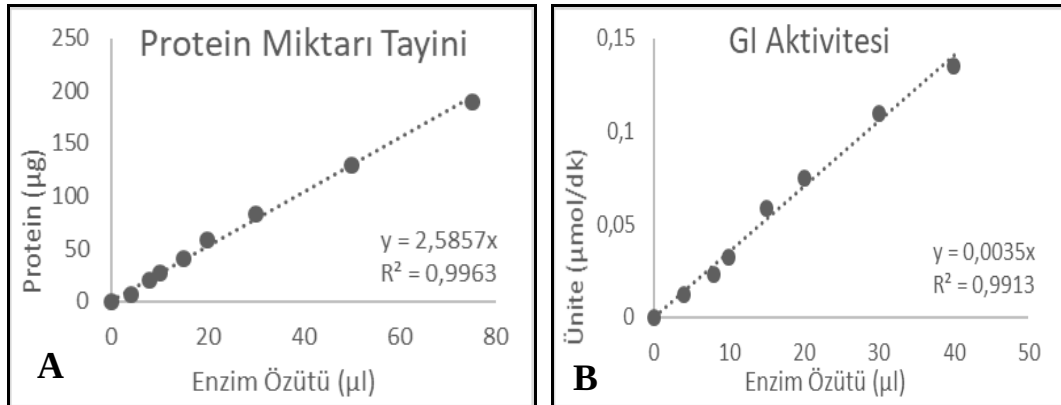
Mutant enzimlerden K111R'ye ait kaba ekstraktın ısı dejenerasyonuna maruz bırakılması sonrası özütteki protein miktarı 3,0882 µg/µl olarak bulundu. GI aktivite deneyi 20 kat sulandırılarak yapıldı ve deney sonucunda GI aktivitesi, 1 µl enzim özütünde 0,0034 x 20 = 0,068 µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı (Şekil 17).

3.2.3. İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması



Şekil 18. K111R'ye ait iyon değişim kolon kromatografisi uygulaması grafiği

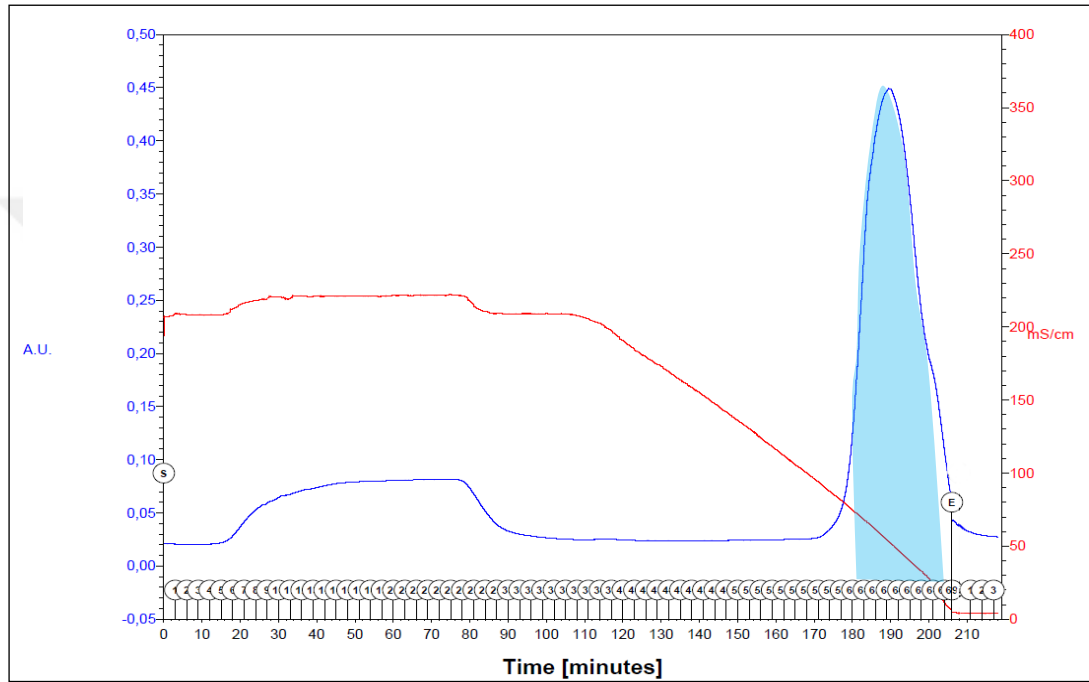
Mutant K111R enziminin iyon değişim kolon kromatografisi uygulamasıyla yukarıdaki grafiği elde edilmiştir. Her tüpte GI aktivitesi arandı ve yapılan protein deneyleri sonucunda 35-43 nolu fraksiyonlarda GI aktivitesi saptandı (Şekil 18).



Şekil 19. K111R'ye ait iyon değişim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini (A: Protein Miktarı Tayini, B: GI Aktivitesi)

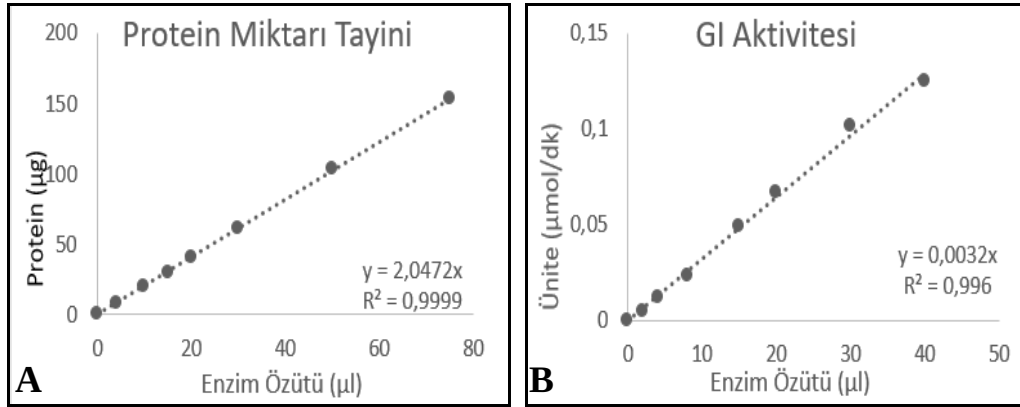
Mutant enzimlerden K111R'nin iyon değişimi kolon kromatografisi uygulaması ardından enzim özütündeki protein miktarı 2,5857 µg/µl olarak bulundu. GI aktivite deneyi 10 kat sulandırılarak yapıldı ve deney sonucunda GI Aktivitesi 1 µl enzim özütünde $0,0035 \times 10 = 0,035$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı (Şekil 19).

3.2.4. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması



Şekil 20. K111R'ye ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulaması grafiği

Mutant K111R enziminin hidrofobik kolon kromatografi uygulamasıyla grafiği elde edilmiştir. Her tüpte GI aktivitesi arandı ve yapılan protein deneyleri sonucunda 61-68 nolu fraksiyonlarda GI aktivitesi saptandı (Şekil 20).



Şekil 21. K111R'ye ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini (A: Protein Miktarı Tayini, B: GI Aktivitesi)

Mutant enzimlerden K111R'nin hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulaması ardından enzim özütündeki protein miktarı 2,0472 µg/µl olarak bulundu. GI aktivite deneyi 10 kat sulandırılarak yapıldı ve deney sonucunda GI Aktivitesi, 1 µl enzim özütünde 0,0032 x 10 = 0,032 µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı (Şekil 21).

3.2.5. K111R'nin Saflaştırma Tablosu

Tablo 9. K111R'nin saflaştırma basamaklarına ait saflaştırma tablosu

Saflaştırma Basamakları	T.Hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Γ.Protein (mg)	Aktivite (µmol/dk/µl)	T.Aktivite (µmol/dk)	S.Aktivite (µmol/dk/mg protein)	Verim	Saflaştırma katı
Kaba Ekstrakt	35	5,56	194,61	0,037	1295,0	6,654	100,0	1
Isı Şoku	32	3,09	98,82	0,034	1088,0	11,010	84,0	1,65
İyon değişim	27,2	2,59	70,33	0,035	952,0	13,536	73,5	2,03
Hidrofobik Etkileşim	27	2,05	55,27	0,032	864,0	15,631	66,7	2,35

Tablo 9'daki verilerden de görüleceği üzere tüm saflaştırma uygulamaları başarılı olmuştur. Enzimin özgün aktivitesi, saflaştırmanın ardından 6,654'ten 15,631 µmol/dk/mg protein'e yükselirken enzim %66,7 verim ile 2,35 kat saflaştırıldı.

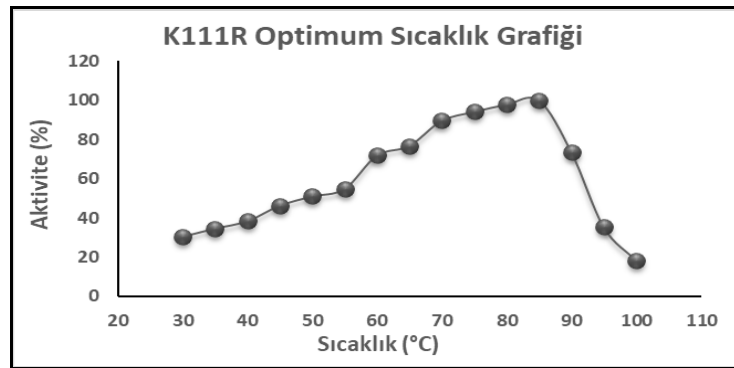
3.2.6. K111R Mutant Enziminin Saflaştırılmasına Ait SDS-PAGE Analizi



Şekil 22. K111R'nin saflaştırılmasına ait SDS-PAGE analizi

Mutant enzimlerden K111R'nin saflaştırma pratiklerinin ardından SDS-PAGE metodu için elde edilen özütlerinden 20 µl kadar alınarak jele yüklenerek yürütme işlemi gerçekleştirildi. Şekil 22'te de GI'nın büyük oranda saflaştırıldığı görülmektedir (A: Kaba ekstrakt, B: Işı Şoku uygulaması sonrası enzim özütü, C: İyon değişim kolon kromatografisi sonrası enzim özütü, D: Hidrofobik kolon kromatografisi sonrası enzim özütü).

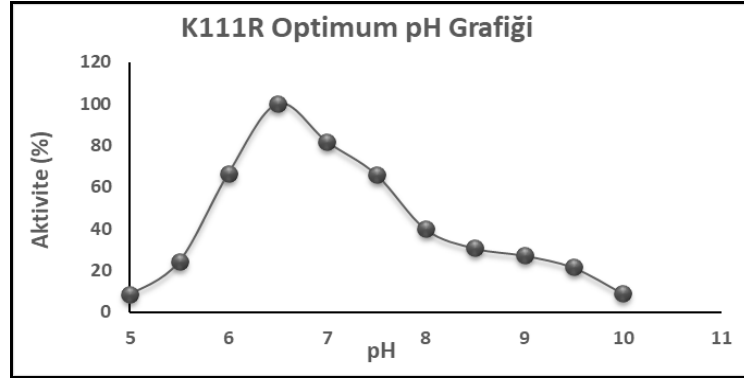
3.2.7. Optimum Sıcaklık



Şekil 23. K111R'nin Optimum Sıcaklık Grafiği

K111R mutant enziminin en iyi çalıştığı sıcaklık, grafikten de görüleceği üzere 85°C'dir (Şekil 23).

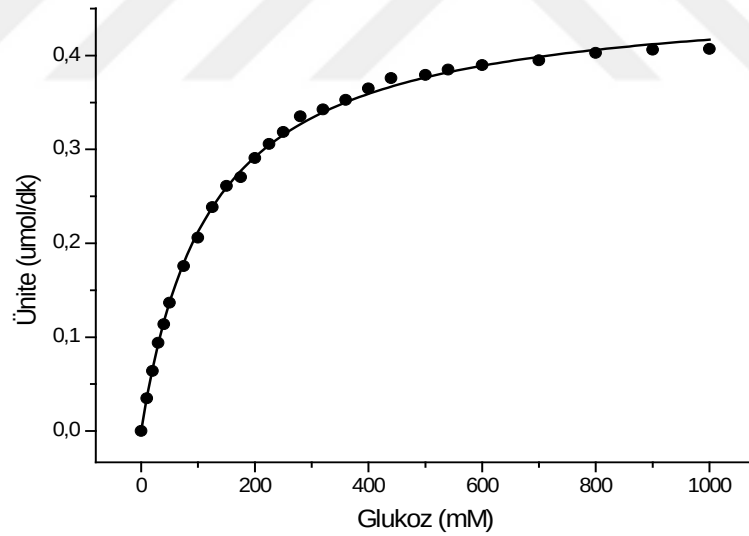
3.2.8. Optimum pH



Şekil 24. K111R'nin Optimum pH Grafiği

K111R mutant enziminin en iyi çalıştığı pH, grafikten de görüleceği üzere 6,5'dir. (Şekil 24).

3.2.9. Kinetik Çalışmalar

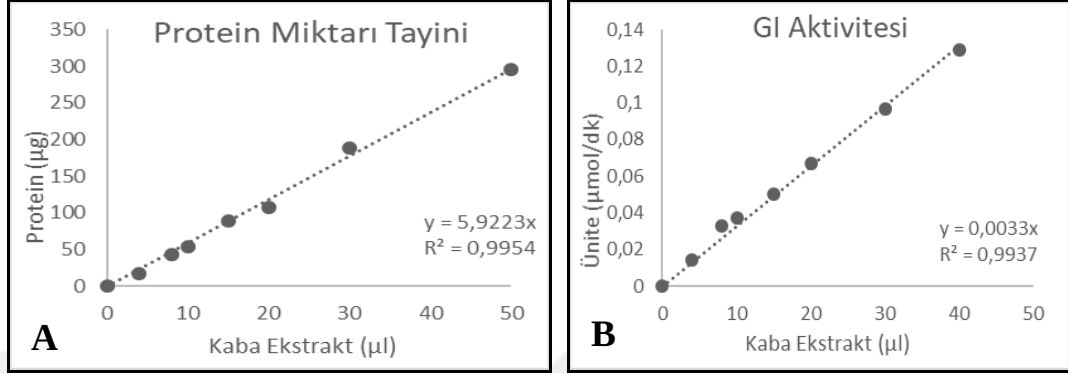


Şekil 25. K111R mutant enzime ait Michaelis-Menten eğrisi

Gerçekleştirilen reaksiyonlarda 5 µl saf enzim özütü (10,236 µg protein) varlığında analizleri yapıldı. Yapılan analizler neticesinde enzimin K_m değeri $120,08 \pm 2,66$ mM, V_{max} değeri ise $45,63 \pm 0,29$ µmol/dk/mg protein olarak hesaplandı (r^2 : 0,99843). Bu veriler kullanılarak k_{cat} değeri 38,06 1/sn olarak hesaplandı. Katalitik etkinlik değerini belirten k_{cat}/K_m 'nin de hesaplanmasıyla 0,317 değerine ulaşıldı (Şekil 25).

3.3. L313I Mutant Enziminin Saflaştırması ve Karakterizasyonu

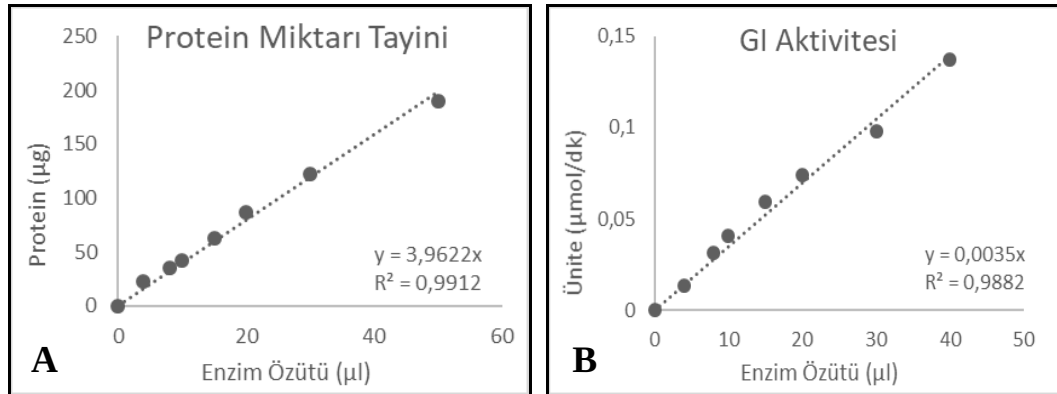
3.3.1. Kaba Ekstrakt



Şekil 26. L313I'nın kaba ekstraktında protein ve GI aktivitesi tayini (A: Protein Miktarı Tayini, B: GI Aktivitesi)

Mutant enzimlerden L313I'nın kaba ekstraktının protein miktarı 5,9223 µg/µl olarak bulundu. GI aktivite deneyi 10 kat sulandırılarak yapıldı ve deney sonucunda GI aktivitesi 1 µl enzim özütünde 0,0033 x 10 = 0,033 µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı (Şekil 26).

3.3.2. Isı Dejenerasyonu Uygulaması

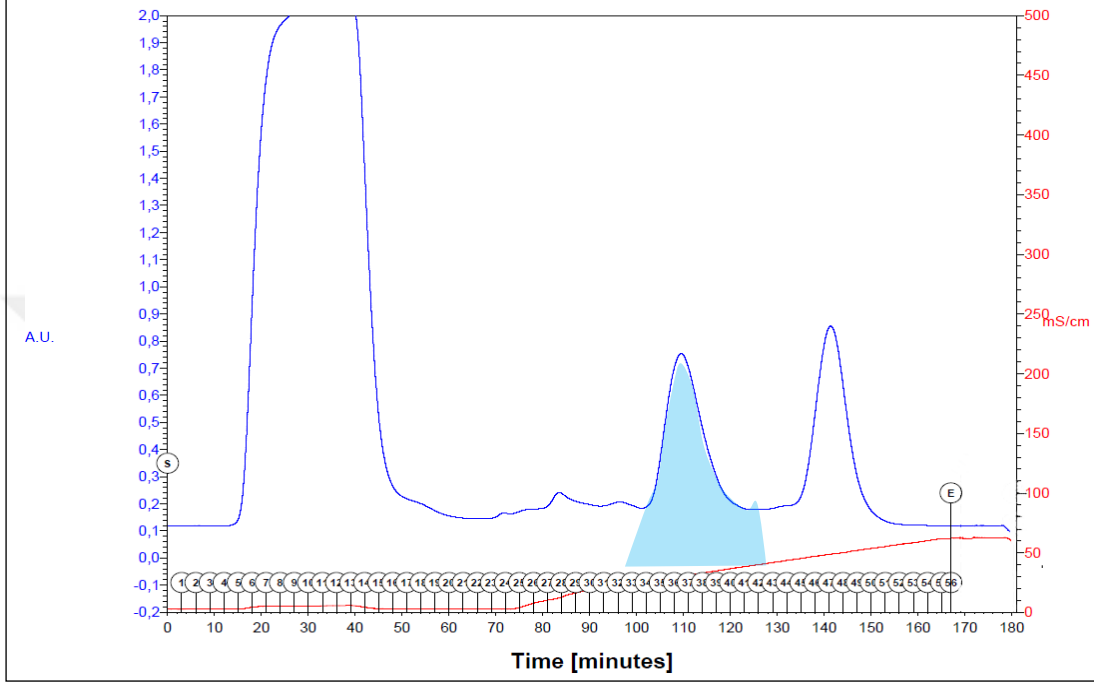


Şekil 27. L313I'nın ısı şoku sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini (A: Protein Miktarı Tayini, B: GI Aktivitesi)

Mutant enzimlerden L313I'ya ait kaba ekstraktın ısı dejenerasyonuna maruz bırakılması sonrası özütteki protein miktarı 3,9622 µg/µl olarak bulundu. GI aktivite

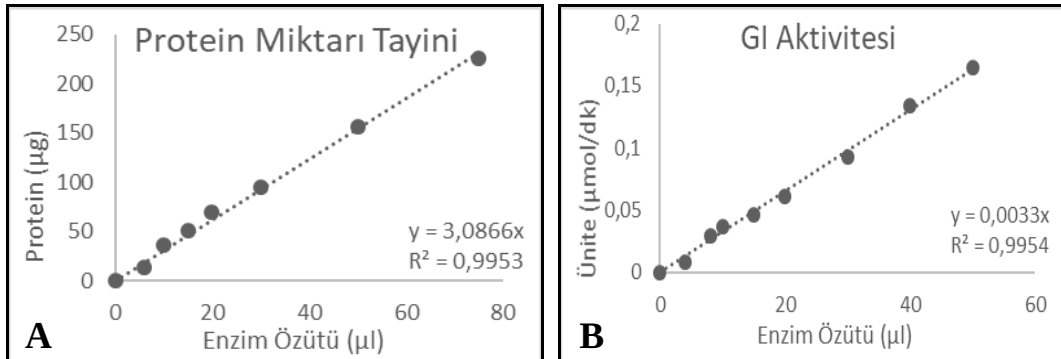
deneyi 10 kat sulandırılarak yapıldı ve deney sonucunda GI aktivitesi, 1 µl enzim özütünde $0,0035 \times 10 = 0,035$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı (Şekil 27).

3.3.3. İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması



Şekil 28. L313I'ya ait iyon değişim kolon kromatografisi uygulaması grafiği

Mutant L313I enziminin iyon değişim kolon kromatografisi uygulamasıyla yukarıdaki grafiği elde edilmiştir. Her tüpte GI aktivitesi arandı ve yapılan protein deneyleri sonucunda 32-41nolu fraksiyonlarda GI aktivitesi saptandı (Şekil 28).



Şekil 29. L313I'ya ait iyon değişim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini (A: Protein Miktarı Tayini, B: GI Aktivitesi)

Mutant enzimlerden L313I'nın hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulaması ardından enzim özütündeki protein miktarı 1,9952 µg/µl olarak bulundu. GI aktivite deneyi 10 kat sulandırılarak yapıldı ve deney sonucunda GI Aktivitesi, 1 µl enzim özütünde $0,0026 \times 10 = 0,026$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı (Şekil 31).

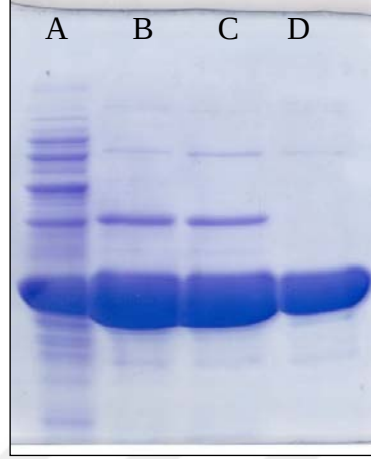
3.3.5. L313I'nın Saflaştırma Tablosu

Tablo 10. L313I'nın saflaştırma basamaklarına ait saflaştırma tablosu

Saflaştırma Basamakları	T.Hacim (ml)	Protein (mg/ml)	T.Protein (mg)	Aktivite (µmol/dk/µl)	T.Aktivite (µmol/dk)	S.Aktivite (µmol/dk/mg protein)	Verim	Saflaştırma katı
Kaba Ekstrakt	42,2	5,92	249,92	0,033	1392,6	5,572	100,0	1
Isı Şoku	35,0	3,96	138,68	0,035	1225,0	8,833	88,0	1,59
İyon değişim	30,2	3,09	93,22	0,033	996,6	10,691	71,6	1,92
Hidrofobik Etkileşim	29,5	2,00	58,86	0,026	767,0	13,031	55,1	2,34

Tablo 10'daki verilerden görüleceği üzere tüm saflaştırma uygulamaları başarılı olmuştur. Enzimin özgün aktivitesi, saflaştırmanın ardından 5,572'den 13,031 µmol/dk/mg protein'e yükselirken enzim %55,1 verim ile 2,34 kat saflaştırıldı. Hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulamasının ardından bir araya getirilerek birleştirilen fraksiyonlar karakterizasyon çalışmalarında saf enzim özütü olarak kullanıldı.

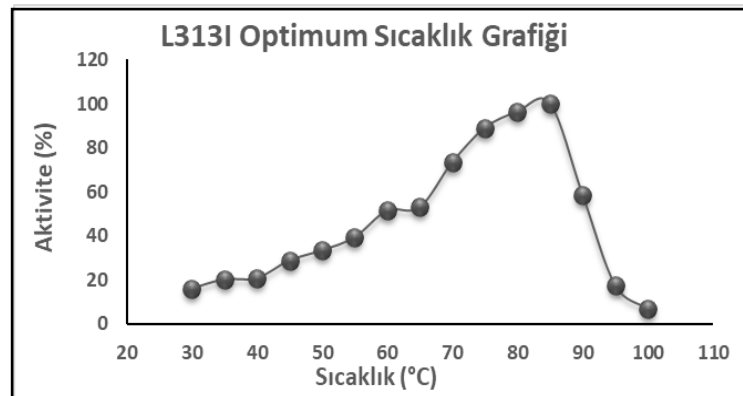
3.3.6. L313I Mutant Enziminin Saflaştırılmasına Ait SDS-PAGE Analizi



Şekil 32. L313I'nın saflaştırılmasına ait SDS-PAGE analizi

Mutant enzimlerden L313I'nın saflaştırma pratiklerinin ardından SDS-PAGE metodu için elde edilen özütlerinden 20 µl kadar alınarak jele yüklenerek yürütme işlemi gerçekleştirildi. Şekilde 32'de de GI'nın büyük oranda saflaştırıldığı görölmektedir (A: Kaba ekstrakt, B: Işı Dejenerasyonu uygulaması sonrası enzim özütü, C: İyon değişim kolon kromatografisi sonrası enzim özütü, D: Hidrofobik kolon kromatografisi sonrası enzim özütü).

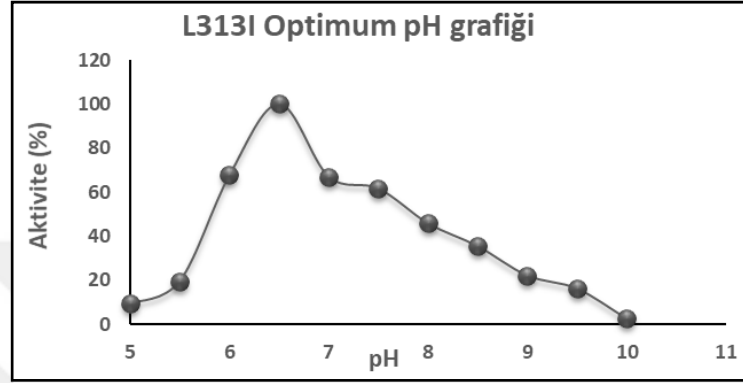
3.3.7. Optimum Sıcaklık



Şekil 33. L313I'nın Optimum Sıcaklık Grafiği

L313I mutant enziminin en iyi çalıştığı sıcaklık, grafikten de görüleceği üzere 85°C'dir (Şekil 33). Yapılan mutasyonun enzimin optimum çalışma sıcaklığında herhangi bir değişikliğe sebebiyet vermediği anlaşılmıştır.

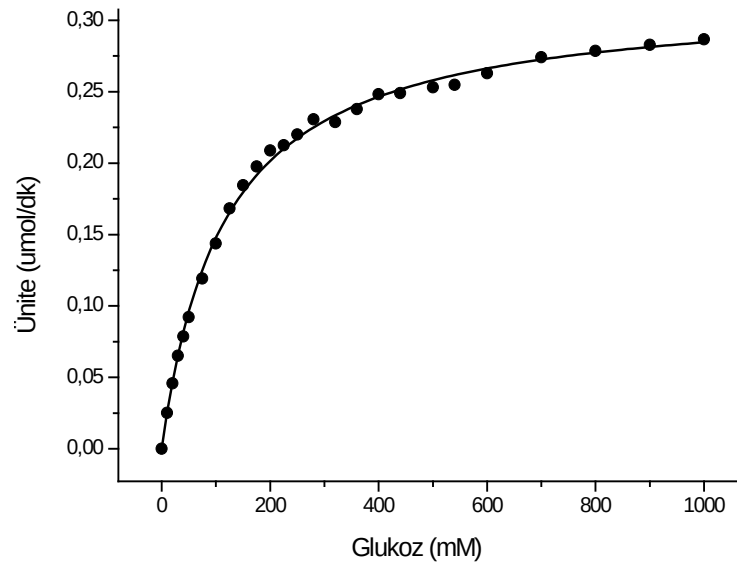
3.3.8. Optimum pH



Şekil 34. L313I'nın Optimum pH Grafiği

L313I mutant enziminin en iyi çalıştığı pH, grafikten de görüleceği üzere 6,5'dir (Şekil 34). Yapılan mutasyonun enzimin optimum pH değerinde herhangi bir değişikliğe sebebiyet vermediği anlaşılmıştır.

3.3.9. Kinetik Çalışmalar

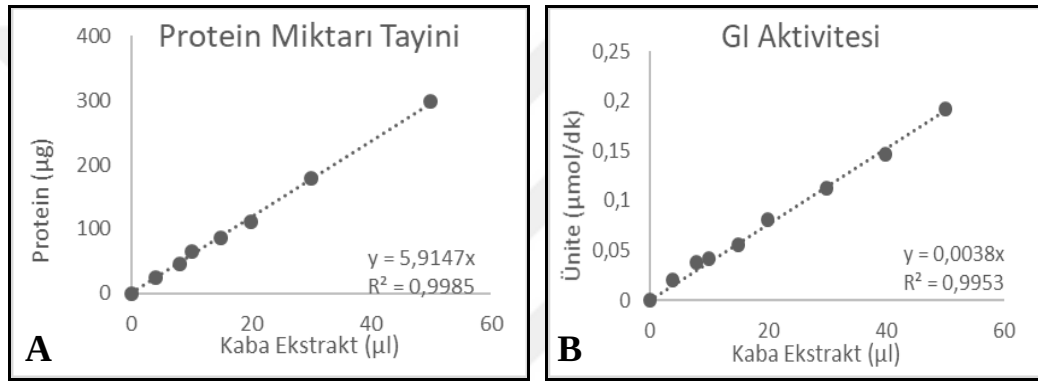


Şekil 35. L313I mutant enzime ait Michaelis-Menten eğrisi

Gerçekleştirilen reaksiyonlarda 5 µl saf enzim özütü (9,976 µg protein) varlığında analizleri yapıldı. Yapılan analizler neticesinde enzimin K_m değeri $114,80 \pm 3,25$ mM, V_{max} değeri ise $31,80 \pm 0,25$ µmol/dk/mg protein olarak hesaplandı (r^2 : 0,9974). Bu veriler kullanılarak k_{cat} değeri 26,53 1/sn olarak hesaplandı. Katalitik etkinlik değerini belirten k_{cat}/K_m 'nin de hesaplanmasıyla 0,230 değerine ulaşıldı (Şekil 35).

3.4.V101R Mutant Enziminin Saflaştırması ve Karakterizasyonu

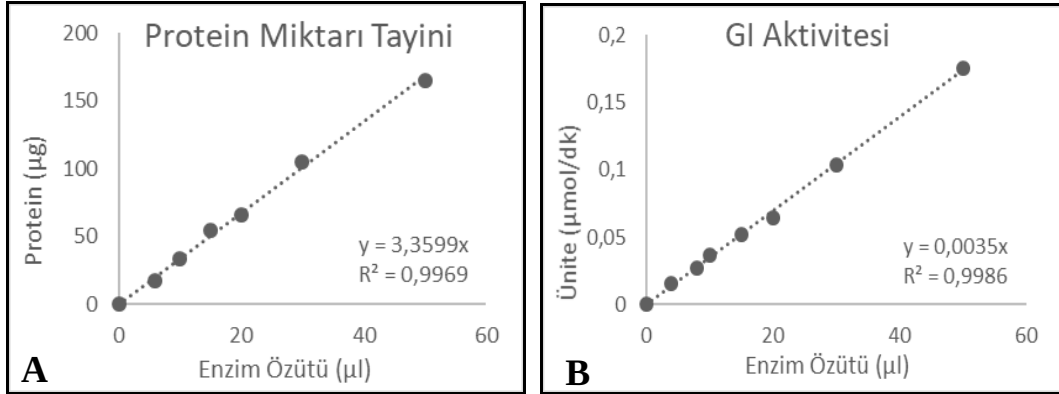
3.4.1. Kaba Ekstrakt



Şekil 36. V101R'nin kaba ekstraktında protein ve GI aktivitesi tayini (A: Protein Miktarı Tayini, B: GI Aktivitesi)

Mutant enzimlerden V101R'nin kaba ekstraktının protein miktarı 5,9147 µg/µl olarak bulundu. GI aktivite deneyi 10 kat sulandırılarak yapıldı ve deney sonucunda GI aktivitesi 1 µl enzim özütünde $0,0038 \times 10 = 0,038$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı (Şekil 36).

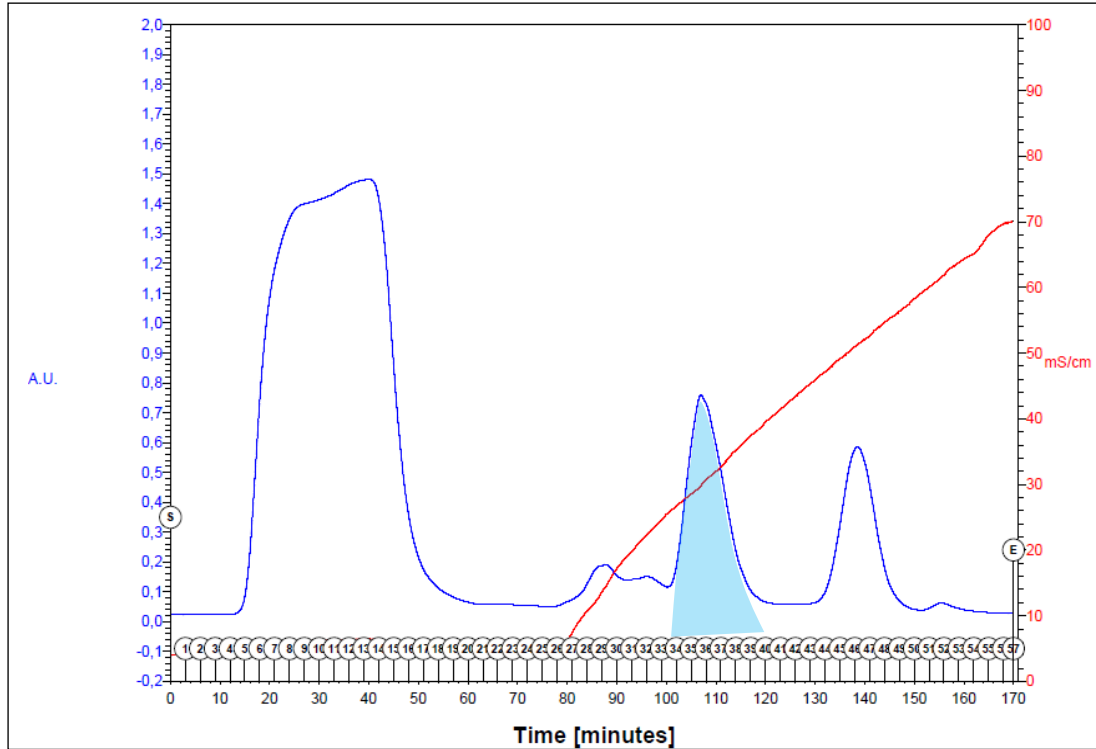
3.4.2. Isı Dejenerasyonu Uygulaması



Şekil 37. V101R'nin ısı şoku sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini (A: Protein Miktarı Tayini, B: GI Aktivitesi)

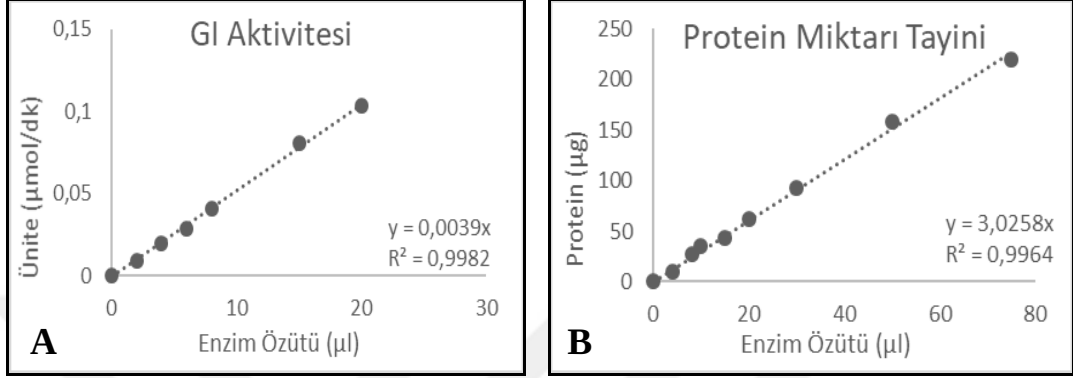
Mutant enzimlerden V101R'ye ait kaba ekstraktın ısı dejenerasyonuna maruz bırakılması sonrası özütteki protein miktarı 3,3599 µg/µl olarak bulundu. GI aktivite deneyi 10 kat sulandırılarak yapıldı ve deney sonucunda GI aktivitesi, 1 µl enzim özütünde 0,0035 x 10 = 0,035 µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı (Şekil 37).

3.4.3. İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması



Şekil 38. V101R'ye ait iyon değişim kolon kromatografisi uygulaması grafiği

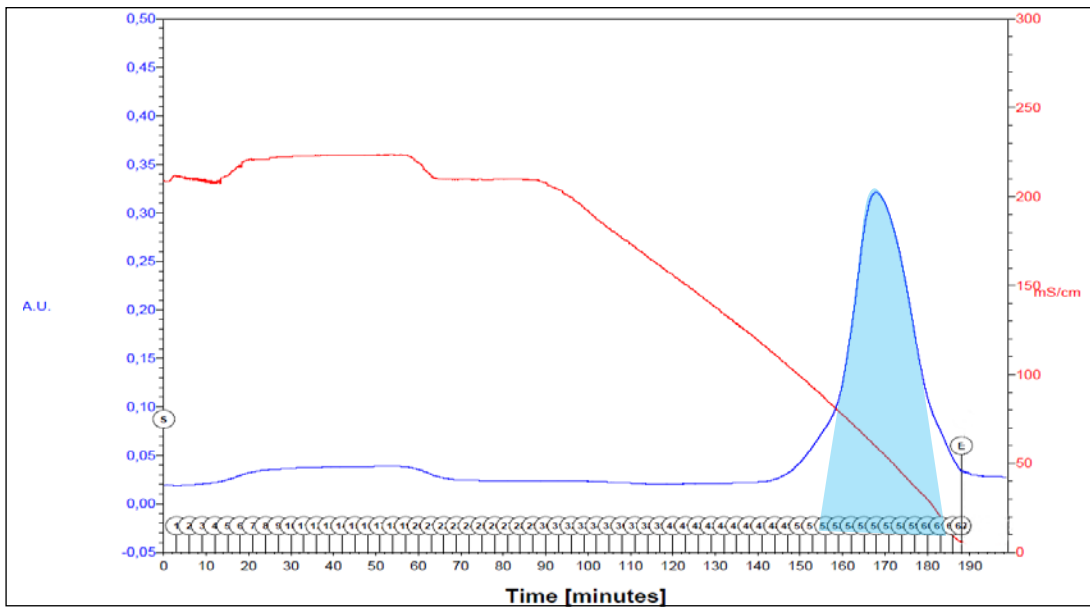
Mutant V101R enziminin iyon değişim kolon kromatografisi uygulamasıyla yukarıdaki grafiği elde edilmiştir. Her tüpte GI aktivitesi arandı ve yapılan protein deneyleri sonucunda 33-40 nolu fraksiyonlarda GI aktivitesi saptandı (şekil 38).



şekil 39. V101R'ye ait iyon değişim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütle protein ve GI aktivitesi tayini (A: Protein Miktarı Tayini, B: GI Aktivitesi)

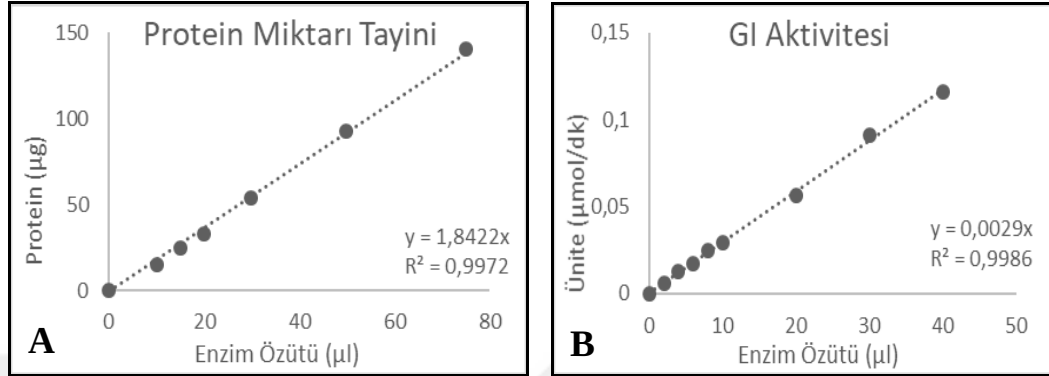
Mutant enzimlerden V101R'nin iyon değişimi kolon kromatografisi uygulaması ardından enzim özüündeki protein miktarı $3,0258 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ olarak bulundu. GI aktivite deneyi 10 kat sulandırılarak yapıldı ve deney sonucunda GI aktivitesi, $1 \mu\text{l}$ enzim özüünde $0,0039 \times 10 = 0,039 \mu\text{mol/dk}$ (Ünite) olarak hesaplandı (şekil 39).

3.4.4. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması



şekil 40. V101R'ye ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulaması grafiği

Mutant V101R enziminin hidrofobik kolon kromatografisi uygulamasıyla grafiği elde edilmiştir. Her tüpte GI aktivitesi arandı ve yapılan protein deneyleri sonucunda 52-61 nolu fraksiyonlarda GI aktivitesi saptandı (Şekil 40).



Şekil 41. V101R'ye ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini (A: Protein Miktarı Tayini, B: GI Aktivitesi)

Mutant enzimlerden V101R'nin hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulaması ardından enzim özütündeki protein miktarı 1,8422 µg/µl olarak bulundu. GI aktivite deneyi 10 kat sulandırılarak yapıldı ve deney sonucunda GI aktivitesi, 1 µl enzim özütünde $0,0029 \times 10 = 0,029$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı (Şekil 41).

3.4.5. V101R'nin Saflaştırma Tablosu

Tablo 11. V101R'nin saflaştırma basamaklarına ait saflaştırma tablosu

Saflaştırma Basamakları	T.Hacim (ml)	Protein (mg/ml)	T.Protein (mg)	Aktivite (µmol/dk/µl)	T.Aktivite (µmol/dk)	S.Aktivite (µmol/dk/mg protein)	Verim	Saflaştırma katı
Kaba Ekstrakt	31,8	5,91	188,09	0,038	1208,4	6,425	100,0	1
Isı Şoku	29	3,36	97,44	0,035	1015,0	10,417	84,0	1,62
İyon değişim	23,8	3,03	72,01	0,039	928,2	12,889	76,8	2,01
Hidrofobik Etkileşim	27,5	1,84	50,66	0,029	797,5	15,742	66,0	2,45

Tablo 11’deki verilerden de görüleceği üzere tüm saflaştırma uygulamaları başarılı olmuştur. Enzimin özgün aktivitesi, saflaştırmanın ardından 6,425’den 15,74 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein’e yükselirken enzim %66,0 verim ile 2,45 kat saflaştırıldı.

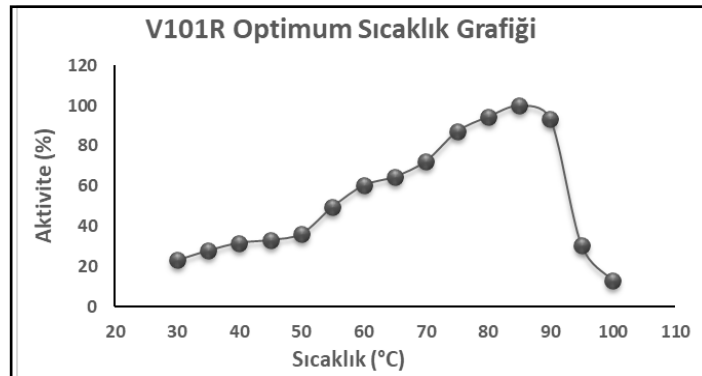
3.4.6. V101R Mutant Enziminin Saflaştırılmasına Ait SDS-PAGE Analizi



Şekil 42. V101R’nin saflaştırılmasına ait SDS-PAGE analizi

Mutant enzimlerden V101R’nin saflaştırma pratiklerinin ardından SDS–PAGE metodu için elde edilen özütlerinden 20 μl kadar alınarak jele yüklenerek yürütme işlemi gerçekleştirildi. Şekil 42’de de GI’nın büyük oranda saflaştırıldığı görülmektedir [(A: Kaba ekstrakt, B: Işı Şoku uygulaması sonrası enzim özütü, C: İyon değişim kolon kromatografisi sonrası enzim özütü, D: Hidrofobik kolon kromatografisi sonrası enzim özütü) (Şekil 42)].

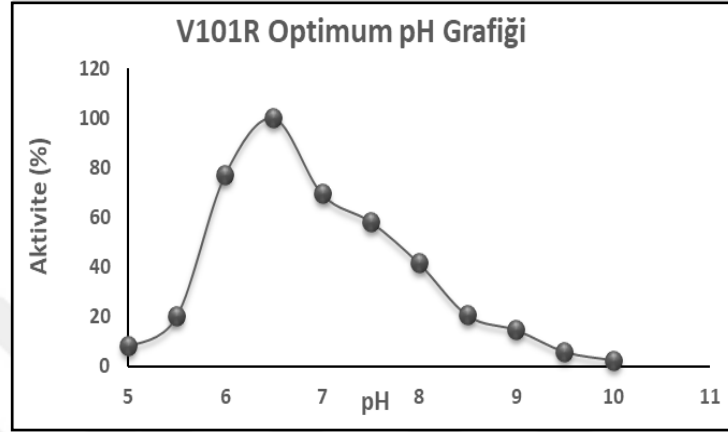
3.4.7. Optimum Sıcaklık



Şekil 43. V101R’nin Optimum Sıcaklık Grafiği

V101R mutant enziminin en iyi çalıştığı sıcaklık, grafikten de görüleceği üzere 85°C’dir (Şekil 43).

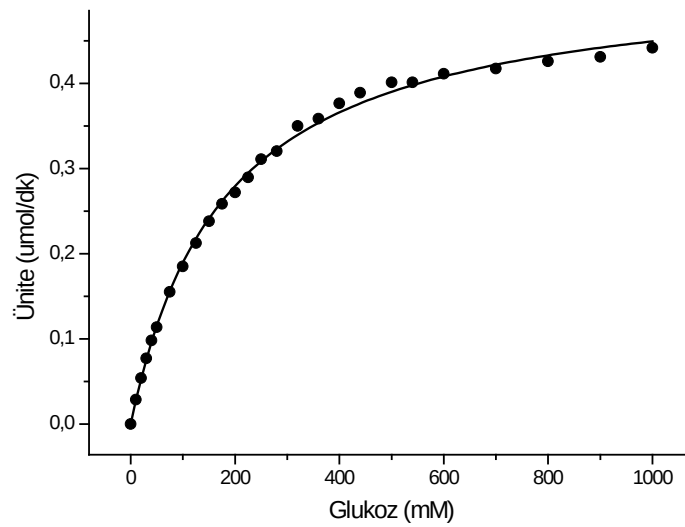
3.4.8. Optimum pH



Şekil 44. V101R’nin Optimum pH Grafiği

V101R mutant enziminin en iyi çalıştığı pH, Şekil 44’te de görüleceği üzere 6,5’dir. Yapılan mutasyonun enzimin optimum pH değerinde herhangi bir değişikliğe sebebiyet vermediği anlaşılmıştır.

3.4.9. Kinetik Çalışmalar

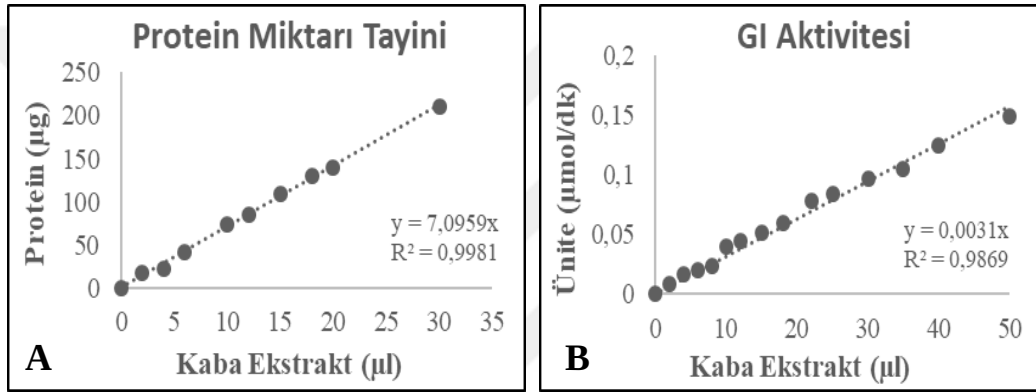


Şekil 45. V101R mutant enzime ait Michaelis-Menten eğrisi

Gerçekleştirilen reaksiyonlarda 5 µl saf enzim özütü (9,211 µg protein) varlığında analizleri yapıldı. Yapılan analizler neticesinde enzimin K_m değeri $179,26 \pm 5,33$ mM, V_{max} değeri ise $57,54 \pm 0,58$ µmol/dk/mg protein olarak hesaplandı (r^2 : 0,99758). Bu veriler kullanılarak k_{cat} değeri 48,00 1/sn olarak hesaplandı. Katalitik etkinlik değerini belirten k_{cat}/K_m 'nin de hesaplanmasıyla 0,268 değerine ulaşıldı (Şekil 45).

3.5. A353G Mutant Enziminin Saflaştırması ve Karakterizasyonu

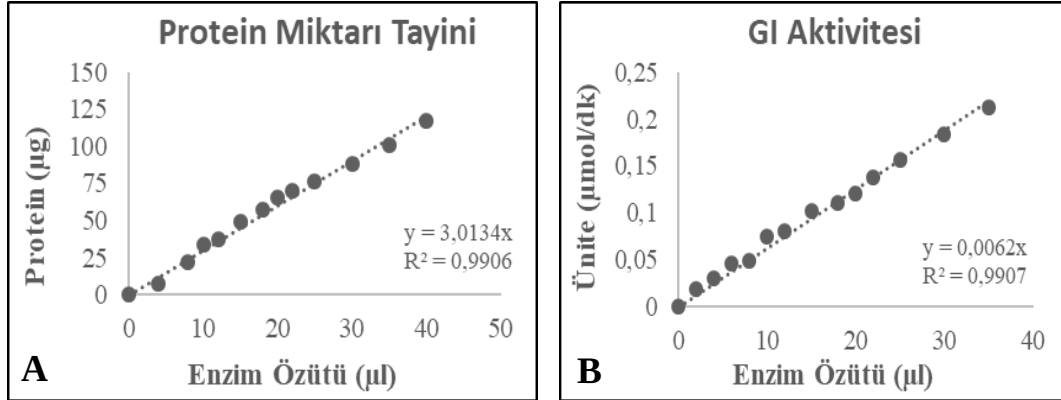
3.5.1. Kaba Ekstrat



Şekil 46. A353G'nin kaba ekstraktında protein ve GI aktivitesi tayini (A: Protein Miktarı Tayini, B: GI Aktivitesi)

Mutant enzimlerden A353G'nin kaba ekstraktının protein miktarı 7,0959 µg/µl olarak bulundu. GI aktivite deneyi 10 kat sulandırılarak yapıldı ve deney sonucunda GI aktivitesi, 1 µl enzim özütünde $0,0031 \times 10 = 0,031$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı (Şekil 46).

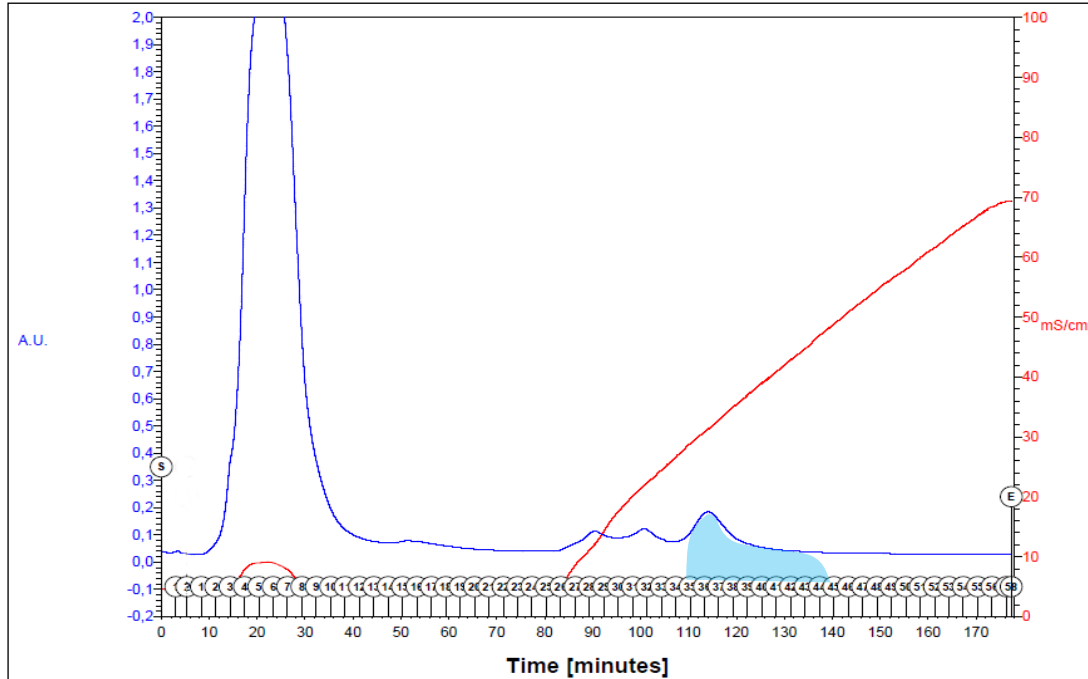
3.5.2. Isı Dejenerasyonu Uygulaması



Şekil 47. A353G'nin ısı şoku sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini (A: Protein Miktarı Tayini, B: GI Aktivitesi)

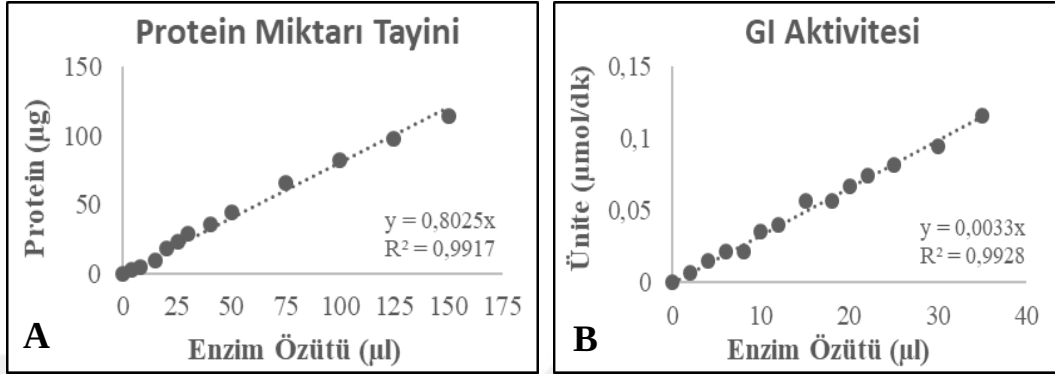
Mutant enzimlerden A353G'ye ait kaba ekstraktın ısı dejenerasyonuna maruz bırakılması sonrası özütteki protein miktarı 3,0134 µg/µl olarak bulundu. GI aktivite deneyi 5 kat sulandırılarak yapıldı ve deney sonucunda GI aktivitesi, 1 µl enzim özütünde $0,0062 \times 5 = 0,031$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı (Şekil 47).

3.5.3. İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması



Şekil 48. A353G'ye ait iyon değişim kolon kromatografisi uygulaması grafiği

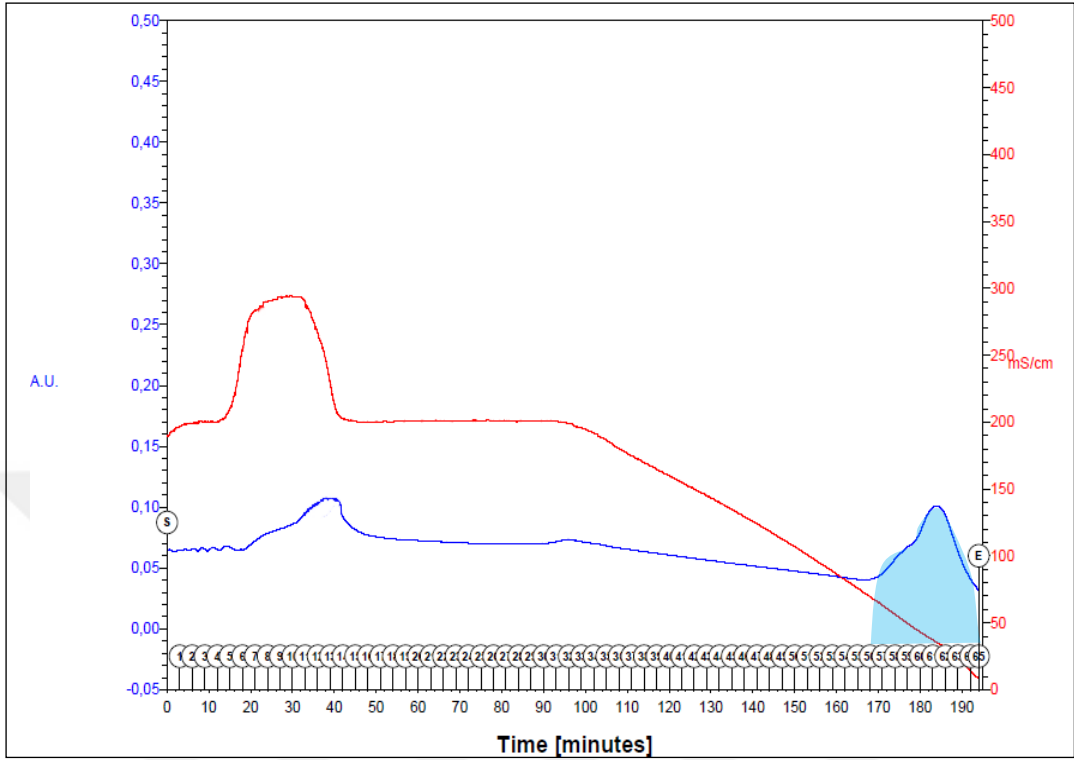
Mutant A353G enziminin iyon değişim kolon kromatografisi uygulamasıyla yukarıdaki grafiği elde edilmiştir. Her tüpte GI aktivitesi arandı ve yapılan protein deneyleri sonucunda 34-40 nolu fraksiyonlarda GI aktivitesi saptandı (şekil 48).



şekil 49. A353G'ye ait iyon değişim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özüdüte protein ve GI aktivitesi tayini (A: Protein Miktarı Tayini, B: GI Aktivitesi)

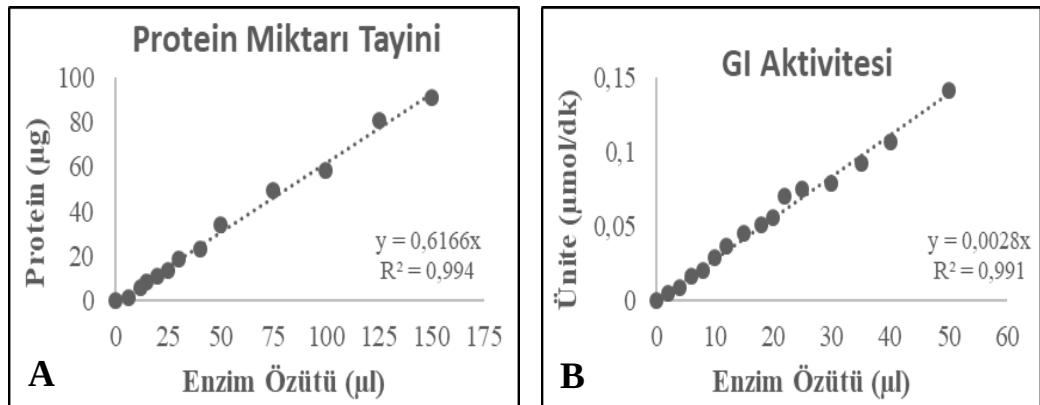
Mutant enzimlerden A353G'nin iyon değişimi kolon kromatografisi uygulaması ardından enzim özüdündeki protein miktarı 0,8025 µg/µl olarak bulundu. GI aktivite deneyi 5 kat sulandırılarak yapıldı ve deney sonucunda GI aktivitesi 1 µl enzim özüdüde $0,0033 \times 5 = 0,0165$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı (şekil 49).

3.5.4. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması



Şekil 50. A353G'ye ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulaması grafiği

Mutant A353G enziminin hidrofobik kolon kromatografisi uygulamasıyla grafiği elde edilmiştir. Her tüpte GI aktivitesi arandı ve yapılan protein deneyleri sonucunda 58-64 nolu fraksiyonlarda GI aktivitesi saptandı (Şekil 50).



Şekil 51. A353G'ye ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini (A: Protein Miktarı Tayini, B: GI Aktivitesi)

Mutant enzimlerden A353G'nin hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulaması ardından enzim özütündeki protein miktarı 0,6166 µg/µl olarak bulundu. GI aktivite deneyi 5 kat sulandırılarak yapıldı ve deney sonucunda GI Aktivitesi, 1 µl enzim özütünde 0,0028 x 5 = 0,014 µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı (Şekil 51).

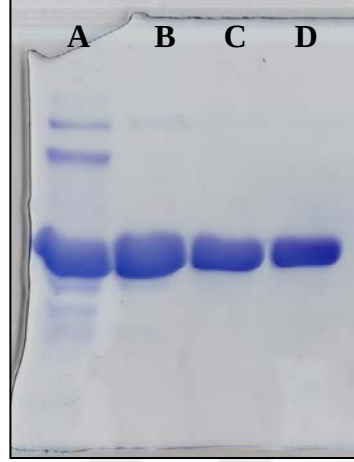
3.5.5. A353G'nin Saflaştırma Tablosu

Tablo 12. A353G'nin saflaştırma basamaklarına ait saflaştırma tablosu

Saflaştırma Basamakları	T.Hacim (ml)	Protein (mg/ml)	T.Protein (mg)	Aktivite (µmol/dk /µl)	T.Aktivite (µmol/dk)	S.Aktivite (µmol/dk/mg protein)	Verim	Saflaştırma katı
Kaba Ekstrakt	22	7,10	156,11	0,031	682	4,369	100,0	1
Isı Şoku	20	3,01	60,27	0,031	620	7,799	90,9	1,79
İyon Değişim	21	0,80	16,85	0,017	346,5	20,561	50,8	4,71
Hidrofobik Etkileşim	20,7	0,62	12,76	0,014	289,8	22,705	42,5	5,20

Tablo 12'deki verilerden de görüleceği üzere tüm saflaştırma uygulamaları başarılı olmuştur. Enzimin özgün aktivitesi, saflaştırmanın ardından 4,369'dan 22,705 µmol/dk/mg protein'e yükselirken enzim %42,5 verim ile 5,2 kat saflaştırıldı. Hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulamasının ardından bir araya getirilerek birleştirilen fraksiyonlar karakterizasyon çalışmalarında saf enzim özütü olarak kullanıldı.

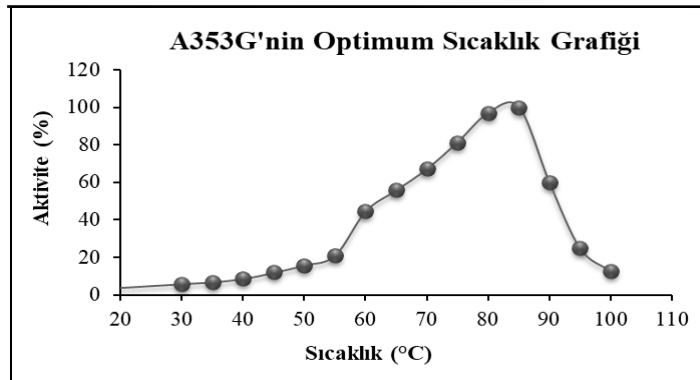
3.5.6. A353G Mutant Enziminin Saflaştırılmasına Ait SDS-PAGE Analizi



Şekil 52. A353G'nin saflaştırılmasına ait SDS-PAGE analizi

Mutant enzimlerden A353G'nin saflaştırma pratiklerinin ardından SDS-PAGE metodu için elde edilen özütlerinden 20 µl kadar alınarak jele yüklenerek yürütme işlemi gerçekleştirildi. Şekilde 'de de GI'nin büyük oranda saflaştırıldığı görülmektedir (A: Kaba ekstrakt, B: Işı Şoku uygulaması sonrası enzim özütü, C: İyon değişim kolon kromatografisi sonrası enzim özütü, D: Hidrofobik kolon kromatografisi sonrası enzim özütü)

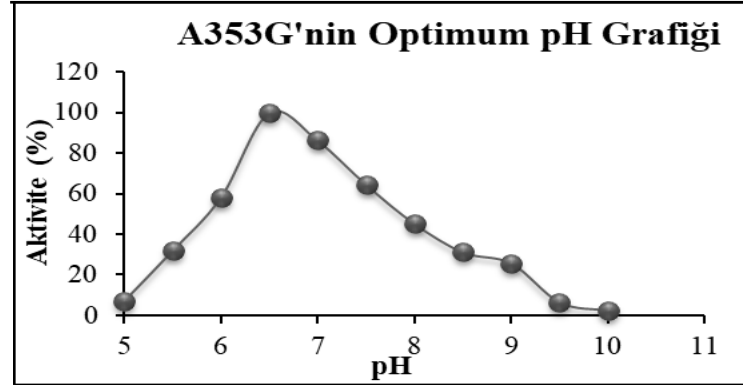
3.5.7. Optimum Sıcaklık



Şekil 53. A353G'nin Optimum Sıcaklık Grafiği

A353G mutant enziminin en iyi çalıştığı sıcaklık, grafikten de görüleceği üzere 85°C'dir (Şekil 53).

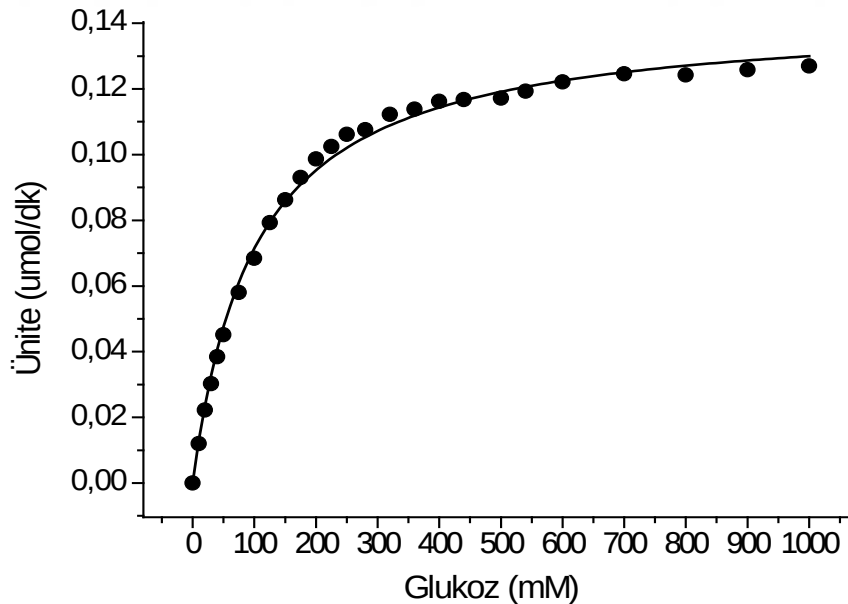
3.5.8. Optimum pH



Şekil 54. A353G'nin Optimum pH Grafiği

A353G mutant enziminin en iyi çalıştığı pH değerinin belirlenebilmesi amacıyla saf enzim özütü eşliğinde bir seri aktivite deneyleri gerçekleştirildi ve Şekil 54'te de görüleceği üzere enzimin en iyi çalıştığı pH 6,5'dir.

3.5.9. Kinetik Çalışmalar

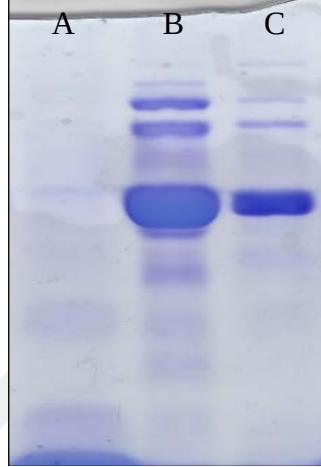


Şekil 55. A353G mutant enzimine ait Michaelis-Menten eğrisi

Gerçekleştirilen reaksiyonlarda 5 µl saf enzim özütü (3,1 µg protein) varlığında analizleri yapıldı. Yapılan analizler neticesinde enzimin K_m değeri $100,23 \pm 3,75$ mM, V_{max} değeri ise $46,13 \pm 0,46$ µmol/dk/mg protein olarak hesaplandı (r^2 : 0,99532). Bu

veriler kullanılarak k_{cat} değeri 38,47 1/sn olarak hesaplandı. Katalitik etkinlik değerini belirten k_{cat}/K_m 'nin de hesaplanmasıyla 0,383 değerine ulaşıldı (Şekil 55).

3.6. A353F ve A353W Mutasyonları

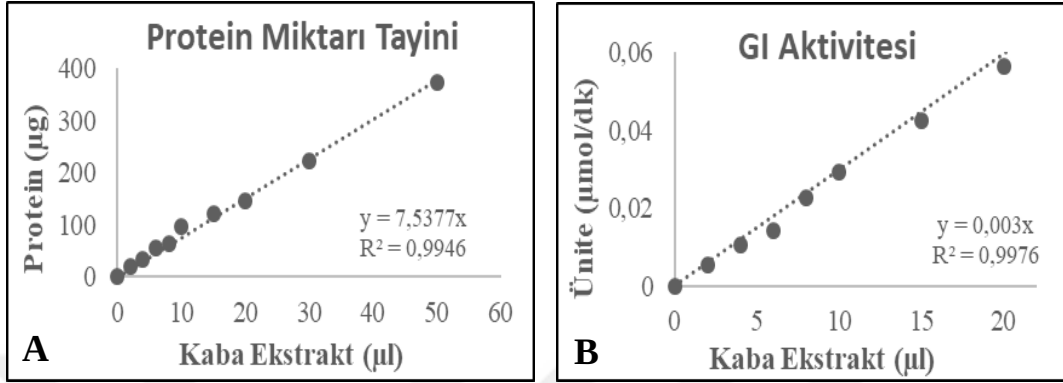


Şekil 56. A353F ve A353W mutasyonlarının kaba ekstraktlarına ait SDS-PAGE analizi

A353F ve A353W mutasyonları başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş ve mutasyonların doğrulaması DNA dizin analizi yapılarak teyit edilmiştir. Fakat mutasyonlar enzim aktivitesini ortadan kaldırdığı için ileri çalışmalar yapılamamıştır. Enzimlerin başarılı bir şekilde ekspres edildiğini gösteren SDS-PAGE analizi Şekil 56'da görülmektedir [A) *E.coli* BL21, B) A353F, C) A353W].

3.7. T428E Mutant Enziminin Saflaştırması ve Karakterizasyonu

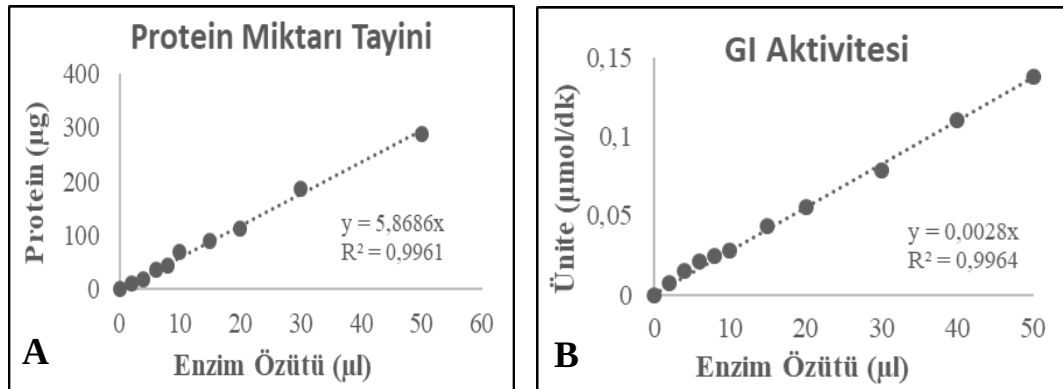
3.7.1. Kaba Ekstrakt



Şekil 57. T428E'nin kaba ekstraktında protein ve GI aktivitesi tayini (A: Protein Miktarı Tayini, B: GI Aktivitesi)

Mutant enzimlerden T428E'nin kaba ekstraktının protein miktarı 7,5377 µg/µl olarak bulundu. GI aktivite deneyi 20 kat sulandırılarak yapıldı ve deney sonucunda GI aktivitesi $0,003 \times 20 = 0,06$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı (Şekil 57).

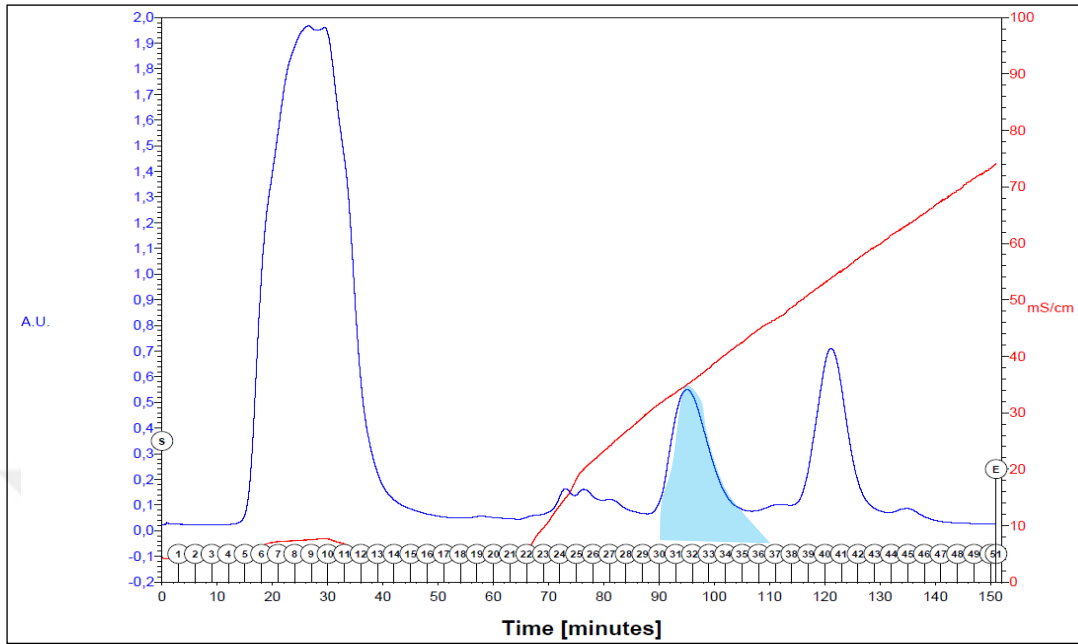
3.7.2. Isı Dejenerasyonu Uygulaması



Şekil 58. T428E'nin ısı şoku sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini (A: Protein Miktarı Tayini, B: GI Aktivitesi)

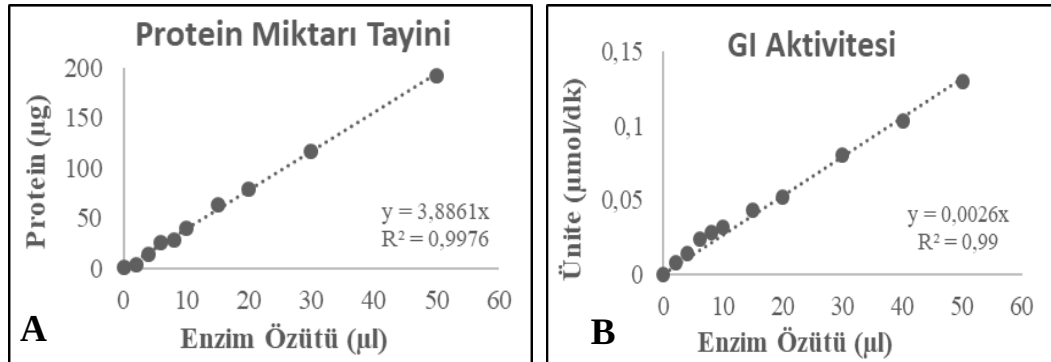
Mutant enzimlerden T428E'ye ait kaba ekstraktın ısı dejenerasyonuna maruz bırakılması sonrası özütteki protein miktarı 5,8686 µg/µl olarak bulundu. GI aktivite deneyi 20 kat sulandırılarak yapıldı ve deney sonucunda GI aktivitesi $0,0028 \times 20 = 0,056$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı (Şekil 58).

3.7.3. İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması



Şekil 59. T428E'ye ait iyon değişim kolon kromatografisi uygulaması grafiği

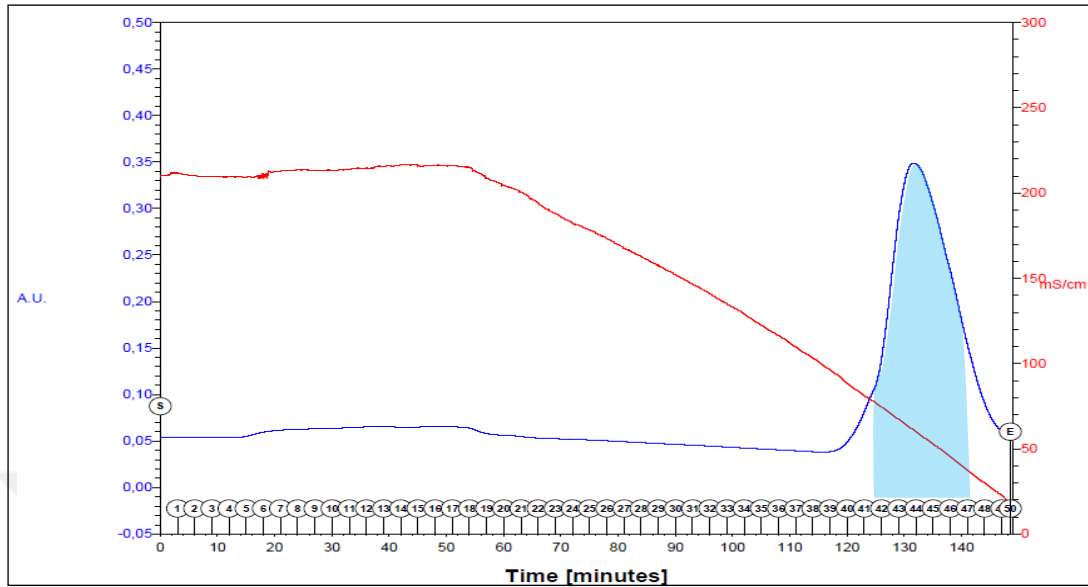
Mutant T428E enziminin iyon değişim kolon kromatografisi uygulamasıyla yukarıdaki grafiği elde edilmiştir. Her tüpte GI aktivitesi arandı ve yapılan protein deneyleri sonucunda 30-36 nolu fraksiyonlarda GI aktivitesi saptandı (Şekil 59).



Şekil 60. T428E'ye ait iyon değişim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini (A: Protein Miktarı Tayini, B: GI Aktivitesi)

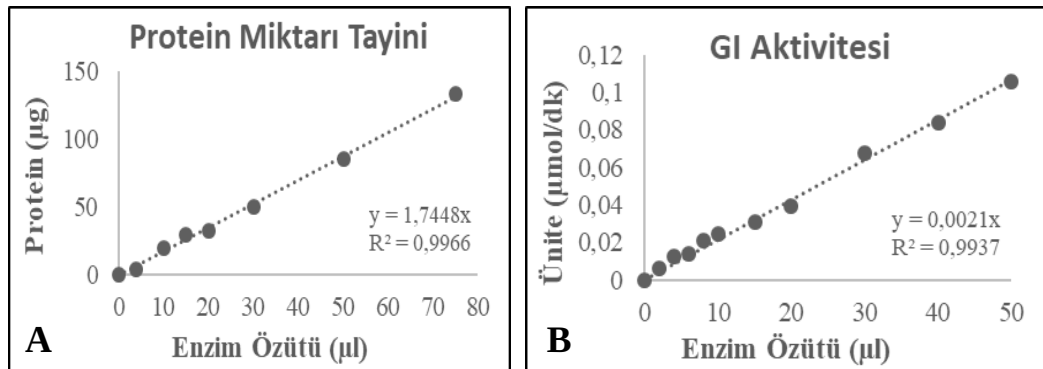
Mutant enzimlerden T428E'nin iyon değişimi kolon kromatografisi uygulaması ardından enzim özütündeki protein miktarı 3,8861 µg/µl olarak bulundu. GI aktivite deneyi 20 kat sulandırılarak yapıldı ve deney sonucunda GI aktivitesi 1 µl enzim özütünde $0,0026 \times 20 = 0,052$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı (Şekil 60).

3.7.4. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması



Şekil 61. T428E'ye ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulaması grafiği

Mutant T428E enziminin hidrofobik kolon kromatografisi uygulamasıyla grafiği elde edilmiştir. Her tüpte GI aktivitesi arandı ve yapılan protein deneyleri sonucunda 42-47 nolu fraksiyonlarda GI aktivitesi saptandı (Şekil 61).



Şekil 62. T428E'ye ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini (A: Protein Miktarı Tayini, B: GI Aktivitesi)

Mutant enzimlerden T428E'nin hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulaması ardından enzim özütündeki protein miktarı 1,7448 µg/µl olarak bulundu. GI aktivite deneyi 20 kat sulandırılarak yapıldı ve deney sonucunda GI aktivitesi 1 µl enzim özütünde $0,0021 \times 20 = 0,042$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı (Şekil 62).

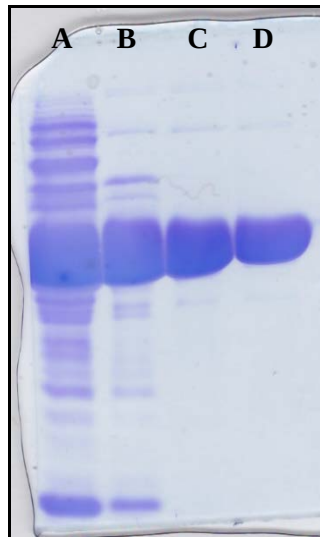
3.7.5. T428E'nin Saflaştırma Tablosu

Tablo 13. T428E'nin saflaştırma basamaklarına ait saflaştırma tablosu

Saflaştırma Basamakları	T.Hacim (ml)	Protein (mg/ml)	T.Protein (mg)	Aktivite ($\mu\text{mol/dk}/\mu\text{l}$)	T.Aktivite ($\mu\text{mol/dk}$)	S.Aktivite ($\mu\text{mol/dk/mg}$ protein)	Verim	Saflaştırma katı
Kaba Eksrakt	20,3	7,54	153,02	0,060	1218	7,960	100,0	1
Isı Şoku	16,7	5,87	98,01	0,056	935	9,542	76,8	1,20
İyon değişim	17	3,89	66,06	0,052	884	13,381	72,6	1,68
Hidrofobik Etkileşim	18	1,74	31,41	0,042	756	24,072	62,1	3,02

Tablo 13'deki verilerden de görüleceği üzere tüm saflaştırma uygulamaları başarılı olmuştur. Enzimin özgün aktivitesi, saflaştırmanın ardından 7,960'dan 24,072 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein'e yükselirken enzim %62,1 verim ile 3,02 kat saflaştırıldı. Hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulamasının ardından bir araya getirilerek birleştirilen fraksiyonlar karakterizasyon çalışmalarında saf enzim özütü olarak kullanıldı.

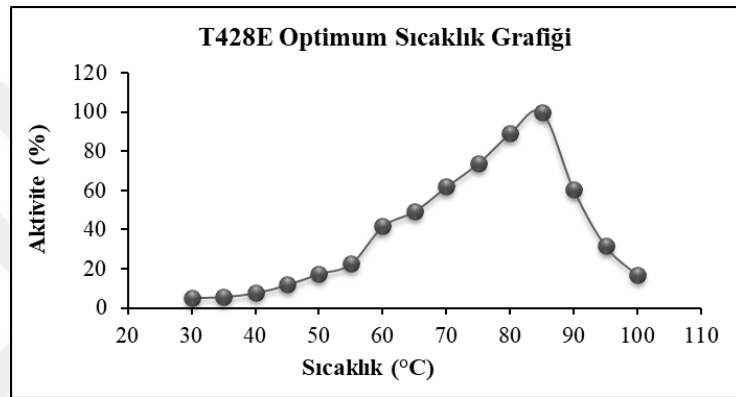
3.7.6. T428E Mutant Enziminin Saflaştırılmasına Ait SDS-PAGE Analizi



Şekil 63. T428E'nin saflaştırılmasına ait SDS-PAGE analizi

Mutant enzimlerden T428E'nin saflaştırma pratiklerinin ardından SDS–PAGE metodu için elde edilen özütlerinden 20 µl kadar alınarak jele yüklenerek yürütme işlemi gerçekleştirildi. Şekil 63'te de GI'nın büyük oranda saflaştırıldığı görülmektedir (A: Kaba ekstrakt, B: Işı Şoku uygulaması sonrası enzim özütü, C: İyon değişim kolon kromatografisi sonrası enzim özütü, D: Hidrofobik kolon kromatografisi sonrası enzim özütü).

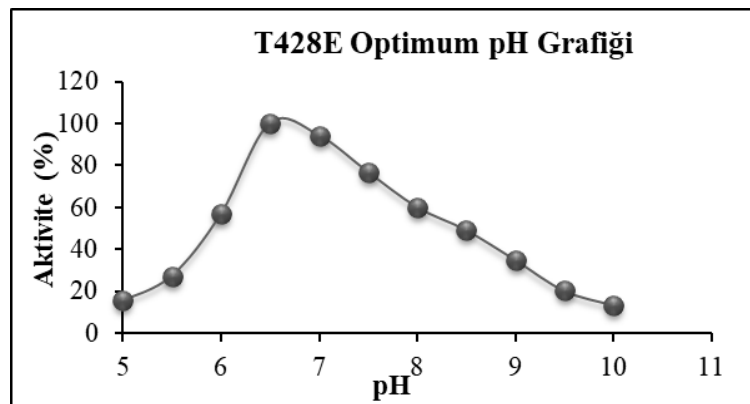
3.7.7. Optimum Sıcaklık



Şekil 64. T428E'nin Optimum Sıcaklık Grafiği

T428E mutant enziminin en iyi çalıştığı sıcaklık, grafikten de görüleceği üzere 85°C'dir (Şekil 64).

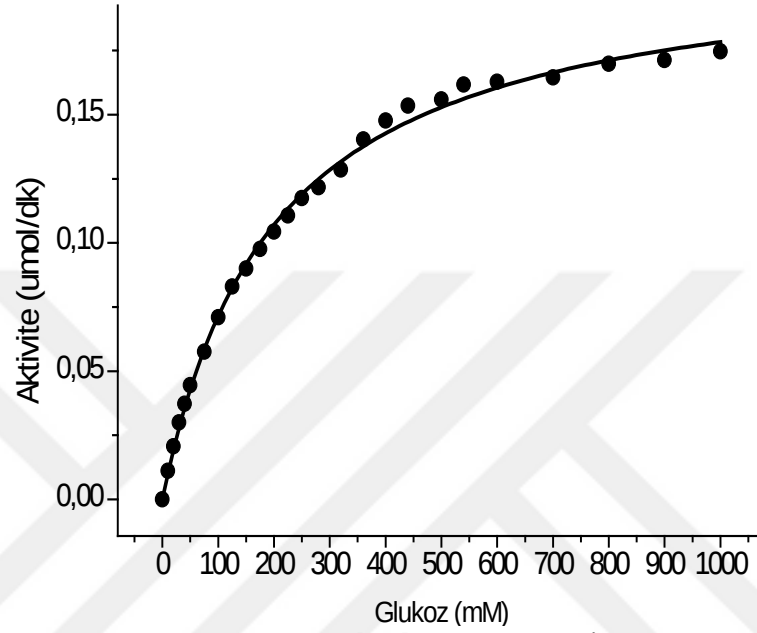
3.7.8. Optimum pH



Şekil 65. T428E'nin Optimum pH Grafiği

T428E mutant enziminin en iyi çalıştığı pH, grafikten de görüleceği üzere 6,5’dir (Şekil 65).

3.7.9. Kinetik Çalışmalar

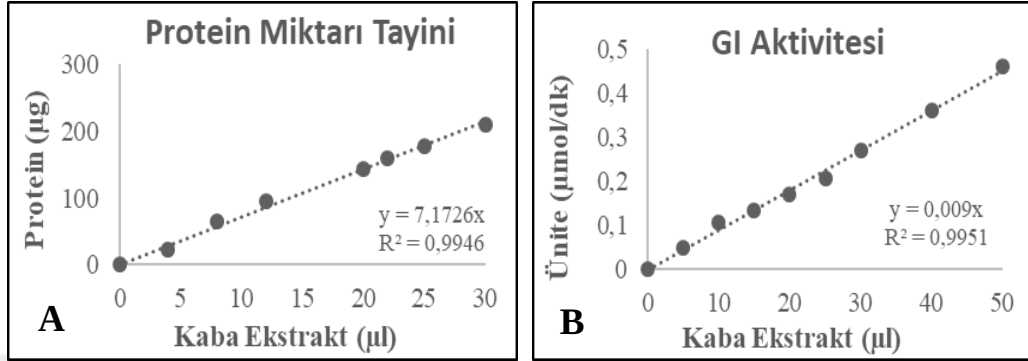


Şekil 66. T428E mutant enzime ait Michaelis-Menten eğrisi

Gerçekleştirilen reaksiyonlarda 2,5 μl saf enzim özütü (4,35 μg protein) varlığında analizleri yapıldı. Yapılan analizler neticesinde enzimin K_m değeri $199,46 \pm 7,04$ mM, V_{max} değeri ise $49,16 \pm 0,61$ μmol/dk/mg protein olarak hesaplandı (r^2 : 0,99671). Bu veriler kullanılarak k_{cat} değeri 41,01 1/sn olarak hesaplandı. Katalitik etkinlik değerini belirten k_{cat}/K_m 'nin de hesaplanmasıyla 0,205 değerine ulaşıldı (Şekil 66).

3.8. T428S Mutant Enziminin Saflaştırması ve Karakterizasyonu

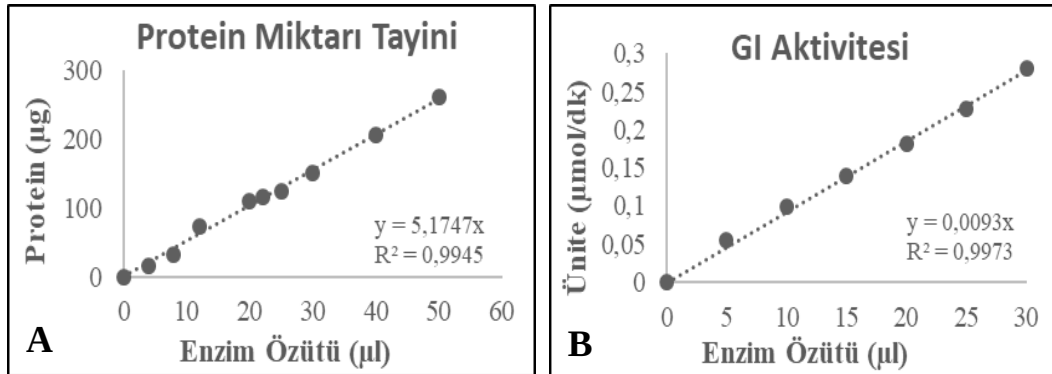
3.8.1. Kaba Ekstrakt



Şekil 67. T428S'nin ısı şoku sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini (A: Protein Miktarı Tayini, B: GI Aktivitesi)

Mutant enzimlerden T428S'nin kaba ekstraktının protein miktarı 7,1726 µg/µl olarak bulundu. GI aktivite deneyi 5 kat sulandırılarak yapıldı ve deney sonucunda GI aktivitesi, 1 µl enzim özütünde $0,009 \times 5 = 0,045$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı (Şekil 67).

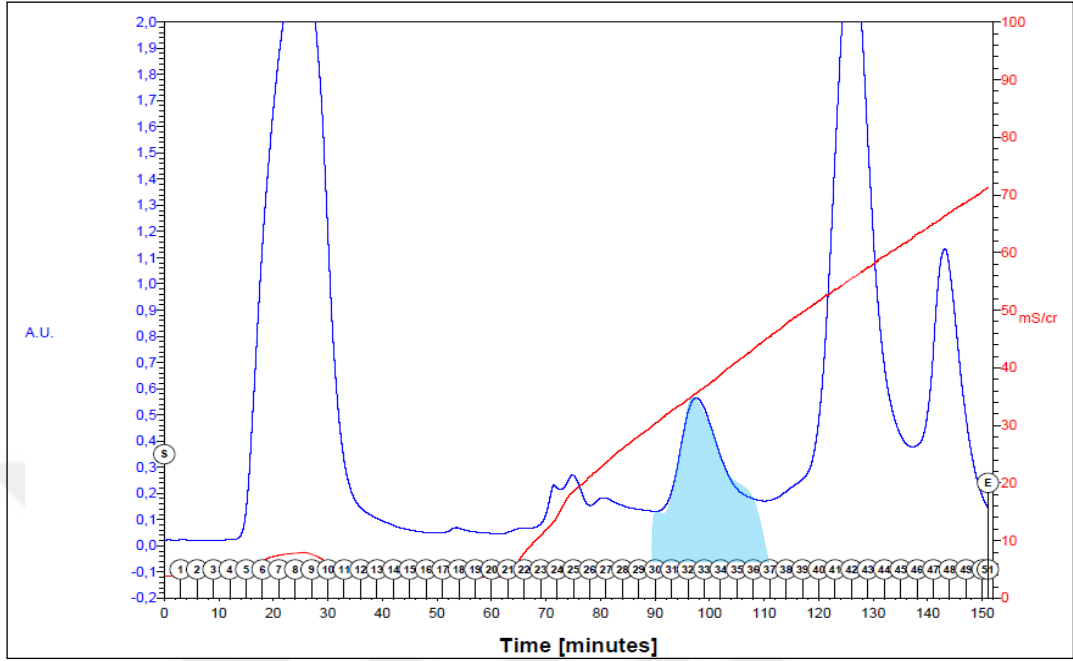
3.8.2. Isı Dejenerasyonu Uygulaması



Şekil 68. T428S'nin ısı şoku sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini (A: Protein Miktarı Tayini, B: GI Aktivitesi)

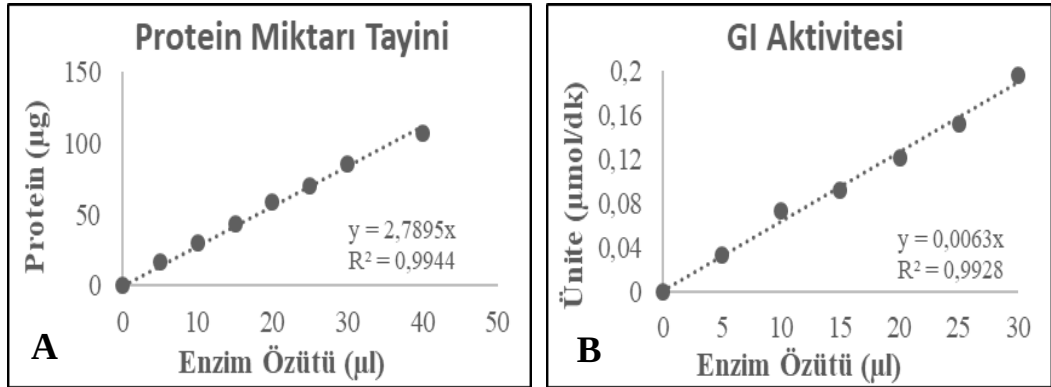
Mutant enzimlerden T428S'ye ait kaba ekstraktın ısı dejenerasyonuna maruz bırakılması sonrası özütteki protein miktarı 5,1747 µg/µl olarak bulundu. GI aktivite deneyi 5 kat sulandırılarak yapıldı ve deney sonucunda GI aktivitesi, 1 µl enzim özütünde $0,0093 \times 5 = 0,0465$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı (Şekil 68).

3.8.3. İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması



Şekil 69. T428S'ye ait iyon değişim kolon kromatografisi uygulaması grafiği

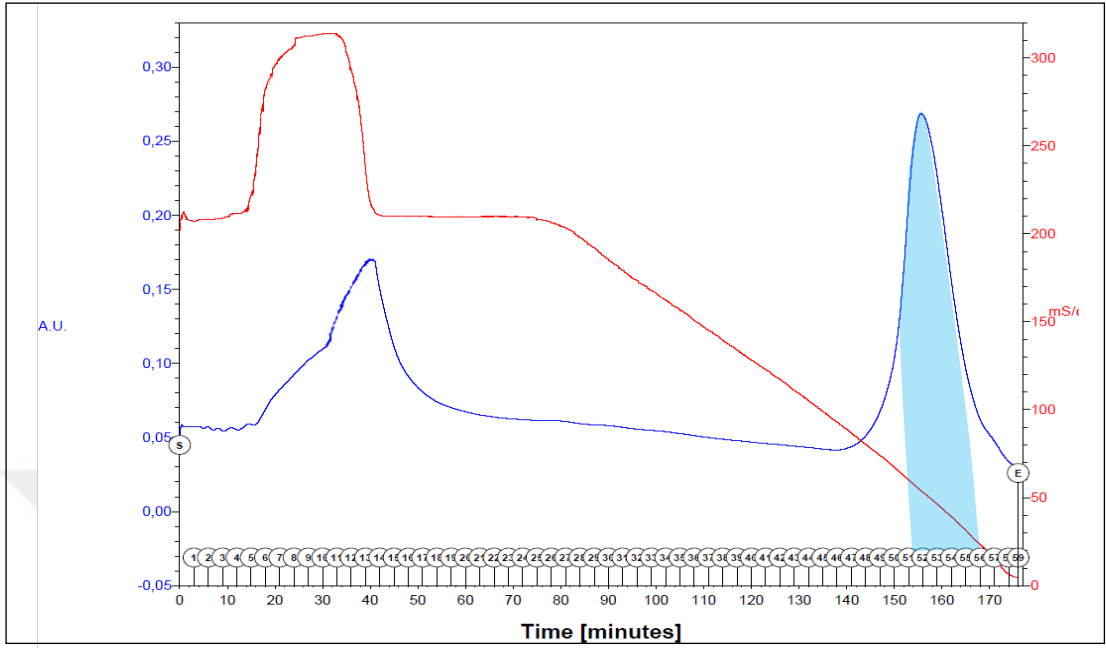
Mutant T428S enziminin iyon değişim kolon kromatografisi uygulamasıyla yukarıdaki grafiği elde edilmiştir. Her tüpte GI aktivitesi arandı ve yapılan protein deneyleri sonucunda 30-36 nolu fraksiyonlarda GI aktivitesi saptandı (Şekil 69).



Şekil 70. T428S'ye ait iyon değişim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini (A: Protein Miktarı Tayini, B: GI Aktivitesi)

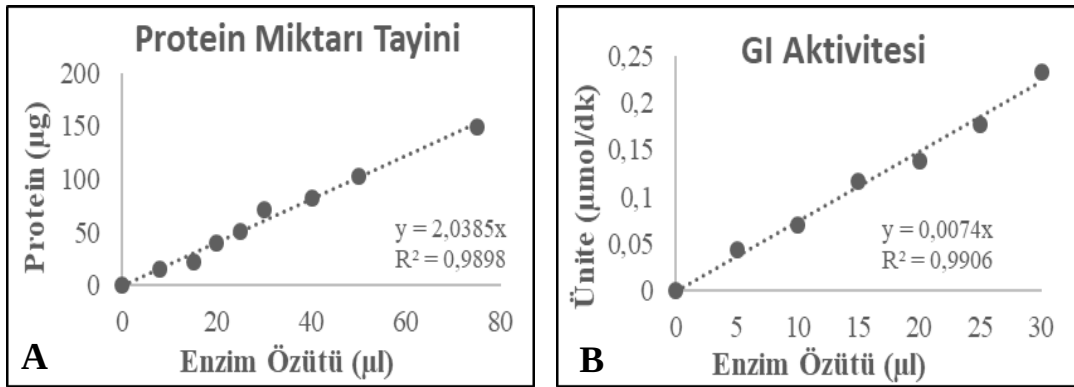
Mutant enzimlerden T428S'nin iyon değişimi kolon kromatografisi uygulaması ardından enzim özütündeki protein miktarı 2,7895 µg/µl olarak bulundu. GI aktivite deneyi 5 kat sulandırılarak yapıldı ve deney sonucunda GI aktivitesi 1 µl enzim özütünde 0,0063 x 5 = 0,0315 µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı (Şekil 70).

3.8.4. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması



Şekil 71. T428S'ye ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulaması grafiği

Mutant T428S enziminin hidrofobik kolon kromatografisi uygulamasıyla grafiği elde edilmiştir. Her tüpte GI aktivitesi arandı ve yapılan protein deneyleri sonucunda 52-56 nolu fraksiyonlarda GI aktivitesi saptandı (Şekil 71).



Şekil 72. T428S'ye ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini (A: Protein Miktarı Tayini, B: GI Aktivitesi)

Mutant enzimlerden T428S'nin hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulaması ardından enzim özütündeki protein miktarı 2,0385 µg/µl olarak bulundu. GI

aktivite deneyi 5 kat sulandırılarak yapıldı ve deney sonucunda GI aktivitesi 1 µl enzim özütünde $0,0074 \times 5 = 0,037$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı (Şekil 72).

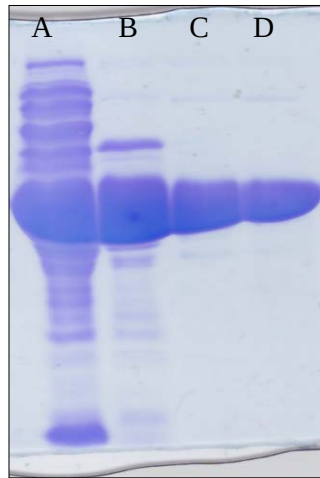
3.8.5. T428S'nin Saflaştırma Tablosu

Tablo 14. T428S'nin saflaştırma basamaklarına ait saflaştırma tablosu

Saflaştırma Basamakları	T.Hacim (ml)	Protein mg/ml	T.Protein (mg)	Aktivite (µmol/dk/µl)	T.Aktivite (µmol/dk)	S.Aktivite (µmol/dk/mg protein)	Verim	Saflaştırma katı
Kaba Ekstrakt	16	7,17	114,76	0,045	720	6,274	100,0	1,00
Işı Şoku	14	5,17	72,45	0,0465	651	8,986	90,4	1,43
İyon Değişim	19	2,79	53,00	0,0315	598,5	11,292	83,1	1,80
Hidrofobik Etkileşim.	15	2,04	30,58	0,037	555	18,151	77,1	2,89

Tablo 14'deki verilerden de görüleceği üzere tüm saflaştırma uygulamaları başarılı olmuştur. Enzimin özgün aktivitesi, saflaştırmanın ardından 6,274'den 18,151 µmol/dk/mg protein'e yükselirken enzim %77,1 verim ile 2,89 kat saflaştırıldı.

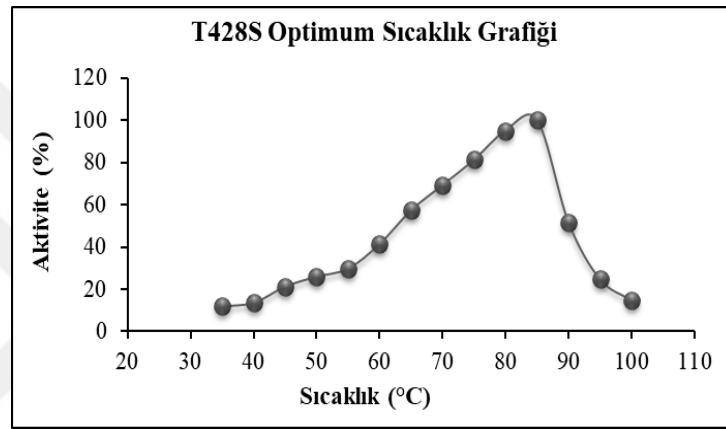
3.8.6. T428S Mutant Enziminin Saflaştırılmasına Ait SDS-PAGE Analizi



Şekil 73. T428S'nin saflaştırılmasına ait SDS-PAGE analizi

Mutant enzimlerden T428S'nin saflaştırma pratiklerinin ardından SDS–PAGE metodu için elde edilen özütlerinden 20 µl kadar alınarak jele yüklenerek yürütme işlemi gerçekleştirildi. Şekilde 73'ten de anlaşılacağı üzere GI büyük oranda saflaştırıldığı görülmektedir (A: Kaba ekstrakt, B: Işı Şoku uygulaması sonrası enzim özütü, C: İyon değişim kolon kromatografisi sonrası enzim özütü, D: Hidrofobik kolon kromatografisi sonrası enzim özütü)

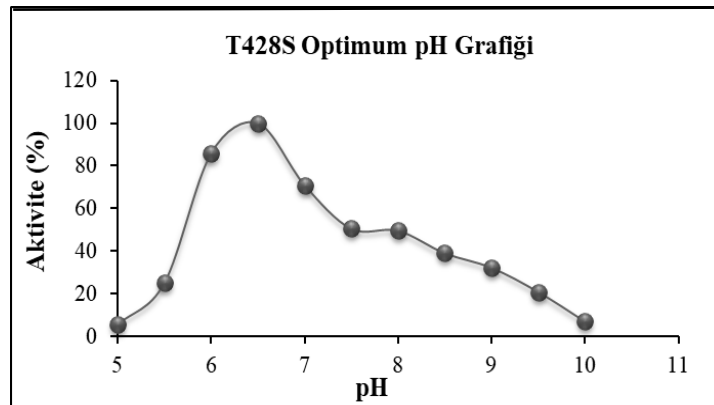
3.8.7. Optimum Sıcaklık



Şekil 74. T428S'nin Optimum Sıcaklık Grafiği

T428S mutant enziminin en iyi çalıştığı sıcaklık, grafikten de görüleceği üzere 85°C'dir (Şekil 74).

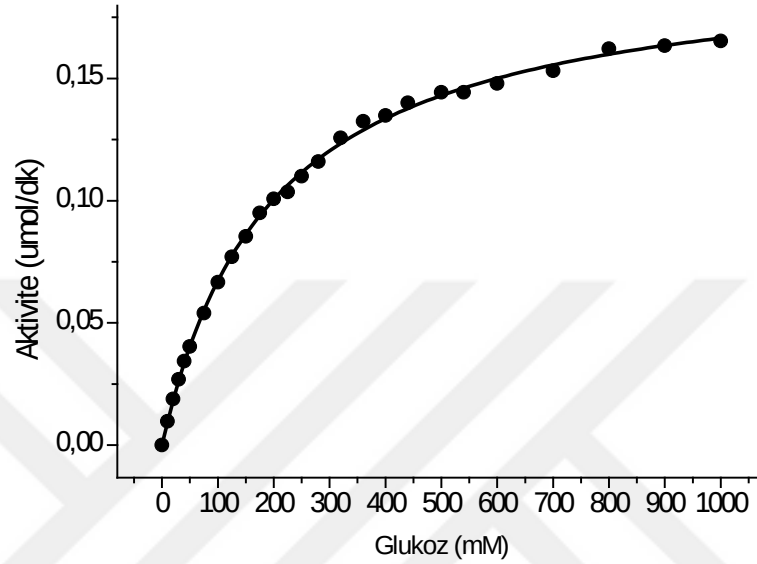
3.8.8. Optimum pH



Şekil 75. T428S'nin Optimum pH Grafiği

T428S mutant enziminin en iyi çalıştığı pH, Şekil 75’de de görüleceği üzere 6,5’dir.

3.8.9. Kinetik Çalışmalar

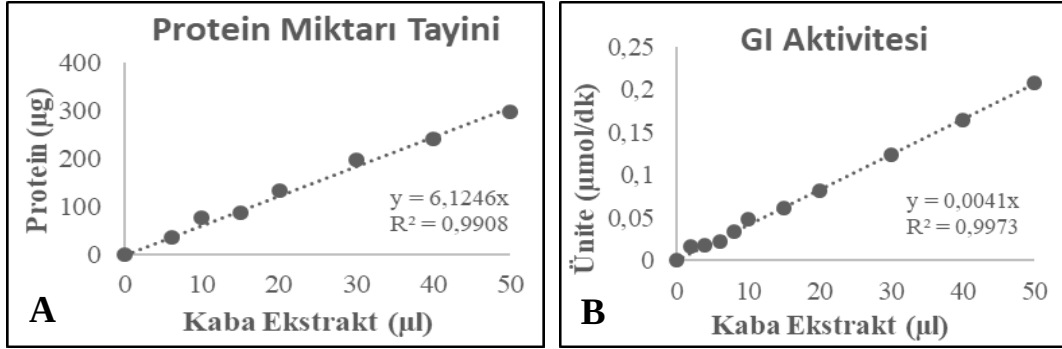


Şekil 76. T428S mutant enzimine ait Michaelis-Menten eğrisi

Gerçekleştirilen reaksiyonlarda 2,5 µl saf enzim özütü (5,096 µg protein) varlığında analizleri yapıldı. Yapılan analizler neticesinde enzimin K_m değeri $196,49 \pm 4,06$ mM, V_{max} değeri ise $39,09 \pm 0,3$ µmol/dk/mg protein olarak hesaplandı (r^2 : 0,99887). Bu veriler kullanılarak k_{cat} değeri 32,60 1/sn olarak hesaplandı. Katalitik etkinlik değeri k_{cat}/K_m 'nin de hesaplanmasıyla 0,166 değerine ulaşıldı (Şekil 76).

3.9. V101R- K111R Mutant Enziminin Saflaştırması ve Karakterizasyonu

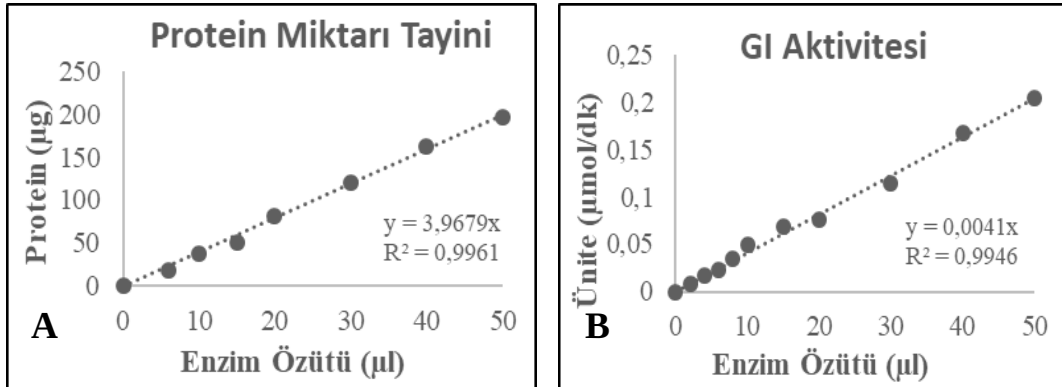
3.9.1. Kaba Ekstrakt



Şekil 77. V101R- K111R'nin kaba ekstraktında protein ve GI aktivitesi tayini (A: Protein Miktarı Tayini, B: GI Aktivitesi)

Mutant enzimlerden V101R-K111R'nin kaba ekstraktının protein miktarı 6,1246 µg/µl olarak bulundu. GI aktivite deneyi 10 kat sulandırılarak yapıldı ve deney sonucunda GI aktivitesi, 1 µl enzim özütünde 0,0041 x 10 = 0,041 µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı (Şekil 77).

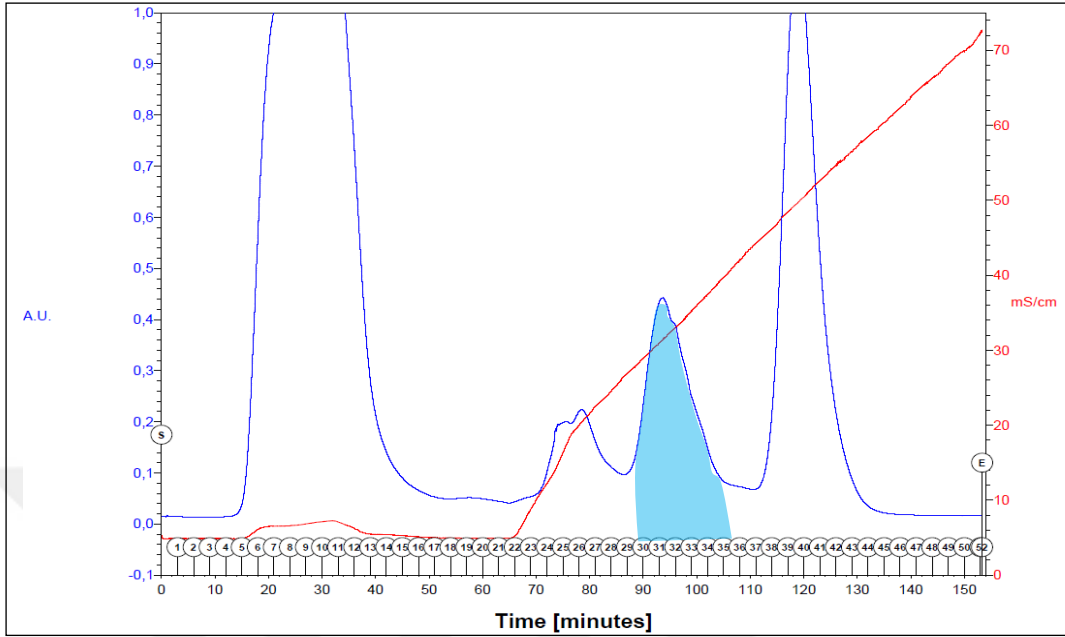
3.9.2. Isı Dejenerasyonu Uygulaması



Şekil 78. V101R-K111R'nin ısı şoku sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini (A: Protein Miktarı Tayini, B: GI Aktivitesi)

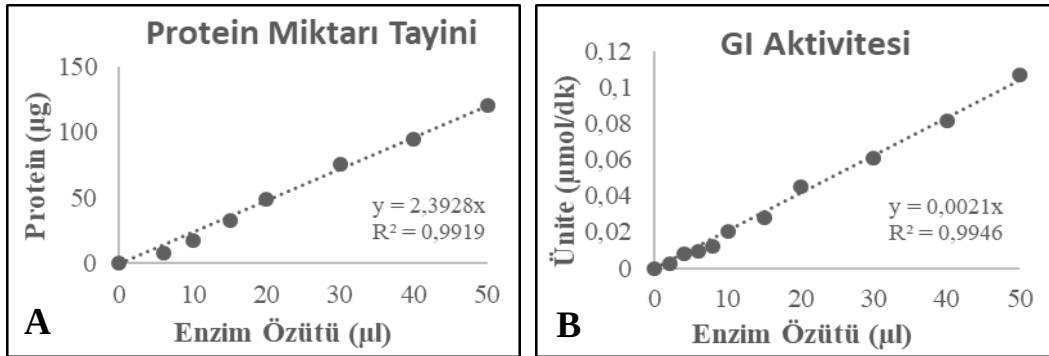
Mutant enzimlerden V101R-K111R'ye ait kaba ekstraktın ısı dejenerasyonuna maruz bırakılması sonrası özütteki protein miktarı 3,9679 µg/µl olarak bulundu. GI aktivite deneyi 10 kat sulandırılarak yapıldı ve deney sonucunda GI aktivitesi, 1 µl enzim özütünde 0,0041 x 10 = 0,041 µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı (Şekil 78).

3.9.3. İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması



Şekil 79. V101R- K111R'ye ait iyon değişim kolon kromatografisi uygulaması grafiği

Mutant V101R-K111R enziminin iyon değişim kolon kromatografisi uygulamasıyla yukarıdaki grafiği elde edilmiştir. Her tüpte GI aktivitesi arandı ve yapılan protein deneyleri sonucunda 30-35 nolu fraksiyonlarda GI aktivitesi saptandı (Şekil 79).

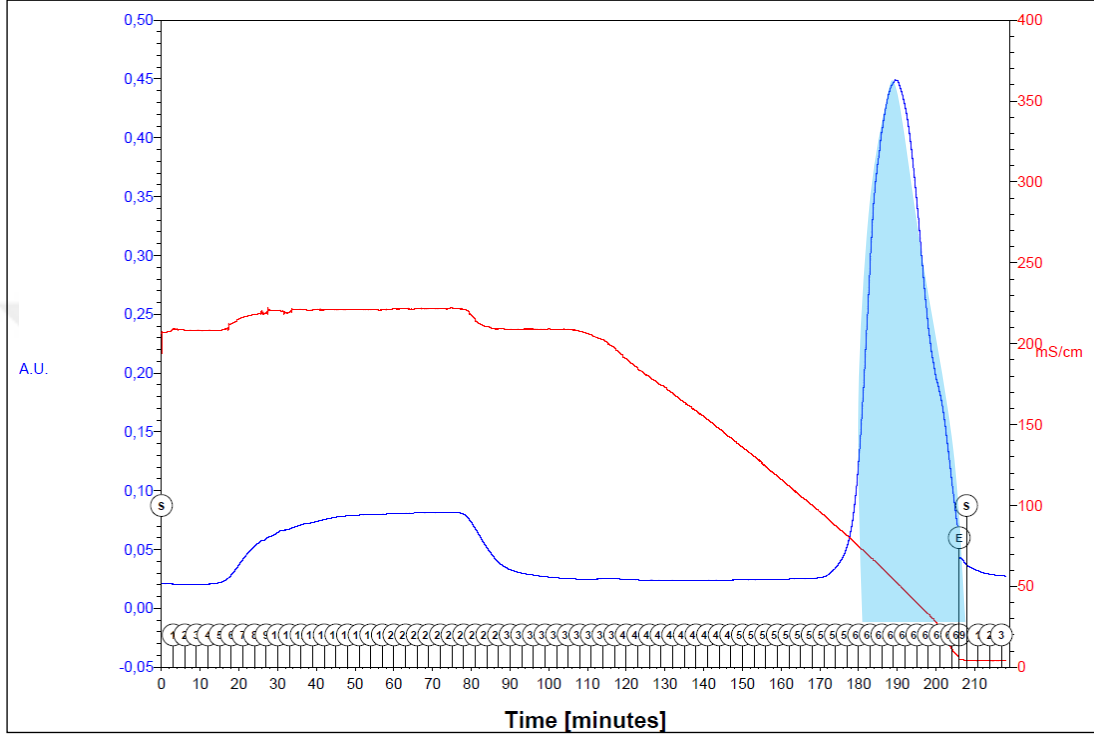


Şekil 80. V101R-K111R'ye ait iyon değişim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini (A: Protein Miktarı Tayini, B: GI Aktivitesi)

Mutant enzimlerden V101R-K111R'nin iyon değişimi kolon kromatografisi uygulaması ardından enzim özütündeki protein miktarı 2,3928 µg/µl olarak bulundu. GI

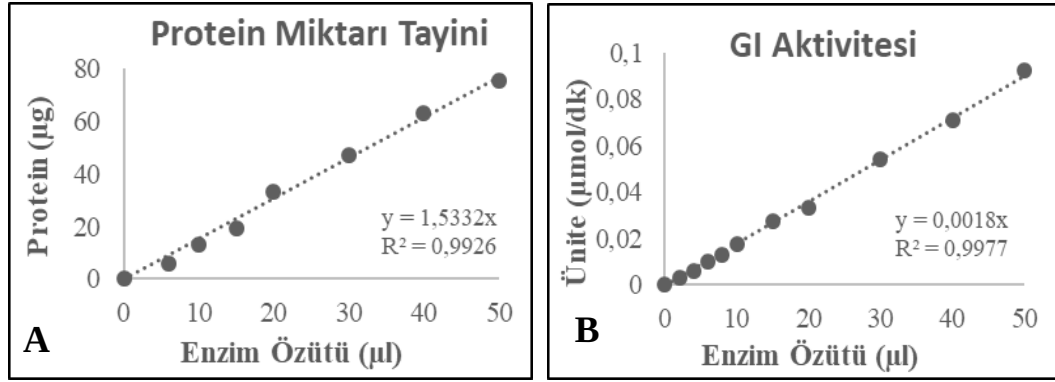
aktivite deneyi 20 kat sulandırılarak yapıldı ve deney sonucunda GI aktivitesi 1 µl enzim özütünde $0,0021 \times 20 = 0,042$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı (Şekil 80).

3.9.4. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması



Şekil 81. V101R- K111R'ye ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulaması grafiği

Mutant V101R-K111R enziminin hidrofobik kolon kromatografisi uygulamasıyla grafiği elde edilmiştir. Her tüpte GI aktivitesi arandı ve yapılan protein deneyleri sonucunda 61-68 nolu fraksiyonlarda GI aktivitesi saptandı (Şekil 81).



Şekil 82. V101R-K111R'ye ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini (A: Protein Miktarı Tayini, B: GI Aktivitesi)

V101R-K111R mutant enzimi hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulaması ardından enzim özütündeki protein miktarı 1,5332 µg/µl olarak bulundu. GI aktivite deneyi 20 kat sulandırılarak yapıldı ve deney sonucunda GI aktivitesi, 1 µl enzim özütünde $0,0018 \times 20 = 0,036$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı (Şekil 82).

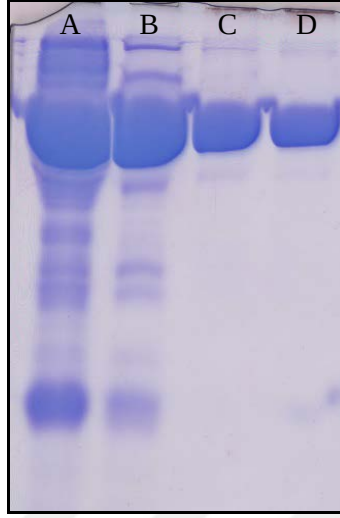
3.9.5. V101R- K111R'nin Saflaştırma Tablosu

Tablo 15. V101R- K111R'nin saflaştırma basamaklarına ait saflaştırma tablosu

Saflaştırma Basamakları	T.Hacim (ml)	Protein mg/ml	T.Protein (mg)	Aktivite (µmol/dk/µl)	T.Aktivite (µmol/dk)	S.Aktivite (µmol/dk/mg protein)	Verim	Saflaştırma katı
Kaba Ekstrakt	21,3	6,12	130,45	0,041	873,3	6,694	100	1
Işı Şoku	19,3	3,97	76,58	0,041	791,3	10,333	90,6	1,54
İyon Değişim	18	2,39	43,07	0,042	756	17,553	86,6	2,62
Hidrofobik Etkileşim	18	1,53	27,6	0,036	648	23,48	74,2	3,51

Tablo 15'deki verilerden de görüleceği üzere tüm saflaştırma uygulamaları başarılı olmuştur. Enzimin özgün aktivitesi, saflaştırmanın ardından 6,694'ten 23,480 µmol/dk/mg protein'e yükselirken enzim %74,2 verim ile 3,51 kat saflaştırıldı. Hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulamasının ardından bir araya getirilerek birleştirilen fraksiyonlar karakterizasyon çalışmalarında saf enzim özütü olarak kullanıldı.

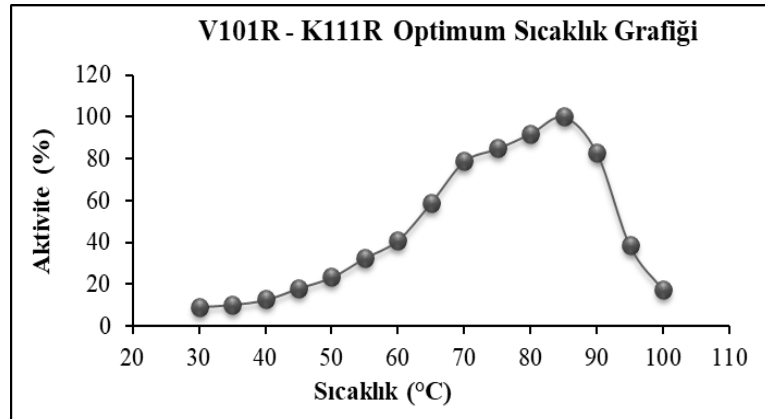
3.9.6. V101R- K111R'nin Saflaştırılmasına Ait SDS-PAGE Analizi



Şekil 83. V101R- K111R'nin saflaştırılmasına ait SDS-PAGE analizi

V101R-K111R mutant enziminin saflaştırma pratiklerinin ardından SDS-PAGE metodu için elde edilen özütlerinden 20 µl kadar alınarak jele yüklenerek yürütme işlemi gerçekleştirildi. Şekil 83'te de GI'nın büyük oranda saflaştırıldığı görülmektedir (A: Kaba ekstrakt, B: Işı Şoku uygulaması sonrası enzim özütü, C: İyon değişim kolon kromatografisi sonrası enzim özütü, D: Hidrofobik kolon kromatografisi sonrası enzim özütü, (Şekil 83).

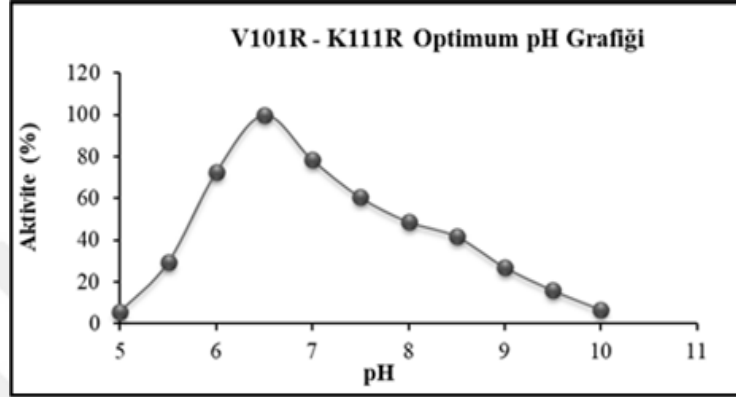
3.9.7. Optimum Sıcaklık



Şekil 84. V101R- K111R'nin Optimum Sıcaklık Grafiği

V101R-K111R mutant enziminin en iyi çalıştığı sıcaklık, grafikten de görüleceği üzere 85°C'dir (Şekil 84). Yapılan mutasyonun enzimin optimum çalışma sıcaklığında herhangi bir değişikliğe sebebiyet vermediği anlaşılmıştır.

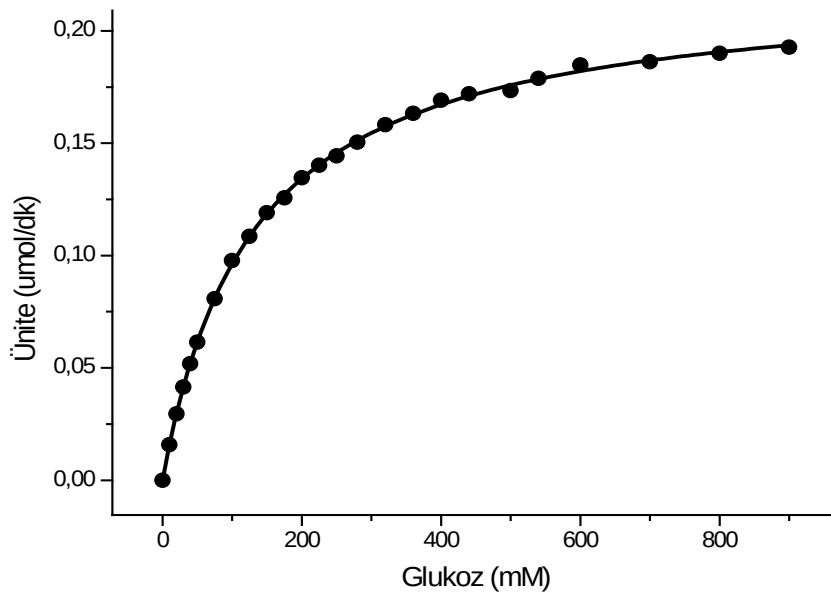
3.9.8. Optimum pH



Şekil 85. V101R- K111R'nin Optimum pH Grafiği

V101R-K111R mutant enziminin en iyi çalıştığı pH, grafikten de görüleceği üzere 6,5'dir (Şekil 85). Yapılan mutasyonun enzimin optimum pH değerinde herhangi bir değişikliğe sebebiyet vermediği anlaşılmıştır.

3.9.9. Kinetik Çalışmalar

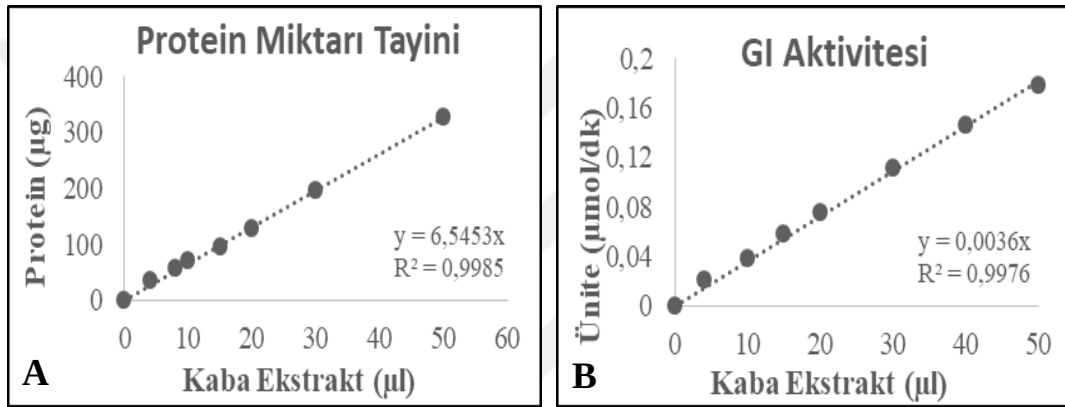


Şekil 86. V101R- K111R mutant enzime ait Michaelis-Menten eğrisi

Gerçekleştirilen reaksiyonlarda 2 µl saf enzim özütü (3,060 µg protein) varlığında analizleri yapıldı. Yapılan analizler neticesinde enzimin K_m değeri $130,06 \pm 1,55$ mM, V_{max} değeri ise $72,40 \pm 0,26$ µmol/dk/mg protein olarak hesaplandı (r^2 : 0,99959). Bu veriler kullanılarak k_{cat} değeri 60,40 1/sn olarak hesaplandı. Katalitik etkinlik değerini belirten k_{cat}/K_m 'nin de hesaplanmasıyla 0,464 değerine ulaşıldı (Şekil 86).

3.10. W137F–V184S–K111R Mutant Enziminin Saflaştırması ve Karakterizasyonu

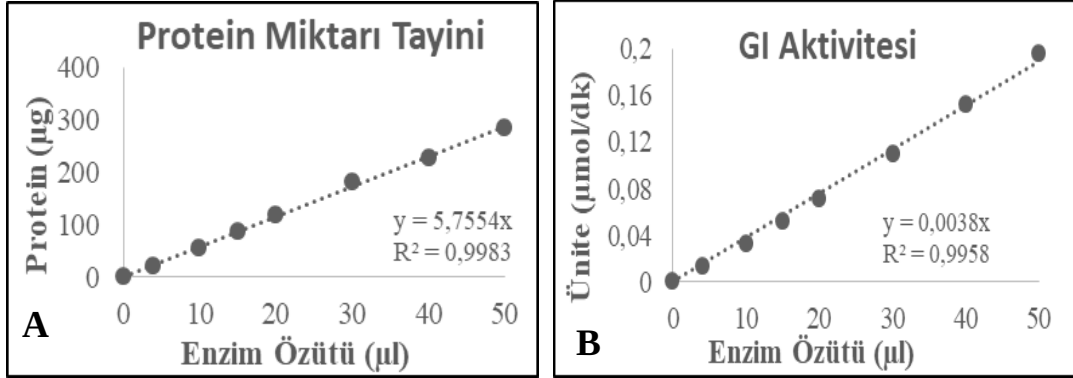
3.10.1. Kaba Ekstrakt



Şekil 87. W137F–V184S–K111R'nin kaba ekstraktında protein ve GI aktivitesi tayini (A: Protein Miktarı Tayini, B: GI Aktivitesi)

W137F–V184S–K111R üçlü mutant enziminin kaba ekstraktının protein miktarı 6,5453 µg/µl olarak bulundu. GI aktivite deneyi 10 kat sulandırılarak yapıldı ve deney sonucunda GI aktivitesi, 1 µl enzim özütünde $0,0036 \times 10 = 0,036$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı (Şekil 87).

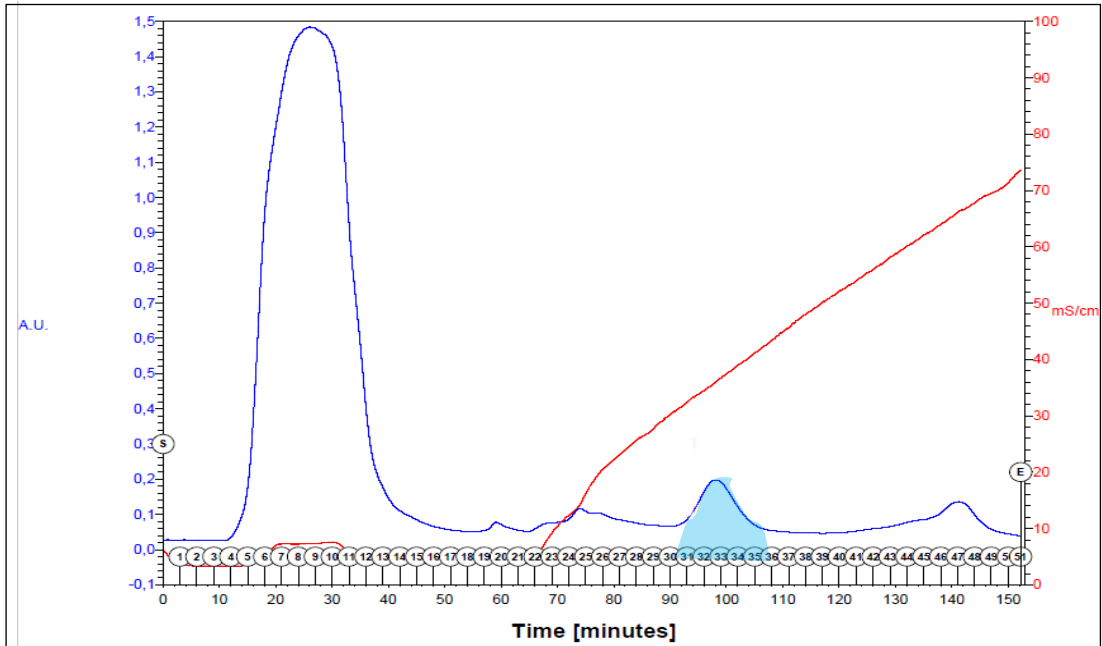
3.10.2. Isı Dejenerasyonu Uygulaması



Şekil 88. W137F – V184S – K111R'nin ısı dejenerasyonu sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini (A: Protein Miktarı Tayini, B: GI Aktivitesi)

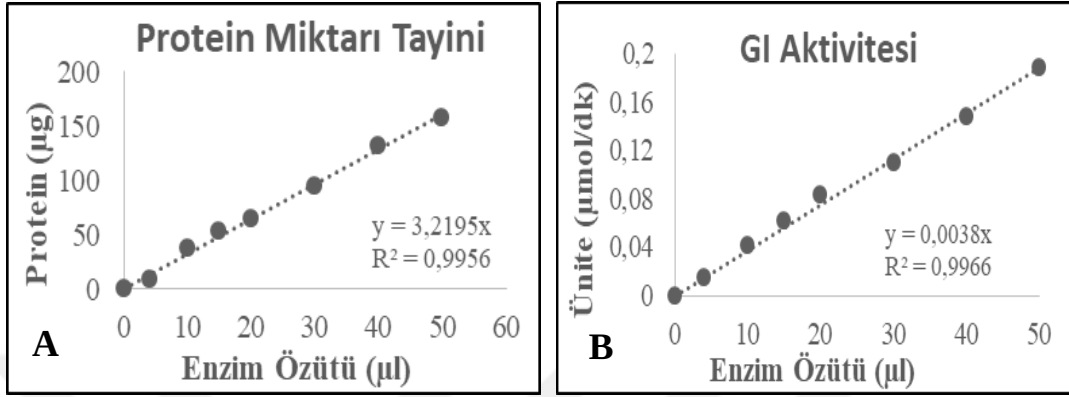
Mutant enzimlerden üçlü W137F – V184S – K111R'ye ait kaba ekstraktın ısı dejenerasyonuna maruz bırakılması sonrası özütteki protein miktarı 5,7554 µg/µl olarak bulundu. GI aktivite deneyi 10 kat sulandırılarak yapıldı ve deney sonucunda GI aktivitesi, 1 µl enzim özütünde $0,0038 \times 10 = 0,038$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı (Şekil 88).

3.10.3. İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması



Şekil 89. W137F – V184S – K111R'ye ait iyon değişim kolon kromatografisi uygulaması grafiği

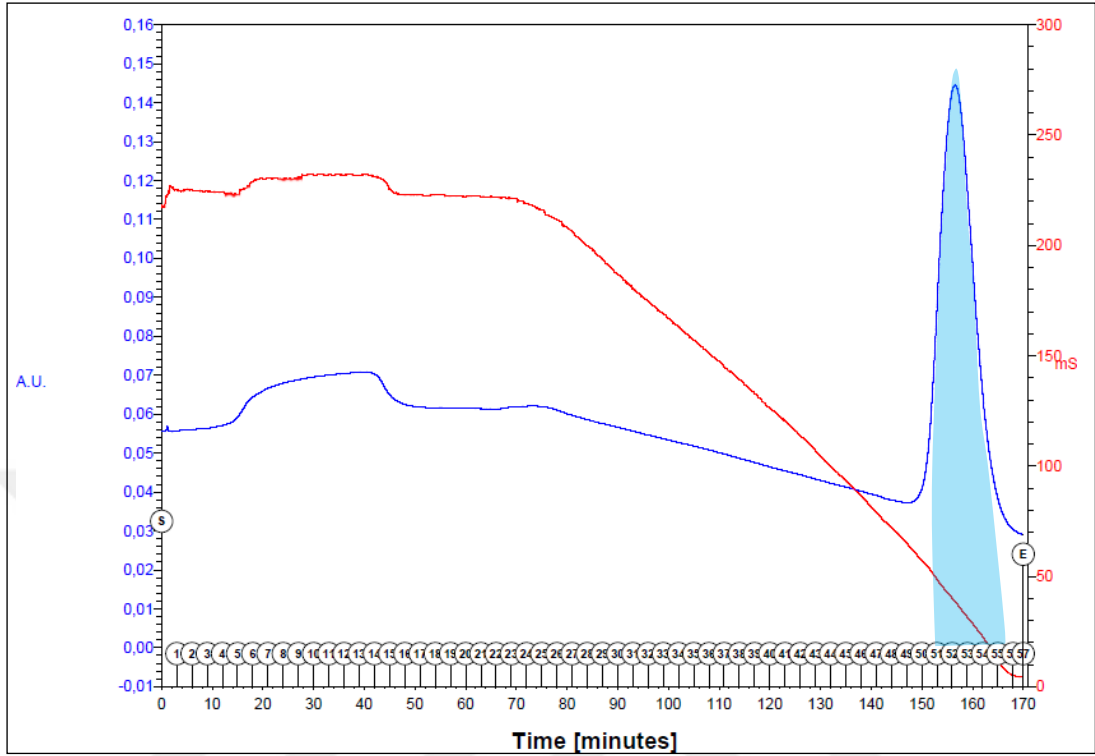
Mutant W137F–V184S–K111R enziminin iyon değişim kolon kromatografisi uygulamasıyla grafiği elde edilmiştir. Her tüpte GI aktivitesi arandı ve yapılan protein deneyleri sonucunda 30-35 nolu fraksiyonlarda GI aktivitesi saptandı (şekil 89).



şekil 90. W137F – V184S – K111R'ye ait iyon değişim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini (A: Protein Miktarı Tayini, B: GI Aktivitesi)

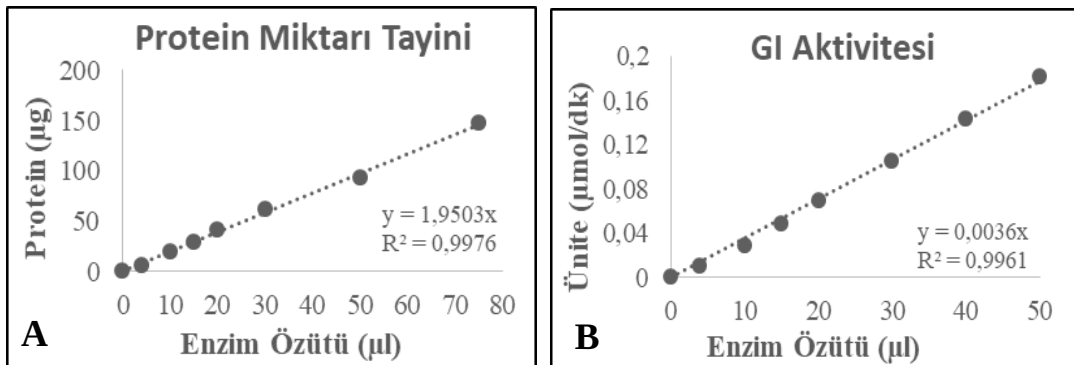
W137F – V184S – K111R mutant enzimin iyon değişimi kolon kromatografisi yöntemi ile saflaştırması sonrası elde edilen enzim özütündeki protein miktarı 3,2195 µg/µl olarak hesaplandı. 10 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite deneyi sonucunda, 1 µl enzim özütünde GI Aktivitesi $0,0038 \times 10 = 0,038$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı (şekil 90).

3.10.4. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması



Şekil 91. W137F-V184S-K111R'ye ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulaması grafiği

Mutant W137F-V184S-K111R enziminin hidrofobik kolon kromatografisi uygulamasıyla grafiği elde edilmiştir. Her tüpte GI aktivitesi arandı ve yapılan protein deneyleri sonucunda 51-55 nolu fraksiyonlarda GI aktivitesi saptandı (Şekil 91).



Şekil 92. W137F - V184S - K111R'ye ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini (A: Protein Miktarı Tayini, B:GI Aktivitesi)

W137F–V184S–K111R mutant enzimin hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulaması ardından enzim özütündeki protein miktarı 1,9503 µg/µl olarak bulundu. GI aktivite deneyi 10 kat sulandırılarak yapıldı ve deney sonucunda GI aktivitesi, 1 µl enzim özütünde $0,0036 \times 10 = 0,036$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı (Şekil 92).

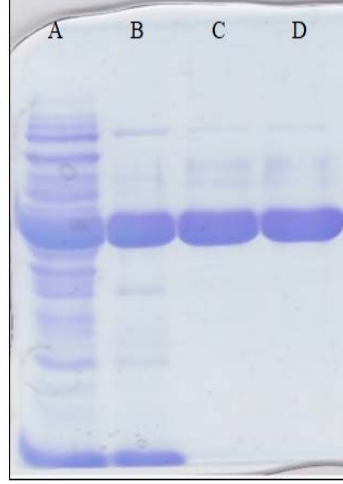
3.10.5. W137F – V184S – K111R’nin Saflaştırma Tablosu

Tablo 16. W137F – V184S – K111R’nin saflaştırma basamaklarına ait saflaştırma tablosu

Saflaştırma Basamakları	T.Hacim (ml)	Protein (mg/ml)	T.Protein (mg)	Aktivite (µmol/dk/µl)	T.Aktivite (µmol/dk)	S.Aktivite (µmol/dk mg protein)	Verim	Saflaştırma katı
Kaba Ekstrakt	21	6,55	137,45	0,036	756,0	5,500	100,0	1
Isı Şoku	18,2	5,76	104,75	0,038	691,6	6,602	91,5	1,20
İyon Değişim	16	3,22	51,51	0,038	608,0	1,803	80,4	2,15
Hidrofobik Etkileşim	13,18	1,95	25,70	0,036	474,5	8,459	62,8	3,36

Tablo 16’daki verilerden de görüleceği üzere tüm saflaştırma uygulamaları başarılı olmuştur. Enzimin özgün aktivitesi, saflaştırmanın ardından 5,5’den 8,459 µmol/dk/mg protein’e yükselirken enzim %62,8 verim ile 3,36 kat saflaştırıldı. Hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulamasının ardından bir araya getirilerek birleştirilen fraksiyonlar karakterizasyon çalışmalarında saf enzim özütü olarak kullanıldı.

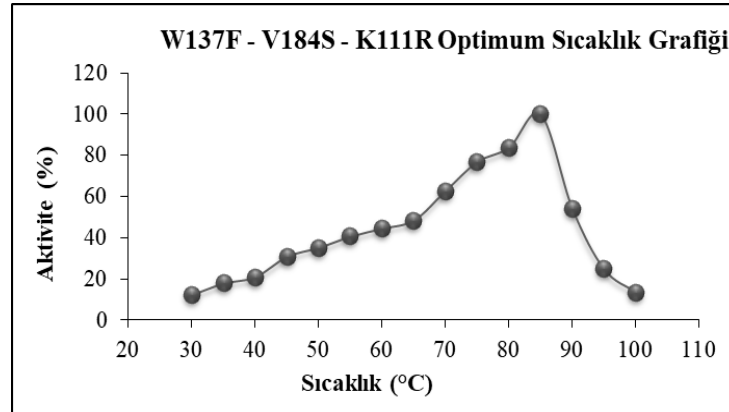
3.10.6. W137F–V184S–K111R Mutant Enziminin Saflaştırılmasına Ait SDS-PAGE Analizi



Şekil 93. W137F – V184S – K111R’nin saflaştırılmasına ait SDS-PAGE analizi

W137F – V184S – K111R mutant enziminin saflaştırma pratiklerinin ardından SDS–PAGE metodu için elde edilen özütlerinden 20 µl kadar alınarak jele yüklenerek yürütme işlemi gerçekleştirildi. Şekil 93’te de GI’nın büyük oranda saflaştırıldığı görülmektedir (A: Kaba ekstrakt, B: Işı Şoku uygulaması sonrası enzim özütü, C: İyon değişim kolon kromatografisi sonrası enzim özütü, D: Hidrofobik kolon kromatografisi sonrası enzim özütü)

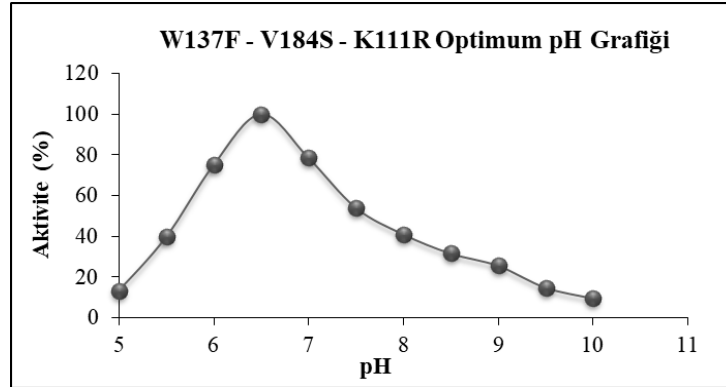
3.10.7. Optimum Sıcaklık



Şekil 94. W137F – V184S – K111R’nin Optimum Sıcaklık Grafiği

W137F–V184S–K111R mutant enziminin en iyi çalıştığı sıcaklık, grafikten de görüleceği üzere 85°C’dir (Şekil 94).

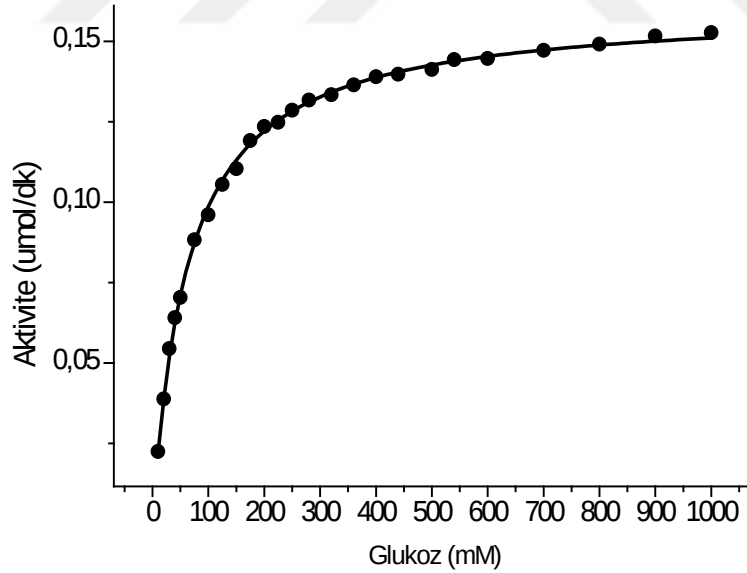
3.10.8. Optimum pH



Şekil 95. W137F – V184S – K111R’nin Optimum pH Grafiği

W137F–V184S–V101R mutant enziminin en iyi çalıştığı pH, grafikten de görüleceği üzere 6,5’dir (Şekil 95). Yapılan mutasyonun enzimin optimum pH değerinde herhangi bir değişikliğe sebebiyet vermediği anlaşılmıştır.

3.10.9. Kinetik Çalışmalar



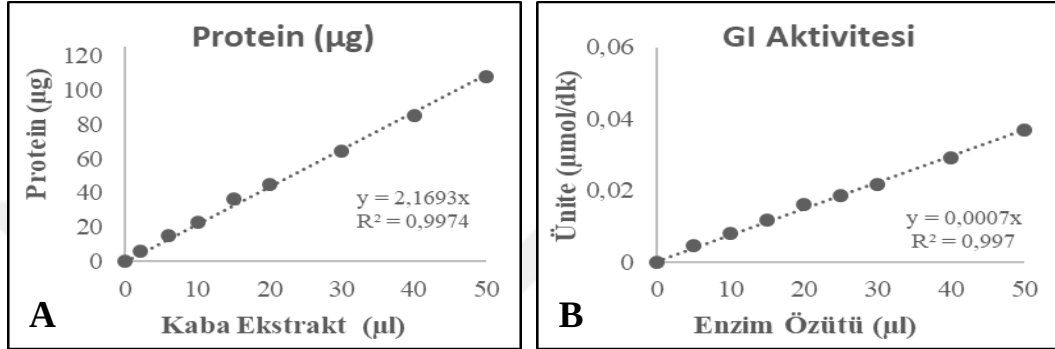
Şekil 96. W137F – V184S – K111R mutant enzimine ait Michaelis-Menten eğrisi

Gerçekleştirilen reaksiyonlarda 2 µl saf enzim özütü (3,9 µg protein) varlığında analizleri yapıldı. Yapılan analizler neticesinde enzimin K_m değeri $62,89 \pm 1,05$ mM, V_{max} değeri ise $41,18 \pm 0,15$ µmol/dk/mg protein olarak hesaplandı (r^2 : 0,9988). Bu

veriler kullanılarak k_{cat} değeri 34,34 1/sn olarak hesaplandı. Katalitik etkinlik değerini belirten k_{cat}/K_m 'nin de hesaplanmasıyla 0,545 değerine ulaşıldı (Şekil 96).

3.11. W137F–V184S–V101R Mutant Enziminin Saflaştırması ve Karakterizasyonu

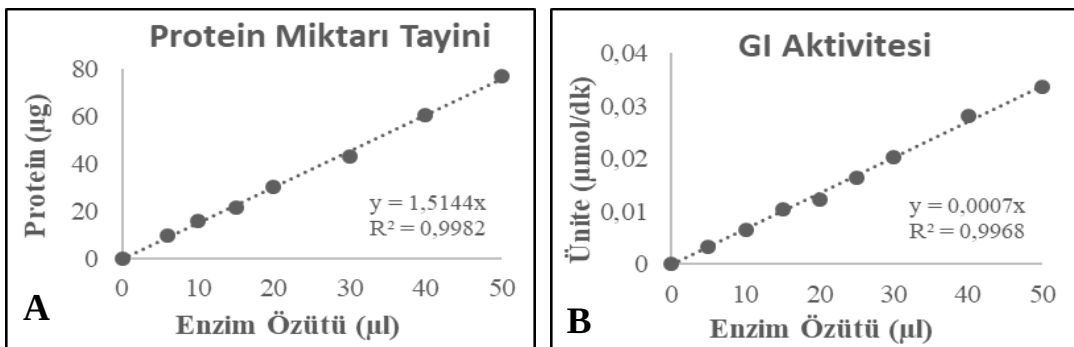
3.11.1. Kaba Ekstrakt



Şekil 97. W137F – V184S – V101R'nin kaba ekstraktında protein ve GI aktivitesi tayini (A: Protein Miktarı Tayini, B: GI Aktivitesi)

W137F–V184S–V101R üçlü mutant enziminin kaba ekstraktının protein miktarı 2,1693 µg/µl olarak bulundu. GI aktivite deneyi 10 kat sulandırılarak yapıldı ve deney sonucunda GI aktivitesi, 1 µl enzim özütünde $0,0007 \times 10 = 0,007$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı (Şekil 97).

3.11.2. Isı Dejenerasyonu Uygulaması

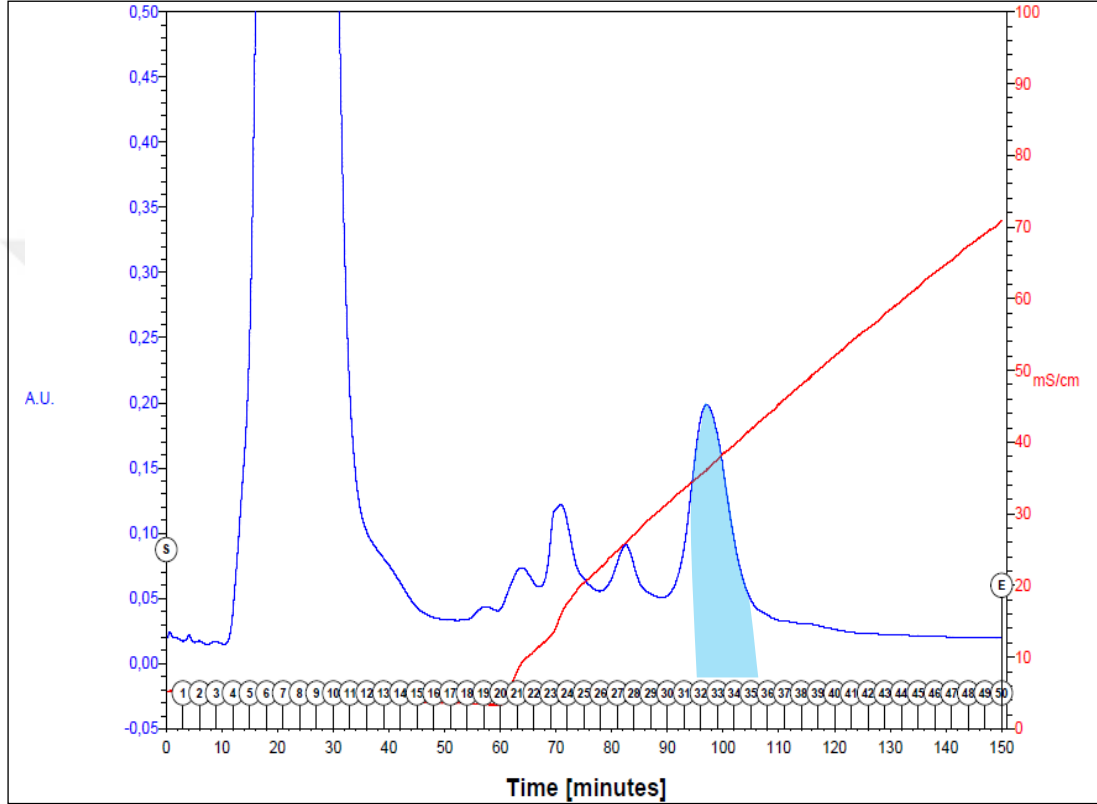


Şekil 98. W137F–V184S–V101R'nin ısı dejenerasyonu sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini (A: Protein Miktarı Tayini, B: GI Aktivitesi)

Mutant enzimlerden üçlü W137F–V184S–V101R'ye ait kaba ekstraktın ısı dejenerasyonuna maruz bırakılması sonrası özütteki protein miktarı 1,5144 µg/µl olarak

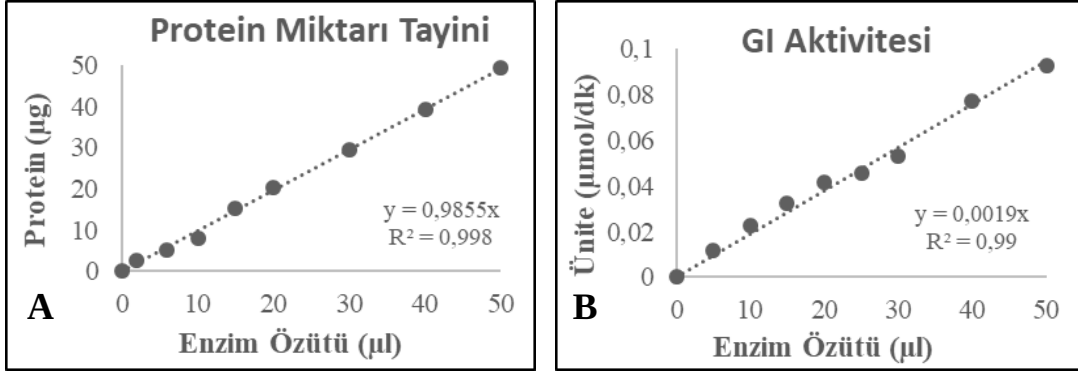
bulundu. GI aktivite deneyi 10 kat sulandırılarak yapıldı ve deney sonucunda GI aktivitesi, 1 µl enzim özütünde $0,0007 \times 10 = 0,007 \mu\text{mol/dk}$ (Ünite) olarak hesaplandı (Şekil 98).

3.11.3. İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması



Şekil 99. W137F–V184S–V101R'ye ait iyon değişim kolon kromatografisi uygulaması grafiği

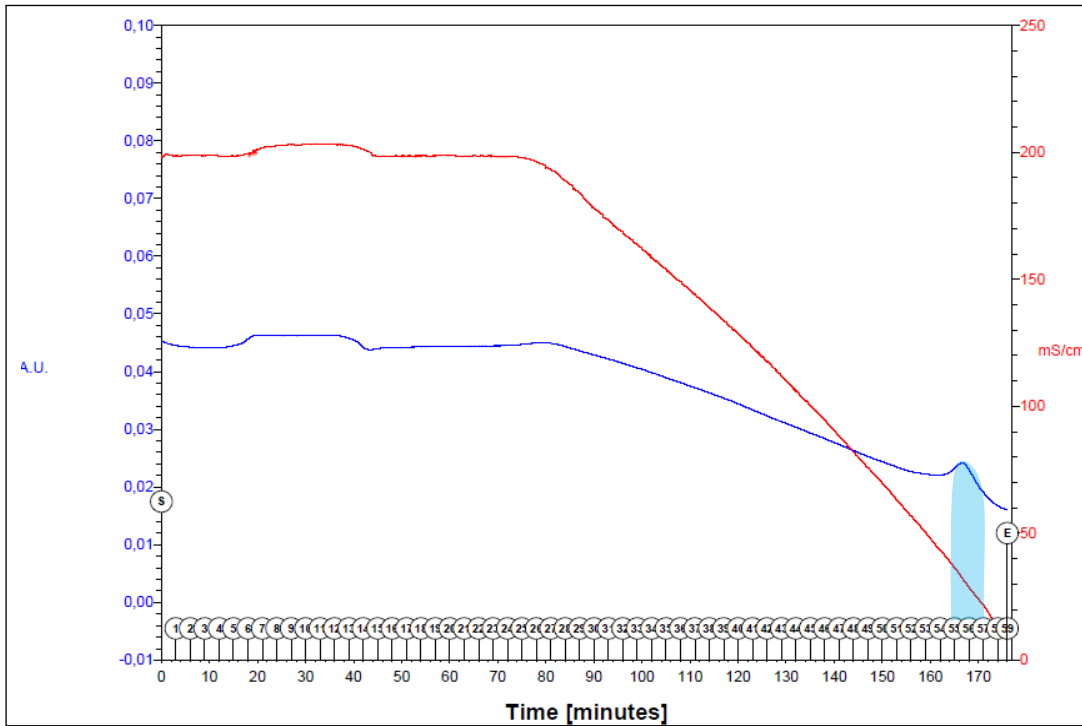
Mutant W137F–V184S–V101R enziminin iyon değişim kolon kromatografisi uygulamasıyla grafiği elde edilmiştir. Her tüpte GI aktivitesi arandı ve yapılan protein deneyleri sonucunda 32-35 nolu fraksiyonlarda GI aktivitesi saptandı (Şekil 99).



Şekil 100. W137F–V184S–V101R'ye ait iyon değişim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini (A: Protein Miktarı Tayini, B: GI Aktivitesi)

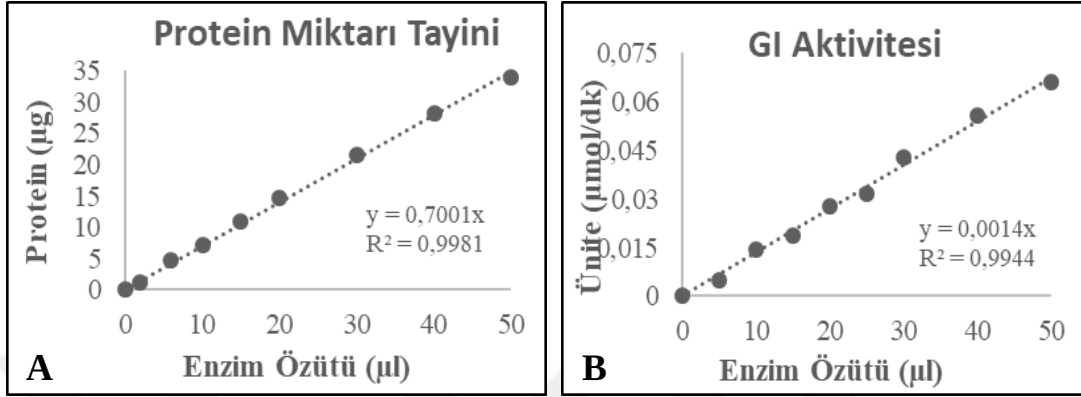
Mutant enzimlerden üçlü W137F–V184S–V101R'nin iyon değişimi kolon kromatografisi uygulaması ardından enzim özütündeki protein miktarı 0,9855 µg/µl olarak bulundu. GI aktivite deneyi 4 kat sulandırılarak yapıldı ve deney sonucunda GI aktivitesi, 1 µl enzim özütünde $0,0019 \times 4 = 0,0076$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı (Şekil 100).

3.11.4. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması



Şekil 101. W137F–V184S–V101R'ye ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulaması grafiği

Mutant W137F–V184S–V101R enziminin hidrofobik kolon kromatografisi uygulamasıyla grafiği elde edilmiştir. Her tüpte GI aktivitesi arandı ve yapılan protein deneyleri sonucunda 55-58 nolu fraksiyonlarda GI aktivitesi saptandı (Şekil 101).



Şekil 102. W137F–V184S–V101R'ye ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütte protein ve GI aktivitesi tayini (A: Protein Miktarı Tayini, B: GI Aktivitesi)

W137F–V184S–V101R mutant enzimin hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulaması ardından enzim özütündeki protein miktarı 0,7001µg/µl olarak bulundu. GI aktivite deneyi 5 kat sulandırılarak yapıldı ve deney sonucunda GI aktivitesi, 1 µl enzim özütünde $0,0014 \times 5 = 0,070$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı (Şekil 102).

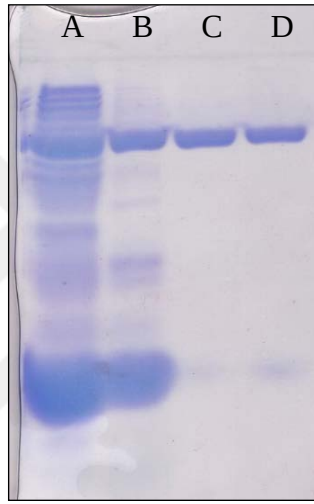
3.11.5. W137F–V184S–V101R'nin Saflaştırma Tablosu

Tablo 17. W137F–V184S–V101R'nin saflaştırma basamaklarına ait saflaştırma tablosu

Saflaştırma Basamakları	T.Hacim (ml)	Protein (mg/ml)	T.Protein (mg)	Aktivite (µmol/dk/µl)	T.Aktivite (µmol/dk)	S.Aktivite (µmol/dk/mg protein)	Verim	Saflaştırma katı
Kaba Ekstrakt	14	2,17	30,37	0,007	98	3,227	100	1
Isı Şoku	12	1,51	18,17	0,007	84	4,622	85,7	1,43
İyon değişim	10,5	0,99	10,35	0,0076	79	7,7	81,4	2,39
Hidrofobik Etkileşim	10	0,70	7,0	0,007	70	10,0	71,4	3,10

Tablo 17'deki verilerden de görüleceği üzere tüm saflaştırma uygulamaları başarılı olmuştur. Enzimin özgün aktivitesi, saflaştırmanın ardından 3,227'den 10 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein'e yükselirken enzim %71,4 verim ile 3,10 kat saflaştırıldı. Hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulamasının ardından bir araya getirilerek birleştirilen fraksiyonlar karakterizasyon çalışmalarında saf enzim özütü olarak kullanıldı.

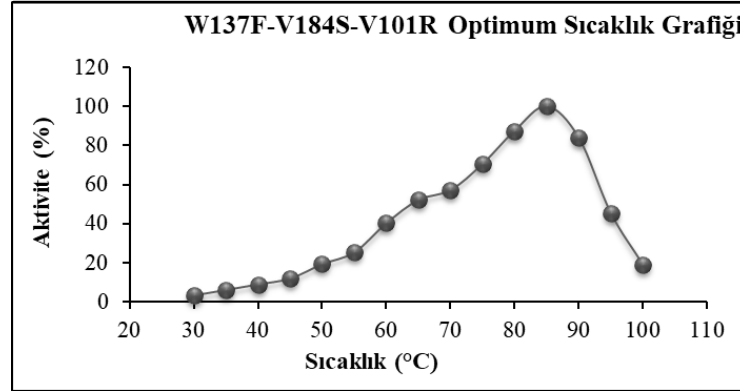
3.11.6. W137F–V184S–V101R Mutant Enziminin Saflaştırılmasına Ait SDS-PAGE Analizi



Şekil 103. W137F–V184S–V101R'nin saflaştırılmasına ait SDS-PAGE analizi

W137F–V184S–V101R mutant enziminin saflaştırma pratiklerinin ardından SDS–PAGE metodu için elde edilen özütlerinden 20 μl kadar alınarak jele yüklenerek yürütme işlemi gerçekleştirildi. Şekil 103'te de GI'nın büyük oranda saflaştırıldığı görülmektedir (A: Kaba ekstrakt, B: Işı Şoku uygulaması sonrası enzim özütü, C: İyon değişim kolon kromatografisi sonrası enzim özütü, D: Hidrofobik kolon kromatografisi sonrası enzim özütü)

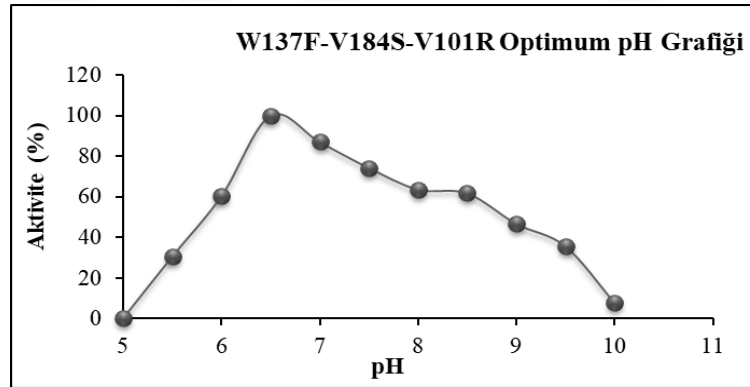
3.11.7. Optimum Sıcaklık



Şekil 104. W137F-V184S-V101R'nin Optimum Sıcaklık Grafiği

W137F-V184S-V101R mutant enziminin en iyi çalıştığı sıcaklık, grafikten de görüleceği üzere 85°C'dir (Şekil 104). Yapılan mutasyonun enzimin optimum çalışma sıcaklığında herhangi bir değişikliğe sebebiyet vermediği anlaşılmıştır.

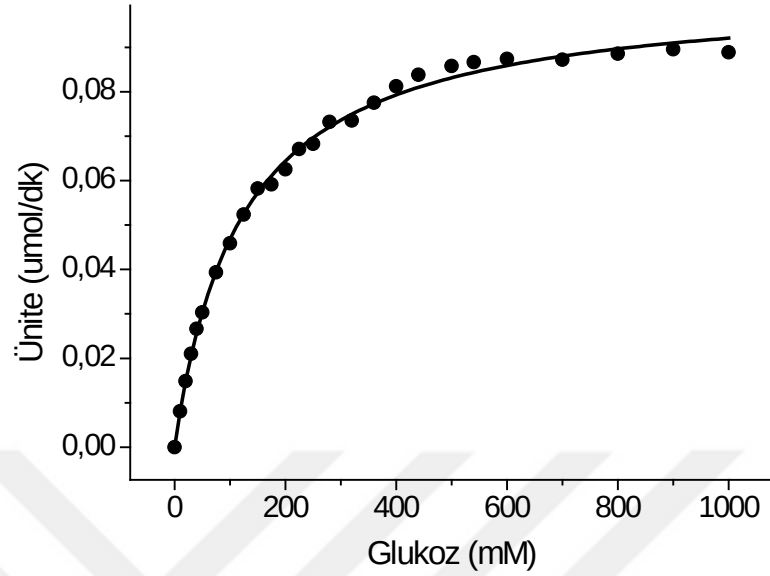
3.11.8. Optimum pH



Şekil 105. W137F-V184S-V101R'nin Optimum pH Grafiği

W137F-V184S-V101R mutant enziminin en iyi çalıştığı pH, grafikten de görüleceği üzere 6,5'dir (Şekil 105). Yapılan mutasyonun enzimin optimum pH değerinde herhangi bir değişikliğe sebebiyet vermediği anlaşılmıştır.

3.11.9. Kinetik Çalışmalar



Şekil 106. W137F-V184S-V101R mutant enzimine ait Michaelis-Menten eğrisi

Gerçekleştirilen reaksiyonlarda 2 µl saf enzim özütü (1,400 µg protein) varlığında analizleri yapıldı. Yapılan analizler neticesinde enzimin K_m değeri $120,29 \pm 4,04$ mM, V_{max} değeri ise $73,69 \pm 0,071$ µmol/dk/mg protein olarak hesaplandı (r^2 : 0,99636). Bu veriler kullanılarak k_{cat} değeri 61,47 1/sn olarak hesaplandı. Katalitik etkinlik değerini belirten k_{cat}/K_m 'nin de hesaplanmasıyla 0,511 değerine ulaşıldı (Şekil 106).

4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Glukozu fruktoza izomerizasyonunu sağlayan GI, endüstriyel alanda hemiselülozlardan etanol üretimi ve özellikle HFCS üretimi için oldukça önemli bir enzimdir. Endüstriyel süreçlerdeki önemli rolünden dolayı birçok araştırma mevcut olup halen istikrarını sürdürmektedir. Özellikle gıda sektöründe beklentiler arasında, enzimin; daha verimli, daha uzun bir yarılanma ömrüne sahip, daha düşük optimum pH değerlerinde çalışabilmesi ve özellikle ısıl kararlılığın artırılması özelliklerine ihtiyaç duyulmakta ve tercih edilmektedir. Enzimin ısıl kararlılığında artış niteliğinin olması, endüstriyel alanda da kullanımının artmasını beraberinde getirecektir. Günümüzde de hali hazırda kullanılan endüstriyel GI'lardan büyük bir çoğunluğu mutasyonlarla geliştirilmişlerdir.

Bu amaçla yapılan çalışmada pET-28a(+) vektörüne klonlanmış *Anoxybacillus gonensis* G2^T ye ait glukoz izomerazı (pETG2GI) ve mutant enzimler mezofilik konak hücre olan *E. coli* BL21(DE3) suşu içerisinde fazla miktarda üretilerek, ekspresyon işlemi için kullanıldı. Ardından izole edildi ve mutant enzimler kolon kromatografisi yöntemiyle saflaştırılarak, biyokimyasal karakterizasyon çalışmaları yapıldı.

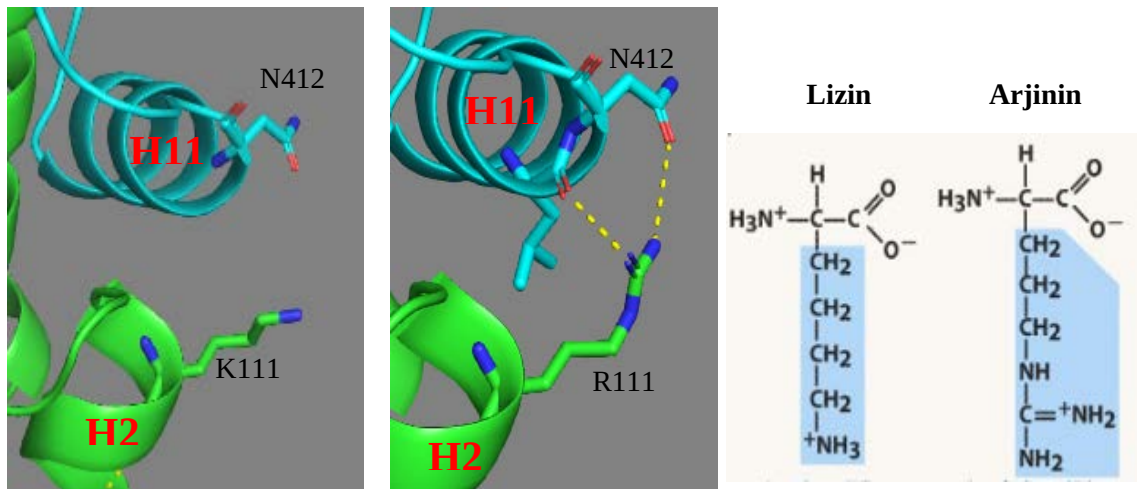
Tablo 18. AgoGI ve mutant enzimlerin kinetik parametreler açısından karşılaştırılması

	K_m (mM)	V_{max} (μ mol/dk/mg protein)	k_{cat} (1/sn)	k_{cat}/K_m
AgoGI	124,45 $\pm$ 2,99	39,6 $\pm$ 0,79	33,03	0,266
K111R	120,08 $\pm$ 2,66	45,63 $\pm$ 0,29	38,06	0,317
L313I	114,80 $\pm$ 3,25	31,80 $\pm$ 0,25	26,53	0,230
V101R	179,26 $\pm$ 5,33	57,54 $\pm$ 0,58	48,00	0,268
A353G	100,23 $\pm$ 3,75	46,13 $\pm$ 0,46	38,47	0,383
T428E	199,46 $\pm$ 7,04	49,16 $\pm$ 0,61	41,01	0,205
T428S	196,49 $\pm$ 4,06	39,09 $\pm$ 0,3	32,60	0,166
V101R/K111R	130,06 $\pm$ 1,55	72,40 $\pm$ 0,26	60,40	0,464
W137F/V184S/K111R	62,89 $\pm$ 1,05	41,18 $\pm$ 0,15	34,34	0,545
W137F-V184S-I372V	120,29 $\pm$ 4,04	73,69 $\pm$ 0,71	61,47	0,511

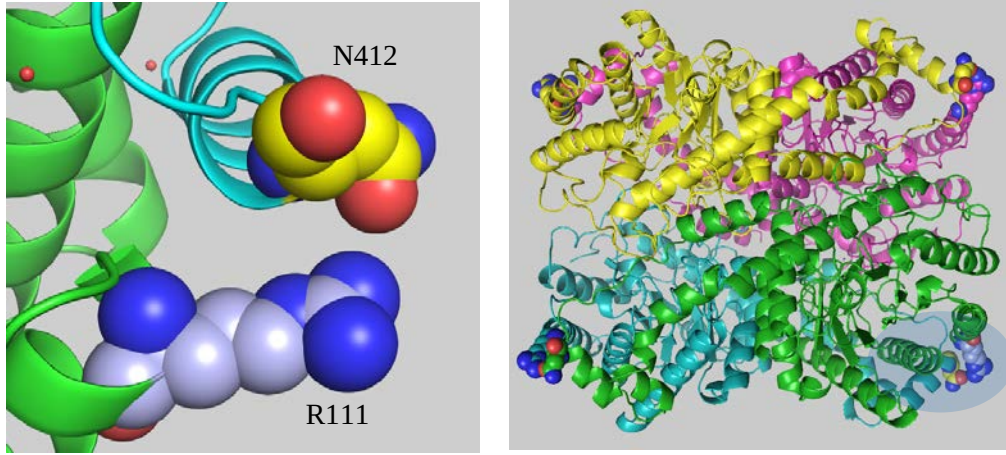
Enzimin ısı kararlılığını arttırmak üzere enzimin 8 noktasında; K111R, L313I, V101R, A353G/F/W ve T428E/S mutasyonları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, pozitif sonuç veren V101R ve K111R mutasyonları birlikte denenerek V101R/K111R mutasyonu gerçekleştirilmiştir. Isıl kararlılıkta artışa sebep olan V101R ve K111R mutasyonları katalitik etkinliği 10 kat arttıran W137F/V184S mutanıtı ile birlikte denenerek W137F/V184S/K111R ve W137F/V184S/V101R mutasyonları gerçekleştirilmiştir. Tüm mutant GI'ların biyokimyasal özellikleri ve kinetik parametreleri de saptanarak mutant enzimlerin doğal enzimle olan karşılaştırılması yapılmıştır (Tablo 18).

4.1. K111R Mutasyonunun Değerlendirilmesi

A. gonensis GI'sında 111. amino asit olan Lizin (K) Arjinin (R) amino asidi ile değiştirilerek K111R mutasyonu gerçekleştirildi. Her 2 amino asitte pozitif yüklü olup arjinin lizinden biraz daha uzundur ve 2 amino bölgesi vardır (Şekil 107). 111. Amino asit H2 α -heliksinde bulunmaktadır. Enzimin kuaterner yapısında bir zincirin (şekilde yeşil renkli) H2 α -heliksi ile diğer zincirin (şekilde mavi renkli) H11 α -heliksi karşı karşıya gelmektedir. 111. Bölgede lizin varlığında her iki bölge arasında herhangi bir etkileşim bulunmamaktadır. K111R mutasyonu sonucu ise arjinin hem H11 α -heliksini ile (peptit bağındaki karboksil grubunun oksijeni ile) hem de H11 α -heliksinin içinde yer alan ve 412 nolu amino asit olan aparajin ile (N412) iki adet hidrojen bağı etkileşimi yapmaktadır.

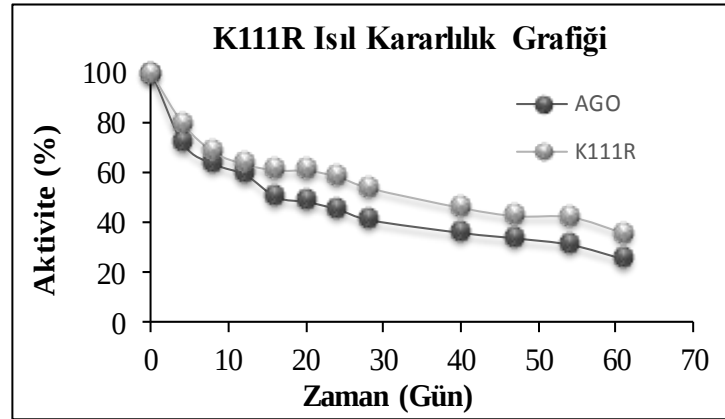


Şekil 107. K111R mutasyonuna ait üç boyutlu modelleme



Şekil 108. K111R mutasyonu sonrası R111-N412 amino asitleri arasındaki etkileşim ve bu noktaların enzim üzerindeki koordinasyonu

GI enzimi homo tetramerdir ve her kısımdan 4 tekrar bulunur. Yapılan K111R mutasyonu ile enzimin tümünde, 4 farklı bölgede 8 adet hidrojen bağı etkileşimi meydana getirilmiştir. K111R mutasyonu ile enzimin kuaterner yapısının daha da kararlı hale gelmesi sağlanmıştır (Şekil 108). Bölgenin enzimin uç kısmında olması ve aktif bölgeden oldukça uzak bir konumda olması sebebiyle mutasyonun enzimin kinetik parametrelerinde bir değişime sebep olmaması beklenmektedir. Yukarıda bahsedilen hidrojen bağı etkileşimlerinde dolayı ise ısı kararlılığında artış beklenmektedir.



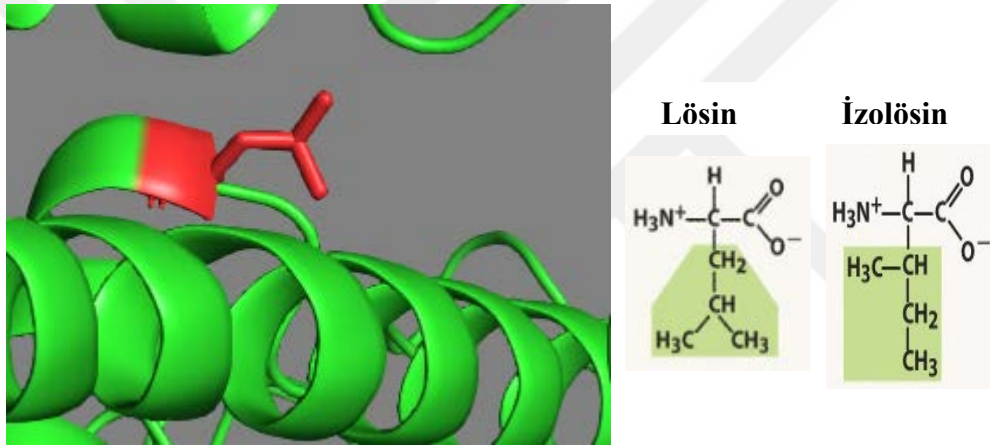
Şekil 109. K111R'nın ısı kararlılık grafiği

Tablo 18 incelenecek olursa yapılan K111R mutasyonu, *A. gonensis* GI'sının K_m 'sinde hafif bir azalmaya V_{max} , k_{cat} ve katalitik etkinlik değerlerinde ise hafif bir artışa neden olarak enzimin kinetik parametrelerini geliştirmiştir. Beklendiği üzere K111R mutasyonu enzimin ısı kararlılığında önemli bir artışa neden olarak enzimin yarılanma ömrü 19 günden 37 güne çıkarmıştır (Şekil 109). Bu açıdan K111R mutasyonu tezin

konusunu oluşturan ısı kararlılığın geliştirilmesi yönüyle başarıya ulaşmış ilk mutasyon noktası olarak göze çarpmaktadır.

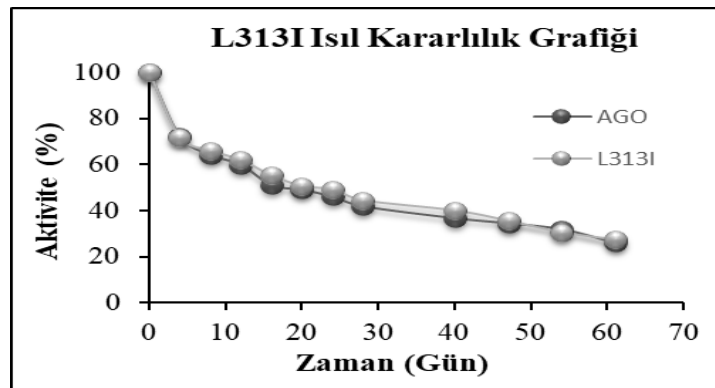
4.2. L313I Mutasyonunun Değerlendirilmesi

A. gonensis GI'sında 313. lösin (L) amino asidi izolösün (I) amino asidi ile değiştirilerek L313I mutasyonu gerçekleştirildi. 323. amino asit H7 α -heliksinde bulunur ve etrafında etkileşim yapacağı bir hidrofobik bölge bulunmamaktadır. Bu doğrultuda L313I mutasyonunun enzimin kinetik ve biyokimyasal parametrelerinden bir değişime neden olması beklenmemektedir (Şekil 110).



Şekil 110. L313I mutasyonuna ait üç boyutlu modelleme

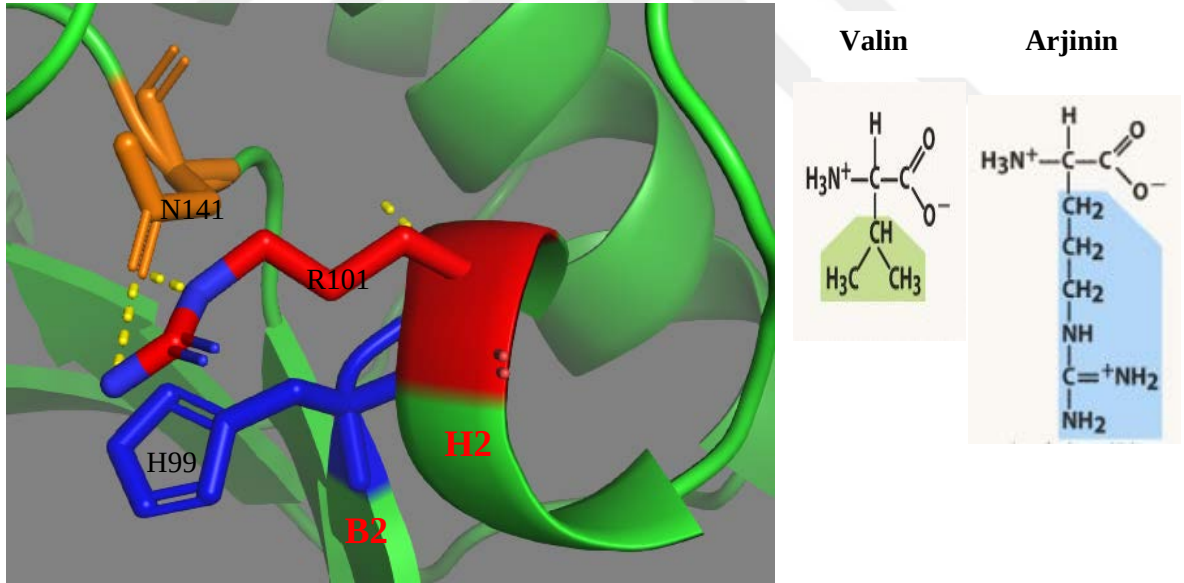
Çizelge 17 ve Şekil 111 incelenecek olursa, beklenildiği üzere, L313I mutasyonu enzimin hiçbir biyokimyasal ve kinetik parametreleri üzerinde önemli bir değişiklik meydana getirmemiştir.



Şekil 111. L313I ısı kararlılık grafiği

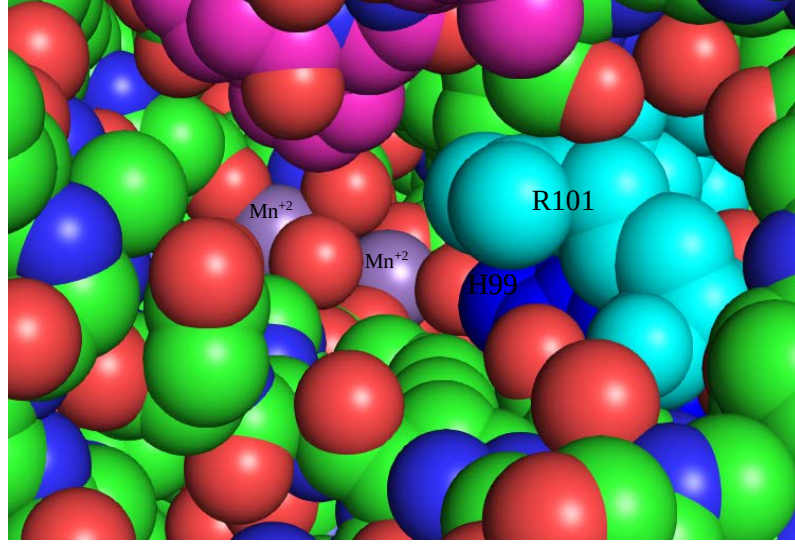
4.3. V101R Mutasyonunun Değerlendirilmesi

A. gonensis GI'sında 101. amino asit olan Valinin (K) Arjinin (R) amino asidi ile değiştirilmesi ile V101R mutasyonu gerçekleştirildi. Valinin hidrofilik bir amino asit olmasına rağmen arjinin pozitif yüklü bir amino asit olup valinden çok daha uzundur. *A. gonensis* GI'sında 101. amino asit olan valin enzimin aktif bölgesindedir enzimin en can alıcı noktasında bulunmaktadır. Hemen alt kısmında bulunan B2 β -levha tabakasında H99 amino asidi bulunmaktadır ki bu amino asit zincir açma reaksiyonunu başlatan amino asittir. Burada meydana getirilecek her mutasyonunu enzimin kritik parametrelerini değiştirmesi oldukça muhtemel gözükmemektedir. V101R mutasyonu sonucu yerleştirilen arjinin hemen yakınında bulunan 141. Amino asit olan asparajin (N141) ile 2 farklı şekilde hidrojen bağı yapar (Şekil 112). Bu etkileşim bu bölgede valinin varlığında mümkün değildir. Hidrojen bağı etkileşimde artış nedeniyle enzimin ısı kararlılığında artış beklenmektedir.



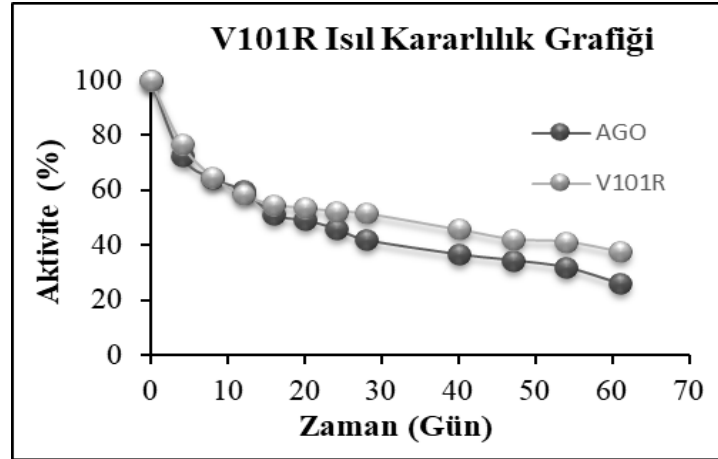
Şekil 112. V101R mutasyonuna ait üç boyutlu modelleme

Şekil 112 incelenecek olursa kısa olan valinin yerine uzun olan asparajinin yerleştirilmesi sonucunda enzimin aktif bölgesinde büyük ölçekli bir daralma söz konusudur. Arjininin, kritik olan histidin amino asidinin, substrat olan glukoz ile etkileşimini azaltma potansiyeli oldukça yüksektir. Doğal olarak enzimin substrata olan ilgisinde azalma yani K_m değerinde artış beklenmektedir.



Şekil 113. GI'nın aktif bölgesinde V101R mutasyonun gösterimi

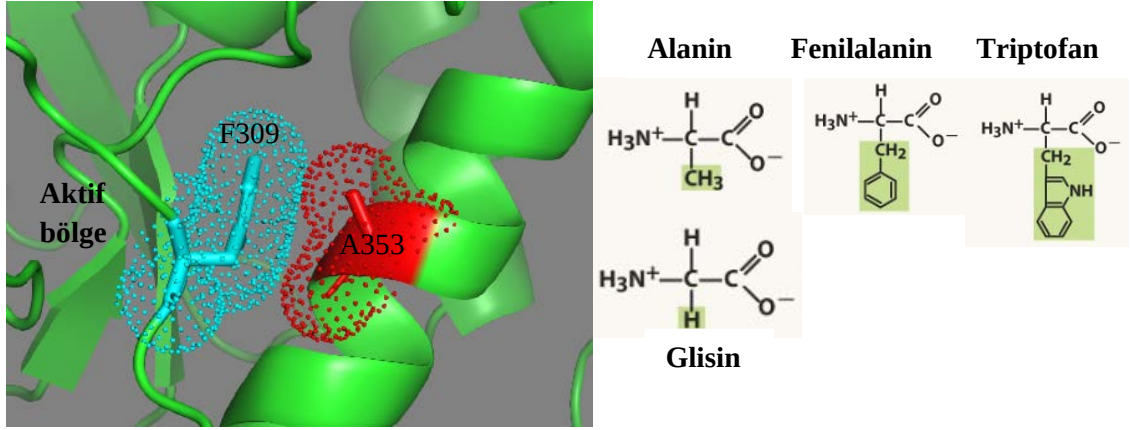
Çizelge 17 incelenecek olursa V101R mutasyonu ile beklenildiği gibi enzimin K_m değerinde çok büyük bir artış gerçekleşmiş ve enzimin substrata olan ilgisi düşmüştür. Fakat ilginç bir şekilde enzimin V_{max} değeri de artmıştır. Bu durum arjininin, H99'un zinciri açmak için ihtiyaç duyduğu protonun desteklenmesi olarak açıklanabilir. V_{max} değerindeki artış K_m değerindeki artışı dengeleyerek, enzimin katalitik etkinlik ve k_{cat} değerlerinin azalmasını engellemiştir.



Şekil 114. V101R'nin ısı kararlılık grafiği

Beklendiği üzere V101R mutasyonu enzimin ısı kararlılığında önemli bir artışa neden olarak enzimin yarılanma ömrü 19 günden 31 güne çıkarmıştır (Şekil 114).

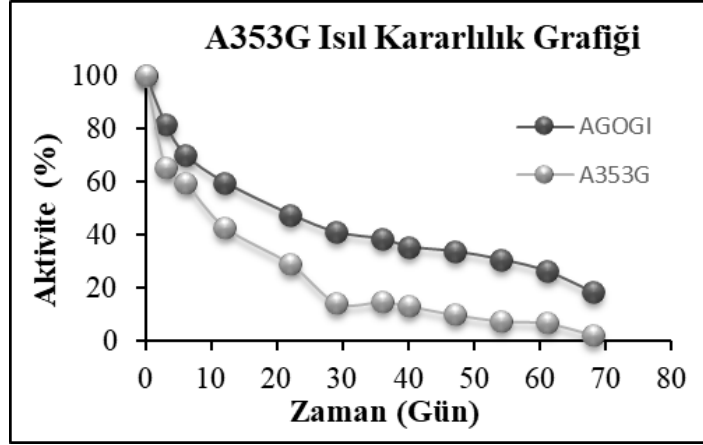
4.4. A353G, A353F ve A353W Mutasyonlarının Değerlendirilmesi



Şekil 115. A353G mutasyonuna ait üç boyutlu modelleme

A. gonensis GI'sında 353. amino asit olan Alaninin (A) Glisin (G) amino asidi ile değiştirilmesi ile A353G mutasyonu gerçekleştirildi. Alanin ve glisin bilinen en küçük hidrofobik karakterli amino asitlerdir. H8 α -heliksinde bulunan 353 amino asidindeki alaninin 309. Amino asit olan fenilalanin ile hidrofobik etkileşim göstermektedir. Daha küçük ve aynı karakterli olan glisinin bu bölgeye girmesi ile enzimin kinetik parametrelerinde bir değişiklik beklenmezken ısı kararlılığında düşüş beklenmektedir. Çünkü glisin alanine göre daha az hidrofobiktir ve fenilalanin ile yapacağı etkileşim azalacaktır.

Çizelge 17 incelenecek olursa A353G mutasyonu ile beklenildiği gibi enzimin kinetik parametrelerinde çok önemli bir değişim meydana gelmemiştir. Yabancı enzime göre K_m değeri ve V_{max} değeri biraz artarak turnover sayısı ve katalitik etkinliğinde hafif bir artış gözlenmiştir. Enzimin kinetik verilerinde ki bu artışın, Şekil 115'te de görüleceği üzere, bu etkileşim bölgesinin hemen aktif bölgenin yanında olmasından kaynaklandığı sanılmaktadır. Bir metil grubunun uzaklaştırılması bu bölgede alan oluşturarak muhtemelen aktif bölgedeki enzimatik reaksiyonun esnasında gerçekleşen fiziksel değişimlere daha olanak tanımıştır.



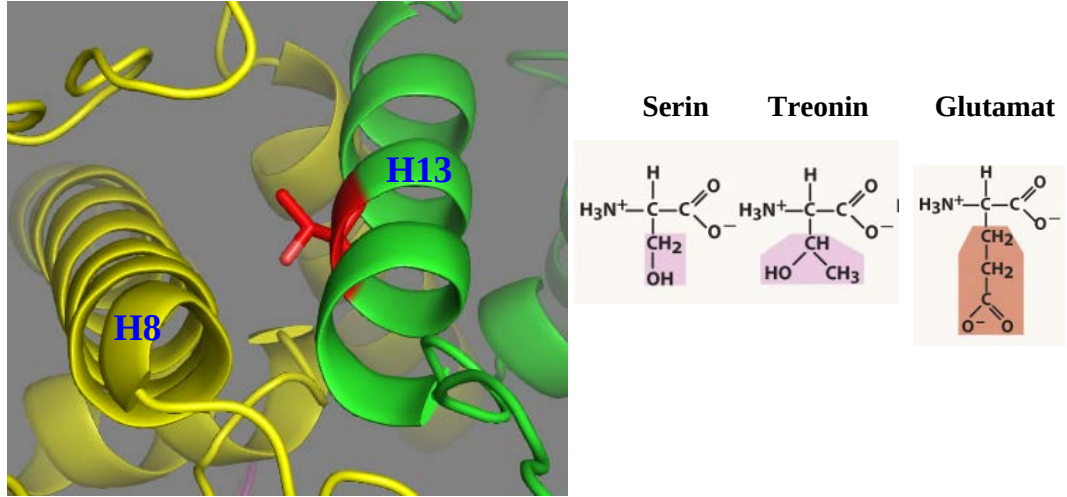
Şekil 116. A353G'nin ısı kararlılık grafiği

Beklenildiği üzere glisin fenilalanin ile daha az hidroforik etkileşim gösterdiğinden A353G mutasyonu ile enzimin ısı kararlılığında azalma meydana gelmiştir. Enzimin yarılanma ömrü 19 günden 9 güne düşmüştür.

Fenilalanin ve triptofan en büyük hidroforik karakterli amino asitlerdir. Şekil 115'te de görüleceği üzere, A353 amino asidi aktif bölgenin yanında yer almaktadır. Yapılan A353F ve A353W mutasyonları aktif bölgede bozulmalar meydana getirdiği için bu mutasyonlar sonucunda enzim aktivitesi gözlemlenememiştir.

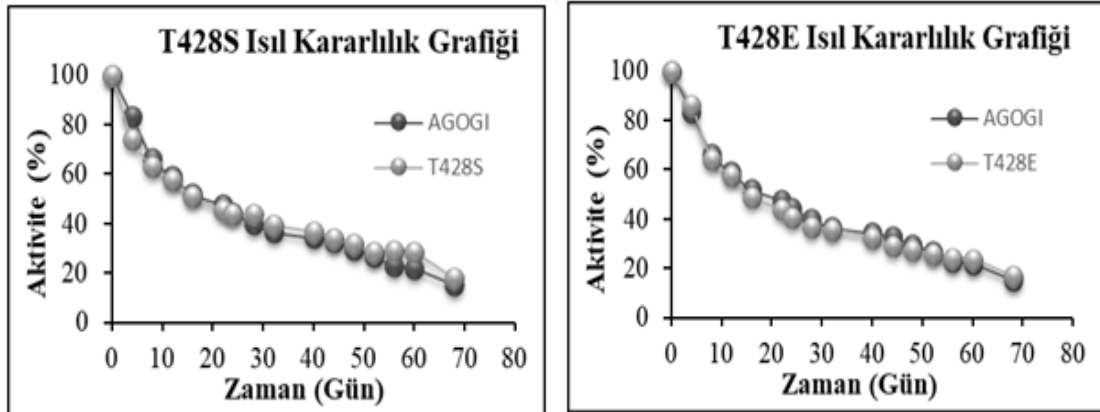
4.5. T428E veT428S Mutasyonlarının Değerlendirilmesi

A. gonensis GI'sında 428. amino asit olan Treoninin (T), Serin (S) amino asidi ile değiştirilmesi ile T428S ve Glutamat (E) amino asidi ile değiştirilmesi ile T428E mutasyonları gerçekleştirildi. Treonin ve serin bir OH grubu taşıyan yüksüz hidrofilik aminoasitlerdir. Glutamik asit ise negatif yüklü hidrofilik bir amino asittir ve treonin ve serine göre daha uzundur. *A. gonensis* GI'sının 428. amino asidi H13 α -heliksinde bulunur. Bir zincirin en uç kısmında olup diğer zincirin α -H8 heliksini tam karşısında bulunur (Şekil 117). Treoninin serine değiştirilmesi sonucu enzimin kinetik ve biyokimyasal parametrelerinde herhangi bir değişiklik beklenmemektedir. Glutamat ise karşı zincirdeki amino asitler ile etkileşebilir.



Şekil 117. T428S ve T428E mutasyonlarına ait üç boyutlu modelleme

Tablo 17 incelendiğinde her iki mutasyonunda enzimin K_m değerini oldukça arttırdığını ve mutant enzimlerin substrata olan ilgilerinin çok düştüğünü görülmektedir. Bu durum zincirler arası etkileşimin varlığını göstermektedir. Çünkü 428. amino asit aktif bölgeden çok uzaktadır. Quaterner yapıda meydana gelen etkileşim değişimleri aktif bölgenin şeklini bozmuş olma olasılığı çok yüksektir.



Şekil 118. T428S ve T428E'nin ısı kararlılık grafiği

T428S ve T428E mutasyonları yaban enzimin ısı kararlılığında önemli bir değişime neden olmamıştır (Şekil 118).

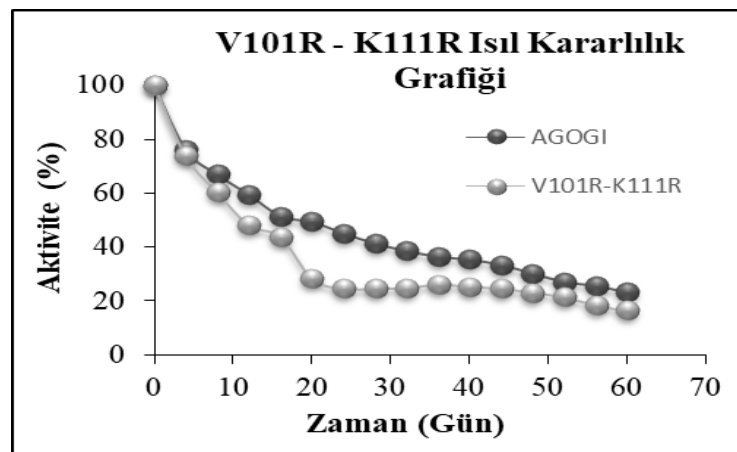
4.6.V101R – K111R Mutasyonunun Değerlendirilmesi

V101R ve K111R mutasyonları ile doğal enzimin ısıl kararlılığında artış sağlanmıştı. Her iki mutasyon, birlikte, *A. gonensis* GI'sında enzimi üzerinde denenerek ortak etkileri araştırıldı. Kinetik parametreler açısından değerlendirildiğinde çifte mutasyon enzimi oldukça geliştirmiştir. V101R'nin K_m değerindeki düşürücü etkisi V101R – K111R mutasyonunda görülmemektedir. Ayrıca mutant enzimin V_{max} değeri oldukça yükselmiştir (Tablo 19).

Tablo 19. V101R – K111R mutasyonunun değerlendirilmesi

	K_m	V_{max}	k_{cat}	k_{cat}/K_m	Ortalama yarılanma ömrü	Kaynak
AgoGI (Rekombinant)	124,45 ± 2,99	39,6 ± 0,79	33,03	0,266	19	Bu Çalışma
K111R	120,08 ± 2,66	45,63 ± 0,29	38,06	0,317	37	Bu Çalışma
V101R	179,26 ± 5,33	57,54 ± 0,58	48,00	0,268	31	Bu Çalışma
V101R- K111R	130,06 ± 1,55	72,40 ± 0,26	60,40	0,464	11,5	Bu Çalışma

Beklenmedik bir şekilde mutasyonların ısıl kararlılığı üzerinde olan artırıcı etkisi yok olmuş hatta yaban tip enzimin yarılanma ömrünün altına düşmüştür (Şekil 119).



Şekil 119. V101R-K111R'nin ısıl kararlılık grafiği

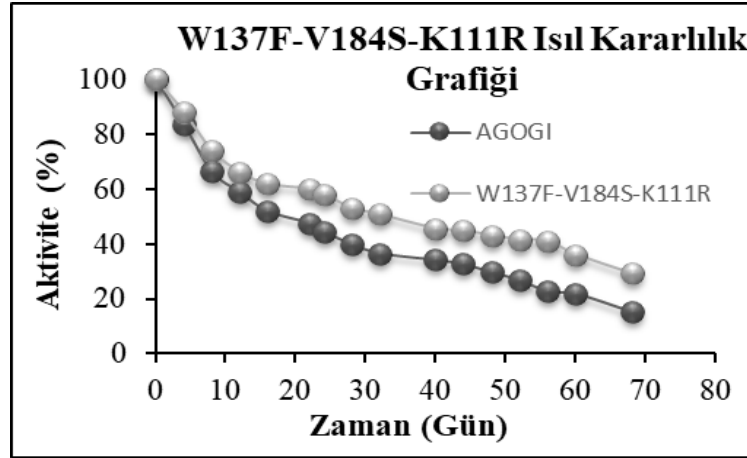
4.7. W137F–V184S–K111R Mutasyonunun Değerlendirilmesi

K111R mutasyonu ile yaban tip enzimin ısı kararlılığı arttırılarak enzimin yarılanma ömrü 19 günden 37 güne yükseltilmiştir. Başarı elde edilen bu mutasyonun, katalitik etkinliği oldukça arttırılmış olan W137F–V184S mutantında da denemesi TEZ çalışmamızın son aşamasını oluşturmaktadır. W137F–V184S–K111R başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Tablo 20’de de görüleceği üzere K111R mutasyonunun W137F–V184S mutant enzimin ısı kararlılığında artışa sebep olmuştur. Fakat yapılan 3. mutasyon ile enzimin katalitik etkinlik değeri 4 kat düşmüştür. Bu azalmanın en büyük sebebi K111R mutasyonunun düşük nitelikli kinetik parametrelere sahip olmasıdır.

Tablo 20. W137F–V184S–K111R mutasyonunun değerlendirilmesi

	K_m	V_{max}	k_{cat}	k_{cat}/K_m	Ortalama yarılanma ömrü	Kaynak
AgoGI (Rekombinant)	124,45 ± 2,99	39,6 ± 0,79	33,03	0,266	19	Bu Çalışma
W137F – V184S	39,29 ± 2,87	99,71 ± 1,83	83,17	2,116	19	Karaoğlu, 2010
K111R	120,08 ± 2,66	45,63 ± 0,29	38,06	0,317	37	Bu Çalışma
W137F –V184S –K111I	62,89 ± 1,05	41,18 ± 0,15	34,34	0,545	33	Bu Çalışma

Buna rağmen, sonuçta açığa çıkan W137F–V184S–K111R mutant enzimi AgoGI’ya göre hem kinetik parametreleri açısından hem de ısı kararlılığı açısından (Şekil 120) oldukça üstün nitelikler taşımaktadır.



Şekil 120. W137F-V184S-K111R'nin Isıl Kararlılık Grafiği

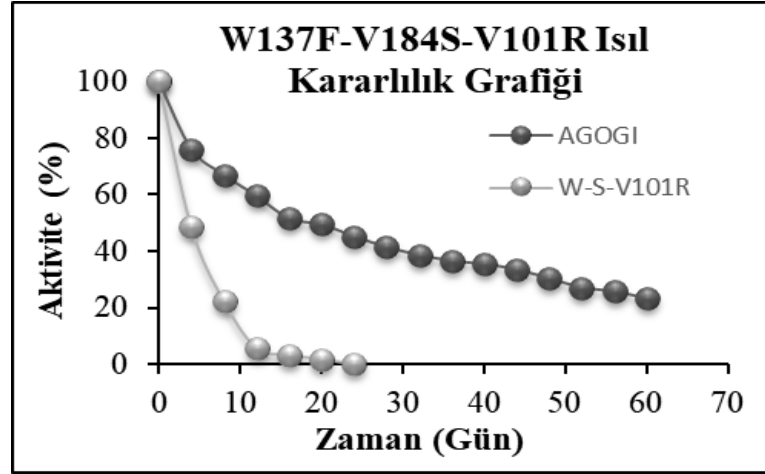
4.8. W137F-V184S-V101R Mutasyonunun Değerlendirilmesi

V101R mutasyonu ile yaban tip enzimin ısı kararlılığı arttırılarak enzimin yarılanma ömrü 19 günden 31 güne yükseltilmiştir. Başarı elde edilen bu mutasyon katalitik etkinliği oldukça arttırılmış olan W137F-V184S mutantında denenerek, W137F-V184S-V101R üçlü mutasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. V101R'nin ikili mutasyonlarında da olduğu gibi enzimin K_m değerinde önemli bir artış söz konusudur (Tablo 21).

Tablo 21. W137F – V184S – V101R mutasyonunun değerlendirilmesi

	K_m	V_{max}	k_{cat}	k_{cat}/K_m	Ortalama yarılanma ömrü	Kaynak
AgoGI (Rekombinant)	124,45 ± 2,99	39,6 ± 0,79	33,03	0,266	19	Bu Çalışma
V101R	179,26 ± 5,33	57,54 ± 0,58	48,00	0,268	31	Bu Çalışma
W137F – V184S	39,29 ± 2,87	99,71 ± 1,83	83,17	2,116	19	Karaoğlu, 2010
W137F – V184S – V101R	120,29 ± 4,04	73,69 ± 0,71	61,47	0,511	3,5	Bu Çalışma

Fakat en olumsuz sonuç enzimin ısı kararlılığında alınmıştır. Enzimin yarılanma ömrü 3,5 güne kadar düşmüştür (Şekil 121).



Şekil 121. W137F-V184S-V101R'nin Isıl Kararlılık Grafiği

5. ÖNERİLER

Bu çalışma ısı kararlılığın artırılması üzerine planlanmıştır. Bunun yanı sıra tüm mutant enzimlerin kinetik parametreleri de araştırılmıştır. Isıl kararlılığında iyi sonuç veren örnekler ile ikili ve üçlü mutasyonlar birlikte değerlendirilmiştir. Bununla birlikte kinetik parametreleri iyi olan fakat ısı kararlılık açısından değerli olmayan mutasyon noktaları da çalışmada tespit edilmiştir. Bu mutasyon noktalarının da ikili ve üçlü bileşimlerinin denenmesi, enzimin katalitik etkinliğinin artırılmasında çok faydalı olacaktır. Bu ise farklı bir çalışma konusu olabilecektir.

Mutasyon noktaları, mezofilik ve termofilik karakterli bakterilerin amino asit sekanslarının karşılaştırılması dikkate alınarak planlanmıştır. Çalışılan tez, mezofilik organizmalarda bulunan benzer enzimlerle homoloji gösteren bölgelerin termofilik organizmalarda bulunan enzimlerdeki aynı noktalardaki amino asitlere benzetilmesi hipotezine dayandırılarak hazırlanmıştır. Yapılan tez çalışmaları esnasında görülmüştür ki, mutasyon noktalarının bu şekilde seçilmesi çok faydalı olmamaktadır. Mutasyon bölgeleri enzimin alakasız noktalarında olabilir. Bunun yerine bir modelleme programı yardımıyla etki etme olasılığı yüksek olan mutasyon noktalarının tespit edilmesi daha yerinde olacaktır.

Gerçekleştirilen mutasyonlardan V101R yerine V101A ve V101RG mutasyonları gerçekleştirilerek ve V101T ve V101S mutasyonları yapılarak başarılı sonuçlar elde edilebilir çünkü Adenin ve Guanin bilinen en küçük hidrofobik aminoasitlerdir. Treonin ve Serin ise OH grubu vardır ve bu grubun aktif bölgede yer alması önemlidir hidrojen bağı etkileşimleri yapabilir.

A353F mutasyonu yerine aktif bölgeyi bozmayacak özellikte olan Serin (S) ve Treonin (T) aminoasitleri kullanılarak mutasyon gerçekleştirilebilir.

K111R mutasyonu N142 yakın olduğu için Aspartat ve Glutamat amino asitleri negatif yüklü oldukları için zıt yüklerin birbirini çekmesi K111D ve K111E mutasyonları gerçekleştirilebilir.

Enzimin immobilize edilmesi ticari değerini çok daha fazla arttıracaktır. Doğal enzim üzerinde immobilizasyon çalışmaları mevcuttur fakat katalitik etkinliği ve ısı kararlılığı yüksek olan enzimin immobilize edilmesi, yaban tipin immobilize edilmesinden daha önemlidir. Elde edilen söz konusu mutantların immobilize edilerek tekrar karakterize edilmesi önemlidir.



KAYNAKLAR

- Akkaya E. ve Kıvanç M., 2008.** Termofil Bakteriler; Sıcak Su Kaynaklarında Yaşayan Gr (+) Basillerin İzolasyon ve İdentifikasyon Yöntemleri. Eskişehir Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Dergisi, 2, 61-70.
- Albayrak Ş., 2018.** Türkiye'nin Farklı Bölgelerinde Bulunan Kaplıcalardan Alınan Örneklerden Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, Konvensiyonel Ve Moleküler Yöntemlerle İdentifikasyonu, Endüstriyel Açıdan Önemli Olan Enzimleri Üretme Potansiyeline Sahip Suşların Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, Türkiye, 94s., 10.
- Anheuser and Busch Inc., 1974.** Method of making glucose isomerase and using same to convert glucose to fructose. U.K. Patent, 1, 399-408.
- Anonim, 1979.** New applications expand HFCS markets increase demand and tighten supplies. Translated New Applications Expand HFCS Markets Increase Demand and Tighten Supplies. Food Product Development, 13, 12-38.
- Anonim, 1993.** Multifunctional sweeteners, Translated Multifunctional Sweeteners. Baking and Snack., 15, 31-34.
- Aschengeen, N., 1975.** Production of glucose fructose syrup. Process Biochemistry, 10, 17-23.
- Ayna, Ç., 2016.** Termofilik *Geobacillus Caldoxylosilyticus* Tk4'ten Elde Edilen Rekombinant Glukoz İzomerazın Bazı Özelliklerinin Mutasyonla Geliştirilmesi, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, Türkiye, 79s., 6.
- Arıkan, B., 2008.** Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from a thermophilic *Bacillus sp.* isolate A3-15. Bioresource Technology, 99, 3071–3076.
- Bak, P., 2017.** *Anoxybacillus Gonensis* G2^T Glukoz İzomerazının Kinetik Ve Bazı Biyokimyasal Parametrelerinin G33D, N138G, T144S, V293I, V32I, E373K ve V380I Bölge Spesifik Mutasyonları İle Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, R.T.E.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize, Türkiye, 101s., 85-93.
- Baltaş, N., 2012.** *Anoxybacillus gonensis* Z4 Suşundan Ekstraselüler α -Amilaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, Türkiye, 91 s., 1-2.
- Barredo, J.L., 2005.** Methods in Biotechnology TM 17: Microbial enzymes and biotransformations. Human Press, Totowa, New Jersey. ISBN: 9781588292537, 320s., BARREDO, J.L. (By Ed.) 1-27.
- Barker, S.A., 1976.** Pure fructose syrups. Process Biochem, 11, 20–25.

- Bartfay, J., 1960.** Glucose isomerase in barley malt. *Nature* (London), 185-924.
- Basciano, H., Federico, L. and Adeli, K., 2005.** Fructose, insulin resistance and metabolic dyslipidemia. *Nutrition and Metabolism*, London, 21, 5.
- Batt, C.A., O'Neill, E., Novak, S.R., Ko, J. and Sinskey, A., 1986.** Hyperexpression of *Escherichia coli* xylose isomerase. *Biotechnology Progress*, 2, 140–144. DOI: 10.1002/btpr.5420020308.
- Batt, C.A., Jamieson, A.C. and Vandeyar, M.A., 1990.** Identification of essential histidine residues in the active site of *Escherichia coli* xylose (glucose) isomerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2, 618-622.
- Beck, C.F. and Warren, R.A.J., 1988.** Divergent promoters, a common form of gene organization. *Microbiology Reviews*, 52, 318–326.
- Bejar, S., Belghith, K., Gargouri, R. and Ellouz, R., 1994.** Construction of a new strain of *Streptomyces violaceoniger*, having strong, constitutive and stable glucose isomerase activity. *Biotechnology Letters*, 16, 1259–1264.
- Bennet J.W. and Klich M.A., 1992.** *Aspergillus: Biology and Industrial Applications*. Butterworth-Heinemann Publishing (USA) Inc, ISBN: 0-7506-9124-7, 448 pp. Bennet J.W. and Klich M.A. (Eds), 329-353.
- Bhosale, S.H., Rao, M.B. and Deshpande, V.V., 1996.** Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. *Microbiological Reviews*, 60, 280-300.
- Blacklow, S.C., Raines, R.T., Lim, W.A., Zamore, P.D. and Knowles, J.R., 1988.** Triosephosphate isomerase catalysis is diffusion controlled. *Biochemistry*, 27, 1158–1167.
- Blow, D.M., Collyer, C.A., Goldberg J.D. and Smart, O.S., 1992.** Structure and mechanism of D-xylose isomerase. *Faraday Discuss*, 93, 67–73.
- Bogumil, R., Kappl, J., Huttermann, C. and Witzel, H., 1993.** Xand Q-band EPR studies on the two Mn²⁺-substituted metal-binding sites of D-xylose isomerase. *European Journal of Biochemistry*, 213, 1185–1192.
- Boguslawski, G. and Rynski, M.J., 1982.** Novel strain of *Bacillus licheniformis* useful in production of glucose isomerase and method of screening *Bacillus* mutants for the ability to produce glucose isomerase in the absence of xylose. *U.S. Patent*, 4, 355-103.
- Bok, S.K., Seidman, W. and Wopat, P.W., 1984.** Selective isolation of acidophilic *Streptomyces* strains for glucose isomerase. *Applied and Environmental Microbiology*, 47, 1213– 1215.

- Bor, Y., Moraes, C., Lee, S., Crossby, W.L, Sinskey, A.J. and Batt, C.A., 1992.** Cloning and sequencing the *Lactobacillus brevis* gene encoding xylose isomerase. *Gene*, 114, 127–131.
- Bradford, M.M., 1976.** rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Bray, G.A., Nielsen S.J. and Popkin B.M., 2004.** Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 537-43.
- Briggs, K.A., Lancashire, W.E. and Hartley, B.S., 1984.** Molecular cloning, DNA structure and expression of the *Escherichia coli* D-Xylose isomerase. *The Embo Journal*, 3, 611–616.
- Bocarsly M.E., Powell E.S., Avena N.M. and Hoebel B.G., 2010.** High-fructose corn syrup causes characteristics of obesity in rats: Increased body weight, body fat and triglyceride levels. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 97, 101-106. DOI: 10.1016/j.pbb.2010.02.012.
- Brown, S.H., Sjöholm, C. and Kelly, R.M., 1993.** Purification and characterization of a highly thermostable glucose isomerase produced by the extremely thermophilic eubacterium, *Thermotoga maritima*. *Biotechnology Bioengineering*, 41, 878– 886.
- Brownell, C.E., 1982.** Process for producing glucose isomerase. U.S. Patent 4, 348-480.
- Bucke, C., 1983.** Glucose Transforming Enzymes, In *Microbial Enzymes and Biotechnology*. Applied Science Publishers, London, 1. edition. 472 pp., W.M. Fogarty (Ç.Ed), 93–127.
- Burg, B.V.D., 2003.** Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, 6, 213-218.
- Callens, M., Kersters-Hilderson, H., Vangrysperre, W. and Debruyne, C. K., 1988.** D-xylose isomerase from *Streptomyces violaceoruber*: structural and catalytic roles of bivalent metal ions. *Enzyme Microbial Technology*, 10, 695–700.
- Carell, H.L., Rubin, B.H., Hurley, T.J. and Glusker, J.P., 1984.** X-Ray crystal structure of D-xylose isomerase at 4 Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*, 259, 3230–3236.
- Carell, H.L., 1989.** X-ray analysis of D-xylose isomerase at 1.9 Å: native enzyme in complex with substrate and with a mechanism-designed inactivator, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 4440-4444. DOI: 10.1073/pnas.86.12.4440.

- Cha, J. and Batt, C.A., 1998.** Lowering the pH optimum of D-xylose isomerase: The effect of mutations of the negatively charged residues. *Molecules and Cells*, 8, 374-382.
- Cha, J., Cho, Y., Whitaker, R.D., Carrell, H.L., Glusker, J.P., Karplus, P.A. and Batt, C.A., 1994.** Perturbing the metal site in D-xylose isomerase: Effect of mutations of His220 on enzyme stability. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 2687-2694.
- Chan, E., Ueng, P.P. and Chen, L.F., 1989.** Metabolism of D-xylose in *Schizosaccharomyces pombe* cloned with a xylose-isomerase gene. *Applied Microbiology of Biotechnology*, 31, 524-528.
- Chauthaiwale, J.V. and Rao, M.B., 1994.** Production and purification of extracellular D-xylose isomerase from an alkaliphilic, thermophilic *Bacillus* sp. *Applied and Environment. Microbiology*, 60, 4495-4499.
- Chen, W.P., Anderson, A.W and Han, Y.W., 1979.** Production of glucose isomerase by. *Streptomyces flavogriseus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 37, 324-331.
- Chen, W.P., 1980a.** Glucose Isomerase. *Process Biochemistry.*, 15, 30-35.
- Chen, W.P., 1980b.** Glucose Isomerase. *Process Biochemistry.*, 15, 36-41.
- Chen, W.P., 1980c.** Glucose Isomerase. *Process Biochemistry.*, 15, 30-35.
- Chiang, L.C., Gong, C.S., Chen, L.F. and Tsao, G.T., 1981a.** D-xylulose fermentation to ethanol by *Saccharomyces Cerevisiae*. *Applied and Environment Microbiology*, 42, 284-289.
- Chiang, L.C., Hsiao, H.Y., Ueng, P.P., Chen, L.F. and Tsao, G.T., 1981b.** Ethanol production from xylose by enzymic isomerisation and yeast fermentation, biotechnology. XI Bioengineering Symposium, Gatlinburg, TN, USA, 12 May, 263-274.
- Collyer, C.A., Henrick, K. and Blow, D.M., 1990.** Mechanism for aldose-ketose interconversion by D-xylose isomerase involving ring opening followed by a 1,2-hydride shift. *Journal of Molecular Biology*, 212, 211-235. DOI: 10.1016/0022-2836(90)90316-E.
- Collyer, C.A. and Blow, D.M., 1990,** Observations of reaction intermediates and the mechanism of aldose-ketose interconversion by D-xylose isomerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 1362-1366. DOI: 10.1073/pnas.87.4.1362.
- CRA, 1994.** Translated Corn Refining the Process the Products, Corn Refiners Association Inc.

- Crabb W.D. and Shetty J.K., 1999.** Commodity scale production of sugars from starches. *Ecology and Industrial Microbiology*, 2, 252-256.
- Crueger, W. and Crueger, A., 1990.** *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*, Sinauer associates, Sunderland, Volume 18, Issue 3, ISBN 0-87893-131-7, 357s., (By Ed.): Thomas D Brock, MA. 151-152.
- Danno, G., 1971.** Studies on D-glucose isomerizing enzyme from *Bacillus coagulans*, strain Hn-68. VI. the role of metal ions on the isomerization of D-glucose and dxylose by the enzyme. *Agricultural and Biological Chemistry*, 35, 997–1006. DOI: 10.1080/00021369.1971.10860029.
- De Raadt, A., Ebner, M., Ekhardt, C., Fechter, M., Lechner, A., Strobi, M. and Stütz, A., 1994.** Glucose Isomerase (EC 5.3.1.5) as a reagent in carbohydrate synthesis: success and failures with the isomerisation of non-natural derivatives of d. *Biocatalysis Today*, 22, 549-561. DOI: 10.1016/0920-5861(94)80123-1.
- Dekker, K., Yamagata, H., Sakaguchi, K. and Udaka, S., 1991.** Xylose (Glucose) isomerase gene from the thermophile *Thermus Thermophilus*: cloning, sequencing, and comparison with other thermostable xylose isomerases. *Journal of Bacteriology*, 173, 3078–3083.
- Douglas, C.W. and Jay, K.S., 1999.** Commodity scale production of sugars from starches. *Current Opinion in Microbiology*, 2, 252–256.
- Dupreez, J.C., Bosch, M. and Prior, B.A., 1987.** Temperature profiles of growth and ethanol tolerance af the xylose fermenting yeasts *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 25, 521–525.
- Dupreez, J.C. and Prior, B.A., 1985.** A Quantitative Screening of some Xylose Fermenting Yeast Isolates. *Biotechnolgy Letters*, 7, 241-246.
- Eltem, R., 2002.** Endüstriyel Mikroorganizmaların Doğal Kaynaklardan İzolasyonu ve Geliştirilmesi Yöntemleri. Fen Fakültesi, Eubiyoloji Topluluğu, Biyolojik Bilimlerde Araştırma Yöntemleri Yaz Okulu Kitabı, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova-İzmir, 281-292, 26 Ağustos-01 Eylül 2002.
- Erbaş, E., 2008.** *Anoxybacillus gonensis* Ksiloz İzomeraz H99E Mutantının Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, Türkiye 40s., 2-5.
- Faiz, Ö., 2005.** Yeni Bir Termofilik Bakterinin, *Anoxybacillus gonensis* A4, Hücre Dışı Lipaz/Esteraz Yeteneğinin İncelenmesi ve Karakterizasyonu, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, Türkiye, 54s., 9.
- Farber, G.K., Glasfeld, A., Tiraby, G., Ringe, D. and Petsko, G.A., 1989.** Crystallographic studies of the mechanism of xylose isomerase. *Biochemistry*, 28, 7289-7297. DOI: 10.1021/bi00444a022.

- Feng L., Wang W., Cheng J., Ren Y., Zhao G., Gao C., Tang Y., Liu X., Han W., Peng X., Liu R. and Wang L., 2007.** Genome and proteome of long-chain alkane degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 isolated from a deepsubsurface oil reservoir. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104, 5602-5607. DOI: 10.1073/pnas.0609650104.
- Fukara, G., 2007.** Bazı Ekstrem Termofil Bakterilerin Amilazlarının Özelliklerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye, 57s., 10.
- Gaikwad, S.M., Rao, M.B. and Deshpande, V.V., 1992.** D-Glucose/Xylose isomerase from *streptomyces*. Differential roles of magnesium and cobalt ions. Enzyme and Microbial Technology, 4, 317–320.
- Gaikwad, S.M., More, M.W., Vartak, H.G. and Deshpande, V.V., 1988.** Evidence for the essential histidine residue at the active site of Glucose/ Xylose isomerase from *Streptomyces*. Biochemical Biophysical Research Communications, 155, 270–277. DOI: 10.1016/s0006-291x(88)81079-9
- Ghatge, M.S., and Deshpande, V.V., 1993.** Evidence for specific interaction of guanidine hydrochloride with carboxy groups of enzymes/proteins. Biochemical Biophysical Research Communucations, 193, 979–984. DOI: 101006/bbrc.1993.1721.
- Ghatge, M.S., Phadtare, S.U., Bodhe, A. M. and Deshpande, V.V., 1994.** Unfolding and refolding of glucose/xylose isomerase from *Streptomyces sp.* NCIM 2730. Enzyme and Microbial Technology, 16, 323–327.
- Gong, C.S., Chen, L.F., Flickinger, M.C., Chiang, L.C. and Tsao, G.T., 1981.** Production of ethanol from D-Xylose by using D-Xylose isomerase and yeasts. Applied and Environmental Microbiology, 41, 430–446.
- Gupta R., Gıgras P., Mohapatra H., Goswami V.K. and Chauhan B., 2003.** Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. Process Biochemistry, 38, 1599-1616.
- Hahn-Hagerdal, B., Wahlbom, F., Van Zyl, W.H., Cordero Otero, R. and Jönsson, L.J., 2001.** Metabolic engineering of *Saccharomyces* for xylose utilisation. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, 73, 53-84.
- Hajer, B.H., Dorra, Z.A., Monia, M., Samir, B. and Nushinb, A., 2014.** Probing the role of helix α 1 in the acid-tolerance and thermal stability of the *Streptomyces sp.* SK glucose isomerase by site-directed mutagenesis. Journal of Biotechnology, 173, 1-6.

- Hartley, B.S., Hanlon, N., Jackson, R.J. and Rangarajan, M., 2000.** Glucose isomerase: Insights into protein engineering for increased thermostability. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1543, 294-335. DOI: 10.1016/s0167-4838(00)00246-6.
- Hausler, H. and Stutz, A.E., 2001.** D-Xylose (D -Glucose) isomerase and related enzymes in carbohydrate synthesis. *Topics in Current Chemistry*, 215, 77-114.
- Hebeda, R.E., 1987.** Corn Sweeteners. *Corn Chemistry and Technology*. Amerian Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, Minn, 674 s., Watson, S.A. and Ramstad, P.E. (Eds.) 501-534.
- Henrick, K., Collyer, C.A. and Blow, D.M., 1989.** Structures of D-xylose isomerase from *Arthrobacter* strain B3728 containing the inhibitors xylitol and d-sorbitol at 2.5 Å and 2.3 Å resolution, respectively. *Journal of Molecular Biology*, 208, 129-147.
- Henrick, K., Collyer, C. and Blow, D., 1989.** Structures of D-Xylose isomerase from *Arthrobacter* strain B3728 containing the inhibitors xylitol and d-sorbitol at 2.5 Å and 2.3 Å resolution, respectively. *Journal of Molecular Biology*, 208, 129-157.
- Hess, J.M., Tchernajenko, V., Vieille, C., Zeikus, J.G. and Kelly, R.M., 1998.** *Thermotoga neapolitana* homotetrameric xylose isomerase is expressed as a catalytically active and thermostable dimer in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 2357-2360.
- Hobbs, L., 1986a.** Corn Syrups, *Cereal Foods World*, 31, 852-858.
- Hobbs, L., 1986b.** Corn Syrups, *Cereal Foods World*, 31, 852-854-856-858.
- Howling, D., 1992.** Glucose Syrup: "Starch Hydrolysis Products", Production, Properties and Applications. VCH Publ. Inc. New York, Schenck, F.W. and Hebeda, R.E. (Eds.), 277-316.
- Inglett, G.E., 1974.** Symposium: Sweeteners, The AVi Publishing Company, Westport, Connecticut, First Edition, ISBN: 0870551531, 240 pp., 1.
- İnan, K., 2011.** İzmir ve Aydın İllerindeki Bazı Kaplıcalardan İzole Edilen Termofilik Bakteri İzolatlarının Moleküler Taksonomisi ve D1021 İzolatının Glukoz İzomerazın Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, Türkiye, 159 s., 10-11.
- Iyer, P.V. and Ananthanarayan, L., 2008.** Enzyme stability and stabilization-aqueous and non aqueous environment, *Process Biochemistry*, 43, 1019–1032. DOI: 10.1016/j.procbio.2008.06.004.
- Johnson, J.M., Harris, C.H. and Barbeau, W.E., 1989.** Effects of HFCS replacement for sucrose on browning, starch gelatinization and sensory characteristics of cakes, *Cereal Chemistry*., 66, 3, 155- 157.

- Jenkins, J., Janin, J., Rey, F., Chiadmi, M., Van Tilbeurgh, H., Lasters, I., De Maeyer, M., Ven Belle, D. and Wodak, S.J., 1992.** Protein engineering of xylose (glucose) isomerase from *Actinoplanes missouriensis*. 1. crystallography and site-directed mutagenesis of metal binding sites. *Biochemistry*, 31, 5449-5458.
- Karaoğlu, H., 2004.** *Anoxybacillus gonensis* Glukoz (D-Ksiloz) İzomeraz Geninin Klonlanması, İzolasyonu Ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, Türkiye, 64 s., 7-13-14-41-44.
- Karaoğlu, H., 2010.** *Anoxybacillus gonensis* Glukoz İzomerazının Genetik Manipulasyonlarla Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin Geliştirilmesi Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, Türkiye, 83s., 4-69-70-72.
- Karaoğlu, M., 2011.** Yüksek Fruktozlu Mısır Şurubu. Atatürk Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Dergisi, Erzurum, 33-39 s.
- Kasumi, T., Hayashi, K. and Tsumura, N., 1982.** Role of cobalt in stabilizing the molecular structure of glucose isomerase from *Streptomyces griseofuscus* S-41. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46, 21-30.
- Knorr, D., 1987.** Modern process technology of HFCS, food biotechnology: biotechnological processes in food production. Department of Food Science, University of Delaware, USA, 1, 225-248.
- Korkmaz, A., 2008.** Fruktoz; Kronik Hastalıklar İçin Gizli Bir Tehdit. *TAF Preventive Medicine Bulletin*, 7, 343-346.
- Kovalevsky, A.Y., Hanson, L., Fisher, S.Z., Mustyakimov, M., Mason, S.A., Forsyth, V.T., Blakeley, M.P., Keen, D.A., Wagner, T. and Carrell, H., 2010.** Metal ion roles and the movement of hydrogen during reaction catalyzed by D-xylose isomerase: A joint x-ray and neutron diffraction study. *Structure*, 18, 688-699. DOI: 10.1016/j.str.2010.03.011.
- Kristo, P., Saarelainen, R., Fagerstrom, R., Aho, S. and Korhola, M., 1996.** Protein purification, and cloning and characterization of the cDNA and gene for xylose isomerase of barley. *European Journal of Biochemistry*, 237, 240-246.
- Kulp, K., Lorenz, J.K. and Stone, M., 1991.** Functionality of carbohydrate ingredients in bakery products. *Food Technology*, 45, 136.
- Kumar, H.D. and Swati, S., 2001.** *Modern Concepts of Microbiology*. Second Revised, ED, Vikas Publishing House, Pvt. Ltd., New Delhi. ISBN: 9788125910008, 683 pp., Kumar, H.D. (By ed.), 455.
- Laemmli, U.K., 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

- Lavie, A., Allen, K.N., Petsko, G.A. and Ringe, D., 1994.** X-ray crystallographic structures of D-xylose isomerase substrate complexes position the substrate and provide evidence for metal movements during catalysis. *Biochemistry*, 33, 5469–5480.
- Lee, C., Bagdasarian, M., Meng, M.H. and Zeikus, J., 1990a.** Catalytic mechanism of xylose (glucose) isomerase from *Clostridium thermosulfurogenes*. Characterization of the structural gene and function of active site histidine. *Journal of Biological Chemistry*, 5, 265.
- Lee, C., Bhatnagar, L., Saha, B.C., Lee, Y.E., Takagi, M., Imanaka, T., Bagdasarian, M. and Zeikus, J.G., 1990b.** Cloning and expression of the *Clostridium thermosulfurogenes* glucose isomerase gene in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Applied Environmental Microbiology*, 56, 2638–2643.
- Le Blanc, B.W., Eggleston, G., Sammataro, D., Cornett, C., Dufault, R., Deeby, T. and Cyr, E.S., 2009.** Formation of hydroxymethylfurfural in domestic high-fructose corn syrup and its toxicity to the honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 9369–9376.
- Lin L.L., Chyau C.C. and Hsu W.H., 1998.** Production and properties of a rawstarch-degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic *Bacillus sp.* TS23. *Biotechnology Applied Biochemistry*, 28, 61-68.
- Lo, C.Y., Li, S.M., Wang Y., Tan, D., Pan, M.H., Sang, S. and Ho, C.T., 2008.** Reactive dicarbonyl compounds and 5-(hydroxymethyl)-2-furfural in carbonated beverages containing high fructose corn syrup. *Food Chemistry*, 107, 1099–1105.
- Lonn, A., Gardonyi M., Zyl, W., Hahn-Hagerdal, B. and Otero, R.C., 2002.** Cold adaptation of xylose isomerase from *Thermus Thermophilus* through random PCR mutagenesis gene cloning and protein characterization. *European Journal of Biochemistry*, 269, 157-163. DOI: 10.1046/j.0014-2956.2002.02631.x.
- Madigan, M.T. and Martinko, J.M., 2010.** Brock Mikroorganizmaların biyolojisi. Palme yayınları, 11. Baskı, ISBN :978-605-5829-62-9. 992 s., Prof. Dr. Cumhur Çökmüş (Ç. Ed.), 532: 26-36- 647-655.
- Maheshwari R., Bharadwaj G. and Bhat M.K., 2000.** Thermophilic fungi: Their physiology and enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 461-488.
- Manohar, R.S. and Rao, P.H., 1997.** Effects of sugars on the rheological characteristics of biscuit dough and quality of biscuits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 75, 383-390.
- Marshall, R.O. and Kooi, E.R., 1957.** Enzymatic conversion of D-Glucose to D-fructose. *Science*, 125, 648-649.

- Meilleur, F., Snell, E.H., Van der Woerd, M.J., Judge, R.A. and Myles, D.A., 2006.** A Quasi-Laue neutron crystallographic study of D-Xylose isomerase. *European Biophysics Journal*, 35, 601-609.
- Meng, M., Bagdasarian, M. and Zeikus, J.G., 1993.** Thermal Stabilization of xylose isomerase from *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 90, 8459-8463.
- Meng, M., Lee, C., Bagdasarian, M. and Zeikus, J.G., 1991.** Switching substrate preference of thermophilic xylose isomerase from d-xylose to d-glucose by redesigning the substrate binding pocket. *Proceeding of the National Academy Sciences USA*, 88, 4015–4019.
- Mojsov, K., 2012.** Microbial α -amylases and their industrial applications: A Review. *International Journal of Management, IT and Engineering (IJMIE)*, 2, 583-609.
- Mozhaev, V., 1993.** Mechanism-based strategies for protein thermostabilization. *Trends Biotechnology*, 11, 88–95.
- Nabors, L.O. and Gelardi, C.R., 1991.** Alternative sweeteners, Marcel Dekker, Inc., Second Edition, ISBN: 0-8247-0437-1, 541.s., Nabors L. O. (By Ed.) 36-110.
- Naidu, M.A. and Saranraj, P., 2013.** Bacterial amylase: A review. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 4, 274 – 287.
- Natake, M. and Yoshimura, S., 1964.** Studies on Glucose isomerase of bacteria: Part II. the glucose isomerizing activity of *Escherichia Intermedia*, strain HN-500 part III. The mode of action of glucose isomerase from *Escherichia Intermedia*, strain HN-500. *Agricultural and Biological Chemistry*, 28, 505-516.
- Marshall, R.O. and Kooi, E.R., 1957.** Enzymatic conversion of d-glucose to d-fructose. *Science*, 5, 648-649.
- Nigar, S., 2005.** Gazlı İçeceklerde Karbondioksit Absorpsiyon Kapasitesinin Artırılmasının İncelenmesi. Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, Türkiye, 125 s., 9.
- Özcan, S., 2009.** Modern Dünyanın Vazgeçilmez Bitkisi Mısır: Genetiği Değiştirilmiş (Transgenik) Mısırın Tarımsal Üretime Katkısı. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 2, 01-34.
- Pandey, A., Nigman, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Singh, D. and Mohan, R., 2000.** Advances in microbial amylases. *Biotechnology Applied Biochemistry*, 31, 135-152.
- Park, Y.K. and Thorna, M., 1974.** Some interrelation between microbial xylanase and glucose isomerase production. *Journal Applied Microbiology*, 20, 67-69.

- Parker, K., Salas, M. and Nwosu, V.C., 2010.** High fructose corn syrup: Production, uses and public health concerns. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 5, 71 – 78.
- Parrish, L.A.W., 2010.** How does the consumption of fructose and high fructose corn syrup impact the health of children and adolescents. *Pediatric Endocrinology Nursing Society*. 459-460.
- Patel, D.H., Cho, E.J., Kim, H.M., Choi, I.S. and Bae, H.J., 2012.** Engineering of the catalytic site of xylose isomerase to enhance bioconversion of a nonpreferential substrate. *Protein Engineering Design and Selection*, 25, 331-336.
- Petrova, S.D., Ilieva, S.Z., Bakalova, N.G., Atev, A.P., Bhat, M.K. and Kolev, D.N., 2000.** Production and characterization of extracellular α amylases from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* (wild and mutant strains). *Biotechnology Letters* 22, 1619-1624.
- Pomeranz, Y., 1985.** Functional Properties of Food Components. Academic Press Inc., Orlando, Florida (USA) ISBN: 9780323146364, 548s., 241-295-536.
- Poyrazoğlu, A.G., 2007.** Nişasta Endüstrisi Atık Sularının Bitki Yetiştirilmesinde Kullanım Olanaklarının Araştırılması. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Adana, Türkiye, 68 s., 5-6.
- Quax, W.J., Mrabet, N.T., Luiten, R.G., Schuurhuizen, P.W., Stanssens, P. and Lasters, I., 1991.** Enhancing the thermostability of glucose isomerase by protein engineering. *Bio/Technology* 9, 738–742.
- Quax, W.J., 1993.** Thermostable Glucose Isomerase. *Trends Food Science Technology*, 4, 3134.
- Rangarajan, M., Asboth, B. and Hartley, B.S., 1992.** Stability of *Arthrobacter* D-Xylose isomerase to denaturants and heat. *Biochemical Journal*, 285, 889–898.
- Rasmussen, H., 1994.** Crystallization and preliminary investigation of xylose isomerase from *Bacillus coagulans*. *Acta Crystallographia Section D* banner, 50, 231–233.
- Rasmussen, H., Cour, T.L., Nyborg, J. and Schulein, M., 1994.** Crystallization and preliminary investigation of xylose isomerase from *Bacillus coagulans*. *Acta Crystallographia Section D* banner, 50, 124-131.
- Reeder, C.F., 1978.** Light foods appease weight conscious americans. *Food Product Development*, 12, 35-36.
- Rey, F., Jenkins, J., Janin, J., Lasters, I., Alard, P., Claessens, M., Matthysens, G. and Wodak, S., 1988.** Structural analysis of the 2.8Å model of xylose isomerase from *Actinoplanes missourensis*. *Proteins Structure Function Genetic*, 4, 165-172.

- Rose, I.A., O'connell, E.L. and Mortlock, R.P., 1969.** Stereochemical evidence for a cis enediol intermediate in mn-dependent aldose isomerases. *Biochimica Biophysica Acta*, 178, 376-379.
- Ross, A.P., Bartness, T.J., Mielke, J.G. and Parent, M.B., 2009.** A high fructose diet impairs spatial memory in male rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92, 410–416.
- Ruiz-Matute, A.I., Weiss, M., Sammataro, D., Finely, J. and Sanz, M.L., 2010.** Carbohydrate composition of high-fructose corn syrups (HFCS) used for bee feeding: effect on honey composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 7317–7322. DOI: 10.1021/jf100758x.
- Saari, G., Kumar, A., Kawasaki, G., Insley, M. and O'hara, P., 1987.** Sequence of the *Ampullariella* sp. Strain 3876 gene coding for xylose isomerase. *Journal of Bacteriology*, 169, 612-618.
- Sanchez, S. and Smiley, K.L., 1975.** Properties of D-xylose isomerase from *Streptomyces albus*. *Applied Microbiology*, 29, 745-750.
- Scallet, B., Shieh, K., Ehrental, I. and Slapshak, L., 1974.** Studies in the isomerization of D-glucose. *Starch Starke*, 26, 405-408.
- Schenk, M. and Bisswanger, H., 1998.** A microplate assay for d-xylose/d-glucose isomerase. *Enzyme and Microbial Technology*, 22, 721-723.
- Schneider, H., Wang, P.Y., Johnson, B.F. and Shopsis C., 1981.** 13 - Pentose fermentation by yeasts. *Proceedings of the Fifth International Yeast Symposium Held in London, Canada, 20–25 July*, 81-85.
- Seliwanoff, T., 1887.** Notiz über eine Fructzuckerreaction. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 20, 181.
- Smith, C.A., Rangarajan, M. and Hartley, B.S., 1991.** D-Xylose (D-Glucose) isomerase from *Arthrobacter strain* N.R.R.L B3728. Purification and properties. *Biochemical Journal*, 277, 255–261.
- Sriprapundh, D., Vieille, C. and Zeikus, J.G., 2000.** Molecular determinants of xylose isomerase thermal stability and activity: analysis of thermozymes by sitedirected mutagenesis. *Protein Engineering*, 13, 259-265.
- Sriprapundh, D., Vieille, C. and Zeikus, J.G., 2003.** Directed evolution of *Thermotoga neapolitana* xylose isomerase: High activity on glucose at low temperature and low pH. *Protein Engineering*, 16, 683-690.
- Takasaki, Y. and Tanabe, O., 1962.** Formation of fructose from glucose by bacteria. I, properties of glucose isomerase. *Hakko Kyokaishi*, 20, 449-455.

- Takasaki, Y. and Tanabe, O., 1963.** Isomerization of sugars by bacteria. I. Cultural conditions for glucose isomerizing bacteria. *Kogyo Gijutsu-in Hakko Kenkyusho Kenkyu*, 23, 41-47.
- Takasaki, Y. and Tanabe, O., 1964.** Nad-linked D-Glucose-isomerizing and D-mannoseisomerizing enzyme from *Paracolonobacterium aerogenoides*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 28, 740-741.
- Takasaki, Y. and Tanabe, O., 1966.** Studies on isomerization of sugars by bacteria: part IX nad-linked d-glucose-isomerizing and d-mannose-isomerizing enzyme from *Paracolonobacterium aerogenoides*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 30, 220-225.
- Takasaki, Y., 1973.** Japanese Patent, 73, 49-951.
- Telefoncu, A., 1986.** Temel ve Uygulamalı Enzimoloji. Ege Üniversitesi, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu, Çeşme-İzmir, Dergi Yayını, 100-113 s. 22 Eylül-3 Ekim.
- Tewari, Y.B. and Goldberg, R.N., 1984.** Thermodynamics of the consersion of aqueous glucose to fructose. *Journal of Solution Chemistry*, 13, 523-547.
- Tilbeurgh, H.V., Jenkins J., Chiadmi M., Janin J., Wodak S.J., Mrabet N.T. and Lambier A., 1992.** Protein engineering of xylose (glucose) isomerase from *Actinoplanes missouriensis*. 3. Changing metal specificity and the pH profile by site directed mutagenesis. *Biochemistry*, 31, 5467– 5471.
- Topal, Ş., 1988.** Mikrobiyal enzimler ve biyoteknolojik yolla rennin üretimindeki gelişmeler. *Gıda/The Journal of Food*, 13, 183-190.
- Tsamura, N., Hagi, M. and Sato, T., 1965.** Enzymatic conversion of D-glucose to D-fructose; II. Propertiesof theenzyme from *S. phaeochromogenes*. *Agricultural Biological Chemistry*, 29, 1129-1134.
- Tükel, S. and Alagöz, D., 2008.** Catalytic efficiency of immobilized glucose isomerase in isomerization of glucose to fructose. *Food Chemistry*, 111, 658-662.
- URL-1, 2014.** <http://www.kozanbilgi.net/enzimlerin-yapisi-ve-isleyisi.html> (09 Ekim 2014).
- URL-2, 2010.** <https://studylibtr.com/doc/561750/enzim/>
- URL-3, 2007.** <http://www.tubitak.gov.tr/btpd/btspd/platform/bio/bol2.html>
- URL-4, 2019.** <https://www.foodelphi.com/tag/biyoteknolojide-enzimler/> (12 Temmuz 2018)
- URL-5, 2007.** <http://umitkaradeli.blogcu.com/endustriyel-mikroorganizmalar/1462781>

URL-6, 2011. <http://www.gidamo.org.tr/resimler/ekler/938b20f9f210570ek.pdf?dergi=45>

Ünal M., 2002. Enzimoloji Ders Notları. Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, 65s, Adana.

Van Der Maarel M.J.E.C., Van Der Veen 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 Bastelaere, P.B.M., Kirsters-Hilderson, H.L.M. and Lambeir, A.M., 1995. Wild type and mutant D-xylose isomerase from *Actinoplanes missouriensis*: metal ion dissociation constants and kinetic parameters of deuterated and non-deuterated substrates and solvent-isotope effects. *Biochemical Journal*, 307, 135–142.

Vieille, C. and Zeikus, J.G., 2001. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 1-43. DOI: 10.1128/MMBR.65.1.1-43.2001.

Vos, M.B., Kimmons, J.E., Gillespie, C., Welsh, J. and Michels Blanck, H., 2008. Dietary fructose consumption among US children and adults; the third national health and nutrition examination survey. *Medscape Journal of Medicine*, 10, 160.

Wang, P.Y., Johnson, B. and Schneider, H., 1980a. Fermentation of D-Xylose by yeasts using glucose isomerase in the medium to convert D-Xylose to D-Xylulose. *Biotechnology Letters*, 2, 273-278.

Wang, P.Y., Shopsis, C. and Schneider, H., 1980b. Fermentation of a pentose by yeasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 94, 248-254.

Whitlow, M., Howard, A.J., Finzel, B.C., Poulos, T.L., Winborne, E. and Gilliland, G.L., 1991. A metal-mediated hydride shift mechanism for xylose isomerase based on the 1.6 Å *Streptomyces rubiginosus* structures with xylitol and D-xylose. *Proteins Structure Function and Genetics.*, 9, 153-173.

Wiseman, A., 1987. *Handbook of Enzymes Biotechnology*, Published by Open Univ Pr 2 nd Edition, ISBN: 9780844815169, 457s., Hubble, J., and Gacesa, P. (Eds), 58.

Crueger, W. and Crueger, A., 1990. *Biyoteknoloji: A textbook of Industrial Mikrobiology*. Sinauer Associates Incorporated; 2nd ed edition. ISBN 0-87893-135, 357 pp, Brock D. T, (By Ed.), 7.

Yanmış, D., 2008. *Anoxybacillus gonensis* G2^T Ksiloz izomeraz Geninin Klonlanması, Gen Ürününün Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, Türkiye, 57s., 14-16.

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Rize’de doğdu. İlkokulu İstiklal İlköğretim Okulu’nda, liseyi Ankara şehrinde bulunan Sincan Anadolu Lisesi’nde tamamladı. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Su Ürünleri Mühendisliği ve Anadolu Üniversitesi Sosyoloji bölümlerinden 2015 yılında mezun oldu. 2016 yılından itibaren Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans öğrenimine devam etmektedir.

