

**T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI**

DOKTORA TEZİ

***Anoxybacillus gonensis* OLİGO-1,4-1,6-ALFA-GLUKOSİDAZ
(SUKRAZ-MALTAZ-İZOMALTAZ) GENİNİN KLONLANMASI,
GEN ÜRÜNÜNÜN SAFLAŞTIRILMASI VE BİYOKİMYASAL
KARAKTERİZASYONU**

ZEYNEP DENGİZ BALTA

**DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Hakan KARAOĞLU**

**RİZE
2023**



**T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI**

DOKTORA TEZİ

***Anoxybacillus gonensis* OLİGO-1,4-1,6-ALFA-GLUKOSİDAZ
(SUKRAZ-MALTAZ-İZOMALTAZ) GENİNİN KLONLANMASI,
GEN ÜRÜNÜNÜN SAFLAŞTIRILMASI VE BİYOKİMYASAL
KARAKTERİZASYONU**

Zeynep DENGİZ BALTA

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Hakan KARAOĞLU**

**RİZE
2023**

KABUL VE ONAY

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Su Ürünleri Anabilim Dalında, Dr. Öğr. Üyesi Hakan KARAOĞLU danışmanlığında, Zeynep DENGİZ BALTA tarafından hazırlanan “*Anoxybacillus gonensis* Oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidaz (Sukraz-Maltaz-İzomaltaz) Geninin Klonlanması, Gen Ürününün Saflaştırılması ve Biyokimyasal Karakterizasyonu” adlı bu tez çalışması, 07/02/2023 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda oy birliğiyle başarılı bulunarak jürimiz tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı, Adı Soyadı	İmzası
Başkan	: Prof. Dr. Fatih Şaban BERİŞ	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Hakan KARAOĞLU	
Üye	: Doç. Dr. Gökhan KALAYCI	
Üye	: Prof. Dr. Yusuf BEKTAŞ	
Üye	: Doç. Dr. Derya EFE	

ETİK BEYAN

Su Ürünleri Anabilim Dalı Programından mezun olmak üzere teslim ettiğim “*Anoxybacillus gonensis* Oligo-1,4-1,6-Alfa-Glukosidaz (Sukraz-Maltaz-İzomaltaz) Geninin Klonlanması, Gen Ürününün Saflaştırılması ve Biyokimyasal Karakterizasyonu” adlı tezim, bilim ve araştırma etiği prensiplerine riayet edilerek tarafımdan yazılmıştır. Tez çalışmamda, başka kaynaklardan aktarılan bütün bilgi ve alıntılar, Enstitünüz Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak açıkça gösterilmiştir. Kaynağı gösterilenler dışında kalan bütün bilgiler uygun araştırma yöntemi kullanılarak tarafımdan edinilmiş ve esere bu şekilde yansıtılmıştır. Şahsıma ait olmayan hiçbir bilgi, kasıt veya kusurlar, şahsıma aitmiş gibi gösterilmemiştir. İnternet kaynakları dâhil, sahibine/kaynağına atıf yapılmaksızın hiçbir bilgi kullanılmamıştır. Aksinin ortaya çıkması halinde doğacak bütün hukuki, idari, akademik ve etik sorumluluk tarafıma ait olacaktır. Eserin tesliminden sonra herhangi bir zamanda, bilim etiğine aykırılık tespit edilmesi ve / veya eserimle ilgili intihal veya intihal şeklinde anlaşılabilecek bir durumun ortaya çıkması halinde; Üniversiteniz ve eğitim kadronuzun hiçbir şekilde sorumlu tutulmayacağını hür irademle kabul, beyan ve taahhüt ederim. 18/01/2023

Zeynep DENGİZ BALTA

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

ÖN SÖZ

“*Anoxybacillus gonensis* Oligo-1,4-1,6-Alfa-Glukosidaz (Sukraz-Maltaz-İzomaltaz) Geninin Klonlanması, Gen Ürününün Saflaştırılması ve Biyokimyasal Karakterizasyonu” isimli bu araştırma çalışması Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı’nda Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarında “Doktora Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Bu araştırma çalışmasının gerçekleştirilmesinde değerli bilgilerini esirgemeyen, çalışmanın her aşamasında katkılarını sunan danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Hakan KARAOĞLU’na teşekkür ederim. Tez çalışmam süresince her zaman bana maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, hayatıma büyük katkıları olan, bilimsel çalışmalarına yön veren değerli hayat arkadaşım Prof. Dr. Fikri BALTA’ya teşekkür ederim. Tez izleme jürimde görev alan hocalarım Prof. Dr. Yusuf BEKTAŞ, Doç. Dr. Fatih Şaban BERİŞ ve Doç. Dr. Gökhan KALAYCI’ya teşekkür ederim. Ömrüm boyunca yanımda olan, aldığım tüm kararları destekleyen, bana moral ve cesaret veren, mutluluk kaynağım olan yakın zamanda kaybettiğim rahmetli canım annem Sehernaz DENGİZ ve rahmetli muhterem babam Ahmet DENGİZ’e teşekkür ederim. Tez çalışmam süresince sabır ve anlayışlarından dolayı Allah’ın lütfu sevgili biricik çocuklarım Nazende, Nursena ve Ahmet Metehan BALTA’ya canı gönülden çok teşekkür ederim.

Hazırlanan bu doktora tez çalışması TUBİTAK tarafından desteklenen 115Z352 nolu projenin kimyasal maddeleri kullanılarak hazırlanmıştır.

Zeynep DENGİZ BALTA

2023/RİZE

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	I
ETİK BEYAN.....	II
ÖN SÖZ.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÖZET.....	VI
ABSTRACT.....	VII
KISALTMALAR.....	VIII
TABLolar LİSTESİ.....	IX
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	X
GİRİŞ.....	1
1. GENEL BİLGİLER.....	7
1.1 Oligo-1,4-1,6-Alfa-Glukosidaz.....	7
1.2 <i>Anoxybacillus gonensis</i> G2 ^T suşunun özellikleri.....	17
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	18
2.1 Enzim Deneylerinde Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	18
2.2 Suşlar ve Vektörler.....	19
2.3 Lauria-Bertani (LB) sıvı ve katı Besi Yerlerinin Hazırlanması.....	19
2.4 <i>A. gonensis</i> G2 ^T 'de Oligo-1,4-1,6-Alfa-Glukosidaz Varlığının Tespiti.....	19
2.5 Moleküler Çalışmaları.....	20
2.5.1 PZR ile Oligo-1,4-1,6-Alfa-Glukosidaz Geninin Tespiti.....	20
2.5.2 <i>A. gonensis</i> G2 ^T 'den SUC Geninin Klonlanması ve Dizilenmesi.....	20
2.5.3 Enzimin Üretilmesi.....	22
2.5.4 Enzimin Saflaştırması.....	23
2.5.4.1 Isı Şoku Muamelesi.....	23
2.5.4.2 İyon Değişim Kromatografisi.....	23
2.5.4.3 Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi.....	24
2.5.4.4 SDS PAGE Analiz Yöntemi.....	24
2.6 Enzimin Kinetik ve Biyokimyasal Parametrelerin İrdelenmesi.....	25
2.6.1 Protein Miktarının Belirlenmesi.....	25

2.6.2 Enzim Aktivite Deneyi.....	26
2.6.3 Optimum Sıcaklık.....	26
2.6.4 Optimum pH.....	27
2.6.5 Enzimin Isıl Kararlılıkları, Mg ⁺² ve DTT'nin Isıl kararlılığa Etkisi.....	27
2.6.6 Enzimin pH Kararlılıkları.....	27
2.6.7 Enzimin Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi.....	28
2.6.8 AgoSuc2 Enzimi Üzerine Aktivatör ve İnhibitörlerin Etkisi.....	28
2.7 Bulgular.....	28
2.7.1 <i>A. gonensis</i> G2 ^T 'de Oligo-1,4-1,6-Alfa-Glukosidaz Varlığı.....	28
2.7.2 AgoSuc2'nin Kaba Ekstraktı.....	29
2.7.3 AgoSuc2'nin Isı Şoku Muamelesi.....	30
2.7.4 İyon Değişim Kromatografisi.....	31
2.7.5 Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi.....	33
2.7.6 Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	35
2.7.7 SDS PAGE Analizi.....	36
2.7.8 Optimum Sıcaklık.....	40
2.7.9 Optimum pH ve pH Kararlılığı.....	41
2.7.10 Enzimin Kinetik Parametrelerine Ait Bulguları.....	43
3. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	44
3.1 Protein Dizilerinin Karşılaştırılması.....	44
3.2 AgoSuc2'nin Aşırı Ekspresyonu ve Saflaştırılması.....	49
3.3 Optimum Sıcaklık ve Isıl Kararlılık.....	50
3.4 Optimum pH ve pH Kararlılığı.....	50
3.5 AgoSuc2'nin Kinetik Parametreleri.....	51
3.6 İnhibitörlerin ve Aktivatörlerin Etkileri.....	52
3.7 Öneriler.....	54
KAYNAKÇA.....	60

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Ana Bilim Dalı : Su Ürünleri Anabilim Dalı

Tez Türü : Doktora

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Hakan KARAOĞLU

Hazırlayan : Zeynep DENGİZ BALTA

Yıl : 2023

Sayfa Sayısı : 68

ÖZET

***Anoxybacillus gonensis* OLİGO-1,4-1,6-ALFA-GLUKOSİDAZ (SUKRAZ-MALTAZ-İZOMALTAZ) GENİNİN KLONLANMASI, GEN ÜRÜNÜNÜN SAFLAŞTIRILMASI VE BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU**

Fruktoz, sağlık açısından sağladığı faydalar nedeniyle tatlandırıcı olarak en çok tercih edilen şekerlerden biridir. Bu nedenle, güvenli olarak kabul edilen fruktozun alternatif üretim yöntemlerinin araştırılması önemli bir gerekliliktir. Günümüzde Yüksek Fruktoz Şurubu (HFS) üretiminde birçok endüstriyel enzim kullanılmaktadır. Genellikle maltooligosakkaritlerin α -1,4-glukozit bağları üzerinde hiçbir aktivitesi olmamasına rağmen, izomaltooligosakkaritlerin indirgeyici olmayan uçları α -1,6-glukozit bağlarını oligo- α -1,6-glukozidaz ile kırarak panoz, palatinoz ve bir a-limit dekstrine hidrolize edilir. Bu çalışmada, termofilik bir bakteri olan *A. gonensis* G2^T'ye ait oligo- α -1,6-glukozidazın sakkaroz hidrolize edici aktivitesinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, *A. gonensis* G2^T'nin oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidaz gen bölgesi pET28(a)+ ekspresyon vektörüne klonlanmış, ekspresyon ürünü ısı şok işlemi, iyon değişim kolan kromatografisi, hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi teknikleri ile saflaştırıldı. Saflaştırılmış enzim biyokimyasal olarak karakterize edildi. Saflaştırılan enzim 60 °C'de ve pH 7,00'de optimal aktivite gösterdi. Enzim aktivitesinin 60 °C'de 276. saatin sonunda yarıya düştüğü belirlendi. Enzim, 60 °C'de pH 6,00-10,00 aralığında 300 saat sonra bile aktivitesini koruduğu gözlemlendi. K_m , V_{max} , k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri sırasıyla 44,69±1,27 mM, 6,28±0,05 μ mol/dk/mg protein, 6,70 1/sn ve 0,15 1/mMsn⁻¹ olarak belirlendi. Enzim aktivitesini Zn⁺², Cu⁺², Pb⁺², Ag⁺², Fe⁺³, Hg⁺² ve Al⁺² metal iyonları düşük konsantrasyonlarda bile inhibe ederken, Mn⁺², Fe⁺² ve Mg⁺² iyonları enzim üzerinde aktivatör etki gösterdi. Sonuç olarak, *A. gonensis* G2^T oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidaz, özellikle Yüksek Fruktoz Şurubu (HFS) üretimi için ilgi çekici özelliklere sahip bir enzimdir.

Anahtar Kelimeler: *Anoxybacillus gonensis* G2^T, oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidaz, HFS, sukraz.

Recep Tayyip Erdogan University Institute of Graduate Studies

Department : Department of Faculty of Fisheries and Aquatic Sciences
Thesis Type : Ph. D Thesis
Supervisor : Asst. Prof. Dr. Hakan KARAOĞLU
Author : Zeynep DENGİZ BALTA
Year : 2023
Pages : 68

ABSTRACT

**CLONING, PURIFICATION AND BIOCHEMICAL
CHARACTERIZATION OF OLIGO-1,4-1,6-ALPHA-
GLUCOSIDASE (SUCRASE-MALTASE-ISOMALTASE)
FROM *Anoxybacillus gonensis***

Fructose is one the most preferred sugar, as fructose are provides the sweetening and health benefits for human. Therefore, it is an important requirement to explore alternative production methods of fructose recognized as safe. Today, many industrial enzymes are used in the production of HFS. Oligo- α -1,6-glucosidase hydrolysis non-reducing ends of isomaltooligosaccharides, panose, palatinose and an a-limit dextrin by breaking α -1,6-glucoside bonds, although it generally has no activity on α -1,4-glucoside bonds of maltooligosaccharides. In this study, it was aimed to evaluate sucrose hydrolyzing activity of oligo- α -1,6-glucosidase belonged to *A. gonensis* G2^T, which is a thermophilic bacterium. For this purpose, oligo- α -1,6-glucosidase gene region of *A. gonensis* G2^T was cloned in pET28(a)+ expression vector, the expression product was purified by heat-shock treatment, ion exchange chromatography, hydrophobic interaction colon chromatography techniques. Purified enzyme was characterized biochemically. The purified enzyme showed optimal activity at 60 °C and pH 7.00. It was determined that the enzyme activity was halved at the end of the 276th hour at 60 °C. The enzyme maintained its activity even after 300 hours in the pH range of 6.00-10.00 at 60 °C. The values of K_m , V_{max} , k_{cat} and k_{cat}/K_m were determined as 44,69±1,27 mM, 6,28±0,05 μ mol/min/mg protein, 6,70 1/sec and 0,15 1/mMsec⁻¹, respectively. While Zn²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺, Ag²⁺, Fe³⁺, Hg²⁺ and Al²⁺ metal ions inhibited the enzyme activity even at low concentrations, Mn²⁺, Fe²⁺ and Mg²⁺ ions behaved as activators on the enzyme. In conclusion, *A. gonensis* G2^T oligo-1,6-glucosidase is an enzyme with interesting properties especially for High Fructose Syrup (HFS) production.

Keywords: *Anoxybacillus gonensis* G2^T, oligo-1,4-1,6- α -glucosidase, HFS, sucrase.

KISALTMALAR

(NH ₄)SO ₄	: Amonyum sülfat'ın formülü'nün simgesi.
°C	: Santigrad derece'nin simgesi.
BSA	: Bovine serum albümin (Sığır serum albümin)'in simgesi.
Ca	: Kalsiyum'un simgesi.
Co	: Kobalt'ın simgesi.
dk	: dakika
DNS	: Dinitrosalisilik asit.
DTT	: Dikloro difenil trikloroetan'ın simgesi.
GI	: Glukoz izomeraz.
HFCS	: High Fructose Corn Syrup (Yüksek Fruktozlu Mısır Şurubu)
HFS	: High Fructose Syrup (Yüksek Fruktoz Şurubu)
Hg	: Civa'nın simgesi.
IPTG	: İzo-propil-d-tiogalaktopiranosid.
kDa	: Kilodalton'un simgesi.
LB	: Lauria-Bertani.
M	: Molarite'nin simgesi.
Mg	: Magnezyum'un simgesi.
mL	: Mili litre'nin simgesi.
Mn	: Mangan veya manganез'in simgesi.
MOPS	: Nötre yakın pH'da biyolojik sistem için mükemmel bir tampondur.
MWCO	: Molecular weight cutoff (Moleküler ağırlık kesme).
NaCl	: Sodyum klorür'ün simgesi.
Ni	: Nikel'in simgesi.
nm	: Nano metre'nin simgesi.
O.D.	: Optical density (Optik yoğunluk).
PZR	: Polimeraz zincir reaksyonu.
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez.
Zn	: Çinkon'un simgesi.
µg	: Mikro gram'ın simgesi.
µL	: Mikro litre'nin simgesi.

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. <i>AgoSuc2</i> 'nin protein saflaştırma tablosu.....	36
Tablo 2. Oligo-1,4-1,6- α -glukosidazların GH13_31 ailesine ait korunmuş bölge.....	48



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Oligo-1,4-1,6- alfa-glukosidaz örnek üç boyutlu yapısı.....	8
Şekil 2. Fruktöz şurubu üretimi için temel enzimatik basamaklar.....	11
Şekil 3. Amiloz ve amilopektinin kimyasal yapısının kimyasal formülü.....	12
Şekil 4. Deneme ve kontrol eppendorf tüplerinde oluşan renk değişimi.....	29
Şekil 5. Hücre özütündeki kaba ekstraktın protein miktarına ait grafik.....	29
Şekil 6. Hücre özütündeki kaba ekstraktın sukraz aktivitesine ait grafik.....	30
Şekil 7. Isı şoku uygulamasında elde edilen hücre özütüne ait protein miktarı.....	30
Şekil 8. Isı şoku uygulamasında elde edilen hücre özütüne ait sukraz aktivitesi.....	31
Şekil 9. AgoSuc2 saflaştırılmasına ait iyon değişimi kolon kromatografisi.....	32
Şekil 10. İyon değişim kolon kromatografisindeki hücre özütü protein miktarı.....	32
Şekil 11. İyon değişim kolon kromatografisindeki hücre özütü sukraz aktivitesi.....	33
Şekil 12. AgoSuc2 saflaştırılma sonrasına hidrofobik etkileşim kolon kromatografisine ait grafik.....	34
Şekil 13. Hidrofobik etkileşim kolon kromatografisine ait protein miktarı.....	35
Şekil 14. Hidrofobik etkileşim kolon kromatografisine ait sukraz aktivitesi.....	35
Şekil 15. AgoSuc2 saflaştırma adımlarının SDS-Page analizleri.....	36
Şekil 16. <i>A. gonensis</i> G2 ^T oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidaz aa ve baz dizilimi.....	38
Şekil 17. AgoSuc2'nin optimum sıcaklığı grafiği.....	40
Şekil 18. AgoSuc2'nin ısı kararlılığı grafiği.....	41
Şekil 19. AgoSuc2'nin optimum pH grafiği.....	42
Şekil 20. AgoSuc2'nin pH stabilitesi grafiği.....	42
Şekil 21. AgoSuc2'nin Mg ⁺² aktivatörlüğünde pH kararlılığı grafiği.....	43
Şekil 22. Sukroz için Michaelis-Menten eğrisi.....	43
Şekil 23. GH13 ailesinin temsili bakteriyel α -glukosidazların filogenetik ağacı....	44
Şekil 24. AgoSuc2'nin tahmin edilen üçüncül yapısı.....	45
Şekil 25. AgoSuc2 için <i>Bacillus cereus</i> MaLL' de tahmin edilen bir dizi modeli.....	46
Şekil 26. UCSF Chimera prog. ile enzim alt ve üst sıra aa'lerin karşılaştırılması....	47
Şekil 27. Metal iyonlarının AgoSuc2 üzerindeki etkisi.....	52
Şekil 28. Bazı Organik bileşiklerin AgoSuc2 üzerindeki etkisi.....	53
Şekil 29. Pymol protein modelleme programı ile glukosidazının aktif bölgesi	55
Şekil 30. Asparat ve glutamat amino asitlerin moleküler yapısı.....	56

Şekil 31. Y63F ve Y63H mutasyonunlarına ait moleküler yapı.....	57
Şekil 32. R192K mutasyonuna, lizin ve arjinin amino asitlerin moleküler yapısı.....	58
Şekil 33. Alanin, valin ve treonin amino asitlerin moleküler yapı.....	58
Şekil 34. R395H mutasyonuna ait moleküler yapı.....	59



GİRİŞ

Dünya nüfusundaki artışa paralel olarak insanoğlunun gıda gereksinimine olan ihtiyacını her geçen gün önemli ölçüde artırmaktadır. İnsanlık tarihindeki gıda tüketimine bağlı bu artış bu nedenle her geçen gün gıda talepleri karşılanamaz hale gelmektedir. Dünya üzerinde yaşayan insan ve hayvanlar yaşamını sürdürebilmek için bitkisel ve hayvansal gıdaları dışardan hazır olarak almak zorundadırlar. Bu hayvansal ve bitkisel gıda maddelerindeki protein, yağ ve karbonhidratlar önce kendilerini oluşturan yapı taşlarına enzimler vasıtası ile sindirilir ve yine taşıyıcı enzimler yardımı ile gastrointestinal sistemden emilerek hücre içine girerler. Yapı taşlarına ayrılan bu maddeler sindirim kanalından emilerek hücrelerin içine girmesi için taşıyıcı enzimlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu enzimler sayesinde hücre içine alınan yapı taşlarından yeni maddelerin sentezlemesi gerçekleşmektedir. İnsan ve hayvanların vücutlarında en uygun şartlar altında hücrelere zarar vermeden metabolizma ve katabolizma olaylarının gerçekleşmesi için biyokimyasal reaksiyonların meydana gelmesinde enzimlerin önemli görevleri bulunmaktadır. İnsan ve hayvanlarda gıda maddeleri ağıza alındığında nişasta pityalin (α -amilaz) enzimi vasıtasıyla sindirilmeye başlamaktadır. α -amilaz enziminin nişastayı disakkarit olan maltoz ve küçük glukoz polimerleri olan maltotrioz ve α -dekstrinler gibi daha küçük bileşiklere hidroliz ettiği bildirilmiştir (Arda, 1985). Et, yumurta gibi proteince zengin yiyeceklere etki eden mide özsuyundaki asitik ortamda (pH 1,90-2,00) pepsin kuvvetli bir enzim olmasına karşın, tripsin ise alkali (pH 8,0) bir ortama sahip olan incebağırsaklarda daha iyi etkinlik göstermektedir. Sindirim sistemindeki proteinlerin daha etkin parçalanması farklı pH ortamlarında farklı enzimler tarafından bu özellikleri sayesinde gerçekleştirildiği bildirilmiştir (Arda, 1985).

Canlı organizmanın hücreleri tarafından organik madde olarak sentezlenen ve katalitik kimyasal görevleri olan birleşiklere enzim denilmektedir. Enzimler hücre içindeki biyokimyasal olayların hızını artırmakta ve reaksiyona girdikleri maddelerle geçici bir süre kimyasal birleşmeler yaptıkları bildirilmişlerdir. Enzimlerin aracılığı olmadan hücre arası maddelerin hücre içine taşınması ve hücre içindeki biyokimyasalların meydana gelmesi çok yavaş meydana geldiği rapor edilmiştir (Arda, 1985). Enzimlerin katalize ettiği biyokimyasal reaksiyonların hızı, enzimsiz

reaksiyonlardan 10^8 - 10^{10} kat daha fazla bir hızda meydana gelmektedir. Mikroorganizmalara ait enzimlerin sentezi ribozomlarda gerçekleşir, golgide aparatında paketlenir ve daha sonra lizozomlarda depolanmaktadır. Bu enzimlerin bir kısmı (endoenzimler, intrasellüler enzimler), anabolizma (asimilasyon) ve katabolizma (dissimilasyon) olayları için hücre içinde tutulurlar. Diğer bir kısım (eksoenzimler, ekstrasellüler enzimler) ise, hücrenin dış ortamına salgılanarak, büyük molekül yapısına sahip maddelerin (protein, polisakkarid, lipid, vs.) hidrolizasyonları sonucu daha küçük maddeler meydana getirmede görev almaktadırlar. Biyokimyasal reaksiyonların başlangıcında substratlar ile geçici bileşikler oluşturan enzimler, reaksiyonlardaki görevleri bittikten sonra onlardan ayrılıp yeni biyokimyasal reaksiyonları katalize etmek üzere ilk formlarına geri dönmektedirler. Bu reaksiyonlar sonucunda kaybolmadıkları için uzun süre çok az miktarı (bir kaç molekül) bile kısa bir süre içinde çok sayıdaki biyokimyasal olaylardaki kimyasal reaksiyonları katalize edebilmektedirler. Örneğin, 2 mL konsantre trypsin enziminin pH 7,50 ve 37 °C'deki uygun koşullar altında 2,5-3 kg sığır etinin hidrolizasyonu için yeterli olduğu bildirilmiştir (Arda, 1985).

Endüstride kullanılan enzimlerin çok az bir kısmı bitkisel ve hayvansal kaynaklardan sağlanmakla birlikte, endüstriyel alanda kullanılan enzimlerin büyük bir çoğunluğu mikroorganizma kaynaklıdır. Teknolojik imkanlar kullanılarak laboratuvar ortamında enzimler çoğunlukla mikroorganizmalardan kolaylıkla elde edilebildiği bildirilmektedir. Enzimlerin üretim kaynağı olarak mikroorganizmaların kullanılmasının başlıca nedeni, aktivitelerinin yüksek olması, yan ürünlerinin daha az meydana gelmesi, daha kararlı ve maliyetlerin düşük olmaları, bol miktarlarda ve uygun bir saflıkta üretilibilmeleridir (Kıran ve Çömlekçioğlu, 2003).

Mikroorganizmalardan uygun koşullar altında biyoteknolojik teknikler kullanılarak çok daha ekonomik mikrobiyel enzimlerin üretilmesi, ayrıca daha uzun süre etkin bir şekilde kullanılabilmesi için suda çözünmeyen maddelere bağlanarak immobilize edilebilmesi (Zhou vd., 2020), enzimlerin endüstriyel sahada kullanılmasındaki artışın temel nedenleri arasında olduğunun rapor edilmiştir (Gümüsel, 2002). Enzimlerin, canlıların hücrelerindeki tüm biyokimyasal olayları yönetebildiği ve hücrelerin fonksiyonlarına zarar vermeden her bir madde için spesifik katalizörler olduğu gösterilmiştir. Enzimatik işlemlerin geleneksel yöntemlere göre

daha az atık madde oluşturmasına bağlı olarak evre kirliliğinin daha az meydana geldiği rapor edilmiştir (Gümüşel, 2002).

Enzimler, kimyasal özelliklerinden dolayı yapısal olarak benzer oldukları kimyasallar arasında spesifik seçicilik gösterebilmektedirler. Enzimlerin biyokimyasal reaksiyonları çok geniş pH (2,00-14,00) aralığında ve sıcaklık değerleri (0-100  C) arasındaki reaksiyonları katalize edebildikleri bildirilmiştir. Bu enzimlerin toksik olmamaları ve geri dönüştürülebilir olmalarının yanı sıra mikroorganizmalar tarafından çok bol miktarlarda retilibildikleri de rapor edilmiştir (Smith, 2004).

Tüm dünya genelinde endüstriyel sahada mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin yıllık kullanım oranları incelendiğinde; %25 alkalın proteaz, %21 diğer proteazlar, %18 amilaz, %10 diğer karbonhidratları parçalayan enzimler (selülaz ve ksilanaz gibi), %10 renin, %3 tripsin, ve %3 lipaz enzimleri ile birlikte %10 oranında analitik ve farmasötik enzimlerin dağılım gösterdiği rapor edilmiştir (Rao vd., 1998).

Zor koşullara dayanıklı olan enzimlerin endüstriyel alanda kullanılmak istenmesinin sebebi endüstriyel açıdan önemli olan birçok kimyasal işlemlerin yüksek sıcaklık ve basınç gibi aşırı ekstrem şartlar altında meydana gelmesidir. Günümüzde özellikle gıda endüstrisinde oldukça yaygın bir şekilde kullanım alanı bulan mezofilik mikroorganizmaların birçok avantajının olmasına karşın sıra dışı şartlardaki kimyasal olaylarda pH, sıcaklık ve iyon konsantrasyonları gibi uygulamalarda faydalanılmaları oldukça sınırlı olduğu bildirilmektedir (Coşkun, 2010). Buna rağmen sıra dışı şartlarda üreyebilen termofilik mikroorganizmalardan sağlanan enzimlerin (ekstremozimler) bahsedilen olağan dışı şartlara dayanıklı oldukları ve bu sebeple ekstremozimlerin son 30 yılda endüstriyel alandaki biyoteknolojik çalışmalarda geniş bir şekilde kullanılmaya başlandığı bildirilmiştir. Aynı zamanda bu enzimlerin ısıl etkinlik ve ısıl kararlılık anlamının düzgün bir şekilde açıklanabilmesi için protein mühendisliğinde model enzimler olarak kullanıldığı da bildirilmiştir (Coşkun, 2010).

Mikrobiyel enzimlerin laboratuvar ortamlarında mikroorganizmalardan kolay retilbilmesi için besi yeri gereksinimlerinin sağlanması, besi yerlerinin hazırlanması, bakterilerin uygun koşullar altında kısa sürede hızlı üretilmesi vb. işlemlerin kolaylığından dolayı araştırmacılar tarafından daha fazla ilgi gösterildiği bildirilmiştir (zcan, 2019).

Gıda endüstrisinde kullanılan enzimlerin çoğunluğunu termofilik bakterilerden elde edilen enzimler oluşturmaktadır. Bu enzimlerin deterjanlara ve organik kimyasal çözücülere karşı oldukça dirençli oldukları bildirilmiştir. Termofilik mikroorganizmalar diğer canlı organizmaların sahip olduğu aynı enzimlere sahip olmalarına karşın termofilik enzimlerinin ısıya daha dayanıklı olduğu, proteolize ve bozulmaya karşı daha sağlam karakter gösterdikleri tespit edilmiştir. Termofilik mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin en önemli özellikleri gıda sanayinde yüksek ısıdaki biyoteknolojik işlemlerde avantajlı bir şekilde kullanılabilmesidir. Düşük çözünürlüğe sahip olan hidrofobik kimyasal maddenin bulunduğu farklı işlemlerde ortamın sıcaklığını artırmak kimyasal maddelerin ve organik çözücünün çözünürlüğünü artırdığı gibi kimyasal reaksiyonun hızının artırmasını sağladığı ve aynı zamanda ortamın vizkozitesinin azalmasına karşın difüzyon katsayısının artışına bağlı olduğu yapılan çalışmalar sonunda bildirilmiştir (Becker vd., 1997; Krahe vd., 1996).

Soğuk aktif enzimlerin düşük sıcaklıklarda yüksek katalitik aktiviteye sahip olmasının yanı sıra azalan ısı kararlılığına da sahip oldukları bildirilmiştir (Siddiqui ve Cavicchioli, 2006). Bu moleküller tipik olarak hidrofobik kalıntıların artan maruziyetini, hidrofobik çekirdeğin küçülen boyutunu ve termostabil hemologlarla kıyaslandığında daha yüksek düzeyde esneklik sağladığı moleküller arası bağların zayıfladığını gösterdiği bildirilmiştir. Bunlar genellikle soğuk ortamda hayatta kalmak için uyum stratejilerinin bir parçası olarak soğuğa uyum göstermiş organizmalar tarafından üretildiği bildirilmiştir (De Maayer vd., 2014; Collins ve Margesin, 2019).

Sükroz (=sakkaroz, α -D-glucopyranosyl β -D-fructofuranoside), doğada doğal organik kimyasallar arasında en çok üretilen disakkarittir. Ucuz, kararlı, saf ve kimyasal olarak reaktif olması nedeniyle endüstriyel açıdan önemli hammaddelerin üretiminde başlangıç malzemeleri üretmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Endüstriyel sakkaroz üretiminin 2006 verilerine göre 148 milyon tona ulaştığı rapor edilmiştir (Queneau vd., 2007). Şeker kamışı ve şeker pancarından üretilen sakkaroz, 1970'lere kadar dünya çapında başlıca tatlandırıcı olarak kullanılmıştır. Ancak Küba Devrimi ile şekerin perakende fiyatının 6 kat artması nedeniyle sakkaroz sıkıntısının başlamasını takiben alternatif bir tatlandırıcı olarak Yüksek Fruktöz Şurubu (HFS) ticari olarak büyük önem kazanmıştır. Yüksek Fruktöz Şurubu (HFS), günümüzde

yiyecek ve içecek endüstrilerinde ana tatlandırıcı olarak kullanılan bir glukoz ve fruktoz karışımıdır. Fruktoz içeriği nedeniyle diğer birçok avantajın sağlamanın yanı sıra, genel olarak güvenli gıda maddesi olarak kabul edildiği bildirilmiştir (Marriott vd., 2009; White, 2014; Khattab ve Kodaki, 2016). Fruktoz sadece düşük kalorili değil, aynı zamanda en tatlı doğal şekerdir. Eşit miktarda sakkarozdan 1,5 ile 2,0 kat daha fazla tatlıdır. Gıda endüstrisinde fruktozun kullanımı noktasında, aroma artırıcı, düşük glisemik indekse sahip olması, yüksek çözünürlükte ve iyi bir nemlendirici olması, kristal oluşumu olmaması ve asidik gıdalarda stabil olmasının yanı sıra yüksek ozmotik basınç sahip olması gibi özelliklerinden dolayı fruktozun birçok avantajının olduğu rapor edilmiştir (Hanover ve White 1993; Zhang vd., 2004; Singh vd., 2018). Fruktozun sağladığı yüksek ozmotik basınç ve düşük su aktivitesi, gıdaların bozulmaya neden olan mikroorganizmalara karşı depolama koşulları altında mikrobiyal kararlılık sağladığı bildirilmiştir (Singh vd., 2018; Eke-Ejiofor, 2015).

Fruktoz ve glukoz içeriklerine göre gruplandırılmış HFS-90 (%90 fruktoz ve %10 glukoz), HFS-55 (%55 fruktoz ve %45 glukoz) ve HFS-42 (%42 fruktoz ve %58 glukoz) gibi HFS'nin birçok tipinin olduğu bildirilmiştir (Neifar vd., 2019; Zahou vd., 2020). HFS genellikle nişastanın çoklu enzimatik reaksiyon ile glukozu hidroliz edildiği, glukoz izomeraz ile glukozun fruktoza izomerizasyonu ve kromatografik ayırma ile yüksek saflıkta fruktoz elde edilmesi aşamaları ile üretildiği rapor edilmiştir (Antrim vd., 1979; Khattab ve Kodaki, 2016). Bu teknik ticari HFS üretimi için kullanılmasına rağmen, HFS üretimi için daha basit ve uygun maliyetli bir yöntemin hala geliştirilmesi gerekmektedir. HFS üretimi için sakkarozun doğrudan monomerlerine (glukoz ve fruktoz) indirgenmesi pratik ve umut verici bir yaklaşım olacaktır.

Oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidaz (E.C.3.2.1.10) enzimi, CAZy veritabanı yardımı ile sınıflandırılarak (<http://www.cazy.org/>) bulunan glikozit hidrolaz ailesi 13'ün (GH13_31) 31 nolu alt ailesine ait olduğu bildirilmiştir (Stam vd., 2006). Genel olarak maltooligosakkaritlerin α -1,4-glukozit bağları üzerinde hiçbir aktivitesi olmamasına rağmen, izomaltooligosakkaritlerin indirgeyici olmayan uçları oligo- α -1,6-glukozidaz enzimi ile α -1,6-glukozit bağlarının parçalayarak panoz, palatinoz ve bir sınır dekstrine hidrolize edildiği rapor edilmiştir (Dong vd., 2020). Enzim ayrıca izomaltaz, sukraz-izomaltaz, dekstrin 6- α -D glukanohidrolaz, α -limit dekstrinaz ve palatinaz

olarak da adlandırılır. Oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidaz, kısa uzunluktaki dallı oligosakkaritleri hidrolize etmesi ve glukoz verimini artırması nedeniyle HFS üretiminin sakkarifikasyon aşamasında yaygın olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Dong vd., 2018). Oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidaz ayrıca sakkarozu HFS için değerli monomerlerine, glukoz ve fruktoza hidrolize edebilir. Bununla birlikte, HFS üretimi için sakkaroz hidrolize etme aktivitesi henüz çalışılmamış olmasına karşın oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidazın izomaltooligosakkaritlerin hidrolize etme aktivitesi üzerine çalışıldığı rapor edilmiştir (Watanabe vd., 1997).



1. GENEL BİLGİLER

1.1 Oligo-1,4-1,6-Alfa-Glukosidaz

Yaygın olarak oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidaz olarak bilinen enzim özellikle HFS üretiminde, nişastanın α -amilaz ile parçalanmasından açığa çıkan oligosakkaritlerin parçalanarak, nişastanın tamamen glukoz indirgenmesinde kullanılması nedeniyle endüstriyel bir öneme sahiptir. Bu öneminden dolayı birçok bakteriden bu enzim izole edilerek karakterize edilmiştir.

Nişasta, bitkilerde fotosentetik işlemlerin bir sonucu olarak üretilen bir depo polisakkariti olarak bilinmektedir. Bitkisel kökenli gıda ürünlerindeki karbohidratların esas depo kaynağı olan nişasta granülleri bitkilerin kök yumrularında, bakliyat kısımlarında ve tohumların içerisinde depolandığı bildirilmektedir. Bir polisakkarit olan nişasta glukoz moleküllerinin α -D-(1,4) ve α -D-(1,6) glikozidik bağlarıyla bağlanması sonucu oluşmuştur. Nişasta doğrudan bir gıda bileşeni olarak kullanıldığı ve kimyasal veya enzimatik işlemlerle biyoteknolojik açıdan önemli birçok ürüne dönüştürülebildiği rapor edilmiştir (Hua ve Yang, 2015). Spesifik olarak, nişastadan elde edilen glukoz şurubu, işlenmiş gıda ve içeceklerin imalatında popüler bir tatlandırıcı özelliğe sahip olan yüksek fruktoz içerikli şeker şurubu elde etmek için kullanılan bir hammadde olduğu bildirilmiştir. Nişastanın enzimatik işlemlerinin ikinci aşamasında yüksek ürün verimi, reaksiyon karışımında bulunan enzimlerin kullanılması ile oligosakkaritleri verimli bir şekilde glukoz dönüştürme yeteneğine bağlı olduğu ileri sürülmüştür (Van Der Maarel vd., 2002). Maltodekstrinlerdeki α -1,6-glikozidik bağların parçalamak için kullanılan glucoamilazın yetersiz hidrolizinin bir sonucu olarak, temizlenmemiş yan ürünler birikerek nihai verimi sınırladığı rapor edilmiştir. Oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidaz (veya izomaltaz) enzimi, glikozil hidrolaz 13 ailesinin (Dong vd., 2020) 31 alt ailesine ait olduğu, dekstrinlerin ve izomaltooligosakkaritlerin indirgeyici olmayan ucundan α -1,6-glikozidik bağları hidrolize edebildiği bildirilmiştir. Oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidazlar, bakteriler, mayalar, filamentli mantarlar ve hayvanlar dahil olmak üzere farklı organizmalarda bulunduğu bildirilmiştir. İncelenen oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidazların hepsi, moleküler ağırlığı 33-71 kDa olan hücre içi enzimler olduğu rapor edilmiştir (Dong vd., 2020). Genellikle, hafif asidik veya nötr pH'da (5,00-7,00) 30-60 °C sıcaklık

aralığında aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Mezofilik *Bacillus cereus*'tan karakterize edilen oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidazın 40 °C’de maksimum aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Watanabe vd., 2001). *B. coagulans*, *B. thermoglucosidasius* ve *B. flavocaldarius* (sırasıyla optimum sıcaklık 62, 70-75 ve 87,5 °C) dahil olmak üzere termofilik mikroorganizmalardan çok sayıda oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidazın tanımlandığı bildirilmiştir (Watanabe vd., 1989; Watanabe vd., 1996; Kashiwabara vd., 1998). Bununla birlikte, bugüne kadar oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidazların sadece bir kaç örneği düşük sıcaklıkta veya doğal ortam sıcaklığında aktif olduğu rapor edilmiştir. Bu tür enzimlerin gıda ve biyoyakıt üretimi sırasında ortam sıcaklığında verimli nişasta şekerlemesi elde etmek için kullanılabildiği beyan edilmiştir (Dong vd., 2020). *Bacillus cereus* suşuna ait oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidaz enziminin örnek üç boyutlu yapısı Şekil 1’de verilmiştir.



Şekil 1. *B. cereus* oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidaz enziminin örnek üç boyutlu yapısı (Watanabe et al., 1997).

Nişastanın tamamen hidroliz olabilmesi ve HFS'ye dönüştürülmesi işlemlerinde, α -amilaz, amilo- α -glukosidaz ve son aşamada glukoz izomeraz kullanılmaktadır. T B TAK 104T472 nolu araştırma projesi ile desteklenen çalışmada, *A. gonensis* G2^T glukoz izomerazı hem doğal hücreden hem de pET28a(+) ekspresyon vektörüne klonlanarak rekombinant olarak ekpress edilmiştir (Karaoglu vd., 2013; Karaoğlu, 2010). Her iki durumda elde edilen enzimler saflaştırılarak enzimlerin tüm biyokimyasal ve kinetik parametreleri ortaya çıkarılmıştır. Elde edilen neticesinde; *A. gonensis* G2^T glukoz izomerazının, üzerine yapılan çalışma sonucunda elde edilen kinetik parametreleri açısından, günümüzde ticari olarak kullanılan birçok GI'lerden oldukça üstün niteliklere sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, enzim üzerinde çeşitli mutasyonlar gerçekleştirilmiş ve bu mutasyonlardan W137F/ V184S ifte mutasyonu ile enzimin katalitik etkinliği yaklaşık 10 kat daha arttırıldığı ortaya konulmuştur (Karaoglu vd., 2013; Karaoğlu, 2010).

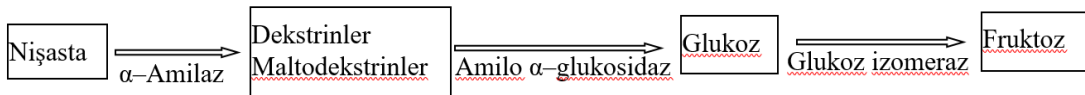
Fuktoz şurubu (HFS); %42 veya 55 fruktoz şekeri bulunduran tatlı ve besleyici sakkarit karışımı olup, mısır nişastasındaki glukozu mikrobiyel enzim olan glukoz izomeraz enzimi kullanılarak fruktoza dönüştürülmesi ile elde edilen bir ürün olduğu rapor edilmiştir (Knorr, 1987; Bandlish vd., 2002; Mu vd., 2012). Ticari olarak kullanılan glukoz izomeraz enzimini mısır nişastasından yüksek fruktoz mısır şurubu (HFCS) elde edilmesinden önceki yıllarda gıdaların tatlandırılmasında %40'ı şeker pancarından, %60'ı ise şeker kamışından klasik yöntemlerle elde edilen sakkarozun tatlandırıcı olarak kullanılması ile sağlandığı bildirilmiştir. Araştırmacılar tarafından alternatif tatlandırıcı olarak glukozu ksilozdan 160 kat daha az ilgisi olan *Pseudomonas hydrophila*'dan elde edilen glukoz izomeraz ile şeker kamışından gereksinim duyulan tatlandırıcı ihtiyaı HFCS  retimi için yeterli olduğu rapor edilmiştir (Marshall ve Kooi,1957). Küba'da 1958 yılında gerçekleştirilen Küba Devrimi yüzünden Küba Devletine ambargo uygulanması sebebi ile yerli olarak üretilen şeker pancarından yeterli miktarda sukroz üretimi gerçekleştirilememiştir. *P. hydrophila*'dan elde edilen glukoz izomeraz ilk kez Japonya'da daha sonra da A.B.D'de ve Küba Devrimi'nden sonra meydana gelen şeker pancarından yeterli sakkaroz üretilmemesi nedeni ile alternatif olarak yüksek fruktoz mısır şurubu elde etmek için bu enzim kullanılarak gereksinimin karşılandığı bildirilmiştir (Karaoğlu, 2004).

Fruktoz şuruplarının tatlı ve viskozitesinin düşük olmasının yanı sıra daha az kristalleşme gibi özellikleri nedeniyle kullanıcıya nakil ve saklama işlemleri esnasında kolaylık sağlayan çok fonksiyonlu bir ürün olduğu bildirilmiştir. Fruktoz şurubunun nem tutma özelliği sayesinde gıdaların kurumasını önlediği gibi lezzet geliştirici özellikleri olduğu, ozmotik basınç yüksekliği ve fermente edilebilir şekerler açısından zengin olduğu da bildirilmiştir. Fruktoz şurubu ağıza alındığında dil üzerinde lezzetin algılanma hissi sakkarozla göre oldukça yüksek olduğu ve tadın hissedilebilme süresinin ise çok daha kısa olduğu bildirilmiştir. Bu yüzden gıda endüstrisinde kullanılan fruktoz şuruplarının bu karakteristik tatlandırıcı özelliklerinin lezzetlerin algılanmasında daha etkili olduğu rapor edilmiştir (Inglett, 1974; Henry, 1976; Pomeranz, 1985; Hobbs, 1986; Howling, 1992; CRA, 1994; Kuyper vd., 2005). HFCS, sakkaroz şekerinden 1,3 kat ve glukoz şekerinden ise 1,7 kat daha fazla tatlılık verebilen endüstriyel bir üründür. Glukoz şekeri sakkaroz şekerinin sahip olduğu tatlılığın %70-75'ine sahipken fruktoz şekeri ise sakkaroz şekerine göre iki kat daha fazla tatlılığa sahiptir. HFCS lezzetinin tatlı olması ve doğal ortamda oldukça bol miktarda bulunan nişastadan imal edildiği düşünüldüğünde ve gıda endüstrisindeki lezzet açısından tatlandırma gücü temel alındığında HFCS'un sakkaroz şekerinden %10-20 daha ucuz olduğu bildirilmiştir. Aynı zamanda HFCS sakkarozda olduğu gibi kristalleşme problemi meydana getirmediği rapor edilmiştir. Tüm bunların yanı sıra fruktoz şekeri midede çok yavaş emildiğinden ve kandaki glukoz seviyesi üzerine olumsuz bir etki yapmadığından dolayı diyabetik hastalar için bir tatlandırıcı olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Bhosale vd., 1996; Karaoglu vd., 2013). Fruktoz şurubu genellikle hem gazsız hemde gazlı içeceklerde, fırın mamüllerinde, hububata dayalı çeşitli ürünlerde, süt mamullerinin hazırlanması, salamura ürünlerin işlenmesi aşamasında, endüstriyel işlenmiş gıdaların hazırlanmasının yanı sıra hazır çorbaların hazırlanmasında, domates soslarının hazırlanmasında, sebze ve meyve gibi konservecilik ürünlerinin hazırlanması aşamasında endüstriyel katkı maddesi olarak kullanıldığı bildirilmiştir. Ayrıca, HFCS unlu mamülleri fermente edilebilen bir madde olduğu, pişirme esnasında unlu mamüllerin kabuk rengine ve ürünün lezzetine katkıda bulunduğu rapor edilmiştir. Ayrıca, bu ürünlerin raf ömrünü uzattığı için ekmek başta olmak üzere, bisküvi, kek, kurabiye, tart dolguları ve jölelerde uzun süre saklanabilmesi amacıyla kullanılabildiği de belirtilmiştir (Reeder, 1978; Pomeranz,

1985; Hebeda, 1987; Wulff, 1987; Johnson vd., 1989; Nabors, 1991; Kulp vd., 1991; Anonymous, 1993; Manohar ve Rao, 1997).

Ülkemizde HFS tamamen dış kaynaklı imkânlar ile (yabancı ülkelere patentli enzimler) üretilmektedir. Çünkü ülkemize ait ve bu endüstriyel uygulamada kullanılan herhangi bir patenli α -amilaz, amiloglukosidaz ve glukoz izomeraz enzimleri bulunmamaktadır. Glukoz izomeraz ile HFS üretimi yapabilmek için kritik safha olan ve oligosakkaritlerin parçalanmasında önemli bir yere sahip olan oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidazın da ülkemize kazandırılması dışa bağımlılıktan kurtulma yolunda büyük bir adım olacaktır. Karakterizasyonu ve ilgili mutasyon çalışmaları tamamlanmış olan bu glukoz izomerazı bir sanayi projesi ile endüstriyel sahada kullanılması planladığından, bu endüstriyel uygulamanın bir basamağını katalizleyen oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidaz enzimin de bu çalışmaya katılması ve bir bütünlük sağlaması son derece önem arz etmektedir.

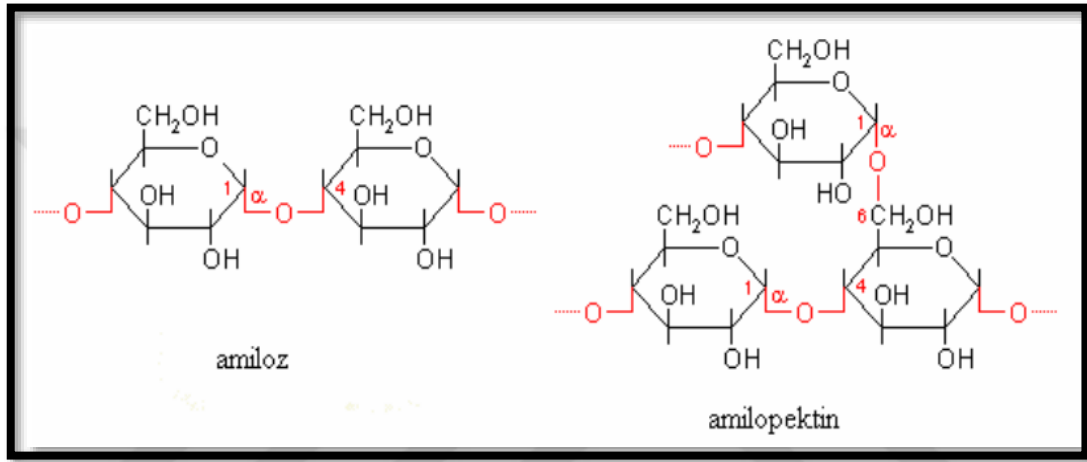
Ayrıca oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidaz enzimi sukrozu (sakkaroz) substrat olarak kullanarak glukoz ve fruktoza parçalaması sebebiyle sukraz veya invertaz enzimi olarak da bilinmektedir. Dolayısı ile enzimin sukraz aktivitesi ile sakkarozdan HFS üretiminin yapılabilmesi de ayrı bir önem arz etmektedir. Özellikle şekerpancari üretiminin popüler olduğu ülkemizde sakkarozdan direk HFS üretiminin gerçekleştirilebilmesi ülkemiz açısından son derece değerli bir kazanç olması muhtemeldir. Nişasta moleküllerinden α -amilaz, amilo- α -glukosidaz ve özellikle glukoz izomeraz enzimleri kullanılarak HFCS (High Fructose Corn Syrup= Yüksek Fruktozlu Mısır Şurubu) üretimi ticari bir öneme sahiptir. Nişastanın enzimatik yolla tamamen hidroliz olabilmesi ve HFCS'ye dönüştürülebilmesi için yukarıda bahsi geçen üç farklı enzimin kombinasyonuna gereksinim duyulduğu bildirilmiştir (Bhosale vd., 1996; Haki ve Rakshit, 2003). Nişastadan fruktoz şurubu üretebilmek için enzimatik yollar ile gerçekleştirilen temel basamaklar Şekil 2'de sunulmuştur.



Şekil 2. Fruktoz şurubu üretimi için temel enzimatik basamaklar.

Polisakkarit olan nişasta molekülü D-glukoz monomerlerinden oluşup, bu monomerler yaklaşık % 10-30 oranında amiloz ve %70-90 oranında da amilopektin

polimerlerini meydana getirmektedir. Amiloz polimeri 6000 kadar D-glukoz molekülünün birbirlerine α -1,4 glukozidik bağ ile bağlanmasıyla oluşan düz zincirlerden oluşmuştur. Amilopektin; α -1,4 glukozidik bağ ile bağlı 10 ile 60 adet glukoz molekülünün biraraya getirdiği kısa düz zincirler ve bu zincirlere α -1,6 glukozidik bağ ile dallanarak bağlanmış 15 ila 45 glukoz molekülünden oluştuğu bildirilmiştir (Niehaus vd., 1999, Van Der Maarel vd., 2002). Amiloz ve amilopektinin kimyasal yapısının kimyasal formülü Şekil 3’de verilmiştir.



Şekil 3. Amiloz ve amilopektinin kimyasal yapısının kimyasal formülü.

Nişasta, amiloz ve amilopektin olmak üzere iki polimerden oluşmaktadır. Tahıllarda bulunan nişasta tipik olarak %70 amilopektin ve %30 amilozdan oluştuğu bildirilmiştir (Poonam ve Dalel, 1995). Amiloz, glukoz birimlerinin α -1,4 bağları yoluyla bağlandığı esasen doğrusal bir moleküldür ve çift sarmal kristal yapıya sahiptir; sarmal, dönüş başına altı D-glukoz molekülü içermektedir. Amilopektin, amilozun tersine, dallanma noktalarında %4 ile %6 α -1,6 bağları olan oldukça dallanmış bir yapıya sahip olduğu ve dal zincirinin ortalama uzunluğu 20-25 glukoz biriminden oluştuğu bildirilmiştir. Amilopektin, 10^8 'den fazla moleküler ağırlığa sahip olduğu, bu da onu doğadaki en büyük molekül yaptığı rapor edilmiştir (Poonam ve Dalel, 1995). Nişasta molekülünün D-glukoz molekülüne parçalanması α -amilaz familyasına (EC 3.2.1.-) ait bir seri enzimin hidroliz reaksiyonu ile gerçekleştirilir. Endo-enzim olarak bilinen α -amilaz (EC 3.2.1.1) zincirin iç bölgesindeki redükleyici α -1,4 glukozidik bağlarına etki ederek nişasta moleküllerini parçalar. Amilopektin oluşumunda bulunan α -1,6 glukozidik bağları ise oligo-1,6-glukozidaz (EC 3.2.1.10)

ile parçalanarak nişasta molekülünün glukoza kadar tamamen parçalanmasının gerçekleştiği rapor edilmiştir (Poonam ve Dalel, 1995).

Nişastanın tamamen hidrolizinde α -amilaz ile birlikte kullanılması sonucunda oligo-1,6-glukozidazın görev alması ile nişasta metabolizmasındaki önemini arttırmaktadır. Bu nedenlerle glukoz ve fruktoz şurubu yapımı gibi endüstriyel işlemlerde, nişastanın tamamen hidrolizi için oligo-1,6-glukozidaz, α -amilazlar ile beraber kullanılması belirgin avantajlar sağladığı bildirilmiştir (Kelly ve Fogarty, 1983; Kelly vd., 1983).

Birçok mikroorganizmada hücre içi olarak sentezlenen oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidaz (E.C 3.2.1.10) sakkaroz molekülünü glukoz-fruktoz bağına parçalar ya da β -D-fruktofuranosit fruktohidrolaz, molekülünü fruktoz kısmından D-fruktoza dönüşümlü izomerizasyonunu ayrıca amilo katalize etmektedir. Enzim oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidaz isminin yanı sıra -1,4-1,6-alfa-glukosidaz, sukraz-maltaz-izomaltaz, invertaz, oilgosakkarit- α -1,6-glukoz hidrolaz gibi isimlerle de adlandırılmaktadır.

Invertaz sahip olduğu endüstriyel önemden dolayı birçok bitkiler ve mikroorganizmalardan karakterize edilmiş olup yaygın şekilde çalışılmıştır. *Saccharomyces cerevisiae*'de invertaz ekspresyonunun düzenleme şemasının kantitatif analizi (Herwig vd., 2001), *Candida utilis* (Belcarz vd., 2002), Batık ve katı hal fermantasyon *Aspergillus niger* tarafından invertaz üretimi (Romero-Gomez vd., 2000), Termofilik bir mantar olan *Thermomyces lanuginosus*'tan yeni bir invertaz enziminin aktivasyon için tiyol ve protein gereksinimi (Chaudhuri ve Maheswari, 1996) belirlendiği rapor edilmiştir. *Penicillium chrisogenum* penisilyum üretiminden kaynaklanan misel atıklarından hayvan besleme için gerekli olan enzimleri (Nuero ve Reyes, 2002) bir araştırmada incelendiği bildirilmiştir. Bir maya olan *Saccharomyces italicus* Y1225 (Halvorson ve Ellias 1958) ve bir küf olan *Aspergillus niger* (Lee vd., 2001) gibi ökaryotik moorganizmalar üzerinde yapılan çalışmalarda izole edilerek saflaştırılan α -glukozidaz enzimleri ve insan lizozomal α -glukozidazının (Hermans vd., 1991) üretildiği bildirilmiştir. Ayrıca, 80 °C'de üreyebilen *Thermococcus* sp. AN185 (Piller vd., 1996) ve *Pyrococcus furiosus* (Constantino vd., 1990) gibi hipertermofilik bakteri suşlarından α -glukozidaz enziminin üretildiği rapor edilmiştir. Bugüne kadar *Thermus caldophilus* GK24 (Nashiru vd., 2001), *Thermomonospora curvata* (Janda vd., 1997), *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* (Wimmer vd.,

1997) ve *Rhizobium* sp. USDA 4280 (Berthelot ve Delmotte, 1999) gibi bakteriyel kökenli suşlarının uygun ortamlarda üretilen kültürlerinden izole edilen α -glukozidaz çalışmaları örnek olarak verilebilir.

Bacillus cinsine ait türlerin izolatlarından termostabil α -glukozidaz enzimi üretebilen; *B. caldovelax* DSM411 (Giblin vd., 1987), *B. flavocaldarius* KP1228 (FERM-P9542) (Suzuki vd., 1987a), *B. thermoamyloliquefaciens* KP1071 (FERM-P84776) (Kashiwabara vd., 2000), *G. stearothermophilus* ATCC7953 (Albert vd., 1998), *G. stearothermophilus* ATCC12016 (Suzuki vd., 1984), *G. thermodenitrificans* HR010 (Ezeji vd., 2005), *Geobacillus* HTA-462 (Hung vd., 2005) ve *Bacillus* sp. DG0303 (Lee, 2000) gibi suşların araştırmacılar tarafından çalışıldığı rapor edilmiştir. Özellikle *G. stearothermophilus* ATCC 12016 ve *G. stearothermophilus* ATCC 7953 türlerin izolatların suşlarından elde edilen α -glukozidazların endüstriyel açıdan önemli olduğu, bugün bu enzimlerin ticari olarak saflaştırılarak üretilme sunulduğu bildirilmiştir (Albert vd., 1998; Suzuki vd., 1984).

Bacillus cinsinin hem mezofilik hemde termofilik suşlarından üretilen α -glukozidazların optimum sıcaklığı 37 ile 85°C arasında değişirken optimum pH değerleri ise 5-9 arasında bir değişim gösterdiği bildirilmiştir (Suzuki vd., 1987a, Hung vd., 2005). Mikrobiyal α -glukozidazlar yaklaşık 70 kDa'un altında olmakla birlikte, genel olarak molekül ağırlıklarının 30 ile 102 kDa arasında değişim gösterdiği rapor edilmiştir (Piller vd., 1996). *Geobacillus* sp. HTA-462 suşları ile yapılan çalışmada bir enzime ait 1,7 kilo bazlık genin klonlanarak *E. coli*'ye aktarıldığı bildirilmiş ve üretilen enzime ait proteinin 555 amino asit içerdiği ve moleküler büyüklüğünün 65 kDa olduğu belirlendiği rapor edilmiştir (Hung vd., 2005). *B. thermoamyloliquefaciens* KP1071 suşuna ait 787 amino asit içerdiği belirlen II. bir α -glukozidazın elde edildiği ve molekül ağırlığı 90 kDa olan bu enzimin üç boyutlu yapısının ortaya çıkarıldığı rapor edilmiştir (Kashiwabara vd., 2000).

Enzimlerin aktivite etkinliği gösterebilmesi için gerekli olan fakat protein yapısında olmayan, özellikle metal iyonlardan meydana gelen yan gruplar, kofaktör olarak isimlendirilmektedir. Enzimlerin birçoğu kofaktör olarak Cu^{+2} , Fe^{+2} , Mg^{+2} ve Zn^{+2} iyonlarına ihtiyaç duymaktadır. Bazı ağır metal iyonları (Ag^{+2} , Cu^{+2} ve Hg^{+2} gibi) veya bunların türevleri, bazı enzimlerin -SH gruplarıyla birleşerek, enzimlerin katalitik merkezinde bulunan sistein kökleri ile merkaptür meydana getirebildiği ve yapılarında

sülfidril grubu içeren enzimlerin, bildirilen ağır metal iyonları ile birleşerek inhibe edildiği bildirilmiştir (Zubay, 1988). Yapılan bir araştırmada termofilik archaeobacteria genusuna ait thermococcus türünden elde edilen α -glukozidazın Hg^{+2} , Co^{+2} ve Ni^{+2} gibi iyonları ile tamamen inhibe edildiği, bununla birlikte Mg^{+2} , Ca^{+2} ve Zn^{+2} gibi çift değerlikli metal iyonlarının ise enzim aktivitesini çok az miktarda düşürdüğü belirtilmiştir (Piller vd., 1996).

Enzimlerin 3 boyutlu yapı çalışmalarında, bölgesel spesifik mutasyonlar ile yapılan inhibisyon çalışmaları, α -glukozidazların substrat ve ürün arasındaki ilişki kurmayı ve aktif bölge kısmındaki amino asitlerin farklı yapılarda olmasının daha iyi anlaşılmasına yardımcı olmuştur (Van Der Maarel vd., 2002). Aynı zamanda amino asit yapılarının analizleri ve amino asit yapıları üzerinde mutasyon çalışmaları sayesinde iyonlaşabilen bir aspartat (Asp) ile glutamat (Glu) amino asit köküne sahip olan katalitik bölgelerin korunmuş dört bölge içerdiği bildirilmiştir ve substratın bağlanma bölgelerinde enzimin substratına spesifikliği belirleyen bir histidin (His) amino asitin varlığının saptanmış olduğu rapor edilmiştir (Kelly vd., 1983).

Yapılan başka bir çalışmada *S. cerevisiae*'den α -glukozidaz ve oligo-1,6-glukozidazlar elde edilmiştir. Yapılan bölgesel spesifik mutasyon deneylerinde oligo-1,6-glukozidazın α -1,6 glukozidik bağlara karşı spesifiklikten sorumlu amino asit kökünün Val216 olmasına karşın, α -1,4 glukozidik bağlarına spesifik α -glukozidazında bu amino asit pozisyonunun ise Thr273 olduğu ortaya konulmuştur. Enzim üzerindeki tek bir amino asit değişikliği ile enzimin substrat tercihi değiştirilebildiği tespit edilmiştir. Bu iki enzim genleri birleştirilerek yeni bir enzim (kimerik enzim) oluşturulduğu bildirilmiştir. Mutasyona uğratılarak elde edilen bu yeni enzim ile hem α -1,4 glukozidik bağları hem de α -1,6 glukozidik bağların hidrolize edilebildiği rapor edilmiştir. Böylece protein mühendisliği yolu ile aynı mikroorganizmaya ait hem oligo-1,4-1,6-alfa-glukozidaz hem de α -glukozidaz aktivitesinin olduğu yeni bir kimerik enzim elde edildiği rapor edilmiştir (Yamamoto vd., 2004).

B. cereus ATCC7064 izolatlarından elde edilen oligo-1,4-1,6-alfa-glukozidazın üç boyutlu yapısını çalışıldığı bir araştırmada bölgeye spesifik mutasyonlar ile enzimin ısıya dayanıklılığını arttırmaya yönelik çalışmalar yapıldığı rapor edilmiştir. Mezofilik yapıda olan bu enzimin üzerinde rastgele seçilen 12 farklı

noktada yaptıkları mutasyonlar ile prolin köklerinin eklenmiş olduğu bildirilmiştir. Bunun sonucunda termostabilizasyon normal değere göre 5,6°C kadar arttırılabildiği rapor edilmiştir (Watanabe vd., 1997). Farklı biyoteknoloji ve biyomedikal alanlarında çok yaygın bir şekilde kullanım alanı bulan enzimlerin *Actinomyces* cinsi mikroorganizmalar tarafından üretildiğinin bildirilmesine (Özcan, 2019) rağmen, son yıllarda gıda endüstrisinde kullanılabilecek enzimlerin birçoğu termofilik bir bakteri olan *Anoxybacillus gonensis* G2^T türünde mevcut olduğu rapor edilmiştir (Saraç, 2011; Bak, 2017; Kızaklı, 2019; Rakıcı, 2019).

Anoxybacillus gonensis G2^T, 55-60 °C’de büyüme sıcaklığına sahip olan termofilik bir bakterinin literatüre kazandırıldığı rapor edilmiştir (Belduz vd., 2003). Yapılan çalışmalarda bu bakterinin oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidaz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Yine çeşitli mutasyonlar ile glukoz izomerazın termal kararlılığının arttırılması çalışmaları tamamlanmıştır (115352 nolu TÜBİTAK araştırma projesi). HFCS üretiminde glukoz izomeraz ile birlikte oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidaz’a da ihtiyaç duyulmaktadır. *Anoxybacillus gonensis* G2^T’e ait oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidaz’ın sukraz aktivitesinin biyokimyasal karakterizasyonunun tamamlanarak kinetik parametrelerinin açığa çıkarılması ve bu değerlerin mutasyonlar ile geliştirilmesi bu çalışmanın konusunu oluşturmaktadır. *Anoxybacillus gonensis* G2^T’e ait glukoz izomeraz enzimi kinetik parametreleri ve biyokimyasal parametreleri açısından endüstriyel olarak kullanımda olan çoğu ticari glukoz izomerazlardan üstün özelliklere sahiptir. Bu bakteriye ait oligo-1,4-1,6 alfa-glukosidazın da endüstriyel uygulamalar açısından önemli kriterlere sahip olacağı umudunu yaşamaktanız. HFCS üretiminde kullanılan 3 enzimden ikisinin aynı bakteri kökenli olması enzimlerin HFCS üretiminde daha fazla performans sağlayacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmada, *A. gonensis* G2^T oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidaz’ı kodlayan gen pET28a(+) vektörü içerisinde klonlanarak plazmite pETG2SUC2 ismi üretilen enzime ise AgoSuc2 ismi verilmiştir. pETG2SUC2, konak hücre olan *E. coli* BL21(DE3) suşu içerisine aktararak ekspres edilmiştir. Bu sistem *E. coli* BL21(DE3)/pETG2SUC2 olarak isimlendirilmiş ve gerekli şekillerde stoklanmıştır. Bu tez çalışması kapsamında;

- ✓ AgoSuc2 geninin tespit edilmesi ve klonlanması,
- ✓ AgoSuc2 enziminin yüksek miktarda ekspresyonu,

- ✓ Ekspres edilen enzimin saflaştırılması,
- ✓ Saflaştırılan enzimin biyokimyasal parametrelerinin belirlenmesi (optimum sıcaklık, optimum pH, inhibitör ve aktivatörlerin araştırılması),
- ✓ Saflaştırılan enzimin değişik substratları (sukroz, izomaltoz, amilopektin, vb.) kullanımına göre kinetik parametrelerinin belirlenmesi,
- ✓ Pymol protein modelleme programı kullanılarak enzimin üç boyutlu yapısının oluşturulması ve aktif bölgede var olan amino asitlerin belirlenmesi,
- ✓ Doğal ve mutant enzimleri kullanarak çay şekeri olarak bilinen sukroz (sakkaroz)'dan HFCS üretiminin araştırılması planlanmıştır.

1.2 *Anoxybacillus gonensis* G2^T suşunun özellikleri

Balıkesir İlinin Gönen ilçesindeki su sıcaklığı 70 °C olan kaplıca suyundan alınan örneklerden termofilik bir bakteri olarak *Anoxybacillus gonensis* G2^T suşu ilk kez izole edildiği rapor edilmiştir (Belduz vd., 2003). Geleneksel klasik yöntemler ve genetik teknikler ile identifikasyonu yapılarak ismlendirildiği rapor edilmiştir. *Anoxybacillus gonensis* ksilanolitik, sporlu, fakültatif anaerob ve büyüme için optimum sıcaklığı 55-60°C olan basil şeklindeki termofilik bir bakteridir. G2^T suşunun hareketli, Gram pozitif oksidaz ve katalaz testi pozitif olduğu tespit edilmiştir (Belduz vd., 2003). Uygun besleyici agar ortamı, G2^T suşu, krem renkte, düzensiz şekilde, pürüzlü kenarlı ve 23 mm çapında küçük kolonileri meydana getirmektedir. Işık mikroskobu ile yapılan muayenede çubuk şeklinde ve hareketli bir bakteri olduğu tespit edildi bildirilmiştir (Belduz vd., 2003). Ksiloz ve glikoz üzerinde yüksek düzeyde ksiloz izomeraz aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir. 16S rRNA gen dizisi analizi, bu izolatın *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641T'ye >%97 benzerlik gösterdiği rapor edilmiştir (Belduz vd., 2003).

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

Bu çalışmada, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Temel Bilimler Anabilim Dalı'nın Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı'ndaki -20 °C'de stoklanan *A. gonensis* G2^T bakterisinin oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidaz (sukraz-maltaz-izomaltaz) geninin rekombinant olarak (pETG2SUC2) şeklinde klonlanıp *E. coli* BL21 (DE3) suşunda üretilmesi, gen ürününün saflaştırılması ve saflaştırılan enzimin biyokimyasal karakterizasyonu çalışılmıştır.

2.1 Enzim Deneylerinde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kimyasallar ticari olarak Aldrich-Chemie (Steinheim, Almanya), Merck A.G. (Darmstadt, Almanya), Fluka Chemie A.G. (Buchs, İsviçre) ve Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, ABD)'den satın alındı. Wizard Genomic DNA Saflaştırma Kiti, Wizard Plus SV Minipreps DNA Saflaştırma Sistemi, Taq DNA Polimeraz, dNTP ve restriksiyon endonükleazların tümü Promega Corp. (Madison, WI, ABD)'tan satın alındı. Tüm kimyasallar ayıraç (reaktif) sınıfındaydı ve tüm çözeltiler damıtılmış ve deiyonize su ile yapıldı. Bu kimyasallar aşağıda listelenmiştir.

Tripton (Fluka), Yeast Ekstrakt (Merck), NaCl (Sigma), CaCl₂ (Sigma), CoCl₂, MgSO₄ (Merck), D-Glukoz (Sigma), 4-Morpholinepropanesulfonic acid (MOPS, Fisher scientific), Lizozim (Bioshop), Etil alkol (Smyras), Ampisilin (Fisher), Kanamisin (Fisher), IPTG (Bioshop), Commassie Brilliant Blue G-250 (Panreac), Commassie Brilliant Blue R-250, BSA (NEB), DEAE-Sepharose (Sigma), Phenyl sepharose 6 Fast Flow (Sigma), Amonyum sülfat (Merck), Amonyum asetat (Merck), Sodyum asetat (Merck), Tris (Fisher Scientific), Potassium phosphate (Merck), Glisin (Fluka), Gliserol (Fluka), Hydrochloric acid (Sigma aldrich), Sodium hydroxide (Applichem), ZnCl₂ (Merck), CuCl₂ (Merck), SnCl₂ (Merck), HgCl₂ (Merck), MgSO₄ (Merck), KCl (Merck), BaCl₂ (Merck), PbCl₂ (Merck), Ag₂O₄S (Merck), MnSO₄ (Merck), FeSO₄ (Merck), Al₂(SO₄)₃ (Merck), Borik asit (Vivantis), Üre, Cadmium (Merck), 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS), Na/K tartanat, Agaros, EDTA (Merck), IPTG (Sigma), Dimethyl Formamide (DMF), Sodyum Dodesil Sülfat (SDS), Amonyum persülfat, TEMED, β-merkaptotanol.

2.2 Suşlar ve Vektörler

A. gonensis G2^T NCIMB 13933T, *E. coli* BL21 (DE3):pLysS, Novagen'den (Madison, WI, ABD) ve Jm101 Stratagene'den (La Jolla, CA, ABD) satın alınmıştır. Çalışmada Promega (pGEM®-T Easy) ve Novagen (pET28 (a)+) plazmit vektörleri kullanılmıştır. Rekombinant plazmitler içeren tüm *E. coli* suşları, aksi belirtilmedikçe, uygun şekilde, 37 °C'de ve pH 7,40'te 100 µg/mL ampisilin veya kanamisin ile desteklenmiş Luria-Bertanie (LB) ortamında kültürlendi.

2.3 Luria-Bertani (LB) Sıvı ve Katı Besi Yerlerinin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan bakteri suşlarının üretilmesi için sıvı ve katı Luria-Bertani (LB) besi yeri hazırlandı. Sıvı LB besi yeri için 10 g tripton, 5 g yeast ekstrakt ve 5 g NaCl kimyasal maddeler hassas terazide tartıldı ve 900 mL saf suda manyetik karıştırıcı yardımı ile çözüldü. Katı LB besi yeri için yukarıdaki formüle 12 gr/L agar eklendi ve ısıtmalı manyetik karıştırıcı yardımı ile çözüldü. Hazırlanan besi yerlerinin pH'sı 7,40 ± 0,20'a olacak şekilde 1 N NaOH ve 1 N HCl tamponları ile titre edilerek 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan besi yeri otoklavda 121 °C'de 20 dakika (dk) süre ile steril edildi.

2.4 *A. gonensis* G2^T'de Oligo-1,4-1,6-Alfa-Glukosidaz Varlığının Tespiti

A. gonensis G2^T 100 mL sıvı LB besi yerinde sallamalı etüvde 55°C'de 16 saatte boyunca üretildi. İnkübasyon sonunda üretilen bakteri 50 mL falkon tüpüne aktararak soğutmalı santrifüjde 7500 rpm'de 5 dk boyunca çöktürüldü. Pellet üzerine 100 mM MOPS (pH 7,00) tamponundan ilave edilerek vortekslendi. Tekrar 7500 rpm'de santrifüj ile aynı sürede çöktürüldü. Hücreler yukarıda belirtilen tampon içerisinde tekrar çözülerek 1 µg/mL lizozim ilavesiyle 37 °C'de 20 dk inkübe edildi. Bu süre sonunda 10 dk boyunca sonikatörle patlatıldı ve elde edilen hücre özütü 14800 rpm'de 20 dk santrifüj edildi ve süpernatant steril tüplere aktarıldı. Reaksiyon çözeltisi için eppendorf tüplere 420 µL 100 mM MOPS tamponu 40 µL 0,5 molar sukroz substratı ve elde edilen hücre özütünden 40 µL ilave edilerek son hacim 500 µL ayarlandı. Kontrol eppendorf tüplerine 460 µL 100 mM MOPS tamponu 40 µL 0,5 molar sukroz substrat ilave edildi ve vortekslenerek karıştırıldı. Eppendorf tüpleri 60 °C'deki thermo shaker'de 30 dk inkübe edildi. Sonra tüpler buz içine alınarak

soğutulularak reaksiyon sonlandırıldı. Bu örneklerden ayrı eppendorf tüplere 200 µl alınıp üzerine 200 µl DNS ilave edilerek 100 °C'de 10 dk inkübe edildi. Eppendorf tüplerin içindeki enzim aktivitesinin varlığı reaksiyon sonrasında oluşan renk değişimine göre kontrol ile kıyaslanarak değerlendirildi.

2.5 Moleküler Çalışmalar

2.5.1 PZR ile Oligo-1,4-1,6-Alfa-Glukosidaz Geninin Tespiti

A. gonensis G2^T bakterisi LB besiyerinde bir gece 55 °C'de inkübe edildi. Üretilen hücreler 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve hücreler 13.000 rpm'de 5 dk santrifüjlenerek çöktürüldü. Wizard Genomic DNA Purification Kiti (Promega) üretici firmanın kullanım talimatlarına göre kullanılarak *A. gonensis* G2^T'in genomik DNA'sı izole edildi. *A. gonensis* G2^T'in oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidaz geni, AG-SUC2-F (5'-CCCATGGAACGGACATGGTGGAAA G-3') ve AG-SUC2-R (5'-CGAATTCTTATTGTAATGCATAAATTCTGC-3') primerleri ile amplifiye edildi. Primerler, *Nco*I ve *Eco*RI restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleriyle tasarlandı. PZR reaksiyonu, 200 µL'lik PZR tüplerinde 50 µL'lik son hacimde hazırlandı. PZR reaksiyon içeriği, 5 µL 10 X PZR tamponu, 5 µL 200 µM dNTP karışımı, 4 µL MgCl₂ (25 mM), 1 µL her bir primerden (10 µM), 1 µL Taq DNA polimeraz ve 2 µL kalıp genomik DNA olacak şekilde ayarlandı ve reaksiyonlar Thermo Cycler PZR cihazı vasıtasıyla (Bio-Rad, Hercules, CA) yapıldı. PZR adımları: 3 dk boyunca 94 °C'de ilk denatürasyon, 40 amplifikasyon döngüsü, 1 dk boyunca 94 °C'de denatürasyon, 40 saniye 49 °C'de bağlanma (annealing) ve 90 saniye 72 °C'de uzama ve 72 °C'de 10 dk son uzama olarak ayarlandı. PZR ürünü 0,5 µg/mL etidyum bromür içeren %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve üretilen DNA bantları görüntülendi.

2.5.2 *A. gonensis* G2^T'den SUC Geninin Klonlanması ve Dizilenmesi

PZR'da çoğaltılan reaksiyon ürünü ve vektör, pGEM®-T Easy klonlama kitinin prosedüründe bildirildiği şekilde, 16 °C'de 12 saat süresince ligasyona tabi tutuldu. Ligasyon ürünleri, CaCl₂ transformasyon metodu ile *E. coli* DH5α kompetent hücrelerine aktarıldı. Tansforme olan hücreler 1 mg/mL olacak şekilde Xgal ve IPTG ile birlikte 1 mg/mL ampisilin ihtiva eden LB agar üzerine yayma ekim yöntemi ile

inoküle edildi. LB agar 37°C’de 16 saat süresince etüvde bekletildi. LB agar üzerinde üreyen mavi ve beyaz kolonilerden beyaz koloniler seçildi. Beyaz koloniler oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidaz genini içeren pGEM®-T Easy vektörünün *E. coli* DH5α hücresinde ürediğini gösterir. Bu koloniler 1 mg/mL ampisilin ihtiva eden LB besi yerine plazmit eldesi için inoküle edildi. Bir gece boyunca inkübasyon sonrası hücreler çöktürülerek, plazmit izolasyonu Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System kiti kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokole göre gerçekleştirildi. İzole edilen plazmitler Magrogen şirketine sekans ettirildi ve enzime ait genin DNA dizisi tespit edildi. Elde edilen veriler, Advanced Blast Program of GenBank (NCBI, NIH, Washington DC) verileri kullanılarak analiz edildi. CLUSTALW programı, oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidaz (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) çoklu dizi hizalamasının gerçekleştirilmesi için kullanıldı ve MEGA X programı (düzeltilmemiş p-mesafe modeline göre komşu birleştirme yöntemiyle) filogenetik analiz ve oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidazın dendrogram yapımı için kullanıldı (Kumar vd., 2018).

Oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidaz genini içeren rekombinant plazmit ve pET28a (+) ekspresyon vektörü, *Nco*I ve *Eco*RI restriksiyon endonükleazları ile kesildi. Enzim kesimi, son hacim 50 µL olacak şekilde 35 µL plazmit, 5 µL buffer, 1 µL *Nco*I, 1 µL *Eco*RI içerecek şekilde 37 °C’de 30 dk bekletilerek gerçekleştirildi. Kesim sonrası elde edilen pET28a (+) vektörü rekombinant plazmitinden elde edilen insert, %1’lik agaroz jele yüklenerek yürütüldü. Jelde belirlenen vektör (pET28a (+)) ve insert (*Ago*SuC2’yi kodlayan DNA parçası) DNA parçaları ultraviyole ortamında bistüri ile kesildi. Jelden çıkarılan parçalar Thermo Scientific Gel Extraction Kiti ile yıkanarak jelden izole edildi. Elde edilen insert ve vektör DNA parçaları ligasyon işlemi ile birleştirildi. Ligasyon; 10 µL son hacimde olacak şekilde 3 µL vektör ve 3 µL insert, 1 µL T4 buffer 1 µL DNA ligaz, 2 µL saf su ile hazırlanıp 12 saat süresince 16 °C’de gerçekleştirildi. CaCl₂ transformasyon reaksiyonu için steril eppendorf tüpüne 200 µL *E. coli* DH5α kompotent hücresi koyuldu ve üzerine 10 µL ligasyon ürünü ekleyip 45 dk buzda bekletildi. Daha sonra 43 °C’ye ayarlanmış ısıtıcı blok (thermoshaker)’da 1,5 dk ısı şoku yapıldı. Hücrelerin üzerine 250 µL LB besi yeri eklenip 37 °C’de 2 saat inkübe edildi. Bu ürün önceden hazırlanmış 1 mg/mL kanamisin içeren LB agar üzerine inoküle edildi ve steril cam baget ile yayma yapıldı. LB agar 37 °C’de 16 saat süresince etüvde bekletildi. Böylece, rekombinant plazmit (pETG2SUC2), CaCl₂ yöntemi ile *E.*

E. coli DH5 α kompetent hücrelerine transformase edilmiş oldu. Daha sonra *E. coli* DH5 α pETG2SUC2 sisteminden elde edilen koliniden plamit izolasyonu yapmak için kanamisin içeren LB besiyerine ekim yapıldı. Besiyeri 37 °C’de 16 saat etüvde bekletildi. Elde edilen plazmit tekrar CaCl₂ transformasyon metodu ile *E. coli* BL21 (DE3) kompetent hücrelerine aktarılarak *E. coli* BL21 (DE3)/pETG2SUC2 sistemi oluşturuldu.

Kompetent hücre hazırlama; 20 mL LB besi yerine *E. coli* BL21 (DE3) suşu veya *E. coli* DH5 α suşu ekildi. Ekim yapılan besiyeri 37 °C’de 16 saat inkübasyona bırakılıp O.D. ölçüldü. O.D. değeri 0,1 olacak şekilde bu kültürden taze kültür hazırlandı ve LB besiyerine ekildi. Taze kültürün O.D’si 0,4 - 0,8 oluncaya kadar 37 °C’de (yaklaşık 1 saat) çalkalamalı etüvde üretildi. Inkübasyon sonrası kültür 50 mL’lik falkon tüplerde 4400 rpm’de soğutmalı santrifüjde 5 dk boyunca çöktürüldü. Süpernatant dökülüp pellet üzerine 10 mL steril CaCl₂ (100 mM) eklendi ve hücreler çözülerek 30 dk buzda bekletildi. Inkübasyon sonrası soğutmalı santrifüjde 4400 rpm’de 5 dk süresince tekara çöktürüldü. Süpernatant kısmı dökülüp pellet üzerine 2 mL steril CaCl₂ (100 mM) eklendi. Buzdolabında (+4 °C) 2 saat tutuldu.

2.5.3 Enzimin Üretilmesi

E. coli BL21(DE3)/pETG2SUC2’ın 1 mg/mL Kanamisin ihtiva eden LB sıvı besi yerine ekilen gece kültüründen, O.D.’si 0,1 olacak şekilde 200 mL kanamisinli LB besi yerine taze ekildi. Taze kültür, O.D’si 0,8 oluncaya kadar 37 °C’de çalkalamalı etüvde (yaklaşık 1 saat) inkübe edildi. Büyüme miktarı spektrofotometre ile yapılan ölçümler ile takip edildi. O.D’si 0,8’e ulaşan hücre kültürü son hacimde 1 mM olacak şekilde IPTG ilavesi ile uyarıldı ve 4 saat daha 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda üreyen bakteri kültürü 7500 rpm’de 5 dk santrifüj edilerek çöktürüldü. Çöktürülen bakteri hücreleri 100 mM MOPS (pH 7,00) tamponunda yıkanarak temizlendi. Yıkama sonrası bakteri hücreleri tekrar 7500 rpm’de santrifüje edilerek çöktürüldü. İşleme tabi tutulan bakteri hücreleri 100 mM MOPS tamponunda yeniden çözülerek içine 1 µg/mL lizozim ilave edilip 37 °C’de etüvde bir saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Bu işlemten sonra bakteri hücreleri 5 dk SONIC Vibra Cell marka sonikatör kullanılarak %20 güçte 1 döngüde patlatıldı ve elde edilen hücre özütü soğutmalı santrifüj yardımı ile 15.300 rpm’de 20 dk santrifüje edildi. Üstte kalan

süpernatant kısmı temiz bir tüpe aktarıldı. Elde edilen süpernatantdaki enzim ile saflaştırma işlemine geçildi.

2.5.4 Enzimin Saflaştırması

2.5.4.1 Isı Şoku Muamelesi

E. coli BL21/pETG2SUC2 sistemi ile üretilen AgoSuc2 termofilik karakter taşımaktadır. Dolayısı ile ekspresyon vektöründen ifade edilen enzimimiz dışında diğer proteinlerin büyük bir bölümü (*E. coli* BL21 hücrelerine ait) mezofilik karakterde olduklarından dolayı kısa bir sıcak şoku uygulanarak bu proteinlerin çok büyük bir kısmı denatüre edildi. Termofilik karakterli enzimimiz ise bu durumdan etkilenmeyecektir. Bu amaç doğrultusunda, saflaştırmanın ilk adımı olarak, kaba ekstrakt olarak elde edilen mezofilik hücre (*E. coli* BL21/pETG2SUC2) özütündeki konak hücreye ait proteinleri elimine etmek için 60 °C’de 30 dk ısı şoku uygulaması yapıldı. Isı şoku sonrası denatüre olan tüm proteinler 15.300 rpm’de 20 dk santrifüj edilerek ortamdan uzaklaştırıldı. Isı şoku uygulanan hücre özütünün protein miktarı Bradford metodu (Bradford, 1976) ile ve aktivite miktarı DNS yöntemi (Miller, 1959) ile ölçüldü. DNS şu şekilde hazırlandı; 1 g DNS, 50 mL damıtılmış su içinde çözündürüldü. 30 g K-Na-Tartrat ve 20 mL 2N NaOH ilave edilerek son hacim 100 mL’ye tamamlandı (Miller, 1959).

2.5.4.2 İyon Değişim Kromatografisi

İyon değişim kromatografisi, 30 cm uzunluğunda ve 1,5 cm çapında bir kolon kullanılarak, Biyolojik Lp Sistemi (Bio-Rad) cihazı vasıtasıyla gerçekleştirildi. Kolon malzemesi olarak DEAE-Sepharose fast flow (Sigma) kullanıldı. Kolon malzemesi ve deneyde kullanılan tüm tamponların gazları vakum pompası kullanılarak alındı. Gazı alınmış olan kolon malzemesi oda sıcaklığına getirildikten sonra bir pastör pipeti yardımıyla yavaş bir şekilde kolona dolduruldu. 50 mM MOPS (pH 7,0) tamponunun 250 mL ile dengeye getirildi. Daha sonra 7,7 mL enzim özütü dengelenmiş olan kolona yüklendi. Tutunmayan proteinlerin kolondan uzaklaştırılması için 25-30 mL kadar aynı tampon kolondan geçirildi. Kolondan çıkan örnekler bir tüp içerisinde biriktirildi. Bu tüp içerisinde oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidaz aktivitesi arandı. Daha sonra kolonun

NaCl konsantrasyonu sıfırdan başlayarak 0,6 M kadar yükseltildi. Bunun için 0-0,6 M NaCl gradient köprüsü kullanıldı. Kolondan çıkan fraksiyonlar çeşitli tüpler içerisinde biriktirildi. Fraksiyonlardaki protein miktarı 280 nm dalga boyunda yapılan ölçümler sonucu belirlendi. Uygulama sonunda elde edilen tüm fraksiyonlarda oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidaz aktivitesine bakıldı. Aktivite bulunan fraksiyonlar bir araya toplandı. Toparlanan enzim özütü (saflaştırma tablosu için gerekli verilere ulaşıldıktan sonra) 50 kDa cut off Vivaspin Consantrator kullanılarak 7500 g'de 10 dk santrifüj edilerek yoğunlaştırıldı.

2.5.4.3 Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi

Hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi için 20 cm uzunluğundaki ve 0,75 cm çapındaki bir kolon kullanıldı. Bu çalışmada kolon malzemesi olarak Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (Sigma) kullanıldı. Uygulama Biyolojik Lp Sistemi (Bio-Rad) cihazı vasıtasıyla gerçekleştirildi. Kolon malzemesinin gazı vakum pompası ile alındı ve oda sıcaklığına geldikten sonra bir pastör pipeti kullanılarak kolona yavaş bir şekilde dolduruldu. Kolon doldurma işlemi bittikten sonra 1,3 M amonyum sülfat içeren 100 mL tampon 50 mM MOPS tamponu (pH 7,00) ile dengeye getirildi. İyon değişim kromatografisinden elde edilen enzim özütüne eşdeğer hacimde 2,6 M amonyum sülfat içeren tampon ile bire bir oranında seyreltildi ve özütün amonyum sülfat içeriğinin 1,3 M olması sağlandı. Özüt kolona yüklenerek yüksek amonyum sülfat konsantrasyonunda proteinler hidrofobik kolon malzemesine bağlanması sağlandı. Daha sonra kolonun amonyum sülfat içeriği 1,3 M'den 0 M'ye düşürüldü. Bunun için 100'er mL'lik amonyum sülfat gradient köprüsü kullanıldı. Tamponun akış hızı 0,5 mL/dk olarak ayarlandı ve kolondan çıkan fraksiyonlar cam tüpler içerisinde 1,7 mL olacak şekilde toplandı. Fraksiyonlardaki protein miktarı 280 nm dalga boyunda yapılan ölçümler sonucu belirlendi. Ayrıca tüm fraksiyonlarda oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidaz aktivitesi araştırıldı. Aktivite bulunan fraksiyonlar bir araya toplandı. Bir araya getirilen bu enzim solüsyonu ile karakterizasyon çalışmaları safhası başlatıldı.

2.5.4.4 SDS PAGE Analiz Yöntemi

Enzim saflaştırılırken saflaştırma işleminin her kademesinde (kaba ekstrakt, ısı şoku muamelesi, iyon değişim ve hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi) bir

miktar özüt saklanarak saflaştırma işleminin sonunda SDS-PAGE analizine tabi tutuldu. Böylelikle saflaştırmaya ait jel görüntüsü de elde edildi. SDS-PAGE’de %12’lik jel, Harlow ve Lane (1988) bildirdiği şekilde hazırlandı. 1,6 mL su, 2 mL %30’luk akrilamid karışımı, 1,3 mL 1,5 M Tris (pH 8,8), 0,05 mL %10 SDS; 0,05 mL %10 amonyum persülfat, 0,002 mL TEMED ile %12’lik ayırma jeli ve 1,4 mL saf su, 0,33 mL %30 akrilamid karışımı, 0,25 mL 1 M Tris (pH 6,8), 0,02 mL %10’luk SDS, 0,02 mL tamponu %10 amonyum persülfat, 0,002 mL TEMED ilave edilerek derişim jeli hazırlandı. SDS-PAGE yürütme tamponu 14,4 gr glisin, 3 gr Tris-base, 10 mL %10’luk SDS 1000 mL saf suda çözülerek hazırlandı. Yürütme boyası 400 µl %10’luk SDS, 150 µL 1 M Tris (pH 6,80), 250 µL gliserol, 60 µL β-merkaptoetanol, 140 µL bromofenol blue ile hazırlandı. 15 µL yürütme boyasına 25 µL enzim özütü eklenip 95 °C’de 5 dk bekletilerek SDS-PAGE jeli yüklendi ve 15 mA akımda yürütme boyası jelden çıkana kadar yürütme işlemine devam edildi. Sonrasında SDS-PAGE jel, Commasie Brilliant Blue (% 0,125 Commasie Brilliant Blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit) boyası ile 1 saat süreyle boyandı. Ardından yıkama solüsyonu I (50 mL metanol, 10 mL asetik asit, 40 mL saf su) SDS-PAGE jeli yıkandı. Yıkama solüsyonu II (7,5 mL metanol, 10 mL asetik asit, 82,5 mL saf su) 3 saat süresince yıkanarak bir bilgisayar tarayıcısı ile fotoğraflandı.

2.6 Enzimin Kinetik ve Biyokimyasal Parametrelerinin İrdelenmesi

2.6.1 Protein Miktarının Belirlenmesi

Yapılan bütün çalışmalarda protein miktarının tayini Bradford’un (1976) geliştirmiş olduğu metoda göre gerçekleştirildi. 1000 mL boya çözeltisi hazırlamak için 100 mg Coommasie Brilliant Blue G-250 50 mL %96’lik etanol içerisinde iyice çözülerek üzerine 100 mL %85’lik fosforik asit ilave edildi ve 1000 mL’ye saf su ile tamamlandı. Hazırlanan çözelti filtre kâğıdı ile süzülerek temizlendi.

Hazırlanan kalibrasyon eğrisinde standart olarak bovine serum albumin (BSA) kullanıldı. Kalibrasyon eğrisi için; 0, 1, 2, 4, 8, 15, 30, 50, 100, 150, 200, 300 µg BSA içeren çözeltiler 0,15 M’lık NaCl ile 100 µL’ye tamamlandı. Ardından üzerine 5 mL yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan boya çözeltisinden ilave edildi ve vorteksenerek 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda 595 nm’de ölçümler spektroskopik

ölçümler yapılarak protein miktarı $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ cinsinden hesaplandı. Örnekler için BSA yerine 0, 2, 4, 8, 15, 20, 30, 50, 75, 100 μL hücre ekstraktı alınıp üzerine 5 mL bradford çözeltisi ilave edildi. Oda sıcaklığında 15 dk bekletilip 595 nm ölçüldü.

2.6.2 Enzim Aktivite Deneyi

Substrat olarak ister sukroz kullanılsın isterse amilopektin kullanılsın oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidaz aktivitesi, açığa çıkan glukoz miktarının tespiti 3,5-dinitrosalisilik asit reaktifi (DNS) yöntemi ile sakkarozdan indirgeyici glukoz salınımı ölçülerek belirlendi. DNS şu şekilde hazırlandı; 1 g DNS, 50 mL damıtılmış su içinde çözündürüldü. 30 g K-Na-Tartrat ve 20 mL 2N NaOH ilave edilerek son hacim 100 mL'ye tamamlandı (Miller, 1959).

Aktivite reaksiyonu için 100 mM MOPS tamponu (pH 7,00), 500 mM sukroz ve 25 μL enzim ile nihai hacim 500 μL 'ye hazırlandı ve 60 °C'de 30 dk inkübe edildi. Reaksiyon karışımı buz üzerine yerleştirilerek reaksiyon sonlandırıldı (Watanabe vd., 1998). Daha sonra reaksiyon karışımından 25, 50, 75, 100 ve 200 μL steril eppendorf tüplere konuldu. Her bir eppendorf tüplerinin üzeri son hacim 200 μL olacak şekilde tampon eklendi ve tüplere 200 μL DNS solüsyonu ilave edildi. Tüpler 100 °C'de 10 dk inkübe edildi. Süre sonunda buz üzerine alındı. Üzerine 400 μL saf su ilave edildi. İndirgeyici şeker miktarı, xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer (Bio-Rad) cihazında 540 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Standart grafik glukoz kullanılarak aynı cihazda ölçülerek çizildi. Serbest kalan şekerlerin tahmini için DNS yöntemi kullanıldı. Bir unite oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidaz, substrat olarak sukroz kullanarak reaksiyon koşulları altında 1 μmol indirgeyici şekeri serbest bırakan enzim miktarı olarak tanımlandı.

2.6.3 Optimum Sıcaklık

Enzimin en iyi çalıştığı en uygun sıcaklık değeri; 500 mM sukroz substratı varlığında, pH'sı 7,00 olan 100 mM MOPS tamponunda son hacim 500 μL 'de gerçekleştirildi. Reaksiyonlar 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ve 100 °C'de 30 dk boyunca inkübe edilerek gerçekleştirildi. Farklı sıcaklıklardaki reaksiyon tüplerinin her birinden 25, 50, 75, 100 ve 200 μL olacak şekilde steril eppendorf tüplere alındı. Her bir eppendorf tüplerinin üzeri son hacim

200 µL olacak şekilde tampon eklendi ve tüplere 200 µL DNS solüsyonu ilave edildi. Tüpler 100 °C’de 10 dk inkübe edildi. Süre sonunda buz üzerine alındı. Üzerine 400 µL saf su ilave edildi. İndirgeyici şeker miktarı, xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer (Bio-Rad) cihazında 540 nm’de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Belirlenen optimum sıcaklık bu aşamadan sonraki tüm aktivite deneylerinde kullanıldı.

2.6.4 Optimum pH

Enzimin en etkili olduğu pH değeri, pH değeri farklı tamponlar ile bir dizi reaksiyon sonrasında belirlendi. Reaksiyonlar pH 5,00 ve 5,50’lik 50 mM asetat tamponunda; pH 5,50, 6,00, 6,50, 7,00, 7,50, 8,00’lik 50 mM fosfat tamponunda; pH 8,00, 8,50, 9,00, 9,50 ve 10,00’luk 50 mM glisin tamponunda belirlenen optimum sıcaklıkta ve 30 dk boyunca gerçekleştirildi. Bu süre sonunda yapılan tüm reaksiyon basamakları optimum sıcaklıkta (2.6.3) yapıldığı gibidir. Belirlenen optimum pH değeri bu aşamadan sonraki tüm aktivite deneylerinde kullanıldı.

2.6.5 Enzimin Isıl Kararlılıkları, Mg⁺² ve DTT’nin Isıl kararlılığa Etkisi

Enzimin optimum sıcaklığı olarak tespit edilen 60 °C’deki kararlılığı ve bu kararlılığa Mg⁺² ve DTT’nin etkisi belirlendi. Enzimin sade hücre özütü, 10 mM Mg⁺² içeren hücre özütü, 10 mM Mg⁺² ile 10 mM DTT içeren hücre özütü 60 °C’de inkübasyona bırakıldı. Her bir tüpten 5, 15, 20, 25 µL hücre özütü alınıp 500 mM sukroz substratı varlığında pH’sı 7,00 olan 100 mM MOPS tamponunda son hacim 500 µL’deki enzim aktivitesi xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer (Bio-Rad) cihazında 540 nm’de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Enzim aktivitesinin ilk ölçümü 0. saatte yapıp sonraki ölçümler 12 saatlik aralıklarla belirlendi.

2.6.6 Enzimin pH Kararlılıkları

Oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidazın pH kararlılığının belirlenmesi için sade hücre özütü, 10 mM Mg⁺² içeren hücre özütü, pH 4,00 - 4,50, 5,00 - 5,50 sodyum asetat; pH 5,50 -6,00, 6,50 - 7,00 potasyum fosfat; pH 7,00 - 7,50, 8,00 - 8,50 - 9,00 tris tamponu; pH 9,00-9,50, 10,00; glisin-NaOH tamponlarında +4 °C’de inkübasyona bırakıldı. Her bir hücre özütünden 50 µL alınıp 500 mM sukroz pH 7,00’deki 100 mM MOPS

tamponu son hacim 500 µl’de enzim aktivitesi ölçüldü. İlk ölçüm 0. saatte olup 24 saat aralıklarla 336. saatte son ölçüm yapıp enzimin kararlı olduğu pH değeri belirlendi.

2.6.7 Enzimin Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

Enzimin kinetik parametrelerini hesaplayabilmek için 500 mM’a kadar arttırılan sakkaroz substratın konsantrasyonu ile optimum sıcaklık ve pH’larda bir seri reaksiyon gerçekleştirildi. Enzim aktivitesi açığa çıkan glukoz miktarının belirlenmesi ile hesaplandı. Ölçümler sırasında substrattan kaynaklanan interferans sorunu; aynı derişimde substrat içeren körler kullanılarak ortadan kaldırıldı. Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerleri OriginPro 2021 analiz programı kullanılarak çizilen Michaelis-Menten eğrisi ile belirlendi.

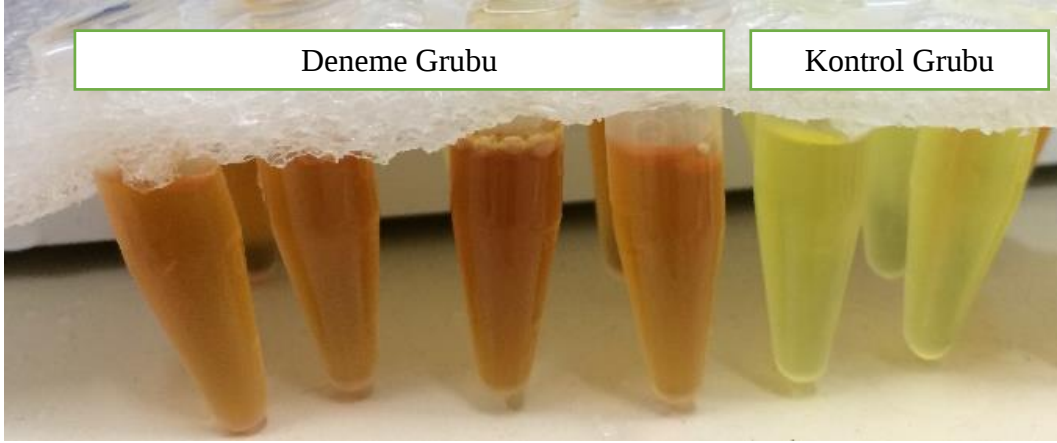
2.6.8 Oligo-1,4-1,6-Alfa-Glukozidaz Üzerine Aktivatör ve İnhibitörlerin Etkisi

Farklı metal iyonlarının (Zn^{+2} , Cu^{+2} , Pb^{+2} , Sn^{+2} , Hg^{+2} , Ca^{+2} , Mg^{+2} , K^+ , Co^{2+} , Na^+ , Ba^{+2} , Ag^{+2} , Mn^{+2} , Fe^{+2} , Al^{+3} ve Fe^{+3}) ve çeşitli kimyasal bileşiklerin (amonyum sülfat, borik asit, üre, oksalik asit, sodyum sitrat, EDTA ve DTT), 1 mM, 5 mM ve 10 mM konsantrasyonlarında, metanol, etanol, gliserol ve aseton %5, %10 ve %20 konsantrasyonlarında, SDS, Tween80 ve β -merkaptoetanol %1, %5 ve %10 konsantrasyonlarında ayrı ayrı reaksiyon tüplerine eklenip üzerine 25 µL hücre özütü, 500 mM sukroz, pH 7,00 olan 100 mM MOPS tamponu ile son hacim 500 µL’de, çeşitli reaksiyonlar gerçekleştirilerek enzim aktivitesi (2.6.2.) ölçüldü. Kontrol numunesinin aktivitesi (herhangi bir katkı maddesi yokluğunda) %100 olduğu varsayılarak aktivite yüzdesi olarak ifade edildi.

2.7 Bulgular

2.7.1 A. gonensis G2^T’de Oligo-1,4-1,6-Alfa-Glukosidaz Varlığı

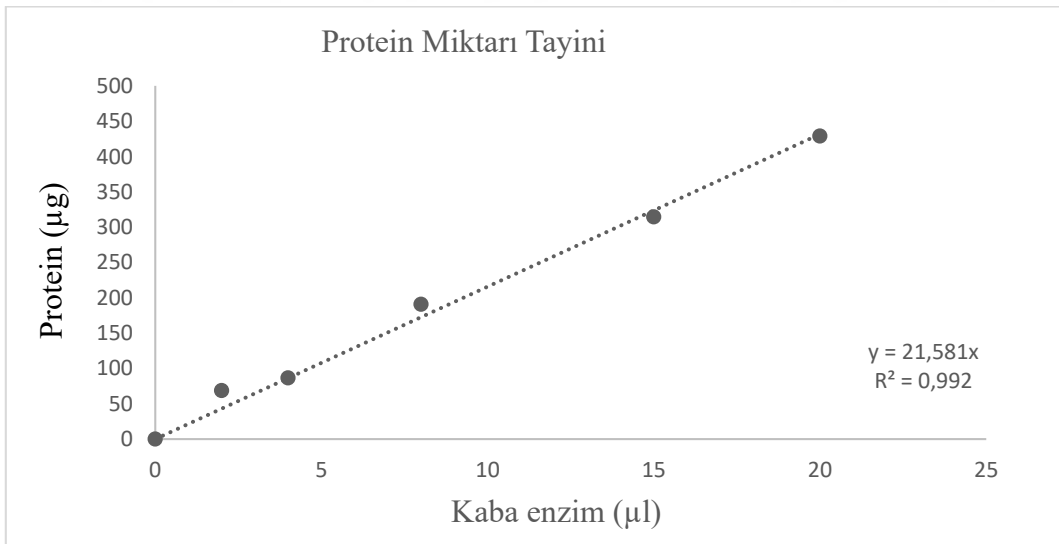
Deneme sonunda eppendorf tüplerde oluşan kırmızımtırak renk sukrozun sukraz tarafından parçalandığını göstermekte ve kontrol grubunun sukraz ilave edilmediği için oluşan sarı renk sukrozun parçalanmadığını göstermektedir. Çalışmanın sonunda deneme ve kontrol grubuna ait eppendorf tüplerde oluşan renk değişimi ait görüntü Şekil 4’de verildi.



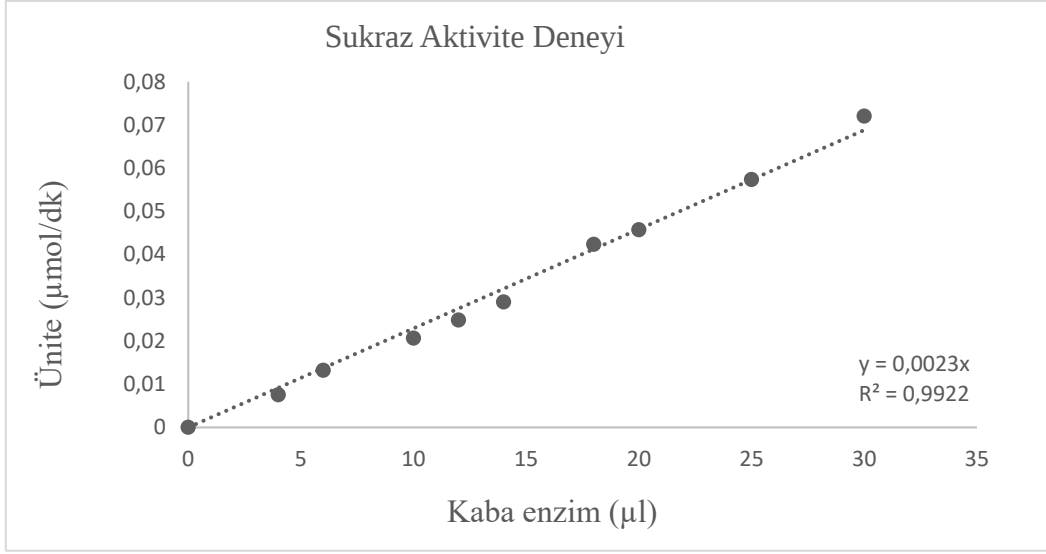
Şekil 4. Deneme ve kontrol gruplarına ait eppendorf tüplerinde oluşan renk değişimi.

2.7.2 AgoSuc2'nin Kaba Ekstraktı

AgoSuc2 enzimin ekspresyonu deneyi sonunda elde edilen hücre özütündeki (kaba ekstrakt) protein miktarı Bradford metodu ile hesaplanarak $21,581 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ olarak tespit edildi. Hücre özütündeki kaba ekstraktının protein miktarına ait grafik Şekil 5'de verildi. Deneme sonunda sukraz aktivitesi ise $0,0023 \mu\text{mol}/\text{dk}$ olarak belirlendi ve sukraz aktivitesine ait grafik Şekil 6'da sunuldu.



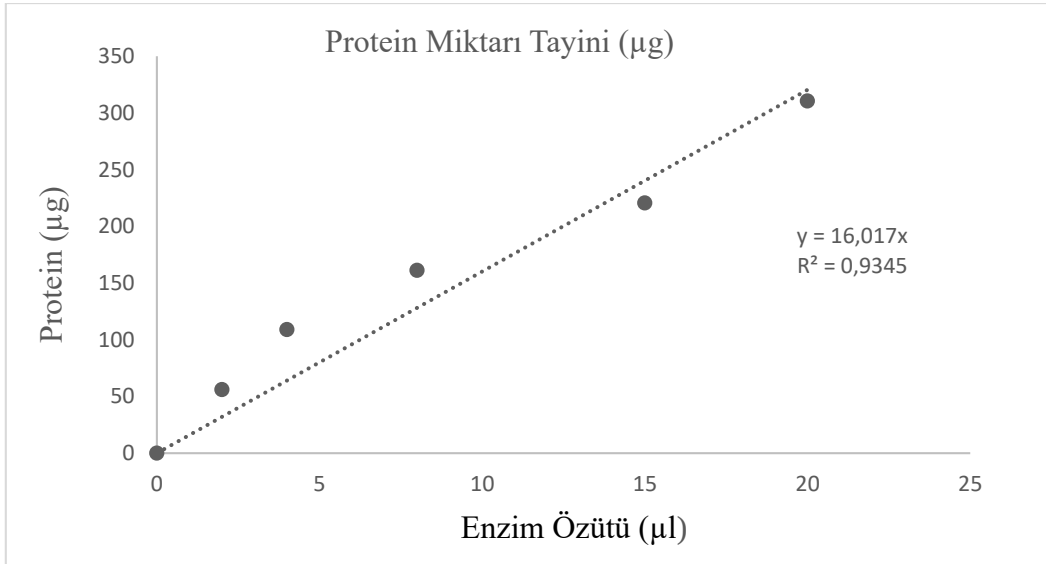
Şekil 5. Hücre özütü saflaştırmasında kaba ekstraktın protein miktarına ait grafik.



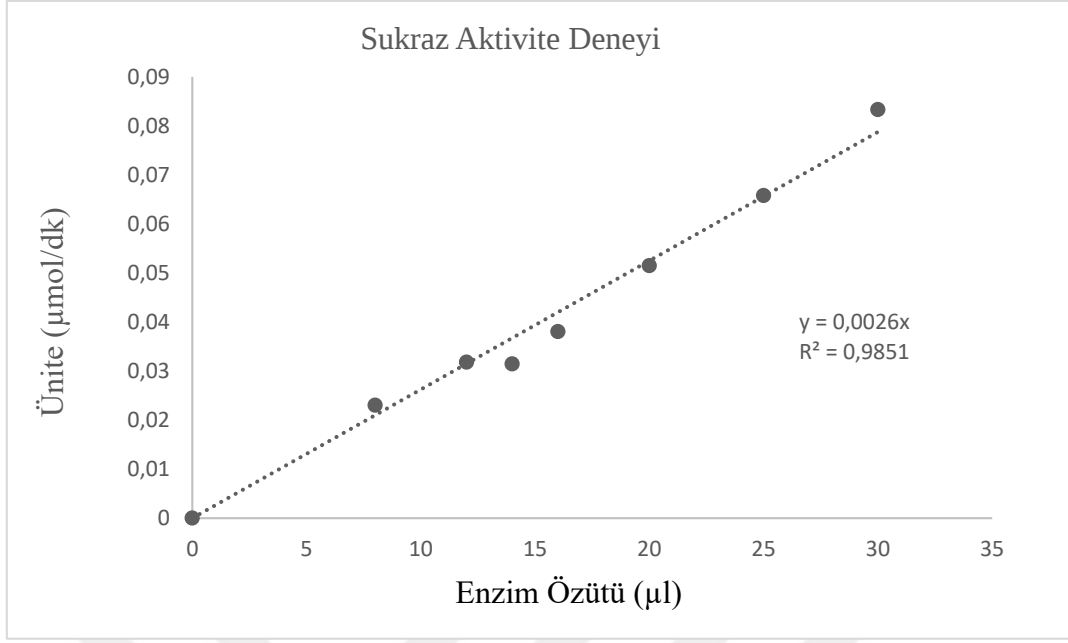
Şekil 6. Hücre özütü saflaştırmasında kaba ekstraktın sukraz aktivitesine ait grafik.

2.7.3 AgoSuc2'nin Isı Şoku Muamelesi

AgoSuc2 kaba ekstrakt enzim özütünün ısı şoku muamelesi sonunda protein miktarı 16,017 µg/µL olarak tespit edildi. Sukraz aktivitesi ise 0,003 µmol/dk olarak belirlendi. AgoSuc2'nin saflaştırılmasında ısı şoku uygulaması sonrası elde edilen hücre özütüne ait protein miktarına ait grafik Şekil 7'de verildi. Isı şoku muamelesi sonunda tespit edilen sukraz aktivitesi Şekil 8'de verildi.



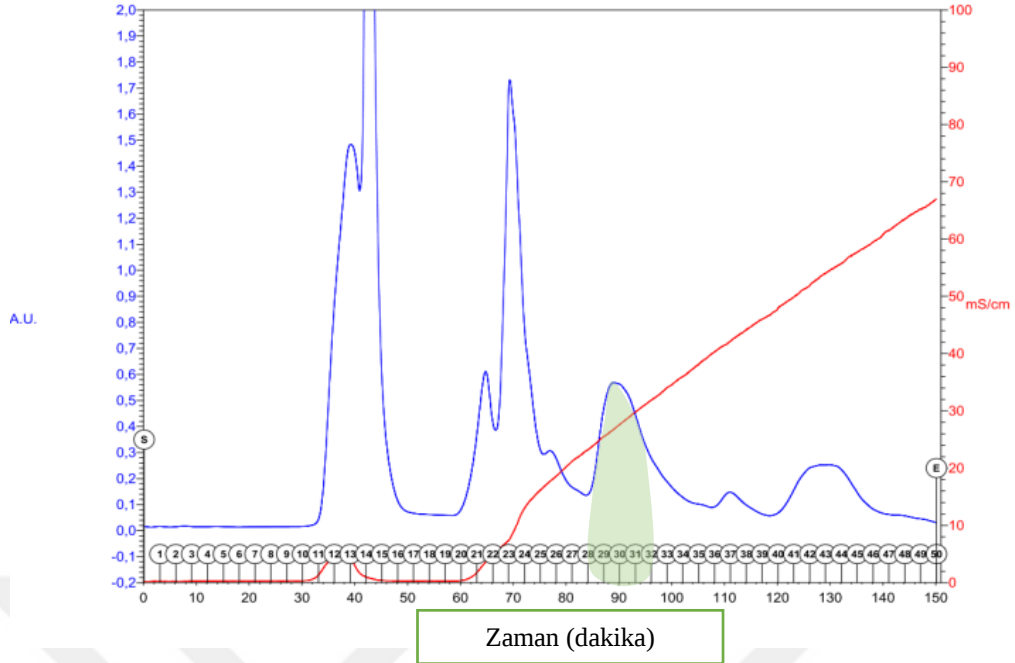
Şekil 7. Isı şoku sonrası elde edilen hücre özütüne ait protein miktarı grafiği.



Şekil 8. Isı şoku sonrası elde edilen hücre özütüne ait sukraz aktivitesi grafiği.

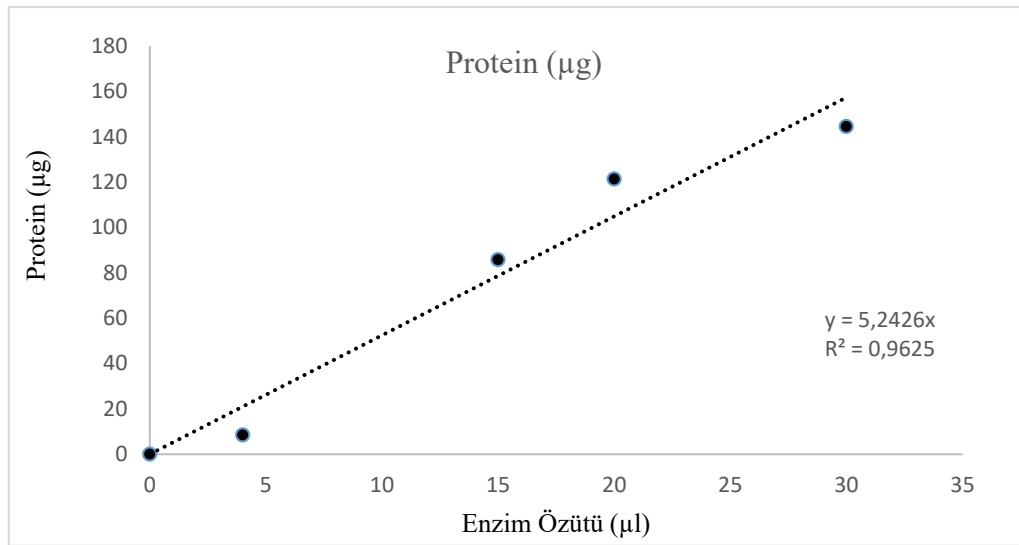
2.7.4 İyon Değişim Kromatografisi

Isı şoku uygulaması sonrası elde edilen hücre Biyolojik Lp Sistemi (Bio-Rad) cihazında DEAE-Sepharose kullanılarak gerçekleştirilen AgoSuc2 saflaştırılma sonrasına ait iyon değişim kromatografisi aşağıdaki Şekil 9’da verilmiştir. Şekil 9’daki grafikte kırmızı renkli çizginin NaCl konsantrasyona ait yoğunluğunu ifade etmektedir. Mavi renkli çizgi ise kolondan çıkan 295 nm absorbansdaki protein miktarını göstermektedir. Yatay sutunda yuvarlak içinde bulunan rakamlar, her biri 3 mL olacak şekilde kolondan çıkan fraksiyonların cam tüp numaralarını ifade etmektedir. Grafikteki mavi renkli pikler irdelendiğinde yüksek miktarlarda proteinlerin kolondan çıktığını göstermiştir. Tüplerin hepsi sukraz aktivitesi yönünden tarandığında 28-32. tüpler arasındada sukraz aktivitesi belirlendi. Diğer mavi pikler ise kolona tutunmayan proteinleri ifade etmektedir. Cihazın maksimum ölçüm aralığı 295 nm’de 2,0 absorbansda olduğu için tüplerin bazılarında piklerin tepe noktalarına ait değerler grafikte gösterilememiştir.

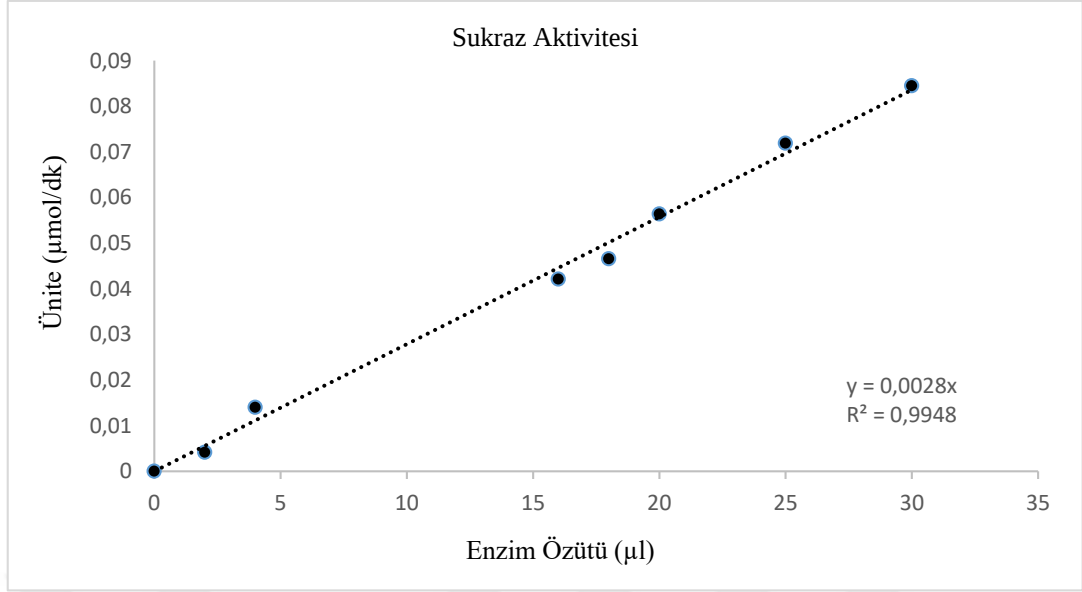


Şekil 9. AgoSuc2 saflaştırılma sonrasına ait iyon değişimi kolon kromatografisi.

İyon değişim kolon kromatografisi deneyinin sonunda AgoSuc2 enzim özütünün protein miktarı 5,2426 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ olarak belirlendi. Sukraz aktivitesi 0,003 $\mu\text{mol}/\text{dk}$ olarak tespit edildi. AgoSuc2'nin saflaştırılmasında iyon değişim kolon kromatografisinde elde edilen hücre özütüne ait protein miktarı Şekil 10'da verildi. AgoSuc2'nin saflaştırılmasında iyon değişim kolon kromatografisindeki hücre özütüne ait sukraz aktivitesi Şekil 11'de gösterildi.



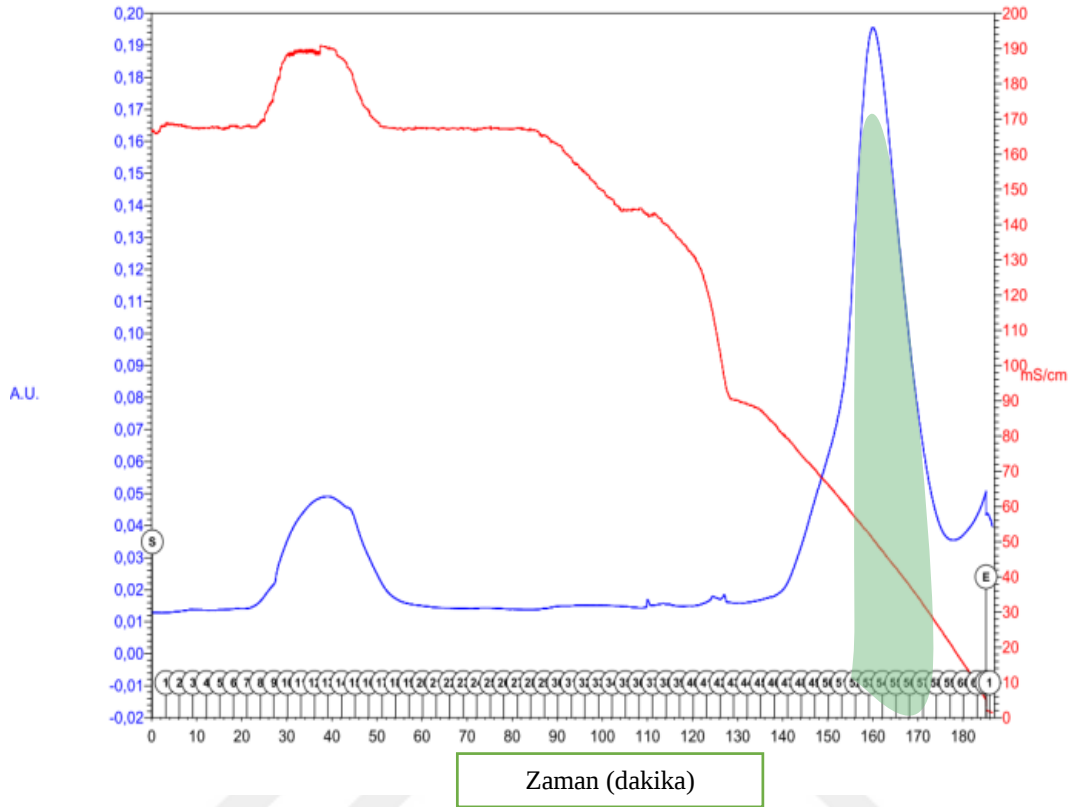
Şekil 10. İyon değişim kolon kromatografisinde hücre özütündeki protein miktarına ait grafik.



Şekil 11. İyon değişim kolon kromatografisinde hücre özütündeki sukraz aktivitesine ait grafik.

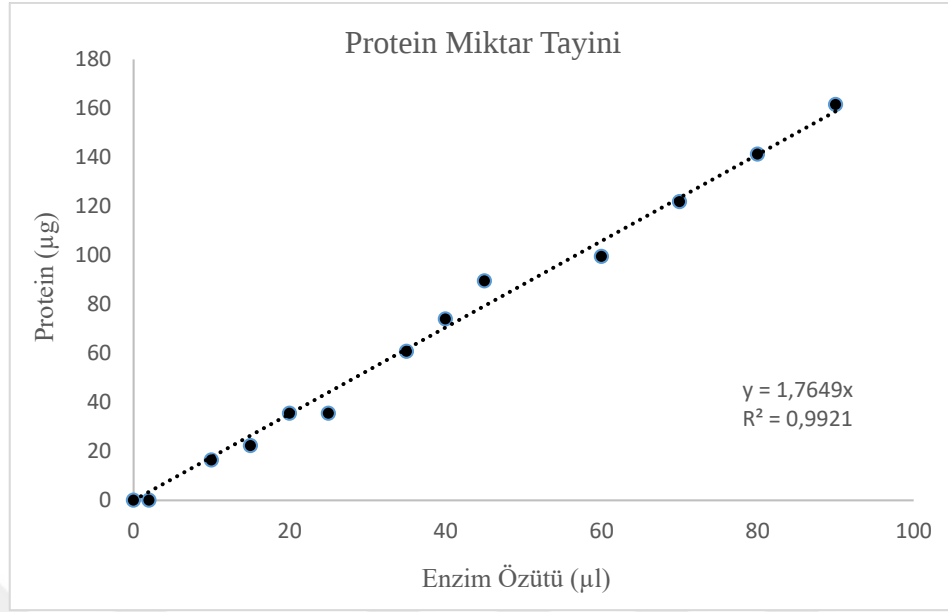
2.7.5 Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi

İyon değişim kolon kromatografisindeki hücre özütü Biyolojik Lp Sistemi (Bio-Rad) cihazında Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (Sigma) kullanılarak gerçekleştirilen AgoSuc2 saflaştırılma sonrasına ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi Şekil 12’de verildi. Grafikteki kırmızı çizgi amonyum sülfat konsantrasyonunu, mavi renkli çizgi ise kolondan çıkan 295 nm absorbandsaki protein miktarını göstermektedir. Grafikteki mavi renkli çizgi irdelendiğinde 9-18 tüpler arasında proteinin kolondan çıktığını göstermiştir. Bu proteinler kolona tutunmayan proteinleri ifade etmektedir. Tüplerin hepsi sukraz aktivitesi yönünden tarandığında 52-58. tüpler arasındada sukraz aktivitesi belirlendi. Elde edilen hücre özütü ile biyokimyasal ve kinetik parametreler çalışıldı.

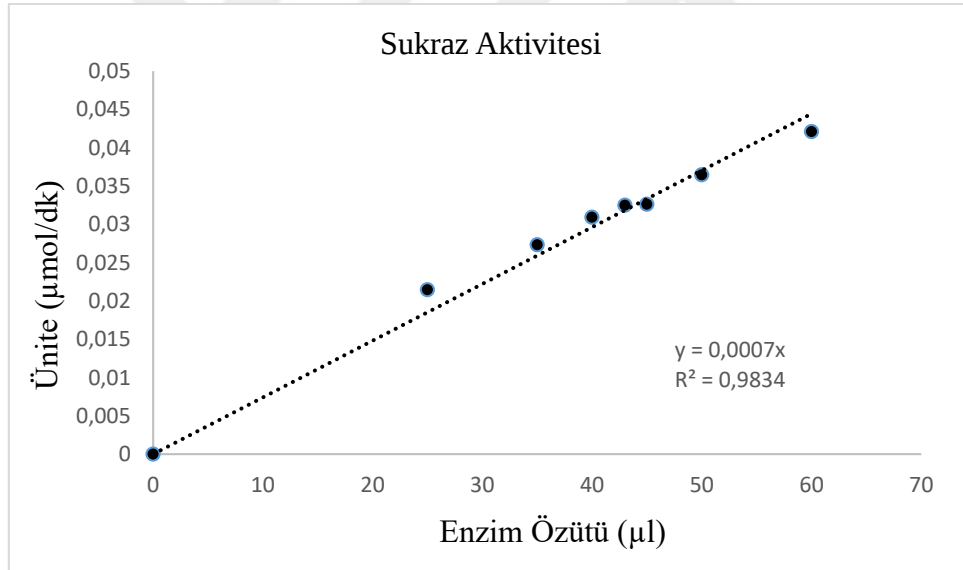


Şekil 12. AgoSuc2 saflaştırılma sonrasına hidroforbik etkileşim kolon kromatografisine ait grafik.

AgoSuc2'nin saflaştırılmasında hidroforbik etkileşim kolon kromatografisinde elde edilen enzim özütünün hesaplanan protein miktarı $1,7649 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ olarak belirlendi. AgoSuc2'nin saflaştırılmasında hidroforbik etkileşim kolon kromatografisinde elde edilen enzim özütünün hesaplanan sukraz aktivitesi ise $0,001 \mu\text{mol}/\text{dk}$ olarak tespit edildi. AgoSuc2'nin saflaştırılmasında hidroforbik etkileşim kolon kromatografisine ait hücre özütü protein miktarı Şekil 13'de gösterildi. Hidroforbik etkileşim kolon kromatografisinde elde edilen hücre özütü ait sukraz miktarı Şekil 14'de verildi.



Şekil 13. Hidrofobik etkileşim kolon kromatografisinde hücre özütündeki protein miktarı ait grafik.



Şekil 14. Hidrofobik etkileşim kolon kromatografisinde hücre özütündeki sukraz miktarına ait grafik.

2.7.6 Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Protein konsantrasyonu Bradford (1976)'un metot ile belirlendi. Standart için BSA kullanıldı. AgoSuc2 enziminin protein saflaştırmasına ait veriler Tablo 1'de verildi. Çalışma sonunda yapılan tüm saflaştırma işlemlerinin başarılı olduğu tespit edilmiştir. Saflaştırma işlemleri sonunda spesifik protein aktivitesi 0,107'den 0,397

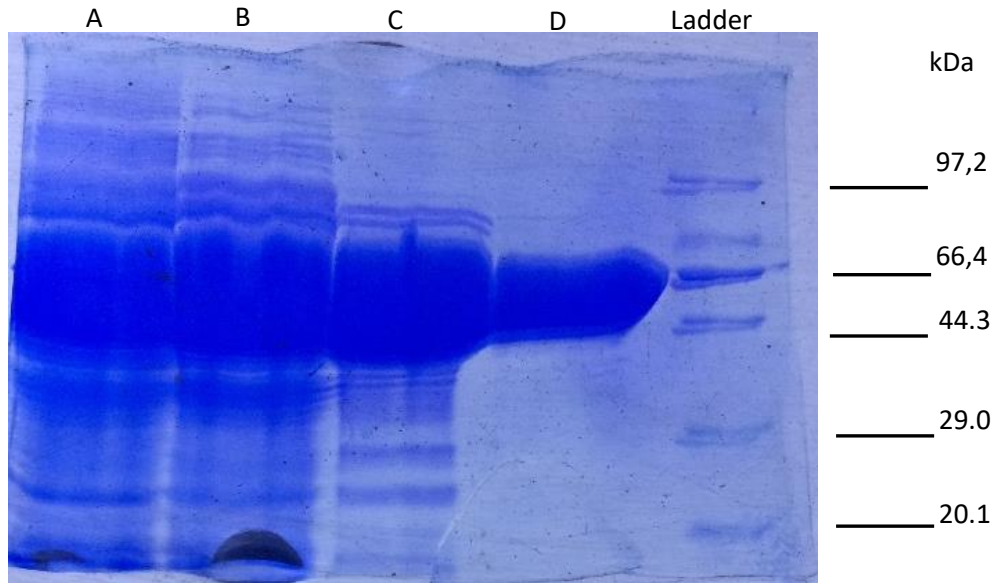
$\mu\text{mol/dk/mg}$ 'a yükselirken AgoSuc2 enzimi %52,4 oranında verim ile 3,72 kat saflaştırılmıştır.

Tablo 1. AgoSuc2 enziminin protein saflaştırma tablosu.

Parametreler	Saflaştırma Basamakları			
	Kaba Ekstrakt	Isı şoku	İyon değişim	Hidrofobik E.
T. Hacim (mL)	9	7,7	9,75	15,5
Protein (mg/mL)	21,58	16,02	8,94	1,76
T. Protein (mg/)	194,23	123,33	87,16	27,36
Aktivite ($\mu\text{mol/dk/ } \mu\text{L}$)	0,002	0,003	0,002	0,001
Aktivite ($\mu\text{mol/dk/ } \mu\text{L}$)	20,70	20,02	18,53	10,85
S. Aktivite ($\mu\text{mol /dk/mg protein}$)	0,107	0,162	0,213	0,397
Verim	100	96,7	89,5	52,4
Saflaştırma Katı	1	1,52	1,99	3,72

2.7.7 SDS-PAGE Analizi

Enzim saflaştırılırken saflaştırma işleminin her kademesinde (kaba ekstrakt, ısı şoku muamelesi, iyon değişim ve hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi) bir miktar özüt saklanarak saflaştırma işleminin sonunda SDS-PAGE analizine tabi tutuldu. Çalışma sonrası elde edilen saflaştırmaya ait jel görüntüsü Şekil 15’de verilmiştir.



(A: Gen ekspres edilen konak hücreye ait hücre özütü (kaba ekstrakt), B: Isı şoku sonrası elde edilen enzim özütü, C: İyon değişimi kolon kromatografisi bitiminde birleştirilen birleştirilen fraksiyonlardan meydana gelen enzim özütü, D: Hidrofobik etkileşim sonrasıkolon kromatografisinde birleştirilmiş fraksiyonlardan meydana gelen enzim özütü).

Şekil 15. AgoSuc2 saflaştırma adımlarının SDS-Page analizleri.

A. gonensis G2^T oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidaz'ı kodlayan 1617 baz çifti geni parçası pET28a(+) vektörü içerisinde klonlanarak plazmite pETG2SUC2 ismi üretilen enzime ise *AgoSuc2* ismi verilmiştir. pETG2SUC2, konak hücre olan *E. coli* BL21(DE3) suşu içerisine aktararak ekspres edilmiştir. Bu sistem *E. coli* BL21(DE3)/pETG2SUC2 olarak isimlendirilmiş, gerekli şekillerde ve uygun ortamda stoklanmıştır. *A. gonensis* G2^T bakterisinden elde edilen 1617 baz çifti oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidaz geninin amino asit (aa) ve baz dizilimi aşağıdaki Şekil 16'da ve Şeklin devamı 17'de verilmiştir.



1	M	K	R	T	W	W	K	E	A	V	V	Y	Q	V	Y	W	R	S	F	F
1	ATG	AAA	CGG	ACA	TGG	TGG	AAA	GAA	GCC	GTC	GTA	TAT	CAA	GTG	TAT	TGG	CGC	AGC	TTT	TTT
21	D	S	N	G	D	G	Y	G	D	L	E	G	L	I	Q	K	L	D	Y	I
61	GAC	TCA	AAT	GGT	GAT	GGG	TAT	GGC	GAT	TTA	GAA	GGG	CTT	ATT	CAA	AAA	CTC	GAT	TAC	ATT
41	R	D	L	G	V	D	V	I	W	L	N	P	C	Y	E	S	P	D	K	D
121	CGC	GAC	TTA	GGG	GTG	GAT	GTC	ATT	TGG	CTG	AAT	CCG	TGC	TAT	GAG	TCG	CCT	GAT	AAA	GAT
61	N	G	Y	D	I	S	D	Y	Y	R	I	M	D	K	A	G	D	M	E	T
181	AAC	GGA	TAC	GAC	ATT	TCT	GAT	TAC	TAT	CGC	ATC	ATG	GAT	AAA	GCA	GGG	GAT	ATG	GAG	ACG
81	F	D	R	L	L	N	E	V	H	K	R	G	M	K	L	I	M	D	L	V
241	TTT	GAC	CGC	TTG	CTG	AAC	GAG	GTG	CAT	AAA	CGT	GGA	ATG	AAA	TTA	ATT	ATG	GAC	CTT	GTC
101	V	N	H	T	S	D	Q	H	P	W	F	I	E	S	R	S	S	K	D	N
301	GTG	AAC	CAT	ACA	TCT	GAT	CAA	CAT	CCT	TGG	TTT	ATT	GAA	TCT	CGT	TCG	TCA	AAA	GAC	AAT
121	P	K	R	D	W	Y	I	W	R	D	K	P	N	N	W	R	S	Y	F	T
361	CCG	AAA	CGC	GAT	TGG	TAC	ATA	TGG	CGC	GAC	AAA	CCG	AAT	AAC	TGG	CGC	TCG	TAC	TTT	ACT
141	P	S	A	W	E	Y	D	E	K	T	G	Q	Y	Y	F	H	S	F	A	V
421	CCA	TCC	GCA	TGG	GAA	TAT	GAT	GAA	AAA	ACA	GGA	CAG	TAT	TAT	TTC	CAT	TCG	TTT	GCG	GTA
161	E	Q	P	D	L	N	W	E	N	E	E	V	R	E	E	I	Y	K	M	M
481	GAA	CAG	CCA	GAT	TTG	AAC	TGG	GAA	AAC	GAA	GAA	GTT	CGT	GAA	GAA	ATT	TAT	AAA	ATG	ATG
181	R	F	W	L	D	K	G	I	D	G	F	R	L	D	A	I	A	L	L	A
541	CGT	TTT	TGG	TTA	GAT	AAA	GGG	ATC	GAT	GGG	TTC	CGT	TTA	GAT	GCG	ATT	GCC	TTA	CTA	GCC
201	K	P	E	G	F	P	D	A	E	N	P	Y	D	I	R	Y	L	T	N	N
601	AAA	CCT	GAA	GGA	TTC	CCA	GAT	GCC	GAA	AAC	CCG	TAT	GAC	ATT	CGT	TAT	TTA	ACA	AAC	AAT
221	P	G	V	H	D	Y	L	Q	E	M	H	E	K	V	L	K	H	Y	D	I
661	CCA	GGC	GTG	CAT	GAT	TAT	TTA	CAA	GAA	ATG	CAC	GAA	AAA	GTA	TTA	AAA	CAT	TAT	GAT	ATT
241	F	T	V	G	E	V	A	F	V	S	P	E	E	G	L	K	Y	V	G	E
721	TTC	ACC	GTC	GGA	GAA	GTC	GCT	TTC	GTA	TCG	CCA	GAG	GAA	GGA	TTA	AAA	TAT	GTC	GGA	GAA
261	D	R	N	E	L	H	T	L	F	H	F	E	V	C	D	E	M	P	T	W
781	GAC	CGA	AAC	GAA	CTA	CAT	ACT	TTG	TTC	CAC	TTT	GAA	GTG	TGC	GAC	GAA	ATG	CCG	ACA	TGG
281	D	P	I	R	F	K	Q	I	Q	K	R	W	Y	E	G	L	W	G	K	G
841	GAT	CCG	ATT	CGT	TTT	AAA	CAA	ATT	CAA	AAA	CGT	TGG	TAC	GAA	GGA	TTG	TGG	GGC	AAA	GGG
301	W	N	S	Q	F	L	N	N	H	D	H	T	R	Q	V	T	R	Y	G	N
901	TGG	AAC	TCG	CAG	TTT	TTA	AAC	AAT	CAC	GAC	CAT	ACG	CGA	CAA	GTG	ACG	CGC	TAC	GGA	AAC
321	D	K	Q	F	R	V	E	S	A	K	L	L	A	T	L	V	H	T	L	P
961	GAT	AAA	CAG	TTC	CGC	GTC	GAA	TCA	GCA	AAA	TTG	CTC	GCT	ACG	CTC	GTG	CAT	ACG	TTG	CCG
341	G	T	P	Y	I	Y	Q	G	E	E	I	G	M	T	G	V	K	F	D	T
1021	GGA	ACC	CCA	TAT	ATT	TAT	CAA	GGT	GAA	GAA	ATT	GGC	ATG	ACT	GGC	GTC	AAG	TTC	GAC	ACG
361	I	E	D	Y	N	D	I	A	M	K	N	K	Y	A	E	E	V	A	K	G
1081	ATC	GAA	GAC	TAT	AAC	GAC	ATT	GCG	ATG	AAA	AAT	AAA	TAT	GCA	GAA	GAA	GTC	GCA	AAA	GGT

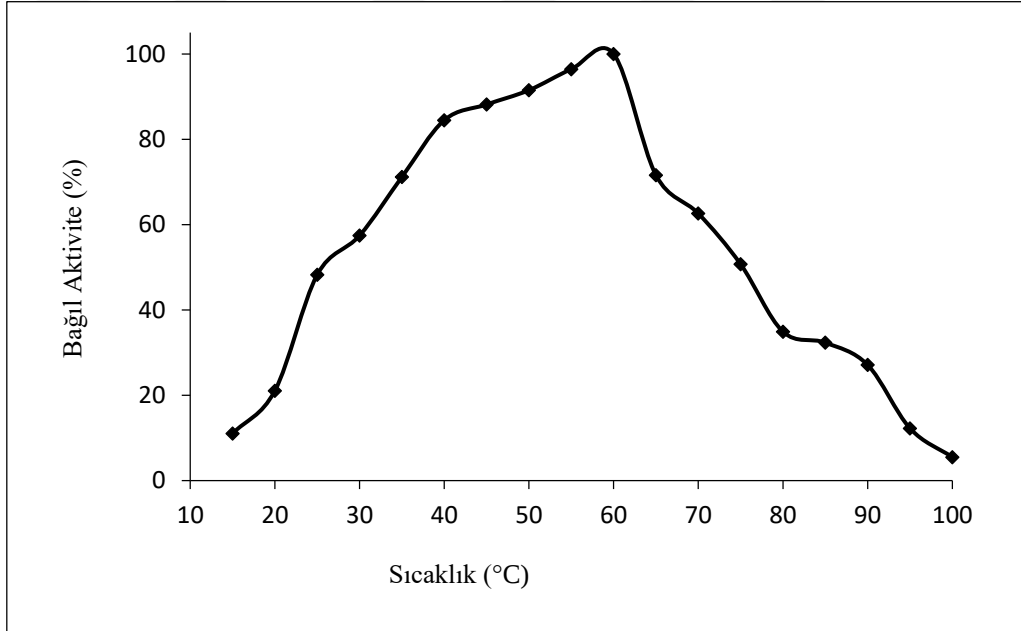
Şekil 16. *A. gonensis* G2T oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidaz amino asit ve baz dizilimi.

381	R	D	P	K	E	V	L	E	S	L	Q	L	L	S	R	D	N	S	R	T
1141	CGC	GAT	CCG	AAA	GAA	GTG	CTT	GAA	AGC	TTG	CAG	CTA	CTG	AGC	CGA	GAT	AAC	TCG	CGT	ACA
401	P	M	Q	W	D	D	S	E	H	A	G	F	T	T	G	T	P	W	L	K
1201	CCA	ATG	CAG	TGG	GAT	GAT	AGC	GAA	CAT	GCT	GGA	TTT	ACA	ACA	GGA	ACA	CCT	TGG	CTA	AAA
421	V	N	P	N	Y	K	E	I	N	V	K	Q	A	L	A	D	P	N	S	V
1261	GTG	AAT	CCG	AAC	TAT	AAA	GAA	ATC	AAT	GTA	AAA	CAA	GCA	TTA	GCG	GAT	CCG	AAC	TCT	GTA
441	Y	Y	Y	Y	K	K	L	I	Q	L	R	K	Q	H	A	V	M	V	Y	G
1321	TAT	TAT	TAC	TAT	AAA	AAG	CTC	ATT	CAA	TTG	CGC	AAG	CAA	CAT	GCC	GTT	ATG	GTG	TAC	GGA
461	T	F	R	D	F	S	E	N	D	P	Y	I	Y	A	Y	T	R	E	L	D
1381	ACG	TTC	CGC	GAT	TTT	TCG	GAA	AAT	GAT	CCG	TAC	ATT	TAC	GCT	TAC	ACG	CGC	GAG	CTC	GAT
481	G	V	R	W	L	I	V	L	N	H	C	D	N	D	N	V	Y	E	L	P
1441	GGC	GTT	CGT	TGG	CTC	ATC	GTC	TTA	AAC	CAT	TGC	GAC	AAC	GAC	AAC	GTA	TAT	GAG	TTG	CCA
501	E	E	L	A	S	A	H	R	H	L	L	L	G	N	Y	T	D	V	K	E
1501	GAA	GAG	CTT	GCT	TCG	GCT	CAC	CGC	CAT	CTT	TTG	CTC	GGC	AAT	TAT	ACA	GAT	GTA	AAA	GAA
521	E	G	T	T	L	Y	M	R	P	H	E	A	R	I	Y	A	L	Q	*	
1561	GAA	GGC	ACA	ACG	CTT	TAT	ATG	CGT	CCG	CAC	GAA	GCA	AGA	ATT	TAT	GCA	TTA	CAA	TAA	

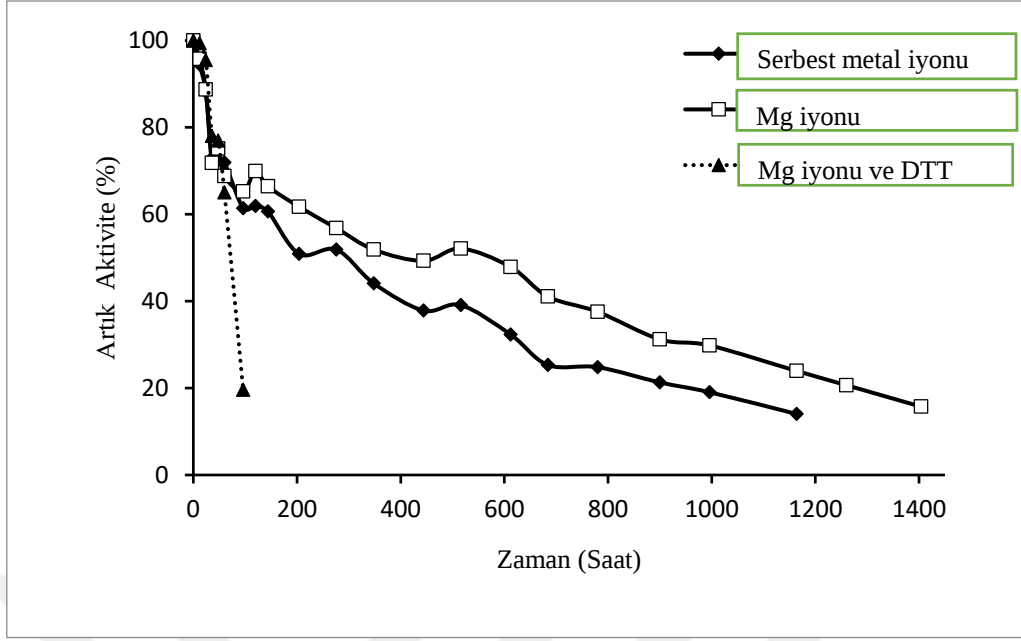
Şekil 16 (Devamı). *A. gonensis* G2T oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidaz amino asit ve baz dizilimi.

2.7.8 Optimum Sıcaklık

AgoSuc2 için optimum sıcaklık 60 °C olarak belirlendi. Bu çalışmada *AgoSuc2*'nin +4 °C'deki aktivitesini kaybetmeden aylarca kararlı kaldığı belirlendi (veriler gösterilmemiştir). Enzim aktivitesini belirlemek için 60 °C'de yapılan ısıl kararlılık testlerinin 276. saatin sonunda enzim aktivitesinin yarıya indiği tespit edildi. Sade hücre özütü 780. saatte, Mg^{+2} içeren hücre özütü 1404. saatte, Mg^{+2} ile DTT içeren hücre özütü 120. saatte son ölçümleri yapıldı. Bu çalışmada *AgoSuc2*'nin 276. saatlik yarı ömre sahip olması endüstriyel uygulamalar için önemli bir enzim olduğu tespit edildi. Bu çalışmada tespit edilen *AgoSuc2* için optimum sıcaklık grafiği Şekil 17'de ve ısıl kararlılık grafiği ise Şekil 18'de verilmiştir.



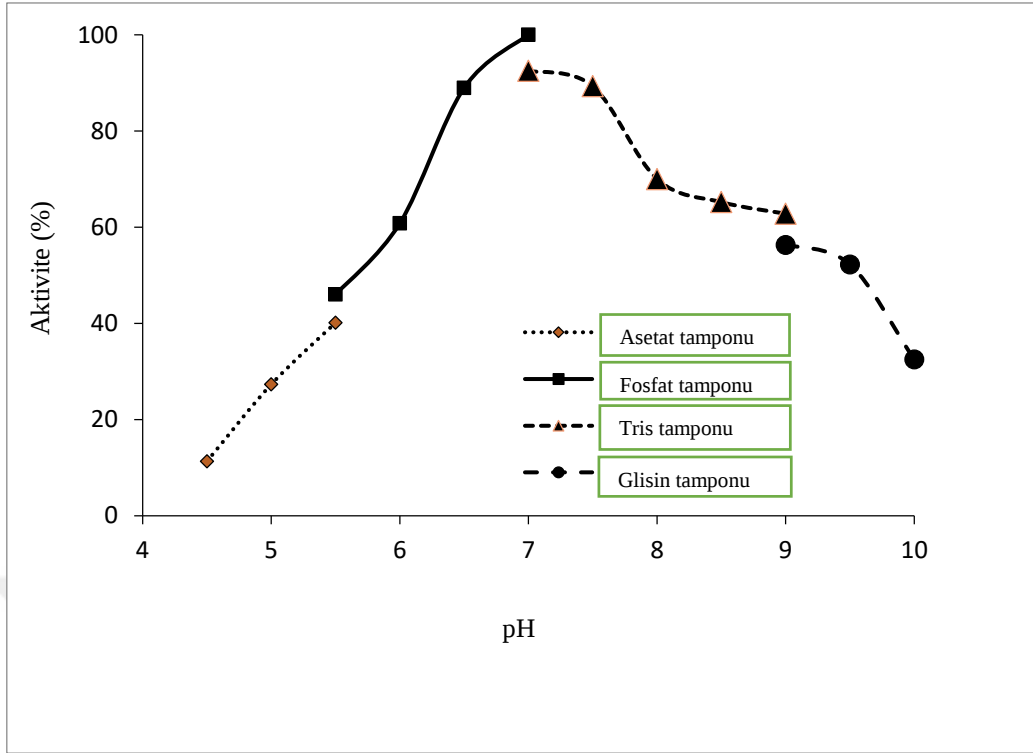
Şekil 17. *AgoSuc2*'nin optimum sıcaklığı grafiği.



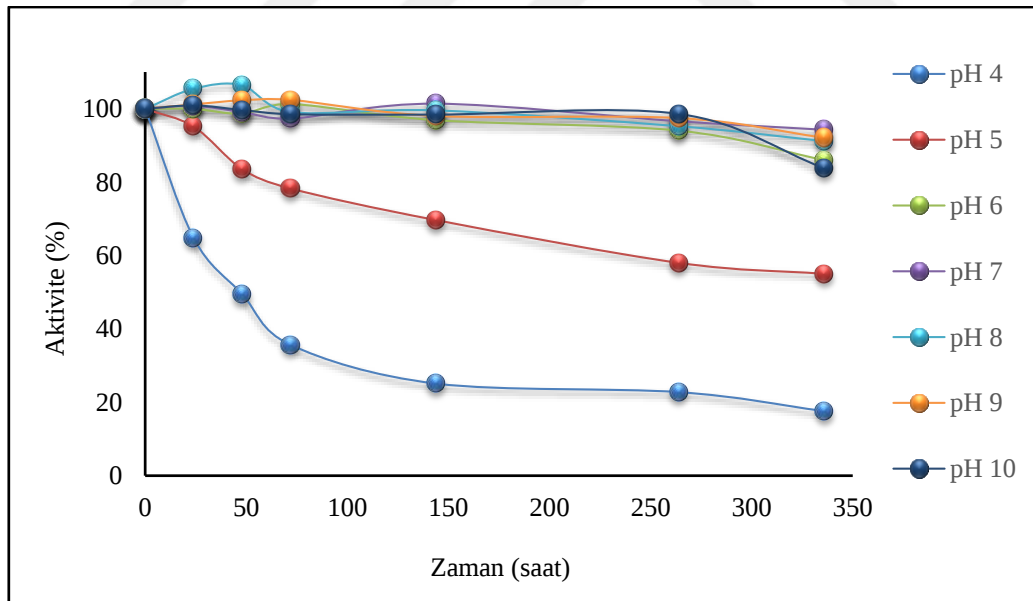
Şekil 18. AgoSuc2'nin ısıl kararlılığı grafiği.

2.7.9 Optimum pH ve pH Kararlılığı

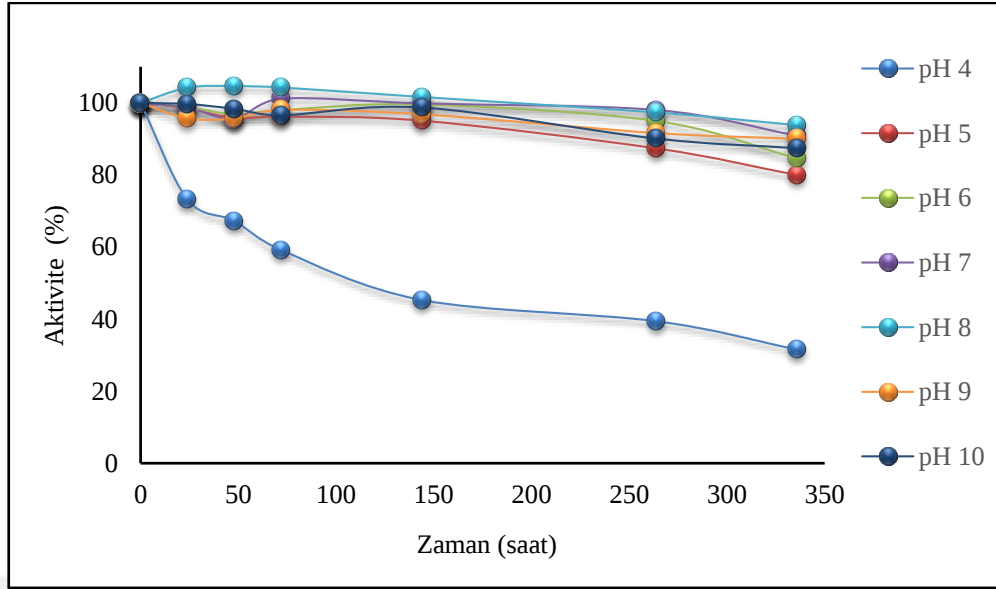
Enzim, AgoSuc2'nin optimum pH aralığını belirlemek için 30 dk boyunca farklı aralıklardaki pH tampon serilerinde inkübe edildi. Optimum pH çalışmalarının sonuçlarına göre enzimin optimum aktivitesini pH 7,00'de gösterdiği ortaya çıkarıldı. Enzim, pH 6,50-7,50 aralığında %80'in üzerinde aktivite sergilediği belirlendi. AgoSuc2'nin optimum pH grafiği Şekil 19'da gösterildi. . Enzimin pH stabilitesini belirlemek için saflaştırılan enzim belirli zaman aralıklarında fosfat tamponunda tutuldu ve daha sonra sukraz aktivitesi ölçüldü. Şekil 20'de gösterildiği gibi enzim, pH 6,00-10,00 aralığında 300 saat sonra bile aktivitesini koruduğu belirlendi. Enzim aktivitesi 300. saatin sonunda pH 5,00'te %55'e ve pH 4,00'de ise %17,5'e kadar düştüğü belirlendi. Mg^{+2} içeren hücre özütünde pH 5,00 - 10,00 aralığında 300. saat sonra aktivitesini koruduğu belirlendi. Enzim aktivitesi pH 4,00'de %31,5'e 300. saatten sonra düştüğü belirlendi. Mg^{+2} içeren hücre özütünde pH kararlılığına ait grafik Şekil 21'de gösterilmiştir.



Şekil 19. AgoSuc2'nin optimum pH grafiği.



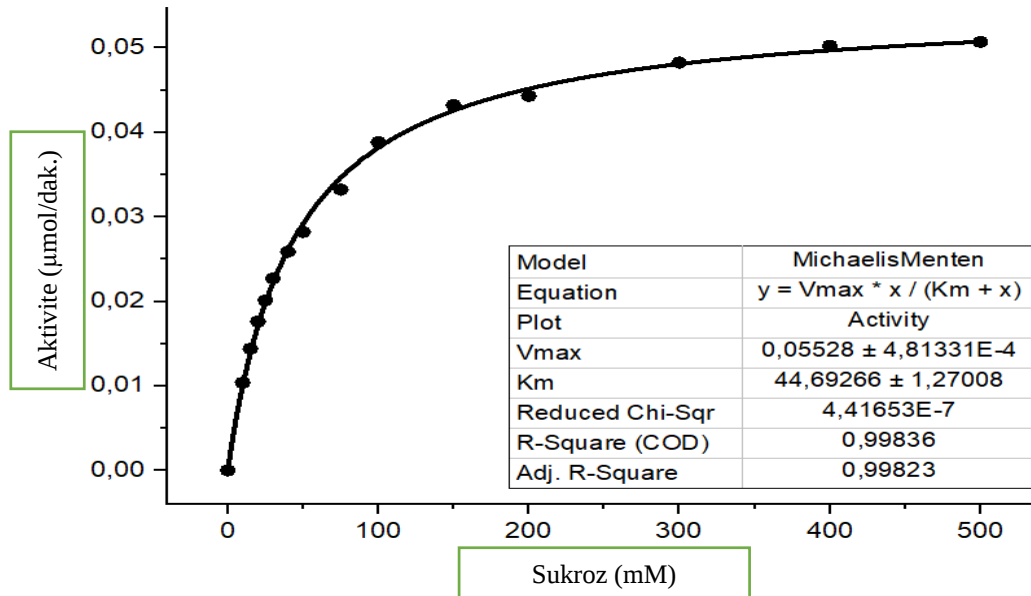
Şekil 20. AgoSuc2'nin pH stabilitesi grafiği.



Şekil 21. AgoSuc2'nin Mg^{+2} aktivatörlüğünde pH kararlılığı grafiği.

2.7.10 Enzimin Kinetik Parametrelerine Ait Bulguları

Enzimin basit Michaelis-Menten kinetiği gösterdiği ortaya çıktı. OriginPro 2021 programı ile yapılan analizlerin bir sonucu olarak protein değerleri sırasıyla, K_m , V_{max} , k_{cat} ve k_{cat}/K_m , $44,69 \pm 1,27$ mM, $6,28 \pm 0,05$ $\mu\text{mol/dak/mg}$ $6,70$ $1/\text{sn}$ ve $0,15$ $1/\text{mM sn}^{-1}$ belirlendi. Sukroz için Michaelis-Menten eğrisi grafiğine ait veriler Şekil 22'de gösterildi.

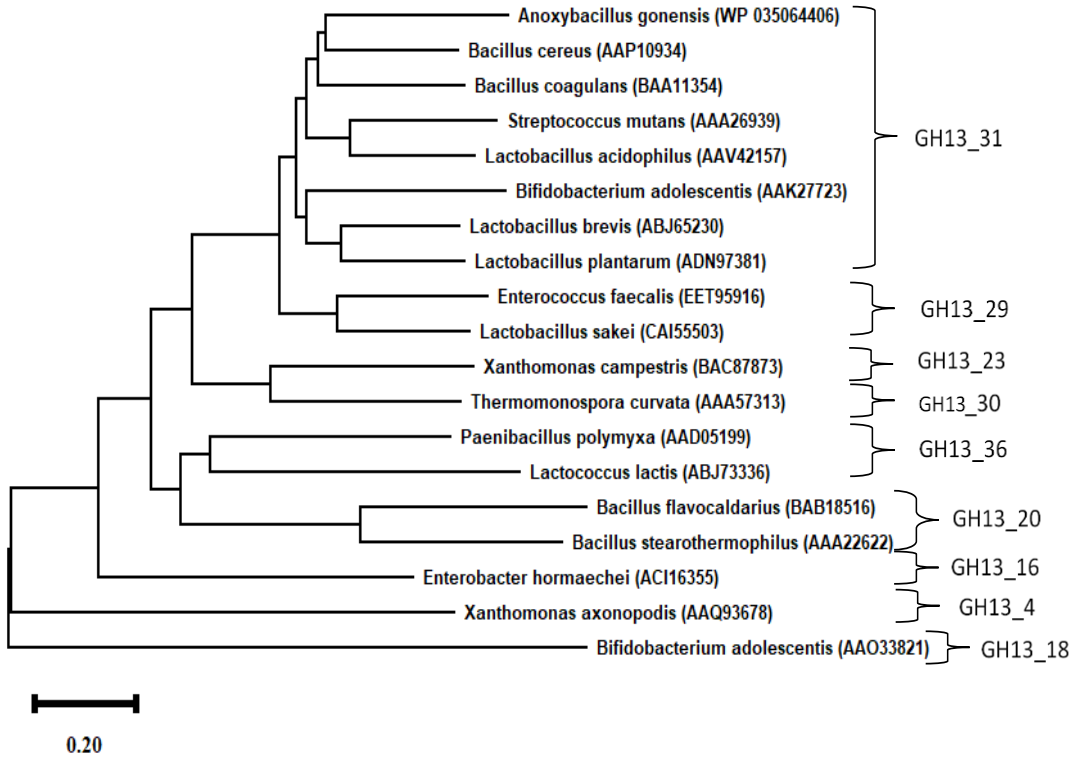


Şekil 22. Sukroz için Michaelis-Menten eğrisi grafiği.

3. SONUÇ VE TARTIŞMA

3.1 Protein Dizilerinin Karşılaştırılması

1617 bp içeren *A. gonensis* G2^T oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidaz geninin DNA dizisi, GenBank'ta (NCBI, NIH, Washington DC) (WP_035064406.1) olarak kodlanan gen ile %100 örtüşmüştür. Glikozit hidrolazlar (GH'ler), α -amilaz süper ailesinin en büyük sınıfını oluşturur. GH sınıfına ait enzimlerin 30 farklı tipi bulunmaktadır (Oslancová ve Janec̣ek, 2002). Glikozit hidrolazların en büyük sınıfı olan GH13 ailesi, α -glikozidik bağlar üzerinde etkili olan bir dizi enzim aktivitesi gerçekleştirir. Stam vd. (2006), oligo-1,4-1,6-alfa-glukozidazın (E.C 3.2.1.10) GH13 ailesinin alt ailesine ait olduğunu belirtmiştir. Bazı bakterilerin oligo-1,4-1,6-alfa-glukozidazlarının amino asit dizilerine göre, MEGA X programı ile çizilen filogenetik ağaç analizi ile AgoSuc2'nin GH13_31 familyasına ait bir *malL* gen ürünü olduğu (komşu birleştirme yöntemi ile düzeltilmemiş p-mesafe modeline) belirlendi. GH13 ailesinin temsili bakteriyel α -glukosidazların filogenetik ağaca ait veriler Şekil 23'de sunuldu.

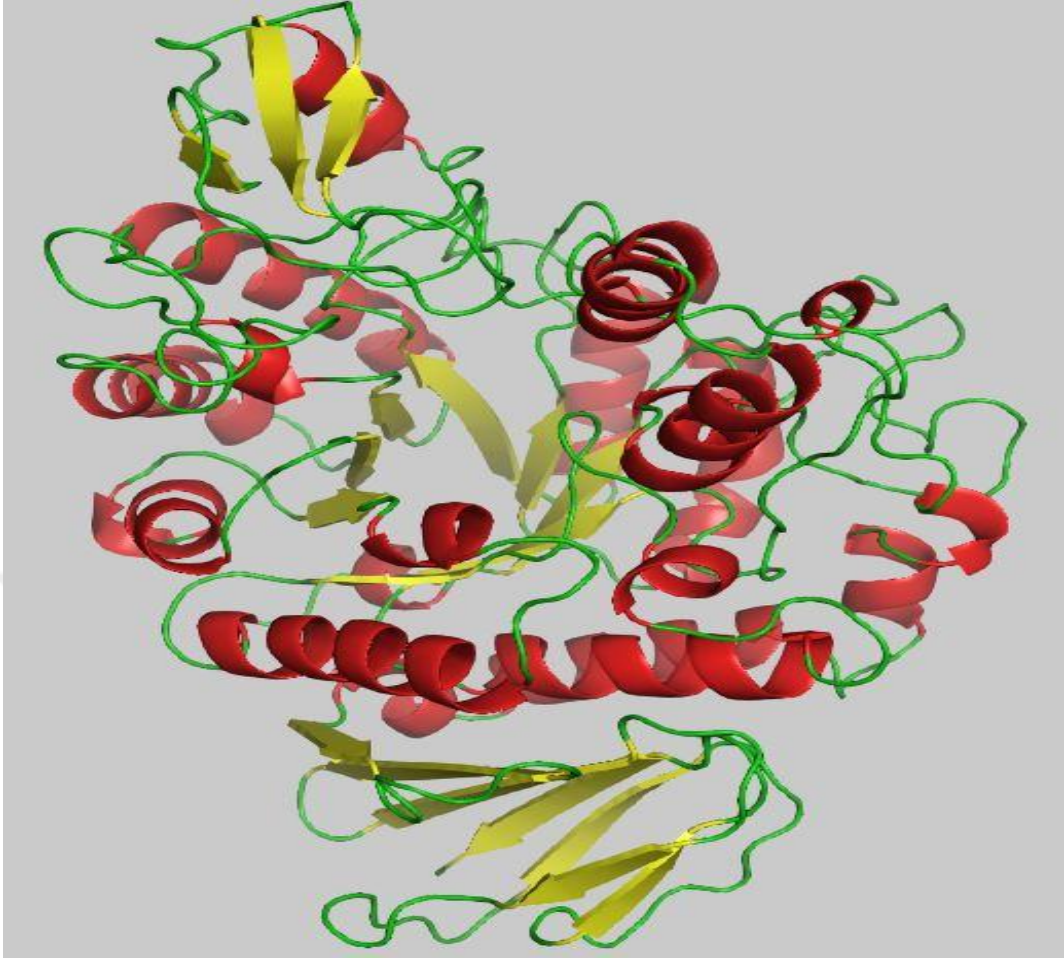


Şekil 23. GH13 ailesinin temsili bakteriyel α -glukosidazların filogenetik ağacı.

BlastN programı ile çizilen filogenetik ağaç sonucunda, AgoSuc2'nin amino sekansı açısından en çok *B. cereus* oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidaza benzediği belirlendi. AgoSuc2'nin üçüncül yapısı, SWISS-MODEL programı ile şablon olarak *B. cereus*'un oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidazı kullanılarak modellenmiştir. Proteinin üçüncül yapısı benzer bir (β/α)-varil (altıgen) yapısı gösterdi ve GH13 ailesine ait enzimlerde katalitik konumun varlığı modellerde de görüldü. *Bacillus cereus*'un tahmin edilen dizi modeline göre hazırlanan AgoSuc2'nin tahmin edilen üçüncül yapısına ait görüntü Şekil 24'de verildi. AgoSuc2'nin yapısının tahmininde bir dizi modeli olarak kullanılan *Bacillus cereus*'tan (B) *malL*'nine (Watanabe vd., 1997) ait görüntü ise Şekil 25'de sunuldu.



Şekil 24. AgoSuc2'nin tahmin edilen üçüncül yapısı (Bu çalışmada).



Şekil 25. *Bacillus cereus*'tan (B) *Mall*'ninki AgoSuc2'nin tahmin edilen bir dizi modeli olarak kullanılan görüntüsü (Watanabe vd., 1997).

Bacillus cereus oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidazının kristal yapısı aydınlatılmıştır ve 3 boyutlu yapısı Protein Data Base'de mevcuttur. UCSF Chimera programı kullanılarak, AgoSuc2 enzimi ve *Bacillus cereus* oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidazı amino asit homolojisi dikkate alınarak (protein data base'den edilen pdb dosyası ile (pdb file: 1uok)) modellenmiştir (Şekil 26). Yine aynı pdb dosyası kullanılarak *Bacillus cereus* oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidazının aktif bölgesinde bulunan ve katalitik aktivitede rol oynayan amino asitler Pymol protein modelleme programı ile belirlenmiş ve bu amino asitlerin varlığı AgoSuc2 üzerinde gösterilmiştir.

1	11	21	31	41
1 MEKWWKEV VYIYPR FM DGDG GDL RGTI KEDYL KELGIDVIWL				
1 MKRTWWKEAV VYQVYWRSFF DSNNGDYGDL EGLIQKLDYI RDLGV DVIWL				
51	61	71	81	91
51 PVYE P DD GYDI DYCK IM EFG MED WDELLHENHE R MKIMMDLV				
51 NPCYESPKDK NGYDISDYR IMDKAGDMET FDRLLNEVHK RGMKLIMDLV				
101	111	121	131	141
101 V H DEH W FIE RK KD KYRDYY WRP GKEGKEP W GAAP G AW				
101 VNHTSDQHPW FIESRSSKDN PKRDWYIWR DKPNNW RSYFTPSAWE				
151	161	171	181	191
151 YDEM DEYYL HLF KK PDL WD EKVR D VYEMMKFWLE KGIDGFRMDV				
146 YDEKTGQYYF HSFAVEQPD LNWENEEVREE TYKMMRFWLD KGIDGFR L D A				
201	211	221	231	241
201 F I KEEGL P VE EEEGY V GHKHEM G P IHKYLHEM EEVL HYDI				
196 IALLAKPEGF PDAENPYD IRYLTNN PGVHDY L QEM HEKVLKH YDI				
251	261	271	281	291
251 M VGEMPGV E EAKLY GE ERKEL MYF FERMDLD GE GGKWDVKPC				
241 FTVGEVAFVS PEEGLKYVGE DRNELHTLFH FEVCD E MPTWDP				
301	311	321	331	341
301 LL LKE L K W KALEH GW LYW HD PRVV RFG D GMYRIE AKM				
283 I RFKQIQKR WYEWLGKGW NSQFLNNHDH TRQVTRYGND KQFRVESAKL				
351	361	371	381	391
351 LA VLHMMKG PYIY GEEI GM NVRF E I DEYRDIE L MYKEKVMERG				
332 LATLVHTLPG TPYIYQGEEI GMTGVKFDTI EDYNDIAMKN KYAEV . AKG				
401	411	421	431	441
401 EDIEKVM I YIKGRD AR FM WDD HA GF GERWIL V PLYKEINV				
381 RDPKEVLESL QLLSRDNSRT PMQWDDSEHA GFTTGTPWLK VNPNYKEINV				
451	461	471	481	491
451 K AL KD I EYKKL IEL RK ELVYVG YDLILE P IFAYVR YG				
431 KQALADPNSV YYYK KLIQL RKQHAVMVYG TFRDFSENDP YIYAYTRELD				
501	511	521	531	541
501 VEKLLVIA F AECEIFELP EDI Y EVEL LIH YDVE G PIE I LRPY				
481 GVRWLIVLNH CNDNVYELP EELASAHRL LLGNYTDVKE EGTTLYMRPH				

Şekil 26. UCSF Chimera programı kullanılarak *AgoSuc2* enzimi (alt sıra) ile *B. cereus* oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidazının (üst sıra) amino asit (aa) homolojisi bakımından karşılaştırılması.

Amino asit dizilerinin detaylı hizalama çalışmaları sonucunda, GH13_31 alt familyasında 7 karakteristik korunmuş bölgenin varlığı belirlendi (Oslancová ve Janeċek, 2002). Bu korunan bölgeler 48 (GVDVIWLNP), 102 (DLVVNH), 170(QPDLN), 199 (GFRMDVISL), 240 (EMPG), 330 (YWSNHD) ve 367 (GTPFIYQGE)'dir ve bunların varlığı *AgoSuc2*'de tespit edildi. *AgoSuc2*'de korunan "QPDLN" bölgesinin varlığı, enzimin bir oligo-1,4-1,6-alfa-glukozidaz olduğunu gösterir. Bu korunmuş bölgelerde bulunan 194D ve 245E, *AgoSuc2*'nin aktif bölgesinde bulunan amino asitlerdir (Tablo 2).

Tablo 2. Bazı oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidazların GH13_31 ailesinin hizasında korunmuş bölgeleri.

<i>Conserved region</i>	48	GVDVIWLNP	102	DLVVNH	170	QPDLN	199	GFRMDVISL	240	EMPG	330	YWSNH	367	GTPFIYQGE
<i>A.gonensis</i>	44	GVDVIWLNP	98	DLVVNH	162	QPDLNW	190	GFRMDAIAL	245	E VAF	305	FLNNH	341	GTPYIYQGEE
<i>B.cereus</i>	44	GIDVIWLSP	98	DLVVNH	167	QPDLNW	195	GFRMDVINP	255	EMPG	324	YWNNH	355	GTPYIYQGEE
<i>B.coagulans</i>	43	GIDCIWISP	96	DLVVNH	167	QPDLNW	195	GWRMDVIGS	255	EAIG	327	YFENH	365	GTPFIYQGEE
<i>S.mutans</i>	44	GVMAIWLSP	98	DLVVNH	163	QPDLNW	190	GFRMDVIDM	236	ETWG	308	FWNNH	341	GTPYIYQGEE
<i>L.acidophilus</i>	43	GIDAIWLSP	97	DLVVNH	166	QPDLNW	194	GFRMDVIEL	240	ETWN	311	FWENH	342	GTPYIFNGEE
<i>B.adolescenetis</i>	60	GVDVLWLSP	114	DLVVNH	189	QPDLNW	217	GFRMDVITQ	290	EAPG	358	FFCNH	396	GTPYIYEGEE
<i>L.brevis</i>	44	GADVIWLNP	98	DLVVNH	167	QPDLNW	195	GFRMDVINL	256	EMPG	328	YWNNH	365	GTPYVYEGEE
<i>L.plantarum</i>	44	GADVIWLNP	98	DIVVNH	167	QPDLNW	195	GFRMDVINL	255	ETPG	328	YWNNH	366	GTPYIYEGEE
Active site								D		E				
Site												D		

3.2 AgoSuc2'nin Aşırı Ekspresyonu ve Saflaştırılması

A. gonensis G2^T oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidaz geni, pET28(a)+'ya klonlandı ve açık okuma çerçevesinin (ORF) (1617 bp) varlığını doğrulamak için MacroGen'de (Kore) DNA dizin analizi yapıldı. Enzim, *E. coli* BL21 (DE3) içinde ifade edildi. Vektör ve vektörden eksprese edilen enzim sırasıyla pETG2SUC2 ve AgoSuc2 olarak adlandırıldı. pETG2SUC2 / *E. coli* BL21 (DE3) klonu IPTG ile indüklendi ve 4 saat inkübe edildi. Ekspresyondan sonra, 0,107 µmol/dk/mg protein sukraz spesifik aktivitesine sahip 9 mL hücre içi ham ekstrakt elde edildi. Enzim sırasıyla ısı şoku uygulaması, iyon değişimi ve hidrofobik kolon kromatografileri ile saflaştırıldı. Enzimin saflaştırma katı ve sukraz spesifik aktivitesi, aşağıda verildiği gibi her saflaştırma adımında belirlendi; Isı şoku uygulamasında 1,52-kat ve 0,162 µmol/dk/mg protein, DEAE-Sepharose kolon kromatografisinde 1,99-kat ve 0,213 µmol/dk/mg protein, Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (Sigma) kolon kromatografisinde 3,72 kat ve 0,397 µmol/dk/mg protein tespit edildi. Tüm saflaştırma aşamalarının sonunda enzim, 52,4 verimle 3,72 kat saflaştırıldı (Tablo 1).

SDS-Page analizlerine göre, AgoSuc2 başarıyla saflaştırıldı (Şekil 22). Expasy.org üzerinden yapılan amino asit dizi analizi sonucunda gen ürününün olası moleküler ağırlığı 63981,64 dalton ve izoelektrik noktası 5,17 olarak hesaplandı. Şekil 15'de (SDS-Page analizleri) gösterildiği gibi, saflaştırılmış enzimin moleküler ağırlığı yaklaşık 64 kDa olarak bulundu.

Bu çalışmaya benzer şekilde, *Bacillus coagulans*, *Parageobacillus thermoglucosidasius*, *Bacillus flavocaldarius*, *Bacillus thermoamyloliquefaciens* KP1071, *Bacillus cereus*, *Bacillus* sp. F5'nin oligo-1,6-glukosidazlarının moleküler ağırlığı 60-66 kDa olarak hesaplandığı bildirilmiştir (Suzuki vd. 1987b; Suzuki vd., 1982; Yamamoto ve Horikoshi 1990). Mikrobiyal oligo-1,6-glikosidazlar genellikle hücre içi enzimler olmasına rağmen, *Bacillus thermoglucosidius* KP'nin hücre dışı olduğu belirtilmiştir (Suzuki vd., 1979). Bu çalışmada AgoSuc2'nin herhangi bir sinyal peptidi içermediği ve AgoSuc2'nin hücre içi bir enzim olduğu Signal P5.0 ile yapılan analizlerle belirlendi.

3.3 Optimum Sıcaklık ve Isıl Kararlılık

Bu tez çalışmasında AgoSuc2 için en uygun sıcaklık değerinin 60 °C olarak tespit edilmiştir (Şekil 17). Gıda endüstrisinde kullanılan endüstriyel enzimlerin özellikle yüksek sıcaklıklarda aktivite göstermeleri gerekmektedir (Karaoglu vd., 2013). Yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilen işlemler, mezofilik karakterli organizmaların neden olduğu kontaminasyon riskini ortadan kaldırmıştır. Bu açıdan AgoSuc2, 60 °C'lik optimum çalışma sıcaklığı ile özellikle gıda endüstrisindeki uygulamalarda tercih edilmektedir. Benzer şekilde *Parageobacillus thermoglucosidasius* enzimi için optimum çalışma sıcaklığı 60 °C olarak hesaplandığı rapor edilmiştir (Suzuki, 1979).

Oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidazın optimum sıcaklık değeri *Bacillus thermoglucosidasius* için 70 °C (Watanabe vd., 1988) iken, *Bacillus cereus* için 42 °C (Suzuki vd., 1982) olarak bildirilmiştir. AgoSuc2'ye yakın olan *Bacillus coagulans*'tan elde edilen enzimin optimum sıcaklığının 62 °C olarak belirlendiği rapor edilmiştir (Suzuki ve Tomura, 1986). Bu çalışmada, AgoSuc2'nin +4 °C'deki aktivitesini kaybetmeden aylarca kararlı kaldığı belirlenmiştir. Enzim aktivitesini belirlemek için 60 °C'de yapılan ısıl kararlılık testlerinin 276. saatin sonunda enzim aktivitesinin yarıya indiği tespit edilmiştir. Sade hücre özütü 780. saatte, Mg^{+2} içeren hücre özütü 1404. saatte ve Mg^{+2} ile DTT içeren hücre özütü ise 120. saatin sonunda ölçümleri yapılmıştır (Şekil 18). Uygulamalardaki enzimin kararlılığı, oluşan ürün miktarında bir artışa neden olmaktadır. Bu çalışmada, tespit edilen 276 saatlik bir yarılanma ömre sahip olması AgoSuc2'nin endüstriyel uygulamalar için önemli bir enzim olduğunu tespit edilmiştir. *Bacillus* sp. SAM1606 suşunun oligosidaz enziminin yarı ömrünün 75 °C'de 10 dk olduğunu rapor edilmiştir (Nakao vd., 1994). Başka bir araştırmaya göre *Bacillus thermoamyloliquefaciens*'ten elde edilen oligo-1,4-1-6 glukozidazın yarılanma ömrü 70 °C'de 10 dk olarak bulunduğu bildirilmiştir (Suzuki vd., 1987b).

3.4 Optimum pH ve pH Kararlılığı

Enzim, AgoSuc2'nin optimum pH aralığını belirlemek için 30 dk boyunca farklı tampon serilerinde aralıklarla inkübe edildi. Optimum pH çalışmalarının sonuçlarına göre enzimin optimum aktiviteyi pH 7,00'de gösterdiği ortaya çıkarıldı. Enzim, pH 6,50-7,50 aralığında %80'in üzerinde aktivite sergilediği belirlendi (Şekil

19). Mikrobiyal oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidazlar genellikle pH 5,00-8,00 aralığında aktif göstermektedirler. *Bacillus coagulans*'tan elde edilen enzimin optimum pH'ı 5,20 olarak bildirilmiştir (Suzuki ve Tomura, 1986). Başka bir araştırmada ise *Bacillus thermoamyloliquefaciens*'ten elde edilen enzimin optimum pH'sı 5,90 olarak belirlendiği rapor edilmiştir (Suzuki vd., 1987b). Diğer bir çalışmada *Bacillus cereus* bakterisinden elde edilen enzimi için optimum pH 6,7 olarak belirlendiği bildirilmiştir (Suzuki vd., 1982).

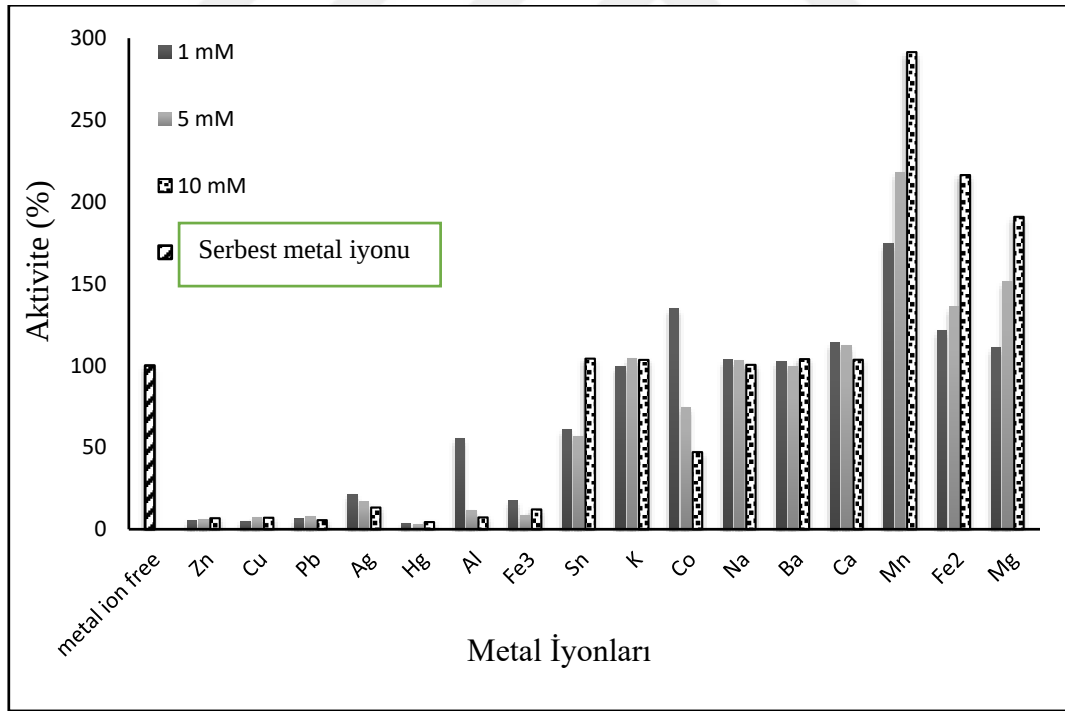
Enzimin pH stabilitesini belirlemek için saflaştırılan enzim belirli zaman aralıklarında fosfat tamponunda tutulmuş ve daha sonra sukraz aktivitesi ölçülmüştür. Şekil 20'de gösterildiği gibi enzim, pH 6-10 aralığında 300 saat sonra bile aktivitesini korumuştur. Enzim aktivitesi 300. saatin sonunda pH 5,00'de %55'e ve pH 4,00'de ise %17.5'e kadar düştüğü belirlenmiştir.

3.5 AgoSUC2'nin Kinetik Parametreleri

AgoSUC2'nin kinetik parametrelerini belirlemek için sukroz ile 0-500 mM aralığında bir dizi reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidazlar da yaygın olarak izomaltaz ve maltaz olarak adlandırılır. Enzim izomalt heksoz, izomaltoz, maltoz gibi çeşitli substratlar üzerinde aktivite göstermekte ve özellikle bu oligosakkaritlerdeki 1-6 glikozidik bağı hidrolize etmektedir. Bu aktivitelere ek olarak enzim, sakkarozda bulunan 1,2 glikozidik bağlarını hidrolize etme yeteneğine de sahiptir (Delgado vd., 2017). Enzimin sukraz parçalayıcı aktivitesi ile ilgili çalışma olarak substrat olarak sükroz kullanıldı. Bu deneyin sonunda tespit edilen protein değerleri sırasıyla, K_m 44,69±1,27 mM, V_{max} 6,28±0,05 µmol/dak/mg, k_{cat} 6,70 1/sn ve k_{cat}/K_m 0,15 1/mM sn⁻¹ olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde, oligo-1,4-1,6-alfa-glukozidazın sukroza karşı aktivitesi ile ilgili birkaç çalışma yapılmıştır. *Saccharomyces cerevisiae*'den elde edilen oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidazın K_m ve k_{cat}/K_m değerlerinin sırasıyla 147 mM ve 351/mM sn⁻¹ olduğunu bildirmiştir (Deng vd., 2014). *Bacillus subtilis*'ten elde edilen oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidaz'ın K_m değeri 10.2 mM olarak belirlemiştir (Schönert vd., 1998).

3.6 İnhibitörlerin ve Aktivatörlerin Etkileri

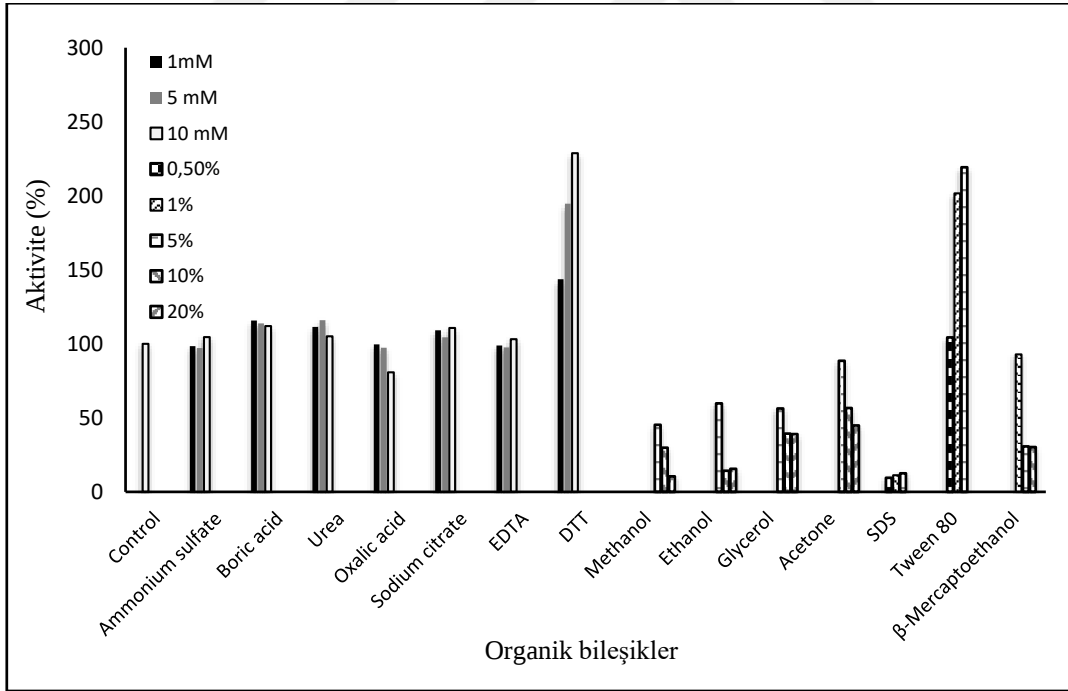
Çeşitli metal iyonlarının ve organik bileşiklerin AgoSuc2 aktivitesi üzerindeki etkilerini belirlemek için pH 7,00'de 60 °C'de bir dizi enzim reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu olarak herhangi bir metal iyonu veya organik bileşik kullanılmadan yapılan deneyler seçilmiştir. Deneyler sonucunda Zn^{+2} , Cu^{+2} , Pb^{+2} , Ag^{+2} , Fe^{+3} , Hg^{+2} ve Al^{+2} metal iyonlarının düşük konsantrasyonlarda (1 mM) bile enzim aktivitesini inhibe ettiği gözlemlendi. Çalışmada içinde süktroz bulunan eppendorf deneme tüplerine 1 mM Co^{+2} iyonunun eklenmesi ile enzim üzerinde bir aktivatör etki yaratırken, daha yüksek konsantrasyonlarda Co^{+2} (5 mM, 10 mM) iyonu eklenmesi durumunda enzim üzerinde engelleyici bir etki gösterdi. Süktroz içeren eppendorf deney tüplerine Mn^{+2} , Fe^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarının enzim üzerinde aktivatör olarak davrandığı tespit edildi. Ayrıca, süktroz içeren deney tüplerine K^{+} , Na^{+} , Ba^{+2} ve Ca^{+2} iyonları enzim üzerinde ne aktivatör ne de inhibitör etki göstermediği tespit edildi (Şekil 27).



Şekil 27. Metal iyonlarının AgoSuc2 üzerindeki etkisi.

Bu çalışmada, süktroz bulunan eppendorf tüplerin içine 10 mM Sn^{+2} kullanımı enzim üzerinde herhangi bir inhibisyona neden olmazken, bu metal iyonunun 1 mM

ve 5 mM kullanımında Sn^{+2} 'nin zayıf bir inhibitör etkisi tespit edildi. Bu çalışmanın sonuçları literatürle uyumlu olduğu görüldü. Benzer şekilde, *Thermoanaerobium* Tok6-B1'in oligo-1,4-1,6-alfa-glukozidazı üzerinde Mn^{+2} ve Mg^{+2} metal iyonlarının aktivatörler olarak görev yaptığı rapor edilmiştir (Plant vd., 1988). Metal iyonlarına ilaveten, enzim üzerinde birçok organik bileşiklerin aktivatör ve inhibitör etkileri açısından araştırılmıştır. Amonyum sülfat, borik asit, üre, oksalik asit, sodyum sitrat ve EDTA'nın enzim üzerinde herhangi bir inhibitör veya aktivatör etkisinin olmadığı belirlendi. Bir şelatlama ajanı olan EDTA'nın enzimin aktivitesine herhangi bir etkisinin olmaması, enzimin kofaktöre sahip olmadığını ve bir apoenzim olarak var olduğunu destekleyen bir kanıttı. Tween 80'nin %1, %5 ve %10'luk konsantrasyonları sırasıyla %103, %112 ve %116 aktivatör etki gösterirken, DTT'nin %1, %5 ve %10'luk konsantrasyonları ise sırasıyla %144, %196, %229 yüksek aktivatör etki göstermiştir. Metanol, etanol gliserol, aseton, SDS ve β -merkapt etanolün düşük konsantrasyonlarda bile enzimi inhibe ettiği belirlendi (Şekil 28).



Şekil 28. Bazı organik bileşiklerin AgoSuc2 üzerindeki etkisi.

Bu çalışmada, *Anoxybacillus gonensis* G2^T'in oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidazı pET-28a(+) vektörü kullanılarak eksprese edilmiş, saflaştırılmış ve iyi bir şekilde

karakterize edilmiştir. Enzim, diğer birçok sukraz ve invertaz enziminden daha üstün kinetik ve biyokimyasal parametrelere sahip olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, bu doktora tez çalışmasında üretilen enzim, sakkarozu parçalayıcı özelliğinden dolayı HFS üretimi için önemli bir potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir.

3.7 Öneriler

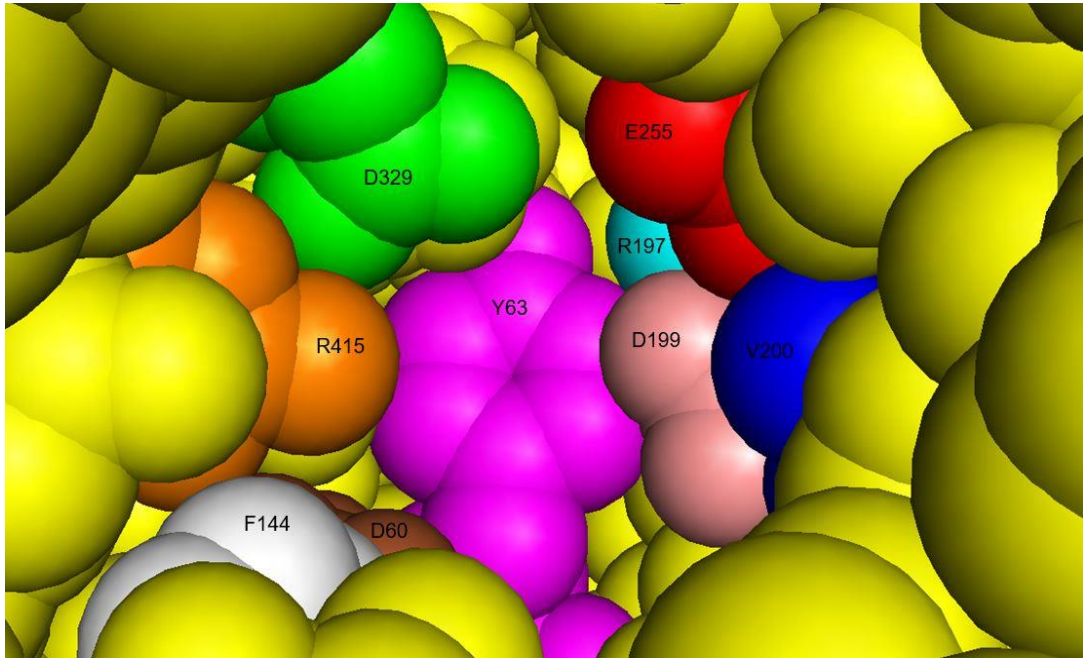
Bacillus cereus oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidazının aktif bölgesinde bulunan ve katalitik aktivitede rol oynayan amino asitler Pymol protein modelleme programı ile belirlenmiştir. Bu veriler doğrultusunda AgoSuc2 üzerinde şu mutasyonların tasarlanması planlanabilir:

- D60E: 60. bölgede bulunan aspartatın glutamat amino asidine dönüştürülmesi,
- Y63F: 63. bölgede bulunan tirozinin fenil alanin amino asidine dönüştürülmesi,
- Y63H: 63. bölgede bulunan tirozinin histidin amino asidine dönüştürülmesi,
- F139E: 139. bölgede bulunan fenil alaninin glutamat amino asidine dönüştürülmesi,
- R192K: 192. bölgede bulunan arjininin lizin amino asidine dönüştürülmesi,
- D194E: 194. bölgede bulunan aspartatın glutamat amino asidine dönüştürülmesi,
- A195V: 195. bölgede bulunan alaninin valin amino asidine dönüştürülmesi,
- A195T: 195. bölgede bulunan alaninin treonin amino asidine dönüştürülmesi,
- E245D: 245. bölgede bulunan glutamatın aspartat amino asidine dönüştürülmesi,
- D310E: 310. bölgede bulunan aspartatın glutamat amino asidine dönüştürülmesi,
- R395H: 395. bölgede bulunan arjinin histidin amino asidine dönüştürülmesi şeklinde gerçekleştirilmesi düşünülebilir.

Watanabe ve arkadaşlarının (2001) yapmış oldukları çalışmada H103N, D199N, E255Q, H328N, D329N mutasyonları ile histidinlerin substratı bağlamada D199, E255 ve D329 amino asitlerinin ise katalitik aktivitede önemli rol oynadıklarını belirlemişlerdir. Yukarıdaki analizden de anlaşılacağı gibi bu 3 amino asit (D199, D329 ve E255) ve mutasyon yapılması planlanan diğer 6 amino asit D60, Y63, F144,

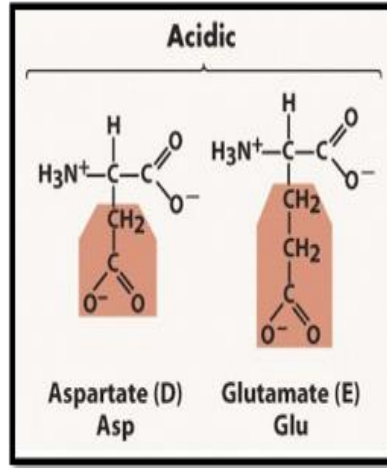
R197, V200 ve R415 enzimin aktif bölgesinde bulunmaktadır ve katalitik aktivitede rol alma olasılığı çok yüksektir.

Bu analizler doğrultusunda AgoSuc2 enzimi üzerinde şu mutasyonların yapılarak katalitik etkinliğe olan etkileri araştırılması planlanabilmektedir. Pymol protein modelleme programı ile *Bacillus cereus* oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidazının aktif bölgesi ve bu bölgede bulunan amino asitlerin moleküler yapısı Şekil 29’da gösterildi.



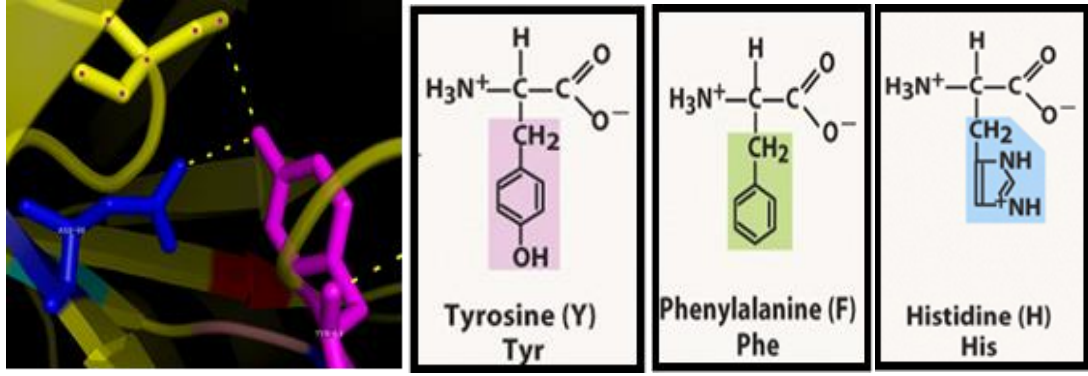
Şekil 29. Pymol protein modelleme programı ile *Bacillus cereus* oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidazının aktif bölgesi ve bu bölgede bulunan amino asitlerin gösterimi.

- *D194E* mutasyonu; *Bacillus cereus* oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidazının D199 amino asidi AgoSuc2 enziminde 194. pozisyonda bulunmaktadır. Aspartik asit glutamik aside göre daha kısa bir yan zincire sahiptir. Söz konusu mutasyon ile uzayan radikal grubunun substrat ile daha iyi etkileşmesi sağlanılabilmektedir. Bu mutasyon ile K_m değerinde düşüş ve dolayısı ile substratlarına olan ilgide bir artış olması beklenebilir. Aspartat ve glutamat amino asitlerin moleküler yapısı Şekil 30’da verildi.



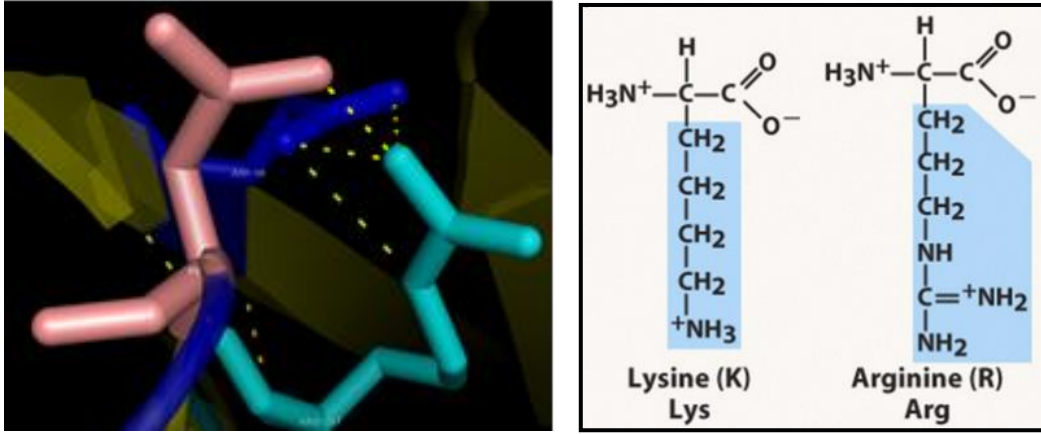
Şekil 30. Asparat ve glutamat amino asitlerin moleküler yapısı.

- *E245D mutasyonu; Bacillus cereus* oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidazının E255 amino asidi AgoSuc2 enziminde 245. pozisyonda bulunmaktadır. Aspartik asit, glutamik aside göre daha kısa bir yan zincire sahiptir. Söz konusu mutasyon ile aktif bölge genişleyeceğinden substratın aktif bölgeye girişi kolaylaşabilir ve V_{max} değerinde ise bir artışın olması beklenilebilir.
- *D310E mutasyonu; Bacillus cereus* oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidazının D329 amino asidi AgoSuc2 enziminde 310. pozisyonda bulunmaktadır. D194E mutasyonunda olduğu gibi K_m değerinde bir düşüşün olması beklenilebilir.
- *D60E mutasyonu; D194E ve D310 E mutasyonunda olduğu gibi K_m değerinde bir düşüşün gerçekleşeceği düşünülebilir.*
- *Y63F ve Y63H mutasyonu; Tirozin, fenil alaninle benzer şekilde benzen halkası ihtiva eder, fakat fenil alaninden farklı olarak hidroksil bulundurduğu için hidrofilik karakterdedir. 63. amino asit olan tirozin, aktif bölgenin tam ortasında bulunup aktif bölgenin hemen arka tarafında bulunan D98 ile hidrojen bağı etkileşimi yapmaktadır. Tirozinin fenil alanine dönüştürülmesi aktif bölgedeki yapıyı bozmadan (Benzen halkasından dolayı) bu etkileşimi ortadan kaldırıp ve aktif bölgenin esnekliğini artırması planlanabilir. Bu mutasyonla katalitik etkinlikte (k_{cat}/K_m) bir artışı olması beklenilebilir. Ayrıca histidin ilavesi ile tersi bir durumda nasıl bir etki oluşabileceği Y63H mutasyonu ile araştırılması planlanabilir. Y63F ve Y63H mutasyonunlarına ait moleküler yapı Şekil 31’de sunuldu.*



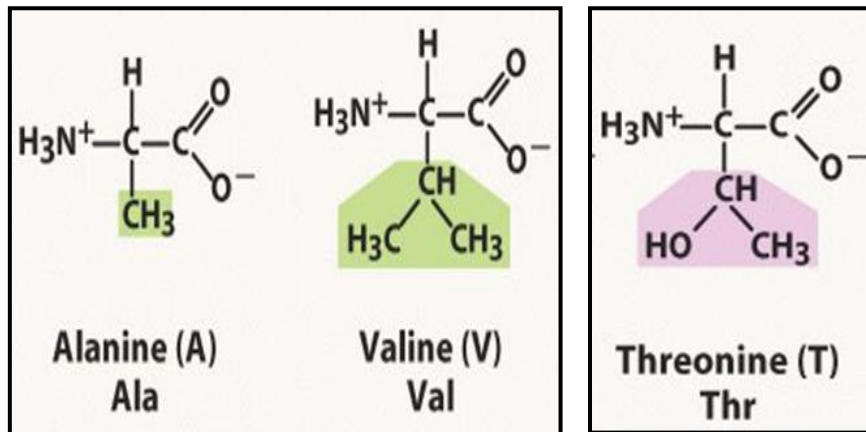
Şekil 31. Y63F ve Y63H mutasyonunlarına ait moleküler yapı.

- *F139E mutasyonu*; *Bacillus cereus* oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidazının F144 amino asidi AgoSuc2 enziminde 139. pozisyonda bulunmaktadır. Fenil alanin, aktif bölgenin hemen giriş kısmında bulunmaktadır. Hidrofobik karakterli fenil alanin, negatif yüklü ve oldukça hidrofilik olan glutamik aside dönüştürülmesi ile substratla olan hidrofilik olan etkileşimlerin arttırılması planlanılabılır. Bu mutasyon ile enzimin katalitik etkinliğinde bir artışın olması beklenilebilir.
- *R192K mutasyonu*; Arjinin ve lizin amino asitleri pozitif yüklü amino asitlerdir. *Bacillus cereus* oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidazının R197 amino asidi AgoSuc2 enziminde 192. pozisyonda bulunmaktadır. Aktif bölgede rol oynayan D194 (*Bacillus cereus* 'ta D199) ve aktif bölgenin arkasında bulunan D98 amino asitlileri ile yoğun şekilde hidrojen bağı etkileşiminde bulunmaktadır. Yine pozitif karakterli lizin amino asidi ile değiştirilmesi bu etkileşimlerin bir kısmını ortadan kaldırması beklenilebilir ve bu durumda aktif bölgede, yük karakterini değiştirmeden esneklik sağlaması düşünülebilir. Bu mutasyon ile enzimin katalitik etkinliğinde bir artışın olması beklenebilir. R192K mutasyonuna, lizin ve arjinin amino asitlerine ait moleküler yapı Şekil 32'de verilmiştir.



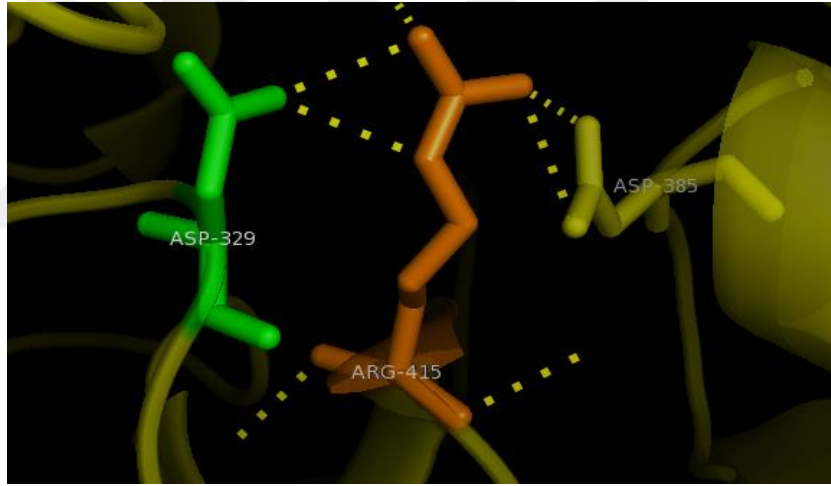
Şekil 32. R192K mutasyonuna, lisin ve arjinin amino asitlerine ait moleküler yapı.

- A195V ve A195T mutasyonu; Yamamoto ve arkadaşları (2004) tarafından yapılan çalışmada bölgeye spesifik mutasyon deneylerinde oligo-1,6-glukozidazda, α -1,6 glukozidik bağlara karşı spesifiklikten sorumlu amino asit kökünün Val216 olduğu, fakat α -1,4 glukozidik bağlara spesifik α -glukozidazda bu amino asit pozisyonunda Thr273 olduğu bildirilmektedir. *Bacillus cereus* oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidazının V200 amino asidi AgoSuc2 enziminde 195. pozisyonda alanin amino asidinin bulunduğu rapor edilmiştir. Bu bölgede A195V ve A195T mutasyonları meydana getirilerek enzimin substrat tercihinin değiştirilmesi planlanabilir. Alanin, valin ve treonin amino asitlerin moleküler yapısı Şekil 33’de verilmiştir.



Şekil 33. Alanin, valin ve treonin amino asitlerin moleküler yapı.

- *R395H mutasyonu*; *Bacillus cereus* oligo-1,4-1,6-alfa-glukosidazının R415 amino asidi AgoSuc2 enziminde 395. pozisyonda bulunmaktadır. Arjinin amno asidi aktif bölgede rol oynayan D310 (*Bacillus cereus*'ta D329) ve aktif bölgenin arkasında bulunan D366 (*Bacillus cereus* 'ta D385) amino asitlileri ile yoğun şekilde hidrojen bağı etkileşiminde bulunmaktadır. Histidin amino asidi, pozitif yüklü olup arjininden daha kısadır. Arjinin yerine histidin yerleştirilmesi ile azalan hidrojen bağı etkileşimi yüzünde esnekliğin artırılması, histidinin daha kısa olması sebebiyle aktif bölgede genişleme ve histidinin substrat bağlanma bölgesi olarak rol oynama ihtimali nedenleri ile K_m değerinde bir azalış olmasına karşın, V_{max} ve katalitik etkinlik değerlerinde ise bir miktar artış olması beklenebilir. R395H mutasyonuna ait moleküler yapı Şekil 34'de gösterilmiştir.



Şekil 34. R395H mutasyonuna ait moleküler yapı.

KAYNAKÇA

- Albert, H., Davies, D.J.G., Woodson, L.P. and Soper, C.J. (1998). Biological indicators for steam sterilization: characterization of a rapid biological indicator utilizing *Bacillus stearothermophilus* spore-associated alpha-glucosidase enzyme. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 865-874.
- Anonymous. (1993). Multifunctional sweeteners. *Baking and Snack*. 15(4), 31-34.
- Antrim, R.L., Colilla, W. and Schnyder, B. J. (1979). Glucose isomerase production of high fructose syrups. *Appl. Biochem. Bioeng.* 2, 97-155.
- Arda, M. (1985). Genel Bakteriyoloji. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları: 402, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 1985. Üçüncü Baskı, 530 s.
- 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 ile Geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize, 101 s.
- Bandlish, R.K., Hess, J.M., Epting, K.L. and Vieille, C. (2002). Glucose to fructose conversion at high temperatures with xylose (glucose) isomerases from *Streptomyces murinus* and to hyperthermophilic Thermotoga species. *Biotechnology and Bioengineering*, 80(2), 185-194. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.10362>
- Becker, P., Abu-Reesh, I., Markossian, S., Antranikian, G. and Markl, H. (1997). Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase-producing thermophile *Bacillus* sp. IHI-91 on olive oil. *Appl Microbiol Biotechnol*, 48, 184-90.
- Belcarz, A., Ginalska, G, Lobarzewski, J. and Penel, C.(2002). The novel non-glycosylated invertase from *Candida utilis* (the properties and the conditions of production and purification). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1594, 40-53.
- Belduz, A.O., Dulger, S. and Demirbag, Z. (2003). *Anoxybacillus gonensis* sp. nov., a moderately thermophilic, xylose-utilizing, endospore-forming bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1315-1320.
- Berthelot, K. and Delmotte, F.M. (1999). Purification and Characterization of an α -Glucosidase from *Rhizobium* sp. (*Robinia pseudoacacia* L.) Strain USDA 4280. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(7), 2907-2911.
- Bhosale, S.H., Rao, M.B. and Deshpande, V.V. (1996). Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. *Microbiol. Rev.* 60, 280-300.
- Bradford, M.A. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-254.

- Collins, T. and Margesin, R. (2019). Psychrophilic lifestyles: Mechanisms of adaptation and biotechnological tools. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 103, 2857-2871.
- Constantino, H., R., Brown, S.H. and Kelly, R.M. (1990). Purification and characterization of an α -glucosidase from a hyperthermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*, exhibiting a temperature optimum of 105 to 1150 °C. *J. Bacteriol.*, 172, 3654-3660.
- CRA. (1994). Corn refining, the process, the products. Corn Refiners Association Inc.
- Çoşkun, A. (2010). Endüstriyel enzimler üreten yeni *Bacillus* sp. suşlarının izolasyonu ve karakterizasyonu. Yüksek lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 115 s.
- Chaudhuri, A. and Maheshwari, R. (1996) A novel invertase from a thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*: its requirement of thiol and protein for activation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 327, 98-106.
- De Maayer, P., Anderson, D., Cary, S. and Cowan, D.A. (2014). Some like it cold: Understanding the survival strategies of psychrophiles. *EMBO Rep.*, 15, 508-517.
- Delgado, S., Flórez, A.B., Guadamuro, L. and Mayo, B. (2017). Genetic and biochemical characterization of an oligo- α -1,6-glucosidase from *Lactobacillus plantarum*. *International Journal of Food Microbiology*, 46, 32-39.
- Deng, X., Petitjean, M., Teste, M., Kooli, W., Tranier, S., Francois, J. ve Parrou, J. (2014). Similarities and differences in the biochemical and enzymological properties of the four isomaltases from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Open Bio.*, 4, 200-212.
- Dong, Z., Hao, X., Pokhrel, D.S., Chen, X., Liu, X., Mchunu, N.P., Permaul, K., Singh, S., Niu, D. and Wang, Z. (2018). Molecular cloning and biochemical characterization of two novel oligo 1,6-glucosidases from *Bacillus mycoides* and *Thermomyces lanuginosus*. *Starch*, 70, 1700093.
- Dong, Z., Tang, C., Lu, Y., Yao, L. and Yunchao, K. (2020). Microbial Oligo- α -1,6-Glucosidase: Current Developments and Future Perspectives. *Starch*, 1900172, 1-11. <http://dx.doi.org/10.1002/star.201900172>
- Eke-Ejiofor, J. (2015). Functional properties of starches, physico-chemical and rheological properties of glucose syrup made from cassava and different potato varieties. *International Journal of Recent Scientific Research*, 6, 4400-4406.
- Ezeji, T.C., Wolf, A. and Bahl, H. (2005). Isolation and identification of *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10, an α -amylase and α -glucosidase producing thermophile. *Can. J. Microbiol.*, 51, 685-693.
- Giblin, M., Kelly, C.T. and Fogarty, W.M. (1987). Thermostable- α -glucosidase produced by *Bacillus caldovelox* DSM 411. *Can. J. Microbiol.*, 33, 614-618.
- Gümüşel, F. (2002). Biyoteknoloji, genetik ve sağlık sektörü. Kocaeli sanayisi için teknolojik öngörü ortak projesi, 73-135 s.

- Haki, G.D. and Rakshit, S.K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*, 89(1), 17-34.
- Hanover, L.M. and White, J.S. (1993). Manufacturing, composition and applications of fructose. *American Journal of Clinical Nutrition*, 58, 724-732.
- Halvorson, H. and Ellias, L. (1958). The purification and properties of an α -glucosidase of *Saccharomyces italicus* Y1225. *Biochim. Biophys. Acta.*, 30, 28-40.
- Harlow, E. and Lane, D. (1988) Antibodies. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Hebeda, R.E. (1987). Corn sweeteners. In: Watson, S.A. and Ramstad, P.E. (eds) "Corn Chemistry and Technology". AACC, Inc. St. Paul, MN. 501-534.
- Henry, E.R. (1976). High fructose corn syrup: New sweetener for the baker. *Baker's Digest*. 50(2), 25.
- Hermans, M.M.P., Kross, M.A., Beeumen, J., Oostra, B.A. and Reuser, A.J.J. (1991). Human lysosomal α -glucosidase. *J. Biol. Chem.*, 266, 13507-13512.
- Herwig, C., Doerrie, C., Marison, I. and von-Stockar, U. (2001). Quantitative analysis of the regulation scheme of invertase expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 76(3), 247-258. <https://doi.org/10.1002/bit.10004>
- Hobbs, L. (1986). Corn syrups. *Cereal Foods World*, 31(12), 852, 854, 856, 858.
- Howling, D. (1992). Glucose syrup: production, properties and applications. In: Schenck, F.W. and R.E. Hebeda (Eds), "Starch Hydrolysis Products". VCH Publ. Inc. New York. 277-316. Inglett, G. E. 1974. Sweeteners. The AVI Publ. Co., Westport, Connecticut.
- Hua, X. and Yang, R. (2015). Enzymes in starch processing. In *Enzymes in Food and Beverage Processing*; Chandrasekaran, M., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, pp. 139-170.
- Hung, V.S., Hatada, Y., Goda, S., Lu, J., Hidaka, Y., Li, Z., Akita, M., Ohta, Y., Watanabe, K., Matsui, H., Ito, S. and Horikoshi, K. (2005). α -Glucosidase from a strain of deep-sea *Geobacillus*: a potential enzyme for the biosynthesis of complex carbohydrates. *Appl. Microbial Biotechnol.*, 68, 757-765.
- Inglett, G.E. (1974). Sweeteners. The AVI Publ. Co., Westport, Connecticut.
- Janda, L., Pavelka, T., Tichý, P., Spižek, J. and Petříček, M. (1997). Production and properties of α -glucosidase from the thermotolerant bacterium *Thermomonospora curvata*. *J. Appl. Microbiol.*, 83, 470-476.
- Johnson, J.M., Harris, C.H. and Barbeau, W.E. (1989). Effects of HFCS replacement for sucrose on browning, starch gelatinization and sensory characteristics of cakes. *Cereal Chem.*, 66(3), 155-157.

- Karaoğlu, H. (2004). *Anoxybacillus gonensis* D-Glukoz (D-Ksiloz) İzomeraz Geninin Klonlanması, İzolasyonu ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 65 s.
- Karaoğlu, H. (2010). *Anoxybacillus gonensis* glukoz izomerazının genetik manipulasyonlarla bazı biyokimyasal özelliklerinin geliştirilmesi. Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Karaoglu, H., Yanmis, D., Sal, F.A., Celik, A., Canakci, S. and Belduz, A.O. (2013). Biochemical characterization of a novel glucose isomerase from *Anoxybacillus gonensis* G2^T that displays a high level of activity and thermal stability. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 97, 215-224. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.08.019>
- Kashiwabara, S.I., Matsuki, Y.i Kishimoto, T. and Suzuki, Y. (1998). Clustered Proline Residues around the Active-Site Cleft in Thermostable Oligo-1,6-glucosidase of *Bacillus flavocaldarius* KP1228. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62, 1093-1102.
- Kashiwabara, S., Azuma, S., Tsuduki, M. and Suzuki, Y. (2000). The primary structure of the subunit in *Bacillus thermoamyloliquefaciens* KP1071 molecular weight 540,000 homohexameric α -glucosidase II belonging to the glycosyl hydrolase family 31. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64, 1379-1393.
- Kelly, C.T. and Fogarty, W.M. (1983). Microbial α - glucosidases. *Process Biochem.*, 18, 6-12.
- Kelly, C.T., O'Reilly, F. and Fogarty, W.M. (1983). Extracellular α -glucosidase of an alkalophilic microorganism, *Bacillus* sp. ATCC 21591. *FEMS Microbiology Letters*, 20(1), 55-59.
- Khattab, S.M.R. and Kodaki, T. (2016). A Novel Production Method for High-Fructose Glucose Syrup from Sucrose-Containing Biomass by a Newly Isolated Strain of Osmotolerant *Meyerozyma guilliermondii*. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 26(4), 675-683. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1510.10091>
- Kıran, Ö.E. ve Çömlekçioglu, U. (2003). Zeytinli İlçası (Kahramanmaraş)'ndan termofil alkafilik amilolitik *Bacillus* sp. suşlarının izolasyonu ve amilaz üretme yetenekleri üzerine azot kaynaklarının etkisi. *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi* 6(2), 41-48.
- Kızaklı, M. (2019). D398s, I323V, I372Q/V ve V380F Mutasyonlarının *Anoxybacillus gonensis* Glukoz İzomerazının Kinetik Parametreleri Ve Isıl Kararlılığı Üzerine Olan Etkisinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize, 118 s.
- Knorr, D. (1987). Modern Process Technology of HFCS. Food Biotechnology Dept. of Food Science, University of Delaware, USA.
- Krahe, M., Antranikian, G. and Markl, H. (1996). Fermentation of extremophilic microorganisms. *FEMS Microbiol Rev.*, 18, 271-85.

- Kulp, K., Lorenz, J.K. and Stone, M. (1991). Functionality of carbohydrate ingredients in bakery products. *Food Technology*, 45(3), 136-142.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kuyper, M., Toirkens, M.J., Diderich, J.A., Winkler, A.A., van Dijken, J.P. and Pronk, J.T. (2005). Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. *FEMS Yeast Research*, 9(2005), 25-34.
- Lee, Y.E. (2000). Cloning and Characterization of α -Glucosidase Gene from Thermophilic *Bacillus* sp. DG0303. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 10(2), 244-250.
- Lee, S.S., He, S. and Withers, S.G. (2001). Identification of the catalytic nucleophile of the Family 31 α -glucosidase from *Aspergillus niger* via trapping of a 5-fluoroglycosyl-enzyme intermediate. *Biochem. J.*, 359, 381-386.
- 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.
- Maloy, S., Stewart, V. and Taylor, R. (1996). Genetic analysis of pathogenic bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Marriott, B. P., Cole, N. and Lee, E. (2009). National estimates of dietary fructose intake increased from 1977 to 2004 in the United States. *Nutrition*, 139, 1228-1235.
- Marshall, R.O. and Kooi, E.R. (1957). Enzymatic conversion of D-glucose to D-fructose. *Science*, 125, 648-649.
- Miller, G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Mu, W., Wang, X., Xue, Q., Jiang, B., Zhang, T. and Miao, M. (2012). Characterization of a thermostable glucose isomerase with an acidic pH optimum from *Acidothermus cellulolyticus*. *Food Res Int.* 47(2), 364-367.
- Nabors, L.O. and Gelardi, C.R. (1991). Alternative Sweeteners, 2nd Ed. Marcel Dekker, Inc., N.Y.
- Nakao, M., Nakayama, T., Harada, M., Kakudo, A., Ikemoto, H., Kobayashi, S. and Shibano, Y. (1994). Purification and characterization of a *Bacillus* sp. thermostable α -glucosidase with transglucosylation activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41, 337-343.
- Nashiru, O., Koh, S., Lee, S. and Lee, D. (2001). Novel α -glucosidase from extreme thermophile *Thermus caldophilus* GK24. *J. Biochem. and Mol. Biol.*, 34, 347-354.

- Neifar, S., Hlima, H. B., Mhiri, S., Mezghani, M., Bouacem, K., Ibrahim, A. H., Jaouadi, B., Bouanane-Darenfed, A. and Bejar, S. (2019). A novel thermostable and efficient Class II glucose isomerase from the thermophilic *Caldicoprobacter algeriensis*: Biochemical characterization, molecular investigation, and application in High Fructose Syrup production. *International Journal of Biological Macromolecules*. 129(2019), 31-40. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.150>
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kähler, M. and Antranikian, G. (1999). Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(6), 711-729.
- Nuero, O.M. and Reyes, F. (2002). Enzymes for animal feeding from *Penicillium chrysogenum* mycelial wastes from penicillin manufacture. *Letters in Applied Microbiology*, 34, 413-416.
- Oslancová, A. and Janec̣ek, Ṣ. (2002). Oligo-1,6-glucosidase and neopullulanase enzyme subfamilies from the α -amylase family defined by the fifth conserved sequence region. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59, 1945-1959.
- Özcan, K. (2019). Artabel gölleri (Gümüşhane) sedimentlerinden izole edilen aktinobakterilerin antimikrobiyal madde ve endüstriyel önemi olan enzimleri üretme kapasitelerinin belirlenmesi. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 4(2), 166-173.
- Piller, K., Daniel, R.M. and Petach, H.H. (1996). Properties and stabilization of an extracellular α -glucosidase from the extremely thermophilic archaeobacteria *Thermococcus* strain AN1: enzyme activity at 130 °C. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1292, 197-205.
- Plant, A.R., Parratt, S., Daniel, R.M. and Morgan, H.W.A. (1988). Cell-associated oligo-1,6- α -glucosidase from an extremely thermophilic anaerobic bacterium, *Thermoanaerobium* Tok6-B1. *Biochemical Journal*, 255, 865-868.
- Pomeranz, Y. (1985). Functional properties of foods. Academic press inc., Orlando, Florida. 536 s.
- Poonam, N. ve Dalel, S. (1995). Enzyme and microbial systems involved in starc processing. *Enzyme Microb. Technol.*, 17, 770-778.
- Queneau, Y., Fitremann, J., Jarosz, S. and Lewandowski, B. (2007). Sucrose chemistry and applications of sucrochemicals. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 217-292.
- Rakıcı, S. (2019). *Anoxybacillus gonensis* Glukoz İzomerazının Isıl Kararlılığının K111R-L313I-V101R-A353G/F/W ve T428E/S Bölge Spesifik Mutasyonları İle Geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize, 145 s.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Gathe, M.S. and Deshpande, V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Micrbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(3), 597-635.

- Reeder, C.F. (1978). Light foods appease weight conscious Americans. *Food Product Development*, 12(3), 35-36.
- Romero-Gómez, S.J., Augur, C. and Viniegra-González, G. (2000). Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Biotechnology Letters*, 22, 1255-1258.
- Saral, A. (2011). *Anoxybacillus gonensis* G2^T CTP sentetaz geninin klonlanması, ekspresyonu, saflaştırılması ve amonyak-bağımlı CTP sentetaz aktivitesinin karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Rize Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize, 49 s.
- Schönert, S., Buder, T. and Dahl, M.K. (1988). Identification and enzymatic characterization of the maltose-inducible alpha-glucosidase MalL (sucrase-isomaltase-maltase) of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 180, 2574-2578.
- Siddiqui, K.S. and Cavicchioli, R. (2006). Cold-Adapted Enzymes. *Annu. Rev. Biochem.*, 75, 403-433.
- Singh, R. S., Chauhan, K., Pandey, A. and Larroche, C. (2018). Biocatalytic strategies for the production of high fructose syrup from inulin. *Bioresource Technology*, 260, 395-403. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2018.03.127>
- Smith, J.E. (2004). *Biotechnology*. Cambridge University Press, New York, p. 271.
- Stam, M.R., Etienne, G.J., Danchin, C.R., Coutinho, P.M. and Henrissat, B. (2006). Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: towards improved functional annotations of a-amylase-related proteins. *Protein Engineering, Design & Selection*, 19(12), 555-562. <http://dx.doi.org/10.1093/protein/gzl044>
- Suzuki, Y. (1979). Hydrolysis of low molecular weight isomaltosaccharides by a p-nitrophenyl-alpha-D-glucopyranoside-hydrolyzing alpha-glucosidase from a thermophile, *Bacillus thermoglucosidius* KP 1006. *Biochimica et Biophysica Acta*, 566, 62-66.
- Suzuki, Y. and Tomura, Y. (1986). Purification and characterization of *Bacillus coagulans* oligo-1,6-glucosidase. *European Journal of Biochemistry*, 158, 77-83.
- Suzuki, Y., Aoki, R. and Hayashi, H. (1982). Assignment of a p-nitrophenyl-alpha-D-glucopyranoside hydrolyzing alpha-glucosidase of *Bacillus cereus* ATCC 7064 to an exo-oligo-1,6-glucosidase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 704, 476-483.
- Suzuki, Y., Fujii, H., Uemura, H. and Kyoto, M.S. (1987a). Purification and characterization of extremely thermostable exo-oligo-1,6-glucosidase from a caldactive *Bacillus* sp. KP 1228. *Starch/Stärke*, 39, 17-23.
- Suzuki, Y., Oishi, K., Nakano, H. and Nagayama, T.A. (1987b). Strong correlation between the increase in number of proline residues and the rise in thermostability of five *Bacillus* oligo-1,6-glucosidases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 26, 546-551.

- Suzuki, Y., Shinji, M. and Eto, N. (1984). Assignment of a ρ -nitrophenyl- α -Dglucopyranosidase of *Bacillus stearothermophilus* ATCC 12016 to a novel exo- α -1,4-glucosidase active for oligomaltosaccharides and α -glucans. *Biochimica et Biophysica Acta*, 787, 281-289.
- Van der Maarel, M.J., van der Veen, B., Uitdehaag, J.C., Leemhuis, H. and Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starchconverting enzymes of the α -amylase family. *J. Biotechnol.*, 94, 137-155.
- Watanabe, K., Hata, Y., Kizaki, H., Katsube, Y. and Suzuki, Y. (1997). The refined crystal structure of *Bacillus cereus* oligo-1,6-glucosidase at 2.0 Å resolution: structural characterization of proline-substitution sites for protein thermostabilization. *Journal of Molecular Biology*, 269(1), 142-153. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1997.1018>
- Watanabe, K., Iha, H., Ohashi, A. and Yuzuru Suzuki. (1988). Cloning and expression in *Escherichia coli* of an extremely thermostable oligo-1,6-glucosidase gene from *Bacillus thermoglucosidasius*. *American Society for Microbiology*, 171(2), 1219-1222.
- Watanabe, K., Iha, H., Ohashi, A. and Suzuki, Y. (1989). Cloning and expression in *Escherichia coli* of an extremely thermostable oligo-1,6-glucosidase gene from *Bacillus thermoglucosidasius*. *J. Bacteriol.*, 171, 1219-1222.
- Watanabe, K., Kitamura, K. and Suzuki, Y. (1996). Analysis of the critical sites for protein thermostabilization by proline substitution in oligo-1,6-glucosidase from *Bacillus coagulans* ATCC 7050 and the evolutionary consideration of proline residues. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 2066-2073.
- Watanabe, K., Miyake, K. and Suzuki, Y. (2001). Identification of catalytic and substrate-binding site residues in *Bacillus cereus* ATCC7064 oligo-1,6-glucosidase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65, 2058-2064.
- Watanabe, R., Inoue, N., Westfall, B., Taron, C.H. Orlean, P., Takeda, J. and Kinoshita, T. (1998). The first step of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis is mediated by a complex of PIG-A, PIG-H, PIG-C and GPI1. *The EMBO Journal*, 17(4), 877-885.
- White, J.S. (2014). Sucrose, HFCS, and fructose: history, manufacture, composition, applications, and production. In: Rippe, J. (Ed.), *Fructose, High Fructose Corn Syrup, Sucrose and Health*. Nutrition and Health, Humana Press, New York, NY, pp. 13-33.
- Wulff, S.M. and Helgeson, D.L. (1987). Preliminary economic feasibility analysis of HFCS processing in US with emphasis on North Dakota. Agricultural Economics Report, No. 229. Dept. Agric. Econ. NDSU, Fargo, ND.
- Yamamoto, K., Nakayama, A., Yamamoto, Y. and Tabata S. (2004). Val216 decides the substrate specificity of α -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 271, 3414-3420.
- Yamamoto, M. and Horikoshi, K. (1990). Purification and properties of an oligo-1,6-glucosidase from alkalophilic *Bacillus* species. *Carbohydrate Research*, 197, 227-235.

- Zhang, Y., Hidajat, K. and Ray, A. K. (2004). Optimal design and operation of SMB bioreactor: production of high fructose syrup by isomerization of glucose. *Biochemical Engineering Journal*. 21, 111-121. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2004.05.007>
- Zhou, G., Peng, C., Liu, X., Chang, F., Xiao, Y., Liu, J. and Fang, Z. (2020). Identification and immobilization of an invertase with high specific activity and sucrose tolerance ability of *Gongronella* sp. w5 for High Fructose Syrup preparation. *Frontier Microbiology*. 11(633),1-13. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.00633>
- Zubay, G. (1988). *Biochemistry*. Machmillan Publishing Company, 866 Third Avenue, New York 10022, 2nd. edition; 131-414, ISBN-0-22-432080-3.

