

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Hypocrea jecorina* SAF KÜLTÜRÜ ve *Trichoderma reesei* 1A
MUTANT SUŞUNDAN GLUTAMİNAZ ENZİMİNİN ÜRETİMİ**

DİLARA BÜLBÜL

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA PROGRAMI**

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. EMİNE KARAKUŞ**

İSTANBUL, 2012

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Hypocrea jecorina* SAF KÜLTÜRÜ ve *Trichoderma reesei* 1A
MUTANT SUŞUNDAN GLUTAMİNAZ ENZİMİNİN ÜRETİMİ**

Dilara BÜLBÜL tarafından hazırlanan tez çalışması 21.06.2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Emine KARAKUŞ
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Emine KARAKUŞ
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Ayşen YARAT
Marmara Üniversitesi

Bu alışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün 2011-01-02-KAP07 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bu çalışmayı büyük bir titizlikle yöneten, çalışma boyunca desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübesiyle içinde bulunduğum yolda beni yönlendiren, yüreklendiren kıymetli hocam Sayın Doç. Dr. Emine KARAKUŞ'a;

Bana olan inancını hep hissettiren değerli hocam emekli Sayın Prof. Dr. İnci ARISAN'a;

İdealim doğrultusunda önümde örnek aldığım, varlığı benim için büyük destek olan inci tanesi, kıymetli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Semra YILMAZER KESKİN'e;

Yaşamım boyunca maddi ve manevi her türlü desteği sunan, motivasyonum dağıldığında beni tekrar yüreklendiren ve bana olan inançlarını hep hissettiren, Huriye HAZAR ve Nuru HAZAR başta olmak üzere tüm aileme;

Tüm laboratuvar çalışmamızı aynı ortamda geçirdiğim, kıymetli arkadaşlarım Kimyager Ayşin ÖZPINAR ve Kimyager Fulya AYTAÇ'a;

Her zaman, her konuda yanımda olan Zafer SİNCAR ve Mustafa Evren BÜLBÜL'e;

Tüm kalbimle teşekkür eder, sonsuz saygı ve sevgilerimi sunarım.

Haziran, 2012

DİLARA BÜLBÜL

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	viii
KISALTMA LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÇİZELGE LİSTESİ	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiv
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı	1
1.3 Hipotez	1
BÖLÜM 2	
ENZİMLER	2
2.1 Genel Bilgi.....	2
2.2 Enzimlerin İsimlendirilmesi	4
2.2.1 Önerilen İsim	4
2.2.2 Sistematik İsim	5
2.3 Enzimlerin Aktif Bölgeleri	5
2.4 Enzim Aktivitesi Tayini	7
2.5 Enzim Aktivitesi Üzerine Etki Eden Faktörler.....	8
2.5.1 Substrat Konsantrasyonu	8
2.5.2 Enzim Miktarı.....	8
2.5.3 pH Etkisi.....	9
2.5.4 Sıcaklık Etkisi.....	9
2.5.5 Kofaktör Konsantrasyonu.....	10
2.6 Enzim Kinetiği.....	10
2.6.1 Michaelis-Menten Eşitliği	10
2.6.2 K_M ve v_{max} Değerlerinin önemi.....	15
2.7 Glutaminaz Enzimi	16

BÖLÜM 3

AMİNOASİTLER	23
3.1 Genel Bilgi	23
3.2 Aminoasitlerin Yapısı ve Özellikleri	25
3.2.1 İç Tuz Formu	26
3.3 Aminoasitlerin Amino Gruplarının Metabolizması	27
3.3.1 Transaminasyon	27
3.3.2 Oksidatif Deaminasyon	28
3.4 Glutamin	28
3.4.1 Genel Bilgi	28
3.4.2 Glutamin ve Fonksiyonları	30
3.4.3 Glutamin Sentez ve Yıkımı	34
3.4.3.1 Glutamin sentezi	34
3.4.3.2 Glutamin yıkımı	35
3.4.4 Glutamin ve Sindirim Sistemindeki Rolü	35
3.4.5 Glutamin Eksikliği	36
3.4.6 Glutamin ve Besinler	37
3.4.7 Glutamin ve Kanser	37
3.4.8 Glutamin ve Tedavi	38

BÖLÜM 4

MANTARLAR	39
4.1 Genel Bilgi	39
4.2 Mantarın Besin Değeri	41
4.3 Küf Mantarları	41
4.4 Mantarların Yararları	42
4.5 <i>Trichoderma reesei</i>	42

BÖLÜM 5

MATERYAL METOD	45
5.1 Çalışmada Kullanılan Küf Suşları	45
5.2 Kullanılan Cihazlar	45
5.3 Kullanılan Çözeltiler	46
5.3.1 Patates Dekstrozu Agar (PDA) Katı Besiyeri Çözeltisi	46
5.3.2 Sıvı Besiyeri	46
5.3.3 Bovin Serum Albumin (BSA) Stok Çözeltisi	46
5.3.4 Glutamin Çözeltisi	47
5.3.5 Fosfat Tamponu (0.1M pH 8.0)	47
5.3.6 NaOH Çözeltileri	48
5.3.7 Nessler Reaktifi (K_2HgI_4)	48
5.3.8 Trikloroasetik asit (TCA) Çözeltisi	48
5.3.9 Bradford Reaktifi	48
5.4 Kültür Ortamı	49
5.4.1 Katı Besiyeri	49
5.4.2 Kültür Suşlarının Üretilmesi	50
5.4.3 Sıvı Besiyeri	50
5.4.3.1 Substrat konsantrasyonu etkisi	51

5.4.3.2 Tuz konsantrasyonunun etkisi.....	51
5.5 Bradford Yöntemi ile Protein Miktar Tayini	52
5.6 Enzim Aktivitesi Tayini	53
5.7 Amonyum Standart Grafiğinin Çizilmesi.....	55
5.8 Optimum pH'nın Belirlenmesi.....	57
5.9 Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi	58
5.10 Enzim Termal Kararlılığı.....	58
5.11 Enzimin Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi.....	58
5.12 Depolama Kararlılığı	58
5.13 Formüller ve Hesaplamalar	59
5.13.1 Protein Miktarının Hesaplanması	59
5.13.2 Enzim Aktivitesinin Hesaplanması	59
5.13.3 Spesifik Aktivitenin Hesaplanması	59
BÖLÜM 6	
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	60
6.1 Giriş	60
6.2 <i>Hypocrea jecorina</i> saf kültürü ve <i>Trichoderma reesei</i> 1A Mutantından Glutaminaz Homojenatı Eldesi.....	61
6.3 Enzim Aktivitesi Tayini	61
6.4 Substrat Konsantrasyonunun Enzim Üretimi Üzerine Etkisi	62
6.5 Tuz Konsantrasyonunun Enzim Üretimi Üzerine Etkisi	63
6.6 Enzim Aktivitesine Etki Eden Parametreler	64
6.6.1 pH'nın Etkisi	64
6.6.2 Sıcaklığın Etkisi.....	66
6.7 Enzimin Termal Kararlılığı	68
6.8 Enzim Kinetiği.....	70
6.9 Enzimin Depolanma Süresince Kararlılığı	72
BÖLÜM 7	
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	74
KAYNAKLAR	75
ÖZGEÇMİŞ	83

SİMGE LİSTESİ

$^{\circ}\text{C}$	Santigrat
$\%$	Yüzde
α	Alfa
ΔG	Serbest enerji
g	gram
K_M	Michaelis-Menten sabiti
L	Litre
μL	Mikrolitre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	milimolar
M	Molarite
M_A	Mol kütlesi
nm	Nanometre
t	Zaman
v_o	Reaksiyon başlangıç hızı
$v_{\max}$	Maksimum reaksiyon hızı

KISALTMA LİSTESİ

ATP	Adenozin trifosfat
ADP	Adenozin difosfat
BSA	Bovin Serum Albumin
DNA	Deoksiribonükleik asit
EC	Enzyme Commission
EU	Enzim Ünitesi
FAD	Flavin adenin dinükleotid
GABA	Gamma-aminobütirik asit
GSH	Glutatyon
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
NAD ⁺	Nikotinamid adenin dinükleotid
PDA	Patates dekstrozu agar
P _i	Fosfat
TCA	Trikloroasetik asit

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1	Enzimin yapısı 2
Şekil 2.2	Enzimin substratla bağlanma şekilleri 3
Şekil 2.3	Enzimlerin aktif bölgesi..... 6
Şekil 2.4	Etkileşme sonucu uygunluk modeli (<i>induced fit</i>) 7
Şekil 2.5	Enzim denatürasyon ve renatürasyonu 10
Şekil 2.6	Enzimatik reaksiyonun hızına substrat konsantrasyonunun etkisi 11
Şekil 2.7	Glutaminaz enziminin dahil olduğu enzim sınıfı 16
Şekil 2.8	L-glutaminaz enziminin katalizlediği reaksiyon 16
Şekil 2.9	Dilimizin ayırt ettiği tatlar 18
Şekil 2.10	Dildeki tat alıcıları 18
Şekil 2.11	Glutaminaz enziminin yapısı 19
Şekil 2.12	Glutaminaz enziminin katalizlediği reaksiyonun mekanizması 20
Şekil 3.1	Polipeptid zinciri ve amino asitler 23
Şekil 3.2	Amino asitlerin yapısal özellikleri 25
Şekil 3.3	İç Tuz formu 26
Şekil 3.4	İç tuz oluşum reaksiyonu 27
Şekil 3.5	Karaciğer-sitoplazmasında meydana gelen deaminasyon reaksiyonları ... 28
Şekil 3.6	Glutaminin yapısı 29
Şekil 3.7	Glutaminin üç boyutlu yapısı 29
Şekil 3.8	Glutamin metabolizması sonucu elde edilen ürünler 31
Şekil 3.9	Glutaminin glutamat üzerinden diğer bileşiklere dönüşümü..... 31
Şekil 3.10	Glutaminin, pürin ve pirimidin halkasına azot sağlaması 32
Şekil 3.11	Glukozamin-6-P'dan fruktoz-6-P oluşumu 32
Şekil 3.12	Amonyak metabolizmasında glutaminin yeri 33
Şekil 3.13	Glutamin biyosentezi 35
Şekil 3.14	Gastrointestinal sistemde tahmini glutamin fonksiyonları 36
Şekil 4.1	<i>Trichoderma reesei</i> 'nin taksonomisi 43
Şekil 4.2	<i>Trichoderma reesei</i> 'in elektronmikroskobu altındaki görüntüsü..... 44
Şekil 5.1	Nessler reaktifinin amonyak ile meydana getirdiği reaksiyon 48
Şekil 5.2	Hazırlanan katı besiyerleri 49
Şekil 5.3	Hazırlanan sıvı besiyerleri 51
Şekil 5.4	Bradford reaktifi ilave edildikten sonra farklı konsantrasyonlarda BSA çözeltilerinin genel görünümü 53
Şekil 5.5	Bovin serum albumin (BSA) standart grafiği 53
Şekil 5.6	Standart grafiği için kullanılan farklı konsantrasyondaki NH ₄ Cl çözeltileri 56
Şekil 5.7	Amonyum klorür standart grafiği 56

Şekil 6.1	Farklı L-glutamin konsantrasyonlarında <i>Hypocrea jecorina</i> saf kültürü ve <i>Trichoderma reesei</i> 1A mutant suşundan elde edilen glutaminaz enzim miktarları.....	62
Şekil 6.2	<i>Hypocrea jecorina</i> saf kültürü ve <i>Trichoderma reesei</i> 1A mutant suşundan üretilen glutaminaz enzim aktivitelere karşı değişen tuz konsantrasyonlarının etkisi	63
Şekil 6.3	<i>Hypocrea jecorina</i> saf kültürü ve <i>Trichoderma reesei</i> 1A mutant suşundan elde edilen glutaminaz enzim aktivitesine pH'nın etkisi	65
Şekil 6.4	<i>Hypocrea jecorina</i> saf kültürü ve <i>Trichoderma reesei</i> 1A mutant suşundan üretilen glutaminaz enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi	67
Şekil 6.5	<i>Hypocrea jecorina</i> 'dan üretilen glutaminaz enziminin termal kararlılığı ..	68
Şekil 6.6	<i>T.reesei</i> 'den üretilen glutaminaz enziminin termal kararlılığı	69
Şekil 6.7	<i>Hypocrea jecorina</i> 'dan üretilen glutaminaz enziminin Lineweaver-Burk grafiği.....	71
Şekil 6.8	<i>Trichoderma reesei</i> 'den üretilen glutaminaz enziminin Lineweaver-Burk grafiği.....	72
Şekil 6.9	4°C'da depolama şartlarında glutaminaz enzim aktivitesinin zamanla değişimi.....	73

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2.1	Enzim sınıfları 5
Çizelge 2.2	Glutaminaz üretiminde kullanılan mikroorganizmalar..... 21
Çizelge 3.1	Esansiyel ve esansiyel olmayan amino asitler 24
Çizelge 3.2	Glutamin amino asidinin iyonlaşabilir gruplarının pK değerleri..... 29
Çizelge 3.3	Glutamin ilavesinin olası yararlı etkileri 38
Çizelge 5.1	Bradford yönteminde kullanılan BSA çözeltilerinin hazırlanması..... 52
Çizelge 5.2	Glutaminaz aktivitesinin belirlenmesi için izlenen yol 54
Çizelge 5.3	Amonyum klorür (NH ₄ Cl) standart çözeltilerinin hazırlanması..... 55
Çizelge 5.4	Farklı pH’da fosfat tamponu hazırlamak için gerekli miktarlar 57
Çizelge 6.1	<i>Hypocrea jecorina</i> saf kültürü ve <i>Trichoderma reesei</i> 1A mutant suşundan elde edilen enzim homojenatı sayısal parametreleri 62
Çizelge 6.2	<i>Hypocrea jecorina</i> saf kültüründen üretilen glutaminaz enziminin farklı pH’larda elde edilen sayısal parametreleri 64
Çizelge 6.3	<i>Trichoderma reesei</i> 1A mutant suşundan üretilen glutaminaz enziminin farklı pH’larda elde edilen sayısal parametreleri 65
Çizelge 6.4	<i>Hypocrea jecorina</i> saf kültüründen üretilen glutaminaz enziminin farklı sıcaklıklarda elde edilen sayısal parametreleri..... 66
Çizelge 6.5	<i>Trichoderma reesei</i> 1A mutant suşundan üretilen glutaminaz enziminin farklı sıcaklıklarda elde edilen sayısal parametreleri 67
Çizelge 6.6	<i>Hypocrea jecorina</i> saf kültüründen üretilen glutaminaz enziminin farklı glutamin konsantrasyonlarında elde edilen sayısal parametreleri..... 70
Çizelge 6.7	<i>Trichoderma reesei</i> 1A mutant suşunda üretilen glutaminaz enziminin farklı glutamin konsantrasyonlarında elde edilen sayısal parametreleri . 71

***Hypocrea jecorina* SAF KÜLTÜRÜ ve *Trichoderma reesei* 1A
MUTANT SUŞUNDAN GLUTAMİNAZ ENZİMİNİN ÜRETİMİ**

Dilara BÜLBÜL

Kimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Emine KARAKUŞ

L-Glutaminaz (L-Glutamin amidohidrolaz EC 3.5.1.2), L-glutamini glutamik asit ve amonyum iyonuna dönüştüren reaksiyonu katalizleyen önemli bir enzimdir. Azot metabolizmasında önemli bir role sahiptir. Son yıllarda bu enzime olan ilgi terapötik ve endüstriyel kullanım alanlarından dolayı artmıştır. Terapötik açıdan antilösemik ajan olarak görev almasının yanı sıra fermente gıdalarda da tat artırıcı özellik göstermekte rolü bulunmaktadır.

Glutaminaz aktivitesi yaygın olarak bitkilerde, hayvansal dokularda ve bakteri, maya ve küfleri kapsayan mikroorganizmalarda gözlenmiştir.

Hypocrea jecorina saf kültüründen ve *Trichoderma reesei* 1A mutant suşundan glutaminaz enziminin mikrobiyal olarak üretimi, üretilen enzimin optimum koşullarının belirlenmesi ve kinetik parametrelerinin hesaplanması hedeflenmiştir. Çalışma sonucunda her iki türden de elde edilen glutaminaz enziminin optimum pH değeri 8.0 ve optimum sıcaklığı 50°C olarak bulunmuştur. Ayrıca her iki türden üretilen glutaminaz enziminin termal kararlılığı ve depolama kararlılığının oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. *Hypocrea jecorina* saf kültürü ve *Trichoderma reesei* 1A mutant suşundan üretilen enzimin kinetik parametreleri olan K_M ve v_{max} değerleri Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek sırasıyla K_M değerleri 0.491 mM, 0.647 mM ve v_{max} değerleri 13.87 U/mL, 13.01 U/mL olarak bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Glutaminaz, *Hypocrea jecorina*, *Trichoderma reesei*, enzim üretimi, L-glutamin.

ABSTRACT

GLUTAMINASE ENZYME PRODUCTION from *Hypocrea jecorina* PURE CULTURE ve *Trichoderma reesei* 1A MUTANT STRAIN

Dilara BÜLBÜL

Department of Chemistry

MSc. Thesis

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Emine KARAKUŞ

L-glutaminase (L-glutamine amidohydrolase EC 3.5.1.2) is the important enzyme that catalyze the deamination of L-glutamine to L-glutamic acid and ammonium ions. It has an important role in the nitrogen metabolism. Recently, L-glutaminase has received much attention with respect to its therapeutic and industrial applications. Beside it acts as potent antileukaemic agent and it shows flavorenhancing agent in the production of fermented foods, too.

Glutaminase activity is widely distributed in plants, animal tissues and microorganisms including bacteria, yeast and fungi.

It has aimed that microbial production of glutaminase enzyme from *Hypocrea jecorina* pure culture and *Trichoderma reesei* 1A mutant strain, determination of optimum conditions and calculation of kinetic parameters of these produced enzymes. As a result of work, it was determined optimum pH value as 8.0 and optimum temperature as 50°C for glutaminase enzyme produced both microorganism species. K_M and v_{max} values, the kinetic parameters of enzyme produced *Hypocrea jecorina* pure culture and *Trichoderma reesei* 1A mutant strain, were determined as 0.491 mM, 0.647 mM of K_M values and 13.87 U/mL, 13.01 U/mL of V_{max} values by plotted Lineweaver-Burk graphs, respectively.

In addition, thermal stability and storage stability of glutaminase enzymes produced from both microorganism species were determined as very high.

Key words: Glutaminase, *Hypocrea jecorina*, *Trichoderma reesei*, enzyme production, L-glutamine.

YILDIZ TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Glutaminaz, L-glutamini glutamik aside dönüştüren reaksiyonu katalizleyen önemli bir enzimdir. Glutaminaz aktivitesi geniş olarak bitkilerde, hayvansal dokularda ve bakteri, maya ve küfleri kapsayan mikroorganizmalarda gözlenmiştir. Mikrobiyal L-glutaminazın antitümör aktivite özelliği fark edildiğinden beri bu maddeye karşı ilgi ve önem artmıştır [1]. Mikrobiyal olarak L-glutaminaz üretimi literatürde *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma koningii*, *Beauveria* sp., *Zygosaccharomyces rouxii*, *Vibrio costicola*, *Lactobacillus reuteri*, *Pseudomonas acidovorans* ve *Pectobacterium carotovorum* gibi mikroorganizmalar kullanılmıştır.

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmada *Hypocrea jecorina* ve *Trichoderma reesei* mikroorganizmaları kullanılarak glutaminaz enziminin mikrobiyal olarak üretiminin gerçekleştirilmesi ve karakterizasyon çalışmaları yapılması amaçlanmıştır. Glutaminaz enziminin optimum çalışma koşullarını belirlemek amacıyla tampon konsantrasyonu, pH, sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Ayrıca enzimin K_M ve v_{max} değerleri hesaplanarak termal kararlılığı belirlenmiştir.

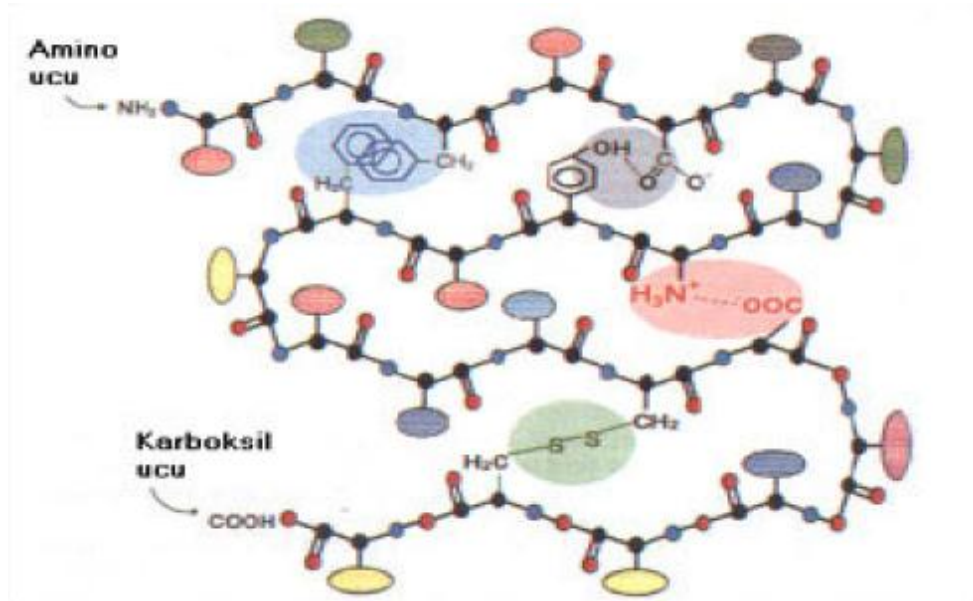
1.3 Hipotez

Hedeflediğimiz tüm çalışmalarımız amacına ulaşarak ürettiğimiz glutaminaz enziminin optimum koşulları belirlenmiş olup ileride glutamin tayini için biyosensör hazırlamada başarılı bir şekilde kullanılması için bir temel oluşturmaktadır. Çalışmalarımız glutamin biyosensörü hazırlama doğrultusunda devam edecektir. Literatürde *Hypocrea jecorina* ve *Trichoderma reesei* türlerinden glutaminaz enziminin üretimine rastlanmamış olması çalışmamızın özgün olduğunu göstermektedir.

ENZİMLER

2.1 Genel Bilgi

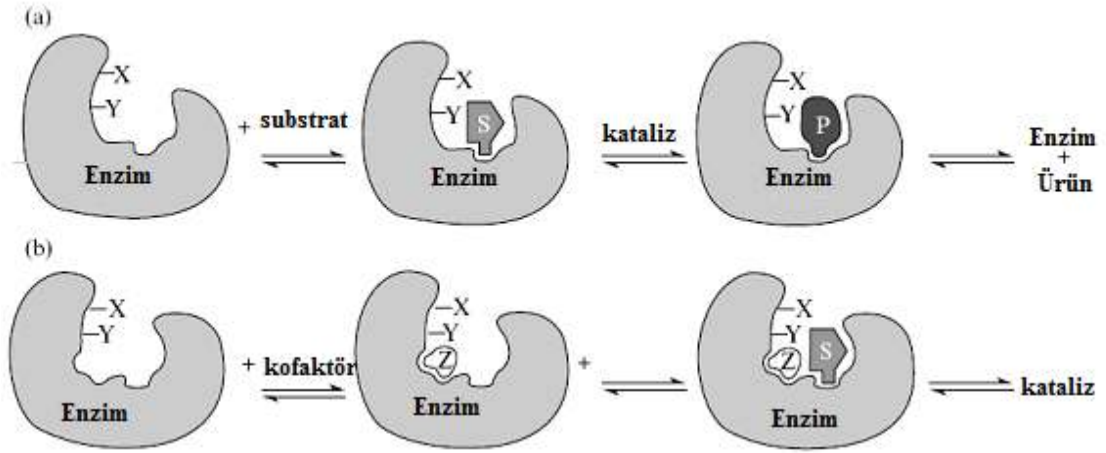
Proteinler aminoasitlerden oluşmuş makro moleküllerdir. Enzimler, büyüklükleri 20.000–100.000 Da arasında olan proteinlerdir [2]. Tüm diğer hücre içi proteinler gibi enzimler de DNA dizisindeki bilgilerin amino asit dizisine dönüştürülmesi ile sentezlenirler. Aminoasitler yapılarında karboksil grubu ($-\text{COOH}$), amino grubu ($-\text{NH}_2$) ve değişken bir R grubuna sahiptirler [3]. Bilinen 20 çeşit aminoasit vardır. Enzimlerin birbirinden farklı olmalarının nedeni aminoasit dizilimlerinin farklı olmasıdır (Şekil 2.1). Enzimin aminoasit dizilimi üç boyutlu yapısını ve hangi reaksiyonu katalizleyeceğini belirler [4].



Şekil 2.1 Enzimin yapısı [5]

Vücuttaki tüm reaksiyonlar, enzimler tarafından yürütülürler. Enzimler, kendileri değişmeden reaksiyonların hızını arttıran protein katalizörleridir. Enerji açısından mümkün olan bir çok biyolojik reaksiyon arasında enzimler reaktanları (substratlar) kullanışlı yollara seçili olarak kanalize ederler. Böylece enzimler bütün metabolik olayları yönlendirirler [6].

Kimyasal termodinamik, dengenin $\Delta G^0 = -RT \ln K$ eşitliğine göre bir kimyasal reaksiyonun serbest enerjisi ile bağlantılı olduğunu öğretir. Reaksiyonlar, denge konsantrasyonları ayarlanıncaya kadar devam ederler ki bu durumda serbest enerji $\Delta G = 0$ dır. Kataliz, serbest enerjide bir değişme olmayıp sonucu belirleyen adımın aktivasyon enerjisinin düşürülmesidir. Bu, enzimin, enzim-substrat kompleksine bağlanmış substrat ile etkileşmesi sayesinde oluşur [7]. Enzimlerin ayırıcı özelliklerinden biri de substrat seçiciliğidir. Her biri farklı bir substrata bağlanarak bu substratın ürüne dönüşmesine yardımcı olurlar. Şekil 2.2 enzimin substratına bağlanma şekillerini göstermektedir [4].



Şekil 2.2 Enzimin substratla bağlanma şekilleri: (a) Enzim-substrat (b) Enzim-substrat-kofaktör ilişkisi [2]

Bazen kofaktör bu bağlanmaya yardımcı olabilmektedir. Enzimle substratı arasındaki bağ kovalent değildir. Enzimin aktif merkezi substratın dış yüzeyinin aynadaki görüntüsü gibidir ve birbirlerini bütünürlükler. Dört çeşit enzim substrat ilişkisi vardır [4]:

- Elektrostatik ilişkiler
- Hidrojen bağları
- Polar olmayan (Van der Waals) bağlar
- Hidrofobik ilişkiler

Sadece canlılar tarafından sentezlenebilen enzimler hücre içindeki reaksiyonları düzenleme özelliklerinin yanı sıra hücre dışında da faaliyet gösterebilirler. Enzimler, protein yapısına bağlanabilen ancak kendisi protein yapıda olmayan organik ve anorganik moleküller de içerebilirler. Bu tarz kompleks yapılarda enzimin protein kısmı “apoenzim”, protein olmayan kısmı ise “koenzim” olarak adlandırılır. İkisinin oluşturduğu yapıya ise “haloenzim” denir [8]. Enzimlerin üç boyutlu yapısında yapılan çalışmalar göstermiştir ki enzimler katalitik aktiviteden sorumlu “aktif bölge” olarak adlandırılan bir bölgeye sahiptir. Bu bölge enzimin %10–%20’lik kısmını meydana getirir [2].

Günümüzde enzimler mikrobiyoloji, biyokimya, tıp, mühendislik, botanik, temizlik maddeleri ve tarım gibi birçok alanda kullanılmaktadır [9]. Enzimler atık suların bertarafında, iyileştirilmesinde, renk gideriminde, tekstil atık sularının arıtımında, aktif çamur sisteminde ve ipek endüstrisinde biyoaktif peptidlerin parçalanmasında gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır [10].

2.2 Enzimlerin İsimlendirilmesi

Her enzime iki isim verilmiştir. Birincisi günlük kullanım için olan, kısa, önerilen isimdir. İkincisi enzimin detaylı olarak tanımlanması gerektiğinde kullanılan, daha kapsamlı sistematik isimdir [6].

2.2.1 Önerilen İsim

En sık kullanılan enzim isimlerinde reaksiyonun substratına, örneğin, glukozidaz, üreaz, sükras, veya yapılan işin tanımına, örneğin, laktat dehidrogenaz ve adenilat siklaz, -az

eki getirilmiştir. (Not: Bazı enzimler, ilgili enzimatik reaksiyon hakkında hiçbir ipucu vermeyen orijinal, sıradan isimlerini korurlar, örneğin, tripsin ve pepsin) [6].

2.2.2 Sistematik İsim

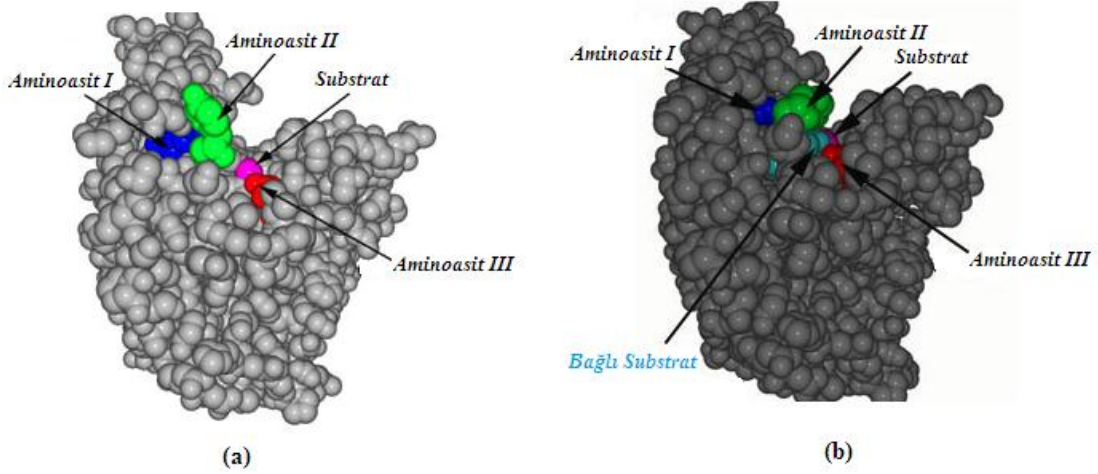
Uluslararası biyokimya ve moleküler biyoloji birliği (IUBMB) enzimlerin her birinin sayısız alt grup içeren altı ana sınıfa bölündüğü bir isimlendirme sistemi geliştirmiştir [6]. Her enzime sistematik kod numarası verilmiştir. Bu numara EC harflerinden sonra art arda gelen dört rakamdan meydana gelir. EC numarasını oluşturan dört rakamdan ilk rakam enzimin bağlı olduğu sınıfı gösterirken, ikinci rakam alt sınıfı, üçüncü rakam alt-alt sınıfı ve dördüncü ise alt-alt sınıftaki seri numarasını gösterir. Enzim sınıfları ve reaksiyon tipleri Çizelge 2.1’de verilmiştir [9], [11].

Çizelge 2.1 Enzim sınıfları [7]

Enzim Sınıfları	Reaksiyon Tipi
Oksidoredüktazlar	İndirgenme-yükseltgenme reaksiyonları
Transferazlar	Fonksiyonel grupların transferleri
Hidrolazlar	Hidroliz reaksiyonları
Liyazlar	Çift bağlara ekleme
İzomerazlar	İzomerizasyon reaksiyonları
Ligazlar	ATP bölünmesiyle bağ oluşumu

2.3 Enzimlerin Aktif Bölgeleri

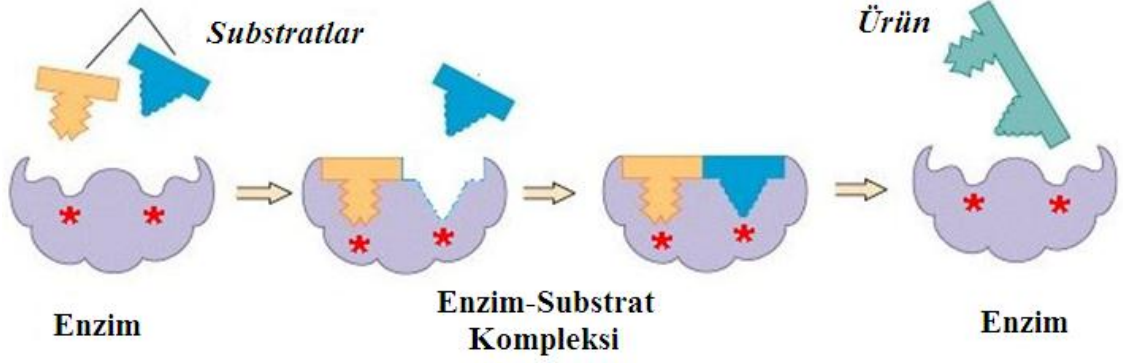
Bir enzimin aktif bölgesi, substratları (varsa kofaktörleri) bağlayan ve bağ yapım ile yıkımında görev yapan rezidüleri kapsar. Bunlara katalitik grup adı da verilir [11]. Aktif bölge substrata komplementer olan üç boyutlu bir yüzey yaratan aminoasit yan zincirleri içerir. Aktif bölge substratı bağlayarak bir enzim-substrat (ES) kompleksi meydana getirir (Şekil 2.3). ES, sonradan enzim ve ürüne parçalanarak enzim-ürün (EP)’e dönüşür [6].



Şekil 2.3 Enzimlerin aktif bölgesi: (a) Substrata komplementer üç boyutlu bir yüzey meydana getiren aminoasit yan zincirleri, (b) Enzim-substrat (ES) kompleksi [12]

1. Aktif bölge, enzimin toplam hacmine oranla küçük bir kısmını oluşturur.
2. Aktif bölge, enzimin lineer yapısının değişik noktalarında bulunan grupların bir araya gelerek oluşturdukları üç boyutlu karmaşık bir bölgedir [11].
3. Substratlar enzimlere nispeten zayıf kuvvetle bağlanır. ES komplekslerinin denge sabitleri 10^{-2} – 10^{-8} M arasında değişir. Bu da 3 ile 12 kcal/mol arasında değişen bağ enerjilerine karşılık gelir. Halbuki kovalent bağların kuvveti 50 ile 110 kcal/mol arasındadır [11]. Bazı durumlarda ise enzim proteinindeki reaksiyon iki adımda gerçekleşir. Bir reaksiyon ortağı (veya molekülün bir kısmı) önce ana valense göre protein bağlanır ve ancak ikinci adımdan sonra ara bileşikten ürün oluşumu gerçekleşir [7].
4. Aktif bölgeler bir yarık veya girinti içinde yer alırlar. Girinti içinde, bağlanma ve kataliz için gerekli polar gruplar vardır. Girintinin apolar karakteri substratın bağlanma gücünü de artırır [11].
5. Spesifik bir bağlanma, atomların aktif bölgede belirli tarzda düzenlenmeleri sonucu mümkün olur. Substrat bu bölgeye tam oturabilecek şekle sahip olmalıdır. Enzimle substrat arasındaki bu anahtar-kilit modeli kataliz olayının stereospesifikliğini açıklamaktadır. Bununla birlikte, son zamanlarda yapılan çalışmalar bazı enzimlerin aktif bölgelerinin rijid bir yapıda olmadığını göstermiştir. Bu tip enzimlerde aktif bölgenin şekli substratın bağlanmasıyla

değişikliğe uğramaktadır. Bölge yalnız bağlanmadan sonar substrata komplementer hale gelmektedir. Bu ikinci çeşit bağlanma modeline *etkileşme sonucu uygunluk modeli (induced fit)* (Şekil 2.4) adı verilir [11].



Şekil 2.4 Etkileşme sonucu uygunluk modeli (*induced fit*) [13]

2.4 Enzim Aktivitesi Tayini

Bir çözelti veya doku ekstraktı içindeki enzim miktarı, enzimin katalitik aktivitesinden faydalanarak bulunur. Bu iş için enzim hakkında şu bilgiler gerekmektedir [11]:

1. Katalizlenen reaksiyon denkleminin net stokiyometrisi,
2. Enzimin kofaktör veya metal iyonuna ihtiyacının olup olmadığı,
3. Substrat ve varsa kofaktörü için K_M değerleri,
4. Optimum pH'sı,
5. Enzimin kararlı ve aktivitesinin yüksek olduğu sıcaklık aralığı,
6. Substratın kayboluş veya ürünün oluşum hızlarının tespit edilebildiği basit bir analitik metod.

Bir çözelti içindeki enzim aktivitesi “enzim ünitesi” cinsinden verilir. 25°C’da ve optimal şartlarda 1 μmol (10^{-6} mol) substratı bir dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarına “enzim ünitesi” denir ve EU veya U şeklinde gösterilir [11].

Uluslararası ölçü sistemine göre zaman birimi “saniye”, madde miktarı birimi “mol” olduğundan bu sistemde enzim aktivite birimi kataldır. 1 katal enzim, belirli şartlar altında saniyede bir mol madde dönüşümüne sebep olur [11].

Bazı enzimler için özel ünite tanımları da vardır. “Spesifik aktivite” (özellik aktivite) terimi de mg protein başına düşen enzim ünitesi (U/mg protein) olarak tarif edilir. Bu, enzim saflığının bir ölçüsüdür ve enzim izolasyonu esnasındaki basamaklarda maksimum ve sabit bir değere ulaşır. Böylece enzimin saf halde elde edildiği anlaşılır [11].

Birim zamanda bir enzim molekülü tarafından dönüşüme uğratılan substrat moleküllerinin sayısını veya aynı şey olan μmol enzim başına μmol substrat sayısını, yani molar aktiviteye turnover sayısı denir. Turnover sayısının hesaplanması için yalnız enzim aktivitesi değil, bağıl molekül kütlesi de bilinmelidir. Yüksek bir turnover sayısı katalizlenen reaksiyonun çok hızlı yürüdüğü anlamındadır [7].

2.5 Enzim Aktivitesi Üzerine Etki Eden Faktörler

2.5.1 Substrat Konsantrasyonu

Substrat konsantrasyonda yapılan artırma reaksiyon hızını artırır. Bunun nedeni, enzim moleküllerinin daha fazla substrat molekülleri ile çarpışarak reaksiyon yönünü ürünlere doğru ilerletmesidir [14]. Fakat bir noktadan sonra substrat konsantrasyonu ne kadar artarsa artsın hızın sabit kaldığı gözlenir. Bunun nedeni bütün enzimlerin dolu olması ve çalışmasıdır. Buna “maksimum hız (v_{max})” denir [4].

2.5.2 Enzim Miktarı

Enzimle katalizlenen reaksiyonlarda substrat konsantrasyonu yüksek miktarda ise, reaksiyonun başlangıç hızı (v_o), enzim konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak artarken reaksiyon hızı belli bir düzeye vardığında ise azalır [15].

2.5.3 pH Etkisi

Her enzim için aktivitelerin maksimum olduğu pH değerleri vardır. Bu değerlerin üzerinde ve altında aktivite düşer. Bununla birlikte bütün enzimlerin pH-aktivite eğrileri aynı şekilde değildir. Bir enzimin pH-aktivite ilişkisinde etkili olan faktörler [11]:

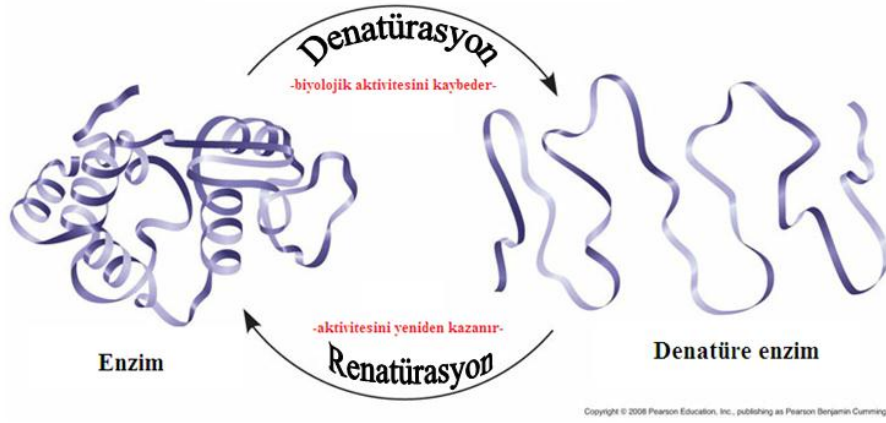
1. Substratı bağlamada görev alan ve enzimin aktif bölgesinde bulunan iyonlaşabilir grupların $pK'sı$,
2. Enzime bağlanma olayında görev gören substrat gruplarının $pK'sı$,
3. Enzim üzerindeki katalitik göreve sahip grupların $pK'sı$,
4. Enzimin biyolojik olarak aktif konformasyonunu belirleyen grupların $pK'sı$.

pH-aktivite eğrileri, her bir pH için substratla doyurulmuş enzim çözeltileri ile yapılan deneyler sonucu elde edilir. Çünkü bir çok enzimin K_M sabiti pH ile değişir [11].

Bir enzimin optimum pH'sı normal hücre içi ortamı pH'sı ile aynı değildir. Bu durum hücre içindeki enzim aktivitesinin kontrolünde, pH-aktivite ilişkisinin önemini göstermektedir [11].

2.5.4 Sıcaklık Etkisi

Sıcaklıktaki artış kimyasal reaksiyonlara katılan moleküllerin kinetik enerjilerinin artmasına ve reaksiyon hızının belli oranda yükselmesine yol açar. Enzimlerin katalizlediği reaksiyonlar da kimyasal reaksiyonlara benzer özellikler gösterir [4]. Isının daha da arttırılması sonucunda enzimin üç boyutlu yapısı bozularak denatürasyona bağlı olarak reaksiyon hızında bir azalma meydana gelir [4], [6]. Şekil 2.5'de bir enzimin denatürasyona uğramadan önceki ve sonraki yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.5 Enzim denatürasyon ve renatürasyonu [16]

Enzim yapısındaki bozulmalar aktif merkezin konfigürasyonunu değiştirir ve enzimin katalitik özelliği kaybolur. Reaksiyon hızı optimum sıcaklığa ulaşıncaya kadar artar, optimum sıcaklıkta en yüksek seviyeye ulaşır [17].

2.5.5 Kofaktör Konsantrasyonu

Bazı enzimler, enzimatik reaksiyon için gerekli olan bir nonprotein kofaktörle birleşirler. Sıklıkla karşılaşılan kofaktörler arasında metal iyonlar (Zn^{2+} , Fe^{2+}) ve koenzim olarak bilinen, genellikle vitamin türevi olan (NAD^+ , FAD, koenzim A) organik moleküller yer alır. Holoenzim, kofaktörüyle birlikte enzimi ifade eder. Apoenzim, holoenzimin protein kısmını ifade eder. Uygun kofaktör yoksa, apoenzim biyolojik aktivite gösteremez. Prostetik grup enzimden ayrılamayan sıkıca bağlı bir koenzimdir [6].

2.6 Enzim Kinetiği

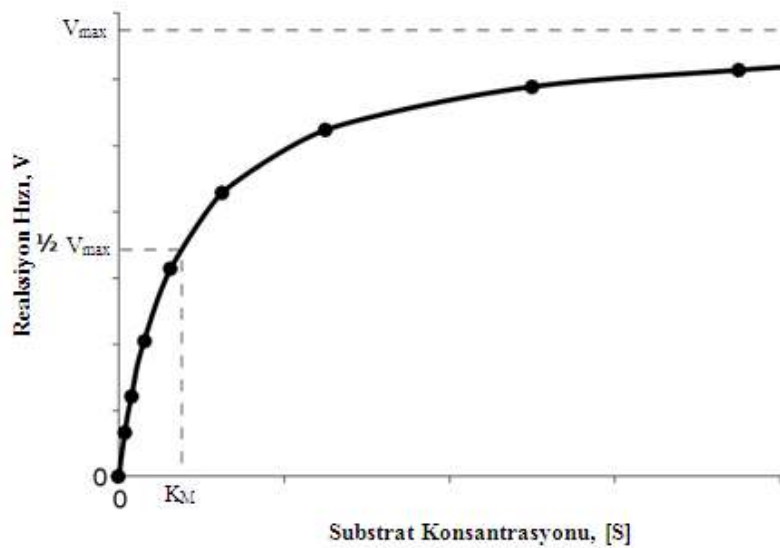
2.6.1 Michaelis-Menten Eşitliği

Enzim kinetiği, enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonların hızlarının incelendiği bir konudur. Kimyasal kinetiğin temel prensipleri burada da geçerlidir. Gerçi kimyasal kinetik, reaksiyon hızlarının kantitatif incelenmesini kapsamalarının yanı sıra reaksiyonların mekanizmalarıyla da ilgilenir. Fakat, burada enzim kinetiği başlığı

altında daha çok biyokimyasal reaksiyonların hızları kantitatif olarak incelenerek ve buna etki eden faktörleri de ele alınacaktır [11].

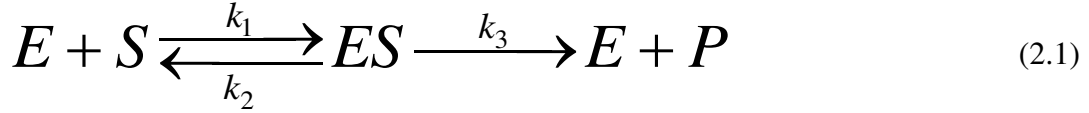
Kimyasal reaksiyonların kinetiği ile ilgili genel prensiplerin enzimli reaksiyonlarda da uygulanır. Bununla beraber bu reaksiyonlarda bazı farklı özellikler vardır. Bunların en önemlisi enzimlerin substratlarına doyma olayıdır. Düşük substrat konsantrasyonunda, reaksiyon hızı substrat konsantrasyonuyla orantılı olarak artar, yani reaksiyon substrata göre birinci mertebededir. Substrat konsantrasyonu artırıldığında zaman, reaksiyon hızı artışında bir azalma gözlenir ve bu bölümde reaksiyon sıfıncı ile birinci mertebeler arasında karışık bir mertebeye sahip olur. Substrat daha da artırıldığında hız sabitleşir ve substrat konsantrasyonuyla değişmez. Bu bölümde reaksiyon sıfıncı mertebededir ve bütün enzim molekülleri substratla birleşmiş, yani doymuş haldedir. Bütün enzimler sözü edilen doymuluk özelliğini gösterirler. Ancak, her birisinin bu hale erişebilmeleri farklı substrat konsantrasyonlarında mümkün olur [11].

Enzimlerin biyolojik katalizörleri olduğunu biliyoruz. Kimyasal katalizörlerin reaktantlarla daha düşük enerjili geçiş kompleksleri oluşturduğunu biliyoruz. Enzimler de substratlarıyla ve bazen de koenzimleriyle kompleksler oluşturur (ES ile gösterilir). Doymuluk durumunda ortamdaki bütün enzim ES halindedir, yani $[E_T]=[ES]$ 'dir [11].



Şekil 2.6 Enzimatik reaksiyonun hızına substrat konsantrasyonunun etkisi [18]

1913 yılında Leonor Michaelis ve Maud Menten, enzimli reaksiyonların ilk basamağında bir ES oluşmasından ve enzimlerin doygunluk özelliğinden yola çıkarak, Şekil 2.6'daki grafiği verecek bir model geliştirdiler. Bu model bir çok enzimin kinetik özelliğini açıklamada başarılı olmuştur. Michaelis ve Menten, enzimli bir reaksiyonu Eşitlik 2.1'de verilen denklemle gösterdiler.



Buna göre; enzim (E) ve substratı (S) k_1 hız sabiti ile ES; enzim-substrat kompleksini oluşturmaktadır. ES kompleksinin iki yolu vardır: Ya k_2 hız sabiti ile tekrar E ve S'ye ayrışacak veya k_3 hız sabiti ile ürüne (P) dönüştürecektir. Burada ürünün tekrar ES kompleksine dönüşmeyeceği farz edilmektedir. Ürün konsantrasyonunun ihmal edilebilecek seviyede olduğu başlangıç durumunda, bu varsayım tamamen doğrudur. Yukarıdaki reaksiyonda ürünün oluşum hızı Eşitlik 2.2'de verilmektedir.

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_3[ES] \quad (2.2)$$

Burada ES terimini enzim ve substrat konsantrasyonları gibi bilinen değerler cinsinden göstermemiz gerekmektedir. ES'nin oluşma ve parçalanma hızları Eşitlik 2.3 ve 2.4'te verilmektedir.

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] \quad (2.3)$$

$$-\frac{d[ES]}{dt} = k_2[ES] + k_3[ES] \quad (2.4)$$

ES kompleksi konsantrasyonunun reaksiyon boyunca nisbeten sabit kaldığı, yapılan spektroskopik çalışmalarda bulunmuştur. Bu da ES kompleksi oluşma hızının parçalanma hızına eşit olmasıyla mümkündür. Böylece Eşitlik 2.5 elde edilir.

$$\frac{d[ES]}{dt} = -\frac{d[ES]}{dt} \quad (2.5)$$

$$k_1[E][S] = (k_2 + k_3)[ES] + [ES]$$

Buradan [ES] çekilip bir düzenleme yapılırsa Eşitlik 2.6 elde edilir.

$$[ES] = \frac{[E][S]}{(k_2 + k_3)/k_1} \quad (2.6)$$

Bu eşitlikteki sabitleri tek bir terimde toplamak için $(k_2+k_3)/k_1=K_M$ yazarız. Burada K_M 'ye Michaelis sabiti adı verilir. Bu sabit yerine konduğu zaman Eşitlik 2.7 elde edilir.

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_M} \quad (2.7)$$

Eşitlik 2.7'de pay'da bulunan [E] ve [S] terimleri incelenirse burada herhangi bir andaki S konsantrasyonunu başlangıçtaki ile aynı alabiliriz. Çünkü enzim konsantrasyonu substrat konsantrasyonundan pek çok defa küçük olduğundan reaksiyon boyunca S konsantrasyonunun değişmediğini kabul ederiz. Fakat serbest haldeki enzim konsantrasyonu ([E]), toplam enzim konsantrasyonu ($[E_T]$) ile [ES] arasındaki farka eşittir (Eşitlik 2.8).

$$[E] = [E_T] - [ES] \quad (2.8)$$

Bu ifadeyi Eşitlik 2.7'de [E]'nin yerine koyarsak Eşitlik 2.9 elde edilir.

$$[ES] = \frac{([E_T] - [ES])[S]}{K_M} \quad (2.9)$$

Eşitlik 2.9'u [ES] için çözdüğümüzde Eşitlik 2.10 elde edilir.

$$[ES] = [E_T] \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (2.10)$$

$v = k_3[ES]$ denkleminde [ES] yerine Eşitlik 2.10'da elde edilen denklem konursa Eşitlik 2.11 elde edilir.

$$v = k_3[E_T] \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (2.11)$$

$[E_T]=[ES]$ doygunluk halinde reaksiyon maksimum hızla yürür. Öyleyse $v_{\max} = k_3[E_T]$ olacaktır. Elde edilen bu denklem Eşitlik 2.11’de yerine koyulursa Eşitlik 2.12 elde edilir.

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{[S] + K_M} \quad (2.12)$$

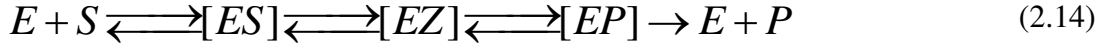
Bu eşitliğe Michaelis-Menten denklemi adı verilir ve Şekil 2.6’daki eğrinin kinetik özelliklerini ifade eder. Düşük substrat konsantrasyonlarında $K_M \gg [S]$ olacağından $[S]$ ihmal edilir ve denklem düzenlenir (Eşitlik 2.13).

$$v = \frac{v_{\max}}{K_M} [S] \quad (2.13)$$

Şekil 2.6’daki eğrinin başlangıç kısmı Eşitlik 2.12’deki v - $[S]$ ilişkisini göstermektedir. $[S] \gg K_M$ olduğu yüksek substrat konsantrasyonunda Eşitlik 2.12’deki K_M ihmal edilir ve $v = v_{\max}$ olur. Burada bütün enzim substratla doymuş ve artan $[S]$ ile hız değişmeyen bir sabit maksimum hıza ulaşmıştır.

Hızın $v_{\max} / 2$ olduğu durumda, değerleri Michaelis-Menten eşitliğinde (Eşitlik 2.12) yerine koyarsak, $K_M = [S]$ sonucunu elde ederiz. Buradan K_M sabitinin tanımını, “maksimum hızın yarısına erişildiği andaki substrat konsantrasyonu” olarak açıklayabiliriz. Birimi de mol/L’dir.

Michaelis-Menten denklemi, enzimatik etkinin kantitatif incelenmesinde, bütün enzimler için temel bir fikirdir. Fakat bir çok enzim, bu eşitliğin çıkarılması esnasında Kabul edilen ideal şartlara uymayabilir. Mesela birden fazla enzim-substrat kompleksinden sonra ürün oluşabilir. Yani reaksiyon Eşitlik 2.14’teki gibi tek basamakta değil, birden çok basamaklar halinde gerçekleşir.



Bunun dışında bazı reaksiyonlarda iki veya daha fazla sayıda substrat olabilir. Böyle bir durumda ES_1 , ES_2 ve ES_1S_2 gibi üç ayrı enzim-substrat kompleksi oluşabilir. Bu tip enzim reaksiyonlarının kinetik analizi çok karmaşıktır ve çözümleri bilgisayarlar aracılığıyla yapılır. Bununla birlikte bütün enzimlerin kinetiğinin analizinde başlangıçtaki Michaelis-Menten eşitliğinden faydalanılır (Eşitlik 2.1) [11].

2.6.2 K_M ve $v_{\max}$ Değerlerinin Önemi

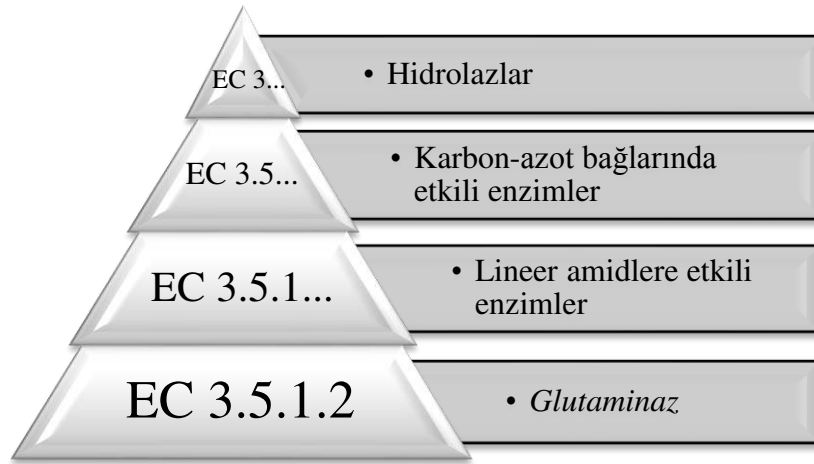
Enzimlerin K_M değerleri birbirlerine göre farklılık gösterir. Bir çok enzim için bu değer 10^{-1} ile 10^{-6} M arasındadır. K_M değeri enzim konsantrasyonuna bağlı değildir. Substratın yapısı, pH, sıcaklık ve iyonik şiddetle değişebilir. Birden fazla substrata sahip enzimlerde, her substrat için ayrı bir K_M değeri vardır [11].

K_M değerinin iki anlamı vardır. Birincisi K_M , enzimin aktif bölgelerinin yarısının dolduğu substrat konsantrasyonudur. İkincisi, K_M değerinin hız sabitleriyle $K_M = (k_2 + k_3) / k_1$ şeklinde eşitliği bulunmaktadır. Bu eşitlikten faydalanarak anlaşılmaktadır ki K_M değeri, enzimin substratına olan ilgisinin bir ölçütüdür. Yüksek K_M zayıf bağlanmayı, düşük K_M kuvvetli bağlanmayı ifade eder [11].

Enzimlerin $v_{\max}$ değerleri de birbirlerinden çok farklıdır. Aynı zamanda substratın yapısı, pH, sıcaklık ve iyonik şiddetle de değişirler. $v_{\max}$ enzimin katalitik aktivitesinin bir ifadesidir. Çünkü $v_{\max} = k_3[E_T]$ ile verilen maksimum hıza belirli konsantrasyondaki enzimin substratıyla doygunluk durumunda erişilir. Doygunluğun çok üzerindeki substrat konsantrasyonlarında hız, enzim miktarıyla doğru orantılıdır [11].

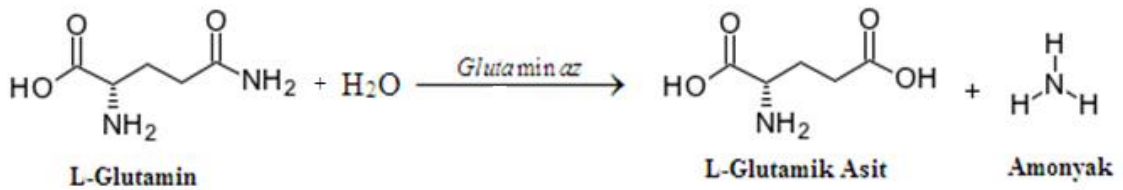
2.7 Glutaminaz Enzimi

Sistematik olarak glutamin aminohidrolaz olarak isimlendirilen enzimin diğer isimlendirme şekilleri de glutaminaz, glutaminaz I ve L-glutaminaz'dır [19], [20], [21]. Glutaminaz enzimi, serin bağımlı beta-laktamaz ve penisilin bağlayıcı proteinler ailesine aittir [22]. Glutaminaz, katalizlediği kimyasal reaksiyona bağlı olarak enzim numaralandırma sistemine göre ise EC 3.5.1.2 şeklinde isimlendirilir. Şekil 2.7'de glutaminazın ait olduğu enzim sınıfı şematize edilmiştir.



Şekil 2.7 Glutaminaz enziminin dahil olduğu enzim sınıfı [23]

Bu enzim hidroliz yoluyla L-glutaminden, L-glutamik asit ve NH_3 oluşumunun katalizinden sorumludur (Şekil 2.8) [24].



Şekil 2.8 L-glutaminaz enziminin katalizlediği reaksiyon [25]

Enzim, katalizlediği reaksiyon sonucu açığa çıkan glutamik asitten dolayı gıdalarda tat artırıcı özelliğe sahiptir bundan dolayı gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılır. Bunun yanında ilaç sektöründe de yaygın kullanım alanına sahiptir. Enzimin

antilösemik ajan olarak görev yapması ile önemi artmıştır. Bunun yanında glutaminaz B intraselüler glutamin havuzunun düzenlenmesinde de görev almaktadır [26], [27], [28], [29].

L-glutaminaz fermente gıdalarda glutamik asit içeriğinin artmasına sebep olur bu da gıdalarda lezzet artışını sağlar. L-glutaminaz glutamik asit sentezinde aktivite gösteren bir enzimdir bu da Shoyu Koji¹'nin enzimik sindiriminde önemli bir katkı maddesidir. Çin yemeklerinde tat artırıcı olarak kullanılan mono sodyum glutamatın (MSG; glutamik asidin endüstriyel kullanım formu) yerini L-glutaminaz almıştır. Bunun en büyük nedeni bazı insanların glutamata karşı alerjik fonksiyon göstermesidir [1]. Mono sodyum glutamat bazı insanlarda hırıltı, kalp atış hızında değişimler ve nefes alma zorluğu gibi negatif etkilere sebep olduğuna dair tartışmalar bulunmaktadır [30].

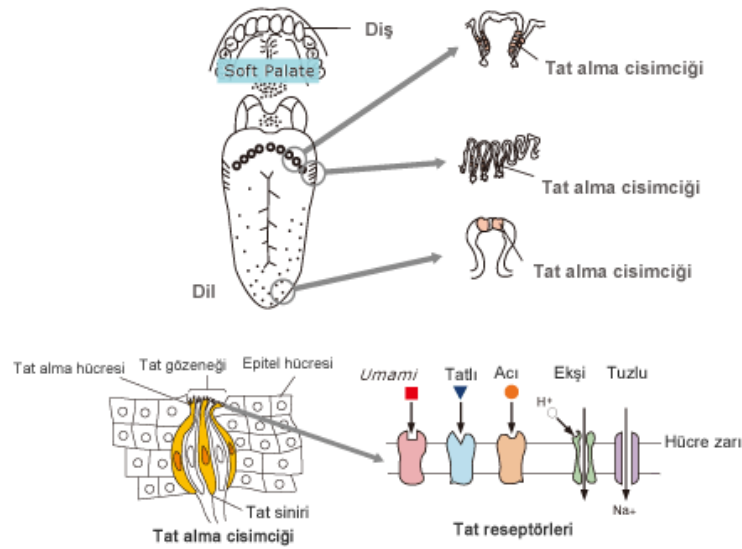
Glutaminaz genellikle soya sosu gibi fermente gıdalarda lezzetli tadı denetleyen önemli bir enzim olarak kabul edilmektedir. Soya sosu yapımında lezzetli bir tat elde edebilmek için glutamik asit düzeyinin yüksek olması önemlidir. Gıdalarda ortamın glutamik asit konsantrasyonunu artırarak tat verici özelliğinden dolayı gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılır. Bu benzersiz tat “umami” adı ile adlandırılmaktadır [1], [31], [32].

Dilimiz beş temel tadı birbirinden ayırt edebilir. Bunlar, tatlı, tuzlu, acı, ekşi ve umamidir (Şekil 2.9) [33]. Temel tat, öteki tatların kombinasyonuyla oluşturulamayacak, bağımsız bir tattır. Temel tatlardan umami, 1908'de Dr. Kikunae Ikeda tarafından keşfedilmiştir. Kendisi *kombu dashi* (esmer su yosunu varek özü) tadına odaklanmış ve tat bileşeninin glutamat olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu tada "umami" adını vermiştir [34]. Umami, Japonya'da yüzyıllardır bilinen bir tattır; ancak araştırmacılar, dildeki umami tat alıcılarını yeni keşfettiler (Şekil 2.10). Özellikle, glutamat içeren besinlerden umami duyumu alıyoruz. Bu tadı, balık, et ürünleri, peynir, domates, bezelye, mısır gibi besinlerde buluruz [31], [33].

¹ Shoyu; soya fasulyesi, kavrulmuş buğday, deniz tuzu ve kojiden (*Aspergillus oryzae*) yapılmış, soya sosu için kullanılan Japonca bir kelimedir. Nemli ortamda fermente olup gelişen sporlar benzersiz bir enzim üretirler. Bu yöntemle soya sosu üretimi Japonya'da 1600'lü yıllardan beri uygulanan bir yöntemdir [35].



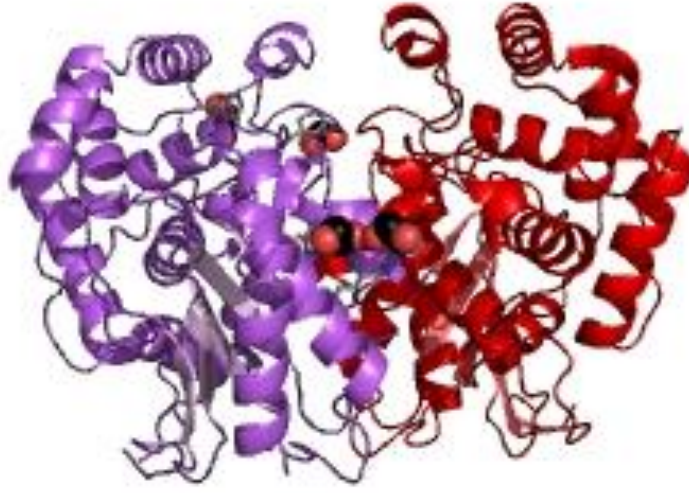
Şekil 2.9 Dilimizin ayırt ettiği tatlar [36]



Şekil 2.10 Dildeki tat alıcıları [34]

Glutaminaz enziminin endüstriyel uygulamasının yanı sıra terapötik kullanım alanı da bulunmaktadır. Bu enzim kuvvetli antilösemik ajan özelliği ile sağlık alanında kullanımı söz konusudur [1]. Klinik alanda yapılan çalışmalarda fosfat-aktive edilmiş glutaminaz enizminin antineoplastik² özellik gösterdiği rapor edilmiştir [30].

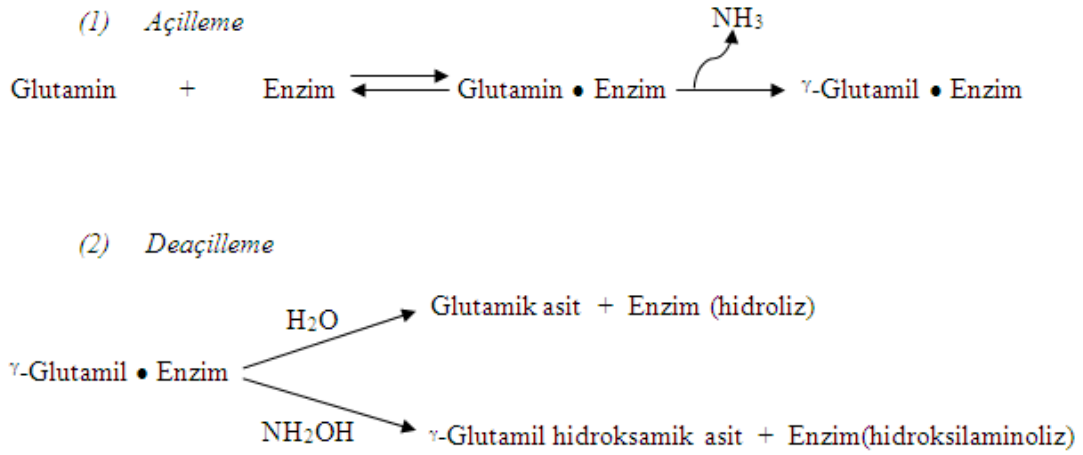
² Tümör hücrelerinin gelişimini önleyen.



Şekil 2.11 Glutaminaz enziminin yapısı [23]

Memeli hücrelerden L-glutaminaz enzimi cDNA'sı izole edilerek dizi analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.11) [29]. İnsanlarda glutaminaz enziminin iki izoformu bulunmaktadır. Bunlardan biri kromozom 2'de lokalize olmuş böbrek tipi “K-tipi” glutaminaz (KGA), diğeri kromozom 12'de lokalize olmuş karaciğer tipi “L-tipi” izozimidir (LGA) [37], [38]. LGA, karaciğere bağlı olmayan bölgelerin dağılımında görev alır. Böbrek tipi glutaminazın en aktif olduğu kısımlar; böbrek, doğal ve sonradan kazanılmış bağışıklık sistemlerinde hızla bölünen hücreler ve ince barsağın villus enterositleridir [37].

Glutaminaz enzimi barsağın ana solunum yakıtı olan amonyum ve glutamat ürünlerini oluşturur. Glutaminaz enzimi barsak metabolizmasının merkezinde görev alan enzimdir: Glutaminaz enziminin katalizlediği reaksiyon sayesinde amino gruplarının nakli kolaylaşır. Enerji verimine yönelik ya da pirimidin nükleotidlerin biyosentezinde de görev alır. Yapılan çalışmalarda barsakta glutamin yokluğunda körelmeler (atrofi) meydana geldiği gözlenmiştir [37].



Şekil 2.12 Glutaminaz enziminin katalizlediği reaksiyonun mekanizması [26]

Glutaminaz aktivitesi geniş olarak bitkilerde, hayvansal dokularda ve bakteri, maya ve küfleri kapsayan mikroorganizmalarda gözlenmiştir. Mikrobiyal L-glutaminazın antitümör aktivite özelliği fark edildiğinden beri bu maddeye karşı ilgi ve önemi artmıştır [1].

Glutaminaz enzimi fonksiyonlarının önemini özetlemek gerekirse, L-glutaminaz enzimi antiretroviral³ ajan olarak, γ -glutamil transfer reaksiyonları ile theanine gibi bazı özel kimyasalların sentezinde, L-glutamin miktarının tayini için biyosensör uygulamalarında ve gıda endüstrisinde tat ve aroma artırıcı olarak geniş kullanım alanına sahiptir [28], [39]. Glutaminaz enziminin literatürde farklı mikroorganizma türlerinden üretimi gerçekleştirilmiştir. Bunlardan bazıları Çizelge 2.2’de sunulmuştur.

³ HIV virüsünün vücutta çoğalmasını ve etkinleşmesini engelleyen, tedavi eden.

Çizelge 2.2 Glutaminaz üretiminde kullanılan mikroorganizmalar

Mikroorganizma	Ref	Mikroorganizma	Ref
Bakteriler		Fungi	
<i>Azotobacter agilis</i>	[40]	<i>Aspergillus flavus</i>	[48]
<i>Bacillus flavum</i>	[40]	<i>Aspergillus nidulans</i>	[49]
<i>Bacillus subtilise</i>	[41]	<i>Aspergillus oryzae</i>	[50]
<i>Lactobacillus reuteri</i>	[30], [42]	<i>Aspergillus sp.</i>	[24]
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	[31]	<i>Beauveria bassiana</i>	[51], [52]
<i>Pseudomonas sp</i>	[43]	<i>Beauveria sp.</i>	[27]
<i>Rhizobium etli</i>	[44]	<i>Debaryomyces spp.</i>	[53], [54]
<i>Micrococcus luteus</i>	[45]	<i>Trichoderma koningii</i>	[28]
<i>Micrococcus glutamicus</i>	[40]	<i>Tilachlidum humicola</i>	[26]
<i>Vibrio costicola</i>	[46]	<i>Verticillium malthousei</i>	[40]
<i>Vibrio sp.</i>	[47]	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	[1], [39]

Kashyap ve arkadaşları (2002), *Zygosaccharomyces rouxii* mikroorganizmasını kullanarak katı ortam fermantasyonu metodu ile L-glutaminaz enzimi üretmişlerdir. Bu doğrultuda; agro-endüstriyel kaynakların (*buğday kepeği, susam yağı vb.*), eklenen substratların nem içeriklerinin (%37.5–%75), aşılana mikroorganizma konsantrasyonunun (0.5–3mL), karbon kaynaklarının (*glukoz, sukroz, maltoz, laktoz, mannitol vb.*), azot kaynaklarının (*NaNO₃, NH₄Cl, Malt ekstrakt, Pepton vb.*), L-glutamin konsantrasyonunun (%0.25–%3) ve inkübasyon sıcaklıklarının (25°C–50°C) enzim üretimine etkilerini çalışmıştır. Yaptıkları çalışmalar sonucu elde edilen optimum değerler şöyledir: agro-endüstriyel kaynak içeriği %64, karbon kaynağı olarak glukoz ve maltoz, optimum sıcaklık 30°C olarak bulunmuştur [1].

Prasanth Kumar ve arkadaşları (2009), halofilik *Aspergillus sp.* mikroorganizmasını kullanarak ekstraselüler L-glutaminaz enzimini üretmişlerdir. Bu doğrultuda; aşılana mikroorganizma konsantrasyonunun (0.5–3mL), karbon kaynaklarının (*glukoz, maltoz, laktoz, galaktoz vb.*), azot kaynaklarının (*NaNO₃, Malt ekstrakt, Pepton vb.*), L-glutamin konsantrasyonunun (%0.5–%3.5) ve inkübasyon sıcaklıklarının (26°C–36°C) enzim üretimine etkilerini çalışmıştır. Çalışma sonucu elde ettikleri optimum değerler şöyledir: Optimum inkübasyon sıcaklığı 28°C, optimum pH değeri 6.0, karbon kaynağı olarak laktoz olarak bulmuşlardır. Bunun yanında azot kaynağının halofilik *Aspergillus sp.*

kullanılarak L-glutaminaz enzimi üretimine negatif etkisi olduğu da yine çalışmalarında yer almaktadır [24].

Sabu ve arkadaşları (2000), *Beauveria* sp. mikroorganizmasını kullanarak katı ortam fermantasyonu metodu ile L-glutaminaz enzimi üretmişlerdir. Çalışma sonucu elde ettikleri optimum değerler şöyledir: Optimum sıcaklık 27°C, optimum pH değerleri 6.0 ve 9.0 ve karbon kaynağı olarak glukozdur [27].

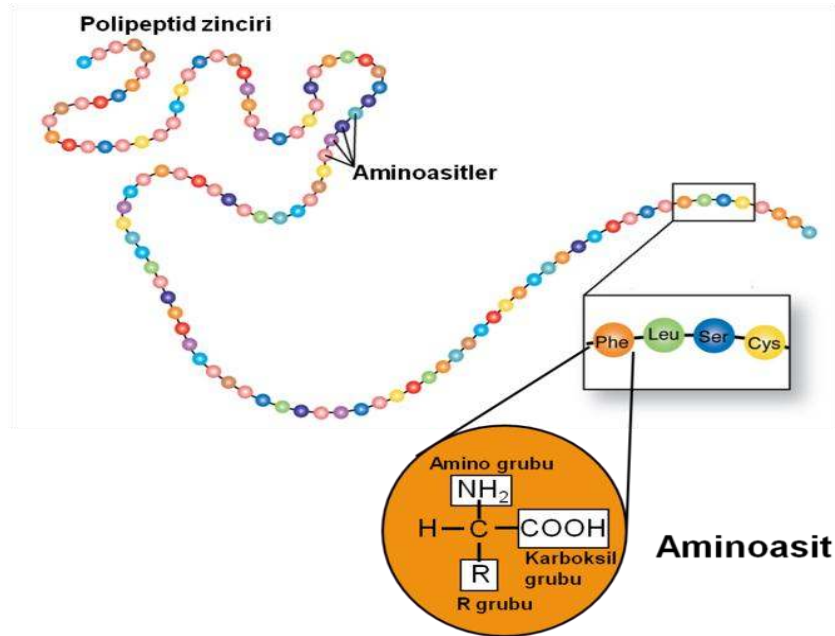
El Sayed (2009), *Trichoderma koningii* mikroorganizmasını kullanarak katı ortam fermantasyonu metodu ile L-glutaminaz enzimi üretmiştir. Bu doğrultuda; agro-endüstriyel kaynakların (*buğday kepeği, susam yağı vb.*), eklenen substratların nem içeriklerinin (%20–%90), aşılana mikroorganizma konsantrasyonunun (0.2–5mL), karbon kaynaklarının (*glukoz, arabinoz, mannitol fruktoz vb.*), pH değerlerinin (pH 3.0–11.0), azot kaynaklarının (*NaNO₃, NH₄Cl, Kazein, Pepton vb.*) ve inkübasyon sıcaklıklarının (15–50 °C) enzim üretimine etkilerini çalışmıştır. Yaptığı çalışmalar sonucu %70 başlangıç nem içeriğine sahip buğday kepeği varlığında, pH değeri 7.0, karbon kaynağı olarak %1 D-Glukoz ve %2 L-glutamin varlığında aşılana mikroorganizma konsantrasyonu 3mL olacak şekilde 30°C inkübasyon sıcaklığında 7 gün inkübe edilerek maksimum enzim aktivitesi elde edilmiştir [8].

Weingand-Ziadé ve arkadaşları (2003), *Lactobacillus rhamnosus* mikroorganizmasını kullanarak tuz (NaCl) konsantrasyonunun, sıcaklığın ve pH'nın glutaminaz enzimi üzerine etkisini araştırmış, enzimin termal kararlılığı ve kinetik parametrelerini belirlemişlerdir. Çalışma sonucunda glutaminaz enzimi için optimum pH'yı 7.0, tuz konsantrasyonunu %2.5 ve sıcaklığı 50°C olarak bulmuşlardır. Enzimin kinetik parametreleri olan K_M değerini 4.8 ± 0.4 mM ve v_{max} değerini 101 ± 2 U/L olarak belirlemişlerdir [31].

AMİNO ASİTLER

3.1 Genel Bilgi

Proteinler yaşayan sistemler içinde en fazla miktarlarda bulunan ve en fazla fonksiyona sahip moleküllerdir [6]. Proteinler; şekil, büyüklük, yük, hidrojen bağı yapma kapasitesi ve kimyasal aktivite yönünden birbirinden farklı R gruplarını bulunduran yirmi çeşit amino asit ihtiva eder. Bakteriden insana kadar bütün türlerin, bütün proteinleri aynı yirmi amino asitten yapılmış olup, bu protein alfabesi yeryüzünde hayatın başlangıcından beri geçerliliğini sürdürmektedir. Proteinlerin birbirinden son derece farklı fonksiyonları, aynen ciltler dolusu kitabın 29 harften yazılması gibi, sözü geçen amino asitlerin değişik dizilişleri ile ortaya çıkmaktadır (Şekil 3.1) [11].



Şekil 3.1 Polipeptid zinciri ve amino asitler [55]

Yani bütün proteinler lineer amino asit polimerleri olarak ortak bir yapısal özelliğe sahiptirler. Proteinler inanılmayacak kadar çok çeşitli fonksiyon üstlenirler [6]. Hücre kuru ağırlığının %50'sinden fazlası proteindir [56].

Standart amino asitlerin hepsi vücutta metabolik ara ürünlerden sentez edilememektedir. Vücutta sentezlenemeyen, protein yapısı için besinlerle alınması zorunlu olan amino asitlere esansiyel amino asitler denir (Çizelge 3.1) [57].

Vücutta metabolik ara ürünlerden sentez edilebilen amino asitler, esansiyel olmayan amino asitler olarak bilinirler (Çizelge 3.1) [57].

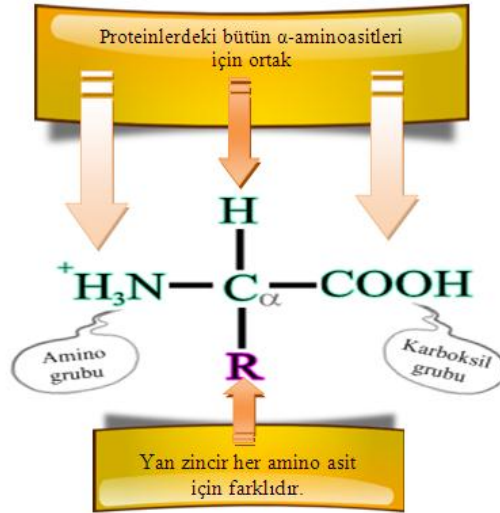
Çizelge 3.1 Esansiyel ve esansiyel olmayan amino asitler [57]

Esansiyel Amino asitler	Esansiyel Olmayan Amino asitler
Arginin*	Alanin
Histidin*	Asparagin
İzolösin	Aspartat
Lösin	Glutamat
Valin	Glutamin
Lisin	Glisin
Metiyonin	Prolin
Treonin	Serin
Fenilalanin	Sistein (Metiyoninden)
Triptofan	Tirozin (Fenilalaninden)

* Çocuklarda esansiyel olup yetişkinlerde olmayan amino asitler.

3.2 Amino Asitlerin Yapısı ve Özellikleri

Amino asitler, bir asit ve bir amino grubu içeren bileşiklerdir [56]. α -Amino asitler, α -karbon atomuna bir amino grubu ($-\text{NH}_2$), bir karboksil grubu ($-\text{COOH}$), bir hidrojen atomu ($-\text{H}$) ve bir yan grubun ($-\text{R}$) bağlanmasından oluşurlar (prolin hariç) (Şekil 3.2) [11].



Şekil 3.2 Amino asitlerin yapısal özellikleri

Fizyolojik pH'da (yaklaşık pH 7.4) karboksil grubu dissosiyasyon olarak negatif yüklü karboksil iyonunu ($-\text{COO}^-$) oluşturur ve amino grubu protonlanır ($-\text{NH}_3^+$). Proteinlerde bu karboksil ve amino gruplarının hemen hepsi peptid bağının yapısında yer alır ve kimyasal reaksiyonlara giremez (hidrojen bağı oluşumu hariç). Bu yüzden, bir amino asidin proteindeki rolünü belirleyen, yan zincirlerin yapısıdır. Bu nedenle amino asitleri yan zincirlerinin özelliklerine göre nonpolar ya da polar (yüksüz, asidik veya bazik) olarak sınıflandırılır [6].

A. Nonpolar yan zincirli amino asitler

Glisin (Gly, G)	Alanin (Ala, A)	Valin (Val, V)
Lösin (Leu, L)	İzolösin (Ile, I)	Fenilalanin (Phe, F)
Triptofan (Trp, W)	Metiyonin (Met, M)	Prolin (Pro, P)

B. Yüksüz polar yan zincirli amino asitler

Serin (Ser, S)	Treonin (Thr, T)	Tirozin (Tyr, Y)
Asparagin (Asn, N)	Sistein (Cys, C)	Glutamin (Gln, Q)

C. Asidik yan zinciri olan amino asitler

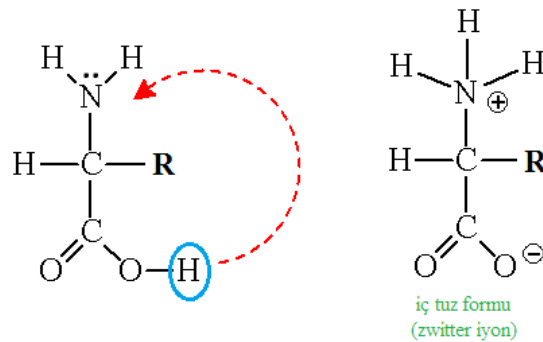
Aspartik Asit (Asp, D)	Glutamik Asit (Glu, E)
------------------------	------------------------

D. Bazik yan zinciri olan amino asitler

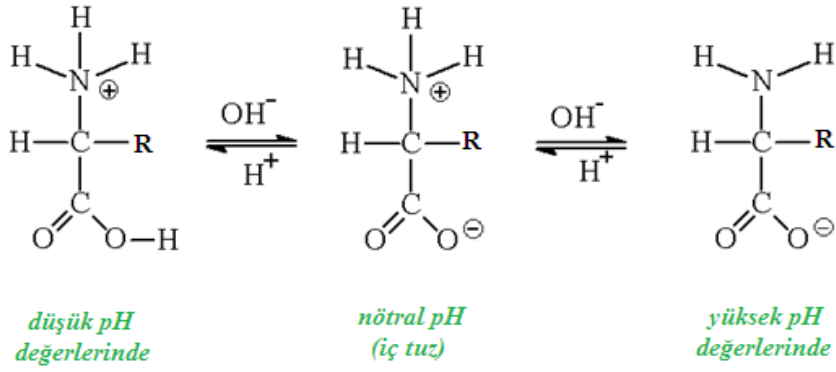
Histidin (His, H)	Lizin (Lys, K)	Arginin (Arg, R)
-------------------	----------------	------------------

3.2.1 İç Tuz Formu

Karboksil grubu asit grubu olarak H^+ salıverebilir. Bazik amino grubu amonyağa benzer, H^+ iyonu bağlar. Her iki grup dissosiyeye olursa Şekil 3.3'teki gibi bir iç tuz oluşur [7].



Şekil 3.3 İç Tuz formu (Glutamin için R: $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$)



Şekil 3.4 İç tuz oluşum reaksiyonu [58]

Belirli bir pH değerinde amino asidin iç tuz formu hakim olarak bulunur (Şekil 3.4). Bu nokta izoelektrik nokta olarak tanımlanır. İzoelektrik nokta asidik ve bazik grupların pK değerlerinden hesaplanır [7].

$$\frac{pK_1 + pK_2}{2} = \text{İzoelektrik nokta}$$

3.3 Amino Asitlerin Amino Gruplarının Metabolizması

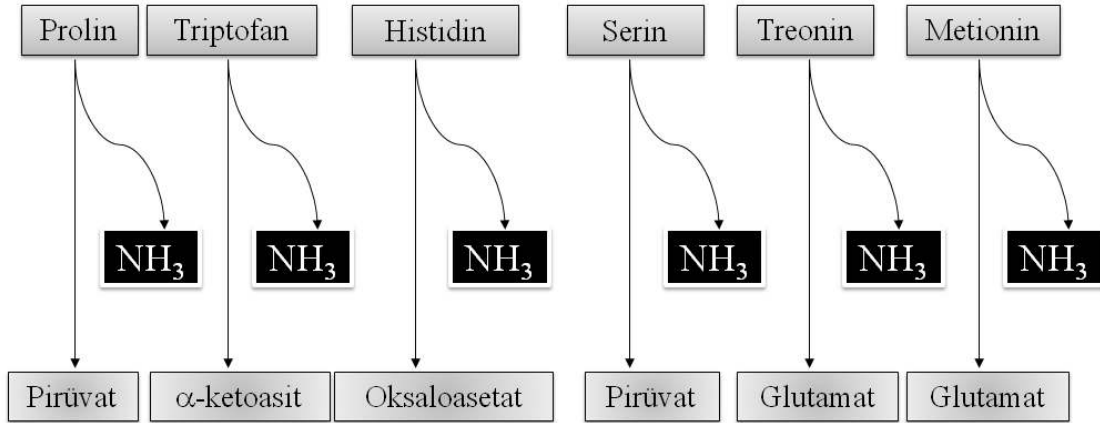
Amino asit katabolizmasının ilk basamağı alfa-amino grubunun ayrılmasıdır. Bu transaminasyon ile sağlanır. Glutamata aktarılan azot gruplarının serbestleştirilmesi olayı ise oksidatif deaminasyon ile sağlanır [56].

3.3.1 Transaminasyon

Bir amino asidin α -amino grubunun, bir α -keto aside naklidir. Reaksiyon sonunda serbest NH₃ açığa çıkmaz. Transaminasyon, nonesansiyel amino asitlerin biyosentezinde, birçok amino asidin yıkılımında ve amino asitlerin değiş tokuşunda kullanılır [56].

3.3.2 Oksidatif Deaminasyon

Burada amino grubu, serbest amonyak halinde açığa çıkar. Başlıca karaciğer ve böbrekte ve sadece mitokondrilerde meydana gelir. Böylece amino asitlerin amino grupları amonyak halinde açığa çıkmış olur (Şekil 3.5) [56].



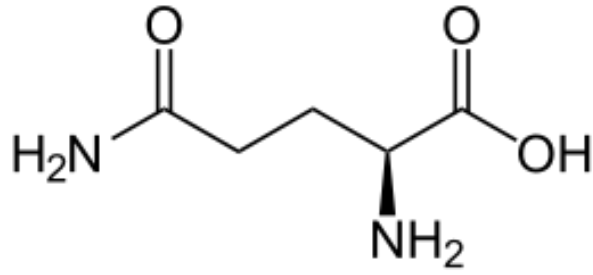
Şekil 3.5 Karaciğer-sitoplazmasında meydana gelen deaminasyon reaksiyonları [59]

3.4 Glutamin

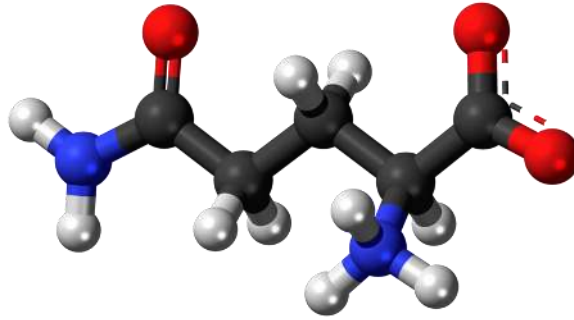
3.4.1 Genel Bilgi

Glutamin ((2S)-2,5-diamino-5-oxo-pentanoik asit, Gln veya Q) genetik olarak kodlanan 20 amino asitten biridir. Molekül formülü C₅H₁₀N₂O₃ olup mol kütlesi 146.14 g.mol⁻¹ dir [60], [61], [62]. Yan zinciri, glutamik asidin hidroksil yan zincirinin amin fonksiyonel grubuyla değişmesiyle oluşan amit grubudur. Kodu CAA ve CAG şeklindedir [61]. Glutaminin yapısı Şekil 3.6 ve Şekil 3.7’de, glutamine ait pK değerleri ise Çizelge 3.2’de görülmektedir.

Glutaminin %41.09’unu karbonhidrat, %6.9’nı hidrojen, %32.84’ünü oksijen ve %19.17’sini nitrojen meydana getirmektedir. Glutaminin iki amin grubu vardır. Terminal grubu ayrılınca glutamat ve amonyak teşekkül eder. Geri kalan alfa amino grubu transaminasyonla diğer amino asitlerin oluşmasında rol oynar [63]. Bu temel bir amino asit olarak kabul edilmez ancak yoğun atletik eğitim veya belirli gastrointestinal (mide-barsak) bozukluklar gibi bazı durumlarda, şartlı gerekli hale gelebilir [60].



Şekil 3.6 Glutaminin yapısı [60]



Şekil 3.7 Glutaminin üç boyutlu yapısı [60]

Çizelge 3.2 Glutamin amino asidinin iyonlaşabilir gruplarının pK değerleri (25°C'da)
[11]

	pK ₁	pK ₂	pK _R	pI
Glutamin	2.17	9.13	-	5.65

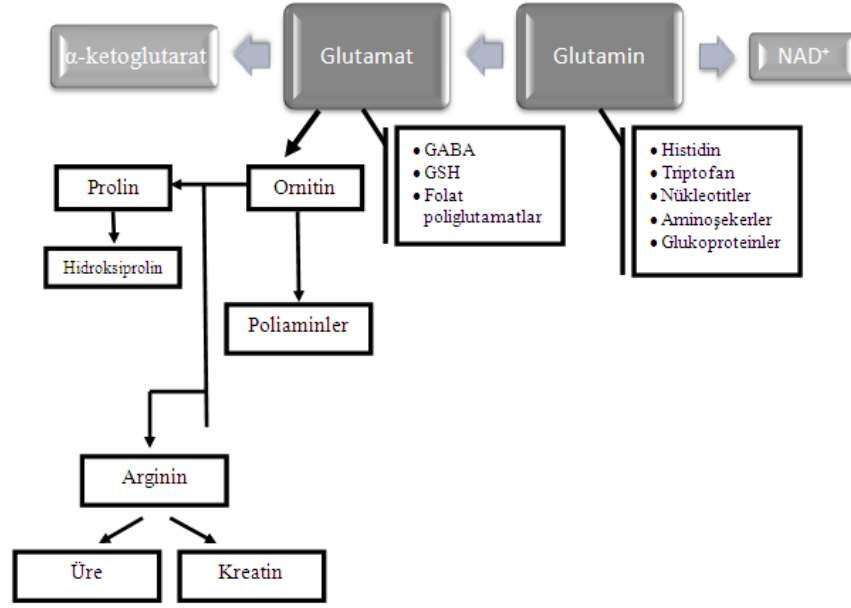
Glutamin (gln), 0.5–0.8 mmol/L plazma konsantrasyonu ve 15-20 µmol/mL intrasellüler kas içi konsantrasyonuna sahip olduğundan insan dokusunda en çok bulunan serbest amino asittir [64], [65], [66], [67]. Erişkin bir insanda (yaklaşık 70 kg), çoğu intrasellüler olmak üzere, yaklaşık 80 g serbest glutamin bulunmaktadır [64]. Kasta, dallı zincirli amino asitlerin metabolizması sonucu oluşur. Esansiyel olmayan bir amino asit olmasına karşılık metabolik stres durumlarında yarı esansiyel veya ortama bağlı esansiyel olarak kabul edilmektedir ve ağır hastalık durumunda dışarıdan takviyesi gerekir [66], [67]. Glutamin aynı zamanda ağırlık kaldırma, vücut geliştirme ve diğer sporlarda kas gelişimi için bir takviyedir ve dayanıklılığı artırır. Aynı zamanda, alkolikleri iyileştirme programlarında vücudun şeker isteği döngüsünü kırmada kullanılır ve diyabetlerde de şeker isteği döngüsü idaresini sağlar [61].

3.4.2 Glutamin ve Fonksiyonları

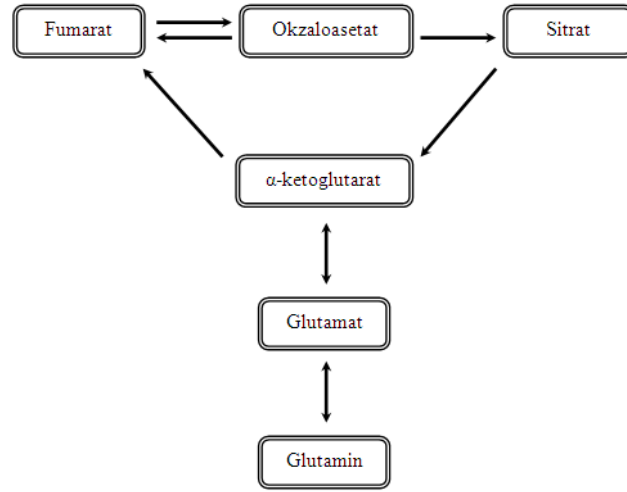
Glutamin, iki azot atomu içerir ve vücutta en önemli toksik olmayan, azot taşıyıcısıdır. Böylece, glutamin, vücudu yüksek amonyak seviyesinin toksik etkilerinden korur. Bazı durumlarda, glutamin kanda taşınan tüm amino asit azotunun %80'ninden fazlasını kapsar [64]. Beyinde oluşan amonyağın depolanma ve taşınma seklidir. Glutamin, kırmızı kan hücreleri ve gliadan oluşan ve beyni kandaki toksinler, bakteriler ve virüslerden koruyan koruyucu bariyer, kan-beyin bariyerini direkt olarak geçebilen tek amino asittir. Kaslarda depolanabilirken, aynı zamanda vücutta dolaşan kanda da bulunur [61], [68].

Glutamin beyinde beyin fonksiyonlarının sağlıklı çalışmasında görevli glutamik asite dönüştürülür ayrıca nörotransmitter gamma-aminobutirik asitin (GABA) seviyesini artırır (Şekil 3.8) [68].

Glutaminin immünite artırıcı özelliği bulunmaktadır. Glutamin hızlı bir şekilde proliferasyon olabilen hücreler için önemli bir metabolik substrattır [65]. Glutamin çoğu hücre için bir enerji substratıdır ve mitokondriyal adenosin trifosfat (ATP) üreticisidir. Şekil 3.9'da görüldüğü gibi glutamat üzerinden α -ketoglutarata dönüşerek sitrik asit döngüsünde yer alarak ATP üretimini sağlar. Özellikle nükleotit sentezinde, glutamat sentezinde ve antioksidan savunmada önemi olan glutatyon sentezinde, glikoneogenezde görev alır (Şekil 3.10). Böylece glutamin, ana solunum yakıtı ve hızlı bölünen hücrelerin metabolik prekürsörü (örneğin; enterosit ve bağışıklık hücreleri) olarak görev alır. Bunun yanında, glutamin, oksidatif stresin yarattığı hasara karşı doğal bir koruyucu ürün olarak görev alır [69], [70]. Ayrıca ısı-şok proteinlerinin sentezini uyarır. Bunlara ek olarak, glutamin hücre volümünün osmotik regülasyonunda önemli rol oynamaktadır. Hem hücre içi protein sentezini uyarır hem de proteinlerin fosforilasyonuna neden olduğu bildirilmiştir [65]. Glutamin, metabolik, antioksidan ve safra kesesi koruyucu etkileri bulunmaktadır. Bu etkiler direkt olarak glutamine veya ürünlerine (glutamik asit veya nükleotid) bağlanabilir [71]. İmmünonütrientlerden biri olan glutamin, bağırsak hücreleri ve lenfosit gibi hızlı çoğalan hücrelerin ana yakıt kaynağıdır [64].

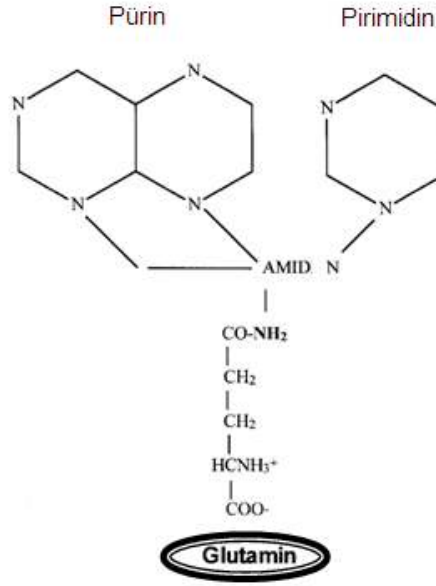


Şekil 3.8 Glutamin metabolizması sonucu elde edilen ürünler [72]



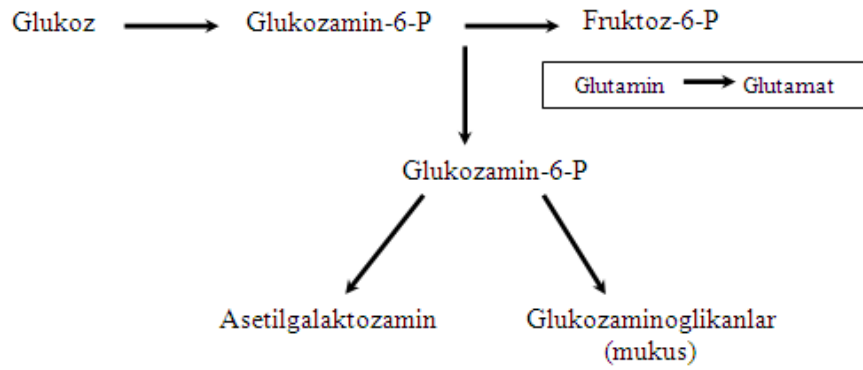
Şekil 3.9 Glutaminin glutamat üzerinden diğer bileşiklere dönüşümü [72]

Vücuttaki plazma serbest amino asitlerin %20'sini, iskelet kasındaki serbest amino asit havuzunun %60'ını oluşturmaktadır. Normal diyetle alınan glutamin 10 gr'ı geçmez. Ağır metabolik stres durumlarında 20–40 gr alınması gerekebilir. Glutasyon, glutamin metabolizma yan ürünüdür normal dokuların temel antioksidanıdır [66], [69].



Şekil 3.10 Glutaminin, pürin ve pirimidin halkasına azot sağlaması [72]

Glutaminin kritik önemi olan heksozaminlerin sentezinde, guanozin trifosfat ve nikotin adenin dinükleotid sentezi için nitrojen temin eder [64], [72]. Glukozamin-6-P'nin glutaminden gelen azot atomunu transferi ile oluşan fruktoz-6-P'nin reaksiyonu Şekil 3.11'de verildiği gibidir.

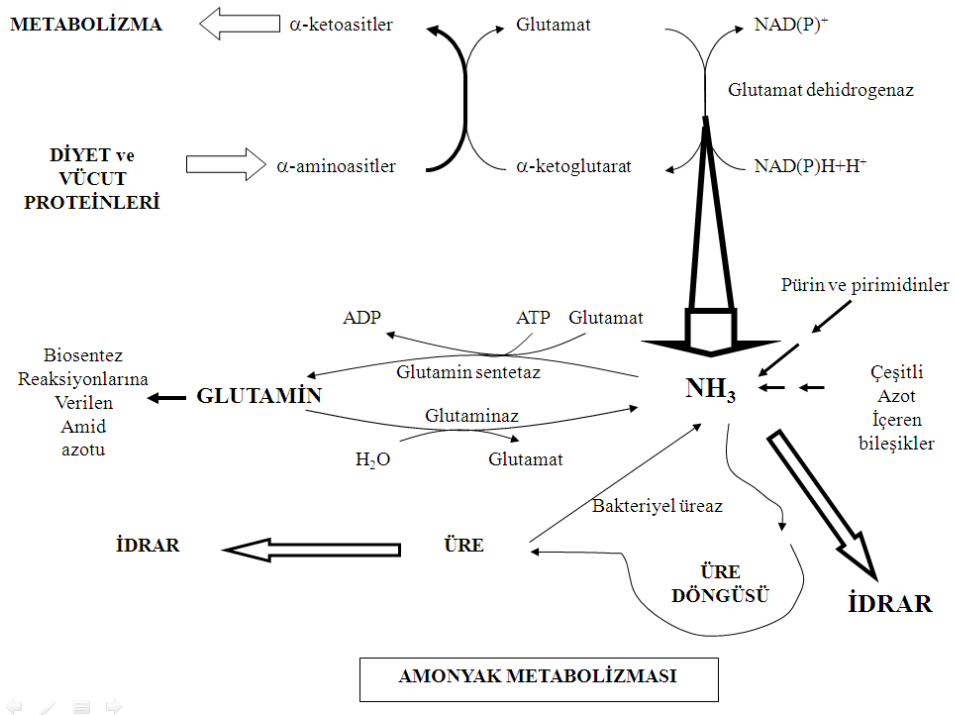


Şekil 3.11 Glukozamin-6-P'dan fruktoz-6-P oluşumu [72]

Glutamin ile ilgili olarak bir çok çalışma yapılmıştır. Hafif olgularda parenteral beslenmede kullanımı sonucu [69];

1. Azot dengesi düzelir
2. Kas glutamine düzeyindeki düşüş azalır
3. İmmünite düzelir
4. Hastanede yatış süresi azalır
5. Gastrointestinal sistemin bariyer fonksiyonu düzelir.

Glutamin, amonyağın vücut içerisinde taşınma ve depolanma formudur. Enterositler için birincil, beyin için alternatif yakıt kaynağıdır. DNA ve protein sentezinde rol oynar. Amonyak metabolizmasının önemli bir bileşenidir. Glutaminin amonyak metabolizmasındaki yeri Şekil 3.12’de gösterilmektedir.



Şekil 3.12 Amonyak metabolizmasında glutaminin yeri [59]

3.4.3 Glutamin Sentez ve Yıkımı

Vücutta glutamin sentezi özellikle iskelet kası ve beyinde, yıkımı ise barsaklar ve böbrekte olmaktadır. İskelet kasında serbest intraselüler amino asitlerin %60'ı glutamindir ve glutamin diğer dokular için başlıca kaynak yeridir [64].

3.4.3.1 Glutamin sentezi

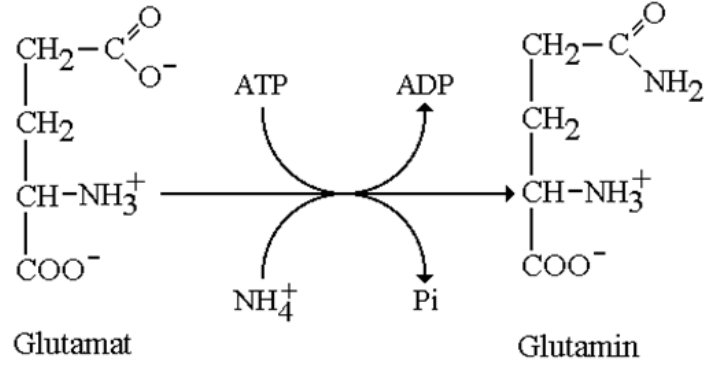
Glutamin birçok dokuda sentez edilmektedir, ancak malnütrisyon, yedi günden uzun süren ağızdan alamama, katabolik durumlar, ameliyat yaralarının iyileşmesi, travma, sepsis ve yanık gibi stresli durumlarda vücut ihtiyacı sentez kapasitesini aşar. Bu durumda hücre içi konsantrasyonu %50'den fazla düşer ve plazma seviyesi normalin %30'na kadar azalır. Bu da glutaminin "duruma bağlı esansiyel amino asit" tanımını almasına neden olur [64].

Amonyakın uzaklaştırması üç şekilde meydana gelir:

1. Üre sentezi
2. Glutamat
3. Glutamin sentezi

Amonyak, glutamin içinde nontoksik olarak depolanır ve taşınır. Glutamin oluşumu başlıca karaciğer, böbrek ve kasda olur. Beyinde de önemlidir. Bu yüzden, glutamin, dolaşımında diğer amino asitlerden daha fazla miktarda bulunur. Böbrekler tarafından alınıp, glutaminaz ile deamine edilir [56].

Glutamin, glutamatın amididir. Glutamin, glutamat ve amonyaktan, *glutamin sentetaz* ın katalitik etkisiyle ve ATP'den sağlanan enerji ile irreversibl bir reaksiyonda oluşur (Şekil 3.13) [57].



Şekil 3.13 Glutamin biyosentezi [57]

3.4.3.2 Glutamin yıkımı

Böbreklere gönderilir ve böbreklerde glutaminaz ve glutamat dehidrogenaz enzimleri ile parçalanarak 2 mol serbest amonyak elde edilir. Bu amonyak asit-baz regülasyonunda kullanılır [59].

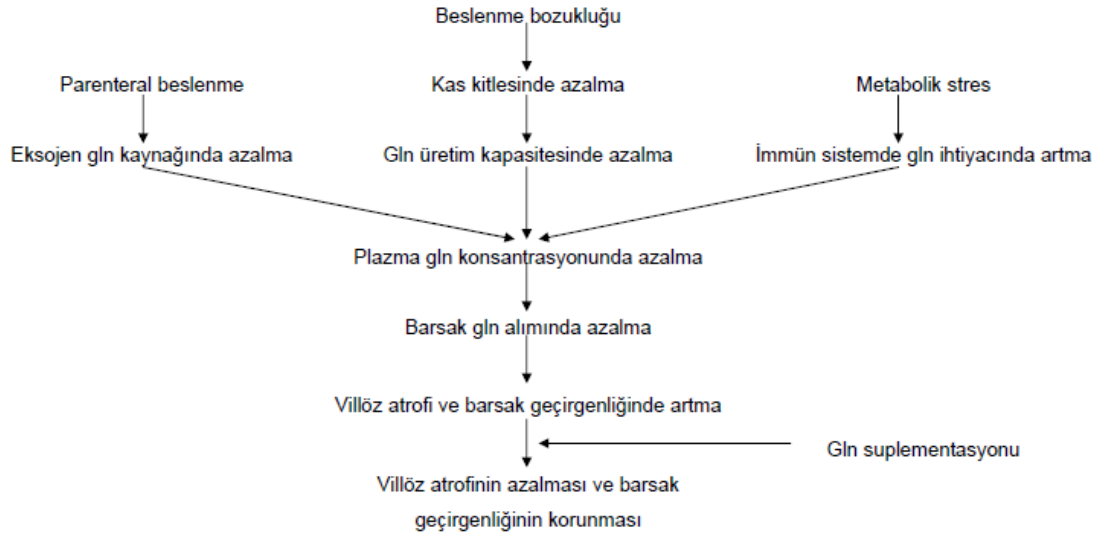
Karaciğer ve böbrek problemi olanlar, Reye sendromu¹ hastaları ve kanda amonyak birikmesine neden olacak hastalığı olanlar glutamin takviyesi kullanmamalıdır. Glutamin takviyesi bu hastalıkları şiddetlendirebilir [68].

3.4.4 Glutamin ve Sindirim Sistemindeki Rolü

Katabolik şartlar altında sindirim kanalı pasif organ olarak kabul edilmekte iken son yıllarda araştırmalar kritik hastalık döneminde sindirim kanalının amino asit regülasyonunda önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Yaralanma veya cerrahi stresi takiben, sindirim kanalı fırçamsı kenarları boyunca glutamin alımını arttırarak barsak metabolizmasını ve fonksiyonlarını korur [64].

Enterositler tarafından glutaminin hızlı bir şekilde kullanımının sonucunda glukoz bırakılır ve bu glukoz stres süresince diğer glukozla bağlı dokular tarafından (beyin, eritrositler) kullanılabilir [64].

¹ Reye sendromu; nezle ya da suçiçeği gibi virüsten kaynaklanan bir hastalıktan sonra görülebilen, nadir rastlanan; fakat ciddi bir hastalıktır. Reye sendromu birçok farklı organa zarar verebilir; ancak çoğunlukla karaciğeri ve beyni etkiler ve bazen de beyne zarar verip ölümlere neden olabilir [73].



Şekil 3.14 Gastrointestinal sistemde tahmini glutamin fonksiyonları [64]

Glutamin, böbrekten atılan amonyağın başlıca kaynağı ve major transport formudur. Glutamat, amonyak ile birleşerek glutamin oluşur. Glutamin, glutamattan farklı olarak, hücre membranlarını kolayca geçebilir. Nontoksik ve nötral bir bileşiktir. Kan ile karaciğere taşınır. Diğer amino asitlere oranla kanda daha fazla bulunur. Yani glutamin kanda en yüksek konsantrasyona sahip amino asittir. Arginin, glutamin ve prolin; glutamattan sentezlenen amino asitlerdir. Böbreklerde glutaminazın kataliziyle glutaminden amonyak meydana gelir. Bu amonyağın büyük kısmı idrarla atılır ve asit-baz dengesi korunur. Barsaklarda da bu reaksiyon olur (Şekil 3.14) [56].

3.4.5 Glutamin Eksikliği

Glutamin eksikliği sonucu, lenfositlerde antijenlere karşı gelişecek aktivasyon sinyalinin oluşmadığı; monositlerde ise antijenleri tanıma ve fagositozda bazı aksaklıklara neden olabileceği ileri sürülmüştür. Deneysel çalışmalar, yine glutamin eksikliğinin nekrotik enterokolit²e neden olduğunu ortaya koymaktadır [65].

Cerrahi, travma, infeksiyon, sepsis gibi metabolik stres durumlarında plazma ve kan içi glutamin konsantrasyonu düşer ve kaslardan glutamin salınımı artar. Fakat bu ihtiyacı

² Yenidoğan nekrotizan enterokoliti, özellikle prematür bebeklerde görülen, sıklıkla ağır stres durumlarıyla beraber olan, barsağın iskemik ülserasyon ve inflamasyon halidir [75].

karşulamakta yetersiz kalmaktadır [67], [69]. Barsaklarda glutamin düzeyindeki azalma bariyer fonksiyonlarını bozarak bakteriyel translokasyonu artırır. Enterositlerde apoptoz artmaktadır [67], [74].

3.4.6 Glutamin ve Besinler

Bazı besin maddeleri glutamin açısından zengindir. Buğdayın amino asit miktarının %35'i glutaminden oluşmaktadır. Soya fasülyesi zengin bir glutamin kaynağı olup amino asit içeriğinin %9.6'si glutaminden oluşmaktadır. Peynir ve süt tozu da glutamik asitten zengindir [64].

L-glutamin; pişirme işlemiyle kolayca yok olabilir. Eğer çiğ yenirse ıspanak ve maydanoz zengin glutamin kaynaklarıdır. Bunun yanında, sığır etinde, tavuk, balık, yumurta, süt ve süt ürünlerinde, lahana, pancar ve fasulyede bulunur. L-glutamin, aynı zamanda sebze sularında ve fermente gıdalarda az miktarda bulunur. Kapsül veya toz formunda takviyeleri de mevcuttur. Amino asit haplarının içinde yer alır [61], [68].

3.4.7 Glutamin ve Kanser

Kanser tanısı olan hastalarda zamanla belirgin glutamin eksikliği gelişir ve kanser kaşeksisinin en önemli nedenlerinden biri olarak iskelet kaslarındaki glutamin eksikliği olarak bildirilmektedir. Bu, optimal etki gösterebilmek için yeterli glutamin stoklarına ihtiyaç duyan intestinal epitelyal doku ve lenfositler gibi dokular üzerinde olumsuz etkilere neden olabilir. Ayrıca kemoterapi ve radyoterapi ile normal dokulara verilen hasar da glutamin stoklarını etkileyebilir. Bütün bu bilgiler glutaminin ilave olarak kullanılmasının bu tedavilere bağlı olarak gelişebilen normal doku hasarını azaltmada etkinliği olabileceğini göstermektedir. Glutamin enteral veya parenteral verilebilir ama enteral yolun barsak koruyucu olduğu gösterilmiştir ve tavsiye edilende budur [66].

Aslında glutamin insan vücudunda diğer tüm serbest amino asitlerden daha yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Her ne kadar tüm hücrelerde glutamat aminotransferaz aracılığı ile α -ketogluterat ve glutamattan sentezlense de, çoğunluğu iskelet kaslarında

yapılır ve intestinal hücreler, böbrek ve lenfositlere taşınır. Bu nedenle kritik hastalık sırasında glutamin ‘duruma göre gerekli’den ‘mutlak gerekli’ konuma geçer [71].

Standart beslenme solüsyonları (polimerik kazein-kaynaklı enteral formüller) içeriklerinde çok az veya hiç glutamine (standart parenteral formüller) içermemektedirler [71].

Pek çok çalışma göstermiştir ki glutamin 0.2 g/kg’dan yüksek dozlarda en az beş gün eklendiğinde ancak etkin olabilmektedir. Glutaminin yararlı etkilerini açıklayan pek çok mekanizma söylenebilir; metabolik, antioksidan ve safra kesesi koruyucu etkileri bu mekanizmalara örnek gösterilebilir. Bu etkiler direkt olarak glutamine veya ürünlerine (glutamik asit veya nükleotid) bağlanabilir [71]. Siroz, respiratuvar ve metabolik asidoz ile belirli kanser türlerinde ise plazma glutamin miktarı azalmaktadır [65].

3.4.8 Glutamin ve Tedavi

Glutamin ve antioksidanların immün mekanizmalardaki fizyolojik önemini anlamak için bir çok çalışma yapılmıştır ve yapılmaktadır. Glutaminin olası yararlı etkileri Çizelge 3.3’de belirtilmektedir.

Çizelge 3.3 Glutamin ilavesinin olası yararlı etkileri [71]

Metabolik	İmmünolojik	Antioksidan	Bağırsak Koruyucu	Spesifik İndüksiyon
Protein sentezi	İmmün hücre replikasyonu	Glutasyon sentezi	Enterosit replikasyonu	HSP
Organlar arası C ve N taşıyıcılığı	T-hücre fonksiyonu	Taurin prekürsörü	GALT idamesi	HO-1
Glukoneogenesis prekürsörü	IgA sentezi	Homooksijineaz	Hipermetabolitenin önlenmesi	
Böbrek amonyum oluşumu	HLADR on CD14			

BÖLÜM 4

MANTARLAR

4.1 Genel Bilgi

Genelde yüz bini aşkın türü olan mantarların büyüklükleri çok değişkendir. Bir hücreli mikroskopik mantarlar olduğu gibi boyu metreleri bulanlar da vardır. Mantarlar esas olarak sporla üreyen (kriptogam) canlılar olduklarından üremelerini sağlayan sporları oluşturmak için meyve verirler [76].

Mantarlar, makrofungusların meyveleridir. Mantar terimi, esas olarak makrofungusların yenilebilir türleri için kullanılır [76], [77]. Çok eski zamanlardan beri besin olarak tüketilen mantarların yetiştirmeciliğine ilk defa 16.yy.'da Fransa'da başlanmıştır. Mevsime bağlı olarak doğada kendiliğinden yetişip yenilebilen mantarlar kırsal alanda yaşayan insanların önemli bir besin kaynağı durumundadır. Bugün bile insanlar doğadan topladıkları mantarları besin maddesi olarak tüketmektedir. Ancak doğadan toplanan mantarların bazılarının zehirli olması ve bunun kolay anlaşılabilmesi önemli tehlikelere yol açmakta kimi zaman ise ölümcül olmaktadır [78].

Çok yakın zamanlara kadar canlılar dünyası, bitkiler dünyası ve hayvanlar dünyası olarak ikiye ayrılıyor ve mantarlar da bitkiler dünyasına dahil ediliyorlardı. Ne var ki yapılan son araştırmalar sonucunda mantarların ne bitkiler dünyasına ne de hayvanlar dünyasına ait olmadığı, ayrı bir dünya olan mantarlar dünyasını oluşturduğu anlaşılmıştır. Bu değişikliğin nedeni mantarlarla bitkiler arasında temelde büyük farklılıkların olduğunun belirlenmesidir. Bu farklılıklardan en önemlisi ise mantarların

yeşil renkli klorofil maddesine sahip olmamalarıdır. Bu madde bitkilere özgüdür ve klorofil özümlemesi yapmaya ve bu yolla “karbonhidrat” yani besin maddesi oluşturmaya yarar [76].

Mantarlar, fotosentetik olmayan ökaryotik mikroorganizmalardır. Görünüm bakımından mantarlar iki tür yapı gösterirler. Bir kısmı çok hücreli iplikçikler oluşturarak gelişirler ki bunlara “küf”, bir kısmı ise tek tek hücreler şeklinde üreme gösterirler, bunlara da “maya” şeklinde mantarlar denir [79]. Bu organizmaların hücreleri hif (hypha) adı verilmiş dallanmış iplikler halindedir. Hifler bir arada miselyum adı verilen mantar vücudunu oluştururlar [80].

Mantarların büyük bir grubunu çıplak gözle görülebilen küfler oluşturur. Ekmek, limon, portakal gibi besin maddeleri üzerinde ürediklerinde, onları kolay fark ederiz [79].

Mantarın insan sağlığı ile ilgili yararlarına kısaca birkaç örnek vermek gerekirse, özellikle yaşı ilerlemiş kimselerde hayvansal protein insan sağlığı bakımından sakınca yaratmaktadır. Hayvansal gıdalardan alınan aminoasitler damarlarda birikerek damar sertliği, buna bağlı olarak kalp rahatsızlığı, sinir sistemi bozuklukları, enfarktüs gibi ölümcül hastalıklara neden olmaktadır. Bu yüzden kırmızı etlerden çok beyaz etlerin yenmesi, doktorlar ve beslenme uzmanlarınca tavsiye edilmektedir. Mantarla alınan protein, hayvansal gıdaların yaptığı zararı ortadan kaldırmaktadır. Hatta mantarda bulunan vitaminler, antibiyotikler, hormonlar insan sağlığını korumaktadır. Dış ülkelerde hastaneler, poliklinikler, diyet merkezleri, şişman insanların zayıflamasında, kalp damar rahatsızlığı olanların beslenmesinde günlük almaları gereken protein miktarını mantarla karşılanmaktadır [81].

Giderek bir iş kolu haline gelen kültür mantarı yetiştiriciliği, mantarın taşıdığı besin değeri açısından iş koklu olmasının ötesinde sağlıklı beslenme açısından da büyük öneme sahiptir [82]. II. Dünya Savaşı’ndan sonra teknolojiye yeni gelişmelerden mantar üretim sektörü de etkilenmiş ve modern üretimin temelleri atılarak klimalı kapalı

Üretim tesisleri kurulmuştur. Kültür mantarı ülkemiz için oldukça yeni bir besin maddesi olup küçük üretim yerlerinde üretimi yapılmaktadır [83].

4.2 Mantarın Besin Değeri

Kültür mantarcılığında şapkalı mantar (*Agaricus bisporus*) en çok yetiştirilen mantar türüdür. Toprak üstünde bulunan beyaz renkli sap ve şapka yenen kısımdır. Mantar insan beslenmesinde önemli bir yere sahiptir. Mantar %90'a yakın su içerir. İçinde çok az miktarda karbonhidrat ve yağ bulunması nedeniyle 100 g taze mantar yendiği zaman 30-40 kalori vermektedir. Ayrıca kalp ve damar hastalarına tavsiye edilen yiyeceklerin başında gelmektedir. Mantarda bulunan protein miktarı tre göre değişmekle beraber 100 g mantarda 3-8 g'dır. Mantar proteinin %70'i hazım olabilir niteliktedir. Ayrıca vücutta bu protein depolanmaz günlük olarak kullanılır. Hayvansal proteinin %30-40 sindirilebilir. Özellikle etle alınan protein fazlası vücutta depolanmaya başlayarak birikir. Protein birikmesi özellikle kalp ve damar hastalıkları olan kişiler için sakıncalıdır [84].

4.3 Kf Mantarları

Kf mantarları, özellikle havada bulunan sporları nemli ve besinli ortamda çoğalarak meydana gelen mantarlardır. Binlerce çok küçük (mikroskopik) mantarın bir araya gelmesiyle oluşur. Kf yapmayı sağlarlar. Çevredeki atıkları çürüterek doğaya katkıda bulunurlar. Sütü ekşitirler, sirke yapımını sağlarlar. Ekmek yapımında da maya olarak kullanılırlar. Hastalık yapanları ise çok çeşitli hastalıklara yol açar. Hatta bu hastalıklar öldürücü olabilirler. Ayrıca kf mantarları sayesinde antibiyotik (penisilin) icat edilip milyonlarca insanın hayatı kurtulmuştur. Besinleri kflerken besinlere tutunurlar. Bunu hif denilen organlarıyla gerçekleştirirler. Bir kısmı hayvanlar ve insanların üzerinde parazit olarak yaşarlar [85].

Tek hücreli bakterilerden farklı olarak küfler çok hücreli yapılar oluşturur, bazen çıplak gözle bile görülebilir. Mikroskop altında küfler ince mantar şeklinde grnrlar. Çoğu küfün yapısı; üzerinde yaşadığı gıdanın i yüzeylerine ulaşmak için ipliksi kökler (miseller), gıdanın üzerinde bulunan bir sap, bu sapın sonunda bulunan sporlar

şeklindedir. Küfün görünen rengini bu sporlar vermektedir. Hava ile temas ettiğinde küf sporları, hindiba tohumları gibi havada asılı kalarak bir yerden bir yere taşınır. Küflerin çok ince iplikler şeklinde dalları ve kökleri bulunmaktadır. Gıda içinde bulunan köklerin görülmesi çok olup, gıdanın çok içlerine nüfuz edebilir. Küflü gıdaların aynı zamanda bakteri taşıma ihtimali de yüksektir [86].

Küfler hemen hemen her türlü çevrede, içerde ve dışarıda tüm mevsimlerde bulunur. Küf gelişimini sıcaklık ve nemli koşullar teşvik eder. Küfler dışarıda gölge, nemli ve çürüten bitkilerin bulunduğu yerlerde, içerde ise yüksek nemli ortamlarda bulunurlar [86].

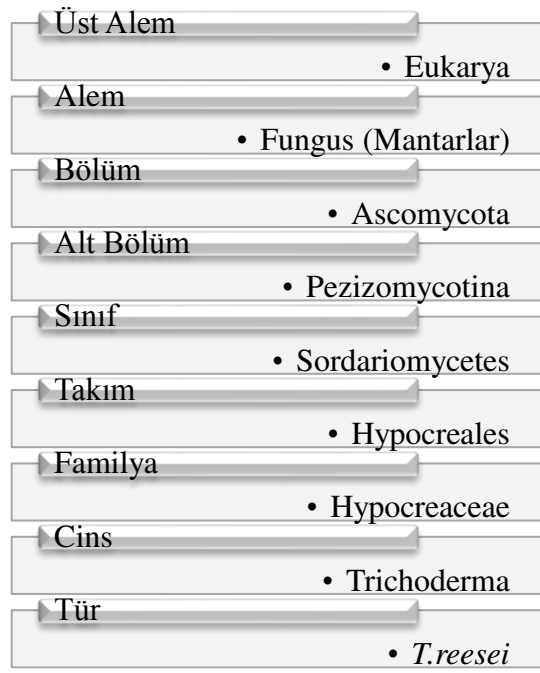
Ortam koşulları uygunluğunu yitirdiğinde küfler spor şeklinde ortama dağılır ve uygun koşulları bulduğunda tekrar gelişmeye başlar [86].

4.4 Mantarların Yararları

Bazı mantarlar çeşitli peynirlerin yapımında peynirin yüzeyinde veya içinde kullanılabilir. Mavi küflü rokfor, blue, gorgonzola ve stilton gibi peynirler *P. roqueforti* veya sporları kullanılarak üretilir. Brie ve kamamber peynirlerinde yüzeyde beyaz küf kullanılır. Bazı hem yüzey hem içinde küf bulunan peynirler de bulunmaktadır. Küf kullanılarak üretilen bu peynirleri tüketmek sağlık açısından risk oluşturmamaktadır [86].

4.5 Trichoderma reesei

Bir ipliksi mantar türü olan *Trichoderma reesei*, *Hypocrea jecorina*'nın eşeysiz üreyen bir soyudur. 7 kromozomdan oluşan genomunun boyutu toplam 33 megabazdır. Selülozu parçalayabilmesi *T. reesei*'yi endüstriyel açıdan önemli bir konuma taşımaktadır (örn. kumaş, kağıt, biyoyakıt üretimi) [87].

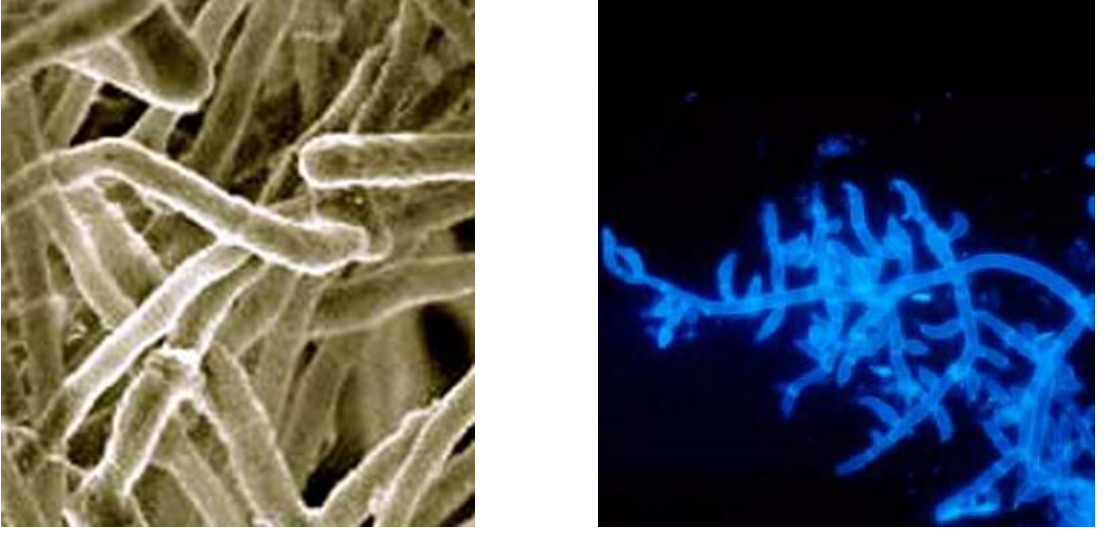


Şekil 4.1 *Trichoderma reesei*'nin taksonomisi

Trichoderma neredeyse 200 yıl önce küf suşları taksonuna dahil edildi. Taksona dahil edilen *Trichoderma* suşu *Trichoderma viride* idi ve *Trichoderma*'ya ait diğer suşların bu küf suşu ile akraba olmadığı düşünülüyordu. *Trichoderma* bunu takip eden 150 yıl boyunca zaman zaman mikotaksonomiyle ilgilenen bilim adamlarının dikkatini çektiyse de diğer bilim dallarının ilgi alanına giremedi. Bu mikroorganizma ilk olarak II. Dünya savaşı sırasında Amerikan ordusunun Solomon Adaları'nda kullandıkları malzemelerin (özellikle pamuklu materyallerin; çadır, paraşüt gibi) çürümeye başlamasını rapor etmesi üzerine yapılan uzun araştırmalar sonucunda keşfedildi. Bu çalışmalar sırasında izole edilen *Trichoderma "viride"* QM6a bu bölgedeki en selülitik küflerden biri olarak tanımlandı. Bu çalışmaların yapıldığı sırada bütün *Trichoderma* suşları "*T. viride*" olarak tanımlanıyordu. Yapılan morfolojik çalışmalar sonucu QM6a suşunun eşsiz biyolojik doğasının keşfedilmesi ve suşun izole eden araştırmacı Elwyn T. Reese onuruna "*T. reesei*" olarak adlandırılması için 20 yıl daha geçmesi gerekti [88], [89].

Elwyn Reese'nin Mary Madels ile Natick Enstitüsü'nde gerçekleştirdiği olağanüstü çalışmalar bu küf ve onun çeşitli mutant suşlarını biyosentez alanındaki bir çok çalışmanın konusu haline getirmiştir. Bu küf Yüksek miktarda salgılayabildiği selüla ve hemiselüla'larla selülozu glukoza kadar parçalayabilir. Selülozun ve diğer

polisakkaridlerin yapısının belirlenmesinde ve bu karbonhidratların katabolizmalarında rol alan mekanizmaların aydınlatılmasında rol alan bir çok çalışmanın da konusu haline getirdi. Reese ve Mandels'in bu çalışmaları sonucunda Amerika'daki, Avrupa'daki ve Asya'daki bir çok laboratuvar 1960'ların sonunda baş gösteren "petrol krizi" sırasında *Trichoderma*'nın selülitik sistemini incelemeye başladı [87], [88].



Şekil 4.2 *Trichoderma reesei*'in elektronmikroskobu altındaki görüntüsü [90], [91]

MATERYAL VE METOD

5.1 Çalışmada Kullanılan Küf Suşları

Bu çalışmada *Hypocrea jecorina* ve *Trichoderma reesei* mikroorganizmaları kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan mikroorganizma *Hypocrea jecorina* ve *Trichoderma reesei*, Viyana Teknik Üniversitesi, Biyokimyasal Teknoloji ve Mikrobiyoloji Enstitüsü tarafından temin edilmiştir.

5.2 Kullanılan Cihazlar

Cihazlar	Marka
1 Buzdolabı	Arçelik
2 Çalkalamalı İnkübatör	VWR-Inkubating Mini Shaker
3 Etüv	Memmert
4 Hassas Terazî	Sartorius-Extend
5 Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	VELP Scientifica-ARE
6 Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	Chiltern-HS31
7 Mantolu Isıtıcı	Termal Laboratuvar Aletleri
8 Otoklav	Certoclav
9 Otomatik Pipet (10–100 µL)	Biohit Proline Plus
10 Otomatik Pipet (100–1000 µL)	Brand

11	pH Metre	Sartorius-PB11
12	Su Banyosu	GFL
13	Su Banyosu	Clifton
14	Su Destilasyon Cihazı	GFL
15	Vortex Karıştırıcı	VELP Scientifica-Vortex
16	UV Spektrofotometresi	Agilent

5.3 Kullanılan Çözeltiler

5.3.1 Patates Dekstroz Agar (PDA) Katı Besiyeri Çözeltisi

39 g patates dekstroz agar tartılarak bir miktar destile su içinde çözülüp destile su ile 1 L'ye tamamlandı. Elde edilen heterojen karışım ısıtılarak homojen hâle getirildi.

5.3.2 Sıvı Besiyeri

1 g glukoz, 0.1 g KH_2PO_4 , 0.05 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g KCl, 5 g NaCl ve 1 g L-glutamin tartılarak bir miktar destile su içinde çözülüp son hacim destile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

5.3.3 Bovin Serum Albumin (BSA) Stok Çözeltisi

1 mg/mL bovin serum albumin (BSA) stok çözeltisinin hazırlanması için 10 mg BSA tartılarak bir miktar destile su içinde çözülüp toplam hacmi 10 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

5.3.4 Glutamin Çözeltisi

0.04M L-glutamin (146.15 g/mol) çözeltisinin hazırlanması için 5.846 g L-glutamin tartılarak bir miktar destile su içinde çözülüp toplam hacmi 1L'ye tamamlanarak hazırlandı.

5.3.5 Fosfat Tamponu (0.1M pH 8.0)

Henderson-Hasselbalch eşitliğinden (Eşitlik 5.1) faydalanarak 0.1M fosfat tamponu hazırlamak için gerekli olan NaH_2PO_4 ve Na_2HPO_4 miktarları aşağıda belirtildiği şekilde hesaplandı.

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad \text{Henderson-Hasselbalch eşitliği} \quad (5.1)$$

$$(1) \quad 8.00 = 7.21 + \log \frac{0.1-x}{x} \quad [HA] = x$$

$$(2) \quad 0.79 = \log \frac{0.1-x}{x} \quad [A^-] = 0.1 - x$$

$$(3) \quad \frac{0.1-x}{x} = 10^{0.79}$$

$$(4) \quad \frac{0.1-x}{x} = 6.166$$

$$(5) \quad 6.166 x = 0.1 - x$$

$$(6) \quad 7.166 x = 0.1$$

$$(7) \quad x = 0.0139 \text{ M} = [HA] = \text{NaH}_2\text{PO}_4$$

$$(8) \quad 0.1 - x = 0.0861 \text{ M} = [A^-] = \text{Na}_2\text{HPO}_4$$

0.0139M NaH_2PO_4 (120 g/mol) çözeltisinin hazırlanması için 1.668 g NaH_2PO_4 tartılarak bir miktar destile su içinde çözüldü. Ayrıca 0.0861M Na_2HPO_4 (142 g/mol) çözeltisinin hazırlanması için 12.262 g Na_2HPO_4 tartılarak bir miktar destile su içinde çözüldü. Her iki çözelti birleştirilerek pH'sı 8.0'a ayarlandıktan sonra hacmi 1L'ye tamamlandı.

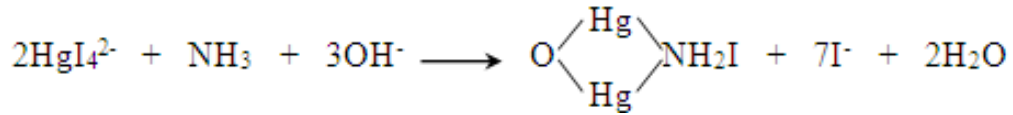
5.3.6 NaOH Çözeltileri

1N NaOH Çözeltisi : 4 g NaOH (40 g/mol) tartılarak bir miktar destile su içinde çözülüp toplam hacmi 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

10N NaOH Çözeltisi : 40 g NaOH (40 g/mol) tartılarak bir miktar destile su içinde çözülüp toplam hacmi 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

5.3.7 Nessler Reaktifi (K₂HgI₄)

14 g KI tartılarak 40 mL destile suda çözüldükten sonra buna %4'lük HgCl₂ çözeltisi eklendi. Kırmızı çökelek oluşuncaya kadar karıştırıldı. Karışıma 100 mL 10N NaOH çözeltisi eklenerek toplam hacmi destile su ile 500 mL'ye tamamlandı. Karışım bir gece karanlıkta bekletilip amber şişe içerisine süzülüp kullanım esnasına kadar oda sıcaklığında, karanlıkta saklandı. Amonyum varlığında Nessler reaktifi ile meydana gelen reaksiyon Şekil 5.1'de gösterilmiştir [92].



Şekil 5.1 Nessler reaktifinin amonyak ile meydana getirdiği reaksiyon

5.3.8 Trikloroasetikasit (TCA) Çözeltisi

1.5M trikloroasetik asit (163.39 g/mol) çözeltisinin hazırlanması için 24.51 g TCA tartılarak bir miktar destile su içinde çözülüp toplam hacmi 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Elde edilen çözelti kullanım esnasına kadar +4°C'da buzdolabında saklandı.

5.3.9 Bradford Reaktifi

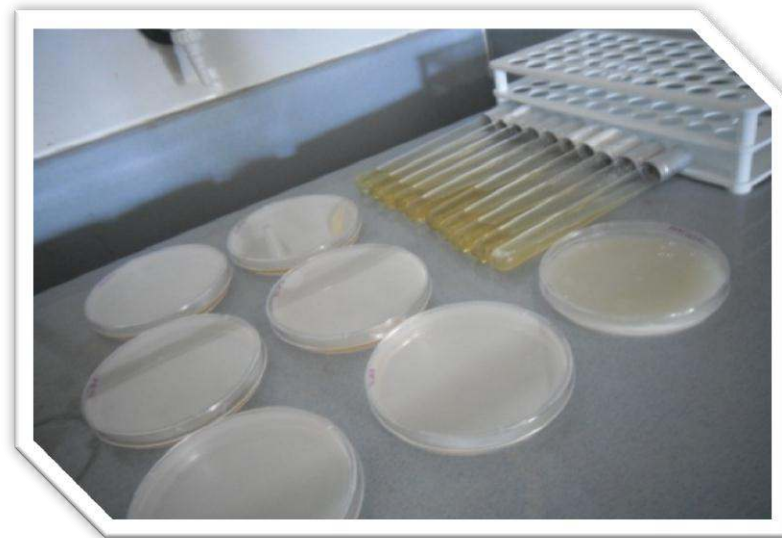
100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 tartılarak üzerine 50 mL %95'lik etanol ve 100 mL %85'lik o-fosforik asit eklendi. Hazırlanan çözelti manyetik karıştırıcı yardımı ile karıştırılıp toplam hacmi 1L'ye tamamlandı. Elde edilen çözelti amber şişeye süzülerek kullanım esnasına kadar +4°C'da buzdolabında saklandı.

5.4 Kültür Ortamı

5.4.1 Katı Besiyeri

Katı besiyeri ortamı olarak saf kültür olarak seçilen *Hypocrea jecorina* ve *Trichoderma reesei* suşlarının her birinin ayrı ayrı üreme ve canlılığını devam ettirmesi için patates dekstrozu agar (PDA) hazırlandı. Bu amaçla 39 g PDA tartılıp suda çözülerek hacmi destile su ile 1 L'ye tamamlanarak hazırlanan çözelti otoklavda 121°C'de 20 dakika sterilizasyon işlemine tabi tutuldu. Sterilizasyon işlemi tamamlandıktan sonra otoklavdan alınan besiyeri için doğru uygulama şekli, besiyerinin 45°C'a soğutulması ve bu sıcaklıkta petri kutularına dökülmesidir. Bu amaçla hazırlanan besiyeri 45°C'a ayarlı su banyosuna alındı. Su banyosunda ısı alışverişi ile besiyerinin sıcaklığı 45°C dökme sıcaklığına geldiğinde besiyeri çözeltisi petri kutularına pay edildi ve soğumaya bırakıldı. Katılaşan besiyerleri kullanılıncaya kadar +4°C'da buzdolabında saklandı (şekil 5.2).

Yatık besiyeri için petrilere kullanılan PDA katı besiyeri çözeltisi hazırlanarak her tp için yaklaşık 15 mL olacak şekilde tüplere pay edildi. Kapakları kapatılarak otoklavda 121°C'da 20 dakika sterilize edildi. Sterilizasyon işlemi tamamlandıktan sonra tüpler yatık konuma getirilerek soğumaya bırakıldı. Katılaşan besiyerleri kullanılıncaya kadar +4°C'da buzdolabında saklandı (şekil 5.2).



şekil 5.2 Hazırlanan katı besiyerleri

5.4.2 K f Suşlarının  retilmesi

K f suşlarının üretilmesi için Bölüm 5.4.1'de petrilere hazırlanan katı besiyerleri kullanıldı. Her bir petri kabına steril bir öze yardımıyla üretilmek istenilen k f suşunun agarından kesilen ufak bir parça ekildi. Ekimi tamamlanmış petri kapları 30 C'a ayarlı etüvde 7 gün inkübe edildi. Sporlanması tamamlanan petri kaplarının ağızları parafilm ile kapatılarak 4 C'de buzdolabında saklandı. Bu işlem taze sporlara ihtiyaç duyuldukça tekrarlandı. 4 C'lik buzdolabında saklanan k f suşları ayda bir taze besiyerlerine aktarılarak k f suşlarının canlılığını sürdürmesi sağlandı.

Yatık besiyerinin hazırlanması için her bir yatık besiyerine steril bir öze yardımıyla üretilmek istenilen k f suşunun agarından alınan sporlar çizme metodu ile ekildi. Ekimi tamamlanmış yatık besiyerleri 30 C'a ayarlı etüvde 7 gün inkübe edildi. Sporlanması tamamlanan yatık besiyerlerinin ağızları parafilm ile kapatılarak 4 C'de buzdolabında saklandı. Bu işlem taze sporlara ihtiyaç duyuldukça tekrarlandı. 4 C'lik buzdolabında saklanan k f suşları ayda bir taze yatık besiyerlerine aktarılarak k f suşlarının canlılığını sürdürmesi sağlandı.

Yapılan tüm işlemler *Hypocrea jecorina* saf kültürü ve *Trichoderma reesei* 1A mutant suşu için belirtilen sırada ayrı ayrı gerçekleştirildi.

5.4.3 Sıvı Besiyeri

Çalışmada glutaminaz enziminin gerçekleştirileceği sıvı besiyeri ortamı, El-Sayed (El-Sayed [28]) tarafından geliştirilen fermente ortamı modifiye edilip hazırlanarak kullanıldı. Sıvı besiyeri ortamı şu maddeleri içermektedir:

% 1 Glukoz

% 0.1 KH₂PO₄

% 0.05 MgSO₄.7H₂O

% 0.05 KCl

% 5 NaCl

% 1 L-glutamin

Besiyeri bileşenleri Bölüm 5.3.2’de belirtildiği şekilde hazırlanan çözelti 121°C’de 20 dakika sterilize edildi. Sterilizasyon işlemi sonunda sıvı besiyeri içeren erlenler 30°C’ye ayarlı su banyosunda 30 dakika inkübe edilerek her iki türün 2 mL’lik saf kültürü/100mL sıvı besiyeri olacak şekilde erlenlere eklenerek çalkalamalı inkübatörde 30°C’de 150 rpm’de inkübe edildi (Şekil 5.3).



Şekil 5.3 Hazırlanan sıvı besiyerleri

5.4.3.1 Substrat konsantrasyonunun etkisi

Bölüm 5.4.3’de belirtilen modifiye sıvı besiyerinin hazırlanmasında yer alan substrat konsantrasyonunun belirlenmesi için %1 ile %4 arasında L-glutamin konsantrasyonuna sahip olacak şekilde sıvı besiyerleri hazırlanarak substrat konsantrasyonunun enzim üretimi üzerine etkisi yapılan aktivite tayinleri ile gerçekleştirildi.

5.4.3.2 Tuz konsantrasyonunun etkisi

Bölüm 5.4.3’de belirtilen modifiye sıvı besiyerinin hazırlanmasında yer alan tuz konsantrasyonunun belirlenmesi için %0 ile %15 arasında tuz konsantrasyonuna sahip olacak şekilde sıvı besiyerleri hazırlanarak tuz konsantrasyonunun enzim üretimi üzerine etkisi yapılan aktivite tayinleri ile gerçekleştirildi.

5.5 Bradford Yöntemi ile Protein Miktar Tayini

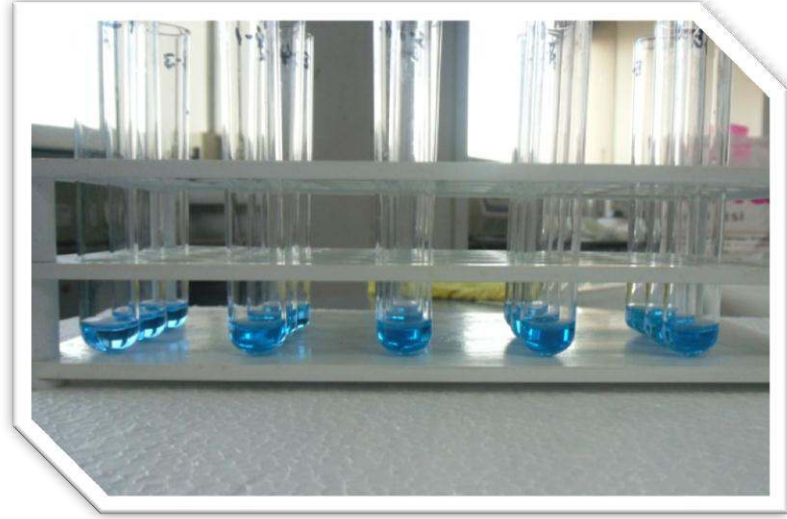
Her iki suştan elde edilen glutaminaz enziminin protein miktarı Bradford yöntemi (Bradford [93]) kullanılarak belirlendi. Yaygın olarak kullanılan bu yöntem, organik boyaların, proteinlerin asidik ve bazik gruplarıyla etkileşerek renk oluşturmasını esas alır. Boya bağlama temelli yöntemlerin en yaygını, Bradford tarafından geliştirilen ve Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının kullanıldığı yöntemdir. Bu boya kuvvetli bir asitte çözündüğü zaman, protonlanmadan dolayı kırmızı-kahverengi arası bir renk alır. Bu boya, (+) yüklü bir proteine bağlandığında ise renk maviye dönüşür. Oluşan rengin UV – Görünür bölge spektrofotometrisinde, 595 nm’de absorbansı ölçülerek protein tayini gerçekleştirilir [94].

Protein standart grafiğinin çizilmesi için bovin serum albuminin (BSA) 1.0 mg/mL’lik stok çözeltisi hazırlandı. Elde edilen stok çözeltinin seyreltilmesi ile 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 ve 1.0 mg/L’lik standart çözeltileri hazırlandı.

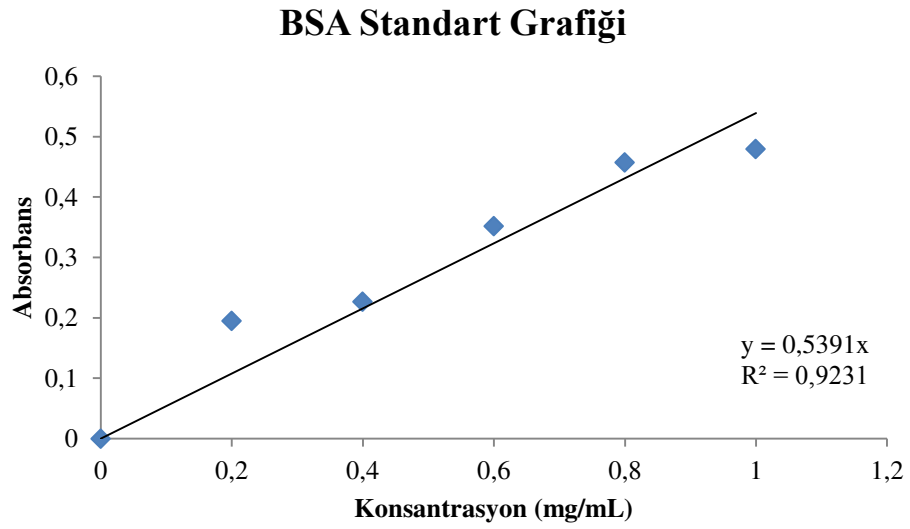
Çizelge 5.1 Bradford yönteminde kullanılan BSA çözeltilerinin hazırlanması

BSA Standart Çözeltileri (mg/mL)	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
<i>BSA (Stok Çözelti), µL</i>	200	400	600	800	1000
<i>Destile su, µL</i>	800	600	400	200	-

Çizelge 5.1’de belirtildiği şekilde hazırlanan standart BSA çözeltilerinin her birinden 800’er µL alınıp üzerine 200’er µL Bradford reaktifi ilave edildikten sonra her biri için ayrı ayrı 595 nm dalga boyunda UV spektrofotometresinde absorbans ölçümü yapıldı (Şekil 5.4) [95]. BSA konsantrasyonlarına karşı elde edilen absorbans değerleri grafiğe geçirilerek standart eğrisi çizildi (Şekil 5.5). Her bir BSA konsantrasyonu için işlem üç defa tekrarlandı.



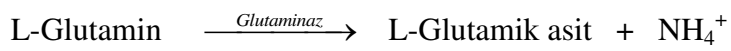
Şekil 5.4 Bradford reaktifi ilave edildikten sonra farklı konsantrasyonlarda BSA çözeltilerinin genel görünümü



Şekil 5.5 Bovin serum albumin (BSA) standart grafiği

5.6 Enzim Aktivitesi Tayini

Glutaminaz enzimi, substratı olan L-glutaminin glutamat ve NH_4^+ iyonlarına dönüşümünü katalizlemektedir.



Çalışmamızda *Hypocrea jecorina* saf kültürü ve *Trichoderma reesei* 1A mutant suşundan üretmiş olduğumuz glutaminaz enziminin aktivitesini belirlemek için enzimin reaksiyonu sonucu oluşan NH_4^+ iyonlarının ölçümüne dayalı metod kullanılmıştır (İmada vd [40]).

Bu amaçla, 0.5 mL 0.04M L-glutamin çözeltisine 0.5 mL 0.1M fosfat tamponu (pH 8.0), 0.5 mL destile su ve 0.5 mL üretilen enzim homojenatı eklenerek hazırlanan çözelti enzimatik reaksiyonun gerçekleşmesi için 37°C’da 30 dakika inkübe edildi. Reaksiyon 0.5 mL 1.5M TCA eklenerek durduruldu. Bu karışımdan alınan 0.1 mL’lik çözelti 3.7 mL destile suya eklendikten sonra bu çözeltiye 0.2 mL Nessler reaktifi ilave edildi. Enzimatik reaksiyon sonucu oluşan NH_4^+ iyonları ile Nessler reaktifinin etkileşmesi için 10 dakika bekletildikten sonra oluşan renk şiddeti 450 nm’de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Olay Çizelge 5.2’ de özetlenmiştir.

Çizelge 5.2 Glutaminaz aktivitesinin belirlenmesi için izlenen yol

	Kör	Numune Çözeltisi
1. Aşama	0.5 mL 0.04M L-Glutamin	0.5 mL 0.04M L-Glutamin
	0.5 mL 0.1M fosfat tamponu (pH 8.0)	0.5 mL 0.1M fosfat tamponu (pH 8.0)
	0.5 mL destile su	0.5 mL destile su
	0.5 mL destile su	0.5 mL enzim homojenatı
	37°C’da 30 dakika inkübasyon ve 0.5 mL 1.5M TCA ilavesi	
2. Aşama	0.1 mL karışım	0.1 mL karışım
	3.7 mL destile su	3.7 mL destile su
	0.2 mL Nessler reaktifi	0.2 mL Nessler reaktifi
10 dakika inkübasyon ile reaksiyonun gerçekleşmesi sağlanarak 450 nm’de absorbans ölçümü yapıldı.		

5.7 Amonyum Standart Grafiğinin Çizilmesi

Glutaminaz enziminin aktivitesini belirlemek için enzimatik reaksiyon sonucu oluşan NH_4^+ iyonlarının miktarının belirlenmesi gerekir. Bu amaçla, amonyum standart grafiği çizilerek enzim aktivitesinin sayısal değeri bulunabilir. Amonyum standart grafiğinin çizilmesi için 1.0 mg/mL'lik amonyum klorür (NH_4Cl) stok çözeltisi hazırlandı. Elde edilen stok çözeltinin seyreltilmesi ile 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 ve 1.0 mg/mL'lik standart çözeltileri hazırlandı (Çizelge 5.3).

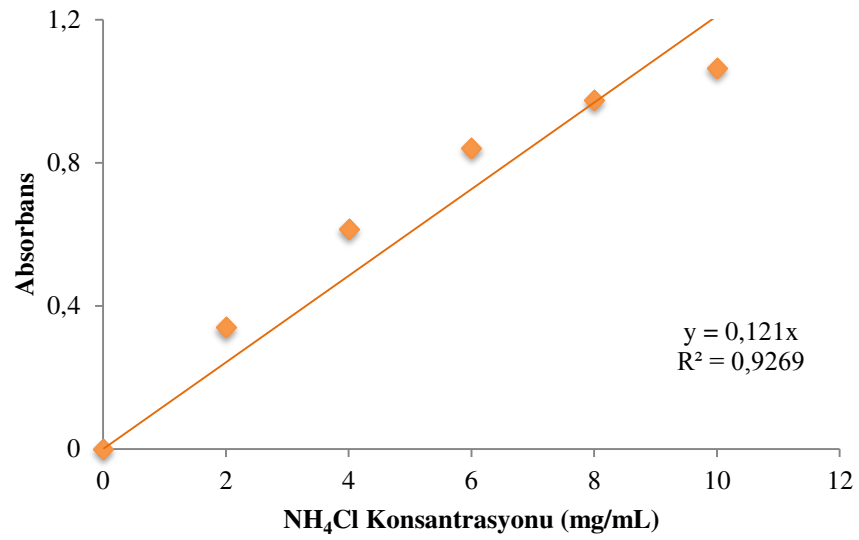
Çizelge 5.3 Amonyum klorür (NH_4Cl) standart çözeltilerinin hazırlanması

NH_4Cl Standart Çözeltileri (mg/mL)	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
<i>NH_4Cl (Stok Çözelti), μL</i>	200	400	600	800	1000
<i>Destile su, μL</i>	800	600	400	200	-

Çizelge 5.3'de belirtildiği şekilde hazırlanan standart amonyum klorür çözeltilerinin her birinden 0.1 mL alınıp üzerine 3.7 mL destile su ve 0.2 mL Nessler reaktifi ilave edildikten sonra reaksiyonun gerçekleşmesi için 10 dakika bekletildi (Şekil 5.6). 3.8 ml destile su ve 0.2 ml Nessler reaktifinden oluşan köre karşı her biri için ayrı ayrı 450 nm dalga boyunda UV spektrofotometresinde absorbans değerleri ölçüldü [40]. Amonyum klorür konsantrasyonuna karşı elde edilen absorbans değerleri grafiğe geçirilerek standart eğrisi çizilmiştir (Şekil 5.7). Her bir NH_4Cl konsantrasyonu için işlem üç defa tekrarlandı.



Şekil 5.6 Standart grafiği için kullanılan farklı konsantrasyondaki NH_4Cl çözeltileri



Şekil 5.7 Amonyum klorür standart grafiği

5.8 Optimum pH'nın Belirlenmesi

Her enzim için aktivitenin maksimum olduğu bir pH değeri vardır. Bu değerin altında ve üzerinde aktivite düşer. Enzimlerin maksimum aktivite gösterdiği pH değerine o enzimin optimum pH değeri denir.

Optimum pH değerinin belirlenmesi için pH aralığı 5.0 ile 9.0 arasında değişen tampon çözeltiler hazırlanarak aktivite tayini bu pH'larda gerçekleştirildi. Tampon çözelti olarak $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 'den oluşan fosfat tamponu kullanıldı. Farklı pH'lara sahip fosfat tamponlarının hesaplamaları Handerson-Hasselbalch eşitliğinden yararlanılarak hesaplandı (Eşitlik 5.1) ve NaH_2PO_4 ve Na_2HPO_4 miktarları Çizelge 5.4'de verildi.

Çizelge 5.4 Farklı pH'da fosfat tamponu hazırlamak için gerekli miktarlar

pH	NaH_2PO_4 , mL (0.1M)	Na_2HPO_4 , mL (0.1M)
5.0	99	1
6.0	94	6
7.0	62	38
8.0	14	86
9.0	2	98

pH etkisinin gözlenmesi için Çizelge 5.2'de enzim aktivitesi tayini esnasında kullanılan tüm destile su ifadeleri yerine analizi gerçekleştirilen pH'daki tampon çözeltiler kullanıldı.

5.9 Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

Her enzim için aktivitenin maksimum olduğu bir sıcaklık değeri vardır. Bu değerin altında ve üzerinde aktivite düşer. Enzimlerin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerine o enzimin optimum sıcaklık değeri denir.

Optimum sıcaklığın belirlenmesi için sıcaklık aralığı 20°C ile 70°C arasında değişen sıcaklık değerlerinde glutaminaz enziminin aktivite tayini gerçekleştirildi.

5.10 Enzimin Termal Kararlılığı

Enzimin termal kararlılığının tayini için her bir mikroorganizmadan elde edilen enzim homojenatı 25°C ile 80°C arasındaki sıcaklıklarda ayrı ayrı bekletilerek toplam 45 dakika süresince her 15 dakikada bir örnek alınarak glutaminaz enziminin aktivite tayini yapılarak elde edilen sonuçlar grafiğe geçirildi.

5.11 Enzimin Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

Enzimin maksimum hızı (v_{max}) ve Michaelis-Menten sabiti K_M 'nin bulunması için kinetik çalışmalar 10 ile 100 mM'lık glutamin çözeltileri (pH 8.0) kullanılarak yapılmıştır. Her konsantrasyona karşılık enzimin aktivitesinin belirlenmesi için spektrofotometrik olarak absorbansları kaydedilmiştir. Her bir absorbans değerine karşılık aktivite değerleri Şekil 5.7'den faydalanılarak hesaplanmıştır. Aktivite değerleri Lineweaver-Burk grafiğinde (1/Ünite'ye karşı 1/[S]) yerine konularak buradan K_M ve v_{max} değerleri bulunmuştur (Lineweaver ve Burk [96]).

5.12 Depolama Kararlılığı

Sıvı besiyerinde üretilen enzim süzülerek enzim homojenatı elde edildi. Elde edilen homojenat -10°C'da depolandı. Depolama kararlılığının belirlenebilmesi için 30 gün boyunca periyodik olarak aktivite tayini yapıldı.

5.13 Formüller ve Hesaplamalar

5.13.1 Protein Miktarının Hesaplanması

Şekil 5.5’de ki BSA standart grafiği kullanılarak mL’deki protein miktarları aşağıdaki denklem yardımıyla hesaplandı.

mg/mL Protein Miktarı Hesabı:

$$\text{Absorbans} = 0.5391 \times \text{BSA Konsantrasyonu (mg/mL)}$$

5.13.2 Enzim Aktivitesinin Hesaplanması

Bir ünite (U) glutaminaz aktivitesi; standart koşullar altında bir dakikada glutaminden 1 µmol amonyum iyonu açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlandı ve enzim aktivitesi total ünite olarak U/mL cinsinden ifade edildi.

mg/mL Amonyum Miktarı Hesabı:

$$\text{Absorbans} = 0.121 \times \text{NH}_4\text{Cl Konsantrasyonu (mg/mL)}$$

Şekil 5.7’deki standart NH₄Cl eğrisi kullanılarak bulunan amonyum iyonu konsantrasyonu aşağıdaki denklemde yerine yazılarak total ünite değeri (U/mL) hesaplandı.

$$\text{Total Ünite (U/mL)} = [(\text{mg amonyum iyonu/mL} \times 1000) / (t \times M_A)]$$

mg amonyum iyon/mL: Numunelerin absorbanslarına karşılık gelen amonyum iyonu miktarı

t : İnkübasyon zamanı (30 dakika)

M_A : Açığa çıkan amonyum iyonunun molekül kütlesi (18 g/mol)

5.13.3 Spesifik Aktivitenin Hesaplanması

Total ünite değerleri mL’deki protein miktarına bölünerek spesifik aktivite hesaplandı. Spesifik aktivite U/mg protein olarak verildi.

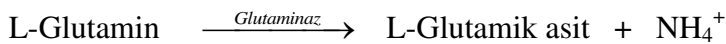
ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

6.1 Giriş

Glutaminaz enzimi, azot metabolizmasında önemli bir role sahiptir. Son yıllarda terapötik ve endüstriyel kullanım alanlarından dolayı bu enzime olan ilgi oldukça artmıştır. Terapötik açıdan antilösemik ajan olarak görev almasının yanısıra fermente gıdalarda da tat artırıcı özellik göstermekte rolü bulunmaktadır. Glutaminaz aktivitesi yaygın olarak bitkilerde, hayvansal dokularda ve bakteri, maya ve küfleri kapsayan mikroorganizmalarda gözlenmiştir.

Hypocrea jecorina saf kültüründen ve *Trichoderma reesei* 1A mutant suşundan glutaminaz enziminin mikrobiyal olarak üretimi, üretilen enzimin optimum koşullarının belirlenmesi ve kinetik parametrelerinin hesaplanması hedeflenmiştir.

Glutaminaz enzimi glutamini glutamik asit ve amonyum iyonuna dönüştüren reaksiyonu katalizleyen önemli bir enzimdir.



Glutaminaz enziminin aktivitesinin belirlenmesinde yukarıdaki reaksiyon sonucu açığa çıkan amonyum iyonlarının ölçümü esas alınmıştır.

6.2 *Hypocrea jecorina* saf kültürü ve *Trichoderma reesei* 1A Mutantından Glutaminaz Enzim Homojenatı Eldesi

Glutaminaz enziminin üretimi için Bölüm 5.4.3’de anlatıldığı gibi karbon kaynağı olarak %1 glukoz ihtiva eden, %0.1 KH_2PO_4 , %0.05 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, %0.05 KCl, %5 NaCl ve enzim üretimi için substrat olarak %1 L-glutamin eklenerek sıvı besiyeri oluşturulmuştur. Elde edilen çözelti otoklav ile sterilizasyon işlemine tabi tutulduktan sonra Bölüm 5.4.1’de anlatıldığı şekilde elde edilen *Hypocrea jecorina* saf kültürü ve *Trichoderma reesei* 1A mutant suşu sterilize olmuş besiyerlerine ayrı ayrı her 100 mL’lik hacme 2 mL mikroorganizma olacak şekilde aşılانmıştır. Aşılama işlemi sonrası besiyeri barındıran erlenler 30°C sıcaklığa ve 150 rpm çalkalama hızına sahip inkübatöre yerleştirilerek 7 gün inkübe edilmiştir.

İnkübasyon işlemi sonunda erlenlerin içerisinde yer alan besiyerleri süzöldükten sonra elde edilen çözelti enzim homojenatı olarak adlandırılmış ve enzim aktivitesi, spesifik aktive, optimum pH, optimum sıcaklık, enzim kinetiğı çalışılmalarının yürütölmesi için kullanılmıştır. Analiz çalışmalarında kullanılacak enzim homojenatı +4°C’da, kullanılmayan ise -10°C’da buzdolabında depolanmıştır.

6.3 Enzim Aktivitesi Tayini

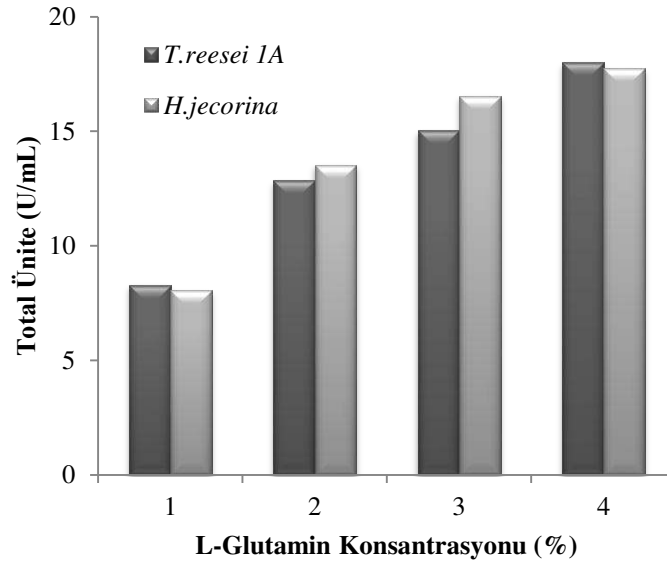
Bölüm 5.6’da anlatıldığı şekilde glutaminaz enzimi aktivitesi, glutaminaz enziminin reaksiyonu sonucu açığa çıkan NH_4^+ iyonlarının Nesslerizasyon reaksiyonu sonucu tayini esasına dayanmaktadır [40]. Tayin, 450 nm’de spektrofotometrik olarak her bir mikroorganizmadan elde edilmiş enzim homojenatı için ayrı ayrı belirlenmiştir. Bölüm 5.5’de belirtildiğı şekilde Bradford metodu (Bradford [93]) kullanılarak protein miktarları belirlenmiş, mg protein başına düşen aktivite değeri hesaplanarak her iki mikroorganizma türünden elde edilen glutaminaz enzimi için spesifik aktivite miktarları tayin edilmiştir. Tüm hesaplamalar, spektrofotometrik olarak elde edilen absorbans değeri Bölüm 5.13’te belirtilen formüller kullanılarak hesaplanmış ve elde edilen değeri Çizelge 6.1’de sunulmuştur.

Çizelge 6.1 *Hypocrea jecorina* saf kültürü ve *Trichoderma reesei* 1A mutant suşundan elde edilen enzim homojenatı sayısal parametreleri

Enzim Homojenatı	NH ₄ ⁺ miktarı (mg/mL)	Aktivite (U/mL)	Protein Miktarı (mg protein/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)
<i>H. jecorina</i>	7.42	13.75	0.341	40.32
<i>T. reesei</i>	7.98	14.78	0.375	39.41

6.4 Substrat Konsantrasyonunun Enzim Üretimi Üzerine Etkisi

Substrat konsantrasyonunun *Hypocrea jecorina* saf kültürü ve *Trichoderma reesei* 1A mutant suşu ile elde edilmesi hedeflenen glutaminaz enzimi üretimi üzerine etkisini belirleyebilmek için Bölüm 5.4.3’de belirtilen sıvı besiyerine %1 ile %4 arasında farklı konsantrasyonlarda L-glutamin ilave edilerek enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda alınan örneklerin Bölüm 5.6’da belirtildiği şekilde aktivite tayinleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar substrat miktarına (%) karşı total ünite (U/mL) değerleri grafiğe geçirilmiştir (Şekil 6.1).

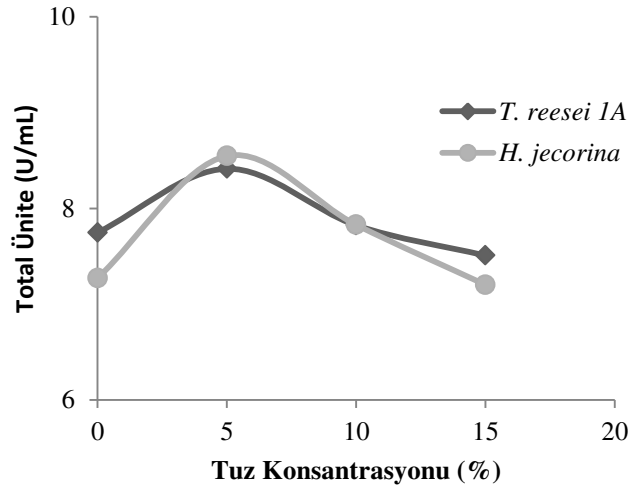


Şekil 6.1 Farklı L-glutamin konsantrasyonlarında *Hypocrea jecorina* saf kültürü ve *Trichoderma reesei* 1A mutant suşundan elde edilen glutaminaz enzim miktarları

Şekil 6.1 incelendiğinde, ortama eklenen substrat miktarı arttıkça glutaminaz enzim aktivitesinin de arttığı görülmektedir. Ortama karbon kaynağı olarak eklenen glukozun tüketilmesinden sonra mikroorganizmalar glutamine yönelmiş, onu hem karbon hem de ihtiva ettiği iki azot atomundan dolayı azot kaynağı olarak kullanmış ve glutaminaz enziminin üretimini gerçekleştirmiştir.

6.5 Tuz Konsantrasyonunun Enzim Üretimi Üzerine Etkisi

Hypocrea jecorina saf kültürü ve *Trichoderma reesei* 1A mutant suşu kullanılarak yapılan glutaminaz enzimi üretimi üzerine ortama ilave edilen tuz konsantrasyonunun etkisini belirlemek için Bölüm 5.4.3’de belirtilen sıvı besiyerine %0 ile %15 arasında farklı konsantrasyonlarda tuz ilave edilerek enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda alınan örneklerin Bölüm 5.6’da belirtildiği şekilde aktivite tayinleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar tuz konsantrasyonuna (%) karşı total ünite (U/mL) değerleri grafiğe geçirilmiştir (Şekil 6.2).



Şekil 6.2 *Hypocrea jecorina* saf kültürü ve *Trichoderma reesei* 1A mutant suşundan üretilen glutaminaz enzim aktivitesine karşı değişen tuz konsantrasyonlarının etkisi

Şekil 6.2 incelendiğinde, ortama %5’lik tuz ilave edildiğinde her iki türden üretilen enzim aktivitesinin en yüksek olduğu görülmüş, %5’ten daha yüksek tuz konsantrasyonlarında aktivite her iki tür için de düşmüştür. %15’lik tuz miktarında *T. reesei* 1A mutant suşundan üretilen enzimin aktivitesinin *H. jecorina*’dan üretilen enzim aktivitesine göre daha yüksek olduğu görülmektedir.

Weingand-Ziadé ve arkadaşları (2003), *Lactobacillus rhamnosus* mikroorganizmasını kullanarak ürettikleri glutaminaz enzimine tuz konsantrasyonunun etkisini incelemek için %0 ile %20 tuz konsantrasyonuna sahip besiyerleri oluşturarak inkübasyon sonucu belirledikleri enzim aktivitesi değerlerini tuz konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirmişler ve üretim için gerekli optimum tuz konsantrasyonunu %2.5 olduğunu belirlemişlerdir [31]. Kashyap ve arkadaşları (2002), sıvı besiyeri ortamını %5 NaCl ihtiva edecek şekilde hazırlamışlardır [1]. Bunun yanı sıra literatürde glutaminaz enziminin üretimi için besiyerleri çözeltileri deniz suyu kullanılarak hazırlanmıştır [24], [27].

6.6 Enzim Aktivitesine Etki Eden Parametreler

6.6.1 pH'nın Etkisi

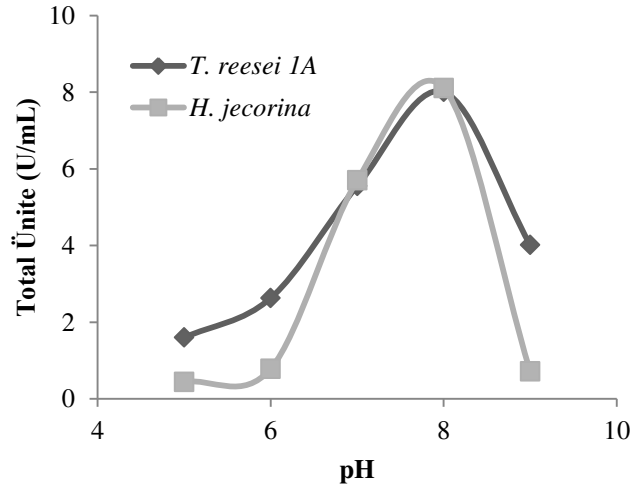
Glutaminaz enziminin aktivitesine pH'nın etkisini incelemek için 5 farklı pH'da (5.0; 6.0; 7.0; 8.0 ve 9.0) tampon çözeltileri hazırlanıp her bir pH değeri için her iki mikroorganizmadan da elde edilen enzim homojenatında aktivite değerleri ölçülmüştür. Elde edilen sayısal değerler Çizelge 6.2 ve Çizelge 6.3'te verilmiş, pH'ya karşı enzim aktivitesi (U/mL) değerleri grafiğe geçirilmiştir (Şekil 6.3).

Çizelge 6.2 *Hypocrea jecorina* saf kültüründen üretilen glutaminaz enziminin farklı pH'larda elde edilen sayısal parametreleri

<i>Hypocrea jecorina</i>				
pH	Absorbans	NH ₄ ⁺ Miktarı (mg/mL)	Total Ünite (U/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)
5.0	0.0291	0.24	0.44	1.29
6.0	0.0514	0.42	0.79	2.29
7.0	0.3724	3.08	5.69	16.58
8.0	0.5296	4.38	8.11	23.57
9.0	0.0467	0.39	0.71	2.08

Çizelge 6.3 *Trichoderma reesei* 1A mutant suşundan üretilen glutaminaz enziminin farklı pH'larda elde edilen sayısal parametreleri

<i>Trichoderma reesei</i> 1A				
pH	Absorbans	NH ₄ ⁺ Miktarı (mg/mL)	Total Ünite (U/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)
5.0	0.1045	0.86	1.60	4.84
6.0	0.1719	1.42	2.63	7.99
7.0	0.3629	2.99	5.55	16.87
8.0	0.5230	4.32	8.01	24.31
9.0	0.2624	2.17	4.02	12.19



Şekil 6.3 *Hypocrea jecorina* saf kültürü ve *Trichoderma reesei* 1A mutant suşundan elde edilen glutaminaz enzim aktivitesine pH'nın etkisi

Çizelge 6.2, Çizelge 6.3 ve Şekil 6.3'te görüldüğü gibi, pH 8.0'a kadar glutaminaz enziminin aktivite değeri kademeli olarak artmıştır. pH 8.0'den sonra aktivite keskin bir düşüş göstermiştir. Dolayısıyla her iki mikroorganizma türünden elde edilen enzimin optimum çalışma pH'sı 8.0 olarak seçilmiştir.

Jeya Parakash ve arkadaşları (2010) da *Vibrio* sp. mikroorganizmasını kullanarak ürettikleri glutaminaz enziminin optimum pH değerini 8.0 olarak belirtmiştir [47]. Durá ve arkadaşları (2004), *Debaryomyces* spp. mikroorganizmasından ürettikleri glutaminaz

enziminin pH 7.5–8.5 aralığında aktivite değerlerinin en yüksek olduğunu belirtmişlerdir [54]. Prasanth Kumar ve arkadaşları (2009), *Aspergillus* sp. kullanarak üretimini gerçekleştirdiği glutaminaz enziminin optimum pH'sını 7.0 olarak belirtmişlerdir [24]. Literatürde mikrobiyal olarak üretilen glutaminaz enziminin optimum pH'sının üretilen mikroorganizmaya bağlı olarak pH 7.0 ile 8.0 arasında değişkenlik gösterdiği bulgularla desteklenmiştir [24], [47], [54].

6.6.2 Sıcaklığın Etkisi

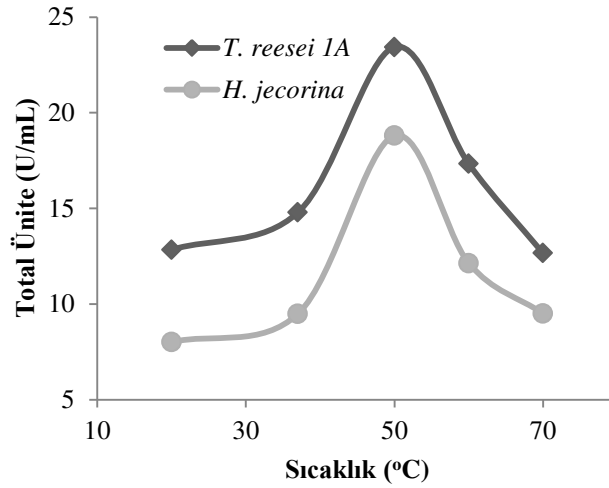
Glutaminaz enzim aktivitesine sıcaklığın etkisini araştırmak için 5 farklı sıcaklıkta (20, 40, 50, 60 ve 70°C) ve enzimin optimum pH değerinde enzim aktivitesi tayini gerçekleştirilmiştir. Optimum koşullarda hazırlanmış olan çözeltiler belirtilen sıcaklarda 30 dakika inkübe edilerek her bir mikroorganizma türünden üretilen enzim aktivitesi belirlenmiştir. Elde edilen sayısal değerler Çizelge 6.4 ve Çizelge 6.5'de verilmiş, sıcaklığa (°C) karşı enzim aktivitesi (U/mL) değerleri grafiğe geçirilmiştir (Şekil 6.4).

Çizelge 6.4 *Hypocrea jecorina* saf kültüründen üretilen glutaminaz enziminin farklı sıcaklıklarda elde edilen sayısal parametreleri

<i>Hypocrea jecorina</i>				
Sıcaklık	Absorbans	NH ₄ ⁺ Miktarı (mg/mL)	Total Ünite (U/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)
20	0.5235	4.33	8.01	43.11
40	0.6198	5.12	9.49	51.04
50	1.2285	10.15	18.80	101.16
60	0.7931	6.55	12.14	65.31
70	0.6212	5.13	9.51	51.15

Çizelge 6.5 *Trichoderma reesei* 1A mutant suşundan üretilen glutaminaz enziminin farklı sıcaklıklarda elde edilen sayısal parametreleri

<i>Trichoderma reesei</i> 1A				
Sıcaklık	Absorbans	NH ₄ ⁺ Miktarı (mg/mL)	Total Ünite (U/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)
20	0.8391	6.93	12.84	34.22
40	0.9661	7.98	14.79	39.40
50	1.5312	12.65	23.43	62.45
60	1.1325	9.36	17.33	46.19
70	0.8273	6.84	12.66	33.74



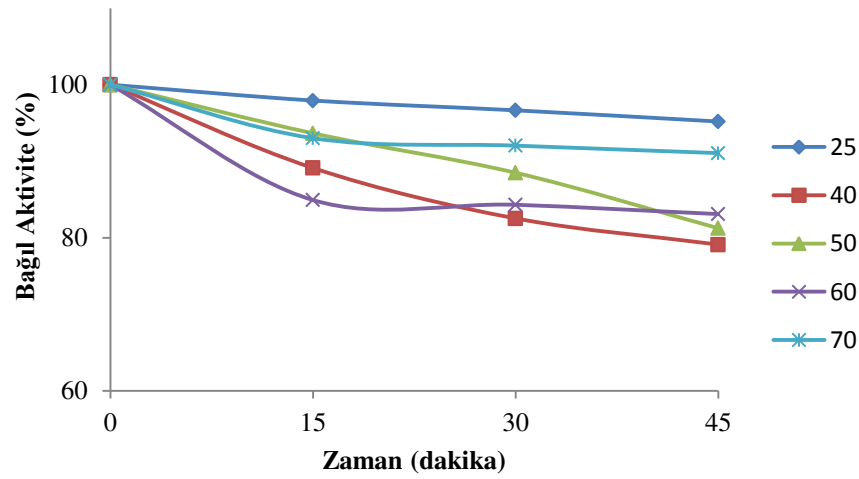
Şekil 6.4 *Hypocrea jecorina* saf kültürü ve *Trichoderma reesei* 1A mutant suşundan üretilen glutaminaz enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi

Çizelge 6.4, Çizelge 6.5 ve Şekil 6.4'te görüldüğü gibi, her iki türden üretilen glutaminaz enziminin aktivitesi 50°C'ye kadar artmış, 50°C'den sonra enzim aktivitesi hızla düşmüştür. Her iki glutaminaz enzimi için optimum sıcaklık değeri 50°C olarak belirlenmiştir.

Weingand-Ziadé ve arkadaşları (2003), *Lactobacillus rhamnosus* mikroorganizmasından ürettikleri glutaminaz enzimine sıcaklığın etkisini incelemişler ve enzimin 50°C’de maksimum aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir [31]. Enzimin yüksek sıcaklıklarda aktivite değerini kaybetmemesi, aksine 50°C sıcaklıkta maksimum aktivite göstererek termal kararlılık göstermesi glutaminaz ile geniş sıcaklık aralığında çalışma alanı yaratması bakımından çok önemlidir.

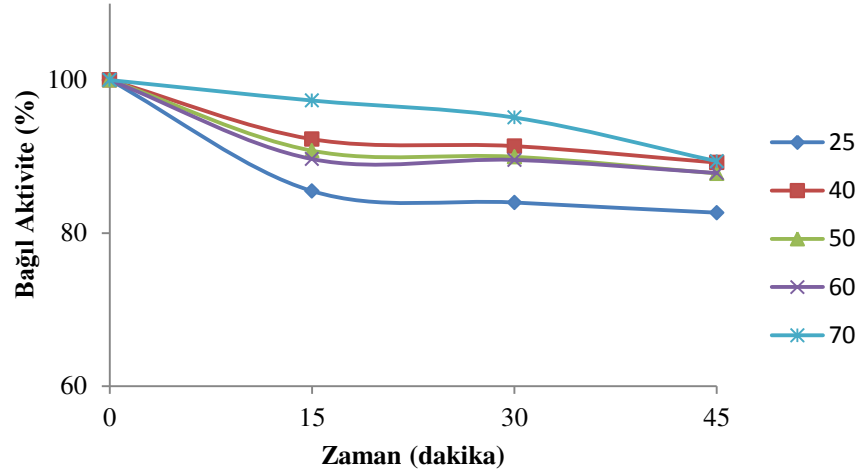
6.7 Enzim Termal Kararlılığı

Bölüm 5.10’da anlatıldığı şekilde yapılan termal kararlılık çalışmalarında elde edilen sonuçlar zamana karşı bağıl aktivite cinsinden grafiğe alınmıştır (Şekil6.5 ve Şekil 6.6).



Şekil 6.5 *Hypocrea jecorina*’dan üretilen glutaminaz enziminin termal kararlılığı

Grafikten, enzimin yüksek sıcaklıklarda zamanla aktivite değerlerinde meydana gelen değişimler görülmektedir. Yüksek sıcaklıklara çıkıldıkça enzim aktiviteleri arasındaki farkların az olması enzimin termal kararlılığının yüksek olduğunu ifade etmektedir. Şekil 6.5 incelendiğinde 40°C’den itibaren 15. dakikada glutaminaz aktivitesinde yaklaşık %10’luk bir azalma dışında sıcaklık arttıkça zamanla enzim aktivitesinde önemli bir azalma görülmemektedir.



Şekil 6.6 *T.reesei*'den üretilen glutaminaz enziminin termal kararlılığı

Şekil 6.6 incelendiğinde enzimin yüksek sıcaklıklarda zamanla aktivite değerlerinde meydana gelen değişimler görülmektedir. Yüksek sıcaklıklara çıkıldıkça enzim aktiviteleri arasındaki farkların az olması *Trichoderma reesei* 1A mutant suşundan üretilen enzimin termal kararlılığının yüksek olduğunu ifade etmektedir.

Weingand-Ziadé ve arkadaşları (2003), *Lactobacillus rhamnosus* mikroorganizmasından ürettikleri glutaminaz enziminin termal kararlılığını 45°C'den 75°C'ye kadar 100 dakika boyunca 20 dakikalık periyotlarla analiz edip grafiğe geçirmişlerdir. Çalışma sonucunda 75°C'da 15 dakika inkübasyon sonucunda enzimin tamamen inhibe olduğunu belirtmişlerdir [31]. Çalışmamızda 70°C'a kadar yapılan ölçümlerde 45 dakika sonucunda enzim aktivitesinde önemli bir kayıp görülmemiştir. Bu da mikrobiyal üretimini gerçekleştirdiğimiz glutaminaz enziminin termal kararlılığının oldukça yüksek olduğunu göstermektedir. Bu durum enzimle çalışılan biyoanalitik çalışmalarda, özellikle enzim temelli biyosensör hazırlanması çalışmalarında büyük önem taşımaktadır.

6.8 Enzim Kinetiği

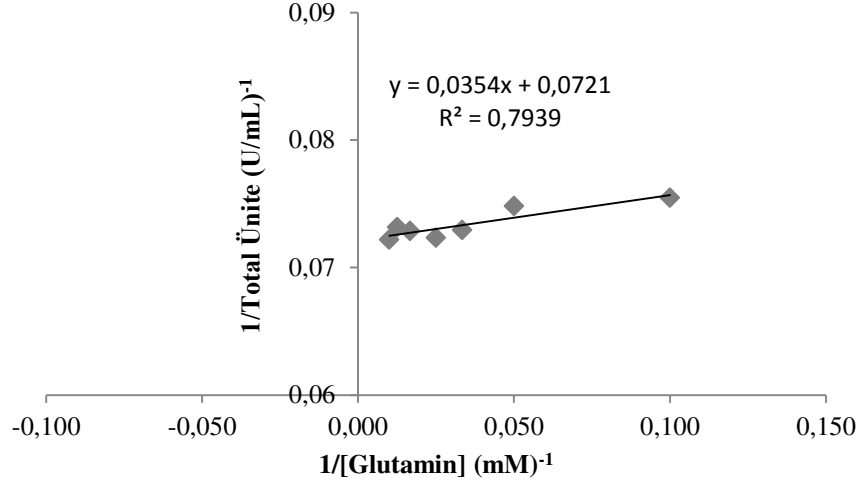
Biyokimyasal reaksiyonlar için enzimlerin kinetik parametrelerinin (K_M ve v_{max} değerleri) belirlenmesi, enzimle yapılan çalışmaları hakkında önemli bilgi sağlaması bakımından çok önemlidir [97].

Maksimum hız, v_{max} , enzimatik katalizin ulaşabileceği en yüksek hız değeridir. Enzim bölgeleri substrat ile tam doygunluğa geçince maksimum hıza ulaşır. Michaelis-Menten sabiti, K_M , en yüksek hız değerinin yarısına ulaşmak için gerekli substrat miktarıdır, enzime ve substrata özgüdür, enzimin substrata olan ilgisini yansıtır. K_M 'si düşük olan bir enzim, substratına yüksek ilgi (affinite) gösterir [97].

Üretilen glutaminaz enziminin kinetik parametreleri olan v_{max} ve K_M değerlerinin hesaplanması Bölüm 5.11'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Farklı glutamin konsantrasyonlarında glutaminaz enzim aktivitesi belirlenmiş, elde edilen sayısal parametreler Çizelge 6.6 ve Çizelge 6.7'de verilmiştir. $1/[\text{glutamin}] \text{ (mM)}^{-1} - 1/\text{Ünite ((U/mL)}^{-1})$ değerleri grafiğe geçirilerek Lineweaver-Burk grafiği elde edilmiştir (Şekil 6.7 ve Şekil 6.8).

Çizelge 6.6 *Hypocrea jecorina* saf kültüründen üretilen glutaminaz enziminin farklı glutamin konsantrasyonlarında elde edilen sayısal parametreleri

<i>Hypocrea jecorina</i>					
Glutamin Konsantrasyonu (mM)	Absorbans	NH_4^+ Miktarı (mg/mL)	Total Ünite (U/mL)	$1/[\text{Glutamin}] \text{ (mM)}^{-1}$	$1/\text{Total Ünite (U/mL)}^{-1}$
10	0.8658	7.16	13.25	0.100	0.0755
20	0.8733	7.22	13.37	0.050	0.0748
30	0.8960	7.40	13.71	0.033	0.0729
40	0.9034	7.47	13.83	0.025	0.0723
60	0.8969	7.41	13.73	0.017	0.0729
80	0.8932	7.38	13.67	0.013	0.0732
100	0.9052	7.48	13.85	0.010	0.0722

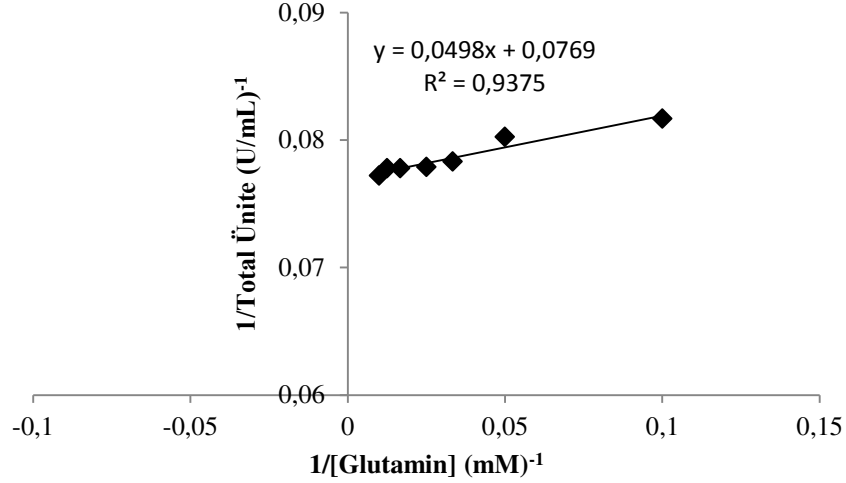


Şekil 6.7 *Hypocrea jecorina*'dan üretilen glutaminaz enziminin Lineweaver-Burk grafiği

Şekil 6.7'de elde edilen grafik kullanılarak K_M ve v_{max} değerleri hesaplanmıştır. Lineweaver-Burk grafiğinde doğrunun y eksenini kestiği ($x=0$) değer ($1/\text{Total Ünite (U/mL)}^{-1}$) $1/v_{max}$ değerine karşılık gelmektedir. Doğrunun x eksenini kestiği ($y=0$) değer ise $-1/K_M$ değerine karşılık gelmektedir. Lineweaver-Burk grafiğinden yararlanılarak bulunan K_M değeri 0.491 mM; v_{max} değeri ise 13.87 U/mL olarak bulunmuştur. K_M değerinin düşük olması glutaminaz enziminin substratı olan glutamine ilgisinin (affinite) yüksek olduğunun bir göstergesidir.

Çizelge 6.7 *Trichoderma reesei* 1A mutant suşunda üretilen glutaminaz enziminin farklı glutamin konsantrasyonlarında elde edilen sayısal parametreleri

<i>Trichoderma reesei</i> 1A					
Glutamin Konsantrasyonu (mM)	Absorbans	NH ₄ ⁺ Miktarı (mg/mL)	Total Ünite (U/mL)	1/[Glutamin] (mM) ⁻¹	1/Total Ünite (U/mL) ⁻¹
10	0.8002	6.61	12.25	0.100	0.0817
20	0.8144	6.73	12.46	0.050	0.0802
30	0.8345	6.90	12.77	0.033	0.0783
40	0.8390	6.93	12.84	0.025	0.0779
60	0.8402	6.94	12.86	0.017	0.0778
80	0.8401	6.94	12.86	0.013	0.0778
100	0.8464	6.99	12.95	0.010	0.0772



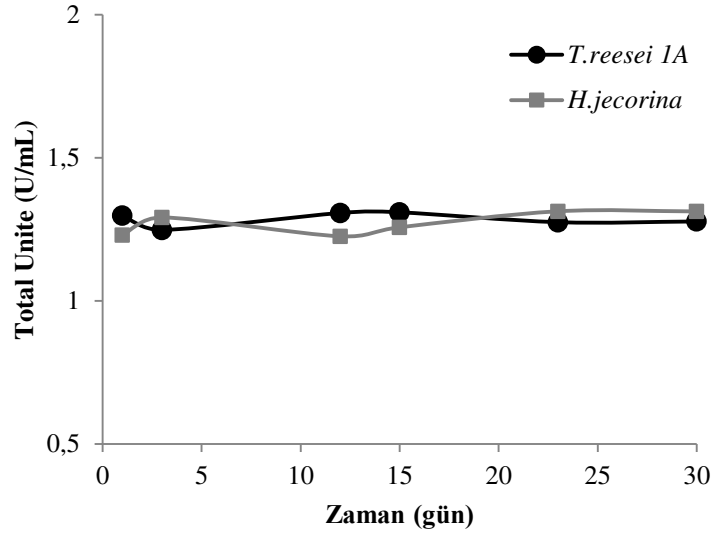
Şekil 6.8 *Trichoderma reesei*'dan üretilen glutaminaz enziminin Lineweaver-Burk grafiği

Şekil 6.8'de elde edilen Lineweaver-Burk grafiğinden yararlanılarak *Trichoderma reesei* 1A mutant suşundan elde edilen glutaminaz enziminin K_M ve v_{max} değerleri hesaplanmıştır. Lineweaver-Burk grafiğinden yararlanılarak bulunan K_M değeri 0.647 mM; v_{max} değeri ise 13.01 U/mL olarak bulunmuştur. K_M değerinin düşük olması nedeniyle *Hypocrea jecorina* saf kültüründen elde edilen enzime göre glutamine olan ilgisi daha düşük olduğu görülmüştür.

Weingand-Ziadé ve arkadaşları (2003), *Lactobacillus rhamnosus* mikroorganizmasından ürettikleri glutaminaz enziminin kinetik parametrelerini çalışmış ve Michaelis-Menten sabiti olan K_M 'yi 4.8 mM, v_{max} değerini ise 101 U/L olarak rapor etmişlerdir [31]. Çalışmamızda her iki mikroorganizma türünden elde edilen K_M değerleri de literatürde yer alan değerden daha küçüktür. Bu da *Hypocrea jecorina* ve *Trichoderma reesei* 1A mikroorganizmalarından elde edilen glutaminaz enziminin substratına olan ilgisinin daha yüksek olduğunu göstermektedir.

6.9 Enzimin Depolanma Süresince Kararlılığı

Hypocrea jecorina ve *Trichoderma reesei* 1A mikroorganizmaları kullanılarak üretimi gerçekleştirilmiş glutaminaz enzim homojenatı +4°C'da 30 gün boyunca aktivite değerleri takip edilerek depolama kararlılığı tayin edilmiştir (Şekil 6.9).



Şekil 6.9 4°C’da depolama şartlarında glutaminaz enzim aktivitesinin zamanla değişimi

Şekil 6.9’den de görüldüğü gibi her iki türden elde edilmiş glutaminaz enziminin 30 gün süresince +4°C’de depolanması sonucunda herhangi bir aktivite kaybı görülmemiştir. Bu durum enzim ile yapılan biyoanalitik çalışmalarda rahatlıkla kullanılabileceğini göstermektedir. Özellikle daha sonrası için planlamış olduğumuz glutaminaz enzim biyosensörü hazırlanması için oldukça avantajlıdır.

SONUÇLAR ve ÖNERİ

Bu çalışmada *Hypocrea jecorina* saf kültüründen ve *Trichoderma reesei* 1A mutant suşundan glutaminaz enziminin mikrobiyal olarak üretimi, üretilen enzimin optimum koşullarının belirlenmesi ve kinetik parametrelerinin hesaplanması hedeflenmiştir.

Hypocrea jecorina saf kültürü ve *Trichoderma reesei* 1A mutant suşu kullanılarak üretilen glutaminaz enziminin optimum pH değeri 8.0, optimum sıcaklığı 50°C olarak belirlenmiş, enzimin termal kararlılığının ve depolama kararlılığının oldukça yüksek olduğu bulunmuştur. Ayrıca her iki mikroorganizmadan üretilen enzimin kinetik parametreleri olan K_M ve v_{max} değerleri Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek hesaplanmıştır.

Yapılan tüm çalışmalarımız amacına ulaşarak, mikrobiyal olarak üretilen glutaminaz enziminin üretim koşullarını, optimum koşullarını ve kinetik parametrelerini zorlanmadan belirledik. Literatürde mikrobiyal olarak glutaminaz üretiminin *Hypocrea jecorina* ve *Trichoderma reesei* mikroorganizmalarıyla üretimi çalışılmamış olması çalışmamızın özgün olduğunu göstermektedir. Sunulan tez çalışmasında üretilen glutaminaz enziminin aktivitesinin, optimum sıcaklığının, termal kararlılığının ve depolama kararlılığının yüksek olması, planlamış olduğumuz, glutamin tayinine yönelik ve glutaminaz enziminin immobilize edilerek biyosensör hazırlanması için temel oluşturması bakımından büyük önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Kashyap P., Sabu A., Pandey A., Szakacs G. ve Soccol C. R., (2002). “Extra-cellular L-glutaminase production by *Zygosaccharomyces rouxii* under solid-state fermentation”, *Process Biochemistry*, 38:307–312.
- [2] Bugg, T. D. H., (2004). *Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry*, İkinci Baskı, Blackwell Publishing.
- [3] Dilsiz, N., (2004). *Moleküler Biyoloji*, Palme Yayıncılık, Ankara.
- [4] Tan, İ., (2008). “Bazı Ağır Metal ve Organik Kirleticilerin Laktat Dehidrogenaz Enzimi Üzerindeki Engelleyici Etkilerinin Belirlenmesi ve Enzim İnhibisyonuna Dayalı Biyosensör Geliştirilmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze.
- [5] Uysal, G., (2006). “Ekmeklik Unlarda Kullanılan Katkı Maddelerinden Hamur Geliştiricilerin, Enzimlerin ve Un Ağartıcıların İncelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
- [6] Champe, P. C., ve Harvey, R. A., (1997). *Lippincott Illustrated Reviews Biochemistry*, İkinci Baskı, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul.
- [7] Telefoncu, A., (1992). *Tıp ve Fen Bilimciler için Biyokimya*, İkinci Baskı, Sermet Matbaası, Kırklareli.
- [8] Mal-Nam, K. ve Kyoung-Hwa, P., (2004). “Immobilization of enzymes for Klebsiella BOD sensor”, *Sensor and Actuators*, 98:1–4.
- [9] Dinçkaya, E., (1997). *Enzimolojiye Genel Bakış:Enzimoloji Konulu Lisansüstü Yaz Okulu Kitabı*, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.
- [10] Jin-Hong W., Zhang, W., ve Shi-Ying X., (2007). “Enzymatic production of bioactive peptides from sericin recovered from silk industry wastewater”, *Process Biochemistry*, 43:480–487.
- [11] Keha, E. ve Küfrevioğlu, İ. (2011). *Biyokimya*, Sekizinci Baskı, Aktif Yayınevi, İstanbul.

- [12] Casiday, R. ve Frey, R., Enzyme-Substrate Binding: Carboxypeptidase; Chemical-Kinetics Experiment,
<http://www.chemistry.wustl.edu/~edudev/LabTutorials/Carboxypeptidase/carboxypeptidase.html>, 15 Mayıs 2012.
- [13] Carr, S. M., Induced-Fit Model of enzyme catalysis,
http://www.mun.ca/biology/scarr/Induced-Fit_Model.html, 16 Mayıs 2012.
- [14] A level Notes, Factors affecting Enzyme Activity,
<http://alevelnotes.com/Enzymes/144#/?id=146>, 13 Mayıs 2012.
- [15] Ulakoğlu Zengin, E., Enzimler, İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Biyokimya ABD.
- [16] BioBeat, Biochem Must Knows,
<http://biobeat.wikispaces.com/01-+Biochem+Must+Knows>, 19 Mayıs 2012.
- [17] Hogg, S., (2005). Essential Microbiology, John Wiley, West Sussex.
- [18] Vikipedi Özgür Ansiklopedi, Enzim Kinetiği,
http://tr.wikipedia.org/wiki/Enzim_kineti%C4%9Fi, 05 Mayıs 2012.
- [19] GenomeNet, Glutaminase,
http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ec:3.5.1.2, 19 Mayıs 2012.
- [20] Enzyme Data Base, Glutaminase,
<http://www.enzyme-database.org/query.php?ec=3.5.1.2>, 19 Mayıs 2012.
- [21] Brenda, Glutaminase,
http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.5.1.2, 19 Mayıs 2012.
- [22] Brown, G., Singer, A., Proudfoot, M., Skarina, T., Kim, Y., Chang, C., Dementieva, I., Kuznetsova, E., Gonzalez, C. F., Joachimiak, A., Savchenko, A. ve Yakuninn, A. F., (2008). “Functional and structural characterization of four glutaminases from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*”, *Biochemistry*, 47(21):5724–5735.
- [23] European Bioinformatics Institute, Enzyme Structures Database,
<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/enzymes/>, 1 Mayıs 2012.
- [24] Parasanth Kumar K., Parabhakar T., Sathish T., Girija Sankar G., Feleke M., Swarajya Lakshmi G. ve Ramana H., (2009). “Studies on Extracellular L-glutaminase Production by Halophilic *Aspergillus* sp.”, *Journal of Pharmacy and Chemistry*, 3(1):4–7.
- [25] GenomeNet, Glutaminase Reaction,
http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?rn:R00256, 19 Mayıs 2012.

- [26] Nandakumar, R., Yoshimmune, K., Wakayama, M. ve Moriguchi, M., (2003). "Microbial glutaminase: biochemistry, molecular approaches and applications in the food industry", *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*, 23:87–100.
- [27] Sabu, A., Keerthi, T. R., Rajeev Kumar, S. ve Chandrasekaran, M., (2000). "L-glutaminase production by marine *Beauveria* sp. Under solid state fermentation", *Process Biochemistry*, 35:705–710.
- [28] El-Sayed, A. S. A., (2009). "L-Glutaminase Production by *Trichoderma Konigii* Under Solid State Fermentation", *Indian J Mikrobiol*, 49:243–250.
- [29] Koibuchi, K., Nagasaki, H., Yuasa, A., Kataoka, J., ve Kitamoto, K.,(2000). "Molecular cloning and characterization of a gene encoding glutaminase from *Aspergillus oryzae*", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54:59–68.
- [30] Jeon, J-M., Lee, H-I., Han, S-H., Chang, C-S. ve So, J-S., (2010). "Partial Purification and Characterization of Glutaminase from *Lactobacillus reuteri* KCTC3594", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162:146–154.
- [31] Weingand-Ziadé, A., Gerber-Décombaz, C. ve Affolter, M., (2003). "Functional characterization of salt-and termotolerant glutaminase from *Lactobacillus rhamnosus*", *Enzyme and Microbial Technology*, 32:862–867.
- [32] Suzuki, H., Izuka, S., Miyakawa, N., Kumagai, H., (2002). "Enzymatic production of theanine, an "umami" component of tea from glutamine and ethylamine with bacterial γ -glutamyltranspeptidase", *Enzyme Microbiology Technology*, 31:884–889.
- [33] Tübitak Bilim ve Teknik Dergisi, Beşinci Tat:Umami, http://www.biltek.tubitak.gov.tr/bilgipaket/duyular/besinci_tat.swf, 19 Mayıs 2012.
- [34] Ajinomoto Group, Umami Global Web Sitesi, <http://www.ajinomoto.com/features/aji-no-moto/tr/umami/index.html>, 20 Mayıs 2012.
- [35] Tamari and Shoyu, The Quality of Traditional Soy Sauce, <http://www.care2.com/greenliving/tamari-shoyutamari-shoyu-soy-sauce.html>, 26 Aralık 2011.
- [36] Drink Factory, Enhancing Umami, <http://drinkfactory.blogspot.com/2011/10/enhancing-umami.html>, 12 Mayıs 2012.
- [37] McCauley, R., Kong S-E., Heel, K., ve Hall J. C., (1999). "The role of glutaminase in the small intestine", *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 31:405–413.

- [38] Campos-Sandoval, J. A., Lopez de la Oliva, A., R., Lobo, C., Segura, J. A., Matés, J., M., Alonso, F. J. ve Márquez, J., (2007). “Expression of functional human glutaminase in baculovirus system: Affinity purification, kinetic and molecular characterization”, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39:765–773.
- [39] Iyer, P. ve Singhal, R. S., (2008). “Production of glutaminase (E.C.3.2.1.5) from *Zygosaccharomyces rouxii*: Statistical optimization using response surface methodology”, *Bioresource Technology*, 99:4300–4307.
- [40] Imada, A., Igarasi, S., Nakahama, K. ve Isono, M., (1973). “Asparaginase and Glutaminase Activities of Micro-organism”, *Journal of General Microbiology*, 76:85–99.
- [41] Minami, H., Suzuki, H., ve Kumagai, H., (2003). “Salt-tolerant γ -glutamyltranspeptidase from *Bacillus subtilis* 168 with glutaminase activity”, *Enzyme and Microbial Technology*, 32:431–438.
- [42] Jeon, J-M., Lee, H-I. ve So, J-S., (2009). “Glutaminase activity of *Lactobacillus reuteri* KCTC3594 and expression of the activity in other *Lactobacillus* spp. by introduction of glutaminase gene”, *African Journal of Microbiology*, 3(10):605–609.
- [43] Kumar, S. R. ve Chandrasekaran, M., (2003). “Continuous production of L-glutaminase by an immobilized marine *Pseudomonas* sp BTMS-51 in a packed bed reactor”, *Process Biochemistry*, 38:1431–1436.
- [44] Huerto-Saquero, A., Calderón-Flores, A., Diaz-Villaseñor, A., Du Pont, G. ve Durán, S., (2004). “Regulation of transcription and activity of *Rhizobium etli* glutaminase A”, *Biochimica Biophysica Acta* 1673:201–207.
- [45] Yano, S., Kamemura, A., Yoshimune, K., Moriguchi, M., Yamamoto, S., Tachiki, T. ve Wakayama, M., (2006). “Analysis of Essential Amino Acid Residues for Catalytic Activity of Glutaminase from *Micrococcus luteus* K-3”, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102(4):362–364.
- [46] Nagendra Prabhu, G. ve Chandrasekaran, M., (1997). “Impact of process parameters on L-glutaminase production by marine *Vibrio costicola* in solid state fermentation using polystyrene as an inert support”, *Process Biochemistry*, 32(4):285–289.
- [47] Jeya Prakash, P., Poorani, E. ve Anantharaman, P., (2010). “Effect of Media Composition on L-Glutaminase Production from Lagoon *Vibrio* sp. SFL-2”, *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 6(5):769–782.
- [48] Nathiya, K., Nath, S. S., Angayarkanni, J. ve Planiswamy, M., (2011). “Optimised production of L-glutaminase: A tumour inhibitor from *Aspergillus flavus* cultured on agroindustrial residues”, *African Journal of Biotechnology*, 10(63):13887–13894.

- [49] Saxena, R. K. ve Sinha, U. (1981). "L-asparaginase and glutaminase activities in the culture filtrates of *Aspergillus nidulans*", Current Science, 50:218–219.
- [50] Thammarongtham, C., Turner, G., Moir, A. J., Tanticharoen, M. ve Cheevadhanarak, S., (2001). "A new class of Glutaminase from *Aspergillus oryzae*", Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 3(4):611–617.
- [51] Suresh, P. V. ve Chandrasekaran, M., (1999). "Impact of process parameters on chitinase production by an alkalophilic marine *Beauveria bassiana* in solid state fermentation", Process Biochemistry, 34:257–267.
- [52] Keerthi, T. R., Suresh, P. V., Sabu, A., Rajeevkumar, S. ve Chandrasekaran, M., (1999). "Extracellular production of L-glutaminase by alkalophilic *Beauveria bassiana* BTMF S10 isolated from marine sediment", World Journal of Microbiology & Biotechnology, 15:751–752.
- [53] Durá, M. A., Flores, M. ve Toldrá, F., (2002). "Purification and characterisation of a glutaminase from *Debaryomyces* spp.", International Journal of Food Microbiology, 76:117–126.
- [54] Durá, M. A., Flores, M. ve Toldrá, F., (2004). "Effects of curing agents and the stability of a glutaminase from *Debaryomyces* spp.", Food Chemistry, 86:385–389.
- [55] National Human Genome Research Institute, http://www.genome.gov/glossary/resources/amino_acids_lg.jpg, 07 Mayıs 2012.
- [56] Kolancı, Ç., (2009). Temel ve Klinik Biyokimya, Birinci Baskı, İstanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul.
- [57] Altınışık, M., (2009). "Amino Asitlerin Biyosentezi ve Anaplerotik Reaksiyonlar", ADÜTF Biyokimya AD.
- [58] University of Bristol, Glycine, <http://www.chm.bris.ac.uk/motm/glycine/glycineh.htm>, 07 Nisan 2012.
- [59] Akin, O., Aminoasit Metabolizması, Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı, Powerpoint Sunusu.
- [60] Wikipedia, Glutamine, <http://en.wikipedia.org/wiki/Glutamine> , 01 Mayıs 2012.
- [61] Hammaddeler, Glutamin, http://www.hammaddeler.com/index.php?option=com_content&view=article&id=4298&Itemid=372 , 01 Mayıs 2012.
- [62] RCSB Protein Data Bank, Glutamine, <http://www.rcsb.org/pdb/ligand/ligandsummary.do?hetId=GLN> , 01 Mayıs 2012.
- [63] Oğuz, M., (1998). "Glutamin ve Beslenmedeki Önemi", Türk Klinikleri Cerrahi Dergisi, 3:120 – 125.

- [64] Yurdakök, K., Yalçın, S. ve Tezcan, İ., (2001). “Akut Gastroenterit Vakalarında Glutamin Suplementasyonunun İshal Süresi ile İnterlökin-8 ve Sekretuvar İga Düzeyleri Üzerine Etkisi”, Proje No: SBAG-2203.
- [65] Konyalıoğlu, S. Ve Özzyer, A., (2000). “Plazma Glutamin Düzeylerinin İki Yöntem ile Değerlendirilmesi”, Ege Tıp Dergisi, 39(1):1–4.
- [66] Çinkaya, A., (2010). Baş-Boyun Radyoterapisi Uygulanan Hastalarda Glutamin Kullanımının Yaşam Kalitesi Üzerine Etkisi, Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Radyasyon Onkolojisi Ana Bilim Dalı, İstanbul.
- [67] Özcan, P. E. ve Tuğrul S., (2011). “Özel Durumlarda Beslenme”, Klinik Gelişim, 24:53 – 58.
- [68] Şifalı Bitkiler ve Doğal Tedavi, Glutamin,
<http://sifalibitkilervedogaltedavi.com/index.php/amino-asitler/126-glutamin>, 16 Mayıs 2012.
- [69] Güven, M., (2007). “Metabolik Sorunların İnfeksiyona Etkisi”, Yoğun Bakım Dergisi, 7(1):54–60.
- [70] Lam, H., Kostov, Y., Rao, G., ve Tolosa, L., (2008). “Low-cost optical lifetime assisted ratiometric glutamine sensor based on glutamine binding protein”, Analytical Biochemistry, 383:61–67.
- [71] Preiser, J-C., Chioleró, R. ve Singer P., (2006). “Yoğun Bakımda Beslenme Desteği:Özel Substratların Kullanılması”, Yoğun Bakım Dergisi, 6(Ek 1):69–78.
- [72] Tapiero, H., Mathé, G., Couvreur, P. ve Tew, K. D., (2002). “II. Glutamine and glutamate”, Biomed Pharmacother, 56:446–457.
- [73] Genel Sağlık Bilgileri.com, Reye Sendromu,
<http://www.genelsaglikbilgileri.com/reye-sendromu/>, 30 Mayıs 2012.
- [74] Melli, M. ve Demirkan, A., (2007). “Sıçanlarda Oluşturulan İntestinal İskemi-Reperfüzyon Modelinde Glutamin Uygulamasının Plazma Lipopolisakkarit Düzeylerine Etkisi”, Proje No: 105S143 (SBAG-HD-35).
- [75] 7 Gün Sağlığım, Nekrotizan Enterokolit,
<http://www.7gunsaglikim.com/nektotizan-enterokolit.html>, 11 Mayıs 2012.
- [76] Demirci, Ö., (2010). “Avrupa Ülkelerinde ve Türkiye’de Mantar Sektörü ve İlgili Düzenlemeler”, Orman Genel Müdürlüğü, 46. Dönem AB Temel Eğitim Kursu, Ankara.
- [77] Boztok, K. ve Atilla, F., (2012). “Zehirli Mantarlar”, Türk Farmakoloji Derneği, Klinik Toksikoloji Çalışma Grubu, İkinci Sayı, 1–59.

- [78] Şen, S. ve Yalçın, M., (2010). “Dünya ve Türkiye’de Kültür Mantarcılığı ve Geliştirilmesi”, III. Ulusal Karadeniz Ormancılık Kongresi, 20–22 Mayıs 2010, Artvin, 1208–1216.
- [79] Çotuk, A., (2003). Genel Mikrobiyoloji Laboratuvar Yöntemleri, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul.
- [80] AKTÜMSEK, A. ve KONUK, M., (2002). Canlılar Bilimi, Birinci Baskı, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara.
- [81] Eren, E., Çetin, M., Türkler, L. ve Öz, O., (1995). Kültür Mantarı Yetiştiriciliğinde İklimlendirme ve Otomasyon
http://www.mmo.org.tr/resimler/dosya_ekler/a9b31f4d596fa52_ek.pdf?tipi=&tuu=&sube=3, 24 Mart 2012.
- [82] Özkul, A., G., (1999). “Kültür Mantarı İklimlendirme Tesisatı”, IV. Ulusal Tesisat Mühendisliği Kongresi, 4–7 Kasım 1999, İzmir, 611–617.
- [83] Tan, A. ve Ökten, E. M., (2008). “Kültür Mantarında Zararlı Nematodlar ve Savaşım Yöntemleri”, Journal of Agricultural, 22(1):9 –16.
- [84] Özdemir, C., (2010). “Mantar Yetiştiriciliği”, Samsun İl Tarım Müdürlüğü, Samsun.
- [85] Vikipedi Özgür Ansiklopedi, Küf Mantarları,
http://tr.wikipedia.org/wiki/K%C3%BCf_mantarlar%C4%B1, 11 Mayıs 2012.
- [86] Gıda Bilimi, Gıdalardaki Küfler,
<http://www.gidabilimi.com/makaleler/34-makaleler/2335-gidalar-daki-kufler>, 11 Mayıs 2012.
- [87] Vikipedi Özgür Ansiklopedi, Trichoderma reesei,
http://tr.wikipedia.org/wiki/Trichoderma_reesei, 23 Mayıs 2012.
- [88] Akel, E., (2009). Trichoderma reesei’ye Ait Bazı Enzimlerin Üretiminin, Yenilenebilir Karbon Kaynağı Olarak Kullanılan D-Ksiloz ve L-Arabinöz Tarafından Baskılanması, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [89] Sandgren, M., Ståhlberg, J. ve Mitchinson, C., (2005). “Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes”, Progress in Biophysics and Molecular Biology, 89:246–291.
- [90] DOE Joint Genome Institute, Fungal Map of Mutations Key to Increasing Enzyme Production for Bioenergy Use,
http://www.jgi.doe.gov/News/news_09_09_01.html, 23 Mayıs 2012.

- [91] Danigelis, A., (2009). Mutant Fungus Has a Cellulose Snack Attack, <http://news.discovery.com/tech/mutant-fungus-has-a-cellulose-snack-attack.html>, 23 Mayıs 2012.
- [92] Krug, F. J., Růžicka, J. ve Hansen, H., (1979). "Determination of Ammonia in Low Concentrations with Nessler's Reagent by Flow Injection Analysis", Analyst, 104:47–54.
- [93] Bradford, M. M., (1976). "Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", Analytical Biochemistry, 72:248-254.
- [94] Karakuş, E., (2010). Protein Saflaştırma Yöntemleri, Yıldız Teknik Üniversitesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Ders Notları.
- [95] Alev, B., (2011). "*Trichoderma reesei* 1A Mutant Suşunda Pektinaz İndüksiyonunun İncelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [96] Lineweaver, H. ve Burk, D., (1934). "The Determination of Enzyme Dissociation Constant", Journal of American Chemical Society, 56:658.
- [97] Bağrıyanık, D. B., (2011). Potansiyometrik Esaslı Glutamin Biyosensörü Tasarlanması ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Dilara BÜLBÜL
Doğum Tarihi ve Yeri : 27.06.1988 Eminönü
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : dilarabulbul@windowslive.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyokimya	Yıldız Teknik Üniversitesi	2012
Lisans	Kimya	Sakarya Üniversitesi	2010
Lise	Sayısal	Kemal Hasoğlu Lisesi (Yabancı Dil Ağırlıklı)	2006

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2010 - 2012	Yıldız Teknik Üniversitesi / İstanbul	Asistan Öğrenci
2009	Sakarya Yenikent Devlet Hastanesi / Adapazarı	Stajer