

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Anoxybacillus gonensis* YABAN TİP VE W137F/ V184S MUTANTI
GLUKOZ İZOMERAZLARININ DEAE-SEFAROZ MATRİKSİNE
KOVALENT VE NON-KOVALENT İMMOBİLİZASYONU**

ZÜLEYHA AKPINAR

TEZ DANIŞMANI

YRD. DOÇ. DR. HAKAN KARAOĞLU

TEZ JÜRİLERİ

YRD. DOÇ. DR. FATİH ŞABAN BERİŞ

YRD. DOÇ. DR. DİLŞAT NİGAR ÇOLAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

RİZE-2017

Her Hakkı Saklıdır

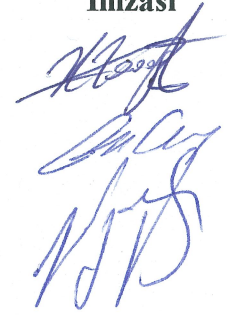
T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Anoxybacillus gonensis* YABAN TİP VE W137F/ V184S MUTANTI GLUKOZ
İZOMERAZLARININ DEAE-SEFAROZ MATRİKSİNE KOVALENT VE NON-
KOVALENT İMMOBİLİZASYONU**

Yrd. Doç. Dr. Hakan KARAOĞLU danışmanlığında, Züleyha AKPINAR tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 01/02/2017 tarihinde Su Ürünleri Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı Adı Soyadı
Başkan	:Yrd.Doç.Dr.Hakan KARAOĞLU
Üye	:Yrd.Doç.Dr.Dilşat Nigar ÇOLAK
Üye	:Yrd.Doç.Dr.Fatih Şaban.BERİŞ

İmzası




Doç. Dr. Ferhat KALAYCI
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

ÖNSÖZ

“*Anoxybacillus gonensis* Yaban Tıp ve W137F/ V184S mutanti glukoz izomerazlarının DEAE-Sefaroz matrisine kovalent ve non-kovalent immobilizasyonu” adlı bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı’nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Bu çalışmanın hazırlanmasında her türlü yardım ve desteklerini şahsıma esirgemeyen danışmanın Sayın Yrd.Doç.Dr. Hakan KARAOĞLU’na teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarım esnasında tecrübe ve bilgilerinden yararlandığım sayın Yrd.Doç.Dr. Derya EFE, sayın Doç.Dr. Yusuf BEKTAŞ, sayın Yrd.Doç.Dr. Fatih Şaban BERİŞ hocalarıma ve çalışmalarımı yürüttüğüm moleküler genetik laboratuvar çalışanlarından Merve KIZAKLI, İsmail AKSU, Pelin BAK, Seyhan RAKICI ve Zeynep Deniz BALTA arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında bana her türlü maddi ve manevi desteği sağlayan sevgili annem Nermin AKPINAR’a, ablalarım ve ağabeylerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hazırlanan bu Yüksek lisans tezi Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü tarafından: 2014.103.01.03 nolu proje ile desteklenmiştir.

Züleyha AKPINAR

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “*Anoxybacillus gonensis* Yaban Tip ve W137F/ V184S mutanđı glukoz izomerazlarının DEAE-Sefaroz matriksine kovalent ve non-kovalent immobilizasyonu” başlıklı bu tezin, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemleri kabul ettiğimi beyan ederim. 12 / 01 / 2017



Züleyha AKPINAR

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

ÖZET

***Anoxybacillus gonensis* YABAN TİP VE W137F/ V184S MUTANTI GLUKOZ İZOMERAZLARININ DEAE-SEFAROZ MATRİKSİNE KOVALENT VE NON-KOVALENT İMMOBİLİZASYONU**

Züleyha AKPINAR

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Su Ürünleri Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Hakan KARAOĞLU

Glukoz izomeraz (GI) (D-ksiloz ketol izomeraz; EC 5.3.1.5), amilaz ve proteaz ile birlikte dünyanın en yüksek tonajlı üç enziminden birisidir. GI'nın D-glukozun D-fruktoza izomerizasyonu HFCS (yüksek fruktoz içerikli hububat şurubu) üretiminde ticari bir öneme sahiptir. Bu öneminden dolayı bugüne kadar pek çok hücreden yeni GI'lar izole edilerek karakterize edilmiştir. Endüstriyel uygulamalar için GI'nın maliyetinin azaltılması ile ilgili birçok yaklaşım araştırılmış ve uygulama alanı bulmuş olmakla birlikte, bu yaklaşımlardan en fazla tercih edilen GI'nın immobilize edilerek tekrar tekrar kullanılmasıdır. Bu çalışmada, saflaştırılan *Anoxybacillus gonensis* G2^T glukoz izomerazının (AgoGI) ve bu enzimin W137F/V184S mutantının DEAE-Sepharoz matriksine iyonik ve kovalent immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra immobilize enzimlerin biyokimyasal ve kinetik parametreleri belirlenmiştir. Enzimlerin hem iyonik hem de kovalent immobilizasyonu sonrası optimum çalışma sıcaklıkları 85°C olarak, optimum pH değerleri ise 6,5 olarak belirlenmiştir. AgoGI'nın iyonik ve kovalent olarak DEAE-Sefarozaya immobilize edilmiş hallerinin K_m değerleri sırasıyla $130,57 \pm 5,42$ mM ve $127,28 \pm 2,96$ mM; V_{max} değerleri ise $0,10136 \pm 0,0014$ $\mu\text{mol/dk}$ ve $0,03985 \pm 0,0003$ $\mu\text{mol/dk}$ olarak hesaplandı. Enzimin W137F/V184S mutantının iyonik ve kovalent olarak DEAE-sefaroza immobilize edilmiş hallerinin K_m değerleri sırasıyla $37,44 \pm 2,09$ mM ve $39,93 \pm 2,02$ mM; V_{max} değerleri ise $0,0641 \pm 0,0008$ $\mu\text{mol/dk}$ ve $0,06408 \pm 0,0007$ $\mu\text{mol/dk}$ olarak belirlendi.

2017, 50 sayfa

Anahtar Kelimeler *Anoxybacillus gonensis*, HFCS, İmmobilizasyon, Enzim Karakterizasyonu

ABSTRACT

COVALENTLY AND NON-COVALENTLY IMMOBILIZATION ON DEAE-SEPHAROSE MATRIX OF WILD TYPE AND W137F/V184S MUTANT GLUCOSE ISOMERASE FROM *Anoxybacillus gonensis*

Züleyha AKPINAR

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

Glucose isomerase (GI) (D-xylose ketol isomerase, EC 5.3.1.5) is the one of the three highest tonnage enzymes with amylase and protease in the World enzyme market. The isomerization of D-glucose to D-fructose has commercial importance to produce high fructose corn syrup (HFCS). Therefore, various GIs have been isolated and characterized from different microorganisms and macroorganisms up to day. Besides, Many procedures have been researched and applied to reduce the cost of GI for industrial applications. The most preferred procedure among the applied procedures has been determined as reuse of GI via enzyme immobilization. In this study, we carried out ionically and covalently immobilizations of both wild type and double mutant enzymes of *Anoxybacillus gonensis* G2^T on DEAE-sepharose matrix. Then, biochemical and kinetic parameters of immobilized enzymes were determined. The optimum temperature and pH value was determined as 85°C and 6,5 for all the enzymes, respectively. According to the results of kinetic studies, K_m and V_{max} values of ionically and covalently immobilized AgoG1 on DEAE-Sepharose were $130,57 \pm 5,42$ mM and $127,28 \pm 2,96$ mM and $0,10136 \pm 0,0014$ $\mu\text{mol}/\text{min}$, $0,03985 \pm 0,0003$ $\mu\text{mol}/\text{min}$, respectively. K_m and V_{max} values of ionically and covalently immobilized AgoG1 with double mutation (W137F/V184S) on DEAE-Sepharose were $37,44 \pm 2,09$ mM, $39,93 \pm 2,02$ mM and $0,0641 \pm 0,0008$ $\mu\text{mol}/\text{min}$, $0,06408 \pm 0,0007$ $\mu\text{mol}/\text{min}$ respectively.

2017, 50 page

Keyword: *Anoxybacillus gonensis*, HFCS, Immobilization, Enzyme Characterization.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ	II
ÖZET	III
ABSTRACT	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
TABLolar DİZİNİ	IX
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	X
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Glukoz İzomeraz ve Glukoz İzomeraz Enziminin Özellikleri	7
1.3. Enzim İmmobilizasyonu	10
1.3.1. İmmobilizasyon Yöntemleri	11
1.3.1.1. Geri Dönüşümsüz İmmobilizasyon	11
1.3.1.2. Geri Dönüşümlü İmmobilizasyon	12
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	15
2.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller	15
2.1.1. DeneYlerde Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler	15
2.1.2. DeneYlerde Kullanılan Besi Yerleri	15
2.1.3. DeneYlerde Kullanılan Hücre ve Plazmitler	16
2.2. Enzimlerin Üretilmesi	16
2.2.1. pETG2GI'nın <i>E.coli</i> BL21(DE3) Suşu İçerisine Trasformasyonu	16
2.2.2. AgoGI Enziminin Üretilmesi	17
2.2.3. W137F/V184S Mutant GI'nın Üretilmesi	17
2.3. Enzimlerin Saflaştırılması	18

2.3.1.	AgoGI'nın Saflaştırılması	18
2.3.1.1.	Isı şoku Uygulaması	18
2.3.1.2.	DEAE-Sefaroz iyon değişim kolon kromatografisi	18
2.3.1.3.	Fenil-Sefaroz Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi.....	19
2.3.2.	W137F/V184S Mutant Enziminin Saflaştırılması	20
2.4.	Enzimlerin DEAE-Sefaroz Matrisine İyonik ve Kovalent İmmobilizasyonu	20
2.4.1.	Enzimlerin Kovalent İmmobilizasyonu	21
2.4.2.	Enzimlerin İyonik İmmobilizasyonu.....	21
2.5.	Biyokimyasal Çalışmalar	22
2.5.1.	Protein Miktarı Tayini.....	22
2.5.2.	Glukoz İzomeraz Aktivite Deneyi.....	22
2.5.3.	Enzimlerin Optimum Çalışma Sıcaklıklarının Belirlenmesi.....	23
2.5.4.	Enzimlerin Optimum pH'larının Belirlenmesi.....	23
2.5.5.	Enzimlerin Kinetik Parametreleri.....	24
2.5.6.	Saflaştırılan Enzimlerin SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrez Analizi	24
3.	BULGULAR	25
3.1.	AgoGI Saflaştırması.....	25
3.1.1.	Kaba Ekstrakt	25
3.1.2.	Isı Şoku Uygulaması	26
3.1.3.	İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması	27
3.1.4.	Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması.....	28
3.1.5.	Saflaştırma Tablosu.....	30
3.1.6.	AgoGI'nın Saflaştırma İşlemlerine Ait SDS-Page Jel Elektrofrez	34
3.2.	W137F/V184S Mutant Enziminin Saflaştırması.....	31
3.2.1.	Kaba Ekstrakt	31
3.2.2.	Isı Şoku Uygulaması	32
3.2.3.	İyon Değişim Kromatografisi.....	32

3.2.4.	Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması	33
3.2.5.	Saflaştırma Tablosu.....	33
3.2.6.	W137F/V184S Mutant Enziminin Saflaştırma İşlemine Ait SDS-Page Jel Elektroforozu.....	34
3.3.	Enzimlerin İmmobilizasyonu	35
3.4.	İmmobilize Enzimlerin Optimum Sıcaklık Değerleri	35
3.5.	İmmobilize Enzimlerin Optimum pH Değerleri	36
3.6.	İmmobilize enzimlerin kinetik değerleri	37
4.	TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....	40
5.	ÖNERİLER	43
	KAYNAKLAR	44
	ÖZGEÇMİŞ	50

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	AgoGI'nın saflaştırması işleminde kaba ekstrakta ait protein miktarı tayini.	25
Şekil 2.	AgoGI'nın saflaştırması işleminde kaba ekstrakta ait GI aktivite tayini	25
Şekil 3.	AgoGI'nın saflaştırması işleminde ışık şoku sonrası elde edilen hücre özütüne ait protein miktarı tayini	26
Şekil 4.	AgoGI'nın saflaştırması işleminde ışık şoku sonrası elde edilen hücre özütüne ait GI aktivite tayini	26
Şekil 5.	AgoGI'nın saflaştırması işlemine ait iyon değişim kolon kromatografisi grafiği.....	27
Şekil 6.	AgoGI'nın saflaştırması işleminde iyon değişim kolon kromatografisi sonrası elde edilen hücre özütüne ait protein miktarı tayini.....	28
Şekil 7.	AgoGI'nın saflaştırması işleminde iyon değişim kolon kromatografisi sonrası elde edilen hücre özütüne GI aktivite tayini	28
Şekil 8.	AgoGI'nın saflaştırması işlemine ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi grafiği.....	29
Şekil 9.	AgoGI'nın saflaştırması işleminde hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi sonrası elde edilen hücre özütüne ait protein miktarı tayini ..	29
Şekil 10.	AgoGI'nın saflaştırması işleminde hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi sonrası elde edilen hücre özütüne ait GI aktivite tayini.....	30
Şekil 11.	AgoGI'nın saflaştırmasına ait SDS-Page Jel Elektroforezi	31
Şekil 12.	W137F/V184S mutant enziminin saflaştırması işlemine ait iyon değişim kolon kromatografisi grafiği.....	32
Şekil 13.	W137F/V184S mutant enziminin saflaştırması işlemine ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi grafiği	33
Şekil 14.	W137F/V184S mutant enziminin saflaştırma işlemine ait SDS-Page Jel Elektroforezi.....	34
Şekil 15.	Kovalent ve iyonik olarak DEAE-Sefaroz matriksine immobilize edilmiş AgoGI'nın optimum sıcaklık değerleri	35
Şekil 16.	Kovalent ve iyonik olarak DEAE-Sefaroz matriksine immobilize edilmiş W137F/V184S mutant GI'nın optimum sıcaklık değerleri.....	36
Şekil 17.	Kovalent ve iyonik olarak DEAE-Sefaroz matriksine immobilize edilmiş AgoGI'nın optimum pH değerleri.....	36

Şekil 18. Kovalent ve iyonik olarak DEAE-Sefaroz matriksine immobilize edilmiş W137F/V184S mutant GI'nin optimum pH değerleri	37
Şekil 19. İyonik olarak immobilize olmuş AgoGI'ya ait Michaelis-Menten grafiği	37
Şekil 20. Kovalent olarak immobilize olmuş AgoGI'ya ait Michaelis-Menten grafiği	38
Şekil 21. İyonik olarak immobilize olmuş W137F/V184S mutant GI'ya ait Michaelis-Menten grafiği	38
Şekil 22. Kovalent olarak immobilize olmuş W137F/V184S mutant GI'ya ait Michaelis-Menten grafiği	39



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. AgoGI'nın saflaştırılması işlemine ait saflaştırma tablosu	30
Tablo 2. W137F/V184S mutant enziminin saflaştırma tablosu	34
Tablo 3. İmmobilize edilen enzimlerin total protein ve ünite miktarları.....	35
Tablo 4. Serbest enzimler ile immobilize enzimleri kinetik parametreler açısından karşılaştırılması	41



SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

bp	Baz çifti
dNTP	Deoksinükleozit trifosfat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etilendiamin tetraasetikasit
K_m	Michaelis-Menten sabiti
LB	Luria-Bertani
mM	Milimolar
μ M	Mikromolar
V_{maks}	Maksimum Hız
RT	Reaksiyon Tamponu
HFCS	Yüksek Fruktoz İçerikli Mısır Şurubu
GI	Glukoz İzomeraz
DNA	Deoksiribonükleik Asit
LB	Laura Bertani Besiyeri
BSA	Bovin Serum Albümin
DEAE	Dietilaminoetil
TEAE	Tris-EDTA Tamponu
<i>Xyla</i>	Glukoz İzomeraz Geni
KI	Ksiloz İzomeraz
SDS-PAGE	Sodyum Dedosilsülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
OD	Optik Yoğunluğun Bir Ölçüsü Olan Ekstinksiyon
M	Molar
nm	Nanometre
AgoGI	<i>Anoxybacillus gonensis</i> Glukoz İzomerazı
Rpm	Dakikadaki Dönüş Sayısı
Sn	Sanite
Yt	Yaban Tip
Rek	Rekombinant

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Kimyager bilim adamları yıllar önce bazı özel kimyasalların başka kimyasallar arasında gerçekleşen tepkimeleri hızlandırdığını keşfetmişlerdir. Bir tepkimeyi hızlandıran, fakat tepkime sonunda değişmeden kalan maddelere katalizör denir. Tıpkı ısıda olduğu gibi, katalizör de bir tepkimenin yönünü, son dengeyi ve reaksiyona karışan enerjiyi değiştirmez. Bir katalizör, termodinamik açıdan olabilecek bir tepkimenin sadece hızını etkiler. Bunu tepkimenin gerçekleşmesi için gereken aktivasyon enerjisini düşürerek gerçekleştirir. Katalizör reaksiyona giren maddelere bağlanarak bu maddeler içerisindeki önemli bağları zayıflatır ve reaksiyonun ürünlere doğru yönlendiği bir geçiş durumu oluşmasını sağlar. Genellikle katalizörler, yardımcı oldukları reaktantlar konusunda fazla seçici değildirler. Doğada katalizörler, birçok kimyasal olayın gerçekleşmesini sağlarlar. Canlılığın devam etmesi için hücreler tüm potansiyel reaktantlara karşı ilgisiz olan, ancak sadece özel tepkimeleri yönetebilen özel biyokatalizörlere ihtiyaç duyarlar.

Hücre içinde veya hücre dışında özgül tepkimeleri ya da grup tepkimelerini hızlandıran, büyük bir çoğunluğu protein yapısında olan, genellikle girdikleri reaksiyonlardan değişmeden çıkarak tekrar tekrar kullanılabilen biyokatalizörlere enzim denir. Enzimleri katalizörlerden ayıran temel özellikler (i) son derece hızlı çalışmaları, (ii) reaksiyonlara ve substratlarına özgül olmaları (kemo-selektif-steroselektiftirler), (iii) biyokimyasal reaksiyonları düşük enerji ve buldukları canlılığın hücre ısısında gerçekleştirmeleridir (Ketoon biyoloji, campeel biyoloji kitapları). Enzimlerin 4000'den fazla farklı reaksiyonu katalizledikleri bilinmektedir. Şu an enzimlerin tıp, eczacılık, gıda, kağıt, deri endüstrileri gibi sayısız sahada biyoteknolojik olarak kullanılmasını sağlayan ve biyokimya bilimi için devrim niteliğindeki keşif 1897'de Eduard Burchner'in enzimlerin hücre dışında da çalıştığını göstermesidir. Eduard Burchner bu keşfi nedeniyle 1907'de Nobel ödülü almıştır.

Günümüzde deterjan kalitesinin artırılması, biyosensör üretimi, çeşitli hastalıkların tespiti, birçok atık maddesinin bertaraf edilmesi, gıda kalitesinin

arttırılması gibi sayısız endüstriyel alanda kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bu durumun nedenleri arasında; mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin bitkisel ve/veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin daha yüksek, daha dayanıklı olması, mikroorganizmaların daha az istenmeyen yan ürün oluşturmaları, mikrobiyal enzim üretiminin daha ucuz olması sayılabilir (Çanakçı, 2003; Demain and Solomon, 1981).

Mikroorganizma grupları içerisinde biyoteknolojik enzim üretimi için en çok kullanılan grup ise biyokimyasal reaksiyonları çok yüksek sıcaklıklarda katalizleyebilen enzimleri nedeniyle termofilik mikroorganizmalardır. Termofilik mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin mezofilik mikroorganizmalardan elde edilen enzimlere göre birçok üstün özelliği bulunur. pH değişikliklerine ve yüksek sıcaklıklara karşı daha dayanıklı ve aktif olmaları, mikroorganizmaların optimum büyüme sıcaklıklarından daha yüksek sıcaklıklarda optimum aktivite göstermeleri ve böylece ortamda mikroorganizma kontaminasyonuna izin vermemeleri termofilik enzimlerin en önemli özellikleridir (Burg, 2003). Ayrıca, yüksek sıcaklıklarda, reaksiyona katılan maddelerin difüzyon hızlarının ve çözünürlüklerinin önemli derecede artması ve böylece daha fazla ürün oluşması da önemli bir avantajdır (Kumar and Swati, 2001). DNA polimeraz, amilaz, ksilanaz, kitinaz, selülaz, proteaz, lipaz ve glukoz izomeraz endüstriyel olarak kullanılan termofilik enzimlerden sadece birkaçıdır. Bu enzimler moleküler biyoloji, gıda, petrol, kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi ve tıp gibi pek çok endüstri alanında geniş ölçüde kullanılmaktadır.

Ticari olarak oldukça önemli olan pek çok termofilik enzim içerisinde, gıda endüstrisinde geniş kullanım alanı bulan ksiloz izomeraz (D-ksiloz ketol izomeraz E.C 5.3.1.5), dünyanın en çok kullanılan üç enzimden biri olması nedeniyle birçok bilim adamının ilgi odağı olmuştur. Glukoz izomeraz olarak adlandırılan glukozu HFCS'nin (High Fructose Corn Syrup) temel bileşeni olan fruktoza izomerize ettiği endüstriyel olarak son derece önemlidir (Chen, 1980; Bor vd., 1992; Bhosale vd., 1996; Karaoglu vd., 2013; Xu vd., 2014). HFCS; mısır nişastası glukozunun glukoz izomeraz vasıtasıyla fruktoza dönüştürülmesiyle elde edilen, %42-55 fruktoz içeren tatlı, besleyici sakkarit karışımıdır (Antrim R.L. vd., 1979; Knorr, 1987; Bandlish vd., 2002; Mu vd., 2012). Glukoz izomerazın ticari kullanımının dolayısıyla HFCS üretiminin olmadığı

yıllarda yiyeceklerde tatlandırıcı olarak %40'ı şeker pancarından, %60'ı şeker kamışından üretilen sakkaroz (sukroz) kullanılmaktaydı. Ancak 1958'de Küba Devrimi nedeniyle Küba'ya ambargo konulması sukrozun ham maddelerinden biri olan şeker pancarının yeterli miktarda temin edilememesine neden olmuştur. Alternatif tatlandırıcı arayışına ise çözüm Marshall ve Kooi tarafından *Pseudomonas hydrophila*'dan izole edilen glukoz izomeraz sayesinde bulunmuştur (Marshall ve ark.,1957). Bu enzimin ilgisi glukozu ksilozdan 160 kat daha düşük olmasına rağmen, sahip olduğu kapasite ihtiyaç duyulan HFCS üretimine yetmiştir.

Fruktoz şurupları tatlı, düşük viskozite ve daha az kristalleşme gibi özellikleri sebebiyle kullanıcıya depolama ve taşıma işlemleri sırasında avantaj sağlayan çok fonksiyonlu ürünlerdir. Fruktoz şurubu nemi tutarak kurumayı önler, lezzeti geliştirici özellikleri vardır, ozmotik basınçları yüksektir ve fermente edilebilir şekerler açısından zengindir. Fruktozun dil üzerinde algılanma yoğunluğu sakkarozu göre çok daha yüksektir ve hissedilme süresi kısadır. Bu nedenle fruktoz şurupları gıdalarda karakteristik lezzet özelliklerinin algılanmasını zenginleştirmede etkilidir (Inglett.,1974; Henry,1976; Pomeranz,1985; Hobbs, 1986; Howling, 1992; CRA,1994; Kuyper vd., 2005). HFCS, sakkarozdan 1,3 ve glukozdan ise 1,7 kat daha tatlılık veren bir üründür. Glukoz, sakkarozun %70-75'i kadar tatlıyken fruktoz sakkarozu göre iki kat daha fazla tatlıdır. HFCS'nin tatlı olması ve doğada bolca bulunan nişastadan üretildiği ve tatlandırma gücü dikkate alındığında HFCS sakkarozdan % 10-20 daha ucuzdur. Tüm bunların yanı sıra fruktoz midede çok yavaş emildiğinden ve kandaki glukoz seviyesine etki etmediğinden fruktoz diyabetik bir tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır (Bhosale,1996; Karaoglu vd., 2013). Fruktoz şurubu sıklıkla gazlı ve gazsız içecekler, fırın ürünleri, çeşitli hububat ürünleri, süt mamulleri, salamura ürünler, işlenmiş gıdalar ve sebze, çorba, domates sosları, meyve gibi konserve ürünlerde kullanılmaktadırlar Ayrıca, HFCS fermente edilebilir substrat olduğu, kabuk rengine ve lezzete katkıda bulunduğu ve raf ömrünü uzattığı için ekmek başta olmak üzere, bisküvi, kek, kurabiye, tart dolguları ve jölelerde kullanılabilir (Hebeda, 1987; Wulff, 1987; Johnson vd., 1989; Nabors, 1991; Kulp vd. 1992; Anon., 1993; Manohar ve Rao, 1997; Schenck, 2000).

GI kullanımı oldukça pahalıdır. Çünkü enzim hücre içi bir enzimdir ve glukozu ilgisinin düşük olması sebebiyle (yüksek K_m), reaksiyonlarda çok yüksek miktarlarda

enzim kullanımına ihtiyaç vardır. GI enziminin endüstriyel olarak kullanılabilir olması için enzimin üretim maliyetinin mümkün olan en düşük miktarda olması arzu edilir. Bu nedenle, birçok bilim adamı üç temel noktaya odaklanarak birçok bilimsel çalışma yapmıştır. Bu üç temel nokta: (i) enzimin verimliliğinin artırılması (bir organizmanın rastgele mutasyonla enzim üretiminin artırılması veya rekombinant DNA teknolojisiyle uygun konakta eksprese edilmesi), (ii) fermentasyon ortamının optimize edilmesi (enzim üretimini indükleyecek ksiloza alternatif daha ucuz maddelerin bulunması), (iii) enzimin immobilize edilmesidir. Bu yaklaşımların yanı sıra endüstriyel olarak kullanılacak enzimin, yönlendirilmiş mutasyonlarla pH, sıcaklık, vb. parametrelere karşı stabilitesinin ya da katalitik etkinliğinin artırılması, enzimin yönettiği süreçlerin maliyetlerinin azaltılmasında rolü büyüktür.

GI maliyetinin azaltılması ile ilgili belirtilen tüm yaklaşımlar araştırılmış ve uygulama alanı bulmuş olmakla birlikte, bu yaklaşımlardan en fazla tercih edilen GI'nın immobilize edilerek tekrar tekrar kullanılmasıdır. Enzim immobilizasyonu; enzimlerin fiziksel olarak belirli bir matrisin içine yerleştirilmesi, hapsedilmesi veya tutturulması, bu sayede enzimin tekrarlanabilir ve sürekli kullanılabilir olmasını sağlamak olarak tanımlanabilir. İmmobilize enzimlerin ilk endüstriyel kullanımı 1969 yılında Japonya'da Tanebe Seiyaku Limited Şirketinde Chibata ve arkadaşlarının, sentetik rasemik D-L amino asitlerin çözünmesi için *Aspergillus oryzae* aminoasilazın immobilizasyonunu gerçekleştirmesidir (Bhosale vd., 1996). Özellikle son 30 yıla baktığımızda, immobilizasyon teknikleri hızla gelişmiştir ve immobilizasyon teknikleriyle ilgili tasarımlar önemli oranda artmıştır. Ancak halen mevcut işlemlerde ilerleme gerekmektedir. İmmobilize enzimlerin diğer pratik işlemlere uygulanabilirliğini artırmak için yeni yöntemlerin geliştirilmesi ve mevcut tekniklerin daha iyi anlaşılması ve geliştirilmesi gerekmektedir.

GI içinde en geniş pazar, enzimin immobilize edilmiş hali içindir. GI'nın immobilizasyonu için geçmişten günümüze birçok farklı yöntem kullanılmıştır (Hemmingsen, 1979; Pedersen, 1993). Ancak bu yöntemlerden sadece bir kısmı ekonomiktir ve ticari HFCS üretimi için uygun olan aktivitesi yüksek enzim sağlar. GI immobilizasyonu için iki temel yaklaşım kullanılmaktadır. Bu yaklaşımlar GI üreten tüm hücrenin immobilizasyonu ve hücreden çıkartılmış enzimin immobilizasyonudur.

GI hücre içi bir enzim olduğu için ticari uygulamalarda tüm hücrenin immobilize edilmesi uygun bir seçenektir. GI'ya sahip hücrelerin immobilize edilmesi ilk kez Clinton Corn Processing Company tarafından ticari amaçla gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, Novo Industries tüm hücrenin polimerik materyal içine tutturularak immobilize edilmesini kullanmıştır (Reynolds, 1973; Gaikwad ve ark., 1992). *Streptomyces sp.* NCIM 2730 suşuna ait GI, Indion 48-R üzerine immobilize edilmiştir ve bu sayede enzimin pH ve ısı kararlılığı artmıştır (Barker ve ark., 1973; Barker, 1976). Yapısını korunmak için immobilize edilmiş çözünebilir enzimler, tüm hücrenin immobilize edildiği durumların tersine tekrar tekrar kullanım için oldukça uygun olan akışkan bir özellik gösterirler. GI enzimi hücreden bağımsız olarak ilk kez *Streptomyces phaeochromogenes* ve *Lactobacillus brevis*'ten elde edilmiş ve DEAE-Selüloza immobilize edilmiştir (Bucke, 1981). DEAE-Selüloza immobilize edilmiş olan GI Clinton Corn Processing Company tarafından HFCS üretmek için halen kullanılmaktadır. Daha sonra gerçekleştirilen bir çalışmada, GI *Streptomyces sp.*'den elde edilmiş ve porlu alüminyum okside immobilize edilmiştir. Bu enzimin yarılanma ömrü 49 gün olarak belirtilmiştir ve sürekli kullanım için uygun olduğu bildirilmiştir. Kontrollü gözenekli alüminyum okside immobilize edilmiş GI'nın Co^{+2} varlığında kullanımı avantajlıdır. Çünkü Co^{+2} daha sonra ardışık muamelelerle ortadan kaldırılabilmektedir. Amerikan Biyoteknoloji Araştırma Birimleri'nden biri olan Monsanto, GI'yı geniş porlu polietilen disklerinden dimetilsülfoksit içindeki poliakrilonitril solüsyonunu sızdırarak immobilize edip, sonunda da glutaraldehit ile sabitlemiştir. Yine, *Streptomyces* GI'sının selüloz asetat filamentlerine yakalanması sonucu gerçekleştirilen etkin başka bir yöntem tanımlanmıştır. Benzer bir yöntem GI ve amiloglukozidazın birlikte immobilize edilmesi için kullanılmıştır (Bucke, 1981). Günümüzde HFCS üreticisi birçok ticari kuruluş patentli olarak yayınlanmış immobilize etme yöntemlerini kullanmaktadır.

HFCS üretiminde mezofilik organizmalardan elde edilen GI, immobilize edilmiş bir şekilde 55-65°C'de pH 7,5 ile 8,5 aralığında kullanılmaktadır (Schenck, 2000; Xu vd., 2014). Bu şartlar altında enzim ile % 40-42 oranında fruktoz üretilebilmektedir. Fakat endüstriyel uygulamalarda kullanılan HFCS'de % 55 fruktoz içeriği aranmaktadır. Dolayısı ile bu oran kromatografik olarak %55 seviyelerine getirilir. Fakat bu işlem üretim maliyetini arttırmaktadır (Douglas and Jay, 1999). Sıcaklığın

artmasıyla fruktoz:glukoz dengesi fruktoz tarafına kaymakta böylece pahalı olan kromatografik saflaştırmaya gerek kalmamaktadır (Karaoglu vd., 2013; Xu vd., 2014). Bu yüzden bu uygulamalarda yüksek sıcaklıklarda çalışan termofilik mikroorganizmalardan elde edilen enzimler tercih edilmektedir (Hartley vd., 2000; Yanmis vd., 2015). Fakat yüksek pH değerlerinde yüksek sıcaklık uygulamaları, istenmeyen mannoz, psikoz ve diğer asidik yan ürünlerin oluşumuna sebep verdiği için düşük pH değerlerinde çalışan bir enzime ihtiyaç bulunmaktadır (Karaoglu vd., 2013; Xu vd., 2014). Mevcut olan bu tür ihtiyaçlardan dolayı günümüze kadar çok sayıda termofilik ve asidik karakterli bakterilerin GI'ı araştırılmıştır ve halen yeni GI'ların araştırılması bilim adamları için büyük bir ilgi uyandırmaktadır.

Dünya literatürü tarandığında GI enzimi ile ilgili birçok yayın ve endüstriyel kullanım ile ilgili patent bulunmaktadır. Ülkemizde ise konuyla ilgili gerçekleştirilen bir yüksek lisans tezi çalışması ile *A. gonensis* GI'sı dünya literatürüne kazandırılmıştır (Karaoğlu, 2004). Termofilik bir bakteri olan *A. gonensis* 'e ait GI'nın katalitik ve kinetik özellikleri bakımından şu ana kadar çalışılmış ve patentlenerek kullanıma sunulmuş olan GI'ların birçoğundan daha üstün özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir (Karaoğlu vd., 2013). Ayrıca gerçekleştirilen çalışmada *xyIA* geni rekombinant DNA teknolojisi yöntemleriyle bir ekspresyon vektörüne (pET28a⁺) klonlandığından enzimin bol miktarda kolaylıkla üretimi mümkün olmuştur. Söz konusu rekombinant vektör mezofilik bir konakta (*E. coli* BL21 suşu) ifade edildiğinden, üretilen termofilik enzim büyük oranda oldukça pratik bir yöntem olan ısı şoku ile saflaştırılabilmektedir.

Yine Karaoğlu ve ark. tarafından gerçekleştirilen 110T282 tübitak projesi kapsamındaki mutasyon çalışmaları sonucunda enzimin katalitik aktivitesi yaklaşık olarak 10 kat arttırılmış, elde edilen veriler doktora tezi kapsamında ulusal literatüre kazandırılmıştır (Karaoğlu, 2010).

Gerek *A. gonensis* ait yabanıl GI gerekse katalitik aktivitesi 10 kat arttırılmış olan W137F/V184S mutant GI, sahip oldukları üstün özellikler nedeniyle endüstriyel alanda kullanım için son derece uygundur. Bununla birlikte, her iki GI'nın immobilize edilerek tekrar tekrar kullanımının sağlanması bu enzimlerin uluslararası enzim pazarındaki rekabet gücünü daha da arttırmak adına uygun bir stratejidir.

Bu bağlamda, Rize Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı imkânlarıyla Yrd. Doç. Dr. Hakan Karaoğlu danışmanlığında gerçekleştirilen bu tez kapsamında; *A.gonensis* 'den elde edilen yabancı GI enzimi ile W137F/V184S mutasyonu ile katalitik aktivitesi yaklaşık olarak 10 kat arttırılmış mutant GI'sı DEAE-Sefaroz matriksi üzerine ayrı ayrı kovalent ve iyonik olarak immobilize edilmiştir. '*Anoxybacillus gonensis* Yaban Tip ve W137F/V184S mutanı glukoz izomerazlarının DEAE-Sefaroz matriksine kovalent ve non-kovalent immobilizasyonu' başlıklı bu tez 2014.103.01.03 nolu BAP projesi ile desteklenmiştir.

1.2. Glukoz İzomeraz ve Glukoz İzomeraz Enziminin Özellikleri

Dünya üzerinde bulunan bitkilerin toplam kütesinin % 40'ını hemiselüloz oluşturur. Birçok farklı mikroorganizma bitkiler üzerinde yaşayabilmek için karbon kaynağı olarak hemiselülozu kullanmak zorundadır. Çeşitli mikroorganizmalar tarafından fermente edilebilen hemiselülotik biyokütlenin temel bileşeni ksilandır ve ksilan da $\beta(1,4)$ bağlarıyla birbirlerine bağlanmış D-ksilozlardan oluşmuştur (Lama vd., 2001). Doğada ve bilinçli oluşturulan üretim alanlarında ksilan enzimatik veya asidik muamele ile ksiloz birimlerine kolayca parçalanabilir. Bakteriler D-ksilozu kullanabilmek için ilk olarak hücre dışı enzimleri ile hemiselülotik biyokütleyi D-ksilozla parçalarlar. Daha sonra, D-ksilozu hücre içine taşıyarak pentoz fosfat yolu öncesi ksilozu ksiluloza izomerize ederler. Ksilozun ksiluloza izomerizasyonunu sağlayan enzim ksiloz izomeraz (KI) (EC 5.3.1.5) enzimidir. D-ksiluloz, D-ksiluloz-5-fosfat'a fosforile edilerek ya pentoz fosfat yoluna ya da fosfoketoz yoluna (Lama vd., 2001) girer. Ksilozun ksiluloza izomerizasyonu endüstriyel olarak potansiyel uygulama alanı bulabilecek bir özelliktir. Çünkü KI ksilozu ksiluloz'a izomerize ederek, ksilozu mayaların alkole fermente edebileceği bir forma dönüştürmüş olur. Günümüzde yaşanan yakıt ve enerji krizleri, hatta bu krizler nedeniyle savaşların bile çıktığı göz önüne alınırsa yenilenebilir bitki biyokütlesinden biyoyakıt üretiminin ne kadar hayati önem taşıdığı anlaşılacaktır. Günümüzde en ekonomik biyoetanol üretimi ilk olarak selüloz ve hemiselülozun glukoz ve ksilozla hidroliz edilerek ve daha sonrada elde edilen glukoz ve ksilozun mayalar kullanılarak alkole fermente edilerek gerçekleştirilir.

Bu nedenle her geçen gün bu konuya duyulan ilgi ve bu konuda gerçekleştirilen bilimsel çalışmalar artmaktadır (Yanmış, 2008).

Ksiloz izomeraz (EC 5.3.1.5) enzimi hücre içinde ksilozu ksiluloza izomerize etmenin yanısıra hücre dışında D-glukoza D-fruktoza izomerize eder. Bu nedenle enzimin yaygın olan kullanılan diğer bir ismi de glukoz izomerazdır. Glukoz izomeraz enzimi, glukozu fruktoza izomerize ederken 'hidrür kayması mekanizması' ile çalışmaktadır. Glukoz izomeraz enzimi bu özelliği nedeniyle amilaz ve proteaz ile birlikte dünya enzim pazarının en çok kullanılan üç enziminden biridir (Bhosale vd., 1996). Çünkü glukoz izomeraz enzimi aktivitesi, tatlandırıcı olarak kullanılan yüksek fruktoz içerikli mısır şurubu üretiminde kullanılır. HFCS glukoz ve fruktozun 1:1 oranında karışımı ile elde edilir. Bu karışımın kullanılması fruktozun tatlandırma kapasitesi sukrozun iki katı, glukozun ise 2,6 katı daha tatlı olduğundan, sadece glukozun veya sadece sukrozun kullanımından daha avantajlıdır. Ayrıca, HFCS'nin sukrozdan daha ucuz olması, sukroz gibi kristallenme problemi olmaması, fruktozun kandaki glukoz seviyesine etki etmeyerek şeker hastaları için daha kullanışlı olması diğer tercih nedenlerindedir (deRaadt vd., 1994).

Fruktoz şurubu sıklıkla gazlı ve gazsız içecekler, fırın ürünleri, çeşitli hububat ürünleri, süt mamulleri, salamura ürünler, işlenmiş gıdalar ve sebze, çorba, domates sosları, meyve gibi konserve ürünlerde kullanılmaktadırlar. GI'nin fruktoz şurubu yapımında kullanımı ilk kez 1957 yılında Marshall ve Kooi'nin *Pseudomonas hydrophyla*'dan elde ettikleri GI ile gerçekleşmiştir. 1995 yılında toplam HFCS tüketimi kuru ağırlık olarak 10 milyon tona ulaşmıştır. Amerika başta olmak üzere birçok ülkede tatlandırıcı olarak sukrozun yerine tamamen HFCS kullanılmaktadır. Glukoz izomeraz enzimi ilk kez *Pseudomonas hydrophila*'da keşfedilmiştir. Daha sonra ise birçok prokaryotik mikroorganizmada çoğunlukla hücre içi nadiren hücre dışı sentezlendiği gözlenmiştir (Bhosale, 1996). *Aspergillus oryzae* GI aktivitesine sahip rapor edilmiş tek mantardır. Ayrıca, buğday tohumunda ve arpa maltında da GI bulunduğu bildirilmiştir (Blow vd., 1992; Bogumil vd., 1993). *Actinomyces olivocinereus*, *Actinoplanes missouriensis*, *Aerobacter aerogenes*, *Bacillus stearothermophilus*, *Brevibacterium incertum*, *Cortobacterium helvolum*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium arborescens*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Microbispora rosea*, *Microellorosporea flavea*, *Paracolobacterium aerogenoides*, *Pseudomonas hydrophila*,

Staphylococcus bibila, *Streptococcus acromogenes*, *Streptomyces olivochromogenes*, *Streptosporangium album*, *Thermopolyspora spp.*, *Xanthomonas spp.*, *Zymomonas mobilis*, *Anoxybacillus gönensis* GI ürettiği bildirilen mikroorganizmalardan sadece birkaçıdır (Yanmış, 2008). D-riboz, L-arabinoz, L-ramnoz, ve D-allozun bu enzimin diğer substratlarıdır (Moses ve Cape, 1994; Pastine vd., 1999). Enzimin optimum çalışma sıcaklığı ve pH'sı elde edildikleri mikroorganizmaların optimum büyüme şartlarına göre 25-85°C ve pH 6.5-9.0 arasındadır. Genellikle moleküler ağırlığı 150.000-185.000 dalton olan GI'lar birbirine benzeyen tetramer veya dimerlerden oluşmaktadır (Bhosale vd., 1996; Xu vd., 2009). Bütün GI'lar aktiviteleri ve kararlı halde bulunmaları için, Co^{+2} , Mn^{+2} , Mg^{+2} veya Cr^{+2} gibi bivalent katyonlara ihtiyaç duyar. Cu^{+2} , Zn^{+2} , Ni^{+2} , Ag^{+2} , Hg^{+2} ve Ca^{+2} gibi bir takım iyonlar ise enzimin katalitik aktivitesini inhibe eder (Brown vd., 1993; Xu vd., 2014).

Enzimatik olarak glukozun izomerizasyonu ilk kez endüstriyel bir oranda 1957 yılında Amerika'da Clinton Corn Processing Co. tarafından başarılmıştır. 1974 yılına gelindiğinde immobilize edilmiş GI artık ticari olarak elde edilebilir halde gelmiştir. Yiyecek endüstrisinde HFCS' ye olan talep her geçen gün artmış ve 1980'e kadar batı dünyasındaki tüm şekerlerle uğraşan büyük şirketler GI teknolojisine başvurmaya başlamıştır. Bugün enzim, yiyecek endüstrisinde en büyük marketlerde yerini almış, dünyanın en çok kullanılan üçüncü endüstriyel enzimi olmuştur (Bhosale, 1996; Mu vd., 2012). GI'nın endüstriyel ölçekte HFCS üretiminde kullanılabilmesi için enzimin üretim maliyetinin düşük olması gerekir. Enzim üretim maliyetini düşürmenin en pratik ve en yaygın kullanılan yolu enzim immobilizasyonudur (Hemmingsen, 1979; Verhoff, 1985; Pedersen, 1993).

HFCS üretiminde mezofilik organizmalardan elde edilen GI, immobilize edilmiş bir şekilde 55-65°C'de pH 7,5 ile 8,5 aralığında kullanılmaktadır (Schenck, 2000; Xu vd., 2014). Bu şartlar altında enzim ile % 40-42 oranında fruktoz üretilebilmektedir. Fakat endüstriyel uygulamalarda kullanılan HFCS'de % 55 fruktoz içeriği aranmaktadır. Dolayısı ile bu oran kromatografik olarak % 55 seviyelerine getirilir. Fakat bu işlem üretim maliyetini arttırmaktadır (Douglas and Jay, 1999). Sıcaklığın artmasıyla fruktoz:glukoz dengesi fruktoz tarafına kaymakta böylece pahalı olan kromatografik saflaştırmaya gerek kalmamaktadır (Tewari and Golberg, 1985; Bhosale,

1996; Karaoglu vd., 2013; Xu vd., 2014). Bu yüzden bu uygulamalarda yüksek sıcaklıklarda çalışan termofilik mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin immobilize halleri tercih edilmektedir (Hartley vd., 2000; Yanmis vd., 2015).

Geçmişten günümüze gerçekleştirilen çalışmaların literatür özetleri tarandığında birçok farklı organizmadan elde edilmiş GI'nın farklı yöntemlerle immobilize edildiği görülür. Chen ve ark., (1979) *Streptomyces flavogriseus* GI'ını benzil DEAE-selüloz, TEAE-selüloz ve DEAE-selüloza immobilize etmişlerdir. Serbest enzim ve immobilize enzimi karşılaştırarak aralarında çeşitli farklar olduğunu rapor etmişlerdir. Palazzi ve Converti (1999) farklı matrikslere immobilize edilmiş glukoz izomerazların kinetik parametrelerini incelemişlerdir. Bandlish vd., (2002) *Thermotoga maritima* (TMGI), *Thermotoga neapolitana* 5068 (TNGI) ve *Streptomyces murinus* (SMGI) glukoz izomerazlarının immobilize ve serbest formlarını kullanarak yüksek sıcaklıklarda glukozun fruktoza izomerizasyonunu araştırmışlardır. GI'nın poliakrilamid; poliakrilamid-k-karrojen; poliakrilamid-alginat matrikslerine ayrı ayrı immobilizasyonları Demirel vd., (2006) Serbest ve immobilize GI enzimi için optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 7,5 ve 60°C olarak belirlemişlerdir. Alagöz vd., (2007) GI'yı Eupergit C250 L üzerine immobilize etmişlerdir. GI enziminin immobilizasyonu ve uygulamaları ile ilgili sayısız patent mevcuttur.

1.3. Enzim İmmobilizasyonu

Bazı biyokatalitik işlemlerde çözünür enzimin bir yüzeye (matrikse) sabitlenmesi istenilir. Bu şekilde bir yüzeye sabitlenmiş enzimlere immobilize (tutuklanmış) enzimler denir. İmmobilizasyon (tutuklanma) yalnızca enzimatik reaksiyonun büyük ölçekli sürekli koşullarda çalışmasını kolaylaştırmakla kalmaz, aynı zamanda denatürasyona karşı enzimin kararlı olmasına yardım eder (Marya, 2012). İlk immobilizasyon uygulaması 1916'da Nelsen ve Griffin'in sukrozu hidrolize eden maya invertazını odun kömürü üzerine absorplamalarıdır. O yıllardan günümüze kadar geçen yaklaşık yüz yıllık sürede yüzlerce farklı enzim sahip oldukları özelliklere göre farklı matriksler üzerine immobilize edilmişlerdir (Marya, 2012). Bir enzimin endüstriyel olarak kullanıma sunulmasında göz önünde bulundurulacak ilk kriter enzimin üretiminin ve kullanımının ne kadar ekonomik olduğudur. Büyük ölçekli gerçekleştirilen

biyoteknolojik süreçlerin birçoğu sıvı bir ortam içerisinde gerçekleşmektedir. Bu nedenle bu süreçlerde kullanılan enzimleri tekrar kullanmak mümkün değildir. Ayrıca, elde edilmesi istenen ürün üretildikten sonra hala enzimin ortamda bulunması çift yönlü çalışan reaksiyonlarda enzimin ürüne zarar vermesine neden olabilir ya da enzimin varlığı başlı başına bir kirlilik olabilir. İmmobilizasyon hem enzimin tekrar tekrar kullanımını sağladığı hem de sıvı reaksiyon ortamından enzimin kolayca uzaklaştırılmasını sağladığından endüstriyel uygulamalarda en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Tüm bunların yanı sıra sürekli üretime olanak veren immobilizasyon yöntemi, birbirini izleyen çoklu reaksiyonlar için de uygundur ve pH, sıcaklık gibi çevre koşullarındaki değişimlere karşı daha dayanıklıdır. Ancak, gerçekleştirilen immobilizasyon işlemi zaman zaman enzimin aktivitesinin bozulmasına neden olabilir (Andreescu vd., 2006; Brady ve Jordan 2009; Naslıyan, 2012). İmmobilizasyon işlemi gerçekleştirilirken kullanılan matrikslerden bazıları boncuklar, lifler (elyaf), filmler, membranlar ve kapalı kapsüllerdir (Twyman, 2005). Matriksler kimyasal yapılarına göre organik veya inorganik olarak sınıflandırılırlar. Organik matriksler; polisakkaritler (selüloz, dekstran, agar, agaroz, kitin vb.), proteinler (kollojen, albümin) gibi doğal matriksler ve poliakrilat, polimetakrilat, poliakrilamid, vinil, polistiren gibi sentetik matriksler olmak üzere ikiye ayrılır. Bentonit, silika gibi doğal mineraller, gözenekli ve gözeneksiz cam, metaller de inorganik matrikslere örnektir. İnorganik taşıyıcılar fiziksel, kimyasal ve mikrobiyal parçalanmaya dayanıklı olma gibi birçok avantaja sahip olmalarına rağmen endüstriyel süreçlerde çoğunlukla organik matriksler kullanılır (Gemeiner, 1992).

1.3.1. İmmobilizasyon Yöntemleri

İmmobilizasyon yöntemleri temel olarak geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz immobilizasyon yöntemleri olmak üzere ikiye ayrılır.

1.3.1.1. Geri Dönüşümsüz İmmobilizasyon

Geri dönüşümsüz immobilizasyonda, taşıyıcı ve enzim ayrıldığında ya taşıyıcı yada enzim biyolojik aktivitesini kaybeder. Kovalent bağ oluşturulması, hapsedme (entrapment), çapraz bağlama geri dönüşümsüz immobilizasyon çeşitleridir.

Kovalent bağ oluşturulması: Enzim ile aktifleştirilmiş katı bir taşıyıcı arasında kovalent bağ oluşumuna dayanır. Bu yöntemde matriks ve enzim arasındaki bağ kararlı ve sağlam olduğundan enzimin çözeltiliye geçmesi önlenmiş olur. Kovalent bağ genellikle enzim yüzeyinde bulunan aminoasitlerin radikal gruplarıyla matriksde bulunan fonksiyonel gruplar arasında oluşur (Kennedy, 1995). Kovalent bağ oluşumu ile immobilizasyon yönteminde en çok dikkat edilmesi gereken nokta enzimin aktif bölgesinin kovalent bağ oluşumuna katılmamasıdır. Çünkü böyle bir durum enzimin katalitik aktivitesini kısmen veya tamamen yitirmesine neden olabilir. Bu durumu önlemek için immobilizasyonun gerçekteştiği ortama enzimin inhibitörlerini ilave etmek uygun bir yaklaşım olabilir. Kovalent bağlanma ile immobilizasyon enzimin konformasyonel kararlılığını arttırarak enzimin sıcaklık, pH ve organik çözücülere karşı kararlılığını arttırır (Mateo vd., 2007).

Hapsetme (Entrapment): Hapsetme immobilizasyon yönteminde serbest halde bulunan enzim molekülleri matriksin yapısı içerisine hareketsiz olarak yerleştirilir. Bu yöntemde genellikle matriks olarak organik polimer, sol-jel gibi polimerik ađ yapısı gösteren maddeler kullanılır (Ackerman, 2006). Enzimin hapsedildiği matriksin gözenekleri enzimin dışarı sızmasını önleyecek kadar sıkı olmakla birlikte substratın ve ürünün hareket etmesine izin verecek boyutta olması gerekmektedir (Bickerstaff, 1997).Enzimlerin tutuklanması genellikle mikrokapsülasyon veya jel veya fiber yapısına hapsetme şeklinde gerçekteştirilir (Guisan, 2006).

Çapraz bağlama: Gluteraldehid, toluen diizosiyanat gibi iki ya da çok fonksiyonlu reaktifler aracılığıyla enzimler arasında kovalent bağların oluşmasına dayanmaktadır (Eldin, 2000; Albayrak vd., 2002). Bu yöntemde proteinlerin çözünmeyen taşıyıcıya çapraz bağlanmasıyla, substrat çözeltilisindeki enzim kaybı önlenmektedir (Sheldon, 2010).

1.3.1.2. Geri Dönüşümlü İmmobilizasyon

Geri dönüşümlü immobilizasyonda enzim bağlandığı matriksten aralarındaki bağ nedeniyle kolaylıkla ayrılabilir. Enzim immobilizasyonu için geri dönüşümlü metotların

kullanımı enzimin aktivitesi düştüğünde matriks yenilenerek enzimin yeniden kullanımına izin verdiği için ekonomik olarak oldukça avantajlıdır.

Adsorpsiyon (kovalent olmayan ilişkiler): Adsorpsiyon immobilizasyon en basit immobilizasyon şeklidir ve enzim ile matriks arasında hidrojen bağı, Van der Waals etkileşimleri, hidrofobik etkileşimler, tuz köprüleri oluşması ile gerçekleşir (Persson vd, 2000). Enzimin aktif bölgesi bu bağlanmadan etkilenmez ve aktivitesini korur (Mulchandam vd, 1998). Adsorpsiyon ile immobilizasyon ılımlı koşullarda, kimyasal madde kullanımına gerek olmaksızın gerçekleşir. Uygulama kolaydır ve enzim aktivitesinin korunması açısından avantajlıdır. Diğer yandan bu immobilizasyonda, bağın gücü, pH, iyonik şiddet, sıcaklık gibi enzimin bazı özellikleri değişebilir. Kullanılan matriksin yüzey özelliklerine bağlı olarak enzim denatürasyonu görülebilir (Costa vd, 2004).

İyonik bağlanma: İyonik bağlanma immobilizasyonunda iyon değişimi kromatografisi yönteminde kullanılan matriks-enzim etkileşimi kullanılır. Basit ve geri dönüşümlü yöntemin uygulanmasındaki en önemli sıkıntı enzimin hem güçlü bağlandığı hem de tamamen aktif olduğu koşulları bulmaktır. Bu uygulamada substrat veya ürünler yüklenmiş halde bulduklarından enzimin optimum pH'sı ve pH stabilitesi değişebilir. Bu durum başlangıçta bir dezavantaj gibi görülsede gerçekleştirilen biyoteknolojik sürece bağlı olarak enzimin optimum pH'sının daha bazik veya daha asidik koşullarda gerçekleşmesi arzu edilen bir durumda olabilir (Brena ve Batista, 2006).

Affinite bağlanma immobilizasyonu: Affinite immobilizasyonunun dayandığı temel prensip komplementer biyomoleküllerin birbirleriyle etkileşerek immobilizasyon sağlamasıdır. Etkileşimlerin son derece spesifik olduğu yöntemde, aktive edilmiş matriks ve enzim yüzeyinde bulunan spesifik grup arasında biyoaffinite oluşur. Bu durum, proteinin belirli pozisyonda affinite kuyruğu kullanılarak elde edilir ve bu protein katlanması veya aktivitesini etkilemez. Affinite bağlanma immobilizasyonunu oluşturulabilmesi için biyo uyumlu ve gerekli fonksiyonel gruplara sahip bir matriks ile proteinin dış yüzeyinde bulunan özel grupların etkileşmesi gerekir (Andreescu vd, 2006). Ayrıntılı manipülasyon işlemlerinin gerekliliği ve pahalı bir yöntem olması

nedeniyle bu yöntem, sadece sulu sistemlerde ve pahalı enzimlerin kullanıldığı durumlarda tercih edilir.

Şelat veya metal bağlama immobilizasyonu: Şelat veya metal bağlama immobilizasyonunda ilk olarak matriks üzerine şelatlayıcı veya metal ligandlar adsorbsiyon bölgelerinin oluşumunu sağlamak için karalı kovalent bağlar ile bağlanırlar. Metal bağlı immobilizasyon olarakta adlandırılan bu metotta başlıca titanyum ve zirkonyum tuzları kullanılır. Bu metal tuzları hidrosit ısıtma veya nötralizasyon aracılığı ile taşıyıcı (seluloz, kitin, alginik asit ve silika bazlı taşıyıcılar) üzerine çöktürülür ve bu gruplar enzimde bulunan gruplarla etkileşim gerçekleştirir. Bu yöntemle enzimlerin spesifik aktivitesi nispeten yükselmekle birlikte taşıyıcıdan önemli derecede metal iyonu sızması nedeniyle alınan sonuçlar farklılık gösterir (Cabral vd, 1991).

Disülfid bağlarının oluşumu immobilizasyonu: Bu immobilizasyon yöntemi prensip olarak matriks ile enzim arasında disülfid (S-S) bağlarının oluşmasına dayanır. Bu nedenle tiyol (-SH) grupları taşıyan enzimler reaktif disülfür veya disülfür oksitlerle sağlanan tiyol destekleri üzerine immobilize edilirler. Bu immobilizasyon yönteminin en önemli avantajı matriks ve enzim arasında oluşan bağlar geri dönüşümlü olduğu için enzim kullanıldıktan sonra matriksten ayrılabilir olması ve matriksin tekrar tekrar kullanılabilir olmasıdır. Bu durum matrikse harcanan yüksek maliyeti düşürür (Carlsson vd, 1998).

Enzimlerin Elektrod Yüzeyine immobilizasyonu: Enzimlerin elektrod yüzeyine immobilizasyonunda elektrokimyasal polimerizasyon parametrelerinin seçimi en önemli basamaktır. Amperometrik ve potansiyometrik enzim elektrodları elektrot yüzeylerine immobilize edilir. Bu yöntemde elektrot yüzeyine enzimin yerleştirilmesi için geleneksel immobilizasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden bazıları diyaliz membran yüzeyine enzimin fiziksel olarak tutuklanması, elektrot yüzeyine veya polimerik taşıyıcıya, enzimin kovalent bağlanması, protein matriks içinde gluteraldehit kullanarak enzimin çapraz bağlanmasıdır (Sternberg vd, 1988).

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

Bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı'ndaki kültür stoklarında bulunan *Anoxybacillus gonensis* G2^T bakterisine ait ve *E.coli* BL21 (DE3) suşunda rekombinant olarak üretilen ve saflaştırılan glukoz izomeraz enzimi ile gerçekleştirilmiştir.

2.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller

2.1.1. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler ve sarf malzemeler

Tripton (Fluka VCBN7396V), Yeast Ekstrakt (Merck VM445253224), NaCl (Sigma 7647-14-5), CaCl₂ (sigma C5670), CoCl₂, MgSO₄ (Merck K45872982 441), D-Glukoz (sigma 50-99-7), D-Fruktoz (Bioshop 5D38250412), MOPS (Fisher scientific 154054), Lizozim (Bioshop 6C42679), Perklorik asit (Merck C691919), Sistein (Sigma 52-90-4), Karbozol (sigma CDS008630), Sülfürik asit (Merk K45905413 434), Etil alkol (Smyras 305041016060), Kanamisin (fisher 134473), IPTG (Bioshop 6C42892), Commassie Brilliant Blue G-250 (Panreac 5M014937), Commassie Brilliant Blue R-250, fosforik asit (Carlo erba 304062), BSA (NEB), DEAE-Sepharose (Sigma GE17-0709-01), Phenyl sepharose 6 Fast Flow (Sigma), Amonyom sülfat (Merck A0296217 201), Sodyum asetat (Merck AM0793468550), Tris (Fisher Scientific 149456A), Glutaredhit (Sigma SLBG1666V), Potassium phosphate (Merck A0435601 442), Glisin (fluka50052), Hydrochloric acid (Sigma aldrich 82670), Sodium hydroxide (Applichem 8Z011622)

2.1.2. Deneylerde Kullanılan Besi Yerleri

Bakteri üretmek için besi yerleri olarak LB (Lauria-Bertani) besi yeri kullanıldı. Bunun için 10 g tripton, 5 g yeast ekstrakt ve 10 g NaCl 700 ml saf suda karıştırıldı ve pH'sı 7,4'e ayarlanarak 1 litreye tamamlandı. Kullanılan tüm besi yerleri otoklavda 121°C'de 1,1 atm basınç altında 20 dakika süre ile Wise Clave- Wisd marka otoklav cihazı kullanılarak steril edildi.

2.1.3. Deneylerde Kullanılan Hücre ve Plazmitler

Glukoz izomeraz enzim kaynağı olarak *Anoxybacillus gonensis* G2^T bakterisinin *xylA* geninin pET28a⁺ ekspresyon vektörüne aktarılmış olduğu ve laboratuvar stoklarımızda mevcut olan pETG2GI vektörü kullandı (Karaoğlu, 2010).

W137F/V184S mutant enzim kaynağı olarak pETG2GI'den üretilmiş olan ve yine laboratuvar stoklarımızda mevcut bulunan mutant plazmit kullanıldı.

Enzimin üretileceği konak organizma olarak ise pET vektör sistemleriyle uyumlu olan *E.coli* BL21(DE3) suşu kullanıldı.

2.2. Enzimlerin Üretilmesi

2.2.1. pETG2GI'nın *E.coli* BL21 (DE3) Suşu İçerisine Trasformasyonu

E.coli BL21 (DE3) suşu 10 ml LB besi yeri içerisine ekilerek 1 gece boyunca 37°C 'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası bu kültürden O.D.'si (optik yoğunluğun bir ölçüsü olan ekstinksiyon) 0,1 olacak şekilde taze LB kültüre ekim yapılarak O.D. değeri 0,45-0,55 oluncaya kadar (yaklaşık 1 saat) 37°C 'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler 4400 rpm'de çöktürülerek üst sıvı kısım döküldü. Hücreler üzerine 10 ml 0,1 M soğuk CaCl₂ ilave edilerek 30 dakika soğuk buz üzerinde bekletildi. Hücreler süre sonunda tekrar 4400 rpm'de çöktürülerek üst sıvı kısım döküldü. Üzerine 2 ml 0,1 M soğuk CaCl₂ ilave edilerek en az 2 saat +8 °C 'de (buzdolabında) inkübe edildi. Böylelikle *E.coli* BL21 (DE3) suşu kompetent hale getirilmiş oldu.

1,5 µl'lik steril edilmiş santrifüj tüpleri içerisinde, 200 µl kompetent hücre üzerine 0,5 µl pETG2GI ilave edilerek karışım en az 30 dk soğuk buz üzerinde bekletildi. Süre sonunda tüpler (karışım) 43°C 'de 90 sn inkübe edilerek hücreler sıcak şokuna uğratıldı. Hücrelerin üzerine 200 µl LB besi yeri ilave edilerek 37°C 'de 1 saat boyunca inkübe edildi. Böylelikle pETG2GI'nın *E.coli* BL21 (DE3) suşu içerisine transformasyonu tamamlanmış oldu. Süre sonunda hücreler 0,05 mg/ml kanamisin ihtiva

eden katı LB agar besiyeri üzerine yayma ekimle ekilerek bir gece boyunca 37°C 'de 1 gece boyunca inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonrası elde edilen kolonilerden gece kültürü hazırlanarak bu kültürden çizgi ekim kanamisinli LB agar petrilere yapıldı ve gliserol stok hazırlandı.

2.2.2. AgoGI Enziminin Üretilmesi

A. gonensis rekombinant glukoz izomerazını (AgoGI) üretmek için pETG2GI plazmit DNA'sını içeren *E.coli* BL21 (DE3) bakterisi 0,05 mg/ml kanamisin ihtiva eden 10 ml LB besi yeri içerisine ekilerek 1 gece boyunca 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası bu kültürden O.D.'si 0,1 olacak şekilde taze 400 ml LB kültüre ekim yapılarak O.D. değeri 0,8 oluncaya kadar (yaklaşık 1/1,5 saat) 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kültürün son konsantrasyonu 1 mM içerecek şekilde IPTG ilave edilerek gen ekspresyonu uyarıldı. Sonrasında 4 saat daha kültür 37°C'de inkübe edilerek enzimin ekspresyonu sağlandı. Süre sonunda kültür 7500 rpm'de 5 dk santrifüj yapılarak çöktürüldü. Süpernatant kısmı atılarak çöken hücreler üzerine 1 mM CoCl₂ ve 10 mM MgSO₄ içeren 100 mM MOPS (pH 6,5) tamponundan 4 ml ilave edilerek çöken hücreler çözüldü. Çözülen hücrelerin üzerine son konsantrasyonda 1 µg/ml olacak şekilde lizozim ilave edildi ve hücreler 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Sonrasında, hücreler 2 dakika boyunca % 20 güç ile Sonics-Vibra cell marka sonikatör cihazı kullanılarak patlatıldı. Elde edilen hücre içi çözeltisi 15.300 rpm de 20 dk santrifüj edildi. Pellet kısmı atılarak elde edilen süpernatant hücre özütü (kaba ekstrakt) olarak alındı. Bu hücre özütü ile saflaştırma işlemlerine geçildi.

2.2.3. W137F/V184S Mutant GI'nın Üretilmesi

Bu çalışmada immobilize edilecek diğer enzim olan W137F/V184S mutant enziminin de üretilmesinde, plazmit olarak W137F/V184S mutant *xyIA* genini taşıyan vektör kullanılarak, yukarıda anlatılan prosedür (Bölüm 2.2.1 ve Bölüm 2.2.2) aynen tekrarlanmıştır.

2.3. Enzimlerin Saflaştırılması

2.3.1. AgoGI'nın Saflaştırılması

Bulunduğu hücre özütünden (kaba ekstrakt) AgoGI'nın saflaştırılması için sırası ile ısı şoku uygulaması, DEAE-Sefaroz iyon değişim kolon kromatografisi ve fenil sefaroz hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi saflaştırma yöntemleri kullanılmıştır.

2.3.1.1. Isı Şoku Uygulaması

AgoGI *A.gonensis* glukoz izomerazı olması nedeniyle oldukça termofilik karakterli bir enzimdir. Bu çalışmada AgoGI mezofilik karakterli olan *E.coli* BL21 (DE3) suşu içerisinde ekspres edilmiştir. Dolayısı ile sonikatör ile hücreleri parçalama sonucu elde edilen hücre özütündeki AgoGI haricindeki proteinlerin çok büyük bir bölümü mezofilik karakterdedir. Yapılacak olan ufak bir ısı şoku uygulaması ile mezofilik karakterdeki proteinler denatüre olacaktır. Termofilik karakterde olan AgoGI ise bu durumdan etkilenmeyecektir.

Bu amaç doğrultusunda elde edilen hücre özütü 15 dakika boyunca 70°C'de inkübe edildi. Denatüre olan proteinler 15.300 rpm de 20 dk santrifüj edilerek uzaklaştırıldı.

2.3.1.2. DEAE-Sefaroz İyon Değişim Kolon Kromatografisi

İyon değişim kromatografisi uygulaması için kolon malzemesi olarak DEAE-Sepharose fast flow (Sigma) kullanıldı. Gazı, KNF marka yağlı vakum pompası ile alınan kolon malzemesi, 30 cm uzunluğunda ve 1,5 cm çapında bir kolona pastör pipeti kullanılarak dolduruldu. Tıpkı kolon malzemesinde olduğu gibi deneyde kullanılan tüm tamponların gazları vakum pompası kullanılarak alındı. Doldurma işleminden sonra kolondan 100 ml saf su geçirilerek temizlendi. Daha sonra kolonu dengeye getirmek için 50 ml 1 mM CoCl₂ ve 10 mM MgSO₄ içeren 100 mM MOPS (pH: 6,5) tamponu kolondan geçirildi. Sonrasında kolondan çıkan tamponun pH'sı kontrol edilerek kolonun dengeye gelip gelmediği kontrol edildi.

İyon değişim kolon kromatografisi deneyi Biologic Lp System (Bio-Rad) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Cihazda şu şekilde bir program yazılarak kromatografi gerçekleştirildi;

- 1) Kolunun dengeye getirilmesi (50 ml)
- 2) Enzim özütünün kolona aktarılması (10 ml)
- 3) Tutunmayan proteinlerin temizlenmesi (20 ml)
- 4) 0–0,6 M NaCl gradient köprüsü (100 ml)
- 5) 1M NaCl ile kolonun temizlenmesi (50 ml)
- 6) Saf su ile iyonları uzaklaştırılması (50 ml)

Uygulamada kolona akış hızı 1ml/dk olacak şekilde ayarlandı. Kolondan çıkan örnekler 3 ml'lik fraksiyonlar halinde toplandı. Fraksiyonlardaki protein ve iyon miktarları cihaz tarafından analiz edildi. Fraksiyonların hepsinde GI aktivite tayini yapılarak enzimin çıktığı fraksiyonlar belirlendi. GI aktivitesi bulunan fraksiyonlar bir araya toplandı. Toparlanan enzim özütünde saflaştırma tablosu için gerekli olan analizler (GI aktivitesi, protein miktarı, total hacim vb.) yapıldıktan sonra hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi işlemlerine geçildi.

2.3.1.3. Fenil-Sefaroz Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi

Hidrofobik etkileşim kromatografisi uygulaması için kolon malzemesi olarak Phenyl-Sepharose fast flow (Sigma) kullanıldı. Kolon olarak 30 cm uzunluğunda ve 1,5 cm çapında cam kolon kullanıldı. Kolon malzemesi tüm tamponların gazları KNF marka yağlı vakum pompası kullanılarak alındı. Kolonu dengeye getirmek için 50 ml 1 mM CoCl₂ ve 10 mM MgSO₄ ve 1,3 M amonyum sülfat içeren 100 mM MOPS (pH: 6,5) tamponu kolondan geçirildi.

Hidrofobik kolon kromatografisi deneyi Biologic Lp System (Bio-Rad) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. İyon değişiminden elde edilen enzim özütünün amonyum sülfat içeriğini 1,3 molarla çıkarmak için özüt, aynı hacimde 1 mM CoCl₂ ve 10 mM MgSO₄ ve 2,6 M amonyum sülfat içeren 100 mM MOPS (pH:6,5) tamponu ile karıştırıldı. Enzimin kolona yüklenmesinden sonra amonyum sülfat içeriği 1,3 M'dan 0

molara kadar düşürülerek kolona bağlanan proteinlerin kademeli olarak kolondan ayrılması sağlandı. Cihazda şu şekilde bir program yazılarak kromatografi gerçekleştirildi;

- 1) Kolunun dengeye getirilmesi (50 ml)
- 2) Enzim özütünün kolona aktarılması (10 ml)
- 3) Tutunmayan proteinlerin temizlenmesi (20 ml)
- 4) 1,3M–0 M Amonyum sülfat gradient köprüsü (100 ml)
- 5) Tampon ile kolonun temizlenmesi (50 ml)
- 6) Saf su ile iyonları uzaklaştırılması (50 ml)

Uygulamada kolona akış hızı 1 ml/dk olacak şekilde ayarlandı. Kolondan çıkan örnekler 3 ml'lik fraksiyonlar halinde toplandı. Fraksiyonlardaki protein ve iyon miktarları cihaz tarafından analiz edildi. Fraksiyonların hepsinde GI aktivite tayini yapılarak enzimin çıktığı fraksiyonlar belirlendi. GI aktivitesi bulunan fraksiyonlar bir araya toplandı. Toplanan enzim özütünde saflaştırma tablosu için gerekli olan analizler (GI aktivitesi, protein miktarı, total hacim vb.) yapıldıktan sonra immobilizasyon çalışmalarına geçildi. AgoGI, amonyum sülfat içeriğinin 0 molara düştüğü konsantrasyonda kolondan ayrıldığı için uygulama sonrasında diyalize ihtiyaç duyulmamıştır.

2.3.2. W137F/V184S Mutant Enziminin Saflaştırılması

W137F/V184S mutant enziminin saflaştırılması için yukarıda anlatılan AgoGI'nın saflaştırılması için uygulanan tüm prosedür aynı şekilde uygulanmıştır.

2.4. Enzimlerin DEAE-Sefaroz Matriksine İyonik ve Kovalent İmmobilizasyonu

Enzimlerin immobilizasyonlarında kullanılan tampon, enzimin optimum şartlarda çalışmasına imkan veren ve “reaksiyon tamponu” (RT) olarak adlandırdığımız 1 mM CoCl₂ ve 10 mM MgSO₄ ve 2,6 M amonyum sülfat içeren 100 mM MOPS (pH: 6,5) tamponudur.

2.4.1. Enzimlerin Kovalent İmmobilizasyonu

Hem AgoGI hem de W137F/V184S mutant enziminin DEAE-Sefaroz matriksine kovalent immobilizasyonu aynı prosedür takip edilerek gerçekleştirilmiştir. İmmobilizasyon için şu prosedür takip edildi;

- 2 adet 15'lik falkon tüplere 4000 µl DEAE-Sefaroz matriksi koyuldu
- Matriks çöktükten sonra 6-7 kez önce saf su ile yıkanarak temizlendi
- 6-7 kez RT (pH 6,5) ile yıkanarak dengelendi
- Matriks tamamen çöktükten sonra, matriks üzerinde 1500 µl RT kalacak kadar sıvı bırakıldı
- Üzerine 3000 µl glutaraldehit eklendi
- 25°C'de 2 saat boyunca sallayıcıda sallanarak matriksin glutaraldehit ile aktifleştirilmesi sağlandı
- Aktifleştirme sonrası matriksin glutaraldehitden arındırılması sağlamak amacıyla RT ile 6-7 kez yıkandı
- Yıkama bittikten sonra tüplerin üzerine 4000 µl enzim (AgoGI ve W137F/V184S) ilave edildi
- 16 saat 2C'de sallanarak enzimlerin kovalent olarak immobilize olması sağlandı
- Daha sonra +8°C'de sonraki çalışmalar için stoklandı.

2.4.2. Enzimlerin İyonik İmmobilizasyonu

Hem AgoGI hem de W137F/V184S mutant enziminin DEAE-Sefaroz matriksine iyonik immobilizasyonu aynı prosedür takip edilerek gerçekleştirildi. Prosedür kovalent immobilizasyonunda takip edilen prosedürün aynısıdır. Sadece farklılık olarak 3000 µl glutaraldehit ilavesi yapılmamış ve RT ile matriks dengelendikten sonra direkt olarak enzim ilavesi yapılmıştır.

2.5. Biyokimyasal Çalışmalar

2.5.1. Protein Miktarı Tayini

Bu çalışma boyunca yapılan tüm protein miktarının tayini Bradford'un (1976) geliştirmiş olduğu metoda göre gerçekleştirildi. 100 ml Bradford çözeltisi hazırlamak için 5 ml % 95'lik etanol içerisinde 10 mg Commassie Brilliant Blue G-250 iyice çözüldü. Bu çözeltinin üzerine 10 ml % 85'lik fosforik asit ilave edilerek 100 ml'ye saf su ile tamamlandı. Çözelti filtre kâğıdı ile süzülerek temizlendi.

Protein miktarı ölçümleri yukarıda hazırlanan çözelti ve standart olarak bovin serum albumin (BSA) kullanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrisine göre hesaplandı. Kalibrasyon eğrisi için; 2, 4, 8, 10, 15, 30, 50, 75, 100, 125, 150 ve 200 µg BSA içeren çözeltiler 0,15 M'lık NaCl ile 100 µl'ye tamamlandı. Üzerlerine 5 ml boya çözeltisinden ilave edilerek vortekslendi. 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyondan sonra Xmark Microplate Spectrophotometer (BioRad) cihazı ile 595 nm'de standart kalibrasyon eğrisi oluşturuldu.

Örneklerin protein miktarı analizi için, BSA yerine analizi yapılacak numune kullanılarak aynı işlemler gerçekleştirildi.

2.5.2. Glukoz İzomeraz Aktivite Deneyi

AgoGI ve mutant enzimi için kullanılan GI aktivitesi tayini metodu Karaoğlu (2010) tarafından belirlenen optimum deney şartları takip edilerek gerçekleştirildi. 15 µl homojenize edilmiş immobilize enzim özütü ile substrat olarak RT içerisinde hazırlanmış 100 mM glukoz, son hacim 250 µl olacak şekilde reaksiyona sokuldu. Reaksiyonun son hacmi 250 µl'ye reaksiyon tamponu (RT: 1 mM CoCl₂, 10mM MgSO₄ ve pH' sı 6,5 olan 100 mM MOPS tamponu) ile tamamlandı. Reaksiyon 85°C'de 30 dakika boyunca TS-100C (Biosan) termoshaker cihazı kullanılarak 1000 rpm'de sallanarak gerçekleştirildi. Reaksiyon, süre sonunda reaksiyon karışımını içeren 1,5 µl'lik santrifüj tüplerinin, buz üzerine alınması ile sonlandırıldı. Bir dakikada 1 µmol fruktoz üreten enzim miktarı 1 Ünite olarak kabul edildi.

Reaksiyon sonucunda tüplerin içinde izomerizasyon sonrası açığa çıkan fruktoz miktarını ölçmek için Dische ve arkadaşlarının (1951) geliştirdikleri sistein-karbozol-sülfürik asit metodu kullanıldı. İmmobilize olan enzim tamamen çöktükten sonra üste kalan reaksiyon çözeltisinin 50 µl'si üzerine % 1,5'lik sistein hidroklorür ve hemen ardından 40 µl % 96'lık etil alkolde çözülmüş % 0,12'lik karbozol ilave edilerek karışım vortekslendi. Üzerine % 70'lik 1,2 ml sülfürik asit ilave edilerek tekrar vortekslendi. 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten Xmark Microplate Spectrophotometer (BioRad) cihazı kullanılarak 560 nm dalga boyunda ölçümler gerçekleştirildi. Açığa çıkan fruktoz miktarı yine aynı cihazda hazırlanan fruktoz kalibrasyon eğrisine göre hesaplandı. GI aktivitesi, glukozun enzim ile izomerizasyonu sonucu açığa çıkan oluşan fruktoz miktarına göre µmol/dakika cinsinden hesaplandı.

2.5.3. Enzimlerin Optimum Çalışma Sıcaklıklarının Belirlenmesi

İmmobilize edilmiş enzimlerin en iyi çalıştığı optimum sıcaklık değerini hesaplamak için farklı sıcaklıklarda bir seri reaksiyon gerçekleştirildi. Reaksiyonlar; 15 µl homojenize edilmiş immobilize enzim özütü ile substrat olarak 100 mM glukozun 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ve 100°C'lerde 30 dakikalık inkübasyonu ile gerçekleştirildi. Reaksiyonun son hacmi reaksiyon tamponu ile 250 µl'ye ayarlandı.

2.5.4. Enzimlerin Optimum pH Değerlerinin Belirlenmesi

İmmobilize edilmiş enzimlerin en iyi çalıştığı pH değerini hesaplamak için farklı pH değerlerine sahip tamponlarda ve 250 µl son hacimde bir dizi reaksiyon gerçekleştirildi. Buna göre reaksiyonlar;

- 100 mM asetat tamponlarında (pH : 5,0 – 5,5)
- 100 mM fosfat tamponlarında (pH : 6,0 – 6,5– 7,0)
- 100 mM Tris-HCl tamponlarında (pH : 7,0 – 7,5 – 8,0 – 8,5)
- 100 mM glisin tamponlarında (pH : 9,0 – 9,5 – 10,0) hazırlandı.

Reaksiyonlar, 85°C’de 30 dakika boyunca, substrat olarak 100 mM glukoz kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm tampon çözeltilerine reaksiyonun son hacimdeki konsantrasyonu 1 mM CoCl₂, 10mM MgSO₄ olacak şekilde, enzimin kofaktör olarak ihtiyaç duyduğu Co⁺² ve Mg⁺² iyonları ilave edildi.

2.5.5. Enzimlerin Kinetik Parametreleri

Enzimlerin kinetik parametrelerini hesaplayabilmek için 700 mM’a kadar arttırılan substrat konsantrasyonu ile yukarıda belirlenen 85°C’de ve pH 6,5’te bir seri reaksiyon gerçekleştirildi. Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerleri; açığa çıkan fruktoz miktarının µmol/dk cinsinde hesaplanması ile çizilen Michaelis-Menten grafiğinden, OriginPro 8.1 analiz programı kullanılarak hesaplandı.

2.5.6. Saflaştırılan Enzimlerin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi Analizi

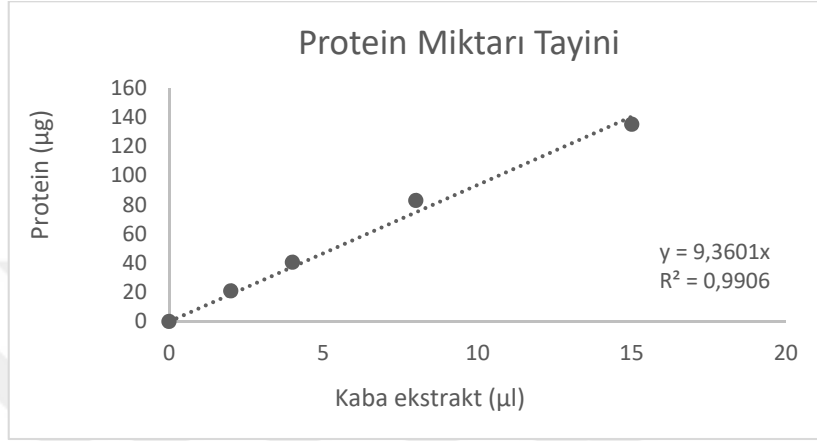
Protein jel elektroferezleri Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad) marka elektroferez cihazı kullanılarak % 12’lik jel de, 40 mA’lik akım altında gerçekleştirildi.

Saflaştırma basamaklarından sonra herbir kuyucuğa enzim özümlerinden 20 µl yüklendi. Her bir örnek üzerlerine eşit miktarlarda muamele (0,15 M Tris-HCl pH 6,8; % 4 SDS; %20 Gliserol; % 6 β-merkaptolanol), tamponu ilave edildi. 99°C’de 4 dakika bekletilerek proteinlerin 3 boyutlu yapıları denatüre edildi. Denatüre edilen örnekler Maniatis ve arkadaşları (1982) tarafından tanımlanan %12’lik sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jeline (SDS-PAGE) yüklendi ve 40 mA akım altında, yürütme boyası jelden çıkana kadar yürütüldü. Yürütme işlemi sonrasında jel, Commasie Brilliant Blue (% 0,125 Commasie Brilliant Blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit) boyası ile 1 saat boyandı ve hemen ardından yıkama solüsyonunda (%36 Metanol, %9 Asetik asit) 1 saat yıkanarak bir bilgisayar tarayıcısı ile fotoğraflandı.

3.BULGULAR

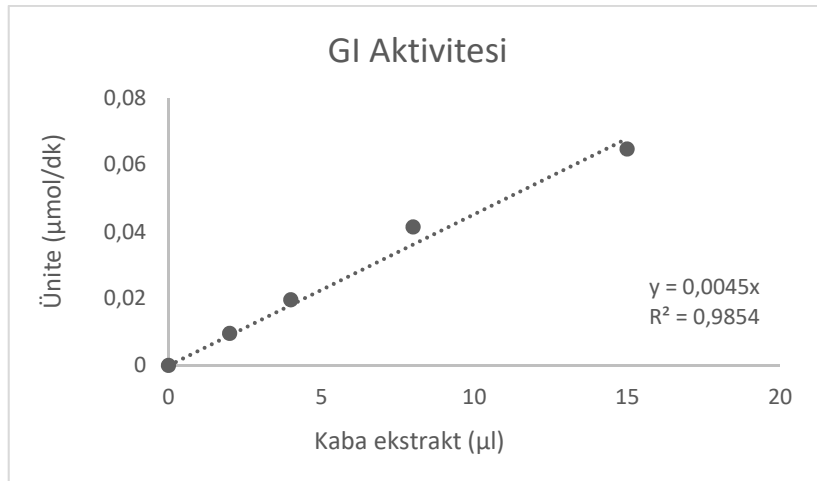
3.1. AgoGI Saflaştırması

3.1.1. Kaba Ekstrakt



Şekil 1. AgoGI'nın saflaştırması işleminde kaba ekstrakta ait protein miktarı tayini

Enzimin ekspresyonu sonrası elde edilen hücre özütünde (kaba ekstrakt) protein miktarı Bradford metodu ile 9,3601 µg/µl olarak hesaplandı.

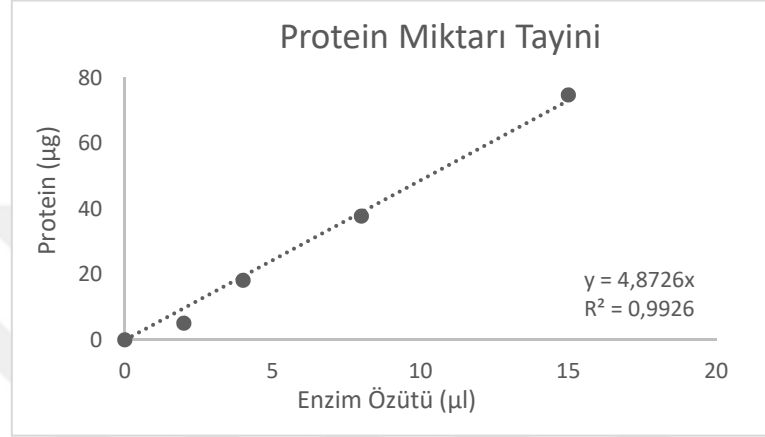


Şekil 2. AgoGI'nın saflaştırması işleminde kaba ekstrakta ait GI aktivite tayini

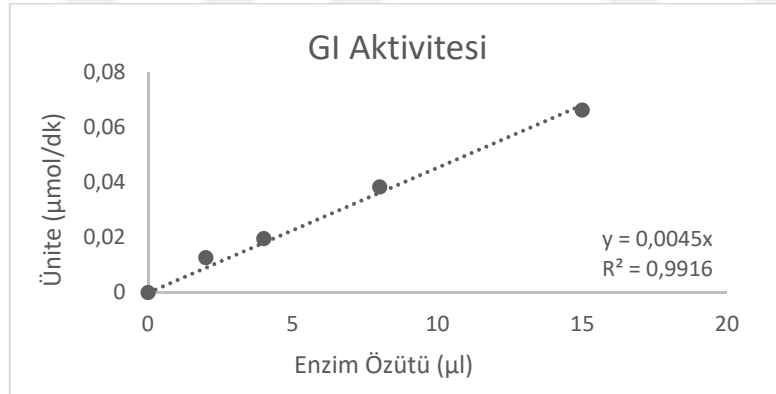
GI aktivitesini hesaplamak için enzim 20 kat sulandırılarak reaksiyon yapıldı. Burada enzim tarafından üretilen fruktoz miktarı çok fazla olduğundan çok fazla renk meydana gelmekte ve spektrofotometrenin okuma aralığını geçmektedir. 20 kat

seyreltilen enzimle reaksiyonlar gerçekleştirilip elde edilen değerin 20 ile çarpılması ile enzimin 1 µl'sinin ürettiği fruktoz miktarı hesaplanabilir. Kaba ekstraktın GI Aktivitesi $0,0045 \times 20 = 0,09$ µmol/dk olarak hesaplandı. Enzim 20 kat sulandırıldığında bile 30 ve 50 µl enzimle yapılan aktivite sonrası ölçümler “out of range” hatası vermektedir.

3.1.2. Isı Şoku Uygulaması



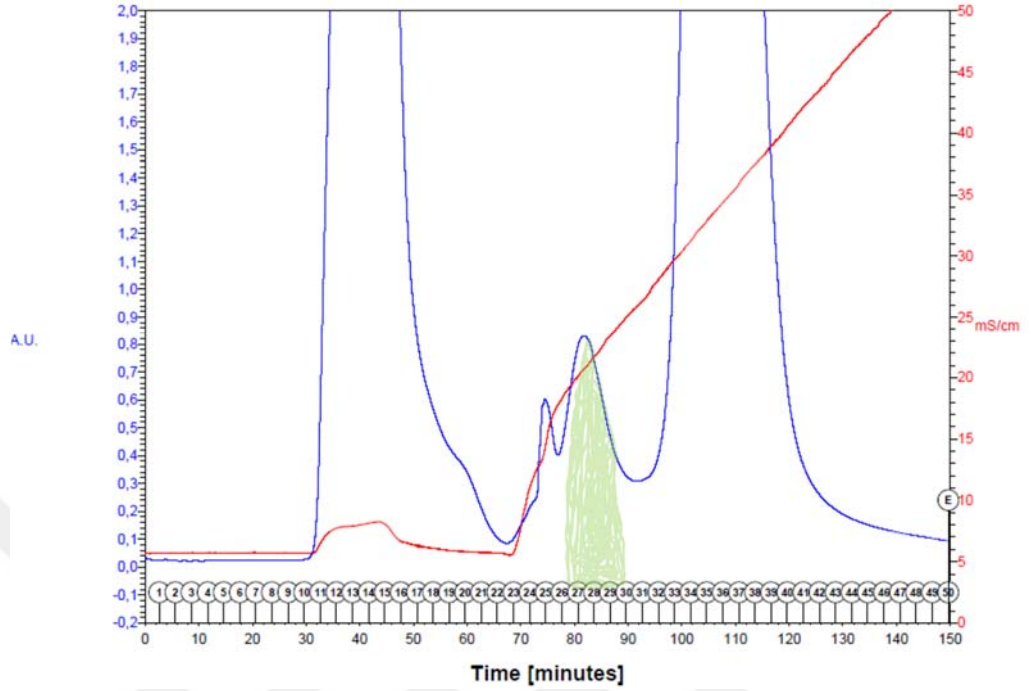
Şekil 3. AgoGI'nın saflaştırması işleminde ısı şoku sonrası elde edilen hücre özütüne ait protein miktarı tayini



Şekil 4. AgoGI'nın saflaştırması işleminde ısı şoku sonrası elde edilen hücre özütüne ait GI aktivite tayini

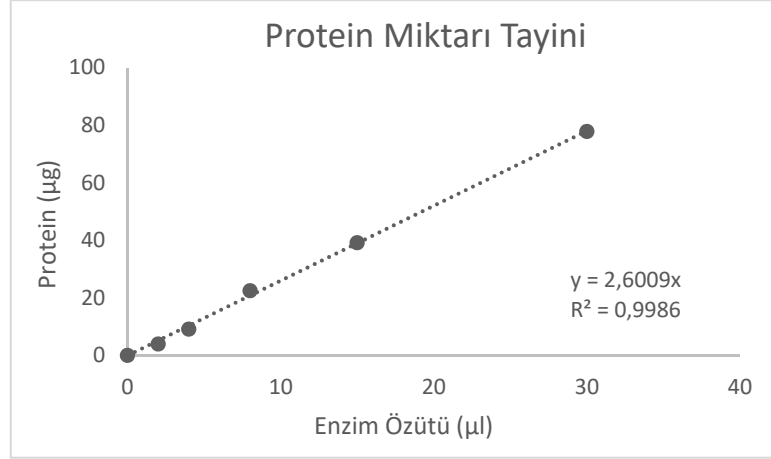
Isı şoku uygulaması sonrası enzim özütünün protein miktarı $4,8726$ µg/µl olarak hesaplandı. 20 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite sonucu ise $0,0045 \times 20 = 0,09$ µmol/dk olarak hesaplandı.

3.1.3. İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması

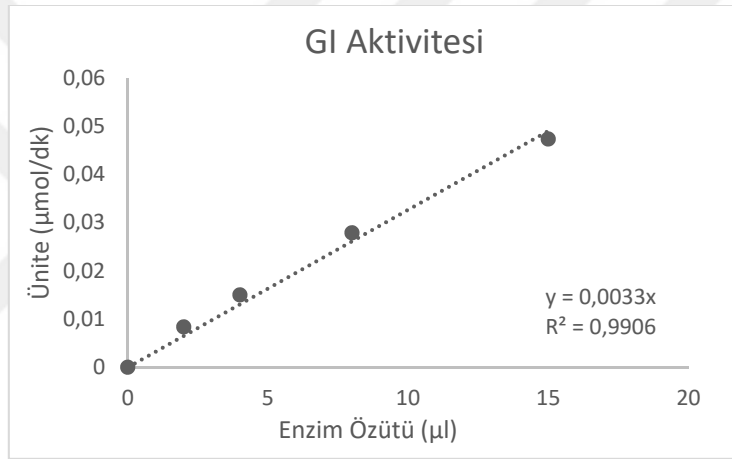


Şekil 5. AgoGI'nın saflaştırması işlemine ait iyon değişim kolon kromatografisi grafiği

DEAE-Sefaroz kullanılarak BioLogic LP cihazında gerçekleştirilen iyon değişim kolon kromatografisi grafiği yukarıda görülmektedir. Şekil 5'te mavi renkte görülen çizgi kolondan çıkan protein miktarını (295 nm'de absorban değerleri) göstermektedir. Yuvarlak içerisinde görülen sayılar her birinin içerisinde 3 ml kolondan çıkan çözelti bulunan tüp numaralarını göstermektedir. Kırmızı renkte görülen çizgi ise NaCl konsantrasyonunu göstermektedir. Mavi renk takip edilecek olursa 10-22 tüpler arasında yüksek miktarlarda protein kolondan çıkmıştır. Burada kolondan çıkan proteinler kolona tutunmayan proteinlerdir. Kırmızı çizginin yani NaCl konsantrasyonunun artmaya başladığı 23 tüpten itibaren artan iyonik güçle birlikte çeşitli proteinlerin farklı tüplere ayrıldığı görülmektedir. Tüm tüplerde GI aktivitesi tarandı ve 27-32 nci tüpler arasında GI aktivitesi tespit edildi. Hem 10-22 tüpler arasında hem de GI enziminin kolondan ayrıldıktan sonra 32 ve 42 nci tüpler arasında gelen yüksek miktarda protein gözlenen fraksiyonlarda GI aktivitesi bulunmamaktadır. Cihazın 295 nm'de maksimum ölçüm aralığı 2.0 absorban olduğundan bazı piklerin tepe noktaları grafikte görülememektedir.



Şekil 6. AgoGI'nın saflaştırması işleminde iyon değişim kolon kromatografisi sonrası elde edilen hücre özütüne ait protein miktarı tayini



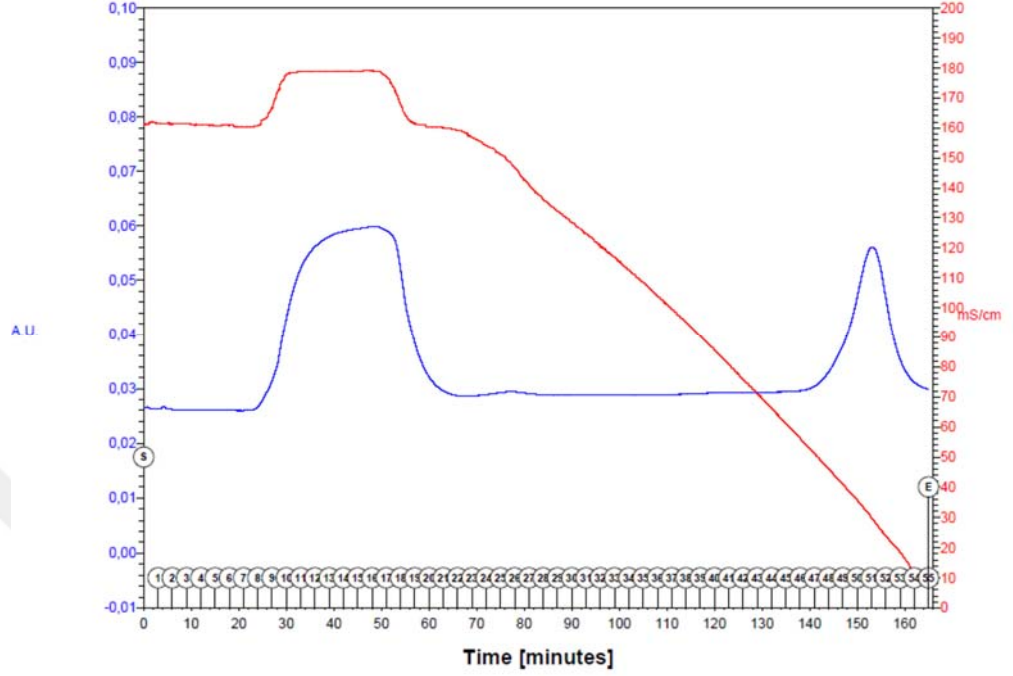
Şekil 7. AgoGI'nın saflaştırması işleminde iyon değişim kolon kromatografisi sonrası elde edilen hücre özütüne GI aktivite tayini

İyon değişim kolon kromatografisi uygulaması sonrası enzim özütünün protein miktarı 2,6009 µg/µl olarak hesaplandı. GI Aktivitesi 0,066 µmol/dk olarak hesaplandı.

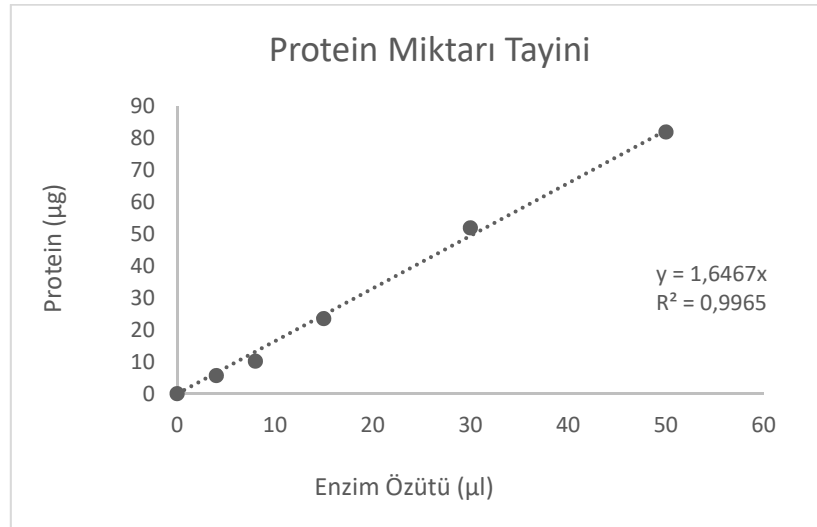
3.1.4. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması

Fhenyl Sepharose 6 Fast Flow (Sigma) kullanılarak BioLogic LP cihazında gerçekleştirilen hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi grafiği aşağıda görülmektedir. Mavi çizgi 295 nm'de absorbans değerini kırmızı çizgi ise Amonyum sülfat konsantrasyonunu göstermektedir. 48-53 ncü tüpler arasında GI enzimi, düşen Amonyum sülfat konsantrasyonu ile birlikte kolondan ayrılmıştır. Yapılan GI aktivite çalışmaları sonrasında sadece 48-53 nolu tüplerde aktiviteye rastlanmıştır. 48-53 arası

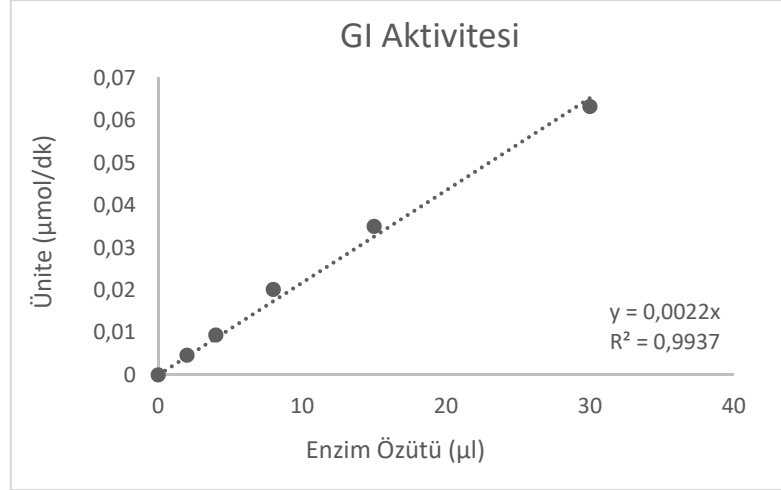
tüplerdeki enzim özütleri birleştirilerek total protein ve aktivite çalışmalarına geçilmiştir.



Şekil 8. AgoGI'nın saflaştırması işlemine ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi grafiği



Şekil 9. AgoGI'nın saflaştırması işleminde hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi sonrası elde edilen hücre özütüne ait protein miktarı tayini



Şekil 10. AgoGI'nın saflaştırması işleminde hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi sonrası elde edilen hücre özütüne ait GI miktarı tayini

Hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulaması sonrası enzim özütünün protein miktarı 1,6467 µg/µl olarak hesaplandı. GI Aktivitesi 0,044 µmol/dk olarak hesaplandı.

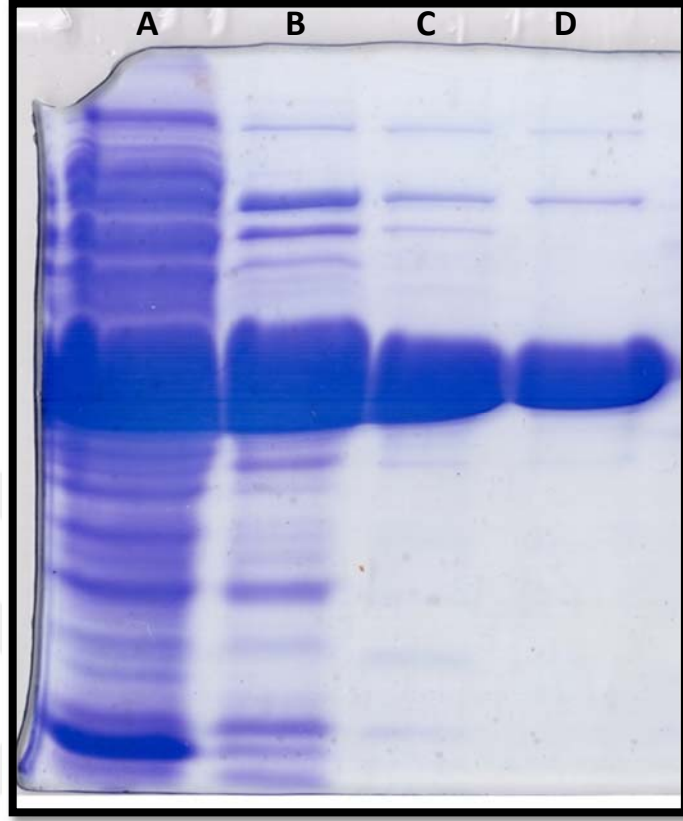
3.1.5. Saflaştırma Tablosu

Tablo1. AgoGI'nın saflaştırılması işlemine ait saflaştırma tablosu

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

Tablo 1'de görüleceği üzere tüm saflaştırma uygulamaları başarılı olmuştur. Saflaştırma sonrası enzimin spesifik aktivitesi 9,615'ten 26,720 µmol/dk/mg proteine yükselirken enzim %60 verim ile 2.78 kat saflaştırıldı. Hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulamasından sonra birleştirilen fraksiyonlar saf enzim özütü olarak kabul edilerek immobilizasyon çalışmalarında kullanıldı.

3.1.6. AgoGI'nın Saflaştırma İşlemlerine Ait SDS-Page Jel Elektroforezi



Şekil 11. AgoGI'nın saflaştırmasına ait SDS-Page Jel Elektroforezi (A: Kaba ekstrakt, B: 1s1 şoku, C: İyon değişim kolon kromatografisi, D: Hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi)

AgoGI'nın saflaştırma işlemleri esnasında, her saflaştırma başamağından sonra bir miktar enzim özütü stoklanarak saflaştırma işlemi sonrasında SDS-Page Jel Elektroforezi hazırlandı.

3.2. W137F/V184S Mutant Enziminin Saflaştırması

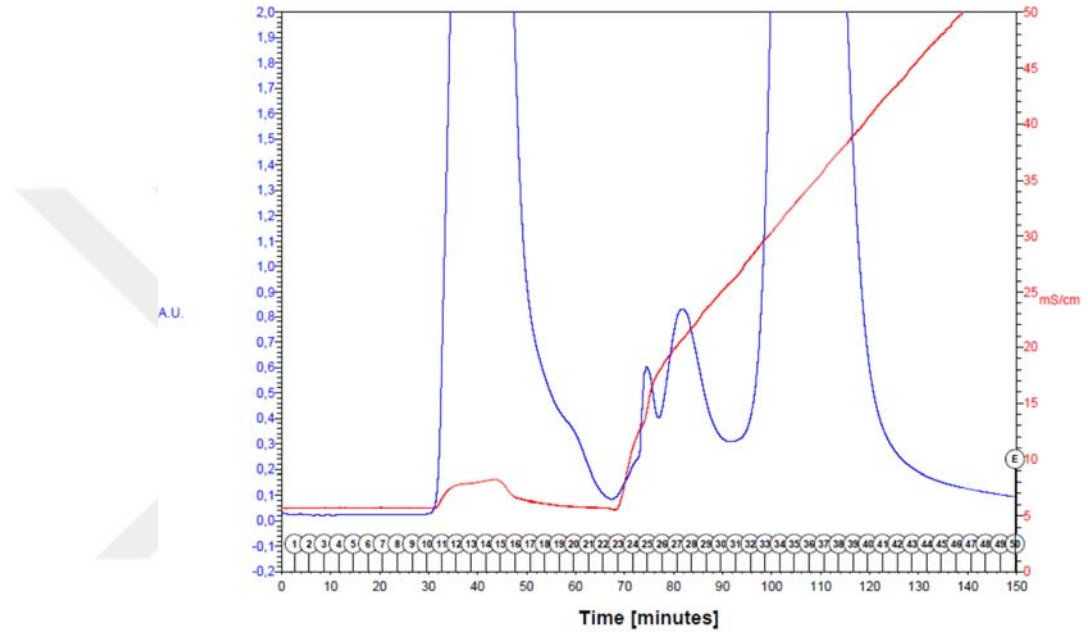
3.2.1. Kaba ekstrakt

W137F/V184S mutant enziminin ekspresyonu sonrası elde edilen hücre özütünde (kaba ekstrakt) protein miktarı Bradford metodu ile 2,18 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olarak hesaplandı. GI aktivitesini hesaplamak için enzim 10 kat sulandırılarak reaksiyon yapıldı. Kaba ekstraktın GI aktivitesi 0,128 $\mu\text{mol}/\text{dk}$ olarak hesaplandı.

3.2.2. Isı Şoku Uygulaması

W137F/V184S mutant enziminin ısı şoku sonrası elde edilen enzim özütünde protein miktarı Bradford metodu ile 1,17 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olarak hesaplandı. GI aktivitesi 0,131 $\mu\text{mol}/\text{dk}$ olarak hesaplandı.

3.2.3. İyon Değişim Kromatografisi



Şekil 12. W137F/V184S mutant enziminin saflaştırması işlemine ait iyon değişim kolon kromatografisi grafiği

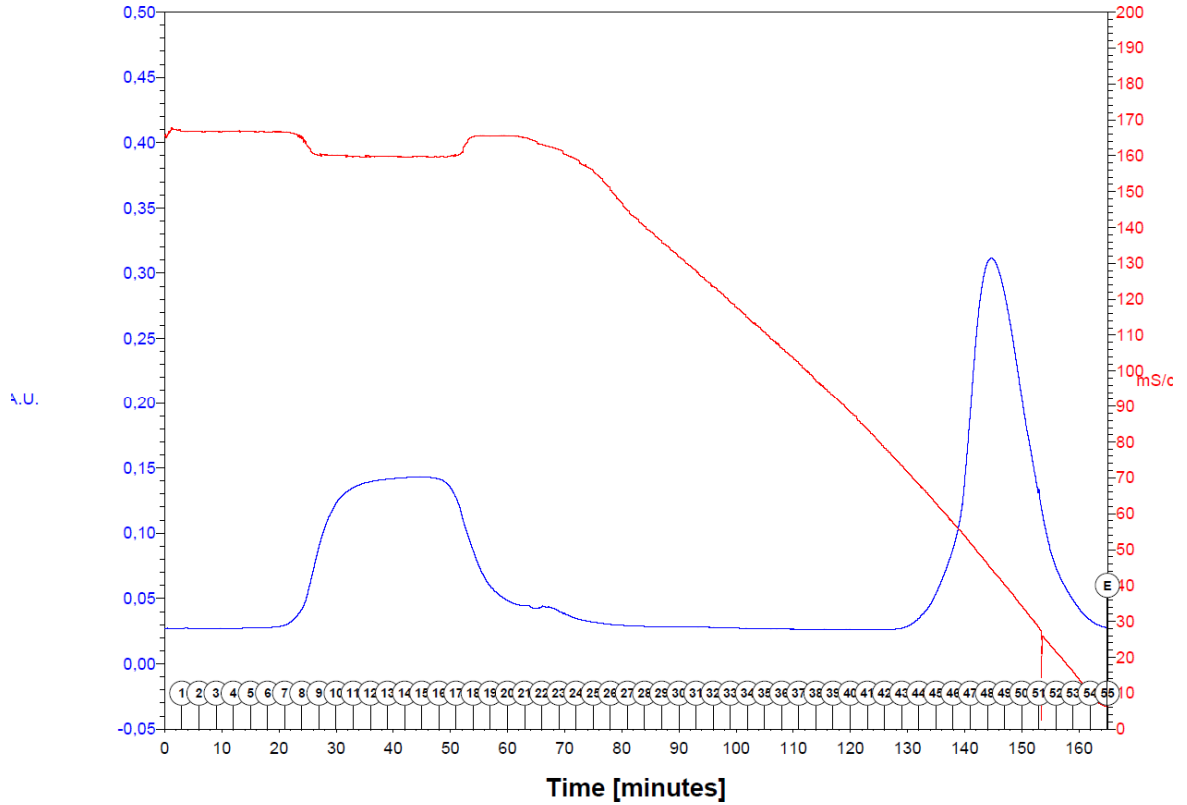
W137F/V184S mutant enziminin saflaştırması işlemine ait iyon değişim kolon kromatografisi grafiği Şekil 10'da görülmektedir. Kolondan çıkan tüm fraksiyonlarda GI aktivitesi tarandı ve 27-32 nci tüpler arasında GI aktivitesi tespit edildi.

W137F/V184S mutant enziminin iyon değişim kolon kromatografisi sonrası elde edilen enzim özütünde protein miktarı Bradford metodu ile 1,03 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olarak hesaplandı.

GI aktivitesi 0,181 $\mu\text{mol}/\text{dk}$ olarak hesaplandı.

3.2.4. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması

W137F/V184S mutant enziminin saflaştırması işlemine ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi grafiği Şekil 12’de görülmektedir. Tüm fraksiyonlarda GI aktivitesi araştırıldı ve 45-54 nolu tüplerde GI aktivitesi belirlendi. Bu tüplerdeki enzim özütleri birleştirilerek total protein ve aktivite çalışmalarına geçildi.



Şekil 13. W137F/V184S mutant enziminin saflaştırması işlemine ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi grafiği

Hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulaması sonrası enzim özütünün protein miktarı 0,48 µg/µl olarak hesaplandı. 10 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite deneyi sonucunda, 1 µl enzim özütünde GI Aktivitesi 0,109 µmol/dk olarak hesaplandı.

3.2.5. Saflaştırma Tablosu

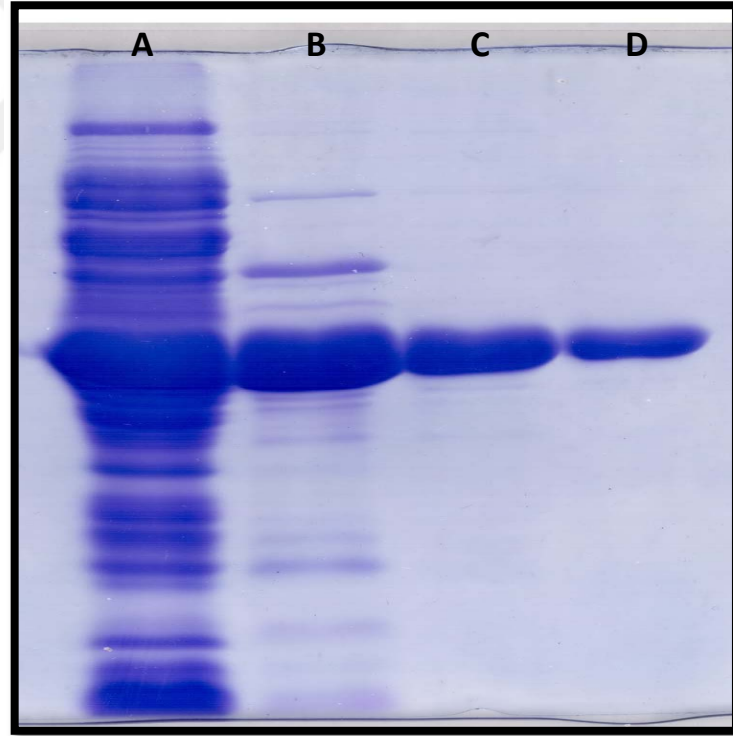
Tablo 2’de görüleceği üzere tüm saflaştırma uygulamaları başarılı olmuştur. Saflaştırma sonrası enzimin spesifik aktivitesi 5,902’den 20,113 µmol/dk/mg protein’e yükselirken enzim %52,6 verim ile 3,41 kat saflaştırıldı. Hidrofobik etkileşim kolon

kromatografisi uygulamasından sonra birleştirilen fraksiyonlar saf enzim özütü olarak kabul edilerek immobilizasyon çalışmalarında kullanıldı

Tablo2. W137F/V184S mutant enziminin saflaştırma tablosu

Saflaştırma Basamakları	T.Hacim (ml)	Protein mg/ml	T.Protein (mg)	Aktivite ($\mu\text{mol/dk}/\mu\text{l}$)	T.Aktivite ($\mu\text{mol/dk}$)	S.Aktivite ($\mu\text{mol/dk}/\text{mg}$ protein)	Verim	S.Katı
Kaba	21	2,18	45,78	0,0128	268,80	5,902	94,0	1
İşı Şoku	19,2	1,17	22,46	0,0131	251,52	12,679	87,9	2,15
İyon Değişim	13,5	1,03	13,91	0,0181	244,35	19,029	85,4	3,22
Hidrofobik E.	13,8	0,48	6,62	0,0109	150,42	20,113	52,6	3,41

3.2.6. W137F/V184S Mutant Enziminin Saflaştırma İşlemine Ait SDS-Page Jel Elektroforezi



Şekil 14. W137F/V184S mutant enziminin saflaştırma işlemine ait SDS-Page Jel Elektroforezi (A: kaba ekstrat, B: ısı şoku, C: iyon değişim kolon kromatografisi, D: hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi)

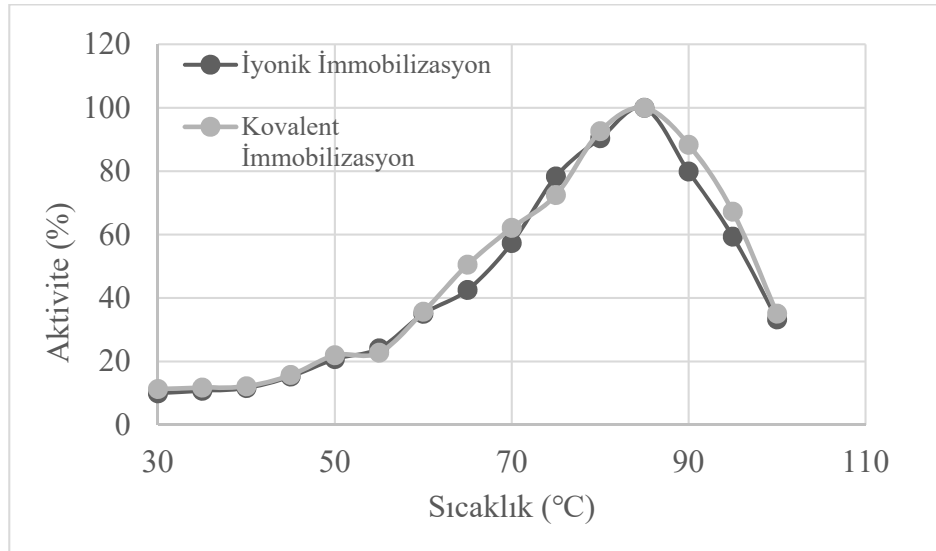
3.3. Enzimlerin İmmobilizasyonu

AgoGI ve W137/FV184S mutant enzimleri hem kovalent olarak hemde iyonik olarak DEAE-Sefaroz matriksi üzerine başarılı bir şekilde immobilize olmuştur. İmmobilize edilen enzimlerin total protein ve ünite miktarları Tablo 3’de verilmiştir.

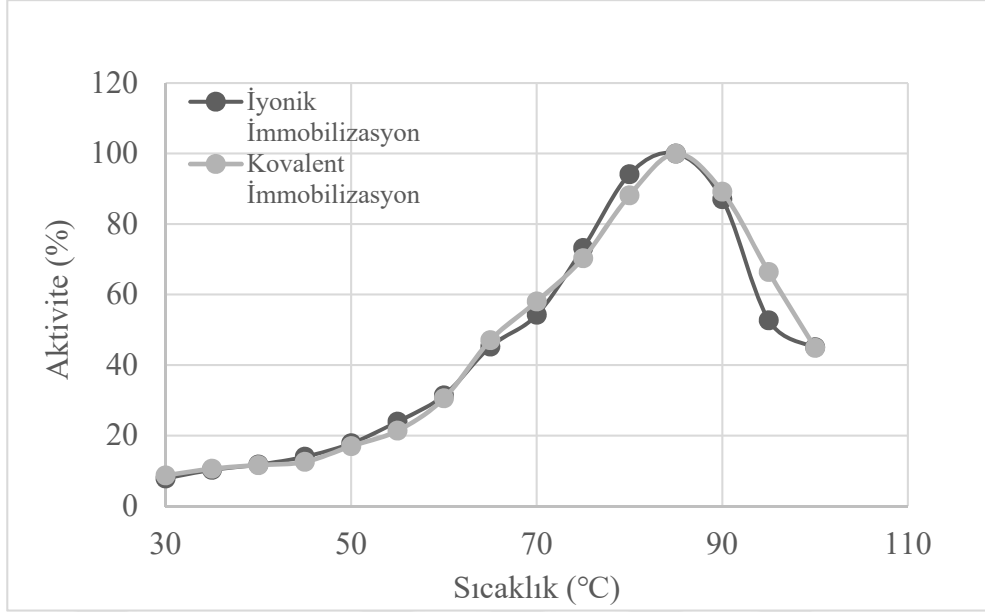
Tablo 3. İmmobilize edilen enzimlerin total protein ve ünite miktarları

	AgoGI	W137F/V184S Mutant GI
İmmobilizasyon için koyulan total protein miktarı	1993,2 µg	864,4 µg
Matrikse tutunan protein miktarı	1801,8 µg	864,4 µg
Matrikse kovalent olarak tutunan Ünite miktarı	37,14 ünite	34,8 ünite
Matrikse iyonik olarak tutunan Ünite miktarı	36,54 ünite	32,6 ünite

3.4. İmmobilize Enzimlerin Optimum Sıcaklık Değerleri



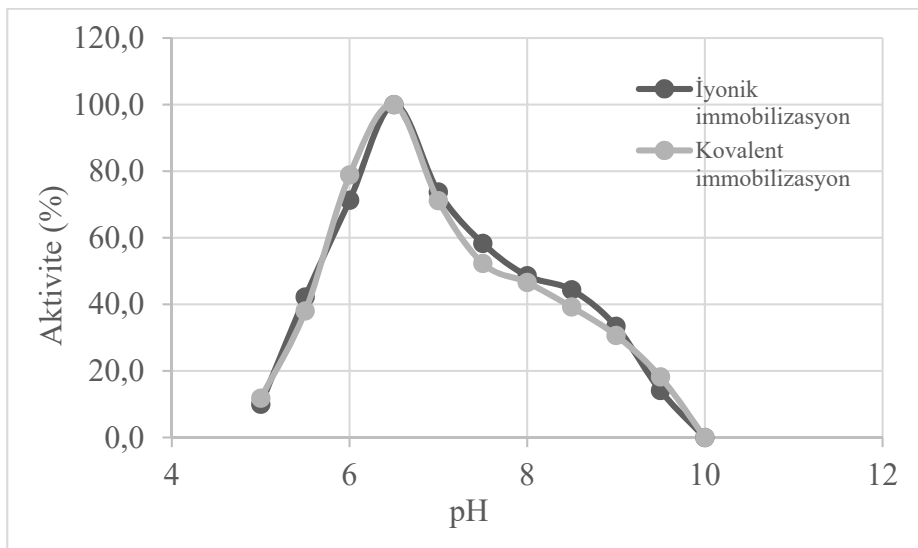
Şekil 15. Kovalent ve iyonik olarak DEAE-Sefaroz matriksine immobilize edilmiş AgoGI'nın optimum sıcaklık değerleri



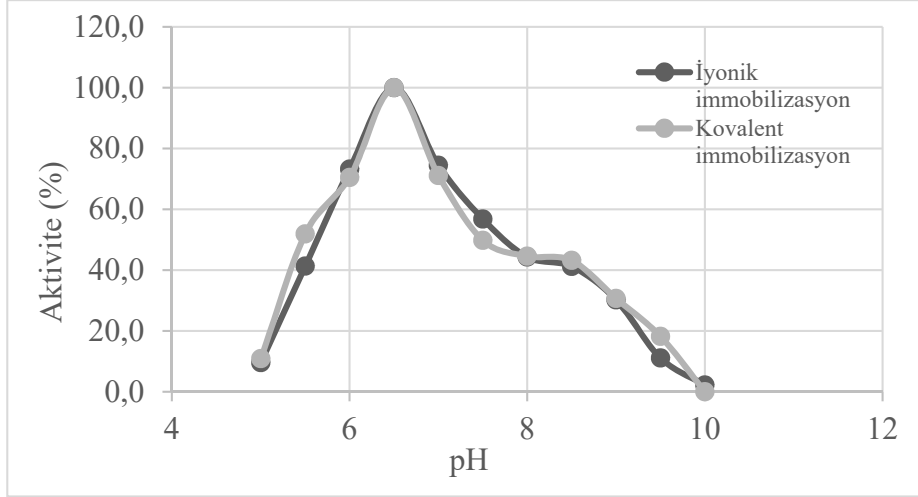
Şekil 16. Kovalent ve iyonik olarak DEAE-Sepharoz matrigisine immobilize edilmiş W137F/V184S mutant GI'nın optimum sıcaklık değerleri

İmmobilize edilmiş enzimlerin en iyi çalıştığı optimum sıcaklık değerini hesaplamak için farklı sıcaklıklarda bir seri reaksiyon gerçekleştirildi. Şekil 13 ve 14 incelenecek olursa kovalent ve iyonik immobilizasyon sonucunda enzimlerin iyi çalıştığı sıcaklık 85°C olarak görülmektedir. İmmobilizasyon işlemi enzimin optimum sıcaklık değerinde bir değişime neden olmamıştır.

3.5. İmmobilize Enzimlerin Optimum pH Değerleri



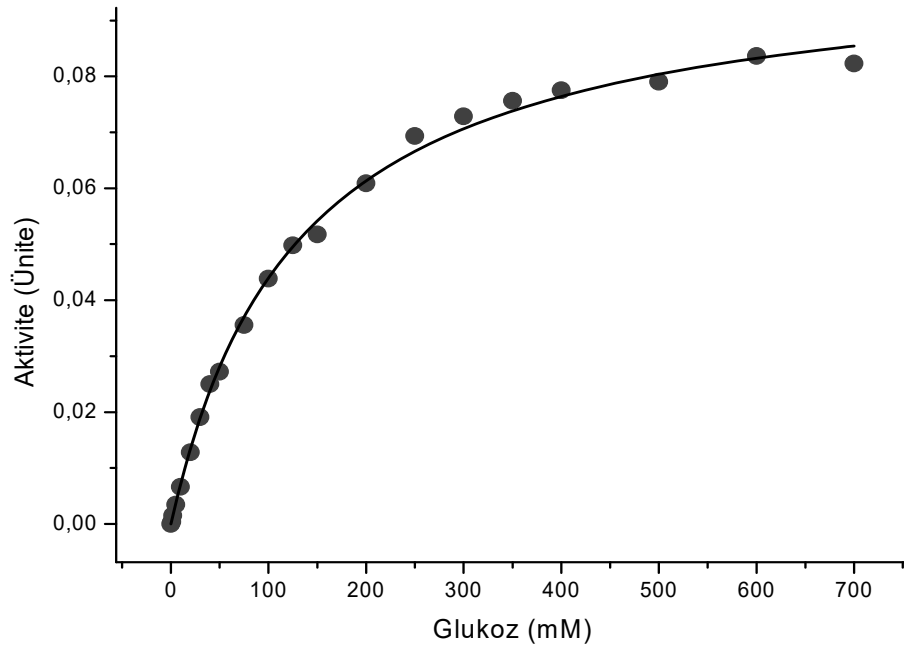
Şekil 17. Kovalent ve iyonik olarak DEAE-Sepharoz matrigisine immobilize edilmiş AgoGI'nın optimum pH değerleri



Şekil 18. Kovalent ve iyonik olarak DEAE-Sefaroz matriksine immobilize edilmiş W137F/V184S mutant GI'nın optimum pH değerleri

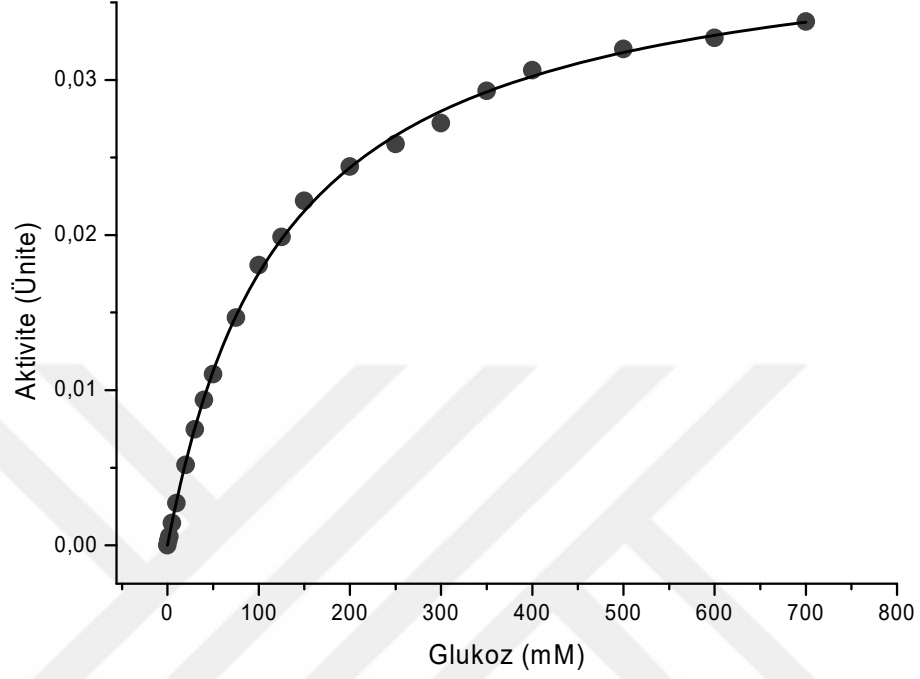
İmmobilize edilmiş enzimlerin en iyi çalıştığı optimum pHk değerini hesaplamak için farklı pH değerlerinde tamponlar kullanılarak bir seri reaksiyon gerçekleştirildi. Şekil 15 ve 16 incelenecek olursa kovalent ve iyonik immobilizasyon sonucunda enzimlerin iyi çalıştığı pH değeri 6,5 olarak belirlendi.

3.6. İmmobilize Enzimlerin Kinetik Değerleri

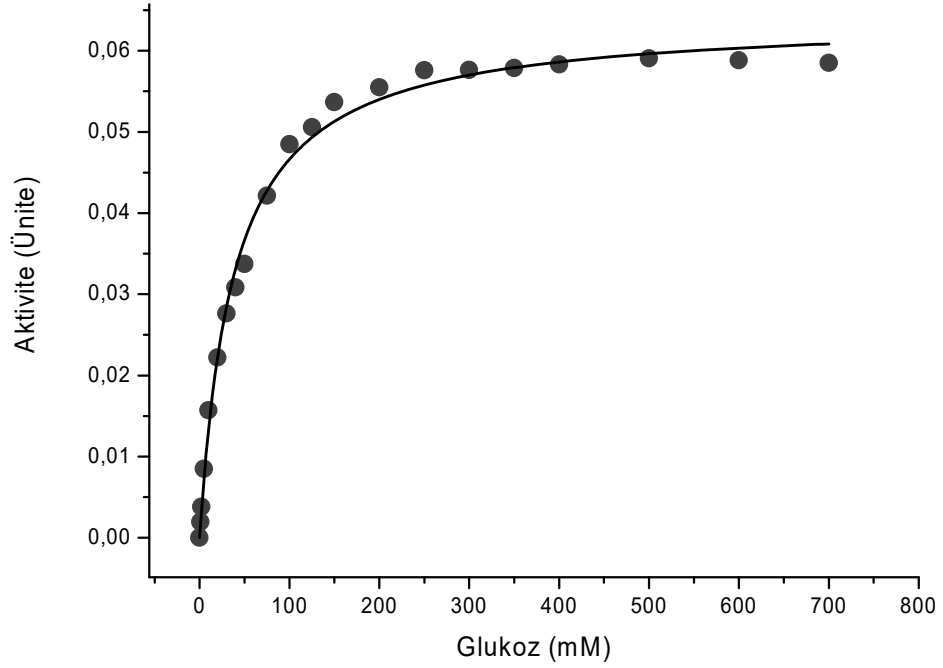


Şekil 19. İyonik olarak immobilize olmuş AgoGI'ya ait Michaelis-Menten grafiği

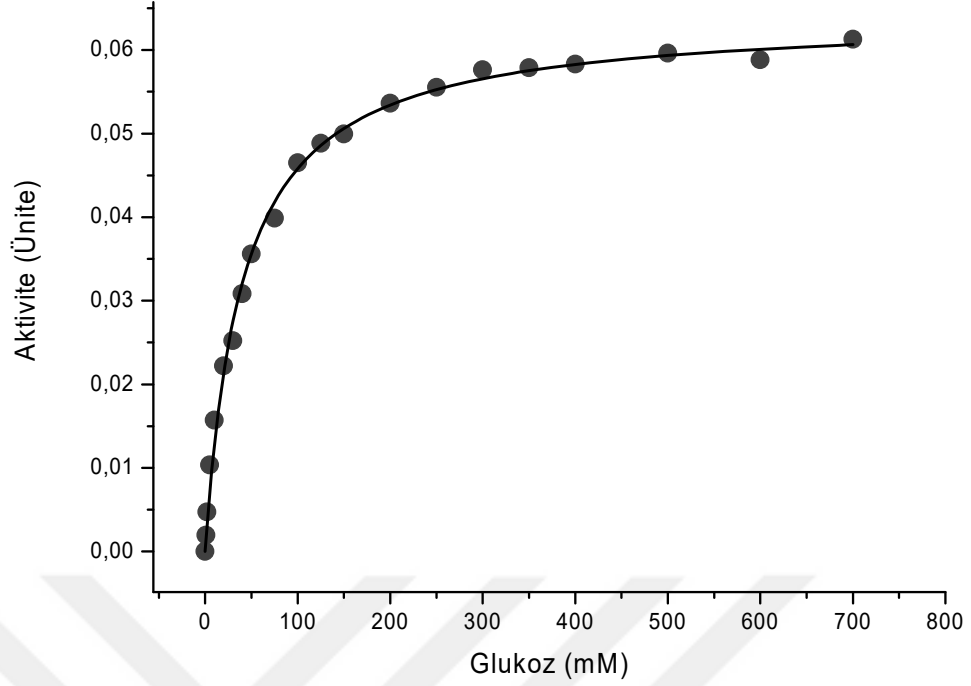
Enzimlerin kinetik parametrelerini hesaplayabilmek için 700 mM'a kadar arttırılan substrat konsantrasyonu ile yukarıda belirlenen 85°C'de ve pH 6,5'te bir seri reaksiyon gerçekleştirildi.



Şekil 20. Kovalent olarak immobilize olmuş AgoGI'ya ait Michaelis-Menten grafiği



Şekil 21. İyonik olarak immobilize olmuş W137F/V184S mutant GI'ya ait Michaelis-Menten grafiği



Şekil 22. Kovalent olarak immobilize olmuş W137F/V184S mutant GI'ya ait Michaelis-Menten grafiği

Hazırlanan Michaelis-Menten grafiklerinden elde edilen veriler doğrultusunda; AgoGI'nın iyonik ve kovalent olarak DEAE-Sefaroza immobilize edilmiş hallerinin K_m değerleri sırasıyla $130,57 \pm 5,42$ mM ve $127,28 \pm 2,96$ mM ; V_{max} değerleri ise $0,10136 \pm 0,0014$ $\mu\text{mol/dk}$ ve $0,03985 \pm 0,0003$ $\mu\text{mol/dk}$ olarak hesaplandı. Enzimin W137F/V184S mutantının iyonik ve kovalent olarak DEAE-sefaroza immobilize edilmiş hallerinin K_m değerleri sırasıyla $37,44 \pm 2,09$ mM ve $39,93 \pm 2,02$ mM; V_{max} değerleri ise $0,0641 \pm 0,0008$ $\mu\text{mol/dk}$ ve $0,06408 \pm 0,0007$ $\mu\text{mol/dk}$ olarak belirlendi.

4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Bu çalışmada, *A. gonensis* G2^T'ye ait GI doğal ve W137F/V184S mutant GI'larının DEAE-sefaroze matriksine iyonik ve kovalent olarak immobilizasyonu, immobilize enzimlerin biyokimyasal özelliklerinin ve kinetik parametrelerinin ortaya konulması üzerine çalışılmıştır.

Bir ekspresyon vektörü olan pET28a⁺ içerisinde bulunan enzimleri kodlayan genler *E.coli* BL21 (DE3) suşu içerisinde aşırı miktarlarda üretilerek, ısı şoku, iyon değişim kolon ve hidrofobik kolon kromatografisi yöntemleri ile başarılı bir şekilde saflaştırılmışlardır. Saflaştırılan enzimler matrikse kovalent ve iyonik olarak başarılı bir şekilde immobilize edilmiştir. İmmobilizasyon işleminden sonra matriksin üzerinde kalan sıvıda protein ve GI aktivite deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu sıvıda protein ve GI aktivitesine rastlanmaması enzimlerin tamamının matrikse immobilize olduğunu göstermektedir. Tablo 3 incelenecek olursa, immobilizasyon öncesinde ve sonrasında yapılan total ünite hesabına göre GI aktivitesinde çok küçük bir azalma mevcuttur. Bu aktivite kaybının matriksin yıkanması esnasında matrikse tutunmayan proteinlerin kaybindan kaynaklandığı düşünülebilir. Fakat kaybedilen ünite miktarı önemsenmeyecek kadar azdır. Örneğin AgoGI'nın kovalent immobilizasyonunda total olarak konulan enzimin % 99,5 oranında bir kısmı immobilize olmuştur. Bu oran iyonik immobilizasyonda ise % 99,2 olarak belirlenmiştir.

İmmobilize edilmiş enzimler ile yapılan optimum sıcaklık çalışmalarında enzimleri en iyi çalıştırdıkları sıcaklık değeri 85°C olarak bulunmuştur. Karaoğlu (2010)'nun yapmış olduğu çalışmada yaban tip ve rekombinant olarak üretilen *A. gonensis* GI'larının ve W137F/V184S mutant GI'nın optimum çalışma sıcaklıkları 85°C olarak bulunmuştur. Bu durumda göstermektedir ki immobilize enzimler ile serbest enzimlerin optimum çalışma sıcaklıkları aynıdır.

Enzimlerin herhangi bir matrikse immobilize edilmesi durumunda, matriksin yüzeyinin yük dağılımının farklı olması ve enzimin matriksle olan etkileşimi sonucu, enzimin yüzey yük dağılımında değişiklikler meydana gelebilir (Kahraman ve ark., 2007). Bu değişim, immobilize olmuş enzim ile serbest enzimin optimum çalışma pH

değerlerinde farklılıklara neden olabilmektedir. Bu çalışmada, immobilize enzimler ile yapılan optimum pH çalışmalarında tüm immobilize enzimlerin optimum derecede çalıştıkları pH değeri 6,5 olarak bulunmuştur. Yine Karaoğlu (2010)'nun yapmış olduğu çalışmada serbest enzimlerin pH değeri 6,5 olarak bulunmuştur. Enzimlerin gerek iyonik gerekse kovalent olarak DEAE-Sefaroz üzerine immobilizasyonu, optimum sıcaklıkta olduğu gibi optimum pH değerlerinde de herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır.

Tablo 4. Serbest enzimler ile immobilize enzimleri kinetik parametreler açısından karşılaştırılması

Glukoz İzomeraz	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol/dk/}$ mg protein)	Kaynak
<i>AgoG2GI-yt</i>	146,08 \pm 9,50	43,72 \pm 1,01	Karaoğlu (2010)
<i>AgoG2GI-rek</i>	138,37 \pm 7,63	40,51 \pm 0,81	Karaoğlu (2010)
W137F/ V184S	39,29 \pm 2,87	99,71 \pm 1,83	Karaoğlu (2010)
İmmobilize (iyonik) <i>AgoGI</i>	130,57 \pm 5,42	44,85 \pm 2,09	Bu çalışma
İmmobilize (kovalent) <i>AgoGI</i>	127,28 \pm 2,96	41,26 \pm 1,97	Bu çalışma
İmmobilize (iyonik) W137F/ V184S mutant GI	37,44 \pm 2,09	98,98 \pm 1,03	Bu çalışma
İmmobilize (kovalent) W137F/ V184S mutant GI	39,93 \pm 2,02	104,13 \pm 2,83	Bu çalışma

Karaoğlu (2014) tarafından gerçekleştirilen doktora tez çalışmasında *A. gonensis* GI'sını kodlayan gen bu bakteriden bir ekspresyon vektörüne klonlanarak enzim rekombinant olarak üretilmiştir. Ayrıca enzim, *A. gonensis* bakterisinde doğal olarak xylose ile uyarılarak yaban olarak izole edilmiş ve karakterize edilmiştir. Böylelikle *AgoG2GI-yt* ve *AgoG2GI-rek* arasında konak organizmada üretimden kaynaklı bir etkinin enzim üzerinde olup olmadığı açığa çıkarılmıştır. Çalışmaya göre iki enzimde aynı kinetik parametrelere sahiptir. Dolayısı ile bu çalışmamızda enzimi rekombinant olarak üretmekte bir sakınca görmediğimizden ayrıca yaban tipte çalışma yapmadık. Tablo 4 incelenecek olursa serbest enzimin K_m değeri 138,37 mM olarak gözükmekte iken bizim çalışmamızda iyonik olarak immobilize olan enzimin K_m değeri 130,57 mM kovalent olarak immobilize edilen K_m değeri ise 127,28 mM olarak belirlenmiştir. Bu değerler immobilize W137F/ V184S mutant GI için ise serbest enzim

için 39,29 mM iken iyonik olarak immobilize olmuş enzim için 37,44 mM, kovalent olarak immobilize olmuş enzim için ise 39,93 mM olarak bulunmuştur. Enzimlerin immobilizasyonu çoğunlukla enzimin K_m ve değerlerinde değişmelere neden olur. Fakat bu çalışmada, kinetik parametrelerde ne iyonik immobilizasyonla ne de kovalent immobilizasyonla kinetik parametrelerde önemli bir değişime meydana gelmemiştir.

Yapılan çalışmada immobilize enzimler tekrar tekrar reaksiyona sokulmuşlardır. İyonik olarak immobilize olan enzimler 4 denemede %50 aktivite kaybına uğrarken kovalent olarak immobilize olan enzimler ise 9. Denemede aktivite olarak yarılanmıştır. Uzun süreli stoklama yapılan denemelerde ise hem serbest enzimler hem de immobilize haldeki enzimler 2 ay süre sonunda bile aktivite kaybetmemişlerdir.

Endüstriyel uygulamalardaki kullanımı düşünüldüğünde enzimin optimum pH, optimum sıcaklık ve kinetik parametrelerinde herhangi bir değişime neden olmadan DEAE-sefaroze matriksine başarılı bir şekilde immobilizasyonu DEAE-sefarozen enzim için uygun bir destek alanı olduğunu göstermektedir.

5. ÖNERİLER

A. gonensis GI ve özellikle bu enzimin W137F/V184S mutanı endüstriyel açıdan değerlendirildiğinde düşük pH değerinde çalışması, katalitik etkinliğinin yüksek olması nedeniyle benzerleri ile endüstriyel uygulamalarda rakip olabilecek özelliklere sahiptir. Endüstriyel uygulamalarda enzimin immobilize edilmiş olması son derece önemlidir. Burada immobilize edilen ortamın maliyetinin de düşük olması istenir. DEAE-sefaroz bu açıdan pahalı bir matrikstir. Çalışmanın ekonomik olarak daha uygun olabilecek matriksler ile denemesi endüstriyel uygulamalarda tercih edilebilirliğini açısından son derece önemlidir.

Çalışmada immobilize edilmiş enzimlerin raf ömürleri ve ısıl kararlılıkları yeterince araştırılmamıştır. Bu verilerinde sağlıklı bir şekilde açığa çıkarılması, enzimin endüstriyel değerini göstermesi açısından son derece önemlidir.

Ekibimiz tarafından AgoGI ve W137F/V184S mutanı üzerinde ısıl kararlılığı mutasyonlar ile artırma üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Buradan açığa çıkacak ısıl kararlılığı yüksek yeni mutant GI'larında immobilize edilmesi önem arz etmektedir.

AgoGI'nın ve mutant enzimin çalışma sıcaklığı 85°C'dir. Her ne kadar enzimin bu sıcaklığa dayanma gücü önemli ise de immobilize edilecek olan matriksinde bu sıcaklığa dayanıklı olması açığa çıkan ürünün tercih edilebilirliği açısından önem arz etmektedir.

Bu çalışmaya ek olarak farklı miktarlarda enzim immobilize edilerek ya da farklı miktarlarda glutaraldehit kullanılarak immobilizasyon şartları optimize edilebilir.

KAYNAKLAR

- Ackerman, E., 2006.** Functionalized nanopores promote enzymatic activity. Pacific Northwest National Laboratory, US. LabTalk. <http://iopscience.iop.org/journal/0957-4484/labtalk/article/26490>
- Alagöz, D., 2007.** β -Galaktozidaz ve Glukoz İzomeraz'ın Eupergit Desteğe Kovalent İmmobilizasyonu ve İmmobilize Enzimlerin Laktoz Hidrolizi ve Glukoz İzomerizasyonunda Kullanılması. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Albayrak, N. and Yang, S.T., 2002.** Immobilization of beta-galactosidase on fibrous matrix by polyethyleneimine for production of galacto-oligosaccharides from lactose. *Biotechnol Prog.* Mar-Apr;18(2):240-51.
- Andreescu, S., Bucur, B. and Marty, J.L., 2006.** Affinity immobilization of tagged enzymes. *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells*, Second Edition Edited by: J. M. Guisan c Humana Press Inc., Totowa, NJ., Vol. 9. pp. 97 - 106.
- Anon., 1993.** Multifunctional sweeteners. *Baking and Snack.* 15 (4): 31-34.
- Bandlish, R.K., Hess, J. M., Epting, K.L., Vieille, C., 2002.** Glucose to Fructose Conversion at High Temperatures with Xylose (Glucose) Isomerases from *Streptomyces Murinus* and to Hyperthermophilic *Thermotoga* Species. *Biotechnology and Bioengineering*, 80(2):185–194.
- Barker, S. A., 1976.** Pure fructose syrups. *Process Biochem*, 11, 20–25.
- Bhosale, S. H., Rao, M. B., and Deshpande, V. V., 1996.** Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. *Microbiol. Rev.*, 60, 280-300.
- Bickerstaff, G.F., 1997.** Immobilization of Enzyme as the 21 st Century Begins. *Immobilization of Enzyme and Cells*, Humana Press, Totowa, New Jersey., Vol.1; pp.1-13.
- Blow, D. M., Collyer, C. A., Goldberg J. D. and Smart, O. S., 1992.** Structure and mechanism of D-xylose isomerase. *Faraday Discuss.* (93): 67-73.
- Bogumil, R., Kappl, J., Huttermann, C. and Witzel, H., 1993.** X and Q-band EPR studies on the two Mn²⁺-substituted metal-binding sites of D-xylose isomerase. *Eur. J. Biochem.*, 213, 1185–1192.
- Bor, Y. C., Moraes, C., Lee, S.-P., Crosby, W. L., Sinskey, A. J., and Batt, C. A., 1992.** Cloning and sequencing the *Lactobacillus brevis* gene encoding xylose isomerase. *Gene* 114:127–131.

- Bradford, M.M., 1976.** Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein dye binding, *Anal. Biochem.*, 72, 248-254
- Brady, D. and Jordan, J., 2009.** Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnol Lett.*, Vol. 31; pp.1639 – 1650.
- Brena, B.M. and Batista-Viera, F., 2006.** Immobilization of enzymes. *Methods in biotechnology: Immobilization of enzymes and cells*, Second edition edited by: J. M. Guisan c Humana Press Inc., Totowa, NJ., Vol.2; pp.15-30.
- Brown, S. H., Sjöholm, C., and R. M. Kelly., 1993.** Purification and characterization of a highly thermostable glucose isomerase produced by the extremely thermophilic eubacterium, *Thermotoga maritima*. *Biotechnol. Bioeng.* 41:878–886.
- Bucke, C., 1981.** Industrial glucose isomerase, p. 147–171. In A. Wiseman (ed.). *Topics in enzyme and fermentation biotechnology*, vol. 1. Industrial glucose isomerase. Ellis Horwood, Chichester, United Kingdom.
- Burg, B.V.D., 2003.** Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, 6: 213-218.
- Cabral, J.M.S. and Kennedy, J.F., 1991.** Covalent and coordination immobilization of proteins. In: *Protein immobilization. Fundamentals and applications* (Taylor, R. F., ed.), Marcel Dekker, New York, NY, pp.73–138.
- Carlsson, J., Batista-Viera, F., and Ryden, L., 1998.** Covalent chromatography. In: *Protein purification: principles, high-resolution methods, and applications*, (Janson, J. C. and Ryden, L., eds.), Wiley-VCH, New York, NY, pp. 343-373.
- Chen, P., Anderson, A.W. and Han, Y.W., 1979.** Production of glucose isomerase by *Streptomyces flavogriseus*. *Applied Environmental Microbiology*, 37:324–331.
- Chen, W. P., 1980.** Glucose isomerase. *Process Biochem.*, 15, 30–35.
- Chibata, I., Tosa, T., Sato, T., Mori, T., and Matuo, Y., 1972.** Proc. of the 4th Int. Fermentation Symp.: *Fermentation Technology Today*. p. 383–389.
- Costa, S.A., Azevedo, H.S. and Reis, R.L., 2004.** Enzyme immobilization in Biodegradable Polymers for Biomedical Applications. 1936-C017. *fm Page*, Vol.17; pp.301 – 324.
- CRA. 1994.** Corn refining, the process, the products. Corn Refiners Association Inc.
- Çanakçı, S., 2003.** Gönen, Kestanbol ve Diyardin Kaplıcalarından Termofilik Bakteriler İzolasyonu, Moleküler Yöntemlerle Karakterizasyonu ve Tanımlanması. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Karadeniz Teknik Üniversitesi.

- Demain, A.L. and Solomon, N.A., 1981.** In industrial microbiology and the advent of genetic engineering. Scientific American, Freeman and Comp. San Francisco, pp. 3-14.
- Demirel, G., Özçetin, G., Şahin, F., Tümtürk, H., Aksoy, S., and Hasırcı, N., 2006.** Semi-interpenetrating Polymer Networks (IPNs) for Entrapment of Glucose Isomerase. *Reactive & Functional Polymers*, 66: 389–394.
- Demirsoy, A. ve Türkan, İ., 2007.** *Ketoon/Gould Genel Biyoloji 1*. Palme Yayıncılık, 694 sayfa, Ankara.
- Deraadt, A., Ebner, M., Ekhart, C. W., Fechter, M., Lechner, A., Strobl, M. and Stutz, A. E., 1994.** Glucose Isomerase (EC 5.3.1.5) as a reagent in carbohydrate synthesis: success and failures with the isomerisation of nonnatural derivatives of D-Glucose into the corresponding 2-Ketoses. *Catalysis Today*, 22, 549–561.
- Dische, Z. and Borenfreund, E., 1951.** A New spectrophotometric method for the detection and determination of ketosugars and trioses., *J. Biol. Chem.*, 192, 583-587.
- Douglas, C.W. and Jay, K.S., 1999.** Commodity scale production of sugars from starches, *Current Opinion in Microbiology*. 2:252–256.
- Dubos, J., 1951.** Louis Pasteur: Free Lance of Science, Gollancz. Quoted in Manchester K. L. (1995) Louis Pasteur (1822–1895)—chance and the prepared mind. *Trends Biotechnol.* 13 (12): 511–515.
- Eldin, M.S.M., 2000.** Immobilization of penicillin G acylase onto chemically grafted nylon particles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. Volume 10, Issue 4, 18 September, Pages: 445–451.
- Gaikwad, S.M., Rao, M.B. and Deshpande, V.V., 1992.** D-Glucose/Xylose isomerase from streptomyces. differential roles of magnesium and cobalt ions. *Enzyme Microb. Technol.*, 4, 317–320.
- Gemeiner, P., 1992.** Materials for enzyme engineering. In: enzyme engineering glucose isomerase, p. 837–859, In M. Moo-Young (ed.), *comprehensive biotechnology*, vol. 3. Pergamon Press, New York.
- Guisan, J.M., 2006.** *Method in biotechnology: Immobilization of enzymes and cells*. Humana Press, 2nd Ed. 450 pages.
- Gündüz, E. ve Türkan, İ. (Çev. Ed.), 2013.** *Campbell Biyoloji*. Yazarlar: Jane B. Reece, Lisa A. Urry , Michael L. Cain , Steven A. Wasserman , Peter V. Minorsky , Robert B. Jackson, Palme Yayıncılık, 1263 sayfa, Ankara.
- Hartley, B.S., Hanlon, N., Jackson, R.J., and Rangarajan, M., 2000.** Glucose isomerase: Insights into protein engineering for increased thermostability. *Biochim. Biophys. Acta*. 1543: 294-335.

- Hebeda, R.E., 1987.** Corn sweeteners. In: Watson, S.A. and Ramstad, P.E. (eds) "Corn Chemistry and Technology". AACC, Inc. St. Paul, MN. 501-534.
- Hemmingsen, S.H., 1979.** Development of an immobilized glucose isomerase for industrial application. *Appl. Biochem. Bioeng.* 2:157–181.
- Henry, E.R., 1976.** High fructose corn syrup: New sweetener for the baker. *Baker's Digest.* 50 (2): 25.
- Hobbs, L., 1986.** Corn syrups. *Cereal Foods World.* 31 (12): 852, 854, 856, 858.
- Howling, D., 1992.** Glucose syrup: production, properties and applications. In: Schenck, F.W. and R.E. Hebeda (Eds), "Starch Hydrolysis Products". VCH Publ. Inc. New York. 277-316. Humana Press Inc. New Jersey., pp.449.
- Inglett, G.E., 1974.** Sweeteners. The AVI Publ. Co., Westport, Connecticut.
- Johnson, J.M., Harris, C.H., and Barbeau, W.E., 1989.** Effects of HFCS replacement for sucrose on browning, starch gelatinization and sensory characteristics of cakes. *Cereal Chem.* 66 (3): 155 - 157.
- Kahraman, M.V., Bayramoğlu, G., Kayaman-Apohan, N., and Güngör, A., 2007.** α - Amylase immobilization on functionalized glass beads by covalent attachment. *Food Chemistry*, 104, 1385 -1392.
- Karaoglu, H., Yanmis, D., Sal, A., S., Celik, A., Canakci, S., Belduz, A., O., 2013.** Biochemical characterization of a novel glucose isomerase from *Anoxybacillus gonensis* G2^T that displays a high level of activity and thermal stability. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 97 (2013): 215– 224.
- Karaoğlu, H., 2004.** *Anoxybacillus gonensis* Glukoz (D-Ksiloz) izomeraz geninin klonlanması, izolasyonu ve karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Karaoğlu, H., 2010.** *Anoxybacillus gonensis* glukoz izomerazının genetik manipulasyonlarla bazı biyokimyasal özelliklerinin geliştirilmesi, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Kennedy, J.F., 1995.** Handbook of enzyme technology, in principles of immobilization. 3rd edn., Wiseman, A., Ed., Prentice Hall Ellis Harwood, New York, p. 235.
- Kulp, K., Lorenz, J.K., and Stone, M., 1991.** Functionality of carbohydrate ingredients in bakery products. *Food Technology.* 45 (3): 136, 138-140, 142.
- Kuyper, M., Toirkens, M.J., Diderich, J.A., Winkler, A.A., van Dijken, J.P. and Pronk, J.T., 2005.** Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain, *FEMS Yeast Research.* 9: 25-34.

- Lama L., Nicolaus, B., Calandrelli, V., Romano, I., Basile, R. and Gambacorta, A., 2001.** Purification and characterization of thermostable Xylose (glucose) isomerase from *Bacillus thermoantarcticus*. *Microbial Biotechnol.*, 27, 234-40.
- Lei, C., Shin, Y., Magnuson, J.K., Fryxell, G., Lasure, L.L., Elliott, D.C., Liu, J., and Ackerman, E.J., 2006.** Characterization of functionalized nanoporous supports for protein confinement. *Nanotechnology*, Volume 17, Issue 22, pp. 5531-5538.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. 1982.** *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor, Newyork.
- Manohar, R.S. and Rao, P.H., 1997.** Effects of sugars on the rheological characteristics of biscuit dough and quality of biscuits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 75: 383-390.
- Marshall, R. O. and Kooi, E. R., 1957.** Enzymatic conversion of D-glucose to D-fructose. *Science*, 125, 648–649.
- Mateo, C., Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M. and Fernandez Lafuente, R., 2007.** Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb Technol.*, Vol.40; pp.1451-1463.
- Moses, V. and Cape, R.E., 1994.** *Biotechnology*, Harwood Acadamik Publishers, USA.
- Mu, W., Wang, X., Xue, Q., Jiang, B., Zhang, T., and Miao, M., 2012.** Characterization of a thermostable glucose isomerase with an acidic pH optimum from *Acidothermus cellulolyticus*. *Food Res Int.* 47(2): 364-367.
- Mulchandam, A. and Rogers, K.R., 1998.** *Methods in Biotechnology, Enzyme and Microbal Biosensors Techniques and Protocols* Humana Press Inc. New Jersey., Vol.6; pp.199 - 223.
- Nabors, L. O. and Gelardi, C. R., 1991.** *Alternative Sweeteners*, 2nd Ed. Marcel Dekker, Inc., N.Y.
- Nashyan, M.V., 2012.** Çeşitli Dokulardan Aldoz Redüktaz Enziminin İzolasyonu ve İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Palazzi, E. and Converti, A., 1999.** Generalized Linearization of Kinetics of Glucose Isomerization to Fructose by Immobilized Glucose Isomerase. *Biotechnology and Bioengineering*, 63(3): 273–284.
- Pastine, O., Schoemaker, H. E. and Leisola, M., 1999.** Xylose isomerase catalyzed novel hexose epimerization. *Biocatal Biotrans.*17: 393-400.
- Pedersen, S., 1993.** Industrial aspects of immobilized glucose isomerase. *Bioprocess Technol.* 16: 185–208.

- Persson, M., Wehtje, E., and Adlercreutz, P., 2000.** Immobilisation of lipases by adsorption and deposition: high protein loading gives lower water activity optimum. *Biotechnol. Lett.*, Vol.22; pp. 1571-1575.
- Pomeranz, Y., 1985.** Functional properties of foods. Academic press inc., Orlando, Florida. 536 s.
- Reynolds, J. H., 1973.** Precipitated nylon as an enzyme support: A-Galactosidase Reactor, P. 63–70. In A. C. Olsen And C. L. Cooney (Ed.), *Immobilised Enzymes In Food and Microbial Processes*, Plenum Press, New York.
- Schenck, F.W., 2000.** High fructose corn syrups- A review . *Int. Sugar J.* 102: 285-288.
- Sheldon, R.A., 2010.** Cross-Linked enzyme aggregates (CLEAs) as industrial biocatalysts. *Biocatalysis challenges for Pharmaceuticals and fine chemicals.* SCIN HQ, London. Delft University of Technology CLEA Technologies B.V., Vol. 2; pp.1831 - 2000.
- Tewari, Y.B., Goldberg, R.N., 1984.** Thermodynamics of the conversion of aqueous glucose to fructose. *J. Solut. Chem.* 13: 523-547.
- Twyman, R.M., 1995.** Immobilized enzymes. *Enzymes.* p: 523-529.
- Twyman, R.M., 2005.** Immobilized enzyme. University of York, UK.
- Verhoff, F. H., Boguslawski, G., Lantero, O. J., Schlager, S. T. and Jao, Y. C., 1985.** Glucose isomerase. In “Comprehensive Biotechnology”. Vol. 3. C. L. Cooney and A. E. Humphrey (Ed.). Pergamon Press, Oxford, UK.
- Wulff, S.M. and Helgeson, D.L., 1987.** Preliminary economic feasibility analysis of HFCS processing in US with emphasis on North Dakota. *Agricultural Economics Report*, No. 229. Dept. Agric. Econ. NDSU, Fargo, ND.
- Xu H., Shen D., Wu X.Q., Liu Z.W., and Yang Q.H., 2014.** Characterization of a mutant glucose isomerase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*. *Genetics and Molecular Biology of Industrial Organisms.* 41, 1581-1589.
- Xu W., Ming Y., Xu L., Ding L., and Pingkai O., 2009.** Engineering the activity of thermophilic xylose isomerase by site-directed mutation at subunit interfaces. *Enzyme and Microbial Technology.* 44, 77-83.
- Yanmış, D., 2008.** *Anoxybacillus gonensis* G2T Ksiloz İzomeraz Geninin Klonlanması, Gen Ürününün Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Trabzon.
- Yanmis D., Karaoglu H., Colak N.D., Sal F.A., Canakci S. and Belduz A.O., 2014.** Characterization of a novel xylose isomerase from *Anoxybacillus gonensis* G²T. *Turk. J. Biol.*, 38, (2014), 586-592

ÖZGEÇMİŞ

Züleyha AKPINAR 01/05/1991 tarihinde Adana'da doğdu. İlköğretimini 2005 yılında Karataş Mehmet Akif Ersoy İlköğretim Okulu'nda ve Ortaöğretimini 2009 yılında Adana'da Karataş Çok Programlı Lisesi'nde tamamladı. 2009 yılında başladığı lisans eğitimini 2013 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesinde tamamladı. 2013 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalında başladığı yüksek lisans öğrenimini halen devam ettirmektedir.

