

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Anoxybacillus gonensis G2^T GLUKOZ İZOMERAZININ KİNETİK
VE BAZI BİYOKİMYASAL PARAMETRELERİNİN G33D, N138G,
T144S, V293I, V32I, E373K VE V380I BÖLGE SPESİFİK
MUTASYONLARI İLE GELİŞTİRİLMESİ

PELİN BAK

TEZ DANIŞMANI

YRD. DOÇ. DR. HAKAN KARAOĞLU

TEZ JÜRİLERİ

YRD. DOÇ. DR. FATİH ŞABAN BERİŞ

YRD. DOÇ. DR. DERYA EFE

YÜKSEK LİSANS TEZİ
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI



RİZE-2017

Her Hakkı Saklıdır

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Anoxybacillus gonensis* G2^T GLUKOZ İZOMERAZININ KİNETİK VE BAZI BİYOKİMYASAL PARAMETRELERİNİN G33D, N138G, T144S, V293I, V32I, E373K VE V380I BÖLGE SPESİFİK MUTASYONLARI İLE GELİŞTİRİLMESİ**

Yrd. Doç. Dr. Hakan KARAOĞLU danışmanlığında, Pelin BAK tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 24/07/2017 tarihinde Su Ürünleri Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir.

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


Doc. Dr. Ferhat KALAYCI
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

ÖNSÖZ

Anoxybacillus gonensis G2^T glukoz izomerazının kinetik ve bazı biyokimyasal parametrelerinin G33D, N138G, T144S, V293I, V32I, E373K ve V380I bölge spesifik mutasyonları ile geliştirilmesini konu alan bu araştırma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı programında “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Bu çalışmanın hazırlanmasında, verilerin değerlendirilmesi ve sonuçlandırılmasında eleştiri ve önerileri ile yol gösteren saygı değer Hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Hakan KARAOĞLU’na teşekkür ederim. Ayrıca çalışmalarım esnasında tecrübe ve bilgilerinden yararlandığım sayın Yrd. Doç. Dr. Fatih Şaban BERİŞ, sayın Yrd. Doç. Dr. Derya EFE, sayın Doç. Dr. Yusuf BEKTAŞ hocalarıma ve çalışmalarımı yürüttüğüm Moleküler Genetik Laboratuvar çalışanlarından İsmail AKSU, Zeynep Dengiz BALTA, Merve KIZAKLI, Seyhan RAKICI arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her anında sevgi ve destekleriyle yanımda olan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

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

Pelin BAK

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “*Anoxybacillus gonensis* G2^T Glukoz İzomerazının Kinetik ve Bazı Biyokimyasal Parametrelerinin G33D, N138G, T144S, V293I, V32I, E373K ve V380I Bölge Spesifik Mutasyonları ile Geliştirilmesi” başlıklı bu tezin, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim. 23/06/2017



Pelin BAK

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

ÖZET

***Anoxybacillus gonensis* G2^T GLUKOZ İZOMERASININ KİNETİK VE BAZI BİYOKİMYASAL PARAMETRELERİNİN G33D, N138G, T144S, V293I, V32I, E373K VE V380I BÖLGE SPESİFİK MUTASYONLARI İLE GELİŞTİRİLMESİ**

Pelin BAK

**Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Hakan KARAOĞLU

Glukoz izomeras, amilaz ve proteaz ile birlikte dünyanın en yüksek tonajlı üç enziminden birisidir. GI; D-glukozun D-fruktoza, D- ksilozun da D- ksiluloza dönüşümlü izomerizasyonunu katalizler. GI, D-glukozun D-fruktoza izomerizasyonu HFCS üretiminde ticari bir öneme sahiptir. Bu öneminden dolayı bugüne kadar pek çok hücreden yeni GI'lar izole edilerek karakterize edilmiştir. *Anoxybacillus gonensis* G2^T glukoz izomerasını kodlayan gen pET-28a(+) ekspresyon vektörüne klonlanarak enzim rekombinant olarak üretildi ve saflaştırıldı. Enzimin biyokimyasal özellikleri, kinetik parametrelerinin geliştirilmek için glukoz izomeras üzerinde G33D, N138G, T144S, V293I, V32I, E373K ve V380I mutasyonları yapıldı. Mutant enzimler ve yaban tip enzim, kolon kromatografisi yöntemleri ile saflaştırıldı. Karakterize edilen tüm enzimler biyokimyasal özellikleri ve kinetik parametreleri bakımından birbirleriyle ve yaban tip enzim ile karşılaştırıldı. Yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda G33D, V293I, V32I, E373K ve V380I mutasyonları ile yaban tip enzimin biyokimyasal özelliklerinde ve kinetik parametrelerinde önemli sayılabilecek bir değişiklik meydana gelmemiştir. N138G ve T144S mutant enzimlerin V_{max} , k_{cat} ve katalitik etkinlik değeri olan k_{cat}/K_m 'sinde artış gözlemlendi. N138G'nin V_{max} değeri $44,24 \pm 0,27$ $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein, T144S'nin V_{max} değeri $34,59 \pm 0,26$ $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein olarak hesaplandı. G33D, T144S mutant enzimlerin ısı kararlılığında yaban tip enzime göre hafif bir artış gözlemlendi.

2017, 101 sayfa

Anahtar Kelimeler: Glukoz İzomeras, HFCS, Enzim Karakterizasyonu, Mutasyon

ABSTRACT

IMPROVEMENT OF KINETIC AND SOME BIOCHEMICAL PARAMETERS OF GLUCOSE ISOMERASE FROM *Anoxybacillus gonensis* G2^T BY SITE DIRECTED MUTAGENESIS G33D, N138G, T144S, V293I, V32I, E373K AND V380I

Pelin BAK

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

Glucose isomerase is one of the three highest tonnage enzymes with along amylase and protease in the World. Glucose isomerase catalyses conversion isomerization of D-glucose to D-fructose, and D-xylose to D-xylulose. Isomerization of D-glucose to D-fructose has a commercial importance in the production of HFCS. Because of this importance, many new GIs have been isolated and characterized to date. The coding gene of glucose isomerase from *Anoxybacillus gonensis* G2^T was cloned to pET-28a(+) vector and GI was produced and characterized. To improve biochemical properties and kinetic parameters of the enzyme, G33D, N138G, T144S, V293I, V32I, E373K and V380I mutations were performed on the wild-type enzyme by site directed mutagenesis. All mutant enzymes and wild-type enzyme were purified by column chromatography methods. All characterized enzymes were compared with each other and with wild-type enzyme in terms of their biochemical and kinetic parameters. As a result of the characterization studies, mutations of G33D, V293I, V32I, E373K and V380I did not give any significant change in the biochemical properties and kinetic parameters of the wild-type enzyme. An increase was observed in the V_{max} , k_{cat} , and k_{cat}/K_m values of the wild-type enzyme by N138G and T144S mutantations. The V_{max} value of N138G mutant enzyme was calculated as $44,24 \pm 0,27 \mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$ protein and the V_{max} value of T144S as $34,59 \pm 0,26 \mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$ protein. Increases were observed in the thermal stability of the G33D and T144S mutant enzymes compared to wild-type enzyme.

2017, 101 pages

Keywords: Glucose Isomerase, HFCS, Enzyme Characterization, Mutation

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	II
ÖZET	III
ABSTRACT.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
TABLolar DİZİNİ.....	XV
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VI
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Endüstriyel Enzim Kaynağı Olarak Mikrobiyal Kaynakların Tercih Edilmesi.....	3
1.2.1. Termofilik Mikroorganizmalardan Elde Edilen Enzimler	3
1.3. Glukoz İzomeraz.....	6
1.3.1. GI'nın Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması.....	7
1.3.2. Substrat Seçiciliği.....	8
1.3.3. Metal İyonu Gereksinimi ve İnhibitörler.....	8
1.3.4. Alt Ünite Yapısı	8
1.3.5. Optimum Sıcaklık ve pH.....	9
1.3.6. GI'ların DNA Dizi Benzerliği ve Reaksiyon Mekanizması	9
1.4. Glukoz İzomerazın Önemi.....	10
1.5. GI Üreten Mikroorganizmalar	12
1.6. GI'ların Endüstriyel Kullanım Alanları	14
1.6.1. Etanol Üretimi.....	15
1.6.2. HFCS Üretimi	16
1.7. GI'nın Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin Bölge Özgün Mutasyonlar ile Geliştirilmesi.....	17

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	19
2.1. Deneylede Kullanılan Kimyasallar.....	19
2.2. Deneylede Kullanılan Hücre ve Plazmitler	19
2.3. Mutasyon Çalışmaları	20
2.3.1. Mutasyon Bölgelerinin Tasarlanması	20
2.3.2. Primerlerin Tasarlanması.....	21
2.3.3. Plazmit İzolasyonu	23
2.3.4. Long PCR	24
2.3.5. <i>DpnI</i> Kesim Reaksiyonu.....	25
2.3.6. Transformasyon Reaksiyonu.....	25
2.4. Enzimlerin Saflaştırılmaları	26
2.4.1. Enzim Üretimi.....	27
2.4.1.1 AgoGI'nin Üretimi.....	27
2.4.1.2. Mutant Enzimlerin Üretimi.....	27
2.4.2. Isı Şoku Uygulaması	28
2.4.3. İyon Değişim Kromatografisi	28
2.4.4. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi	29
2.5. Biyokimyasal Çalışmalar	30
2.5.1. Protein Miktarı Tayini.....	30
2.5.2. Glukoz İzomeraz Aktivite Deneyi.....	30
2.5.3. Optimum Sıcaklık.....	31
2.5.4. Optimum pH.....	31
2.6. Enzimlerin Kinetik Parametreleri	32
2.7. Mutasyonların Isıl Kararlılığı Üzerine Etkisi	32
2.8. SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE)	32
3. BULGULAR.....	34

3.1. AgoGI (Rekombinant Olarak Üretilen Yaban Tip Enzim) Saflaştırması ve Karakterizasyonu	34
3.1.1. Kaba Ekstrakt	34
3.1.2. Isı Şoku Uygulaması	34
3.1.3. İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması	35
3.1.4. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması	36
3.1.5. Saflaştırma Tablosu	38
3.1.6. AgoGI'nın Saflaştırılmasına Ait SDS-PAGE Analizi	38
3.1.7. Optimum Sıcaklık	39
3.1.8. Optimum pH	39
3.1.9. Kinetik Çalışmalar	40
3.2. N138G Mutant Enziminin Saflaştırması ve Karakterizasyonu	40
3.2.1. Kaba Ekstrakt	40
3.2.2. Isı Şoku Uygulaması	41
3.2.3. İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması	41
3.2.4. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması	42
3.2.5. Saflaştırma Tablosu	43
3.2.6. N138G Mutant Enziminin Saflaştırılmasına Ait SDS-PAGE Analizi	44
3.2.7. Optimum Sıcaklık	44
3.2.8. Optimum pH	45
3.2.9. Kinetik Çalışmalar	46
3.3. G33D Mutant Enziminin Saflaştırması ve Karakterizasyonu	46
3.3.1. Kaba Ekstrakt	46
3.3.3. İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması	47
3.3.4. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması	48
3.3.5. Saflaştırma Tablosu	49
3.3.6. G33D Mutant Enziminin Saflaştırılmasına Ait SDS-PAGE Analizi	50

3.3.7. Optimum Sıcaklık.....	50
3.3.8. Optimum pH.....	51
3.3.9. Kinetik Çalışmalar.....	52
3.4. T144S Mutant Enziminin Saflaştırması ve Karakterizasyonu.....	52
3.4.1. Kaba Ekstrakt.....	52
3.4.2. Isı Şoku Uygulaması	53
3.4.3. İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması	53
3.4.4. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması	54
3.4.5.Saflaştırma Tablosu.....	55
3.4.6. T144S mutant enziminin saflaştırılmasına ait SDS-PAGE Analizi.....	56
3.4.7. Optimum Sıcaklık.....	56
3.4.8. Optimum pH.....	57
3.4.9. Kinetik Çalışmalar.....	58
3.5. V293I Mutant Enziminin Saflaştırması ve Karakterizasyonu	58
3.5.1. Kaba Ekstrakt.....	58
3.5.2. Isı Şoku Uygulaması	59
3.5.3. İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması	59
3.5.4. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması.....	60
3.5.5. Saflaştırma Tablosu.....	62
3.5.6. V293I Mutant Enziminin Saflaştırılmasına Ait SDS-PAGE Analizi.....	62
3.5.7. Optimum Sıcaklık.....	63
3.5.8.Optimum pH.....	63
3.5.9. Kinetik Çalışmalar.....	64
3.6. V32I Mutant Enziminin Saflaştırması ve Karakterizasyonu	65
3.6.1. Kaba Ekstrakt.....	65
3.6.2. Isı Şoku Uygulaması	65
3.6.3. İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması	66

3.6.4. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması.....	67
3.6.5. Saflaştırma Tablosu.....	67
3.6.6. V32I Mutant Enziminin Saflaştırılmasına Ait SDS-PAGE Analizi.....	68
3.6.7. Optimum Sıcaklık.....	68
3.6.8. Optimum pH.....	69
3.6.9. Kinetik Çalışmalar.....	70
3.7. E373K Mutant Enziminin Saflaştırması ve Karakterizasyonu.....	70
3.7.1. Kaba Ekstrakt.....	70
3.7.2. Isı Şoku Uygulaması.....	71
3.7.3. İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması.....	71
3.7.4. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması.....	72
3.7.5. Saflaştırma Tablosu.....	74
3.7.6. E373K Mutant Enziminin Saflaştırılmasına Ait SDS-PAGE Analizi.....	74
3.7.7. Optimum Sıcaklık.....	75
3.7.8. Optimum pH.....	75
3.7.9. Kinetik Çalışmalar.....	76
3.8. V380I Mutant Enziminin Saflaştırması ve Karakterizasyonu.....	77
3.8.1. Kaba Ekstrakt.....	77
3.8.2. Isı Şoku Uygulaması.....	77
3.8.3. İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması.....	78
3.8.4. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması.....	79
3.8.5. Saflaştırma Tablosu.....	80
3.8.6. V380I Mutant Enziminin Saflaştırılmasına Ait SDS-PAGE Analizi.....	80
3.8.7. Optimum Sıcaklık.....	81
3.8.8. Optimum pH.....	82
3.8.9. Kinetik Çalışmalar.....	82
3.9. Enzimlerin Isıl Kararlılık Çalışmaları.....	83

4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	85
5.ÖNERİLER.....	94
KAYNAKLAR.....	95
ÖZGEÇMİŞ.....	101



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. D-glukozun D-fruktoza, D- ksilozun da D- ksiluloza GI aracılığıyla dönüşümlü izomerizasyonu	6
Şekil 2. A) <i>Geobacillus stearothermophilus</i> glukoz izomerazı B) <i>Anoxybacillus gonensis</i> G2 ^T glukoz izomerazı	20
Şekil 3. <i>E.coli</i> genlerinin üretilmesinde tercih edilen kodon kullanımı (Maloy, vd., 1996)	22
Şekil 4. AgoGI' nın kaba ekstraktın protein miktarı ve GI aktivite tayini grafiği	34
Şekil 5. AgoGI' nın ısı şoku uygulamasının protein miktarı ve GI aktivite tayini grafiği.....	35
Şekil 6. AgoGI' nın saflaştırılmasına ait iyon değişim kolon kromatografisi grafiği	36
Şekil 7. AgoGI' nın İyon değişim kolon kromatografisinin protein miktarı ve GI aktivite grafiği.....	36
Şekil 8. AgoGI' nın saflaştırılmasına ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi grafiği.....	37
Şekil 9. AgoGI hidrofobik etkileşim kolon kromatografisinin protein ve GI aktivite grafikleri	37
Şekil 10. AgoGI' nın SDS-PAGE jel elektroforez görüntüsü	38
Şekil 11. AgoGI' nın optimum sıcaklık grafiği	39
Şekil 12. AgoGI' nın optimum pH grafiği	39
Şekil 13. AgoGI-yt ait Michaelis-Menten grafiği	40
Şekil 14. N138G' ye ait kaba ekstraktın protein miktarı tayini ve GI aktivite grafikleri	41
Şekil 15. N138G ısı uygulaması sonrası protein miktarı tayini ve GI aktivite grafikleri	41
Şekil 16. N138G mutant enzimin saflaştırılmasına ait iyon değişimi kolon kromatografisi grafiği	42
Şekil 17. N138G mutant enzimin iyon değişimi kolon kromatografisinin protein miktarı tayini ve GI aktivite grafikleri.....	42
Şekil 18. N138G mutant enzimin saflaştırılmasına ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi.....	43
Şekil 19. N138G mutant enzimin hidrofobik etkileşim kolon kromatografisinin protein miktarı tayini ve GI aktivite grafikleri	43
Şekil 20. N138G mutant enziminin SDS-PAGE jel elektroforez görüntüsü.....	44
Şekil 21. N138G mutant enzimin optimum sıcaklık grafiği.....	45
Şekil 22. N138G mutant enziminin optimum sıcaklık grafiği.....	45
Şekil 23. N138G mutant enzime ait Michaelis-Menten grafiği.....	46

Şekil 24. G33D mutant enziminin ait kaba ekstraktın protein miktarı tayini ve GI aktivite grafikleri	47
Şekil 25. G33D mutant enzimin ısı uygulamasına ait protein miktarı tayini ve GI aktivite grafikleri	47
Şekil 26. G33D mutant enzimin saflaştırılmasına ait iyon değişimi kolon kromatografisi.....	48
Şekil 27. G33D mutant enzimin iyon değişimi kolon kromatografisinin protein miktarı tayini ve GI aktivite grafikler	48
Şekil 28. G33D mutant enzime ait saflaştırmanın hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi.....	49
Şekil 29. G33D mutant enzimin hidrofobik etkileşim kolon kromatografisinin protein miktarı tayini ve GI aktivite grafikleri	49
Şekil 30. G33D mutant enzimin SDS-PAGE jel elektroforez görüntüsü.....	50
Şekil 31. G33D mutant enzimin optimum sıcaklık grafiği.....	51
Şekil 32. G33D mutant enziminin optimum pH grafiği	51
Şekil 33. G33D mutant enzime ait Michaelis-Menten grafiği.....	52
Şekil 34. T144S mutant enzime ait kaba ekstraktın protein miktarı ve GI aktivite grafikleri	53
Şekil 35. T144S mutant enzimin ısı uygulamasına ait protein miktarı ve GI aktivite grafikleri	53
Şekil 36. T144S mutant enzime ait saflaştırmanın iyon değişimi kolon kromatografisi.....	54
Şekil 37. T144S mutant enzimin iyon değişimi kolon kromatografisine ait protein miktarı ve GI aktivite grafikleri.....	54
Şekil 38. T144S mutant enzime ait saflaştırmanın hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi.....	55
Şekil 39. T144S mutant enzime hidrofobik etkileşimkolon kromatografisine ait protein miktarı ve GI aktivite grafikleri	55
Şekil 40. T144S mutant enzimin SDS-PAGE jel elektroforez görüntüsü.....	56
Şekil 41. T144S mutant enzimin optimum sıcaklık grafiği.....	57
Şekil 42. T144S mutant enzimin optimum pH grafiği	57
Şekil 43. T144S mutant enzime ait Michaelis-Menten grafiği.....	58
Şekil 44. V293I mutant enzime ait kaba ekstraktın protein miktarı ve GI aktivite grafikleri	59
Şekil 45. V293I mutant enzimin ısı uygulaması sonrası protein miktarı ve GI aktivite grafikleri	59
Şekil 46. V293I mutant enzime ait saflaştırmanın iyon değişim kolon kromatografisi.....	60

Şekil 47. V293I mutant enzimin iyon değişimi kolon kromatografisine ait protein miktarı ve GI aktivite grafikleri.....	60
Şekil 48. V293I mutant enzimine ait saflaştırmanın hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi.....	61
Şekil 49. V293I mutant enzimine hidrofobik etkileşimkolon kromatografisine ait protein miktarı ve GI aktivite grafikleri	61
Şekil 50. V293I mutant enzimin SDS-PAGE jel elektroforez görüntüsü	62
Şekil 51. V293I mutant enzimin optimum sıcaklık grafiği	63
Şekil 52. V293I mutant enzimin optimum pH grafiği.....	64
Şekil 53. V293I mutant enzime ait Michaelis-Menten grafiği	65
Şekil 54. V32I mutant enzim kaba ekstraktın protein miktarı ve GI aktivite grafiği	65
Şekil 55. V32I mutant enzimin ısı uygulaması protein miktarı ve GI aktivite grafikleri	66
Şekil 56. V32I mutant enzimine iyon değişim kolon kromatografisine ait protein miktarı ve GI aktivite grafikleri.....	66
Şekil 57. V32I mutant enzimi hidrofobik etkileşim kolon kromatografisine ait protein miktarı ve GI aktivite grafikleri	67
Şekil 58. V32I mutant enzimin SDS-PAGE jel elektroforez görüntüsü	68
Şekil 59. V32I mutant enzimin optimum sıcaklık grafiği	69
Şekil 60. V32I mutant enzimin optimum pH grafiği.....	69
Şekil 61. V32I mutant enzime ait Michaelis-Menten grafiği	70
Şekil 62. E373K mutant enzim kaba ekstraktın protein miktarı ve GI aktivite grafikleri	71
Şekil 63. E373K mutant enzimin ısı uygulaması protein miktarı ve GI aktivite grafikleri	71
Şekil 64. E373K mutant enzimine ait saflaştırmanın iyon değişim kolon kromatografisi.....	72
Şekil 65. E373K mutant enzimin iyon değişimi kolon kromatografisi protein miktarı tayini ve GI aktivite grafikleri.....	72
Şekil 66. E373K mutant enzimine ait saflaştırmanın hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi.....	73
Şekil 67. E373K mutant enzimi hidrofobik etkileşim kolon kromatografisine ait protein miktarı ve GI aktivite grafikleri	73
Şekil 68. E373K mutant enzimin SDS-PAGE jel elektroforez görüntüsü	74
Şekil 69. E733K mutant enzimin optimum sıcaklık grafiği	75
Şekil 70. E733K mutant enzimin optimum pH grafiği.....	76
Şekil 71. E373K mutant enzime ait Michaelis-Menten grafiği	77
Şekil 72. V380I'ya ait kaba ekstraktın protein miktarıve GI aktivite grafikleri.....	77

Şekil 73. V380I mutant enzimin ısı uygulaması protein miktarı tayini ve GI aktivite grafikleri	78
Şekil 74. V380I mutant enzimine ait saflaştırmanın iyon değişim kolon kromatografisi.....	78
Şekil 75. V380I mutant enzimin iyon değişimi kolon kromatografisi protein miktarı ve GI aktivite grafikleri	79
Şekil 76. V380I mutant enzimine ait saflaştırmanın hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi.....	79
Şekil 77. V380I mutant enzimin hidrofobik kolon kromatografisi protein miktarı tayini ve GI aktivite grafikleri	80
Şekil 78. V380I mutant enzimin SDS-PAGE jel elektroforez görüntüsü	81
Şekil 79. V380I mutant enzimin optimum sıcaklık grafiği	81
Şekil 80. V380 mutant enzimin optimum pH grafiği	82
Şekil 81. V380I mutant enzime ait Michaelis-Menten grafiği	83
Şekil 82. Mutasyon enzimlerin ısı kararlılık grafiği.....	84
Şekil 83. G33D mutasyonuna ait üç boyutlu görüntüsü ve amino asitlerin yapıları	86
Şekil 84. V32I mutasyonuna ait üç boyutlu görüntüsü ve amino asitlerin yapıları.....	87
Şekil 85. E373K mutasyonuna ait üç boyutlu görüntüsü ve amino asitlerin yapıları	88
Şekil 86. V293I mutasyonuna ait üç boyutlu görüntüsü ve amino asitlerin yapıları.....	89
Şekil 87. V380I mutasyonuna ait üç boyutlu görüntüsü ve amino asitlerin yapıları.....	90
Şekil 88. N138G mutasyonuna ait üç boyutlu görüntüsü ve amino asitlerin yapıları	91
Şekil 89. T144S mutasyonuna ait üç boyutlu görüntüsü ve amino asitlerin yapıları	92

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. GI üreten bazı mikroorganizmalar	13
Tablo 2. Ticari öneme sahip GI'ları üreten bazı mikroorganizmalar ve ürünlerinin (GI) ticari adları	15
Tablo 3. A. gonensis GI'sında yapılması planlanan mutasyonların diğer mezofilik ve termofilik kaynaklı Tip 2 GI'ların amino asit sıraları ile karşılaştırılması...21	
Tablo 4. Mutasyon primerleri	22
Tablo 5. Doğal poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler	33
Tablo 6. AgoGI saflaştırma işlemine ait saflaştırma tablosu	38
Tablo 7. N138G mutant enzimin saflaştırma işlemine ait saflaştırma tablosu	44
Tablo 8. G33D mutant enzimin saflaştırma işlemine ait saflaştırma tablosu	50
Tablo 9. T144S mutant enzimin saflaştırma işlemine ait saflaştırma tablosu.....	56
Tablo 10. V398I mutant enzimin saflaştırma işlemine ait saflaştırma tablosu	62
Tablo 11. V32I mutant enzimin saflaştırma işlemine ait saflaştırma tablosu	68
Tablo 12. E373K mutant enzimin saflaştırma işlemine ait saflaştırma tablosu	74
Tablo 13. V380I mutant enzimin saflaştırma işlemine ait saflaştırma tablosu	80
Tablo 14. AgoGI ve mutant enzimlerin kinetik parametrelerinin karşılaştırılması.....	85

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AgoGI	Rekombinant Olarak Üretilen Yaban Tip Enzim
pETG2GI	Ekspresyon Vektörü ile Üretilen <i>Anoxybacillus gonensis</i> GI'sı
bp	Baz Çifti
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etilendiamin Tetraasetikası
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
BSA	Bovine Serum Albümin
DEAE	Dietil Aminoetil
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksi Nükleotid trifosfat
GI	Glukoz İzomeraz
HCl	Hidroklorik asit
CaCl ₂	Kobalt Klorür
HFCS	High Fructose Corn Syrup
IPTG	İzopropil β -D-1- tiyogalaktopiranosid
M	Molar
MOPS	3-(N-Morfolino) Propansülfonik asit
NAD ⁺	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
nm	Nanometre
μ l	Mikrolitre
PCR	Polimer Zincir Reaksiyonu
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Enzimler, canlı hücrede meydana gelen metabolik reaksiyonların hızını arttıran ve düzenleyen protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Doğal ortamları dışında yeterli koşullar sağlandığında etkilerini gösterebildiklerinden dolayı günümüzde pek çok alanda enzimlerden yararlanılabilmektedir. Bu nedenle enzimlerin yer aldıkları dokuların veya hücre kısımlarının belirlenmesi, bu biyokatalizörlerin saflaştırılarak elde edilmesi, biyokimyasal reaksiyon işlevlerinin ortaya çıkarılması, etki mekanizmalarının ve kinetik özelliklerinin tüm ayrıntılarıyla incelenmesi büyük önem taşımaktadır (Sökmen, 2005).

Günümüzde enzim katalizli süreçlerin, daha ekonomik, hızlı ve çevre dostu olması, ürün veriminin yüksek ve safsızlık oluşumunun oldukça düşük oluşu, klinik ve endüstriyel uygulamalarda kimyasal reaksiyonlara kıyasla daha fazla tercih edilmelerine sebep olmuştur. Enzim katalizli süreçlere duyulan bu ilgi sebebiyle dünya genelinde bir enzim pazarı ortaya çıkmıştır. Bu durum, enzimlerle ilgili çalışmaların artmasına da neden olmuştur. Gün geçtikçe artan talepler, artık daha iyi özelliklere sahip ya da özellikleri geliştirilmiş enzimlere duyulan ihtiyacı da gözler önüne sermektedir. Endüstriyel enzimlerin % 60'ı Avrupa, geri kalan % 40'lık bölümü ise Amerika ve Japonya tarafından üretilmektedir (Bhat, 2000).

Biyoteknolojinin endüstriyel enzimler ile ilgili alanda enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ekonomik değerlerinin çok yüksek olması ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği nedeniyle yapılan araştırmalar daha çok önem kazanmaktadır. Enzimlerin endüstriyel kullanım alanlarına göre dağılımına bakıldığında, % 29'unun gıda sektöründe, % 15'inin hayvan yemi sektöründe, % 56'sının ise genel teknik alanlarda kullanıldığı görülmektedir (Kirk vd., 2002; Schallmeyer vd., 2004). Sıcaklık, endüstri için en önemli temel unsurlarından biridir. Enzimlerin ise doğal biyokatalizörler olarak en iyi bilinen dezavantajları yüksek sıcaklıkta üç boyutlu yapılarının bozulması ve aktivitelerini kaybetmeleridir. Ancak bazı mikroorganizmaların yüksek sıcaklıklarda yaşayabilmesi; bu sistemlerde bulunan enzim

bileşenlerinin bu sıcaklıklarda dahi yapılarını korumaları ve böylelikle aktivite gösterebilmelerinden kaynaklanır. Termofilik bakteriler, yüksek sıcaklıklara dayanıklı enzimleri içeren organizmalardır. Bu nedenle de endüstriyel amaçlar için kullanılabilir potansiyel enzim kaynaklarını oluştururlar (Faiz, 2005).

Endüstriyel alanlarda kullanılan başlıca enzimler, proteolitik enzimler, amilolitik enzimler, selülozlar, pektolitik enzimler, galaktozidazlar ve glukoz izomeraz (GI) olarak sıralanabilir. GI olarak bilinen D-glukoz/ksiloz izomeraz (EC 5.3.1.5.), proteaz ve amilaz ile birlikte dünya enzim endüstrisinin en yüksek kullanım alanına sahip enzimlerinden biridir (Bhosale vd.,1996). Bu enzim; D-glukozun D-fruktoza, D-ksilozun da D-ksiluloza dönüşümlü izomerizasyonunu katalizler (Belfauih ve Penninckx, 2000).

Ksilozun ksiluloza dönüşümü, çürümüş bitki materyalleri üzerinde yayılım gösteren saprofilik bakterilerin beslenme ihtiyaçlarını gidermek için kullandıkları yoldur. Bu reaksiyon ayrıca hemiselülozun etanole dönüşmesine de yardımcı olur. Glukozun fruktoza izomerizasyonunun endüstriyel önemi ise, yüksek fruktoz içerikli mısır şurubu (High Fructose Corn Syrup: HFCS) üretiminin bu reaksiyon ile sağlanabilmesidir. 1976 yılına kadar yiyeceklerde tatlandırıcı olarak kullanılan ve şeker kamışı % 60 ile şeker pancarından % 30 elde edilen sakkaroz yerini, glukozun fruktoza izomerizasyonunun keşfiyle günümüz tatlandırıcıları yani fruktoz şurupları almıştır. GI kullanılarak HFCS üretimi ilk olarak Japonya'da başlamış, 1958'deki Küba Devrimi'nden sonra Amerika'da ortaya çıkan sakkaroz kaynağı sıkıntısını gidermeye de çare olarak görülmüştür. GI, o yıllardan günümüze kadar en önemli endüstriyel enzimlerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır (Bhosale vd.,1996).

GI'nin endüstriyel alanlarda kullanımını oldukça pahalıdır. Çünkü hücre içi bir enzim olduğunda ve glukozun ilgisinin düşük olması sebebiyle (yüksek K_m), reaksiyonlarda çok yüksek miktarlarda enzim kullanımına ihtiyaç vardır. Glukoz izomeraz 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. Enzimin verimliliğinin artırılması bir organizmanın rastgele mutasyonla enzim üretiminin artırılması veya rekombinant DNA

teknolojisiyle uygun konakta eksprese edilmesi), Fermentasyon ortamının optimize edilmesi (enzim üretimini indükleyecek ksiloza alternatif daha ucuz maddelerin bulunması), 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.

1.2. Endüstriyel Enzim Kaynağı Olarak Mikrobiyal Kaynakların Tercih Edilmesi

Endüstrinin bütün alanlarında kullanılan enzimler genellikle mikrobiyal kaynaklıdır. Bunun nedeni mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin bitkisel ve hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, ucuz ve daha kararlı olmaları, fazla miktarda üretilibilmeleridir (Wiseman, 1987). Ayrıca mikroorganizmalar bitki ve hayvanlara göre daha kolay genetik değişimlere tabii tutulabilirler. Endüstriyel öneme sahip birçok enzim, mikroorganizmalar tarafından hücre dışına salınabilir. Böylece enzim elde etmek için hücrenin parçalanmasına da gerek kalmaz (Walsh, 2002).

1.2.1. Termofilik Mikroorganizmalardan Elde Edilen Enzimler

Mikroorganizmalar, yaşadıkları sıcaklık aralıklarına göre sakrofiller, mezofiller, termofiller olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Sakrofiller -10°C 'ye kadar olan sıcaklıklarda yaşayabilirken, mezofiller $20-45^{\circ}\text{C}$ 'de büyüebilirler. Termofilik mikroorganizmalarsa yüksek sıcaklıklarda yaşamaya adapte olup kendi aralarında ılımlı termofiller ($45-65^{\circ}\text{C}$) ve hipertermofiller (85°C) şeklinde sınıflanırlar (Demirjian vd., 2001).

Ekstrem şartlarda yaşamak ve çoğalmak için organizmalar tüm metabolik fonksiyonlarını bu ortamlara adapte etmek zorundadırlar. Termofillerin hücre membranı doymuş yağ asitlerinden oluşmuştur ve bu yağ asitleri hidrofobik bir ortam sağlayarak yüksek sıcaklıklarda yaşayabilmeleri için hücreyi yeterince sıkı ve sert tutarlar. Termofilik organizmaların hücresel bileşenleri de (enzimler, proteinler, nükleik asitler vb.) yüksek sıcaklığa ve ekstrem derecede asidik ya da alkali şartlara dayanıklıdırlar (Kristjansson ve Asgeirsson, 2002; Haki ve Rakshit; 2003).

Termofilik mikroorganizmalar tarafından üretilen enzimler, termozimler olarak adlandırılırlar (Li vd., 2005). Bu enzimler, biyoteknolojik amaçlar için oldukça uygundur. Çünkü ısı şoku ile saflaştırılmaları kolaydır, çözücü ve birçok denatüre edici ajana karşı dayanıklıdırlar, mikrobiyal kontaminasyonlara daha az duyarlıdırlar ve reaksiyon hızları mezofil organizmalardan elde edilen enzimlere göre daha yüksektir. Ayrıca termozimler, elde edildikleri mikroorganizmanın büyüdüğü sıcaklıkta etkin şekilde çalışırlar ve denatürasyonları bu sıcaklık derecesinin çok üzerinde meydana gelir (Koffler, 1957; Amelunxen ve Lins, 1968).

Termofilik mikroorganizmaların yüksek büyüme oranları ve minimum kontaminasyonları sebebiyle endüstriyel açıdan çok büyük öneme sahiptirler. Bu organizmalardan elde edilen enzimlerin yüksek sıcaklıklara dayanıklı olmaları onları endüstriyel uygulamalar için cazip hale getirir. Ayrıca hücre dışı termozimler genellikle daha kolay saflaştırılabilir ve daha kararlı olmaları gibi özellikleri sebebiyle hücre içi enzimlere göre daha çok tercih edilirler. Çünkü bu özellikleri hücre dışı enzimlerin üretim maliyetlerini azaltır (Eveleigh, 1979).

Endüstriyel süreçler için yüksek sıcaklıkta gerçekleşen reaksiyonların ilgi çekici olmasının bir takım sebepleri vardır. Sıcaklığın artırılması organik bileşiklerin çözünürlüğünü arttırması, viskozitenin düşmesini ve organik bileşiklerin difüzyon katsayısının artmasını da beraberinde getirir. Böylelikle reaksiyonlar daha yüksek hızlarda gerçekleştirilir (Güven, 2007). Ayrıca yüksek sıcaklıkta bakteriyel ve viral kontaminasyon riski de azaltılmış olur (Haki ve Rakshit, 2003).

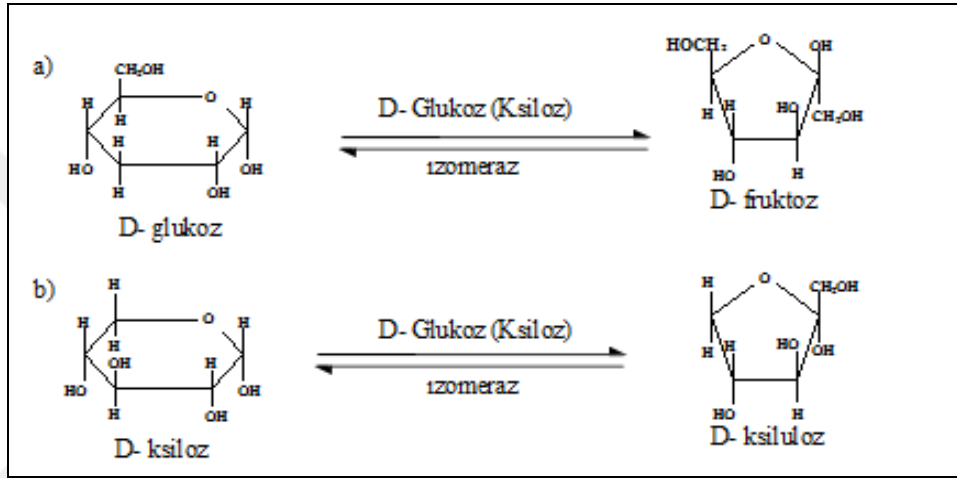
Enzimlerin endüstriyel kullanımlarını sınırlayan en önemli sebebi, yüksek sıcaklıklarda denatüre olmalarıdır. Termal denatürasyon iki şekilde açıklanabilir. Birincisi; düşük sıcaklıklarda proteinin katlanmış formu ile katlanmamış formu arasındaki dengenin katlanmış form yönüne kaymasıdır. İkincisi ise; yüksek sıcaklıklarda dönüşümsüz çökelmelerin ve kovalent değişimlerin olmasıdır. Termofilik mikroorganizmalar, bu problemi çözmek için proteinlerin yüksek sıcaklıklarda aktif konformasyonlarını sürdürürler. Yine de, enzimlerin termal kararlılık mekanizmalarının tam olarak belirlenmesi zordur. Çünkü bu mekanizmalar oldukça fazla ve karmaşıktır (Arnold, 2001).

Termofilik ve mezofilik proteinlerin aminoasit sıralarının ve yapılarının karşılaştırılması sonucu termofilik proteinlerin, termal denatürasyondan korunmak için bazı ilave yapısal özelliklere sahip oldukları belirlenmiştir (Vieille ve Zeikus, 2001). Yapılan çalışmalar iki protein türünün de benzer sekonder ve tersiyer yapıya sahip olmaları yanında, aminoasit içerikleri ve yan zincir etkileşimlerinin az oranda fakat açık şekilde farklı olduğunu göstermektedir. Termofilik proteinler çok sayıda yüklü ve hidrofobik aminoasit bulundurur (Fujiwara, 2002). Ayrıca termozimler, mezofilik benzerlerine kıyasla daha kısa yüzey loplarna sahiptir (Wintrode vd., 2001) ve termal kararlılığı sağlamak için disülfür bağları, tuz köprüleri ve metal koordinasyonu kullanılır. Proteinin içindeki hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağları da termal kararlılık için önemlidir (Sauve ve Sygusch, 2001).

İlk zamanlar protein kararlılığı çalışmaları çözünebilir monomerik yapıdaki enzimler üzerinde araştırılmıştır (Dill, 1990). Termofilik enzimlerin çalışmasıyla protein kararlılığı mekanizmalarının açıklanabilmesi hızlanmıştır. Termofilik enzimler nispeten mezofilik enzimlere benzerler; aminoasit dizilimi mezofilik eşlerinkine % 40-85 benzerlik gösterir (Vieille vd., 1995; Burdette vd., 1996), üç boyutlu yapıları birbirlerine çok benzer (Davies vd., 1993; Fujinaga vd., 1993) ve aynı katalitik mekanizmayı kullanırlar (Vieille vd., 1995; Voorhorst vd., 1995). Termofilik enzimlerin gösterdiği yüksek kararlılık ve aktivite, mezofiliklerden farklı aminoasitler buldukları için kaynaklanmaktadır. Termofilik enzimlerin çeşitli denatüre edici ortamlara sağladıkları direnç göz önüne alındığında oldukça rijit bir yapıda olmaları gereklidir. Özellikle aktif bölgede rol oynayan aminoasitlerin oldukça korunumlu olduğu görülmektedir (Veronese vd., 1984; Wrba vd., 1990; Kanaya ve Itaya, 1992).

1.3. Glukoz İzomeraz

Glukoz izomeraz, büyümeleri için ksilozu kullanan bakterilerde bulunan ve D-glukoz / ksiloz izomeraz (D-ksiloz ketol izomeraz; EC 5.3.1.5) birçok mikroorganizma tarafından sentezlenen, izomeraz sınıfı, hücre içi bir (intraselüler) enzimdir (Chen, 1980). GI, D-ksilozun D-ksiluloza ve D-glukozun D- fruktoza dönüşümünü katalizler (Takasaki ve v.d., 1969).



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

D-ksilozun D-ksiluloza hem de D-glukozun D-fruktoza dönüşümlü izomerizasyonunu katalizler (Bhosale vd., 1996; Chen, 1980). Bunun yanında D-riboz, L-arabinoz, L-ramnoz ve D-allozun bu enzimin düşük izomerizasyon oranına sahip birer substratı oldukları çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Moses ve Cape, 1994; Pastine vd., 1999; Pastinen vd., 1999; Sanchez ve Smiley, 1975; Yamanaka, 1968). Glukoz izomeraz, bugüne kadar; toprak, deniz ve tatlı sularda yaşayabilen aerobik ve anaerobik birçok mikroorganizmada incelenmiştir. Ökaryotik canlılarda ise *Hordeum vulgare*'de glukoz izomerazın varlığı gösterilmiştir (Kristo vd., 1996).

Oldukça termostabil ve termofilik olan glukoz izomerazlar ise *Thermus thermophilus*, *Thermus aquaticus*, *Thermotoga maritima* ve *Thermotoga neapolitana* bakterilerinden izole edilmektedir (Vieille ve Zeikus, 2001). Enzimi üreten mikroorganizmaların orantılı olarak enzimin optimum çalışma sıcaklığı ile büyüme

sıcaklığı, 25-85°C olmasına rağmen, bütün glukoz izomerazlar bir çok açıdan benzer özellikler göstermektedir; bu özelliklere bakıldığında birbirine benzeyen tetramer veya dimerlerden oluşurlar ve moleküler ağırlığı yaklaşık 173.000 dalton civarındadır (Carell, 1989).

Bütün ksiloz izomerazlar kararlı halde bulunmaları ve aktiviteleri için, Co^{+2} , Mn^{+2} , Mg^{+2} veya Cr^{+2} gibi bivalent katyonlara ihtiyaç duyarlar. Cu^{+2} , Zn^{+2} , Ni^{+2} , Ag^{+2} , Hg^{+2} ve Ca^{+2} gibi bir takım iyonlar ise enzimin katalitik aktivitesini inhibe eder (Bogumil vd., 1993; Briggs vd., 1984; Bucke, 1981). İki tip glukoz izomeraz tanımlanmıştır. Birinci tip glukoz izomerazların amino ucunda yaklaşık 50 amino asitlik bir bölge bulunmaktadır, ikinci tipte ise bu bölge bulunmamaktadır (Hartley vd., 2000). Enzimin kristal yapısı birçok mikroorganizmada bulunmaktadır. Bu organizmalara örnek olarak *Arthrobacter* (Henrik vd., 1989), *Actinoplanes missouriensis* (Reyvd., 1988), *Streptomyces rubiginosus* (Whitlow vd., 1991), *Streptomyces murinus* (Rasmussen vd., 1994) verilebilir. Bir çok yapılan çalışmalarda kristal yapısı üzerinde enzimin tersiyer yapısının oldukça kararlı olduğu anlaşılmıştır (Henrik vd., 1989).

1.3.1. GI'nin Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması

Çeşitli mikroorganizmalardan izole edilen glukoz izomerazların enzimatik ve biyokimyasal özellikleri yoğun bir şekilde çalışılmıştır. Enzimin inhibe olmasını engellemek ve HFCS üretiminde ticari olarak uygulanabilirliğini değerlendirmek açısından ısı kararlılığı, pH, metal iyon gereksinimi, substrat spesifikliğı gibi spesifik özellikleri hakkındaki bilgiler önemlidir.

GI'lar büyüklükleri, metal iyonu tercihleri ve amino asit sırası benzerliklerine göre Sınıf I ve Sınıf II olarak iki başlık altında toplanabilirler (Vangrysterperre vd., 1990). Sınıf I GI'lar, yaklaşık olarak 390 amino asitten oluşurlar ve genellikle yüzeysel birimlerde birkaç sekans farklılığı ile beraber kendi aralarında yüksek homoloji gösterirler. Sınıf I GI'lar benzer katalitik aktivite ve optimum sıcaklık sergilerlerken, Sınıf II GI'lar geniş aralıklı sekans homolojisi yanı sıra değişken aktivite ve optimum sıcaklık sergilerler. Ayrıca fazladan 45-55 aminoasit birimi bulundururlar (Hartley vd., 2000).

1.3.2. Substrat Seçiciliği

GI'nın en yaygın substratları glukoz ve ksilozdur. GI aktivitesi, farklı birçok şeker ve şeker türevi için de test edilmiştir. Enzimin, elde edildiği mikroorganizmalara göre substrat seçiciliği farklılık göstermektedir. D-riboz, L-arabinoz, L-ramnoz, D-alloz ve 2-deoksiglukoz gibi pek çok şekerin, GI'nın substratı olduğu tespit edilmiştir (Hausler ve Stutz, 2001). Bunun yanında, glukoz ve ksiloz gibi ekvatorial düzlemindeki 3. ve 4. karbonlarında hidroksil grubu taşıyan substratlar varlığında enzimin maksimum izomerizasyon gerçekleştirdiği bilinmektedir (Bhosale vd., 1996).

1.3.3. Metal İyonu Gereksinimi ve İnhibitörler

GI'nın, kararlılığı ve aktivitesi için Mg^{+2} , Mn^{+2} ve Co^{+2} gibi bivalent katyonlara veya bunların değişik kombinasyonlardaki kullanımına ihtiyaç duymaktadır. Co^{+2} ve Mg^{+2} aktivite için zorunlu olmasına rağmen birlikte fonksiyonları farklılıklar gösterir. Mg^{+2} , Co^{+2} göre daha etkin bir aktivatörken, Co^{+2} enzimin kuaterner yapısının korunmasını sağlayarak enzimin kararlı hale gelmesinden sorumludur (Bhosale vd.,1996). GI'nın katalitik aktivitesi Ag^{+2} , Hg^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Ni^{+2} ve Ca^{+2} iyonları tarafından değişik oranlarda inhibe olmaktadır (Bhosale vd., 1996).

1.3.4. Alt Ünite Yapısı

GI'nın sedimentasyon sabitleri ve moleküler ağırlıkları sırasıyla 7,55 ile 11,45 arasında ve 52.000 ile 191.000 dalton arasında değişiklik göstermektedir (Chen, 1980). GI'nın alt ünite ve amino asit yapısına bakıldığında, molekül birbirine benzer veya aynı 4 ya da 2 alt ünitelerden meydana gelmektedir. Alt üniteler arasında disülfid bağları bulunmaz fakat birbirlerine kovalent olmayan etkileşimlerle bağlıdırlar. *Bacillus sp.*'den elde edilen ekstrasellular GI üç alt birimden meydana gelmektedir (Chauthaiwale ve Rao, 1994). Basuki ve arkadaşlarının *Streptomyces phaeochromogenes*'de varlığını gösterdikleri GI enziminin birbirinden farklı olan 4 alt birimden meydana geldiği gösterilmiştir (Bhosale vd., 1996). *Arthrobacter* ve *Streptomyces* türlerinde yapılan çalışmalarda molekülün biyolojik aktivitesinde rol oynayan birimin dimer ya da

tetramerler olduğu ve monomer ünitelerin tek başlarına herhangi bir biyolojik aktiviteye sahip olmadıkları gösterilmiştir (Gaikwad vd., 1992; Rangarajan vd., 1992).

1.3.5. Optimum Sıcaklık ve pH

GI'nın çeşitli organizmalarda optimum sıcaklığı 60°C ile 80°C arasında değişiklik göstermektedir ve bu değerler Co^{+2} varlığı ile artış göstermektedir. Optimum pH değerleri ise genel olarak 7 ile 9 arasında değişiklik göstermektedir. Bununla birlikte endüstriyel alanda istenilen düşük pH değerlerinde çalışabilen enzimler de bulunmaktadır. Örneğin *Lactobacillus brevis*'den elde edilen GI, pH 6 ile 7 arasında optimum aktivite göstermektedir. *Streptomyces spp.*, *Bacillus spp.*, *Actinoplanes missouriensis* ve *Thermus thermosulfurogenes*'e ait GI'lar yüksek sıcaklıklarda kararlı enzimler oldukları halde *Lactobacillus* ve *Escherichia spp*'ye ait GI'lar yüksek sıcaklıklara az kararlıdırlar (Bhosale vd., 1996).

1.3.6. GI'ların DNA Dizi Benzerliği ve Reaksiyon Mekanizması

Glukoz izomerazların yapı ve işlevleri arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için çeşitli organizmalardan elde edilen GI (*xylA*) genlerinin amino asit dizilimleri karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda enzimin N-terminal ucunda 40-50 amino asitlik bir bölgenin olup olmamasına göre 2 sınıfa ayrılmışlardır. Birinci tip GI'lar 390 amino asit içerir ve *Streptomyces spp.*, *Actinoplanes spp.*, *Ampullariella spp.*, *Arthrobacter spp.*, ve *Thermus thermophilus* gibi türlere ait GI'lar bu sınıftandır. İkinci tip aminoasitler *Escherichia coli*, *Bacillus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Lactococcus spp.*, *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*, ve *Thermotoga spp* türleridir ve 440 amino asitten meydana gelmişlerdir (Hess vd., 1998). İkinci tip GI'lar 8 sarmal ile çevrelenmiş birbirine paralel 8 β -levhadan ve diğer monomerlerle ilişkide bulunan uzamış bir C-terminal kuyruktan meydana gelirler.

Enzimin aktif bölgesi açık bir fıçı şeklinde bir cepten meydana gelir ve bu cebin alt tarafında, genel olarak hidrofobik aminoasitler ile Mg^{+2} , Mn^{+2} ve Co^{+2} gibi bivalent katyonlar ile birlikte çalışan glutamik asit, aspartik asit ve histidin gibi amino asitleri bulunmaktadır (Whitlow vd.,1991). Birinci ve ikinci tip glukoz izomerazlar arasında

aminoasit dizilimlerine bakıldığında büyük farklılıklar görülmektedir buna rağmen; substrat ile ilişkide H100, T140, E231, K233, D338, metal iyonunun bağlanmasında E231, E267, H270, D295, D306, D308, D338 ve katalitik işlemlerde ise H100, D103, D338'in büyük ölçüde korunduğu görülmektedir. Birbirlerine uzak olan türlerin karşılaştırmalarında enzimin aktif bölgesine ait içeriğin oldukça yakın olduğu görülebilmektedir (Hess vd., 1998).

1.4. Glukoz İzomerazın Önemi

GI, termofilik enzimlerin yapısı ve işlevleri arasındaki ilişkiyi araştırmak için ileri biyokimya ve genetik mühendisliği teknikleriyle bir model oluşturmaktadır. Enzim, akademik öneminin yanı sıra, hemiselülozdan etanol üretilmesindeki potansiyel uygulamaları ve HFCS üretimindeki kullanımını açısından endüstriler tarafından artan yoğun ilgiye sahiptir. Glukoz izomeraz, glukozun fruktoza izomerizasyonunu katalizlediği için endüstriyel alanda, özellikle HFCS (High Fructose Corn Syrup) üretiminde, ticari bir öneme sahiptir. Endüstriyel uygulamalarda fruktoz şuruplarının başarıyla uygulanabilmesinin sebebi glukoz izomerazın keşfi olmuştur. Ülkemizde ve AB mevzuatında fruktoz şuruplarının tanımı yer almamaktadır. FDA (2000)'e göre fruktoz şurupları; besleyici sakkarit karışımı olup, % 42-55 fruktoz içeren tatlı, mısır nişastasası glukozunun glukoz izomeraz enzimi kullanılarak fruktoza dönüştürülmesiyle elde edilen bir üründür. Ayrıca % 90 fruktoz içeren farklı üçüncü bir tipi de bulunmaktadır ve dünyada sınırlı kullanıma sahiptir (Knorr, 1987).

Enzim ticari alanlarda kullanılmaya başlamadan önce sakkaroz yiyeceklerde tatlandırıcı madde olarak kullanılmaktaydı. Glukoz izomerazın keşfedilmesi 1958 yılındaki Küba devrimi sonrası meydana gelen sakkaroz yokluğu sebebiyle, fruktoz şuruplarının kullanımında artış olmuştur (Bhosale vd., 1996). Fruktoz şurupları tatlı (Pomeranz, 1985), düşük viskozite ve daha az kristalleşme gibi özellikleri sebebiyle kullanıcıya depolama ve taşıma işlemleri sırasında avantaj sağlayan ürünlerdir (Inglett, 1974). Fruktoz şuruplarının özellikleri; lezzeti geliştirici özellikleri (CRA, 1994), ozmotik basınçlarının yüksek olması (Hobbs, 1986), nemi hapsederek kurumayı önlemeleri (Pomeranz, 1985) ve fermente edilebilir şekerler açısından zengin olmalarıdır (Henry, 1976). Fruktoz şurupları bu özellikler sebebiyle, gazlı ve gazsız

içecekler, fırın ürünleri, çeşitli hububat ürünleri, süt mamulleri ve işitlenmiş gıdalarda kullanılabilir (Wulff ve Helgeson, 1987). Fruktoz şuruplarının kullanımı mayonez ve salata sosları gibi ürünlerde emülsiyon stabilitesi artmakta (Inglett, 1974) ve enerji değeri de düşürülebilmektedir (Reeder,1978). Fruktoz şuruplarının salamura ürünlerde kullanılmakta ve su aktivitesini azaltıcı özelliğinden yararlanılmaktadır (Hobbs,1986). Ayrıca fruktoz şuruplarının sebze, çorba, domates sosları ve meyve gibi konserve ürünlerinde de kullanımı artmaktadır (Nabors ve Gelardi, 1991; Hebeda, 1987; Anon, 1993).

Fruktoz şurubu, dondurmanın dokusunda pürüzsüzlük ve hacimde artış gibi özellikler kazandırmaktadır (Anon, 1979). Fruktoz şurupları; ekmek, bisküvi, kek, kurabiye, tart dolguları ve jlelerde kullanılabilir (Pomeranz, 1985). Fruktoz şurupları fermente edilebilir substrat olup, ekmeğin kabuk rengine ve lezzetine katkıda bulunmakta ve raf ömrünü uzatmaktadır (Kulp vd., 1991) En iyi bisküvi rengini veren indirgen şekerler içerisinde fruktoz şuruplarından elde edilmiştir (Manohar ve Rao, 1997). Keklerde sakkaroz yerine fruktoz şurupları kullanıldığı için içerisindeki yüksek indirgen şekerler sebebiyle esmerleşmeyi arttırmakta ve kekin tazelik süresini uzatmaktadır (Johnson, 1989). Fruktoz şurupları gıdalarda lezzetin gelişmesine ve tatlandırma özelliklerinin artmasında rol oynar. Fruktozun dil üzerinde algılanma yoğunluğu sakkarozu göre çok daha yüksektir ve hissedilme süresi oldukça kısadır. Bu nedenle fruktoz şurupları gıdalarda karakteristik lezzet özelliklerinin algılanmasını zenginleştirmede etkilidir (Howling, 1992).

HFCS tatlı olmayan nişastadan imal edildiği düşünüldüğünde ve tatlandırma gücü sakkarozdan % 10-20 daha ucuzdur. Aynı zamanda HFCS sakkarozda olduğu gibi kristalleşme problemi oluşturmaz. Ayrıca D-fruktoz diyabetik bir tatlandırıcı olarak da kullanıldığından, sadece fruktoz midede çok yavaş bir şekilde emilir ve kandaki glukoz seviyesine bir etki yapmaz (Bhosale vd.,1996). 1957 yılında Marshall ve Kooi'nin *Pseudomonas hydrophyla*'dan elde ettikleri enzimin glukoz izomeraz kapasitesi şeker kamışı şekerinin yerine HFCS kullanımında bu enzimin değerlendirilmesinde başlangıç noktasını oluşturmuştur. Bu enzimin, büyüme sırasında ksiloza ihtiyaç duyduğu ve üretim arsenat varlığıyla arttırılabildiği gösterilmiştir (Marshall ve Kooi, 1957). Daha sonraları ksilozdan bağımsız olarak, ksiloz izomeraz aktivitesi *Escherichia*

intermedia'da bulunmuştur (Natake ve Yoshimura, 1964). Takasaki ve Tanabe, *Bacillus megaterium*'dan NAD⁺ bağımlı ve glukozu özgü bir glukoz izomerazı (EC 5.3.1.18) izole etmişlerdir (Takasaki ve Tanabe, 1962; Takasaki ve Tanabe, 1963). Glukoz ve mannozun fruktoza izomerizasyonunu yapan benzer bir glukoz izomeraz *Paracolobacterium aerogenoides*'den izole edilmiştir (Takasaki ve Tanabe, 1964; Takasaki ve Tanabe, 1966). Bütün bu aktiviteleri gösteren glukoz izomerazlardan EC (5.3.1.5) numaralı enzimler, ilk kez endüstriyel bir oranda 1957 yılında Amerika'da Clinton Corn Processing Co. tarafından başarılmıştır. 1974 yılına gelindiğinde immobilize edilmiş glukoz izomeraz artık ticari olarak elde edilebilir hale gelmiştir.

Gıda endüstrisinde HFCS'ye olan talep her geçen gün artmış ve 1980'e kadar batı dünyasındaki tüm şekerlerle uğraşan büyük şirketler glukoz izomeraz teknolojisine başvurmaya başlamıştır. Bugün enzim, gıda endüstrisinde en büyük marketlerde yerini almıştır (Bhosale vd., 1996). GI, ksiloz ve glukozun izomerizasyonunu katalizler. Enzimin bu özelliği ksilozun, mayalar tarafından fermente edilebilen ksiluloza izomerizasyonunda kullanılmaktadır. Yenilenebilir biyolojik artıkların fermente edilebilen şekerlere ve etanole biyolojik olarak dönüşümü, fosil yakıtların hızlı tüketimi göz önüne alındığında önemlidir. Bu biyolojik artıklar % 40 selüloz ve % 30 ligninden oluşmaktadır. Selüloz ve hemiselülozun ksiloz ve glukozu hidrolizine ve mayalarla etanole fermente edilmesi biyolojik artıkların kullanımının ekonomik yapılabilirliğine bağlıdır.

1.5. GI Üreten Mikroorganizmalar

Endüstriyel uygulamalar kullanılması için gerekli olan enzim miktarı oldukça fazladır. Bu nedenle, biyolojik sistemlerden izole edilen bir enzimin endüstriyel işlemlerde kullanılabilmesi için, enzimin nasıl ve hangi kaynaktan elde edileceği bulunmalıdır. Bu kaynakların ticari olarak kullanılabilmeleri, maliyetleri ve elde edilebilme kolaylığı gibi faktörlere ve biraz da toplumda kabul görmelerine bağlıdır (Faiz, 2005). GI, çoğunlukla prokaryotik mikroorganizmalarda bulunur.

Tablo 1. GI üreten bazı mikroorganizmalar

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

Endüstriyel açıdan taşıdığı önem sebebiyle yeni GI'ların geliştirilmesi için çeşitli çalışmalar yapılmış ve enzimin indüksiyonu, kararlılığı ve saflaştırılması üzerine odaklanılmıştır (Quax, 1993). *Pseudomonas hydrophila*'da bulunmasından sonra birçok bakteri türünde GI aktivitesi görülmüştür. Heterolaktik asidik bakteriler arasında *Lactobacillus brevis*'ten elde edilen GI, düşük pH değerlerinde aktifken yüksek sıcaklıklarda kararlılığını kaybetmesi sebebiyle endüstriyel amaçlar için uygun değildir (Yamanaka, 1975). *Streptomyces glaucescens* (Weber,1976) ve *S. flavogriseus* (Chen

vd., 1979) türlerinde elde edilen GI'nın ekstrasellular olduğu rapor edilmiştir. Enzimin hücre içerisinden dışarı salınmasının hücre duvarının geçirgenliğindeki bir değişiklik ve hücrenin kısmi lizisi ile meydana geldiği kabul edilmiştir. *Chainia sp.* ve (Srinivasan vd., 1983; Vartak vd., 1984) alkalotermofilik bir tür olan *Bacillus sp* (Chauthaiwale ve Rao, 1994)'den elde edilen ekstrasellular GI'lar, jel filtrasyon, iyon değişim kromatografisi ve preparatif poliakrilamid jel elektroforezi gibi saflaştırma teknikleri ile homojen bir şekilde saflaştırılmışlardır. *Streptomyces spp.* türlerinin yanı sıra *Bacillus* türleri de GI üretmektedirler. *Candida utilis* (Wang vd., 1980) ve *Candida boidinii* (Vongsuvanlert ve Tani, 1988) gibi birkaç mayada da GI varlığı görülmüştür. Buğday tohumunda (Pubols vd., 1963) çimlenmiş arpada (Bartfay, 1960) GI'nın var olduğu gösterilmiştir.

1.6. GI'ların Endüstriyel Kullanım Alanları

GI'nın büyük bir ticari öneme sahip olmasından dolayı enzimin kullanımında geliştirilen birçok yöntem ve enzimi üreten birçok yeni organizma hakkındaki bilgi patentleşmiştir (Boguslawski ve Rynski, 1982; Hafner, 1985; Hafner ve Jackson, 1985; Iuzuka vd., 1971; Lee, 1976; Miles Laboratories Inc., 1972; Outtrup, 1974; Shieh, 1977; Weber, 1976). 1967 yılında ABD'de Clinton Corn Processing Co. tarafından glukozun fruktoza enzimatik izomerizasyonunun endüstriyel alanda ilk uygulaması yapılmıştır. 1974 yılında İmmobilize GI kullanılmaya başlanmıştır. GI, bugün fırıncılık, meşrubat, konserve yapımı ve şekerleme endüstrisinde en büyük pazar payına sahip olan enzimdir (Bhosale v.d., 1996). GI üreten ve ticari olarak önemli olan bir kaç organizma Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Ticari öneme sahip GI'ları üreten bazı mikroorganizmalar ve ürünlerinin (GI) ticari adları

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

1.6.1. Etanol Üretimi

Yenilenebilir ham maddelerden üretilen etanolün sıvı yakıtlara karşı artan küresel talebi karşılamak için kullanılması, yakılması sera gazı etkisine neden olmadığı için iyi bir alternatif oluşturmaktadır. Lignoselülozik ham maddenin % 10-40'ı, baskın kısmı ksiloz olmak üzere pentozlardan oluşmaktadır (Hahn-Hagerdal vd., 2001). GI, hemiselülozlardan etanol üretimindeki potansiyel uygulamaları sebebiyle endüstriyel açıdan artan bir ilgi görmektedir (Tükel ve Alagöz, 2008).

GI, glukoz ve ksilozun izomerizasyonunu katalizler. Enzimin bu özelliği, mayalar tarafından alkole fermente edilebilen ksilulozun ksilozdan üretilmesi için kullanılır. Yenilenebilir biyokütlelerin fermente olabildiği şekerlere ve sonrasında etanole biyolojik çevrimi, hızla tükenen fosil yakıtlar oldukça önemlidir. Biyoküteller, % 30 hemiselüloz % 40 selüloz ve % 30 lignin içermektedir. Biyokütellerden ekonomik olarak yararlanılabilmesi selüloz ve hemiselülozun glukoz ve ksiloza hidroliz olmasına ve sonra da mayalar tarafından etanole fermentasyonuna bağlıdır. Selülozun biyolojik çevrimi ile ilgili yapılan çok sayıda çalışma, lignoselülozun biyolojik çevriminin hızlı ve verimli olduğunu göstermiştir. Zira artıkların değerlendirilmesi ve hemiselüloz içeren biyokütelerde yararlanabilmek için hemiselülozun fermentasyonuna tüm dünyanın ilgisini çekmektedir (Wang vd., 1980). Ksilan, ksiloz ünitelerinin β -(1,4) bağlanmasıyla oluşur ve hemiselülozun ana birleşimidir. D-ksiloz üniteleri ksilanın enzimatik veya asidik yöntemlerle kolayca hidroliz edilmesiyle açığa çıkmaktadır. *Saccharomyces cerevisiae* gibi bazı mayalar heksozların etanole fermentasyonu verimli

şekilde sağlarlar, fakat D-ksilozu kullanamazlar. *Candida utilis*, *Candida sheatae*, *Pachysolen tannophilus* ve *Pichia stipitis* gibi bazı mayalar da oksidoredüktatif yollarla pentozlar üretebilirler. Ancak bu organizmaların fermentasyon oranları oldukça düşüktür. Ayrıca bu organizmaların oksijenli ortamda etanolü katabolize etmeleri ve düşük etanol toleransları ticari kullanımlarını sınırlamaktadır (Dupress vd., 1987). *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* ve *Candida tropicalis* gibi mayalar tarafından ksilozun etanole fermentasyon prosesinde ise ksiloz metabolik engel olarak görülmektedir.

Bu nedenle GI'nın kullanılmasıyla ksilozun ksiluloza izomerizasyonu sağlanmakta ve daha sonra ksiluloz etanole fermente edilmektedir (Chaing vd., 1981). Bugün bilimsel araştırmalar, GI geninin mayalara aktarılması ile ksilozun alkole kendiliğinden fermentasyonunun sağlanması çalışmaları üzerine yoğunlaşmaktadır.

1.6.2. HFCS Üretimi

Saf şekere talebin artması, üretim maliyetinin yüksek olması ve insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkisinin farkına varılmasıyla birlikte sakkaroz yerine kullanılacak başka kaynaklar araştırılması zorunlu hale gelmiştir. Karbohidrat içermeyen ve kalorisiz sakkarin, asesülfam-K, aspartam, siklamat ve taumatin gibi yapay tatlandırıcıların kullanımı sağlıkla ilgili problemlerin yaşanmasına neden oldukları için sınırlandırılmıştır. Aspartam depolanma süresini arttırmak için alkolsüz içeceklerde kullanılır ve düşük pH'da yavaş hidroliz olduğundan içeceklerde tatsızlığa neden olmaktadır. Taumatin protein yapısında bir tatlandırıcıdır, fakat ürünlerin tadında bozukluk meydana getirir. Sakkarinin ise epitelyum dokuda yapısal değişikliklere neden olduğu ve hamilelerde bebeğe geçip biriktiği belirlenmiştir. Son yıllarda çok sık kullanılan aspartamın aşırı tüketiminin beyin hasarı ve tümörlerine neden olduğu klinik çalışmalarla ortaya konulmuştur (Faiz, 2004).

HFCS, tamamen tatsız olan nişastadan elde edilen glukoz ve fruktozun dengede olduğu bir tatlandırıcıdır. Pek çok gıda ürünü ve meşrubatlarda şeker kamışı yerine kullanılabilen bir tatlandırıcıdır. Sakkaroz 1,3 kat, glukozdan ise 1,7 kat daha tatlıdır. Glukozun tatlandırma kapasitesi sakkaroz % 70-75'i kadarken, fruktozun tatlandırma

kapasitesi sakkarozun yaklaşık iki katıdır (Barker, 1976). Fruktoz, sakkarozdan daha tatlı olması yanında tadı, rengi, viskoziteyi ve hidroskopik özellikleri geliştirebilme yeteneğine sahiptir. Ayrıca metabolizmada glukozu göre daha yavaş emilir ve insülin müdahalesi olmaksızın metabolize edilir. Tüm bu özellikleri sebebiyle glukozun fruktoza izomerizasyonu endüstriyel açıdan çok önemlidir ve izomerizasyon yaygın olarak serbest ya da immobilize GI üzerinde çalışılmıştır. HFCS, diğer tatlandırıcı ürünlere göre pek çok avantajlara sahiptir. Tatlandırma güçleri dikkate alınarak yapılan bir karşılaştırmaya bakacak olursak HFCS sakkarozdan % 10-20 daha ucuzdur ve fruktozun emiliminin yavaş olması sebebiyle daha az kalorilidir. HFCS'nin diğer bir avantajı da, glukoz ve fruktozun sakkaroz ile kıyaslandığında daha iyi bir çözünürlüğe sahip oluşudur. Böylelikle kullanıldığı gıda ürünlerinde kristallenme daha az görülmektedir. Bu durum HFCS'nin şekerleme, reçel, dondurma, konserve ürünleri, fırıncılık, turşu ve birçok yiyecek ürünü üretiminde kullanımına yol açmıştır (Misset vd., 1991). İçeceklerde HFCS'nin yüksek tüketim oranı, birçok beslenme araştırmacısını HFCS ile tatlandırılmış ürün tüketimi ile obezite, diyabet veya benzer diğer kronik hastalıklar arasındaki olası ilişki üzerine odaklamıştır (Basciano vd., 2005; Bray vd., 2004). Son zamanlarda, gazlı içeceklerdeki HFCS'nin toksik ve kanserojen özellikli reaktif α -dikarbonil bileşiklerinin ana kaynağı olduğuna dair araştırmalar yapılmıştır. Ayrıca aynı araştırma ile tüketim ürünlerindeki reaktif α -dikarbonil bileşiklerinin konsantrasyonunun HFCS'nin saklama koşullarına ve üretildiği kaynağın farklılığına göre önemli ölçüde değiştiği bildirilmiştir (Lo vd., 2008).

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

Mezofilik organizmalardan elde edilen glukoz izomeraz, 55-65°C'de pH 7,5 ile 8,5 aralığında immobilize edilmiş bir şekilde kullanılmaktadır (Schenck, 2000). Bu şartlar sağlandığında enzim ile % 40-42 oranında fruktoz üretilebilmektedir. Endüstriyel alanlarda kullanılan HFCS'de % 55 oranında fruktoz üretimi istenmektedir. Bu nedenle oran kromatografik olarak % 55 seviyelerine getirilir. Ancak bu işlemde üretim maliyetini arttırmaktadır (Douglas vd., 1999). Yüksek sıcaklıklarda fruktoz glukoz dengesi fruktoz tarafına kaymakta böylelikle pahalı olan kromatografik saflaştırmaya gerek kalmamaktadır (Bhosale vd., 1996; Tewari ve Goldberg, 1984). Bu yüzden bu uygulamalarda yüksek sıcaklıklarda çalışan termofilik mikroorganizmalardan elde

edilen enzimler tercih edilmektedir (Hartley vd., 2000). Fakat yüksek pH ve yüksek sıcaklık uygulamaları, istenmeyen mannoz, psikoz ve diğer asidik yan ürünlerin oluşmasına sebep olduğu için düşük pH değerlerinde çalışan bir enzime ihtiyaç duyulmaktadır (Bucke, 1983). Bu nedenle bugüne kadar birçok termofilik ve asidik karakterli bakterilerin glukoz izomerazı araştırılmıştır (Bhosale vd., 1996).

Enzimler üzerinde mutasyonlar meydana getirilerek, enzimin özelliklerinin geliştirilmesi için araştırmalar yapılmıştır. Bu kapsamda, bölge özgün mutasyonlarla çeşitli mikroorganizmalara ait birçok glukoz izomerazın; termal kararlılığının artırılması, optimum pH değerinin düşürülmesi, substrat tercihinin değiştirilmesi, çeşitli amino asitlerin molekül içerisindeki fonksiyonunun belirlenmesi ve alt üniteler arasındaki etkileşimlerin ortaya çıkarılması gibi birçok endüstriyel ve bilimsel öneme sahip mutasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Bhosale vd.,1996).

Isıl kararlılığın artırılması amacıyla yapılan çalışmalarda; *C. thermosulfurogenes* ait GI enzimi üzerinde gerçekleştirilen W15R (15. amino asit olan triptofan, arjinine dönüştürülmüş) mutasyonu ile molekülün 80°C'deki termal kararlılığı (Meng vd., 1993) % 60, yarılanma ömrü ise % 30 arttırılmıştır (Quax vd., 1991).

Cha ve arkadaşları (1994) *Streptomyces rubiginosus* GI'sında His219 aminoasidi üzerinde bölge spesifik mutasyonlar yaparak bu aminoasidin enzimin aktivitesi ve ısıl kararlılığı üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Bu aminoasit neredeyse bütün GI'larda mevcuttur. Bu aminoasidin Ser, Glu ve Asn aminoasidleri ile değiştirilmesi sonucunda K_m değerinde 30-40 kat artış olmuştur. Isıl kararlılık çalışmaları sonucunda H219S ve H219N mutant enzimlerinin 5-8°C'de daha az kararlı oldukları ortaya çıkarken H219E ve H219K mutant enzimlerinin 13-24°C'de daha az kararlı olduğu bulunmuştur.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Deneyleerde Kullanılan Kimyasallar

Tripton (Fluka VCBN7396V), yeast ekstrakt (Merck VM445253224), NaCl (Sigma SZBE1470V), CaCl₂ (Sigma C5670), CoCl₂, MgSO₄ (Merck K45872982 441), D-Glukoz (Sigma SZBA1790V), D-Fruktoz (Bioshop 5D38250412), MOPS (Fisher Scientific 154054), lizozim (Bioshop 6C42679), perklorik asit (Merck C691919), sistein (Sigma SLBD2448V), karbozol (Sigma BCBP5577V), sülfirik asit (Merk K45905413 434), etil alkol (Smyras 305041016060), kanamisin (Fisher Scientific 134473), IPTG (Bioshop 6C42892), commassie brillant blue G-250 (Panreac 5M014937), commassie brillant blue R-250, fosforik asit (Carlo Erba 304062), BSA (NEB), DEAE-Sepharose (Sigma MKBT1646V), phenyl sepharose 6 Fast Flow (Sigma), amonyom sülfat (Merck A0296217 201), sodyum asetat (Merck AM0793468550), tris (Fisher Scientific 149456A), K₂HPO₄ (Merck A0435601 442), glisin (Fluka 50052), HCl (Sigma Aldrich 82670), NaOH (Applichem 8Z011622).

2.2. Deneyleerde Kullanılan Hücre ve Plazmitler

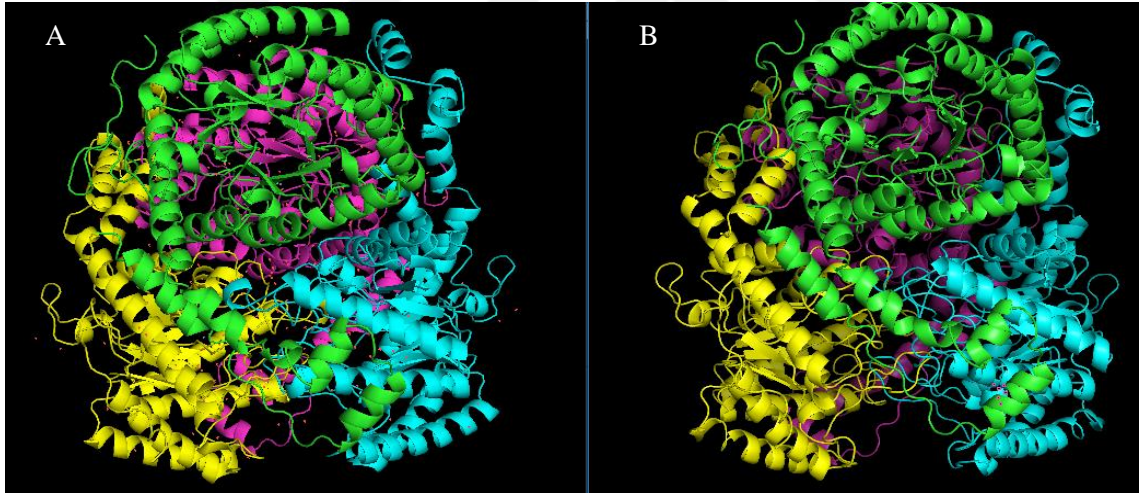
Termofilik bir bakteri olan *Anoxybacillus gonensis* G2^T bakterisi Glukoz izomeraz geninin kaynağı olarak kullanıldı. Çalışmalarımızda *A. gonensis* G2^T GI'nı kodlayan 1326 baz çiftlik *xyIA* geni pET28a(+) vektörü içerisinde klonlanarak plazmite pETG2GI ismi verilmiştir. pETG2GI, konak hücre olan *E. coli* BL21(DE3) suşu içerisinde aktarılarak ekspres edilmiştir. Bu sistem *E. coli* BL21(DE3)/ pETG2GI olarak isimlendirilmiş ve gerekli şekillerde stoklanmıştır. Yaptığımız mutasyon çalışmaları pETG2GI üzerinde içerisinde bulunan *xyIA* geni kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.3. Mutasyon Çalışmaları

2.3.1. Mutasyon Bölgelerinin Tasarlanması

Endüstriyel uygulamalarda enzimin maliyetini azaltmanın diğer bir yolu da enzimin ısı kararlılığını geliştirerek yarılanma ömrünü arttırmaktır. Reaksiyon şartlarında daha kararlı olan bir enzim endüstriyel uygulamalarda daha fazla tercih edilecektir. Bu nedenle çalışmalarımızda amacımız, *Anoxybacillus gonensis* G2^T glukoz izomerazının bölge spesifik mutasyonları ile kinetik, biyokimyasal parametrelerini geliştirmek, ısı kararlılığını ve yarılanma ömrünü arttırmaktır.

Anoxybacillus gonensis G2^T glukoz izomerazının üç boyutlu aminoasit yapısı ve *Geobacillus stearothermophilus* GI ile karşılaştırılmıştır. Şekil 2’de görüleceği üzere, enzimlerin göstermiş oldukları sekonder organizasyonlar birbirine benzemektedir.



Şekil 2. A) *Geobacillus stearothermophilus* glukoz izomerazı B) *Anoxybacillus gonensis* G2^T glukoz izomerazı

Birçok mezofilik ve termofilik karakterli GI'lara ait amino asit sıraları birbirleriyle ve *A. gonensis* GI'sı ile karşılaştırılarak aşağıdaki tablo hazırlanmıştır. GI'ların aminoasit dizilimi karşılaştırıldığında mevcut α -heliks ve β -levha tabakaların hangi amino asitlerden meydana geldikleri de belirlenmiştir.

Mutasyon noktalarında *A. gonensis* glukoz izomerazının mezofilik karakterli GI'lara benzediği görülecektir. Örneğin *A. gonensis* glukoz izomerazının 373'üncü

amino asidi glutamat ve 8 nolu α -heliks (H8) içerisinde bulunmaktadır. Bu noktada termofilik karakterli GI'lara bakılacak olursak enzimlerin hepsinde glutamat yerine lizin amino asidi bulunmaktadır. Mezofilik karakterli GI'larda ise bu bölgede çoğunlukla glutamat amino asidi bulunmaktadır. Açık bir şekilde görülmektedir ki, *A. gonensis* glukoz izomerazının 373'üncü amino asidi olan glutamat lisine dönüştürülmesi (E373K mutasyonu) enzimin termofilik karakterli GI'lara benzemesini sağlayacaktır. Aynı şekilde, 32. amino asit olan valinin izolösine olan mutasyonunun (V32I) enzimin termofilik karakterinde bir artışa neden olacağı görülmektedir. Bu şekilde tüm amino ait dizilimi incelenerek termal kararlılığı arttırabileceği hususunda kritik gördüğümüz 7 noktada (32, 33, 138, 144, 293, 373, 380. amino asitler) mutasyon çalışmaları yapılmıştır.

Tablo 3. *A. gonensis* GI'sında yapılması planlanan mutasyonların diğer mezofilik ve termofilik kaynaklı Tip 2 GI'ların amino asit sıraları ile karşılaştırılması (Hartley v.d., 2000)

<i>A. gonensis</i> G2 ^T GI'da hedeflenen mutasyon noktaları	Mezofilik Tip2 GI'lar											Termofilik Tip2 GI'lar							Proteinin Sekonder organizasyon yapıları (α -heliks ve β levha tabakalar)		
	<i>B. subtilis</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>H. influenzae</i>	<i>L. lactis</i>	<i>R. flavefaciens</i>	<i>T. halophilus</i>	<i>S. xylosoy</i>	<i>L. pentostus</i>	<i>L. brevis</i>	<i>A. gonensis</i> G2 ^T	<i>C. thermosulfurogenes</i>	<i>T. saccharolyticum</i>	<i>C. thermohydrosulfuricum</i>	<i>C. thermosaccharolyticum</i>	<i>T. aquaticus</i>		<i>T. neopalitana</i>	<i>T. maritima</i>
V32I	I	V	V	V	V	I	V	I	I	L	I	V	I	I	I	I	I	I	I	I	B
G33D	G	G	G	L	L	L	A	N	M	G	G	M	G	D	D	D	D	D	D	D	B3
N138G	N	N	N	G	G	G	N	G	N	N	N	N	N	G	G	G	G	G	G	G	B3
T144S	T	T	T	T	T	T	S	D	T	T	T	T	S	S	S	S	S	S	S	S	B7
V293I	V	V	I	V	V	I	I	I	L	V	L	V	I	I	I	I	I	I	I	I	B7
E373K	E	E	E	E	E	Q	E	E	D	E	Q	E	K	K	K	K	K	K	K	K	H8
V380I	V	V	V	R	R	I	I	F	I	I	L	V	F	F	F	F	F	F	F	F	H9

2.3.2. Primerlerin Tasarlanması

Spesifik mutasyon primerlerin tasarlanması, mutasyon bölgesine yönelik biri ileri diğeri geri, en az 25-30 bazlık iki primere ihtiyaç vardır. Değiştirilecek amino asidi kodlayan dizi primerin tam ortasına denk gelmelidir. Mutasyon noktalarındaki amino asidi kodlayan sıraların konak hücrenin (*E. coli* BL21(DE3)) kodon kullanımına göre tercih edilmesi gereklidir.

	Codon	Amino acid ²	% ³	Ratio ⁴	Codon	Amino acid	%	Ratio	Codon	Amino acid	%	Ratio	Codon	Amino acid	%	Ratio	
U	UUU	Phe (F)	1.9	0.51	UCU	Ser (S)	1.1	0.19	UAU	Tyr (Y)	1.6	0.53	UGU	Cys (C)	0.4	0.43	U
	UUC	Phe (F)	1.8	0.49	UCC	Ser (S)	1.0	0.17	UAC	Tyr (Y)	1.4	0.47	UGC	Cys (C)	0.6	0.57	C
	UUA	Leu (L)	1.0	0.11	UCA	Ser (S)	0.7	0.12	UAA	STOP	0.2	0.62	UGA	STOP	0.1	0.30	A
	UUG	Leu (L)	1.1	0.11	UCG	Ser (S)	0.8	0.13	UAG	STOP	0.03	0.09	UGG	Trp (W)	1.4	1.00	G
C	CUU	Leu (L)	1.0	0.10	CCU	Pro (P)	0.7	0.16	CAU	His (H)	1.2	0.52	CGU	Arg (R)	2.4	0.42	U
	CUC	Leu (L)	0.9	0.10	CCC	Pro (P)	0.4	0.10	CAC	His (H)	1.1	0.48	CGC	Arg (R)	2.2	0.37	C
	CUA	Leu (L)	0.3	0.03	CCA	Pro (P)	0.8	0.20	CAA	Gln (Q)	1.3	0.31	CGA	Arg (R)	0.3	0.05	A
	CUG	Leu (L)	5.2	0.55	CCG	Pro (P)	2.4	0.55	CAG	Gln (Q)	2.9	0.69	CGG	Arg (R)	0.5	0.08	G
A	AUU	Ile (I)	2.7	0.47	ACU	Thr (T)	1.2	0.21	AAU	Asn (N)	1.6	0.39	AGU	Ser (S)	0.7	0.13	U
	AUC	Ile (I)	2.7	0.46	ACC	Thr (T)	2.4	0.43	AAC	Asn (N)	2.6	0.61	AGC	Ser (S)	1.5	0.27	C
	AUA	Ile (I)	0.4	0.07	ACA	Thr (T)	0.1	0.30	AAA	Lys (K)	3.8	0.76	AGA	Arg (R)	0.2	0.04	A
	AUG	Met (M)	2.6	1.00	ACG	Thr (T)	1.3	0.23	AAG	Lys (K)	1.2	0.24	AGG	Arg (R)	0.2	0.03	G
G	GUU	Val (V)	2.0	0.29	GCU	Ala (A)	1.8	0.19	GAU	Asp (D)	3.3	0.59	GGU	Gly (G)	2.8	0.38	U
	GUC	Val (V)	1.4	0.20	GCC	Ala (A)	2.3	0.25	GAC	Asp (D)	2.3	0.41	GGC	Gly (G)	3.0	0.40	C
	GUA	Val (V)	1.2	0.17	GCA	Ala (A)	2.1	0.22	GAA	Glu (E)	4.4	0.70	GGA	Gly (G)	0.7	0.09	A
	GUG	Val (V)	2.4	0.34	GCG	Ala (A)	3.2	0.34	GAG	Glu (E)	1.9	0.30	GGG	Gly (G)	0.9	0.13	G

Şekil 3. *E.coli* genlerinin üretilmesinde tercih edilen kodon kullanımı (Maloy,vd., 1996)

İzolösün (Ile (I)) aminoasidi AUU, AUC ve AUA olarak 3 farklı kodla kodlanmaktadır. Fakat *E.coli* bakterisinin kodon tercihi AUU (0,47) ve AUC (0,46) olarak görülmektedir. Baz dizilimi olarak düşünürsek mutasyon yapılacak olan GTC'nin ATT veya ATC nükleotid dizilerine değiştirilmesi gereklidir. Tek bir bazın değiştiği ATC bu örneğimiz için hem kodon kullanımı açısından hem de daha az noktada baz değişimi yapılması açısından en uygun seçenektir. Tasarlanan primerler aşağıdaki tabloda listelenmiştir.

Tablo 4. Mutasyon primerleri

Adı	DNA Sırası 5'-3'	Nt	Tm	PCR Tm
AGI-N138G-F	CCAAGTTGCTTTGGGGTACAGCTAATTTATTTAC	34	59,6	58
AGI-N138G-R	GTAATAAATTAGCTGTACCCCAAAGCAACTTGG	34	59,6	58
AGI-G33D-F	CCGGAAGAAAAAATCGATGATAAAAACGATGG	31	58,5	57
AGI-G33D-R	CCATCGTTTTATCATCGATTTTTTCTTCCGG	31	58,5	57
AGI-T144S-F	CAGCTAATTTATTTAGCCATCCTCGTTTTG	30	56,9	55
AGI-T144S-R	CAAAACGAGGATGGCTAAATAAATTAGCTG	30	56,9	55
AGI-V293I-F	GGAATGCTCGGTTGATCGATGCCAACCAAGG	32	67	62
AGI-V293I-R	CCTTGGTTGGCATCGATCGAACCGAGCATTCC	32	67	62
AGI-V32I-F	CCGGAAGAAAAAATCGGGGATAAAAACG	27	58,9	57
AGI-V32I-R	CGTTTTATCCCCGATTTTTTCTTCCGG	27	58,9	57
AGI-E373K-F	GGCGTATCGTTAAATTAAGATCGTGTGTTGAATC	36	59,3	58
AGI-E373K-R	GATTCAAACACAGATCTTTAATTAACGATACGCC	36	59,3	58
AGI-V380I-F	CGTGTGTTGAATCAATTGTTGAGGAACTCGCG	33	62,9	60
AGI-V380I-R	CGCGAGTTCCTCAACAATTGATTCAAACACACG	33	62,9	60

2.3.3. Plazmit İzolasyonu

Enzimi üretecek olan vektör pETG2GI 10 ml LB besiyerinde 1 gece 37°C inkübe edildi. Mutasyonların gerçekleştirileceği PCR reaksiyonunda kalıp DNA olarak kullanılacak olan pETG2GI'nın, (*A. gonensis* glukoz izomeraz enzimini kodlayan geni taşıyan pET28a(+)) ekspresyon vektörü) mutant plazmitlerin ve diğer tüm plazmitlerin buldukları hücreden izolasyonları PureYield™ Plasmid Miniprep System plazmit izolasyon kiti kullanılarak ve üretici firmanın önerdiği protokol takip edilerek gerçekleştirildi. Protokol aşağıda verilmiştir.

- pETG2GI kültüründen ependorf tüplerinde 11000 g'de 30 sn santrifüj yapıldı.(iki kez tekrarlandı)
- Sıvı kısım döküldü, üzerine A1 solisyonundan 250 µl eklendi ve pipet ucuyla karıştırıldı.
- Üzerine A2 solisyonundan 250 µl eklendi ve yavaşca 10 kez alt üst edildi.
- 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- Üzerine A3 solisyonunda 300 µl eklendi 10 kez alt üst yapıldı.
- 11000 g'de 10 dk santrifüj yapıldı.
- Sıvı kısım kitin filitreli tüplerine alındı 11000 g'de 1 dk santrifüj yapıldı.
- Filtreli tüpün altındaki sıvı dökülür üzerine 500 µl AW solisyonundan eklendi ve 11000 g'de 2 dk santrifüj yapıldı.
- Üzerine A4 solisyonundan 600 µl eklendi 11000 g'de 1dk santrifüj yapıldı.
- Alt kısımdaki sıvı dökülür tekrar 11000 g'de 2dk santrifüj yapıldı.
- Filtreli tüpün üst kısmı steril ependorf içine yerleştirilir ve üzerine 50 µl AE solisyonu eklendi 2 dk odasıcaklığında bekletildikten sonra 11000 g'de 1 dk santrifüj yapıldı.
- İzolasyon sonrası elde edilen Plazmiti % 1' lik agaroz jel elektroforezinde yürütülüp görüntülendi.

2.3.4. Long PCR

Mutasyon çalışmalarında kalıp DNA olarak kullanılacak olan pETG2GI Taq DNA polimeraz ile çoğaltılması mümkün değildir. Çünkü Taq DNA polimeraz sentez aşamasında yaklaşık 1000 bazda 1 hata yapar ve doğruluğu çok düşüktür. Bu yüzden PCR’de Taq DNA polimeraz yerine 25 kb’a kadar zincir sentezleyebilen yüksek doğruluğa sahip bir DNA polimeraz enzimi kullanıldı. Long-PCR reaksiyonu “Phusion High-Fidelity DNA polymerase” (Thermo Scientific) kullanıldı. Mutasyonlar, mutasyon primerleri ile pETG2GI’nın kalıp DNA olarak kullanıldığı PCR’de son hacim 50 µl olacak şekilde çoğaltıldı. PCR şartları aşağıdaki gibidir.

- Enzim 0,5 µl
- Buffer 10 µl
- dNTP 5 µl
- Primer (ileri ve geri) 1 µl
- dH₂O 31,5 µl
- DNA 1 µl

PCR döngü şartları;

- 98°C’de 2 dakika
 - 98°C’de 30 saniye
 - 41°C’de 20 saniye
 - 72°C’de 3 dakika 30 saniye
 - 98°C’de 20 saniye
 - 52°C’de 20 saniye
 - 72°C’de 3 dakika 2 saniye
 - 72°C’de 10 dakika
 - 12°C’de ∞
- 1.döngü : 10 kez
2. döngü: 30 kez

Şeklinde belirlenerek uygulandı.

2.3.5. *DpnI* Kesim Reaksiyonu

Long-PCR ile pETG2GI'dan sentezlenen yeni zincirler metillenmemiştir. Fakat kalıp DNA olarak kullanılan pETG2GI'nın hücreden izole edildiği için metillidir. PCR sırasında vektörün her iki zinciri de kalıp olarak kullanılmaktadır. PCR reaksiyonu sonrasında tüp içerisinde bulunan pETG2GI'ya ait zincirlerin ortamdaki uzaklaştırılması gereklidir. Bunu sağlamak için ise PCR ürünü *DpnI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilmelidir. *DpnI* enzimi GATC dizisini tanıdığı yerden A'nin metillenmiş halini keser. Dolayısıyla kesim reaksiyonu sonucunda, PCR ürünü içerisindeki pETG2GI'ya ait tüm zincirler parçalanarak ortamdaki uzaklaştırılır. Geriye sadece mutasyon noktalarını taşıyan yeni sentezlenmiş zincirler kalır. Daha sonra PCR ürünü son hacim 50 µl olacak şekilde *DpnI* (New England Biolabs) enzimi ile 37°C'de 2 saatlik bir reaksiyon sonucunda kesim gerçekleştirildi. Kesim şartları aşağıda verilmiştir.

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

Kesim reaksiyonu 37°C'de 30 dakika inkübasyon tamamlandıktan sonra 80°C'de 20 dakika inkübe edilerek *DpnI* enzimi denatüre edildi. Reaksiyon sonrası kesim ürünü herhangi bir ligasyon işlemine tabi tutulmaksızın doğrudan CaCl₂ transformasyon metodu ile *E. coli* DH5α suşuna aktarılma işlemine geçildi.

2.3.6. Transformasyon Reaksiyonu

E. coli DH5α suşu 10 ml LB besiyeri içerisinde ekilerek 1 gece boyunca 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası bu kültürden OD'si 0,1 olacak şekilde taze LB besiyerine ekim yapılarak OD değeri 0,45-0,55 oluncaya kadar 1 saat 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler steril kabin içerisinde falkon tüplere alındı. 4400 rpm'de 5 dakika çöktürülerek sıvı kısım döküldü. Hücreler üzerine 10 ml 0,1 M soğuk CaCl₂ ilave edilerek en düşük seviyede vortekslendi ve 30 dakika buz üzerinde bekletildi. Hücreler süre sonunda tekrar 4400 rpm'de 5 dakika çöktürülerek sıvı kısım döküldü. Üzerine 2 ml 0,1 M soğuk CaCl₂ ilave edilerek en az 2 saat +4°C'de

(buzdolabında) inkübe edildi. Böylelikle *E.coli* DH5 α suşu kompetent hale getirilmiş oldu.

Steril kabin içerisinde santrifüj tüplerine, 200 μ l *E.coli* DH5 α kompetent hücre koyulduktan sonra üzerine sırasıyla 5, 10, 15, 20 μ l pETG2GI ilave edilerek karışım en az 30 dk buz üzerinde bekletildi. Daha sonra tüpler 43°C’de 1,5 dk inkübe edilerek hücreler sıcak şokuna uğratıldı. Hücrelerin üzerine 200 μ l LB besi yeri ilave edilerek 37°C’de 2 saat boyunca inkübe edildi. Böylelikle pETG2GI’nın *E. coli* DH5 α suşu içerisine transformasyonu tamamlanmış oldu. Süre sonunda hücreler 0,05 mg/ml kanamisinli katı LB agar besiyeri üzerine yayma ekimle ekilerek bir gece boyunca 37°C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası oluşan kolonilerin her birinden kültür atıldı ve plazmit izolasyon kiti ile izolasyonu yapıldı.

pET vektör sistemleri T7 promotoruna sahip olduğu için T7 RNA polimeraz enzimine sahip konak hücrelerde çalışabilmektedirler. Dolayısı ile *E.coli* DH5 α içerisinde bulunan mutant plazmitler, plazmit izolasyonu ile izole edilerek CaCl₂ transformasyon yöntemi ile *E.coli* BL21(DE3) suşuna aktarıldı. Transformasyon sonrası hücreler kanamisinli LB katı agar besiyerine ekilerek 1 gece 37°C’de büyütüldü. Burada büyüyen kolonilerden sıvı besiyerine ekim yapıldı. Çizgi ekim ve gliserol stok hazırlandı ve plazmit izolasyonu yapıldı. İzole edilen plazmitler sekansa gönderilerek ilgili mutasyonların olup olmadığı araştırıldı.

2.4. Enzimlerin Saflaştırılmaları

A. gonensis G2^T *xylA*’nın kodladığı orijinal enzim (AgoG2GI-yt) ve *E.coli* BL21/pETG2GI sistemi ile üretilen pETG2GI vektöründen üretilen tüm mutant enzimlerin saflaştırılmasında kolon kromatografi yöntemleri kullanıldı. Bu teknikte; ısı bozunumu, amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişimi ve hidrofobik kolon kromatografisi aşamalarına yer verildi.

2.4.1. Enzim Üretimi

2.4.1.1 AgoGI'nin Üretimi

Steril kabin içerisinde katı besiyerinden alınan *A.gonensis* G2^T bakterisi 60 ml kanamisinli LB besiyerine ekim yapıldı ve 37°C'de bir gün büyütüldü. Bu kültürden, 2 litrelik bir erlen içerisine 400 ml LB besiyerine OD'si 0,1 olacak şekilde taze ekim yapıldı. Yaklaşık hücreler bir saat kadar 37°C'de OD'si 0,6-0,8 oluncaya kadar büyütülmeye bırakıldı. Hücrelerin OD değeri 0,6-0,8 olunca kültüre filtrasyon ile steril edilmiş IPTG ilave edilerek hücreler, glukoz izomeraz üretmek üzere uyarıldılar. IPTG eklendikten sonra 37°C'de 4 saat kadar büyütülen hücreler 50 ml falkon tüplerde 6000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Bu yöntem ile hücre pelleti elde edildi. Çöken hücreler pH'sı 6,5 olan 1 mM CoCl₂ ve 10 mM MgSO₄ içeren 100 mM MOPS tamponundan 2 ml ilave edilerek vortek yapıldı. 1 µg/ml lizozim ilave edilerek 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Daha sonra Sonics-Vibra cell marka sonikatör cihazı kullanılarak % 20 güçte 1 döngü aralığında 2 dakika süre ile hücreler patlatıldı. 14.800 rpm de 15 dk santrifüj edildi. Pellet kısmı atılarak sıvı kısmı hücre özütü ayrıldı ve saflaştırma işlemlerine devam edildi.

2.4.1.2. Mutant Enzimlerin Üretimi

Mutant enzimlerin kültüründen sıvı LB besiyerine OD' si 0,1 olacak şekilde taze kültür ekildi. Taze kültürden 2 litrelik bir erlen içerisine 400 ml LB besiyerine OD'si 0,6-0,8 oluncaya kadar büyütüldü. 1 mM IPTG ile uyarıldı ve 4 saat sonra kültür 6000 rpm'de 5 dk santrifüj yapılarak çöktürüldü. Çöken hücreler pH'sı 6,5 olan 1 mM CoCl₂ ve 10 mM MgSO₄ içeren 100 mM MOPS tamponundan ilave edilerek vortekslendi. 1 µg/ml lizozim ilave edilerek 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Sonikatörle 2 dk patlatıldı ve elde edilen hücre özütü 14.800 rpm de 15 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant kısmı alınarak saflaştırma işlemlerine geçildi.

2.4.2. Isı Şoku Uygulaması

AgoG2GI oldukça termofilik karakterli bir enzimdir. *E.coli* BL21/pETG2GI sistemi ile üretilen mutant enzimlerde termofilik karakter taşımaktadır. Elde edilen hücre özütündeki AgoGI haricindeki proteinlerin çok büyük bir bölümü mezofilik karakterde olduklarından dolayı kısa süreli bir ısı şoku uygulandığında proteinlerin çoğu denatüre olmaktadır. Termofilik karakterli AgoGI enzimimiz ise ısı şoku uygulamasından etkilenmemektedir. Saflaştırmanın ilk adımı olarak 70°C’de 15 dakika ısı şoku uygulandı. Isı şoku sonrası denatüre olan tüm proteinler 14.800 rpm’de 15 dk santrifüj edilerek çöktürüldü ve süpernatant kısmı alındı. Gerekli hesaplamalar yapıldıktan sonra iyon değişim kromatografisi için enzim özütü olarak kullanıldı.

2.4.3. İyon Değişim Kromatografisi

İyon değişim kromatografisi için 30 cm uzunluğunda ve 1,5 cm çapında bir kolon kullanıldı. Kolon malzemesi olarak DEAE-Sepharose Fast Flow (Sigma) kullanıldı. Kolon malzemesi ve deneyde kullanılan bütün tamponların vakum pompası (KNF) kullanılarak gazları alındı. Gazı alınmış olan kolon malzemesi pastör pipeti yardımıyla yavaş bir şekilde kolona dolduruldu. Doldurma işleminden sonra kolondan 100 ml saf su geçirilerek temizlendi. Daha sonra kolonu dengeye getirmek için 100 ml 1 mM CoCl₂ ve 10 mM MgSO₄ içeren 100 mM MOPS (pH 6,5) tamponu kolondan geçirildi. Sonrasında kolondan çıkan tamponun pH’sı ölçülerek 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; 50 ml kolonun dengeye getirilmesi, 20 ml enzim özütünün kolona aktarılması, 20 ml tutunmayan proteinlerin temizlenmesi, 100 ml (0-0,6 M) NaCl gradient köprüsü, 20 ml 1 M NaCl ile kolonun temizlenmesi.

Isı şoku uygulaması sonrası elde edilen enzim özütü kolona yüklenerek, kolona tutunmayan proteinlerin kolondan uzaklaştırılması için 20 ml kadar tampon kolondan geçirildi. Daha sonra kolonun NaCl konsantrasyonu sıfırdan başlayarak 0,6 molara

kadar yükseltildi. Bunun için cihazdan 100 ml daha 0-0,6 M NaCl gradient karışımı geçirildi. Kolonun akış hızı 1 ml/dk olacak şekilde ayarlandı. Kolondan çıkan fraksiyonlar 3 ml olacak şekilde cam tüpler içerisinde toplandı. Fraksiyonlardaki protein miktarı 280 nm dalga boyundaki absorban ölçümleri belirlendi. Ayrıca tüm fraksiyonlarda glukoz izomeras aktivitesine bakıldı. 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.

2.4.4. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi

Hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi için 30 cm uzunluğundaki ve 1,5 cm çapındaki bir kolon kullanıldı. Kolon malzemesi olarak Phenyl Sepharose 6 (Sigma) Fast Flow kullanıldı. Kolon malzemesinin gazı vakum pompası (KNF) ile alındı ve sonra bir pastör pipeti kullanılarak kolona dikkatli bir şekilde dolduruldu. Kolonu dengeye getirmek için 100 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 değişim kromatografisinden elde edilen enzim özütü ise 2,6 M amonyum sülfat içeren tampon ile bire bir oranında seyreltildi ve enzimin amonyum sülfat içeriğinin 1,3 M olması sağlandı. Cihazda şu şekilde bir program yazılarak kromatografi gerçekleştirildi; 50 ml kolonun dengeye getirilmesi, 20 ml enzim özütünün kolona aktarılması, 20 ml tutunmayan proteinlerin temizlenmesi, 100 ml amonyum sülfat gradient köprüsü(1,3 M-0 M), 20 ml tampon ile kolonun temizlenmesi.

Enzim özütü yüklenerek yüksek amonyum sülfat konsantrasyonunda proteinler hidrofobik kolon malzemesine bağlanması sağlandı. Daha sonra kolonun amonyum sülfat içeriği 1,3 M'den 0 M'ye düşürüldü. Bunun için 1,3 M-0 M 100 ml amonyum sülfat gradient köprüsü kullanıldı. Tamponun akış hızı 1 ml/dk olarak ayarlandı ve kolondan çıkan fraksiyonlar cam tüpler içerisinde 3 ml olacak şekilde toplandı. Fraksiyonlardaki protein miktarı 280 nm dalga boyunda absorban yapılan ölçümler

sonucu belirlendi. Ayrıca tüm fraksiyonlarda glukoz izomeraz aktivitesine bakıldı. GI aktivitesi bulunan fraksiyonlar bir araya toplandı. Bir araya getirilen enzim solüsyonu ile saflaştırma tablosu için gerekli olan analizler (GI aktivitesi, protein miktarı, total hacim vb.) yapıldıktan sonra karakterizasyon çalışmaları başlatıldı.

2.5. Biyokimyasal Çalışmalar

2.5.1. Protein Miktarı Tayini

Yapılan bütün çalışmalarda protein miktarının tayini Bradford'un (1976) geliştirmiş olduğu metoda göre gerçekleştirildi. 1000 ml boya çözeltisi hazırlamak için 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 50 ml % 95'lik etanol içerisinde iyice çözüldükten sonra üzerine 100 ml % 85'lik fosforik asit yavaş bir şekilde ilave edildi ve 1000 ml'ye saf su ile tamamlandı. Hazırlanan çözelti filtre kâğıdından süzülerek temizlendi. Hazırlanan kalibrasyon eğrisinde standart olarak bovin serum albumin (BSA) kullanıldı. Kalibrasyon eğrisi için; 1, 2, 4, 8, 15, 30, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500 µg BSA içeren çözeltiler 0,15 M'lık NaCl ile 100 µl'ye tamamlandı. Ardından üzerine 5 ml yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan boya çözeltisinden ilave edildi ve vortekslenerek 15 dakika oda sıcaklığında beklemeye bırakıldı. Xmark Microplate Spectrophotometer (BioRad) cihazı ile 595 nm'de standart kalibrasyon eğrisi oluşturuldu.

Örnekler için BSA yerinine 2, 4, 8, 15, 30, 50 µl hücre ekstratı kullanılarak aynı işlemler gerçekleştirildi. Süre sonunda 595 nm'de ölçümler yapıldı ve protein miktarı µg/µl cinsinden hesaplandı.

2.5.2. Glukoz İzomeraz Aktivite Deneyi

Yapılan çalışmalarda fruktoz miktarı tayini Seliwanoff metodu kullanıldı. 1000 ml seliwanoff çözeltisi hazırlamak için % 0,05 (w/v) 1 g resorcinol 330 ml 3 N HCl içerisinde çözüldü ve saf suyla tamamlandı. Reaksiyon değişik miktarlarda enzim özütü kullanılarak 25 µl 500 mM glukoz, pH'sı 6,5 olan 100 mM MOPS tamponu içerisinde son hacim 250 µl olacak şekilde tamamlandı ve 85°C'de 30 dakika TS-100C (Biosan) termoshecer cihazında 1000 rpm'de inkübe edildi. Reaksiyon, inkübasyon süresi

sonunda örnekler buz üzerine alınarak sonlandırıldı. Reaksiyon çözeltilerinden yeni tüplere 50 µl alındı. Üzerlerine 600 µl Seliwanoff çözeltisi eklendi ve vorteks yapıldıktan sonra 80°C’de 40 dk inkübe edildi (Schenk, v.d.,1998). İnkübasyon süresi bitince örnekler buza alındı soğuduktan sonra Xmark Microplate Spectrophotometer (BioRad) cihazı kullanılarak 480 nm dalga boyunda ölçümler yapıldı. Fruktoz miktarı hazırlanan fruktoz kalibrasyon eğrisine göre hesaplandı. Enzim aktivitesi reaksiyon sonrası oluşan fruktoz miktarına göre µmol/dk cinsinden hesaplandı.

2.5.3. Optimum Sıcaklık

A. gonensis glukoz izomerazının ve mutasyon enzimlerin en iyi çalıştığı optimum sıcaklık değeri 50 mM glukoz varlığında pH’sı 6,5 olan MOPS (100 mM MOPS, 10 mM MgSO₄, 1 mM CoCl₂) tamponunda gerçekleştirildi. Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklığı belirlemek amacıyla reaksiyonlar 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ve 100°C’lerde gerçekleştirildi. Reaksiyonlar 5 µl enzim özütü ile substrat olarak 500 mM glukoz ve son hacmi 250 µl olacak şekilde MOPS tamponuyla tamamlandı. Elde edilen veriler kullanılarak çizilen sıcaklık grafiğine göre GI için optimum sıcaklık değeri belirlendi.

2.5.4. Optimum pH

Enzim aktivitesine pH’nın etkisini incelemek amacıyla farklı pH aralıklarındaki tamponları kullanılarak, 85°C’de aktivite tayinleri yapıldı. Glukoz izomeraz aktivitesine pH’nın etkisi için hazırlanan tamponlar, 100 mM Sodyum asetat tamponu pH (5-5,5); 100 mM mops tamponu pH (6- 6,5-7-7,5); 100 mM Tris-HCl tamponu pH (8-8,5- 9); 100 mM glisin tamponu pH (9,5-10) değerlerinde 500 mM glukoz konsantrasyonunda 85°C’de 30 dakikalık reaksiyon şartlarında incelendi. Elde edilen veriler kullanılarak çizilen pH grafiğine göre GI için optimum pH değeri belirlendi.

2.6. Enzimlerin Kinetik Parametreleri

Protein konsantrasyonu sabit tutularak, 0-1000 mM konsantrasyonda glukoz, pH'sı 6,5 olan MOPS tamponu ile tamamlandı ve 85°C'de aktivite tayinleri yapıldı. Enzimlerin kinetik parametrelerini hesaplayabilmek için 0-1000 mM a kadar arttırılan glukoz konsantrasyonu ile yukarıda belirlenen sıcaklık ve pH'larda bir seri reaksiyon gerçekleştirildi. Glukoz izomeras aktivitesi açığa çıkan fruktoz miktarının belirlenmesi ile hesaplandı. Ölçümler sırasında aynı derişimde glukoz içeren körler kullanıldı. Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerleri OriginPro 8.1 isimli analiz programı kullanılarak çizilen Michaelis-Menten eğrisi ile belirlendi.

2.7. Mutasyonların Isıl Kararlılığı Üzerine Etkisi

Yapılmış olan bu mutasyonların ve *A. gonensis* G2^T GI'sının ısı kararlılığı üzerine etkisini belirlemek için saflaştırılan enzim özütleri 60°C'de inkübe edildi. Belirlenen gün aralıklarında bu örneklerden enzim alınarak, optimum çalışma şartlarında 500 mM glukoz pH 6,5 olan MOPS tamponunda 250 µl son hacimde ve 85°C'de 30 dk boyunca pH 6,5 olan MOPS tamponunda reaksiyon gerçekleştirildi. Reaksiyon sonrası GI aktivite ölçümü yapıldı ve enzimin kalan aktivitesi hesaplandı.

2.8. SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE)

SDS-PAGE, protein ve nükleik asitler gibi yüklü taneciklerin belirli bir pH'da elektriksel bir alanda moleköl büyüklüğü ve saflaştırılmasında yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Ham enzim özütünde ve saf enzim eluatında GI enziminin varlığı doğal poliakrilamid jel elektrofrezisi ile ortaya konulduktan sonra sodyum dodesil sülfat (SDS) poliakrilamid jel elektrofrezisiyle ilgili proteinin moleköl ağırlığı ve farklı alt birim içerip içermediği belirlenmeye çalışıldı. SDS poliakrilamid jel elektrofrezisi % 12'lik ayırma jeli ve yükleme jeli kullanılarak gerçekleştirildi. SDS poliakrilamid jel hazırlanmasında kullanılan maddeler tablo 5'de verilmiştir.

Tablo 5. Doğal poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler

Bileşenler	Ayırma jeli (5 ml % 12'lik)	Yükleme jeli
H ₂ O	1600 µl	1400 µl
% 30 Akrilamid	2000 µl	330 µl
1,5 M Tris -HCl, pH 8,8	1800 µl	-
1 M Tris -HCl, pH 6,8	-	250µl
% 10'luk SDS	50 µl	20 µl
% 10 Amonyum persülfat	50 µl	20 µl
TEMED	2 µl	2 µl

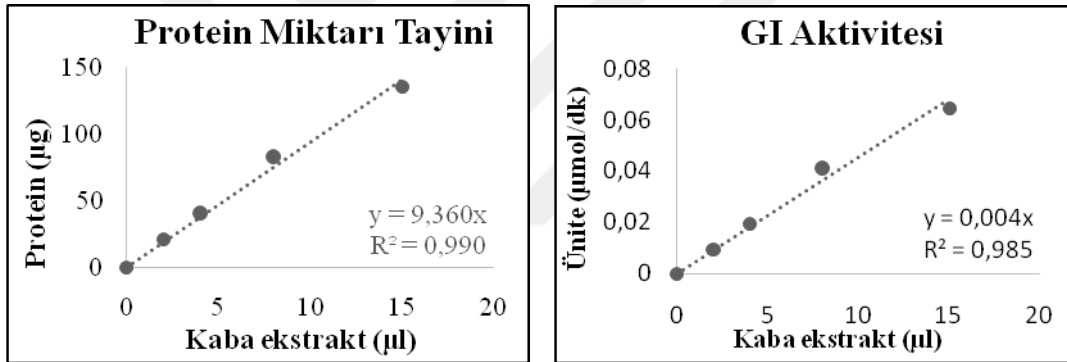
Jel hazırlandıktan sonra elektroforez tankına yerleştirildi ve tank SDS yürütme tamponu (7,2 gr glisin 1,5 gr tris base, 500 ml saf su, 5 ml % 10'luk SDS) ile dolduruldu. Yükleme yapılacak örneklerden 25 µl ependorf tüplerine koyuldu üzerine hazırlanan yürütme boyasından (400 µl % 10'luk SDS, 150 µl TrisHCl, 250 µl gliserol, 60 µl β-merkaptoetanol, 140 µl bromofenol blue) 15 µl ilave edilip hafifce karıştırıldı. 95 °C'de 5 dk inkübe edildi. Örneklerden 20 µl alınarak yükleme yapıldı. Daha sonra güç kaynağı çalıştırılarak 50 mA, 110 V, 100 W'da ayarlanıp 1,5 saat yürütüldü. Elektrik akımı kesildikten sonra jel sistemden dikkatlice çıkarıldı ve boyama işlemine geçildi. Örneklerdeki protein bantlarının gözlenebilmesi için jel, Coomassie Brilliant Blue G - 250 boyama çözeltisi içinde 1 saat bekletildi. Jelden boyanın uzaklaşması için yıkama solüsyonu (50 ml metanol, 100 ml asetik asit, 40 ml saf su) dökülerek 1 saat karanlıkta bekletildi. Yıkama solüsyonu 2' den (8 ml metanol, 10 ml asetik asit, 82 ml saf su) dökülerek 16-20 saat karanlık ortamda bekletildi.

3. BULGULAR

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

3.1.1. Kaba Ekstrakt

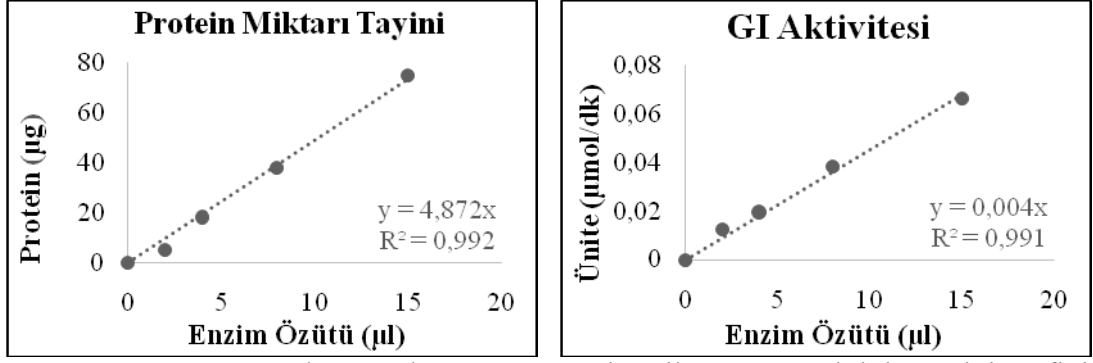
AgoGI'ya ait kaba ekstraktın protein miktarı 9,3601 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olarak hesaplandı. GI aktivitesini hesaplamak için enzim 20 kat sulandırılarak reaksiyonlar gerçekleştirildi. Enzim tarafından üretilen fruktoz miktarı çok yoğun olduğundan spektrofotometrenin okuma aralığını geçmektedir. 20 kat seyreltilen enzimle reaksiyonlar gerçekleştirilip elde edilen değerin 20 ile çarpılarak enzimin 1 μl 'sinin ürettiği fruktoz miktarı hesaplandı. Kaba ekstraktın GI aktivitesi $0,0045 \times 20 = 0,09 \mu\text{mol}/\text{dk}$ (Ünite) olarak hesaplandı.



Şekil 4. AgoGI' nın kaba ekstraktın protein miktarı ve GI aktivite tayini grafiği

3.1.2. Isı Şoku Uygulaması

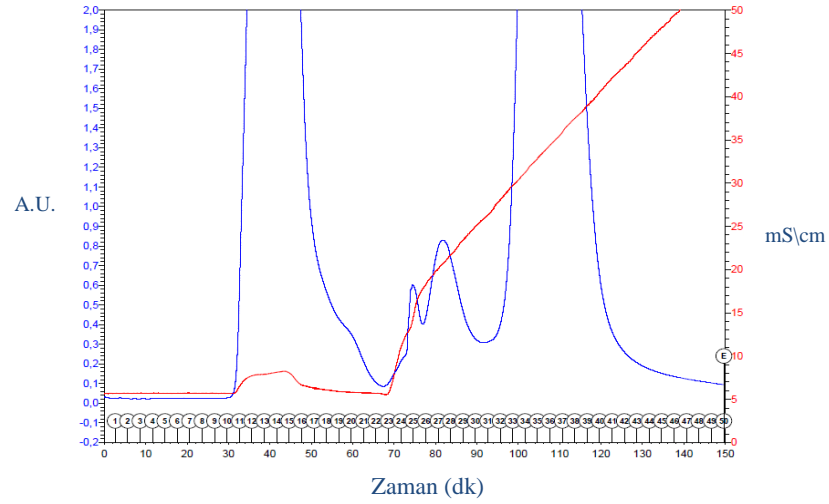
Isı şoku uygulaması sonrası enzim özütünün protein miktarı 4,8726 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olarak hesaplandı. 20 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite sonucu ise $0,0045 \times 20 = 0,09 \mu\text{mol}/\text{dk}$ (Ünite) olarak hesaplandı.



Şekil 5. AgoGI' nın ısı şoku uygulamasının protein miktarı ve GI aktivite tayini grafiği

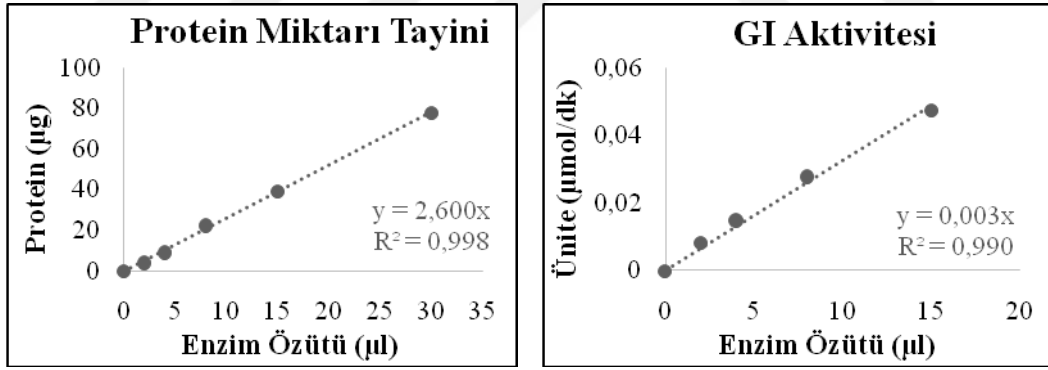
3.1.3. İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması

DEAE-Sepharose kullanılarak BioLogic LP cihazında gerçekleştirilen iyon değişim kolon kromatografisi aşağıda görülmektedir. Grafikte mavi renkte görülen çizgi kolondan çıkan protein miktarını (295 nm'de absorbans değerleri) göstermektedir. Yuvarlak içerisinde görülen sayılar her birinin içerisinde 3 ml kolondan çıkan çözelti bulunan tüp numaralarını göstermektedir. Kırmızı renkte görülen çizgi ise NaCl konsantrasyonunu göstermektedir. Mavi renk takip edilecek olursa 10-22 tüpler arasında yüksek miktarlarda protein kolondan çıkmıştır. Burada kolondan çıkan proteinler kolona tutunmayan proteinlerdir. Kırmızı çizginin yani NaCl konsantrasyonunun artmaya başladığı 23 tüpten itibaren artan iyonik güçle birlikte çeşitli proteinlerin farklı tüplere ayrıldığı gözükmektedir. 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.



Şekil 6. AgoGI'nın saflaştırılmasına ait iyon değişim kolon kromatografisi grafiği

İyon değişim kolon kromatografisi uygulaması sonrası enzim özütünün protein miktarı 2,6009 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olarak hesaplandı. 20 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite deneyi sonucunda, 1 μl enzim özütünde GI aktivitesi $0,0033 \times 20 = 0,066 \mu\text{mol}/\text{dk}$ (Ünite) olarak hesaplandı.

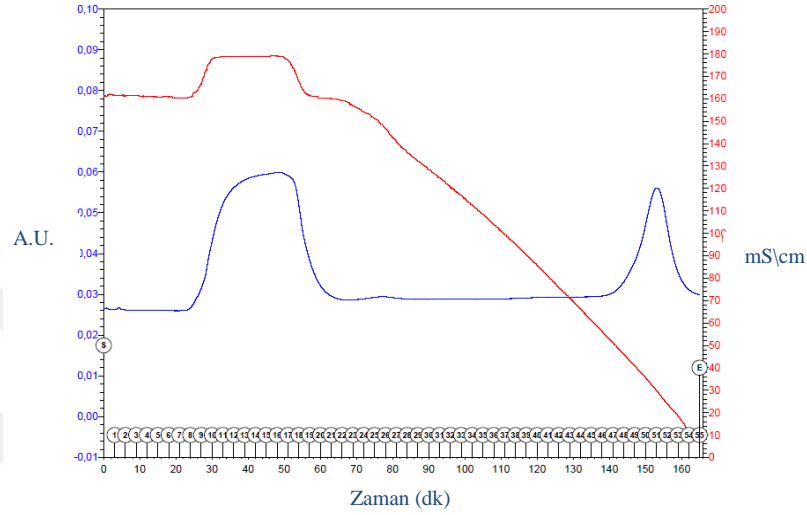


Şekil 7. AgoGI'nın iyon değişim kolon kromatografisinin protein miktarı ve GI aktivite grafiği

3.1.4. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması

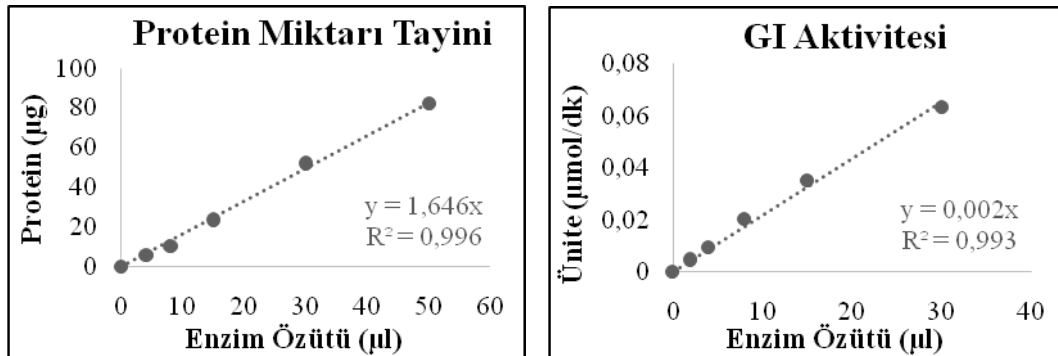
Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (Sigma) kullanılarak BioLogic LP cihazında gerçekleştirilen hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi grafiği aşağıda görülmektedir. Mavi çizgi 295 nm'de absorbans değerini kırmızı çizgi ise Amonyum sülfat konsantrasyonunu göstermektedir. Görüldüğü gibi iki noktada kolondan protein çıkışı olmuştur. 8-20 nci tüpler arasında çıkan protein ya da proteinler kolona

tutunamayan proteinlerdir. GI enzimi amonyum sülfat konsantrasyonunun düşmesiyle 48-53 ncü tüpler arasında kolondan ayrılmıştır. Yapılan GI aktivite çalışmaları sonrasında sadece 48-53 nolu tüplerde aktiviteye rastlandı. 48-53 arası tüplerdeki enzim özütleri birleştirilerek total protein ve aktivite çalışmalarına geçildi.



Şekil 8. AgoGI' nin saflaştırılmasına ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi grafiği

Hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulaması sonrası enzim özütünün protein miktarı 1,6467 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olarak hesaplandı. 20 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite deneyi sonucunda, 1 μl enzim özütünde GI aktivitesi $0,0022 \times 20 = 0,044 \mu\text{mol}/\text{dk}$ (Ünite) olarak hesaplandı.



Şekil 9. AgoGI hidrofobik etkileşim kolon kromatografisinin protein ve GI aktivite grafikleri

3.1.5.Saflaştırma Tablosu

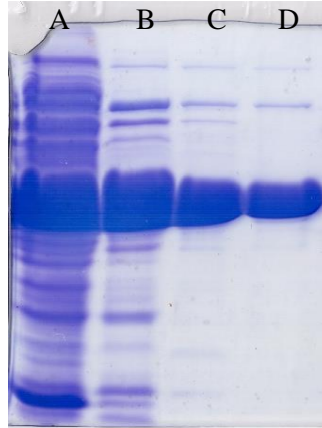
Tabloda da görüleceği üzere tüm saflaştırma uygulamaları başarılı oldu. Saflaştırma sonrası enzimin spesifik aktivitesi 9,615'ten 26,720 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein'e yükselirken enzim % 60 verim ile 2,78 kat saflaştırıldı.

Tablo 6. AgoGI saflaştırma işlemine ait saflaştırma tablosu

Saflaştırma Basamakları	T.Hacim (ml)	Protein (mg/ml)	T.Protein (mg)	Aktivite ($\mu\text{mol/dk}/\mu\text{l}$)	T.Aktivite ($\mu\text{mol/dk}$)	S.Aktivite ($\mu\text{mol/dk/mg}$ protein)	Verim	Saflaştırma katı
Kaba 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

3.1.6. AgoGI'nın Saflaştırılmasına Ait SDS-PAGE Analizi

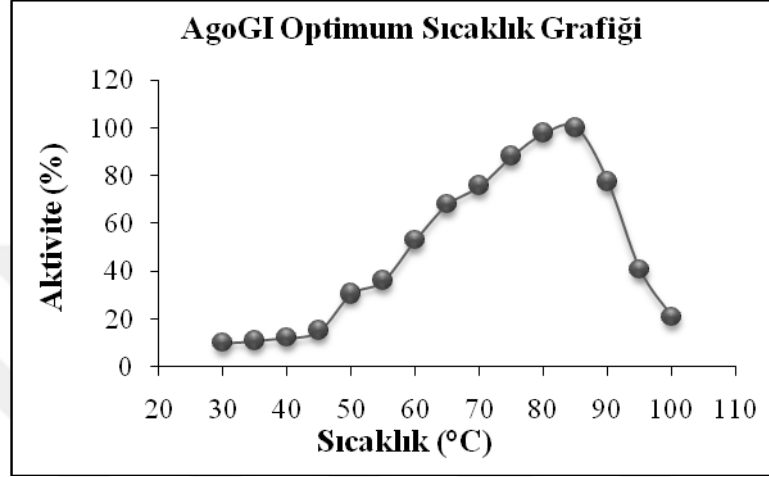
AgoGI'nın saflaştırma uygulamaları sonrasında elde edilen özütlerin 20 μl kadarı SDS-PAGE'e yüklenerek yürütüldü (A: Kaba ekstrakt, B: Isı Şoku uygulaması sonrası enzim özütü, C: İyon değişim kolon kromatografisi sonrası enzim özütü, D: Hidrofobik kolon kromatografisi sonrası enzim özütü). Görüldüğü gibi saflaştırma sonrası GI büyük oranda saflaştırılmıştır.



Şekil 10. AgoGI'nın SDS-PAGE jel elektroforez görüntüsü

3.1.7. Optimum Sıcaklık

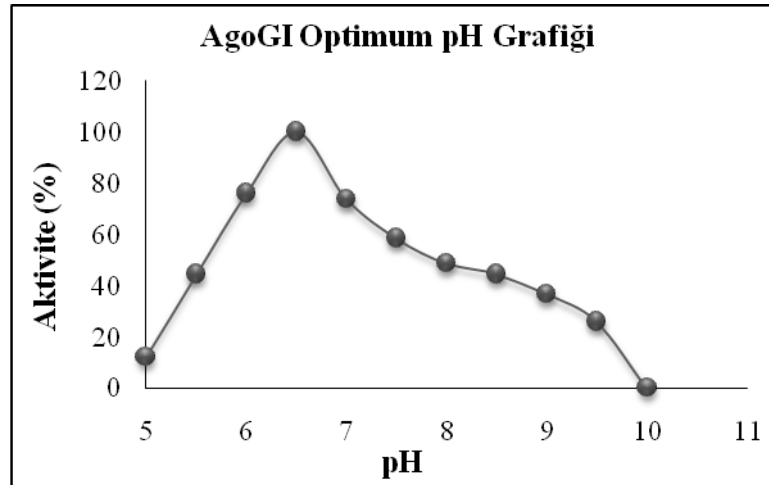
Enzimin optimum çalışma sıcaklığını belirlemek için saf enzim özütü ile farklı sıcaklıklarda bir seri aktivite deneyi gerçekleştirildi. Grafikte görüldüğü gibi enzim en iyi 85°C’de çalışmaktadır.



Şekil 11. AgoGI'nın optimum sıcaklık grafiği

3.1.8. Optimum pH

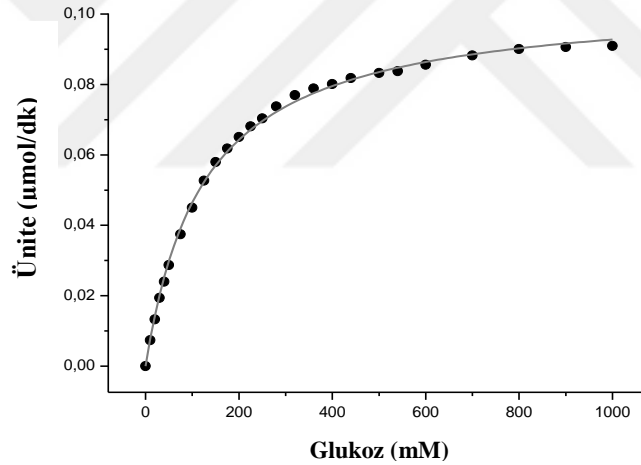
Enzimin optimum çalışma pH değerini belirlemek için saf enzim özütü ile farklı pH değerlerinde aktivite deneyi gerçekleştirildi. Grafikte görüldüğü gibi enzim en iyi 6,5 pH’da çalışmaktadır.



Şekil 12. AgoGI'nın optimum pH grafiği

3.1.9. Kinetik Çalışmalar

AgoGI'nın kinetik parametrelerini hesaplayabilmek için 1000 mM'a kadar arttırılan glukoz konsantrasyonu ile bir seri reaksiyon gerçekleştirildi. Glukoz izomeraz aktivitesi açığa çıkan fruktoz miktarının belirlenmesi ile hesaplandı. Ölçümler sırasında aynı derişimde glukoz içeren körler kullanılarak glukozdan kaynaklanan interferans sorunu ortadan kaldırıldı. Reaksiyonlarda 3,5 µl saf enzim özütü (5,775 µg protein) kullanıldı. Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerleri OriginPro 8.1 analiz programı kullanılarak çizilen Michaelis-Menten eğrisi ile belirlendi (R^2 : 0,99821). Programda yapılan analiz sonucunda enzimin K_m değeri $124,45 \pm 2,99$ mM V_{max} değeri ise $16,97 \pm 0,12$ µmol/dk/mg protein olarak hesaplandı. Bu veriler ile yapılan hesaplamalar sonucunda k_{cat} değeri ise 56,63 1/sn olarak hesaplandı. Katalitik etkinlik değeri olan k_{cat}/K_m değeri ise 0,455 olarak hesaplandı.

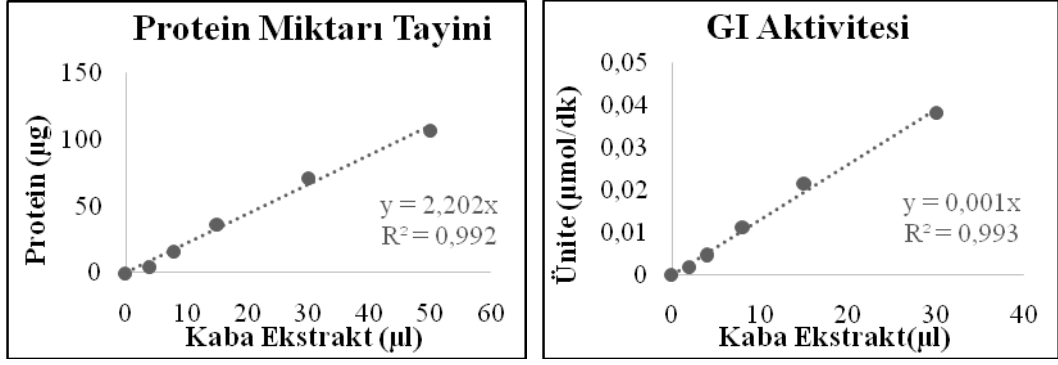


Şekil 13. AgoGI-yt ait Michaelis-Menten grafiği

3.2. N138G Mutant Enziminin Saflaştırması ve Karakterizasyonu

3.2.1. Kaba Ekstrakt

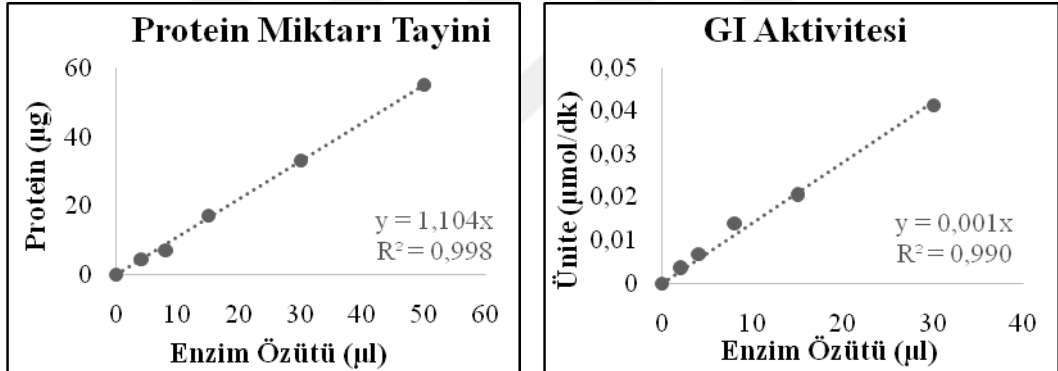
N138G'ye ait kaba ekstraktın protein miktarı 2,2025 µg/µl olarak hesaplandı. 10 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite deneyi sonucunda, 1 µl enzim özütünde GI aktivitesi $0,0013 \times 10 = 0,013$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı.



Şekil 14. N138G'ye ait kaba ekstraktın protein miktarı tayini ve GI aktivite grafikleri

3.2.2. Isı Şoku Uygulaması

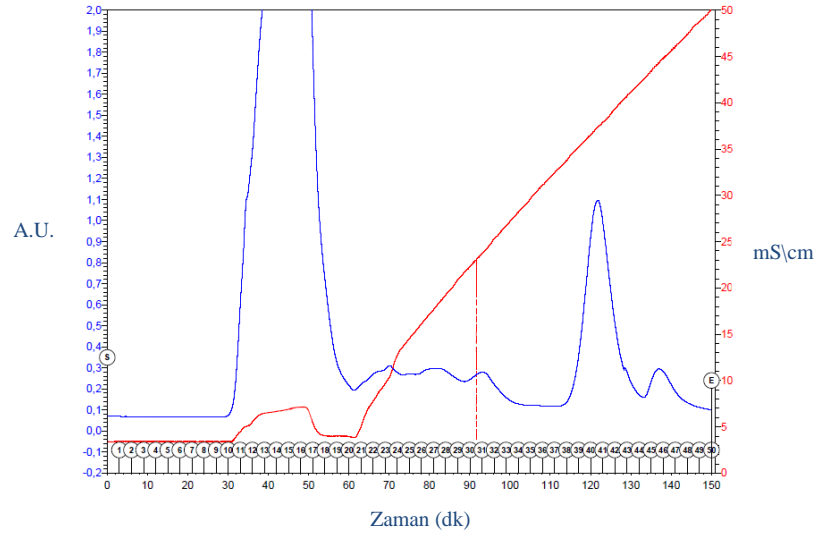
N138G mutant enzimin ısı uygulaması sonrası protein miktarı 1,1042 µg/µl olarak hesaplandı. 10 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite deneyi sonucunda, 1 µl enzim özütünde GI aktivitesi $0,0014 \times 10 = 0,014$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı.



Şekil 15. N138G ısı uygulaması sonrası protein miktarı tayini ve GI aktivite grafikleri

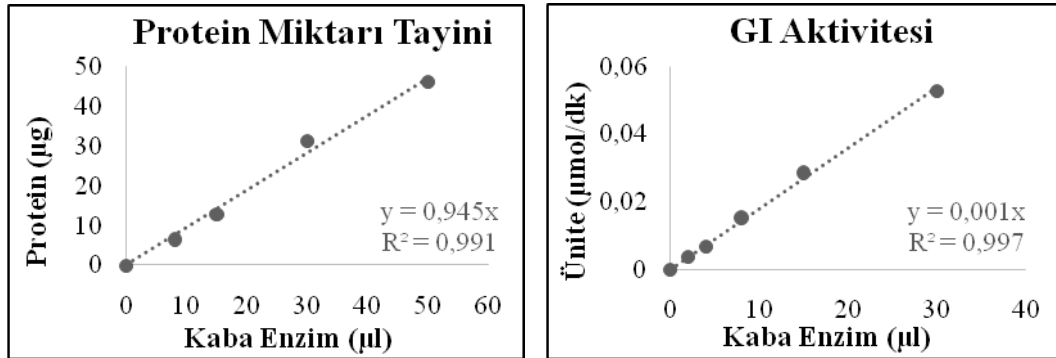
3.2.3. İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması

N138G mutant enzimin iyon değişimi kolon kromatografisi yöntemi ile saflaştırmasına ait grafik aşağıda görülmektedir. Her tüpte yapılan GI aktivite deneyleri sonucunda 31-35 nolu fraksiyonlarda GI aktivitesi tespit edildi. Bu tüpler birleştirilerek aktivite ve protein analizleri yapıldıktan sonra hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulamasına başlandı.



Şekil 16. N138G mutant enzimin saflaştırılmasına ait iyon değişimi kolon kromatografisi grafiği

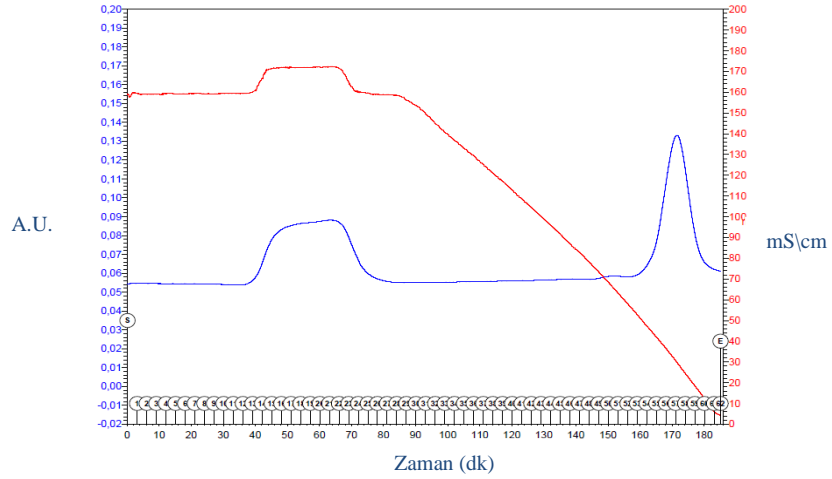
N138G mutant enzimin iyon değişimi kolon kromatografisi yöntemi ile saflaştırması sonrası elde edilen enzim özütündeki protein miktarı 0,9459 µg/µl olarak hesaplandı. 10 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite deneyi sonucunda, 1 µl enzim özütünde GI aktivitesi 0,0018 x 10 = 0,018 µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı.



Şekil 17. N138G mutant enzimin iyon değişimi kolon kromatografisinin protein miktarı tayini ve GI aktivite grafikleri

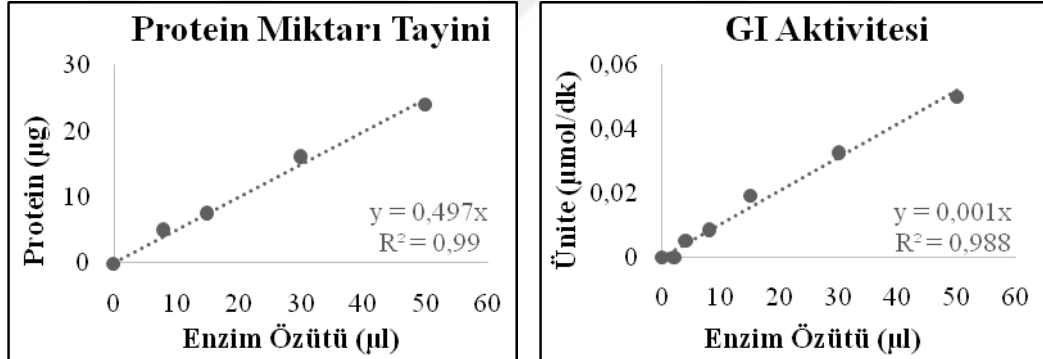
3.2.4. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması

N138G mutant enzimin hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi yöntemi ile saflaştırılmasına ait grafik aşağıda görülmektedir. Her tüpte yapılan GI aktivite deneyleri sonucunda 54-58 nolu fraksiyonlarda GI aktivitesi tespit edildi. Tüpler birleştirilerek aktivite ve protein analizleri yapıldı.



Şekil 18. N138G mutant enzimin safılaştırılmasına ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi

N138G mutant enzimin hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi yöntemi ile safılaştırması sonrası elde edilen enzim özütündeki protein miktarı 0,4972 µg/µl olarak hesaplandı. 10 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite deneyi sonucunda, 1 µl enzim özütünde GI aktivitesi 0,001 x 10 = 0,01 µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı.



Şekil 19. N138G mutant enzimin hidrofobik etkileşim kolon kromatografisinin protein miktarı tayini ve GI aktivite grafikleri

3.2.5. Safılaştırma Tablosu

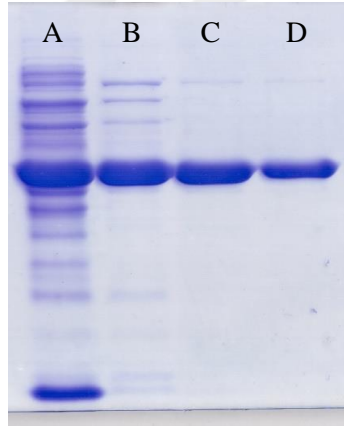
Tabloda da görüleceği üzere tüm safılaştırma uygulamaları başarılı olmuştur. Safılaştırma sonrası enzimin spesifik aktivitesi 5,902'den 20,113 µmol/dk/mg protein'e yükselirken enzim % 49 verim ile 3,41 kat safılaştırıldı.

Tablo 7. N138G mutant enzimin saflaştırma işlemine ait saflaştırma tablosu

Saflaştırma Basamakları	T.Hacim (ml)	Protein mg/ml	T.Protein (mg)	Aktivite ($\mu\text{mol/dk}/\mu\text{l}$)	T.Aktivite ($\mu\text{mol/dk}$)	S.Aktivite ($\mu\text{mol/dk/mg}$ protein)	Verim	Saflaştırma katı
Kaba E.	22	2,20	48,46	0,0130	286,00	5,902	100	1
Isı Şoku	19,45	1,10	21,48	0,0140	272,30	12,679	95,2	2,15
İyon Değişim	15	0,95	14,19	0,0180	270,00	19,029	94,4	3,22
Hidrofobik E.	14	0,50	6,96	0,0100	140,00	20,113	49,0	3,41

3.2.6. N138G Mutant Enziminin Saflaştırılmasına Ait SDS-PAGE Analizi

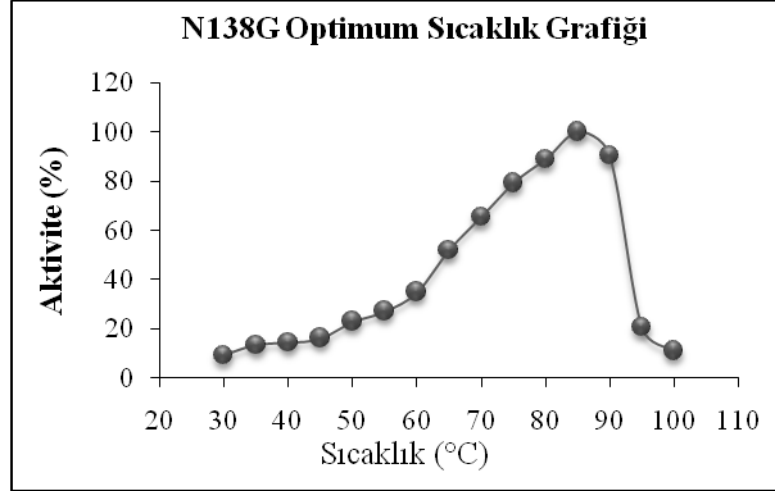
N138G saflaştırma uygulamaları sonrasında elde edilen özütlerin 20 μl kadarı SDS-PAGE'e yüklenerek yürütüldü (A: Kaba ekstrakt, B: Isı Şoku uygulaması sonrası enzim özütü, C: İyon değişim kolon kromatografisi sonrası enzim özütü, D: Hidrofobik kolon kromatografisi sonrası enzim özütü). Görüldüğü gibi saflaştırma sonrası GI büyük oranda saflaştırılmıştır.



Şekil 20. N138G mutant enziminin SDS-PAGE jel elektroforez görüntüsü

3.2.7. Optimum Sıcaklık

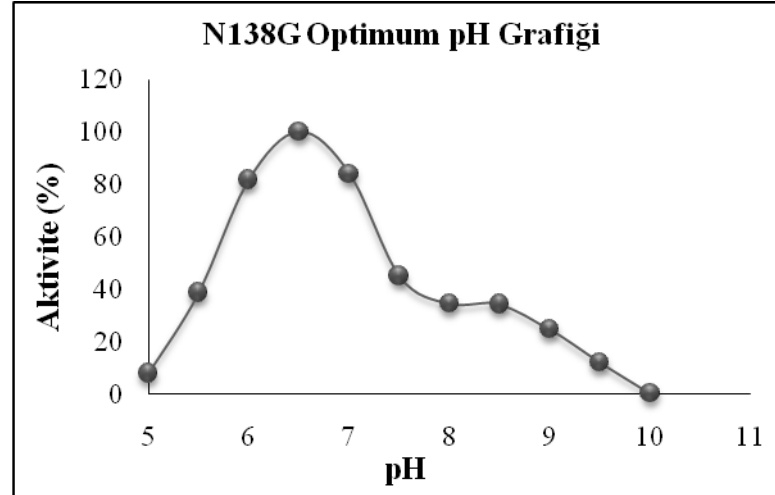
N138G mutant enzimin optimum çalışma sıcaklığını belirlemek için saf enzim özütü ile farklı sıcaklıklarda bir seri aktivite deneyi gerçekleştirildi. Grafikten de görüleceği üzere enzim en iyi 85°C'de çalışmaktadır. Mutasyon enzimin optimum çalışma sıcaklığında herhangi bir değişime neden olmamıştır.



Şekil 21. N138G mutant enzimin optimum sıcaklık grafiği

3.2.8. Optimum pH

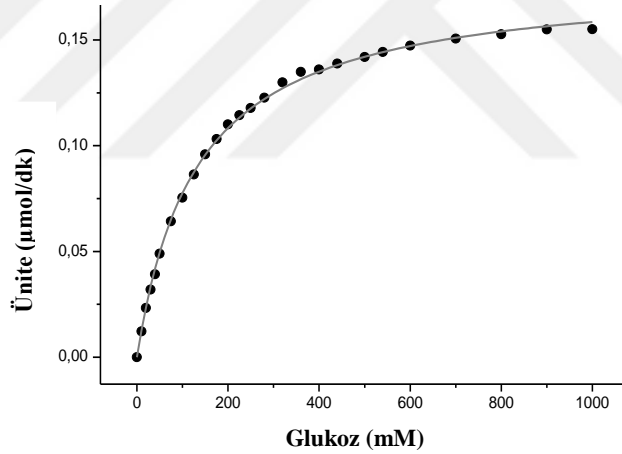
N138G mutant enziminin en iyi çalıştığı pH değerini belirlemek için saf enzim özütü ile farklı pH değerlerinde bir seri aktivite deneyi gerçekleştirildi. Grafikten de görüleceği üzere enzim en iyi 6,5 pH'da çalışmaktadır. Mutasyon enzimin optimum pH değerinde herhangi bir değişime neden olmamıştır.



Şekil 22. N138G mutant enziminin optimum sıcaklık grafiği

3.2.9. Kinetik Çalışmalar

N138G mutant enziminin kinetik parametrelerini hesaplayabilmek için 1000 mM'a kadar arttırılan glukoz konsantrasyonu ile bir seri reaksiyon gerçekleştirildi. Glukoz izomeraz aktivitesi açığa çıkan fruktoz miktarının belirlenmesi ile hesaplandı. Ölçümler sırasında aynı derişimde glukoz içeren körler kullanılarak glukozdan kaynaklanan interferans sorunu ortadan kaldırıldı. Reaksiyonlarda 8 µl saf enzim özütü (4 µg protein) kullanıldı. Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerleri OriginPro 8.1 analiz programı kullanılarak çizilen Michaelis-Menten eğrisi ile belirlendi (R^2 : 0,99873). Programda yapılan analiz sonucunda enzimin K_m değeri $131,09 \pm 2,67$ mM V_{max} değeri ise $44,24 \pm 0,27$ µmol/dk/mg protein olarak hesaplandı. Bu veriler ile yapılan hesaplamalar sonucunda k_{cat} değeri ise 147,60 1/sn olarak hesaplandı. Katalitik etkinlik değeri olan k_{cat}/K_m değeri ise 1,126 olarak hesaplandı.

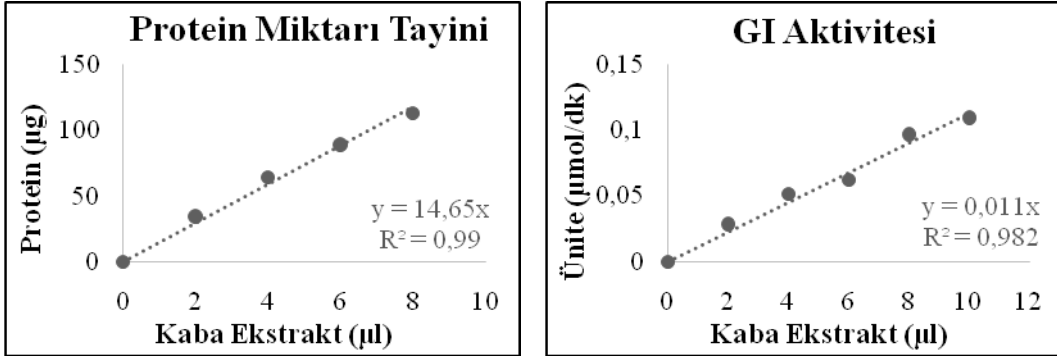


Şekil 23. N138G mutant enzime ait Michaelis-Menten grafiği

3.3. G33D Mutant Enziminin Saflaştırması ve Karakterizasyonu

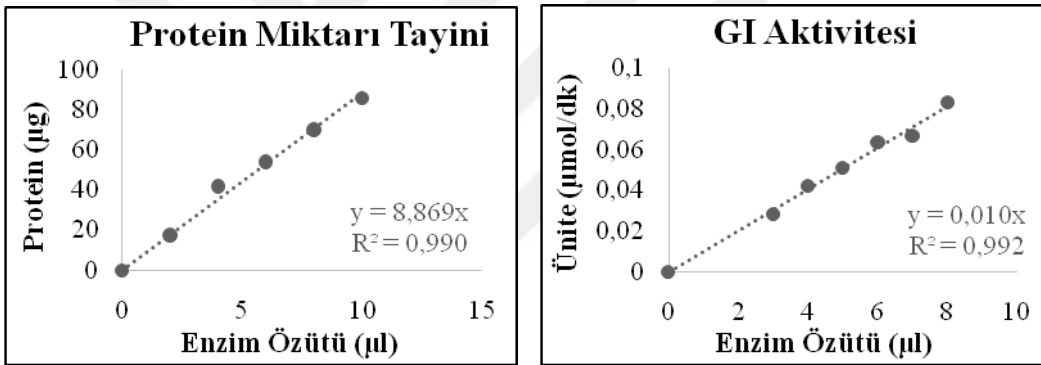
3.3.1. Kaba Ekstrakt

G33D'ye ait kaba ekstraktın protein miktarı 14,657 µg/µl olarak hesaplandı. 20 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite deneyi sonucunda, 1 µl enzim özütünde GI aktivitesi $0,0113 \times 20 = 0,226$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı.



Şekil 24. G33D mutant enziminin ait kaba ekstraktın protein miktarı tayini ve GI aktivite grafikleri

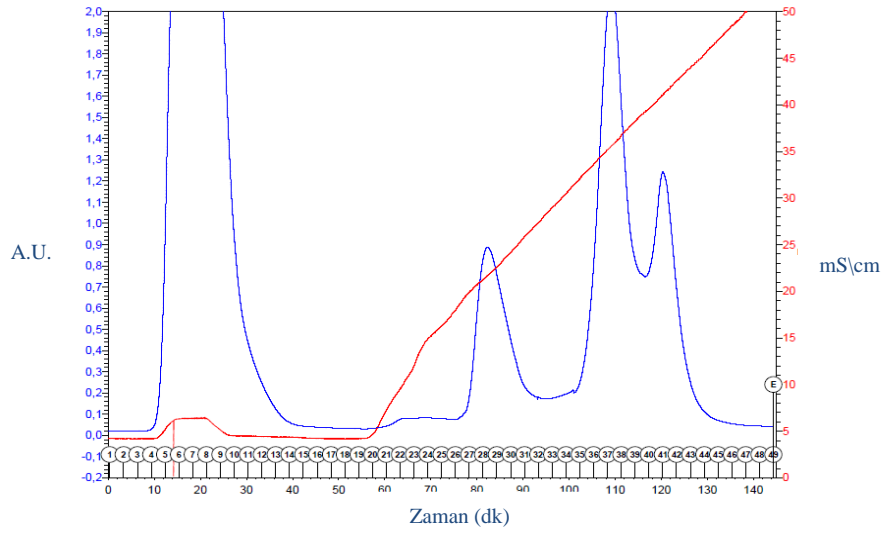
G33D mutant enzimin ısı uygulaması sonrası protein miktarı 8,8694 µg/µl olarak hesaplandı. 20 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite deneyi sonucunda, 1 µl enzim özütünde GI aktivitesi $0,0101 \times 20 = 0,202$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı.



Şekil 25. G33D mutant enziminin ısı uygulamasına ait protein miktarı tayini ve G aktivite grafikleri

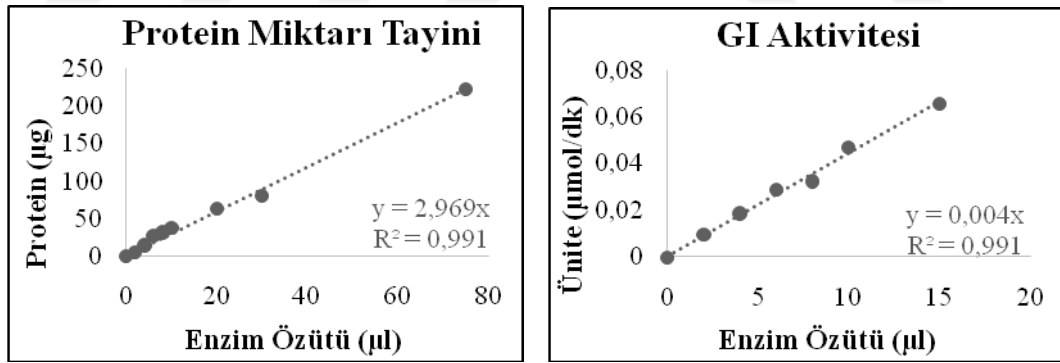
3.3.3. İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması

G33D mutant enzimin iyon değişimi kolon kromatografisi yöntemi ile saflaştırmasına ait grafik aşağıda görülmektedir. Her tüpte yapılan GI aktivite deneyleri sonucunda 27-32 nolu fraksiyonlarda GI aktivitesi tespit edildi. Bu tüpler birleştirilerek aktivite ve protein analizlerinden sonra hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulamasına başlandı.



Şekil 26. G33D mutant enzimin saflaştırılmasına ait iyon değişimi kolon kromatografisi

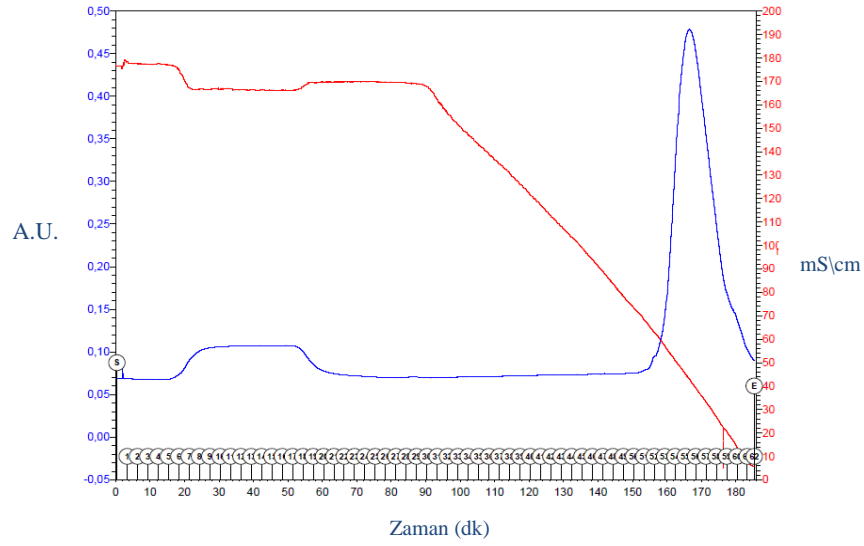
G33D mutant enzimin iyon değişimi kolon kromatografisi yöntemi ile saflaştırması sonrası elde edilen enzim özütündeki protein miktarı 2,9696 µg/µl olarak hesaplandı. 20 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite deneyi sonucunda, 1 µl enzim özütünde GI aktivitesi $0,0045 \times 20 = 0,098$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı.



Şekil 27. G33D mutant enzimin iyon değişimi kolon kromatografisinin protein miktarı tayini ve GI aktivite grafikler

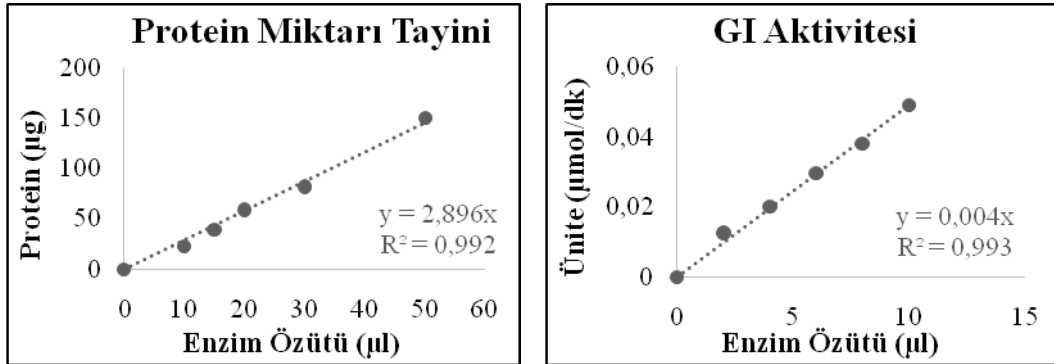
3.3.4. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması

G33D mutant enzimin hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi yöntemi ile saflaştırılmasına ait grafik yukarıda görülmektedir. Her tüpte yapılan GI aktivite deneyleri sonucunda 52-61 nolu fraksiyonlarda GI aktivitesi tespit edildi. Saf enzim özütü olarak bu tüpler birleştirildi ve aktivite ve protein analizleri yapıldı.



Şekil 28. G33D mutant enzimine ait saflaştırmanın hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi

G33D mutant enzimin hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi yöntemi ile saflaştırması sonrası elde edilen enzim özütündeki protein miktarı 2,8962 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olarak hesaplandı. 20 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite deneyi sonucunda, 1 μl enzim özütünde GI aktivitesi $0,0049 \times 20 = 0,098 \mu\text{mol}/\text{dk}$ (Ünite) olarak hesaplandı.



Şekil 29. G33D mutant enzimin hidrofobik etkileşim kolon kromatografisinin protein miktarı tayini ve GI aktivite grafikleri

3.3.5. Saflaştırma Tablosu

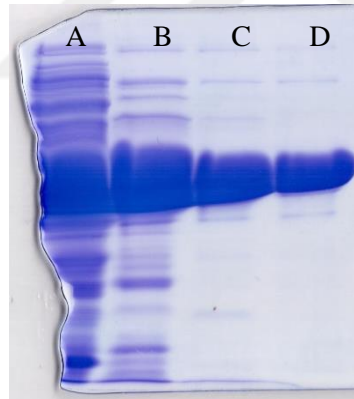
Tabloda da görüleceği üzere tüm saflaştırma uygulamaları başarılı olmuştur. Saflaştırma sonrası enzimin spesifik aktivitesi 15,419'dan 33,837 $\mu\text{mol}/\text{dk}/\text{mg}$ protein'e yükselirken enzim % 61,5 verim ile 2,19 kat saflaştırıldı.

Tablo 8. G33D mutant enzimin saflaştırma işlemine ait saflaştırma tablosu

Saflaştırma Basamakları	T.Hacim (ml)	Protein (mg/ml)	T.Protein (mg)	Aktivite ($\mu\text{mol/dk}/\mu\text{l}$)	T.Aktivite ($\mu\text{mol/dk}$)	S.Aktivite ($\mu\text{mol/dk}/\text{mg}$ protein)	Verim	Saflaştırma katı
Kaba E.	12,8	14,66	187,61	0,226	2892,80	15,419	100,0	1
Isı Şoku	11,45	8,87	101,55	0,202	2312,90	22,775	80,0	1,48
İyon değişim	21,6	2,97	64,14	0,090	1944,00	30,307	67,2	1,97
Hidrofobik E.	18,15	2,90	52,57	0,098	1778,7	33,837	61,5	2,19

3.3.6. G33D Mutant Enziminin Saflaştırılmasına Ait SDS-PAGE Analizi

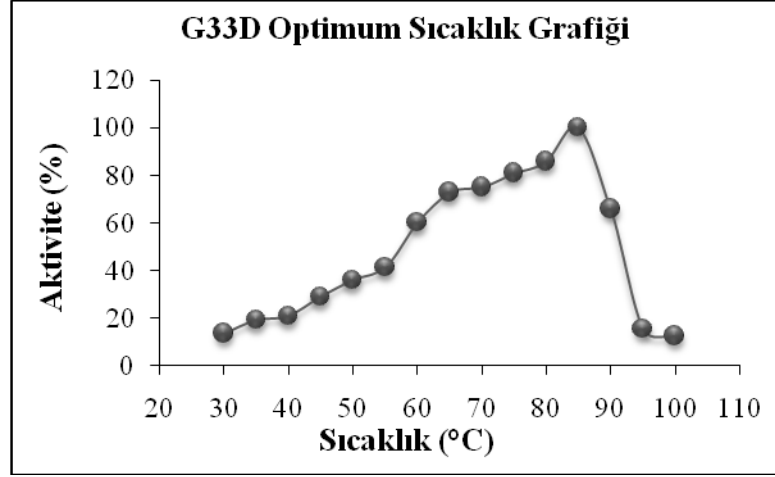
G33D saflaştırma uygulamaları sonrasında elde edilen özütlerin 20 μl kadarı SDS-PAGE'e yüklenerak yürütüldü (A: Kaba ekstrakt, B: Isı Şoku uygulaması sonrası enzim özütü, C: İyon değişim kolon kromatografisi sonrası enzim özütü, D: Hidrofobik kolon kromatografisi sonrası enzim özütü). Görüldüğü gibi saflaştırma sonrası GI büyük oranda saflaştırılmıştır.



Şekil 30. G33D mutant enzimin SDS-PAGE jel elektroforez görüntüsü

3.3.7. Optimum Sıcaklık

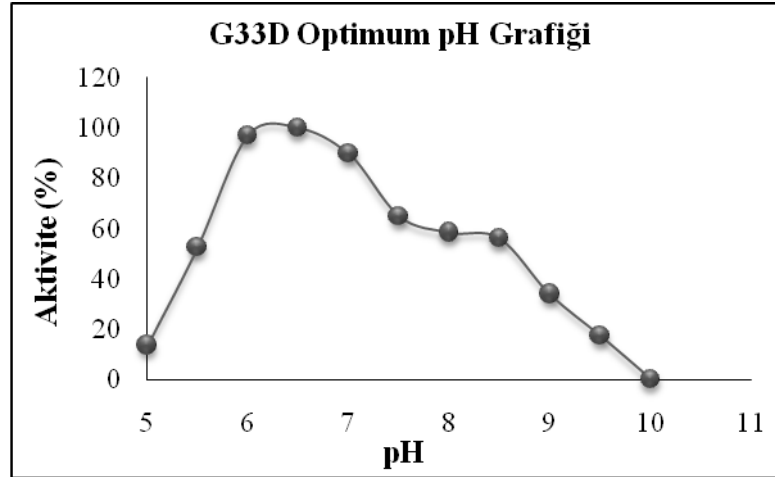
G33D mutant enzimin optimum çalışma sıcaklığını belirlemek için saf enzim özütü ile farklı sıcaklıklarda bir seri aktivite deneyi gerçekleştirildi. Grafikten de görüleceği üzere enzim en iyi 85°C'de çalışmaktadır. Mutasyon enzimin optimum çalışma sıcaklığında herhangi bir değişime neden olmamıştır.



Şekil 31. G33D mutant enzimin optimum sıcaklık grafiği

3.3.8. Optimum pH

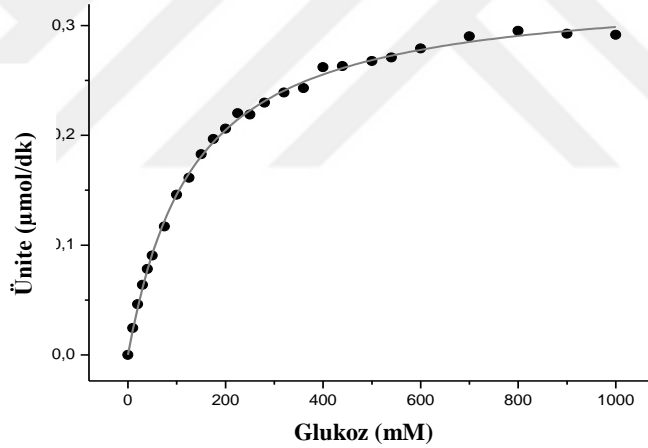
G33D mutant enziminin en iyi çalıştığı pH değerini belirlemek için saf enzim özütü ile farklı pH değerlerinde bir seri aktivite deneyi gerçekleştirildi. Grafikten de görüleceği üzere enzim en iyi 6,5 pH'da çalışmaktadır. Mutasyon enzimin optimum pH değerinde herhangi bir değişime neden olmamıştır.



Şekil 32. G33D mutant enziminin optimum pH grafiği

3.3.9. Kinetik Çalışmalar

G33D mutant enziminin kinetik parametrelerini hesaplayabilmek için 1000 mM'a kadar arttırılan glukoz konsantrasyonu ile bir seri reaksiyon gerçekleştirildi. Glukoz izomeraz aktivitesi açığa çıkan fruktoz miktarının belirlenmesi ile hesaplandı. Ölçümler sırasında aynı derişimde glukoz içeren körler kullanılarak glukozdan kaynaklanan interferans sorunu ortadan kaldırıldı. Reaksiyonlarda 6,5 µl saf enzim özütü (18,85 µg protein) kullanıldı. Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerleri OriginPro 8.1 analiz programı kullanılarak çizilen Michaelis-Menten eğrisi ile belirlendi (R^2 : 0,99801). Programda yapılan analiz sonucunda enzimin K_m değeri $128,44 \pm 4,89$ mM V_{max} değeri ise $17,81 \pm 0,27$ µmol/dk/mg protein olarak hesaplandı. Bu veriler ile yapılan hesaplamalar sonucunda k_{cat} değeri ise 59,42 1/sn olarak hesaplandı. Katalitik etkinlik değeri olan k_{cat}/K_m değeri ise 0,463 olarak hesaplandı.

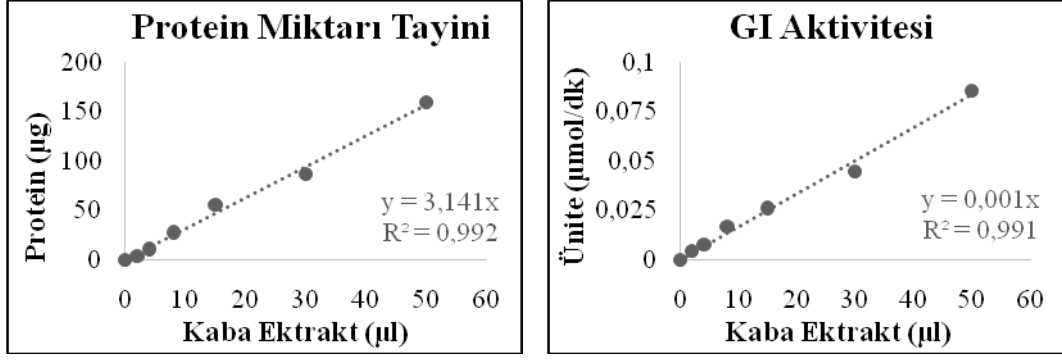


Şekil 33. G33D mutant enzime ait Michaelis-Menten grafiği

3.4. T144S Mutant Enziminin Saflaştırması ve Karakterizasyonu

3.4.1. Kaba Ekstrakt

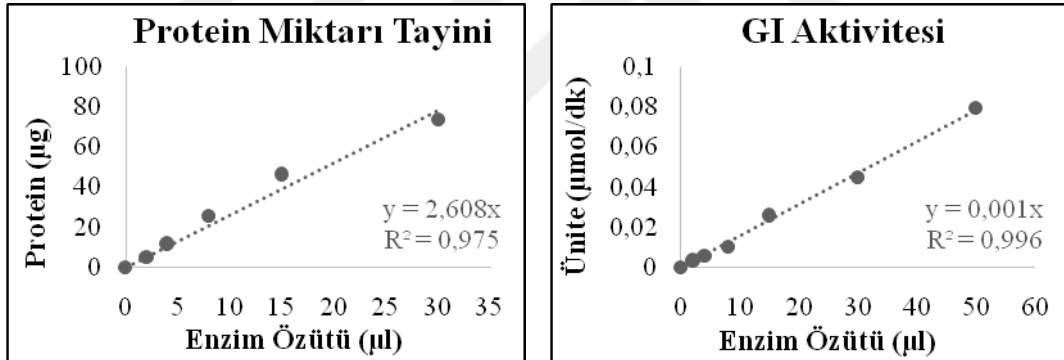
T144S'ye ait kaba ekstraktın protein miktarı 3,1418 µg/µl olarak hesaplandı. 5 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite deneyi sonucunda, 1 µl enzim özütünde GI aktivitesi $0,0017 \times 5 = 0,0085$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı.



Şekil 34. T144S mutant enzime ait kaba ekstraktın protein miktarı ve GI aktivite grafikleri

3.4.2. Isı Şoku Uygulaması

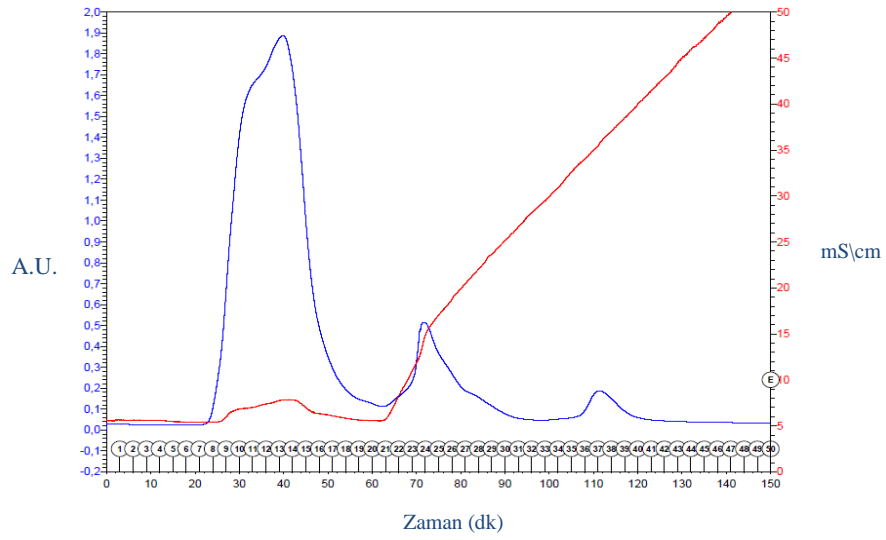
T144S mutant enzimin ısı uygulaması sonrası protein miktarı 2,6081 µg/µl olarak hesaplandı. 5 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite deneyi sonucunda, 1 µl enzim özütünde GI aktivitesi $0,0016 \times 5 = 0,008$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı.



Şekil 35. T144S mutant enzimin ısı uygulamasına ait protein miktarı ve GI aktivite grafikleri

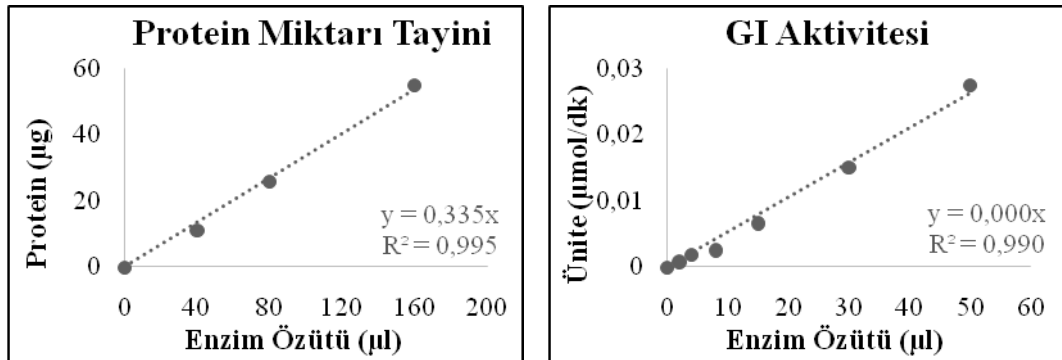
3.4.3. İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması

T144S mutant enzimin iyon değişimi kolon kromatografisi yöntemi ile saflaştırmasına ait grafik aşağıda görülmektedir. Her tüpte yapılan GI aktivite deneyleri sonucunda 22-27 nolu fraksiyonlarda GI aktivitesi tespit edildi. Bu tüpler birleştirilerek aktivite ve protein analizleri yapıldıktan sonra hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulamasına başlandı.



Şekil 36. T144S mutant enzimine ait saflaştırmanın iyon değişimi kolon kromatografisi

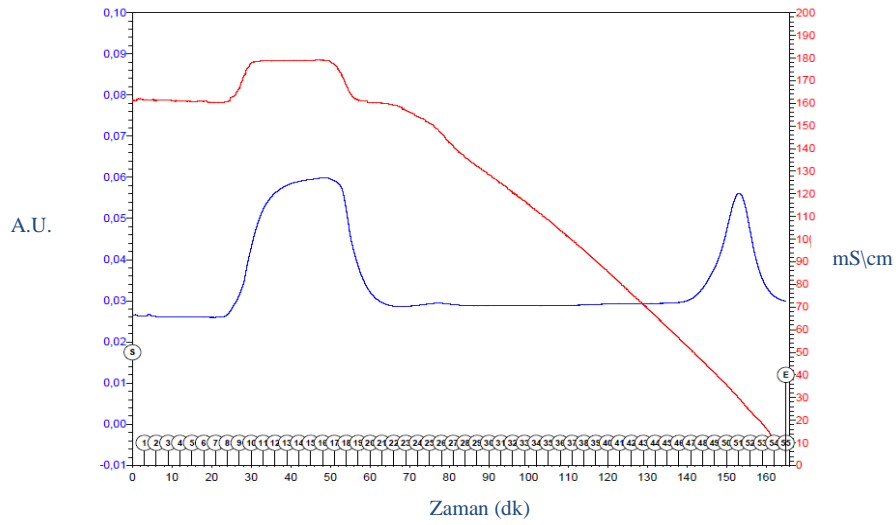
T144S mutant enzimin iyon değişimi kolon kromatografisi yöntemi ile saflaştırması sonrası elde edilen enzim özütündeki protein miktarı 0,3358 µg/µl olarak hesaplandı. 5 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite deneyi sonucunda, 1 µl enzim özütünde GI aktivitesi 0,0005 x 5 = 0,0025 µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı.



Şekil 37. T144S mutant enzimin iyon değişimi kolon kromatografisine ait protein miktarı ve GI aktivite grafikleri

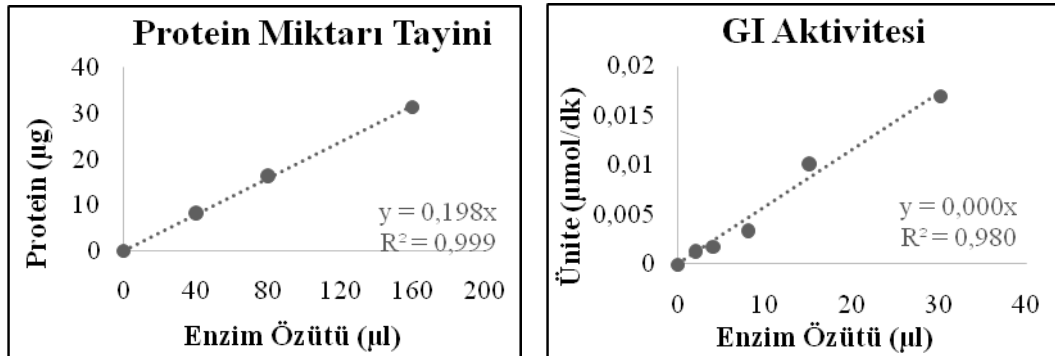
3.4.4. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması

T144S mutant enzimin hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi yöntemi ile saflaştırmasına ait grafik aşağıda görülmektedir. Her tüpte yapılan GI aktivite deneyleri sonucunda 50-54 nolu fraksiyonlarda GI aktivitesi tespit edildi. Saf enzim özütü olarak bu tüpler birleştirildi ve aktivite ve protein analizleri yapıldı.



Şekil 38. T144S mutant enzimine ait saflaştırmanın hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi

T144S mutant enzimin hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi yöntemi ile saflaştırması sonrası elde edilen enzim özütündeki protein miktarı $0,1987 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ olarak hesaplandı. 5 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite deneyi sonucunda, $1 \mu\text{l}$ enzim özütünde GI aktivitesi $0,0006 \times 5 = 0,003 \mu\text{mol}/\text{dk}$ (Ünite) olarak hesaplandı.



Şekil 39. T144S mutant enzimine hidrofobik etkileşim kolon kromatografisine ait protein miktarı ve GI aktivite grafikleri

3.4.5. Saflaştırma Tablosu

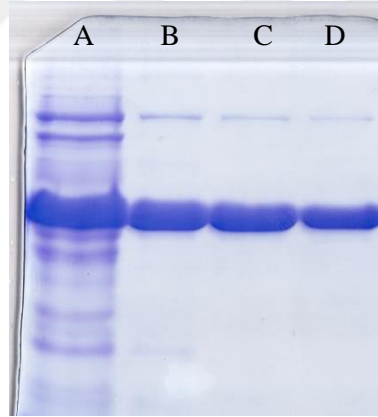
Tabloda da görüleceği üzere tüm saflaştırma uygulamaları başarılı olmuştur. Saflaştırma sonrası enzimin spesifik aktivitesi 2,705'den $15,098 \mu\text{mol}/\text{dk}/\text{mg}$ protein'e yükselirken enzim % 22,2 verim ile 5,58 kat saflaştırıldı.

Tablo 9. T144S mutant enzimin saflaştırma işlemine ait saflaştırma tablosu

Saflaştırma Basamakları	T.Hacim (ml)	Protein (mg/ml)	T.Protein (mg)	Aktivite ($\mu\text{mol/dk}/\mu\text{l}$)	T.Aktivite ($\mu\text{mol/dk}$)	S.Aktivite ($\mu\text{mol/dk}/\text{mg}$ protein)	Verim	Saflaştırma katı
Kaba E.	22,3	3,14	70,06	0,009	189,55	2,705	100,0	1
Isı Şoku	19	2,61	49,55	0,008	152,00	3,067	80,2	1,13
İyon değişim	18	0,34	6,04	0,003	45,00	7,445	23,7	2,75
Hidrofobik E.	14	0,20	2,78	0,003	42,00	15,098	22,2	5,58

3.4.6. T144S mutant enziminin saflaştırılmasına ait SDS-PAGE Analizi

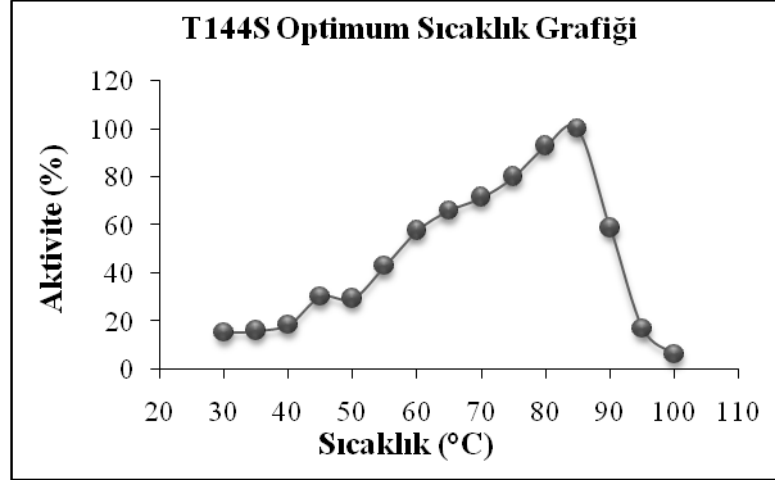
T144S saflaştırma uygulamaları sonrasında elde edilen özütlerin 20 μl kadarı SDS-PAGE'e yüklenerek yürütüldü (A: Kaba ekstrakt, B: Isı Şoku uygulaması sonrası enzim özütü, C: İyon değişim kolon kromatografisi sonrası enzim özütü, D: Hidrofobik kolon kromatografisi sonrası enzim özütü). Görüldüğü gibi saflaştırma sonrası GI büyük oranda saflaştırılmıştır.



Şekil 40. T144S mutant enzimin SDS-PAGE jel elektroforez görüntüsü

3.4.7. Optimum Sıcaklık

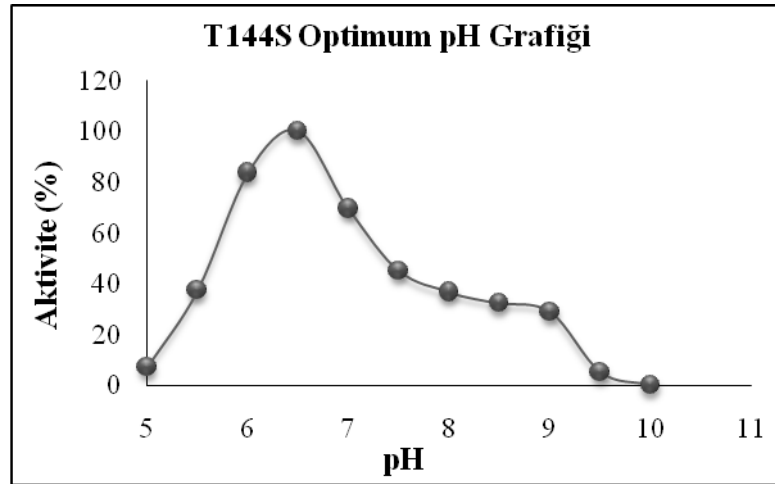
T144S mutant enzimin optimum çalışma sıcaklığını belirlemek için saf enzim özütü ile farklı sıcaklıklarda bir seri aktivite deneyi gerçekleştirildi. Grafikten de görüleceği üzere enzim en iyi 85°C'de çalışmaktadır. Mutasyon enzimin optimum çalışma sıcaklığında herhangi bir değişime neden olmamıştır.



Şekil 41. T144S mutant enzimin optimum sıcaklık grafiği

3.4.8. Optimum pH

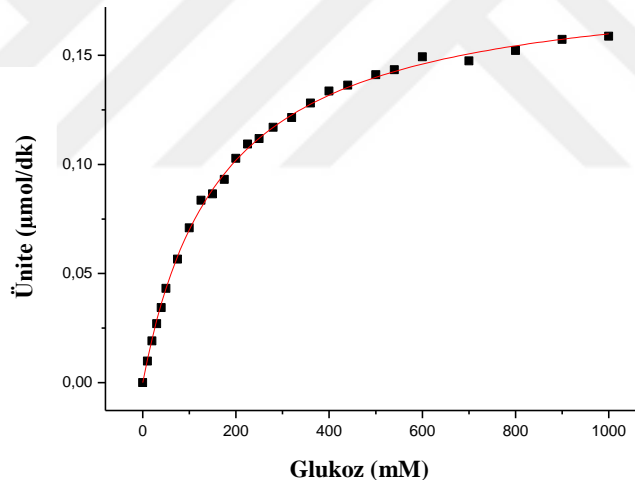
T144S mutant enziminin en iyi çalıştığı pH değerini belirlemek için saf enzim özütü ile farklı pH değerlerinde bir seri aktivite deneyi gerçekleştirildi. Grafikten de görüleceği üzere enzim en iyi 6,5 pH'da çalışmaktadır. Mutasyon enzimin optimum pH değerinde herhangi bir değişime neden olmamıştır.



Şekil 42. T144S mutant enzimin optimum pH grafiği

3.4.9. Kinetik Çalışmalar

T144S mutant enziminin kinetik parametrelerini hesaplayabilmek için 1000 mM'a kadar arttırılan glukoz konsantrasyonu ile bir seri reaksiyon gerçekleştirildi. Glukoz izomeraz aktivitesi açığa çıkan fruktoz miktarının belirlenmesi ile hesaplandı. Ölçümler sırasında aynı derişimde glukoz içeren körler kullanılarak glukozdan kaynaklanan interferans sorunu ortadan kaldırıldı. Reaksiyonlarda 25 µl saf enzim özütü (5 µg protein) kullanıldı. Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerleri OriginPro 8.1 analiz programı kullanılarak çizilen Michaelis-Menten eğrisi ile belirlendi (R^2 : 0,99857). Programda yapılan analiz sonucunda enzimin K_m değeri $165,83 \pm 3,75$ mM V_{max} değeri ise $34,59 \pm 0,26$ µmol/dk/mg protein olarak hesaplandı. Bu veriler ile yapılan hesaplamalar sonucunda k_{cat} değeri ise 115,41 1/sn olarak hesaplandı. Katalitik etkinlik değeri olan k_{cat}/K_m değeri ise 0,696 olarak hesaplandı.

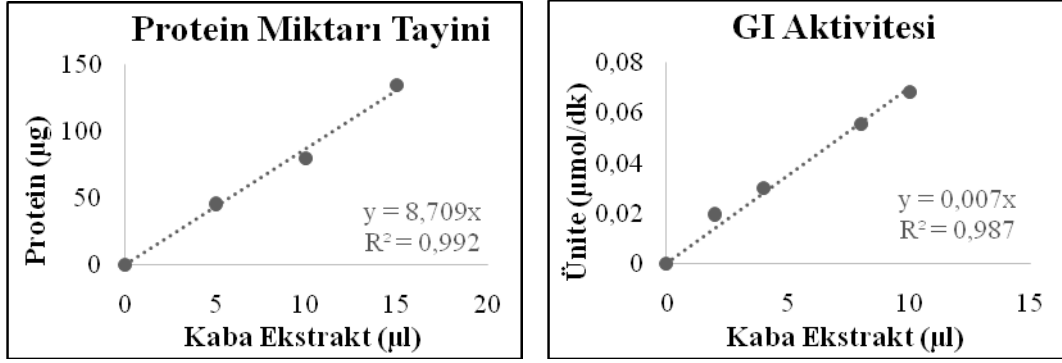


Şekil 43. T144S mutant enzime ait Michaelis-Menten grafiği

3.5. V293I Mutant Enziminin Saflaştırması ve Karakterizasyonu

3.5.1. Kaba Ekstrakt

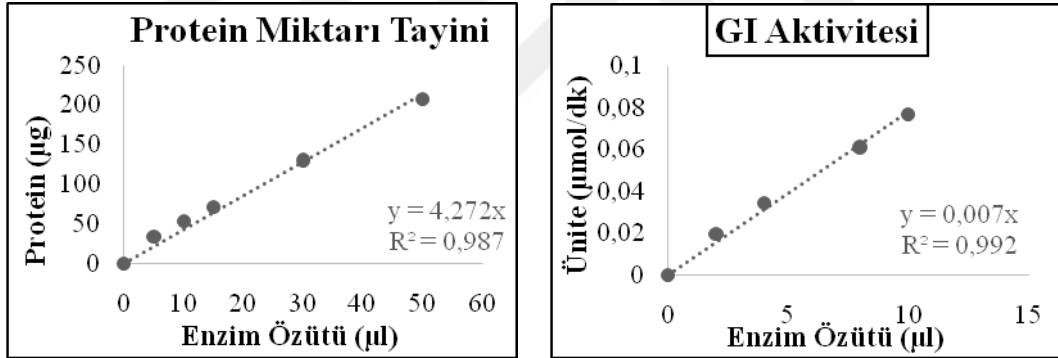
V293I'ya ait kaba ekstraktın protein miktarı 8,709 µg/µl olarak hesaplandı. 5 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite deneyi sonucunda, 1 µl enzim özütünde GI aktivitesi $0,007 \times 5 = 0,035$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı.



Şekil 44. V293I mutant enzime ait kaba ekstraktın protein miktarı ve GI aktivite grafikleri

3.5.2. Isı Şoku Uygulaması

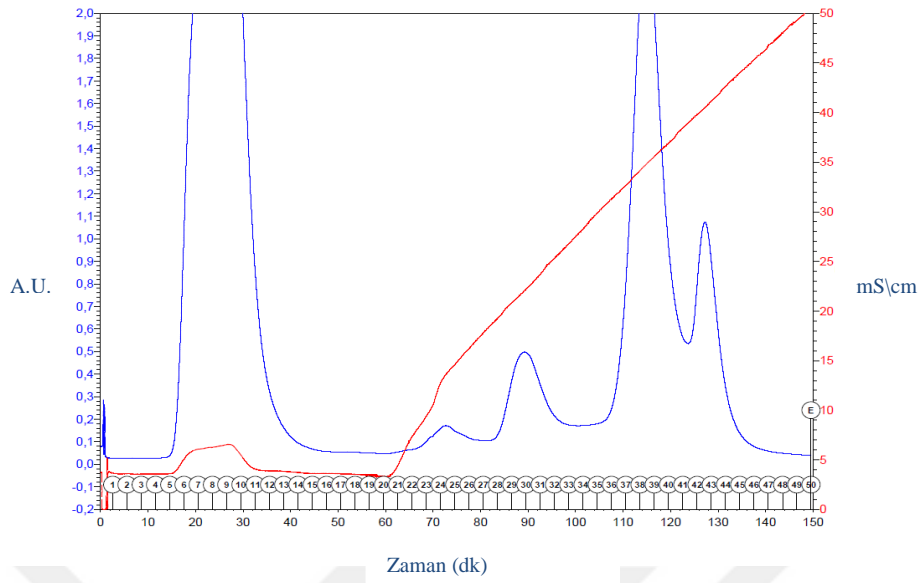
V293I mutant enzimin ısı uygulaması sonrası protein miktarı 4,2723 µg/µl olarak hesaplandı. 5 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite deneyi sonucunda, 1 µl enzim özütünde GI aktivitesi $0,0078 \times 5 = 0,039$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı.



Şekil 45. V293I mutant enzimin ısı uygulaması sonrası protein miktarı ve GI aktivite grafikleri

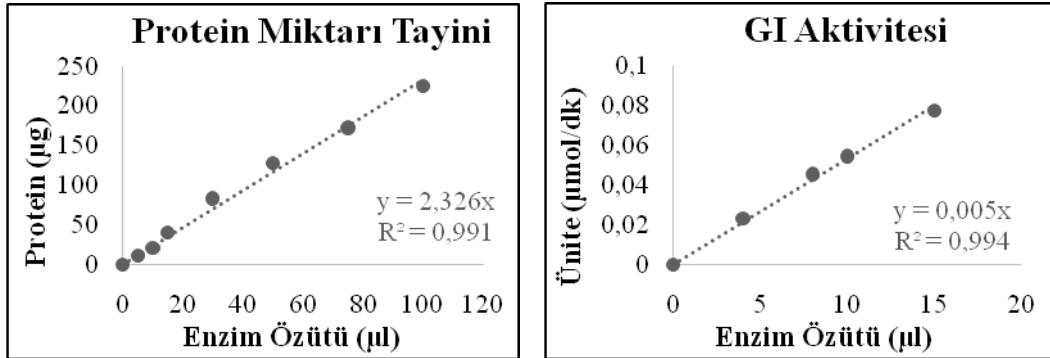
3.5.3. İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması

V293I mutant enzimin iyon değişimi kolon kromatografisi yöntemi ile saflaştırmasına ait grafik aşağıda görülmektedir. Her tüpte yapılan GI aktivite deneyleri sonucunda 28-33 nolu fraksiyonlarda GI aktivitesi tespit edildi. Bu tüpler birleştirilerek aktivite ve protein analizleri yapıldıktan sonra hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulamasına başlandı.



Şekil 46. V293I mutant enzimine ait saflaştırmanın iyon değişim kolon kromatografisi

V293I mutant enzimin iyon değişimi kolon kromatografisi yöntemi ile saflaştırması sonrası elde edilen enzim özütündeki protein miktarı 2,3265 µg/µl olarak hesaplandı. 5 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite deneyi sonucunda, 1 µl enzim özütünde GI aktivitesi $0,0053 \times 5 = 0,0265$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı.

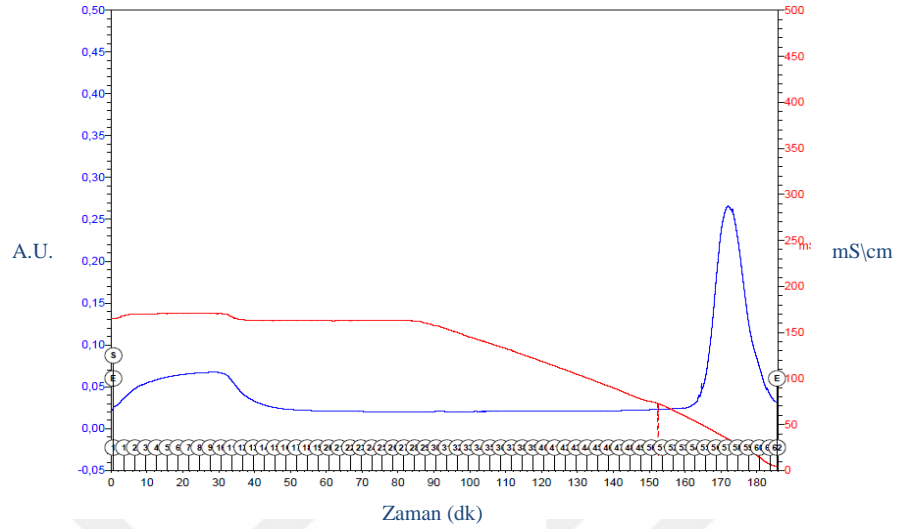


Şekil 47. V293I mutant enzimin iyon değişimi kolon kromatografisine ait protein miktarı ve GI aktivite grafikleri

3.5.4. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması

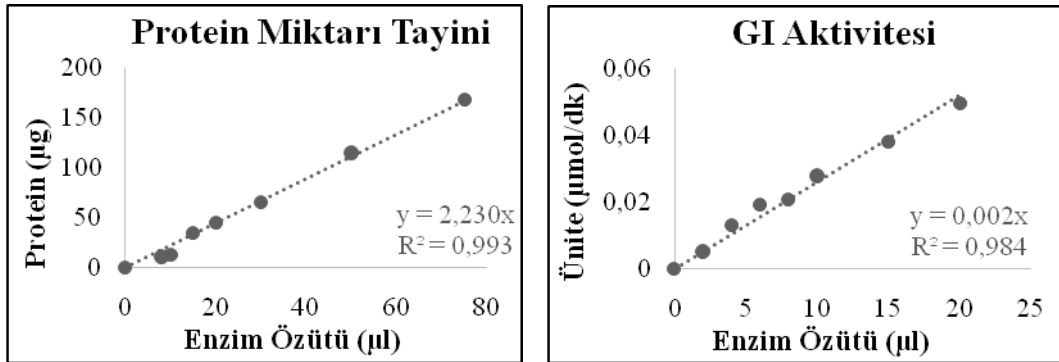
V293I mutant enzimin hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi yöntemi ile saflaştırmasına ait grafik yukarıda görülmektedir. Her tüpte yapılan GI aktivite

deneyleri sonucunda 55-60 nolu fraksiyonlarda GI aktivitesi tespit edildi. Saf enzim özütü olarak bu tüpler birleştirildi ve aktivite ve protein analizleri yapıldı.



Şekil 48. V293I mutant enzimin hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi

V293I mutant enzimin hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi yöntemi ile saflaştırması sonrası elde edilen enzim özütündeki protein miktarı 2,2305 µg/µl olarak hesaplandı. 10 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite deneyi sonucunda, 1 µl enzim özütünde GI aktivitesi $0,0026 \times 10 = 0,026$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı.



Şekil 49. V293I mutant enzimin hidrofobik etkileşim kolon kromatografisine ait protein miktarı ve GI aktivite grafikleri

3.5.5. Saflaştırma Tablosu

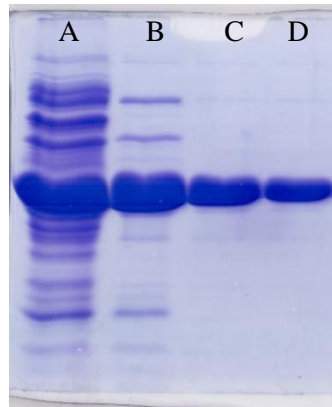
Tabloda da görüleceği üzere tüm saflaştırma uygulamaları başarılı olmuştur. Saflaştırma sonrası enzimin spesifik aktivitesi 4,019'dan 11,657 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein'e yükselirken enzim % 76,1 verim ile 2,90 kat saflaştırıldı.

Tablo 10. V398I mutant enzimin saflaştırma işlemine ait saflaştırma tablosu

Saflaştırma Basamakları	T.Hacim (ml)	Protein (mg/ml)	T.Protein (mg)	Aktivite ($\mu\text{mol/dk}/\mu\text{l}$)	T.Aktivite ($\mu\text{mol/dk}$)	S.Aktivite ($\mu\text{mol/dk/mg}$ protein)	Verim	Saflaştırma katı
Kaba E.	16,5	8,71	143,70	0,035	577,50	4,019	100,0	1
Isı Şoku	12,5	4,27	53,40	0,039	487,50	9,129	84,4	2,27
İyon değişim	18	2,33	41,88	0,027	477,00	11,391	82,6	2,83
Hidrofobik E.	16,9	2,23	37,70	0,026	439,4	11,657	76,1	2,90

3.5.6. V293I Mutant Enziminin Saflaştırılmasına Ait SDS-PAGE Analizi

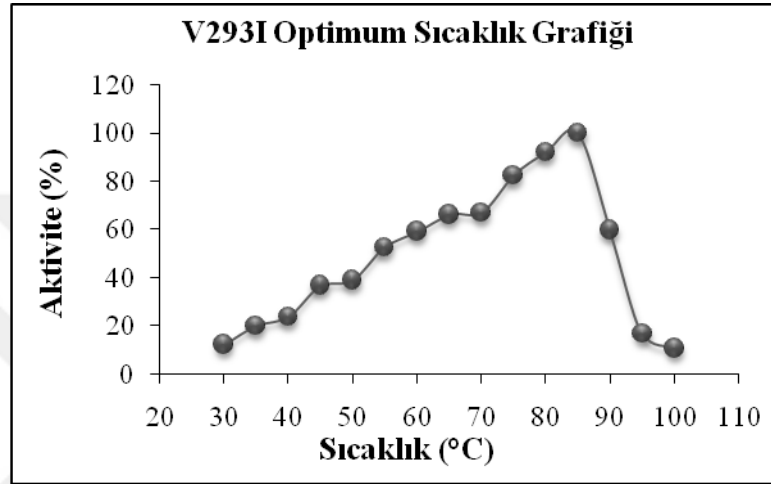
V293I saflaştırma uygulamaları sonrasında elde edilen özütlerin 20 μl kadarı SDS-PAGE'e yüklenerek yürütüldü (A: Kaba ekstrakt, B: Isı Şoku uygulaması sonrası enzim özütü, C: İyon değişim kolon kromatografisi sonrası enzim özütü, D: Hidrofobik kolon kromatografisi sonrası enzim özütü). Görüldüğü gibi saflaştırma sonrası GI büyük oranda saflaştırılmıştır.



Şekil 50. V293I mutant enzimin SDS-PAGE jel elektroforez görüntüsü

3.5.7. Optimum Sıcaklık

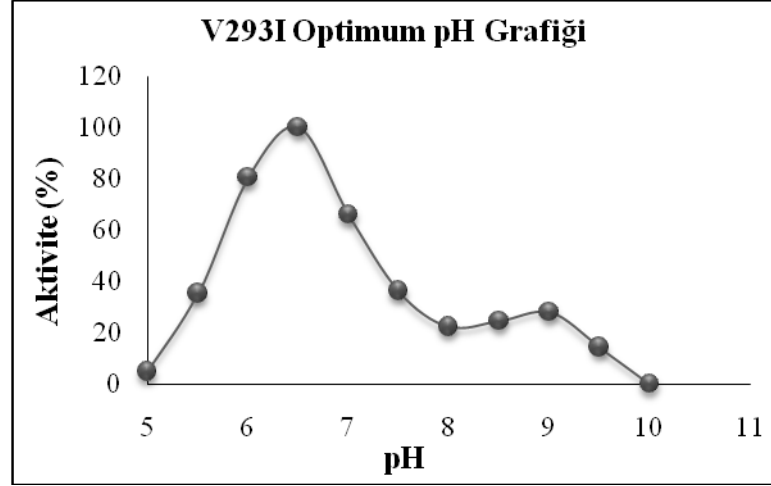
V293I mutant enzimin optimum çalışma sıcaklığını belirlemek için saf enzim özütü ile farklı sıcaklıklarda bir seri aktivite deneyi gerçekleştirildi. Grafikten de görüleceği üzere enzim en iyi 85°C'de çalışmaktadır. Mutasyon enzimin optimum çalışma sıcaklığında herhangi bir değişime neden olmamıştır.



Şekil 51. V293I mutant enzimin optimum sıcaklık grafiği

3.5.8. Optimum pH

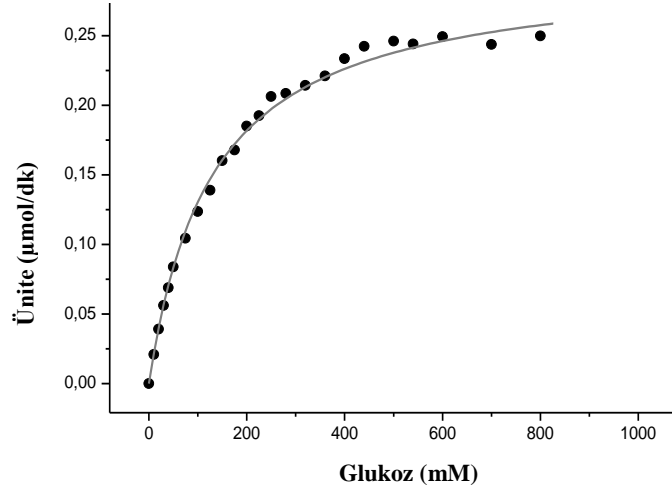
V293I mutant enziminin iyi çalıştığı pH değerini belirlemek için saf enzim özütü ile farklı pH değerlerinde bir seri aktivite deneyi gerçekleştirildi. Grafikten de görüleceği üzere enzim en iyi 6,5 pH'da çalışmaktadır. Mutasyon enzimin optimum pH değerinde herhangi bir değişime neden olmamıştır.



Şekil 52. V293I mutant enzimin optimum pH grafiği

3.5.9. Kinetik Çalışmalar

V293I mutant enziminin kinetik parametrelerini hesaplayabilmek için 1000 mM'a kadar arttırılan glukoz konsantrasyonu ile bir seri reaksiyon gerçekleştirildi. Glukoz izomeraz aktivitesi açığa çıkan fruktoz miktarının belirlenmesi ile hesaplandı. Ölçümler sırasında aynı derişimde glukoz içeren körler kullanılarak glukozdan kaynaklanan interferans sorunu ortadan kaldırıldı. Reaksiyonlarda 8,5 µl saf enzim özütü (18,955 µg protein) kullanıldı. Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerleri OriginPro 8.1 analiz programı kullanılarak çizilen Michaelis-Menten eğrisi ile belirlendi (R^2 : 0,99398). Programda yapılan analiz sonucunda enzimin K_m değeri $129,34 \pm 5,73$ mM V_{max} değeri ise $16,22 \pm 0,21$ µmol/dk/mg protein olarak hesaplandı. Bu veriler ile yapılan hesaplamalar sonucunda k_{cat} değeri ise 54,10 1/sn olarak hesaplandı. Katalitik etkinlik değeri olan k_{cat}/K_m değeri ise 0,418 olarak hesaplandı.

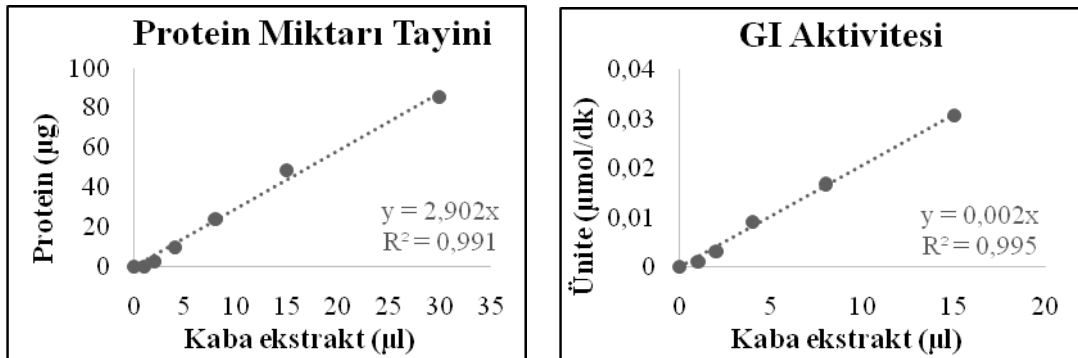


Şekil 53. V293I mutant enzime ait Michaelis-Menten grafiği

3.6. V32I Mutant Enziminin Saflaştırması ve Karakterizasyonu

3.6.1. Kaba Ekstrakt

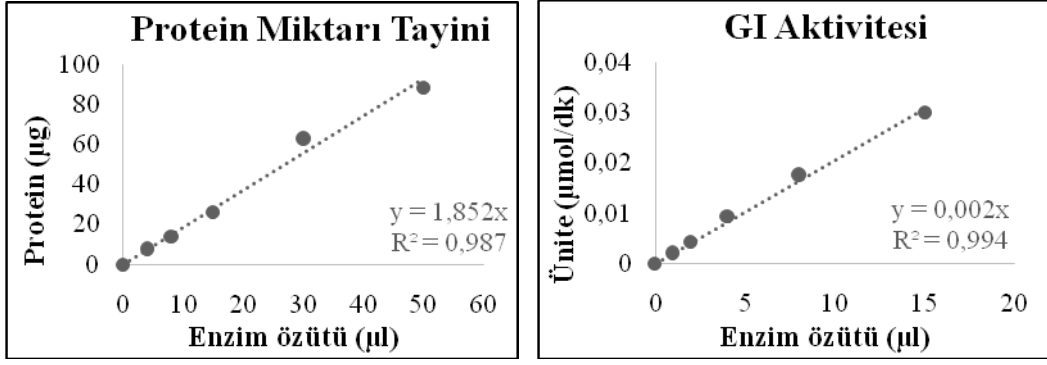
V32I'ya ait kaba ekstraktın protein miktarı 2,9027 µg/µl olarak hesaplandı. 10 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite deneyi sonucunda, 1 µl enzim özütünde GI aktivitesi 0,0021 x 10 = 0,021 µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı.



Şekil 54. V32I mutant enzim kaba ekstraktın protein miktarı ve GI aktivite grafiği

3.6.2. Isı Şoku Uygulaması

V32I mutant enzimin ısı uygulaması sonrası protein miktarı 1,8529 µg/µl olarak hesaplandı. 10 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite deneyi sonucunda, 1 µl enzim özütünde GI aktivitesi 0,0021 x 10 = 0,021 µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı.

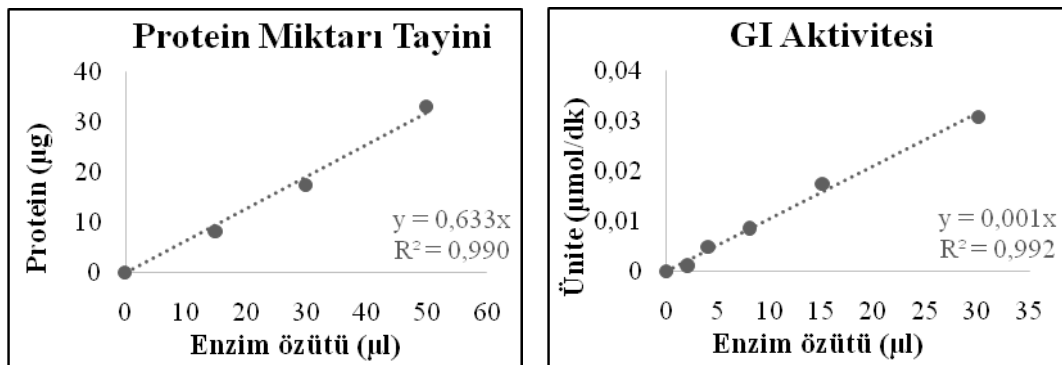


Şekil 55. V32I mutant enzimin ısı uygulaması protein miktarı ve GI aktivite grafikleri

3.6.3. İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması

V32I mutant enzimin saflaştırmasına ait iyon değişimi kolon kromatografisine hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi yöntemleri ile saflaştırma çalışmaları başarılı bir şekilde yapılmıştır. Fakat çalışmalara ait cihazdan elde edilen saflaştırma grafikleri kazara bilgisayardan silinmiştir. Enzime ait tüm çalışmalar yapılmış ve tüm analizler elimizde mevcuttur. Sadece grafikler eksiktir.

İyon değişimi kolon kromatografisisonrası her tüpte yapılan GI aktivite deneyleri sonucunda 29-34 nolu fraksiyonlarda GI aktivitesi tespit edildi. Bu tüpler birleştirilerek aktivite ve protein analizleri yapıldıktan sonra hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulamasına başlandı.



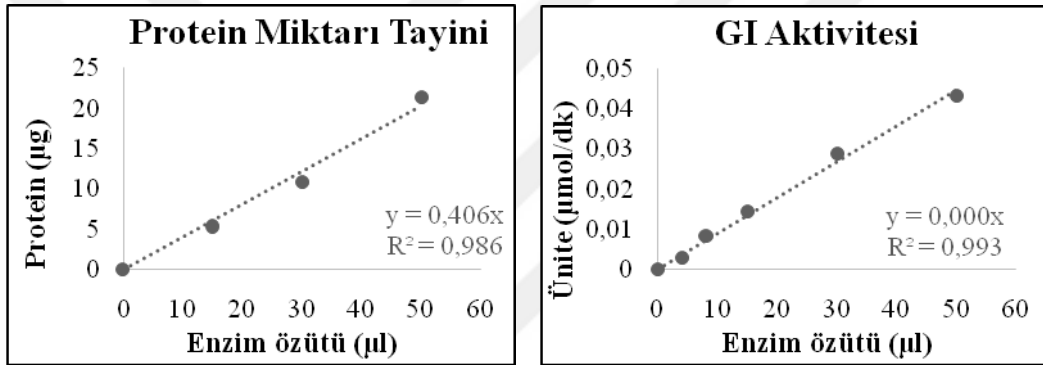
Şekil 56. V32I mutant enzimine iyon değişim kolon kromatografisine ait protein miktarı ve GI aktivite grafikleri

V32I mutant enzimin iyon değişimi kolon kromatografisi yöntemi ile saflaştırması sonrası elde edilen enzim özütündeki protein miktarı 0,6337 µg/µl olarak hesaplandı. 10

kat sulandırılarak yapılan GI aktivite deneyi sonucunda, 1 µl enzim özütünde GI aktivitesi $0,0011 \times 10 = 0,011 \mu\text{mol/dk}$ (Ünite) olarak hesaplandı.

3.6.4. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması

V32I mutant enzimin hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi yöntemi ile saflaştırmasına ait grafik yukarıda anlatılan sebeplerde elimizde bulunmamaktadır. Her tüpte yapılan GI aktivite deneyleri sonucunda 48-53 nolu fraksiyonlarda GI aktivitesi tespit edildi. Saf enzim özütü olarak bu tüpler birleştirildi ve aktivite ve protein analizleri yapıldı.



Şekil 57. V32I mutant enzimi hidrofobik etkileşim kolon kromatografisine ait protein miktarı ve GI aktivite grafikleri

V32I mutant enzimin hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi yöntemi ile saflaştırması sonrası elde edilen enzim özütündeki protein miktarı $0,4068 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ olarak hesaplandı. 10 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite deneyi sonucunda, 1 µl enzim özütünde GI aktivitesi $0,0009 \times 10 = 0,009 \mu\text{mol/dk}$ (Ünite) olarak hesaplandı.

3.6.5. Saflaştırma Tablosu

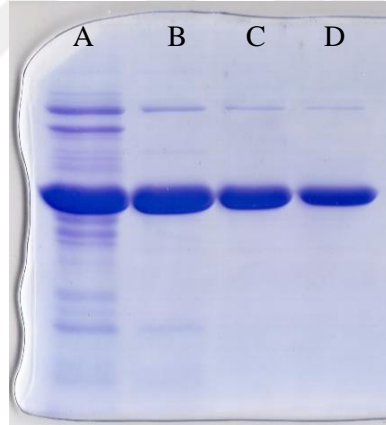
Tabloda da görüleceği üzere tüm saflaştırma uygulamaları başarılı olmuştur. Saflaştırma sonrası enzimin spesifik aktivitesi 7,235'ten $22,124 \mu\text{mol/dk/mg}$ protein'e yükselirken enzim % 60,8 verim ile 3,06 kat saflaştırıldı

Tablo 11. V32I mutant enzimin saflaştırma işlemine ait saflaştırma tablosu

Saflaştırma Basamakları	T.Hacim (ml)	Protein (mg/ml)	T.Protein (mg)	Aktivite ($\mu\text{mol/dk}/\mu\text{l}$)	T.Aktivite ($\mu\text{mol/dk}$)	S.Aktivite ($\mu\text{mol/dk}/\text{mg}$ protein)	Verim	Saflaştırma katı
Kaba E.	12,8	2,90	37,15	0,021	268,80	7,235	100,0	1
Isı Şoku	11,45	1,85	21,22	0,021	240,45	11,334	89,5	1,57
İyon değişim	21,6	0,63	13,69	0,011	237,60	17,358	88,4	2,40
Hidrofobik E.	18,15	0,41	7,38	0,009	163,35	22,124	60,8	3,06

3.6.6. V32I Mutant Enziminin Saflaştırılmasına Ait SDS-PAGE Analizi

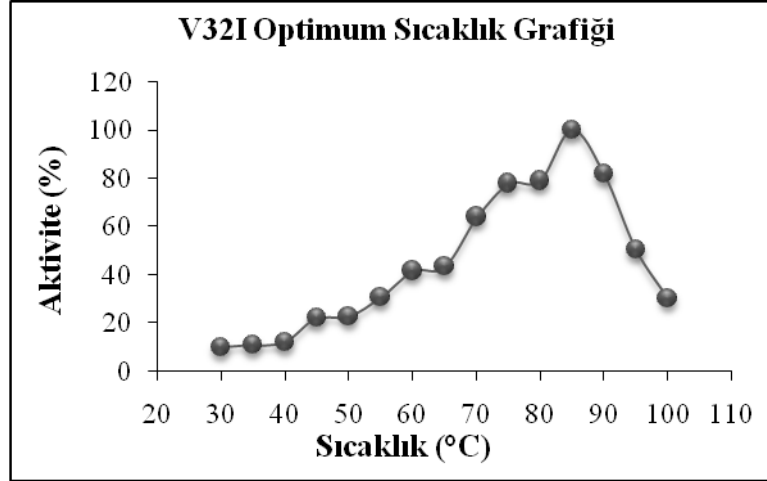
V32I saflaştırma uygulamaları sonrasında elde edilen özütlerin 20 μl kadarı SDS-PAGE'e yüklenerek yürütüldü (A: Kaba ekstrakt, B: Isı Şoku uygulaması sonrası enzim özütü, C: İyon değişim kolon kromatografisi sonrası enzim özütü, D: Hidrofobik kolon kromatografisi sonrası enzim özütü). Görüldüğü gibi saflaştırma sonrası GI büyük oranda saflaştırılmıştır.



Şekil 58. V32I mutant enzimin SDS-PAGE jel elektroforez görüntüsü

3.6.7. Optimum Sıcaklık

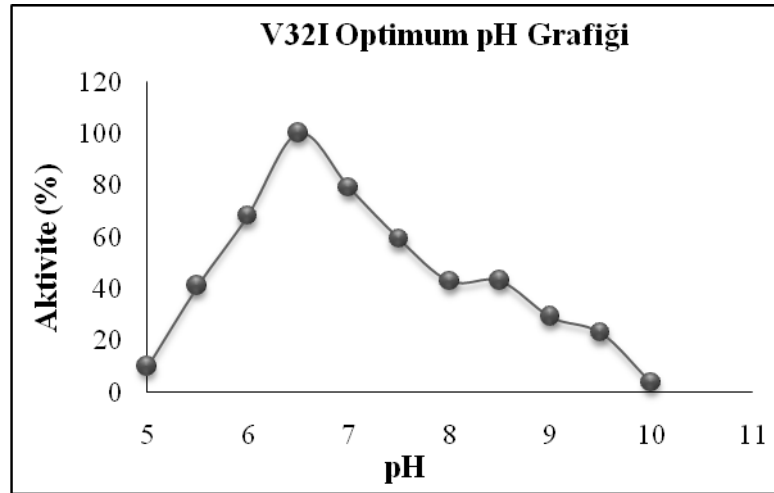
V32I mutant enzimin optimum çalışma sıcaklığını belirlemek için saf enzim özütü ile farklı sıcaklıklarda bir seri aktivite deneyi gerçekleştirildi. Grafikten de görüleceği üzere enzim en iyi 85°C'de çalışmaktadır. Mutasyon enzimin optimum çalışma sıcaklığında herhangi bir değişime neden olmamıştır.



Şekil 59. V32I mutant enzimin optimum sıcaklık grafiği

3.6.8. Optimum pH

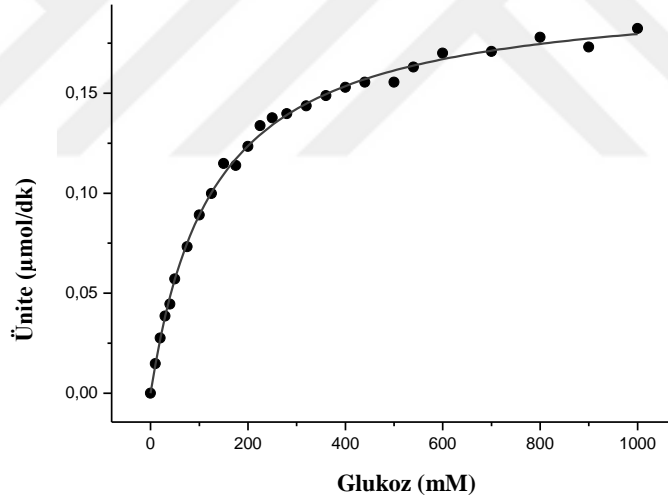
V32I mutant enziminin en iyi çalıştığı pH değerini belirlemek için saf enzim özütü ile farklı pH değerlerinde bir seri aktivite deneyi gerçekleştirildi. Grafikten de görüleceği üzere enzim en iyi 6,5 pH'da çalışmaktadır. Mutasyon enzimin optimum pH değerinde herhangi bir değişime neden olmamıştır.



Şekil 60. V32I mutant enzimin optimum pH grafiği

3.6.9. Kinetik Çalışmalar

V32I mutant enziminin kinetik parametrelerini hesaplayabilmek için 1000 mM'a kadar arttırılan glukoz konsantrasyonu ile bir seri reaksiyon gerçekleştirildi. Glukoz izomeraz aktivitesi açığa çıkan fruktoz miktarının belirlenmesi ile hesaplandı. Ölçümler sırasında aynı derişimde glukoz içeren körler kullanılarak glukozdan kaynaklanan interferans sorunu ortadan kaldırıldı. Reaksiyonlarda 30 µl saf enzim özütü (12,300 µg protein) kullanıldı. Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerleri OriginPro 8.1 analiz programı kullanılarak çizilen Michaelis-Menten eğrisi ile belirlendi (R^2 : 0,99705). Programda yapılan analiz sonucunda enzimin K_m değeri $127,40 \pm 3,91$ mM V_{max} değeri ise $16,46 \pm 0,15$ µmol/dk/mg protein olarak hesaplandı. Bu veriler ile yapılan hesaplamalar sonucunda k_{cat} değeri ise 54,91 1/sn olarak hesaplandı. Katalitik etkinlik değeri olan k_{cat}/K_m değeri ise 0,431 olarak hesaplandı.

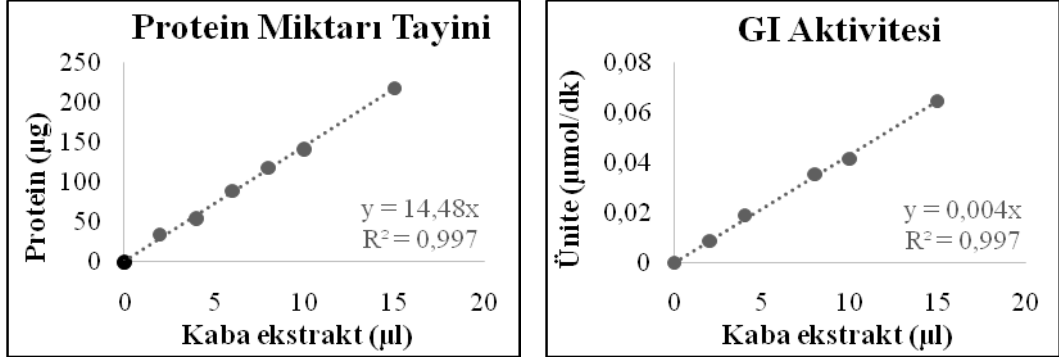


Şekil 61. V32I mutant enzime ait Michaelis-Menten grafiği

3.7. E373K Mutant Enziminin Saflaştırması ve Karakterizasyonu

3.7.1. Kaba Ekstrakt

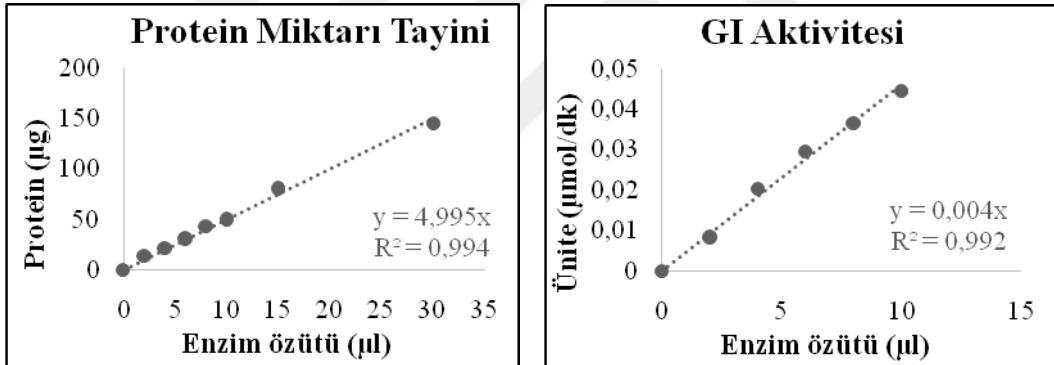
E373K'ya ait kaba ekstraktın protein miktarı 14,482 µg/µl olarak hesaplandı. 10 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite deneyi sonucunda, 1 µl enzim özütünde GI aktivitesi $0,0043 \times 10 = 0,043$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı.



Şekil 62. E373K mutant enzim kaba ekstraktın protein miktarı ve GI aktivite grafiği

3.7.2. Isı Şoku Uygulaması

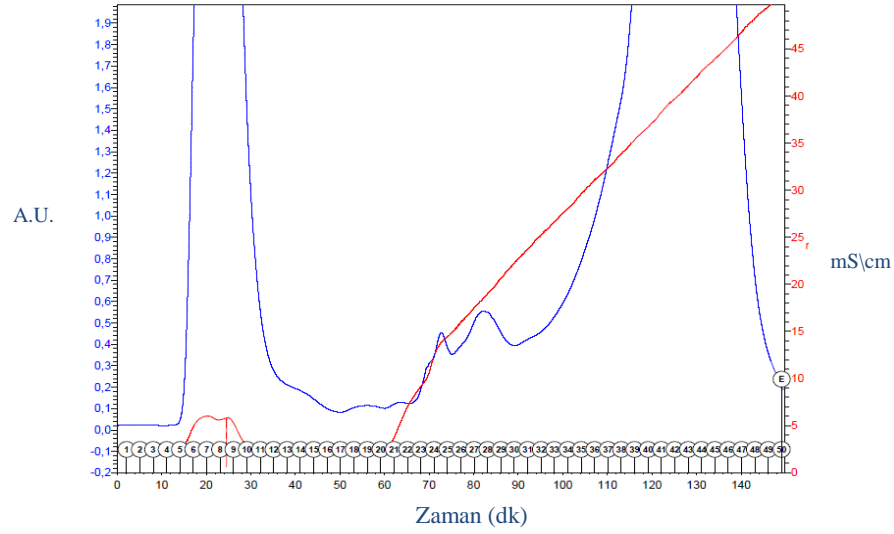
E373K mutant enzimin ısı uygulaması sonrası protein miktarı 4,9954 µg/µl olarak hesaplandı. 10 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite deneyi sonucunda, 1 µl enzim özütünde GI aktivitesi 0,0046 x 10 = 0,046 µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı.



Şekil 63. E373K mutant enzimin ısı uygulaması protein miktarı ve GI aktivite grafikleri

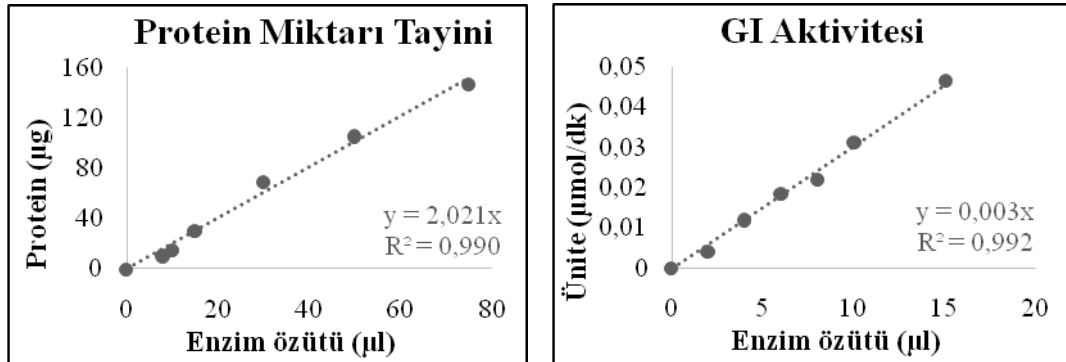
3.7.3. İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması

E373K mutant enzimin iyon değişimi kolon kromatografisi yöntemi ile saflaştırmasına ait grafik aşağıda görülmektedir. Her tüpte yapılan GI aktivite deneyleri sonucunda 26-31 nolu fraksiyonlarda GI aktivitesi tespit edildi. Bu tüpler birleştirilerek aktivite ve protein analizleri yapıldıktan sonra hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulamasına başlandı.



Şekil 64. E373K mutant enzimine ait saflaştırmanın iyon değişim kolon kromatografisi

E373K mutant enzimin iyon değişimi kolon kromatografisi yöntemi ile saflaştırması sonrası elde edilen enzim özütündeki protein miktarı 2,0213 µg/µl olarak hesaplandı. 10 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite deneyi sonucunda, 1 µl enzim özütünde GI aktivitesi $0,003 \times 10 = 0,03 \mu\text{mol/dk}$ (Ünite) olarak hesaplandı.

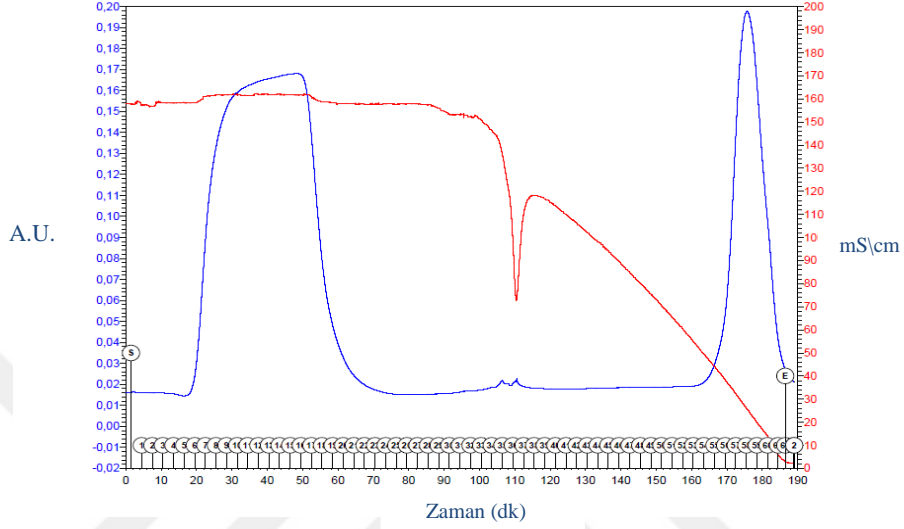


Şekil 65. E373K mutant enzimin iyon değişimi kolon kromatografisi protein miktarı tayini ve GI aktivite grafikleri

3.7.4. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması

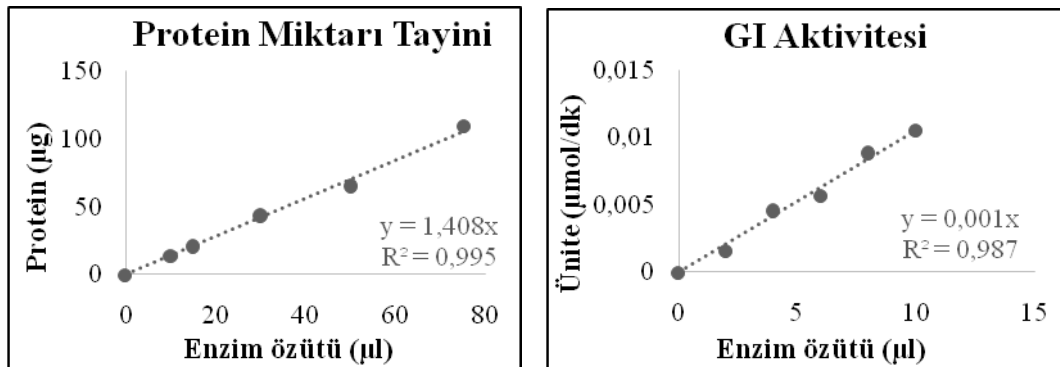
E373K mutant enzimin hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi yöntemi ile saflaştırmasına ait grafik yukarıda görülmektedir. Her tüpte yapılan GI aktivite deneyleri sonucunda 56-62 nolu fraksiyonlarda GI aktivitesi tespit edildi. Saf enzim özütü olarak bu tüpler birleştirildi ve aktivite ve protein analizleri yapıldı. İyon

konsantrasyonun 33-37 nolu fraksiyonlar arasında düşüş göstermesinin sebebi deney esnasında cihaz kablolarından birisinin kazara çıkması sonucudur. Her hangi bir protein çıkış anına denk gelmediği için sonrasında yapılan analizlerde herhangi bir problem oluşturmamıştır.



Şekil 66. E373K mutant enzime ait saflaştırmanın hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi

E373K mutant enzimin hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi yöntemi ile saflaştırması sonrası elde edilen enzim özütündeki protein miktarı $1,4088 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ olarak hesaplandı. 20 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite deneyi sonucunda, $1 \mu\text{l}$ enzim özütünde GI aktivitesi $0,0011 \times 20 = 0,022 \mu\text{mol}/\text{dk}$ (Ünite) olarak hesaplandı.



Şekil 67. E373K mutant enzimi hidrofobik etkileşim kolon kromatografisine ait protein miktarı ve GI aktivite grafikleri

3.7.5. Saflaştırma Tablosu

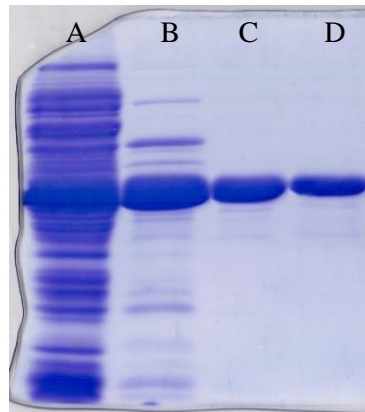
Tabloda da görüleceği üzere tüm saflaştırma uygulamaları başarılı olmuştur. Saflaştırma sonrası enzimin spesifik aktivitesi 2,969'dan 15,616 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein'e yükselirken enzim % 63,7 verim ile 5,26 kat saflaştırıldı.

Tablo 12. E373K mutant enzimin saflaştırma işlemine ait saflaştırma tablosu

Saflaştırma Basamakları	T.Hacim (ml)	Protein (mg/ml)	T.Protein (mg)	Aktivite ($\mu\text{mol/dk}/\mu\text{l}$)	T.Aktivite ($\mu\text{mol/dk}$)	S.Aktivite ($\mu\text{mol/dk/mg}$ protein)	Verim	Saflaştırma katı
Kaba E.	13,5	14,48	195,51	0,043	580,50	2,969	100,0	1
Isı Şoku	11,0	5,00	54,95	0,046	506,00	9,208	87,2	3,10
İyon değişim	14,7	2,02	29,71	0,030	441,00	14,842	76,0	5,00
Hidrofobik E.	16,8	1,41	23,67	0,022	369,6	15,616	63,7	5,26

3.7.6. E373K Mutant Enziminin Saflaştırılmasına Ait SDS-PAGE Analizi

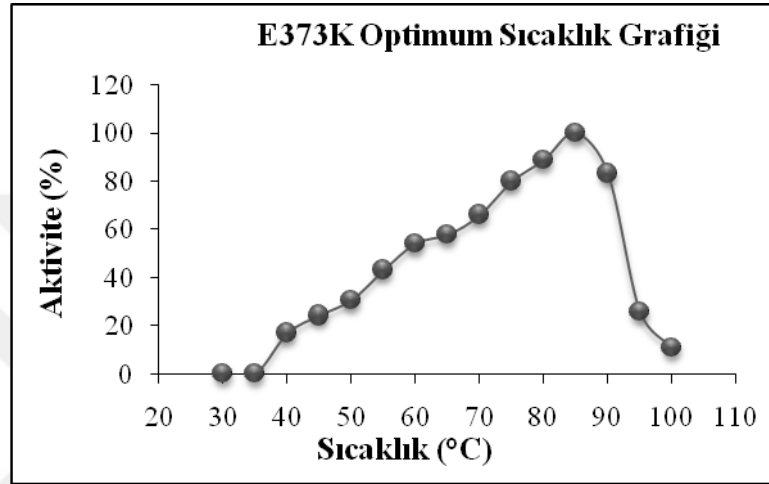
E373K saflaştırma uygulamaları sonrasında elde edilen özütlerin 20 μl kadarı SDS-PAGE'e yüklenerek yürütüldü (A: Kaba ekstrakt, B: Isı Şoku uygulaması sonrası enzim özütü, C: İyon değişim kolon kromatografisi sonrası enzim özütü, D: Hidrofobik kolon kromatografisi sonrası enzim özütü). Görüldüğü gibi saflaştırma sonrası GI büyük oranda saflaştırılmıştır.



Şekil 68. E373K mutant enzimin SDS-PAGE jel elektroforez görüntüsü

3.7.7. Optimum Sıcaklık

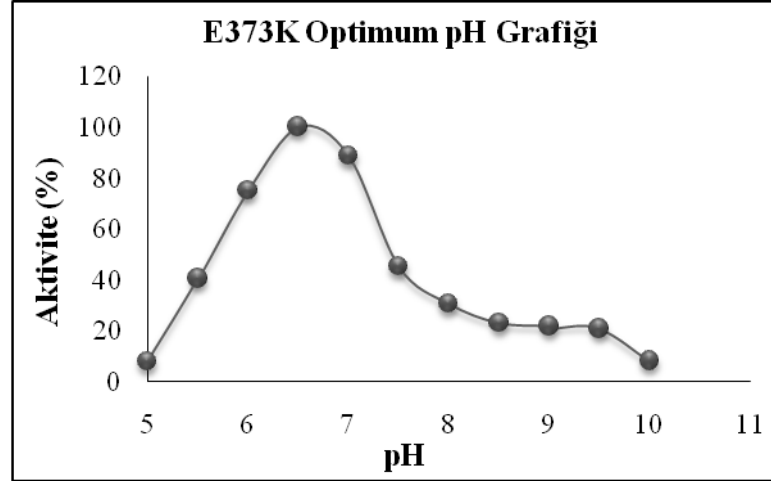
E733K mutant enzimin optimum çalışma sıcaklığını belirlemek için saf enzim özütü ile farklı sıcaklıklarda bir seri aktivite deneyi gerçekleştirildi. Grafikten de görüleceği üzere enzim en iyi 85°C'de çalışmaktadır. Mutasyon enzimin optimum çalışma sıcaklığında herhangi bir değişime neden olmamıştır.



Şekil 69. E733K mutant enzimin optimum sıcaklık grafiği

3.7.8. Optimum pH

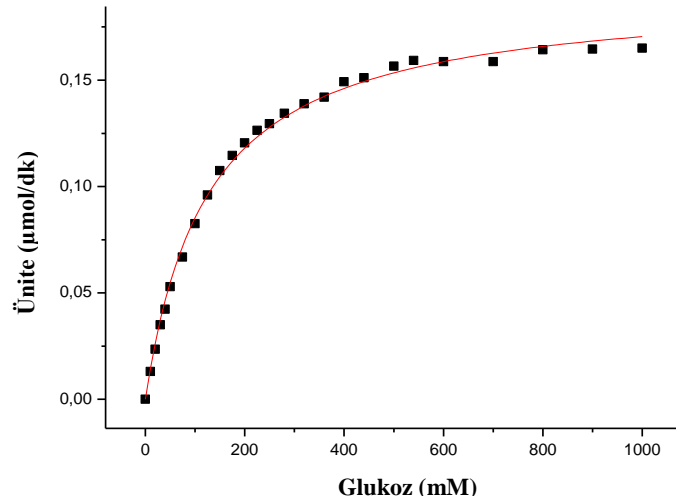
E733K mutant enziminin iyi çalıştığı pH değerini belirlemek için saf enzim özütü ile farklı pH değerlerinde bir seri aktivite deneyi gerçekleştirildi. Grafikten de görüleceği üzere enzim en iyi 6,5 pH'da çalışmaktadır. Mutasyon enzimin optimum pH değerinde herhangi bir değişime neden olmamıştır.



Şekil 70. E733K mutant enzimin optimum pH grafiği

3.7.9. Kinetik Çalışmalar

E373K mutant enziminin kinetik parametrelerini hesaplayabilmek için 1000 mM'a kadar arttırılan glukoz konsantrasyonu ile bir seri reaksiyon gerçekleştirildi. Glukoz izomeraz aktivitesi açığa çıkan fruktoz miktarının belirlenmesi ile hesaplandı. Ölçümler sırasında aynı derişimde glukoz içeren körler kullanılarak glukozdan kaynaklanan interferans sorunu ortadan kaldırıldı. Reaksiyonlarda 7,5 µl saf enzim özütü (10,575 µg protein) kullanıldı. Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerleri OriginPro 8.1 analiz programı kullanılarak çizilen Michaelis-Menten eğrisi ile belirlendi (R^2 : 0,99627). Programda yapılan analiz sonucunda enzimin K_m değeri $124,82 \pm 4,35$ mM V_{max} değeri ise $18,24 \pm 0,18$ µmol/dk/mg protein olarak hesaplandı. Bu veriler ile yapılan hesaplamalar sonucunda k_{cat} değeri ise 60,86 1/sn olarak hesaplandı. Katalitik etkinlik değeri olan k_{cat}/K_m değeri ise 0,488 olarak hesaplandı.

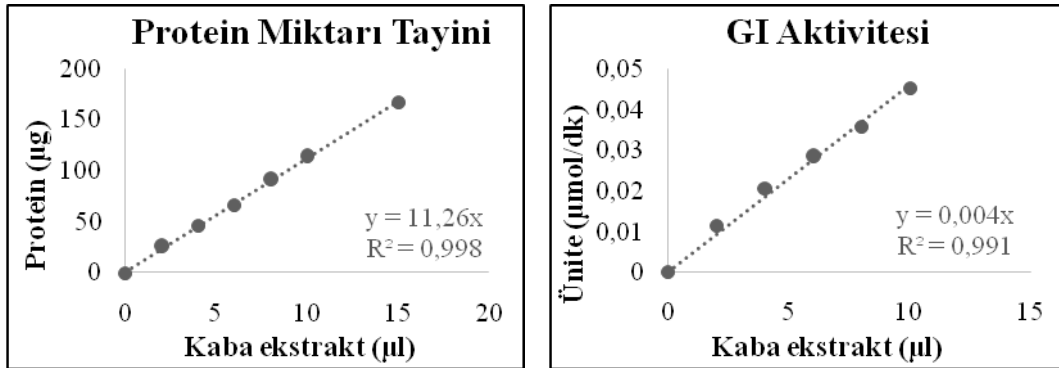


Şekil 71. E373K mutant enzime ait Michaelis-Menten grafiği

3.8. V380I Mutant Enziminin Saflaştırması ve Karakterizasyonu

3.8.1. Kaba Ekstrakt

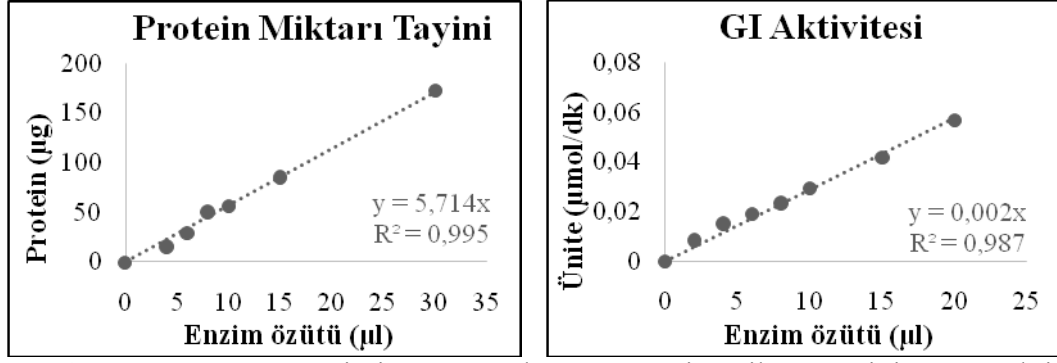
V380I'ya ait kaba ekstraktın protein miktarı 11,262 µg/µl olarak hesaplandı. 10 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite deneyi sonucunda, 1 µl enzim özütünde GI aktivitesi $0,0046 \times 10 = 0,046$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı.



Şekil 72. V380I'ya ait kaba ekstraktın protein miktarı ve GI aktivite grafikleri

3.8.2. Isı Şoku Uygulaması

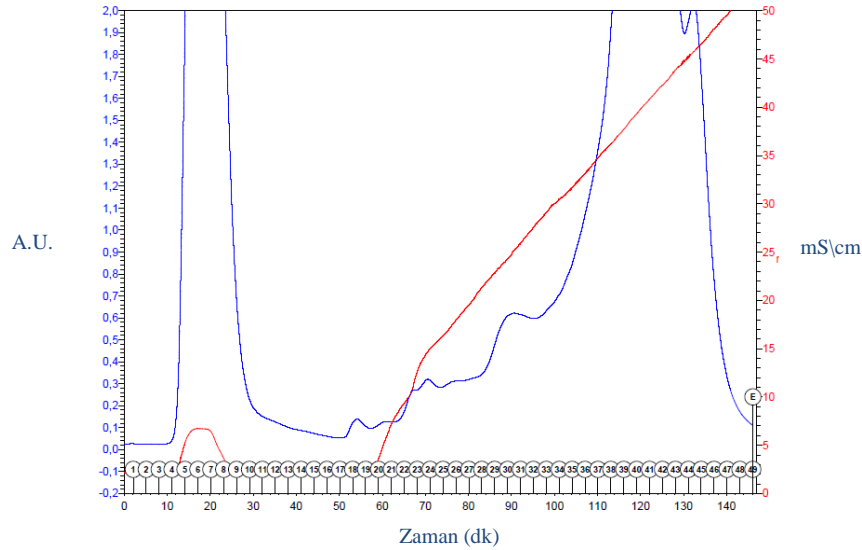
V380I mutant enzimin ısı uygulaması sonrası protein miktarı 5,7142 µg/µl olarak hesaplandı. 10 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite deneyi sonucunda, 1 µl enzim özütünde GI aktivitesi $0,0029 \times 10 = 0,029$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı.



Şekil 73. V380I mutant enzimin ısı uygulaması protein miktarı tayini ve GI aktivite grafikleri

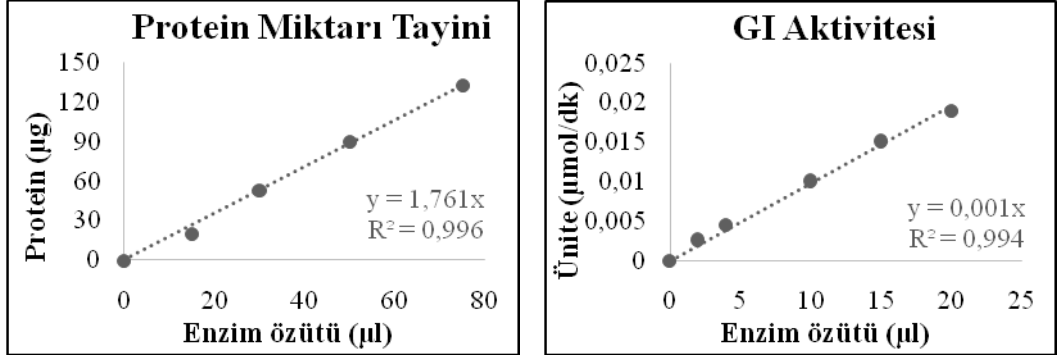
3.8.3. İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması

V380I mutant enzimin iyon değişimi kolon kromatografisi yöntemi ile saflaştırmasına ait grafik aşağıda görülmektedir. Her tüpte yapılan GI aktivite deneyleri sonucunda 29-34 nolu fraksiyonlarda GI aktivitesi tespit edildi. Bu tüpler birleştirilerek aktivite ve protein analizleri yapıldıktan sonra hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulamasına başlandı.



Şekil 74. V380I mutant enzimine ait saflaştırmanın iyon değişim kolon kromatografisi

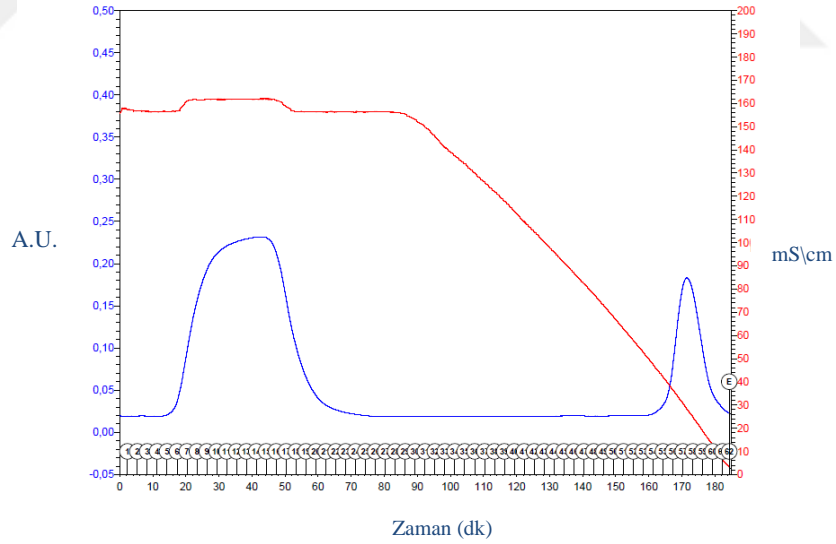
V380I mutant enzimin iyon değişimi kolon kromatografisi yöntemi ile saflaştırması sonrası elde edilen enzim özütündeki protein miktarı 1,7613 µg/µl olarak hesaplandı. 10 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite deneyi sonucunda, 1 µl enzim özütünde GI aktivitesi $0,001 \times 10 = 0,01$ µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı.



Şekil 75. V380I mutant enzimin iyon değişimi kolon kromatografisi protein miktarı ve GI aktivite grafikleri

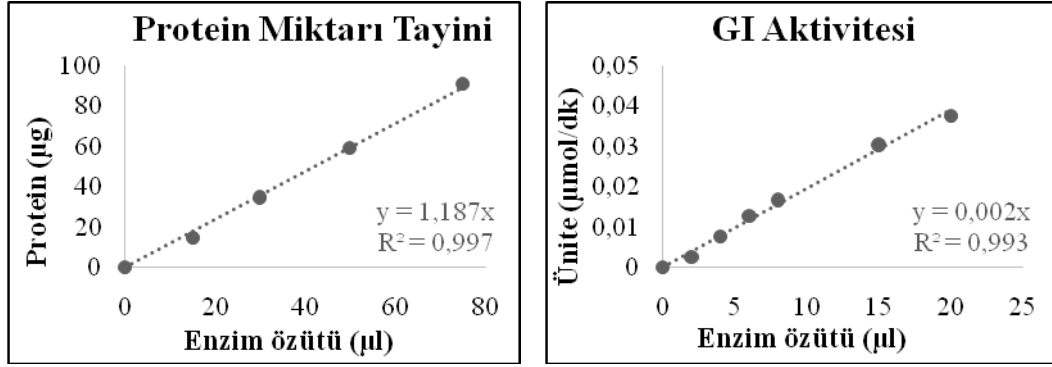
3.8.4. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması

V380I mutant enzimin hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi yöntemi ile saflaştırmasına ait grafik aşağıda görülmektedir. Her tüpte yapılan GI aktivite deneyleri sonucunda 56-61 nolu fraksiyonlarda GI aktivitesi tespit edildi. Saf enzim özütü olarak bu tüpler birleştirildi ve aktivite ve protein analizleri yapıldı.



Şekil 76. V380I mutant enzimine ait saflaştırmanın hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi

V380I mutant enzimin hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi yöntemi ile saflaştırması sonrası elde edilen enzim özütündeki protein miktarı 1,1878 µg/µl olarak hesaplandı. 5 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite deneyi sonucunda, 1 µl enzim özütünde GI aktivitesi 0,002 x 5 = 0,01 µmol/dk (Ünite) olarak hesaplandı.



Şekil 77. V380I mutant enzimin hidrofobik kolon kromatografisi protein miktarı tayini ve GI aktivite grafikleri

3.8.5. Saflaştırma Tablosu

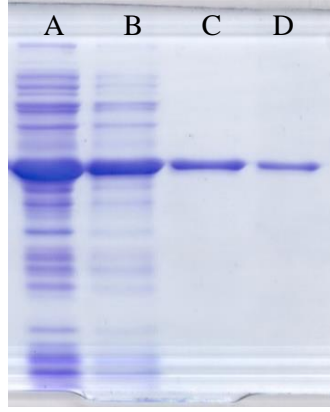
Tabloda da görüleceği üzere tüm saflaştırma uygulamaları başarılı olmuştur. Saflaştırma sonrası enzimin spesifik aktivitesi 4,085'den 8,419 µmol/dk/mg protein'e yükselirken enzim % 34,2 verim ile 2,06 kat saflaştırıldı.

Tablo 13. V380I mutant enzimin saflaştırma 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 E.	10,50	11,26	118,25	0,046	483,00	4,085	100,0	1
Isı Şoku	8,80	5,71	50,28	0,029	255,20	5,075	52,8	1,24
İyon değişim	17,00	1,76	29,94	0,010	170,00	5,678	35,2	1,39
Hidrofobik E.	16,50	1,19	19,60	0,010	165	8,419	34,2	2,06

3.8.6. V380I Mutant Enziminin Saflaştırılmasına Ait SDS-PAGE Analizi

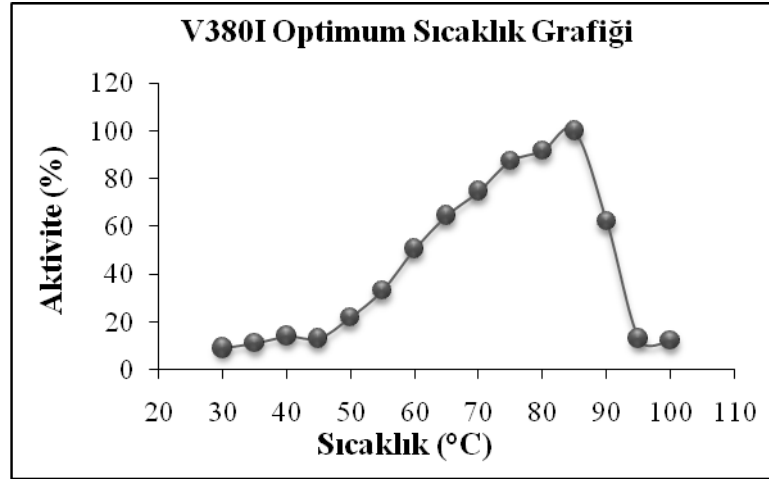
V380I saflaştırma uygulamaları sonrasında elde edilen özütlerin 20 µl kadarı SDS-PAGE'e yüklenerek yürütüldü (A: Kaba ekstrakt, B: Isı Şoku uygulaması sonrası enzim özütü, C: İyon değişim kolon kromatografisi sonrası enzim özütü, D: Hidrofobik kolon kromatografisi sonrası enzim özütü). Görüldüğü gibi saflaştırma sonrası GI büyük oranda saflaştırılmıştır.



Şekil 78. V380I mutant enzimin SDS-PAGE jel elektroforez görüntüsü

3.8.7. Optimum Sıcaklık

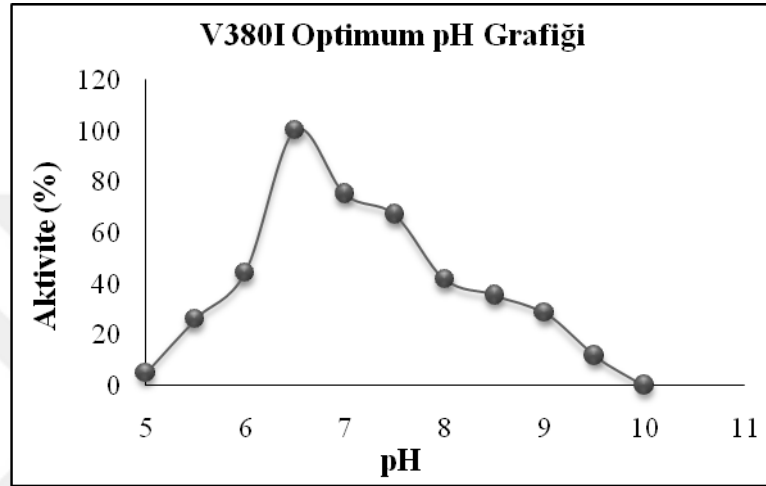
V380I mutant enzimin optimum çalışma sıcaklığını belirlemek için saf enzim özütü ile farklı sıcaklıklarda bir seri aktivite deneyi gerçekleştirildi. Grafikten de görüleceği üzere enzim en iyi 85°C’de çalışmaktadır. Mutasyon enzimin optimum çalışma sıcaklığında herhangi bir değişime neden olmamıştır.



Şekil 79. V380I mutant enzimin optimum sıcaklık grafiği

3.8.8. Optimum pH

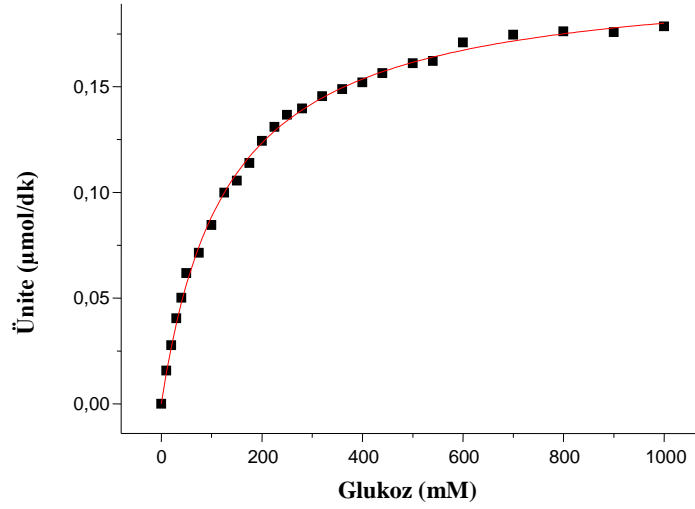
V380I mutant enziminin en iyi çalıştığı pH değerini belirlemek için saf enzim özütü ile farklı pH değerlerinde bir seri aktivite deneyi gerçekleştirildi. Grafikten de görüleceği üzere enzim en iyi 6,5 pH'da çalışmaktadır. Mutasyon enzimin optimum pH değerinde herhangi bir değişime neden olmamıştır.



Şekil 80. V380 mutant enzimin optimum pH grafiği

3.8.9. Kinetik Çalışmalar

V380I mutant enziminin kinetik parametrelerini hesaplayabilmek için 1000 mM'a kadar arttırılan glukoz konsantrasyonu ile bir seri reaksiyon gerçekleştirildi. Glukoz izomeraz aktivitesi açığa çıkan fruktoz miktarının belirlenmesi ile hesaplandı. Ölçümler sırasında aynı derişimde glukoz içeren körler kullanılarak glukozdan kaynaklanan interferans sorunu ortadan kaldırıldı. Reaksiyonlarda 10 µl saf enzim özütü (11,900 µg protein) kullanıldı. Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerleri OriginPro 8.1 analiz programı kullanılarak çizilen Michaelis-Menten eğrisi ile belirlendi (R^2 : 0,9977). Programda yapılan analiz sonucunda enzimin K_m değeri $129,79 \pm 3,49$ mM V_{max} değeri ise $17,09 \pm 0,14$ µmol/dk/mg protein olarak hesaplandı. Bu veriler ile yapılan hesaplamalar sonucunda k_{cat} değeri ise 57,03 1/sn olarak hesaplandı. Katalitik etkinlik değeri olan k_{cat}/K_m değeri ise 0,439 olarak hesaplandı.



Şekil 81. V380I mutant enzime ait Michaelis-Menten grafiği

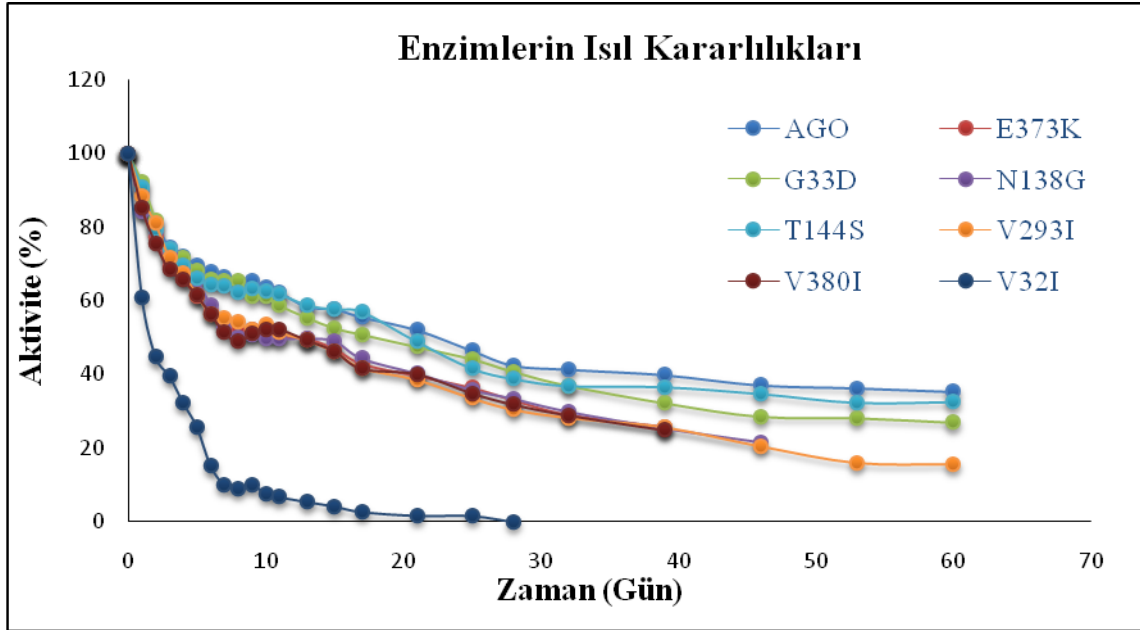
3.9. Enzimlerin Isıl Kararlılık Çalışmaları

Mutant enzimlerin ısıl kararlılığını belirlemek için saflaştırılan enzim özütleri özellikle endüstriyel uygulamalarda tercih edilen 60°C’de inkübe edildi. Farklı zaman aralıklarında bu örneklerden enzim alınarak, optimum çalışma şartlarında (50 mM glukoz varlığında 250 µl son hacimde ve 85°C’de 30 dk boyunca pH 6,5 olan MOPS tamponunda) glukoz izomeraz aktivite reaksiyonları gerçekleştirildi. Reaksiyon sonrası GI aktivite ölçümü yapılarak ve enzimin kalan aktivitesi hesaplandı. Buharlaştırma problemini ortadan kaldırmak için enzim özütleri contalı ve vidalı kapaklı santrifüj tüplerinde 60°C’de inkübe edilmiştir.

Her 24 saatte bir enzimlerin GI aktivite ölçümleri yapıldı. Enzimlerin aktivitelerinin uzun süre düşüş göstermemesi nedeniyle 11. günden sonra ölçümler her 48 saatte bir, 17. günden sonra 36 saatte bir, 21. günden sonra 48 saatte bir ve 32. günden sonraki günler haftada bir örnekler alınmaya başlandı. Grafikten de anlaşılacağı üzere V32I mutasyonu enzimin ısıl kararlılığında düşüşe sebep olmuş ve 2. günün sonunda enzim yarılanma ömrüne ulaşmıştır. Enzim 28. günün sonunda aktivitesi tamamen bitmiştir.

N138G, E373K, V380I ve V293I mutasyonları ise AgoGI ile kıyaslandığında ısıl kararlılıkta çok az bir düşüşe sebep olmaktadır. T144S ve G33D mutasyonları ise AgoGI'nın ısıl kararlılığında herhangi bir etki yapmamış gibi görülmektedir.

Deneylerin bu kadar uzun süreceği öngörülmediği için etüve ayrılan örnekler tükenmiştir. V380I ve E373K 39. gün sonunda, N138G 46. gün sonunda ve diğer enzimler ise 60. gün sonunda tükendiği için deneyler sonlandırılmıştır



Şekil 82. Mutasyon enzimlerin ısıl kararlılık grafiği

4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

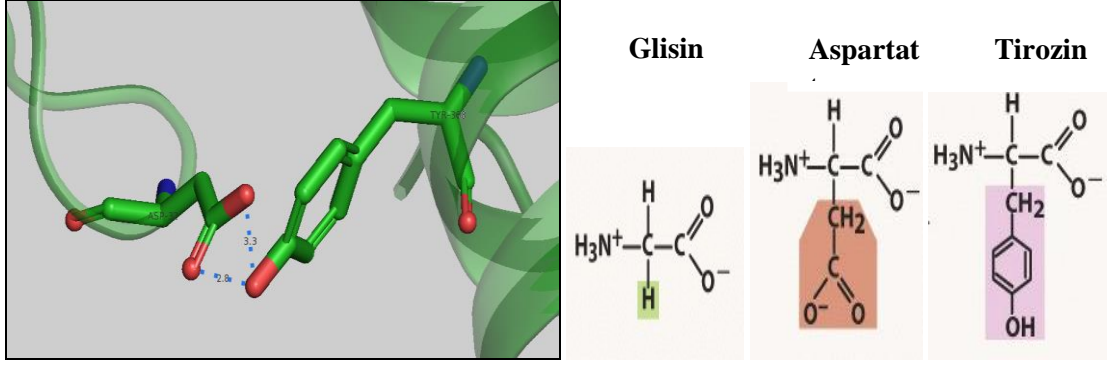
Anoxybacillus gonensis G2^T glukoz izomerazı hem doğal hücreden izole edilmiş hem de pET-28a(+) ekspresyon vektörüne klonlanarak bu vektöre pETG2GI ismi verilmiştir. pETG2GI, konak hücre olan *E. coli* BL21(DE3) suşu içerisine aktarılarak ekspresyonda kullanılmıştır.

GI, glukozu fruktoza izomerize etmesi sebebiyle endüstriyel alanda, özellikle HFCS üretiminde ticari bir öneme sahiptir. GI kullanımını oldukça pahalıdır. Çünkü bu enzim hücre içi bir enzimdir ve glukozla ilgisinin düşük olması sebebiyle (yüksek K_m), reaksiyonlarda çok yüksek miktarlarda enzim kullanımına ihtiyaç vardır. Bu nedenle GI enzimini üretiminin maliyetini azaltmak ve biyokimyasal ve kinetik parametrelerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Enzimin ısıl kararlılığında artırılması endüstriyel kullanım alanlarında artışa neden olacaktır. Bu yüzden kritik görülen yedi noktada mutasyonlar meydana getirildi. G33D, V32I, E373K, V293I, V380I, N138G, T144S mutasyonları ile GI enziminin biyokimyasal özellikleri ve kinetik parametreleri çalışmaları yapıldı. Mutant enzimlerin kinetik parametreleri incelendi ve doğal enzimle olan karşılaştırılması Tablo 14' de verildi.

Tablo 14. AgoGI ve mutant enzimlerin kinetik parametrelerinin karşılaştırılması

	K_m mM	V_{max} (μ mol/dk/mg protein)	k_{cat} (1/sn)	k_{cat}/K_m
AgoGI	124,45 \pm 2,99	16,97 \pm 0,12	56,63	0,455
G33D	128,44 \pm 4,89	17,81 \pm 0,27	59,42	0,463
V32I	127,40 \pm 3,91	16,46 \pm 0,15	54,91	0,431
E373K	124,82 \pm 4,35	18,24 \pm 0,18	60,86	0,488
V293I	129,34 \pm 5,73	16,22 \pm 0,21	54,10	0,418
V380I	129,79 \pm 3,49	17,09 \pm 0,14	57,03	0,439
N138G	131,09 \pm 2,67	44,24 \pm 0,27	147,60	1,126
T144S	165,83 \pm 3,75	34,59 \pm 0,26	115,41	0,696

Mutasyonların üç boyutlu görünümüleri Pymol enzim modelleme programı ile belirlendi. Bu çalışmaların sonunda mutant enzimlerin gerçekleştiği yerler ve sonuçların değerlendirmeleri aşağıda anlatılmıştır.

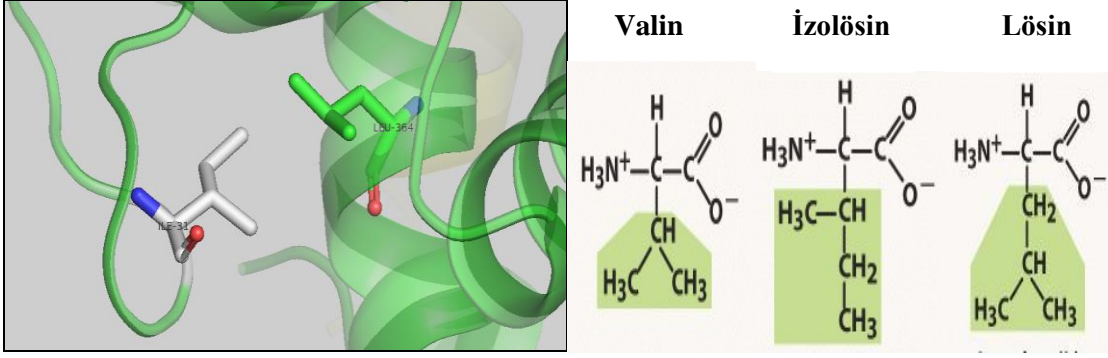


Şekil 83. G33D mutasyonuna ait üç boyutlu görüntüsü ve amino asitlerin yapıları

A.gonensis GI'sında 33. glisin (G) amino asidi aspartat (D) amino asidi ile değiştirilerek G33D mutasyonu gerçekleştirildi. Glisin yüksüz ve hidrofobik özellik gösteren bir amino asittir. Aspartat ise negatif yüklü ve hidrofilik özellik gösteren bir amino asittir. Aspartat aminoasidi glisine göre daha uzun yan zincire sahip amino asittir. Bu bölgenin hemen karşısındaki α -heliks tabakasında 368. amino asit olan hidrofobik tirozin (Y) amino asidi bulunmaktadır. Aspartat amino asidi 368. aminoasit olan tirozin (Y) ile hidrojen bağı etkileşimi yapar. Bu mutasyon ile birlikte bu bölgede ekstra bir hidrojen bağı etkileşimi gerçekleştirilmiştir. Bu da enzimin ısı kararlılığında artışa neden olacaktır. Mutasyonun gerçekleştirildiği bölge, enzimin uç kısmında ve enzimin aktif bölgesine uzak olduğu için enzim kinetik parametrelerinde herhangi bir değişiklik beklenmemektedir.

Tablo 14 incelenecek olursa yapılan G33D mutasyonu, *A.gonensis* GI'sının kinetik parametrelerinde (K_m , V_{max} , k_{cat} ve katalitik etkinlik değeri olan k_{cat}/K_m) önemli bir değişime neden olmamıştır. Ayrıca eklenen hidrojen bağı etkileşimi enzimin ısı kararlılık üzerinde de bir etkiye neden olmamıştır.

Literatürde daha önceki yıllarda glukoz izomerazın bu bölgesinde yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır.



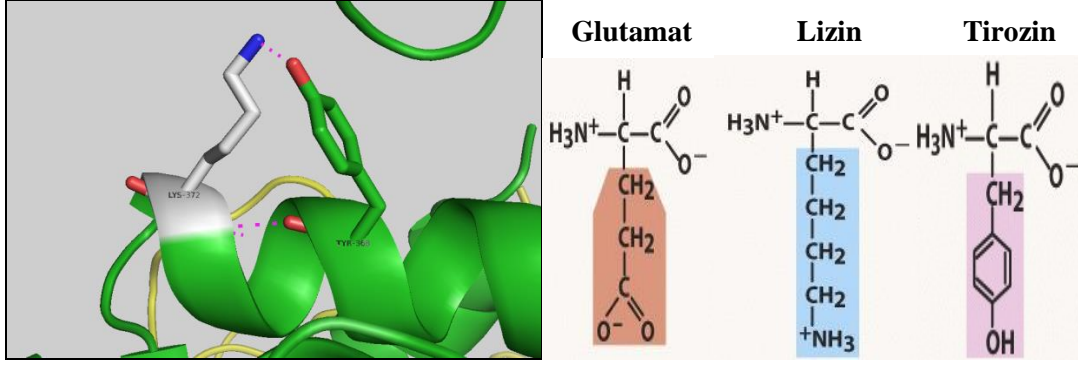
Şekil 84. V32I mutasyonuna ait üç boyutlu görüntüsü ve amino asitlerin yapıları

A. gonensis GI'sında 32. Valin (V) amino asidi izölösün (I) aminoasidi ile değiştirilerek V32I mutasyonu gerçekleştirildi. Valin amino asidi hidrofobik özellikte bir aminoasittir. İzölösün, valine göre daha uzun yan zincire sahip bir amino asit olup daha fazla hidrofobik özellik gösterir. Bu bölgenin hemen karşısındaki α -heliks tabakasında 365. amino asit olan hidrofobik Lösün (L) aminoasidi bulunmaktadır. *A. gonensis* GI'sında 32. Aminoasit olan valin, 365. amino asit olan lösin ile hidrofobik etkileşime girmektedir.

Yapılan V32I mutasyonu ile daha hidrofobik olan izölösünün valinin yerine değiştirilmesi buradaki hidrofobik etkileşimin daha da kuvvetli olmasını sağlayacaktır. Bu da enzimin ısı kararlılığında artışa neden olacaktır. Mutasyonun gerçekleştiği bölge enzimin uç kısmında ve aktif bölgeye uzak olduğu için enzim kinetik parametrelerinde bir değişiklik beklenmemektedir.

Tablo 14 incelenecek olursa yapılan V32I mutasyonu, *A. gonensis* GI'sının kinetik parametrelerinde (K_m , V_{max} , k_{cat} ve katalitik etkinlik değeri olan k_{cat}/K_m) önemli bir değişime neden olmamıştır. Fakat lösün amino asidi izölösün ile hidrofobik etkileşime girdiklerinden buldukları heliks yapılarını bozarak hidrofobik etkileşim artmıştır. Ayrıca hidrofobik etkileşim enzimin ısı kararlılık üzerinde de bir etkiye neden olmamıştır.

Literatürde daha önceki yıllarda glukoz izomerazın bu bölgesinde yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır.



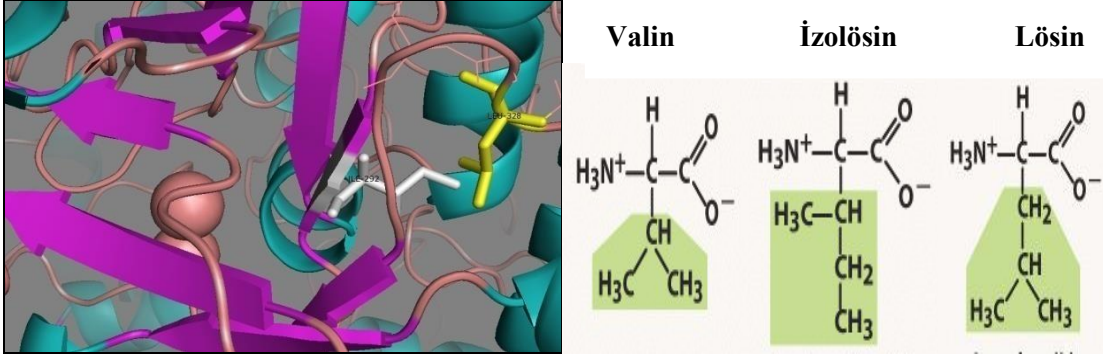
Şekil 85. E373K mutasyonuna ait üç boyutlu görüntüsü ve amino asitlerin yapıları

A. gonensis GI'sında 373. glutamat (E) amino asidi lizin (K) amino asidi ile değiştirilerek E373K mutasyonu gerçekleştirildi. Glutamat negatif yüklü hidrofilik özellik gösteren bir amino asittir. Lizin ise pozitif yüklü ve hidrofilik özellik gösteren daha uzun yan zincire sahip bir amino asittir. Lizin amino asidinin bulunduğu α -heliks tabakada 369. amino asit olan hidrofilik tirozin (Y) bulunmaktadır.

E373K mutasyonu ile birlikte Lizin amino asidi α -heliks tabakada bulunan 368. aminoasit olan tirozin (Y) ile hidrojen bağı etkileşimi yapar. Bu bölgede mutasyon ile birlikte hidrojen bağı etkileşimi gerçekleşmiştir. Bu da enzimin ısı kararlılığında artışa neden olacaktır. Mutasyonun gerçekleştiği bölge enzimin uç kısmında ve aktif bölgeye uzak olduğu için enzim kinetik parametrelerinde bir değişiklik beklenmemektedir.

Tablo 14 incelenecek olursa yapılan E373K mutasyonu, *A. gonensis* GI'sının kinetik parametrelerinde (K_m , V_{max} , k_{cat} ve katalitik etkinlik değeri olan k_{cat}/K_m) önemli bir değişime neden olmamıştır. Ayrıca hidrojen bağı etkileşimi enzimin ısı kararlılık üzerinde bir etkiye neden olmamıştır.

Lönn ve arkadaşları *Thermus thermophilus* GI'nın 372. amino asidi olan glutamat (E) bilinen en küçük glisin (D) amino asidine değiştirilerek E372G mutasyonu yapılmış. Bu mutasyon sonucunda D-ksiloz ile 60°C çalışıldığında k_{cat} turn over sayısını 9 kat artmasına sebep olmuştur. Bizim E373K mutant enzimimiz bu çalışmaya benzemektedir. Fakat bu çalışma ksiloza yönelik olduğundan sonuçlarda benzerlik göstermemiştir.



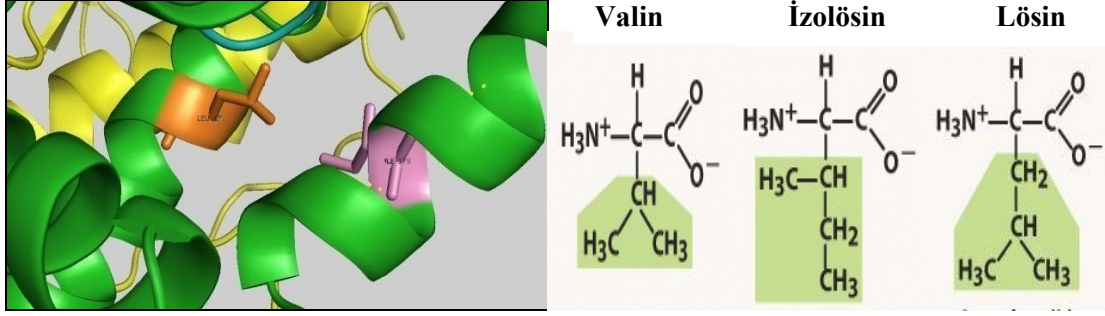
Şekil 86. V293I mutasyonuna ait üç boyutlu görüntüsü ve amino asitlerin yapıları

A. gonensis GI'sında 293. valin (V) amino asidi izolösün (I) amino asidi ile değiştirilerek V293I mutasyonu gerçekleştirildi. Valin amino asidi hidrofobik özellikte bir aminoasittir. İzolösün hidrofobik özellikte ve valine göre daha uzun yan zincire sahip bir amino asittir. V293I mutasyonu gerçekleştiği β -levhanın hemen karşısında 329. hidrofobik lösün amino asidi bulunmaktadır. İzolösün ile hidrofobik özellikteki lösün amino asidi hidrofobik etkileşim yapar. Bu bölgede mutasyon ile birlikte hidrofobik etkileşimi gerçekleşmiştir.

V293I mutasyonun gerçekleştiği yer β -levha tabakası üzerinde ve aktif bölgeye yakın olduğundan dolayı aktif bölgeyi daraltabilir. Mutasyon β -levha üzerindeki hidrojen bağlarının da bir etkide bulunmuş olabilir. Aktif bölgede bir daralma olduğundan V_{max} değerinde azalma beklenmektedir. K_m değerinde ise önemli bir değişim beklenmemektedir.

Tablo 14 incelenecek olursa yapılan V293I mutasyonu, *A. gonensis* GI'sının kinetik parametrelerinde (K_m , V_{max} , k_{cat} ve katalitik etkinlik değeri olan k_{cat}/K_m) K_m 'sinde küçük bir artış görülmüştür ve mutasyon aktif bölgeyi daralttığından V_{max} 'sında beklenildiği gibi bir azalma görülmemiştir. k_{cat} ve katalitik etkinlik değeri olan k_{cat}/K_m değerinde önemli bir değişim meydana gelmemiştir. Ayrıca hidrofobik etkileşimi enzimin ısı kararlılık üzerinde bir etkiye neden olmamıştır.

Literatürde daha önceki yıllarda glukoz izomerazın bu bölgesinde yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır.



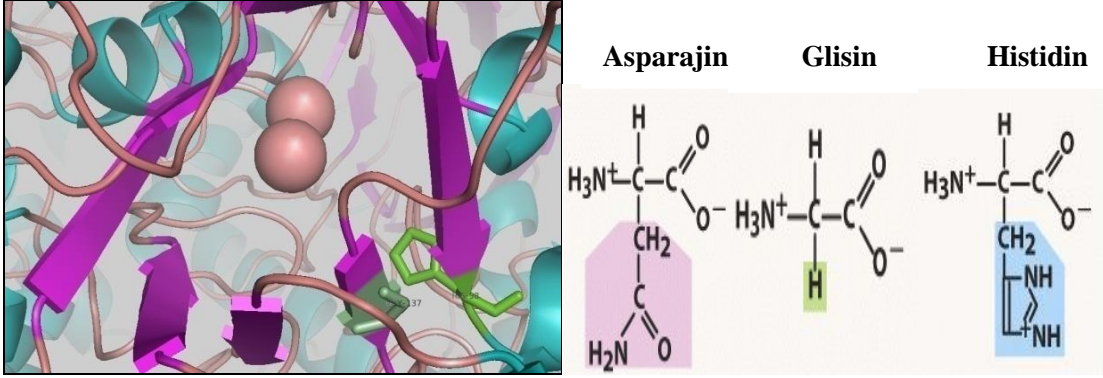
Şekil 87. V380I mutasyonuna ait üç boyutlu görüntüsü ve amino asitlerin yapıları

A.gonensis GI'sında 380. Valin (V) amino asiti izölösin (I) amino asidi ile değiştirilerek V380I mutasyonu gerçekleştirildi. Valin amino asidi hidrofobik özellikte bir amino asittir. İzölösin hidrofobik özellikte ve valine göre daha uzun yan zincire sahip bir amino asittir. Mutasyonun gerçekleştiği bölgenin karşısında α -heliks tabakasında 426. hidrofobik lösin(L) amino asidi bulunmaktadır. İzölösin α -heliks tabakasında bulunan 426. lösin (L) amino asidi hidrofobik özellikte olduğundan hidrofobik etkileşime girerler. Bu bölgede mutasyon ile birlikte hidrofobik etkileşimi gerçekleşmiştir.

V380I mutasyon aktif bölgeye uzak olduğundan dolayı K_m ve V_{max} 'sında bir değişiklik beklenmemektedir. İki α -heliks tabaka arasında hidrofobik etkileşim olduğundan sulu ortamda hidrofobikliği arttırarak ısı kararlılıkta bir artış beklenmektedir.

Tablo 14 incelenecek olursa yapılan V380I mutasyonu, *A.gonensis* GI'sının kinetik parametrelerinde (K_m , V_{max} , k_{cat} ve katalitik etkinlik değeri olan k_{cat}/K_m) önemli bir değişime neden olmamıştır. Ayrıca hidrofobik etkileşimi enzimin ısı kararlılık üzerinde bir etkiye neden olmamıştır.

Literatürde daha önceki yıllarda glukoz izomerazın bu bölgesinde yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır.



Şekil 88. N138G mutasyonuna ait üç boyutlu görüntüsü ve amino asitlerin yapıları

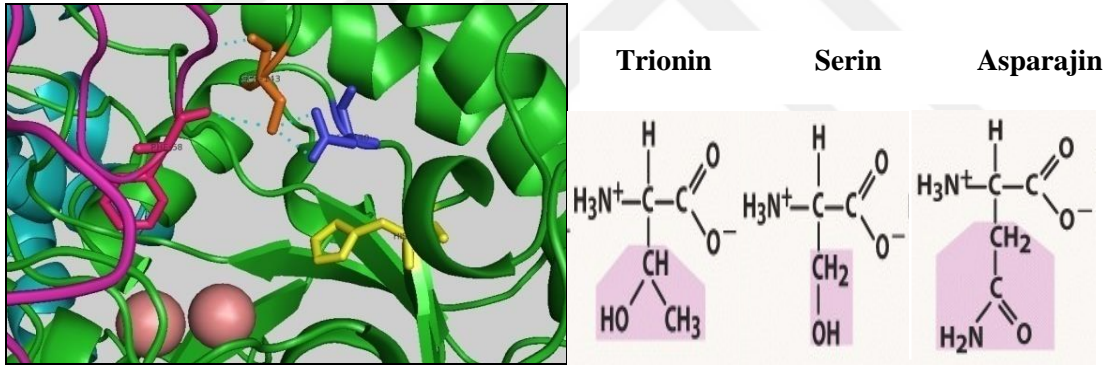
A. gonensis GI'sında 138. asparajin (N)amino asidi glisin (G) amino asidi ile değiştirilerek N138G mutasyonu gerçekleştirildi. Asparajin amino asidi hidrofilik ve yüksüz uzun zincir taşıyan özellikte bir aminoasittir. Glisin hidrofobik özellikte ve bilinen en küçük amino asitlerden biridir. Glisinin bulunduğu yerin yanındaki β -levha tabakasında 99. Histidin (H) amino asidi bulunmaktadır ki bu amino asit aktif bölgedeki substratı parçalayan ve reaksiyonu katalizleyen en önemli amino asittir. Yapılan N138G mutasyonu sonucunda, bu mutasyon noktasının hemen yanında bulunan β -levha tabakadaki histidin ile glisin arasında etkileşimler meydana gelebilir. Böyle bir durumda da bu mutasyon Histidin gerektiği şekilde işlev gösterememesine ve iyi çalışmamasına sebep olabilir. Böylelikle K_m 'de artış, V_{max} 'ta ise azalışa neden olabilir.

N138G mutasyonun gerçekleştiği yer aktif bölgedeki β -levha tabakası üzerindedir. Glisin asparajine kıyasla oldukça kısa bir yan zincire sahip bir amino asittir. Asparajin glisin amino asidi ile değiştirilmesi aktif bölge alanında substrata bağlanma bölgesini genişletecektir. Enzimin substrat ile daha kolay bir şekilde kompleks oluşturmaya izin verecektir. Aktif bölgede bir genişleme olduğundan yapılan bu mutasyon V_{max} değerinde artış beklenmektedir.

Ayrıca substrat olan D-glukoz molekülü oldukça hidrofilik karakterde bir moleküldür. 138. amino asit olan hidrofilik asparajinin hidrofobik olan glisine dönüştürülmesi ile substrat ile enzim arasındaki hidrofilik etkileşimler azaltılmıştır. Böyle bir durumda enzimin substrata olan ilgisinde azalma beklemekteyiz. Bu nedenlerden dolayı yapılan bu mutasyon ile enzimin K_m değerinde artış beklemekteyiz.

Tablo 14 incelenecek olursa yapılan N138G mutasyonu, *A.gonensis* GI'sının kinetik parametrelerinde (K_m , V_{max} , k_{cat} ve katalitik etkinlik değeri olan k_{cat}/K_m) önemli bir değişime neden olmuştur. Enzimin K_m değeri ön görüldüğü gibi $124,45 \pm 2,99$ mM' dan $131,09 \pm 2,67$ mM'a yükselmiştir. Beklendiği gibi enzimin V_{max} değeri $16,97 \pm 0,12$ $\mu\text{mol/dk/mg}$ proteinden $44,24 \pm 0,27$ $\mu\text{mol/dk/mg}$ proteine yükselmiştir. Bu veriler ile yapılan hesaplamalar sonucunda k_{cat} değeri 56,63 1/sn' den 147,60 1/sn'ye yükseldi. Katalitik etkinlik değeri olan k_{cat}/K_m değeri 0,455'ten 1,126'ya yükselmiştir. Enzim 2.47 kat etkin bir hale getirilmiştir.

Zu ve arkadaşları *Thermus thermophilus* GI'nın 91. Amino asiti olan asparajini (N) aspartat (D) amino asidine değiştirilerek N91D mutasyonu yapmışlardır. Bu mutasyondaki 91. asparajin bizim mutasyonumuzdaki 138. asparajine denk gelmektedir. N91D mutant enziminin kinetik özellikleri substrat olarak D ksiloz ile belirlenmiştir. Aktivitede artış sağlandı ve ısıl kararlılıkta azalma görülmüştür.



Şekil 89. T144S mutasyonuna ait üç boyutlu görüntüsü ve amino asitlerin yapıları

A. gonensis GI'sında 144. trionin (T) amino asidi serin (S) amino asidi ile değiştirilerek T144S mutasyonu gerçekleştirildi. Trionin ve serin amino asidi yüksüz hidrofilik özellikte bir aminoasittir. Serin 141. amino asit olan hidrofilik asparajin (asn) ile hidrojen bağı etkileşimi yapar. Bu bölgede mutasyon ile birlikte hidrojen bağı etkileşimi gerçekleşmiştir. Ayrıca aktif bölgede 59. fenil alanin ve 99. histidin amino asitleriyle etkileşime girer.

T144S mutasyonun gerçekleştiği yer aktif bölgededir. Trionin serin amino asidi ile değiştirildiği için aktif bölge alanında substrata bağlanma bölgesini genişleterek

enzimin substrat ile daha kolay bir şekilde kompleks oluşturmasına izin vermektedir. Aktif bölgede bir genişleme olduğundan V_{max} değerinde artış beklenmektedir. Aktif bölge içerisinde birden fazla amino asitlerin birbirleriyle etkileşimleri enzimin hareketini engelliyebileceği ve substrata ilgisini dūřurebileceėinden dolayı K_m değerinde artış beklenmektedir.

Bu mutasyon ile aktif bölgenin dışa bakan ağız kısmında birden fazla hidrojen bağı etkileşimi meydana getirilmiştir. Ayrıca Fenil alanin 58. amino asidi farklı bir incirdedir. Dolayısıyla bu mutasyon sonucunda serin ile fenil alanin arasında meydana gelen hidrojen bağı etkileşimi iki farklı zincirin birbirleriyle hidrojen bağı ile bağlanması ifade etmektedir. Bu da enzimin ısıl kararlılığında artışa neden olabilir.

Tablo 14 incelenecek olursa yapılan T144S mutasyonu, *A.gonensis* GI'sının kinetik parametrelerinde (K_m , V_{max} , k_{cat} ve katalitik etkinlik değeri olan k_{cat}/K_m) önemli bir değişime neden olmuştur. Enzimin K_m değeri $124,45 \pm 2,99$ mM' dan $165,83 \pm 3,7$ mM'a yükselmiştir. V_{max} 'sında beklendiği gibi V_{max} değeri $16,97 \pm 0,12$ $\mu\text{mol/dk/mg}$ proteinden $34,59 \pm 0,26$ $\mu\text{mol/dk/mg}$ proteine yükselmiştir. Bu veriler ile yapılan hesaplamalar sonucunda k_{cat} değeri $56,63$ 1/sn' den $115,41$ 1/sn'ye yükseldi ve katalitik etkinlik değeri olan k_{cat}/K_m değeri $0,455$ 'ten ise $0,696$ 'ya artış olarak hesaplandı. Ayrıca aktif bölgenin zincirlerle sağlamlaşması ısıl kararlılığın direncini arttırmıştır.

Literatürde daha önceki yıllarda glukoz izomerazın bu bölgesinde yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır.

5. ÖNERİLER

GI, endüstrinin ihtiyaç duyduğu önemli enzimlerden birisidir. HFCS ve etanol üretimi gibi endüstriyel alanlardaki önemli rolü sebebiyle, birçok araştırma yapılmaktadır. Sahip olduğu Endüstriyel önemden dolayı birçok mikroorganizmanın GI'ı incelenmiştir ve mutasyonlar ile geliştirilmesine önem verilmektedir. Endüstrinin yeni üretilen glukoz izomerazdan beklentisi ısı kararlılıkta artış göstermeleri ve düşük optimum pH sahip olmalarıdır. Çünkü yüksek pH ve yüksek sıcaklık uygulamaları istenmeyen yan ürünlerin oluşmasına sebep olmaktadır. Isıl kararlılığının artırılması ve pH değerinin düşürülmesi için asidik ve termofilik glukoz izomerazlar araştırılabilir. Kinetik parametrelerinin (K_m , V_{max} , k_{cat} ve katalitik etkinlik değeri olan k_{cat}/K_m) geliştirilmesine yönelik pymol enzim modelleme programı ile mutasyon yapılacak yerler tasarlanabilir.

Glukoz izomeraz hücre içi bir enzim olup oldukça pahalı bir enzimdir. Glukoza ilgisinin düşük olduğundan reaksiyonlarda fazla miktarlarda kullanılması gerekmektedir. Bu nedenle üretim maliyetini azaltmak için enzimin reaksiyondan sonra tekrar kullanımını sağlayarak immobilize etmektir. Böylelikle enzimin tekrar tekrar kullanımını sağlanabilir.

KAYNAKLAR

- Amelunxen, R. E. and Lins, M., 1968.** Comparative Thermostability of Enzymes from *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus cereus*, Arch. Biochem. Biophys., 125,765-771.
- Lönn, A., Gardonyi M., Zyl, W., Hahn-Hagerdal, B. and Otero, R. C., 2002.** Department of Applied Microbiology, Lund University, Sweden; 2Department of Microbiology, University of Stellenbosch, Matieland, South Africa Eur. J. Biochem. 269, 157-163.
- Arnold, F. H., 2001.** Combinatorial and Computational Challenges for Biocatalyst Design, Nature, 409, 253-257.
- Barker, S. A., Somers, P. J. and Hatt B. W., 1983.** Fructose, U.S. Patent, 3, 875, 140, <http://www.uspto.gov/>.
- Bartfay, J., 1960.** Glucose Isomerase in Barley Malt, Nature (London), 185-924.
- Basciano, H., Federico, L. and Adeli, K., 2005.** Fructose, Insulin Resistance and Metabolic Dyslipidemia. Nutrition and Metabolism, London, 2-5.
- Belfaquih, N. and Penninckx, M., 2000.** A bifunctional β -xylosidase-xylose isomerase from *Streptomyces* sp. EC 10, Enzyme Microb. Technol., 27, 114-121.
- Bhat, M. K., 2000.** Cellulases and Related Enzymes in Biotechnology, Biotechnology Advances, 18, 355-383.
- Bhosale, S. H., Rao, M. B. and Deshpande, V. V., 1996.** Molecular and Industrial Aspects of Glucose Isomerase, Microbiol. Rev., 60, 280-300.
- Bogumil, R., Kappl R., J. Huttermann, C., Sudfeldt and Witzel., H., 1993.** X and Q-band Studies on the Two Mn12-substituted Metal-Binding Sites of D-xylose Isomerase, Eur. J. Biochem., 213, 1185–1192.
- Bucke, C., 1983.** Glucose Transforming Enzymes, In W. Fogarty (Ed.), Microbial Enzymes and Biotechnology, Applied Science Publishers, London, 93–127.
- Burdett, D. S., Vieille, C. and Zeikus, J. G., 1996.** Cloning and Expression of the Gene Encoding the *Thermoanaerobactor ethanolicus* 39e Secondary-Alcohol Dehydrogenase and Biochemical Characterization of the Enzyme, Biochem. J, 316, 115-122.
- Carell, H. L. 1989.** Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 86, 4440-4444.
- Chaing, L. C., Gong, C. S., Chen, L. F. and Tsao, G. T., 1981.** D-Xylulose Fermentation to Ethanol by *Saccharomyces Cerevisiae*, Appl. Environ. Microbiol., 42, 284-289.

- Chauthaiwale, J. V. and Rao, M. B., 1994.** Production and Purification of Extracellular DXyloseIsomerase from an Alkaliphilic, Thermophilic *Bacillus* Sp, Appl. Environ. Microbiol., 60, 4495–4499.
- Chen, W. P., Anderson, A. W. and Han, Y. W., 1979.** Production of Glucose Isomerase by *Streptomyces Flavogriseus*, Appl. Environ. Microbiol., 37, 324–331.
- CRA., 1994.** Corn Refining, the Process, the Products, Corn Refiners Association Inc.
- Demirjian, D. C., Moris-Varas, F. and Cassidy, C. S., 2001.** Enzymes from Extremophiles, Current Opinion in Chemical Biology, 5, 144-151.
- Dill, K. A., 1990.** Dominant Forces in Protein Folding, Biochemistry, 29, 7133-7155.
- Douglas, C. W. and Jay, K. S., 1999.** Commodity Scale Production of Sugars from Starches, Current Opinion in Microbiology, 2, 252–256.
- Dupreez, J. C. and Prior, B. A., 1985.** A Quantitative Screening of some Xylose Fermenting Yeast Isolates, Biotechnol. Lett., 7, 241-246.
- Eveleigh, D. E. and Montenecourt, B. S., 1979.** Increasing Yields of Extracellular Enzymes. Adv. Appl. Microbiol. 25,57-74
- Faiz, Ö., 2005.** Yeni Bir Termofilik Bakterinin, *Anoxybacillus gonensis* A4, Hücre Dışı Lipaz/Esteraz Yeteneğinin İncelenmesi ve Karakterizasyonu, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon
- Fujinaga, M., Berthet-Colominas, C., Yaremchuk, A. D., Tukalo, M. A. and Cusak, S., 1993.** Refined Crystal Structure of the Seryl-Trna Synthetase from *Thermus thermophilus* at 2.5 Å Resolution, J. Mol. Biol., 234, 222-233.
- Fujiwara, S., 2002.** Extremophiles Developments of Their Special Functions and Potential Resources. Journal of Bioscience and Bioengineering. 94, 518-525.
- Gaikwad, S. M., More, M. W., Vartak, H. G. and Deshpande, V. V., 1988.** Evidence for the Essential Histidine Residue at the Active site of Glucose/ Xylose isomerase from *Streptomyces*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 155, 270–277.
- Gül-Güven, R., 2007.** Sıcak Su Kaynaklarından Bakteri İzolasyonu, Tanımlanması ve *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *rittmanii*'nin β-galaktozidaz Enziminin Saflaştırılması, Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.
- Hahn-Hagerdal, B., Wahlbom, F., Van Zyl, W.H., Cordero Otero, R. and Jönsson, L. J., 2001.** Metabolic engineering of *Saccharomyces* for xylose utilisation. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.,73, 53-84.

- Haki, G. D. and Rakshit, S. K., 2003.** Developments In Industrially Important Thermostable Enzymes: a Review. *Bioresour Technol.* 89, 17-34.
- 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.
- Hausler, H. and Stutz, A. E., 2001.** D-Xylose (D -Glucose) Isomerase and Related Enzymes in Carbohydrate Synthesis, *Top. Curr. Chem.*, 215, 77-114.
- Henrik, K., Collyer, C. A. and Blow, D. M., 1989.** *J. Mol. Biol.*, 208, 129-147.
- Henry, E. R., 1976.** High Fructose Corn Syrup: New Sweetener for the Baker., *Baker's Digest.*, 50, 2, 25.
- Hess, J. M., Tchernajenko, V., Vieille, C., Zeikus, J. G. and Kelly, R. M., 1998.** *Thermotoga neapolitana* Homotetra-Meric Xylose Isomerase is Expressed as a Catalytically and Thermostable Dimer in *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 2357-2360.
- Hobbs, L., 1986.** Corn Syrups, *Cereal Foods World.*, 31, 12, 852, 854, 856, 858.
- Howling, D., 1992.** Glucose Syrup: Production, Properties and Applications. In: Schenck, F.W. and R.E. Hebeda (Eds), "Starch Hydrolysis Products", VCH Publ. Inc. New York, 277-316.
- Inglett, G. E., 1974.** Sweeteners., Westport, Connecticut, The AVI Publ. Co., 240. Isomerase From An Alkaliphilic, Thermophilic *Bacillus* sp. , *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 4495-4499.
- Janket, S. J., Manson, J. E., Sesso, H., Buring, J. E. and Liu, S., 2003.** A Prospective Study of Sugar Intake and Risk of Type 2 Diabetes in Women. *Diabetes Care*, 26, 1008-1015.
- Kanaya, S. and Itaya, M., 1992.** Expression, Purification, and Characterization of a Recombinant Ribonuclease H from *Thermus thermophilus* HB8, *Biol. Chem.*, 267, 10184-10192.
- Kirk, O., Borchert, T. V. and Fuglsang, C. C., 2002.** Industrial Enzyme Applications, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13, 345-351.
- Knorr, D., 1987.** Modern Process Technology of HFCS. Food Biotechnology Dept. of Food Science, University of Delaware, USA, 36, 280.
- Koffler, H., 1957.** Protoplasmic Differences between Mesophiles and Thermophiles, *Bacterial Rev.*, 21, 227-232.

- Kristjansson, M. M. and Asgeirsson, B., 2002.** Properties of Extremophilic Enzymes and Their Importance in Food Science and Technology. Handbook of Food Enzymology (ed. J.R. Whitaker), NY, USA, p. 77-99.
- Kristo, P., Saarelainen, R., Fagerstrom, R., Aho, S. and Korhola, M., 1996.** Eur. J. Biochem. 237, 240-246.
- Kulp, K., Lorenz, J. K. and Stone, M., 1991.** Functionality of Carbohydrate Ingredients in Bakery Products. Food Technology, 45, 3, 136, 138-140, 142.
- Li, W. F., Zhou, X. X. and Lu, P., 2005.** Structural Features of Thermozyms, Biotechnol. Adv., 23, 271-281
- Lo, C. Y., Wang, Y., Tan, D., Pan, M. H. and Sang, S., 2008.** Reactive Dicarbonyl Compounds in Carbonated Beverages Containing High Fructose Corn Syrup. Food Chemistry, 107, 1099-1105.
- 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.
- Meng, M., Bagdasarian, M. and Zeikus, J. G., 1993.** Thermal Stabilization of Xylose Isomerase from *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 8459-8463.
- Misset, O., Labout, J., Wilms, J., Van Eekelen, C. A. G. and Busnach, H. A., 2001.** High Fructose Corn Syrup. Biotechnological Innovation in Food Processing. Oxford: Butterworth.
- Moses, V. and Cape, R. E., 1994.** Biotechnology, Harwood Academic Publishers, USA, 100, 113.
- Pastine, O., Schoemaker, H. E. and Leisola, M., 1999.** Xylose Isomerase Catalyzed Novel Hexose Epimerization, Biocatal Biotrans, 17, 393-400.
- Pomeranz, Y. 1985.** Functional Properties of Foods, Academic Press Inc., Orlando, Florida, 536.
- Pubols, M. H., Zahnley, J. C. and Axelrod, B., 1963.** Partial Purification and Properties of Xylose And Ribose Isomerase in Higher Plants, Plant Physiol., 38, 457-461.
- Quax, W. J., Mrabet, N. T., Luiten, R. G. M., Schuurheizen, P. W., Stanssens, P. And Lasters, I., 1991.** Enhancing the Thermostability of Glucose Isomerase by Protein Engineering. Biotechnology, 9, 738-742.
- Rasmussen, H., Cour, T. L., Nyborg, J. and Schulein, M., 1994.** Acta cryst. D50, 124-131.

- Reeder, C. F., 1978.** Light Foods Appease Weight Conscious Americans, *Food Product Development*, 12,3, 35-36, 40.
- Rey, F., Jenkins, J., Janin, J., Lasters, I., Alard, P., Claessens, M., Matthyssens, G. and Wodak, 1988.** Proteins struc. Funct. Genet., 4, 165-172. Sanchez, S. ve Smiley, K. L., 1975, Properties of D- xylose Isomerase from *Streptomyces albus*, *Appl Microbiol.*, 29,745-50.
- Sauve, V. and Sygush, J., 2001.** Molecular Cloning, Expression, Purification and Characterization of Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase from *Thermus aquaticus*, *Protein Expression Purif.*, 21, 293-302.
- Schallmeyer, M., Singh, A. and Ward, O. P., 2004.** Developments in the Use of *Bacillus* Species for Industrial Production, *Can. J. Microbiol.*, 50, 1-17.
- Schenck, M. and Bisswanger, H., 1998.** A microplate assay for D-xylose/D-glucose isomerase. *Enzyme and. Mic.Tech.*, 22, 721-723.
- Schenck, F. W., 2000.** High Fuctose Corn Syrups- A review, *Int. Sugar J.*, 285-288.
- Sökmen, B. B., 2005.** Kayısı (*Armeniaca vulgaris* Lam.) Tohumlarından Lipazın Saflaştırılması ve Çeşitli Taşıyıcılara İmmobilize Edilmesi, Doktora Tezi, İ.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Srinivasan, M. C., Vartak, H. G., Powar, V. K. and Khire, J. M., 1983.** High Activity Extracellular Glucose/(Xylose) Isomerase from a *Chainia* Species, *Biotechnol. Lett.*, 5, 611.
- Takasaki, Y., Kanbayashi, A., Kasugi, Y., 1969.** Studies on Sugar Isomerizing Enzyme. *Agriculture of Biological Chemistry*, 33:1527-1534.
- Vangrýsperre, W., Vandamme, J., Vandekerckhove, J., Debruyne, C. K., Cornelis, R. and Kerstershilderson, H., 1990.** Localization of the Essential Histidine and Carboxylate Group in D-Xylose İsomerases, *Biochem. J.*, 265, 699-705.
- Vartak, H. G., Srinivasan, M. C., Powar, V. K., Rele, M. V. and Khire, J. M., 1984.** Characterisation of Extracellular Substrate Specific Glucose and Xylose Isomerases of *Chainia*, *Biotechnol. Lett.*, 6, 493-494-614.
- Veronese, F. M., Boccu, E., Schiavon, O., Grandi, C. and Fontana, A., 1984.** General Stability of Thermophilic Enzymes: Studies on 6-Phosphogluconate Dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* and yeast, *Appl. Biochem.*, 6, 39-47.
- Vieille, C., Hess, M., Kelly, R. M. and Zeikus, J. G., 1995.** XylA Cloning and Sequencing and Biochemical Characterization af Xylose Isomerase from *Thermotoga neapolitana*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 1867-1875.

- Vieille, C. and Zeikus, G. J., 2001.** Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 65, 1-43.
- Vongsuvanlert, V. and Tani, Y., 1988.** Purification and Characterization of Xylose Isomerase of a Methanol Yeast, *Candida Boidinii*, Which is Involved in Sorbitol Production from Glucose, *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1817–1824.
- Voorhorst, W. G. B., Eggen, R. I. L., Luesink, E. J. and Vos, W. M., 1995.** Characterization of the Celb Gene Coding for P-Glucosidase from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* and its Expression and Site-Directed Mutation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 177, 7105-7111.
- Walsh, G., 2002.** *Proteins: Biochemistry and Biotechnology*, Wiley, Newyork
- Wang, P. Y., Johnson, B. F. and Schneider, H., 1980.** Fermentation Of D- xylose by Yeasts Using Glucose Isomerase in The Medium to Convert D-Xylose to DXylulose, *Biotechnol. Lett.*, 2, 273- 278.
- Weber, P., 1976.** Fructose by Isomerisation of Glucose U.K. Patent 1, 496, 309.
- Xu, W., Yan, M., Xu, L., Ding, L., Ouyang P., 2009.** State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, College of Life Science and Pharmacy, Nanjing University of Technology, New Mofan Road 5, Nanjing, PR China *Enzyme and Microbial Technology* 44, 77–83.
- Whitlow, M., Howard, A. J., Finzel, B. C., Poulos, T.L., Winborne, E. and Gilliland, G. L., 1991.** *Proteins Struct. Funct. Genet.*, 9, 153-173.
- Wintrode, P. L., Miyazaki, K. ve Arnold, F. H., 2001.** Patterns of Adaptation in a Laboratory Evolved Thermophilic Enzyme, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1549, 1-8.
- Wiseman, A., 1987.** *Handbook of Enzymes Biotechnology*, Second Edition, John Wiley Sons, New York.
- Wrba, A., Schweiger, A., Schultes, V., Jaenicke, R. and Zavodsky, P., 1990.** Extremely Thermostable D-Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase from the Eubacterium *Thermotoga maritima*. *Biochemistry* 29, 7584-7592.
- 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, 213.
- Yamanaka, K., 1975.** D-Xylose Isomerase from *Lactobacillus Brevis*, *Methods Enzymol.*, 41, 466-471.
- Yamanaka, K., 1968.** Purification, Crystallization and Properties of the D-xylose Isomerase from *Lactobacillus brevis*, *Biochim Biophys Acta.*, 151-670-8.

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Trabzon'da doğdu. İlkokulu İskender Paşa İlköğretim Okulu'nda, liseyi Mehmet Akif Ersoy Lisesi'nde okudu. Maçka Meslek Yüksek Okulu Su Ürünleri bölümünden 2010 yılında mezun oldu. Ara vermeden dikey geçişle KTÜ Balıkçılık Teknoloji Mühendisliğine geçiş yaptı ve 2014 yılında mezun oldu. 2014 yılında RTEÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalında Yüksek lisans öğrenimine başladı.

