

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Geobacillus stearothermophilus AH22 SUŞUNDAN
GLUKOZ İZOMERAZIN KARAKTERİZASYONU

Müge BOZ

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Özlem FAİZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

RİZE 2013

T.C.

RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

Geobacillus stearothermophilus AH22 SUŞUNDAN GLUKOZ İZOMERAZIN

KARAKTERİZASYONU

MÜGE BOZ

YÜKSEK LİSANS

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 26/ 12 / 2012

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 22/ 01 / 2013

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Özlem FAİZ

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Barbaros DİNÇER

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Hakan KARAOĞLU

Enstitü Müdürü: Doç. Dr. Fatih YILMAZ

RİZE, 2013



ÖNSÖZ

Bu çalışma, *Geobacillus stearothermophilus* AH22 suşunun sahip olduğu glukoz izomeraz aktivitesinin incelenmesini içermektedir. Çalışmadaki deneysel kısımlar, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Yüksek Lisans tez çalışmam boyunca gerek konu seçiminde gerekse çalışmam boyunca engin bilgi ve tecrübesinden yararlandığım, her konuda yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Özlem FAİZ' e gösterdiği sabır, anlayış ve iyi niyetten dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Materyal temininde göstermiş olduğu destekten dolayı Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyesi Hocamız Sayın Doç. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince her türlü yardım ve manevi desteklerini esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Barbaros DİNÇER' e, Sayın Arş. Gör. A. Pınar EKİNCİ' ye, Sayın Arş. Gör. Gülay CANDAN' a, Sayın Okutman Nimet BALTAŞ'a ve diğer tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Ayrıca beni bugünlere getiren, her konuda ilgi, destek ve yardımlarını esirgemeyen aileme şükranlarımı sunarım.

Müge BOZ

Ocak, 2013

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET.....	IV
SUMMARY.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
TABLolar DİZİNİ.....	VII
SEMBOLLER DİZİNİ.....	VIII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Enzimlerin Uygulama Alanları.....	2
1.3. Glukoz İzomeraz.....	2
1.3.1. Glukoz İzomerazın Yapısı.....	4
1.3.2. Glukoz İzomerazın Kullanım Alanları.....	5
1.3.3. Glukoz İzomerazın Katalitik Mekanizması.....	7
1.3.4. Glukoz İzomerazın Metal İyonu Gereksinimi.....	8
1.3.5. Glukoz İzomerazın Özellikleri.....	8
1.3.5.1. Substrat Spesifikliği.....	8
1.3.5.2. Alt Ünite Yapısı.....	8
1.3.5.3. Optimum Sıcaklık ve pH.....	10
1.3.5.4. Aktif- Bölge Çalışmaları.....	10
1.3.6. Glukoz İzomeraz Üreten Organizmalar.....	10
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	12
2.1. Kullanılan Materyaller.....	12
2.1.1. Cihazlar.....	12
2.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler.....	13
2.1.3. Luria- Bertani Sıvı ve Katı Besiyerlerinin Hazırlanması.....	13
2.1.4. Çözeltiler.....	14
2.1.4.1. Tampon Çözeltiler.....	14
2.1.4.2. Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	14
2.1.4.3. Enzim Aktivitesi Tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	15
2.1.4.4. Protein Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler.....	16
2.2. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	17

2.2.1.	Termofilik Bakterinin Sıvı Besi Ortamında Büyütülmesi.....	17
2.2.2.	Hücrelerin Patlatılması ve Protein Özütünün Elde Edilmesi.....	17
2.2.3.	Isı Şoku Uygulaması.....	17
2.2.4.	Amonyum Sülfat Çöktürmesi.....	17
2.2.5.	Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi (Doğal PAGE).....	18
2.2.6.	Glukoz İzomeraz Aktivitesinin Tayini ve Karakterizasyonu.....	18
2.2.7.	Fruktoz Standart Grafiğinin Hazırlanması.....	19
2.2.8.	Glukoz İzomeraz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi.....	19
2.2.9.	Glukoz İzomeraz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	19
2.2.10.	Glukoz İzomeraz Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi.....	20
2.2.11.	Glukoz İzomeraz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi.....	20
2.2.12.	Glukoz İzomerazın Isıl Kararlılığının İncelenmesi.....	20
2.2.13.	Glukoz İzomerazın pH Kararlılığının İncelenmesi.....	20
2.2.14.	Glukoz İzomeraz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi.....	20
2.2.15.	Protein Tayini.....	21
3.	BULGULAR.....	22
3.1.	Glukoz İzomeraz Aktivitesinin Tayini.....	22
3.2.	Fruktoz Standart Grafiğinin Hazırlanması.....	22
3.3.	Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi (Doğal PAGE).....	22
3.4.	Glukoz İzomeraz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi.....	23
3.5.	Glukoz İzomeraz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	24
3.6.	Glukoz İzomeraz Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi.....	24
3.7.	Glukoz İzomeraz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi.....	25
3.8.	Glukoz İzomerazın Isıl Kararlılığının İncelenmesi.....	27
3.9.	Glukoz İzomerazın pH Kararlılığının İncelenmesi.....	27
3.10.	Glukoz İzomeraz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi.....	28
4.	TARTIŞMA ve SONUÇLAR.....	29
5.	ÖNERİLER.....	33
6.	KAYNAKLAR.....	34
	ÖZGEÇMİŞ.....	39

ÖZET

Glukoz izomeraz, D-ksilozun D-ksiluloza dönüşümünü katalizlediği gibi D-glukozun D-fruktoza dönüşümünü de katalizleyen bir enzimdir. Enzimin bu ikinci özelliği yüksek fruktoz mısır şurubu (HFCS) üretiminde endüstriyel alanda kullanılmaktadır. Glukoz izomeraz bugün dünyada ticari amaçla en çok kullanılan üç enzimden biridir.

Bu çalışmada, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü araştırmacıları tarafından izole edilen *Geobacillus stearothermophilus* AH22 suşunun endüstriyel bir enzim olan glukoz izomerazı üretebilme kapasitesi belirlenerek, bu enzimin bazı kinetik verileri ve spektroskopik özellikleri ortaya konuldu.

Geobacillus stearothermophilus AH22 suşundan elde edilen glukoz izomerazın optimum pH'sı 6,0 olarak bulundu ve enzimin optimum sıcaklığı, 80 °C'de olarak tespit edildi. pH 5,0-9,0 aralığında, 4 °C'de 48 saat bekletildikten sonra, glukoz izomeraz'ın kararlı olduğu gözlemlendi. Isıl kararlılık eğrisi incelendiğinde, enzim, 60 °C ve 70 °C'de 5 saat bekletildiğinde, ilk aktivitesini % 100 koruduğu gözlemlendi. *Geobacillus stearothermophilus* AH22 termofilik suşu glukoz izomerazının glukoz substratı varlığında kinetik çalışması sonucunda V_{maks} değeri 2,109 U/mg protein ve K_m değeri 58,16 mM olarak belirlendi. 1 ve 5 mM'lık son konsantrasyonda, Co^{+2} , Mg^{+2} ve Mn^{+2} varlığında enzim aktivitesi kayda değer ölçüde arttığı gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Glukoz İzomeraz, HFCS, ksiloz

SUMMARY

Characterization of Glucose Isomerase from *Geobacillus stearothermophilus* AH22 Strain

Glucose isomerase, is an enzyme converting D-xylose to D-xylulose and D-glucose to D-fructose. This second feature of the enzyme is used in the industrial production of high fructose corn syrup (HFCS). Glucose isomerase today is one of the three most commonly used enzyme for commercial purposes in the world.

In this study, the industrial capacity of *Geobacillus stearothermophilus* AH22 strain, isolated by researchers in Atatürk University, Faculty of Science, Department of Molecular Biology and Genetics, to produce glucose isomerase and spectroscopic and kinetic properties of the enzyme were investigated.

Glucose isomerase isolated from *Geobacillus stearothermophilus* AH22 strain was found to have an optimum pH at 6.0 and optimum temperature at 80 ° C. The enzyme was found to be stable in the pH range 5.0 to 9.0, after incubated 48 hours at different pHs. The enzyme retained all of its activity after 5 hours incubation at 60 ° C and 70 ° C. As a result of the kinetic study of glucose isomerase from thermophilic strain *Geobacillus stearothermophilus* AH22 V_{max} and K_m were determined to be 2.109 U / mg protein and 58.16 mM, respectively. At 1 and 5 mM final concentration of Co^{+2} , Mg^{+2} and Mn^{+2} the activity was highly stimulated.

Key words: Glucose isomerase, HFCS, xylose

ŞEKİLLER DİZİNİ

SayfaNo

Şekil 1. D- glukozun D- fruktoza, D- ksilozun da D- ksiluloza GI aracılığıyla dönüşümlü izomerasyonu.....	3
Şekil 2. GI'nın alt birim yapısı.....	5
Şekil 3. Şekerlerin % tatlılık oranları.....	6
Şekil 4. GI'nın endiol mekanizması.....	7
Şekil 5. GI'nın Görünümü.....	9
Şekil 6. <i>Streptomyces Rubiginosus</i> dan elde edilen glukoz izomerazın X-ışını kırınımı ile çekilmiş fotoğrafı.....	9
Şekil 7. Fruktoz standart grafiği.....	22
Şekil 8. Doğal PAGE elektroforezi.....	23
Şekil 9. GI aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.....	23
Şekil 10. GI aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	24
Şekil 11. GI aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisi.....	25
Şekil 12. Glukoz varlığında GI'nın substrat doygunluk eğrisi.....	26
Şekil 13. Glukoz varlığında GI'nın Lineweaver-Burk eğrisi.....	26
Şekil 14. GI'nın ısı kararlılık eğrisi.....	27
Şekil 15. GI'nın 4 °C'deki pH kararlılık eğrisi.....	28

TABLolar DİZİNİ

SayfaNo

Tablo 1. GI üreten bazı mikroorganizmalar.....	11
Tablo 2. Kullanılan cihazlar.....	12
Tablo 3. Kullanılan kimyasal madde ve malzemeler.....	13
Tablo 4. Kullanılan tampon çözeltiler ve içerikleri / hazırlanışları.....	14
Tablo 5. Protein tayininde kullanılan çözeltiler ve içerikleri / hazırlanışları.....	15
Tablo 6. Enzim aktivitesi tayininde kullanılan çözeltiler ve içerikleri / hazırlanışları....	15
Tablo 7. Doğal-PAGE’de kullanılan çözeltiler ve içerikleri hazırlanışları.....	16
Tablo 8. Doğal PAGE’de kullanılan bileşenler ve oranları.....	18
Tablo 9. GI aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi.....	28

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

GI	: Glukoz İzomeraz
BSA	: Bovin serum albumin (Sığır Serum Albumini)
K_m	: Michaelis- Menten sabiti
LB	: Luria Bertani
MES	: 2-(N-morfolino) etansülfonik asit
rpm	: Dakikadaki dönüş sayısı
mM	: Milimolar
V_{maks}	: Maksimum Hız
μM	: Mikromolar
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamin
PAGE	: Poliakrilamit Jel Elektroforezi
U	: Ünite

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Enzimlerin kullanımı çok eski çağlara dayanır. İlk çağlarda insanlar bilinçsiz olarak ekmek hamuru, peynir, kıymız, yoğurt gibi gıdaların hazırlanmasında enzimlerin işlevlerinden yararlanmışlardır. Enzimlerin yapısı ve tepkime mekanizmalarının aydınlatılmasıyla enzimler gıda, ilaç, kozmetik, tekstil, temizlik maddeleri gibi çeşitli endüstriyel maddelerin üretiminde, üretime yönelik çeşitli tepkimelerin katalizlenmesinde ve fizyolojik rahatsızlıkların tedavisinden tıpta tanı çalışmalarına kadar uzanan yeni birçok alanda kullanılmaya başlanmıştır (Bailey, 1986). Enzimoloji konusundaki gelişmeler 1897’de Büchner’in canlı maya hücrelerinden ilk aktif enzimi ekstrakte etmesiyle başlamıştır. Büchner bu çalışmasıyla enzimlerin katalitik aktivitelerini içinde buldukları hücrelerin yaşamsallığına bağlı olmaksızın farklı ortamlarda da devam ettirdiğini göstermiştir. 1926’da Sumner enzimlerin protein yapısında olduğunu ortaya koymuş ve ilk enzim saflaştırmasını gerçekleştirmiştir (Geminos, 1978).

Enzimler canlı hücrelerden elde edilmiş proteinlerdir. Değişik avantajlarından dolayı enzimler çeşitli kimyasal reaksiyonlarda katalizör olarak kullanılmaktadır. Bitki, hayvan dokuları ve mikroorganizmalardan elde edilen çok sayıdaki enzim yapılarına ve kontrol ettikleri reaksiyon mekanizmalarına göre karakterize edilmişlerdir. Karakterize edilen bu enzimlerin ticari ve saf şekillerinin bulunması endüstriyel uygulamalarda kullanılmalarını sağlamaktadır. Enzimlerin spesifik olmaları ve reaksiyonları katalizleme kabiliyetleri onların biyokimyasal, endüstriyel ve analitik alanlarda uygulamalarını cazip hale getirmektedir (Zaborsky, 1973).

Doğal enzimler yüksek molekül kütlesine sahip proteinler olup genellikle suda çözünürler. Ancak çözelti halinde kararlılıklarının sınırlı olması, ortamdan ayrılmasının çok zor olması, reaksiyon denetimlerini güçleştirmelerini ve enzimlerin tekrar kullanılmalarının mümkün olmaması immobilize enzim düşüncesini ortaya çıkarmıştır. Sonuçta immobilizasyon ile enzimlerin ısısal, mekanik ve kimyasal kararlılıklarının artırılması ile tekrar kullanılabilirleri mümkün kılınmıştır (Onat, 2002).

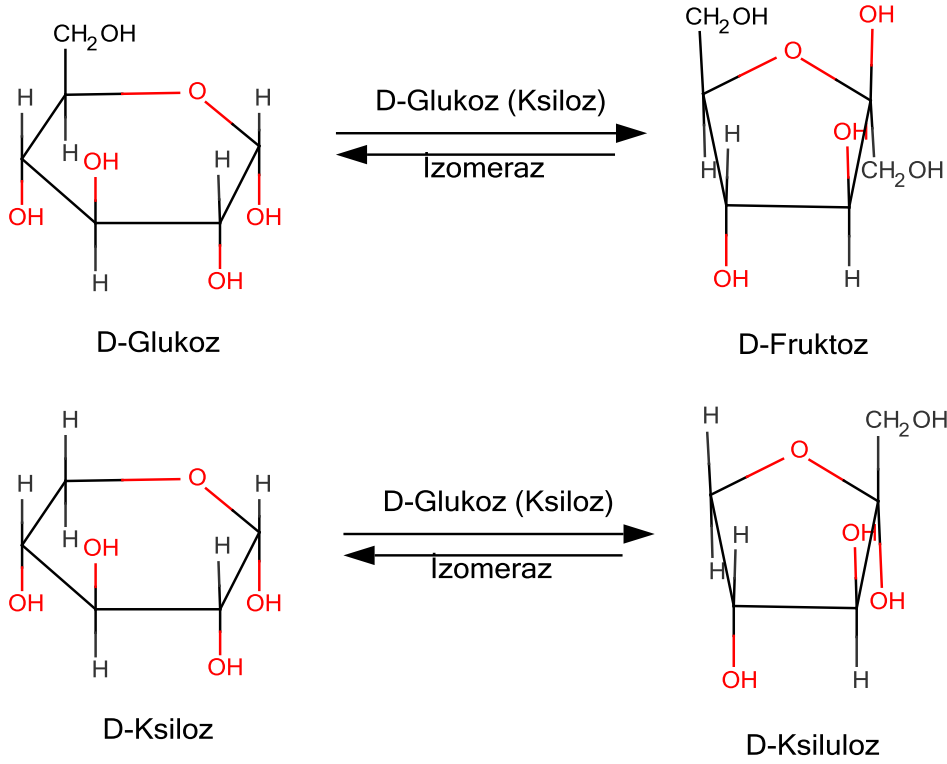
1.2. Enzimlerin uygulama alanları

Enzimler, biyolojik sistemlerdeki reaksiyonların canlılığa zarar vermeyecek ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan biyokatalizörler olarak tanımlanırlar. Bununla beraber yeterli koşulların sağlanması durumunda etkilerini gösterebiliyor olmaları, enzimlerden doğal ortamlarının dışındaki pek çok alanda yararlanabilme imkânı ortaya çıkarmaktadır. Bu doğrultuda enzimler hakkında elde edilen bilgiler pratik uygulamalara imkân verdikçe enzimlerin değişik alanlarda çeşitli amaçlarla kullanımı hayata geçmektedir (Telefoncu, 1986). Yaygın kullanım bulan enzimlerden bazıları şunlardır: proteolitik enzimler, amilolitik enzimler, glukoz izomeraz (GI), pektolitik enzimler, selülazlar, galaktozidazlardır.

Enzimlerin endüstriyel, analitik ve tıbbi uygulamaları gün geçtikçe yaygınlaşmaktadır. Enzimlerin katalitik potansiyelleri yalnız analitik amaçlar için değil aynı zamanda sentetik amaçlar ve modifikasyonlar için de değerlendirilmektedir. Bu çerçevede başta gıda sektörü olmak üzere, ilaç sanayi, kimya sanayi, deri ve tekstil sanayi gibi birçok sanayi dalında enzimler geniş uygulama alanları bulmuşlardır. Yeterli koşulların sağlanması durumunda etkilerini gösterebiliyor olmaları enzimlerin doğal ortamlarının dışındaki pek çok alanda yararlanabilme imkânını ortaya çıkarmaktadır. Endüstride kullanılan enzimlerin yaklaşık % 30-35'i deterjan sanayinde, %20-25'i nişasta ile ilgili alanlarda, % 20'si süt ve süt ürünleri sanayinde kullanılmaktadır. Bira, meyve ve şarap, unlu mamuller, tekstil, kâğıt, deri ve yem sanayinde kullanılan enzimler için her alanın yaklaşık % 1-5 arasında bir payı bulunmaktadır (Telefoncu, 1997).

1.3. Glukoz İzomeraz

Glukoz izomeraz (GI), amilaz ve proteazın içinde bulunduğu dünya enzim endüstrisinin en yüksek verimli üç enziminden biridir (Bhosale vd., 1996). Wiseman'a göre Glukoz izomeraz gelecekte tüm endüstriyel enzimler içinde en önemli enzim olabilir (Wiseman, 1975). Bu enzim, adlandırılmasından da anlaşıldığı gibi D-glukozun D-fruktoza, D-ksilozunda D-ksiluloza dönüşümlü olarak izomerizasyonunu katalizler (Şekil 1).



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

Ksilozun ksiluloza dönüşümü çürümüş bitki materyalleri üzerinde yayılım gösteren saprofitik bakterilerin beslenmede kullandıkları bir reaksiyondur. Ksilozun ksiluloza dönüşümünü katalizleyen bir enzim olan glukoz izomeraz çoğunlukla bakterilerden izole edilmekle beraber, bitkilerden ve mantarlardan izole edilmiş glukoz izomerazlar da bulunmaktadır (Banerjee vd., 1994; Kristo vd., 1996; Harhangi vd., 2003). Bu enzimin katalizlediği reaksiyon aynı zamanda hemiselülozun etanole dönüşmesinde de kullanılır. Yeryüzündeki bitki biokütlesinin neredeyse % 40'ı hemiselülozdur ve birçok mikroorganizma tek karbon kaynağı olarak hemiselülozu kullanarak bu biokütlenin üzerinde yaşar (Lama vd., 2001). Biokütlelerden ekonomik olarak yararlanılabilmesi selüloz ve hemiselülozun glukoz ve ksiloza hidroliz olmasına ve daha sonra mayalar tarafından etanole fermantasyonuna bağlıdır.

Glukozun fruktoza izomerizasyonu reaksiyonu ile glukozdan sentezlenen fruktoz yüksek-fruktoz mısır şurubu (High Fructose Corn Syrup: HFCS) üretiminde kullanıldığı için büyük bir ticari öneme sahiptir. 1976 yıllarına kadar dünyada kullanılan ana tatlandırıcı kaynağı %40'ı şeker pancarından, %60'ı şeker kamışından üretilen sukrozdu. Ancak fruktozun glukozdan izomerizasyonunun gerçekleştirilmesi günümüzde yaygın olarak kullanılan tatlandırıcıların yani fruktoz şuruplarının kökenini oluşturmaktadır. Glukoz

izomeraz kullanarak HFCS üretimi ilk olarak Japonya'da gerçekleştirilmiştir ve Amerika'da ortaya çıkan sukroz kaynağı sıkıntısını gidermek amacıyla HFCS üretimine başvurulmuştur. O yıllardan günümüze kadar GI en önemli endüstriyel enzimlerden biri olma özelliğini sürdürmektedir (Bhosale vd., 1996).

Bugün başlı başına bir endüstri konusu olan enzimlerin, insanlar tarafından ilk kullanımı antik dönemlere kadar dayanmaktadır. O dönemlerde enzimler peynir, mayalı ekmek, bira, şarap, sirke gibi gıdaların üretimi ile deri ve keten işlemede kullanılıyordu (Kirk vd., 2002).

Sıcaklık, endüstride vazgeçilmez bir unsurdur. Biyokatalizör olarak enzimlerin en bilinen dezavantajı yüksek sıcaklıklarda bozunmaları ve dolayısıyla aktivitelerini kaybetmeleridir. Ancak bazı mikroorganizmaların yüksek sıcaklıklarda büyüebilmesi; bu sistemlerde mevcut enzim bileşenlerinin bu sıcaklıklarda bile yapılarını korumaları ve dolayısıyla aktivite gösterebilmelerinden kaynaklanır. Termofilik bakteriler bu türden, sıcaklığa dayanıklı enzimleri içeren organizmalardır ve endüstrilerde kullanılacak potansiyel enzim kaynakları oluştururlar (Faiz, 2005).

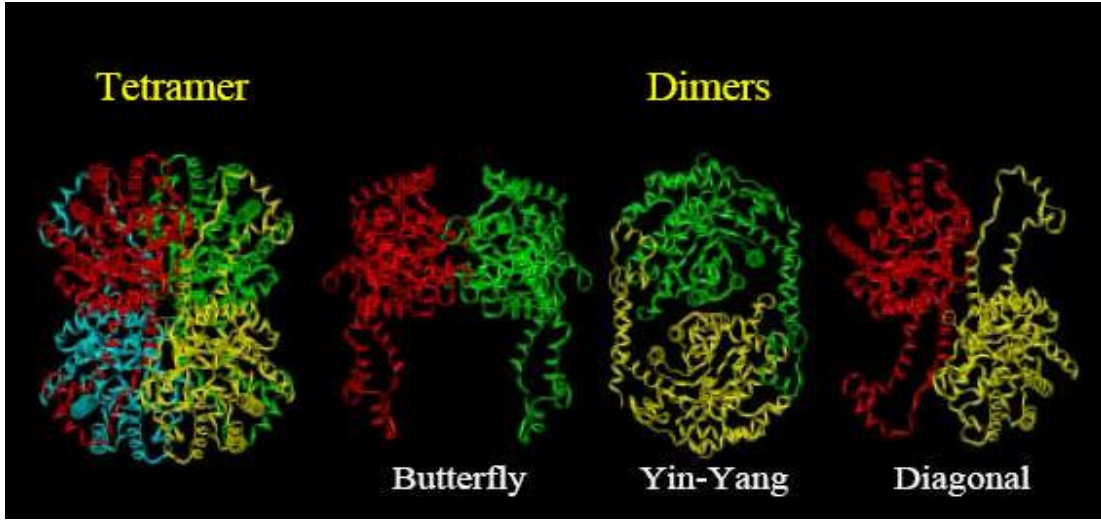
1.3.1. Glukoz İzomeraz'ın Yapısı

Bugüne kadar Glukoz İzomerazların yapı-görev ilişkilerini aydınlatmak amacıyla çeşitli organizmalardan GI kodlayan gen sıraları karşılaştırılmıştır. GI'lar aminoasit sıralarına ve metal iyon tercihlerine göre iki sınıfa ayrılır. Sınıf I GI'ların amino asit sayıları değişiklik göstermektedir. Sınıf I GI'ların elde edildiği organizmalara *Streptomyces* spp., *Actinoplanes* spp., *Ampullarielle* sp., *Artrobacter* spp. ve *Thermus thermophilus* örnek gösterilebilir (Vangryspere, 1988; Karaoğlu, 2004).

Sınıf II GI'lar ise 440 aminoasitten meydana gelirler. *Escherichia coli*, *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* ve *Thermotoga* spp. sınıf II GI'ların elde edildiği organizmalara örnek gösterilebilir (Whitlow, 1991; Karaoğlu, 2004).

Yapılan çalışmalar sonucunda sınıf I ve sınıf II GI'ların amino asitlerin substrata bağlanma bölgeleri, metal iyon bağlanma bölgeleri ve katalizlemede etkili olan bölgelerinin tamamen korunduğu gözlenmiştir. GI'ların alt ünite yapıları ve amino asit içerikleri hakkında yapılan çalışmalar GI'ların kovalent olmayan bağlarla birbirine bağlı tetramer veya dimer, birbirine benzer alt ünitelerden oluştuğunu ve disülfid bağlarından yoksun olduğunu göstermiştir. Günümüzde en iyi bilinen GI'lar moleküler ağırlığı her alt ünite başına 45-50

kDa olan homotetramerlerdir. Şekil 2’de GI’nın alt birim yapısı gösterilmiştir (Karaoğlu, 2004).

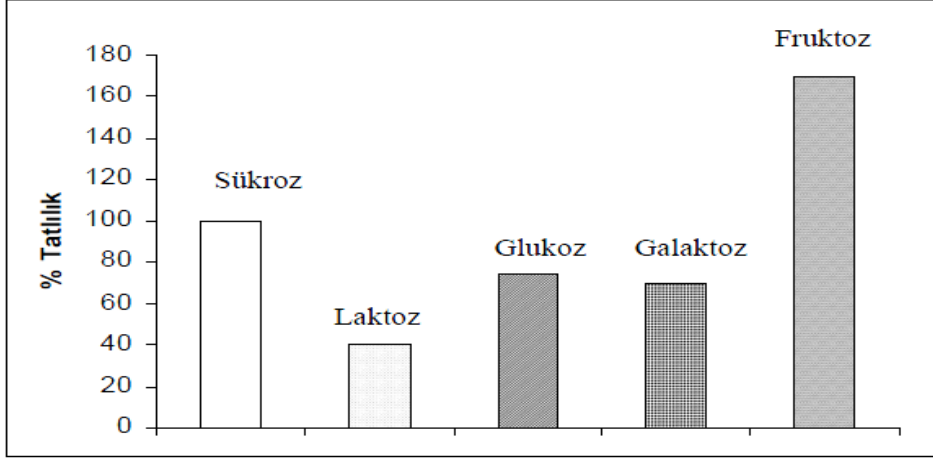


Şekil 2. GI'nın alt birim yapısı

1.3.2. Glukoz İzomeraz'ın Kullanım Alanları

Glukoz İzomeraz, ileri biyokimyasal ve genetik mühendisliği tarafından yapı-fonksiyon ilişkileri için ilginç bir model olarak kullanılır. Ayrıca akademik çalışmalarda, HFCS üretiminde ve hemiselülozlardan etanol üretiminde yararlanılması gibi farklı amaçlar için kullanılabilir.

HFCS üretiminde kullanılması: Rafine şekere talebin artması, üretim maliyetinin yüksek olması ve insan sağlığına sükrozun ve şekerin fazla tüketiminin olumsuz etkisinin farkına varılmasıyla birlikte sükrozun yerine kullanılacak başka kaynaklar araştırılmıştır. Kalorisiz ve karbonhidrat içermeyen sakkarin, siklamat, asesülfam-K, aspartam ve taumatin gibi yapay tatlandırıcılar bulunmaktadır. Fakat bunlar sağlıkla ilgili temel problemlerin yaşanmasına neden olmaktadır. Alkolsüz içeceklerin depolanma süresini arttırmak için kullanılan aspartam, düşük pH'da yavaş hidroliz olduğundan dolayı içeceklerin tatlılık oranını düşürmektedir. Taumatin protein yapısında bir tatlandırıcıdır ve sükrozdan 2000 kez daha tatlıdır. Fakat hoş olmayan bir tat verir. HFCS ise glukoz ve fruktozun dengede olduğu ve nişastadan elde edilen bir tatlandırıcıdır. Sükrozdan 1,3 kez ve glukozdan da 1,7 kez daha tatlıdır. Şekil 3'te bazı şekerlerin tat verme oranları gösterilmiştir (Chaing vd., 1981).



Şekil 3. Şekerlerin % tatlılık oranları

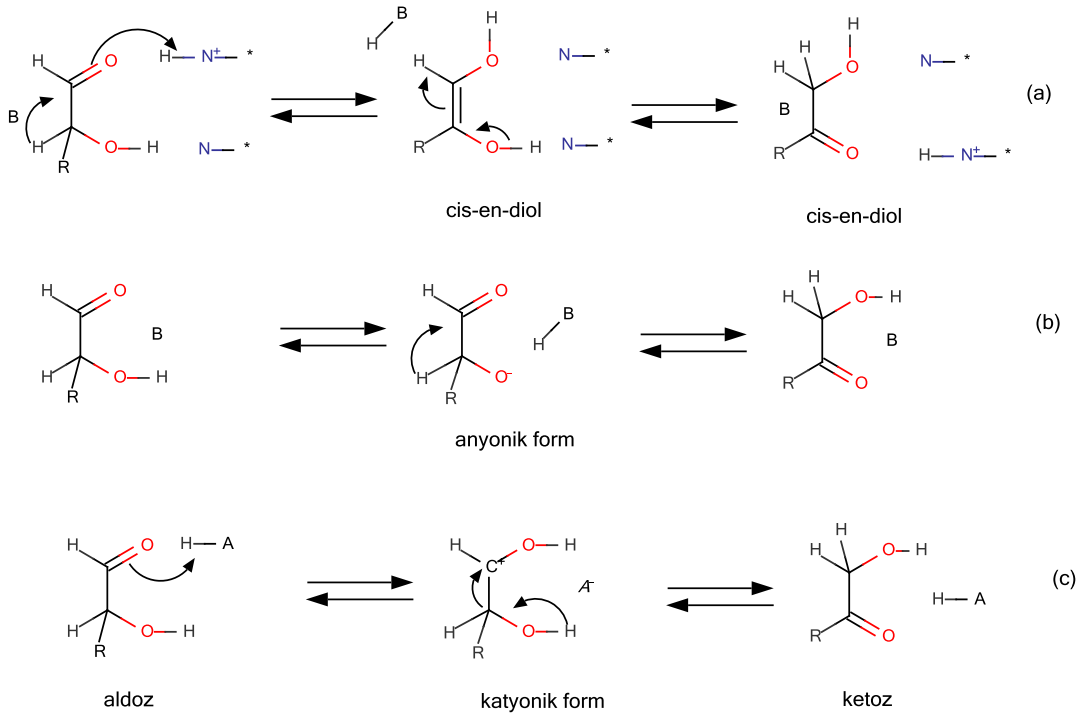
HFCS, sükrozdan %10-20 daha ucuzdur ve sükroz gibi kristalleşmeye neden olmadığından dolayı yiyecek endüstrisinde tercih edilmektedir. Ayrıca fruktoz diyabetik tatlandırıcılarda önemli bir rol oynar. Çünkü fruktoz midede yavaş bir şekilde absorbe edilir ve kan şekeri seviyesini etkilemez. HFCS, başlıca meşrubat ve şekerleme endüstrisinde, fırıncılıkta ve konserve yapımında kullanılmaktadır.

Etanol Üretiminde Kullanılması: Yenilenen biokütlelerin fermente olabilen şekerlere ve sonrasında etanole biyolojik çevrimi hızla tükenen fosil yakıtlar bakımından önemlidir. Biokütlelerden ekonomik olarak yararlanılabilmesi selüloz ve hemiselülozun glukoz ve ksiloza hidroliz olmasına ve daha sonra mayalar tarafından etanole fermantasyonuna bağlıdır. Araştırmacılar selülozun biyolojik çevrimi ile ilgili birçok çalışma yapmışlardır ve lignoselülozun biyolojik çevriminin hızlı ve verimli olduğunun farkına varmışlardır. Zirai artıkların değerlendirilmesi ve hemiselüloz içeren biokütlelerden en etkili şekilde yararlanabilmek için tüm dünyanın ilgisi hemiselülozun fermantasyonuna kaymaktadır. (Chaing vd., 1981).

1.3.3. Glukoz İzomeraz'ın Katalitik Mekanizması

Glukoz izomerazların reaksiyon mekanizmaları hakkında ilk bilgiler bu enzimin şeker fosfat izomerazlara benzer bir şekilde endiol mekanizması ile işlev gördükleri varsayımına dayanmaktaydı (Rose vd., 1969). Her iki enzimin de aynı tersiyer yapı motifine sahip olduğu ve aktif bölgede benzer reaksiyonları katalizlediği bilinmektedir (Sinnott, 1998; Karaoğlu, 2010).

Ancak sonradan iki enzimin birbirinden çok farklı olduğu belirlendi. Fosfat izomerazları, herhangi bir kofaktöre ihtiyaç duymazken, GI aktivitesi için iki metal kofaktör gerekmektedir. GI, katalitik bölgede endiol mekanizması için gerekli olan uygun bir baz içermemektedir (Collyer vd., 1990). Sonradan yapılan çalışmalar, enzimin hidrür kayması mekanizması ile çalıştığını göstermektedir. Şekil 4'te GI'nın katalitik mekanizması gösterilmiştir (Karaoğlu, 2010).



Şekil 4. GI'nın endiol mekanizması

1.3.4. Glukoz İzomeraz'ın Metal İyonu Gereksinimi

Glukoz izomeraz maksimum aktivite için Co^{+2} , Mg^{+2} ve Mn^{+2} gibi bivalent katyonlara veya bunların kombinasyonuna ihtiyaç duymaktadır. Co^{+2} ve Mg^{+2} aktivite için gerekli olmasına rağmen, her ikisi de farklı bir görevde rol oynarlar. Mg^{+2} , Co^{+2} ye nazaran daha etkin bir aktivatör iken, Co^{+2} istenilen konformasyonu sağlayarak (özellikle quarterner yapının sağlanmasında) enzimin kararlı hale gelmesinden sorumludur (Callens vd., 1986; Callens vd., 1988; Gaikwad vd., 1992; Karaoğlu, 2010). GI'nın katalitik aktivitesi; Ag^+ , Hg^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Ni^{+2} ve belli bir oranda da Ca^{+2} ile inhibe olmaktadır. GI'nın bazı diğer inhibitörleri; ksilitol, arabitol, sorbitol, mannitol, liksoz ve TRİS'tir (Bucke, 1983; Smith vd., 1991; Karaoğlu, 2010).

1.3.5. Glukoz İzomeraz'ın Özellikleri

Birçok organizmadan elde edilen Glukoz İzomeraz enziminin enzimatik ve fizikokimyasal özellikleri çok geniş bir biçimde çalışılmıştır. Enzimin kararlılığı, substrat spesifikliğı ve metal iyon gerekliliğı gibi bilgiler enzimin özellikle ticari uygulamalarda kullanılabilmesi için çok gereklidir (Karaoğlu, 2010)

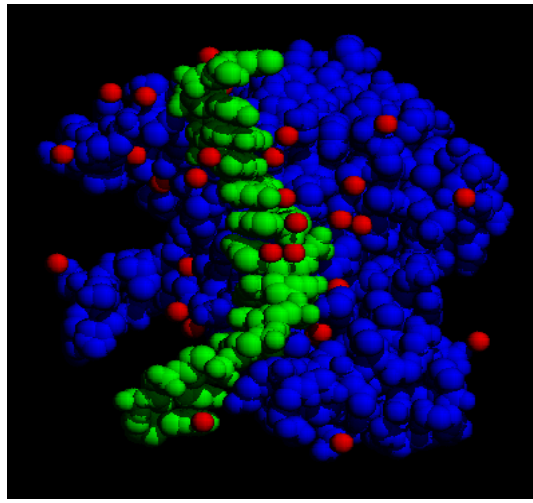
1.3.5.1. Substrat Spesifikliğı

D-riboz, L-arabinoz, L-ramnoz, D-alloz ve 2-deoksiglukoz gibi birçok şeker glukoz izomeraz için substrat olarak kullanabilir. GI'nın farklı mikroorganizmalardan elde edilmesine göre substrat spesifikliğı değişiklik gösterir, ancak enzim GI'nın en yaygın substratları ise D-glukoz ve D-ksilozdur (Karaoğlu, 2010). Enzimin maksimum izomerizasyon gerçekleştirdiğı substratlar glukoz ve ksiloz gibi ekvatorial düzlemindeki 3. ve 4. karbonlarında hidroksil grubu taşıyan substratlardır (Karaoğlu, 2010). Farklı mikroorganizmalardan çözülmüş veya immobilize formda bulunan GI'ların D-glukozu D-fruktoza dönüştürme oranı %26-59 arasında dağılım gösterir. Enzimin K_m değeri D-glukoz için 0,086 ile 0,920 M arasında, D-ksiloz için 0,005 ile 0,093 M arasında dağılım gösterir (Chen, 1980).

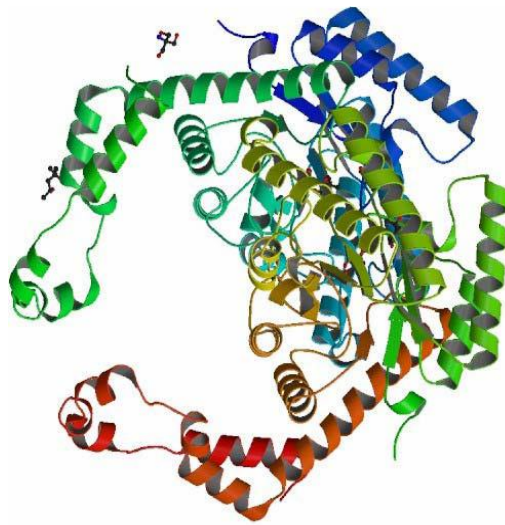
1.3.5.2. Alt Ünite Yapısı

Glukoz izomeraz enzimi birbirine benzer ve aynı olan dört alt üniteden ya da iki alt üniteden birbirlerine kovalent olmayan bağlarla bağlanarak oluşmuş bir enzimdir. Bu alt üniteler arasında disülfid bağları bulunmaz (Karaoğlu, 2010). *Bacillus sp.*'den izole edilen GI'nın bir trimer olduğu rapor bilinmektedir (Şekil 5) (Chauthaiwaleve vd., 1994). Basuki ve

arkadaşları *Streptomyces phaeochromogenes*'den elde edilen bir GI'nın izoenzimlerini rapor etmişlerdir (Basuki, 1992). İzoenzimlerin her biri farklı dört alt üiteden oluşmaktadır. *Arthrobacter* ve *Streptomyces* spp.'den elde edilen GI'larda üre, guanidinhidroklorid, SDS, gibi denatüranların ve ısıtmanın aktiviteye etkisi çalışılmıştır (Gaikwad vd., 1992; Rangarajan vd., 1992). *Streptomyces* sp. suşundan katlanmamış yapıda çözülmüş tetramerik GI göstermiştir ki; monomer yapılar inaktifken, tetramer ve dimer bölgeler aktiftir. GI'nın tam katlanma yolunda tam katlanmış ara bir şeklinin varlığı ilk defa gösterilmiştir (Ghatge, 1994). Şekil 6'da glukoz izomerazın X-ışını kırınımı ile çekilmiş fotoğrafı gösterilmiştir (Karaoğlu, 2010).



Şekil 5. GI'nın Görünümü



Şekil 6. *Streptomyces Rubiginosus* dan elde edilen glukoz izomerazın X-ışını kırınımı ile çekilmiş fotoğrafı.

1.3.5.3. Optimum Sıcaklık ve pH

Glukoz izomeraz'ın optimum sıcaklığı 60 °C'den 80 °C'ye kadar dağılım gösterir ve optimum sıcaklık Co^{+2} varlığında artar. Optimum pH genellikle pH 7,0 – 9,0 arasındadır. *Lactobacillus brevis*'ten izole edilen GI pH 6,0 – 7,0 arasında optimum pH'ya sahiptir ve bu durum ticari uygulamalar için arzu edilen bir özelliktir (Karaoğlu, 2010).

1.3.5.4. Aktif-Bölge Çalışmaları

Glukoz izomeraz enziminin aktif bölgesindeki veya aktif bölgesinin yakınındaki aminoasitlerin özelliklerinin belirlenmesi, gruba özel kimyasal modifiye ediciler ve X-ışın kristallografisi ile başarılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda özellikle histidin ve karboksilat gruplarının aktif bölgede yer aldığı bildirilmiştir (Callens vd., 1988; Gaikwad vd., 1988; Ghatge vd., 1993). GI'nın hem glukozun hem ksilozun izomerizasyonundan sorumlu olduğu çok uzun zamandır bilinmektedir. Ancak bu reaksiyonlar aynı bölgede mi gerçekleşiyor, yoksa farklı bölgede mi bilinmiyordu. Hem glukozun hem ksilozun izomerizasyonu için bir aktif bölgenin olduğu Keleti ve arkadaşları tarafından geliştirilen kinetik metot kullanılarak gösterildi (Keleti vd., 1987; Karaoğlu, 2010).

1.3.6. Glukoz İzomeraz Üreten Organizmalar

Glukoz izomeraz, prokaryotlar arasında oldukça yaygın bir şekilde bulunmaktadır. *Pseudomonas hydrophila*'da keşfinden sonra, birçok bakteri ve *Actinomycetes* türünde arsenat yokluğunda GI aktivitesi belirlenmiştir. Heterolaktik asidik bakterilerden *Lactobacillus brevis* en yüksek miktarda enzimi ürettiyordu. Fakat bu enzim düşük pH'da aktif olmasına rağmen yüksek sıcaklıkta kararlı olmadığından ekonomik uygulamalar için uygun bir enzim değildi. GI'nın hücre dışına salgılanması çok nadir rastlanan bir durum olmuştur. Hücre dışı GI'nın *Streptomyces glaucescens* ve *S. flavogriseus* tarafından üretildiği bildirilmiştir (Batt vd., 1986; Beck vd., 1988 ; Karaoğlu, 2010).

Bu organizmalarda enzimin hücreden salınması, hücre duvarının kısmi parçalanması ve hücre duvarı geçirgenliğinin değişmesinde görev yapar. Bir hücre dışı GI *Chania* sp. ve bir alkolotermofilik olan *Bacillus* sp.'den iyon-değişimi kromatografisi, jel filtrasyonu kromatografisi gibi bir dizi saflaştırma tekniğiyle saflaştırılmıştır (Bengston vd., 1973). Birçok *Bacillus* ve *Streptomyces* türü iyi GI üreticisidirler. GI'nın, *Candida utilis* ve *Candida boidinii* gibi birkaç mayada bulunduğu belgelenmiştir (Blacklow vd., 1988; Blow vd., 1990). *Aspergillus oryzae* GI aktivitesine sahip olduğu bildirilmiş tek mantardır. GI'nın arpa maltında ve buğday tohumunda da varlığı rapor edilmiştir (Blow vd., 1992; Bogumil vd.,

1993). GI, ticari olarak çok büyük bir öneme sahip olduğu için yeni bulunan birçok GI üreticisi organizma ve bu organizmalarla geliştirilmiş süreçler hakkındaki bilgileri patent altına almıştır (Boguslawski vd., 1982; Bok vd., 1984; Briggs vd., 1984; Bor vd., 1992). GI üreten bazı mikroorganizmalar Tablo 1’de verilmiştir (Karaoğlu, 2010).

Tablo 1. GI üreten bazı mikroorganizmalar

GI Üreten Bazı Mikroorganizmalar	
<i>Actinomyces olivocinereus</i>	<i>Paracolobacterium aerogenoides</i>
<i>A. phaeochromogenes</i>	<i>Pseudonocardia</i> spp.
<i>Actinoplanes missouriensis</i>	<i>Pseudomonas hydrophila</i>
<i>Aerobacter aerogenes</i>	<i>Sarcina</i> spp.
<i>A. cloacae</i>	<i>Staphylococcus bibila</i>
<i>A. levanicum</i>	<i>S. flavovirens</i>
<i>Anoxybacillus gonensis</i> G2	<i>Geobacillus caldoxylosilyticus</i> TK4
<i>Arthrobacter</i> spp.	<i>S. echinatus</i>
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>S. acromogenes</i>
<i>B. megabacterium</i>	<i>S. phaeocromogenes</i>
<i>B. coagulans</i>	<i>S. fracliae</i>
<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>S. roseochromogenes</i>
<i>Brevibacterium incertum</i>	<i>S. olivaceus</i>
<i>B. pentosaminoacidium</i>	<i>S. californicos</i>
<i>Chainia</i> spp.	<i>S. venuceus</i>
<i>Corynebacterium</i> spp.	<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. cinnamonensis</i>
<i>L. mannitopoeus</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>

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Materyaller

2.1.1. Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Firma- Model
Spektrofotometre	Shimadzu UV-1601 UV-Visible
Santrifüj	Thermo Fisher Scientific Heraeus Multifuge 3 SR+ Centrifuge
Elektroforez	Bio-RAD Mini Protean Tetra Cell
Saf Su Cihazı	Sartorius Stedim Biotech Arium 61316 ProUV
Su Banyolu Çalkalayıcı	Memmert WNB 7-45
Otomatik Pipet	Ratiolab Accupetta
Hava Banyolu Çalkalayıcı	Barnstead/ Lab-Line MaxQ Mini 4450 Shaker
pH Metre	Thermo Scientific Orion 3 Star pH Benchtop
Sonikatör	Bandelin SonopulsHD3100
Buz Makinesi	Hoshizaki FM-80EE
Vorteks	Velp Scientifica Vortex Mixer
Derin Dondurucu	Vestel FT-290
Hassas Terazı	Precisa XB 220A
Etüv	Memmert UNB 400

2.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler

Çalışmada kullanılan madde ve malzemeler Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü laboratuvarlarından temin edildi. Çalışmada kullanılan kimyasal madde ve malzemeler Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan kimyasal madde ve malzemeler

Kimyasal Madde/ Malzemeler	Firma
Tripton	Merck
Yeast Extract	Merck
Trizma-base	Merck
Etanol	Merck
Folin Reaktifi	Merck
NaCl	Merck
HCl	Merck
H ₂ O ₂	Merck
D-Ksiloz	Sigma
MnSO ₄	Merck
Perklorik asit	Merck
Sistein	AppliChem
Karbazol	Sigma
Sülfürik asit	Merck
Amonyom sülfat	Merck
CoCl ₂	AppliChem
Tris	Sigma
Sodyum asetat	Merck

2.1.3. Luria-Bertani Sıvı ve Katı Besiyerlerinin Hazırlanması

Luria-Bertani besiyerinin (LB) hazırlanması: 10,0 g bakto-tripton, 5,0 g maya ekstreği ve 5,0 g NaCl yaklaşık 990 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile titre edilerek 7,5'e ayarlandı. Sonra çözeltinin hacmi 1000 mL'ye tamamlandı ve 121°C'de, 1 atm basınç altında 20 dakika bekletilerek steril edildi (Maniatis vd., 1989).

Luria-Bertani Agar besiyerinin (LB Agar) hazırlanması: 10,0 g bakto-tripton, 5,0 g maya ekstreği, 5,0 g NaCl ve 15,0 g agar yaklaşık 990 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile 7,5'e ayarlandı. Daha sonra çözeltinin hacmi 1000 mL'ye tamamlandı ve 121 °C'de, 1 atm basınç altında 20 dakika bekletilerek steril edildi (Maniatis vd., 1989).

2.1.4. Çözeltiler

2.1.4.1. Tampon Çözeltiler

Kullanılan tampon çözeltiler, içerikleri ve hazırlanışları Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. Kullanılan tampon çözeltiler ve içerikleri / hazırlanışları

Çözelti Adı	Çözeltinin Hazırlanışı
Asetat Tamponu (50 mM, pH 4,0-5,5)	0,34 g sodyum asetat trihidrat yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N asetik asit ile istenilen pH'a ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
MES Tamponu (50 mM, pH 5,5-7,0)	0,52 g MES yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile istenilen pH'a ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 7,5-9,0)	0,30 g Tris yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N HCl ile istenilen pH'a ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı

2.1.4.2. Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Protein tayininde kullanılan çözeltiler, içerikleri ve hazırlanışları Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 5. Protein tayininde kullanılan çözeltiler ve içerikleri / hazırlanışları

Çözelti Adı	Çözeltinin Hazırlanışı
Lowry A Çözeltisi	0,4 g NaOH ve 2,0 g Na ₂ CO ₃ saf su ile çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4°C'de saklandı.
Lowry B Çözeltisi (% 1 CuSO ₄ .5H ₂ O çözeltisi)	1,0 g CuSO ₄ .5H ₂ O saf su ile çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
Lowry C Çözeltisi (% 2 Na-K tartarat çözeltisi)	2,0 g Na-K tartarat saf su ile çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
Lowry D Çözeltisi	1 kısım Lowry B ve 1 kısım Lowry C karıştırılarak hazırlandı.
Lowry E Çözeltisi	0,5 mL Lowry D ile 25 mL Lowry A karıştırılarak hazırlandı.
Sığır Serum Albümin (BSA) Çözeltisi (1 mg/mL)	5,0 mg BSA saf su ile çözülüp hacmi 5 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
0,1 N NaOH içinde % 0,1 (w/v) SDS Çözeltisi	0,4 g NaOH ve 0,1 g SDS saf su ile çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.

2.1.4.3. Enzim Aktivitesi Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Enzim aktivitesi tayininde kullanılan çözeltiler, içerikleri ve hazırlanışları Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Enzim aktivitesi tayininde kullanılan çözeltiler ve içerikleri / hazırlanışları

Çözelti Adı	Çözeltinin Hazırlanışı
Karbazol (% 0,12)	0,06 g karbazolün etanolde çözülüp hacminin 50 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı
Sülfürik Asit (% 70)	70 mL sülfürik asit üzerine yavaş yavaş saf suyun ilave edilip hacminin 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı
Glukoz Çözeltisi (1 M)	1,80 g glukozun saf suda çözülüp hacminin 10 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı
Sistein Hidroklorür Çözeltisi (% 1,5)	0,75 g sistein hidroklorürün saf suda çözülüp hacminin 50 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı

2.1.4.4. Protein Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler

Protein elektrofrezinde kullanılan çözeltiler, içerikleri ve hazırlanışları Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7. Doğal-PAGE’de kullanılan çözeltiler ve içerikleri / hazırlanışları

Çözelti Adı	Çözeltinin Hazırlanışı
Ayırma Jeli Tamponu (1,5 M Tris-HCl)	5,42 g Tris 200 mL saf suda çözüldü, pH’sı 8,8’e ayarlandı, hacmi 250 mL’ye tamamlandı ve 4 °C’de saklandı.
Yığıma Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl)	0,28 g Tris 200 mL saf suda çözüldü, pH’sı 6,8’e ayarlandı, hacmi 250 mL’ye tamamlandı ve 4°C’de saklandı.
Amonyum Persülfat (APS) Çözeltisi (% 10)	1 g APS saf suda çözülüp hacmi 10 mL’ye tamamlandı ve hazırlanan çözelti -20 °C’de saklandı.
N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin (TEMED)	Orijinal şişesinden kullanıldı.
Gliserol Çözeltisi (% 80)	80 mL gliserolün hacminin saf su ile 100 mL’ye tamamlanması ile hazırlandı.
Akrilamid/Bisakrilamid Çözeltisi (% 30)	29,2 g akrilamid ve 0,8 g N,N'-metilen bisakrilamid saf suda çözülüp hacmi 100 mL’ye tamamlandı ve 4°C’de saklandı.
Bromofenol Mavisi (% 0,1)	10 mg bromofenol mavisi saf suda çözüldü ve hacmi 10 mL’ye tamamlandı.
Doğal-PAGE Yükleme Çözeltisi	150 µL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 100µL % 0,1 bromofenol mavisi, 250 µL % 80 gliserol karıştırılması ile hazırlandı ve küçük kısımlara ayrılarak -20 °C’de saklandı.
Doğal-PAGE Yürütme Tamponu	7,2 g Tris ve 1,5 g glisin yaklaşık 480 mL saf suda çözüldükten sonra pH 8,3’e ayarlandı ve çözeltinin hacmi 500 mL’ye tamamlandı.
Jel Boyama Çözeltisi	1 g Coomassie Brilliant Blue-R250’nin 62,5 mL glasiyal asetik asit ve 93,5 mL metanol içinde çözülmesi ile hazırlandı

2.2. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

2.2.1. Termofilik Bakterinin Sıvı Besi Ortamında Büyütülmesi

Geobacillus stearothermophilus AH22 (*G. stearothermophilus* AH22) suşu, %1 ksiloz içeren LB sıvı besi ortamında 55°C’de 16 saat boyunca büyütüldü. Büyütülen kültür 4°C’de ve 13.000 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi. Oluşan çökelek saklandı.

2.2.2. Hücrelerin Patlatılması ve Protein Özütünün Elde Edilmesi

Elde edilen pellet reaksiyon tamponunda (10 mM MgSO₄ ve 1 mM CoCl₂ içeren 50 mM MES tamponu pH 6) çözüldü. Sonrasında, %30 şiddetinde, 1 devirde 5 dk boyunca Bandelin Sonopuls sonikatör aleti kullanılarak hücreler patlatıldı. Elde edilen hücre solüsyonu 13.000 rpm’de 15 dk boyunca santrifüj edildi. Pellet kısmı atılarak süpernatant alındı. Süpernatantda GI aktivitesi bakıldı. GI aktivitesinden emin olduktan sonra kaba ekstratta protein konsantrasyonunu, spesifik aktiviteyi belirlemek ve protein jel elektroforezinde kullanmak üzere 100 µl örnek ayrılarak enzimin biyokimyasal karakterizasyon işlemlerine başlanıldı.

2.2.3. Isı Şoku Uygulaması

Elde edilen kaba ekstrakt 20 dk süreyle 80 °C’de bekletildi. Denatüre olan proteinleri uzaklaştırmak için 20 dk 13.000 rpm’de santrifüjlendi. Süpernatant alındı, çöken kısım uzaklaştırıldı.

2.2.4. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Isı şoku uygulaması sonucu elde edilen 15 ml özütte kademeli olarak amonyum sülfat çöktürmesi uygulandı. % 50’lik amonyum sülfat çöktürmesi için, bir beher içerisinde çok yavaş bir şekilde karıştırılmakta olan özüte 4,71 gr kristal haldeki amonyum sülfat azar azar ilave edildi. Çözünme işlemi tamamlandıktan sonra özüt 1 saat daha karıştırılmaya bırakıldı. Ortamın soğuk olması için özütün içinde bulunduğu beher buz içerisinde muhafaza edildi. 1 saat sonunda 13.000 rpm’de ve 4°C’de 15 dakika santrifüj edilerek proteinler çöktürüldü. Süpernatant tekrar bir beher içerisine koyularak daha ileri çöktürme sağlandı. Bu şekilde 0,97 gr daha amonyum sülfat ilave edilerek % 60’lik, 1,01 gr daha amonyum sülfat ilave edilerek % 70’lik, 1,05 gr daha amonyum ilave edilerek % 80’lik amonyum sülfat çöktürmesi sağlandı. Elde edilen pelletler 2 ml 1 mM CoCl₂ ve 10 mM MgSO₄ içeren 50 mM MES tamponunda çözüldü ve bu örneklerdeki GI aktivitesi araştırıldı. % 60, % 70 ve %80’lik

amonyum sülfat çöktürmesi yapılan çözeltilerde glukoz izomeraz (GI) aktivitesi bulundu. Bu 3 örnek birleştirildi ve amonyum sülfatın uzaklaştırılması için 10.000 amicon filtreden geçirildi. Elde edilen çözelti enzim özütü olarak kullanıldı.

2.2.5. Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez (Doğal PAGE)

Jel hazırlandıktan sonra tanka yerleştirildi ve yürütme tamponu ile dolduruldu. Yaklaşık 40 µg saf protein yükleme çözeltisi ile karıştırılıp elektrofrez kuyucuklarına yüklendi. Boya, yığıma jelinden çıkana kadar yaklaşık olarak 10 dakika 20 mA'de, daha sonra da ayırma jelinin alt kısmına gelene kadar yaklaşık olarak 45 dakika 30 mA'de yürütüldü. Jel, % 0,1 Bromofenol Mavisi çözeltisi içine alındı ve yavaş bir şekilde sallanarak 10 dakika bekletildi. Boyanan jel, fazla boya uzaklaşıp protein bantları görünür hale gelene kadar boya uzaklaştırma çözeltisi ile muamele edildi.

Tablo 8. Doğal PAGE'de kullanılan bileşenler ve oranları

	%5'lik Yığıma Jeli Bileşenleri (mL)	% 10'luk Ayırma Jeli Bileşenleri (mL)
Saf su	3,45	4,1
% 30'luk akrilamid/bisakrilamid	0,83	3,3
1,0 M Tris (pH 6,8)	0,63	-
1,5 M Tris (pH 8,8)	-	2,5
% 10'luk APS	0,050	0,1
TEMED	0,0005	0,004

2.2.6. Glukoz İzomeraz Aktivitesinin Tayini ve Karakterizasyonu

Glukoz İzomeraz aktivitesi spektrofotometrik olarak belirlendi. Reaksiyon 5 µl enzim özütü kullanılarak, 100 mM Glukoz, 10 mM MgSO₄ ve 1 mM CoCl₂ pH'ı 6,0 olan 50 mM MES tamponu içerisinde, son hacim 100 µL olacak şekilde 60 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Reaksiyon, inkübasyon süresi sonunda, 0,5 M 100 µl perklorik asit ilavesi ile durduruldu. Reaksiyon sonunda açığa çıkan fruktoz miktarı Dishe ve arkadaşlarının (1951) geliştirmiş olduğu sistein karbazol-sülfürik asit yöntemi ile belirlendi. Reaksiyon çözeltisinin 20 µL'sinin üzerine sırasıyla 40 µL % 1,5'lik sistein hidroklorür ve bunu takiben 40 µL % 0,12'lik karbazol konuldu. Karışım vortekslendikten sonra üzerine 1 dk ara ile 1,2 ml % 70'lik sülfürik asit ilave edildi ve tekrar vortekslendi. 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten

sonra spektrofotometrede 560 nm dalga boyunda ölçümler gerçekleştirildi. Fruktoz miktarı, hazırlanan fruktoz kalibrasyon eğrisine göre hesaplandı. Reaksiyonun gerçekleştirildiği tüm koşullar (reaksiyon sıcaklığı, reaksiyon pH'sı, substrat konsantrasyonu, enzim miktarı) enzim karakterize edildikçe yeniden düzenlenmiştir. Bir enzim ünitesi dakikada oluşan mikromol fruktoz olarak tanımlandı.

2.2.7. Fruktoz Standart Grafiğinin Hazırlanması

1M konsantrasyonda fruktoz çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan fruktoz stok çözeltisinden belirli oranda seyretmeler yapıldı. Her bir konsantrasyon üç paralel çalışıldı. Deney tüplerine ve köre toplam hacim 100 µL olacak şekilde tampon, belirli konsantrasyonlarda olacak şekilde fruktoz ve 10 mM konsantrasyonda olacak şekilde Glukoz çözeltileri ilave edildi. Bu karışımın 20 µL'sinin üzerine 40 µL % 1,5'lik sistein hidroklorür ve 40 µL % 0,12'lik karbazol ilave edildi. Karışım vortekslendi ve üzerine 1 dk ara ile 1,2 ml % 70'lik sülfürik asit ilave edildi ve tekrar vortekslendi. 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra spektrofotometrede 560 nm dalga boyunda ölçümler gerçekleştirildi.

2.2.8. Glukoz İzomeraz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

GI aktivitesi üzerine pH'nın etkisini incelemek amacıyla aktivitenin ölçüldüğü rutin yöntemde kullanılan tampon yerine belirli pH değerlerinde tamponlar kullanıldı ve bu pH değerlerindeki aktivite tayinleri 60 °C'de gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan tamponların tamamı 50 mM konsantrasyonda olup farklı pH değerleri için sırasıyla asetat tamponu (pH 4,0-5,5), MES tamponu (pH 6,0-7,0) ve Tris-HCl tamponu (7,5-9,0) kullanıldı. Sonuçların değerlendirilmesi ile optimum pH değeri belirlendi. Gözlenen optimum pH değeri daha sonra yapılacak olan optimum sıcaklık, pH ve ısı kararlılık, metal iyonu etkisi ve kinetik parametrelerin belirlenmesi gibi çalışmalarda reaksiyon pH'sı olarak kullanıldı.

2.2.9. Glukoz İzomeraz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

GI'nın en iyi aktivite gösterdiği sıcaklık, 10 °C'lik artışlarla 30-90 °C aralığındaki sıcaklıklarda aktivite tayinleri yapılarak incelendi. Enzim aktivitesi için belirlenen optimum sıcaklık daha sonraki deneylerde reaksiyon sıcaklığı olarak kullanıldı.

2.2.10. Glukoz İzomeraz Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi

Bu çalışmada substrat konsantrasyonu sabit tutulup, protein içeriği bilinen enzim özütünden belirli hacimlerde alınıp bir seri reaksiyon karışımı hazırlandı. Değişen protein miktarı ile aktivite ilişkisi incelendi.

2.2.11. Glukoz İzomeraz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

GI aktivitesinin K_m ve V_{maks} değerlerinin belirlenebilmesi için MES tamponu (50 mM, pH 6,0) içinde 2-200 mM son konsantrasyonda glukoz içeren reaksiyon karışımları hazırlandı. Bu karışımlar kullanılarak sabit enzim konsantrasyonunda aktivite tayinleri gerçekleştirildi ve Lineweaver-Burk grafiği çizilerek K_m ve V_{maks} değerleri hesaplandı.

2.2.12. Glukoz İzomeraz'ın Isıl Kararlılığının İncelenmesi

Enzimin ısıl kararlılığını incelemek amacıyla, MES tamponu (50 mM, pH 6,0) içindeki enzim 80°C de inkübe edildi. Bu sürenin sonunda enzim çözeltisi buz içine alınarak 5 dakika bekletildi ve buzdan çıkartılıp oda sıcaklığına kadar ısınması beklendi. Daha sonra çeşitli zamanlarda örnekler alınarak optimum şartlar altında aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Isı ile hiç muamele edilmemiş enzimin aktivitesi % 100 olarak kabul edilerek bekletilen enzimlerin % kalan aktiviteleri hesaplandı.

2.2.13. Glukoz İzomeraz'ın pH Kararlılığının İncelenmesi

Enzimin pH kararlılığını incelemek amacıyla, enzim 1:1 oranında hepsi 50 mM olan pH 5,0-9,0 arasındaki tamponları ile karıştırıldı. Enzim-tampon karışımları +4°C de (buzdolabında) inkübe edildi ve sonra çeşitli zaman aralıklarında enzimlerden örnekler alınarak optimum şartlar altında aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Aynı şekilde hazırlanmış fakat 4°C'de bekletilmemiş enzim-tampon karışımlarının optimum şartlar altında aktiviteleri bakılarak bu değerler % 100 olarak kabul edildi ve bu değerlerden faydalanılarak bekletilen enzimlerin % kalan aktiviteleri hesaplandı.

2.2.14. Glukoz İzomeraz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi

GI aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek amacıyla Mg^{+2} , Mn^{+2} , Ca^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} ve Cu^{+2} iyonlarının klorür tuzlarının 100 mM'lık stok çözeltileri kullanıldı. Reaksiyon karışımlarına son konsantrasyonları 1 ve 5 mM olacak şekilde her bir metal iyonundan ilave edilerek optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Metal iyonu ile

muamele edilmeyen karışımın aktivitesi % 100 olarak kabul edilip metal iyonu ilavesi durumunda % kalan aktiviteler hesaplandı.

2.2.15. Protein Tayini

Protein tayini Lowry metoduna göre yapılmıştır (Lowry vd., 1951) ve protein standardı olarak Sığır Serum Albümini (BSA) kullanılmıştır.

Kalibrasyon grafiği çizebilmek amacıyla hazırlanan BSA çözeltisinden (1,0 mg/ml) deney tüplerine sırasıyla 10, 20, 30, 40 ve 50 µL konulmuştur. Standart içeren tüplerin dışında ham enzim kaynağından, bir deney tüpüne 10 µL ilave edilmiştir. Standartların ve örneğin son hacimlerini 500 µL'ye tamamlayacak şekilde 0,1 N NaOH içindeki %0,1 (w/v) SDS çözeltisinden ilave edilip vortekslenmiştir. Daha sonra her bir tüpe 1 mL Lowry E çözeltisi ilave edilip vorteksledikten sonra oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir.

Standartlara ve numuneye saf su ile 1:1 oranında seyretilmiş olan Folin Reaktifinden 100 µL ilave edilmiş ve karanlık ortamda 30 dakika inkübe edildikten sonra 650 nm'de absorbanları okunmuştur. Kalibrasyon grafiği çizilerek örneklerdeki protein konsantrasyonu hesaplanmıştır.

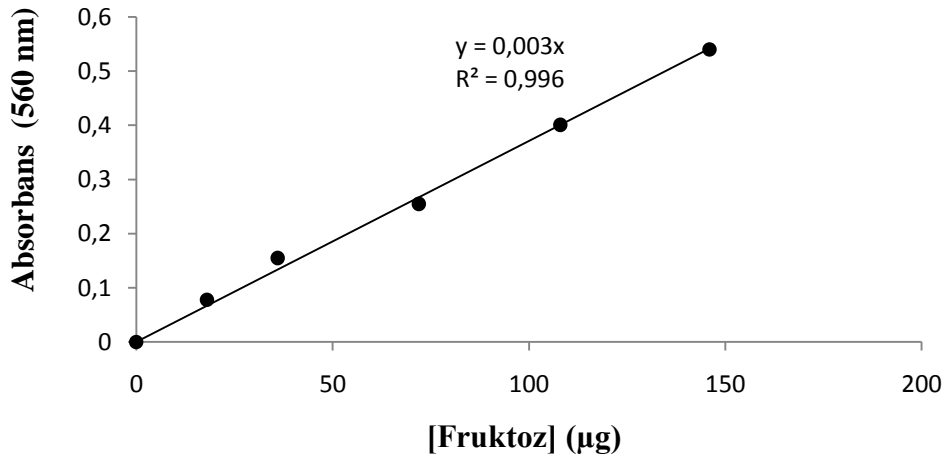
3. BULGULAR

3.1. Glukoz İzomeraz Aktivitesinin Tayini

Glukoz izomeraz (GI) aktivitesi reaksiyon sonucunda oluşan fruktoz miktarının spektroskopik olarak belirlenmesi üzerinden ünite olarak hesaplandı. Bir ünite enzim aktivitesi; 80 °C’de dakikada 1 µmol fruktoz açığa çıkartan enzim miktarı olarak hesap edildi. İncelemeler sonucunda *Geobacillus stearothermophilus* AH22 (*G. stearothermophilus* AH22) suşunun %1’lik ksiloz içeren LB besiyerinde büyütülmesi ile elde edilen hücre içi özütün GI aktivitesine sahip olduğu belirlendi.

3.2. Fruktoz Standart Grafiğinin Hazırlanması

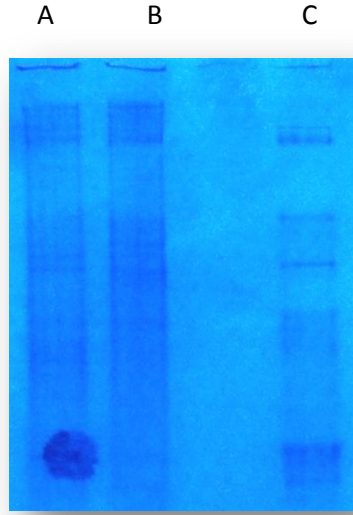
Hazırlanan 1M konsantrasyondaki fruktoz çözeltisinin belirli oranlarda seyreltilmesi ile gerçekleştirilen denemelerde elde edilen verilerden faydalanılarak absorbansa karşılık gelen µg fruktoz standart grafiği hazırlandı.



Şekil 7. Fruktoz standart grafiği

3.3. Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez (Doğal PAGE)

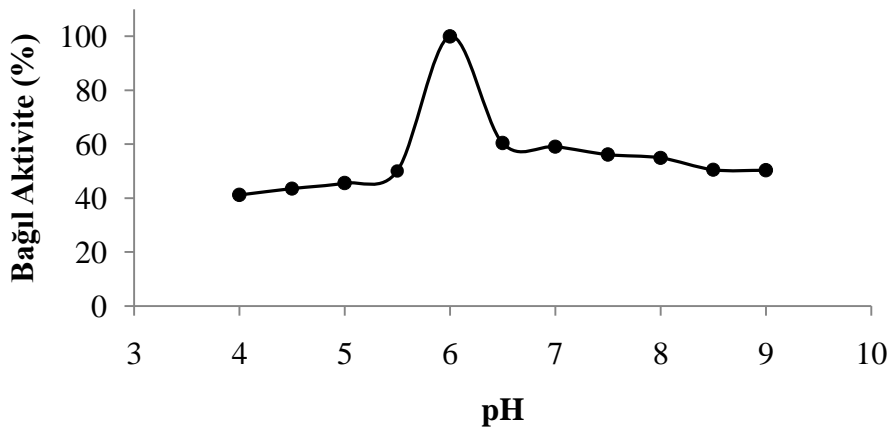
G. stearothermophilus AH22 suşu, LB ortamında ve %1 ksiloz içeren LB sıvı besi ortamında büyütülmesi ile elde edilen hücre içi özütler ve amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen enzim özütü doğal poliakrilamid jel elektrofrezinde yürütüldü. Jel, jel boyama çözeltisi ile boyandı ve fazla boya uzaklaştırıldı (Şekil 8). Doğal jel elektrofrez görüntüsü incelendiğinde, ksiloz ile indüklenme sonucu birden fazla bandın belirginleştiği görülmektedir.



Şekil 8. Doğal PAGE elektroforezi. A: *G. stearothermophilus* AH22'nin LB besi yerinde büyütülmesi ile elde edilen hücre içi özüt, B: *G. stearothermophilus* AH22'nin %1 ksiloz içeren LB besi yerinde büyütülmesi ile elde edilen hücre içi özüt, C: Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen enzim özütü

3.4. Glukoz İzomeraz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

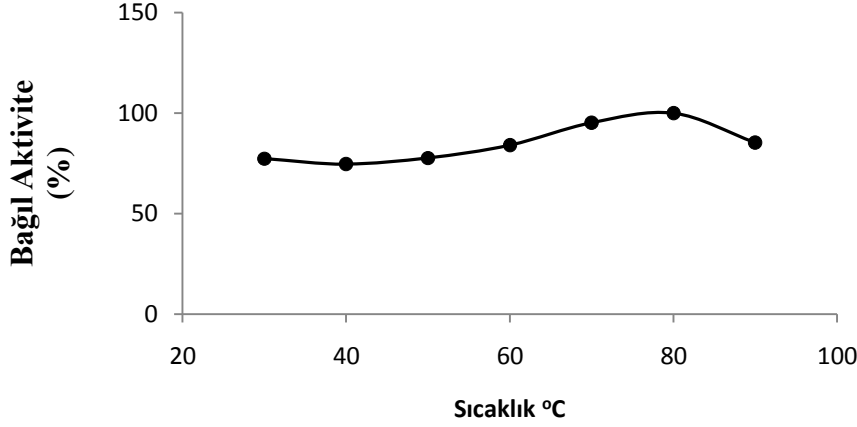
GI aktivitesi üzerine pH'nın etkisi ve en yüksek etkinlik gösterdiği pH'nın belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada, pH 4,0-9,0 arasında tamponlarla reaksiyon karışımları hazırlandı. Her bir tamponla hazırlanan reaksiyon karışımları için aktiviteler belirlenerek pH değerlerine karşılık gelen aktivitelerle bir pH-% Bağlı Aktivite eğrisi elde edildi (Şekil 9). Enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değeri 6,0 olarak belirlendi.



Şekil 9. GI aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

3.5. Glukoz İzomeraz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

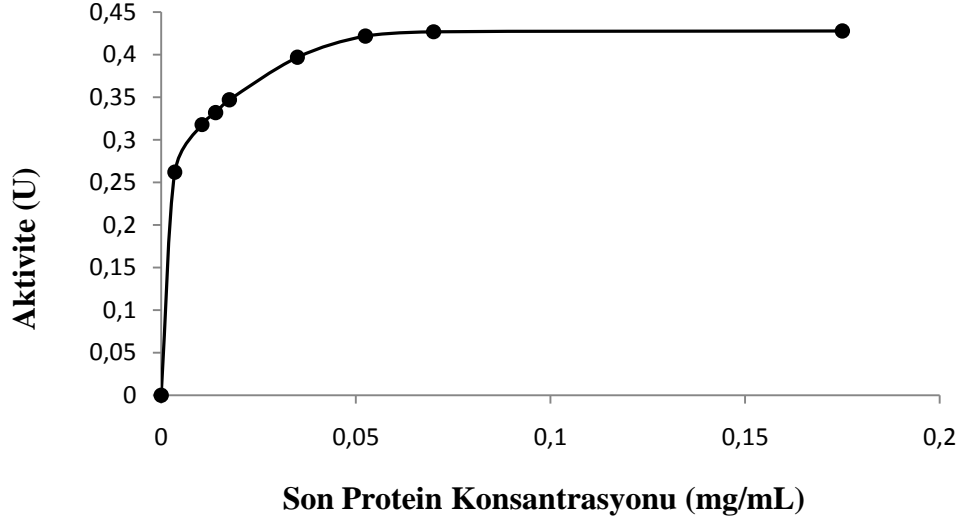
Sıcaklığın GI aktivitesi üzerine etkisi ve optimum sıcaklığın tayini çalışması 10 °C'lik artışlarla olmak üzere 30-90 °C arasındaki sıcaklıklarda aktivite tayinleri yapılarak incelendi ve Sıcaklık-% Bağıl Aktivite grafiği çizildi (Şekil 10). GI aktivitesinin 80 °C'de optimuma ulaştığı ve enzimin 90 °C'de optimum aktivitesinin yaklaşık % 75'ini koruduğu gözlemlendi.



Şekil 10. GI aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

3.6. Glukoz İzomeraz Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi

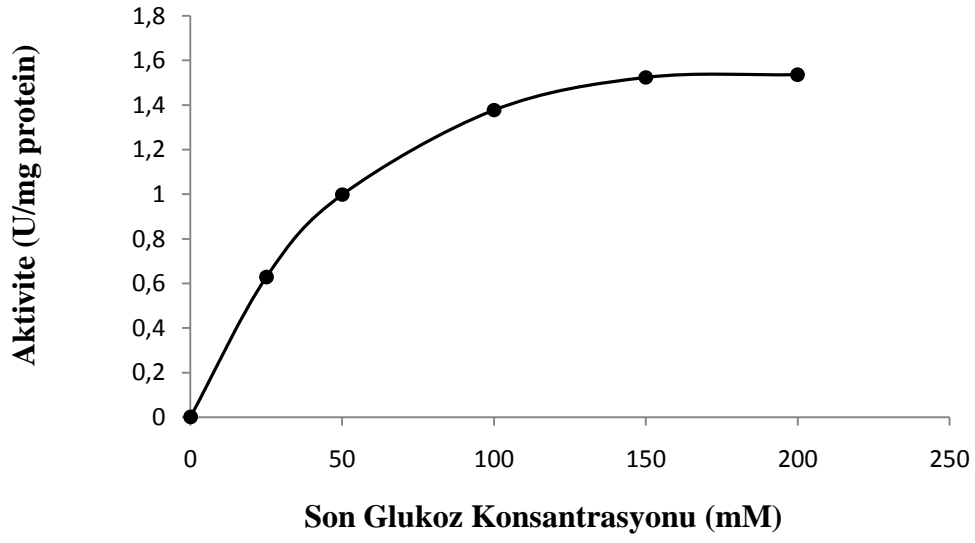
Sabit substrat konsantrasyonunda GI aktivitesinin protein miktarına bağımlılığını incelemek amacıyla reaksiyon karışımında ayrı ayrı 0,02-2 mg/mL arasındaki değerlerde son konsantrasyonda protein içerecek şekilde enzim çözeltileri kullanılarak aktivite tayinleri yapıldı. Daha sonra protein konsantrasyonuna karşı aktivite değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 11). Şekil 11'deki hiperbolik eğriden de görüleceği gibi, 100 mM substrat konsantrasyonunda maksimum aktivitenin gözlemlendiği optimum enzim konsantrasyonu 0,07 mg/mL olarak belirlendi.



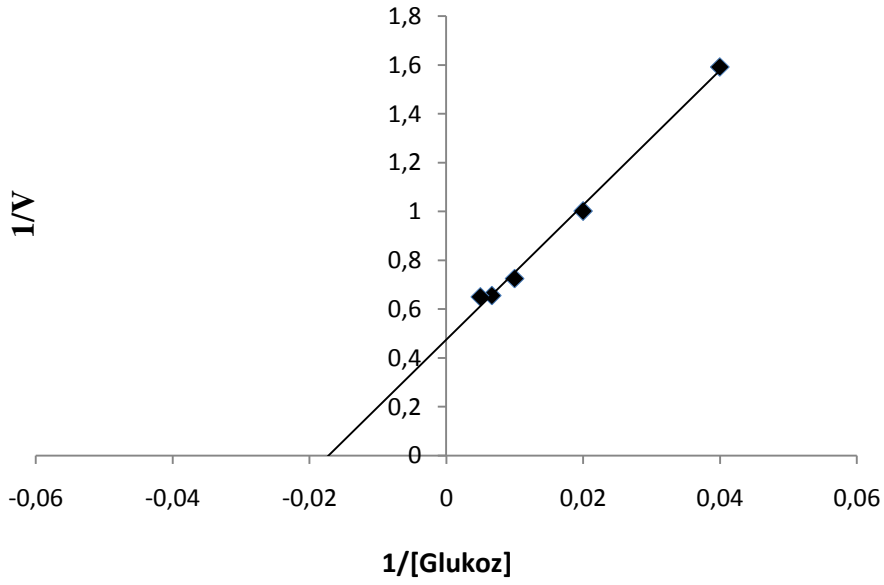
Şekil 11. GI aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisi

3.7. Glukoz İzomeraz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

GI aktivitesinin çeşitli kinetik verilerle ifade edilmesi amacı ile sabit enzim konsantrasyonunda ve 2-200 mM son glukoz konsantrasyonunda aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Elde edilen veriler kullanılarak substrat doygunluk eğrisi (Şekil 12) ve Lineweaver-Burk (Şekil 13) grafiği çizildi. Substrat doygunluk eğrisi incelendiğinde, enzimin basit Michaelis-Menten kinetiğini takip ettiği belirlendi ve 100 mM substrat konsantrasyonu değerine kadar aktivitede bir artışın gözlemlendiği, ancak daha yüksek substrat konsantrasyon değerlerinde ise enzimin doygunluk noktasına ulaşması nedeniyle aktivitenin bu optimum değerinde sabit kaldığı gözlemlendi. Bu nedenle, bundan sonraki karakterizasyon çalışmalarında reaksiyon karışımındaki substrat konsantrasyonu, 100 mM olacak şekilde ayarlandı. Lineweaver-Burk eğrisinden ise K_m ve V_{maks} değerleri sırasıyla 58,16 mM ve 2,109 U/mg protein olarak tespit edildi.



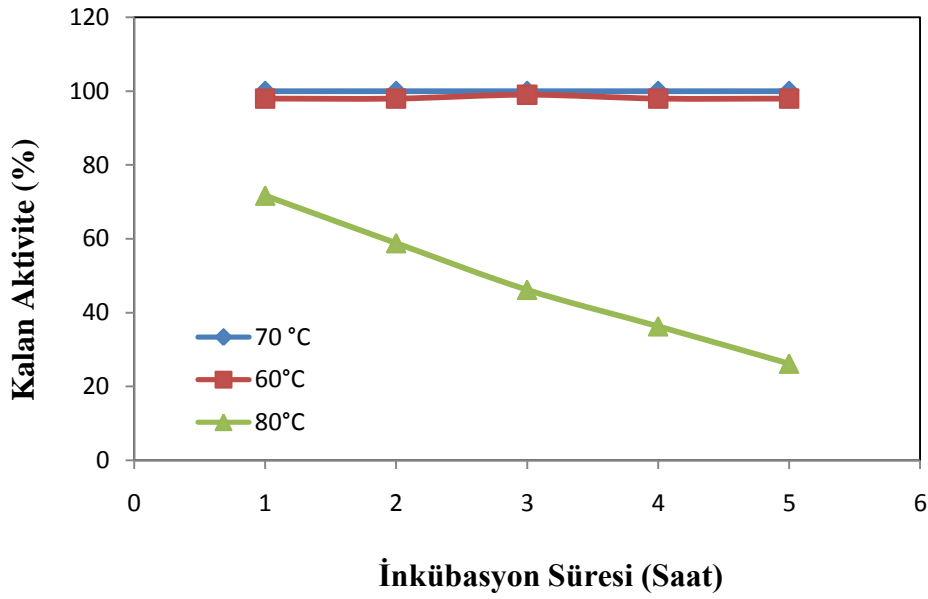
Şekil 12. Glukoz varlığında GI' nın substrat doygunluk eğrisi



Şekil 13. Glukoz varlığında GI' nın Lineweaver-Burk eğrisi

3.8. Glukoz İzomeraz'ın Isıl Kararlılığının İncelenmesi

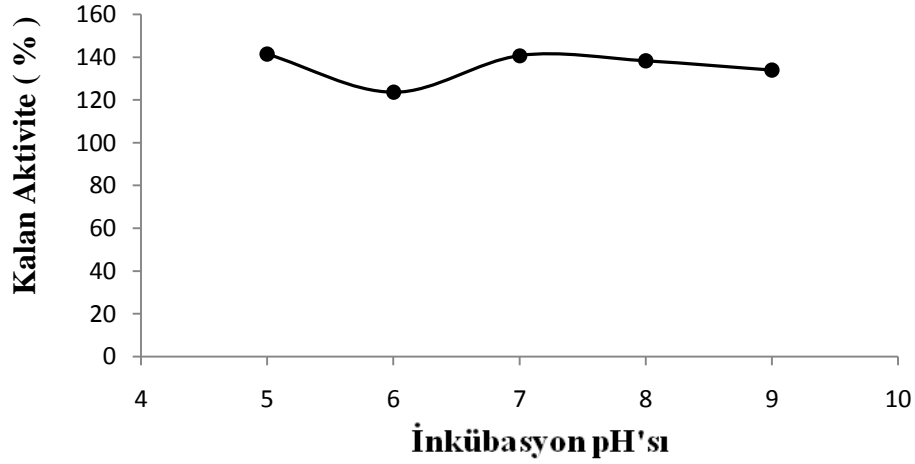
Enzimin ısıl kararlılığı, MES tamponu (50 mM, pH 6,0) içindeki enzimin 60, 70, 80 °C'lerdeki su banyolarında 1, 2, 3, 4 ve 5 saat boyunca bekletilmesi ve bu sürelerin sonunda, gerekli işlemlerden sonra optimum şartlar altında aktivite tayinlerinin gerçekleştirilmesi ile incelendi. Isı ile hiç muamele edilmemiş enzimin aktivitesi % 100 olarak kabul edilerek, bekletilen enzimlerin % kalan aktiviteleri hesaplandı ve zaman- % Kalan Aktivite grafiği çizildi (Şekil 14). Enzimin aktivitesinin 80 °C'lerde birinci saatten itibaren hızlıca düştüğü, 3 saatin sonunda ise aktivitenin sırasıyla % 60 ve % 90 oranında azaldığı belirlendi.



Şekil 14. GI'nın ısıl kararlılık eğrisi

3.9. Glukoz İzomeraz'ın pH Kararlılığının İncelenmesi

Enzimin pH kararlılığını incelemek amacıyla, enzim 1:1 oranında pH 5,0-9,0 arasındaki tamponlarla karıştırılarak ayrı ayrı 4 °C'de 48 saat bekletildikten sonra, optimum şartlar altında aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Aynı şekilde hazırlanmış fakat hiç bekletilmemiş enzim-tampon karışımlarının optimum şartlar altında aktiviteleri bakılarak bu değerler % 100 olarak kabul edildi ve bu değerlerden faydalanarak bekletilen enzimlerin % kalan aktiviteleri hesaplandı. Daha sonra inkübasyon pH'sına karşı % kalan aktiviteler grafiği geçirildi (Şekil 15).



Şekil 15. GI'nın 4 °C'deki pH kararlılık eğrisi

Şekil 15'ten de görüldüğü gibi enzim farklı pH'lardaki tamponlar içinde 4°C'de inkübe edildiğinde aktivitede önemli ölçüde bir azalma olmamaktadır.

3.10. Glukoz İzomeraz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi

GI aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek amacı ile Mg^{+2} , Mn^{+2} , Ca^{+2} , Co^{+2} , Cu^{+2} ve Ni^{+2} iyonlarının klorür tuzlarının reaksiyon karışımındaki son konsantrasyonları 1 ve 5 mM olacak şekilde optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı ve bu iyonların enzim aktivitesi üzerine etkileri belirlendi.(Tablo 9).

Tablo 9. GI aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi

Metal İyonu	1 mM	5 mM
	% Kalan Aktivite	% Kalan Aktivite
-	100	100
Mn^{+2}	147	154
Ca^{+2}	90	107
Mg^{+2}	139	142
Co^{+2}	290	290
Cu^{+2}	44	45
Ni^{+2}	67	68

Tablo 8'den de anlaşıldığı gibi Mg^{+2} , Mn^{+2} ve Co^{+2} varlığında GI aktivitesinde dikkate değer bir artış gözlemlendi. Ca^{+2} , Cu^{+2} ve Ni^{+2} varlığında ise farklı oranlarda inhibisyon gözlemlendi.

4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Glukoz izomeraz (GI), 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). Enzimi üreten mikroorganizmaların büyüme sıcaklığı ile orantılı olarak enzimin optimum çalışma sıcaklığı, 25-85 °C gibi geniş bir yayılım göstermesine rağmen, bütün glukoz izomerazlar bir takım benzer özellikler sergilemektedir; genel olarak bakıldığında birbirine benzeyen tetramer veya dimerlerden oluşurlar, moleküler ağırlığı yaklaşık 173.000 dalton civarındadır (Carell, 1989).

GI, termofilik enzimlerin yapısı ve işlevleri arasındaki ilişkiyi ileri biyokimya ve genetik mühendisliği teknikleriyle araştırmak için bir model oluşturmaktadır. Enzim, akademik öneminin yanı sıra, hemiselülozdan etanol üretilmesindeki potansiyel uygulamaları ve HFCS üretimindeki kullanımı açısından endüstriler tarafından artan bir ilgiye sahiptir. (Knorr, 1987).

Bu çalışmada *Geobacillus stearothermophilus* AH22 (*G. stearothermophilus* AH22) suşundan hazırlanan özütlerden amonyum sülfat çöktürmesi ile izole edilen GI enzimi incelenmiştir.

Bu çalışmada substrat olarak glukoz kullanılmıştır. Reaksiyon sonucu açığa çıkan fruktoz miktarına göre enzim aktivitesi belirlenmiştir. Dolayısı ile (GI) enziminin karakterizasyonunun yapılabilmesi için reaksiyon sonrasında açığa çıkan fruktoz miktarının belirlenmesi gerekmektedir.

Oluşan fruktoz miktarı Dische ve arkadaşlarının (1951) geliştirdikleri sistein-karbazol sülfirik asit metoduyla belirlenmektedir. Açığa çıkan fruktoz, bu reaksiyon sonrasında, pembe-mor renkli bir ürüne dönüşmektedir. Bir çözelti içerisindeki fruktoz miktarı 560 nm dalga boyunda yapılan spektroskopik ölçümler sonrası oluşturulan fruktoz standardından belirlenmiştir.

G. stearothermophilus AH22 suşu %1 ksiloz içeren ortamda büyütüldü ve ardından hücre içi özüt hazırlandı. Hazırlanan özüt %50–80 (a/h) aralığında gradientli olarak amonyum sülfat ile çöktürüldü. %60, %70 ve %80 'lik fraksiyonlarda GI aktivitesi tespit edildi ve bu fraksiyonlar birleştirildi. Doğal PAGE elektroforezi. *G. stearothermophilus* AH22'nin LB besi yerinde büyütülmesi ile elde edilen hücre içi özüt, *G. stearothermophilus* AH22'nin %1 ksiloz içeren LB besi yerinde büyütülmesi ile elde edilen hücre içi özüt ve amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen enzim özüt için doğal PAGE gerçekleştirildi.

Elektroforez sonucunda ham enzim özütü ve amonyum sülfat çöktürmesi sonrası (%1 ksiloz ile indüklenmiş ve ısı şoku uygulanmış özüt) bantlar karşılaştırıldığında bant sayısının oldukça azaldığı ve indüklenme ile birden fazla bandın belirginleştiği görülmektedir. İndüklenme sonucu birden fazla bandın belirginleşmesi bu organizmada GI aktivitesine sahip birden fazla enzimin varlığını ya da ksiloz ile indüklenen birden fazla enzimin bulunduğu göstermektedir (Şekil 8). Aktivite değerleri karşılaştırıldığında ısı şoku ve amonyum sülfat çöktürmesi sonrası aktivitenin 11 kat arttığı belirlendi.

Enzimlerde, optimum pH değerlerinin, kullanılan materyalin kaynağına, kullanılan substrata ve enzimin kullanılan formuna (immobilize ya da serbest) göre değişiklik gösterdiği bilinmektedir (Faiz, 2008). *G. stearothermophilus* AH22'nin sahip olduğu GI aktivitesinin pH'ya bağımlılığı incelendiğinde optimum pH'nın 6,0 olduğu gözlemlendi (Şekil 9). Enzim aktivitesinin bu pH değerinde en yüksek aktiviteyi göstermesi *G. stearothermophilus* AH22'nin ürettiği GI enzimini endüstriyel olarak arzu edilen asidik koşullarda kullanılabilir olduğunu ortaya koymaktadır. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, *Acidothermus cellulolyticus* GI'sının da aynı substrat varlığında, 80 °C'de, optimum pH değeri 6,5 olarak bildirilmiştir (Mu vd., 2012). Yapılan literatür incelemesiyle, glukoz substratı varlığında *Lactobacillus brevis* (Yamanaka, 1975), *Thermoanaerobacterium* sp. (Liu vd., 1996), *Actinoplanes missouriensis* (Van Tillbeurgh vd., 1992), *Thermus aquaticus* (Lehmbacher, 1990) GI'ları haricindeki diğer GI'ların optimum pH değeri 6,5'ten yukarıdır. Bunların dışında, glukoz substratı, *Geobacillus caldxylosilyticus* TK4 (Faiz vd, 2011), *Bacillus* sp. (Sukumar vd., baskıda) GI'larının daha yüksek bir pH optimumuna sahip oldukları belirtilmiştir.

G. stearothermophilus AH22'nin ürettiği GI'nın aktivitesinin sıcaklığa bağımlılığı 30-90 °C aralığında incelendi. Elde edilen sonuçlar değerlendirildi ve enzimin optimum sıcaklığı 80 °C olarak belirlendi (Şekil 10). Ancak enzim bağıl aktivitesinin, çalışılan sıcaklık aralığında en fazla %25 oranında düştüğü görülmektedir. Bu durum *G. stearothermophilus* AH22'nin sadece optimum sıcaklık değeri olan 80 °C değil, gerekirse çalışılan sıcaklık aralığındaki tüm sıcaklıklarda kullanılabileceğini göstermektedir. Mu ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada *Acidothermus cellulolyticus* GI'sının optimum sıcaklık değeri de 80 °C olarak belirlenmiştir (Mu vd., 2012). Farklı kaynaklardan elde edilen GI'ların aktivitelerinin sıcaklıkla değişimi hakkında fikir sahibi olmak için yapılan literatür çalışmalarına göre, *Streptomyces* sp. (Inyang vd., 1995) ve *Bacillus* sp. (Chauthaiwale vd., 1994), *Anoxybacillus gonensis* G2 (Karaoğlu, 2004) türlerine ait GI'nın optimum çalışma sıcaklıklarının da 85 °C olduğu gösterilmiştir. *Thermus thermophilus*'ta ve *Bacillus thermoantarcticus*'ta 90 °C (Lönn

vd., 2002; Lama vd., 2001) olarak belirlenmiştir. *Geobacillus caldoxylosilyticus* TK4 (Faiz vd., 2011), *Streptomyces chibaensis* J-59 (Joo vd., 2005) GI'ları ile benzerlik göstermekle beraber, bu çalışmalarda enzim aktivitesinin sıcaklığa bağımlılığı tek bir pik göstermekte olup, enzimin farklı sıcaklıklarda kullanımını sınırlamaktadır.

Aktivitenin enzim konsantrasyonuna bağımlılığı incelendiğinde, 0,07 mg/mL'lik protein içeriğine kadar, GI aktivitesinin arttığı, daha yüksek protein konsantrasyonlarında ise, GI aktivitesinin enzim miktarından bağımsız olduğu belirlendi (Şekil 11). Sonuç olarak, maksimum enzim miktarına ulaşıldıktan sonra, glukozun izomerizasyon hızının, enzim miktarından bağımsız olarak gerçekleştiği söylenebilir.

Enzimin, 60-80 °C aralığında, saatte bir aktivite tayini yapılmak suretiyle, toplam beş saat bekletilmesi sonunda, kalan aktiviteleri belirlenerek, ısı kararlılığı incelendi (Şekil 14). Optimum sıcaklık olan 80 °C'de bir saatlik inkübasyon sonunda, enzim aktivitesi % 60'ın üzerinde korunduğu gözlemlendi. 60 °C'de ve 70 °C'de, 5 saatlik bekletme sonunda, enzim, aktivitesini yaklaşık % 100 koruduğu gözlemlendi. *Geobacillus stearothermophilus* başka bir suşunda yapılan çalışmada, bu suşun sahip olduğu GI'nın 75 °C'de bir saat kararlı olduğu belirtilmiştir (Suakena vd., 1978). Yüksek sıcaklıklarda enzim aktivitesindeki düşmeler, sıcaklığın etkisi ile enzimin üç boyutlu yapısında negatif değişmelerin olmasından kaynaklanabilmektedir.

GI'nın +4 °C'deki pH kararlılığı incelendiğinde, enzimin oldukça kararlı bir yapıya sahip olduğu ve çalışılan tüm pH'larda 48 saatlik bekletme süreleri sonunda enzim aktivitesinin en az % 20 oranında arttığı gözlemlendi (Şekil. 15). Aktivitede bir azalma olmaması, enzimin, saklanma koşullarının belirlenmesi açısından oldukça önemlidir (Faiz, 2008). *G. stearothermophilus* AH22 GI'sı çalışılan pH aralığında uzun bir süre rahatlıkla depolanabilir. Bu durum, bize inkübasyonla, enzimin yapısının mükemmelleşmesinin sağlandığını düşündürmektedir. (Faiz, 2008) Değişen pH'larda kalan aktivitenin hep % 100'ün üzerinde fakat sigmoidal bir biçimde değişmesi, tampon iyonlarının enzimle etkileşerek aktiviteyi etkilediği sonucunu ortaya çıkarmaktadır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara benzer sonuçlar daha önce rapor edilmiştir (Faiz, 2008). İleriki bir çalışmayla tampon iyonlarının aktivite üzerine etkisinin ayrıntılı bir şekilde incelenmesi, enzimin bu davranışı hakkında daha fazla bilgi edinmemizi sağlayabilir. *Acidothermus cellulolyticus* glukoz izomerazı için yapılan pH kararlılık çalışmasında enzimin pH 5,5, 6,5 tamponlarında 4 saat bekletilmesi sonucunda aktivitenin %10 ve 7,5 pH tamponunda aynı süre bekletilmesi sonucu aktivitenin yaklaşık %25 oranında düştüğü tespit edilmiştir (Mu vd., 2012).

Glukoz izomerazlar aktivitelerini gösterebilmek için metal iyonlarına ihtiyaç duyduklarından dolayı, çeşitli metal iyonlarının aktiviteyi nasıl etkilediği araştırıldı. GI'lar özellikle divalent katyonların varlığında daha iyi aktivite göstermektedirler (Callens vd., 1988; Callens vd., 1986). Mn^{+2} , Mg^{+2} , Co^{+2} metal iyonları 1 mM ve 5 mM konsantrasyonlarında, metal iyonu konsantrasyonu arttıkça enzim aktivitesinde % 40-190 oranında artış meydana gelirken Cu^{+2} , Ni^{+2} gibi diğer metal iyonları aktiviteyi % 45-55 oranında inhibe etmiştir. GI'nın maksimum aktivite için Mg^{+2} , Co^{+2} veya Mn^{+2} gibi divalent katyonlara veya bunların kombinasyonlarına ihtiyaç duyduğu bilinmektedir (Bhosale vd., 1996). Dolayısıyla yapılan çalışmada gözlenen sonuçlar, literatürle uyum içerisindedir. GI'nın metal iyonlarına karşı benzer davranışları daha önce bildirilmiştir (Bucke, 1983; Smith vd., 1991; Faiz vd., 2011).

Yapılan kinetik incelemelerde, *G. stearothermophilus* AH22 GI'nın glukoz için düşük K_m değerine sahip olduğu, dolayısı ile enzimin glukozla olan ilgisinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Şekil 12'den de görüldüğü üzere, *G. stearothermophilus* AH22 GI'nın K_m değerinin birçok mikroorganizmanın K_m değerine göre düşük olduğu görünmektedir. Enzimin kinetik değerlerinin ve optimum substrat konsantrasyonunun belirlenmesi çalışması glukoz substratı varlığında yapıldı. Çizilen substrat-doygunluk grafiğinden, GI'nın basit Michealis-Menten kinetiğine uyduğu açıkça görüldü (Şekil. 12). Çizilen bu grafikten yararlanarak, enzimin optimum substrat konsantrasyonu 100 mM olarak belirlendi. Enzimin 150 mM substrat konsantrasyonunda, doygunluğa ulaştığı ve bundan sonraki konsantrasyonlarda hızın değişmediği saptandı. Enzimin kinetik verileri olan Michealis-Menten (K_m) ve maksimum hız (V_{maks}) değerleri, çizilen Lineweaver-Burk eğrisinden sırasıyla, 58,16 mM ve 2,109 U/mg protein olarak belirlendi (Şekil. 13). Substratın enzime olan ilgisinin bir göstergesidir olan K_m değeri ne kadar küçük olursa, enzimin substrata karşı ilgisi o kadar fazladır. Buna göre GI'nın glukozla ilgisi, *Actinoplanes missouriensis*, *Streptomyces sp.*, *Clostridium thermosulfurogenes*, *Streptomyces olivochromogenes*, *Arthrobacter sp.*, *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*, *Bacillus coagulans*, ve *Streptomyces albus* GI'larından oldukça fazladır. Yine aynı substrat varlığında, *Streptomyces flavogriseus* GI'sı için K_m 0,297 mM olarak bildirildi (Chen vd., 1979). Bu GI'nın glukozla ilgisinin ise *G. stearothermophilus* AH22 GI'sından daha fazla olduğu görüldü.

5. ÖNERİLER

Yıllar boyunca birçok farklı organizmadan yüzlerce farklı enzim karakterize edilmiş ve farklı organizmalardan yeni enzimlerin ortaya çıkarılması çalışmaları halen çok büyük önem arz etmektedir. Günümüzde enzimler tıptan birçok sanayi dalına kadar farklı alanlarda kullanılmaktadır çünkü enzim katalizli prosesler daha hızlı, daha ekonomik, çevre dostu, ürün verimi oldukça yüksek ve safsızlık oluşumu oldukça düşüktür.

Bu çalışmada *Geobacillus stearothermophilus* AH22 (*G. stearothermophilus* AH22) suşundan hazırlanan özütlerden amonyum sülfat çöktürmesi ile izole edilen glukoz izomeraz (GI) enzimi karakterize edilmiş ve kinetik verileri elde edilmiştir.

Bundan sonra yapılabilecek olan çalışmalar, *G. stearothermophilus* AH22’de izole edilip karakterize edilmiş olan GI enziminin tam saflaştırılması ve ileri derecede karakterize edilmesi, çeşitli kimyasal maddeler mevcudiyetinde davranışının incelenmesi ve inhibisyon mekanizmalarının ayrıntılı bir şekilde ortaya konması şeklinde sıralanabilir. Ayrıca, GI enzimini kodlayan gen için moleküler biyoloji çalışmaları gerçekleştirilerek rekombinant enzim üretimi sağlanabilir ve çeşitli mutasyon çalışmaları ile enzimin biyokimyasal özellikleri endüstriyel kullanılabilirliğini artıracak yönde geliştirilebilir.

İmmobilizasyon yöntemi, enzimatik işlemlerde masrafları büyük oranda düşürdüğü için, enzimlerin sürekli kullanılabilirliklerini ve kararlılıklarını arttırmanın etkin bir yolu olarak kullanılmaktadır. *G. stearothermophilus* AH22 GI’sının çeşitli matrislerde immobilizasyonu ve ardından immobilize enzimin özelliklerinin ve dolayısıyla kararlılıklarının nasıl değiştiği araştırılabilir. İmmobilize edilmiş enzim reaksiyonlarda defalarca kullanılabilir hale getirileceğinden, endüstriyel açıdan da oldukça cazip hale gelebilecektir.

6. KAYNAKLAR

- Bailey JE and Ollis DF. 1986. Biochemical Engineering Fundamentals, Mc Graw Hill, New York, 984-985.
- Banerjee S, Archana A and Satyanarayana T. 1994. Xylose metabolism in a Thermophilic Mold *Malbranchea pulchella* var. *Sulfurea* Tmd-8, Curr. Microbiol, 29:349-352.
- Basuki W, Lizuka M, Ito K, Furuichi K and Minamiura N. 1992. Evidence for the existence of isoenzymes of glucose isomerase from *Streptomyces phaeochromogenes*. Biosci Biotechnol Biochem, 56:180-185.
- Batt CA, O'neill E, Novak SR, Ko J and Sinskey A. 1986. Hyperexpression of Escherichia coli Xylose Isomerase. Biotechnol Prog, 2:140-144.
- Beck CF and Warren RAJ. 1988. Divergent Promoters, a Common form of Gene Organization. Microbiol Rev, 52:318-326.
- Bengston BL and Amm WR. 1973. Procédé Du Isomerisation du Glucose et du Fructose, French Patent, 2:172-882.
- Bhosale SH, Rao MB and Deshpande VV. 1996. Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. Microbiol Rev, 60:280-300.
- Blacklow SC, Raines RT, Lim WA, Zamore PD and Knowles JR. 1988. Triosephosphate Isomerase Catalysis is Diffusion Controlled. Biochemistry, 27:1158-1167.
- Blow DM and Collyer CA. 1990. Structure, mechanism, and engineering of xylose isomerase, Sixth International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms.
- Blow DM, Collyer CA, Goldberg JD and Smart OS. 1992. Structure and mechanism of D-xylose isomerase. Faraday Discuss, 93:67-73.
- Bogumil R, Kappl J, Huttermann C and Witzel H. 1993. Xand Q-band EPR studies on the two Mn²⁺-substituted metal-binding sites of D-xylose isomerase. Eur J Biochem, 213:1185-1192.
- Boguslawski G and Rynski MJ. 1982. Novel Strain Of *Bacillus Licheniformis* Useful in production of glucose isomerase and method of screening *Bacillus* mutants for the ability to produce glucose isomerase in the absence of xylose, U.S. Patent, 4:355-363.
- Bok SK, Seidman W and Wopat PW. 1984. Selective isolation of acidophilic *Streptomyces* strains for glucose isomerase. Appl. Environ. Microbiol, 47:1213-1215.
- Bor Y, Moraes C, Lee S, Crossby WL, Sinskey AJ and Batt CA. 1992. Cloning and sequencing the *Lactobacillus brevis* encoding xylose isomerase gene. Gene, 114:127-131.
- Briggs KA, Lancashire WE and Hartley BS. 1984. Molecular cloning, DNA structure and expression of the *Escherichia coli* D-Xylose isomerase. Embo J, 3:611-616.

- Bucke C. 1983. Glucose Transforming Enzymes, Applied Science Publishers, London, 93-127.
- Callens M, Kersters-Hilderson H, Van Opstal O and De Bruyne CK. 1986. Catalytic properties of D-Xylose isomerase from *Streptomyces violaceoruber*. Enzyme Microb. Technol, 8:696-700.
- Callens M, Kersters-Hilderson H, Vangrysperre W and De Bruyne CK. 1988. D-Xylose Isomerase from *Streptomyces Violaceoruber*: Structural and Catalytic Roles of Bivalent Metal Ions, Enzyme Microb. Technol, 10:695-700.
- Carell HL. 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:4440-4444.
- Chaing LC, Hsiao HY, Ueng PP, Chen LF and Tsao GT. 1981. Ethanol Production from Xylose by Enzymic Isomerisation and Yeast Fermentation. Biotechnological Bioengineering Symp, 11:263-274.
- Chauthaiwale JV and Rao MB. 1994. Production and purification of extracellular D-xylose isomerase from an alkaliphilic, thermophilic *Bacillus* sp. Appl. Environ. Microbiol, 60:4495-4499.
- Chen WP and Anderson AW. 1979. Purification, Immobilization and Some Properties of Glucose Isomerase from *Streptomyces flavogriseus*. Appl. Environ. Microbiol, 6: 1111-1119.
- Chen WP. 1980. Glucose Isomerase. Process Biochemistry, june/july 1-5 august/september 5-11.
- Collyer CA and Blow DM. 1990. Observations of Reaction Intermediates and The Mechanism of Aldose-Ketose Interconversion by D-Xylose Isomerase, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 87:1362-1366.
- Faiz Ö. 2005. Yeni Bir Termofilik Bakterinin, *Anoxybacillus gonensis* A4, hücre Dışı Lipaz/Esteraz Yeteneğinin İncelenmesi ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü. Trabzon.
- Gaikwad SM, More MW, Vartak HG and Deshpande VV. 1988. Evidence for the essential histidine residue at the active site of Glucose/ Xylose isomerase from *Streptomyces*. Biochem. Biophys. Res. Commun, 155:270-277.
- Gaikwad SM, Rao M and Deshpande VV. 1992. Structure-Function Relationship of Glucose/Xylose Isomerase from *Streptomyces*: Evidence for The Occurrence of Inactive Dimer, Enzyme Microb. TECHNOL., 15:155-157.
- Geminos G, Greenfield PF. 1978. An enzymatic technique for the detection of dextran in cane juice and prediction of viscosity increases. Int. Sugar J., 80:227-231.
- Ghatge MS, and Deshpande VV. 1993. Evidence for specific interaction of guanidine 193: 979-984.

- Ghatge MS, Phadtare SU, Bodhe AM and Deshpande VV. 1994. Unfolding and refolding of glucose/xylose isomerase from *Streptomyces* sp. NCIM 2730. *Enzyme Microb. Technol.*, 16:323–327.
- Harhangi HR, Akhmanova AS, Emmens R, Van Der Drift C, De Leat WTAM, Van Dijken JP, Jetten MSM, Pronk JT and Den Camp HJMO. 2003. Xylose Metabolism in the Anaerobic Fungus *Piromyces* sp. Strain E2 Follows the Bacterial Pathway, *Arc. Microbiol*, 180:134-141.
- Hess JM, Tchernajenko V, Vieille C, Zeikus JG and Kelly RM. 1998. *Thermotoga neapolitana* Homotetra-Meric Xylose İsomerase is Expressed as a Catalytically and Thermostable Dimer in *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol*, 64:2357-2360.
- Inyang CU, Gebhart U, Obi SKC and Bisswanger H. 1995. Isolation and Characterization of a D-Glucose/Xylose Isomerase from a New Thermophilic Strain *Streptomyces* Sp. (Plc), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43:632-638.
- Joo GJ, Shin JH, Heo GY, Kim, YM and Rhee IK. 2005. Molecular Cloning and Expression of a Thermostable Xylose (Glucose) Isomerase Gene, *xylA*, from *Streptomyces chibaensis* J-59, *J. Microbiol*, 43:34-37.
- Karaoğlu H. 2010. *Anoxybacillus gonensis* Glukoz İzomerazının Genetik Manipulasyonlarla Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin Geliştirilmesi. Doktora Tezi. K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü. Trabzon.
- Karaoğlu H. 2004. *Anoxybacillus gonensis* Glukoz (D-Ksiloz) İzomeraz Geninin Klonlanması, İzolasyonu ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü. Trabzon.
- Keleti T, Leocini R., Pagani R and Marinello E. 1987. A kinetic method for distinguishing whether an enzyme has one or two active sites for two different substrates: rat liver L-threonine dehydratase has a single active site for threonine and serine. *Eur. J. Biochem.*, 170:179–183.
- Kirk O, Borchert TV and Fuglsang CC. 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.
- Kristo P, Saarelainen R, Fagerstrom R, Aho S and Korhola M. 1996. Protein purification, and Cloning and Characterization of the cDNA and Gene for Xylose İsomerase of Barley, *Eur. J. Biochem.*, 237:240-246.
- Lama L, Nicolaus B, Calandrelli V, Romano I, Basile R and Gambacorta A. 2001. Purification and characterization of thermostable Xylose (glucose) isomerase from *Bacillus thermoantarcticus*. *Microbial Biotechnol.*, 27: 234-400.

- Lehmbacher A and Bisswanger H. 1990. Isolation and Characterization of an Extremely Thermostable D-Xylose Isomerase from *Thermus aquaticus* HB8, J. Gen. Microbiol., 136:679-686.
- Liu SY, Wiegel J and Gherardine FC. 1996. Purification And Cloning of A Thermostable Xylose (Glucose) Isomerase With An Acidic pH Optimum From *Thermoanaerobacterium* Strain Jw/SI-Ys 489, J. Bacteriol., 178:5938-5945.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, J. Biol. Chem., 193:265-275.
- Lönn A, Gardonyi M, Willem VZ, Bärbel HH and Cordero OR. 2002. Cold Adaptation of Xylose Isomerase from *Thermus thermophilus* Through Random PCR Mutagenesis: Gene Cloning and Protein Characterization, Eur. J Biochem., 269:157-163.
- Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Mu W, Wang X, Xue Q, Jiang B, Zhang T and Miao M. 2012. Characterization of a thermostable glucose isomerase with an acidic pH optimum from *Acidothermus cellulolyticus*. Food Research International. 47:364-367
- Onat T, Emerk K, Sözmen EY. 2002. İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Rangarajan M, Asboth B and Hartley BS. 1992. Stability of *Arthrobacter* D-Xylose isomerase to denaturants and heat. Biochem., J., 285:889-898.
- Rose IA, O'conell EL and Mortlock RP. 1969. Stereochemical Evidence for a Cis-Enediol Intermediate in Mn- Dependent Aldose Isomerases, Biochim. Biophys. Acta., 178:376.
- Sinnot ML. 1998. Comprehensive Biological Catalysis, Academic Presss, New York, 254-271.
- Smith CA, Rangarajan M and Hartley BS. 1991. D-Xylose (D-glucose) Isomerase from *Arthrobacter* Strain NRRL B3728, Biochem. J., 277:255-261.
- Suekane M, Tamura M and Tomimura Ch. 1978. Physico-chemical and enzymatic properties of purified glucose isomerases from *Streptomyces olivochromogenes* and *Bacillus stearothermophilus*. Agric. Biol. Chem. 42: 909-917.
- Telefoncu A. 1997. Enzimoloji, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, İzmir, 1:305.
- Van Tillbeurgh H, Jenkins J, Chiadmi M, Janin J, Wodak SJ, Mrabet NT and Lambeir AM. 1992. Protein Engineering of Xylose (Glucose) Isomerase From *Actinoplanes Missouriensis*. 3. Changing Metal Specificity And The pH Profile By Site-Directed Mutagenesis, Biochemistry, 31:5467-5471.
- Vangrýsperre W, Callens M, Kersters-Hilderson H and De bruyne CK. 1988. Evidence for an essential histidine residue in D-xylose isomerases. Biochem. J. 250:153-160.

- Vangrype W, Van Damme J, Vandekerckhove C, de Bruyne K, Cornelis R and Kersters-Hilderson H. 1990. Localization of the essential histidine and carboxylate group in D-xylose isomerases. *Biochem. J.* 265:699–705.
- Whitlow M, Howard AC, Finzel BC, Poulos TL, Winborne E and Gilliland GL. 1991. A metal mediated hydride shift mechanism for xylose isomerase based on the 1,6A° *Streptomyces rubiginosus* structures with xylitol and D-xylose. *Protein* 9:153-173.
- Wiseman A. 1975. *Handbook of enzyme biotechnology*. Ellis Horwood Ltd., Chichester, United Kingdom.
- Yamanaka K. 1975. D-xylose Isomerase from *Lactobacillus brevis*, *Methods Enzymol.* 41:466-471.
- Zaborsky O. 1973. *Immobilized Enzyme*, CRC Pres, Ohio, 1-3.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Trabzon'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Trabzon Mehmet Akif Ersoy İlköğretim Okulu'nda tamamladı. 2005-2009 yılları arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nde Lisans öğrenimini tamamladı. 2009 yılında Rize Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda tezli yüksek lisans programına başladı.