

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***Anoxybacillus gonensis* GLUKOZ İZOMERAZININ GENETİK
MANİPULASYONLARLA BAZI BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN
GELİŞTİRİLMESİ**

Biyolog Hakan KARAOĞLU

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
“Doktor (Biyoloji)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 21.06.2010
Tezin Savunma Tarihi : 26.08.2010**

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Edip KEHA
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Salih TERZİOĞLU

Trabzon 2010

ÖNSÖZ

Anoxybacillus gonensis glukoz izomerazının genetik manipulasyonlarla bazı biyokimyasal özelliklerinin geliştirilmesini konu alan bu araştırma, 104T472 nolu TÜBİTAK araştırma projesi, TBAG-AY/395 nolu TÜBİTAK hızlı destek projesi ve KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri biriminden (Proje No: 2003-111.04.6) sağlanan imkânlarla KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Doktor Programında, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji laboratuvarında yapılmıştır.

Araştırma konusunun seçiminde, verilerin değerlendirilmesi ve sonuçlandırılmasında değerli eleştiri ve önerileri ile yol gösteren saygıdeğer hocam Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ'e, biyokimyasal çalışmalarda değerli eleştiri ve önerilerini esirgemeyen hocam Prof.Dr. Edip KEHA'ya, laboratuvar çalışmaları esnasında bilgi ve tecrübelerini esirgemeyerek yol gösterici olan Doç.Dr. Sabriye ÇANAKÇI'ya teşekkür etmeyi bir borç bilirim. Ayrıca, bu çalışmada büyük emekleri bulunan, Arş. Gör. Derya YANMIŞ ve Arş. Gör. Fulya AY'a çok teşekkür ederim. Kolonların hazırlanmasında yardımcı olan Nuriye EFE'ye sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Ayrıca öğrencilik hayatım boyunca benden maddi-manevi hiçbir desteğini esirgemeyen biricik eşim Arş.Gör.Handan KARAOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tüm bunlara ek olarak sevgi ve destekleriyle her zaman bana güç veren aileme, akrabalarım ve yakın arkadaşlarıma minnetlerimi sunarım.

Hakan KARAOĞLU

Trabzon 2010

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET	VI
SUMMARY	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ	X
SEMBOLLER DİZİNİ	XI
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Glukoz İzomerazın Özellikleri.....	2
1.1.1. Substrat Seçiciliği.....	2
1.1.2. Metal İyonu Gereksinimi ve İnhibitörler.....	3
1.1.3. Alt Ünite Yapısı	3
1.1.4. Optimum Sıcaklık ve pH	4
1.1.5. GI'ların DNA Dizi Benzerliği ve Reaksiyon Mekanizması.....	4
1.2. Glukoz İzomerazın Önemi.....	6
1.3. GI Üreten Mikroorganizmalar.....	9
1.4. Endüstriyel GI'lar.....	11
1.5. Termofilik Enzimler	12
1.6. GI'nın Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin Bölge Özgün Mutasyonlar ile Geliştirilmesi	13
1.6.1. Isıl Kararlılığı Mutasyonları	13
1.6.2. Aktif Bölge Mutasyonları	16
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	19
2.1. Deneylerde Kullanılan Gereç ve Kimyasallar	19
2.2. Deneylerde Kullanılan Hücre ve Plazmitler	19
2.3. <i>A. gonensis</i> G2 ^T 'ye Ait Yaban Tip <i>xylA</i> Geninin Baz Diziliminin Açığa Çıkarılması.....	20
2.4. <i>A. gonensis</i> G2 ^T Yaban Tip <i>xylA</i> Geninin pET28a(+) Ekspresyon Vektörüne Klonelanması.....	21
2.4.1. Bir HisTag Kuyruğu Taşıyan GI'yı Üretecek Vektörün Tasarlanması.....	21

2.4.2.	Yaban Tip GI'yi Mezofilik Bir Konakta Üretecek Vektörün Tasarlanması	22
2.5.	Mutasyon Çalışmaları.....	22
2.6.	Enzimlerin Saflaştırılmaları	24
2.6.1.	Enzim Üretimi.....	24
2.6.1.1.	<i>AgoG2GI-yt</i> 'nin Üretimi.....	24
2.6.1.2.	<i>AgoG2GI-rek</i> 'in ve Mutant Enzimlerin Üretimi.....	25
2.6.2.	Isı Bozunumu	25
2.6.3.	Amonyum Sülfat Çöktürmesi	26
2.6.4.	İyon Değişim Kromatografisi	26
2.6.5.	Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi.....	27
2.7.	Biyokimyasal Çalışmalar	28
2.7.1.	Protein Miktarı Tayini	28
2.7.2.	Glukoz İzomeraz Aktivite Deneyi.....	28
2.7.3.	<i>AgoG2GI-yt</i> 'nin Karakterizasyonu	29
2.7.3.1.	Optimum Sıcaklık.....	29
2.7.3.2.	Optimum pH	29
2.7.4.	Kinetik Parametreler.....	29
2.7.5.	Mutasyonların Isıl Kararlılığı Üzerine Etkisi	30
2.8.	Enzimin Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi	30
3.	BULGULAR.....	31
3.1.	<i>A. gonensis</i> G2 ^T Yaban Tip GI kodlayan <i>xyIA</i> Geninin Baz Dizilimi.....	31
3.2.	<i>AgoG2GI-yt</i> 'yi Kodlayan <i>xyIA</i> Geninin pET28a(+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması	32
3.3.	Mutant GI Enzimleri.....	33
3.4.	Enzimlerin Saflaştırılmaları ve Kinetik Parametreleri	34
3.4.1.	<i>AgoG2GI-yt</i>	34
3.4.2.	<i>AgoG2GI-rek</i>	36
3.4.3.	W137F Glukoz İzomeraz.....	38
3.4.4.	V184T Glukoz İzomeraz	41
3.4.5.	V184S Glukoz İzomeraz.....	43
3.4.6.	H99Q Glukoz İzomeraz	45
3.4.7.	H99N Glukoz İzomeraz	48
3.4.8.	H99D Glukoz İzomeraz.....	50

3.4.9.	H99E Glukoz İzomeraz	52
3.4.10.	H99L Glukoz İzomeraz	55
3.4.11.	W137F/V184S Glukoz İzomeraz	57
3.5.	<i>Ago</i> G2GI- <i>yt</i> , <i>Ago</i> G2GI- <i>rek</i> ve mutant GI'lara Ait Diğer Karakterizasyon Çalışmaları	59
3.5.1.	Optimum Sıcaklık.....	59
3.5.2	Optimum pH	60
3.6.	Mutasyonların Isıl Kararlılığı Üzerine Etkisi	61
3.7.	Enzimin Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi	62
4.	TARTIŞMA	63
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	72
6.	KAYNAKLAR	74
	ÖZGEÇMİŞ	84

ÖZET

Glukoz izomeraz (D-ksiloz ketol izomeraz; EC 5.3.1.5), büyümek için karbon kaynağı olarak ksilozu kullanabilme yeteneğine sahip, birçok bakteride bulunan hücre içi bir enzimdir. Glukoz izomeraz, D-ksilozun D-ksiluloza dönüşümünü katalizlediği gibi D-glukozun D-fruktoza dönüşümünü de katalizlemektedir. Bu ikinci özelliği HFCS (fruktoz şurubu) üretiminde endüstriyel alanda kullanılmaktadır. Glukoz izomeraz bugün dünyada ticari amaçla en çok kullanılan üç enzimden biridir.

Bu çalışmada, *Anoxybacillus gonensis* G2^T glukoz izomeraz geni klonlanarak izole edildi ve baz dizilimi belirlendi. İzole edilen gen, pET-28a(+) ekspresyon vektörüne klonlanarak *E. coli* BL21(DE3) suşu içerisinde yüksek miktarlarda üretildi. Bütün glukoz izomerazlar, amino asit dizilimleri açısından, oldukça korunumlu bazı bölgelere sahiptirler. Bu bölgeler incelenerek, bölge özgün mutasyon yöntemiyle, klonlanan glukoz izomeraz üzerinde W137F, V184T, V184S, H99Q, H99N, H99D, H99E ve H99L mutasyonları yapıldı. Yaban tip ve mutant enzimler kolon kromatografisi yöntemiyle saflaştırıldı ve karakterize edildi. Tüm mutant enzimler yaban tip enzim ile biyokimyasal özellikleri ve kinetik parametreleri bakımından karşılaştırıldı.

Yaban tip enzimin optimum pH'sı 6,5, optimum sıcaklığı 85°C, K_m 'si $146,08 \pm 9,50$ mM ve V_{max} 'sı ise $43,72 \pm 1,01$ $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein olarak belirlendi. Yapılan W137F mutasyonu ile K_m değeri $64,02 \pm 2,10$ mM'a düşürüldü. V184T, V184S mutasyonları enzim kinetik parametrelerinde önemli bir değişiklik meydana getirmezken genel olarak H99 ile yapılan mutasyonlar sonucu enzimin K_m değerinde bir artış V_{max} değerinde ise bir azalış gözlemlendi. Yapılan W137F/ V184S mutasyonu ile K_m değeri $39,29 \pm 2,87$ mM'a düşürüldü.

Anahtar Kelimeler : Glukoz izomeraz, ksiloz izomeraz, HFCS, fruktoz şurubu, bölge özgün mutasyon, enzim klonlama, enzim karakterizasyonu

SUMMARY

Enhancing Some Biochemical Properties of *Anoxybacillus gonensis* Glucose Isomerase by Genetic Manipulation

Glucose isomerase (D-xylose ketol isomerase; EC 5.3.1.5) is an intracellular enzyme found in a number of bacteria that utilize xylose as carbon substrate for growth. Glucose isomerase converts D-xylose to D-xylulose *in vivo* and also catalyzes the conversion of D-glucose to D-fructose *in vitro*. The latter activity is used in industry for the production of high fructose corn syrup (HFCS). Therefore, glucose isomerase is one of the largest volume commercial enzymes used today.

Gene coding for thermophilic glucose isomerase of *Anoxybacillus gonensis* G2^T was isolated and its complete nucleotide sequence was determined. The gene has been cloned to plasmid vector pET-28a(+) and overexpressed in *E. coli* BL21(DE3). Several discrete regions were highly conserved throughout the amino acid sequences of all glucose isomerases. By examining this regions; W137F, V184T, V184S, H99Q, H99N, H99D, H99E, and H99L mutations were performed by site-directed mutagenesis techniques at cloned glucose isomerase. The wild type enzyme and mutant enzymes were purified by column chromatography techniques. The biochemical properties of all glucose isomerases were characterized. All mutant enzymes compared with wild type enzyme for biochemical properties and kinetics parameters.

The wild-type optimal temperature was 85°C and maximal activity was observed in a pH 6,5. Its K_m and V_{max} value was calculated as $146,08 \pm 9,50$ mM and $43,72 \pm 1,01$ μ mol/dk/mg protein respectively. W135 F mutation reduced K_m value to $64,02 \pm 2,10$. V184T and V184S has not changed kinetic parameters. H99 mutations were generally increased K_m value and reduced V_{max} value. W135 F/ V184T mutation reduced K_m value to $39,29 \pm 2,87$ mM.

Keywords: Glucose isomerase, Xylose isomerase, HFCS, fructose syrup, site-directed-mutagenesis, cloning, enzyme characterization

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. D-glukozun D-fruktoza, D- ksilozun da D- ksiluloza GI aracılığıyla dönüşümlü izomerizasyonu	1
Şekil 2. Tip 2 glukoz izomerazının bir monomerinin 3 boyutlu yapısı	5
Şekil 3. GI'nın çalışma mekanizması.....	6
Şekil 4. <i>Anoxybacillus gonensis</i> GI'sının amino asit ve baz dizilimi	31
Şekil 5. HisTag kuyruklu ve kuyuksuz enzimin SDS-PAGE jel görüntüsü	33
Şekil 6. <i>AgoG2GI-yt</i> 'nin saflaştırılmasına ait iyon değişimi kolon kromatografisi	34
Şekil 7. <i>AgoG2GI-yt</i> 'nin saflaştırılmasına ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi	35
Şekil 8. <i>AgoG2GI-yt</i> ait Michaelis-Menten grafiği	35
Şekil 9. <i>AgoG2GI-rek</i> 'in saflaştırılmasına ait iyon değişimi kolon kromatografisi	36
Şekil 10. <i>AgoG2GI-rek</i> 'in saflaştırılmasına ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi	37
Şekil 11. <i>AgoG2GI-rek</i> 'e ait Michaelis-Menten grafiği.....	38
Şekil 12. W137F GI'ya ait iyon değişimi kolon kromatografisi	39
Şekil 13. W137F GI'ya ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi.....	39
Şekil 14. W137F GI'ya ait Michaelis-Menten grafiği	40
Şekil 15. V184T GI'ya ait iyon değişimi kolon kromatografisi.....	41
Şekil 16. V184T GI'ya ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi.....	42
Şekil 17. V184T GI'ya ait Michaelis-Menten grafiği.....	42
Şekil 18. V184S GI'ya ait iyon değişimi kolon kromatografisi	43
Şekil 19. V184S GI'ya ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi.....	44
Şekil 20. V184S GI'ya ait Michaelis-Menten grafiği.....	45
Şekil 21. H99Q GI'ya ait iyon değişimi kolon kromatografisi	46
Şekil 22. H99Q GI'ya ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi	46
Şekil 23. H99Q GI'ya ait Michaelis-Menten grafiği	47
Şekil 24. H99N GI'ya ait iyon değişimi kolon kromatografisi	48
Şekil 25. H99N GI'ya ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi	49
Şekil 26. H99N GI'ya ait Michaelis-Menten grafiği	49

Şekil 27. H99D GI'ya ait iyon değişimi kolon kromatografisi	50
Şekil 28. H99D GI'ya ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi	51
Şekil 29. H99D GI'ya ait Michaelis-Menten grafiği	52
Şekil 30. H99E GI'ya ait iyon değişimi kolon kromatografisi.....	53
Şekil 31. H99E GI'ya ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi.....	53
Şekil 32. H99E GI'ya ait Michaelis-Menten grafiği.....	54
Şekil 33. H99L GI'ya ait iyon değişimi kolon kromatografisi.....	55
Şekil 34. H99L GI'ya ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi.....	56
Şekil 35. H99L GI'ya ait Michaelis-Menten grafiği.....	56
Şekil 36. W137F/V184S GI'ya ait iyon değişimi kolon kromatografisi	57
Şekil 37. W137F/V184S GI'ya ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi	58
Şekil 38. W137F/V184S GI'ya ait Michaelis-Menten grafiği	59
Şekil 39. Sıcaklık- GI aktivite grafiği	60
Şekil 40. pH- GI aktivite grafiği	60
Şekil 41. W137F, V184S, V184T ve W137F/V184S mutasyonlarının enzimin ısıl kararlılığı üzerine etkisi	61
Şekil 42. H99E, H99D, H99Q, H99L ve H99N mutasyonlarının enzimin ısıl kararlılığı üzerine etkisi	61
Şekil 43. <i>AgoG2GI-yt</i> enziminin moleküler ağırlığının MALDI-TOF yöntemi ile belirlenmesi.....	61
Şekil 44. Tip 1 ve Tip 2 glukoz izomerazlarda aktif bölgede olduğu düşünülen korunmuş amino asitler	68

TABLULAR DİZİNİ

Sayfa No

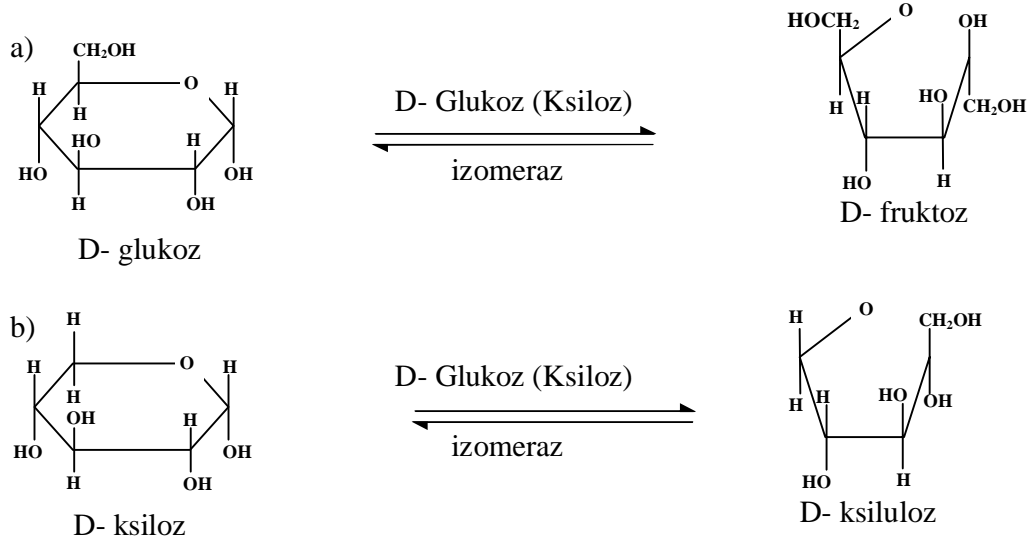
Tablo 1. GI üreten mikroorganizmalar	10
Tablo 2. Ticari öneme sahip GI'ları üreten bazı mikroorganizmalar ve ürünlerinin (GI) ticari adları	11
Tablo 3. GI'nın Isıl kararlılığını geliştirmek için yapılan bazı mutasyonlar.....	15
Tablo 4. GI'nın aktif bölgesi içerisinde yapılan bazı mutasyonlar.....	17
Tablo 5. <i>A. gonensis</i> G2 ^T 'ye ait <i>xylA</i> geninin baz diziliminin açığa çıkarılmasında kullanılan invers-PCR primerleri	20
Tablo 6. Ekspresyon vektörüne klonlamada kullanılan primerler.....	21
Tablo 7. Mutasyonların gerçekleştirilmesinde kullanılan primerler.....	23
Tablo 8. <i>AgoG2GI-yt</i> ait saflaştırma tablosu.....	34
Tablo 9. <i>AgoG2GI-rek</i> 'e ait saflaştırma tablosu.....	37
Tablo 10. W137F GI'ya ait saflaştırma tablosu	38
Tablo 11. V184T GI'ya ait saflaştırma tablosu	41
Tablo 12. V184S GI'ya ait saflaştırma tablosu	44
Tablo 13. H99Q GI'ya ait saflaştırma tablosu.....	45
Tablo 14. H99N GI'ya ait saflaştırma tablosu.....	48
Tablo 15. H99D GI'ya ait saflaştırma tablosu.....	51
Tablo 16. H99E GI'ya ait saflaştırma tablosu	52
Tablo 17. H99L GI'ya ait saflaştırma tablosu	55
Tablo 18. W137F/V184S GI'ya ait saflaştırma tablosu.....	58
Tablo 19. Çeşitli mikroorganizmalara ait GI'nın glukoz için K_m değerleri	66
Tablo 20. Çeşitli mikroorganizmalara ait GI'nın glukoz için k_{cat} değerleri.....	66
Tablo 21. Yaban tip ve mutant enzimlerin kinetik parametreler açısından karşılaştırılmaları	69

SEMBOLLER DİZİNİ

AgoG2GI-yt	<i>Anoxybacillus gonensis</i> glukoz izomerazı
AgoG2GI-rek	Ekspresyon vektörü ile üretilen <i>Anoxybacillus gonensis</i> GI'sı
BSA	Bovine serum albümin
DEAE	Dietil aminoetil
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo nükleik asit
dNTP	Deoksi nükleotid trifosfat
FDA	Food and Drug Administration
GI	Glukoz izomeraz
HCl	Hidroklorik asit
HFCS	High Fructose Corn Syrup
HisTag	Histidin kuyruğu
IPTG	İzopropil β -D-1- tiyogalaktopiranosid
LB	Luria-bertoni broth
M	Molar
mM	Milimolar
MOPS	3-(N-Morfolino) propansülfonik asit
NAD ⁺	Nikotinamid adenin dinükleotid
NEB	New England Biolabs
ng	Nanonogram
nm	Nanometre
μ l	Mikrolitre
μ g	Mikrogram
μ M	Mikromolar
PCR	Polimer zincir reaksiyonu
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
TE	Tris-EDTA tamponu
X-Ray	Röntgen radyasyonu
vd.	Ve diğerleri

1. GENEL BİLGİLER

D-glukoz / ksiloz izomeraz (D-ksiloz ketol izomeraz; EC 5.3.1.5) birçok mikroorganizma tarafından sentezlenen, izomeraz sınıfı, hücre içi bir (intraselüler) enzimdir ve hem 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). 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).



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

Bütün ksiloz izomerazlar aktiviteleri ve kararlı halde bulunmaları 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 aydınlatılmıştır. Bu organizmalara örnek olarak *Arthrobacter* (Henrik vd., 1989), *Actinoplanes missouriensis* (Rey vd., 1988), *Streptomyces rubiginosus* (Whitlow vd., 1991), *Streptomyces murinus* (Rasmussen vd., 1994) verilebilir. Kristal yapısı üzerinde yapılan bu çalışmalardan enzimin tersiyer yapısının oldukça kararlı olduğu ortaya çıkmıştır (Henrik vd., 1989).

1.1. Glukoz İzomerazın Özellikleri

Çeşitli mikroorganizmalardan izole edilen GI'ların enzimatik ve biyokimyasal özellikleri yoğun bir şekilde çalışılmıştır. Enzimin pH ve ısıl kararlılığı, metal iyon gereksinimi, substrat spesifikliği gibi spesifik özellikleri hakkındaki bilgiler enzimin inhibe olmasını engellemek ve HFCS üretiminde ticari olarak uygulanabilirliğini değerlendirmek açısından önemlidir.

1.1.1. Substrat Seçiciliği

GI'nın pentoz, heksoz, şeker alkoller ve şeker fosfatları gibi geniş çeşitteki substratlarını izomerize etme yeteneği birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir. Farklı organizmalardan elde edilen enzimlerin substrat seçiciliği organizmadan organizmaya değişiklik göstermektedir. GI'nın en yaygın substratları D-ksiloz ve D-glukozdur. D-riboz, L-arabinoz, L-ramnoz, D-alloz ve 2-deoksiglukoz gibi şekerlerin de GI'nın birer substratı oldukları tespit edilmiştir. Glukoz ve ksilozda olduğu gibi ekvatorial pozisyonundaki 3. ve 4. karbon atomlarında hidroksil grubu bulunduran substratlarla maksimum izomerizasyon gözlenmiştir. İster immobilize edilmiş olsun ister olmasın, çeşitli mikroorganizmalardan elde edilen GI'nın katalizlediği D-glukozun D-fruktoza dönüşümü %29 ile %59 arasında değişiklik göstermektedir (Bhosale vd., 1996).

1.1.2. Metal İyonu Gereksinimi ve İnhibitörler

GI 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., 1988; Gaikwad vd., 1992). *Bacillus coagulans*'dan elde edilen GI üzerinde direkt metal iyonunun bağlanma çalışmaları Danno tarafından gerçekleştirilmiştir (Danno, 1971). Kasumu ve arkadaşları ise her bir tetramer için 4 Co^{+2} 'nin varlığını tespit etmişlerdir (Kasumi vd., 1982).

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, lyksos ve TRİS'dir (Bucke, 1983; Smith vd., 1991).

1.1.3. Alt Ünite Yapısı

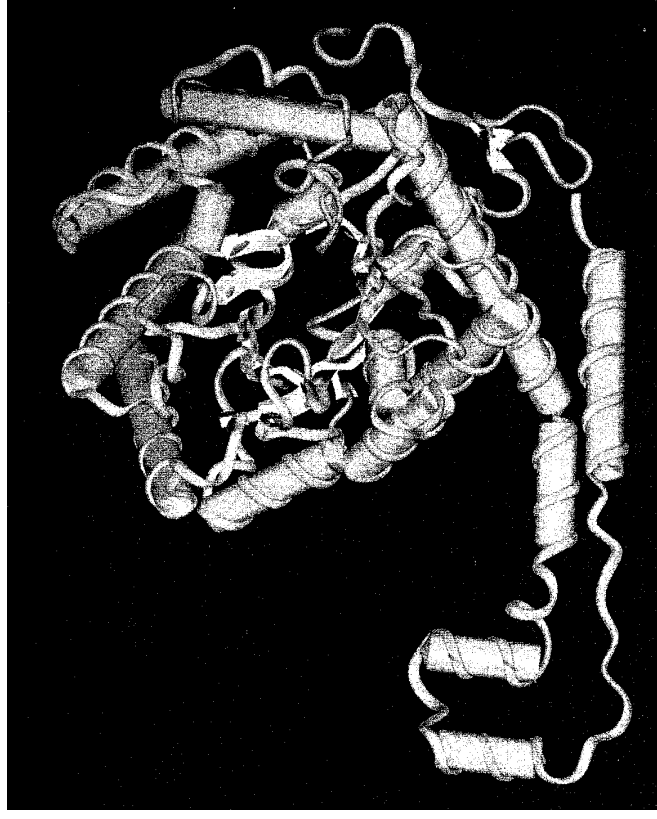
GI'nın sedimentasyon sabitleri ve moleküler ağırlıkları sırasıyla 7,55 ile 11,45 arasında ve 52.000 ile 191.000 dalton arasında değişiklik göstermektedir (Chen, 1980). GI'nın alt ünite ve amino asit yapısına bakıldığında, molekül birbirine benzer veya aynı 4 yâda 2 alt ünitelerden meydana gelmektedir. Alt üniteler birbirlerine kovalent olmayan etkileşimlerle bağlıdır ve alt üniteler arasında disülfid bağları bulunmamaktadır. *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 izoenziminin birbirinin aynı olmayan 4 alt birimden meydana geldiği gösterilmiştir (Bhosale vd., 1996). *Arthrobacter* ve *Streptomyces* türlerinde yapılan çalışmalarda molekülün biyolojik aktivitesinde rol oynayan birimin dimer yâda tetramerler olduğu ve monomer ünitelerin tek başlarına herhangi bir biyolojik aktiviteye sahip olmadıkları gösterilmiştir. (Gaikwad vd., 1992; Rangarajan vd., 1992).

1.1.4. Optimum Sıcaklık ve pH

GI'nın optimum sıcaklığı çeşitli organizmalarda 60°C ile 80°C arasında değişiklik göstermektedir ve bu değerler Co^{+2} varlığı ile artış göstermektedir. Optimum pH değerleri ise genel olarak 7,0 ile 9,0 arasında değişiklik göstermektedir. Bununla birlikte endüstriyel olarak arzu edilen 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 kararlıdır (Bhosale vd., 1996).

1.1.5. GI'ların DNA Dizi Benzerliği ve Reaksiyon Mekanizması

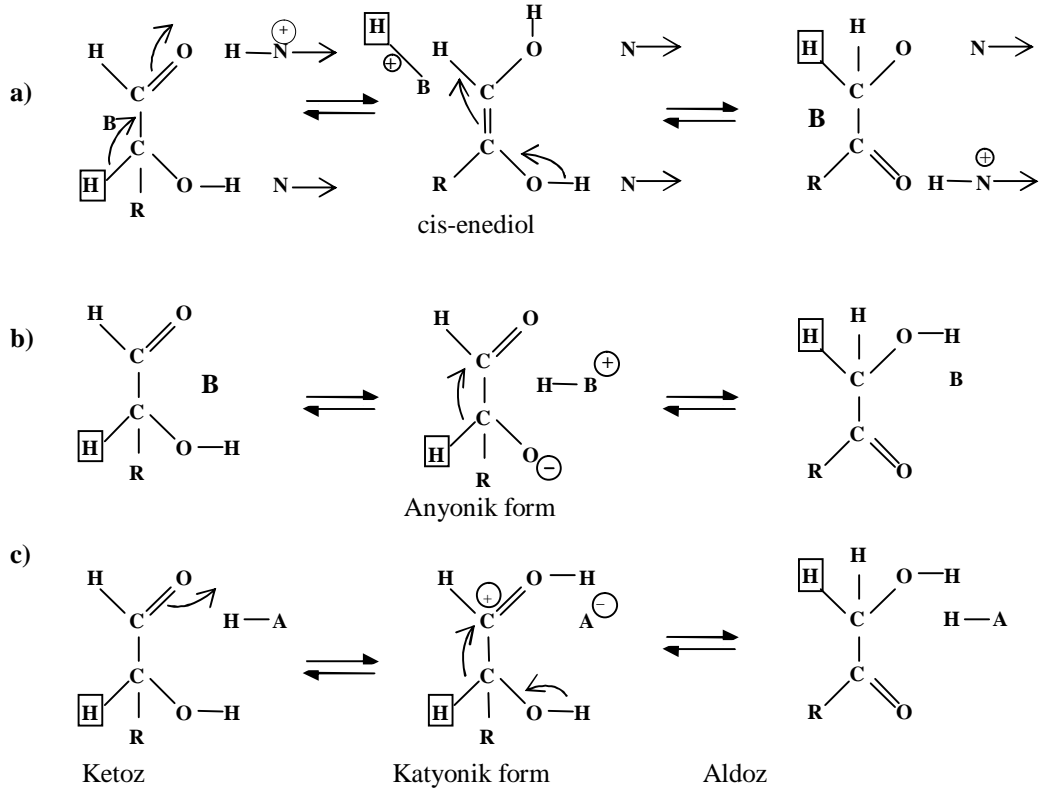
Glukoz izomerazların yapı ve işlevleri arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için çeşitli organizmalardan elde edilen GI (*xylA*) genlerinin amino asit dizilimleri karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda enzimin N-terminal ucunda 40-50 amino asitlik bir bölgenin olup olmamasına göre 2 sınıfa ayrılmışlardır. Tip 1 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. *Escherichia coli*, *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*, ve *Thermotoga spp* türlerine ait GI'lar ise 440 amino asitten meydana gelmişlerdir ve Tip 2 GI'lar olarak sınıflandırılırlar (Hess vd., 1998). Tip 2 GI'lar 8 sarmal ile çevrelenmiş birbirine paralel 8 β -levhadan ve diğer monomerlerle ilişkide bulunan uzamış bir C-terminal kuyruktan meydana gelirler (Şekil 2). Enzimin aktif bölgesi açık bir fiçli şeklinde bir cepten meydana gelir ve bu cebin alt tarafında, genel olarak hidrofobik amino asitler 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). Tip 1 ve Tip 2 glukoz izomerazlar arasında amino asit dizilimi açısından büyük farklılıklar olmasına rağmen genel olarak; 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. Uzak olan türlerin karşılaştırmalarında bile enzimin aktif bölgesine ait içeriğin birbirine oldukça yakın olduğu görülebilmektedir (Hess vd., 1998).



Şekil 2. Tip 2 glukoz izomerazının bir monomerinin 3 boyutlu yapısı

GI'nın çalışma mekanizması *Arthrobacter* ve *Streptomyces* GI'ları üzerinde yapılan X-ray kristallografisi yöntemleriyle açığa çıkarılmıştır (Farber vd, 1989; Collyer vd., 1990). Enzimin biyokimyasal özelliklerine ait veriler ise aktif bölgede yapılan bölge spesifik mutasyonlar ile belirlenmiştir.

İlk zamanlar, GI'nın şeker fosfat izomerazlara benzer bir şekilde ene-diol mekanizması ile işlev gördükleri sanılmaktaydı (Rose vd., 1969). Fakat yapılan son çalışmalarla enzimin hidrit-sift mekanizması ile çalıştığı anlaşılmıştır. Enzimin yapısı ve işlevi arasındaki ilişkiyi açıklayabilmek için onun aktif kısmının konformasyonunu bilmek son derece önemlidir. Enzimin aktif kısmını çalışmak ve işlev mekanizmasını anlamak için kimyasal modifikasyon, X-Ray kristallografisi ve izotop değişimi gibi farklı yaklaşımlar denenmiştir. GI'nın katalitik mekanizması substrat halkasının açılması, hidritin C-1'den C-2'ye kaydırılması ve halkanın kapanması şeklinde cereyan etmektedir (Bhosale vd.,1996).



Şekil 3. GI'nın çalışma mekanizması. a) cis-enediol. b) Proton transfer. c) Hidrid-shift. Kutular stereospesifik olarak transfer edilen hidrojen atomlarını göstermektedir.

1.2. Glukoz İzomerazın Önemi

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 kullanımını açısından endüstriler tarafından artan bir ilgiye sahiptir.

Glukoz izomeraz, glukozun fruktoza izomerizasyonunu katalizlediği için endüstriyel alanda, özellikle HFCS (High Fructose Corn Syrup) üretiminde, ticari bir öneme sahiptir. Fruktoz şuruplarının endüstriyel uygulamalarda başarıyla uygulanabilmesinin altında yatan sebep glukoz izomerazın keşfi olmuştur. Ülkemizde ve AB mevzuatında fruktoz şuruplarının tanımı yer almamaktadır. FDA (2000)'e göre fruktoz şurupları; %42 veya 55 fruktoz içeren tatlı, besleyici sakkarit karışımı olup, mısır nişastasını glukozunun glukoz izomeraz enzimi kullanılarak fruktoza dönüştürülmesi ile elde edilen bir üründür. Ayrıca %90 fruktoz içeren üçüncü bir tipi de bulunmakta olup, dünyada sınırlı kullanıma sahiptir (Knorr, 1987). Enzim

ticari anlamda kullanılmaya başlamadan önce yiyeceklerde tatlandırıcı madde olarak sakkaroz (sukroz) kullanılmaktaydı. Glukoz izomerazın keşfi ve özellikle 1958 yılındaki Küba devrimi sonrası meydana gelen sukroz yokluğu sebebiyle, fruktoz şuruplarının kullanımı hız kazanmıştır (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 (Inglett, 1974.) çok fonksiyonlu ürünlerdir. Fruktoz şuruplarının önemli işlev özellikleri; nemi tutarak kurumayı önlemeleri (Pomeranz, 1985), lezzeti geliştirici özellikleri (CRA., 1994), ozmotik basınçlarının yüksek olması (Hobbs, 1986.) ve fermente edilebilir şekerler açısından zengin olmalarıdır (Henry, 1976). Bu özellikleri sebebiyle fruktoz şurupları, sıklıkla gazlı ve gazsız içecekler, fırın ürünleri, çeşitli hububat ürünleri, süt mamulleri ve işlenmiş gıdalarda kullanılabilir (Wulff ve Helgeson, 1987). Mayonez ve salata sosları gibi ürünlerde fruktoz şuruplarının kullanımı ile emülsiyon stabilitesi artmakta (Inglett, 1974) ve enerji değeri de düşürülebilmektedir (Reeder, 1978). Fruktoz şuruplarının su aktivitesini azaltıcı özelliğinden yararlanılmakta ve salamura ürünlerde kullanılabilir (Hobbs, 1986). Ayrıca fruktoz şuruplarının sebze, çorba, domates sosları ve meyve gibi konserve ürünlerde de kullanımı yaygınlaşmaktadır (Nabors ve Gelardi, 1991; Hebeda, 1987; Anon, 1993). Dondurma viskozitesi değişimleri üzerinde yapılan çalışmalar fruktoz şuruplarının kullanımıyla bu ürünlerin viskozitesinin arttığını göstermiştir. Fruktoz şurubu, dondurmaya eriyebilirlik, dokuda pürüzsüzlük ve hacim kazandırmaktadır (Anon, 1979). Fruktoz şurupları; ekmek, bisküvi, kek, kurabiye, tart dolguları ve jölelerde kullanılabilir (Pomeranz, 1985). Ekmekte fruktoz şurupları fermente edilebilir substrat olup, kabuk rengine ve lezzete katkıda bulunmakta ve raf ömrünü uzatmaktadır (Kulp vd., 1991) İndirgen şekerler içerisinde en iyi bisküvi rengi fruktoz şurupları ile elde edilmiştir (Manohar ve Rao, 1997). Keklerde sakkaroz yerine fruktoz şurupları kullanımı içerdiği yüksek indirgen şekerler sebebiyle esmerleşmeyi arttırmakta ve kekin tazelik süresini uzatmaktadır (Johnson, 1989). Fruktoz şurupları tatlı tat verme özelliklerinin yanı sıra gıdalarda lezzetin gelişmesinde de rol oynar. Fruktozun dil üzerinde algılanma yoğunluğu sakkarozla göre çok daha yüksektir ve hissedilme süresi kısadır. Bu nedenle fruktoz şurupları gıdalarda karakteristik lezzet özelliklerinin algılanmasını zenginleştirmede etkilidir (Howling, 1992). HFCS, sakarozdan 1,3 ve glukozdan ise 1,7 kat daha tatlılık veren bir üründür. Glukoz, sakkarozun sahip olduğu tatlılığın %70-75'ine sahipken fruktoz ise sakkarozla göre iki kat daha fazla tatlılığa sahiptir. HFCS tatlı olmayan nişastadan imal edildiği düşünüldüğünde ve tatlandırma gücü temel alındığında sakarozdan %

10–20 daha ucuzdur. Aynı zamanda HFCS sakkarozda olduğu gibi kristalleşme problemi meydana getirmez. Üstelik D-fruktoz diyabetik bir tatlandırıcı olarak rol oynamaktadır çünkü 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 ortamında ksiloza ihtiyaç duyduğu ve üretimin 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*'den 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, ticari uygulamalarda kullanılmaya en uygun enzimdir. Enzimatik olarak glukozun izomerizasyonu 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. Yiyecek 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, yiyecek endüstrisinde en büyük marketlerde yerini almıştır (Bhosale vd., 1996). Sahip olduğu endüstriyel önemden dolayı bugüne kadar birçok organizmanın glukoz izomeraz enzimi incelenmiş (Brown vd.,1993; Chen,1980; Lee vd.,1989; Suekane, 1978) ve birçok bakterinin *xyIA* geni gen bankasındaki yerini almıştır (Amore ve Hollenberg, 1989; Bor vd., 1992; Briggs vd., 1984; Collyer ve Blow, 1990; Dekker vd., 1991; Drocourt vd., 1988; Lee vd., 1990; Lee vd., 1993; Meadeu vd., 1994; Saari vd., 1987; Wilhelm ve Hollenberg, 1985).

GI, ksiloz ve glukozun her ikisinin de izomerizasyonunu katalizler. Enzimin bu özelliği ksilozun, en nihayetinde 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. Biyolojik artıkların kullanımının ekonomik yapılabilirliği selüloz ve hemiselülozun ksiloz ve glukozu hidrolizine

ve takiben mayalarla etanole fermente edilmesine bağlıdır. Lignoselüloz ve tarımsal artıkların biyodönüşümünün etkili bir şekilde çalışmasının temel olarak biyolojik artık bileşenlerinin etkili kullanımına bağlı olduğunun anlaşılmasıyla dünya çapında tüm ilginin birden bire hemiselülozu fermente etme üzerine değiştiği görüldü. $\beta(1,4)$ bağlarıyla birbirine bağlı ksiloz ünitelerinden oluşan ksilan hemiselülozun en büyük ana birimini oluşturmaktadır. D- ksiloz çok kolay bir şekilde ksilanın asidik veya enzimatik hidrolizinden elde edilebilir (Bhosale vd.,1996). *Saccharomyces cerevisiae* gibi endüstriyel maya suşları, genel olarak heksozları etkili bir şekilde fermente edebilirler fakat D-ksilozu kullanamazlar. *Pachysolen tannophilus*, *Pichiastipitis*, *Candida utilis*, ve *Candida shehatae* gibi bazı maya türlerinin pentozları oksidoredüktatif bir yolla kullandıkları bilinmektedir fakat fermantasyon oranı oldukça düşüktür (Dupreez vd., 1985; Dupreez vd., 1983; Slininger vd., 1985; Tomoyeda ve Horitsu, 1964). Bunun yanı sıra, bu mayaların düşük etanol toleransı ve oksijen varlığındaki etanol katabolizması ticari uygulamalarda kullanılmalarını sınırlamaktadır (Dupreez vd., 1986; Dupreez vd., 1987; Ligthelm vd., 1988). *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* ve *Candida tropicalis* gibi ticari mayalar vasıtayla ksilozun fermente edilebilmesi için GI, ksilozun ksiluloza izomerizasyonunda kullanılmaktadır (Chaing vd., 1981; Schneider vd., 1981; Wang vd., 1980). D-ksilozdan etanol üretiminde düşük fermantasyon oranı gözlenmesine ve düşük ürün verimliliği elde edilmesine rağmen şu anda ksilozun izomerizasyonunu ve etanole fermantasyonunu eş zamanda sağlamak amacıyla GI geninin mayalara transfer edilmesi çalışmaları hızla artmaktadır.

1.3. GI Üreten Mikroorganizmalar

Genel olarak bakıldığında, GI; birçok prokaryotik mikroorganizmada yaygın bir şekilde bulunmaktadır (Tablo 1). *Pseudomonas hydrophila*'da bulunmasından sonra birçok bakteri ve *Actinomycetes* türünde GI aktivitesi saptanmıştır. Heterolaktik asidik bakteriler arasında *Lactobacillus brevis*'ten elde edilen GI, düşük pH değerlerinde aktif haldeydi fakat yüksek sıcaklıklarda ise kararlı değildi. Bu yüzden de ekonomik olarak bu mikroorganizmadan yararlanma da elverişli değildi (Bhosale vd.,1996).

Tablo 1. GI üreten mikroorganizmalar

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

Hücre dışına sekresyonu yapılan GI'lara ait raporlar yaygın değildir. *Streptomyces glaucescens* (Weber,1976) ve *S. flavogriseus* (Chen vd.,1979) türlerinde elde edilen GI'nın ekstrasellular olduğu rapor edilmiştir. Burada 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 yaygın saflaştırma teknikleri ile homojen bir şekilde saflaştırılmışlardır. *Streptomyces* spp. türlerinin yanı sıra *Bacillus* türleri de iyi miktarlarda GI üretmektedirler. *Candida utilis* (Wang vd., 1980) ve *Candida boidinii* (Vongsuvanlert, ve Tani, 1988) gibi birkaç mayada da GI varlığı tespit edilmiştir. Çimlenmiş arpada (Bartfay, 1960) ve buğday tohumunda da (Pubols vd., 1963) GI'nın var olduğu gösterilmiştir.

1.4. Endüstriyel GI'lar

GI üreten ve ticari olarak önemli olan birkaç organizma Tablo 2'de verilmiştir. GI'nın büyük bir ticari önemi olmasından dolayı enzimi üreten birçok yeni organizma ve bu enzimin kullanımında geliştirilen birçok yöntem 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).

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

Organizma	Ticari Adı	Üretici
<i>Actinoplanes missousriensis</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>	<i>Swetase</i>	Nagase
<i>Arthrobacter</i> sp.		Reynold Tobacco
<i>Streptomyces olivaceus</i>		Miles Laboratories Inc.

1.5. Termofilik Enzimler

Termofilik ve hipertermofilik organizmalardan elde edilen enzimlere termofilik enzimler denilmektedir. Bu bakteriler birçok karasal ve sucul ortamlardan izole edilebilmektedir. Termofilik enzimler essiz bir yapı işlev özelliğine sahiptirler (Vieille ve Zeikus, 1996; Vieille ve Zeikus, 2001). Bu enzimler günümüzde moleküler biyoloji uygulamalarında (*Taq* DNA polimeraz), nişasta endüstrisinde (α -amilaz, glukoz izomeraz) ve yüksek kararlılık isteyen organik ürünlerin sentezi, teşhis ve tanı işlemleri, kâğıt endüstrisi ve hayvanların beslenmelerinde kullanılan ürünlerin sentezi gibi daha birçok endüstri kollarında yoğun olarak kullanılmaktadır (Vieille vd., 1996).

Özellikle endüstriyel uygulamalarda, yüksek sıcaklıklarda aktif olarak çalışabilen enzimler mezofilik ve psikofilik enzimlere göre büyük avantajlara sahiptirler. Bu enzimler mezofilik bir organizma içerisinde sentezlenebildiklerinden enzimin saflaştırma aşamalarında kolaylık sağlamaktadır. Bu enzimler yüksek sıcaklıklara ve aktiviteleri denatüre edici ajanlara karşı oldukça kararlıdır ve yüksek substrat konsantrasyonlarında iyi bir şekilde çalışırlar. Ayrıca çalışma ortamının diğer mikrobiyal kontaminasyonlardan etkilenme olasılığı oldukça düşüktür.

Protein kararlılığı çalışmaları ilk zamanlar çözünebilir monomerik yapıdaki enzimler üzerinde araştırılmıştır (Dill,1990). Termofilik enzimlerin çalışmasıyla protein kararlılığı mekanizmalarının açıklanabilmesi hızlanmıştır. Termofilik enzimler nispeten mezofilik enzimlere benzerler; amino asit dizilimi mezofilik eşlerinkine %40-85 benzerlik gösterir (Vieille vd., 1995; Burdette vd., 1996), üç boyutlu yapıları birbirleri 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, mezofilik eşlerinden farklı olarak bulundurdukları bazı amino asitlerden kaynaklanmaktadır. Çeşitli denatüre edici ortamlara sağladıkları direnç göz önüne alındığında termofilik enzimlerin oldukça rijit bir yapıda olmaları gereklidir. Bakıldığında özellikle aktif bölgede rol oynayan amino asitlerin oldukça korunumlu olduğu görülmektedir (Veronese vd., 1984; Wrba vd., 1990; Kanaya ve Itaya, 1992).

Günümüzde proteinin termal kararlılığı; hidrofobik etkileşim, proteinin katlanma etkinliği, atomik etkileşim, tuz köprüleri, hidrojen bağları, metal bağlanması, konformasyonel zincirlerin azaltılması, prolin ünitelerinin açığa çıkardığı entropi, heliks ve loopların

kararlılığı, alt üniteler arasındaki etkileşim ve oligomerizasyon, kovalent parçalanmaya olan direnç ve post translasyonel modifikasyonlar açısından oldukça iyi bir şekilde çalışılmıştır.

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

HFCS üretiminde mezofilik organizmalardan elde edilen glukoz izomeraz, immobilize edilmiş bir şekilde 55–65°C'de pH 7,5 ile 8,5 aralığında kullanılmaktadır (Schenck, 2000). Bu şartlar altında enzim ile %40–42 oranında fruktoz üretilebilmektedir. Fakat endüstriyel uygulamalarda kullanılan HFCS'de % 55 fruktoz içeriği aranmaktadır. Dolayısı ile bu oran kromatografik olarak %55 seviyelerine getirilir. Fakat bu işlem üretim maliyetini arttırmaktadır (Douglas vd., 1999). Sıcaklığın artmasıyla fruktoz: glukoz dengesi fruktoz tarafına kaymakta böylece 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 değerlerinde yüksek sıcaklık uygulamaları, istenmeyen mannoz, psikoz ve diğer asidik yan ürünlerin oluşumuna sebep verdiği için düşük pH değerlerinde çalışan bir enzime ihtiyaç bulunmaktadır (Bucke, 1983). Bu ihtiyaçlardan dolayı bugüne kadar birçok termofilik ve asidik karakterli bakterilerin glukoz izomerazı araştırılmıştır (Bhosale vd., 1996).

Bunun yanı sıra mevcut 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 yönünde birçok endüstriyel ve bilimsel öneme sahip çalışma gerçekleştirilmiştir (Bhosale vd.,1996).

1.6.1. Isıl Kararlılığı Mutasyonları

Farklı kaynaklardan elde edilen GI'lar incelendiğinde enzimin aktif bölgesinde aromatik amino asitlerden oluşan bir bölge bulunmaktadır. Bu bölgenin enzimin monomer ve dimerleri arasındaki ilişki ve kararlılığın devam etmesinden sorumlu olduğu varsayılmaktadır

(Collyer ve Blow 1990; Whitlow vd., 1991). Meng ve arkadaşları (1993) kofaktör olarak Co^{+2} 'yi kullanan *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* GI'sında; Trp48, Phe59, Trp138, Phe144 ve Trp187 amino asitlerinde mutasyonlar yaparak aromatik amino asitlerin enzimin ısı kararlılığı üzerindeki etkilerini araştırmışlardır.

Yapılan Trp187His ve Phe144Lys mutasyonları, doğal ve mutant enzimin saflaştırmasında kullanılan yöntemlerden biri olan 75°C'deki sıcaklık uygulamasında, enzimin aktivitesinin kaybolmasına sebep olmuştur. Bu durum, enzimin yüksek sıcaklıklardaki kararlılığının devamı için Trp187 ve Phe144 amino asitlerinin önemli bir görevde rol oynadıklarını göstermektedir. Trp138 amino asidinin daha küçük hidrofobik yan grup içeren amino asitlerle olan mutasyonları ise enzimin ısı kararlılığını 85°C'deki uygulamalarda %43-91 oranında arttırdığı görülmüştür. Trp138 amino asidinin indol grubu enzimin aktif bölgesine doğru bir çıkıntı yaptığından dolayı bu amino asidin Phe, Met veya Ala amino asitleri ile değişimi enzimin aktif bölge alanında bir azalmaya yol açmış ve böylelikle enzimin ısı kararlılığı üzerinde bir artışa sebep olmuştur. Trp48Arg mutasyonu enzimin aktivitesinde bir değişikliğe neden olmazken ısı kararlılığını %60 oranında artırmıştır. Bu mutasyonda Arg48 amino asidi Asp338 amino asidi ile hidrojen bağı oluşturma görevini yerine getirmiş ve enzimin aktif bölgesinde bir değişikliğe neden olmamıştır. Phe59His mutasyonu ise yaban tip enzime göre daha az kararlı bir enzim meydana getirmiştir.

Farklı bir yaklaşım Quax ve arkadaşları (1991) tarafından *Actinoplanes missouriensis*'te gerçekleştirilmiş ve lizin amino asitlerinin yerine Arg amino asitleri koyulmuştur. GI'nın kimyasal modifikasyonundan kaynaklanan ve HFCS'den şeker içeriğinde özellikle amino gruplarının enzimatik olmayan glikasyonun kaynaklanan zararlı etkileri ortadan kaldırmak için özel bir çaba sarf edilmiştir. Her *Actinoplanes missouriensis* GI alt ünitesi 20 adet lizin amino asidi ihtiva eder ve bunlarda Lys252 ve Lys294 amino asitleri dimer/dimer ara yüzüne yerleşmiştir. Lys 252 amino asidi GI tetramerlerinde gömülü haldedir ve dimerler arası yüzeyde elektrostatik etkileşim olayında görev yapar. Lys252Arg mutasyonu aktivite kaybı olmaksızın enzimin ısı kararlılığını %30 oranında arttırmıştır. Bu mutasyonun immobilize edilmiş halinin yarılanma ömrü yaban tip enzime göre 3 kat daha fazla bulunmuştur. Lys252 amino asidi dimerler birbirinden ayrıldığında glikasyon için uygun hale gelir. Bu durumda dimerlerin tekrar bir araya gelmesi ve enzimin aktif hale gelmesi mümkün olmaz. Bu immobilize enzimin neden daha kararlı

Tablo 3. GI'nın Isıl kararlılığını geliştirmek için yapılan bazı mutasyonlar

Amino asit	Mutasyon	Aktivite (% <i>yt</i>) (<i>k_{cat}/K_m</i>)	Isıl Kararlılık (%)	Referans
E203/Q204	D/R	% 100	% 100	(Varsani vd., 1993)
L199/A200	C199/C200	% 100	% 100	
A223	C	% 100	% 100	
Y253	C	% 15 azaldı	% 50	
W15	A	?	<% 1	(Meng vd., 1993)
W15	F	?	% 4	
W15	R	% 100	157	
F25	H	% 40	71	
W87	F	?	% 191	
W87	M	?	% 166	
W87	A	?	% 143	
F93	K	?	<% 1	
W136	H	?	<% 1	
K252	R	% 100	% 130	
K294	R	% 100	% 78	
A73	S	% 100	% 76	
G70/G74	S/T	% 100	% 95	
A73/G70/G74	S/T	% 100	% 114	
K252	R	% 93	% 130	(Mrabet vd., 1992)
K252	Q	% 69	<% 1	
K309	R	% 100	% 150	
K309	Q	% 100	% 80	
K319	R	% 100	% 150	
K323	R	% 100	% 100	
K323	Q	% 100	% 90	
K309/319/323	R/R/R	100%	% 240	

olduğunun açıklaması olarak gösterilebilir (Jamieson ve Batt, 1992). Lys294 amino asidi Asp256 ve Asp292 amino asitleriyle tuz köprüsü oluşturur. Dolayısı ile Lys294Arg mutasyonu ısı kararlılığın azalmasına yol açar.

Chang ve arkadaşları (1999) oldukça termofilik bir özellik gösteren ve Tip1 GI'lerden olan *Thermus thermophilus* ve *Thermus caldophilus* GI'lerini çalışmışlardır. Bu çalışmada sonuçları daha az bir termofilik olan *Artobacter* B3728 ve *Actinoplanes missouriensis* GI'leriyle karşılaştırmışlardır.

Cha ve arkadaşları (1994) *Streptomyces rubiginosus* GI'sında His 219 amino asidi üzerinde bölge spesifik mutasyonlar yaparak bu amino asidin enzimin aktivitesi ve ısı kararlılığı üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Bu amino asit neredeyse bütün GI'larda mevcuttur. Bu amino asidin Ser, Glu ve Asn amino asidi ile değişimi sonucu K_m değerinde 30-40 katlık bir artış gözlenmiştir.

Isı bozunumu çalışmaları sonucunda, His219Ser ve His219Asn mutant enzimlerinin 5-8°C'de daha az kararlı oldukları ortaya çıkarken His219Glu ve His219Lys mutant enzimlerinin 13-24°C'de daha az kararlı olduğu bulunmuştur.

C. thermosulfurogenes ait glukoz izomeraz enzimi üzerinde gerçekleştirilen W15R (15. amino asit olan triptofan, arjinine dönüştürülmüş) mutasyonu ile molekülün 80°C'deki termal kararlılığı (Bhosale vd., 1996) %60, yarılanma ömrü ise %30 arttırılmıştır (Quax vd., 1991). *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* glukoz izomerazında meydana getirilen W139F, M, A mutasyonları ile enzimin ısı kararlılığı arttırılmıştır (Meng vd., 1993).

1.6.2. Aktif Bölge Mutasyonları

Birçok çalışmada, enzimin aktif bölgesinde yapılan mutasyonlar sonucunda enzimin aktivitesinde bir azalma olmasına karşın ısı kararlılığında artış meydana gelmiştir (Hartley vd., 2000). *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* GI'sının aktif bölgesinde yapılan mutasyonlar sonucunda enzimin ksiloza olan ilgisi glukozla dönüştürülmüştür. *Arthorobacter* GI'sında yapılan Trp138Phe mutasyonu enzimin K_m değerinde azalmaya k_{cat} değerinde ise artışa neden olmuştur. Bu mutasyon substrat olarak ksiloz kullanıldığında K_m değerinde bir artışa neden olmuştur. Bu mutant enzimin ksiloz molekülünün girebilmesi için geniş bir aktif bölgeye sahip olduğunu fakat mutasyonun ksilozun bağlanma etkinliğini zayıflattığını göstermektedir. Bağlanma cebinin genişlemesi enzimle substrat arasındaki bağlanma enerjisini azaltmaktadır (Hess vd.,1998).

Val185Thr mutant enzimi yaban tip enzimle karşılaştırıldığında oldukça düşük K_m ve daha yüksek bir k_{cat} değerine sahiptir. Thr yerine Ser amino asidi kullanıldığında ise her hangi bir artış gözlenememiştir. Thr140Ser mutasyonu hem glukoz için hem de ksiloz için K_m değerini arttırmış ve katalitik etkinliği düşürmüştür. Thr140 amino asidi substrat ile hidrojen bağı yapar fakat glukozun tam olarak bağlanmasını sağlamaz. Yapılan Trp138Phe/Val185Thr ve Trp138Phe/Val185Ser çifte mutasyonları sonucunda enzimin katalitik etkinliği sırasıyla 5 kat ve 2 kat arttırılmıştır. Enzimin glukozu olan ilgisi ksiloza nazaran arttırılmıştır (Meng vd., 1991).

Tablo 4. GI'nın aktif bölgesi içerisinde yapılan bazı mutasyonlar

Amino asit	Mutasyon	Aktivite (%yt) (k_{cat}/K_m)	Referans
W15	A, L, F	% 1, % 1, % 11	(Lambeir vd.,1992)
W15	F, A, R	% 30, % 10, % 9	(Meng vd.,1993)
A24	K	% 52	(VanBastelaere vd.,1995)
F25	K	İnaktif	(Lambeir vd.,1992)
H33c	F	% 115	(Lee vd.,1989)
H53	K	-	(Lambeir vd.,1992)
H53	A, N, Q	% 4, % 3, % 4	(Lambeir vd.,1992)
H53	S, F	% 3, İnaktif	(Whitaker vd.,1995); (Lee vd.,1989)
H53	N	% 3, % 45	(Whitaker vd.,1995); (VanBastelaere vd.,1995)
H53	Q, N, E, D	% 10, % 14, % 5, % 9	(Lee vd.,1989)
D56	N	% 37	(Lambeir vd.,1992)
D56	N, H	% 60, % 34	(VanTilbeurgh vd.,1992)
W87	F, Y	% 60, % 28	(Meng vd.,1993)
W87	M, L, V,	% 44, % 52, % 52	(Meng vd.,1993)
W87	A, K	% 56, % 28	(Meng vd.,1993)
H100	F	% 92	(Lee vd.,1989)
W136	E; F	İnaktif; 2%, 4%	(Lambeir vd.,1992); (VanBastelaere vd.,1995)

Tablo 4'ün devamı

Amino asit	Mutasyon	Aktivite (%yt) (k_{cat}/K_m)	Referans
W136	E; F	İnaktif; 2%, 4%	(Lambeir vd.,1992); (VanBastelaere vd.,1995)
W136	H	< % 0,1	(Meng vd.,1993)
E180	A, S	İnaktif	(Jenkins vd.,1992)
E180	Q	< % 0,1	(Jenkins vd.,1992)
E180	D	%0.6, %2	(Jenkins vd.,1992), (VanBastelaere vd.,1995)
K182	S, Q, R	İnaktif	(Lambeir vd.,1992)
K182	M	İnaktif	(Whitaker vd.,1995)
K182	Q	İnaktif	(VanBastelaere vd.,1995)
E185	D	%25	(VanTilbeurgh vd.,1992)
E185	Q	%10,%45	(VanTilbeurgh vd.,1992); (VanBastelaere vd.,1995)
E216	D, Q	İnaktif	(Jenkins vd.,1992)
H219	N, E, S	< % 0,1	(Jenkins vd.,1992); (Whitaker vd.,1995)
H219	Q	%1, %3	(Jenkins vd.,1992); (VanBastelaere vd.,1995)
D244	N	%0.1, %0.3	(Jenkins vd.,1992); (VanBastelaere vd.,1995)
D254	A, N	< % 1	(Jenkins vd.,1992); (VanBastelaere vd.,1995)
D254/D256	E/E	%1.6	(Fuxreiter vd.,1997)
D256	S, K; E	İnaktif; %2	(Jenkins vd.,1992)
D256	N	%0.5,%10	(Jenkins vd.,1992); (VanBastelaere vd.,1995)
K294	Q, R	%3.6,%61	(Lambeir vd.,1992)

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Deneyleerde Kullanılan Gereç ve Kimyasallar

Tripton (Merck V441613949), Yeast Ekstract (Merck VM175053), NaCl (MerckK34243404), D-Ksiloz (SigmaY4625), D-Glukoz (Sigma G7528), D-Fruktoz (F2543), MOPS (AppliChem A29470100), MnSO₄ (AnalaR 10153), Lizozim (Gerbu 250501), Perklorik asit (Merck 518), Sistein (AppliChem), Karbozol (Sigma C-5132), Sülfürik asit (Riedel-deHaen), Etil alkol, Kanamisin (Bioanalyse), IPTG (Sigma 15502), Amfisilin (Bioanalyse), *NcoI* (NEB), *MboI* (NEB), *HinfI* (NEB), *AvaII* (NEB), *BamHI* (NEB), *HindIII* (NEB), *SacI*,(NEB) *PstI* (NEB), *Sa3AI* (NEB), *SalI* (NEB), *PspGI* (NEB), *AvaI* (NEB) , *Bfal* (NEB), *XbaI* (NEB), *EcoRI* (NEB), *DpnI* (NEB) , T4 DNA ligaz (NEB), *Taq* DNA polimeraz (Promega), Roche'un Expand long Range dNTP packs, Genomik DNA İzolasyon Kiti, Jelden Çıkarma Kiti, EDTA (Merck 84211000), dNTP seti (Promega), pGEM-T Easy klonlama vektörü, HisTag saflaştırma kiti (Promega), pET-28a(+) Ekspresyon Vektörü, CaCl₂ (Aktar Kimya), X-gal (Appllichem A10070005), Commassie Brilliant Blue G-250, Commassie Brilliant Blue R-250, etanol, fosforik asit, BSA (NEB), DEAE-Sepharose (Sigma) , Phenyl sepharose 6 Fast Flow (Sigma), Amonyom sülfat (Merck A734116), Sodyum asetat (Merck TA867065), K₂HPO₄ (Merck 1,050,211), KH₂PO₄ (Merck 1,050,212), Tris (Melfoid Lab 14271), CoCl₂ (Appllichem 25,559-9)

2.2. Deneyleerde Kullanılan Hücre ve Plazmitler

Glukoz izomeraz geninin kaynağı olarak termofilik bir bakteri olan *Anoxybacillus gonensis* G2^T bakterisi kullandı (Belduz vd., 2003). GI aktivitesinin var olup olmadığının belirlenmesi için yapılan çalışmalarda pozitif kontrol olarak *Saccharococcus caldxylosilyticus* negatif kontrol olarak ise *E. coli* HB101 (*F⁻ hsdS20 ara-1 recA13 proA12 lacY1 galK2 rpsL20 mtl-1 xyl-5*) bakterileri kullanılmıştır (Boyer ve D. Roulland-Dussoix, 1969). Genin klonlanması ve baz diziliminin belirlenmesi için yapılan her türlü çalışmalarda konak hücre olarak *E.coli* JM101 ve pET28a(+) ekspresyon vektörüne klonlanmış yaban tip ve mutant enzimlerin aşırı ekspresyonlarında *E.coli* BL21 (DE3) suşu kullanılmıştır. Mutasyon çalışmalarında *E.coli* DH5α suşu kullanılmıştır. Ekspresyon vektörü olarak pET28a(+) klonlama ve baz dizilimi analizleri için pGEM-T Easy vektörleri kullanılmıştır.

2.3. *A. gonensis* G2^T'ye Ait Yaban Tip *xylA* Geninin Baz Diziliminin Açığa Çıkarılması

A. gonensis G2^T'ye ait *xylA* geninin 530 baz çiftlik bir kısmı, KTÜ-BAP yüksek lisans proje desteği ve birimizde var olan imkanlar ile daha önceki çalışmalarımızda klonlanmış, klonlanan bu kısmın baz dizilimi belirlenmişti. Genin tüm baz dizilimini belirleyebilmek için invers-PCR yöntemi kullanıldı. Bu bağlamda, elde bulunan genin uç kısımlarından komplementer bir şekilde ileri ve geri yönde invers-PCR primerleri tasarlandı. Bu çalışmada kullanılan tüm invers-PCR primerleri Tablo 5'de gösterilmiştir.

Tablo 5. *A. gonensis* G2^T'ye ait *xylA* geninin baz diziliminin açığa çıkarılmasında kullanılan invers-PCR primerleri

XylaIF01	5'- AgACgCggTTCgTTTgAACC -3'
XylaIF02	5'- ACgTTTCATAgCCTTCACg -3'
XylaIF03	5'- AgCAGCAAaggTgAAAAAagg -3'
XylaIF04	5'- TggACTAAAAGTggCgTATCg -3'
XylaIF05	5'- ATCATTgATgggAAggCCgAC -3'
XylaIR01	5'- gCATAgTCAACCgCCATATgC -3'
XylaIR02	5'- AggCggATTgAACTTTgATgC -3'
XylaIR03	5'- TgCCARTAVgCRAYVgMRADDCg -3'
XylaIR04	5'- TCCAAAgCAACTTggTTTTgC -3'
XylaIR05	5'- TgCACCATgTACAAAACgAgg -3'
XylaIR06	5'- gCgCAAATgCTCCTCCATCg -3'
XylaIR07	5'- ggCCAATTCCTTCTgTATAgC -3'

Daha sonra *A. gonensis* G2^T ait genomik DNA; *HinfI*, *BamHI*, *HindIII*, *EcoRI*, *SacI*, *PstI*, *Sa3AI*, *Sall*, *PspGI*, *AvaI*, *Bfal* ve *XbaI* restriksiyon endonükleazlarıyla bir gece boyunca kesilerek her bir kesimin kendi üzerine yapışması (self-ligasyon) sağlandı ve DNA fragmentleri halkalaştırıldı. Self ligasyon olarak adlandırılan bu reaksiyon; 2,5 µg kesilmiş DNA, 40 µl 10X tampon, 1 U T4 DNA ligaz enzimi içerecek şekilde 400 µl son hacimde 16°C'de bir gece boyunca gerçekleştirildi. Ligasyon sonrası DNA'lar etanol çöktürmesi ile çöktürülerek 20 µl TE tamponu içerisinde çözüldükten sonra PCR reaksiyonlarında kullanıldı.

Dizayn edilen primer çiftleri kullanılarak yapılan PCR reaksiyonu 200 µl'lik ince cidarlı PCR tüpleri içerisinde, 50 µl'lik son hacimde gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı 1X PCR

tamponu, 200 µM dNTP, 2,5 mM MgCl₂, her bir primerden 25 pmol, 10–40 ng kalıp genomik DNA ve 1 U *Taq* DNA polimeraz içerecek şekilde hazırlandı. Reaksiyon şartları, 95°C’de 1 dakika ön denatürasyon sonrasında, 35 döngü olacak şekilde; 94°C’de 30 saniye denatürasyon, 56°C’de 30 saniye bağlanma, 72°C’de 1,5 dakika uzama ve döngü sonunda 72°C’de 5 dakika son uzama safhası şeklinde gerçekleştirildi. Ürünler %1,2’lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi. Elde edilen parçalar, baz dizilimini belirlenmek üzere, pGEM-T Easy klonlama vektörüne klonlandı ve baz dizilim analizi Macrogen şirketi aracılığı ile yapıldı.

2.4. *A.gonensis* G2^T Yaban Tip *xylA* Geninin pET28a(+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

Baz dizilimi belirlenen genin pET28a(+) ekspresyon vektörüne klonlanarak *E.coli* BL21 (DE3) suşunda yüksek miktarlarda ekspres edilmesi planlanmıştır. Genin klonlanmasında iki farklı strateji kullanılmıştır. İlk olarak enzim saflaştırma işlemleri aşamasında kolaylık sağlaması açısından bir HisTag kuyruğu içerecek şekilde klonlanmıştır. İkincil olarak ise enzim hiçbir kuyruk veya eklenti içermeyecek şekilde yani yaban tip enzimin aynısını üretecek şekilde ekspresyon vektörüne klonlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda Tablo 6’da gösterilen primerler tasarlanmıştır.

Tablo 6. Ekspresyon vektörüne klonlamada kullanılan primerler

Xyla_Ex_F1	5'-CgAgCTCCATggCgTATTTTgAAAACg-3' <i>NcoI</i>
Xyla_Ex_R1	5'-CCAAGCTTACgAgCTACACAAACTTC-3' <i>HindIII</i>
Xyla_Ex_R2	5'-CggATCCgTACTATCATTAACgAgC-3' <i>BamHI</i>

2.4.1. Bir HisTag Kuyruğu Taşıyan GI’yı Üretecek Vektörün Tasarlanması

Öncelikle gen ürününün kolay saflaştırılabilmesi için HisTag kuyruğu taşımasına karar verildi. pET28a(+) ekspresyon vektörü incelendiğinde, gen ürününün amino veya karboksil ucunda HisTag kuyruğu olabilecek şekilde, vektöre klonlama yapabilmenin mümkün olduğu görülmektedir. Gen, *NdeI* bölgesine klonlarsa gen ürününün N terminal ucunda HisTag kuyruğu bulunur. Fakat gen dizimiz içerisinde 2 adet *NdeI* bölgesi bulunması sebebiyle, *NdeI* bölgesini kullanıp, N terminal ucuna HisTag kuyruğu eklemek zordur. Bu nedenle, gen

ürünün C ucuna HisTag kuyruğu takılacak şekilde klonlanmasına karar verildi. Geni, pET28a(+)'daki *NcoI-HindIII* bölgeleri arasına klonlayabilmek için, *NcoI* bölgesi içeren Xyla_Ex_F1 primeri ve *HindIII* bölgesi içeren Xyla_Ex_R1 primerleri ile *A.gonensis* G2^T genomik DNA'sı kalıp olarak kullanılarak PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. PCR şartları olarak Bölüm 2.3.'de anlatılan şartlar kullanıldı. PCR ürünü *NcoI* ve *HindIII* enzimleri ile kesilerek, aynı enzimlerle kesilmiş pET28a(+)'ya klonlandı ve klon pETG2GIC olarak adlandırıldı. pETG2GIC, sahip olduğu T7 promotorunun çalışmasına ve GI'nın ekspresyonuna imkân sağlayan *E.coli* BL21(DE3) suşuna CaCl₂ transformasyonu ile aktarıldı, bu sisteme *E.coli* BL21/pETG2GIC adı verildi ve bu hücreler kanamisinli ortamda büyütüldü. Hücrelerden ekspres edilen enzim HisTag protein saflaştırma kiti ile saflaştırıldı.

2.4.2. Yaban Tip GI'yı Mezofilik Bir Konakta Üretecek Vektörün Tasarlanması

pETG2GIC'den yüksek aktivite elde edilememesi sonucunda, *xylA* geninin pET28a(+) vektörüne, HisTag kuyruğu taşımadan klonlanmasına karar verildi. Vektör incelendiğinde, *NcoI-BamHI* klonlamasının, GI'nın HisTag kuyruğu veya herhangi bir eklenti içermeyecek şekilde doğal enzimin aynısını üretecek bir vektörün oluşumuna imkân sağladığı görülmektedir. *BamHI* bölgesinin hemen önünde stop kodonları yerleştirildi. Xyla_Ex_F1 ve Xyla_Ex_R2 primerleri kullanılarak yukarıda anlatılan tüm prosedür tekrarlandı ve gen ekspresyon vektörüne klonlandı. Fakat protein HisTag kuyruğu taşımadığından dolayı enzimin saflaştırılması kolon kromatografi yöntemi ile gerçekleştirildi. Klonlanma sonucu oluşan rekombinant plazmide pETG2GI adı verildi.

2.5. Mutasyon Çalışmaları

Enzimin biyokimyasal özelliklerini endüstriyel uygulamalara daha uygun hale getirebilmek için, aktif bölgede olduğu tahmin edilen 3 ayrı amino asitte; H99E, H99D, H99Q, H99L, H99N, W137F, V184T ve V184S mutasyonlarının yapılması planlanmıştır. Sözü edilen mutasyonlar ile enzimin K_m değerinde azalma, V_{max} değerinde ve enzimin ısı kararlılığında ise bir artışın olması planlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda Tablo 7'de belirtilen primerler tasarlandı.

Tablo 7. Mutasyonların gerçekleştirilmesinde kullanılan primerler

W137F_F01	5'-AACCAAgtTgCTTTTCAATACAgCTAATTTATTTACAC-3'
W137F_R01	5'-gTgTAAATAAATTAgtCTgTATTgAAAAGCAACTTggTT-3'
V184S_F01	5'-ggTgCAgAAAACtATTCATTCTggggCgggC-3'
V184S_R01	5'-gCCCgCCCCAgAATgAATAgTTTTCTgCACC-3'
V184T_F01	5'-ggTgCAgAAAACtATACCTTCTggggCgggC-3'
V184T_R01	5'-gCCCgCCCCAgAaggTATAgTTTTCTgCACC-3'
His99X_F01	5-CCATTTTTCTgCTTCVAgATgTCgATATTgCC-3'
His99X_R01	5-ggCAATATCgACATCSTBgAAgCAgAAAAATgg-3'
His99D_F01	5'-CCATTTTTCTgCTTCgACgATgTCgATATTgCC-3'
His99D_R01	5'-ggCAATATCgACATCgTCgAAgCAgAAAAATgg-3'

HisTag kuyruğu içermeyecek şekilde enzimi üretecek olan vektör (pETG2GI) *E.coli* BL21 (DE3) içerisinde, 1 gece büyütüldüğü kültürden plazmit izolasyon kiti kullanılarak izole edildi. pETG2GI kalıp DNA olarak kullanılarak, ilgili mutasyon primerleri ile PCR'de çoğaltıldı. Bu amaçla yapılan PCR'de *Taq* DNA polimeraz yerine 25 kb'ye kadar zincir sentezleyebilen yüksek doğruluğa sahip bir DNA polimeraz enzimi kullanıldı (Roche'un Expand long Range dNTP packs). Kalıp olarak ilgili vektörün kullanıldığı PCR'de, PCR ile sentezlenen zincirler metillenmemiş haldedir fakat vektörün kendisi metillidir. PCR sırasında vektörün her iki zinciri de kalıp olarak kullanılmaktadır. Bu reaksiyon tamamlandıktan sonra PCR ürünü, PCR temizleme kiti ile temizlendi. Böylelikle kesim reaksiyonu için uygun hale getirilmiş oldu. Sonrasında 50 µl son hacimde 10 ünite *DpnI* enzimi ile 37°C'de 2 saatlik bir reaksiyon sonucunda kesildi. *DpnI* enzimi GATC dizisini tanıdığı yerden A'nın metillenmiş halini keser. Dolayısı ile reaksiyon sonunda ana plazmitten gelen DNA zinciri bu enzim ile kesilirken yeni üretilen zincirde kesim meydana gelmez. Reaksiyon sonrası kesim ürünü herhangi bir ligasyon işlemine tabi tutulmaksızın doğrudan CaCl₂ transformasyon metodu ile *E.coli* DH5α suşuna aktarıldı (Üretilen PCR fragmentlerinin iki ucu birbirine homolog olduğundan hücrede bu uçlar rekombine olarak PCR ürünü bir plazmit halini alır). Transformasyon sonrası hücreler kanamisin ihtiva eden LB katı besiyerine ekilerek 1 gece 37°C'de büyütüldü. Burada büyüyen kolonilerden plazmit izolasyonu yapıldı. İzole edilen plazmitler sekans ettirilerek ilgili mutasyonların olup olmadığı araştırıldı.

2.6. Enzimlerin Saflaştırılmaları

E.coli BL21/pETG2GIC sistemi ile üretilen enzim HisTag kuyruğuna sahiptir. Dolayısı ile bu enzimin saflaştırılması HisTag saflaştırma kiti aracılığı ile yapıldı. *E.coli* BL21/pETG2GI sistemi ile üretilen HisTag içermeyen enzimimizin Ni kolonu ile saflaştırılması mümkün değildir. Bu nedenle, gerek *A. gonensis* G2^T *xylA*'nın kodladığı orijinal enzimin (*AgoG2GI-yt*) gerekse *E.coli* BL21/pETG2GI sistemi ile üretilen HisTag kuyruğuna sahip olmayan rekombinant enzimin (*AgoG2GI-rek*) (ve pETG2GI vektöründen üretilen tüm mutant enzimlerin) saflaştırılmasında kolon kromatografi yöntemleri kullanıldı. Bu teknikte; ısı bozunumu, iyon değişimi ve hidrofobik kolon kromatografisi uygulamalarına yer verildi. *A. gonensis* G2^T *xylA*'nın kodladığı *AgoG2GI-yt*'nin saflaştırılmasında bu uygulamalara ek olarak amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı.

2.6.1. Enzim Üretimi

2.6.1.1. *AgoG2GI-yt*'nin Üretimi

A.gonensis G2^T bakterisi 50 ml LB besiyerinde 55°C'de bir gün büyütüldü. Bu kültürden, 2 litrelik bir erlen içerisindeki 500 ml LB besiyerine O.D.'si 0,1 olacak şekilde taze ekim yapıldı ve hücreler O.D.'si 0,6-0,9 oluncaya kadar 55°C'de büyütülmeye bırakıldı. Hücrelerin O.D. değeri 0,6-0,9 olunca kültüre son konsantrasyonu %0,5 olacak şekilde filtrasyon ile steril edilmiş D-kiloz ilave edilerek hücreler, glukoz izomeraz üretmek üzere uyarıldılar. Bu şekilde 55°C'de 4 saat kadar büyütülen hücreler 7500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Bu yöntem ile 4 lt kültürden yaklaşık olarak 10 gr kadar hücre pelleti elde edildi. Çöken hücreler 0,5 mM CoCl₂ ve 5 mM MgSO₄ içeren 20 mM MOPS tamponunda (pH 6,5) yıkanarak temizlendi ve sonrasında tekrar 7500 rpm'de santrifüj ile çöktürüldü. Hücreler yukarıda belirtilen tamponun 15 ml'si içerisinde tekrar çözülerek 1 µg/ml lizozim ilavesiyle 37°C'de 30 dakika kadar inkübe edildi. Daha sonra 10 dakika Sartorius Labsonic marka sonikatör kullanılarak %80 güçte 1 döngü aralığında patlatılan hücreler 15.300 rpm de 20 dk santrifüj edildi. Pellet kısmı atılarak sıvı kısmı oluşturan hücre özütü ile saflaştırma işlemlerine devam edildi.

2.6.1.2. AgoG2GI-rek'in ve Mutant Enzimlerin Üretimi

E.coli BL21/pETG2GI'nin gece kültüründen sıvı LB besiyerine O.D. si 0,1 olacak şekilde taze kültür ekildi. Taze kültür O.D'si 0,6-0,9 oluncaya kadar büyütülerek 1mM IPTG ile uyarıldı ve 3 saat sonra kültür 7500 rpm'de 5 dk santrifüj yapılarak çöktürüldü. Çöken hücreler 0,5 mM CoCl₂ ve 5mM MgSO₄ içeren 20 mM MOPS tamponunda (pH 6,5) yıkanarak temizlendi ve müteakiben tekrar 7500 rpm'de santrifüj ile çöktürüldü. Hücreler yukarıda belirtilen tampon içerisinde tekrar çözülerek 1 µg/ml lizozim ile 37°C'de 20 dakika inkübe edildikten sonra 10 dakika sonikatörle patlatıldı ve elde edilen hücre özütü 15.300 rpm de 20 dk santrifüj edildi. Süpernatant alınarak saflaştırma işlemlerine geçildi. Mutant enzimlerin üretilmesinde ve *E.coli* BL21/pETG2GIC ile üretilen HisTag kuyruklu enzimin üretilmesinde de aynı prosedür takip edildi.

2.6.2. Isı Bozunumu

AgoG2GI-yt oldukça termofilik karakterli bir enzimdir. *E.coli* BL21/pETG2GI sistemi ile üretilen *AgoG2GI*-rek de (ki buna mutant enzimler de dahil) termofilik karakter taşımaktadır. Dolayısı ile ekspresyon vektöründen ifade edilen enzimimiz dışında diğer tüm proteinler (*E.coli* BL21 hücresine ait) mezofilik karakterde olduklarından dolayı kısa bir sıcak şoku uygulamasında bu proteinlerin çok büyük bir bölümü denatüre olmaktadır. Termofilik karakterli enzimimiz ise bu durumdan etkilenmemektedir. Saflaştırmanın ilk adımı olarak, mezofilik hücre (*E.coli* BL21/ pETG2GI) özütüne 80°C'de 15 dakika ısı şoku uygulandı. Isı şoku sonrası denatüre olan tüm proteinler 15.300 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek uzaklaştırıldı.

Yapılan sıcak şoku çalışmalarında, termofilik bir bakteri olmakla birlikte *A. gonensis* bütün proteinlerinin aynı ısıl kararlılıkta olmaması sebebi ile proteinlerinin bir kısmının yüksek sıcakla muamele edilmesi sonucu denatüre olduklarını fakat 80°C'de 15 dk'lık ısı uygulamasının diğer proteinlerin çoğunu denatüre ederken glukoz izomerazı çok az etkilediği belirlendi. Bunun sonucu olarak orijinal enzimin saflaştırılmasında da ısı bozunumu yöntemini kullanıldı.

2.6.3. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

AgoG2GI-yt'nin saflaştırılmasında diğer enzimlerin saflaştırma prosedüründen farklı olarak amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Sıcak şoku uygulaması sonucu elde edilen 24 ml özütte kademeli olarak amonyum sülfat çöktürmesi uygulandı. %40'lık amonyum sülfat çöktürmesi için, bir beher içerisinde çok yavaş bir şekilde karıştırılmakta olan özüte 4,06 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 12500 rpm'de ve 5°C'de 15 dakika santrifüj edilerek proteinler çöktürüldü. Süpernatant tekrar bir beher içerisine koyularak daha ileri çöktürme sağlandı. Bu şekilde 1,43 gr daha amonyum sülfat ilave edilerek %50'lik, 1,51 gr daha amonyum sülfat ilave edilerek %60'lık, 1,59 gr daha amonyum ilave edilerek %70'lik ve 1,68 gr daha amonyum sülfat ilave edilerek %80'lik bir amonyum sülfat çöktürmesi sağlandı. Elde edilen pelletler 2 ml 0,5 mM CoCl₂ ve 5 mM MgSO₄ içeren 20 mM MOPS tamponunda çözüldü ve bu örneklerdeki GI aktivitesi araştırıldı. %60 ve %70'lik amonyum sülfat çöktürmesi yapılan çözeltilerde GI aktivitesi bulundu. Bu 2 örnek birleştirildi ve amonyum sülfatın uzaklaştırılması için 1 gece boyunca 2 litrelik 0,5 mM CoCl₂ ve 5 mM MgSO₄ içeren 20 mM MOPS tamponu içerisinde diyaliz edildi.

2.6.4. 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 tüm tamponların gazları vakum pompası kullanılarak alındı. Gazı alınmış olan kolon malzemesi oda sıcaklığına getirildikten sonra bir pastör pipeti yardımıyla yavaş bir şekilde kolona dolduruldu. Kolon 0,5 mM CoCl₂ ve 5 mM MgSO₄ içeren 20 mM MOPS tamponunun (pH:6,5) 250 mililitresi ile dengeye getirildi. Sıcaklık uygulamasından elde edilen enzimi içeren örnek kolona akış hızı 1 ml/dk olacak şekilde emdirildi. Örneğin kolona yüklenmesinden sonra tutunmayan proteinlerin kolondan uzaklaştırılması için 25–30 ml kadar tampon kolondan geçirildi. Kolondan çıkan örnekler bir tüp içerisinde biriktirilip bu tüp içerisinde glukoz izomeraz aktivitesi arandı. Yapılan deney sonucunda çıkan solüsyonda glukoz izomeraz aktivitesi bulunamadı. Bu durum enzimin kolon matriksine bağlandığını göstermektedir. Daha sonra kolonun NaCl konsantrasyonu sıfırdan başlayarak 0,6 molara kadar yükseltildi. Bunun için 0–0,6 M NaCl gradient köprüsü kullanıldı

(İki beher içerisine 200 ml tampon koyulup kaplardan birisinin içerisine 0,6 M olacak şekilde NaCl ilave edildi, beherler arasındaki tampon geçişi ince bir cam boru ile sağlandı, peristaltik pompa 0 M tuz içeren tampondan sıvı çektikçe, 0,6 M tuz içeren beher içerisindeki tamponun 0 M tuz içeren behere geçişi sağlandı ve böylelikle tuz konsantrasyonu dereceli olarak arttırıldı). Kolondan çıkan fraksiyonlar 3,0 ml olacak şekilde cam tüpler içerisinde biriktirildi. Fraksiyonlardaki protein miktarı 280 nm dalga boyunda yapılan ölçümler sonucu belirlendi. Ayrıca tüm fraksiyonlarda glukoz izomeraz aktivitesine bakıldı. GI aktivitesi bulunan fraksiyonlar bir araya toplandı. Toparlanan enzim özütü (saflaştırma tablosu için gerekli verilere ulaşıldıktan sonra) vivaspin konsantrator kullanılarak 7500 g'de 10 dk santrifüj edilerek yoğunlaştırıldı.

2.6.5. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi

Hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi için 20 cm uzunluğundaki ve 0,75 cm çapındaki bir kolon kullanıldı. Bu çalışmada kolon malzemesi olarak Phenyl Sepharose 6 (Sigma) Fast Flow kullanıldı. Kolon malzemesinin gazı vakum pompası ile alındı ve oda sıcaklığına geldikten sonra bir pastör pipeti kullanılarak kolona yavaş bir şekilde dolduruldu. Kolon doldurma işlemi bittikten sonra 1,3 M amonyum sülfat içeren 100 ml tampon (0,5 mM CoCl_2 ve 5 mM MgSO_4 içeren 20 mM MOPS tamponu (pH 6,5)) ile dengeye getirildi. İyon değişim kromatografisinden elde edilen enzim özütü ise 2,6 M amonyum sülfat içeren tampon ile bire bir oranında seyreltildi ve özütün amonyum sülfat içeriğinin 1,3 M olması sağlandı. Özüt kolona yüklenerek yüksek amonyum sülfat konsantrasyonunda proteinler hidrofobik kolon malzemesine bağlanması sağlandı. Daha sonra kolonun amonyum sülfat içeriği 1,3 M'den 0 M'ye düşürüldü. Bunun için 100'er ml'lik amonyum sülfat gradient köprüsü kullanıldı. Tamponun akış hızı 0,5 ml/dk olarak ayarlandı ve kolondan çıkan fraksiyonlar cam tüpler içerisinde 1,7 ml olacak şekilde toplandı. Fraksiyonlardaki protein miktarı 280 nm dalga boyunda yapılan ölçümler sonucu belirlendi. Ayrıca tüm fraksiyonlarda glukoz izomeraz aktivitesi araştırıldı. GI aktivitesi bulunan fraksiyonlar bir araya toplandı. Bir araya getirilen bu enzim solüsyonu ile karakterizasyon çalışmaları başlatıldı.

2.7. Biyokimyasal Çalışmalar

2.7.1. Protein Miktarı Tayini

Yapılan bütün çalışmalarda protein miktarının tayini Bradford'un (1976) geliştirmiş olduğu metoda göre gerçekleştirildi. 100 ml boya çözeltisi hazırlamak için 10 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 5 ml %95'lik etanol içerisinde iyice çözülerek üzerine 10 ml %85'lik fosforik asit ilave edildi ve 100 ml'ye saf su ile tamamlandı. Hazırlanan çözelti filtre kâğıdı ile süzülerek temizlendi.

Hazırlanan kalibrasyon eğrisinde standart olarak bovin serum albumin (BSA) kullanıldı. Kalibrasyon eğrisi için; 2, 4, 6, 10, 15, 20, 40, 60, 80 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 10 dakika oda sıcaklığında beklemeye bırakıldı. Örnekler için BSA yerine 10 µl hücre ekstratı kullanılarak aynı işlemler gerçekleştirildi. Süre sonunda Agilent 8453E UV-visible Spectroscopy System cihazı kullanılarak 595 nm'de ölçümler yapıldı ve protein miktarı µg/µl cinsinden hesaplandı.

2.7.2. Glukoz İzomeraz Aktivite Deneyi

Biyokimyasal incelemelerde kullanılan GI aktivitesi tayini metodu Belfaquih ve arkadaşları (2000) tarafından geliştirilmiştir. 50 mM glukoz, 10 mM MgSO₄, 1 mM CoCl₂ ve 5 µg enzim özütü, pH'sı 7 olan 100 mM MOPS tamponu içerisinde, son hacim 100 µl olacak şekilde, 55°C'de 30 dakika inkübe edildi. Reaksiyon, inkübasyon süresi sonunda, buz üzerine alınarak sonlandırıldı. Oluşan fruktoz miktarı Dische ve arkadaşlarının (1951) geliştirdikleri sistein-karbozol-sülfürik asit metodu ile belirlendi. Reaksiyon çözeltisi üzerine 40 µl %1,5'lik sistein hidroklorür ve hemen ardından 40 µl etil alkolde çözülmüş %0,12'lik karbozol ilave edildi. Karışım vortekslendikten sonra üzerine 1,2 ml %70'lik sülfürik asit ilave edildi ve tekrar vortekslendi. 15–20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra spektrofotometrede 560 nm dalga boyunda ölçümler gerçekleştirildi. Fruktoz miktarı hazırlanan fruktoz kalibrasyon eğrisine göre hesaplandı. Enzim aktivitesi reaksiyon sonrası oluşan fruktoz miktarına göre µmol/dakika cinsinden hesaplandı. Reaksiyonda kullanılan şartlar (kullanılan enzim miktarı, reaksiyonun gerçekleştiği sıcaklık ve pH, substrat konsantrasyonu v.s.) enzimin biyokimyasal özellikleri belirlendikçe yeniden düzenlendi ve sonuç olarak reaksiyon şartları; 200 mM glukoz, 10 mM MgSO₄, 1 mM CoCl₂ ve enzim

özütü, pH'sı 6,5 olan 50 mM MOPS tamponu içerisinde, son hacim 100 µl olacak şekilde, 85°C'de 30 dakika olarak belirlendi.

2.7.3. AgoG2GI-yt'nin Karakterizasyonu

AgoG2GI-yt'nin saflaştırılması sonrasında optimum sıcaklık ve optimum pH gibi biyokimyasal çalışmalar bitirilerek enzimin karakterizasyonu tamamlandı. Bu parametreler ana AgoG2GI-yt'nin yanı sıra *E.coli* BL21/pETG2GI sistemi ile üretilip saflaştırılan AgoG2GI-rek için de araştırıldı. Böylelikle klonlamanın enzimin biyokimyasal parametreleri üzerinde herhangi bir etkisinin olup olmadığı da araştırılmış oldu. Enzim karakterizasyonu ve kinetiği ile ilgili tüm çalışmalar en az 3 kez tekrar edilmiştir.

2.7.3.1. Optimum Sıcaklık

A.gonensis glukoz izomerazının en iyi çalıştığı optimum sıcaklık değeri 50 mM glukoz varlığında pH'sı 6,5 olan MOPS tamponunda gerçekleştirildi. Reaksiyonlar 25, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 78, 81, 85, 87, 89, 95 ve 100°C'lerde gerçekleştirildi. Özellikle enzimin iyi çalıştığı bilinen 75 ve 95°C arasındaki reaksiyonlar sonuçların hassas olması açısından BioRAD MJ Mini Personal Thermalcycler cihazı içerisinde gerçekleştirildi.

2.7.3.2. Optimum pH

Glukoz izomeraz aktivitesine pH'nın etkisi, 50 mM asetat tamponunda pH 5 - 5,5; 50 mM fosfat tamponunda pH 6 - 7,0; 50 mM Tris-HCl tamponunda pH 7,5 - 9,0 değerlerinde ve 50 mM glisin tamponunda pH 9,5-10 değerlerinde, 200 mM glukoz konsantrasyonunda, 85°C'de 30 dakikalık reaksiyon şartlarında incelendi.

2.7.4. Kinetik Parametreler

Yapılan ön çalışmalar sonrasında, enzimlerinin (AgoG2GI-yt, AgoG2GI-rek ve mutant enzimler) kinetik parametrelerini hesaplayabilmek için 700 mM a kadar arttırılan glukoz konsantrasyonu ile yukarıda belirlenen sıcaklık ve pH'larda bir seri reaksiyon gerçekleştirildi. Glukoz izomeraz aktivitesi açığa çıkan fruktoz miktarının belirlenmesi ile hesaplandı.

Ölçümler sırasında glukozdan kaynaklanan interferans sorunu; aynı derişimde glukoz içeren körler kullanılarak ortadan kaldırıldı. Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerleri OriginPro 8.1 isimli analiz programı kullanılarak çizilen Michaelis-Menten eğrisi ile belirlendi.

2.7.5. Mutasyonların Isıl Kararlılığı Üzerine Etkisi

Yapılmış olan bu mutasyonların *A. gonensis* G2 GI'sının ısı kararlılığı üzerine etkisini belirlemek için saflaştırılan enzim özütleri 85°C'de inkübe edildi. Çeşitli zamanlarda bu örneklerden enzim alınarak, optimum çalışma şartlarında (100 mM glukoz varlığında 100 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. Enzimin Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi

AgoG2GI-yt enziminin bir monomerinin ağırlığı MALDI-TOF kütle Spektrometresi kullanılarak hesaplandı. Saflaştırılan *AgoG2GI-yt* jel elektroforezinde yürütüldükten sonra buradan izole edilen proteinler enzimlerle parçalanarak tuzlarından arındırıldı ve sonra kristalizasyon için doymuş matriks solusyonu içeren MALDI plağına aktarıldı. Sonrasında lazer ışını uygulanarak hızlı enerji transferiyle plaka yüzeyine iyon fırlatıldı ve peptitlerin gaz fazına dönüştürülmesi sağlandı. Maldı plağına +20 ile +30 kV'larda yüksek voltaj uygulandı. Pozitif yüklü peptidler flight tüpünün ağızına doğru hızlandı. Peptidler ağız kısmına ulaştıklarında $(z/m)^{1/2}$ orantılı bir hıza sahiptirler. Peptidler ağız kısmına geldiklerinde hepsi aynı kinetik enerjiye sahiptirler fakat farklı kütlelerden dolayı aynı hıza sahip değildiler. Küçük kütleli iyonlar dekdektöre daha önce çarpar ve sinyal verir. Bu şekilde edilen veriler bilgisayar ortamında değerlendirilerek enzimin bir monomerinin ağırlığı belirlendi.

3. BULGULAR

3.1. *A. gonensis* G2^T Yaban Tip GI Kodlayan *xyIA* Geninin Baz Dizilimi

1 M A Y F E N V D K V V Y E G P A S E N P
1 ATG GCG TAT TTT GAA AAC GTT GAC AAA GTG GTG TAT GAA GGC CCG GCA TCG GAA AAT CCG

21 L A F K F Y N P E E K V G D K T M E E H
63 CTT GCG TTT AAG TTT TAT AAT CCG GAA GAA AAA GTC GGG GAT AAA ACG ATG GAG GAG CAT

41 L R F S V A Y W H T F V G D G A D P F G
123 TTG CCG TTT TCG GTG GCG TAT TGG CAC ACA TTT GTT GGG GAT GGG GCA GAC CCG TTT GGG

61 V G T A I R P W N R Y S G M D L A K A R
183 GTT GGT ACG GCG ATC GCG CCG TGG AAC CGA TAC AGC GGA ATG GAT TTG GCA AAA GCG CGT

81 V E A A F E L F D K L N I P F F C F H D
243 GTG GAG GCA GCG TTT GAG TTA TTT GAT AAG CTA AAC ATT CCA TTT TTC TGC TTC CAC GAT

101 V D I A P E G A T L K E T Y Q N L D T I
303 GTC GAT ATT GCC CCA GAA GGA GCG ACG TTA AAA GAA ACG TAT CAA AAC TTA GAT ACG ATT

121 V D M I E E Y M K T S K T K L L W N T A
363 GTT GAT ATG ATC GAA GAA TAC ATG AAA ACA AGC AAA ACC AAG TTG CTT TGG AAT ACA GCT

141 N L F T H P R F V H G A A T S C N A D V
423 AAT TTA TTT ACA CAT CCT CGT TTT GTA CAT GGT GCA GCC ACT TCT TGC AAT GCA GAT GTG

161 F A Y A A A K V K K G L E I A K R L G A
483 TTT GCG TAT GCA GCA GCA AAG GTG AAA AAA GGC TTA GAA ATT GCC AAA CGA CTT GGT GCA

181 E N Y V F W G G R E G Y E T L L N T N M
543 GAA AAC TAT GTA TTC TGG GGC GGG CGT GAA GGC TAT GAA ACG TTG TTA AAT ACA AAT ATG

201 K L E L D N L A R F L H M A V D Y A K E
603 AAG CTC GAA CTG GAC AAT TTA GCC CGC TTT TTG CAT ATG GCG GTT GAC TAT GCG AAA GAA

221 I G F D G Q F L I E P K P K E P T K H Q
663 ATT GGC TTT GAC GGG CAA TTT TTA ATT GAG CCA AAA CCA AAA GAA CCA ACG AAG CAT CAA

241 Y D F D V A T A L A F L Q T Y G L K D Y
723 TAC GAC TTT GAT GTT GCA ACA GCA TTA GCG TTT CTA CAG ACG TAT GGA CTA AAA GAT TAT

261 F K F N I E A N H A T L A G H T F E H E
783 TTC AAA TTC AAC ATT GAA GCA AAC CAT GCG ACA TTG GCA GGT CAT ACA TTT GAA CAT GAA

281 L R V A R I H G M L G S V D A N Q G D P
843 CTT CCG GTA GCG CGC ATT CAC GGA ATG CTC GGT TCG GTC GAT GCC AAC CAA GGC GAC CCG

301 L L G W D T D E F P T D L Y S T T L A M
903 TTG CTT GGC TGG GAT ACC GAC GAA TTC CCA ACA GAC TTG TAT TCT ACT ACT CTT GCG ATG

321 Y E I L Q N G G L G K G G L N F D A K V
963 TAC GAA ATT TTA CAA AAT GGC GGA CTC GGA AAA GGC GGA TTG AAC TTT GAT GCG AAA GTA

341 R R G S F E P E D L F Y A H I A G M D S
1023 AGA CCG GGT TCG TTT GAA CCA GAA GAC TTA TTC TAC GCC CAT ATT GCC GGA ATG GAT AGC

361 F A I G L K V A Y R L I E D R V F E S V
1083 TTT GCG ATT GGA CTA AAA GTG GCG TAT CGT TTA ATT GAG GAT CGT GTG TTT GAA TCA GTT

381 V E E R Y K S Y T E G I G R D I I D G K
1143 GTT GAG GAA CCG TAT AAA AGC TAT ACA GAA GGA ATT GGC CCG GAT ATC ATT GAT GGG AAG

401 A D F H T L E A Y A L T L R D I S N R S
1203 GCC GAC TTC CAT ACA CTA GAG GCA TAT GCA TTA ACT CTT CCG GAT ATT TCC AAT CGT TCA

421 G R Q E R L K T L L N Q Y L L E V C A A
1263 GGA CCG CAA GAA CGT CTG AAG ACC TTG CTG AAC CAG TAT CTA CTG GAA GTC TGC GCC GCG

441 R *
1320 CGT TAA

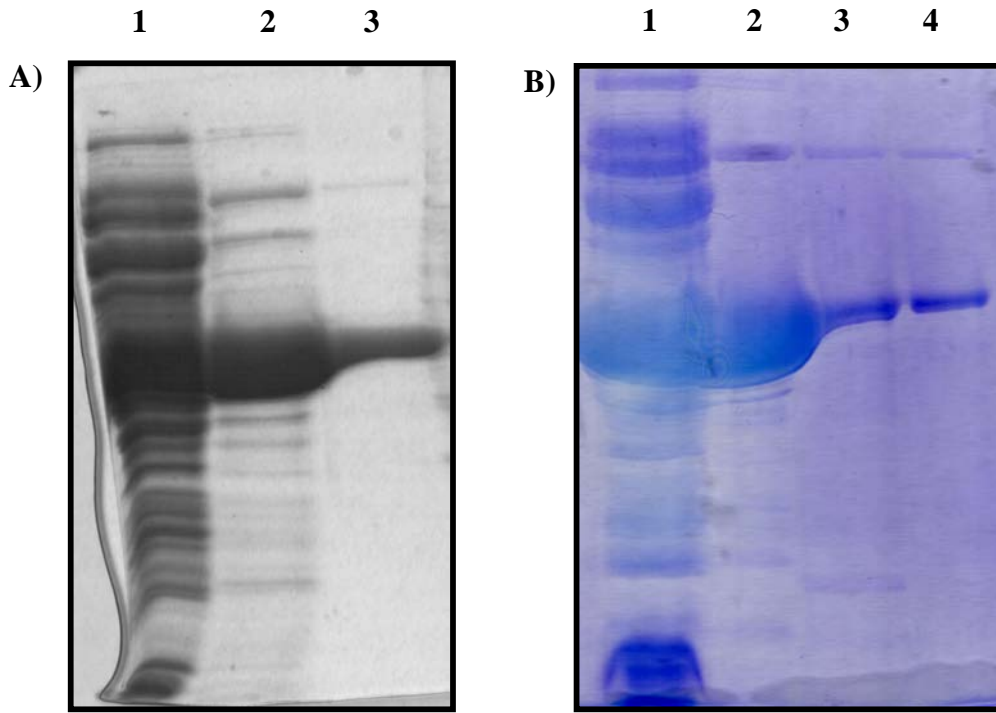
Şekil 4. *Anoxybacillus gonensis* GI'sının amino asit ve baz dizilimi

Yapılan invers-PCR uygulamaları sonucunda, ilk olarak, daha önce tespit edilmiş olan 530 nükleotidlik kısma 5' yönünde 182 nükleotid, 3' yönde ise 56 nükleotit ilave yapılması sağlandı ve bilinen baz dizilimi 768 nükleotide yükseltildi. Bu yeni parça kullanılarak inverse-PCR işlemleri tekrarlandı. Yeni elde edilen parçaların ilavesiyle 1073 bp'lik bir kısmın baz dizilimi belirlendi. Bu son parçanın uçlarından sentezlenen yeni primerler ile tekrarlanan deneyler sonucunda dizisi bilinen kısmın uzunluğu 1273 bp'ye kadar uzatıldı ve genin baş kısmı yakalandı. Sentezlenen en son bir primer ile de genin son kısmının baz dizilimi de açığa çıkarılmış oldu. Böylelikle yapılan çalışmalar sonucunda *Anoxybacillus gonensis*'e ait 1326 bp'lik glukoz izomeraz geninin baz dizilimi tamamıyla belirlendi. Açığa çıkarılan baz ve amino asit dizilimi Şekil 4'de gösterilmektedir.

3.2. AgoG2GI-yt'yi Kodlayan *xyIA* Geninin pET28a(+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

E.coli BL21/pETG2GIC sistemi kullanılarak üretilen ve HisTag saflaştırma kiti ile saflaştırılan enzim, Şekil 5A'da da görüldüğü gibi, hücrede bol miktarda ekspres oldu fakat yapılan aktivite çalışmalarında enzimin çok düşük bir aktiviteye sahip olduğu belirlendi. Enzimin karboksil ucuna taktığımız HisTag kuyruğunun enzimin aktivitesi üzerinde olumsuz bir etki yapmış olduğunun belirlenmesi sebebiyle, enzimin HisTag kuyruğu olmayacak şekilde klonlanmasına karar verildi.

E.coli BL21 pETG2GI sistemi kullanılarak üretilen ve HisTag kuyruğu içermeyen enzim kolon kromatografisi yöntemi ile saflaştırıldı. Saflaştırma işlemine ait veriler ileriki bölümlerde gösterilmiştir. Saflaştırma sonrası SDS-PAGE jel görüntüsü aşağıda görülmektedir (Şekil 5B). Ekspresyon sonrasında yüksek aktivitenin gözlenmesi klonlanmanın ve ekspresyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.



Şekil 5. HisTag kuyruklu ve kuyuksuz enzimin SDS-PAGE jel görüntüsü A) HisTag kuyruklu proteinin SDS-PAGE jel görüntüsü; 1) Genin ekspres edildiği hücrenin hücre özütü (290 µg protein), 2) 70°C’de 15 dk sıcak şoku uygulanmış hücre özütü (98 µg protein), 3) HisTag kiti ile saflaştırılmış enzim (7 µg protein). B) HisTag kuyuksuz enzimin SDS-PAGE jel görüntüsü; 1) Genin ekspres edildiği hücrenin hücre özütü (294 µg protein), 2) 80°C’de 15 dk sıcak şoku uygulanmış hücre özütü (121 µg protein), 3) İyon değişim kolon kromatografisi sonrası birleştirilen fraksiyonlardan oluşan enzim özütü (12,25 µg protein), 4) Hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi sonrası birleştirilen fraksiyonlardan oluşan enzim özütü (3,5 µg protein).

3.3. Mutant GI Enzimleri

Bu tez kapsamında, aktif bölgede olduğu tahmin edilen 3 ayrı amino asitte; H99E, H99D, H99Q, H99L, H99N, W137F, V184T, V184S ve W137F/V184S mutasyonları gerçekleştirildi. Mutasyon sonuçlarını doğrulamak için, her mutant enzimin genini taşıyan plazmitin baz dizin analizi yapıldı ve orijinal sıra ile karşılaştırıldı. Sonuç olarak tüm mutasyonlar başarılı bir şekilde gerçekleştirildi.

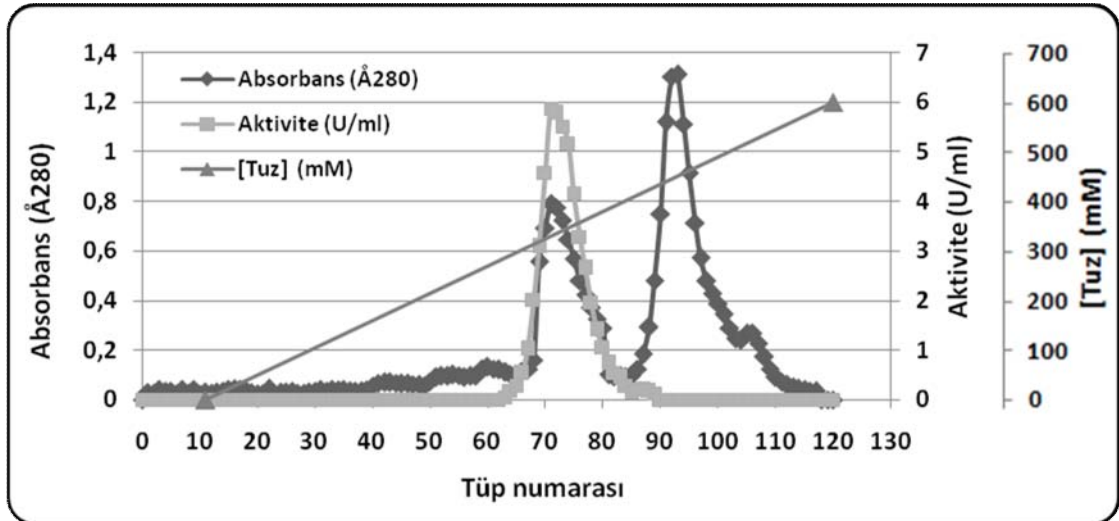
3.4. Enzimlerin Saflaştırılmaları ve Kinetik Parametreleri

3.4.1. AgoG2GI-yt

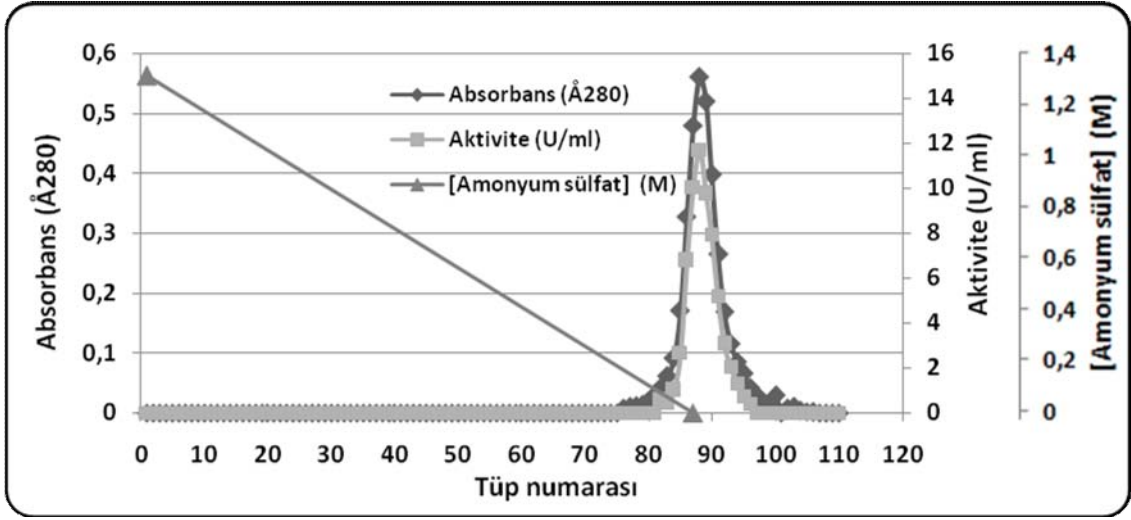
Anoxybacillus gonensis G2^T glukoz izomerazı ısı bozunumu, amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişimi kolon kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi yöntemleriyle saflaştırıldı. Bu çalışmaya ait saflaştırma tablosu Tablo 8’de gösterilmektedir. Bu saflaştırma işlemi sonucunda enzim hücre özütüne göre 17,14 kat saflaştırıldı. İyon değişimi kolon kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi saflaştırmalarına ait grafikler Şekil 6 ve 7’de gösterilmektedir.

Tablo 8. AgoG2GI-yt ait saflaştırma tablosu

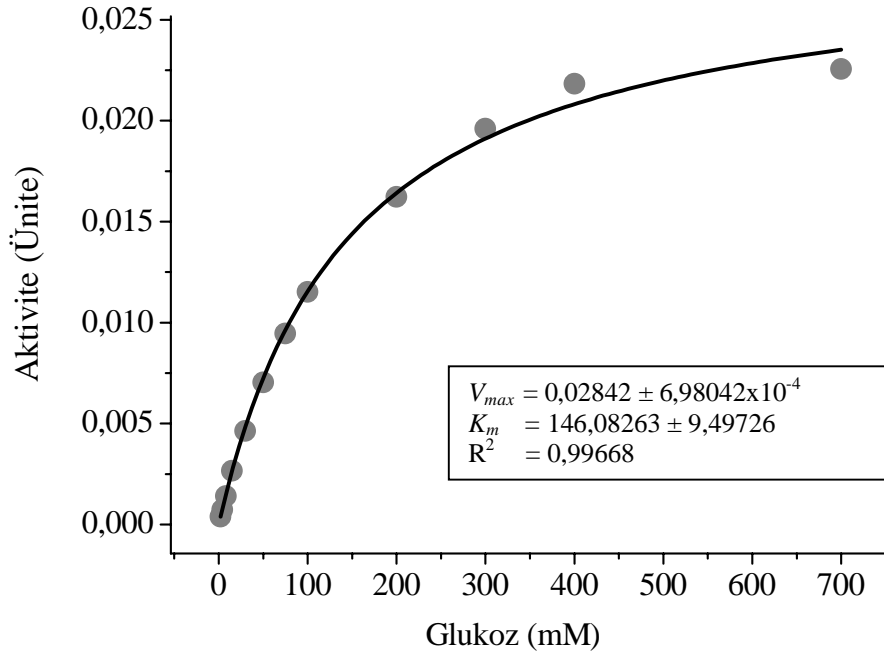
Saflaştırma basamağı	Hacim (ml)	[Protein] (mg/ml)	T.protein (mg)	T.aktivite (U)	S.aktivite (U/mg)	Verim	Saflaştırma katı
Hücre özütü	30	11,53	345,9	423	1,22	100	1
Isı bozunum	24	2,50	60,1	255	4,25	60,2	3,47
A.S çöktürmesi ve Diyaliz	19	1,80	34,2	175	5,11	41,3	4,18
İyon değişimi (DEAE-S.)	45	0,24	10,8	147	13,61	34,7	11,12
Hidrofobik etkileşim	17	0,33	5,5	116	20,98	27,4	17,14



Şekil 6. AgoG2GI-yt'nin saflaştırılmasına ait iyon değişimi kolon kromatografisi (Deney; 30 cm uzunluğunda ve 1,5 cm çapında bir kolon ile DEAE-Sepharose Fast Flow (Sigma) kolon malzemesi kullanılarak yapıldı. Deneyde tampon olarak; 0,5 mM CoCl₂ ve 5 mM MgSO₄ içeren 20 mM MOPS tamponu (pH:6,5) kullanıldı. Kolona akış hızı 1 ml/dk olarak ayarlandı. 65–83 nolu tüpler arasında aktivite saptandı ve bu fraksiyonlardan 67–81 nolu fraksiyonlar alınarak birleştirildi).



Şekil 7. AgoG2GI-yt'nin saflaştırılmasına ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi (Deney; 20 cm uzunluğunda ve 0,75 cm çapında bir kolon ile Phenyl sepharose 6 Fast Flow (Sigma) kolon malzemesi kullanılarak yapıldı. Deneyde tampon olarak; 0,5 mM CoCl_2 ve 5 mM MgSO_4 içeren 20 mM MOPS tamponu (pH:6,5) kullanıldı. Kolona akış hızı 0,5 ml/dk olarak ayarlandı. 82–96 nolu tüpler arasında aktivite saptandı ve bu fraksiyonlardan 85-94 nolu fraksiyonlar alınarak birleştirildi).

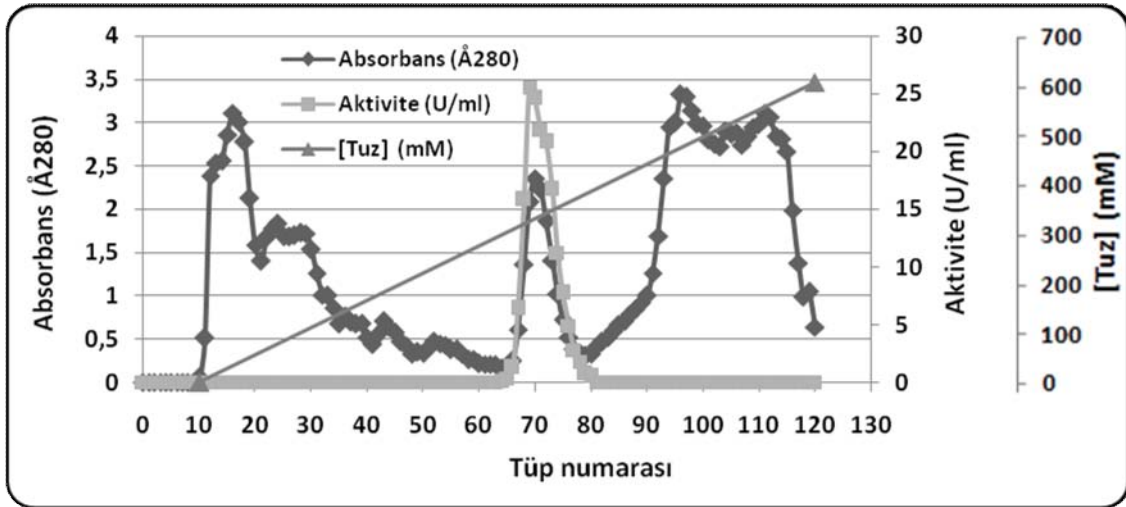


Şekil 8. AgoG2GI-yt ait Michaelis-Menten grafiği

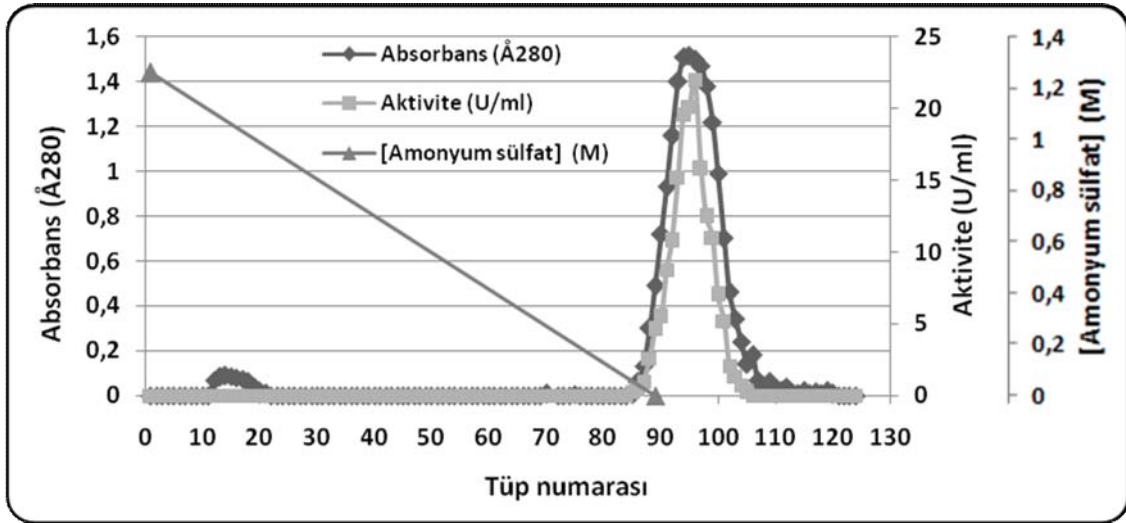
OriginPro 8.1 programı kullanılarak hazırlanan Michaelis-Menten grafiğinden elde edilen veriler doğrultusunda; *A. gonensis* G2^T glukoz izomerazının glukoz için K_m değeri $146,08 \pm 9,50$ mM ve V_{max} değeri ise $43,72 \pm 1,01$ $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein olarak hesaplandı. Bu veriler doğrultusunda enzimin k_{cat} değeri 36,47 (1/sn), katalitik etkinliğini gösteren k_{cat}/K_m değeri 0,250 olarak hesaplandı (Şekil 8).

3.4.2. AgoG2GI-rek

E.coli BL21/pETG2GI sistemi kullanılarak üretilen ve HisTag kuyruğu içermeyen glukoz izomerazı ısı bozunumu, iyon değişimi kolon kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi yöntemleriyle saflaştırıldı. Bu çalışmaya ait saflaştırma tablosu Tablo 9'da gösterilmektedir. Bu saflaştırma işlemi sonucunda enzim hücre özütüne göre 3,85 kat saflaştırıldı. İyon değişimi kolon kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi saflaştırmalarına ait grafikler Şekil 9 ve 10'da gösterilmektedir.



Şekil 9. AgoG2GI-rek'in saflaştırılmasına ait iyon değişimi kolon kromatografisi (Deney; 30 cm uzunluğunda ve 1,5 cm çapında bir kolon ile DEAE-Sepharose Fast Flow (Sigma) kolon malzemesi kullanılarak yapıldı. Deneyde tampon olarak; 0,5 mM CoCl₂ ve 5 mM MgSO₄ içeren 20 mM MOPS tamponu (pH:6,5) kullanıldı. Kolona akış hızı 1ml/dk olarak ayarlandı. 63–78 nolu tüpler arasında aktivite saptandı ve bu fraksiyonlardan 66–77 nolu fraksiyonlar alınarak birleştirildi).

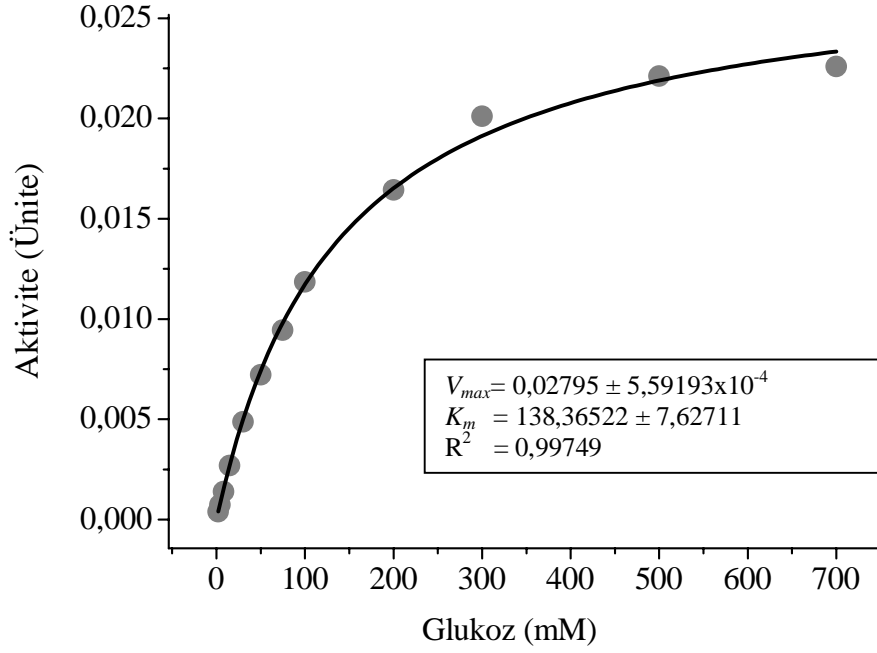


Şekil10. AgoG2GI-rek'in saflaştırılmasına ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi (Deney; 20 cm uzunluğunda ve 0,75 cm çapında bir kolon ile Phenyl sepharose 6 Fast Flow (Sigma) kolon malzemesi kullanılarak yapıldı. Deneyde tampon olarak; 0,5 mM CoCl₂ ve 5 mM MgSO₄ içeren 20 mM MOPS tamponu (pH:6,5) kullanıldı. Kolona akış hızı 0,5 ml/dk olarak ayarlandı. 86–104 nolu tüpler arasında aktivite saptandı ve bu fraksiyonlardan 88-102 nolu fraksiyonlar alınarak birleştirildi).

Tablo 9. AgoG2GI-rek'e ait saflaştırma tablosu

Saflaştırma basamağı	Hacim (ml)	[Protein] (mg/ml)	T. protein (mg)	T. aktivite (U)	S.aktivite (U/mg)	Verim	Saflaştırma katı
Hücre özütü	13	17,38	225,9	1730	7,66	100,0	1,00
Isı bozunum	12	5,74	68,8	1251	18,17	72,3	2,37
İyon değişimi (DEAE-S.)	33	1,21	39,8	1045	26,25	60,4	3,43
Hidrofobik etkileşim	30	0,85	25,5	752	29,50	43,5	3,85

OriginPro 8.1 programı kullanılarak hazırlanan Michaelis-Menten grafiğinden elde edilen veriler doğrultusunda; *E.coli* BL21/pETG2GI'den saflaştırılan GI'nın glukoz için K_m değeri $138,37 \pm 7,63$ mM ve V_{max} değeri ise $40,51 \pm 0,81$ $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein olarak hesaplandı (Şekil 11). Bu veriler doğrultusunda enzimin k_{cat} değeri 33,79 (1/sn), katalitik etkinliğini gösteren k_{cat}/K_m değeri 0,244 olarak hesaplandı.



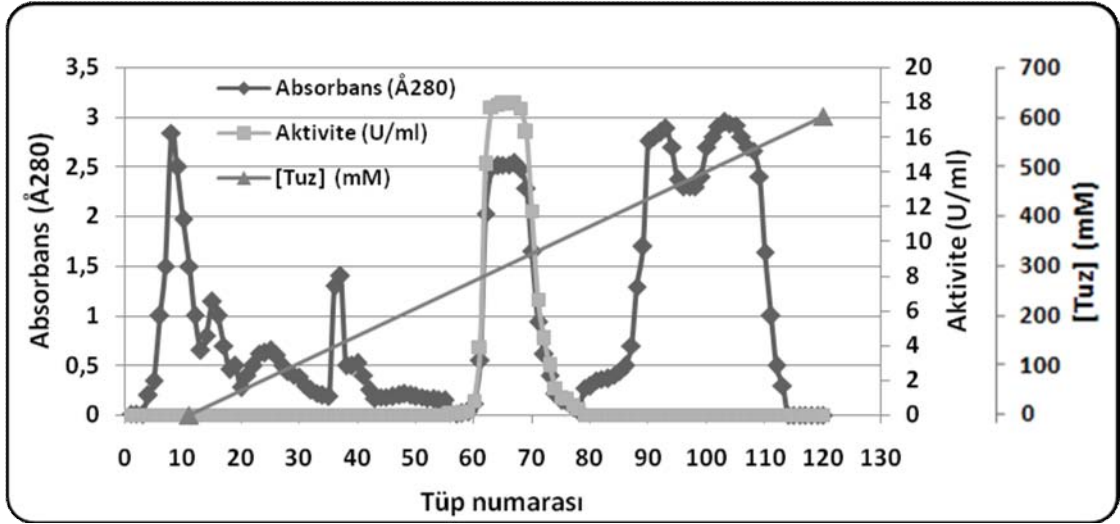
Şekil 11. AgoG2GI-rek'e ait Michaelis-Menten grafiği

3.4.3. W137F Glukoz İzomeraz

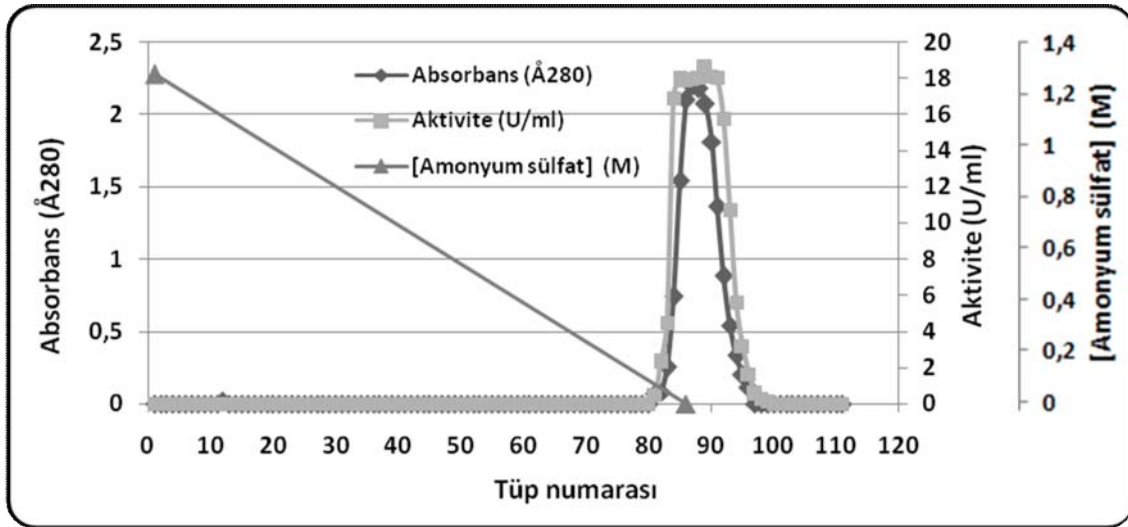
W137F glukoz izomerazı ısı bozunumu, iyon değişimi kolon kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi yöntemleriyle saflaştırıldı. Bu çalışmaya ait saflaştırma tablosu Tablo 10'da gösterilmektedir. Bu saflaştırma işlemi sonucunda enzim 3,84 kat saflaştırıldı. İyon değişimi kolon kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi saflaştırmalarına ait grafikler Şekil 12 ve 13'de gösterilmektedir.

Tablo 10. W137F GI'ya ait saflaştırma tablosu

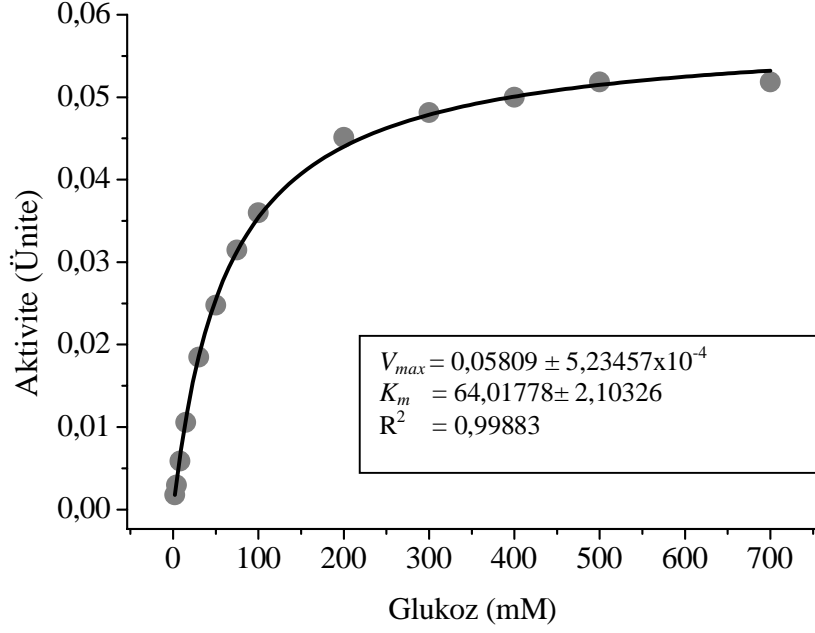
Saflaştırma basamağı	Hacim (ml)	[Protein] (mg/ml)	T.protein (mg)	T.aktivite (U)	S.aktivite (U/mg)	Verim	Saflaştırma katı
Hücre özütü	10,1	17,93	181,1	1688	9,32	100,0	1,00
Isı bozunum	9	6,77	61,0	1157	18,98	68,5	2,04
İyon değişimi (DEAE-S.)	45	0,71	32,0	983	30,69	58,2	3,29
Hidrofobik etkileşim	29	0,68	19,9	711	35,79	42,1	3,84



Şekil 12. W137F GI'ya ait iyon değişimi kolon kromatografisi (Deney; 30 cm uzunluğunda ve 1,5 cm çapında bir kolon ile DEAE-Sepharose Fast Flow (Sigma) kolon malzemesi kullanılarak yapıldı. Deneyde tampon olarak; 0,5 mM CoCl_2 ve 5 mM MgSO_4 içeren 20 mM MOPS tamponu (pH:6,5) kullanıldı. Kolona akış hızı 1ml/dk olarak ayarlandı. 60–76 nolu tüpler arasında aktivite saptandı ve bu fraksiyonlardan 61–75 nolu fraksiyonlar alınarak birleştirildi).



Şekil 13. W137F GI'ya ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi (Deney; 20 cm uzunluğunda ve 0,75 cm çapında bir kolon ile Phenyl sepharose 6 Fast Flow (Sigma) kolon malzemesi kullanılarak yapıldı. Deneyde tampon olarak; 0,5 mM CoCl_2 ve 5 mM MgSO_4 içeren 20 mM MOPS tamponu (pH:6,5) kullanıldı. Kolona akış hızı 0,5 ml/dk olarak ayarlandı. 81-97 nolu tüpler arasında aktivite saptandı ve bu fraksiyonlardan 82-96 nolu fraksiyonlar alınarak birleştirildi).



Şekil 14. W137F GI'ya ait Michaelis-Menten grafiği

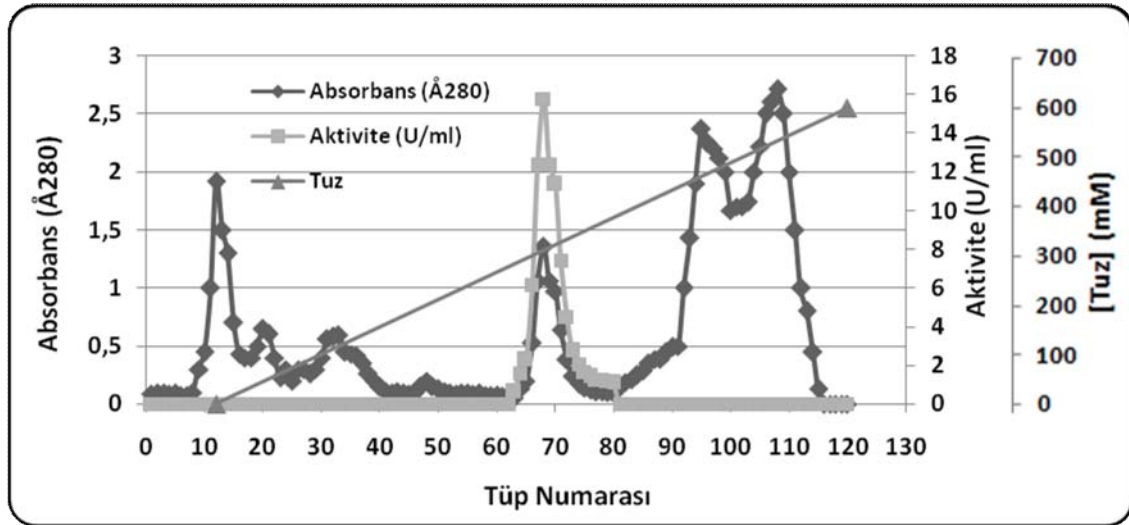
Hazırlanan Michaelis-Menten grafiğinden elde edilen veriler doğrultusunda; *E.coli* W137F GI'nın glukoz için K_m değeri $64,02 \pm 2,10$ mM ve V_{max} değeri ise $46,07 \pm 0,42$ $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein olarak hesaplandı (Şekil 14). Bu veriler doğrultusunda enzimin k_{cat} değeri 38,42 (1/sn), katalitik etkinliğini gösteren k_{cat}/K_m değeri 0,600 olarak hesaplandı.

3.4.4. V184T Glukoz İzomeraz

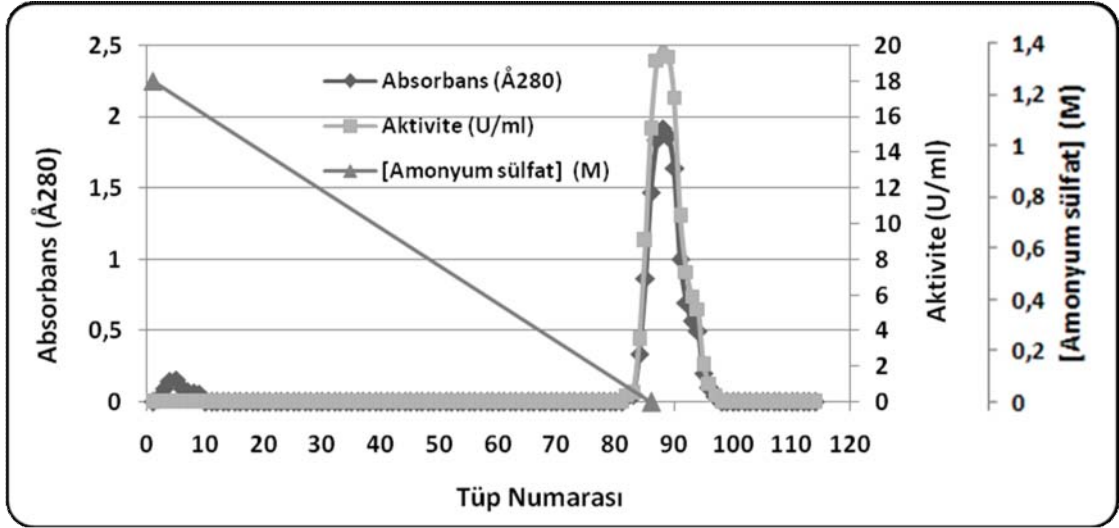
V184T glukoz izomerazı ısı bozunumu, iyon değişimi kolon kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi yöntemleriyle saflaştırıldı. Bu çalışmaya ait saflaştırma tablosu Tablo 11’de gösterilmektedir. Bu saflaştırma işlemi sonucunda enzim 4,22 kat saflaştırıldı. İyon değişimi kolon kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi saflaştırmalarına ait grafikler Şekil 15 ve 16’da gösterilmektedir.

Tablo 11. V184T GI’ya ait saflaştırma tablosu

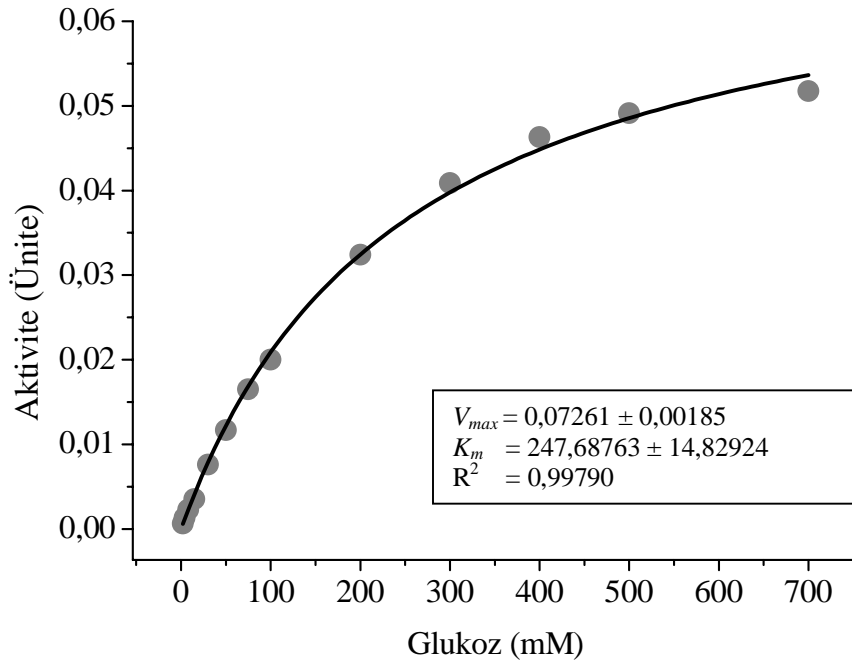
Saflaştırma basamağı	Hacim (ml)	[Protein] (mg/ml)	T.protein (mg)	T.aktivite (U)	S.aktivite (U/mg)	Verim	Saflaştırma katı
Hücre özütü	9,7	13,71	133,0	831	6,25	100,0	1,00
Isı bozunum	9	4,04	36,3	528	14,53	63,5	2,32
İyon değişimi (DEAE-S.)	39	0,47	18,3	414	22,67	49,8	3,63
Hidrofobik etkileşim	23,5	0,58	13,7	362	26,36	43,6	4,22



Şekil 15. V184T GI’ya ait iyon değişimi kolon kromatografisi (Deney; 30 cm uzunluğunda ve 1,5 cm çapında bir kolon ile DEAE-Sepharose Fast Flow (Sigma) kolon malzemesi kullanılarak yapıldı. Deneyde tampon olarak; 0,5 mM CoCl₂ ve 5 mM MgSO₄ içeren 20 mM MOPS tamponu (pH: 6,5) kullanıldı. Kolona akış hızı 1ml/dk olarak ayarlandı. 64–77 nolu tüpler arasında aktivite saptandı ve bu fraksiyonlardan 65–77 nolu fraksiyonlar alınarak birleştirildi).



Şekil 16. V184T GI'ya ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi (Deney; 20 cm uzunluğunda ve 0,75 cm çapında bir kolon ile Phenyl sepharose 6 Fast Flow (Sigma) kolon malzemesi kullanılarak yapıldı. Deneyde tampon olarak; 0,5 mM CoCl_2 ve 5 mM MgSO_4 içeren 20 mM MOPS tamponu (pH:6,5) kullanıldı. Kolona akış hızı 0,5 ml/dk olarak ayarlandı. 82-97 nolu tüpler arasında aktivite saptandı ve bu fraksiyonlardan 84-96 nolu fraksiyonlar alınarak birleştirildi).

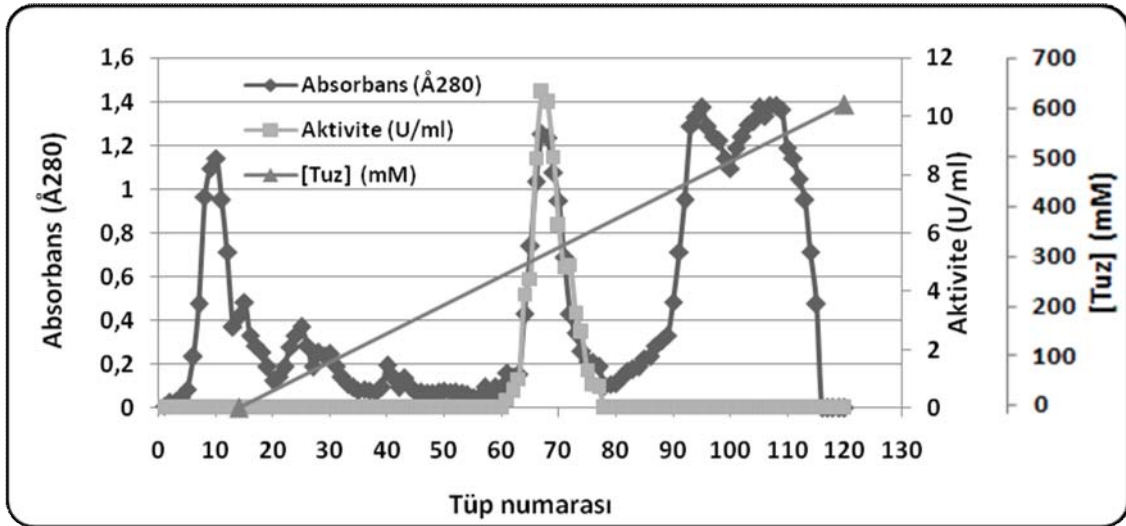


Şekil 17. V184T GI'ya ait Michaelis-Menten grafiği

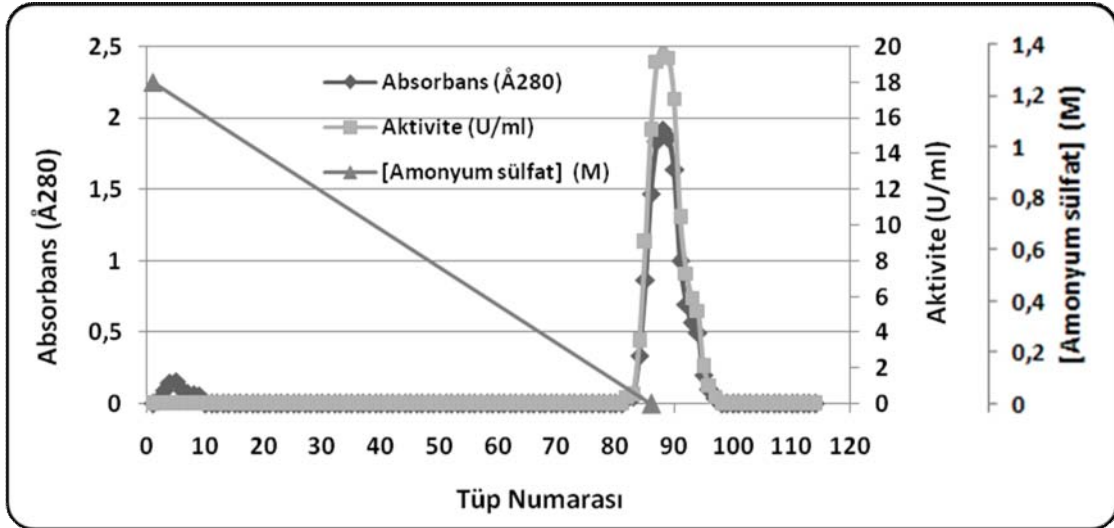
Hazırlanan Michaelis-Menten grafiğinden elde edilen veriler doğrultusunda; V184T GI'nın glukoz için K_m değeri $247,69 \pm 14,83$ mM ve V_{max} değeri ise $59,08 \pm 1,51$ $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein olarak hesaplandı (Şekil 17). Bu veriler doğrultusunda enzimin k_{cat} değeri 49,28 (1/sn), katalitik etkinliğini gösteren k_{cat}/K_m değeri 0,199 olarak hesaplandı.

3.4.5. V184S Glukoz İzomeraz

V184S glukoz izomerazı ısı bozunumu, iyon değişimi kolon kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi yöntemleriyle saflaştırıldı. Bu çalışmaya ait saflaştırma tablosu Tablo 12'de gösterilmektedir. Bu saflaştırma işlemi sonucunda enzim 3,94 kat saflaştırıldı. İyon değişimi kolon kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi saflaştırmalarına ait grafikler Şekil 18 ve 19'da gösterilmektedir.



Şekil 18. V184S GI'ya ait iyon değişimi kolon kromatografisi (Deney; 30 cm uzunluğunda ve 1,5 cm çapında bir kolon ile DEAE-Sepharose Fast Flow (Sigma) kolon malzemesi kullanılarak yapıldı. Deneyde tampon olarak; 0,5 mM CoCl_2 ve 5 mM MgSO_4 içeren 20 mM MOPS tamponu (pH:6,5) kullanıldı. Kolona akış hızı 1ml/dk olarak ayarlandı. 61–77 nolu tüpler arasında aktivite saptandı ve bu fraksiyonlardan 62–76 nolu fraksiyonlar alınarak birleştirildi).

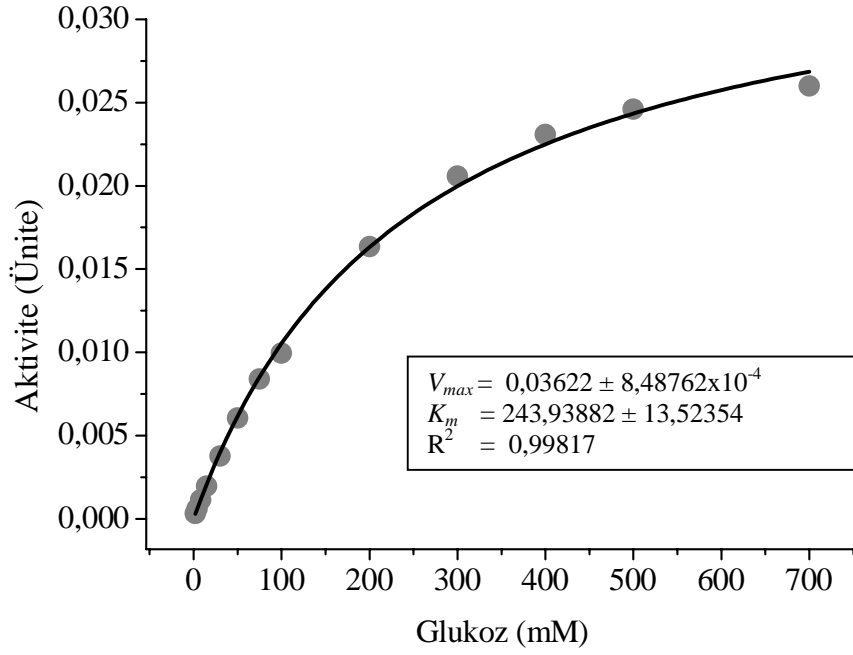


Şekil 19. V184S GI'ya ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi (Deney; 20 cm uzunluğunda ve 0,75 cm çapında bir kolon ile Phenyl sepharose 6 Fast Flow (Sigma) kolon malzemesi kullanılarak yapıldı. Deneyde tampon olarak; 0,5 mM CoCl_2 ve 5 mM MgSO_4 içeren 20 mM MOPS tamponu (pH:6,5) kullanıldı. Kolona akış hızı 0,5 ml/dk olarak ayarlandı. 83-98 nolu tüpler arasında aktivite saptandı ve bu fraksiyonlardan 84-96 nolu fraksiyonlar alınarak birleştirildi).

Tablo 12. V184S GI'ya ait saflaştırma tablosu

Saflaştırma basamağı	Hacim (ml)	[Protein] (mg/ml)	T.protein (mg)	T.aktivite (U)	S.aktivite (U/mg)	Verim	Saflaştırma katı
Hücre özütü	8	8,89	71,1	406	5,71	100,0	1,00
Isı bozunum	7	3,24	22,6	260	11,48	64,0	2,01
İyon değişimi (DEAE-S.)	42	0,26	11,0	197	17,89	48,6	3,13
Hidrofobik etkileşim	21	0,36	7,6	170	22,49	41,9	3,94

Hazırlanan Michaelis-Menten grafiğinden elde edilen veriler doğrultusunda; V184S GI'nın glukoz için K_m değeri $243,94 \pm 13,52$ mM ve V_{max} değeri ise $49,82 \pm 1,17$ $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein olarak hesaplandı (Şekil 20). Bu veriler doğrultusunda enzimin k_{cat} değeri 41,56 (1/sn), katalitik etkinliğini gösteren k_{cat}/K_m değeri 0,170 olarak hesaplandı.



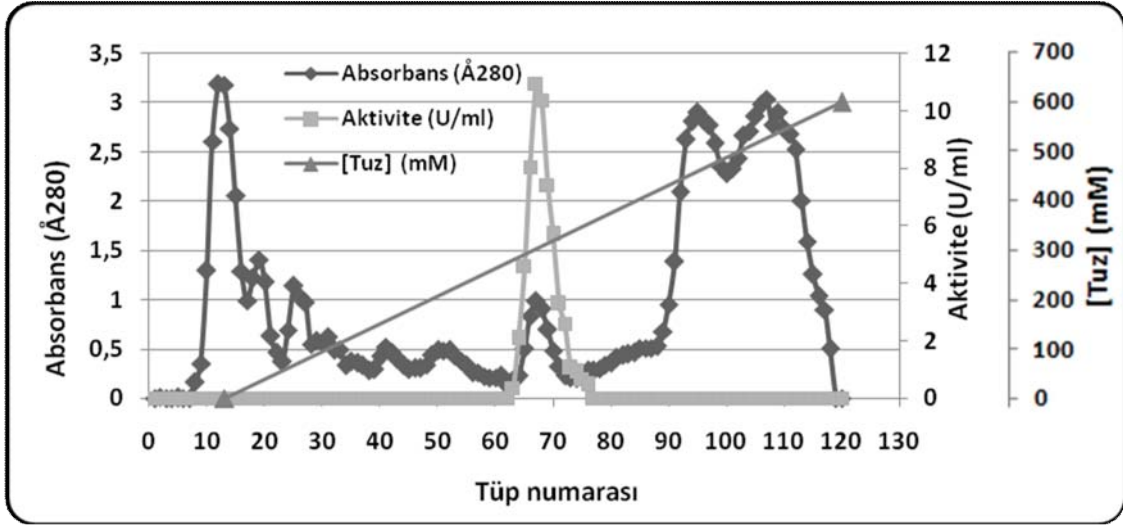
Şekil 20. V184S GI'ya ait Michaelis-Menten grafiği

3.4.6. H99Q Glukoz İzomeraz

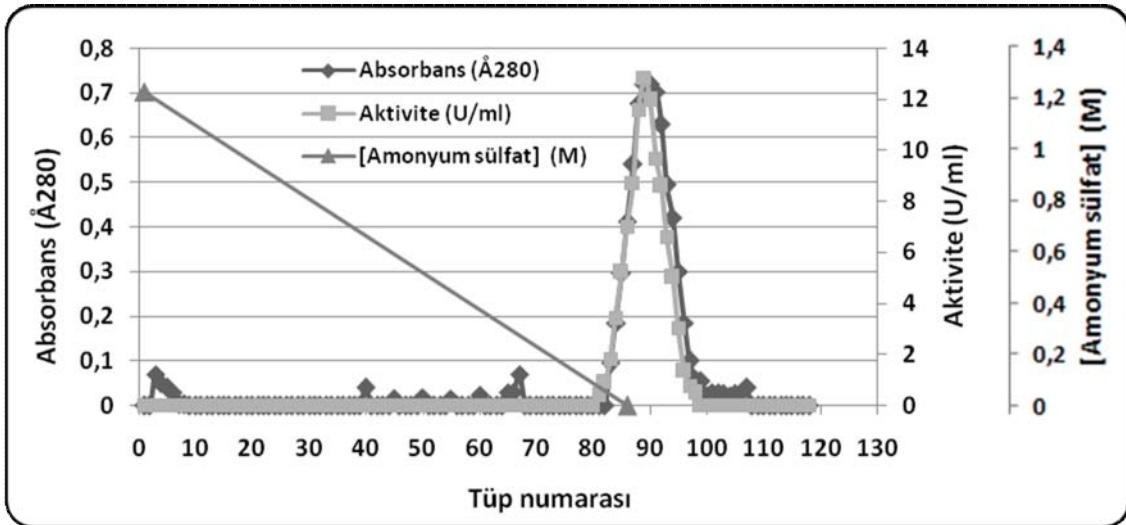
H99Q glukoz izomerazı ısı bozunumu, iyon değişimi kolon kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi yöntemleriyle saflaştırıldı. Bu çalışmaya ait saflaştırma tablosu Tablo 13'de gösterilmektedir. Bu saflaştırma işlemi sonucunda enzim 3,47 kat saflaştırıldı. İyon değişimi kolon kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi saflaştırmalarına ait grafikler Şekil 21 ve 22'de gösterilmektedir.

Tablo 13. H99Q GI'ya ait saflaştırma tablosu

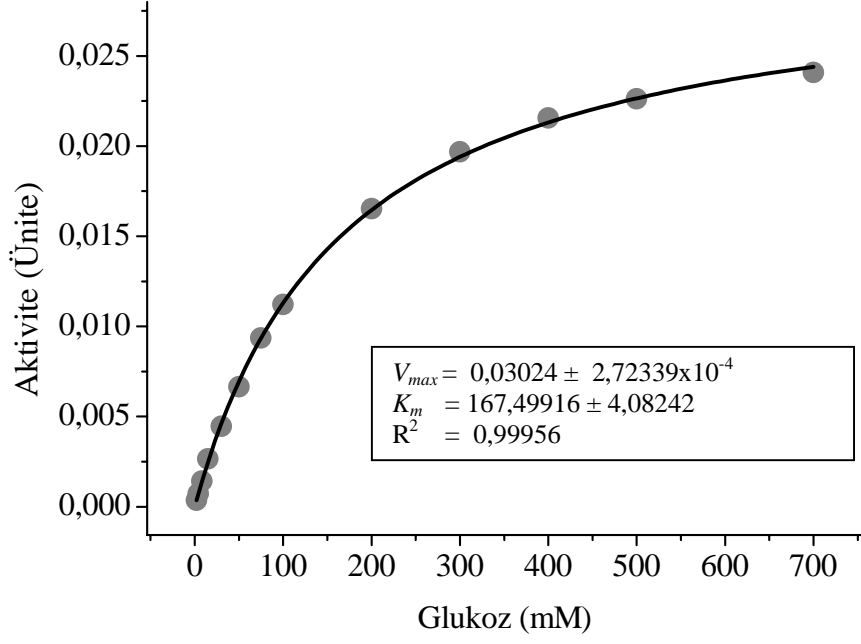
Saflaştırma basamağı	Hacim (ml)	[Protein] (mg/ml)	T.protein (mg)	T.aktivite (U)	S.aktivite (U/mg)	Verim	Saflaştırma katı
Hücre özütü	17,5	17,39	304,3	396	1,30	100,0	1,00
Isı bozunum	16,1	5,73	92,3	241	2,61	60,9	2,01
İyon değişimi (DEAE-S.)	33,5	1,80	60,4	204	3,38	51,5	2,59
Hidrofobik etkileşim	25	1,47	36,7	166	4,52	41,9	3,47



Şekil 21. H99Q GI'ya ait iyon değişimi kolon kromatografisi (Deney; 30 cm uzunluğunda ve 1,5 cm çapında bir kolon ile DEAE-Sepharose Fast Flow (Sigma) kolon malzemesi kullanılarak yapıldı. Deneyde tampon olarak; 0,5 mM CoCl_2 ve 5 mM MgSO_4 içeren 20 mM MOPS tamponu (pH:6,5) kullanıldı. Kolona akış hızı 1ml/dk olarak ayarlandı. 63–76 nolu tüpler arasında aktivite saptandı ve bu fraksiyonlardan 64–74 nolu fraksiyonlar alınarak birleştirildi).



Şekil 22. H99Q GI'ya ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi (Deney; 20 cm uzunluğunda ve 0,75 cm çapında bir kolon ile Phenyl sepharose 6 Fast Flow (Sigma) kolon malzemesi kullanılarak yapıldı. Deneyde tampon olarak; 0,5 mM CoCl_2 ve 5 mM MgSO_4 içeren 20 mM MOPS tamponu (pH:6,5) kullanıldı. Kolona akış hızı 0,5 ml/dk olarak ayarlandı. 81-98 nolu tüpler arasında aktivite saptandı ve bu fraksiyonlardan 83-97 nolu fraksiyonlar alınarak birleştirildi).



Şekil 23. H99Q GI'ya ait Michaelis-Menten grafiği

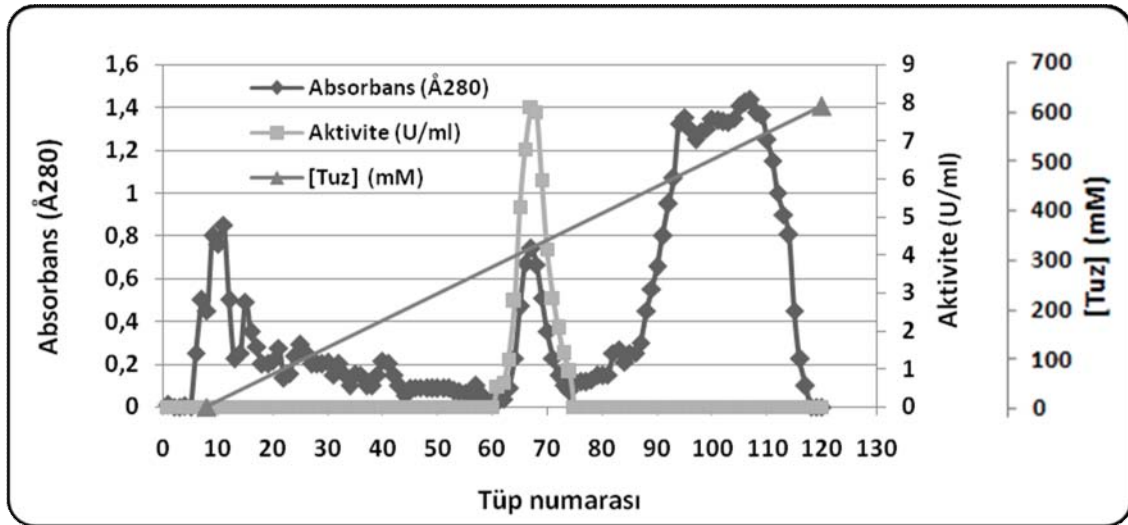
Hazırlanan Michaelis-Menten grafiğinden elde edilen veriler doğrultusunda; H99Q GI'nın glukoz için K_m değeri $167,50 \pm 4,08$ mM ve V_{max} değeri ise $8,24 \pm 0,07$ $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein olarak hesaplandı (Şekil 23). Bu veriler doğrultusunda enzimin k_{cat} değeri 6,87 (1/sn), katalitik etkinliğini gösteren k_{cat}/K_m değeri 0,041 olarak hesaplandı.

3.4.7. H99N Glukoz İzomeraz

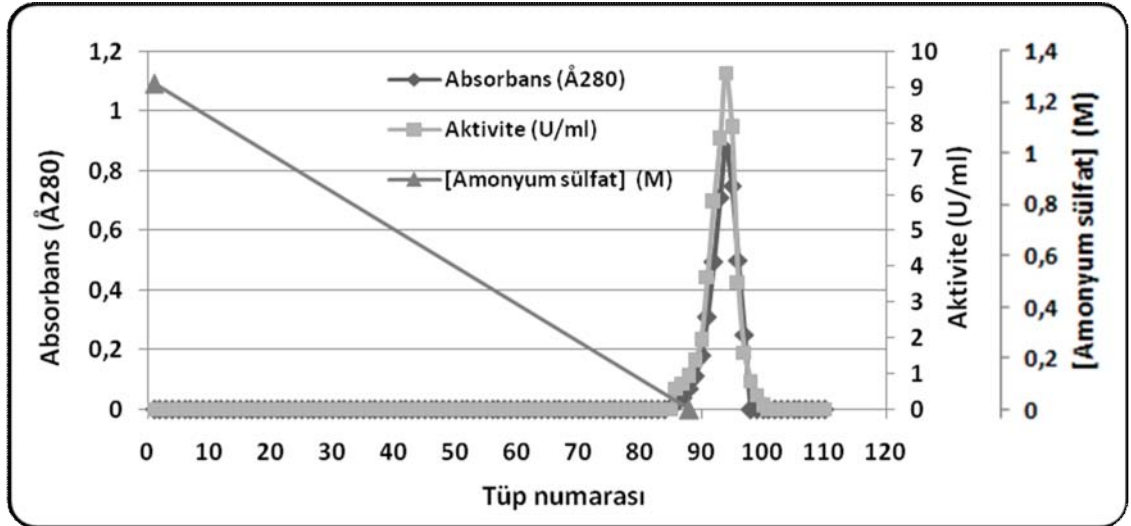
H99N glukoz izomerazı ısı bozunumu, iyon değişimi kolon kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi yöntemleriyle saflaştırıldı. Bu çalışmaya ait saflaştırma tablosu Tablo 14’de gösterilmektedir. Bu saflaştırma işlemi sonucunda enzim 4,09 kat saflaştırıldı. İyon değişimi kolon kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi saflaştırmalarına ait grafikler Şekil 24 ve 25’de gösterilmektedir.

Tablo 14. H99N GI’ya ait saflaştırma tablosu

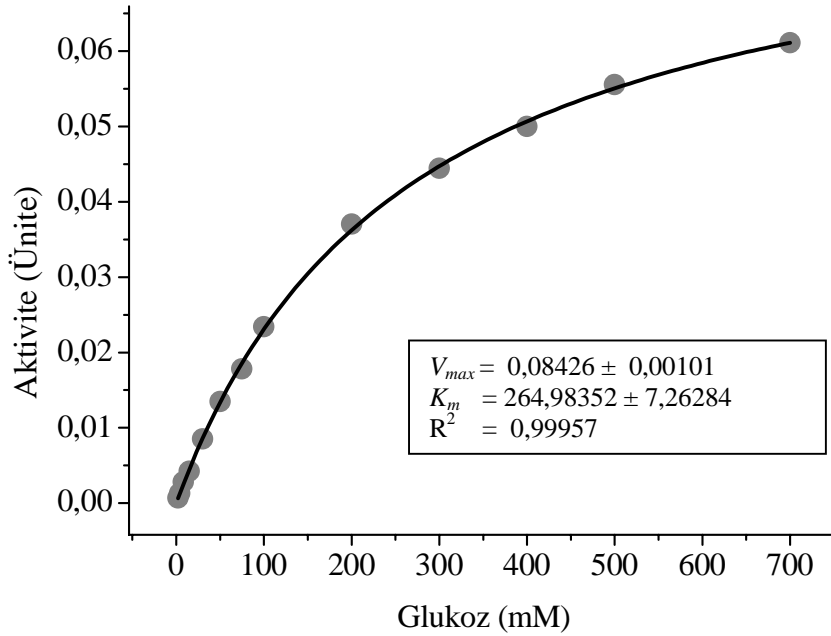
Saflaştırma basamağı	Hacim (ml)	[Protein] (mg/ml)	T.protein (mg)	T.aktivite (U)	S.aktivite (U/mg)	Verim	Saflaştırma katı
Hücre özütü	8,2	17,15	140,6	246	1,75	100,0	1,00
Isı bozunum	7,1	8,44	59,9	152	2,53	61,6	1,45
İyon değişimi (DEAE-S.)	33	0,68	22,4	134	5,98	54,5	3,42
Hidrofobik etkileşim	17,5	0,61	10,7	76	7,16	31,0	4,09



Şekil 24. H99N GI’ya ait iyon değişimi kolon kromatografisi (Deney; 30 cm uzunluğunda ve 1,5 cm çapında bir kolon ile DEAE-Sepharose Fast Flow (Sigma) kolon malzemesi kullanılarak yapıldı. Deneyde tampon olarak; 0,5 mM CoCl₂ ve 5 mM MgSO₄ içeren 20 mM MOPS tamponu (pH:6,5) kullanıldı. Kolona akış hızı 1ml/dk olarak ayarlandı. 61-74 nolu tüpler arasında aktivite saptandı ve bu fraksiyonlardan 63-73 nolu fraksiyonlar alınarak birleştirildi).



Şekil 25. H99N GI'ya ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi (Deney; 20 cm uzunluğunda ve 0,75 cm çapında bir kolon ile Phenyl sepharose 6 Fast Flow (Sigma) kolon malzemesi kullanılarak yapıldı. Deneyde tampon olarak; 0,5 mM CoCl_2 ve 5 mM MgSO_4 içeren 20 mM MOPS tamponu (pH:6,5) kullanıldı. Kolona akış hızı 0,5 ml/dk olarak ayarlandı. 86-99 nolu tüpler arasında aktivite saptandı ve bu fraksiyonlardan 88-97 nolu fraksiyonlar alınarak birleştirildi).

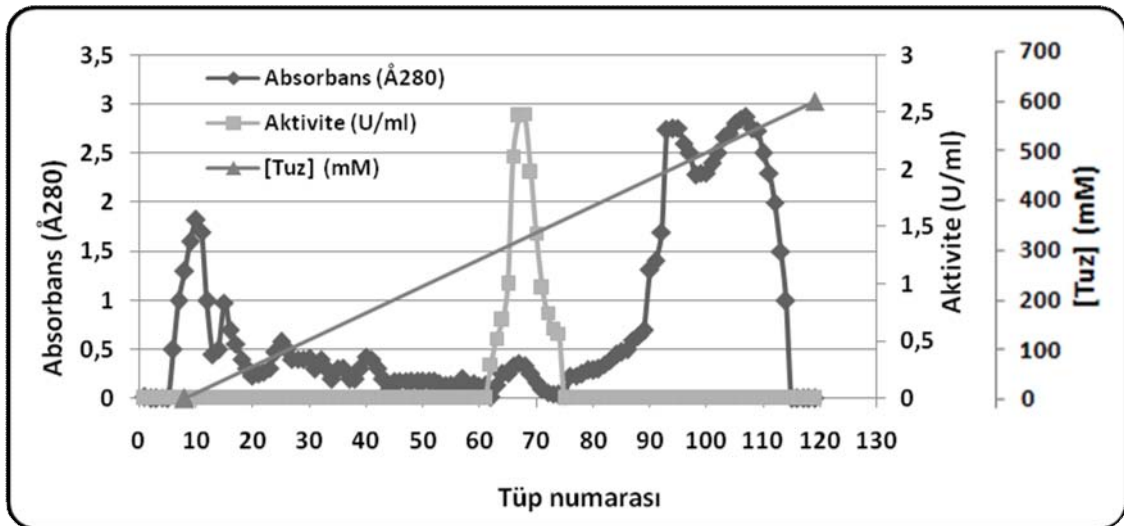


Şekil 26. H99N GI'ya ait Michaelis-Menten grafiği

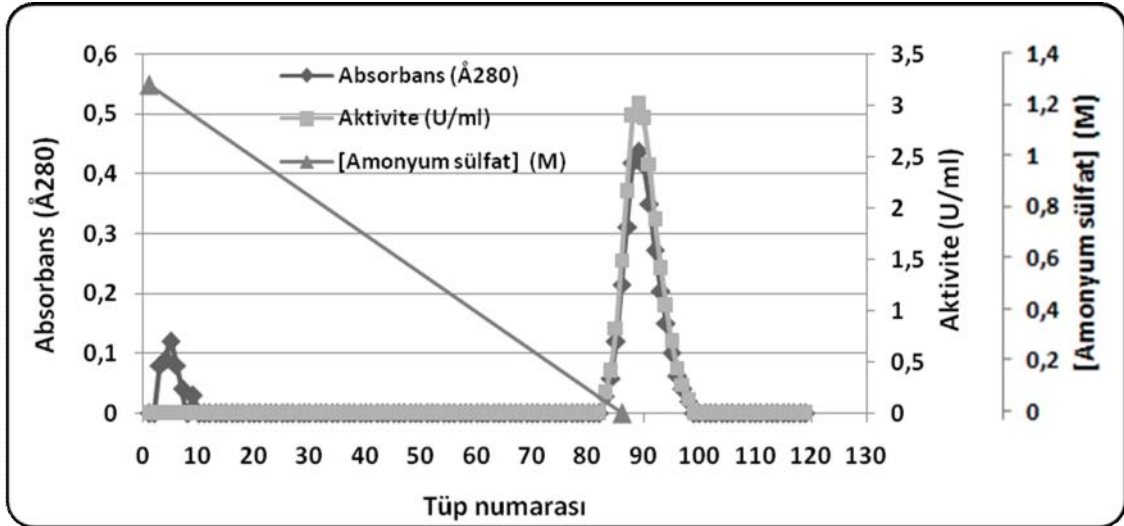
Hazırlanan Michaelis-Menten grafiğinden elde edilen veriler doğrultusunda; H99N GI'nın glukoz için K_m değeri $264,98 \pm 7,26$ mM ve V_{max} değeri ise $16,29 \pm 0,20$ $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein olarak hesaplandı (Şekil 26). Bu veriler doğrultusunda enzimin k_{cat} değeri 13,59 (1/sn), katalitik etkinliğini gösteren k_{cat}/K_m değeri 0,051 olarak hesaplandı.

3.4.8. H99D Glukoz İzomeraz

H99D glukoz izomerazı ısı bozunumu, iyon değişimi kolon kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi yöntemleriyle saflaştırıldı. Bu çalışmaya ait saflaştırma tablosu Tablo 15'de gösterilmektedir. Bu saflaştırma işlemi sonucunda enzim 3,51 kat saflaştırıldı. İyon değişimi kolon kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi saflaştırmalarına ait grafikler Şekil 27 ve 28'de gösterilmektedir.



Şekil 27. H99D GI'ya ait iyon değişimi kolon kromatografisi (Deney; 30 cm uzunluğunda ve 1,5 cm çapında bir kolon ile DEAE-Sepharose Fast Flow (Sigma) kolon malzemesi kullanılarak yapıldı. Deneyde tampon olarak; 0,5 mM CoCl_2 ve 5 mM MgSO_4 içeren 20 mM MOPS tamponu (pH:6,5) kullanıldı. Kolona akış hızı 1ml/dk olarak ayarlandı. 62–74 nolu tüpler arasında aktivite saptandı ve bu fraksiyonlardan 64–73 nolu fraksiyonlar alınarak birleştirildi).

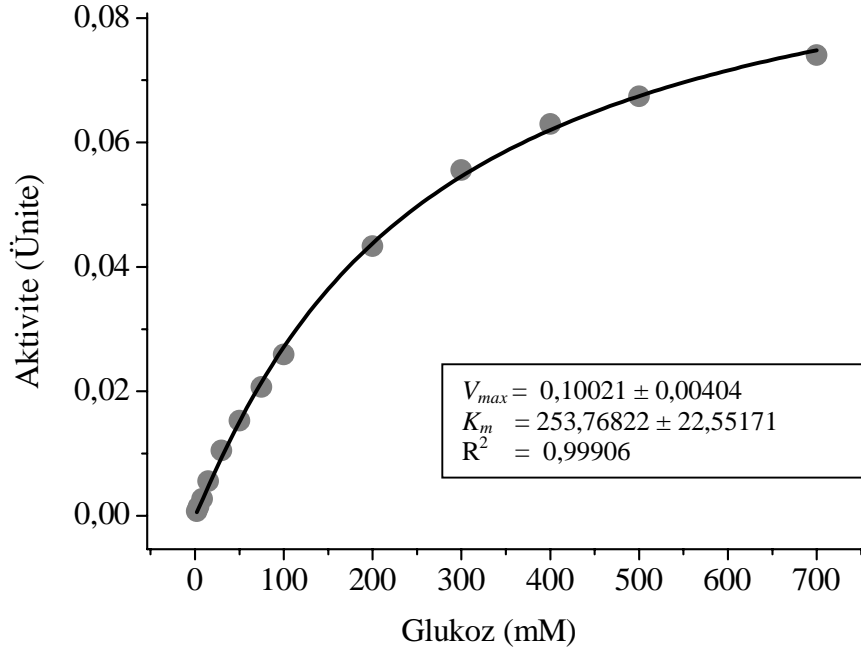


Şekil 28. H99D GI'ya ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi (Deney; 20 cm uzunluğunda ve 0,75 cm çapında bir kolon ile Phenyl sepharose 6 Fast Flow (Sigma) kolon malzemesi kullanılarak yapıldı. Deneyde tampon olarak; 0,5 mM CoCl_2 ve 5 mM MgSO_4 içeren 20 mM MOPS tamponu (pH:6,5) kullanıldı. Kolona akış hızı 0,5 ml/dk olarak ayarlandı. 83-98 nolu tüpler arasında aktivite saptandı ve bu fraksiyonlardan 84-95 nolu fraksiyonlar alınarak birleştirildi).

Tablo 15. H99D GI'ya ait saflaştırma tablosu

Saflaştırma basamağı	Hacim (ml)	[Protein] (mg/ml)	T.protein (mg)	T.aktivite (U)	S.aktivite (U/mg)	Verim	Saflaştırma katı
Hücre özütü	17,5	16,25	284,4	107	0,38	100,0	1,00
Isı bozunum	15,9	7,69	122,3	61	0,50	56,4	1,31
İyon değişimi (DEAE-S.)	32	1,37	43,8	52	1,19	48,4	3,14
Hidrofobik etkileşim	22,1	1,34	29,6	39	1,33	36,5	3,51

Hazırlanan Michaelis-Menten grafiğinden elde edilen veriler doğrultusunda; H99D GI'nın glukoz için K_m değeri $253,77 \pm 22,55$ mM ve V_{max} değeri ise $3,05 \pm 0,12$ $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein olarak hesaplandı (Şekil 29). Bu veriler doğrultusunda enzimin k_{cat} değeri 2,54 (1/sn), katalitik etkinliğini gösteren k_{cat}/K_m değeri 0,010 olarak hesaplandı.



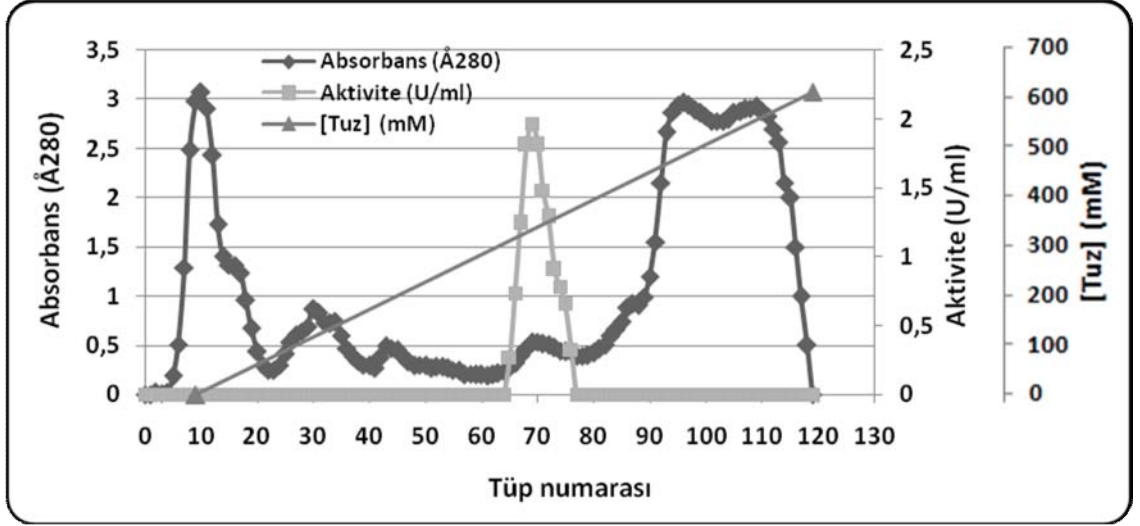
Şekil 29. H99D GI'ya ait Michaelis-Menten grafiği

3.4.9. H99E Glukoz İzomeraz

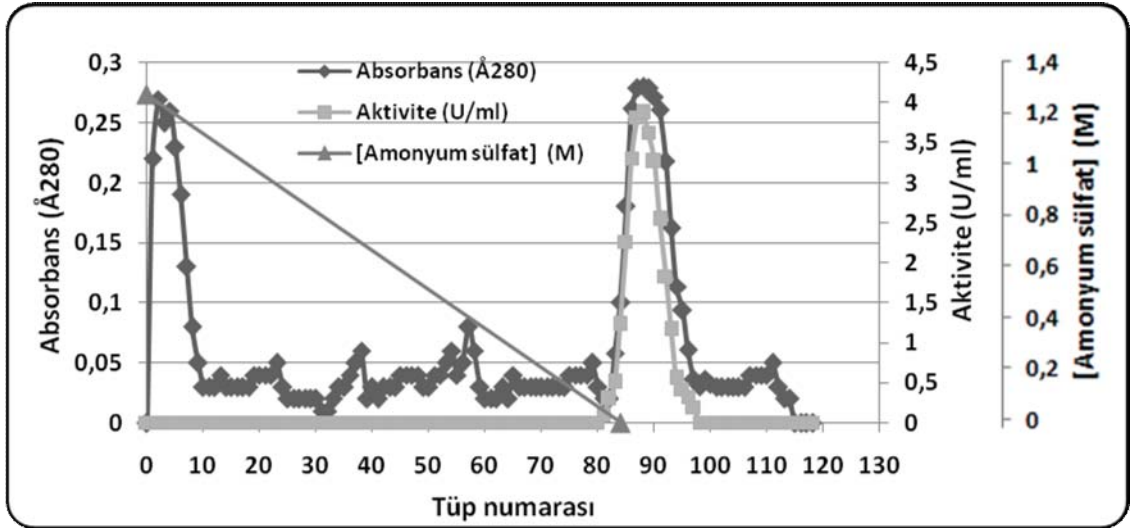
H99E glukoz izomerazı ısı bozunumu, iyon değişimi kolon kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi yöntemleriyle saflaştırıldı. Bu çalışmaya ait saflaştırma tablosu Tablo 16'da gösterilmektedir. Bu saflaştırma işlemi sonucunda enzim 3,32 kat saflaştırıldı. İyon değişimi kolon kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi saflaştırmalarına ait grafikler Şekil 30 ve 31'de gösterilmektedir.

Tablo 16. H99E GI'ya ait saflaştırma tablosu

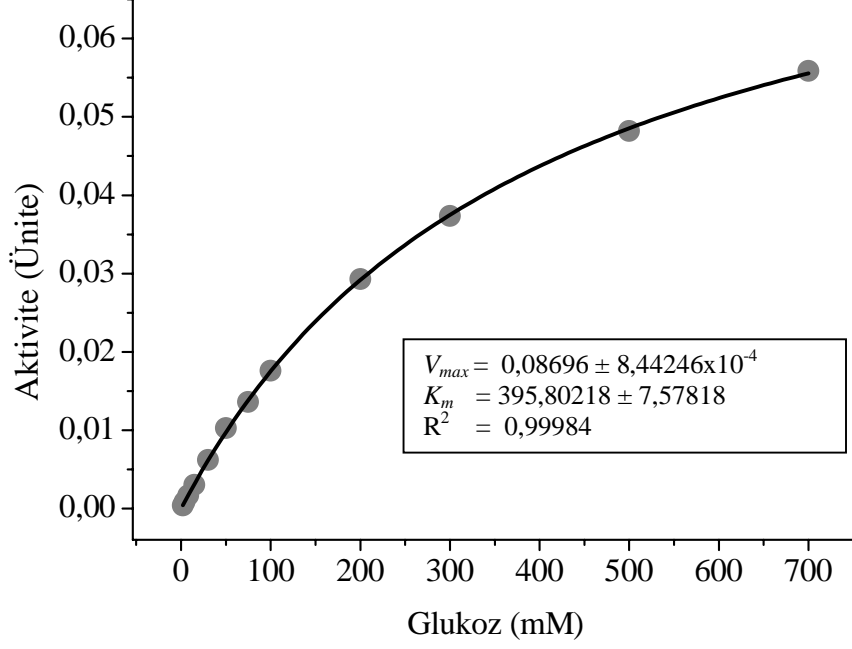
Saflaştırma basamağı	Hacim (ml)	[Protein] (mg/ml)	T.protein (mg)	T.aktivite (U)	S.aktivite (U/mg)	Verim	Saflaştırma katı
Hücre özütü	17,5	15,28	267,4	114	0,43	100,0	1,00
Isı bozunum	15,5	8,48	131,4	68	0,51	59,4	1,21
İyon değişimi (DEAE-S.)	27	1,53	41,2	52	1,27	45,9	2,98
Hidrofobik etkileşim	15,3	2,11	32,3	46	1,41	40,1	3,32



Şekil 30. H99E GI'ya ait iyon değişimi kolon kromatografisi (Deney; 30 cm uzunluğunda ve 1,5 cm çapında bir kolon ile DEAE-Sepharose Fast Flow (Sigma) kolon malzemesi kullanılarak yapıldı. Deneyde tampon olarak; 0,5 mM CoCl_2 ve 5 mM MgSO_4 içeren 20 mM MOPS tamponu (pH:6,5) kullanıldı. Kolona akış hızı 1ml/dk olarak ayarlandı. 65-76 nolu tüpler arasında aktivite saptandı ve bu fraksiyonlardan 66-74 nolu fraksiyonlar alınarak birleştirildi).



Şekil 31. H99E GI'ya ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi (Deney; 20 cm uzunluğunda ve 0,75 cm çapında bir kolon ile Phenyl sepharose 6 Fast Flow (Sigma) kolon malzemesi kullanılarak yapıldı. Deneyde tampon olarak; 0,5 mM CoCl_2 ve 5 mM MgSO_4 içeren 20 mM MOPS tamponu (pH:6,5) kullanıldı. Kolona akış hızı 0,5 ml/dk olarak ayarlandı. 83-93 nolu tüpler arasında aktivite saptandı ve bu fraksiyonlardan 84-92 nolu fraksiyonlar alınarak birleştirildi).



Şekil 32. H99E GI'ya ait Michaelis-Menten grafiği

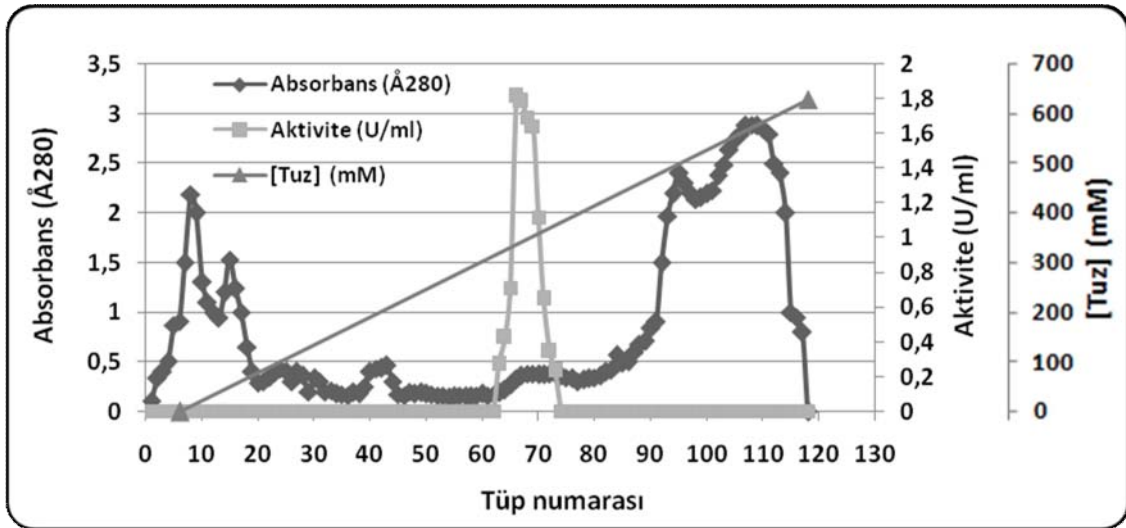
Hazırlanan Michaelis-Menten grafiğinden elde edilen veriler doğrultusunda; H99E GI'nın glukoz için K_m değeri $395,80 \pm 7,58$ mM ve V_{max} değeri ise $4,12 \pm 0,04$ $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein olarak hesaplandı (Şekil 32). Bu veriler doğrultusunda enzimin k_{cat} değeri 3,44 (1/sn), katalitik etkinliğini gösteren k_{cat}/K_m değeri 0,009 olarak hesaplandı.

3.4.10. H99L Glukoz İzomeraz

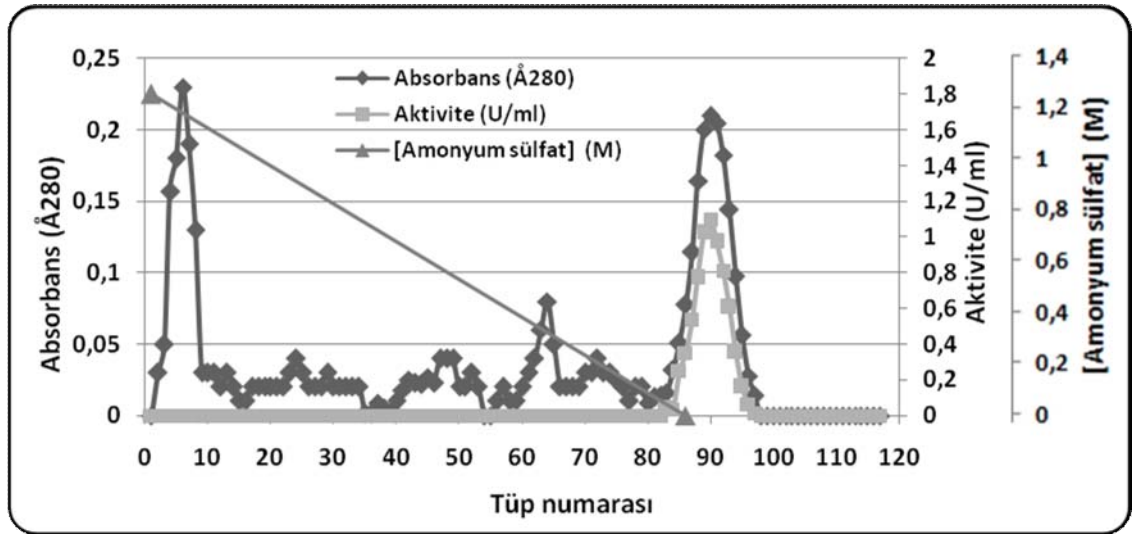
H99L glukoz izomerazı ısı bozunumu, iyon değişimi kolon kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi yöntemleriyle saflaştırıldı. Bu çalışmaya ait saflaştırma tablosu Tablo 17’de gösterilmektedir. Bu saflaştırma işlemi sonucunda enzim 2,56 kat saflaştırıldı. İyon değişimi kolon kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi saflaştırmalarına ait grafikler Şekil 33 ve 34’de gösterilmektedir.

Tablo 17. H99L GI’ya ait saflaştırma tablosu

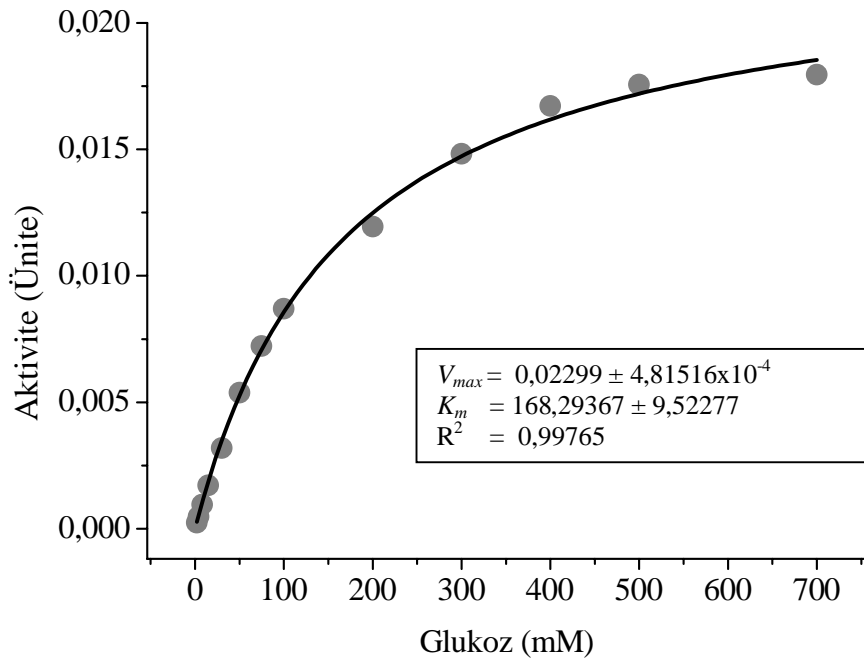
Saflaştırma basamağı	Hacim (ml)	[Protein] (mg/ml)	T.protein (mg)	T.aktivite (U)	S.aktivite (U/mg)	Verim	Saflaştırma katı
Hücre özütü	8,5	32,05	272,4	26	0,10	100,0	1,00
Isı bozunum	7	17,14	120,0	12	0,10	47,9	1,09
İyon değişimi (DEAE-S.)	33	1,97	65,0	10	0,15	38,2	1,60
Hidrofobik etkileşim	17	1,63	27,7	7	0,24	26,1	2,56



Şekil 33. H99L GI’ya ait iyon değişimi kolon kromatografisi (Deney; 30 cm uzunluğunda ve 1,5 cm çapında bir kolon ile DEAE-Sepharose Fast Flow (Sigma) kolon malzemesi kullanılarak yapıldı. Deneyde tampon olarak; 0,5 mM CoCl₂ ve 5 mM MgSO₄ içeren 20 mM MOPS tamponu (pH:6,5) kullanıldı. Kolona akış hızı 1ml/dk olarak ayarlandı. 63–73 nolu tüpler arasında aktivite saptandı ve bu fraksiyonlardan 63–73 nolu fraksiyonlar alınarak birleştirildi).



Şekil 34. H99L GI'ya ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi (Deney; 20 cm uzunluğunda ve 0,75 cm çapında bir kolon ile Phenyl sepharose 6 Fast Flow (Sigma) kolon malzemesi kullanılarak yapıldı. Deneyde tampon olarak; 0,5 mM CoCl_2 ve 5 mM MgSO_4 içeren 20 mM MOPS tamponu (pH:6,5) kullanıldı. Kolona akış hızı 0,5 ml/dk olarak ayarlandı. 84-95 nolu tüpler arasında aktivite saptandı ve bu fraksiyonlardan 85-94 nolu fraksiyonlar alınarak birleştirildi).

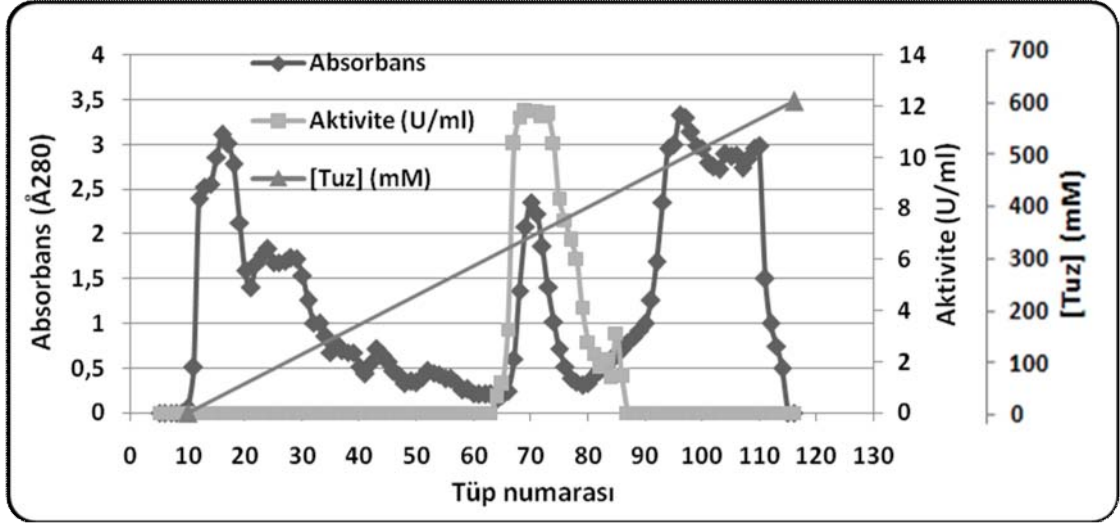


Şekil 35. H99L GI'ya ait Michaelis-Menten grafiği

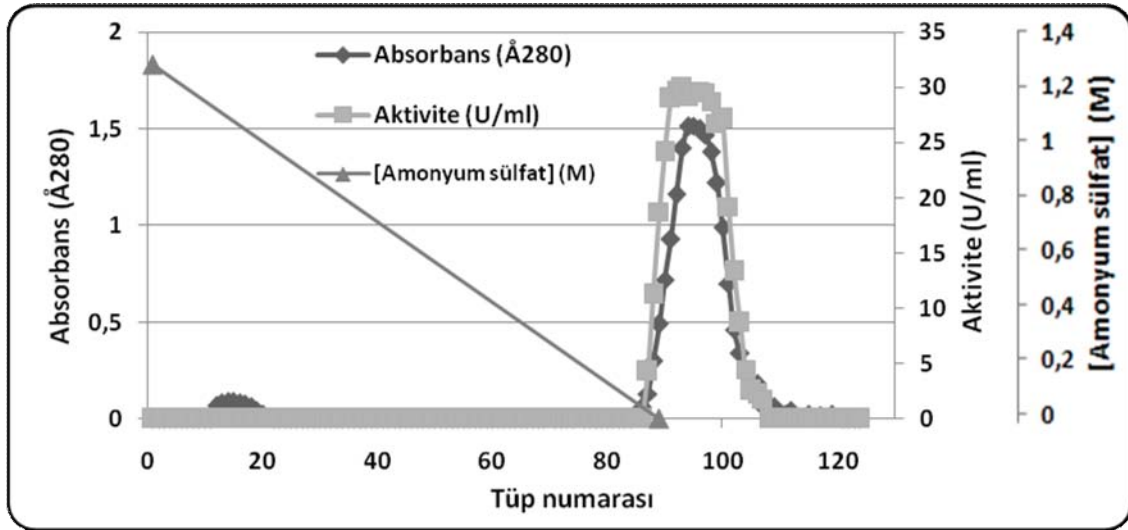
Hazırlanan Michaelis-Menten grafiğinden elde edilen veriler doğrultusunda; H99L GI'nın glukoz için K_m değeri $168,29 \pm 9,52$ mM ve V_{max} değeri ise $0,48 \pm 0,01$ $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein olarak hesaplandı (Şekil 35). Bu veriler doğrultusunda enzimin k_{cat} değeri 0,40 (1/sn), katalitik etkinliğini gösteren k_{cat}/K_m değeri 0,002 olarak hesaplandı.

3.4.11. W137F/V184S Glukoz İzomeraz

W137F/V184S glukoz izomerazı ısı bozunumu, iyon değişimi kolon kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi yöntemleriyle saflaştırıldı. Bu çalışmaya ait saflaştırma tablosu Tablo 18'de gösterilmektedir. Bu saflaştırma işlemi sonucunda enzim 4,84 kat saflaştırıldı. İyon değişimi kolon kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi saflaştırmalarına ait grafikler Şekil 36 ve 37'de gösterilmektedir.



Şekil 36. W137F/V184S GI'ya ait iyon değişimi kolon kromatografisi (Deney; 30 cm uzunluğunda ve 1,5 cm çapında bir kolon ile DEAE-Sepharose Fast Flow (Sigma) kolon malzemesi kullanılarak yapıldı. Deneyde tampon olarak; 0,5 mM CoCl_2 ve 5 mM MgSO_4 içeren 20 mM MOPS tamponu (pH:6,5) kullanıldı. Kolona akış hızı 1ml/dk olarak ayarlandı. 63–86 nolu tüpler arasında aktivite saptandı ve bu fraksiyonlardan 65–80 nolu fraksiyonlar alınarak birleştirildi).

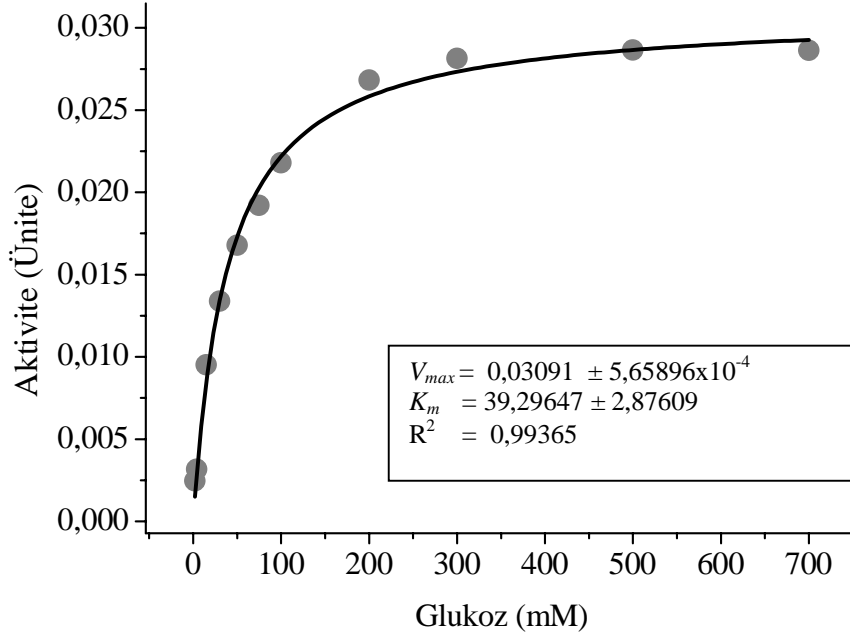


Şekil 37. W137F/V184S GI'ya ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi (Deney; 20 cm uzunluğunda ve 0,75 cm çapında bir kolon ile Phenyl sepharose 6 Fast Flow (Sigma) kolon malzemesi kullanılarak yapıldı. Deneyde tampon olarak; 0,5 mM CoCl_2 ve 5 mM MgSO_4 içeren 20 mM MOPS tamponu (pH:6,5) kullanıldı. Kolona akış hızı 0,5 ml/dk olarak ayarlandı. 87-104 nolu tüpler arasında aktivite saptandı ve bu fraksiyonlardan 85-97 nolu fraksiyonlar alınarak birleştirildi).

Tablo 18. W137F/V184S GI'ya ait saflaştırma tablosu

Saflaştırma basamağı	Hacim (ml)	[Protein] (mg/ml)	T.protein (mg)	T.aktivite (U)	S.aktivite (U/mg)	Verim	Saflaştırma katı
Hücre özütü	11,5	21,25	244,4	2957	12,10	100,0	1,00
Isı bozunum	9	7,75	69,8	1904	27,30	64,4	2,26
İyon değişimi (DEAE-S.)	48	1,00	48,0	1624	33,84	54,9	2,80
Hidrofobik etkileşim	36	0,62	22,3	1308	58,60	44,2	4,84

Hazırlanan Michaelis-Menten grafiğinden elde edilen veriler doğrultusunda; W137F/V184S GI'nın glukoz için K_m değeri $39,29 \pm 2,87$ mM ve V_{max} değeri ise $99,71 \pm 1,83$ $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein olarak hesaplandı (Şekil 38). Bu veriler doğrultusunda enzimin k_{cat} değeri 83,17 (1/sn), katalitik etkinliğini gösteren k_{cat}/K_m değeri 2,116 olarak hesaplandı.



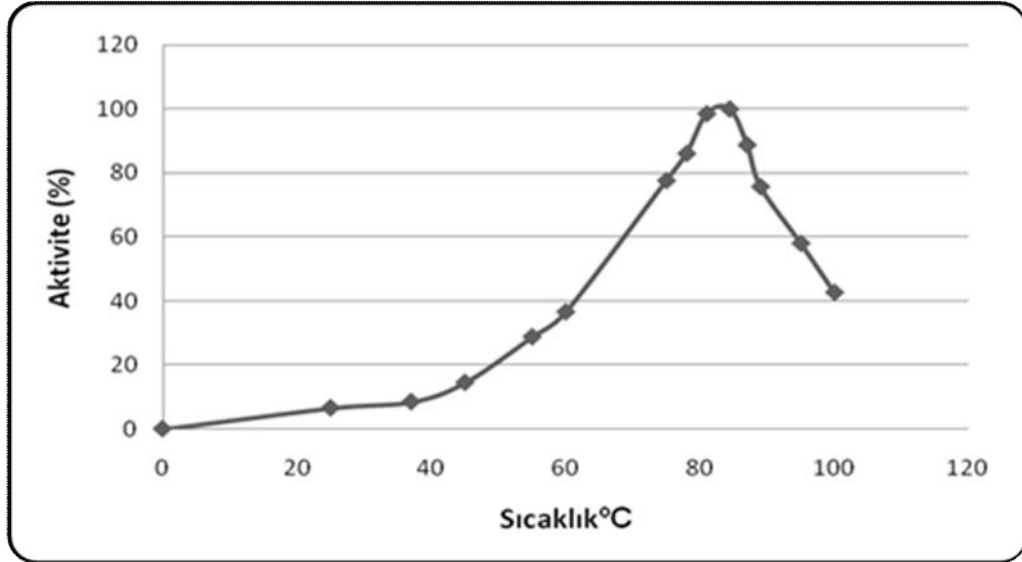
Şekil 38. W137F/V184S GI'ya ait Michaelis-Menten grafiği

3.5. AgoG2GI-yt, AgoG2GI-rek ve Mutant GI'lara Ait Diğer Karakterizasyon Çalışmaları

A.gonensis G2^T ve *E.coli* BL21/pETG2GI'den saflaştırılan GI ve mutant GI'lar ile yapılan çalışmalarda hemen hemen aynı aktivite elde edildiğinden sonuçlar ortak grafik ile gösterildi. Çalışmalar 3 kez tekrarlandı. Enzimlere ait kinetik veriler Bölüm 3.4'de belirtilmektedir.

3.5.1. Optimum Sıcaklık

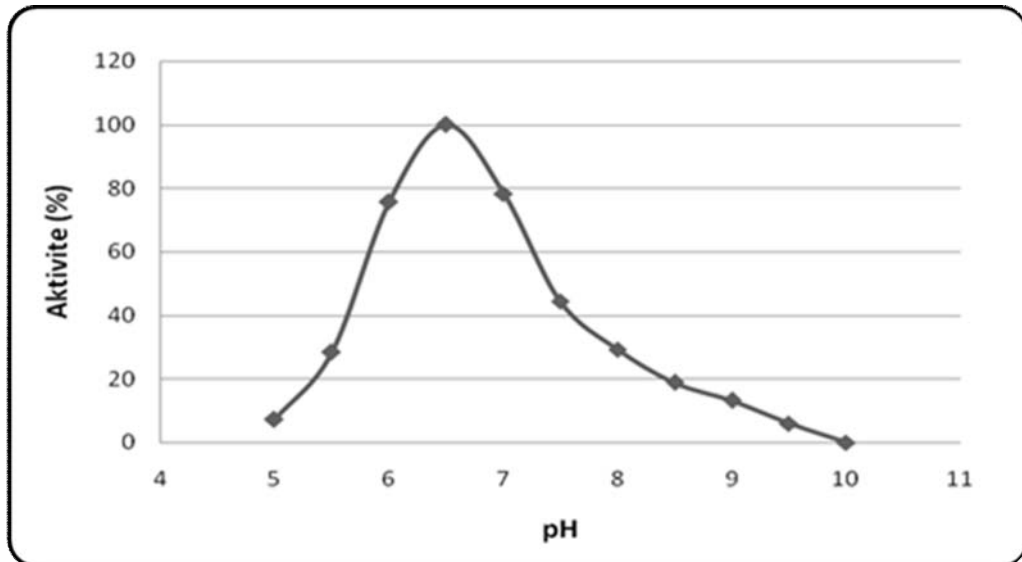
Optimum sıcaklık çalışmaları *A.gonensis* ve *E.coli* BL21/pETG2GI'den saflaştırılan GI enzimleri ile 25, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 78, 81, 85, 87, 89, 95 ve 100°C'lerde aktivite reaksiyonları yapılarak gerçekleştirildi. GI enziminin en yüksek aktiviteyi 85°C'de gösterdiği ve enzimin oldukça termofilik özellik gösterdiği belirlendi (Şekil 39).



Şekil 39. Sıcaklık- GI aktivite grafiği

3.5.2. Optimum pH

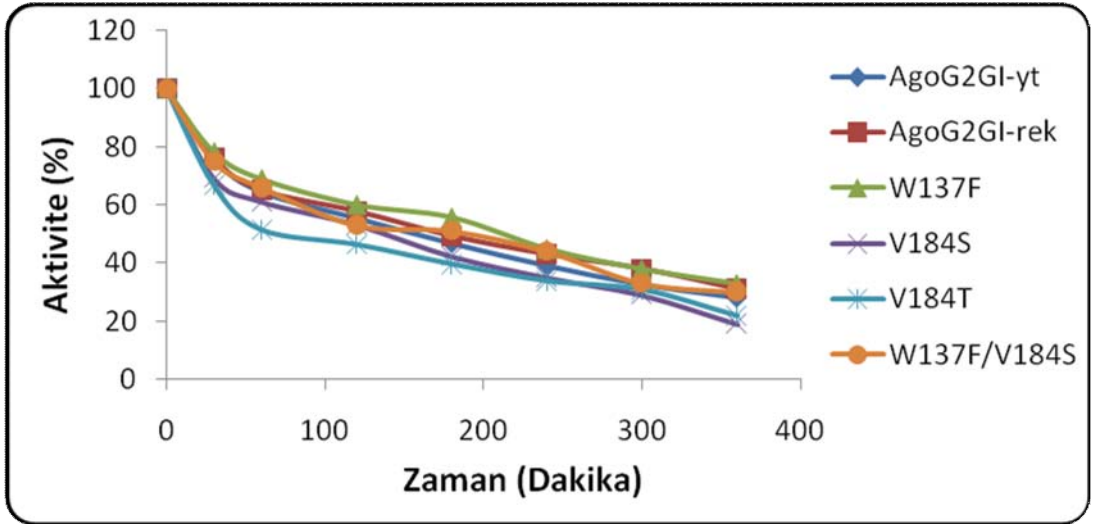
pH'nın GI aktivitesi üzerine etkisi pH 5–10 aralığındaki tamponlarda gerçekleştirilen bir seri reaksiyon ile incelendi. Elde edilen aktivite ölçümlerine göre pH aktivite grafiği oluşturuldu. Şekil 40'da da görüldüğü üzere GI aktivitesi en yüksek 6,5 pH'ya sahip tamponda gözlemlendi.



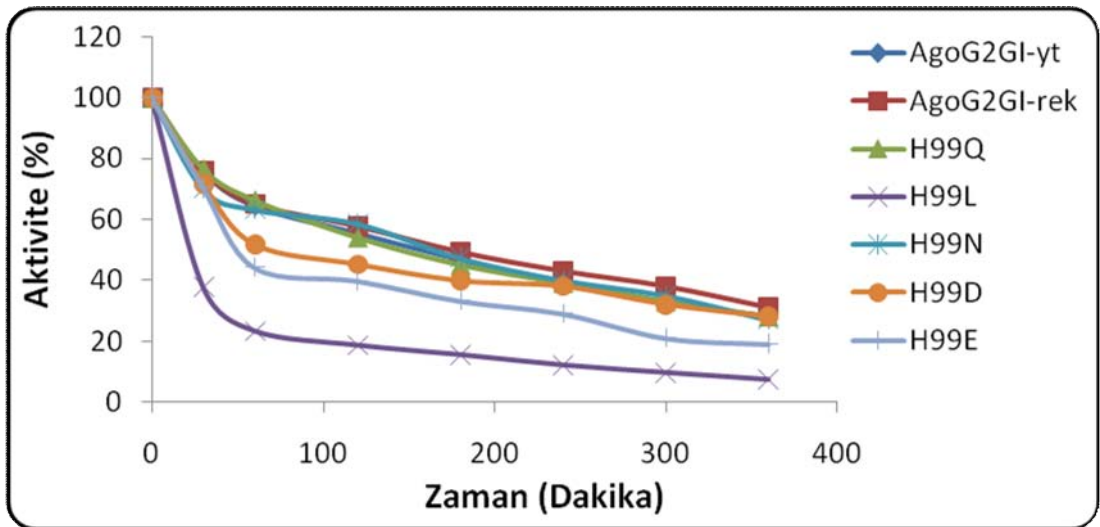
Şekil 40. pH- GI aktivite grafiği

3.6. Mutasyonların Isıl Kararlılığı Üzerine Etkisi

Saflaştırılan enzimler 85°C’de bekletildi, bu enzimlerle 0.dk’dan itibaren farklı zaman aralıklarında aktivite ölçümleri alındı ve alınan bu ölçümler değerlendirilerek bu sıcaklıkta enzimin kararlılığı belirlendi (Şekil 41, 42). Enzimlerin optimum çalışma sıcaklığı olan 85°C’lik uygulamalarda 3,5 saat sonunda enzim aktivitesinin yarıya düştüğü belirlendi. Şekil 41 ve 42’de de görüldüğü üzere, H99L dışında, yapılan mutasyonların yaban tip enzimin ısıl kararlılığı üzerine önemli bir etkisinin bulunmadığı tespit edildi.



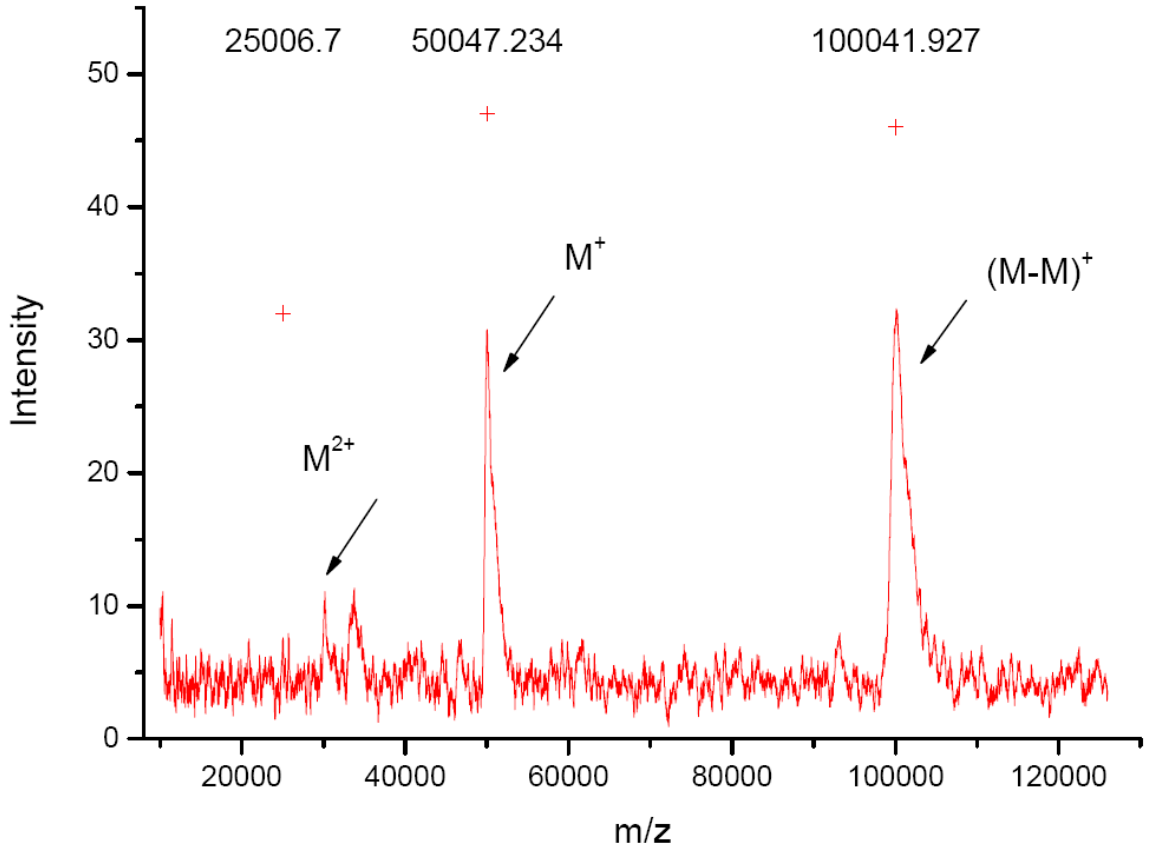
Şekil 41. W137F, V184S, V184T ve W137F/V184S mutasyonlarının enzimin ısıl kararlılığı üzerine etkisi



Şekil 42. H99E, H99D, H99Q, H99L ve H99N mutasyonlarının enzimin ısıl kararlılığı üzerine etkisi

3.7. Enzimin Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi

AgoG2GI-yt enziminin moleküler ağırlığı MALDI-TOF yöntemi ile belirlendi. Yapılan bu çalışmaya göre enzimin bir alt ünitesinin ağırlığı 50047 dalton olarak hesap edildi (Şekil 43). Literatürde yapılan incelemeler sonucunda; *AgoG2GI-yt* enziminin de 4 alt üiteden oluşan homotetramer bir yapıda olduğu düşünülmektedir. Bu durumda enzimin moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 200188 dalton civarı olmaktadır.



Şekil 43. *AgoG2GI-yt* enziminin moleküler ağırlığının MALDI-TOF yöntemi ile belirlenmesi

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada; Gönen kaplıcalarından izole edilen *A. gonensis* G2^T'a ait GI enzimini kodlayan genin klonlanmasına, enzimin biyokimyasal özelliklerinin ve kinetik parametrelerinin ortaya konulmasına ve bu parametrelerin bölge özgün mutasyonlar ile geliştirilmesine çalışılmıştır.

A. gonensis G2^T GI geninin 530 baz çiftlik bir kısmı daha önce yapılan çalışmalar ile belirlenmişti. Bu tez kapsamında öncelikle, genin tüm baz dizilimi açığa çıkarılmıştır. Sonrasında, *A. gonensis* G2^T GI'sı Genbank'taki diğer bakterilerin GI genleriyle amino asit dizimleri dikkate alınarak karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonuçlarına göre *A. gonensis* G2^T GI'sı amino asit dizimleri bakımından; *Bacillus stearothermophilus*'a %90, *Geobacillus thermodenitrificans* ve *Geobacillus kaustophilus*'a %89, *Bacillus halodurans*'a %79, *Bacillus clausii*'e %78, *Bacillus cereus*'a %76, *Bacillus subtilis*'e %76, *Bacillus megaterium*'a %77, *Bacillus coagulans*'a %75 ve daha birçok bakterinin GI genine de %70'in üzerinde benzerlik göstermektedir. Genel olarak bakıldığında GI'lar amino asit dizimlerine göre iki grup altında sınıflandırılırlar (Bhosale vd.,1996). GI'lar, enzimin N-terminal ucunda 40-50 amino asitlik bir bölgenin olup olmamasına göre 2 sınıfa ayrılmışlardır. Tip 1 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. *Escherichia coli*, *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*, ve *Thermotoga* spp türlerine ait GI'lar ise 440 amino asitten meydana gelmişlerdir ve Tip 2 GI'lar olarak sınıflandırılırlar (Hess vd.,1998). Genbank'ta yapılan bu karşılaştırmalar sonucunda, *A. gonensis* G2^T GI'sının Tip 2 GI'lara benzerlik gösterdiği görülmektedir. *A. gonensis* G2^T GI'sının 440 amino asitten oluşması da bu sonucu doğrulamaktadır.

Klonlama işlemlerinde gen ürününün kolay bir şekilde saflaştırılabilmesi için HisTag kuyruğu taşımaya karar verilmiştir. pET28a(+) ekspresyon vektörü incelendiğinde, gen ürününün amino veya karboksil ucunda HisTag kuyruğu olabilecek şekilde, vektöre klonlama yapabilmeyen mümkün olduğu görülmektedir. Gen, *NdeI* bölgesine klonlanırsa gen ürününün N terminal ucunda HisTag kuyruğu bulunur. Fakat gen dizimiz içerisinde 2 adet *NdeI* kesim bölgesi bulunması sebebiyle, bu bölgeyi kullanıp, N terminal ucuna HisTag kuyruğu eklemek mümkün değildir. Bu nedenle, gen ürününün C ucuna HisTag kuyruğu takılacak şekilde klonlanmasına karar verilmiştir. Bu doğrultuda; *A. gonensis* G2^T GI geni Xyla_Ex_F1 ve Xyla_Ex_R1 primerleri kullanılarak pET28a(+) ekspresyon vektörüne, C-terminalinde HisTag kuyruğu içerecek şekilde klonlanmış ve *E.coli* BL21(DE3) suşunda ekspres edilmiştir.

Ancak, bu hücreden izole edilen hücre özütünde yapılan GI aktivite çalışmalarında aktivitenin çok düşük olduğu gözlenmiştir. Şekil 5’de görüldüğü üzere HisTag kuyruğu bulduran enzim yüksek miktarda üretilmiş ve HisTag saflaştırma kiti kullanılarak başarılı bir şekilde saflaştırılmıştır. Bu sonuca göre ekspresyonda herhangi bir problem görünmemektedir. Bu durumda; proteinin karboksil ucuna taktığımız HisTag kuyruğunun proteinin aktivitesi üzerinde olumsuz bir etki yaptığı düşünülmektedir. Tip 2 glukoz izomerazının bir monomerinin 3 boyutlu yapısı incelenecek olursa; monomerin 8 sarmal ile çevrelenmiş birbirine paralel 8 β -levhadan ve diğer monomerlerle ilişkide bulunan uzamış bir C-terminal kuyruktan meydana geldiği görülmektedir. Buradaki C-terminal kuyruk monomerlerin bir araya gelmesinde rol oynamaktadır (Bhosale vd., 1996; Whitlow vd., 1991). Bu uca HisTag kuyruğu takmak monomerlerin bir araya gelmesini zorlaştırmış ve bunun sonucu olarak da aktivite kaybına sebep olmuş olabilir. Düşük aktivite elde edilmesi sebebiyle, enzimin vektör içerisine HisTag kuyruğu olmadan klonlanmasına karar verilmiş ve enzim Xyla_Ex_F1 ve Xyla_Ex_R2 primerleri kullanılarak, pET-28a(+) ekspresyon vektörüne klonlanmıştır. Klonlama sonrası elde edilen hücre özütünde yüksek GI aktivitesi gözlenmesi bir önceki klonlamadaki aktivite kaybına sebebin HisTag kuyruğu olduğunu desteklemektedir.

Her ne kadar *A. gonensis* G2^T GI’sı bir ekspresyon vektörüne klonlanarak mezofilik bir konakta aşırı miktarlarda üretilecek olsa da, enzim *A. gonensis*’den kolon kromatografisi yöntemiyle saflaştırılarak karakterize edilmiştir. Burada; rekombinant olarak üretilen enzimin, hücreden üretilen enzimle aynı biyokimyasal özelliklere ve aynı kinetik parametrelere sahip olup olmadığı ortaya koymak hedeflenmiştir. HisTag kuyruğunun enzimin biyokimyasal özelliklerine ne gibi bir etkisinin olacağı belirsizdir. *E.coli* BL21/pETG2GI sistemi ile üretilen AgoG2GI-rek enzimini kodlayan gen ile AgoG2GI-yt enzimini kodlayan gen bire bir aynı olmasına rağmen bu genlerin ekspresyonu farklı konaklarda ve farklı sistemler aracılığı ile gerçekleşmektedir. Özellikle enzimin aktif olan son halinin oluşmasında bu sistemlerin etkileri olabilir. Rekombinant olarak üretilen enzimin *A. gonensis*’te üretilen GI ile aynı özelliklere sahip olduğunun gösterilmesi bu açıdan önemlidir. Yapılan incelemeler sonucunda; AgoG2GI-yt ve AgoG2GI-rek enzimleri biyokimyasal özellikleri ve kinetik parametreleri açısından birbirinin aynı özellikleri göstermektedir.

AgoG2GI-rek ve mutant enzimleri mezofilik olan *E.coli* BL21(DE3) hücresinde üretilmiştir. Dolayısı ile bu konak hücreden elde edilen hücre özütünde vektörden çoğaltılan enzimimiz dışında diğer tüm proteinlerin, mezofilik karakterde olduklarından dolayı kısa süreli bir sıcak şoku uygulamasında, çok büyük bir bölümü denatüre olmaktadır. Termofilik karakterli enzimler ise bu durumdan etkilenmemektedir. Kuyruksuz GI enzimi içeren hücre özütüne, HisTag ile saflaştırma yapmayacağımızdan dolayı, daha fazla saflaştırma

sağlayabilmek için 15 dakika 80°C'lik bir ısı şoku uygulaması yapılarak kolon kromatografisi öncesi bir ön saflaştırma işlemi yapılmıştır. Yapılan sıcak şoku çalışmalarında, *A. gonensis* termofilik bir bakteri olmakla birlikte bütün proteinlerinin aynı ısı kararlılıkta olmaması sebebi ile proteinlerinin bir kısmının yüksek sıcaklıkla muamele edilmesi sonucu denatüre oldukları, fakat 80°C'de 15 dk'lık ısı uygulamasının diğer proteinlerin çoğunu denatüre ederken glukoz izomerazı çok az etkilediği belirlenmiştir. Bunun sonucu olarak orijinal enzimin saflaştırılmasında da ısı bozunumu yöntemini kullanılmıştır. Enzimlere ait saflaştırma tablolarından da görüleceği üzere ısı bozunumu yöntemi ile hücre özütlerindeki GI'ya ait spesifik aktivite belirgin bir oranda arttırılmıştır.

Karakterizasyon çalışmaları enzim aktivasyonu üzerinden yapılmaktadır. Bu çalışmada enzim aktivasyonu, reaksiyon sonucu açığa çıkan fruktoz miktarına göre belirlenmektedir. Dolayısı ile glukoz izomeraz enziminin karakterizasyonunun yapılabilmesi için reaksiyon sonrasında açığa çıkan fruktoz miktarının belirlenmesi gerekmektedir.

Oluşan fruktoz miktarı Dische ve arkadaşlarının (1951) geliştirdikleri sistein-karbozol 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 belirlenebilmektedir. Reaksiyon sonrasında özellikle analiz yapılacak örnek içerisinde yüksek miktarda fruktoz oluşmaktadır. Bu durum ise özellikle belli bir yoğunluktan sonra spektrofotometrede bulunması durumunda yüksek miktarlarda renkli ürün gerçek değerinin altında ölçüm alınmasına sebep olmaktadır. Lambert-Beer Kanunu olarak bilinen bu durum sonucunda artan fruktoz içeriğine karşı belli bir noktadan sonra alınan ölçümlerin gerçeği yansıtmadığı saptanmıştır. Bu nedenle enzim seyreltilmeden yapılan deneylerden elde edilen sonuçlar aldatıcı olmaktadır. Reaksiyon öncesinde enzimin gerekli miktarlarda seyreltilmesi gerekliliği anlaşılmıştır.

Yapılan kinetik incelemelerde, *A. gonensis* G2^T GI'nın glukoz için düşük K_m değerine sahip olduğu, dolayısı ile enzimin glukozla olan ilgisinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Tablo 19'da da görüldüğü üzere, *A. gonensis* G2^T GI'sının K_m değerinin birçok mikroorganizmanın K_m değerine göre düşük olduğu görülmektedir. Genel olarak bakıldığında; *A. gonensis* G2^T GI'sının K_m değeri amino asit olarak benzerlik gösterdiği türlere ait GI'ların K_m değerine yakın olduğu görülmektedir.

Tablo 19. Çeşitli mikroorganizmalara ait GI'nın glukoz için K_m değerleri

Mikroorganizma	K_m (mM)	Kaynaklar
<i>Streptomyces flavogriseus</i>	0,24	(Chen ve Anderson, 1979)
<i>Streptomyces albus</i>	86	(Sanchez ve Smiley, 1975)
<i>Arthrobacter sp.</i>	86	(Smith vd., 1991)
<i>Bacillus coagulans</i>	90	(Danno, 1970)
<i>Thermoanaerobacterium saccharolyticum</i>	120	(Liu vd., 1996)
<i>Clostridium thermosulfurogenes</i>	130	(Lee vd, 1990)
<i>Bacillus sp.</i>	142	(Chauthaiwale ve Rao,1994)
<i>Anoxybacillus gonensis</i> G2 ^T	146,08	Bu çalışma
<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	250	(Suekane vd., 1978)
<i>Actinoplanes missouriensis</i>	290	(Jenkins vd., 1992)
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	298	(Kawai vd., 1994)
<i>Streptomyces sp.</i>	400	(Inyang vd., 1995)
<i>Lactobacillus brevis</i>	920	(Yamanaka, 1975)

A. gonensis G2^T GI glukoz için oldukça yüksek bir k_{cat} değerine sahiptir (Tablo 20). Genel olarak bakıldığında; *A. gonensis* G2^T GI'sının k_{cat} değeri amino asit olarak benzerlik gösterdiği türlere ait GI'ların k_{cat} değerine yakın olduğu görünmektedir. *A. gonensis* G2^T GI'sı herhangi bir mutasyon olmaksızın yaban formda, *Bacillus* türleri haricindeki tüm GI'lardan daha yüksek bir turnover sayısına sahiptir.

Tablo 20. Çeşitli mikroorganizmalara ait GI'nın glukoz için k_{cat} değerleri

Mikroorganizma	k_{cat} (1/sn)	Kaynaklar
<i>Bacillus sp.</i>	50	(Chauthaiwale ve Rao,1994)
<i>Anoxybacillus gonensis</i> G2 ^T	33,79	Bu çalışma
<i>Streptomyces chibaensis</i>	30,72	(Joo vd., 2001)
<i>Actinoplanes missouriensis</i>	25,3	(Karimaki vd., 2004)
<i>Arthrobacter sp.</i>	19,9	(Smith vd., 1991)
<i>Streptomyces rubiginosus</i>	4,53	(Cha ve Batt, 1998)
<i>Thermus Aquaticus</i>	3,23	(Lehmbacher vd., 1990)
<i>Thermus thermophilus</i>	0,833	(Lonn vd., 2002)

GI'nin optimum sıcaklığı, genel olarak çeşitli organizmalarda 60°C ile 80°C arasında değişiklik göstermektedir (Bhosale vd., 1996). *A. gonensis* G2^T GI'sı optimum 85°C'de aktivite gösterdiği bulunmuştur. Benzer şekilde *Streptomyces* sp. (Inyang vd., 1995) ve *Bacillus* sp. (Chauthaiwale vd., 1994) türlerine ait GI'nin optimum çalışma sıcaklıklarının da 85°C olduğu gösterilmiştir. *Thermotoga neapolitana* GI'sının ise optimum 95°C'de çalıştığı gösterilmiştir (Hess vd., 1998). Bu GI'lar haricindeki diğer GI'lar genel olarak optimum 60°C ile 80°C arasında aktivite göstermektedirler. Bu verilere dayanılarak, 85°C'lik optimum çalışma sıcaklığı ile *A. gonensis* G2^T GI'sının oldukça termofilik bir enzim olduğu söylenebilir.

Thermoanaerobacterium sp. (Liu vd., 1996), *Actinoplanes missouriensis* (Van Tillbeurgh vd., 1992), *Lactobacillus brevis* (Yamanaka, 1975) ve *Thermus aquaticus* (Lehmbacher, 1990) GI'ları haricindeki diğer GI'ların optimum pH değeri 6,5'ten yukarıdır. *A. gonensis* G2^T GI'sının optimum pH değeri 6,5 olarak bulunmuştur. Bu özelliği ile enzim, özellikle endüstriyel olarak arzu edilen asidik pH değerlerine, birçok mikroorganizmanın GI'sına göre, daha yakındır.

Endüstriyel alanda özellikle gıda sektöründe duyulan talep sonucunda; daha çok verimli, daha uzun bir yarılanma ömrüne sahip, daha yüksek sıcaklık ve daha düşük pH değerlerinde çalışabilen glukoz izomerazlara ihtiyaç duyulmuş ve bu ihtiyaçlardan dolayı bugüne kadar birçok termofilik ve asidik karakterli bakterinin glukoz izomeraz geni çalışılmıştır. Halen daha, endüstriyel açıdan daha çok arzu edilen özellikli glukoz izomerazlara ihtiyaç bulunmaktadır. Yukarıda yapılan araştırmalar ve karşılaştırmalar sonucu *Anoxybacillus gonensis* G2^T GI'sının hakkında tespit ettiğimiz özellikler, enzimin endüstride kullanılmakta olan enzimler ile rekabet edebilir olduğunu, hatta bazı yönleri ile bilinenlerden daha da üstün olduğunu göstermektedir.

Bugün günümüzde kullanılan endüstriyel GI'lardan büyük bir çoğunluğu mutasyonlarla geliştirilmişlerdir. *Anoxybacillus gonensis* G2^T GI'sının da endüstriyel olarak daha çok arzu edilen bir enzim haline getirebilmek için mutasyonlarla geliştirilmesine karar verilmiştir. Genel olarak 2 temel unsur üzerinde durulmuştur. Bunlardan birincisi enzimin katalitik etkinliğini arttırmak yani, daha düşük K_m değerine sahip daha yüksek V_{max} ve k_{cat} değerine sahip bir enzim oluşturmak, ikincisi ise ısı kararlılığı yüksek bir enzim meydana getirmektir. Enzimde mutasyon yapılacak noktaları seçmek için enzimin 3 boyutlu yapısının ve reaksiyon mekanizmasının iyi biliniyor olması gereklidir. Dolayısı ile bu çalışmalarını yapabilmek X-Ray kristallografisi yöntemleri ile mümkündür. Birimizde bu imkânlar bulunmadığından dolayı mutasyonların seçimi literatürde mevcut olan mutasyonlar göz önünde bulundurularak yapılmıştır. Hedeflenen özellikleri sağlayan ve *Anoxybacillus gonensis* G2^T GI'sında mevcut

olan 3 nokta belirlenmiştir. Bunlar 99. amino asit olan histidin amino asidi, 137. amino asit triptofan amino asidi ve 184. amino asit valin amino asitleridir. Bu amino asitlerin aktif bölgede olduğunun bir kanıtı da oldukça korunumlu olmalarıdır. Tip 2 glukoz izomerazlar kendi aralarında birbirlerine amino asit dizilimleri açısından büyük benzerlikler göstermelerine rağmen Tip1 glukoz izomerazların amino asit dizilimleri hem birbirlerine hemde Tip 2 glukoz izomerazlara benzerlik göstermez. Buna rağmen her iki tip glukoz izomerazda da var olan oldukça korunmuş bölgeler bulunur. Bu bölgelerin enzimin aktif bölgesinde rol oynadıkları düşünülebilir. Clustal W programı ile yapılan karşılaştırmalar sonucunda hedeflenen bu 3 amino asidin her iki tip GI'da da bulunan korunumlu bir bölge içerisinde olduğu belirlenmiştir (Şekil 44). Bu ön incelemeler sonrasında, aktif bölgede olduğu tahmin edilen H99E, H99D, H99Q, H99L, H99N, W137F, V184T, V184S ve W137F/V184S mutasyonları ile enzimin biyokimyasal özelliklerinin geliştirilmesine çalışılmıştır. Bu mutasyonlar ile genel olarak enzimi K_m değerinde azalma, V_{max} değerinde bir artış ve ısı kararlılığında ise bir yükselme hedeflenmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 21'de gösterilmektedir.

	H99	W137	V184	
Tip 2 GI	<i>Anoxybacillus gonensis</i> G2T	--FCFHDVD---	LLWNTAN---	ENYVFWGG--
	<i>Bacillus megaterium</i>	--FAFHDRD---	LLWNTAN---	ENYVFWGG--
	<i>Bacillus subtilis</i>	--FAFHDRD---	LLWNTAN---	ENYVFWGG--
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	--FCFHDVD---	LLWNTAN---	ENYVFWGG--
	<i>Bacillus halodurans</i>	--FCFHDVD---	LLWNTAN---	ENYVFWGG--
	<i>Bacillus licheniformis</i>	--FCFHDVD---	LLWNTAN---	ENYVFWGG--
	<i>Thermotoga maritima</i>	--FCFHDRD---	LLWGTAN---	EGYVFWGG--
	<i>Bifidobacterium longum</i>	--FCFHDRD---	LLWNTSS---	ENYVFWGG--
	<i>Pirellula</i> sp.	--YAWHDRD---	LLWGTAN---	ENYVFWGG--
	<i>Xanthomonas axonopodis</i>	--YCFHDID---	LLWGTAN---	ENYVFWGG--
	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	--FTFHDVD---	LLWGTAN---	ENYVFWQN--
Tip 1 GI	<i>Thermoanaerobacter yonsei</i>	--FCFHDRD---	VLWGTAN---	QNYVFWGG--
	<i>Thermoanaerobacterium</i>	--FCFHDRD---	VLWGTAN---	ENYVFWGG--
	<i>Oceanobacillus iheyensis</i>	--FCFHDVD---	LLWNTVN---	ENYVFWGG--
	<i>Lactococcus lactis</i>	--YCFHDID---	LLWNTAN---	ENYVFWGG--
	<i>Enterococcus faecalis</i>	--FCFHDID---	LLWNTAN---	ENYVFWGG--
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	--YCFHDTD---	LLWGTAN---	ENYVFWGG--
	<i>Pseudomonas syringae</i>	--YSFHDTD---	LLWGTAN---	ANYVLWGG--
	<i>A. pleuropneumonia</i>	--YCFHDVD---	LLWGTAN---	SNYVLWGG--
	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	--YCFHDVD---	LLWGTAN---	ENYVFWGG--

Şekil 44. Tip 1 ve Tip 2 glukoz izomerazlarda aktif bölgede olduğu düşünülen korunmuş amino asitler

Tablo 21. Yaban tip ve mutant enzimlerin kinetik parametreler açısından karşılaştırılmaları

Glukoz İzomeraz	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol/dk/}$ mg protein)	k_{cat} (1/sn)	Katalitik etkinlik (k_{cat}/K_m)
AgoG2GI-yt	146,08 \pm 9,50	43,72 \pm 1,01	36,47	0,250
AgoG2GI-rek	138,37 \pm 7,63	40,51 \pm 0,81	33,79	0,244
W137F	64,02 \pm 2,10	46,07 \pm 0,42	38,42	0,600
V184T	247,69 \pm 14,83	59,08 \pm 1,51	49,28	0,199
V184S	243,94 \pm 13,52	49,82 \pm 1,17	41,56	0,170
H99Q	167,50 \pm 4,08	8,24 \pm 0,07	6,87	0,041
H99N	264,98 \pm 7,26	16,29 \pm 0,20	13,59	0,051
H99D	253,77 \pm 22,55	3,05 \pm 0,12	2,54	0,010
H99E	395,80 \pm 7,58	4,12 \pm 0,04	3,44	0,009
H99L	168,29 \pm 9,52	0,48 \pm 0,01	0,40	0,002
W137F/ V184S	39,29 \pm 2,87	99,71 \pm 1,83	83,17	2,116

Clostridium thermosulfurogenes GI'sında yapılan X-ray kristallografi çalışmaları sonucunda enzimin aktif bölgesinde substrat bağlanma bölgesi içerisinde W139, V186 ve V186 amino asitleri bulunmaktadır. Bu bölgede yapılan W139F, V186S ve V186T mutasyonları ile enzimin katalitik etkinliğinde bir artış elde edilmiştir. Yaptığımız incelemeler sonucunda 139. sıradaki triptofan amino asidi bizim dizimizde 137. sıradaki amino aside denk gelmektedir. Yapmış olduğumuz W137F mutasyonu ile enzimimizin K_m 'sinde önemli bir düşüşe V_{max} 'sında küçük bir artışa yol açarak enzimin katalitik etkinliğinde bir artışa neden olduk. Enzimin mutasyonlar ile özelliklerinin geliştirilmesi açısından, W137F mutasyonu başarılı sonuç vermiştir. Triptofan fenilalanine göre daha hidrofobik bir yan zincire sahiptir. Hidrofobiklikte azalma böyle bir sonuca neden olmuştur. Ayrıca fenilalanin triptofana göre daha küçük bir yan zincire sahiptir. W137F mutasyonu substrat reaksiyon mekanizmasında bir sıkıntı oluşturmadığı gibi substrata bağlanma bölgesini genişleterek enzimin substrat ile daha kolay bir şekilde kompleks oluşturmasına izin vermektedir. Bu durumda da enzimin katalitik etkinliği artmaktadır. 184 nolu amino asit olan valin polar ve yüksüz karakterlerde olan treonin ve serin amino asitlerine değiştirilmiştir. Burada amaç substrat enzim kompleksi oluşumunda substrata proton sağlayabilecek yan zincirleri substrat bağlanma bölgesine ilave

edilmesidir. Yapılan V184S ve V184T mutasyonları neticesinde enzimin K_m ve V_{max} 'sında artış meydana gelmiştir. Yani enzim daha hızlı çalışır hale gelmiştir fakat düşük substrat konsantrasyonlarında çalışabilme özelliğini kaybetmiştir. Tablo 21 incelenecek olursa bu mutasyonlar tek başlarına enzimin katalitik etkinliğini (k_{cat}/K_m) kötü yönde etkilemişlerdir.

Yine *Clostridium thermosulfurogenes* GI'sında yapılan mutasyon ile W139F/V186S ve W139F/V186T mutasyonları ile enzim katalitik etkinliği sırasıyla 2 kat ve 5 kat olacak şekilde artırılmıştır (Bhosale vd.,1996; Meng vd.,1991). Bizde aynı şekilde, *A.gonensis* G2^T GI'sı üzerinde yapmış olduğumuz W139F/V186T mutasyonu ile enzimin katalitik etkinliğini yaklaşık 8,6 kat arttırdık. Bu mutasyon ile aktif bölgede bulunan substrat bağlanma cebinde 2 mutasyon yaparak hem bu cebin hacmi arttırılmış (W139F) hem de substrata proton sağlayacak yan zincir cebe ilave edilmiştir (V184S).

Chanyong Lee ve arkadaşları *Clostridium thermosulfurogenes* GI'nın 101. amino asitinde bulunan histidin üzerinde mutasyonlar yaparak bu amino asitin enzimin aktif bölgesinde bulunduğunu göstermişlerdir. Yaptığımız incelemeler sonucunda 101. sıradaki histidin amino asidinin bizim dizimizde 99. sıradaki amino aside denk geldiği belirlendi. Bu noktada yapmış olduğumuz H99E, H99D, H99Q, H99L ve H99N mutasyonları ile enzimin özelliklerini geliştirmeye çalıştık. Bu mutasyonlarla pozitif yüklü bir amino asit olan histidin; negatif yüklü aspartik asit (H99D) ve glutamik asite (H99E), hidrofilik özellikli asparagine (H99N) ve glutamine (H99Q) ve hidrofobik özellikli lösine (H99L) dönüştürüldü. Pozitif yükün negatif yüke değişimi enzimin katalitik etkinliğinde gerilemeye sebep olmuştur. H99D ve H99E mutasyonları ile enzimin K_m değeri artmış V_{max} değeri ise azalmıştır. Aynı şekilde pozitif yüklü amino asitin hidrobik özellikli amino asite dönüşümü de özellikle V_{max} değerini çok düşürmüştür. Pozitif yüklü amino asitin hidrofilik karakterli bir amino aside dönüşümü ise daha az etkili olmuştur. Sonuç olarak bu bölgede yapılan tüm mutasyonlar enzimin K_m 'sinde artışa V_{max} 'sında ise düşüşe neden olmuştur. Bu sonuçlar 99. amino asit histidinin enzimin aktif bölgede olduğunun bir göstergesidir.

Glukozun fruktoza dönüşümü iki alternatif mekanizma ile açıklanmaya çalışılmıştır. Bunlardan birincisinde histidin amino asiti bir baz görevi oynayarak substrattan proton alır ve reaksiyon başlar. Diğerinde ise histidin substrata hidrojen bağı sağlayarak halka açılması reaksiyonunu başlatır (Bhosale vd.,1996). Dikkat edilecek olursa iki mekanizmada da histidinin proton alabilme ve hidrojen bağı yapabilme özelliği kullanılmaktadır. Asparajin ve glutamine bakıldığında her ne kadar yüksüz amino asit olsalar da, hidrofilik karakterlerinden dolayı ve taşımış oldukları yan gruplardan dolayı histidine benzer karakterde amino asit oldukları görünmektedir. Bu amino asitler, enzimin çalışma mekanizmasında histidinin yapmış olduğu görevi belli ölçülerde yapabilirler. Oysaki hidrofilik karakter taşıyan lösinin

bu mekanizmalar için uygun bir amino asit olmadığı görülmektedir. Dolayısı ile enzimin K_m 'sinde artış, V_{max} 'sında ise çok büyük bir azalış görülmektedir. Aspartik asit ve glutamik asit her ne kadar hidrojen bağı oluşturabilme ve proton alıp verme yeteneğine sahip özellikte olsalar da pozitif yüklü histidin ile ters karakterli amino asitlerdir. Sahip oldukları ters yük substrata olan ilgiyi düşürmektedir. Burada en şiddetli ters etki hiçbir hidrofilik karakter taşımayan ve GI'nın olası mekanizmalarına uymayan lösün ile elde edilmiştir.

Yapılan mutasyonların ısıl kararlılığı üzerine olan etkisi de araştırılmıştır. Elde edilen verilerden de görüleceği üzere H99L mutasyonu enzimin ısıl kararlılığını olumsuz yönde değiştirmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu doktora tezi kapsamında; ilk aşamada *Anoxybacillus gonensis* glukoz izomeraz geninin belirlenmemiş olan kısmının baz dizilimi klonlanarak ortaya çıkarıldı, böylelikle enzimin tüm baz dizilimi belirlendi. Enzimi kodlayan gen pET28a(+) ekspresyon vektörüne klonlanarak *E.coli* BL21(DE3) suşunda aşırı miktarlarda üretildi ve bu mikroorganizmadan izole edilip kolon kromatografisi yöntemiyle saflaştırıldı, daha önce imkânsızlıklar nedeniyle tamamlanamayan biyokimyasal çalışmalar bitirilerek enzimin karakterizasyonu tamamlandı. Elde edilen verilere göre *Anoxybacillus gonensis* GI'sı optimum 85°C'de ve 6,5 pH'da çalışan oldukça termofilik bir enzimdir. Enzimin K_m 'si $146,08 \pm 9,50$ mM V_{max} 'ı ise $43,72 \pm 1,01$ $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein olarak bulundu. Bu veriler doğrultusunda enzimin k_{cat} değeri 145,88 (1/sn), katalitik etkinliğini gösteren k_{cat}/K_m değeri 0,999 olarak hesaplandı. Klonlanan enzimin K_m 'si $138,37 \pm 7,63$ mM ve V_{max} değeri ise $40,51 \pm 0,81$ $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein olarak hesaplandı (Şekil 11). Bu veriler doğrultusunda enzimin k_{cat} değeri 135,15 (1/sn), katalitik etkinliğini gösteren k_{cat}/K_m değeri 0,977 olarak hesaplandı.

Çalışmanın daha sonraki kısmında ise aktif bölgede olduğu tahmin edilen H99E, H99D, H99Q, H99L, H99N, W137F, V184T ve V184S mutasyonları ile enzimin biyokimyasal özelliklerinin geliştirilmesine çalışıldı. Saflaştırılan enzimler mutant enzimlerin kinetik parametreleri incelendi. Bu çalışmalar sonucunda W137F mutasyonu ile enzimin K_m değerinde azalma sağlandı. Bu yönü ile daha iyi özellikli bir enzim üretme amacıyla başarıya ulaşıldı. Özellikle H99 ile ilgili mutasyonlar enzimin özelliklerini kötü yönde etkiledi. Bu aşamada, W137F mutasyonu ile elde edilen GI'nın karakterizasyonun yapılarak enzimin bazı biyokimyasal parametreleri (optimum pH, optimum sıcaklık ve ısıl kararlılığı), yaban tip GI'nınki ile karşılaştırıldı. Böylelikle enzimin özelliklerinin; endüstriyel uygulamalar için daha uygun hale getirilip getirilmediği irdelendi.

Clostridium thermosulfurogenes GI'sında yapılan mutasyon ile W139F/V186S ve W139F/V186T mutasyonları ile enzim katalitik etkinliği sırasıyla 2 kat ve 5 kat olacak şekilde arttırılmıştır. Bu durum göz önüne alındığında W137F/V184T ikili mutasyonunun da yapılması gerekmektedir. Mutasyonların birlikte olan etkileri araştırılmalıdır. Ayrıca 99. amino asit histidinin aktif bölgede olduğu bellidir. Bu amino asit üzerinde daha değişik mutasyonlar denenebilir. Pozitif yüklü histidinin diğer tip amino asitlere değişimi denenmiştir fakat başka bir pozitif yüklü amino aside değişimi denenmemiştir. Örneğin H99K ve H99R mutasyonlarının etkileri incelenmelidir. Ayrıca bu bölgedeki mutasyonlar 137 ve 184. amino asitte yapılan mutasyonlarla beraber gerçekleştirilerek ortak etkinin ne olduğu araştırılabilir.

Bu mutasyonların pH kararlılığına olan etkisi araştırılmamıştır. Bu kısım tamamlanarak enzimi saklama koşulları geliştirilebilir.

Endüstriyel uygulamalarda, GI enzimi düşük pH değerlerinde ve 60°C'de kullanılmaktadır. *A. gonensis* G2^T GI'sının optimum sıcaklığı 85°C'dir. Isıl kararlılığı bozmadan optimum sıcaklığı 60°C'ye düşürecek bir mutasyon endüstriyel uygulamalar için çok yararlı olacaktır. Bu tarz bir mutasyonun yapılması tasarlanmalıdır.

6. KAYNAKLAR

- Amore, R. ve Hollenberg, C. P., 1989, Xylose Isomerase from *Actinoplanes missouriensis*: Primary Structure of the Gene and the Protein, Nucleic Acids Res., 17, 18, 7515.
- Anon, 1979, New Applications Expand HFCS Markets Increase Demand and Tighten Supplies, Food Product Development., 13, 12, 38.
- Anon, 1993, Multifunctional Sweeteners, Baking and Snack., 15, 4, 31-34.
- Bartfay, J., 1960, Glucose Isomerase in Barley Malt, Nature (London), 185- 924.
- Belduz, A. O., Dulger, S. ve Demirbag, Z., 2003, *Anoxybacillus gonensis* sp. nov., a Moderately Thermophilic, Xylose-Utilizing, Endospore-Forming Bacterium, Int J Syst Evol Microbiol., 53, 1315-20.
- Belfaquih, N. ve Penninck M. J., 2000, A Bifunctional B-Xylosidase-Xylose Isomerase from *Streptomyces* Sp. Ec 10., Enzyme And Microbial Tech., 27, 114–121.
- Bhosale, S. H., Rao, M. B. ve Deshpande, V. V., 1996, Molecular and Industrial Aspects of Glucose Isomerase, Microbiol. Rev., 60, 280-300.
- Bogumil, R., Kappl R., J. Huttermann, C., Sudfeldt ve H. Witzel., 1993, X and Q-band EPR Studies on the Two Mn²⁺-substituted Metal-Binding Sites of D-xylose Isomerase, Eur. J. Biochem., 213, 1185–1192.
- Boguslawski, G. ve Rynski, M. J., 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, 103.
- Bor, Y. C., Moraes, C., Lee, S.-P., Crosby, W. L., Sinskey, A. J., ve Batt, C. A., 1992, Cloning and Sequencing the *Lactobacillus brevis* Gene Encoding Xylose Isomerase Gene, 114, 127–131.
- Boyer, H. W. ve D. Roulland-Dussoix., 1969, A Complementation Analysis of the Restriction and Modification of DNA in *Escherichia coli*, J. Mol. Biol., 41, 459–472.
- Bradford, M.M., 1976, Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilising the Principle of Protein Dye Binding, Anal. Biochem., 72, 248-254.
- Briggs, K. A., Lancashire, W. E. ve Hartley B. S., 1984, Molecular Cloning, DNA Structure and Expression of the *Escherichia coli* D-Xylose Isomerase, EMBO J., 3,611–616.
- Brown, S. H., Sjøholm, C. ve Kelly R. M., 1993, Purification and Characterization of a Highly Thermostable Glucose Isomerase Produced by the Extremely Thermophilic eubacterium, *Thermotoga maritima.*, Biotechnol. Bioeng., 41, 878–886.

- Bucke, C., 1981, Industrial Glucose Isomerase., In A. Wiseman (ed.). Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology, Industrial Glucose Isomerase, Ellis Horwood, Chichester, United Kingdom, 1, 147–171.
- 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, ve 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.
- Callens, M., Kersters-Hilderson, H., Vangrysperre, W. ve Debruyne, C. K., 1988, D-Xylose Isomerase from *Streptomyces violaceoruber*: Structural and Catalytic Roles of Bivalent Metal Ions, Enzyme Microb. Technol., 10, 695–700.
- Carell, H.L. 1989., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 4440-4444.
- Cha, J., Cho, Y., Whitaker, R. D., Carrell, H. L., Glusker, J. P., Karplus, P. A. ve Batt, C. A., 1994, Perturbing the Metal Site in D-xylose Isomerase: Effect of Mutations of His-220 on Enzyme Stability, J. Biol. Chem., 269, 2687-2694.
- Cha, J. ve Batt, C.A., 1998, Lowering the pH Optimum of D-Xylose Isomerase: The Effect of Mutations of The Negatively Charged Residues, Mol. Cells., 8, 374-382.
- Chaing, L. C., Hsiao, H. Y., Ueng, P. P., Chen, L. F. ve Tsao, G. T., 1981, Ethanol Production from Xylose by Enzymic Isomerisation and Yeast Fermentation, Biotechnol. Bioeng. Symp., 11, 263–274.
- C. Chang, B.C. Park, Lee D.-S. ve Suh S.W., 1999, NCBI Protein database CAB 4930288.
- Chauthaiwale, J. V. ve Rao, M. B., 1994, Production and Purification of Extracellular D-Xylose Isomerase from an Alkaliphilic, Thermophilic *Bacillus* Sp, Appl. Environ. Microbiol., 60, 4495–4499.
- Chen, W. P., Anderson, A. W. ve Han, Y. W., 1979, Production of Glucose Isomerase by *Streptomyces Flavogriseus*, Appl. Environ. Microbiol., 37, 324–331.
- Chen, W.P., 1980, Proc. Biochem., 30-35.
- Collyer, C. A. ve Blow, D. M., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87, 1362-1366.
- CRA., 1994, Corn Refining, the Process, the Products, Corn Refiners Association Inc.
- Danno, G., 1970, Studies on The D-Glucose-Isomerizing Enzyme from *Bacillus Coagulans*, Strain Hn-68. Part V. Comparative Study on the Three Activities of D-Glucose, D-Xylose And D-Ribose Isomerization of The Crystalline Enzyme, Agric. Biol. Chem., 34, 1805-1814.
- Danno, 1971, G., Studies on D-Glucose Isomerizing Enzyme From *Bacillus Coagulans*, Strain Hn-68. V1. The Role of Metal Ions on the Isomerization of D-Glucose and D-Xylose by the Enzyme, Agric. Biol. Chem., 35, 997–1006.

- Davies, G. J., Gamblin, S. J., Littlechild, J. A. ve Watson, H. C., 1993, The Structure of a Thermally Stable 3-Phosphoglycerate Kinase and a Comparison with its Mesophilic Equivalent, Protein Struct. Funct. Genet., 15, 283-289.
- Dekker, K., Yamagata, H., Sakaguchi, K. ve Udaka, S., 1991, Xylose (Glucose) Isomerase Gene from the Thermophile *Thermus Thermophilus*: Cloning, Sequencing, and Comparison with Other Thermostable Xylose Isomerases, J. Bacteriol., 173, 3078–3083.
- Dill, K. A., 1990, Dominant Forces in Protein Folding, Biochemistry, 29, 7133-7155.
- Dische, Z. ve Borenfreund, E., 1951, A New Spectrophotometric Method for The Detection and Determination Of Ketosugars and Trioses, J.Biol.Chem., 192, 583-587.
- Douglas, C. W. ve Jay, K .S., 1999, Commodity Scale Production of Sugars from Starches, Current Opinion in Microbiology, 2, 252–256.
- Drocourt, D., Bejar, S., Calmels, T., Reynes, J. P. ve Tiraby, G., 1988, Nucleotide Sequence of the Xylose Isomerase Gene from *Streptomyces violaceoniger*, Nucleic Acids Res., 16, 9337.
- Dupreez, J. C. ve Prior, B. A., 1985, A Quantitative Screening of Some Xylose Fermenting Yeast Isolates, Biotechnol. Lett., 7, 241–246.
- Dupreez, J. C., ve Vanderwalt, J. P., 1983, Fermentation of D-Xylose to Ethanol by a Strain of *Candida shehatae*, Biotechnol. Lett., 5, 357–362.
- Dupreez, J. C., Bosch, M. ve Prior, B. A., 1986, Xylose Fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: Effects of pH, Temperature and Substrate Concentration, Enzyme Microb. Technol., 8, 360–364.
- Dupreez, J. C., Bosch, M. ve Prior, B. A., 1987, Temperature Profiles of Growth and Ethanol Tolerance of The Xylose Fermenting Yeasts *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 25, 521–525.
- Farber, G. K., Glasfeld, A., Tiraby, G., Ringe, D. ve Petsko, G. A., 1989, Crystallographic Studies of the Mechanism of Xylose Isomerase, Biochemistry, 28, 7289-7297.
- Fujinaga, M., Berthet-Colominas, C., Yaremchuk, A. D., Tukalo, M. A. ve 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.
- Fuxreiter M., Bocskei Z., Szeibert A., Szabo E., Dallmann G. ve Naray-Szabo B., 1997, The Role of Electrostatics at the Catalytic Metal Binding Site in Xylose Isomerase Action. Ca²⁺ Inhibition and Metal Competence in Double Mutant D254E/D256E. Proteins, 28, 183-193.
- Gaikwad, S. M., Rao, M. B. ve Deshpande, V. V., 1992, D-Glucose/Xylose Isomerase from *Streptomyces*. Differential Roles of Magnesium and Cobalt Ions, Enzyme Microb. Technol., 4, 317–320.

- Hafner, E. W., 1985, Constitutive Mutant of a Thermostable Glucose Isomerase, U.S. Patent 4, 551, 430.
- Hafner, E. W. ve Jackson, D. M., 1985, Constitutive Glucose Isomerase Producer, U.S. Patent 4, 532, 208.
- Hartley, B. S., Hanlon, N., Jackson, R. J. ve Rangarajan, M., 2000, Glucose Isomerase: Insights into Protein Engineering for Increased Thermostability, Biochim Biophys Acta, 1543, 294-335.
- Hebeda, R.E., 1987, Corn Sweeteners. In: Watson, S.A. and Ramstad, P.E. (eds) "Corn Chemistry and Technology", AACC, Inc. St. Paul, MN., 501-534.
- Henrik, K., Collyer, C.A. ve 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. ve Kelly, R.M., 1998, *Thermotoga neapolitana* Homotetrameric Xylose Isomerase is Expressed as a Catalytically Active 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.
- Inyang, C.U., Gebhart, U., Obi, S.K.C. ve 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.
- Iuzuka, H., Ayukawa, Y., Suekane, S. ve Kano, M., 1971, Production of Extracellular Glucose Isomerase by *Streptomyces*, U.S. Patent, 3, 622, 463.
- Jamieson, A. C. ve Batt, C. A., 1992, Fluorescent properties of the *Escherichia coli* D-xylose isomerase active site, Protein Eng., 5, 235-240.
- Jenkins, J., Janin, J., Rey, F., Chiadmi, M., Van Tilbeurgh, H., Lasters, I., DeMaeyer, M., VanBelle, D., Wodak, S. J., Lauwereys, M., Stanssens, P., Mrabet, N. T., Snauwaert, J., Matthysens, G. ve Lambeir, G. A., 1992, Protein Engineering of Xylose (Glucose) Isomerase from *Actinoplanes missouriensis*, 1. Crystallography and Site Directed Mutagenesis of Metal Binding Sites, Biochemistry, 31, 5449-5458.
- Johnson, J.M., Harris, C.H. ve Barbeau, W.E., 1989, Effects of HFCS Replacement for Sucrose on Browning, Starch Gelatinization and Sensory Characteristics of Cakes., Cereal Chem., 66, 3, 155 - 157.

- Joo, G.J., Shin, J.H., Heo, G.Y., Kwak, Y.Y., Choi, J.H. ve Rhee, I.K., 2001, Purification and Characterization of a Thermostable Xylose (Glucose) Isomerase from *Streptomyces chibaensis* J-59, Agric. Chem. Biotechnol., 44, 113-118.
- Kanaya, S. ve Itaya, M., 1992, Expression, Purification, and Characterization of a Recombinant Ribonuclease H from *Thermus thermophilus* HB8, Biol. Chem., 267, 10184-10192.
- Karimaki, J., Parkkinen, T., Santa, H., Pastinen, O., Leisola, M., Rouvinen, J. ve Turunen, O., 2004, Engineering the Substrate Specificity of Xylose Isomerase, Protein Eng. Des. Sel., 17, 861-869.
- Kasumi, T., Hayashi, K. ve Tsumura, N., 1982, Role of Cobalt in Stabilizing the Molecular Structure of Glucose Isomerase from *Streptomyces griseofuscus* S-41, Agric. Biol. Chem., 46, 21–30.
- Kawai, Y., Konishi, H., Horitsu, H., Sakurai, H., Takamizawa, K., Suzuki, T. ve Kawai, K., 1994, Purification and Characterization of D-Xylose Isomerase from *Bifidobacterium adolescentis*, Biosci. Biotechnol. Biochem., 58, 691-694.
- 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. ve Korhola, M., 1996, Eur. J. Biochem. 237, 240-246.
- Kulp, K., Lorenz, J.K. ve Stone, M., 1991, Functionality of Carbohydrate Ingredients in Bakery Products. Food Technology, 45, 3, 136, 138-140, 142.
- Lambeir A.-M., Lauwereys M., Stanssens P., Mrabet N.T., Snauwaert J., VanTilbeurgh H., Matthyssens G., Lasters I., DeMaeyer M., Wodak S.J., Jenkins J., Chiadmi M. ve Janin J., 1992, Biochemistry, 31, 5459-5466.
- Lee, C. K., 1976, Preparation and Use of Glucose Isomerase, U.S. Patent, 4, 61,539.
- Lee, C., Bhatnagar, L., Meng, M. ve Zeikus, J. G., 1989, Catalytic Mechanism of Xylose (Glucose) Isomerase from *Clostridium thermosulfurogenes*. The journal of Biological Chemistry., 265, 19082-19090.
- Lee, C., L. Bhatnagar, B. C. Saha, Y.-E. Lee, M. Takagi, T. Imanaka, M. Bagdasarian ve J. G. Zeikus., 1990, Cloning and Expression of the *Clostridium thermosulfurogenes* Glucose Isomerase Gene in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, Appl. Environ. Microbiol., 56, 2638–2643.
- Lee, Y.-E., Matur, V. R. ve Zeikus, J. G., 1993, Cloning, Sequencing and Biochemical Characterization of Xylose Isomerase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* Strain B6A-RI, J. Gen. Microbiol., 139, 1227–1234.

- Lehmbacher, A. ve Bisswanger, H., 1990, Isolation and Characterization of an Extremely Thermostable D-Xylose Isomerase from *Thermus Aquaticus* Hb8, J. Gen. Microbiol., 136, 679-686.
- Ligthelm, M. E., Prior, B. A. ve Dupreez, J. C., 1988, The Oxygen Requirements of Yeasts for the Fermentation of D-Xylose and D-Glucose to Ethanol, Appl. Microbiol. Biotechnol., 28, 63–68.
- Liu, S.Y., Wiegel, J. ve Gherardine, F.C., 1996, Purification and Cloning of a Thermostable Xylose (Glucose) Isomerase with an Acidic pH Optimum From *Thermoanaerobacterium* Strain Jw/Sl-Ys 489, J. Bacteriol., 178, 5938-5945.
- Lonn, A., Gardonyi, M., van Zyl, W., Hahn-Hagerdal, B. ve Otero, R.C., 2002, Cold Adaptation of Xylose Isomerase from *Thermus thermophilus* through Random PCR Mutagenesis. Gene Cloning and Protein Characterization, Eur. J. Biochem., 269, 157-163.
- Meadeu, P. G., J. Aduse-Opoku, J., Reizer, A., Reizer, Y. A., Lanceman, M. F. Martin ve Mitchell, W. J., 1994, The Xylose Isomerase-Encoding Gene (xylA) of *Clostridium thermosaccharolyticum*: Cloning, Sequencing and Phylogeny of XylA Enzymes Gene 141, 97–101.
- Manohar, R.S. ve Rao, P.H., 1997, Effects of Sugars on the Rheological Characteristics of Biscuit Dough and Quality of Biscuits, Journal of the Science of Food and Agriculture, 75, 383-390.
- Marshall, R. O. ve Kooi E. R., 1957, Enzymatic Conversion of D-glucose to D-fructose, Science, 125, 648–649.
- Meng, M., Bagdasarian, M. ve Zeikus, J. G., 1993, Thermal Stabilization of Xylose Isomerase from *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 8459-8463.
- Meng, M., Lee, C., Bagdasarian, M. ve Zeikus, J. G., 1991, Switching Substrate Preference of Thermophilic Xylose Isomerase from D-xylose to D-glucose by Redesigning the Substrate Binding pocket, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4015–4019.
- Miles Laboratories Inc., 1972, Production of Glucose Isomerase, U.K. Patent 1, 376, 787, 123.
- Moses, V. ve Cape, R. E., 1994, Biotechnology, Harwood Academic Publishers, USA, 100, 113.
- Mrabet N.T., VandenBroeck A., VandenBrande I., Stanssens P., Laroche Y., Lambeir A.-M., Matthijssens G., Jenkins J., Chiadmi M., VanTilbeurgh H., Rey F., Janin J., Quax W.J., Lasters I., DeMaeye M. ve Wodak S.J., 1992, Biochemistry, 31, 2239-2253.
- Nabors, L. O. ve Gelardi, C. R., 1991, Alternative Sweeteners, 2nd Ed. Marcel Dekker, Inc., 110, 36.

- Natake, M. ve S. Yoshimura, 1964, Studies on Glucose Isomerase of Bacteria. III. The Mode of Action of Glucose Isomerase from *Escherichia intermedia* Strain HN-500, Agric. Biol. Chem., 28, 510–516.
- Outtrup, H., 1974, New Glucose Isomerase By Fermentation, German Patent Application, 2, 400,323.
- Pastine, O., Schoemaker, H. E. ve Leisola, M., 1999, Xylose Isomerase Katalyzed Novel Hexose Epimerization, Biocatal Biotrans,17, 393-400.
- Pastinen, O., Visuri, K., Schoemaker, H. E. ve Leisola, M., 1999, Novel Reactions of Xylose Isomerase from *Streptomyces rubiginos*, Enzyme Microb Technol., 25, 675-700.
- Pomeranz, Y. 1985, Functional Properties of Foods, Academic Press Inc., Orlando, Florida, 536.
- Pubols, M. H., Zahnley, J. C. ve 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. ve Lasters, I., 1991, Enhancing the Thermostability of Glucose Isomerase by Protein Engineering. Biotechnology, 9, 738-742.
- Rangarajan, M. ve Hartley, B.S., 1992, Mechanism of D-Fructose Isomerization by *Arthrobacter* D-Xylose Isomerase, Biochem. J., 283, 223-233.
- Rasmussen, H., Cour, T. L., Nyborg, J. ve Schulein, M., 1994, Acta cryst. D50, 124-131.
- Reeder, C. F., Light Foods Appease Weight Conscious Americans, 1978, Food Product Development, 12,3, 35-36, 40.
- Rey, F., Jenkins, J., Janin, J., Lasters, I., Alard, P., Claessens, M., Matthyssens, G. ve Wodak, 1988, Proteins struc. Funct. Genet.,4, 165-172.
- Rose, I. A., O'connell, E. L. ve Mortlock, R. P., 1969, Stereochemical Evidence for a Cis-Enediol Intermediate In Mn-Dependent Aldose Isomerases, Biochim. Biophys. Acta., 178, 376.
- Saari, G., A. Kumar, Kawasaki, G., Insley, M. ve Hara, P. O., 1987, Sequence of the *Ampullariella* sp. strain 3876 gene coding for xylose isomerase, J. Bacteriol., 169, 612–618.
- Sanchez, S. ve Smiley, K. L., 1975, Properties of D- xylose Isomerase from *Streptomyces albus*, Appl Microbiol., 29,745-50.
- Schenck, F. W., 2000, High Fuctose Corn Syrups- A review, Int. Sugar J., 285-288.
- Schneider, H., Wang, P. Y. ve Johnson, B. F., 1981, Current Developments in Yeast Research, P. Pergamon Press, Toronto., 81–85.
- Shieh, K. K., 1977, Media Containing, 293-337.

- Schenck, F. W., 2000, High Fructose Corn Syrups- A review, Int. Sugar J., 102, 285-288.
- Schneider, H., Wang, P. Y. ve Johnson, B. F., 1981, Current Developments in Yeast Research, Pergamon Press, Toronto, P. 81–85.
- Shieh, K. K., 1977, Media Containing Molasses and Soy Flour for Producing Glucose Isomerase and Method, U.S. Patent, 4, 003, 793.
- Slininger, P. J., Bothast, R. J., Okos, M. R. ve Ladisch, M. R., 1985, Comparative Evaluation of Ethanol Production by Xylose Fermenting Yeasts Presented High Xylose Concentrations, Biotechnol. Lett., 7, 431–436.
- Smith, C. A., Rangarajan, M. ve Hartley, B. S., 1991, D-Xylose (D-Glucose) Isomerase from *Arthrobacter Strain* Nr1 B3728, Biochem. J., 277, 255–261.
- Srinivasan, M. C., Vartak, H. G., Powar, V. K. ve Khire, J. M., 1983, High Activity Extracellular Glucose/(Xylose) Isomerase from a *Chainia* Species, Biotechnol. Lett., 5, 611–614.
- Suekane, M., Tamura, M. ve Tomimura, C., 1978, Physicochemical and Enzymatic Properties of Purified Glucose Isomerase from *Streptomyces olivochromogenes* and *Bacillus stearothermophilus*, Agric. Biol. Chem., 42, 909–917.
- Takasaki, Y. ve Tanabe, O., 1962, Formation of Fructose from Glucose by Bacteria. I. Properties of Glucose Isomerase, Hakko Kyokaishi, 20, 449–455.
- Takasaki, Y. ve Tanabe, O., 1963, Isomerization of sugars by bacteria. I. Cultural conditions for glucose isomerizing bacteria, Kogyo Gijutsu-in Hakko Kenkyusho Kenkyu, 23, 41–47.
- Takasaki, Y. ve Tanabe, O., 1964, NAD-Linked D-Glucose Isomerizing and D-Mannose Isomerizing Enzyme from *Paracolonobacterium aerogenoides*, Agric. Biol. Chem., 28, 740–741.
- Takasaki, Y. ve Tanabe, O., 1966, Studies on Isomerisation of Sugars by Bacteria. IX. NAD-Linked D-Glucose Isomerizing and D-Mannose Isomerizing Enzyme from *Paracolonobacterium aerogenoides*, Agric. Biol. Chem., 30, 220–225.
- Tewari, Y.B. ve Goldberg, R.N., 1984, Thermodynamics of the Conversion of Aqueous Glucose to Fructose, J. Solut Chem., 13, 523-547.
- Tomoyeda, M. ve Horitsu, H., 1964, Pentose Metabolism By *Candida Utilis*. I. Xylose Isomerase, Agric. Biol. Chem., 28, 139–143.
- VanTilbeurgh H., Jenkins J., Chiadmi M., Janin J., Wodak S.-J., Mrabet N.T. ve Lambeir, A., 1992, M. Biochemistry 31, 5467-5471.
- VanBastelaere, P.B.M., Kersters-Hilderson, H.L.M. ve Lambeir, A., M., 1995, Biochem. J., 307, 135-142.

- Vartak, H. G., Srinivasan, M. C., Powar, V. K., Rele, M. V. ve Khire, J. M., 1984, Characterisation of Extracellular Substrate Specific Glucose and Xylose Isomerases of *Chainia*, *Biotechnol. Lett.*, 6, 493–494.
- Varsani L., Cui T., Rangarajan M., Hartley B.S., Goldberg J., Collyer C. ve Blow D.M. 1993, *Biochem. J.*, 291, 575-583.
- Veronese, F. M., Boccu, E., Schiavon, O., Grandi, C. ve 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. ve Zeikus, J. G., 1995, XylA Cloning and Sequencing and Biochemical Characterization of Xylose Isomerase from *Thermotoga neapolitana*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 1867-1875.
- Vieille, C., Burdette, D. S. ve Zeikus, J. G., 1996, Thermozyms, *Biotechnol. Annu. Rev.*, 2, 1-83.
- Vieille, C. ve Zeikus, J. G., 1996, Thermozyms: Identifying Molecular Determinants of Protein Structural and Functional Stability, *Trends Biotechnol.*, 14, 183-190.
- Vieille, C. ve Zeikus, J. G., 2001, Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 65, 1-43.
- Vongsuvanlert, V. ve 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. ve de 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.
- Wang, P. Y., Johnson, B. F. ve Schneider, H., 1980, Fermentation of D-Xylose by Yeasts Using Glucose Isomerase in the Medium to Convert D-Xylose to D-Xylulose, *Biotechnol. Lett.*, 2, 273–278.
- Weber, P., Fructose by Isomerisation of Glucose, 1976, *U.K. Patent 1*, 496, 309.
- Whitaker, R.D., Cho Y., Cha J., Carrell H.L., Glusker J.P., Karplus P.A ve Batt C.A., 1995, *J. Biol. Chem.*, 270, 22895-22906.
- Whitlow, M., Howard, A. J., Finzel, B. C., Poulos, T.L., Winborne, E. ve Gilliland, G. L., 1991, *Proteins Struct. Funct. Genet.*, 9, 153-173.
- Wilhelm, M. ve C. P. Hollenberg., Nucleotide Sequence of the *Bacillus subtilis* Xylose Isomerase Gene: Extensive Homology Between the *Bacillus* and the *Escherichia coli* Enzyme, *Nucleic Acids Res.*, 13 (1985), 5717–5722.
- Wrba, A., Schweiger, A., Schultes, V., Jaenicke, R. ve Zavodsky, P., 1990, Extremely Thermostable D-Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase from the Eubacterium *Thermotoga maritima*. *Biochemistry* 29, 7584-7592.

- Wulff, S.M. ve 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., 1968, Purification, Crystallization and Properties of the D-xylose Isomerase from *Lactobacillus brevis*, Biochim Biophys Acta.,151-670-80.
- Yamanaka, K., D-Xylose Isomerase from *Lactobacillus Brevis*, 1975, Methods Enzymol., 41, 466-471.

ÖZGEÇMİŞ

29.3.1976 tarihinde İstanbul'da doğdu. İlköğrenimini İstanbul Yavuz Selim İlkokulunda, orta ve lise öğrenimini ise Ahmet Rasim Lisesinde tamamladı. 1995 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans öğrenimine başladı ve 2000 yılında Biyolog unvanı ile mezun oldu. Aynı yıl Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Doç. Dr.Ali Osman BELDÜZ danışmanlığında altında yüksek lisans öğrenimine başladı. 2001-2002 yılları arası Fen Bilimleri Enstitüsünde Araştırma Görevlisi olarak çalıştı. 2004 yılında yüksek biyolog unvanı kazandı. Aynı yıl Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Prof.Dr. Dr Ali Osman BELDÜZ danışmanlığında altında Doktora öğrenimine başlamış olup iyi derecede İngilizce bilmektedir.