

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

D398S, I323V, I372Q/V VE V380F MUTASYONLARININ
***Anoxybacillus gonensis* GLUKOZ İZOMERAZININ KİNETİK**
PARAMETRELERİ VE ISIL KARARLILIĞI ÜZERİNE OLAN
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

MERVE KIZAKLI

TEZ DANIŞMANI
DR. ÖĞR. ÜYESİ HAKAN KARAOĞLU

TEZ JÜRİLERİ
DR. ÖĞR. ÜYESİ DERYA EFE
DOÇ. DR. FATİH BERİŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

RİZE-2019
Her Hakkı Saklıdır

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**D398S, I323V, I372Q/V VE V380F MUTASYONLARININ *Anoxybacillus gonensis*
GLUKOZ İZOMERAZININ KİNETİK PARAMETRELERİ VE ISIL
KARARLILIĞI ÜZERİNE OLAN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Öğr. Üyesi Hakan KARAOĞLU danışmanlığında, Merve KIZAKLI tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 18/07/2019 tarihinde Su Ürünleri Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir.

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

İmzası

[Handwritten signatures in blue ink]


Doç. Dr. Ferhat KALAYCI
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

ÖNSÖZ

D398S, I323V, I372Q/V ve V380F mutasyonlarının *Anoxybacillus gonensis* glukoz izomerazının kinetik parametreleri ve ısıl kararlılığı üzerine olan etkisinin araştırılmasını konu alan bu çalışma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı'nda Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarında “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenden fazlasını sunan ve gelecekteki mesleki hayatımda da bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağımı düşündüğüm kıymetli ve danışman hoca statüsünü hakkıyla yerine getiren Dr. Öğr. Üyesi Hakan KARAOĞLU' na teşekkürlerimi bir borç bilirim. Çalışma hayatım boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Derya EFE' ye, bilgi ve tecrübelerinden faydalanmamı sağlayan ve bu meslekte yetişmeme yardım eden değerli Doç. Dr. Fatih Ş. BERİŞ' e, eğitim hayatımda bana değerli katkılarda bulunan değerli Prof. Dr. Yusuf BEKTAŞ' a, yıllardır laboratuvarında yetişmemde büyük emeği olan sevgili hocam Öğr. Gör. İsmail AKSU' ya, gerek çalışmamın ilerlemesinde gerekse bana olan desteğini üzerimden hiç eksik etmeyen değerli arkadaşım ve meslektaşım Züleyha AKPINAR' a, laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan Seyhan RAKICI' ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Eğitim hayatım boyunca bana maddi manevi destek olan ve beni bu yolda yalnız bırakmayan çok değerli anne babam Meryem ve Mehmet KIZAKLI' ya, bana daima ilham ve manevi kalkan olan sevgili kardeşlerim Mesut, Meltem ve Melike' ye, akademik hayatımda göstermiş olduğu sonsuz güven ve destekten dolayı sevgili eşim İnan YILDIRIM' a yürekten teşekkürlerimi borç bilirim.

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

Merve KIZAKLI

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “D398S, I323V, I372Q/V ve V380F mutasyonlarının *Anoxybacillus gonensis* glukoz izomerazının kinetik parametreleri ve ısıl kararlılığı üzerine olan etkisinin araştırılması” başlıklı bu tezin, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin otaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim.
18/06/2019

Merve KIZAKLI

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

ÖZET

D398S, I323V, I372Q/V VE V380F MUTASYONLARININ *Anoxybacillus gonensis* GLUKOZ İZOMERAZININ KİNETİK PARAMETRELERİ VE ISIL KARARLILIĞI ÜZERİNE OLAN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Merve KIZAKLI

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi
Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Hakan KARAOĞLU

Glukozun fruktoza isomerizasyonunu katalizleyen glukoz izomeraz (D- xylose ketol - isomerase E.C 5.3.1.5) birçok mikroorganizmada bulunmaktadır. Günümüze kadar birçok termofilik bakteriden GI' lar karakterize edilerek birçoğu endüstriyel alanlarda kullanılır hale getirilmiştir. Ayrıca endüstriyel alanlarda kullanılmak üzere birçok GI geni biyomühendislik uygulamaları ile mutant hale getirilerek GI' ın hem kinetik hem de biyokimyasal parametrelerinin geliştirilmesi üzerine birçok çalışma yapılmıştır. *Anoxybacillus gonensis* G2^T glukoz izomerazı rekombinant olarak izole edilmiştir. Elde edilen veriler sonucunda; *Anoxybacillus gonensis* G2^T glukoz izomerazının kinetik parametreler açısından ticari olarak kullanılan birçok GI' dan üstün nitelikler taşıdığı belirlenmiştir.

Bu çalışmada, genetik manipülasyonlarla kinetik özellikleri geliştirilmiş olan AgoGI' sının yine aynı yöntemler ile biyokimyasal ve kinetik parametrelerinin geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Bu amaçla AgoGI' sı üzerinde I323V, I372V, I372Q, V380F, D398S, bölge spesifik mutasyonları uygulanmıştır. Ayrıca, başarılı sonuç alınan I373V ve V380F mutasyonları kinetik parametreler açısından geliştirilmiş olan enzimin W137F/ V184S mutantı üzerinde de uygulanmıştır. W137F/ V184S/I372V' ye ait kinetik veriler; K_m değeri $64,37 \pm 1,3$ mM, V_{max} değeri $99,05 \pm 0,44$, k_{cat} değeri $82,62$ 1/sn ve k_{cat}/ K_m değeri $1,283$ olarak hesaplanmıştır. W137F/ V184S/W380F' ye ait kinetik veriler ise K_m değeri $116,57 \pm 4,37$ mM, V_{max} değeri $37,22 \pm 0,39$ μ mol/dk/mg protein, k_{cat} değeri $31,05$ 1/sn ve k_{cat}/ K_m değeri $0,266$ olarak hesaplandı.

2019, 118 sayfa

Anahtar Kelimeler: Glukoz İzomeraz, Enzim Karakterizasyonu, Bölge Spesifik Mutasyon

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF D398S, I323V, I372Q / V AND V380F MUTATIONS ON THE KINETIC PARAMETERS AND THERMAL STABILITY OF GLUCOSE ISOMERASE FROM *Anoxybacillus gonensis* G2^T

Merve KIZAKLI

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

Glucose isomerase, known as xylose isomerase (E.C 5.3.1.5), catalyzes isomerization of glucose to fructose and found in many microorganisms. Until today, many GI' s from different thermophilic bacteria have been characterized and most of them have been used in industrial applications. In addition, a great deal of studies has been performed to improve kinetic and biochemical parameters of GI by bioengineering applications such as mutagenesis for using in industrial areas. GI of *Anoxybacillus gonensis* G2^T was isolated as recombinant. According to the results, the G2^T GI of *Anoxybacillus gonensis* was found to possess superior properties than the other GI' s being used today in terms of kinetic parameters.

In this study, we aimed to improve biochemical and kinetic parameters of AgoGI with improved kinetic properties by genetic manipulations. To this end, I323V, I372V, I372Q, V380F, D398S site-specific mutations were created on AgoGI. In addition, successful I373V and V380F mutations were applied on GI with W137F/ V184S mutation with improved kinetic parameters. Kinetic parameters for W137F/ V184S/I372V were calculated as $64,37 \pm 1,3$ mM for K_m , $99,05 \pm 0,44$ for V_{max} , $82,62$ 1/sn for k_{cat} and $1,283$ for k_{cat}/ K_m . Kinetic parameters for W137F/ V184S/V380F were calculated as $116,57 \pm 4,37$ mM for K_m , $37,22 \pm 0,39$ $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein for V_{max} , $31,05$ 1/sn for k_{cat} ve $0,266$ for k_{cat}/ K_m .

2019, 118 pages

Keywords: Glucose Isomerase, Enzyme Characterization, Site Directed Mutagenesis

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	II
ÖZET	III
ABSTRACT.....	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
TABLolar DİZİNİ.....	XVI
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ	XVII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Glukoz İzomerazın Genel Özellikleri ve Önemi	3
1.3. Glukoz İzomerazın Yapısal Özellikleri	7
1.3.1. Enzimin Alt Ünite Yapısı.....	7
1.3.2. Enzimin Optimum Sıcaklık ve pH Özellikleri.....	9
1.3.3. Enzimin Metal İyonu Gereksinimi ve İnhibitörleri	11
1.3.4. Enzimin Substrat Seçiciliği.....	12
1.3.5. GI' ların DNA Dizi Benzerliği ve Reaksiyon Mekanizması	13
1.4. Glukoz İzomeraz Üreten Mikroorganizmalar	16
1.5. Endüstriyel Glukoz İzomerazlar	18
1.6. Mikroorganizma Kökenli Enzimlerin Endüstriyel Kullanımdaki Yeri	18
1.7. Termofilik Enzimlerin Endüstriyel Ticarete Kullanım Amacı	19
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	20
2.1. Kullanılan Kimyasallar, Plazmit ve Hücreler	20
2.2. Mutasyon Bölgeleri ve Mutasyon Primerlerinin Seçimi	20
2.3. Tasarlanan Mutasyonlar İçin Primer Dizaynı	22
2.4. pETG2GI' nın ve Mutant Plazmitlerin İzolasyonları	23
2.5. Mutasyon Uygulamaları.....	23
2.5.1. pETG2GI Mutantlarının PCR ile Üretilmesi	23
2.5.2. DpnI ile Orjinal Vekörün Temizlenmesi	25
2.5.3. Mutant Plazmitlerin <i>E. coli</i> DH5α Suşuna Transformasyonu	25
2.5.4. Mutant Plazmitlerin <i>E. coli</i> BL21(DE3) suşuna Transformasyonu.....	26
2.6. Enzimlerin Ekspresyonu ve Saflaştırılması	27

2.6.1.	Rekombinant GI ve Mutant GI Genlerin Ekspresyonu.....	27
2.6.2.	Enzimlerin Saflaştırılma Basamakları	28
2.6.2.1.	Isı Şoku ile Saflaştırma	28
2.6.2.2.	DEAE - İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması	28
2.6.2.3.	Fenil Sefaroz Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması	30
2.6.2.4.	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS - PAGE)	31
2.7.	Enzimlerin Kinetik ve Biyokimyasal Parametreler Açısından İrdelenmesi	31
2.7.1.	Protein Miktarı Analizi	31
2.7.2.	Glukoz İzomeraz Aktivite Deneyi	32
2.7.2.1.	Sistein – Karbozol - Sülfürik Asit Reaksiyonu.....	32
2.7.2.2.	Seliwanoff reaksiyonu	33
2.7.3.	Enzimlerin Biyokimyasal Karakterizasyonu	33
2.7.3.1.	Optimum Sıcaklık	33
2.7.3.2.	Optimum pH	34
2.7.4.	Enzimlerin Isıl Kararlılıkları.....	35
2.7.5.	Enzimlerin Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi.....	35
3.	BULGULAR.....	36
3.1.	AgoGI (Rekombinant Olarak Üretilen Yaban Tip Enzim) Saflaştırılması ve karakterizasyonu	36
3.1.1.	AgoGI Yaban Tip Enzimin Saflaştırılması	36
3.1.1.1.	Kaba Ekstrakt Elde Edilmesi	36
3.1.1.2.	Isı Şoku ile Denetrasyon Uygulaması.....	36
3.1.1.3.	DEAE - İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması.....	37
3.1.1.4.	Fenil Sefaroz Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması	39
3.1.1.5.	AgoGI' nin Saflaştırma Verileri.....	40
3.1.1.6.	SDS - PAGE Analizi.....	40
3.1.2.	AgoGI' nin Karakterizasyonu	41
3.1.2.1.	AgoGI' nin Optimum pH Aralığı	41
3.1.2.2.	AgoGI' nin Optimum Sıcaklık Aralığı.....	42
3.1.2.3.	Kinetik Çalışmalar	42
3.2.	D398S Mutant GI' sının Saflaştırması ve Karakterizasyonu.....	43
3.2.1.	D398S Mutant GI' nin Saflaştırılması	43
3.2.1.1.	Kaba Ekstrakt Uygulaması	43
3.2.1.2.	Isı Şoku ile Denetrasyon Uygulaması.....	44
3.2.1.3.	DEAE - İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması.....	44

3.2.1.4.	Fenil Sefaroz Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması	45
3.2.1.5.	D398S Mutant GI' nin Saflaştırma Verileri.....	46
3.2.1.6.	D398S Mutant GI' nin Saflaştırılmasına ait SDS - PAGE Analizi	47
3.2.2.	D398S Mutant GI' nin Karakterizasyonu	47
3.2.2.1.	D398S Mutant GI' nin Optimum pH Aralığı	47
3.2.2.2.	D398S Mutant GI' nin Optimum Sıcaklık Aralığı	48
3.2.2.3.	D398S Mutant GI' ya Ait Kinetik Veriler	48
3.3.	I323V Mutant GI' nin Saflaştırması ve Karakterizasyonu	49
3.3.1.	I323V Mutant GI' nin Saflaştırılması	49
3.3.1.1.	Kaba Ekstrat Uygulaması	49
3.3.1.2.	Isı Şoku İle Denetrasyon Uygulaması.....	50
3.3.1.3.	DEAE - İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması.....	50
3.3.1.4.	Fenil Sefaroz Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması	51
3.3.1.5.	I323V Mutant GI' nin Saflaştırma Verileri	52
3.3.1.6.	I323V Mutant GI' nin Saflaştırılmasına Ait SDS - PAGE Analizi	53
3.3.2.	I323V Mutant GI' nin Karakterizasyonu	54
3.3.2.1.	I323V Mutant GI' nin Optimum pH Aralığı.....	54
3.3.2.2.	I323V Mutant GI' nin Optimum Sıcaklık Aralığı	54
3.3.2.3.	I323V Mutant GI' ya Ait Kinetik Veriler	55
3.4.	I372Q Mutant GI' nin Saflaştırması ve Karakterizasyonu	56
3.4.1.	I372Q Mutant GI' nin Saflaştırılması	56
3.4.1.1.	Kaba Ekstrakt Uygulaması	56
3.4.1.2.	Isı Şoku ile Denetrasyon Uygulaması.....	56
3.4.1.3.	DEAE - İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması.....	57
3.4.1.4.	Fenil Sefaroz Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması	58
3.4.1.5.	I372Q Mutant GI' nin Saflaştırma Verileri	59
3.4.1.6.	I372Q Mutant GI' nin Saflaştırılmasına ait SDS - PAGE Analizi	59
3.4.2.	I372Q Mutant GI' nin Karakterizasyonu	60
3.4.2.1.	I372Q Mutant GI' nin Optimum pH Aralığı.....	60
3.4.2.2.	I372Q Mutant GI' nin Optimum Sıcaklık Aralığı	61
3.4.2.3.	I372Q Mutant GI' ya Ait Kinetik Veriler	61
3.5.	I372V Mutant GI' nin Saflaştırması ve Karakterizasyonu	62
3.5.1.	I372V Mutant GI' nin Saflaştırılması	62
3.5.1.1	Kaba Ekstrakt Uygulaması	62

3.5.1.2.	Isı Şoku İle Denetrasyon Uygulaması.....	63
3.5.1.3.	DEAE - İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması	63
3.5.1.4.	Fenil Sefaroz Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması	64
3.5.1.5.	I372V Mutant GI' nın Saflaştırma Verileri	65
3.5.1.6.	I372V Mutant GI' nın Saflaştırılmasına Ait SDS - PAGE Analizi	65
3.5.2.	I372V Mutant GI' nın Karakterizasyonu	66
3.5.2.1.	I372V Mutant GI' nın Optimum pH Aralığı.....	66
3.5.2.2.	I372V Mutant GI' nın Optimum Sıcaklık Aralığı.....	67
3.5.2.3.	I372V Mutant GI' ya Ait Kinetik Veriler	67
3.6.	V380F Mutant GI' nın Saflaştırması ve Karakterizasyonu	68
3.6.1.	V380F Mutant GI' nın Saflaştırılması	68
3.6.1.1.	Kaba Ekstrakt Uygulaması	68
3.6.1.2.	Isı Şoku İle Denetrasyon Uygulaması.....	69
3.6.1.3.	DEAE - İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması	69
3.6.1.4.	Fenil Sefaroz Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması	70
3.6.1.5.	V380F Mutant GI' nın Saflaştırma Verileri.....	71
3.6.1.6.	V380F Mutant GI' nın Saflaştırılmasına Ait SDS - PAGE Analizi	71
3.6.2.	V380F Mutant GI' nın Karakterizasyonu	72
3.6.2.1.	V380F Mutant GI' nın Optimum pH Aralığı.....	72
3.6.2.2.	V380F Mutant GI' nın Optimum Sıcaklık Aralığı	73
3.6.2.3.	V380F Mutant GI' ya Ait Kinetik Veriler	73
3.7.	V380F - I372V Mutant GI' nın Saflaştırması ve Karakterizasyonu.....	74
3.7.1.	V380F - I372V Mutant GI' nın Saflaştırılması.....	74
3.7.1.1.	Kaba Ekstrakt Uygulaması	74
3.7.1.2.	Isı Şoku ile Denetrasyon Uygulaması.....	75
3.7.1.3.	DEAE - İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması	76
3.7.1.4.	Fenil Sefaroz Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması	77
3.7.1.5.	V380F - I372V Mutant GI' nın Saflaştırma Verileri	78
3.7.1.6.	V380F- I372V Mutant GI' nın Saflaştırılmasına ait SDS - PAGE Analiz	78
3.7.2.	V380F - I372V Mutant GI' nın Karakterizasyonu	79
3.7.2.1.	V380F - I372V Mutant GI' nın Optimum pH Aralığı	79
3.7.2.2.	V380F - I372V Mutant GI' nın Optimum Sıcaklık Aralığı.....	79
3.7.2.3.	V380F - I372V Mutant GI' ya Ait Kinetik Veriler.....	80
3.7.3.	W137F - V184S - V380F Mutant Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu	81

3.7.4.	W137F - V184S - V380F Mutant GI' nin Saflaştırılması	81
3.7.4.1.	Kaba Ekstrakt Uygulaması	81
3.7.4.2.	Isı Şoku ile Denetrasyon Uygulaması.....	81
3.7.4.3.	DEAE - İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması.....	82
3.7.4.4.	Fenil Sefaroz Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması	83
3.7.4.5.	W137F - V184S - V380F Mutant GI' nin Saflaştırma Verileri.....	84
3.7.4.6.	W137F - V184S - V380F Mutant GI' nin Saflaştırılmasına ait SDS - PAGE Analizi.....	84
3.7.5.	W137F - V184S - V380F Mutant GI' nin Karakterizasyonu	85
3.7.5.1.	W137F - V184S - V380F Mutant GI' nin Optimum pH Aralığı.....	85
3.7.5.2.	W137F - V184S - V380F Mutant GI' nin Optimum Sıcaklık Aralığı.....	85
3.7.5.3.	W137F - V184S - V380F Mutant GI' ya Ait Kinetik Veriler	86
3.7.6.	W137F - V184S - I372V Mutant Enziminin Saflaştırması ve Karakterizasyonu	87
3.7.7.	W137F - V184S - I372V Mutant GI' nin Saflaştırılması	87
3.7.7.1.	Kaba Ekstrakt Uygulaması	87
3.7.7.2.	Isı Şoku ile Denetrasyon Uygulaması.....	87
3.7.7.3.	DEAE - İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması.....	88
3.7.7.4.	Fenil Sefaroz Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması	89
3.7.7.5.	W137F - V184S - I372V Mutant GI' nin Saflaştırma Verileri.....	90
3.7.7.6.	W137F - V184S - I372V Mutant GI' nin Saflaştırılmasına ait SDS - PAGE Analizi.....	90
3.7.8.	W137F - V184S - I372V Mutant GI' nin Karakterizasyonu	91
3.7.8.1.	W137F - V184S - I372V Mutant GI' nin Optimum pH Aralığı.....	91
3.7.8.2.	W137F - V184S - I372V Optimum Sıcaklık Aralığı.....	92
3.7.8.3.	W137F - V184S - I372V Mutant GI' ya Ait Kinetik Veriler	92
4.	TARTIŞMA	94
4.1.	Mutasyonların Değerlendirilmesi	97
4.1.1.	D398S Mutasyonunun Değerlendirilmesi.....	98
4.1.2.	I323V Mutasyonunun Değerlendirilmesi	99
4.1.3.	I372V ve I372Q Mutasyonlarının Değerlendirilmesi	100
4.1.4.	V380F Mutasyonunun Değerlendirilmesi.....	102
4.1.5.	V380F - I372V Mutasyonunun Değerlendirilmesi	104
4.2.	W137F - V184S - V380F Mutasyonunun Değerlendirilmesi.....	105
4.3.	W137F - V184S - I372V Mutasyonunun Değerlendirilmesi.....	106

5. ÖNERİLER.....	107
KAYNAKLAR	116
ÖZGEÇMİŞ	118



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	GI' nın katalizlediği D- glukoz D- fruktoz izomerizasyonu	4
Şekil 2.	GI'nın tek alt ünite yapısı	9
Şekil 3.	<i>A. gonensis</i> glukoz izomerazının bir alt ünitesinin sekonder yapısı	14
Şekil 4.	Bazı Tip 2 Glukoz izomerazların amino asit dizi benzerliği	15
Şekil 5.	<i>E. coli</i> genlerinin üretilmesinde tercih edilen kodon kullanımı	21
Şekil 6.	Mutasyon primerlerinin dizaynı.....	22
Şekil 7.	Long PCR uygulaması	24
Şekil 8.	AgoGI' nın Kaba Ekstrakt uygulamasına ait analiz sonuçları.....	36
Şekil 9.	AgoGI' nın ısı şoku ile denatrasyon sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları.....	37
Şekil 10.	AgoGI' ya ait DEAE - İyon Değişim Kolon Kromatografisi uygulaması grafiği.....	37
Şekil 11.	AgoGI' ya ait İyon Değişim Kolon Kromatografisi sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları.....	38
Şekil 12.	AgoGI' ya ait Fenil Sefaroz Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi grafiği.....	39
Şekil 13.	AgoGI' ya ait Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları	40
Şekil 14.	AgoGI' nın saflaştırılmasına ait SDS-PAGE analizi	41
Şekil 15.	AgoGI' nın Optimum pH Grafiği.....	41
Şekil 16.	AgoGI' nın Optimum Sıcaklık Grafiği	42
Şekil 17.	AgoGI' ya ait Michaelis - Menten eğrisi.....	43
Şekil 18.	D398S' nin Kaba ekstrakt uygulaması sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları.....	43
Şekil 19.	D398S' nin Isı Şoku ile Saflaştırma sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları.....	44
Şekil 20.	D398S' ye ait İyon Değişim Kolon Kromatografisi uygulaması grafiği	44
Şekil 21.	D398S' ye ait İyon Değişim Kolon Kromatografisi sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları.....	45
Şekil 22.	D398S' ye ait Fenil Sefaroz Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi uygulaması grafiği	45
Şekil 23.	D398S' ye ait Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları	46
Şekil 24.	D398S' nin saflaştırılmasına ait SDS - PAGE analizi	47
Şekil 25.	D398S' nin Optimum pH Grafiği	47

Şekil 26.	D398S' nin Optimum Sıcaklık Grafiği	48
Şekil 27.	D398S mutant enzimine ait Michaelis - Menten eğrisi	49
Şekil 28.	I323V' nin Kaba Ekstraktından elde edilen özüte ait analiz sonuçları	50
Şekil 29.	I323V' nin Isı Şoku sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları	50
Şekil 30.	I323V' ye ait İyon Değişim Kolon Kromatografisi uygulaması grafiği.....	51
Şekil 31.	I323V' ye ait İyon Değişim Kolon Kromatografisi sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları.....	51
Şekil 32.	I323V' ye ait Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi uygulaması grafiği	52
Şekil 33.	I323V' ye ait Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları	52
Şekil 34.	I323V' nin saflaştırılmasına ait SDS - PAGE analizi	53
Şekil 35.	I323V' nin Optimum pH Grafiği	54
Şekil 36.	I323V' nin Optimum Sıcaklık Grafiği	54
Şekil 37.	I323V mutant enzimine ait Michaelis - Menten eğrisi	55
Şekil 38.	I372Q' nun Kaba ekstraktından alınan özüte ait analiz sonuçları	56
Şekil 39.	I372Q' nun Isı Şoku sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları	57
Şekil 40.	I372Q' ya ait İyon Değişim Kolon Kromatografisi uygulaması grafiği.....	57
Şekil 41.	I372Q' ya ait İyon Değişim Kolon Kromatografisi sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları.....	58
Şekil 42.	I372Q' ya ait Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi uygulaması grafiği	58
Şekil 43.	I372Q' ya ait Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları	59
Şekil 44.	I372Q' nun saflaştırılmasına ait SDS - PAGE analizi	60
Şekil 45.	I372Q' nun Optimum pH Grafiği	60
Şekil 46.	I372Q' nun Optimum Sıcaklık Grafiği	61
Şekil 47.	I372Q mutant enzimine ait Michaelis - Menten eğrisi	61
Şekil 48.	I372V' nin Kaba ekstraktından elde edilen özüte sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları.....	62
Şekil 49.	I372V' nin Isı Şoku sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları	63
Şekil 50.	I372V' ye ait İyon Değişim Kolon Kromatografisi uygulaması grafiği.....	63
Şekil 51.	I372V' ye ait İyon Değişim Kolon Kromatografisi sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları.....	64
Şekil 52.	I372V' ye ait Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi uygulaması grafiği	64

Şekil 53.	I372V' ye ait Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları	65
Şekil 54.	I372V' nin Saflaştırılmasına ait SDS - PAGE analizi	66
Şekil 55.	I372V' nin Optimum pH Grafiği	66
Şekil 56.	I372V' nin Optimum Sıcaklık Grafiği	67
Şekil 57.	I372V mutant enzimine ait Michaelis - Menten eğrisi	67
Şekil 58.	V380F' nin Kaba Ekstraktından elde edilen özüte ait analiz sonuçları	68
Şekil 59.	V380F' nin Isı Şoku sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları	69
Şekil 60.	V380F' ye ait İyon Değişim Kolon Kromatografisi uygulaması grafiği	69
Şekil 61.	V380F' ye ait İyon Değişim Kolon Kromatografisi sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları	70
Şekil 62.	V380F' ye ait Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi uygulaması grafiği	70
Şekil 63.	V380F' ye ait Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları	71
Şekil 64.	V380F' nin Saflaştırılmasına ait SDS - PAGE Analizi	72
Şekil 65.	V380F' nin Optimum pH Grafiği	72
Şekil 66.	V380F' nin Optimum Sıcaklık Grafiği	73
Şekil 67.	V380F Mutant enzimine ait Michaelis - Menten eğrisi	74
Şekil 68.	V380F - I372V' nin Kaba ekstraktından alınan özüte ait analiz sonuçları	75
Şekil 69.	V380F - I372V' nin Isı Şoku sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları	75
Şekil 70.	V380F - I372V' ye ait İyon Değişim Kolon Kromatografisi uygulaması grafiği	76
Şekil 71.	V380F - I372V' ye ait İyon Değişim Kolon Kromatografisi sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları	76
Şekil 72.	V380F - I372V' ye ait Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi uygulaması grafiği	77
Şekil 73.	V380F - I372V' ye ait Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları	77
Şekil 74.	V380F - I372V' nin Saflaştırılmasına ait SDS-PAGE analizi	78
Şekil 75.	V380F - I372V' nin Optimum pH Grafiği	79
Şekil 76.	V380F - I372V' nin Optimum Sıcaklık Grafiği	80
Şekil 77.	V380F - I372V mutant enzimine ait Michaelis - Menten eğrisi	80
Şekil 78.	W137F - V184S - V380F' nin kaba ekstraktından elde edilen özüte ait analiz sonuçları	81

Şekil 79.	W137F - V184S - V380F' nin Isı Şoku sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları	81
Şekil 80.	W137F - V184S - V380F' ye ait İyon Değişim Kolon Kromatografisi uygulaması grafiği	82
Şekil 81.	W137F - V184S - V380' ye ait İyon Değişim Kolon Kromatografisi sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları.....	82
Şekil 82.	W137F - V184S - V380F' ye ait Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi uygulaması grafiği	83
Şekil 83.	W137F - V184S - V380F' ye ait Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları	83
Şekil 84.	W137F - V184S - V380F' nin Saflaştırılmasına ait SDS – PAGE analizi.....	84
Şekil 85.	W137F - V184S - V380F' nin Optimum pH Grafiği	85
Şekil 86.	W137F - V184S - V380F' nin Optimum Sıcaklık Grafiği	86
Şekil 87.	W137F - V184S - V380F mutant enzimine ait Michaelis - Menten eğrisi.....	86
Şekil 88.	W137F - V184S - I372V' nin Kaba ekstraktından elde edilen özüte özüte ait analiz sonuçları.....	87
Şekil 89.	W137F - V184S - I372V' nin Isı Şoku sonrası elde edilen özüte özüte ait analiz sonuçları	88
Şekil 90.	W137F - V184S - I372V' ye ait İyon Değişim Kolon Kromatografisi uygulaması grafiği	88
Şekil 91.	W137F - V184S - I372V' ye ait İyon Değişim Kolon Kromatografisi sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları.....	89
Şekil 92.	W137F - V184S - I372V' ye ait Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi uygulaması grafiği	89
Şekil 93.	W137F - V184S - I372V' ye ait Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları	90
Şekil 94.	W137F - V184S - I372V' nin saflaştırılmasına ait SDS – PAGE analizi.....	91
Şekil 95.	W137F - V184S - I372V' nin Optimum pH Grafiği	91
Şekil 96.	W137F – V184S – I372V'nin Optimum Sıcaklık Grafiği.....	92
Şekil 97.	W137F - V184S - I372V mutant enzimine ait Michaelis - Menten eğrisi.....	93
Şekil 98.	D398S mutasyonuna ait üç boyutlu modelleme	98
Şekil 99.	D398S' nin Isıl Kararlılık grafiği.....	99
Şekil 100.	I323V mutasyonuna ait üç boyutlu modelleme	99
Şekil 101.	I323V' nin Isıl Kararlılık grafiği.....	100
Şekil 102.	I372V mutasyonuna ait üç boyutlu modelleme	100

Şekil 103.	I372V' nin Isıl Kararlılık grafiği.....	101
Şekil 104.	I372Q' nun ısı kararlılık grafiği.....	102
Şekil 105.	V380F mutasyonuna ait üç boyutlu modelleme	102
Şekil 106.	V380F mutasyonun α - heliks tabakalara etkisi	103
Şekil 107.	V380F' nin Isıl Kararlılık grafiği.....	103
Şekil 108.	V380F - I372V' nin Isıl Kararlılık grafiği	104
Şekil 109.	W137F - V184S - V380F' nin Isıl Kararlılık Grafiği	105
Şekil 110.	W137F - V184S - I372V' nin ısı kararlılık grafiği.....	106



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1.	Enzimlerin genel kullanım alanları ve kaynak organizmaları	2
Tablo 2.	Çeşitli enzimlerin kaynak organizmaları ve kullanımları	3
Tablo 3.	Bazı organizmalara ait GI' ların alt ünite yapıları	8
Tablo 4.	Bazı organizmaların optimum sıcaklık değerleri	10
Tablo 5.	Bazı organizmalara ait GI' ların optimum pH değerleri	10
Tablo 6.	Farklı organizmaların kullandığı metal ve iyonlar	11
Tablo 7.	Bazı organizmaların inhibitörleri	12
Tablo 8.	Bazı organizmaların kullandığı substratlar	12
Tablo 9.	Bazı GI' ların doğal substratları	13
Tablo 10.	Glukoz izomeras aktivitesine sahip olan bazı organizmalar	17
Tablo 11.	Mutasyon çalışmalarında kullanılan primer çiftleri	23
Tablo 12.	Optimum pH deneylerinde kullanılan tampon sistemleri	34
Tablo 13.	AgoGI' nin saflaştırma basamaklarına ait saflaştırma verileri	40
Tablo 14.	D398S Mutant GI' nin saflaştırma verileri	46
Tablo 15.	I323V' nin saflaştırma basamaklarına ait saflaştırma tablosu	53
Tablo 16.	I372Q' nun Saflaştırma Basamaklarına ait Saflaştırma Tablosu	59
Tablo 17.	I372V' nin Saflaştırma Basamaklarına ait Saflaştırma Tablosu	65
Tablo 18.	V380F' nin Saflaştırma Basamaklarına ait Saflaştırma Tablosu	71
Tablo 19.	V380F - I372V' nin Saflaştırma Basamaklarına ait Saflaştırma Tablosu ...	78
Tablo 20.	W137F - V184S - V380F' nin Saflaştırma Basamaklarına ait Saflaştırma Tablosu	84
Tablo 21.	W137F - V184S - I372V' nin Saflaştırma Basamaklarına ait Saflaştırma Tablosu	90
Tablo 22.	Mutasyonların tasarlanmasında kullanılan GI' lara ait amino asit dizilimi karşılaştırması	96
Tablo 23.	Kinetik hesaplamalar	97
Tablo 24.	V380F - I372V Mutasyonunun Değerlendirilmesi	104
Tablo 25.	W137F - V184S - V380F mutasyonunun değerlendirilmesi	105
Tablo 26.	W137F - V184S - I372V mutasyonunun değerlendirilmesi	106

SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<i>Ago</i> GI	Rekombinant Olarak Üretilen Yaban Tip GI
pETG2GI	Vektör Plazmit
bp	Baz Çifti
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	Etilendiamin Tetraasetikası
K_m	Michaelis-Menten Sabiti
LB	Luria-Bertani
mM	Milimolar
μ M	Mikromolar
V_{maks}	Maksimum Hız
RT	Reaksiyon Tamponu
HFCS	Yüksek Fruktoz İçerikli Mısırsı Şurubu
BSA	Bovine Serum Albümin
DEAE	Dietil Aminoetil
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksi Nükleotid Trifosfat
GI	Glukoz İzomeraz
HCl	Hidroklorik Asit
CoCl ₂	Kobalt Klorür
HFCS	High Fructose Corn Syrup
IPTG	İzopropil β -D-1- Tiyogalaktopiranosid
M	Molar
MOPS	3-(N-Morfolino) Propansülfonik Asit
NAD ⁺	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
Nm	Nanometre
ml	Mikrolitre
PCR	Polimer Zincir Reaksiyonu
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Kimyasal tepkimelerde katalizör görevini üstlenen bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenen çoğunlukla protein yapılı moleküllere enzim denir. Enzimler; canlılık döngüsüne zarar vermeden, yapısal değişim göstermeden biyokimyasal olayların hızını arttırabilirler ve biyolojik sistemdeki reaksiyonların oluşmasına imkân sağlarlar. Enzimler protein yapıda olduğu için yüksek sıcaklıklarda 3 boyutlu yapıları değişir ve etkilerini kaybederler (Bhat, 2000).

Enzimlerin tarihçesi çok eskiye dayanmaktadır. Eskiden toplumlar şarap, peynir ve ekmek gibi birçok fermente ürünü enzimler sayesinde yapabilmıştır. 1897 yılında Buchner hücreden enzimin ayrıştırılabileceğini ilk kez ortaya atmıştır. Küf enzimlerinin ticari olarak ilk kullanımı 20. yy. başlarında, bakteriyel enzimlerin kullanımı ise 1. Dünya Savaşı sırasında olmuştur (Casida, 1968). Endüstriyel enzimlerin kullanımı yavaş bir süreçte gerçekleşmiştir ve artan taleple birlikte hızla yükselmeye başlamıştır. Geliştirilen yeni yöntemler ile birlikte enzimlerin mikrobiyal üretimi yakın geçmişte önem kazanmıştır.

1998 yılında endüstriyel enzim pazarı yaklaşık 1,6 milyar dolara ulaşmıştır (tanısal ve tedavi edici özellikteki enzimler dâhil edilmemiştir). 2000 yılında bu miktar 2 milyar dolara ulaşırken, günümüze kadar pazar payı her sene %10 - 15 artarak büyümeye devam etmektedir (Barredo, 2005). Ticari önemi olan enzimler mikrobiyal fermantasyon işlemi ile büyük ölçekte üretilmektedir. Bunlara örnek olarak proteinleri (proteazlar), yağları (lipazlar) ve nişastayı (amilaz) parçalayan enzimler verilebilir. Endüstriyel önemi büyük olan fruktoz üretiminde kullanılan glukoz izomeraz ile yarı - sentetik penisilinlerin endüstriyel olarak yapımında kullanılan penisilin açılaz da örnek verilebilir (Crabb ve Shetty, 1999; Van der Maarel vd., 2002). Enzimler bunların yanı sıra; süt ürünlerinin üretiminde, biracılıkta, etlerin işlenmesinde, deterjan endüstrisinde, tekstil ve tıp gibi başlıca alanlarda kullanılmaktadır.

Enzimlerin genetik manipölasyonlarla hem intraselöler (hücre içi) hem de ekstraselöler (hücre dışı) ortamlarda üretimi binlerce kat arttırılabilir, aktiviteleri ve yapıları değıştirilerek yeni ürünlerin yapımında kullanılabilirler (Barredo, 2005). Tablo 1 ve Tablo 2’ de enzimlerin kullanım alanları ve kaynak organizmaları verilmiştir.

Tablo 1. Enzimlerin genel kullanım alanları ve kaynak organizmaları

Endüstri	Enzim	Kullanım Alanları
Bira Endüstrisi	Amilaz, Proteaz Glukanaz β -glukanaz	Nışasta, protein, şeker ve amino asitlerin yıkımı (malt oluşumu) Mayanın berraklaştırılması ve parçalanması.
Tekstil	Bakteriyel Amilaz	Dokumadan önce nışasta banyosuna batırılan ipliklerden nışastanın uzaklaştırılması.
Deri	Mikrobiyal Tripsin	Deriden tüy veya kılların uzaklaştırılması.
Tıp	Tripsin	Kan pıhtılarının eritilmesi ve yaraların temizlenmesi.
Tarım ve Orman	Ligninaz	Odunsu atıklardaki lignoselölözik yapıdaki selölözün hayvanların kullanmasını sağlamak ve endüstriyel organik substrat olarak kullanmak.
Ekmek ve Pasta Endüstrisi	Proteaz, Maya α -amilazı	Bisküvi üretimi için düşük proteinli un üretimi. Undaki nışastanın şekerlere yıkılması ve mayanın kullanıma hazır olması.
Süt Ürünleri	Hayvan türevli renin Mikrobiyal renin Lipaz	Peynir imalatı, <i>Penicillium roquoferti</i> ' den izole edilen hücre dışı lipaz özel peynir üretiminde.

Tablo 2. Çeşitli enzimlerin kaynak organizmaları ve kullanımları

Enzim	Kullanım Alanı	Mikroorganizma
α -amilaz	Maltoz yıkılması	<i>Bacillus subtilis</i>
	Leke çıkarıcı	<i>Aspergillus oryzae</i>
	Glukoz şurubu	<i>B. licheniformis</i>
β -glukanaz	Unun zenginleştirilmesi	<i>Aspergillus oryzae</i>
	Biranın berraklaştırılması	<i>Bacillus subtilis</i>
		<i>E. coli</i>
Glukoz izomeraz	Glukoz- fruktoz dönüşümü	<i>Streptomyces spp.</i> <i>Aspergillus spp.</i>
Selülaz	Deterjan katkı maddesi Atıkların değerlendirilmesi	<i>Penicillium spp.</i>
Katalaz	İçeceklerin bozulmasını önlemede	<i>Aspergillus niger</i>
Sukraz (invertaz)	Şekerleme endüstrisi	<i>Saccharomyces spp.</i>
Proteaz	Deterjan katkı maddesi	<i>Bacillus subtilis</i>
Glukoz oksidaz	Deri endüstrisi	<i>Aspergillus niger</i>
Renin	Peynir Endüstrisi	<i>Kluyveromyces lactis</i>
		<i>Mucor spp.</i>

1.2. Glukoz İzomerazın Genel Özellikleri ve Önemi

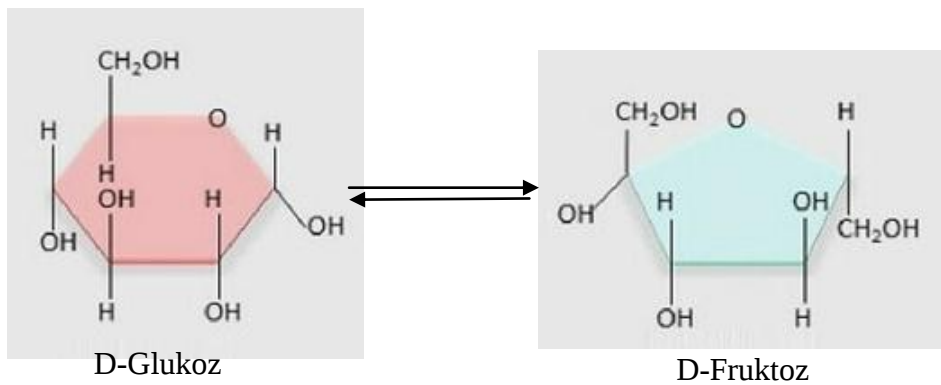
Glukoz izomeraz (GI) (EC 5.3.1.5), ksiloz izomeraz, ketol izomeraz olarak da isimlendirilen, yaşamsal faaliyetleri için ksilozu kullanan, birçok mikroorganizma tarafından sentezlenen intraselüler (hücre içi) bir enzimdir. GI, D- ksilozun D- ksiluloza ve D- glukozun D- fruktoza dönüşümlü izomerizasyonunu katalizler (Bhosale vd., 1996; Chen, 1980). Substratları L- arabinoz, L- ramnoz, D- riboz, D- alloz ve D- mannoz olarak sayılabilmektedir (Pastine vd., 1999; Pastinen vd., 1999; Sanchez ve Smiley, 1975; Yamanaka, 1968; Santa, H. vd., 2005). Günümüze kadar tatlı sularda, toprak ve denizlerde yaşayan birçok aerobik ve anaerobik mikroorganizmada (*Lactobacillus reuteri*, *Thermus thermophilus*, *Vibrio sp.*) ve bazı ökaryotik canlılarda (*Hordeum vulgare*, Kristo vd.,1996) GI' nin varlığı tespit edilmiş ve çalışılmıştır.

Enzimlerin aktivite göstermesi için optimum koşulların gerçekleşmesi gerekmektedir. Optimum koşullar, enzimlerin maksimum performans gösterdikleri olaylar bütünüdür. GI' nin optimum sıcaklık çalışma aralığı atmosferik basınçta,

enzimi üreten mikroorganizmaların büyüme koşulları ile doğru orantılı olarak 30 - 95°C, optim pH aralığı ise 2 - 11 arasında değişim gösterebilmektedir (Carell,1989).

Glukoz izomerazların neredeyse tümünde benzer yapısal özellikler gözlemlenmiştir; birbirine benzeyen tetramer veya dimerlerden oluşan yapılar, ortalama 173.000 dalton civarında moleküler ağırlıkları (Carell, 1989) ve çok iyi korunmuş aktif bölgeye sahip olmaları (Mireia vd., 2002) olarak belirtilebilir. Bütün GI' lar, kararlı yapıda olmak ve maksimum aktivite gösterebilmek için Mn^{+2} , Cr^{+2} , Co^{+2} gibi bivalent katyonlara gereksinim duyar. Cu^{+2} , Zn^{+2} , Ni^{+2} , Ca^{+2} gibi iyonlar enzimi inhibe etmektedir (Bogumil vd., 1993; Brown vd., 1993; Karaoglu vd., 2013; Yanmis vd., 2014; Xu vd., 2014).

Glukoz izomerazlar iki tip olarak tanımlanır. Birinci tipteki glukoz izomerazların amino ucunda 50 amino asitlik fazladan bir bölge bulunur, tip ikide ise bu bölge bulunmamaktadır (Hartley vd., 2000; Xu vd., 2009; Karaoglu vd.,2013; Yanmis vd., 2014). Enzimin kristal yapısı, *Arthrobacter* (Henrik ve Collyer, 1989; Xu vd., 2014), *Actinoplanes missouriensis* (Rey vd., 1988), *Streptomyces rubiginosus* (Whitlow vd., 1991) ve *Streptomyces murinus* (Rasmussen vd., 1994) gibi birçok mikroorganizmada ve ayrıca bazı mutant enzimlerde (Xu vd., 2009; Xu vd., 2014) açığa çıkartılmıştır. Şekil 1' de GI' nın izomerizasyon dönüşümü verilmiştir.



Şekil 1. GI' nın katalizlediği D- glukoz D- fruktoz izomerizasyonu

GI, glukozu fruktoza izomerize etmesi sebebiyle endüstriyel alanda, özellikle HFCS (High Fructose Corn Syrup) üretiminde ticari bir öneme sahiptir. Fruktoz şurubu, %42 veya 55 fruktoz içeren tatlı, besleyici sakkarit karışımı olup, mısır nişastasındaki

glukozun GI kullanılarak fruktoza dönüştürülmesi ile elde edilen bir üründür (Antrim vd., 1979; Knorr, 1987; Bandlish vd., 2002; Mu vd., 2012). Bu enzimin ticari kullanımının olmadığı yıllarda yiyeceklerde tatlandırıcı olarak sakkaroz (sukroz) tercih edilmekteydi. Fakat Küba Devriminde Küba' ya konulan ambargolar gıda endüstrisinde yeterli sukroz bulunamaması ile sonuçlandı. Bu sebeple 1960' lı yıllarda zaten keşfedilmiş olan GI' nın değerlendirilmesi ile fruktoz şuruplarının kullanımı gündeme gelmiştir (Bhosale, 1996). GI hala tercih edilen bir enzimdir. Bunun nedeni enzimin artan talebi karşılaması, yüksek tonajlarda üretilmesi, kolay çalışılması ve endüstriyel alanda geliştirilebilmesi olarak sayılabilir (Karaoglu vd., 2013; Yanmis vd., 2014).

Marshall ve Kooi' nin *Pseudomonas hydrophyla*' dan elde etmiş oldukları glukoz izomeraz, şeker kamışının yerine geçmiş ve HFCS kullanımında bu enzimin ilk çalışmalarının önünü açmıştır. Böylelikle bir dönemin başlangıcını oluşturmuşlardır. İlerleyen yıllarda *Escherichia intermedia*' da ksiloz izomeraz aktivitesi bulunmuştur (Natake ve Yoshimura, 1964). Glukoz izomeraz, günümüzde en çok ihtiyaç duyulan proteaz ve amilaz gibi yüksek tonajlı 3 enzimden biridir.

Endüstriyel alanda ilk olarak 1957 yılında Amerika' da Clinton Corn Processing Co. tarafından enzimatik olarak glukozun izomerizasyonu gerçekleştirildi, 1974 yılında immobilize edilmiş glukoz izomeraz ticari olarak elde edilebilir hale geldi. Yiyecek endüstrisinde HFCS' ye olan talebin artmasıyla birlikte batıda şekerlerle uğraşan büyük ölçekli şirketler glukoz izomeraz yeniliğine başvurdu (Bhosale vd., 1996). İçerdiği endüstriyel öneminden ötürü bugüne kadar birçok organizmanın glukoz izomerazı incelenmiş (Brown vd.,1993; Chen,1980; 1989; Lee vd., 1993; Suekane, 1978) ve birçok bakterinin *xyla* geni gen bankasına aktarılmıştır (Amore ve Hollenberg, 1989; Drocourt vd., 1988; Bor vd., 1992; Briggs vd., 1984; Collyer ve Blow, 1990; Dekker vd., 1991; Lee vd., 1990; Wilhelm ve Hollenberg, 1985; Maedeu vd., 1994; Saari vd., 1987).

GI endüstriyel alanda yoğun bir şekilde çalışılmasının yanı sıra, akademik çalışmalar arasında da en fazla çalışılan konulardan biri olmaktadır. Wiseman' a göre, GI gelecekteki bütün endüstriyel enzimlerin arasında en önemlisi olabilir. 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). Bunlara benzer bir glukoz izomeraz olan, glukoz ve mannozun fruktoza izomerizasyonunu gerçekleştiren *Paracolobacterium aerogenoides*' den elde edilen glukoz izomerazdır (Takasaki ve Tanabe, 1962; Takasaki ve Tanabe, 1964; Takasaki ve Tanabe.1966). Aktivite gösteren glukoz izomerazlardan EC (5.3.1.5) numaralı enzimler, ticari uygulamalarda en çok tercih edilen enzimdir.

HFCS üretiminde fruktoz - glukoz dengesinin oluşması sıcaklıkla ilişkilidir. Mezofilik organizmalardan elde edilen glukoz izomerazlar yaklaşık olarak %40 - 45 oranında fruktoz üretebilmektedir. Endüstriyel uygulamalarda kullanılan HFCS' de %50 fruktoz içeriği istenmektedir. Kromatografik yöntemler kullanılarak bu oranın %50' lere çıkması sağlanır fakat bu yöntemlerin uygulanması yüksek maliyet gerektirmektedir. Bu yüzden bu tip uygulamalarda termofilik organizmalardan elde edilen glukoz izomerazlar kullanılmaya başlanmıştır. Sıcaklığın artması ile birlikte fruktoz - glukoz dengesi fruktoz tarafına doğru geçer ve böylelikle pahalı kromatografik yöntemlerin kullanılmasına gerek kalmaz (Karaoglu vd., 2013; Xu vd., 2014; Yanmis vd.,2014).

Yüksek sıcaklıklarda çalışan enzimin avantajlı olmasının yanı sıra, yüksek pH değerlerinde yüksek sıcaklık uygulanması, ortaya istenmeyen asidik yan ürünlerin oluşmasını sağlar (mannoz, psikoz) ve bu durum yapılacak olan uygulama için dezavantaj olarak görülmektedir. Bu sebeple düşük pH değerlerinde çalışacak enzime ihtiyaç duyulmaktadır (Karaoglu vd., 2013; Xu vd., 2014).

HFCS' ler tatlı (Pomerans, 1985), daha az kristalleşme ve düşük viskositeye sahip olması sebebiyle kullanıcılar için taşıma, depolama sırasında avantaj bulunduran geniş fonksiyonlu ürünlerdir. En önemli işlevsel özellikleri; fermente edilebilir şekerler açısından zengin olmaları (Henry, 1976), ozmotik basınçlarının yüksek olması (Hobbs, 1986), lezzeti geliştirici özellikleri (CRA., 1994) ve nemi tutarak kurumayı önlemeleridir (Pomeranz 1985). Bu gibi özelliklerinin olması sebebiyle HFCS yoğunlukla fırın ürünleri, gazlı ve gazsız içecekler, çeşitli süt mamulleri, hububat ürünleri ve işlenmiş gıdalar gibi geniş kapsamlı alanlarda kullanılabilir (Wulff ve Helgeson, 1987). Su aktivitesini azaltıcı özelliğinden yararlanılmasıyla salamura ürünlerinde de kullanılmaktadır (Hobbs, 1986). HFCS; ekmek, kek, bisküvi, kurabiye,

tart dolguları ve jölelerde de tercih edilmektedir (Pomeranz,1985). Tatlı tat vermelerinin yanı sıra gıdalarda lezzetin gelişmesini de sağlamaktadır. Fruktozun dil üzerindeki hücreler tarafından algılanma yoğunluğu sakkarozu göre çok daha yüksektir ve hissedilme süresi daha kısadır. Bu sebeple fruktoz şurupları gıdalarda belirli lezzet özelliklerinin algılanmasında ve geliştirilmesinde etkilidir (Howling, 1992).

HFCS, glukozdan 1,7 kat ve sakarozdan 1,3 kat daha fazla tatlılık veren bir üründür. Tatlı olmayan bir ürün olan nişastadan üretildiği göz önünde bulundurulduğunda ve tatlandırma kapasitesine bakıldığında, sakarozdan %10 - 20 kat daha fazla ucuzdur. Ayrıca D- fruktoz diyabetik bir tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır. Bunun sebebi fruktozun midede çok yavaş emilim göstermesi ve kandaki glukoz seviyesini etkilememesidir (Bhosale vd., 1996).

1.3. Glukoz İzomerazın Yapısal Özellikleri

Farklı mikroorganizmalardan izole edilmiş GI' ların biyokimyasal ve enzimatik özellikleri detaylı şekilde çalışılmıştır. Enzimin ticari olarak kullanılabilmesi için; yapısı, optimum sıcaklık, optimum pH, pH kararlılığı, ısı kararlılığı, katalizör ve inhibitör özelliği, substrat seçimi ve immobilizasyonu gibi spesifik özelliklerinin bilinmesi ve bunların geliştirilmesi enzimin ticari olarak kullanılmasında büyük önem taşımaktadır.

1.3.1. Enzimin Alt Ünite Yapısı

Amino asit ve alt ünite yapılarına bakıldığında GI' lar birbirine benzer veya aynı 2 ya da 4 alt ünitelerden oluşmaktadır. Bu alt üniteler birbirine kovalent bağ içermeyen etkileşimler ile bağlı olduğu belirlenmiştir. GI' nın çökme katsayısı 7,55 - 11,45 moleküler ağırlıkları ise 52.000 - 191.000 dalton arasında değişiklik gösterir (Chen, 1980).

Yapılan çalışmalara göre enzimin biyolojik aktivitesinde rol oynayan birimlerinin dimer ya da tetramer yapıda olduğu, monomerik yapıda olan ünitelerin tek başlarına biyolojik aktivite göstermedikleri belirlenmiştir (Gaikwad vd., 1992; Rangarajan vd.,

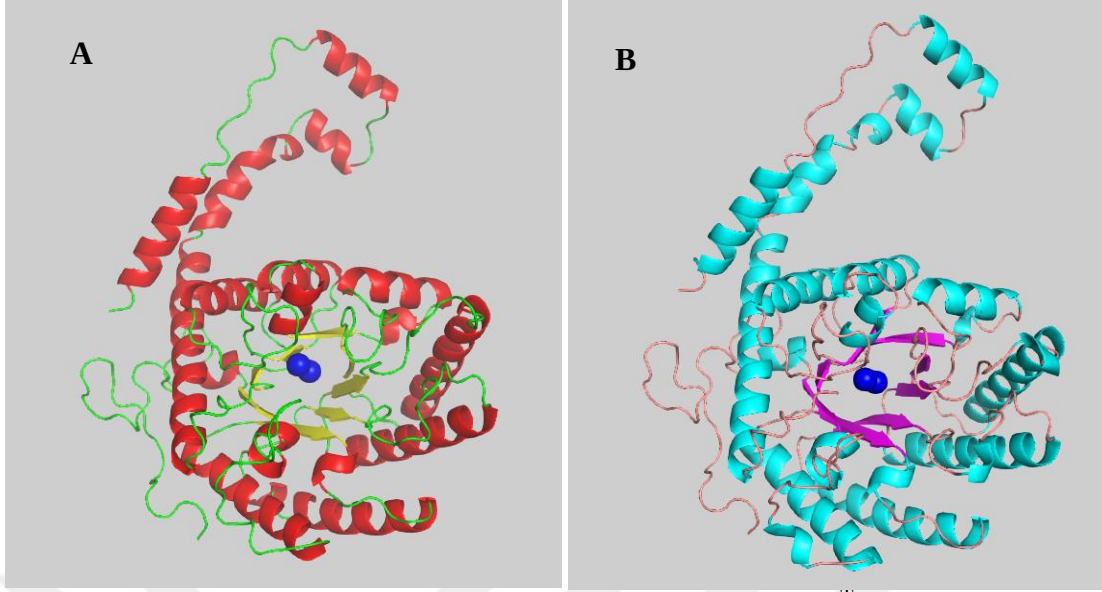
1992). Bu enzimin alt ünitelerin birbirinin aynısı olabileceği gibi birbirinden farklı alt ünitelerinde olabileceği de tespit edilmiştir. Tablo 3’ te bazı organizmalara ait GI’ ların alt ünite yapıları verilmektedir.

Tablo 3. Bazı organizmalara ait GI’ ların alt ünite yapıları

Organizma	Moleküler ağırlığı	Alt Ünite sayısı	Referans
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	130000	1	(Suekane, M vd., 1978)
<i>Opuntia vulgaris</i>	66000	1	(Ravikumar, S vd., 2011)
<i>Opuntia ficus-indica</i>	66000	1	(Ravikumar, S vd., 2011)
<i>Bacillus sp.</i>	58000	2	(Kwon, H.J vd., 1987)
<i>Escherichia coli</i>	44000	2	(Tucker, M.Y. vd., 1988)
<i>Thermotoga neapolitana</i>	50000	2	(Hess, J. M. vd., 1998)
<i>Bacillus sp. (in: Bacteria)</i>	50000	3	(Chauthaiwale, J. vd., 1994)
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	53000	3	(Kawai, Y. vd., 1994)
<i>Arthrobacter sp.</i>	47000	4	(Smith, C.A. vd., 1991)
<i>Thermus aquaticus</i>	50000	4	(Lehmbacher, A. vd., 1990)
<i>Streptomyces albus</i>	43000	4	(Hogue-Angeletti, R. A. 1975)
<i>Anoxybacillus gonensis</i>	50047	4	(Karaoglu, H. vd., 2013)

Chauthawale’ nin çalışmış olduğu *Bacillus sp*’ den izole edilmiş hücre dışı GI üç alt birimden oluşmakta (Chauthaiwale ve Rao, 1994), Basuki ve arkadaşlarının varlığını tespit etmiş oldukları *Streptomyces phaeochromogenes*’ de bulunan GI birbirinin farklı 4 alt üniteden oluşmaktadır (Bhosale vd., 1996).

Karaoglu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *Anoxybacillus gonensis*’ de bulunan GI’ nın birbirinin aynı (homotetramer) 4 alt üniteden oluştuğunu bulmuşlardır (Karaoglu, H. vd., 2013). Şekil 2’ de *Anoxybacillus gonensis* G2^T ve *Geobacillus stearothermophilus* glukoz izomerazının 3 boyutlu yapısı verilmektedir.



Şekil 2. GI'nın tek alt ünite yapısı [A) *Anoxybacillus gonensis* G2¹ B) *Geobacillus stearothermophilus* glukoz izomerazı]

1.3.2. Enzimin Optimum Sıcaklık ve pH Özellikleri

Glukoz izomerazın optimum sıcaklık aralığı, enzimin aktivite gösterdiği organizmanın bulunduğu ortama göre 30°C ile 95°C arasında değişim göstermektedir. *Thermotoga neapolitana*' ya ait glukoz izomeraz 95°C' de (Hess, J.M vd., 1998), *Escherichia coli*' ye ait GI 30°C' de (Meijnen, J.P vd., 2008) ve *Anoxybacillus gonensis*' e ait GI 85°C' de (Karaoglu H. vd., 2013) maksimum 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' ların yüksek sıcaklıklarda kararlı halde kalma sürelerinin az olduğu bulunmuştur (Bhosale vd., 1996). Co⁺², nin, GI' nın yüksek sıcaklıklarda kararlı yapıda kalmasını sağladığı tespit edilmiştir. Tablo 4' te bazı organizmaların optimum sıcaklık değerleri verilmektedir.

GI' ların optimum pH değerleri 5,0 - 9,0 arasında değişim gösterir. Bu durum yine elde edilen organizmadaki enzimin çalışma pH' sına göre değişmektedir. Endüstriyel alanda özellikle düşük pH özelliğine sahip enzimler tercih edilmektedir.

Tablo 4. Bazı organizmaların optimum sıcaklık değerleri

Organizma	Optimum Sıcaklık	Referans
<i>Escherichia coli</i>	30°	(Meijnen, J.P. vd., 2008)
<i>Orpinomyces sp.</i>	37°	(Madhavan, A. vd., 2008)
<i>Escherichia coli K-12</i>	45°	(Rozanov, A. vd., 2009)
<i>Bacillus sp.</i>	60°	(Kwon, H.J. vd., 1983-1989 -1987)
<i>Thermus thermophilus</i>	60°	(Xu, W. vd., 2009)
<i>Lactobacillus ruteri</i>	65°	(Staudigl, P. vd., 2014)
<i>Streptomyces flavogriseus</i>	70°	(Chen, W.P. vd., 1979)
<i>Ciona intestinalis</i>	75°	(Ding, M. vd., 2009)
<i>Streptomyces albus</i>	70 - 80°	(Sanchez, S. vd., 1975)
<i>G. stearothermophilus</i>	80°	(Suekane, M. vd., 1978)
<i>T. saccharolyticum</i>	80 - 85°	(Liu, S.Y.vd., 1996)
<i>Anoxybacillus gonensis</i>	85°	(Karaoglu, H. vd., 2013)
<i>Streptomyces corchorusii</i>	85°	(Joo, G.J. vd., 2001)
<i>Thermus caldophilus</i>	90°	(Chang, C. vd., 1999)
<i>Thermotoga neapolitana</i>	95°	(Hess, J.M. vd., 1998)

Örneğin; *Lactobacillus ruteri*' den elde edilen GI pH 5' te (Staudigl vd., 2014), *Bacillus sp.*' den elde edilen GI pH 7' de (Kwon, H.J vd., 1987), *Anoxybacillus gonensis*' ten elde edilen GI ise pH 6,5' te aktivite göstermektedir (Karaoglu H. vd., 2013). Tablo 5' te farklı organizmalardaki GI' ların optimum pH aralıkları verilmektedir.

Tablo 5. Bazı organizmalara ait GI' ların optimum pH değerleri

Organizma	pH	Referans
<i>Lactobacillus ruteri</i>	5	(Staudigl, P. vd., 2014)
<i>Thermus aquaticus</i>	5.5 - 8.5	(Lehmbacher, A. vd., 1990)
<i>Lctobacillus brevis</i>	6 - 7	(Yamanaka, K.; vd., 1975)
<i>Opuntia vulgaris</i>	6 - 8	(Ravikumar, S. vd., 2011)
<i>Actinoplanes missouriensis</i>	6.25	(Van Tillbeurgh, H. vd., 1992)
<i>T. saccharolyticum</i>	6.4	(Liu, S.Y. vd., 1996)
<i>Anoxybacillus gonensis</i>	6.5	(Karaoglu, H. vd., 2013)
<i>Escherichia coli K-12</i>	6.8	(Rozanov, A. vd., 2009)
<i>Bacillus coagulans</i>	7	(Danno, G. vd., 1970)
<i>Bacillus sp. (in: Bacteria)</i>	7- 10	(Kwon, H.J.; vd., 1987)
<i>Vibrio sp.</i>	7.5	(Umemoto, Y. vd., 2012)
<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	8	(Sapunova, L.I. vd., 2006)
<i>Streptomyces sp.</i>	9	(Khire, J.M.vd., 1990)

1.3.3. Enzimin Metal İyonu Gereksinimi ve İnhibitörleri

Glukoz izomerazın maksimum aktivite göstermek için Co^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} gibi bivalent katyonlara ya da bu katyonların kombinasyonlarına gereksinim duyar (Bhosale vd., 1996). Mn^{+2} ve Co^{+2} enzim aktivitesi için gerekli olmasına rağmen farklı görevleri üstlenirler.

Tablo 6. Farklı organizmaların kullandığı metal ve iyonlar

Metal ve İyonlar	Organizma
Co^{+2}	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Anoxybacillus gonensis</i>
Fe^{+2}	<i>Streptomyces rubiginosus</i>
Mg^{+2}	<i>Escherichia coli</i>
Mn^{+2}	<i>Opuntia vulgaris</i> <i>Anoxybacillus gonensis</i>
Zn^{+2}	<i>Thermus aquaticus</i>

Co^{+2} , quarterner yapının sağlanmasından sorumludur (Enzimin istenilen konformasyona gelmesini sağlar), Mn^{+2} ise etkin bir aktivatör görevindedir (Callens vd., 1988; Gaikwad vd., 1992). Tablo 6' da farklı organizmaların kullandığı metal ve iyonları göstermektedir.

GI' nın aktivitesinde rol oynayan; Hg^{+2} , Zn^{+2} , Ni^{+2} , Ag^{+2} , Ba^{+2} , nın yanı sıra, sorbitol, mannitol, arabitol, EDTA, xylitol, lyxose ve TRİS gibi inhibitörler de bulunmaktadır (Bucke, 1983; Smith vd., 1991, Danno, G 1970, Henrick K.1989). Tablo 7' de bazı organizmaların inhibitörlerini göstermektedir.

Tablo 7. Bazı organizmaların inhibitörleri

Inhibitörler	Organizma
2-O-Methyl-D-xylose	<i>Thermus aquaticus</i>
	<i>Anoxybacillus gonensis</i>
Arsenate	<i>Streptomyces rubiginosus</i>
Co ⁺²	<i>Thermus thermophilus</i>
D-Threonohydroxamic acid	<i>Streptomyces rubiginosus</i>
EDTA	<i>Bacillus coagulans</i>
NAD ⁺	<i>Streptomyces sp.</i>
Hg ⁺²	<i>Streptomyces flavogriseus</i>

1.3.4. Enzimin Substrat Seçiciliği

Glukoz izomerazın yaygın kullandığı substratları D - glukoz ve D - ksilozdur. Bunların yanı sıra substrat olarak; D - mannoz, D - arabinoz, L - ramnoz, L - riboz gibi şekerleri de kullanmaktadır. Farklı organizmalardan elde edilmiş enzimlerin substrat seçiciliği tamamen organizmaya özgüdür (Kevin, L.vd., 2005).

Tablo 8. Bazı organizmaların kullandığı substratlar

Substrat	Ürün	Organizma
Alfa - D-glukoz	Alfa - D - fruktoz	<i>Streptomyces rubiginosus</i>
D - fruktoz	D - glukoz	<i>Escherichia coli</i>
D - mannoz	D - fruktoz	<i>Thermus thermophilus</i>
		<i>Bacillus coagulans</i>
D - ksiloz	D - ksiluloz	<i>Anoxybacillus gonensis</i>
		<i>T. thermosulfurigenes</i>
Glukoz	Fruktoz	<i>Anoxybacillus gonensis</i>
D - riboz	L - arabinoz	<i>Actinoplanes missouriensis</i>
D - liksoz	D - ksiluloz	<i>Thermus thermophilus</i>

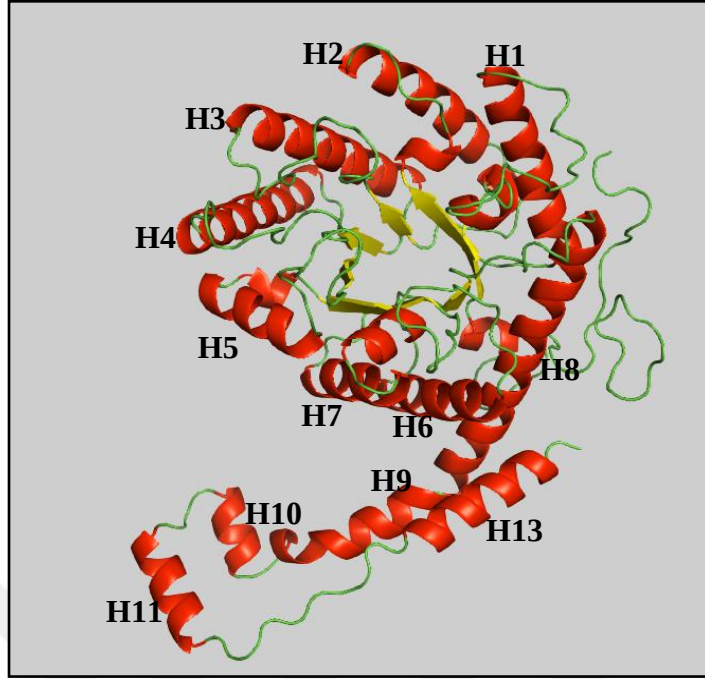
Yapılan çalışmalarda glukoz izomerazın şeker alkoller, heksoz, pentoz ve şeker fosfatları gibi geniş aralıklardaki substratların izomerizasyonu gerçekleştirdiği belirtilmiştir. Tablo 8 ve 9’ da organizmaların kullandığı substratları gösterilmektedir.

Tablo 9. Bazı GI’ ların doğal substratları

Doğal Substrat	Doğal Ürün	Organizma
D - Glukoz	D - Fruktoz	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>
		<i>Anoxybacillus gonensis</i>
D - ksiloz	D - ksiluloz	<i>Escherichia coli</i>
		<i>Anoxybacillus gonensis</i>
L - Arabinoz	L - Ribuloz	<i>Escherichia coli</i>

1.3.5. GI’ ların DNA Dizi Benzerliği ve Reaksiyon Mekanizması

Çeşitli organizmalardan elde edilen GI (*xyla*) genleri amino asit dizilimlerine göre karşılaştırılmış ve glukoz izomerazlar arasındaki yapısal ve işlevsel farklılıkları ortaya çıkartılmıştır. Yapılan karşılaştırmalar sonucunda enzimin N - terminal ucunda bulunan 40 - 50 amino asitten oluşan fazlalık olmasına göre 2 tip olarak sınıflandırılmışlardır. Tip 1 GI’ lar 390 amino asit içermektedir. Bu gruba örnek olarak *Thermus thermophilus*, *Arthrobacter spp.* gibi türler örnek verilebilir. *E. coli*, *Lactobacillus spp.*, *Bacillus spp.* ve *Anoxybacillus gonensis* türlerine ait glukoz izomerazlar ise 440 amino asitten meydana gelmektedir ve Tip 2 GI’ lar olarak sınıflandırılmaları yapılmıştır (Hess vd., 1998., Karaoglu H. vd., 2003). Şekil 4’ te bazı Tip 2 GI’ ların amino asit benzerliği verilmektedir. Tip 1 ve Tip 2 glukoz izomerazlar arasında amino asit dizilim farkı vardır. Her iki tipte de substrat ilişkisinde H100, E231, K233, T140, D338 bölgelerinin korunduğu görülmektedir. Metal iyonunun bağlanmasında H270, D306, D338, E231, D308 ve E267 bölgesinin korunduğu görülmektedir. Katalitik olaylarda ise D103, D338 ve H100 bölgesinin büyük oranda korunduğu belirlenmiştir. Yapılan karşılaştırmalarda uzak türler arasında bile enzimin aktif bölgesindeki yapının birbirine yakın benzerlikte olduğu keşfedilmiştir (Hess vs., 1998).



Şekil 3. *A. gonensis* glukoz izomerazının bir alt ünitesinin sekonder yapısı

Tip 2 glukoz izomerazlar 8 α sarmal tarafından çevrili ve birbirine paralel 8 β levhadan, diğer monomerler ile ilişki içinde olan uzun bir terminal kuyruktan oluşmaktadır. Bu enzimin aktif bölgesi geniş bir cepten oluşmaktadır ve bu genişliğin alt kısmında genelde hidrofobik özellikte olan amino asitler ile Co^{+2} ve Mn^{+2} gibi bivalent katyonlar ve bu yapılarla ortak çalışan histidin, aspartik asit ve glutamik asit gibi amino asitler yer almaktadır (Whitlow vd., 1991). Şekil 3' te *A. gönensis* GI' sının bir alt ünitesinin sekonder yapısını göstermektedir.

Arthrobacter ve *Streptomyces* GI' ları üzerinde yapılmış olan X - Ray kristallografisi metodu ile glukoz izomerazın çalışma mekanizması çözülmüştür (Collyer vd., 1990). Enzimin biyokimyasal özellikleri ise aktif bölgede yapılan özellikli mutasyonlar ile ortaya çıkarılmıştır.

<i>A.gonensis</i>	-----MA YFENVDKVVY EGPASENPLA FKFYNPEEKV GDKTMEEHLR
<i>G. stearothermophilus</i>	-----P ..D..ISTIA.. ..K..... ..Y.....V.. ..G...KDO..
<i>Bacillus megaterium</i>	MVOTSTNKIN H..SAN..L.. ..KD.K.. ..Y.....V.. ..G...KDO..
<i>Bacillus licheniformis</i>	-----M F.R..IGMIE.. ..AD...Y.. ..Y...D.F.. ..G...K... ..AG...A... ..
	T F..ND..E..Q.. ..R..T..Y.. ..Y.....I.. ..AG...A... ..
	* * * * *
<i>A.gonensis</i>	FSVAYWHTFV GDGADFFGVG TAIRPWNRYG G-MDLAKARV EAAFELEFDKL
<i>G. stearothermophilus</i>	T ..S...A.. NM...K..F.E..
<i>Bacillus megaterium</i>	O.T A..T...AA ..MO.S.D.DO...ET..
<i>Bacillus licheniformis</i>	A.....D A..K...D.. ..MF.A...LT HPL.K...AF.E..
	I..... ..S..... ..MO...DO..F.E..
	* : : * * * * * * : : * * * * * * : : * * * * * * : : * * * * * *
<i>A.gonensis</i>	NIPFFCFHDV DIAPEGATLK ETYQNLDITV DMIEEYMKTS KTKLLWNTAN
<i>G. stearothermophilus</i>	E..... ..K...I..
<i>Bacillus megaterium</i>	V...A...RS...QNK...V.. ..T...K...Q.. ..NV.....
<i>Bacillus licheniformis</i>	GV.Y..... ..VD... ..R ..FTY...OMS SFLK.M.E.. HVO.....
	V.Y..... ..V...E...A D...K...E.. L...KD...
	: : * : * * * * * * : : * * * * * * : : * * * * * * : : * * * * * *
<i>A.gonensis</i>	LFTHPRFVHG AATSCNADVF AYAAAKVKKG LEIAKRLGAE NYVFWGGREG
<i>G. stearothermophilus</i>	
<i>Bacillus megaterium</i>	M...N.....
<i>Bacillus licheniformis</i>	M...Y.....
	M...WI..... ..P...YG.E.....
	: * : * : * : * : * * * * : * * * * : * * * * : * : * * * * * : * * * * * * : * * * * * *
<i>A.gonensis</i>	YETLLNTNMK LEILDNLARFL HMAVDYAKEI GFDGQFLIEP KPKEPTKHQY
<i>G. stearothermophilus</i>	D.....
<i>Bacillus megaterium</i>	LQ..... ..M..... ..T..... ..YT..... ..T.....
<i>Bacillus licheniformis</i>	D..... ..E..SS..Y R...E..R..
	F..... ..A.....
	* * * * * * : : * * * * * * : * * * * * * : * : * * * * * * : * * * * * *
<i>A.gonensis</i>	DFDVATALAF LQTYGLKDYF KFNIEANHAT LAGHTFEHEL RVARIHGMGLG
<i>G. stearothermophilus</i>	R.....
<i>Bacillus megaterium</i>	T.A...TIS.. ..RQ...DK.. ..L.L.....VQ..L..
<i>Bacillus licheniformis</i>	A...TI.. ..E...H.. ..L.L.....AL..D..
	GI.. ..K.H..DEH..HL...D..D..
	* * * * * : * * : * * * * * : * * * * * * * * * * * * : : * : : : * *
<i>A.gonensis</i>	SV DANQGDPL LGWDTDEFPT DLYSTTLAMY EILQNGGLGK GGLNFDAKVR
<i>G. stearothermophilus</i>	M.....
<i>Bacillus megaterium</i>	I.....
<i>Bacillus licheniformis</i>	T.....
	* : * * * * * * * * * * * * * * * : : * * * * * * : * : * * * * * * : * : * * * * * *
<i>A.gonensis</i>	RGSFEPEDLF YAHIAQMDSF AIGLKVAYRL IEDRVFESVV EERYKSYTEG
<i>G. stearothermophilus</i>	H..... ..V.....DEFI
<i>Bacillus megaterium</i>	OD..L ..V...A.. ..R...HK.. V...N..I N...S..FK..
<i>Bacillus licheniformis</i>	P..AD.. ..H.....TY.. ..V.....S.. L...KALDQ..IE...K..
	AN..... ..H..... ..NQ.. L...L..D..I DN...QS..
	* * * * : * * : * * * * * * : * * * * * * : * * * * * * : * * * * * *
<i>A.gonensis</i>	IGRDIIDGKA DFHTLEAYAL NLRDISNRSG ROERLKTLLN QYLLEVCVAR
<i>G. stearothermophilus</i>	E..VE..T.. ..K...H.. ..Q..Q..Q..A..
<i>Bacillus megaterium</i>	LE..VE... ..N...O...F KNEN..A..K..SI.. ..I.....
<i>Bacillus licheniformis</i>	LE..KE..RT..LKK..A..... ..ENDH..E..Q.. ..ATV.. ..R...NALREA
	OK..ANNDT NLKE..... ..S..GE..KHS.. ..Q...I..AT..R..NEY-
	* * * * * : * : : * * * * * : * * * * * * : * * * * * * : * * * * * *

Şekil 4. Bazı Tip 2 Glukoz izomerazların amino asit dizi benzerliği

Önceden GI' nın ene - diol mekanizması ile çalıştığı ileri sürülmekteydi (Rose vd.,1969). Son yapılan çalışmalarla görüldü ki enzim hidrit - sift mekanizması ile çalışmaktadır. Enzimin işlevi ve yapısı arasındaki ilişkiyi kavrayabilmek için enzimin aktif bölgesinin konformasyonunu bilmek önem arz etmektedir. Bu mekanizmayı anlamak için çeşitli kimyasal modifikasyonlar, izotop değişimi ve X - Ray kristallografisi gibi farklı çalışma metotları denenmiştir. Glukoz izomerazın katalitik mekanizması; substrat halkasının açılması, hidritin C - 1' den C - 2' ye kaydırılması ve halkanın kapanması şeklinde gerçekleşmektedir (Bhosale vd., 1996).

1.4. Glukoz İzomeraz Üreten Mikroorganizmalar

GI üreten mikroorganizmalara genel olarak bakıldığında; termofilik özellikte olanlardan, mezofilik olanlara ve bazı mayalara kadar geniş yelpazede değişim göstermektedir. Glukoz izomeraz birçok prokaryotik mikroorganizmada yaygın şekilde bulunmaktadır. Özellikle *Pseudomonas hydrophila*' da keşfedilmesiyle birçok farklı bakteri türünde araştırmaya başlanmış ve bu bakterilerde de GI aktivitesine rastlanılmıştır. Ekonomik olarak kullanılabilirliği açısından düşük pH ve yüksek sıcaklıkta kararlı olan bakteri türleri üzerinde çalışmalar yapılmıştır.

In vitro ve *in vivo* ortamlarda GI aktivitesi gösteren bakterilerin keşfedilmesiyle birlikte çalışmalar daha geniş kapsamda yapılmaya başlanmıştır. Hücre dışı (*in vitro*) GI üreten mikroorganizmalar pek bilinmemesine rağmen yapılan ön çalışmalara göre endüstriye yönelik yeterli verim alınamayacağı görüşü savunulmaktadır. Bu sebeple hücre içi enzim üretim yapan mikroorganizmaların çalışılmasına ağırlık verilmiş ve tercih edilmiştir. *S. flavogriseus* (Chen vd., 1979) ve *Streptomyces glaucescens* (Weber, 1976) türlerinden elde edilen GI' nın *in vitro* (hücre dışı) olduğu görülmüştür.

Enzimin hücre içinden dışarı salınmasındaki neden hücre duvarının geçirgenliğindeki bir değişiklik ile birlikte hücrenin kısmi lizisi meydana gelmiş olduğu düşüncesidir. GI enzimi *Bacillus*, *Arthrobacter*, bazı *Streptomyces* ve *Flavobacterium* türleri gibi mikroorganizmalardan saflaştırılmaktadır. Bu organizmalar yüksek verim sağlar, ayrıca bu organizmaların kültürü ve kullanımı kolaydır (Sheeba vd., 2018).

GI varlığı bazı maya türlerinde (*Candida boidinii* (Vongsuvanlert, Tani ,1988), *Candida utilis* (Wang vd., 1980)) tespit edilmiştir. Ayrıca buğday tohumunda (Pubols vd.,1963) ve çimlenmiş buğdayda da (Bartfay.1960) glukoz izomerazın varlığı tespit edilmiştir.

Tablo 10. Glukoz izomeraz aktivitesine sahip olan bazı organizmalar (Karaoglu, H., 2013).

Organizmalar		
<i>Actinomyces</i>	<i>Microbispora rosea</i>	<i>Streptomyces</i>
✓ <i>A. olivocinereus</i> ,	<i>Microellobosporia flavea</i>	✓ <i>S. venezaelie</i>
✓ <i>A. phaeochromogenes</i>	<i>Mycobacterium</i> spp.	✓ <i>S. wedmorensis</i>
<i>Actinoplanes missouriensis</i>	<i>Nocardia</i>	✓ <i>S. griseolus</i>
<i>Aerobacter</i>	✓ <i>N. corallia</i> ,	✓ <i>S. glaucescens</i>
✓ <i>A. aerogenes</i>	✓ <i>N. dassonvillei</i>	✓ <i>S. bikiniensis</i>
✓ <i>A. cloacae</i>	✓ <i>N. asteroides</i>	✓ <i>S. rubiginosus</i>
✓ <i>A. levanicum</i>	<i>Lactobacillus</i>	✓ <i>S. achinatus</i>
<i>Anoxybacillus</i>	✓ <i>L. brevis</i>	✓ <i>S. cinnamomensis</i>
✓ <i>A. gonensis</i>	✓ <i>L. Buchneri</i>	✓ <i>S. fradiae</i>
✓ <i>A. kamchatkensis</i>	✓ <i>L. Fermenti</i>	✓ <i>S. albus</i>
<i>Arthrobacter</i> spp.	✓ <i>L. mannitopoeus</i>	✓ <i>S. griseus</i>
<i>Bacillus</i>	✓ <i>L. fermenti</i>	✓ <i>S. hivers</i>
✓ <i>B. stearothermophilus</i>	✓ <i>L. plantarum</i>	✓ <i>S. matensis</i>
✓ <i>B. megabacterium</i>	✓ <i>L. Pentosus</i>	✓ <i>S. nivens</i>
✓ <i>B. coagulans</i>	<i>Paracolonobacterium</i>	✓ <i>S. platensis</i>
<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>aerogenoides</i>	✓ <i>S. olivochromogenes</i>
<i>Brevibacterium</i>	<i>Pseudonocardia</i> spp.	
✓ <i>B. incertum</i>	<i>Pseudomonas hydrophila</i>	<i>Streptosporangium</i>
✓ <i>B. pentosaminoacidum</i>	<i>Sarcina</i> spp.	✓ <i>S. oulgare</i>
<i>Chainia</i> spp.	<i>Staphylococcus</i>	✓ <i>S. album</i>
<i>Corynebacterium</i> spp.	✓ <i>S. flavovirens</i>	<i>Thermopolyspora</i> spp.
<i>Cortobacterium helvolum</i>	✓ <i>S. echinatus</i>	<i>Thermoanaerobacter</i>
<i>Escherichia</i>	✓ <i>S. bibila</i>	<i>ethanolicus</i>
✓ <i>E. freundi</i> ,	<i>Streptococcus</i>	<i>Thermoanaerobacterium</i>
✓ <i>E. intermedia</i> ,	✓ <i>S. phaeochromogenes</i> ,	<i>thermosulfurigenes</i>
✓ <i>E. coli</i>	✓ <i>S. fracliae</i> ,	<i>Thermus</i> spp.
<i>Flavobacterium</i>	✓ <i>S. roseochromogenes</i> ,	<i>Vibrio</i> sp.
✓ <i>F. arborescens</i>	✓ <i>S. olivaceus</i> ,	<i>Xanthomonas</i> spp.
✓ <i>F. devorans</i>	✓ <i>S. californicos</i> ,	<i>Zymononas mobilis</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	✓ <i>S. venuceus</i> ,	
	✓ <i>S. acromogenes</i>	

Alkalotermofilik bir tür olan *Bacillus* sp. (Chauthaiwale, Rao, 1994) ve *Chainia* sp. (Srinivasan vd., 1983; Vartak vd.,1984)' den elde edilen hücre dışı (ekstrasellular)

GI' lar çeşitli jel filtrasyon, kromatografik yöntemler ve preparatif jel elektroforezi gibi saflaştırma yöntemleri ile eşit bir şekilde saflaştırılmaktadır. *Streptomyces spp.* türleri ile birlikte *Bacillus* türleri de fazla miktarda GI üretebilmektedir. Tablo 10' da GI aktivitesine sahip olan organizmalar gösterilmektedir.

1.5. Endüstriyel Glukoz İzomerazlar

GI' nın özellikle ticari öneminden dolayı enzimi üreten yeni organizmalar ve enzimin geliştirilmesinde kullanılan yöntemler hakkındaki bilgilerin çoğu patentlenmiştir (Chanyong Lee vd., 1993; Pawar, S.A vd., 2000; Vuolanto, A vd.,2002; Hanson, B.L vd., 2004; Santa, H vd., 2005; Joo, G.J vd., 2005; Yanase, H vd.,2007; Madhavan, A vd., 2009; Kim, S vd., 2010; Umemoto, Y vd., 2012).

Novo - Nordisk tarafından *Bacillus coagulans*' tan üretilen Sweetzyme, *Streptomyces rubiginosus*' tan elde edilen Optisweet ve Spezyme, *Actinoplanes missousriensis*' ten elde edilen Maxazyme günümüzde yoğun olarak kullanılan ticari glukoz izomerazlar arasında yer almaktadır (Bhosale, 1996).

1.6. Mikroorganizma Kökenli Enzimlerin Endüstriyel Kullanımdaki Yeri

Mikroorganizmalar enzimatik ve metabolik çeşitliliği sayesinde endüstride önemli bir yere sahiptir. Geleneksel olarak yapılan ekmek, şarap, bira, peynir, sirke ve turşu gibi birçok fermente ürünlerin elde edilmesi binlerce yıldır mikroorganizmalar sayesinde gerçekleştirilmiştir. Endüstriyel mikrobiyolojinin gelişme evresi yavaş olmakla beraber 20. yüzyılın başlarında büyük ölçekli fermentasyon metotları sayesinde ilk defa vitaminler, organik asitler ve enzimler gibi ürünlerin üretimi gerçekleştirilmiştir. Takip eden zaman içerisinde ise antibiyotik fermentasyonu gerçekleştirilerek penisilin ve streptomisin üretimi yapılmıştır.

Önceleri bitki, hayvan veya kimyasal sentezlerle üretilen enzimlerin mikroorganizmalar tarafından sentezlenmesinin nedenleri başlıca şunlardır:

- Farklı ortamlara uyum sağlayabilmektedirler,
- Çok çeşitli reaksiyonları gerçekleştirebilirler,

- Ucuz karbon ve nitrojen kaynaklarında kolaylıkla gelişebilirler,
- Tür çeşitliliği sayesinde aynı türe ait organizmalardan farklı enzimlerin üretilmesi sayesinde farklı ortamlarda çalıştırılabilirler,
- Genetik manipölasyonlar ile *in vitro* ve *in vivo* ortamlarda üretim miktarını artırabilir, aktiviteleri değıştirilebilir ve bu sayede yeni bir ürün elde edilebilir (Barredo, 2005).

1.7. Termofilik Enzimlerin Endüstriyel Ticarete Kullanım Amacı

Sıcaklık canlı çevresindeki en önemli unsurlardan biridir. Bu sebeple organizmaların sınıflandırılmaları yapılırken sıcaklık değışkenleri de göz önünde bulundurulmaktadır. Mikroorganizmalar genel sınıflandırıldığında psikrofil, mezofil ve termofil olarak 3 ana gruba ayrılmaktadır (Kristjansson, J. K. ve Stetter K.O. 1992). Termofilik organizmalar yüksek sıcaklık derecelerinde yaşamaya adapte olmuşlardır ve bu organizmalar da kendi aralarında ılımlı termofiller (45 – 65°C) ve hipertermofiller (85°C) olarak ayrılmaktadırlar (Demirjian vd., 2001).

Bakteriyolojinin neredeyse ilk dönemlerinde termofilik bakterilerin varlığı bilinmekteydi. İlk karakterize edilen hipertermofilik bakteri *Thermus aquaticus* tur (Brock, T.D. 1997). 1879 yılında Miquel tarafından 72°C' de çoğalabilme özelliğine sahip termofilik bakteriler izole edilmiştir ve bu bakterilerin numuneleri çamur, toprak, nehir, toz ve kanalizasyondan elde edilmiştir (J. Jenkins, 1999).

Termofilik organizmaların DNA' sında pozitif süper sarmallar oluşturan geri dönüşümü sağlayan bir DNA Giraz bulundurur. Bunun avantajı da DNA' nın erime noktasını organizmanın büyüme sıcaklığına kadar yükselmesini sağlamaktır. Termofilik organizmalar, non - termotolerant organizmaların da kullanmış olduğu elektrostatik disülfid köprüsü ve hidrofobik etkileşim gibi etkileşimleri kullanır ve sıcaklığa karşı böylece tolerans gösterebildiler (Haki vd., 2003; Fujiwara, S. 2002).

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Kimyasallar, Plazmit ve Hücreler

A. gonensis GI' sını kodlayan geni taşıyan plazmit laboratuvar stoklarımızda *E. coli* BL21(DE3) / pETG2GI şeklinde *E. coli* BL21(DE3) suşu içerisinde bulunmaktadır. İhtiyaç halinde gen bu kaynaktan temin edilmiştir.

Çalışmada *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* JM101, *E. coli* DH5α ve *A. gonensis* hücreleri aktif olarak kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan kimyasallar: Commassie Brilliant Blue G - 250 (Panreac 5M014937), Commassie Brilliant Blue R - 250, Etanol, Fosforik asit (Carlo erba 304062), BSA (NEB), DEAE-Sepharose (Sigma MKBT1646V) , PHenyl Sepharose 6 Fast Flow (Sigma), Amonyom sülfat (Merck A0296217 201), Sodyum asetat (Merck AM0793468550), Tris (Fisher Scientific149456A), Glutaraledhit, K₂HPO₄ (Merck A0435601 442), Glisin (Fluka50052), HCl (Sigma aldrich 82670), NaOH (Applichem 8Z011622), Tripton (Fluka VCBN7396V), Yeast Ekstrakt (Merck VM445253224), NaCl (Sigma SZBE1470V), CaCl₂ (Sigma C5670), CoCl₂, MgSO₄ (Merck K45872982 441), D-Glukoz (Sigma SZBA1790V), D - Fruktoz (Bioshop 5D38250412), MOPS (Fisher Scientific 154054), Lizozim (Bioshop 6C42679), Perklorik asit (Merck C691919), Sistein (Sigma SLBD2448V), Karbozol (Sigma BCBP5577V), Sülfürik asit (Merk K45905413 434), Etil alkol (Smyras 305041016060), Kanamisin (Fisher 134473) ve IPTG (Bioshop 6C42892)' dir.

2.2. Mutasyon Bölgeleri ve Mutasyon Primerlerinin Seçimi

Tasarlanan mutasyonların amacı, enzimin tercih edilen biyokimyasal ve kinetik parametrelere ulaştırılıp endüstriyel alanda kullanımını sağlamaktır.

Çalışmada, kaynak gen olarak *Anoxybacillus gonensis* bakterisinden elde edilen glukoz izomeraz geni (*xyla*) kullanıldı. Çalışmanın amacına yönelik bakteriye ait GI' nın yapısal özelliklerinden faydalanılarak (amino asit dizilimi) mutasyon noktaları

belirlenmiştir. *A. gonensis* GI' sınıfının amino asit dizilimi diğer termofilik ve mezofilik organizmalara ait glukoz izomerazlar ile karşılaştırıldığında, *A. gonensis* GI' sınıfının bazı noktalarda amino asit dizilimi açısından mezofilik organizmaların GI' larıyla benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu bölgelerdeki amino asit dizilimini tek noktada yapılacak mutasyonlar ile mezofilik organizmalara olan benzerliğinin termofilik organizmalara olan benzerliğe dönüştürülmesi ile enzimin ısı kararlılığının arttırılacağı ve 3 boyutlu yapısında daha kararlı olacağı düşünülmüştür. Örneğin; *A. gonensis* glukoz izomerazının 323. bölgesinde bulunan izölösün aminoasidi bütün mezofilik karakterdeki glukoz izomerazlarda bulunmaktadır. Bu bölgede yapılacak tek bölgede mutasyon ile izölösün amino asidi olan bölgenin valin a.a' ne dönüşmesi sağlanır ve yapı olarak termofilik özelliği kazanır. Bu sebeple yapılacak olan mutasyon bölgeleri bu stratejiye göre seçilmiştir. Şekil 5' te *E. coli* genlerinin üretilmesinde tercih edilen kodon kullanımını göstermektedir (Maloy vd., 1996)

	Codon	Amino Acid	%	Codon	Amino Acid	%	Codon	Amino Acid	%	Codon	Amino Acid	%	
U	UUU	Phe F	0.51	UCU	Ser S	0.19	UAU	Tyr Y	0.53	UGU	Cys C	0.43	U
	UUC	Phe F	0.49	UCC	Ser S	0.17	UAC	Tyr Y	0.47	UGC	Cys C	0.57	C
	UUA	Leu L	0.11	UCA	Ser S	0.12	UAA	STOP	0.62	UGA	STOP	0.30	A
	UUG	Leu L	0.11	UCG	Ser S	0.13	UAG	STOP	0.09	UGG	Trp W	1.00	G
C	CUU	Leu L	0.10	CCU	Pro P	0.16	CAU	His H	0.52	CGU	Arg R	0.42	U
	CUC	Leu L	0.10	CCC	Pro P	0.10	CAC	His H	0.48	CGC	Arg R	0.37	C
	CUA	Leu L	0.03	CCA	Pro P	0.20	CAA	Gln Q	0.31	CGA	Arg R	0.05	A
	CUG	Leu L	0.55	CCG	Pro P	0.55	CAG	Gln Q	0.69	CGG	Arg R	0.08	G
A	AUU	Ile I	0.47	ACU	Thr T	0.21	AAU	Asn N	0.39	AGU	Ser S	0.13	U
	AUC	Ile I	0.46	ACC	Thr T	0.43	AAC	Asn N	0.61	AGC	Ser S	0.27	C
	AUA	Ile I	0.07	ACA	Thr T	0.30	AAA	Lys K	0.76	AGA	Arg R	0.04	A
	AUG	Met M	1.00	ACG	Thr T	0.23	AAG	Lys K	0.24	AGG	Arg R	0.03	G
G	GUU	Val V	0.29	GCU	Ala A	0.19	GAU	Asp D	0.59	GGU	Gly G	0.38	U
	GUC	Val V	0.20	GCC	Ala A	0.25	GAC	Asp D	0.41	GGC	Gly G	0.40	C
	GUA	Val V	0.17	GCA	Ala A	0.22	GAA	Glu E	0.70	GGA	Gly G	0.09	A
	GUG	Val V	0.34	GCG	Ala A	0.34	GAG	Glu E	0.30	GGG	Gly G	0.13	G
	U			C			A			G			

Şekil 5. *E. coli* genlerinin üretilmesinde tercih edilen kodon kullanımı (Maloy, vd., 1996)

Yapılması planlanan mutasyon noktaları:

- D398S (398. bölgede bulunan Aspartik asit (D)' in Serin (S) a.a' ne dönüştürülmesi).
- I323V (323. bölgede bulunan İzölösün (I) a.a' nin Valin (V) a.a' ne dönüştürülmesi).
- I372Q (372. bölgede bulunan İzölösün (I) a.a' nin Glutamin(Q) a.a' ne dönüştürülmesi).

- I372V (372. bölgede bulunan İzolösin (I) a.a' nin Valin (V) a.a' ne dönüştürülmesi).
- V380F (380. bölgede bulunan Valin(V) a.a' nin Fenilalanin(F) a.a' ne dönüştürülmesi).
- V380F - I372V (V380F mutant plazmidi kalıp olarak kullanılarak 372. bölgede bulunan İzolösin(I) a.a' nin Valin (V) a.a' ne dönüştürülmesi).
- W137F - V184S - V380F (W137F - V184S mutant plazmiti kalıp olarak kullanılarak (Karaoğlu, 2010) 380. bölgede bulunan Valin (V) a.a' nin Fenilalanin (F) a.a' ne dönüştürülmesi).
- W137F - V184S – I372V (W137F - V184S mutant plazmiti kalıp olarak kullanılarak (Karaoğlu, 2010) 372. Bölgede bulunan İzolösin(I) a.a' nin Valin(V) a.a' ne dönüştürülmesi).

2.3. Tasarlanan Mutasyonlar İçin Primer Dizaynı

İlgili mutasyonlar Long – PCR uygulaması ile gerçekleştirilmiştir. Bunun için birbirlerinin tamamlayıcısı olan biri forward (ileri) diğeri reverse (geri) 2 adet primere ihtiyaç vardır. Bu doğrultuda *A. gonensis* GI' sınıfı kodlayan *xyla* geni kalıp olarak kullanılarak her mutasyon için bir çift primer sentez edildi. İstenilen mutasyon noktaları primerin tam ortasında olacak şekilde primerler dizayn edildi.

(Forward Primer 34 nt)

I372V

5'-GTGGCGTATCGTTT**AGTT**GAGGATCGTGTGTTTG-3'
 5'-TGGACTAAAAGTGGCGTATCGTTT**AATT**GAGGATCGTGTGTTTGAATCAGTTGTTGAGG-3'
 3'-ACCTGATTTTCACCGCATAGCAAAT**TAACT**CCTAGCACACAACTTAGTCAACAACCTCC-5'
 3'-CACCGCATAGCAAAT**CAACT**CCTAGCACACAAAC-5'

(Reverse Primer 34 nt)

AGI-I372V-F : 5'-GTGGCGTATCGTTT**AGTT**GAGGATCGTGTGTTTG-3'

AGI-I372V-R : 5'-CAAACACACGATCCT**CAACT**TAAACGATACGCCAC-3'

Şekil 6. Mutasyon primerlerinin dizaynı

Mutant enzimler konak hücresi olarak *E. coli* BL21(DE3) içerisinde üretilmesi planlanmıştır. Bu sebeple mutasyonların sentezinde amino asit değişiklikleri yapılırken konak hücrenin kodon kullanım sıklığı göz önüne alınmıştır (Şekil 5). Şekil 6' da

mutasyon primierlerinin dizaynına örnek olarak I372V mutasyonu verilmiştir. Tablo 11’ de mutasyon çalışmalarında kullanılan primer çiftleri verilmiştir.

Tablo 11. Mutasyon çalışmalarında kullanılan primer çiftleri

Primer	Nükleotit Dizisi 5’->3’	Nt	T _m
D398S-F	5’ -GGCCGGGATATCATT TCT GGGAAGGCCGACTTC-3’	33	67, 6
D398S-R	5’ -GAAGTCGGCCTTCCC AGA AATGATATCCCGGCC-3’	33	67, 6
I323V-F	5’ -CTTGCGATGTACGAA GTT TTACAAAATGGCGGAC-3’	34	62, 7
I323V-R	5’ -GTCCGCCATTTTGTAA AAC TTTCGTACATCGCAAG-3’	34	62, 7
I372Q-F	5’ -GTGGCGTATCGTTT CAG GAGGATCGTGTGTTTG-3’	34	64, 4
I372Q-R	5’ -CAAACACACGATCCTC CTG TAAACGATACGCCAC-3’	34	64, 4
I372V-F	5’ -GTGGCGTATCGTTT GTT GAGGATCGTGTGTTTG-3’	34	63, 3
I372V-R	5’ -CAAACACACGATCCTC AAC TAAACGATACGCCAC-3’	34	63, 3
V380F-F	5’ -CGTGTGTTTGAATCA TTT GTTGAGGAACGCG-3’	33	62, 9
V380F-R	5’ -CGCGAGTTCCTCAAC AAA TGATTCAAACACACG-3’	33	62, 9

2.4. pETG2GI’ nın ve Mutant Plazmitlerin İzolasyonları

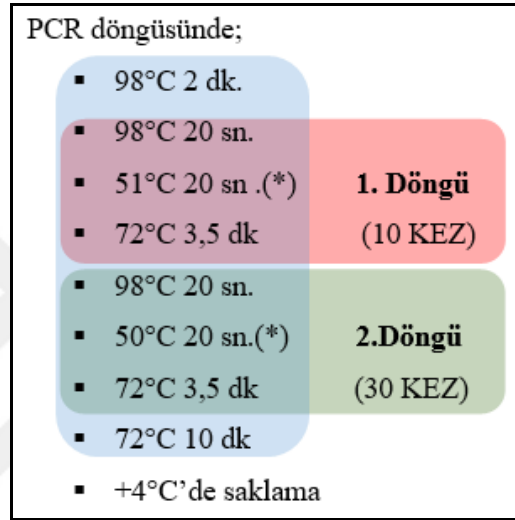
Mutasyonların gerçekleştirildiği PCR reaksiyonunda kalıp DNA olarak kullanılacak olan pETG2GI’ nın ve daha sonra da mutant plazmitlerin, bulundukları hücreden izolasyonları için Quick - DNA™ Miniprep Plus plazmit izolasyon kiti (Zymo Research) kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokol takip edilerek gerçekleştirildi.

2.5. Mutasyon Uygulamaları

2.5.1. pETG2GI Mutantlarının PCR ile Üretilmesi

Tasarlanan yöntemde mutasyonlar, ilgili mutasyon primerleri ile pETG2GI’ nın kalıp DNA olarak kullanıldığı Long - PCR yöntemi ile yapıldı. Böylelikle sadece *xylA* geninin değil tüm pETG2GI’ nın üretilmesi amaçlandı.

Xyla geni 1326 nükleotid büyüklüğündedir. Klonlandığı pET28a(+) vektörünün de 5369 nükleotid olduğunu hesapladığımızda toplam 6695 nükleotid uzunluğundaki bir pETG2GI' nin PCR' da hatasız olarak çoğaltılması gerekir. Bu çoğaltmanın *Taq* DNA polimeraz ile olması mümkün değildir. Çünkü *Taq* DNA polimeraz, sentez aşamasında yaklaşık 1000 bazda 1 hata yapar ve bu nedenle oluşacak olan sentezin doğruluğu çok düşüktür. Bu sebeple *Taq* DNA polimeraz yerine, 25 kb' a kadar zincir sentezleyebilen yüksek doğruluğa sahip bir DNA polimeraz kullanılmalıdır.



Şekil 7. Long PCR uygulaması

Tüm bunların doğrultusunda, Long - PCR reaksiyonu “Phusion High - Fidelity DNA polymerase” (Thermo Scientific) kullanılarak üretici şirketin önerdiği protokole göre yapıldı. Bu protokole göre reaksiyonlar son hacim 50 µL olacak şekilde; 1 µL pETG2GI (Kalıp DNA), 10 µL reaksiyon tamponu, 0,5 µL Phusion *Taq*, her primerden 1'er µL ve 31,5 µL ddH₂O kullanılarak hazırlandı.

Long PCR uygulaması Şekil 7' de gösterilen döngü sistemi kullanılarak olacak şekilde hesaplamalar gerçekleştirildi. “ * ” ile belirtilen yerlerde sıcaklık derecesi, kullanılan primerin T_m hesaplamasına göre farklılık göstermektedir. Bu yüzden kullanılan primerlere göre T_m dereceleri her mutasyon primeri için ayrı ayrı hesaplandı.

2.5.2. *DpnI* ile Orjinal Vekörün Temizlenmesi

PCR döngüsü tamamlandıktan sonra 50µL' lik örnek içerisinde, hem yeni primer ile örülmüş yeni bir zincir, hem de pETG2GI orijinal zinciri bulunmaktadır. Kalıp DNA olarak kullanılan pETG2GI, hücreden izole edildiği için metillenmiş bölgelere sahiptir. Yeni oluşan zincirlerde ise metillenmiş bölgelere rastlanmaz. Kalıp DNA' ya ait metillenmiş zincirlerin ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu sebeple PCR ürünü metillenmiş bölgeleri tanıyıp onları kesen bir restriksiyon endonükleaz ile kesilmeli ve ortamdan uzaklaştırılmalıdır.

DpnI enzimi özellik olarak GATC dizisini tanıdığı yerden, A' nin metillenmiş halini keser. Bu sebeple kesim reaksiyonu sonucunda PCR ürünü içerisinde bulunan, ortamda olmasını istemediğimiz pETG2GI' ya ait tüm zincirler bu enzim sayesinde parçalanıp ortamdan uzaklaştırılmış olur. Böylelikle ortamda sadece yeni örülmüş zincirler kalacaktır.

Bu işlemin gerçekleşmesi için *DpnI* (New England Biolabs) enzimi kullanıldı. Kesim işlemi üretici şirketin önerdiği protokole göre gerçekleştirildi. Reaksiyon sonrasında kesim ürünü %1' lik agaroz jelde yürütüldü ve görüntülendi.

2.5.3. Mutant Plazmitlerin *E. coli* DH5α Suşuna Transformasyonu

Transformasyon metodu olarak soğuk CaCl₂ metodu kullanılmıştır. Kesim ürünlerinin hücre içerisine aktarılması için kompetent hücre stokları hazırlandı. CaCl₂ metoduna göre kompetent hücre hazırlamada şu protokol takip edilmiştir;

- Steril kabinde *E. coli* DH5α suşu 20 mL LB besiyerine ekildi. 37°C' de 16 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası büyüyen örneğin O.D₆₀₀ ölçümü yapıldı. O.D₆₀₀ değeri 0,1 olacak şekilde hesaplama yapılarak gerekli hücre miktarı ile yeni LB besiyerine taze ekim yapıldı.
- 37°C' de O.D₆₀₀ değeri 0,45 - 0,55 olana kadar yaklaşık 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası steril kabin içerisinde büyüyen örnekler 50 mL' lik steril falkon tüplere aktarıldı. 4400 rpm' de 5 dk sentrifüj yapıldı.

- Santifr j sonrası süpernatant döküldü ve     en pellet üzerine önceden hazırlanmış olan 100 mM' lık soğuk CaCl₂' den 10 mL ilave edildi. Hücre yapısını bozmadan yavaşça homojen şekilde     nmesi sağlandı. Ardından 30 dk buzda inkübe edildi. Inkübasyon sonrası 4400 rpm' de 5 dk santifrüj yapıldı. Kalan sıvı kısım döküldü.
- Hücre yığını üzerine 2 mL soğuk CaCl₂ eklendi, homojen karışması sağlandı ve en az 2 saat + 4  C' de inkübe olması sağlanarak hücreler kompetent hale getirildi.

Hazırlanmış olan komponent *E. coli* DH5  suşuna *DpnI* ile kesimi yapılmış örneklerin transformasyonu için;

- Steril kabinde ependorf tüplere önceden hazırlanmış olan kompetent *E. coli* DH5 ' dan 200  L aktarıldı. Aktarılan hücreler üzerine önceden kesimi yapılmış PCR ürünlerinden 5, 10, 15 ve 20  L olacak şekilde 4 farklı ependorfa eklendi. 30 dk buzda inkübasyonu gerçekleştirildi.
- Daha sonra buzdan çıkartılan örnekler 43 C' de 90 sn inkübe edildi. Ardından  rnekler tekrar buza aktarıldı ve 3 - 4 dk buzda bekletildi. Buzdan çıkartılan örneklerin üzerine 200  L LB besiyeri ekendi ve örnekler 37 C' de 2 saat inkübe edildi.
- Önceden transformasyonu yapılmış örnekler hazırlanmış olan 0,05 mg/mL kanamisin ihtiva eden katı besiyeri üzerine aktarıldı ve yayma ekimi yapıldı. Ekimi yapılan kültürler 37 C' de 1 gece inkübe edildi.  ıkan kolonilerden alınan örneklerden hazırlanan sıvı kültürlerin plazmit izolasyonu yapıldı ve jelde görüntülendi. Böylelikle Long PCR sonrası kesik uçlara sahip olan mutant vektörler *E. coli* DH5  suşuna aktarılarak konak hücrenin sahip olduğu rekombinasyon genleri ile onarılması sağlandı.

2.5.4. Mutant Plazmitlerin *E. coli* BL21(DE3) Suşuna Transformasyonu

Onarılan mutant plazmitler *E. coli* DH5  suşu içerisinde ekspres edilemezler.     nk  mutant plazmitler içerisinde bulunan gen T7 promotor sisteminin altında bulunmaktadır ve *E. coli* DH5  suşu T7 RNA polimeraza sahip değildir. Bu yüzden, plazmitlerin *E. coli* DH5  suşundan alınarak *E. coli* BL21(DE3) gerekmektedir.

Plazmit izolasyonu *E. coli* DH5 α suşundan izole edilen mutant plazmitler Bölüm 2.5’ te anlatılan protokol takip edilerek *E. coli* BL21(DE3) içerisine transforme edildi. Elde edilen kolonilerden sıvı kültür hazırlanarak plazmit izolasyonları, gliserol stokları ve çizgi ekimleri yapıldı ve stoklandı. İzole edilen plazmitler, mutasyon doğruluğunun kontrolü için MacroGen şirketine sekans analizine gönderildi.

2.6. Enzimlerin Ekspresyonu ve Saflaştırılması

Sekans doğrulaması yapılan mutant genlerin ve *A. gonensis* G2^T GI’ sını kodlayan *xyla* geninin rekombinant olarak *E. coli* BL21(DE3) konak hücresi içerisinde ekspresyonu ve sonrasında üretilen enzimlerin bulundukları hücre ekstraktlarından saf olarak elde edilebilmesi için çeşitli üretim ve saflaştırma basamaklarından geçmeleri gerekmektedir.

2.6.1. Rekombinant GI ve Mutant GI Genlerin Ekspresyonu

- Mutant plazmitler ve / veya pETG2GI plazmidini taşıyan hücrelerden bir koloni seçilerek 100 mL kanamisinli LB besiyerine ekildi ve 16 saat 37°C’ de inkübe edildi. Üretilen kültürlerden son hacmi 500 mL olacak şekilde kanamisinli sıvı LB besiyerinde O.D₆₀₀’ si 0,1 olacak şekilde taze ekimleri yapıldı.
- Taze kültürler O.D₆₀₀’ si 0,6 - 0,9 oluncaya kadar 37°C inkübe edildi. Sonrasında kültür son hacimde 1 mM IPTC içerecek şekilde indüklendi ve 3 saat boyunca 37°C’ de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, kültürler 50 mL falkon tüplere aktarıldı ve 7500 rpm’ de 5 dk santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatantlar döküldü.
- Çöken hücrelerden oluşan pellet, 0,5 mM CoCl₂ ve 5 mM MgSO₄ içeren 20 mM MOPS tamponunda (pH 6,5) yıkanarak temizlendikten sonra 7500 rpm’ de santrifüj edildi.
- Çöktürülen hücreler, 1 µg/mL lizozim içeren yukarıda belirtilen tampon içerisinde homojen olarak çözüldü ve 37°C’ de 20 dk inkübe edildikten sonra 10 dakika boyunca sonikatörle patlatıldı. Elde edilen hücre özütü, 15.300 rpm’ de 20 dk santrifüj edildi. Süpernatant alınarak saflaştırma işlemlerine geçildi.

2.6.2. Enzimlerin Saflaştırılma Basamakları

Rekombinant olarak üretilen enzimlerin bulunduğu konak hücreden saflaştırılmasında; ısı şoku uygulaması, iyon değişim ve hidrofobik kolon kromatografisi gibi saflaştırma protokolleri kullanılmıştır.

2.6.2.1. Isı Şoku ile Saflaştırma

Hücrenin patlatılması sonrası elde edilen hücre özütünde, istenilen enzim dışında kalan bazı istenmeyen enzimlerin ve proteinlerin ve hücreye ait çeşitli atıkların ortamdan uzaklaştırılmaları gerekmektedir. Bu sebeple uygulanacak olan sıcak şoku mezofilik karakterde olan birçok proteini ve çeşitli yapıları denatüre edecektir böylelikle ortamdan ayrıştırılmasını sağlayacaktır. Yabanıl tip enzim (*AgoG2GI-yt*) ve mutant enzimler (*AgoGI*) özellik olarak termofilik karakterdedir. Bu sebeple termofilik karakterde olan bu enzimler uygulanacak olan sıcaklıktan etkilenmeyecek ve böylelikle amaca yönelik kısmen saflaştırma yapılmış olacaktır.

Bu amaç doğrultusunda sonikatör uygulaması sonrası elde edilen mutant ve mutant olmayan GI' lara ait hücre özütleri 70°C' de 15 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası denetüre olan yapılar 15.300 rpm' de 15 dk sentrifüj edilerek çöktürüldü, süpernatantlar alındı ve pellet atıldı.

2.6.2.2. DEAE - İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması

Bu yöntemdeki amaç, kısmen saflaşmış olan enzimle aynı ortamda bulunan bazı proteinlerin ortamdan izoelektrik noktalarına göre ayrıştırılmalarını sağlamaktır. Bunun için seçilecek olan matriks önemlidir ve enzimin özelliklerine göre kullanılmalıdır.

Çalışmada kolon matriksi olarak DEAE - Sepharose Fast Flow (Sigma) kullanıldı. Uygulamanın yapılacağı olan cam kolonun boyutları 30 cm uzunluğunda 1,5 cm çapında seçildi. Matriks kullanılmadan önce vakum pompası ile yaklaşık 1 saat kadar degaze edilerek bir pipet yardımıyla kolona yüklendi. Matriks üzerinde kullanılacak olan tüm tamponlar da aynı yöntem ile degaze edildi. Matriks, 150 mL saf su ile yıkandı

ve sonrasında 0,5 mM CoCl₂, 5 mM MgSO₄ içeren 20 mM MOPS (pH:6,5) tamponu ile dengeye getirilmesi sağlandı.

Saflaştırma işlem için Biologic Lp System (Bio - Rad) cihazı kullanıldı. Cihazda hazırlanan kromatografik bir programla uygulama tamamlandı. Uygulama boyunca izlenen adımlar ve uygulama şartları şu şekildedir;

Uygulama Şartları

- ✓ Kolonun akış hızı: 1 mL/dk
- ✓ Fraksiyondan toplayıcı tüplerde biriktirilecek miktar: 3,0 mL
- ✓ Sıcaklık: Oda sıcaklığı
- ✓ Kullanılan Tampon (Tampon A): 0,5 mM CoCl₂, 5 mM MgSO₄, 20 mM MOPS (pH:6,5)

İzlenen adımlar

- ✓ Kolondan 50 mL Tampon A geçirilerek kolon dengeye getirildi
- ✓ Isı şoku uygulamasından elde edilen özüt kolana yüklendi
- ✓ 25 mL tampon (A) geçişi ile tutunmayan proteinler kolondan uzaklaştırıldı
- ✓ 100 mL gradient geçiş 0 - 0,6 M NaCl. Kolonun tuz konsantrasyonu kademeli olarak sıfırdan 0,6 M' a kadar yükseltildi
- ✓ 50 mL 1M NaCl kullanılarak kolona tutulan tüm proteinler kolondan uzaklaştırıldı ve kolon temizlendi.

Fraksiyon tüplerindeki protein miktarı uygulama esnasında cihaz tarafından 280 nm dalga boyunda yapılan ölçümler ile tespit edildi. Uygulama sonrasında toplanan fraksiyonlarda GI aktivitesi yapıldı ve aktivite gösteren tüplerdeki örnekler bir araya toplandı. Toplanan enzim özütü (saflaştırma tablosu için gerekli verilere ulaşıldıktan sonra) 50 kDa cut off Vivaspın Consantrator kullanılarak 7500 g' de 10 dk santrifüj edilerek yoğunlaştırıldı.

2.6.2.3. Fenil Sefaroz Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması

Hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi, iyon değişim kromatografisindeki mantıkla gerçekleşmektedir. Kolondan geçen proteinlerin hidrofobik ya da hidrofilik olmalarına göre azalan amonyum sülfat konsantrasyonu ile kolondan uzaklaştırılmaları sağlanmaktadır.

Hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi için 20 cm uzunluğundaki ve 0,75 cm çapındaki bir kolon kullanıldı. Kolon matriksi olarak PHenyl Sepharose 6 Fast Flow (Sigma) kullanıldı. Yine aynı matriks degaze edildi ve oda sıcaklığına geldikten sonra bir pastör pipeti kullanılarak kolona yavaş bir şekilde dolduruldu. Kolon doldurma işlemi bittikten sonra degaze edilmiş olan 1,3 M amonyum sülfat içeren 100 mL tampon (0,5 mM CoCl₂ ve 5 mM MgSO₄ içeren 20 mM MOPS tamponu pH 6,5) ile dengeye getirildi. İyon değişim kromatografisinden elde edilen enzim özütü 2,6 M amonyum sülfat içeren tampon ile bire bir oranında seyreltilti. Özütün amonyum sülfat içeriğinin 1,3 M olması sağlandı.

Kullanılan Biologic Lp System (Bio - Rad) cihazında fraksiyona bağlı tüplerin ve kullanılacak olan tamponların eş zamanlı ayarlanması yapıldı. Ayarlama:

- Kolonun akış hızı 0,5 mL/dk
- Fraksiyondan tüplere geçecek miktar 3 mL
- Enzim özütü geçişi 20 mL (1,3 M amonyum sülfat içeren)
- 100 mL gradient geçiş (1,3 M amonyum sülfat - 0 M)
- 50 mL tampon (0,5 mM CoCl₂, 5 mM MgSO₄, 20 mM MOPS pH:6,5)
- 50 mL saf su ile kolonun temizlenmesi.

olacak şekilde cihaza tanımlandı. Fraksiyonlardaki protein miktarı 280 nm dalga boyunda yapılan ölçümler sonucu belirlendi. Tüm fraksiyonların glukoz izomeraz aktivitesine bakıldı. GI aktivitesi bulunan fraksiyonlar bir araya toplandıktan sonra karakterizasyon çalışmaları başlatıldı.

2.6.2.4. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS - PAGE)

Saflaştırma işlemi sonrasında, her bir saflaştırma basamağına ait önceden ayrılmış örnekler ile SDS - PAGE analiz yapılarak saflaştırma işlemin doğruluğu takip edildi. Yöntem %12' lik jel kullanılarak hazırlandı. Bunun için aşağıdaki çözeltiler kullanıldı.

- TEMED
- %30 akrilamid (mL)
- %10' luk SDS
- %10' luk Amonyum Persülfat
- 1 M Tris - HCl pH 6,8
- 1,5 M Tris - HCl pH 8
- Saf su

Hazırlanan jel elektroforez tankına yerleştirildi. Hazırlanan örnekler kuyucuklara 20µL olacak şekilde yüklendi. 50 mA, 110V, 100 W ayarlarında güç kaynağı çalıştırıldı ve jel 1,5 saat yürütüldü. Bantların görülmesi için jel Coomassie Brilliant Blue G- 250 boyama çözeltisi içinde 1 saat bekletildi. Jelin boyadan arınma işleminden sonra jel resimleri çekildi.

2.7. Enzimlerin Kinetik ve Biyokimyasal Parametreler Açısından İrdelenmesi

2.7.1. Protein Miktarı Analizi

Enzimlerin protein miktarını belirlemek için Bradford' un (1976) geliştirmiş olduğu yöntem kullanıldı. Bradford çözeltisinin hazırlanması için aşağıdaki basamaklar takip edildi (200 mL);

- 20 mg Coomassie Brilliant Blue G- 250
- 10 mL %95' lik etanol
- 20 mL %85' lik fosforik asit
- 150 mL saf su

Hazırlanan boya çözeltisi filtre kâğıdı ile süzüldü ve koyu renk şişede saklandı.

Kalibrasyon eğrisinin hazırlanması için önce standart oluşturulması gereklidir. Standart olarak bovin serum albumin (BSA) kullanıldı. Kalibrasyon eğrisi için; 2, 4, 6,

10, 15, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 250 µg BSA içeren çözeltiler 0,15 M'lık NaCl ile 100 µL'ye tamamlandı. Üzerine 5 mL hazırlanan boya çözeltisinden ilave edildi ve vortekslenerek 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda Xmark Microplate Spectrophotometer (BioRad) cihazında 595 nm' de spektroskopik ölçümler yapılarak standart eğrisi oluşturuldu. Saflaştırılan örnekler için BSA yerine 10 µL hücre ekstratı kullanılarak aynı işlemler gerçekleştirildi. Örneklerin protein miktarı µg/µL cinsinden hesaplandı.

2.7.2. Glukoz İzomeraz Aktivite Deneyi

GI Aktivite deneyleri, önceki çalışmalarda Dische ve arkadaşlarının (1951) geliştirdiği ve Belfaqui ve arkadaşları (2000) tarafından uyarlanmış olan Sistein - Karbozol - Sülfürik asit metodu takip edilerek gerçekleştirildi. Sonraki deneylerde ise daha güvenilir sonuç alınabilmesi sebebiyle Theodor Seliwanoff (1887)' un tasarladığı ve Martin Schenk ve Hans Bisswanger (1998)' in uyarladığı seliwanoff yöntemi kullanılmıştır.

2.7.2.1. Sistein – Karbozol - Sülfürik Asit Reaksiyonu

GI ihtiva eden enzim özütleri pH' sı 6,5 olan 100 mM MOPS tamponu içerisinde, son hacim 250 µL olacak şekilde, 85°C' de 30 dakika inkübe edildi. Reaksiyon, inkübasyon süresi sonunda 250 µL 0,5 M perklorik asit ilavesi ile sonlandırıldı. Oluşan fruktoz miktarı Dische ve arkadaşlarının (1951) geliştirdikleri Sistein - Karbozol - Sülfürik asit metoduna göre belirlendi. Buna göre reaksiyondan çıkan çözeltinin 50 µL' si 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. 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer (Bio-Rad) cihazı ile 560 nm dalga boyunda ölçümleri alındı. Fruktoz miktarı hazırlanan fruktoz kalibrasyon eğrisine göre hesaplandı.

Fruktoz kalibrasyon eğrisi 2, 4, 8, 10, 15, 30, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600 µg fruktoz içeren çözeltiler hazırlandıktan sonra yukarıda anlatılan muamele

sonrası cihaza yüklendi. Tıpkı protein miktarı ölçümlerinde olduğu gibi aktivite ölçümlerinde de tek bir ölçüm almak yerine farklı miktarlarda enzim alınarak elde edilen sonuçlardan lineer grafik hazırlandı ve fruktoz miktarı $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ cinsinden $R^2 > 0,99$ olacak şekilde hesaplandı.

2.7.2.2. Seliwanoff Reaksiyonu

Yapılan çalışmalarda fruktoz miktarının tayini için kullanılan Seliwanoff metoduna göre reaktifi hazırlamak için;

- %0,05 (w/v) 1 gr resorcinol
- 330 mL 3 N HCl
- 670 mL saf su
- 1 gr resorcinol 330 mL 3 N HCl içerisinde iyice çözüldü. 670 mL saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

Reaksiyonlar; 25 μL 500 mM Glukoz, 100 mM MOPS tamponu (pH 6,5) ve değişik miktarlarda enzim özütü ile birlikte son hacim 250 μL olacak şekilde ependorf tüplerinde hazırlandı. 85°C ısıtıcı blok cihazında 1000 rpm' de 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda örnekler buz içerisinde alındı ve reaksiyonun durması hızlandırıldı. Buzdan alınan 50 μL reaksiyon çözeltisi üzerine 600 μL Seliwanoff reaktifi ilave edilerek vortekslendi, 80°C' de 40 dakika tekrar inkübe edildikten sonra, buz üzerine alınarak reaksiyon sonlandırıldı. Xmark Microplate Reader (Biorad) cihazı ile 480 nm dalga boyunda ölçümleri alındı. Fruktoz miktarı önceden hazırlanan fruktoz kalibrasyon eğrisine göre hesaplandı. Enzim aktivitesi reaksiyon sonrası oluşan fruktoz miktarına göre $\mu\text{mol}/\text{dakika}$ cinsinden hesaplamalar tamamlandı.

2.7.3. Enzimlerin Biyokimyasal Karakterizasyonu

2.7.3.1. Optimum Sıcaklık

Enzimlerin en iyi çalıştığı sıcaklık değerlerini bulmak için farklı sıcaklık aralıklarında (25, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ve 100°C) bir dizi reaksiyon gerçekleştirildi. Reaksiyonlar; 3 μL saf enzim özütü kullanılarak, 50 mM

glukoz varlığında, pH' sı 6,5 olan MOPS (100 mM MOPS, 10 mM MgSO₄, 1 mM CoCl₂) tamponu içerisinde, 30 dk süre ile reaksiyonların son hacmi 250 µL olacak şekilde gerçekleştirildi. Özellikle enzimlerin en iyi çalıştığı bilinen 70 ve 95°C arasındaki reaksiyonlar, sonuçların hassas olması açısından, BioRAD MJ Mini Personal Thermalcycler cihazı içerisinde gerçekleştirildi. Reaksiyon sonrası, alınan verilere göre optimum sıcaklık grafikleri oluşturuldu.

2.7.3.2. Optimum pH

Enzimlerin en iyi çalıştığı pH değerlerini bulmak için farklı pH değerlerine sahip tamponlarda bir dizi reaksiyon gerçekleştirildi. Reaksiyonlar, 3 µL saf enzim özütü kullanılarak, 50 mM glukoz varlığında, ilgili pH değerini sağlayan tampon içerisinde (Tablo 12) 30 dk süre ile reaksiyonların son hacmi 250 µL olacak şekilde ve 85°C' de gerçekleştirildi. Elde edilen veriler kullanılarak çizilen pH grafiğine göre enzimlerin optimum pH değerleri belirlendi.

Tablo 12. Optimum pH deneylerinde kullanılan tampon sistemleri

pH Değeri	Tampon Adı	Tampon Konsantrasyonu	İlave kimyasallar
5	Sodyum asetat		
5,5	Sodyum asetat		
6	MOPS		
6,5	MOPS		
7	MOPS		
7,5	MOPS	100 mM	10 mM MgSO ₄ 1 mM CoCl ₂
8	Tris-HCl		
8,	Tris-HCl		
9	Tris-HCl		
9,5	Glisin		
10	Glisin		

2.7.4. Enzimlerin Isıl Kararlılıkları

Yapılan mutasyonlardan sonra, mutant enzimlerin ısı kararlılığını belirlemek için saflaştırılan enzim özütleri özellikle endüstriyel uygulamalarda tercih edilen 60°C’ de inkübe edildi. Farklı zamanlarda bu örneklerden enzim alınarak, optimum çalışma şartlarında (50 mM glukoz varlığında 250 µL son hacimde ve 85°C’de 30 dk boyunca pH 6,5 olan MOPS tamponunda) glukoz izomerase aktivite reaksiyonları gerçekleştirildi. Reaksiyon sonrası GI aktivite ölçümleri yapıldı ve enzimlerin kalan aktiviteleri hesaplandı.

2.7.5. Enzimlerin Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

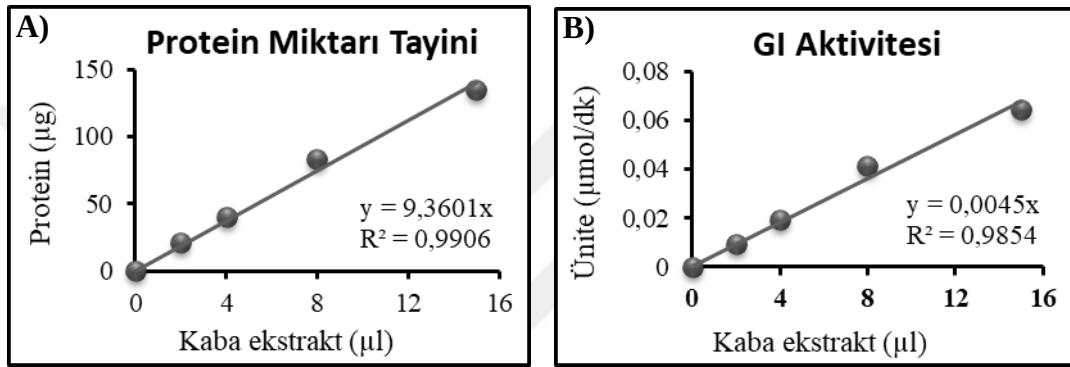
Mutant enzimlerin kinetik parametrelerini hesaplayabilmek için 1000 mM’ a kadar arttırılan glukoz konsantrasyonu ile yukarıda belirlenen sıcaklık ve pH’ larda bir seri reaksiyon gerçekleştirildi. Glukoz izomerase aktivitesi, açığa çıkan fruktoz miktarının belirlenmesi ile hesaplandı. Ölçümler sırasında 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 analiz programı kullanılarak çizilen Michaelis - Menten eğrisi ile belirlendi.

3. BULGULAR

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

3.1.1. AgoGI Yaban Tip Enzimin Saflaştırılması

3.1.1.1. Kaba Ekstrakt Elde Edilmesi

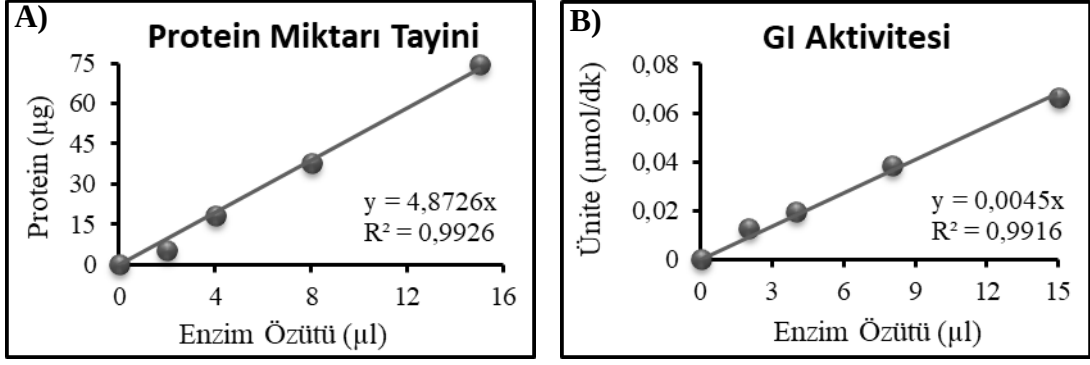


Şekil 8. AgoGI' nın Kaba Ekstrakt uygulamasına ait analiz sonuçları (A: Protein miktarı tayini , B: GI aktivitesi tayini)

Yapılan ilk denemelerde üretilen enzimin yoğun olduğu tespit edildi ve bundan dolayı enzim 20 kat sulandırılarak reaksiyonlar gerçekleştirildi ve elde edilen ölçüm sonuçları 20 ile çarpılarak tabloya aktarıldı. Alınan örnek sonuçlarına göre enzimin protein miktarı $R^2 = 0,9906$ doğrulukla $9,3601 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ olarak bulundu. GI aktivitesi için yine aynı şekilde enzim 20 kat sulandırılarak reaksiyonlar gerçekleştirildi ve ekstratın $1 \mu\text{L}'$ sine ait fruktoz miktarı tespit edildi. Buna göre enzimin kaba ekstratının GI Aktivitesi $R^2 = 0,9854$ doğrulukla $0,0045 \times 20 = 0,09 \mu\text{mol}/\text{dk}$ (Ünite) olarak bulundu (Şekil 8). Enzim 20 kat sulandırıldığı halde 30 ve $50 \mu\text{L}$ enzimle yapılan aktivite sonrası oluşan yoğun fruktoz miktarı nedeniyle ölçümler “out of range” hatası verdi.

3.1.1.2. Isı Şoku ile Denetrasyon Uygulaması

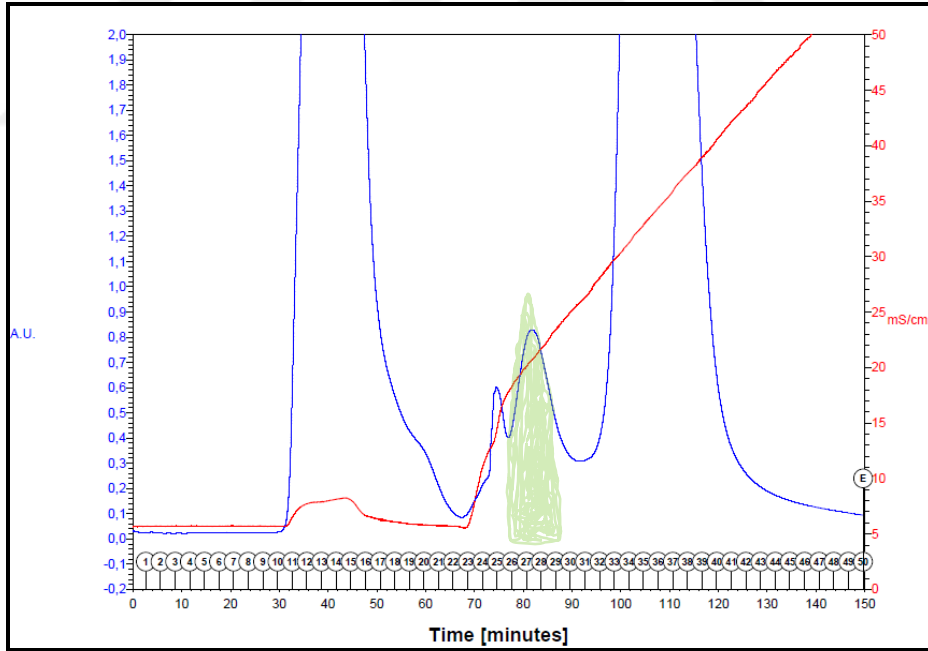
Isı şoku ile denetrasyondan sonra kaba ekstratta istenmeyen çok fazla protein uzaklaştırıldığı için protein miktarı ölçümünde enzim sulandırılma işlemi yapılmadı. Alınan örnek sonuçlarına göre enzimin protein miktarı $R^2 = 0,9926$ doğrulukla $4,8726 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ olarak bulundu.



Şekil 9. AgoGI' nın ısı şoku ile denatasyon sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları (A: Protein miktarı tayini, B: GI aktivitesi tayini)

Ekstrat ile yapılan ilk ölçümlere göre yoğun fruktoz elde edilmesi sebebiyle 20 kat sulandırılması gerçekleştirildi. Buna göre ölçüm sonucunda GI aktivite sonucu $R^2 = 0,9916$ doğrulukla $0,0045 \times 20 = 0,09 \mu\text{mol/dk}$ (Ünite) olarak bulundu (Şekil 9).

3.1.1.3. DEAE - İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması



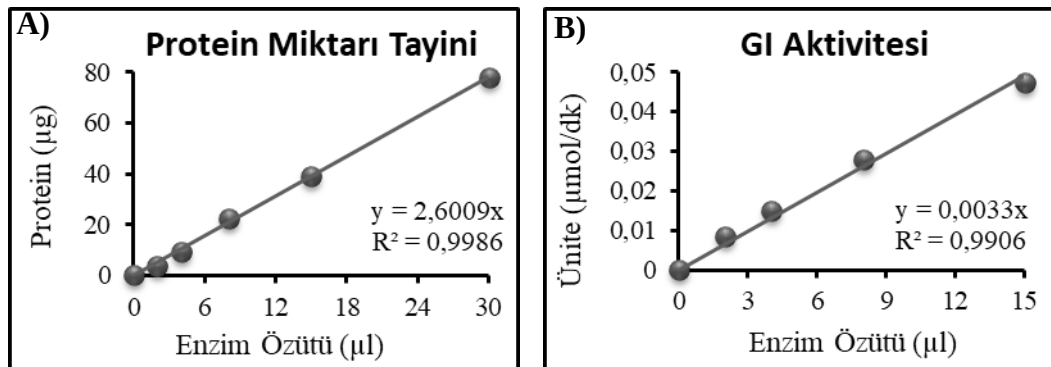
Şekil 10. AgoGI' ya ait DEAE - İyon Değişim Kolon Kromatografisi uygulaması grafiği

BioLogic LP cihazı kullanılarak yapılan İyon Değişim Kolon Kromatografisi işlemi DEAE - Sepharose matriksi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 10' da görülen grafikte mavi renkte görülen çizgi kolondan çıkan protein miktarını (295 nm' de absorbans değerleri), yuvarlak içerisinde görülen sayılar kolondan fraksiyonlara

aktarılan 3 mL' lik çözelti bulunan tüplerin numaralarını, kırmızı renkte görülen çizgi ise NaCl konsantrasyonunu temsil etmektedir. Grafikteki mavi renk takip edilirse 10 - 22 tüpler arasında yüksek miktarlarda protein kolondan ayrılmıştır. Bunlar kolona tutunmayan proteinlerdir. NaCl konsantrasyonun (kırmızı renkli çizgi) artmaya başlamış olduğu 23 numaralı tüpten itibaren artan iyonik güçle birlikte çeşitli proteinlerin farklı tüplere toplandığı görülmektedir.

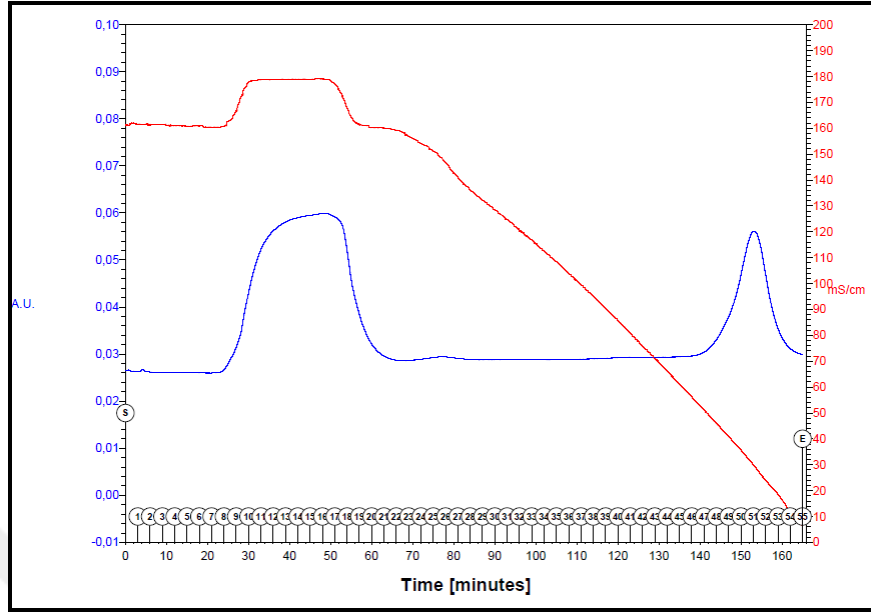
Tüm tüplerin GI aktivitesi ölçüldüğünde 27 - 32. tüpler arasında GI aktivitesinin varlığına rastlanılmıştır. Hem 10 - 22. tüpler arasında hem de GI enziminin kolondan ayrıldıktan sonra 32 ve 42. tüpler arasında gelen yüksek miktarda protein gözlenen fraksiyonlarda GI aktivitesi bulunmamaktadır. Daha önce de belirtildiği gibi bu proteinler bizim enzimimiz dışında hücre ekstratında olan proteinlerdir. GI aktivitesi görülen pikin net anlaşılır olması için pik yeşil renkle belirginleştirilmiştir.

Alınan ve birleştirilen örnek sonuçlarına göre DEAE uygulaması sonrası elde edilen özütün protein miktarı $R^2 = 0,9986$ doğrulukla $2,6009 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ olarak bulundu. Özüt ile yapılan ilk ölçümlere göre yoğun fruktoz eldesi sebebiyle reaksiyonlar 20 kat sulandırılarak gerçekleştirildi. Buna göre ölçüm sonucunda GI aktivite sonucu $R^2 = 0,9906$ doğrulukla $0,0033 \times 20 = 0,066 \mu\text{mol}/\text{dk}$ (Ünite) olarak bulundu (Şekil 11).



Şekil 11. AgoGI' ya ait İyon Değişim Kolon Kromatografisi sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları (A: Protein miktarı tayini, B: GI aktivitesi tayini)

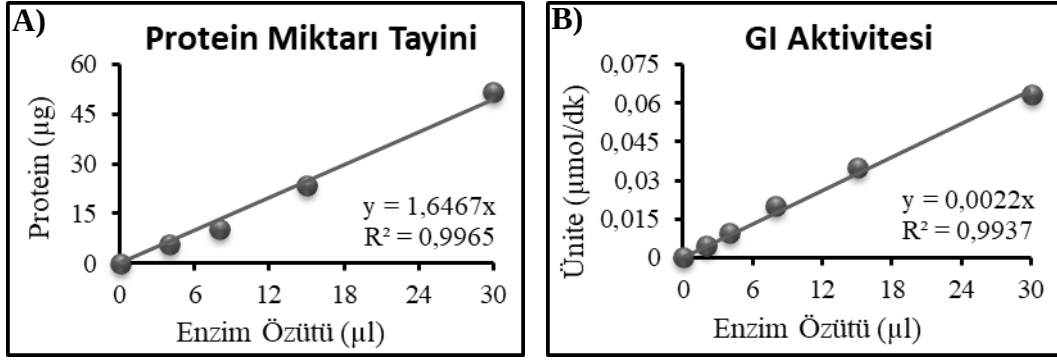
3.1.1.4. Fenil Sefaroz Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması



Şekil 12. AgoGI' ya ait Fenil Sefaroz Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi grafiği

BioLogic LP cihazı kullanılarak yapılan Fenil Sefaroz Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi işlemi pHenyl Sepharose 6 Fast Flow (Sigma) matriksi ile gerçekleştirilmiştir. Yukarıda oluşturulmuş grafikte mavi çizgi kolondan çıkan proteinlerin 295 nm' de absorbans değerini, kırmızı renkli çizgi ise amonyum sülfat konsantrasyonunu ifade etmektedir. Grafik incelendiğinde 2 farklı protein çıkışı gerçekleşmiştir. 8 ve 20. tüpler arasında çıkan protein ya da proteinler kolona tutunamayan proteinlerdir. Grafikte 48 - 53. tüpler arasında GI enzimi olduğu düşünülmektedir. Bütün tüplerde yapılan GI aktivite ölçümleri sonrasında sadece 48 - 53 nolu tüplerde aktivite olduğu kesinleşmiştir. Bu sebeple bu tüpler birleştirilerek total enzim özütü olarak kabul edildi. Bu total enzim özütü ile gerekli protein ve aktivite çalışmaları gerçekleştirildi.

Fenil Sefaroz Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi uygulaması sonrası yapılan ölçüm sonuçlarına göre enzim özütünün protein miktarı $R^2 = 0,9965$ doğrulukla $1,6467 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ bulundu. 20 kat sulandırılan enzim özütü ile yapılan GI aktivite deneyi sonucunda, GI Aktivitesi $R^2 = 0,9937$ doğrulukla $0,0022 \times 20 = 0,044 \mu\text{mol}/\text{dk}$ (Ünite) ($1\mu\text{L}$ enzim'e göre) bulundu (Şekil 13).



Şekil 13. AgoGI' ya ait Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları (A: Protein miktarı tayini, B: GI aktivitesi tayini)

3.1.1.5. AgoGI' nin Saflaştırma Verileri

Tablo 13 incelenecek olursa saflaştırılan enzimin protein miktarı 9,36' dan 1,65 mg/mL' ye azalırken, spesifik aktivitesi 9,615' ten 26,720 µmol/dk/mg protein' e %60 verim ile yükselmiştir. Enzim 20 mL hacime ulaştırılıp 2,78 kat saflaştırılmıştır. Tablo 13' teki veriler incelendiğinde, çalışmanın amacına yönelik saflaştırma uygulamalarının başarılı bir şekilde gerçekleştiği anlaşılmaktadır. Enzimin çalışmalarda doğru sonuç vereceğini düşündüğümüz saflığa ulaşması sebebi ile karakterizasyon çalışmalarına geçilmiştir.

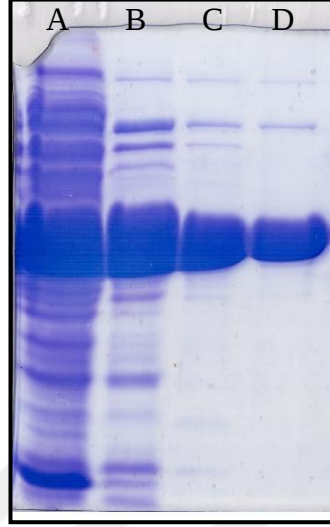
Tablo 13. AgoGI' nin saflaştırma basamaklarına ait saflaştırma verileri

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

3.1.1.6. SDS - PAGE Analizi

Saflaştırılan enzim SDS - PAGE jel elektroforezi ile yürütüldükten sonra Şekil 14' te görüntülenmiştir. Kaba ekstratın yüklendiği ((A) 25 µL) kuyucuk incelendiğinde oluşan yoğun protein bantları Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi sonrası ((D) 25 µL)

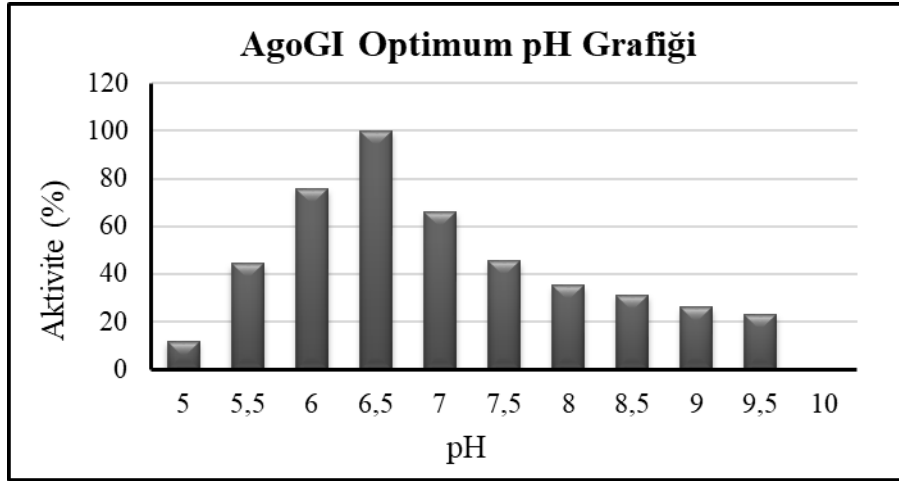
büyük oranda bertaraf edilmiştir. Isıl işlem sonrası ((B) 25 µL) ve DEAE İyon değişim Kromatografisi sonrası ((C) 25 µL) oluşan protein bantları kuyucuklarda görülmektedir.



Şekil 14. AgoGI' nın saflaştırılmasına ait SDS-PAGE analizi

3.1.2. AgoGI' nın Karakterizasyonu

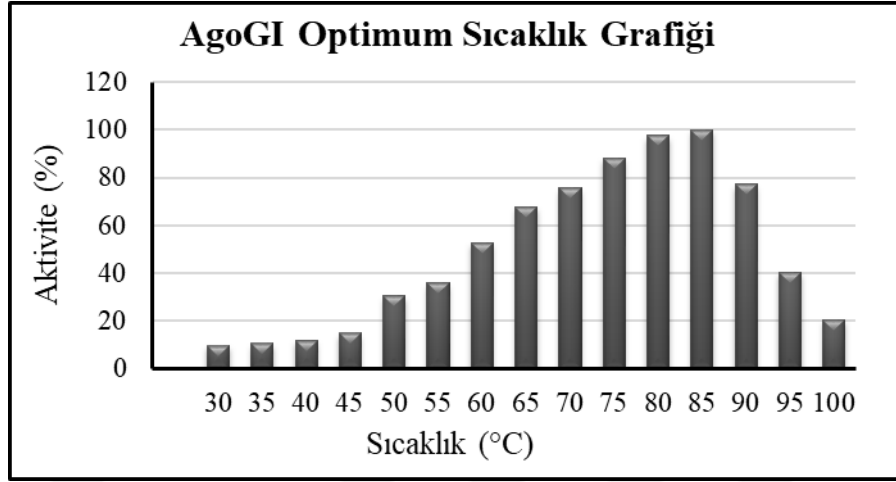
3.1.2.1. AgoGI' nın Optimum pH Aralığı



Şekil 15. AgoGI' nın Optimum pH Grafiği

Enzime ait optimum pH' ın belirlenmesi için farklı pH tamponları kullanılarak yukarıdaki grafik oluşturulmuştur (Şekil 15). Enzim pH 5' te minimuma yakın bir aktivite göstermiştir ve pH 10' a gelindiğinde enzimin aktivitesi tamamen durmuştur. Grafikten de görüleceği üzere enzim maksimum aktiviteyi pH 6,5' te göstermektedir

3.1.2.2. AgoGI' nın Optimum Sıcaklık Aralığı



Şekil 16. AgoGI' nın Optimum Sıcaklık Grafiği

Enzime ait optimum sıcaklığın belirlenmesi için farklı sıcaklıklar kullanılarak yapılan uygulama sonrası Şekil 16' da görülen grafik oluşturulmuştur. Enzim 30 - 40 - 45°C' de minimum aktivite göstermiş, 90°C' den itibaren de aktivitesinde giderek azalma gerçekleşmiştir. Grafikten de görüleceği üzere enzimin en iyi çalıştığı sıcaklık 85°C' dir.

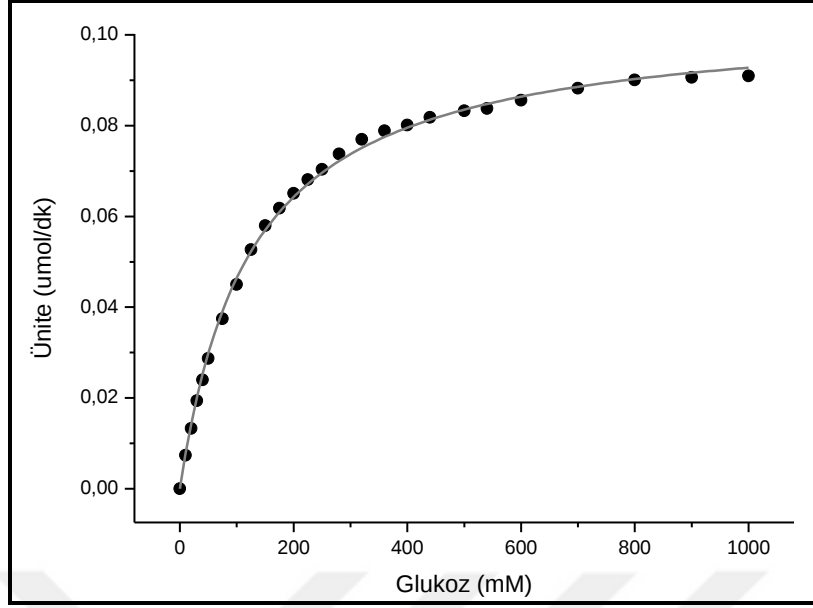
3.1.2.3. Kinetik Çalışmalar

Enzime ait kinetik parametrelerin belirlenmesi için değişik substrat konsantrasyonları ile yapılan GI aktivite çalışmalarından sonra OriginPro 8.1 analiz programı ile Şekil 17' de görülen Michaelis - Menten eğrisi oluşturuldu. Reaksiyonlarda 1,5 µL saf enzim özütü (2,475 µg protein) kullanıldı ve enzimin;

- K_m değeri $124,45 \pm 2,99$ mM,
- V_{max} değeri $39,6 \pm 0,79$ µmol/dk/mg protein ($R^2 = 0,99821$) olarak hesaplandı.

Bu veriler ile yapılan hesaplamalar sonucunda ise enzimin;

- k_{cat} değeri 33,03 1/sn,
- k_{cat}/K_m değeri ise 0,266 (katalitik etkinlik değeri) olarak hesaplandı.

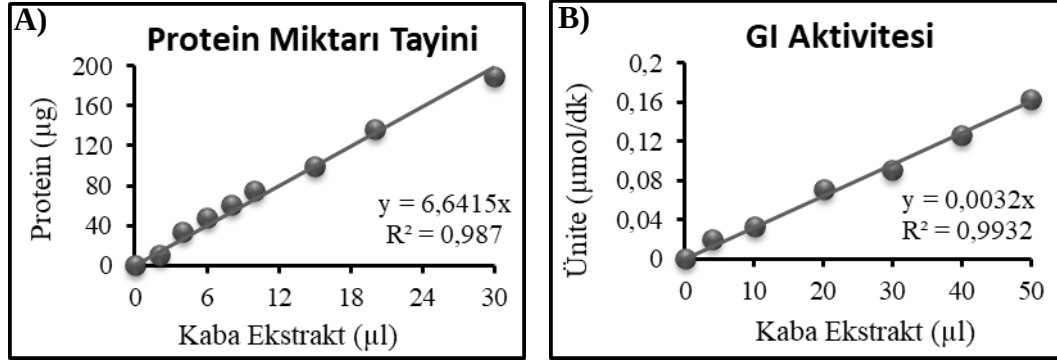


Şekil 17. AgoGI' ya ait Michaelis - Menten eğrisi

3.2. D398S Mutant GI' sının Saflaştırması ve Karakterizasyonu

3.2.1. D398S Mutant GI' nın Saflaştırılması

3.2.1.1. Kaba Ekstrakt Uygulaması

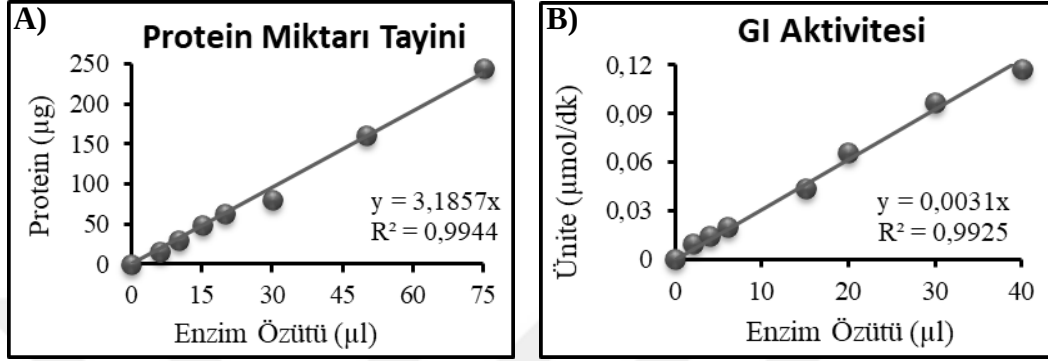


Şekil 18. D398S' nin Kaba ekstrakt uygulaması sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları (A: Protein miktarı tayini, B: GI aktivitesi tayini)

D398S mutant GI' ın kaba ekstraktı ile yapılan reaksiyonlar sonrası elde edilen ölçümlere göre Şekil 18' de görülen grafikler oluşturulmuştur. Buna göre kaba ekstraktın protein miktarı $R^2 = 0,987$ doğrulukla $6,6415 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ bulundu. Yapılan çalışmalarda aktivite ölçümleri sonrası fruktoz oranı yoğun olduğu için ekstrat 10 kat sulandırıldı ve

tekrar GI aktivitesi hesaplandı. Buna göre GI Aktivitesi $R^2 = 0,9932$ doğrulukla $0,0032 \times 10 = 0,032 \mu\text{mol/dk}$ (Ünite) bulunmuştur.

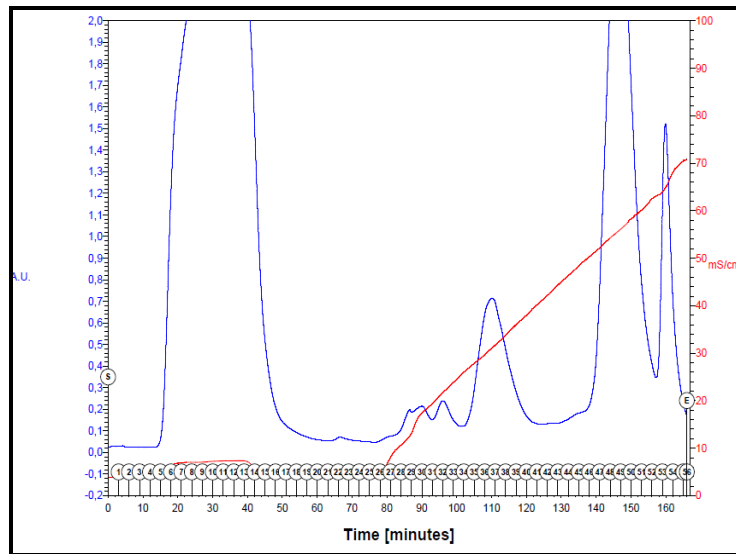
3.2.1.2. Isı Şoku ile Denetrasyon Uygulaması



Şekil 19. D398S' nin Isı Şoku ile Saflaştırma sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları (A: Protein miktarı tayini, B: GI aktivitesi tayini)

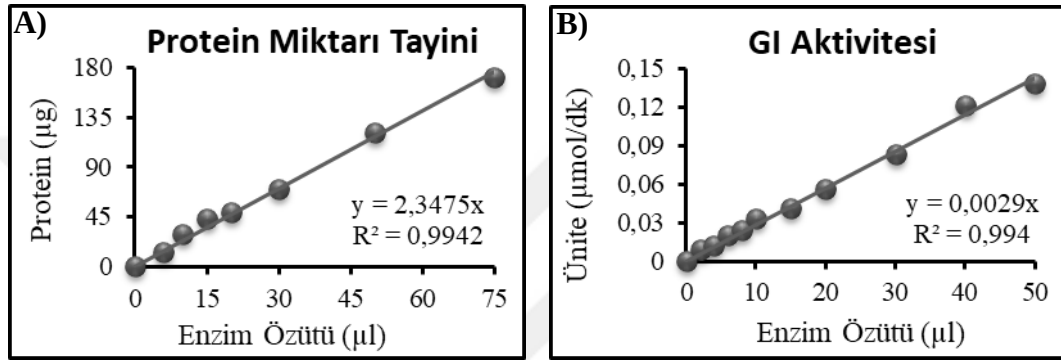
D398S mutant GI' na ısı şoku uygulaması sonrasında, enzim özütünün protein miktarı $R^2 = 0,9944$ doğrulukla $3,1857 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ bulundu. Özüt ile yapılan GI aktivitesine göre mutant enzimin fruktoz oranı yoğun olduğu için 10 kat sulandırma yapıldı. Yapılan yeni ölçümlere göre mutant enzimin GI aktivitesi $R^2 = 0,9925$ doğrulukla $0,0031 \times 10 = 0,031 \mu\text{mol/dk}$ (Ünite) bulunmuştur (Şekil 19).

3.2.1.3. DEAE - İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması



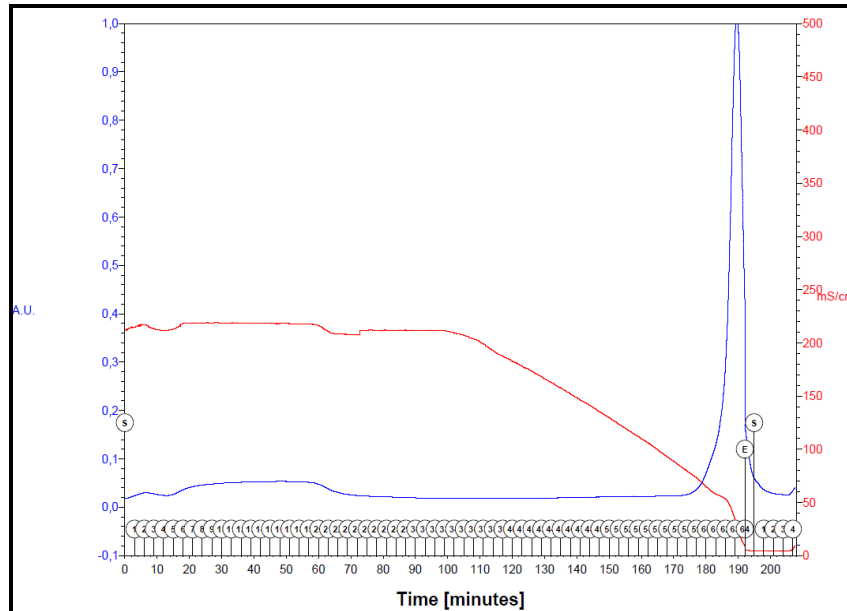
Şekil 20. D398S' ye ait İyon Değişim Kolon Kromatografisi uygulaması grafiği

DEAE - İyon değişim kolon kromatografisi uygulaması sonrası elde edilen tüm tüplerde GI aktivitesi ölçüldüğünde 35 - 42 nolu fraksiyonlarda GI aktivitesinin varlığına rastlanılmıştır (Şekil 20). Uygulama sonrası yapılan GI aktivite ölçüm sonuçlarına göre enzim özütünün protein miktarı $R^2 = 0,9942$ doğrulukla $2,3475 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ bulunmuştur. Mutant enzim 10 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite deneyi sonucunda, $1 \mu\text{L}$ enzim özütünün GI aktivitesi $R^2 = 0,994$ doğrulukla $0,0029 \times 10 = 0,029 \mu\text{mol/dk}$ (Ünite) bulunmuştur (Şekil 21).



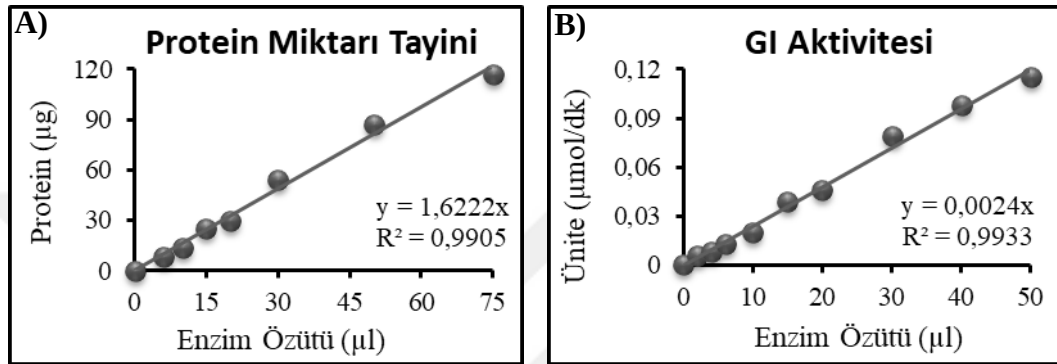
Şekil 21. D398S' ye ait İyon Değişim Kolon Kromatografisi sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları (A: Protein miktarı tayini, B: GI aktivitesi tayini)

3.2.1.4. Fenil Sefaroz Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması



Şekil 22. D398S' ye ait Fenil Sefaroz Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi uygulaması grafiği

Fenil sefaroze hidroforik etkileşim kolon kromatografisi uygulaması sonrası, bütün tüplerde yapılan GI aktivite ölçümleri sonucunda, sadece 59 - 66 nolu tüplerde GI aktivitesi olduğu kesinleşmiştir (Şekil 22). Enzim özütünün protein miktarı $R^2 = 0,9905$ doğrulukla $1,622 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ olarak hesaplandı. Yoğun olan enzim özütü 10 kat sulandırıldı ve yapılan GI aktivite deneyi sonucunda, $1 \mu\text{L}$ enzim özütünün GI Aktivitesi $R^2 = 0,9933$ doğrulukla $0,0024 \times 10 = 0,024 \mu\text{mol}/\text{dk}$ (Ünite) olarak hesaplandı (Şekil 23).



Şekil 23. D398S' ye ait Hidroforik Etkileşim Kolon Kromatografisi sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları (A: Protein miktarı tayini, B: GI aktivitesi tayini)

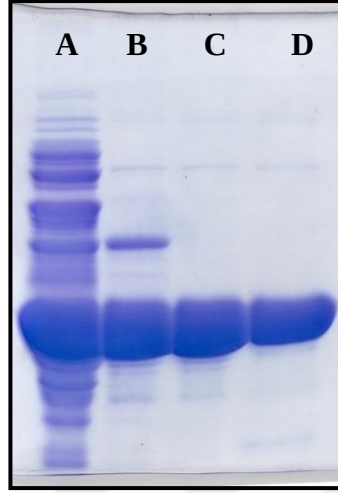
3.2.1.5. D398S Mutant GI'nin Saflaştırma Verileri

Tablo 14. D398S Mutant GI' nin saflaştırma verileri

Saflaştırma Basamakları	Total Hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Total Protein (mg)	Aktivite ($\mu\text{mol}/\text{dk}/\mu\text{L}$)	Total Aktivite ($\mu\text{mol}/\text{dk}$)	S. Aktivite ($\mu\text{mol}/\text{dk}/\text{mg}$ protein)	Verim	Saflaştırma katı
Kaba Ekstrakt	31,5	6,64	209,21	0,032	1008,00	4,818	100,0	1
Isı Şoku	29,2	3,19	93,02	0,031	905,20	9,731	89,8	2,02
İyon Değişim	27,2	2,35	63,85	0,029	788,80	12,354	78,3	2,56
Hidroforik Etkileşim	24,4	1,62	39,58	0,024	585,6	14,795	58,1	3,07

Tablo 14 incelenecek olursa saflaştırılan enzimin protein miktarı $6,64$ ’ ten $1,62 \text{ mg}/\text{mL}$ ’ ye düşürülmüş, spesifik aktivitesi ise $4,818$ ’ ten $14,795 \mu\text{mol}/\text{dk}/\text{mg}$ protein’ e $\%58,1$ verim ile arttırılmıştır. Enzim $24,4 \text{ mL}$ hacime ulaştırılıp $3,07$ kat saflaştırılmıştır. Enzimin çalışmalarda doğru sonuç vereceğini düşündüğümüz saflığa ulaşması sebebi ile karakterizasyon çalışmalarına geçilmiştir.

3.2.1.6. D398S Mutant GI' nin Saflaştırılmasına ait SDS - PAGE Analizi

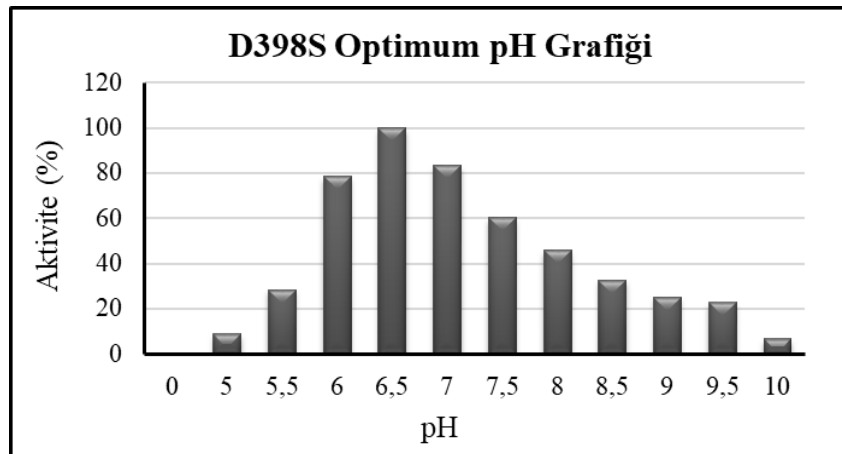


Şekil 24. D398S' nin saflaştırılmasına ait SDS - PAGE analizi

Saflaştırılan D398S mutant enzimi SDS - PAGE jel elektroforezi uygulaması ile jelde yürütüldükten sonra Şekil 24' te gösterilmiştir. Kaba enzimin yüklendiği ((A) 25 µL) kuyucuk incelendiğinde oluşan yoğun protein bantları Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi sonrası ((D) 25 µL) büyük oranda bertaraf edilmiştir. Isıl işlem sonrası ((B) 25 µL) ve DEAE İyon değişim Kromatografisi sonrası ((C) 25 µL) oluşan protein bantları kuyucuklarda görülmektedir.

3.2.2. D398S Mutant GI' nin Karakterizasyonu

3.2.2.1. D398S Mutant GI' sının Optimum pH Aralığı

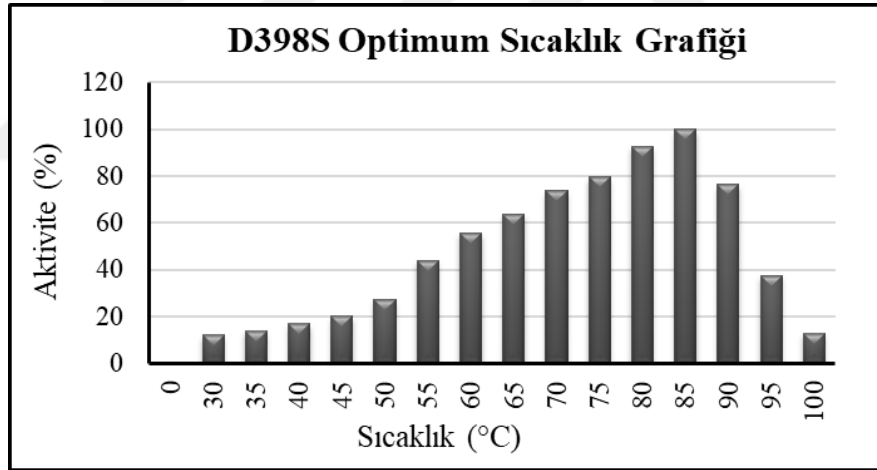


Şekil 25. D398S' nin Optimum pH Grafiği

D398S mutant GI' sına ait optimum pH' yı belirlemek için farklı pH tamponları kullanılarak Şekil 25' te görülen grafik oluşturulmuştur. Enzim pH 5' te minimuma yakın bir aktivite göstermiştir ve pH 10' a gelindiğinde enzimin aktivitesi tamamen durmuştur. Grafikten de görüleceği üzere enzim en iyi 6,5 pH' da aktivite göstermektedir.

3.2.2.2. D398S Mutant GI' nın Optimum Sıcaklık Aralığı

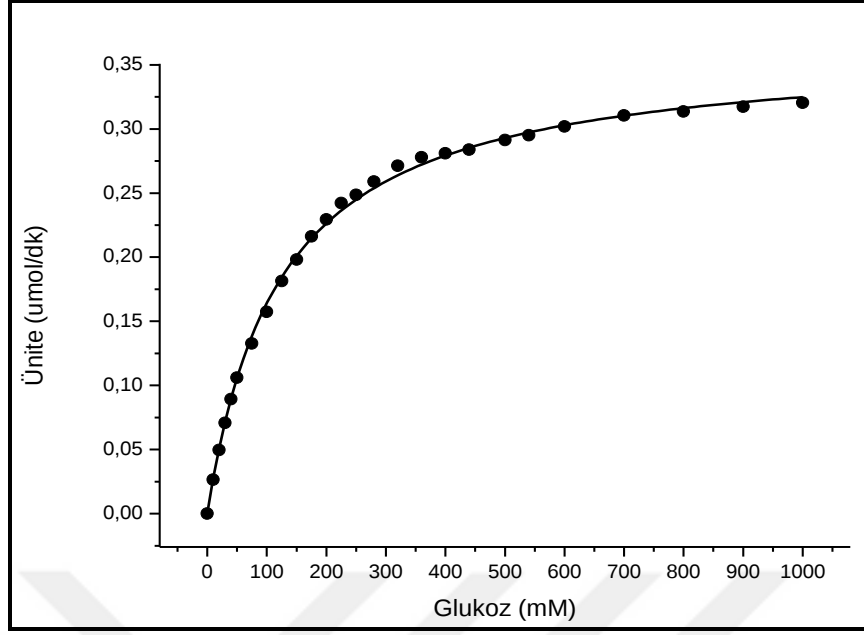
D398S mutant GI' na ait optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi için farklı sıcaklıklar kullanılarak Şekil 26' da görülen grafik oluşturulmuştur. Enzim 30 - 40 - 45°C' de minimum aktivite göstermiş, 90°C' den itibaren de aktivitesinde giderek azalma gerçekleşmiştir. Grafikten de görüleceği üzere mutant enzimin en iyi çalıştığı sıcaklık 85°C' dir.



Şekil 26. D398S' nin Optimum Sıcaklık Grafiği

3.2.2.3. D398S Mutant GI' ya Ait Kinetik Veriler

D398S mutant GI' na ait kinetik parametrelerin belirlenmesi için farklı substrat konsantrasyonları ile yapılan GI aktivite çalışmalarından sonra OriginPro 8.1 analiz programı ile Şekil 27' de görülen Michaelis - Menten eğrisi oluşturuldu.



Şekil 27. D398S mutant enzimine ait Michaelis - Menten eğrisi

Reaksiyonlarda 5 µL saf enzim özütü (8,100 µg protein) kullanıldı ve enzimin;

- K_m değeri $122,05 \pm 2,84$ Mm
- V_{max} değeri $44,99 \pm 0,30$ µmol/dk/mg protein ($R^2 = 0,99828$) olarak hesaplandı.

Bu veriler ile yapılan hesaplamalar sonucunda ise enzimin;

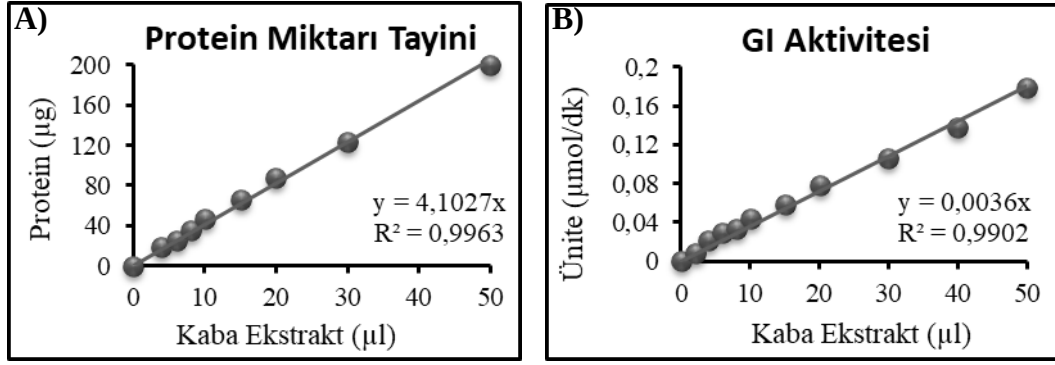
- k_{cat} değeri 37,53 1/sn
- k_{cat}/K_m değeri ise 0,308 (katalitik etkinlik değeri) olarak hesaplandı.

3.3. I323V Mutant GI'nın Saflaştırması ve Karakterizasyonu

3.3.1. I323V Mutant GI'nın Saflaştırılması

3.3.1.1. Kaba Ekstrat Uygulaması

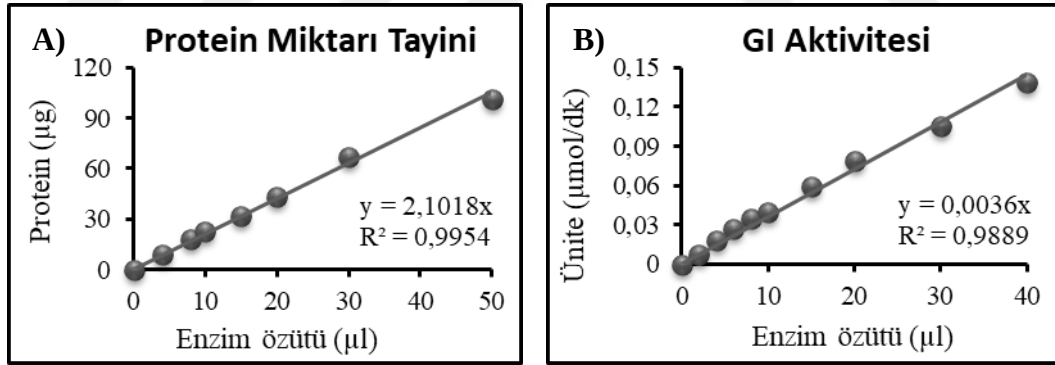
I323V mutant GI' ın kaba ekstraktı ile yapılan ölçümlere göre Şekil 28' de görülen grafikler oluşturulmuştur. Buna göre kaba ekstratın protein miktarı $R^2 = 0,9963$ doğrulukla 4,1027 µg/µL bulundu. Yapılan GI aktivite çalışması sonrası elde edilen fruktoz oranı yoğun olduğu için enzim 10 kat sulandırıldı ve GI aktivitesi tekrar hesaplandı. Buna göre 1 µL enzim özütünde GI Aktivitesi $R^2 = 0,9902$ doğrulukla $0,0036 \times 10 = 0,036$ µmol/dk (Ünite) bulunmuştur.



Şekil 28. I323V' nin Kaba Ekstraktından elde edilen özüte ait analiz sonuçları (A: Protein miktarı tayini, B: GI aktivitesi tayini)

3.3.1.2. Isı Şoku İle Denetrasyon Uygulaması

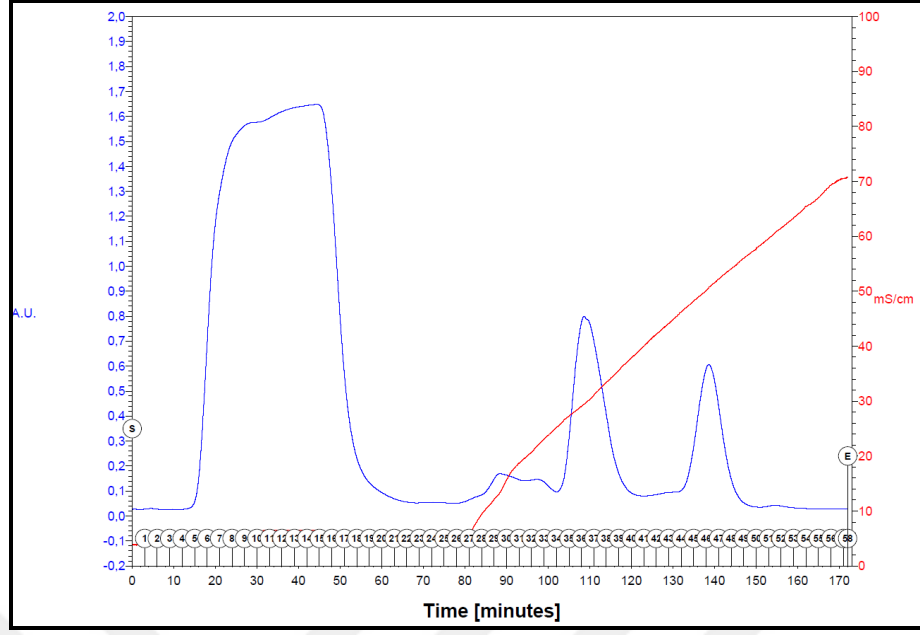
I323V mutant GI' sının bulunduğu kaba ekstrat ile ısı şoku işlemi sonrasında elde edilen enzim özütünün protein miktarı $R^2 = 0,9954$ doğrulukla $2,1018 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ bulundu. Yoğun olan özüt 10 kat sulandırıldı ve yapılan GI aktivite deneyi sonucunda, $1 \mu\text{L}$ enzim özütünde GI Aktivitesi $R^2 = 0,9889$ doğrulukla $0,0036 \times 10 = 0,036 \mu\text{mol/dk}$ (Ünite) bulunmuştur (Şekil 29).



Şekil 29. I323V' nin Isı Şoku sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları (A: Protein miktarı tayini, B: GI aktivitesi tayini)

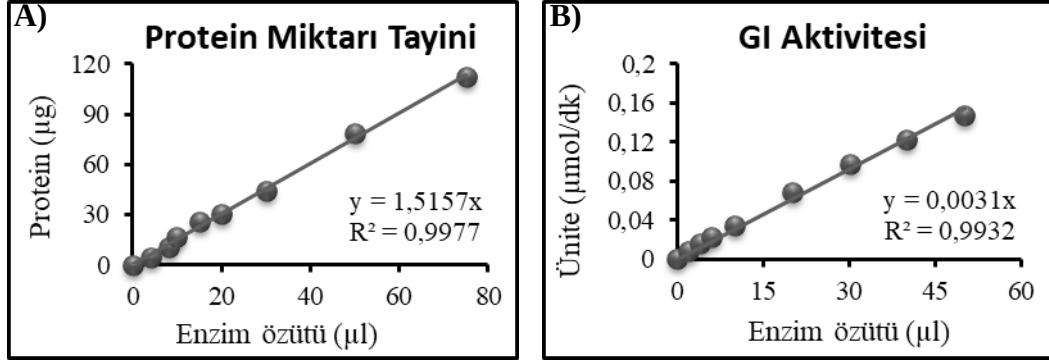
3.3.1.3. DEAE - İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması

DEAE - İyon Değişim Kolon Kromatografisi uygulaması sonrası tüm tüplerin GI aktivitesi ölçüldüğünde 33 - 41 nolu fraksiyonlarda GI aktivitesinin varlığına rastlanılmıştır (Şekil 30).



Şekil 30. I323V' ye ait iyon değişim kolon kromatografisi uygulaması grafiği

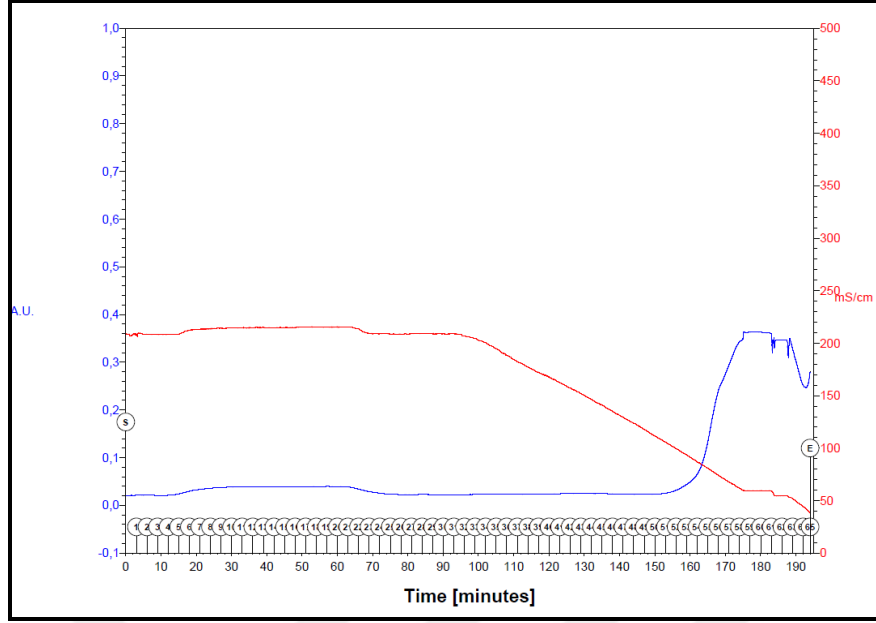
Uygulama sonrası elde edilen enzim özütünün protein miktarı $R^2 = 0,9977$ doğrulukla $1,5157 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ olarak bulundu. Enzim özütü 10 kat sulandırıldı ve yapılan GI aktivite ölçümü sonucunda, $1 \mu\text{L}$ enzim özütünün GI aktivitesi $R^2 = 0,9932$ doğrulukla $0,0031 \times 10 = 0,031 \mu\text{mol}/\text{dk}$ (Ünite) bulunmuştur (Şekil 31).



Şekil 31. I323V' ye ait İyon Değişim Kolon Kromatografisi sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları (A: Protein miktarı tayini, B: GI aktivitesi tayini)

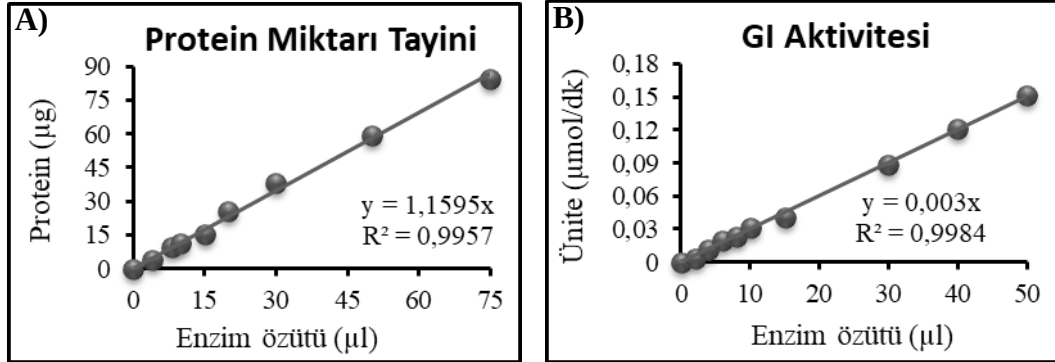
3.3.1.4. Fenil Sefaroz Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması

I323V' ye ait Fenil Sefaroz Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi uygulaması sonrası, bütün tüplerde GI aktivitesi araştırılmış ve sadece 56 - 64 nolu tüplerde aktivite olduğu belirlenmiştir (Şekil 32).



Şekil 32. I323V' ye ait Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi uygulaması grafiği

Uygulama sonrası elde edilen enzim özütünün protein miktarı $R^2 = 0,9957$ doğrulukla $1,1595 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ olarak bulundu. Yapılan GI aktivitesi ölçüm sonucunda, $1 \mu\text{L}$ enzim özütünün GI Aktivitesi $R^2 = 0,9984$ doğrulukla $0,003 \times 10 = 0,03 \mu\text{mol/dk}$ (Ünite) bulunmuştur (Şekil 33).



Şekil 33. I323V' ye ait Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları (A: Protein miktarı tayini, B: GI aktivitesi tayini)

3.3.1.5. I323V Mutant GI' nin Saflaştırma Verileri

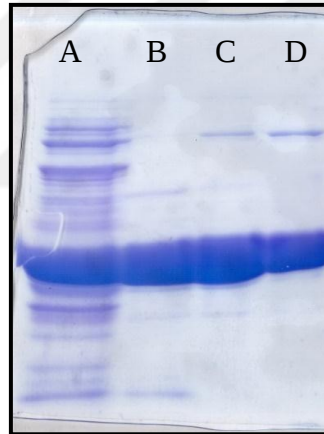
Tablo 15 incelenecek olursa saflaştırılan enzimin protein miktarı $4,10'$ dan $1,16 \text{ mg/mL}'$ ye düşürülüp, spesifik aktivitesi ise $8,775'$ ten $25,873 \mu\text{mol/dk/mg protein}'$ e $\%55,7$ verim ile yükseltilmiştir.

Tablo 15. I323V' nin saflaştırma basamaklarına ait saflaştırma tablosu

Saflaştırma Basamakları	Total Hacim (ml)	Protein mg/ml	Total Protein (mg)	Aktivite ($\mu\text{mol/dk}/\mu\text{l}$)	Total Aktivite ($\mu\text{mol/dk}$)	S. Aktivite ($\mu\text{mol/dk/mg}$ protein)	Verim	Saflaştırma katı
Kaba E.	38,6	4,10	158,36	0,036	1389,6	8,775	100,0	1
Işı Şoku	33	2,10	69,36	0,036	1188,0	17,128	85,5	1,95
İyon Değişim	27	1,52	40,92	0,031	837,0	20,453	60,2	2,33
Hidrofobik Etkileşim	25,8	1,16	29,92	0,030	774,0	25,873	55,7	2,95

Enzim 25,8 mL hacime ulaştırılıp 2,95 kat saflaştırılmıştır. Enzimin çalışmalarda doğru sonuç vereceğini düşündüğümüz saflığa ulaşması sebebi ile karakterizasyon çalışmalarına geçilmiştir.

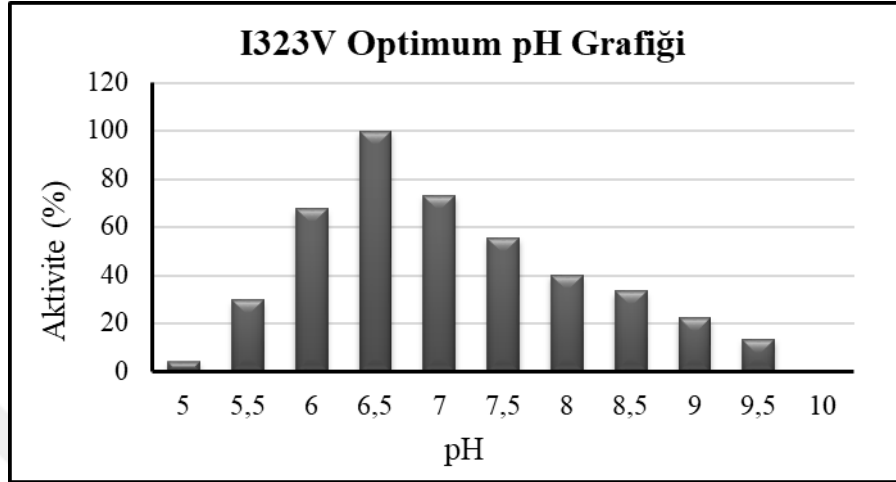
3.3.1.6. I323V Mutant GI' nin Saflaştırılmasına Ait SDS - PAGE Analizi

**Şekil 34.** I323V' nin saflaştırılmasına ait SDS - PAGE analizi

Saflaştırılan I323V mutant enzim SDS - PAGE jel elektroforezi ile yürütüldükten sonra Şekil 34' te gösterilmiştir. Kaba enzimin yüklendiği ((A) 25 μL) kuyucuk incelendiğinde oluşan yoğun protein bantları Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi sonrası ((D) 25 μL) büyük oranda bertaraf edilmiştir. Isıl işlem sonrası ((B) 25 μL) ve DEAE İyon değişim Kromatografisi sonrası ((C) 25 μL) oluşan protein bantları kuyucuklarda görülmektedir.

3.3.2. I323V Mutant GI' nın Karakterizasyonu

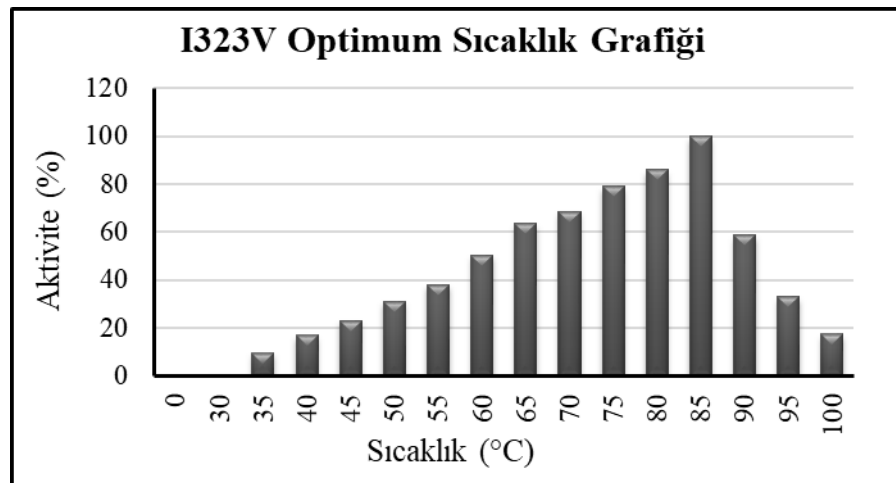
3.3.2.1. I323V Mutant GI'nın Optimum pH Aralığı



Şekil 35. I323V' nin Optimum pH Grafiği

I323V mutant GI' na ait optimum pH' ın belirlenmesi için farklı pH tamponları kullanılarak Şekil 35' teki grafik oluşturulmuştur. Enzim pH 5' te minimuma yakın bir aktivite göstermiştir ve pH 10' a geldiğinde enzimin aktivitesi tamamen durmuştur. Enzim en iyi pH 6,5 aktivite göstermektedir.

3.3.2.2. I323V Mutant GI' nın Optimum Sıcaklık Aralığı

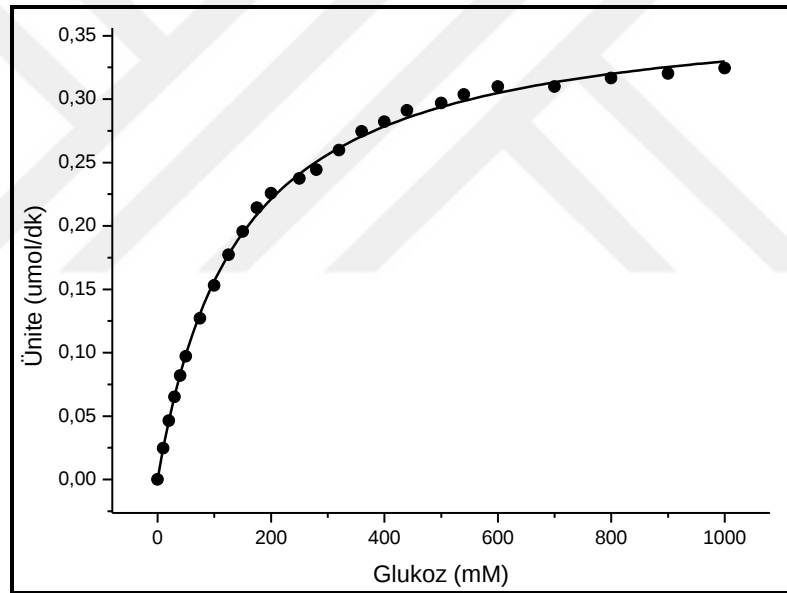


Şekil 36. I323V' nin Optimum Sıcaklık Grafiği

I323V mutant GI' na ait optimum sıcaklığın belirlenmesi için farklı sıcaklıklar kullanılarak Şekil 36' da görülen grafik oluşturulmuştur. Enzim 30 - 40 - 45°C' de minimum aktivite göstermiş, 90°C' den itibaren de aktivitesinde giderek azalma gerçekleşmiştir. Grafikten de görüleceği üzere mutant enzimin en iyi aktivite gösterdiği sıcaklık 85°C' dir.

3.3.2.3. I323V Mutant GI' ya Ait Kinetik Veriler

I323V mutant GI' na ait kinetik parametrelerin belirlenmesi için yapılan GI aktivite çalışmalarından sonra OriginPro 8.1 analiz programı ile Şekil 37' de görülen Michaelis - Menten eğrisi oluşturuldu.



Şekil 37. I323V mutant enzime ait Michaelis - Menten eğrisi

Reaksiyonlarda 8 µL saf enzim özütü (9,28 µg protein) kullanıldı ve enzimin;

- K_m değeri $140,026 \pm 3,43$ mM,
- V_{max} değeri $40,52 \pm 0,30$ µmol/dk/mg protein ($R^2 = 0,99831$) olarak hesaplandı.

Bu veriler ile yapılan hesaplamalar sonucunda enzimin;

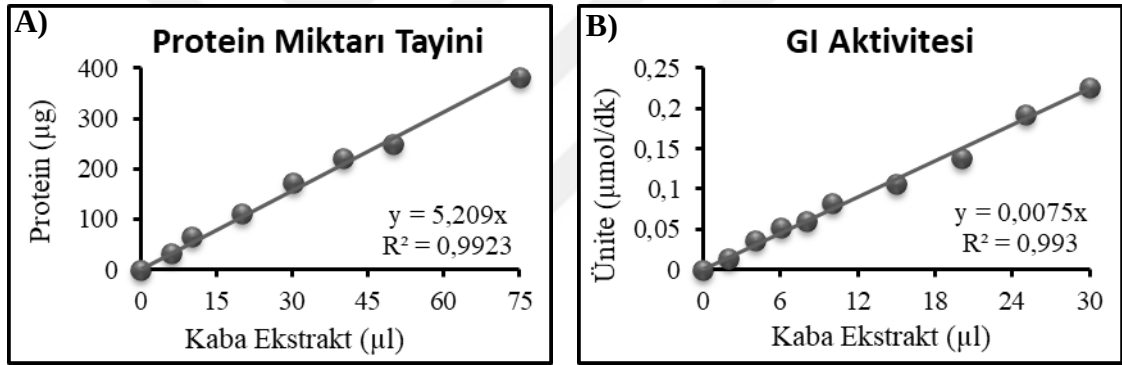
- k_{cat} değeri 33,80 1/sn
- k_{cat}/K_m değeri ise 0,241 (katalitik etkinlik değeri) olarak hesaplandı.

3.4. I372Q Mutant GI' nın Saflaştırması ve Karakterizasyonu

3.4.1. I372Q Mutant GI' nın Saflaştırılması

3.4.1.1. Kaba Ekstrakt Uygulaması

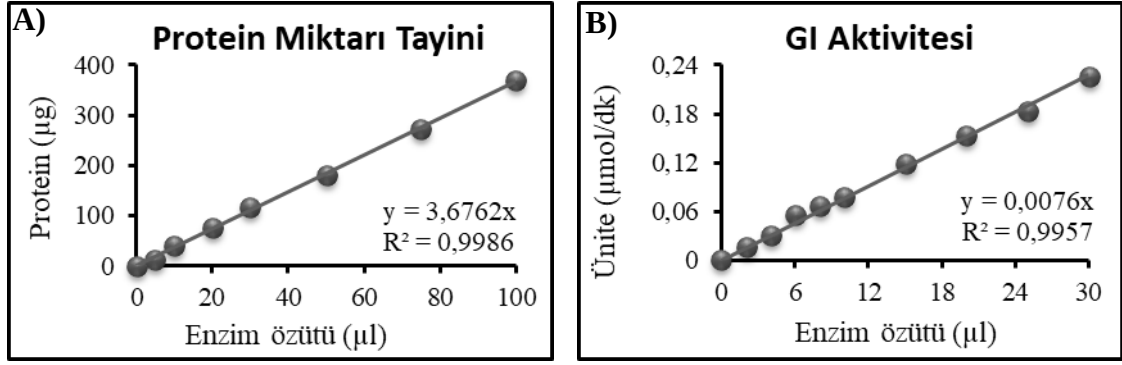
I372Q mutant GI' ın kaba ekstraktında yapılan ölçümlere Şekil 38' de görülen grafikler oluşturulmuştur. Buna göre elde edilen kaba ekstraktın protein miktarı $R^2 = 0,9923$ doğrulukla $5,209 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ bulunmuştur. GI aktivite deneyleri sonrası elde edilen fruktoz oranı yoğun olduğu için ekstrat 10 kat sulandırıldı ve GI aktivitesi tekrar hesaplandı. Buna göre $1 \mu\text{L}$ enzim özütünde GI Aktivitesi $R^2 = 0,993$ doğrulukla $0,0075 \times 10 = 0,075 \mu\text{mol/dk}$ (Ünite) bulunmuştur.



Şekil 38. I372Q' nun Kaba ekstraktından alınan özüte ait analiz sonuçları (A: Protein miktarı tayini, B: GI aktivitesi tayini)

3.4.1.2. Isı Şoku ile Denetrasyon Uygulaması

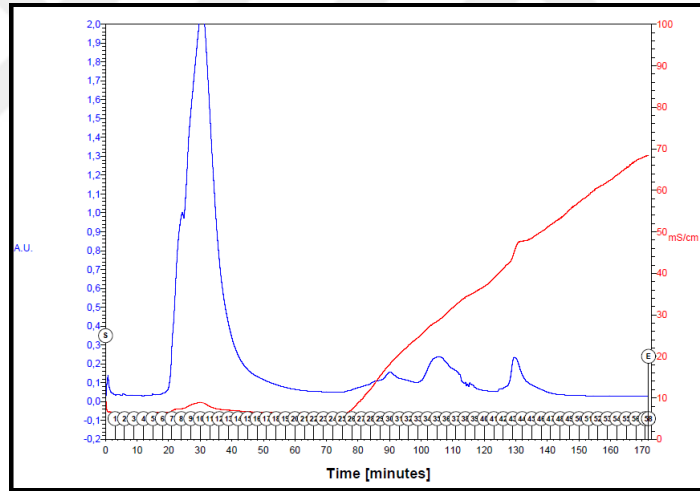
I372Q mutant GI' na ait kaba ekstraktın ısı şoku ile denetrasyonu sonrasında elde edilen özütün protein miktarı Şekil 39' da gösterilmiştir. Yapılan ölçüm sonuçlarına göre enzim özütünün protein miktarı $R^2 = 0,9986$ doğrulukla $3,6762 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ bulunmuştur. 10 kat sulandırılması sonrası yapılan GI aktivite ölçüm sonucunda, $1 \mu\text{L}$ enzim özütünde GI Aktivitesi $R^2 = 0,9957$ doğrulukla $0,0076 \times 10 = 0,076 \mu\text{mol/dk}$ (Ünite) bulunmuştur.



Şekil 39. I372Q' nun Isı Şoku sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları (A: Protein miktarı tayini, B: GI aktivitesi tayini)

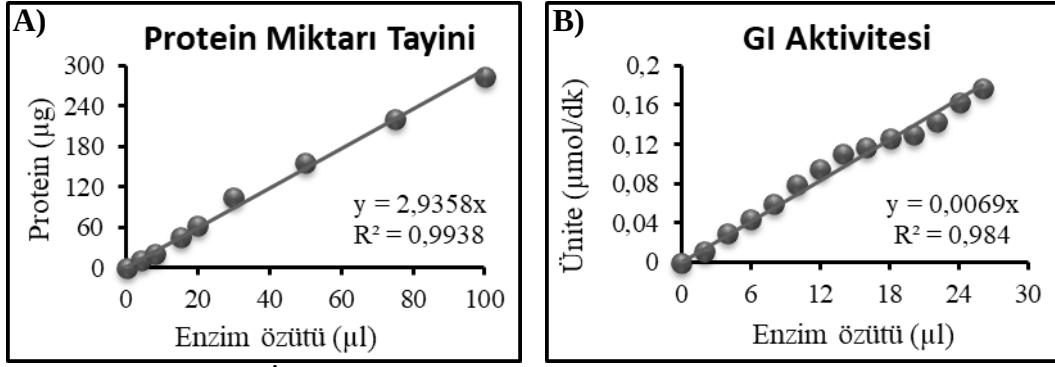
3.4.1.3. DEAE - İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması

DEAE - İyon Değişim Kolon Kromatografisi uygulaması sonrası 33 - 38 nolu fraksiyonlarda GI aktivitesinin varlığına rastlanılmıştır (Şekil 40).



Şekil 40. I372Q' ya ait İyon Değişim Kolon Kromatografisi uygulaması grafiği

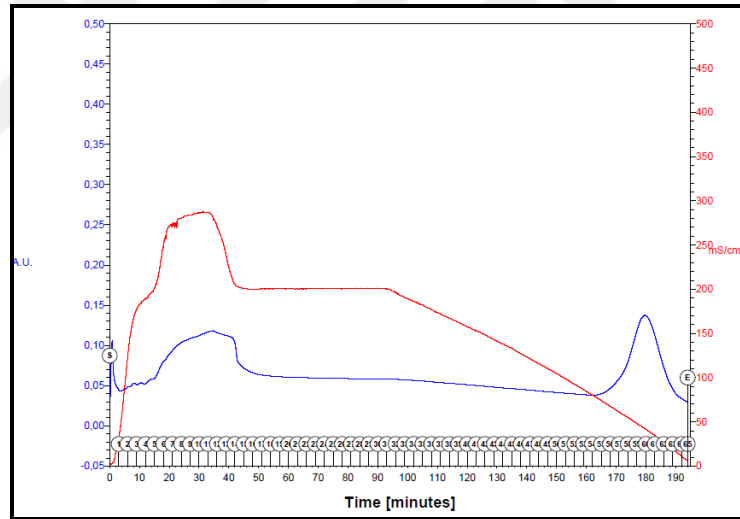
İyon Değişim Kolon Kromatografisi uygulaması sonrası yapılan ölçüm sonuçlarına göre elde edilen enzim özütünün protein miktarı $R^2 = 0,9938$ doğrulukla $2,9358 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ olarak bulunmuştur. Enzim özütü 10 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite deneyi sonucunda, $1 \mu\text{L}$ enzim özütünün GI Aktivitesi $R^2 = 0,984$ doğrulukla $0,0069 \times 10 = 0,069 \mu\text{mol/dk}$ (Ünite) olarak hesaplanmıştır (Şekil 41).



Şekil 41. I372Q' ya ait İyon Değişim Kolon Kromatografisi sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları (A: Protein miktarı tayini, B: GI aktivitesi tayini)

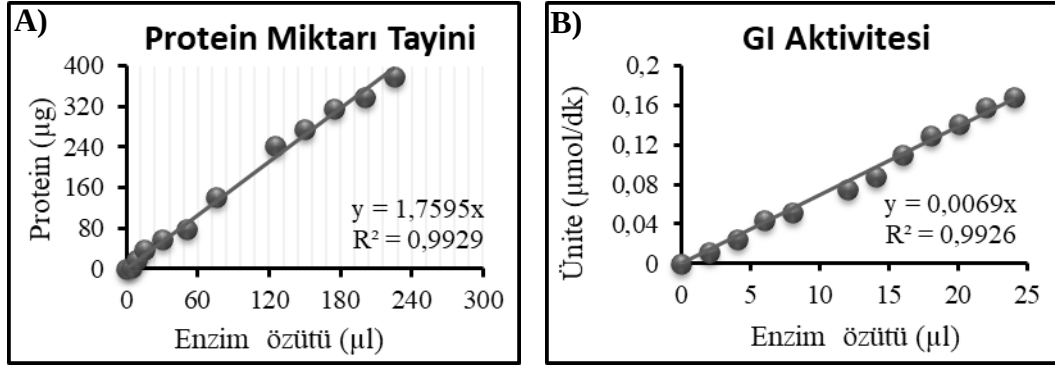
3.4.1.4. Fenil Sefaroz Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması

Fenil sefaroze hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulaması sonrası 59 - 64 nolu fraksiyonlarda GI aktivitesinin varlığına rastlanılmıştır (Şekil 42).



Şekil 42. I372Q' ya ait Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi uygulaması grafiği

Uygulama sonrası elde edilen enzim özütünün protein miktarı $R^2 = 0,9929$ doğrulukla $1,7595 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ bulundu. Yoğun olan enzim özütü 10 kat sulandırıldı ve GI aktivite ölçüm sonucunda, $1 \mu\text{L}$ enzim özütünde GI Aktivitesi $R^2 = 0,9926$ doğrulukla $0,0069 \times 10 = 0,069 \mu\text{mol}/\text{dk}$ (Ünite) bulunmuştur (Şekil 43).



Şekil 43. I372Q' ya ait Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları (A: Protein miktarı tayini, B: GI aktivitesi tayini)

3.4.1.5. I372Q Mutant GI' nın Saflaştırma Verileri

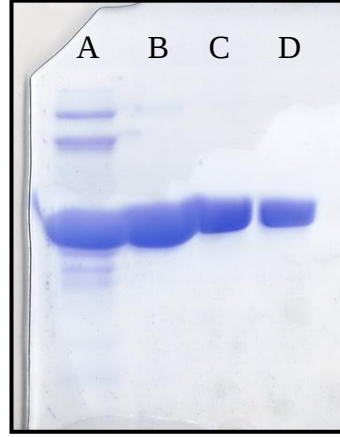
Tablo 16 incelenecek olursa saflaştırılan enzimin protein miktarı 5,15' ten 1,76 mg/mL'ye düşürülmüş iken, spesifik aktivitesi 14,398' ten 39,216 μmol/dk/mg protein' e %75,3 verim ile yükseltilmiştir. Enzim 18 mL hacime ulaştırılıp 2,72 kat saflaştırılmıştır. Enzimin çalışmalarda doğru sonuç vereceği düşünülen saflığa ulaşması sebebi ile karakterizasyon çalışmalarına geçilmiştir.

Tablo 16. I372Q' nun Saflaştırma Basamaklarına ait Saflaştırma Tablosu

Saflaştırma Basamakları	Total Hacim (ml)	Protein mg/ml	Total Protein (mg)	Aktivite (μmol/d k/μl)	Total Aktivite (μmol/d k)	S. Aktivite (μmol/dk/m g protein)	Verim	Saflaştırma katı
Kaba E.	22	5,15	113,3	0,075	1650	14,398	100	1
Işı Şoku	20	3,68	73,52	0,076	1520	20,674	92,1	1,44
İyon Değişim	18,5	2,94	54,31	0,069	1276,5	23,503	84,0	1,63
Hidrofobik Etkileşim	18	1,76	31,67	0,069	1242	39,216	75,3	2,72

3.4.1.6. I372Q Mutant GI' nın Saflaştırılmasına ait SDS - PAGE Analizi

Saflaştırılan I372Q mutant enzimine ait SDS - PAGE jel elektroforezi uygulaması sonrası elde edilen jel görüntüsü Şekil 44' te gösterilmiştir.

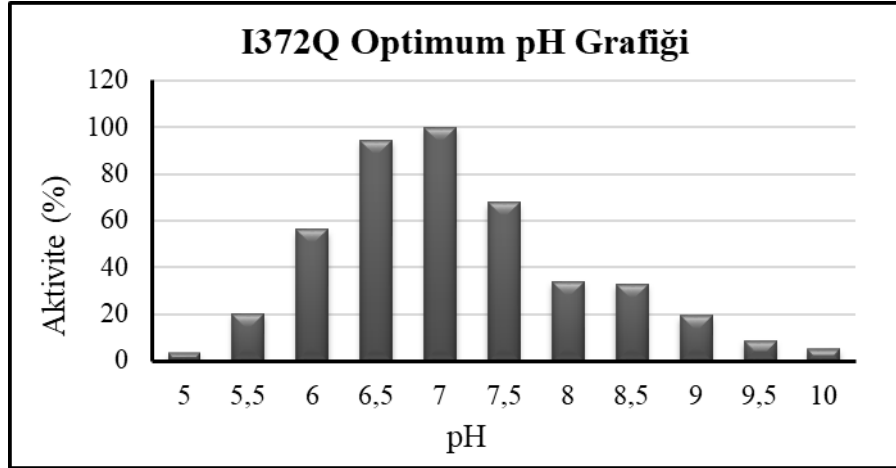


Şekil 44. I372Q' nun saflaştırılmasına ait SDS - PAGE analizi

Kaba enzimin yüklendiği ((A)25 µl) kuyucuk incelendiğinde oluşan yoğun protein bantları Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi sonrası ((D)25 µl) büyük oranda bertaraf edilmiştir. Isıl işlem sonrası ((B) 25 µL) ve DEAE İyon değişim Kromatografisi sonrası ((C) 25 µL) oluşan protein bantları kuyucuklarda görülmektedir.

3.4.2. I372Q Mutant GI' nın Karakterizasyonu

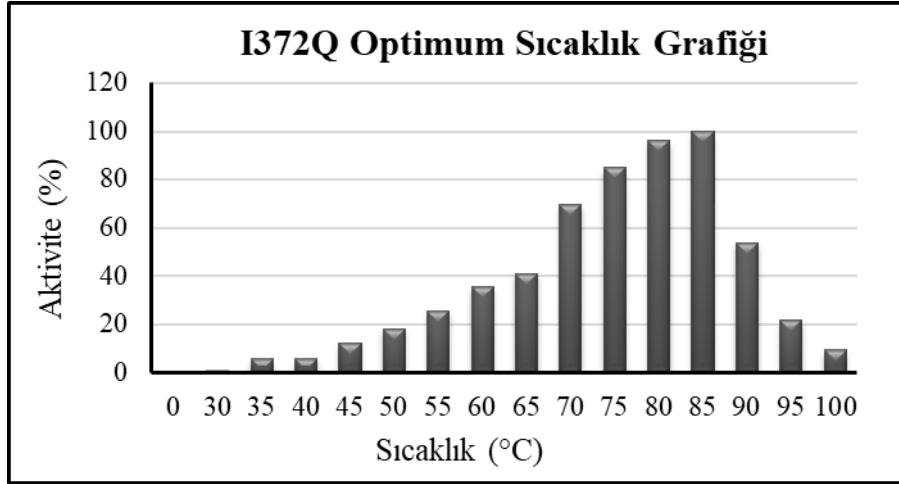
3.4.2.1. I372Q Mutant GI' nın Optimum pH Aralığı



Şekil 45. I372Q' nun Optimum pH Grafiği

I372Q mutant GI' na ait optimum pH' ın belirlenmesi için farklı pH tamponları kullanılarak Şekil 45' teki grafik oluşturulmuştur. Grafikten de görüleceği üzere enzim en iyi aktiviteyi pH 7' de göstermektedir. Mutasyon yaban tip enzimin optimum pH değerini 6,5' tan 7' ye değiştirmiştir. Deney kontrollü bir şekilde 7 kez tekrarlanmıştır.

3.4.2.2. I372Q Mutant GI' nin Optimum Sıcaklık Aralığı

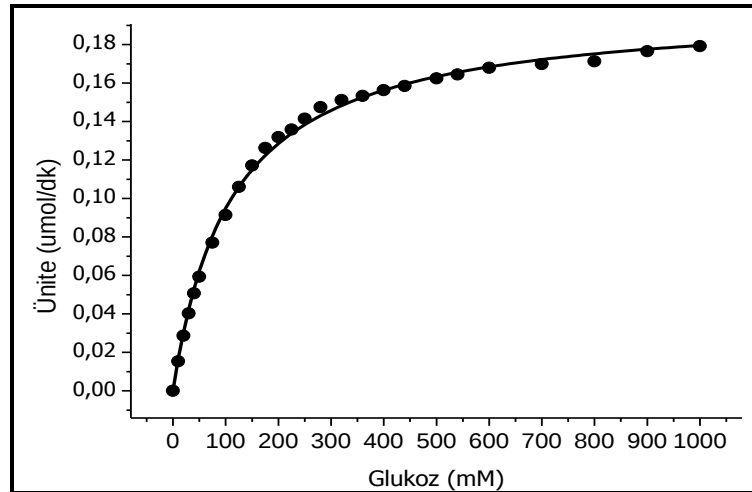


Şekil 46. I372Q' nun Optimum Sıcaklık Grafiği

I372Q mutant GI' na ait optimum sıcaklığın belirlenmesi için farklı sıcaklıklar kullanılarak Şekil 46' daki grafik oluşturulmuştur. Enzim 30 - 35 - 40°C' de minimum aktivite göstermiş, 90°C' den itibaren de aktivitesinde giderek azalma gerçekleşmiştir. Grafikten de görüleceği üzere mutant enzimin en iyi çalıştığı sıcaklık 85°C' dir.

3.4.2.3. I372Q Mutant GI' ya Ait Kinetik Veriler

I372Q mutant GI' na ait kinetik parametrelerin belirlenmesi için yapılan GI aktivite çalışmalarından sonra OriginPro 8.1 analiz programı ile Şekil 47' deki Michaelis - Menten eğrisi oluşturuldu.



Şekil 47. I372Q mutant enzimine ait Michaelis - Menten eğrisi

Reaksiyonlarda 5 µL saf enzim özütü (8,8 µg protein) kullanıldı ve enzimin;

- K_m değeri $110,17 \pm 3,09$ mM
- V_{max} değeri $22,65 \pm 0,17$ µmol/dk/mg protein ($R^2 = 0,99744$) olarak

hesaplandı.

Bu veriler ile yapılan hesaplamalar sonucunda enzimin;

- k_{cat} değeri 18,89 1/sn, k_{cat}/K_m değeri 0,172 (katalitik etkinlik değeri)

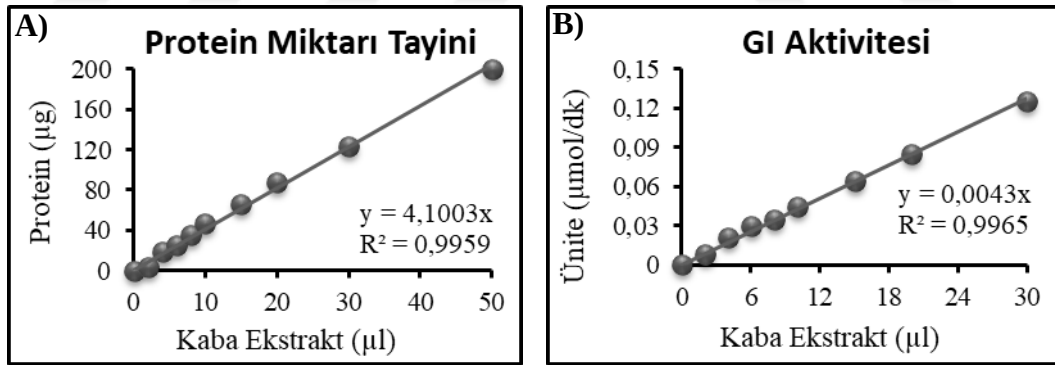
olarak hesaplandı.

3.5. I372V Mutant GI' nın Saflaştırması ve Karakterizasyonu

3.5.1. I372V Mutant GI' nın Saflaştırılması

3.5.1.1. Kaba Ekstrakt Uygulaması

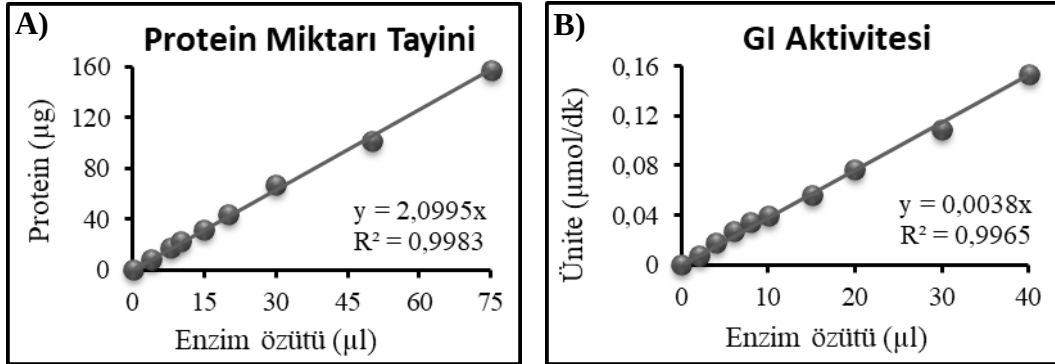
I372V mutant GI'ın kaba ekstraktında yapılan ölçümlere göre Şekil 48' de görülen grafikler oluşturulmuştur.



Şekil 48. I372V' nin Kaba ekstraktından elde edilen özüte sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları (A: Protein miktarı tayini, B: GI aktivitesi tayini)

Buna göre kaba ekstraktın protein miktarı $R^2 = 0,9959$ doğrulukla $4,1003$ µg/µL bulunmuştur. Yoğun olan enzim özütü 10 kat sulandırıldı ve yapılan GI aktivite deneyi sonucunda, 1 µL enzim özütünde GI Aktivitesi $R^2 = 0,9965$ doğrulukla $0,0043 \times 10 = 0,043$ µmol/dk (Ünite) bulunmuştur.

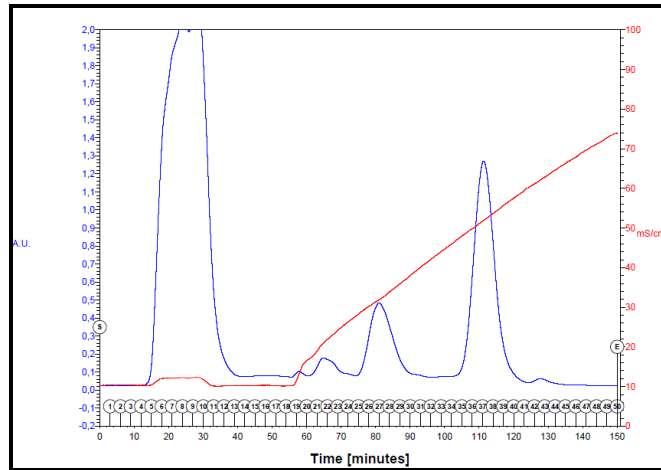
3.5.1.2. Isı Şoku İle Denetrasyon Uygulaması



Şekil 49. I372V' nin Isı Şoku sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları (A: Protein miktarı tayini, B: GI aktivitesi tayini)

I372V mutant GI' na uygulanan ısı şoku uygulaması sonrasında Şekil 49' daki grafikler oluşturulmuştur. Enzim özütünün protein miktarı $R^2 = 0,9983$ doğrulukla $2,0995 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ bulunmuştur. Yoğun olan enzim özütü 10 kat sulandırılarak $1 \mu\text{L}$ enzim özütünde GI Aktivitesi $R^2 = 0,9965$ doğrulukla $0,0038 \times 10 = 0,038 \mu\text{mol/dk}$ (Ünite) bulunmuştur.

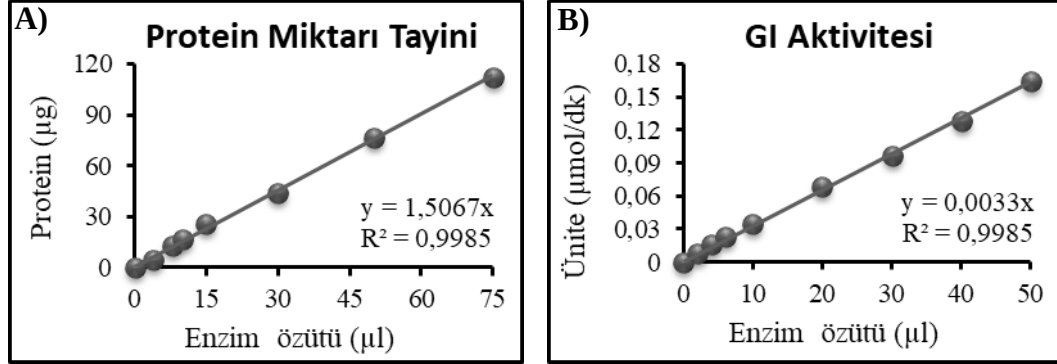
3.5.1.3. DEAE - İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması



Şekil 50. I372V' ye ait İyon Değişim Kolon Kromatografisi uygulaması grafiği

DEAE - İyon Değişim Kolon Kromatografisi uygulaması sonrası 23 - 31 nolu fraksiyonlarda GI aktivitesinin varlığına rastlanılmıştır (Şekil 50). Yapılan ölçüm sonuçlarına göre I372V mutant GI' nın protein miktarı $R^2 = 0,9985$ doğrulukla $1,5067 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ bulundu. Yoğun olan enzim 10 kat sulandırıldı ve yapılan GI aktivite deneyi

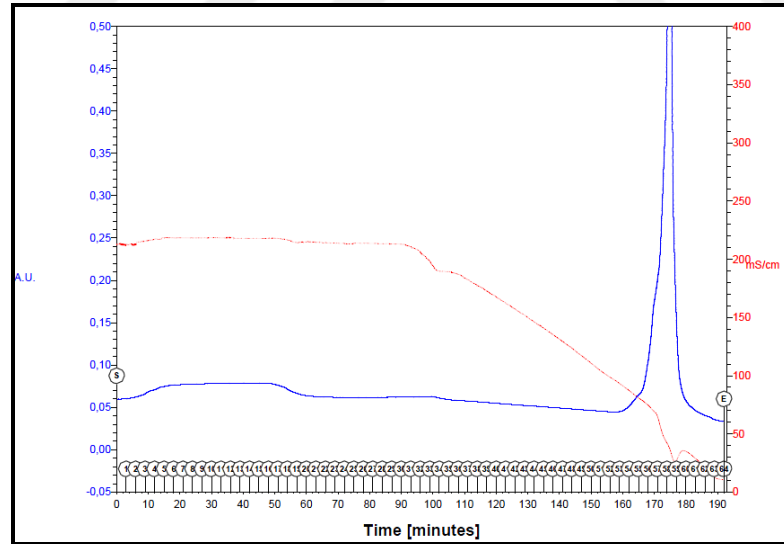
sonucunda, 1 μL enzim özütünde GI Aktivitesi $R^2 = 0,9985$ doğrulukla $0,0033 \times 10 = 0,033 \mu\text{mol/dk}$ (Ünite) bulunmuştur (Şekil 51).



Şekil 51. I372V' ye ait İyon Değişim Kolon Kromatografisi sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları (A: Protein miktarı tayini, B: GI aktivitesi tayini)

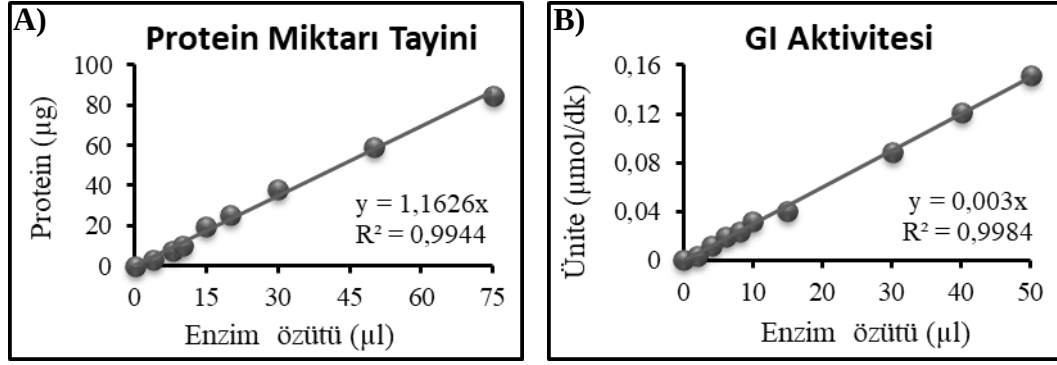
3.5.1.4. Fenil Sefaroz Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması

Fenil Sefaroz Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi uygulaması sonrası 56 - 62 nolu tüplerde aktivite olduğu saptanmıştır (Şekil 52).



Şekil 52. I372V' ye ait Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi uygulaması grafiği

Yapılan ölçümler sonrası I372V mutant GI' nın protein miktarı $R^2 = 0,9944$ doğrulukla $1,1626 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ bulunmuştur. Yoğun olan enzim özütü 10 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite deneyi sonucunda, 1 μL enzim özütünde GI Aktivitesi $R^2 = 0,9984$ doğrulukla $0,003 \times 10 = 0,03 \mu\text{mol/dk}$ (Ünite) bulunmuştur (Şekil 53).



Şekil 53. I372V' ye ait Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları (A: Protein miktarı tayini, B: GI aktivitesi tayini)

3.5.1.5. I372V Mutant GI' nın Saflaştırma Verileri

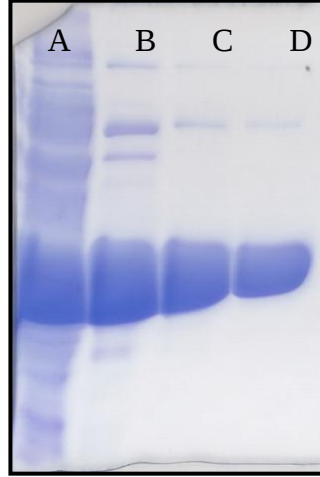
Tablo 17 incelenecek olursa saflaştırılan enzimin protein miktarı 4,10' dan 1,16 mg/ml' a düşürülmüş ve spesifik aktivitesi 10,487' den 25,804 µmol/dk/mg protein'e %48,4 verim ile yükseltilmiştir. Enzim 26,8 mL hacime ulaştırılıp 2,46 kat saflaştırılmıştır.

Tablo 17. I372V' nin Saflaştırma Basamaklarına ait Saflaştırma Tablosu

Saflaştırma Basamakları	Total Hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Total Protein (mg)	Aktivite (µmol/dk/µl)	Total Aktivite (µmol/dk)	S. Aktivite (µmol/dk/mg protein)	Verim	Saflaştırma katı
Kaba E.	38,6	4,10	158,27	0,043	1659,8	10,487	100	1
Isı Şoku	33	2,10	69,33	0,038	1254	18,087	75,6	1,72
İyon değişim	27	1,51	40,68	0,033	891	21,902	53,7	2,09
Hidrofobik Etkileşim	26,8	1,16	31,16	0,030	804	25,804	48,4	2,46

3.5.1.6. I372V Mutant GI' nın Saflaştırılmasına Ait SDS - PAGE Analizi

Saflaştırılan I372V mutant enzim SDS - PAGE jel elektroforezi uygulaması sonrasında elde edilen jel görüntüsü Şekil 54' te gösterilmiştir.

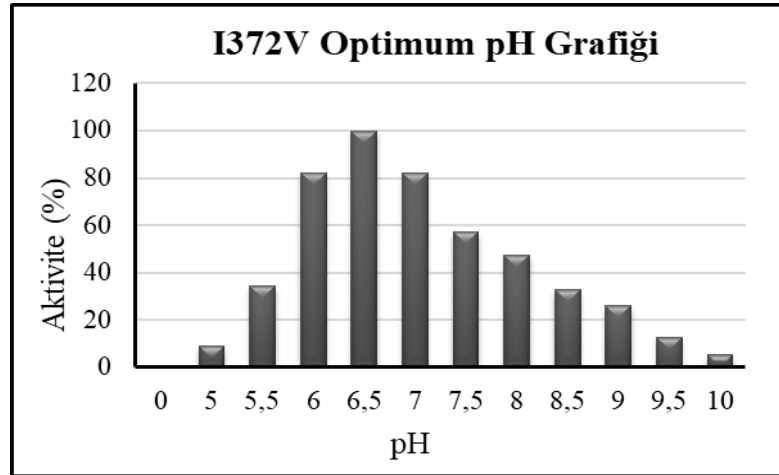


Şekil 54. I372V' nin Saflaştırılmasına ait SDS - PAGE analizi

Kaba enzimin yüklendiği ((A) 25 µL) kuyucuk incelendiğinde oluşan yoğun protein bantları Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi sonrası ((D) 25 µL) büyük oranda bertaraf edilmiştir. Isıl işlem sonrası ((B) 25 µL) ve DEAE İyon değişim Kromatografisi sonrası ((C) 25 µL) oluşan protein bantları kuyucuklarda görülmektedir.

3.5.2. I372V Mutant GI' nın Karakterizasyonu

3.5.2.1. I372V Mutant GI' nın Optimum pH Aralığı

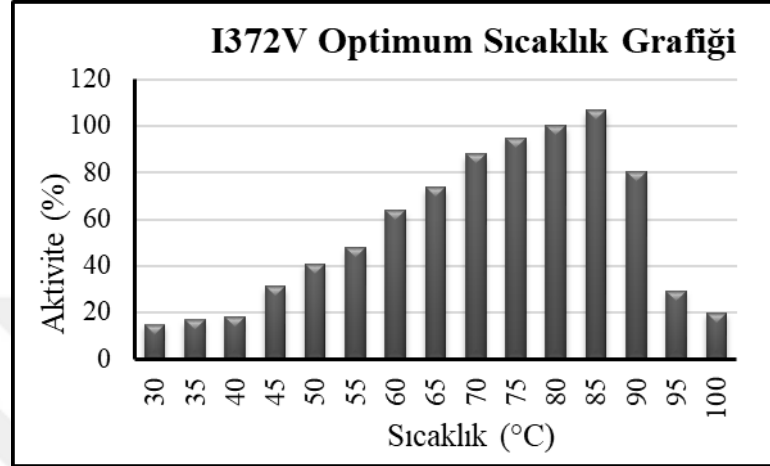


Şekil 55. I372V' nin Optimum pH Grafiği

I372V mutant GI' na ait optimum pH' ın belirlenmesi için farklı pH tamponları kullanılarak Şekil 55' te görülen grafik oluşturulmuştur. Enzim pH 5' te minimuma yakın bir aktivite göstermiştir ve pH 10' a gelindiğinde enzimin aktivitesi tamamen

durmuştur. Grafikten de görüleceği üzere enzim en iyi aktiviteyi pH 6,5’ te göstermektedir.

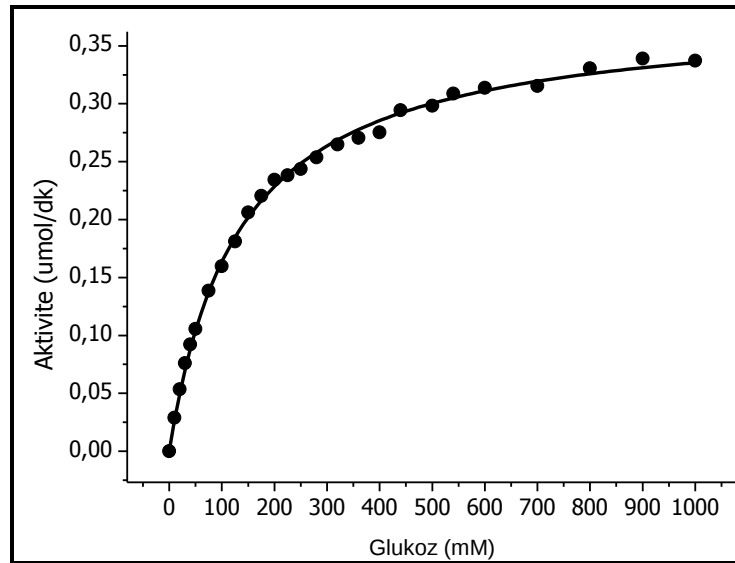
3.5.2.2. I372V Mutant GI’ sının Optimum Sıcaklık Aralığı



Şekil 56. I372V’ nin Optimum Sıcaklık Grafiği

I372V mutant GI’ na ait optimum sıcaklığın belirlenmesi için farklı sıcaklıklar kullanılarak Şekil 56’ daki grafik oluşturulmuştur. Enzim 30 - 35 - 40°C’ de minimum aktivite göstermiş, 90°C’ den itibaren de aktivitesinde giderek azalma gerçekleşmiştir. Grafikten de görüleceği üzere mutant enzimin en iyi çalıştığı sıcaklık 85°C’ dir.

3.5.2.3. I372V Mutant GI’ ya Ait Kinetik Veriler



Şekil 57. I372V mutant enzime ait Michaelis - Menten eğrisi

I372V mutant GI' na ait kinetik parametrelerin belirlenmesi için yapılan GI aktivite çalışmalarından sonra OriginPro 8.1 analiz programı ile Şekil 57' deki Michaelis-Menten eğrisi oluşturuldu. Reaksiyonlarda 5 µL saf enzim özütü (5,8 µg protein) kullanıldı ve enzimin;

- K_m değeri $132,11 \pm 3,7$ mM,
- V_{max} değeri $65,46 \pm 0,55$ µmol/dk/mg protein ($R^2 = 0,9975$) olarak hesaplandı.

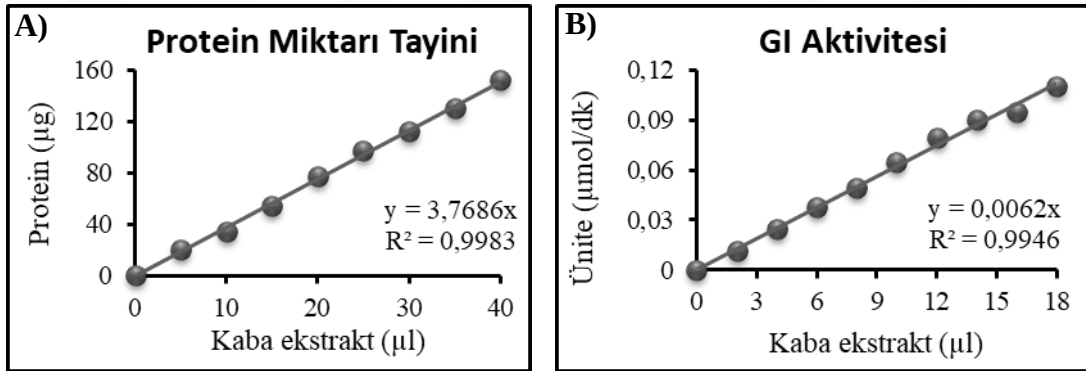
Bu veriler ile yapılan hesaplamalar sonucunda enzimin;

- k_{cat} değeri 54,60 1/sn,
- k_{cat}/K_m değeri 0,413(katalitik etkinlik değeri) olarak hesaplandı

3.6. V380F Mutant GI' nin Saflaştırması ve Karakterizasyonu

3.6.1. V380F Mutant GI' nin Saflaştırılması

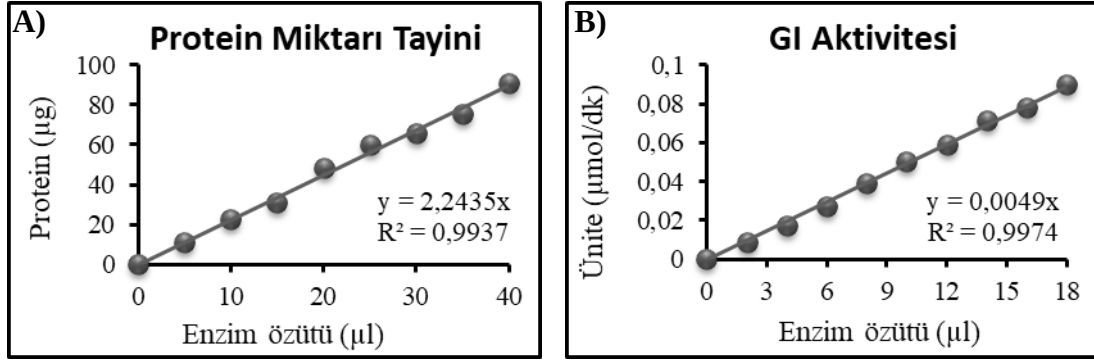
3.6.1.1. Kaba Ekstrakt Uygulaması



Şekil 58. V380F' nin Kaba Ekstraktından elde edilen özüte ait analiz sonuçları (A: Protein miktarı tayini, B: GI aktivitesi tayini)

V380F mutant GI' ın kaba ekstraktında yapılan ölçümlere göre Şekil 58' deki grafikler oluşturulmuştur. Kaba ekstraktın protein miktarı $R^2 = 0,9983$ doğrulukla $3,7686$ µg/µL bulunmuştur. Enzim özütü 5 kat sulandırıldı ve yapılan GI aktivite çalışmaları sonucunda, 1 µL enzim özütünde GI Aktivitesi $R^2 = 0,9946$ doğrulukla $0,0062 \times 5 = 0,031$ µmol/dk (Ünite) bulunmuştur.

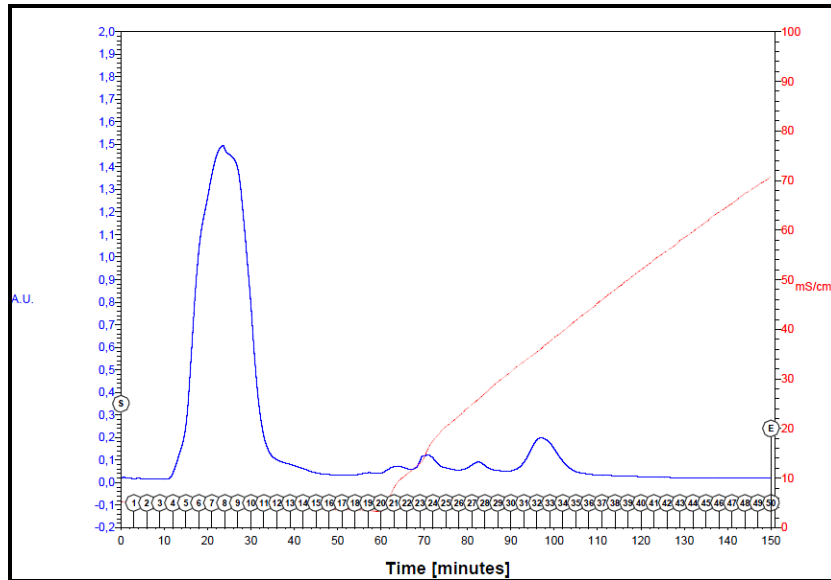
3.6.1.2. Isı Şoku İle Denetrasyon Uygulaması



Şekil 59. V380F' nin Isı Şoku sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları (A: Protein miktarı tayini, B: GI aktivitesi tayini)

V380F mutant GI' na ısı şoku ile denetrasyonu sonrasında Şekil 59' daki grafikler oluşturulmuştur. Enzim özütünün protein miktarı miktarı $R^2 = 0,9937$ doğrulukla 2,2435 µg/µL bulundu. Enzim özütü 5 kat sulandırıldı ve yapılan GI aktivite deneyi sonucunda, 1 µL enzim özütünde GI Aktivitesi $R^2 = 0,9974$ doğrulukla $0,0049 \times 5 = 0,0245$ µmol/dk (Ünite) bulunmuştur.

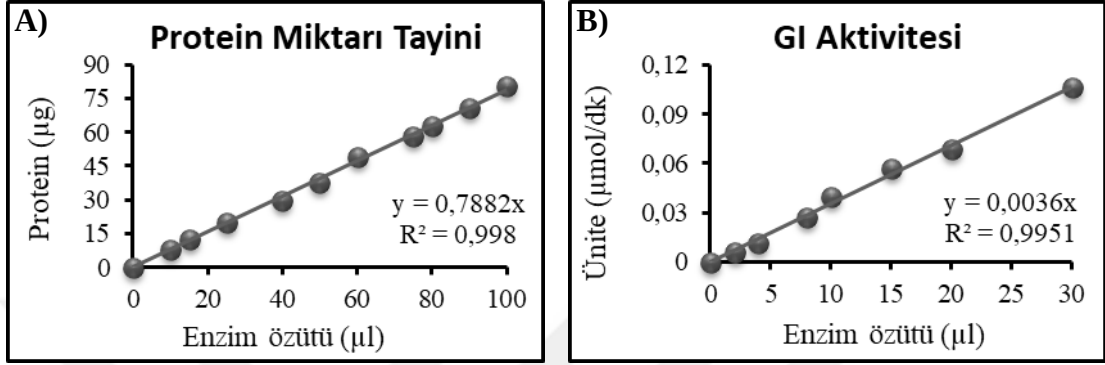
3.6.1.3. DEAE - İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması



Şekil 60. V380F' ye ait İyon Değişim Kolon Kromatografisi uygulaması grafiği

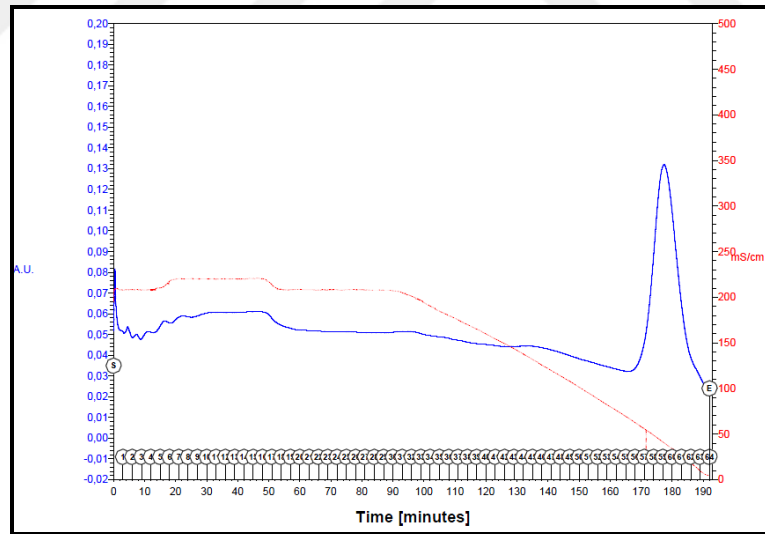
DEAE - İyon Değişim Kolon Kromatografisi uygulaması sonrası 31 - 36 nolu fraksiyonlarda GI aktivitesinin varlığına rastlanılmıştır (Şekil 60). Uygulama sonrası

enzim özütünün protein miktarı $R^2 = 0,998$ doğrulukla $0,7882 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ olarak bulunmuştur. Enzim özütü 5 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite ölçümleri sonucunda, $1 \mu\text{L}$ enzim özütünde GI Aktivitesi $R^2 = 0,9951$ doğrulukla $0,0036 \times 5 = 0,018 \mu\text{mol}/\text{dk}$ (Ünite) bulunmuştur (Şekil 61).



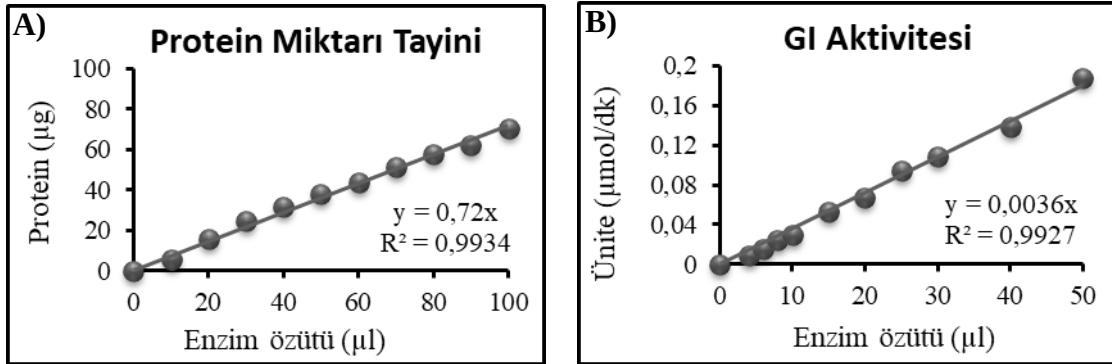
Şekil 61. V380F' ye ait İyon Değişim Kolon Kromatografisi sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları (A: Protein miktarı tayini, B: GI aktivitesi tayini)

3.6.1.4. Fenil Sefaroz Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması



Şekil 62. V380F' ye ait Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi uygulaması grafiği

Uygulanan Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi sonrasında sadece 58 - 62 nolu tüplerde aktivite olduğu belirlenmiştir (Şekil 62). Uygulama sonrası enzim özütünün protein miktarı $R^2 = 0,9934$ doğrulukla $0,72 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ olarak bulunmuştur. Enzim özütü 5 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite ölçümü sonucunda, $1 \mu\text{L}$ enzim özütünde GI Aktivitesi $R^2 = 0,9927$ doğrulukla $0,0036 \times 5 = 0,018 \mu\text{mol}/\text{dk}$ (Ünite) olarak bulunmuştur (Şekil 63).



Şekil 63. V380F' ye ait Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları (A: Protein miktarı tayini, B: GI aktivitesi tayini)

3.6.1.5. V380F Mutant GI' nın Saflaştırma Verileri

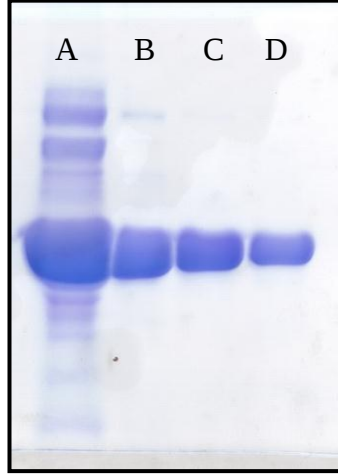
Tablo 18. V380F' nin Saflaştırma Basamaklarına ait Saflaştırma Tablosu

Saflaştırma Basamakları	Total Hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Total Protein (mg)	Aktivite (µmol/dk/µl)	Total Aktivite (µmol/dk)	S. Aktivite (µmol/dk/mg protein)	Verim	Saflaştırma katı
Kaba E.	18	3,77	67,84	0,031	558	8,225	100	1
Isı Şoku	15	2,24	33,65	0,0245	367,5	10,920	65,9	1,3
İyon değişim	17	0,79	13,40	0,018	306	22,837	54,8	2,8
Hidrofobik Etkileşim	15	0,72	10,80	0,018	270	25,000	48,4	3,0

Tablo 18 incelenecek olursa saflaştırılan enzimin protein miktarı 3,77' den 0,72 mg/ml'a düşürülmüş, spesifik aktivitesi 8,225' ten 25,000 µmol/dk/mg protein' e %48,4 verim ile yükseltilmiştir. Enzim 15 mL hacime ulaştırılıp 3,0 kat saflaştırılmıştır.

3.6.1.6. V380F Mutant GI' nın Saflaştırılmasına Ait SDS - PAGE Analizi

Saflaştırılan V380F mutant enzim SDS - PAGE jel elektroforezi uygulaması yapıldıktan sonra Şekil 64' teki jel görüntüsü oluşturulmuştur.

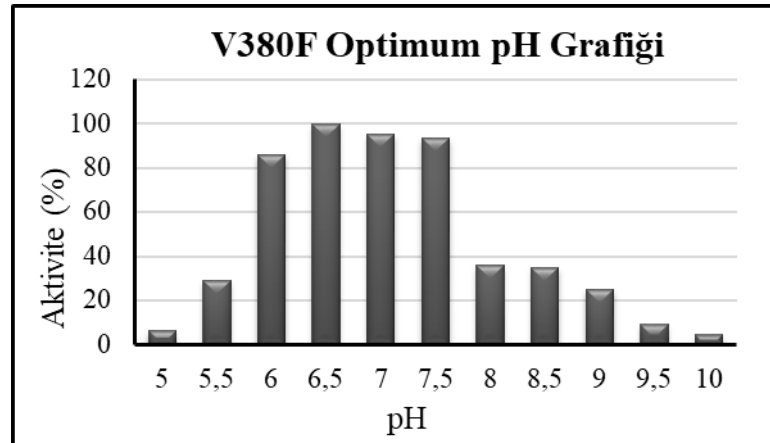


Şekil 64. V380F' nin Saflaştırılmasına ait SDS - PAGE Analizi

Kaba enzimin yüklendiği ((A) 25 μ L) kuyucuk incelendiğinde oluşan yoğun protein bantları Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi sonrası ((D) 25 μ L) büyük oranda bertaraf edilmiştir. Isıl işlem sonrası ((B) 25 μ L) ve DEAE İyon Değişim Kromatografisi sonrası ((C) 25 μ L) oluşan protein bantları kuyucuklarda görülmektedir.

3.6.2. V380F Mutant GI' nin Karakterizasyonu

3.6.2.1. V380F Mutant GI' nin Optimum pH Aralığı

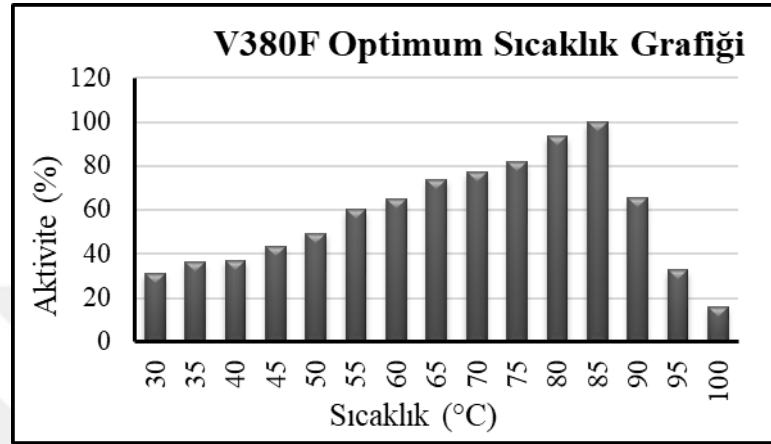


Şekil 65. V380F' nin Optimum pH Grafiği

V380F mutant GI' na ait optimum pH' ın belirlenmesi için farklı pH tamponları kullanılarak Şekil 65' te görülen grafik oluşturulmuştur. Enzim pH 5' te minimuma yakın bir aktivite göstermiştir ve pH 10' a gelindiğinde enzimin aktivitesi tamamen

durmuştur. Grafikten de görüleceği üzere enzim en iyi çalışma aralığı pH 6,5'te göstermektedir.

3.6.2.2. V380F Mutant GI' nın Optimum Sıcaklık Aralığı

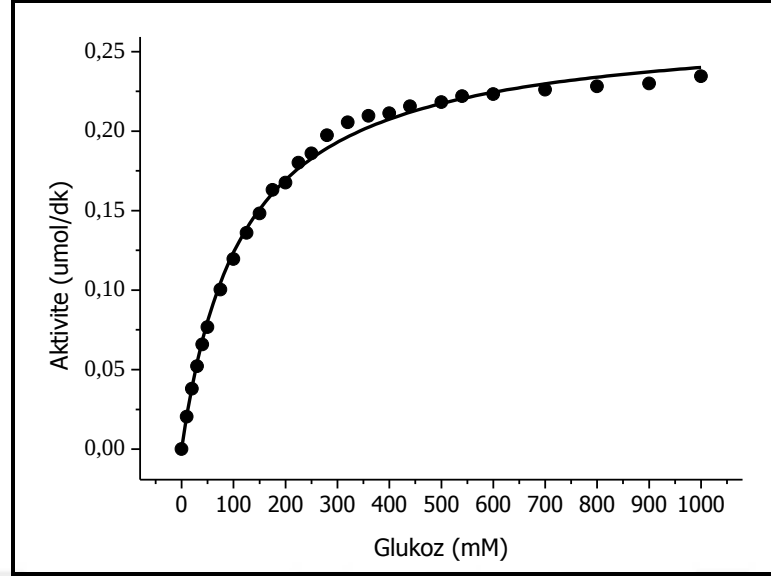


Şekil 66. V380F' nin Optimum Sıcaklık Grafiği

V380F mutant GI' na ait optimum sıcaklığın belirlenmesi için farklı sıcaklıklar kullanılarak Şekil 66' daki grafik oluşturulmuştur. Enzim 30 - 35 - 40°C' de minimum aktivite göstermiş, 90°C' den itibaren de aktivitesinde giderek azalma gerçekleşmiştir. Grafikten de görüleceği üzere mutant enzimin en iyi çalıştığı sıcaklık 85°C' dir.

3.6.2.3. V380F Mutant GI' ya Ait Kinetik Veriler

V380F mutant GI' na ait kinetik parametrelerin belirlenmesi için yapılan GI aktivite çalışmalarından sonra OriginPro 8.1 analiz programı ile Şekil 67' de görülen Michaelis - Menten eğrisi oluşturuldu.



Şekil 67. V380F Mutant enzimine ait Michaelis - Menten eğrisi

Reaksiyonlarda 10 µl saf enzim özütü (7,2 µg protein) kullanıldı ve enzimin;

- K_m değeri $116,57 \pm 4,37$ mM
- V_{max} değeri $37,22 \pm 0,39$ µmol/dk/mg protein ($R^2 = 0,9955$) olarak hesaplandı.

Bu veriler ile yapılan hesaplamalar sonucunda enzimin;

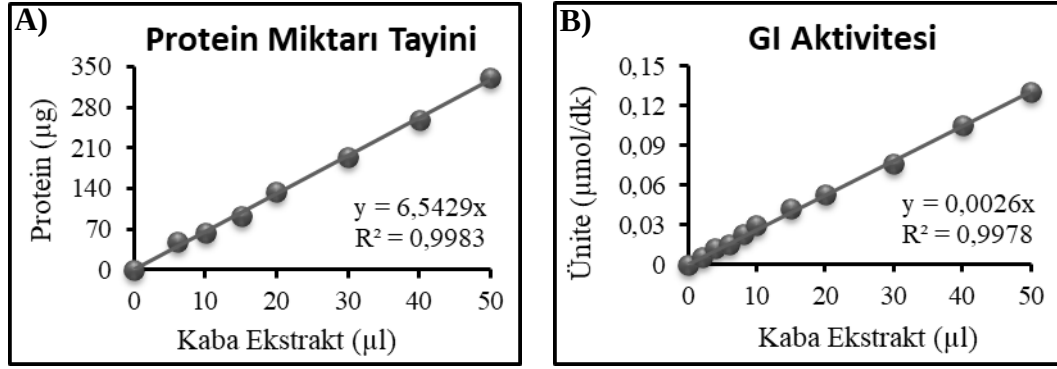
- k_{cat} değeri 31,05 1/sn
- k_{cat}/K_m değeri 0,266 (katalitik etkinlik değeri) olarak hesaplandı.

3.7. V380F - I372V Mutant GI' nın Saflaştırması ve Karakterizasyonu

3.7.1. V380F - I372V Mutant GI' nın Saflaştırılması

3.7.1.1. Kaba Ekstrakt Uygulaması

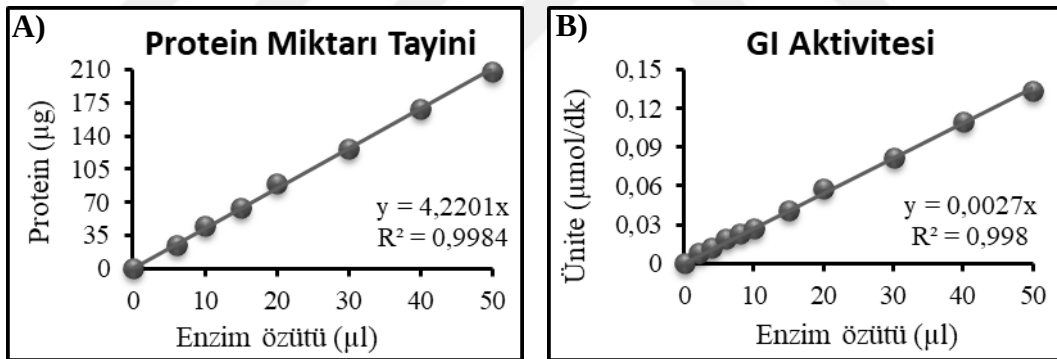
V380F - I372V mutant GI' ın kaba ekstraktında yapılan ölçümlere göre Şekil 68' deki grafikler oluşturulmuştur.



Şekil 68. V380F - I372V' nin Kaba ekstraktından alınan özüte ait analiz sonuçları (A: Protein miktarı tayini, B: GI aktivitesi tayini)

Kaba ekstraktın protein miktarı $R^2 = 0,9983$ doğrulukla $6,5429 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ bulundu. Enzim özütü 10 kat sulandırıldı ve yapılan GI aktivite çalışması sonucunda, $1 \mu\text{L}$ enzim özütünde GI Aktivitesi $R^2 = 0,9978$ doğrulukla $0,0026 \times 10 = 0,026 \mu\text{mol}/\text{dk}$ (Ünite) bulunmuştur.

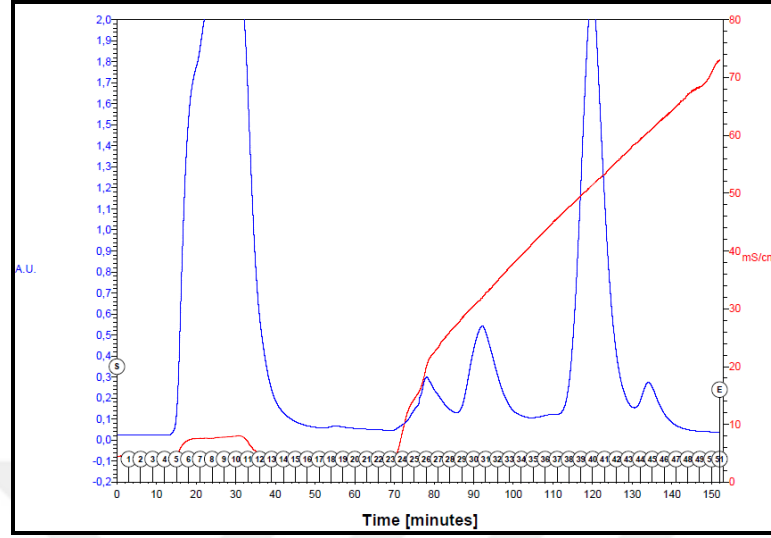
3.7.1.2. Isı Şoku ile Denetrasyon Uygulaması



Şekil 69. V380F - I372V' nin Isı Şoku sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları (A: Protein miktarı tayini, B: GI aktivitesi tayini)

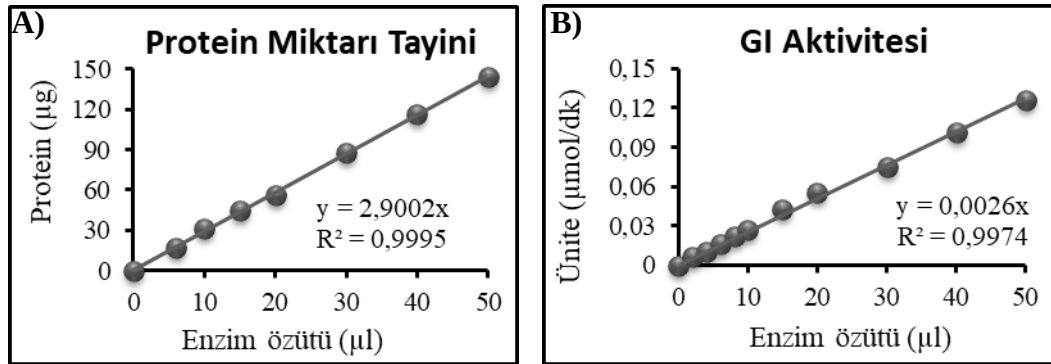
Isı şoku uygulaması sonrasında Şekil 69' daki grafikler oluşturulmuştur. Enzim özütünün protein miktarı $R^2 = 0,9984$ doğrulukla $4,2201 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ bulunmuştur. Enzim özütü 10 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite çalışması sonucunda, $1 \mu\text{L}$ enzim özütünde GI Aktivitesi $R^2 = 0,9998$ doğrulukla $0,0027 \times 10 = 0,027 \mu\text{mol}/\text{dk}$ (Ünite) bulunmuştur.

3.7.1.3. DEAE - İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması



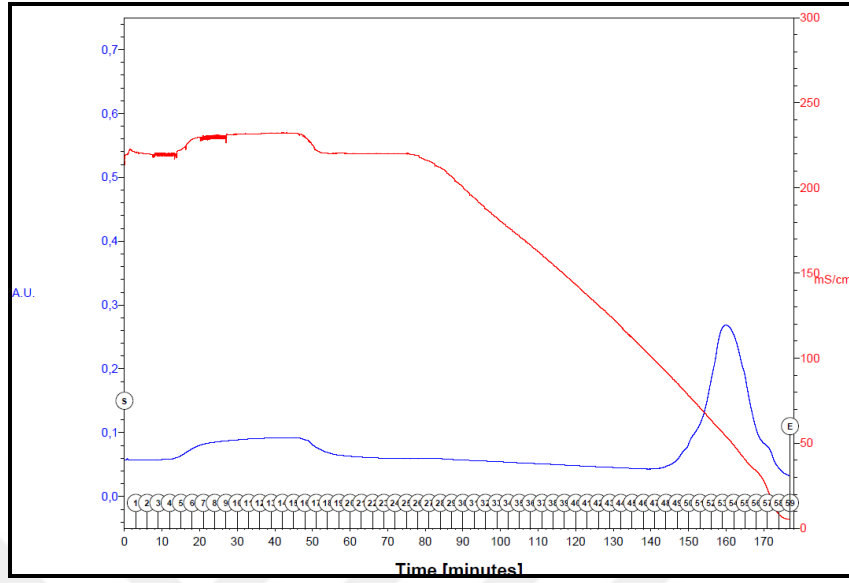
Şekil 70. V380F - I372V' ye ait İyon Değişim Kolon Kromatografisi uygulaması grafiği

İyon Değişim Kolon Kromatografisi uygulama sonrası 29 - 34 nolu fraksiyonlarda GI aktivitesinin varlığına rastlanılmıştır (Şekil 70). V380F - I372V mutant GI' nın protein miktarı $R^2 = 0,9995$ doğrulukla $2,9002 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ bulunmuştur. Enzim özütü 10 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite çalışması sonucunda, $1 \mu\text{L}$ enzim özütünde GI Aktivitesi $R^2 = 0,9974$ doğrulukla $0,0026 \times 10 = 0,026 \mu\text{mol}/\text{dk}$ (Ünite) bulunmuştur (Şekil 71).



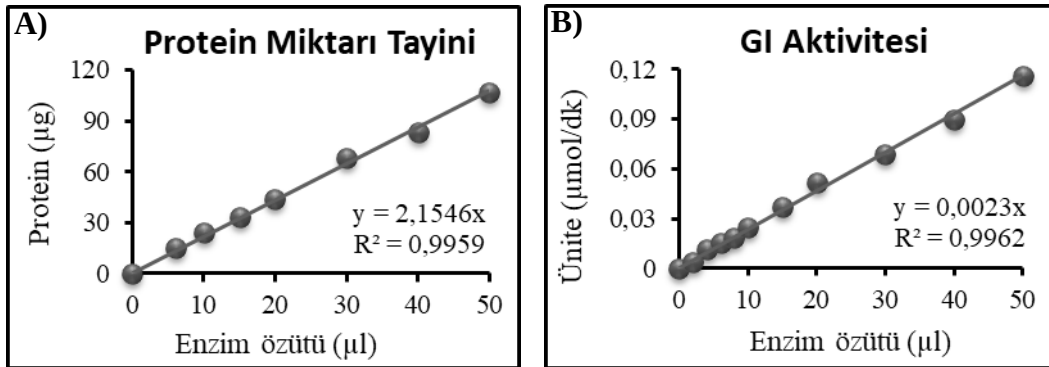
Şekil 71. V380F - I372V' ye ait İyon Değişim Kolon Kromatografisi sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları (A: Protein miktarı tayini, B: GI aktivitesi tayini)

3.7.1.4. Fenil Sefaroz Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması



Şekil 72. V380F - I372V' ye ait Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi uygulaması grafiği

V380F - I372V mutant enzimin Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi uygulaması sonrası 52 - 57 nolu tüplerde aktivite olduğu saptanmıştır (Şekil 72). Uygulama sonrası elde edilen enzim özütündeki protein miktarı $R^2 = 0,9959$ doğrulukla $2,1546 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ bulunmuştur. Enzim özütü 10 kat sulandırılarak yapılan GI aktivite çalışması sonucunda, $1 \mu\text{L}$ enzim özütünde GI Aktivitesi $R^2 = 0,9962$ doğrulukla $0,0023 \times 10 = 0,023 \mu\text{mol}/\text{dk}$ (Ünite) bulunmuştur (Şekil 73).



Şekil 73. V380F - I372V' ye ait Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları (A: Protein miktarı tayini, B: GI aktivitesi tayini)

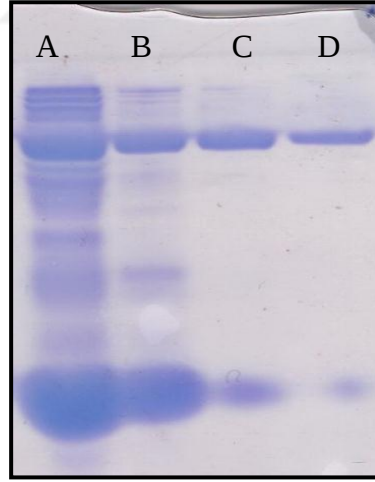
3.7.1.5. V380F - I372V Mutant GI' nin Saflaştırma Verileri

Tablo 19. V380F - I372V' nin Saflaştırma Basamaklarına ait Saflaştırma Tablosu

Saflaştırma Basamakları	Total Hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Total Protein (mg)	Aktivite ($\mu\text{mol/dk}/\mu\text{l}$)	Total Aktivite ($\mu\text{mol/dk}$)	S. Aktivite ($\mu\text{mol/dk}/\text{mg protein}$)	Verim	Saflaştırma katı
Kaba E.	20,3	6,54	132,82	0,026	527,8	3,974	100,0	1
Isı Şoku	18,0	4,22	75,96	0,027	486,0	6,398	92,1	1,61
İyon değişim	16,3	2,90	47,27	0,026	423,8	8,965	80,3	2,26
Hidrofobik E.	16,0	2,15	34,47	0,023	368,0	10,675	69,7	2,69

Tablo 19 incelenecek olursa saflaştırılan enzimin protein miktarı 6,54' den 2,15 mg/ml'a düşürülmüş, spesifik aktivitesi ise 3,974' ten 10,675 $\mu\text{mol/dk}/\text{mg protein}$ ' e %69,7 verim ile yükseltilmiştir. Enzim 16 mL hacime ulaştırılıp 2,69 kat saflaştırılmıştır.

3.7.1.6. V380F - I372V Mutant GI' sının Saflaştırılmasına ait SDS - PAGE Analizi



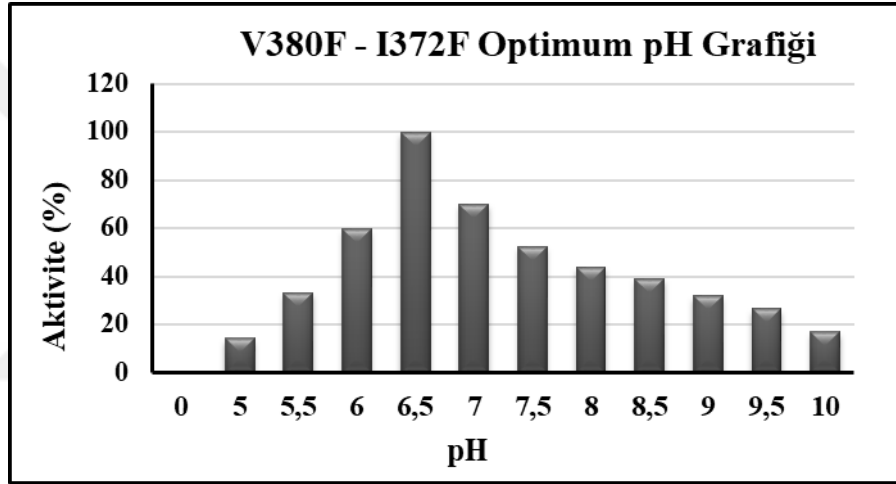
Şekil 74. V380F - I372V' nin Saflaştırılmasına ait SDS-PAGE analizi

Saflaştırılan V380F - I372V mutant enzim SDS - PAGE jel elektroforezi uygulaması sonrasında Şekil 74'deki jel görüntüsü oluşturulmuştur. Kaba enzimin yüklendiği ((A) 25 μL) taraf incelendiğinde oluşan yoğun protein bantları Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi sonrası ((D) 25 μL) büyük oranda bertaraf edilmiştir. Isıl işlem sonrası ((B) 25 μL) ve DEAE İyon Değişim Kromatografisi sonrası ((C) 25 μL) oluşan protein bantları kuyucuklarda görülmektedir.

3.7.2. V380F - I372V Mutant GI' nın Karakterizasyonu

3.7.2.1. V380F - I372V Mutant GI' nın Optimum pH Aralığı

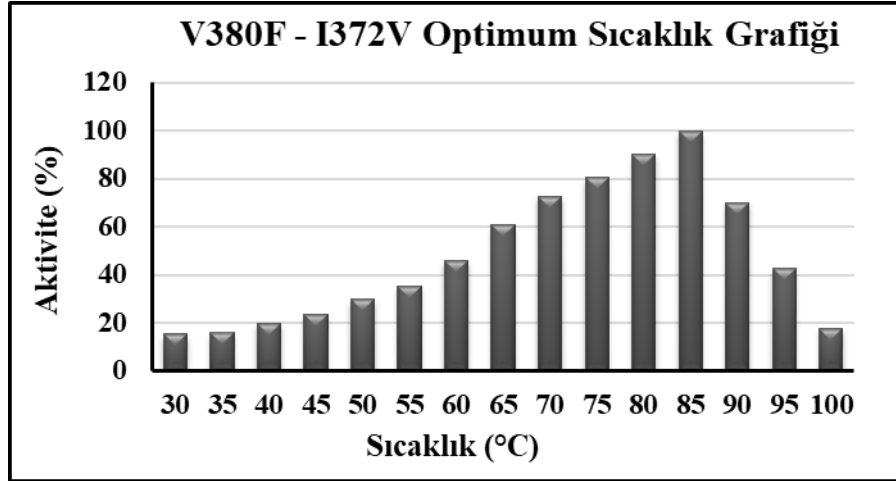
V380F - I372V mutant GI' na ait optimum pH' ın belirlenmesi için farklı pH tamponları kullanılarak Şekil 75' teki grafik oluşturulmuştur. Enzim pH 5' te minimuma yakın bir aktivite göstermiştir ve pH 10' a gelindiğinde enzimin aktivitesi tamamen durmuştur. Grafikten de görüleceği üzere enzim en iyi çalışma aralığı pH 6,5' te göstermektedir.



Şekil 75. V380F - I372V' nin Optimum pH Grafiği

3.7.2.2. V380F - I372V Mutant GI' nın Optimum Sıcaklık Aralığı

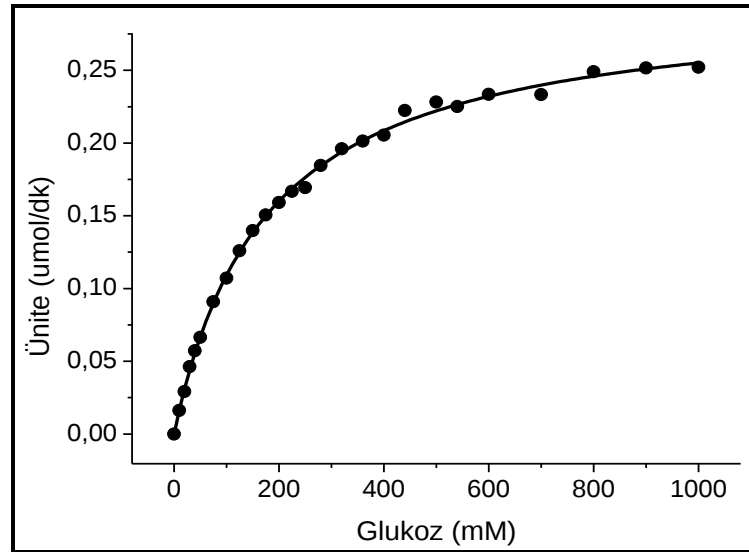
V380F - I372V mutant GI' na ait optimum sıcaklığın belirlenmesi için farklı sıcaklıklar kullanılarak Şekil 76' da gösterilen grafik oluşturulmuştur. Enzim 30 - 35 - 40°C' de minimum aktivite göstermiş, 90°C' den itibaren de aktivitesinde giderek azalma gerçekleşmiştir. Grafikten de görüleceği üzere mutant enzimin en iyi çalıştığı sıcaklık 85°C' dir.



Şekil 76. V380F - I372V' nin Optimum Sıcaklık Grafiği

3.7.2.3. V380F - I372V Mutant GI' ya Ait Kinetik Veriler

V380F - I372V mutant GI' na ait kinetik parametrelerin belirlenmesi için yapılan GI aktivite çalışmalarından sonra OriginPro 8.1 analiz programı ile Şekil 77' de gösterilen Michaelis - Menten eğrisi oluşturuldu. Reaksiyonlarda 2,5 µL saf enzim özütü (5,375 µg protein) kullanıldı ve enzimin; K_m değeri $174,72 \pm 4,6$ mM ve V_{max} değeri $55,76 \pm 0,49$ µmol/dk/mg protein ($R^2 = 0,9981$) olarak hesaplandı. Bu veriler ile yapılan hesaplamalar sonucunda enzimin k_{cat} değeri 46,51 1/sn ve k_{cat}/K_m değeri (katalitik etkinlik değeri) ise 0,265 olarak hesaplandı.

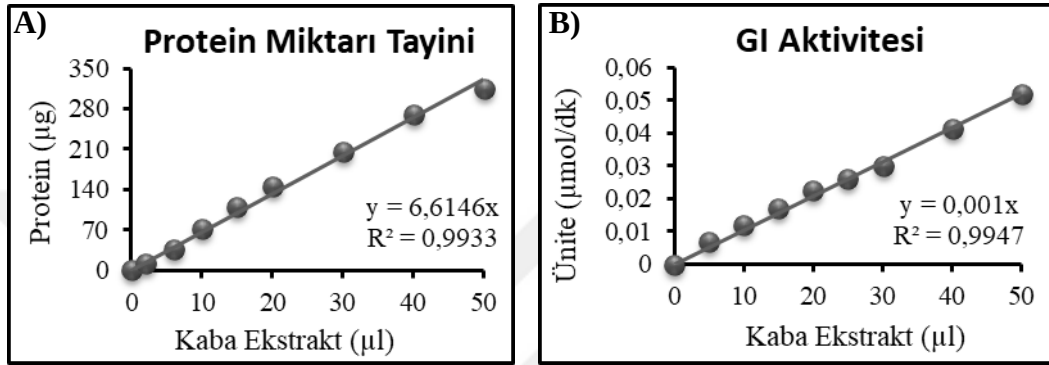


Şekil 77. V380F - I372V mutant enzimine ait Michaelis - Menten eğrisi

3.7.3. W137F - V184S - V380F Mutant Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu

3.7.4. W137F - V184S - V380F Mutant GI' nın Saflaştırılması

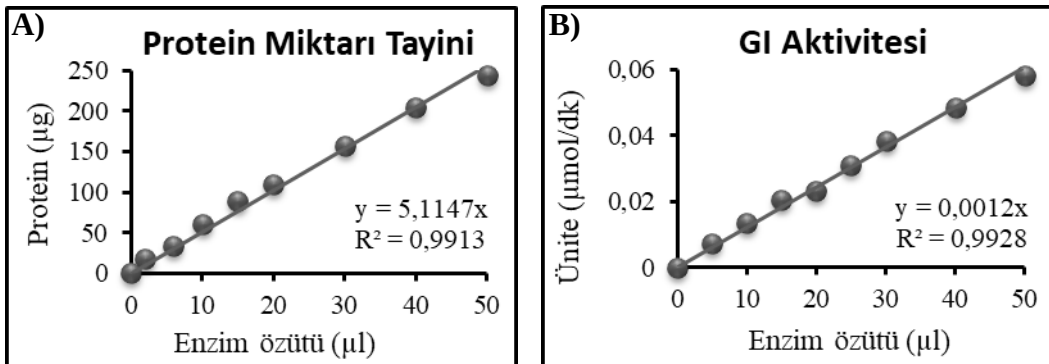
3.7.4.1. Kaba Ekstrakt Uygulaması



Şekil 78. W137F - V184S - V380F' nin kaba ekstraktından elde edilen özüte ait analiz sonuçları (A: Protein miktarı tayini, B: GI aktivitesi tayini)

W137F - V184S - V380F mutant GI' ın kaba ekstraktında yapılan ölçümlere göre Şekil 78' de görülen grafikler oluşturulmuştur. Buna göre kaba ekstraktın protein miktarı $R^2 = 0,9933$ doğrulukla $6,6146 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ bulundu. Enzim özütü 10 kat sulandırılmış ve yapılan GI aktivite çalışması sonucunda, $1 \mu\text{L}$ enzim özütünde GI aktivitesi $R^2 = 0,9947$ doğrulukla $0,001 \times 10 = 0,01 \mu\text{mol}/\text{dk}$ (Ünite) bulunmuştur.

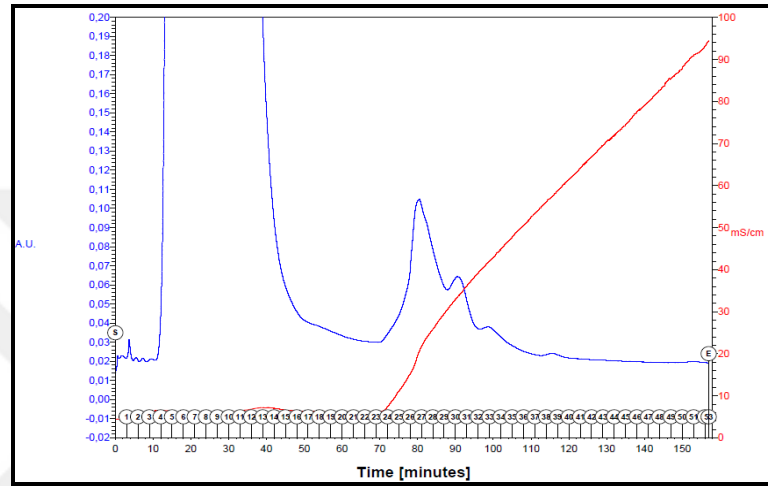
3.7.4.2. Isı Şoku ile Denetrasyon Uygulaması



Şekil 79. W137F - V184S - V380F' nin Isı Şoku sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları (A: Protein miktarı tayini, B: GI aktivitesi tayini)

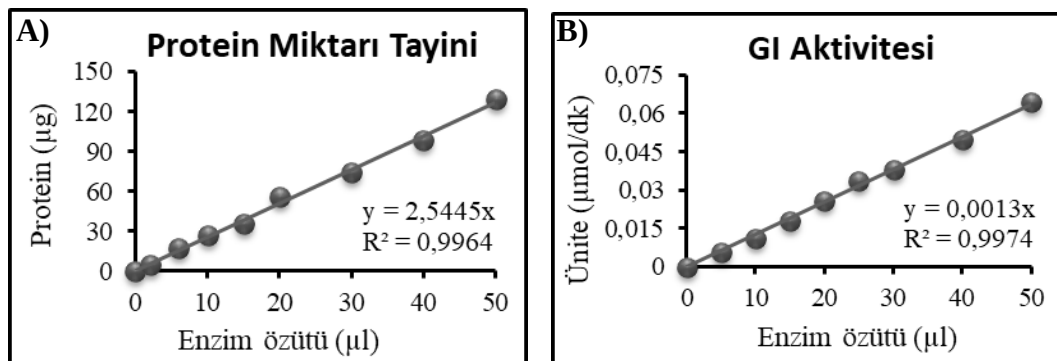
W137F - V184S - V380F mutant GI' na ait ısı şoku uygulaması sonrasında elde edilen enzim özütünün protein miktarı $R^2 = 0,9913$ doğrulukla $5,1147 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ bulunmuştur. GI aktivite çalışması sonucunda, $1 \mu\text{L}$ enzim özütünde GI Aktivitesi $R^2 = 0,9928$ doğrulukla $0,0012 \times 10 = 0,012 \mu\text{mol}/\text{dk}$ (Ünite) olarak bulunmuştur (Şekil 79).

3.7.4.3. DEAE - İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması



Şekil 80. W137F - V184S - V380F' ye ait İyon Değişim Kolon Kromatografisi uygulaması grafiği

DEAE - İyon Değişim Kolon Kromatografisi uygulaması sonrası 25 - 29 nolu fraksiyonlarda GI aktivitesinin varlığına rastlanılmıştır (Şekil 80).

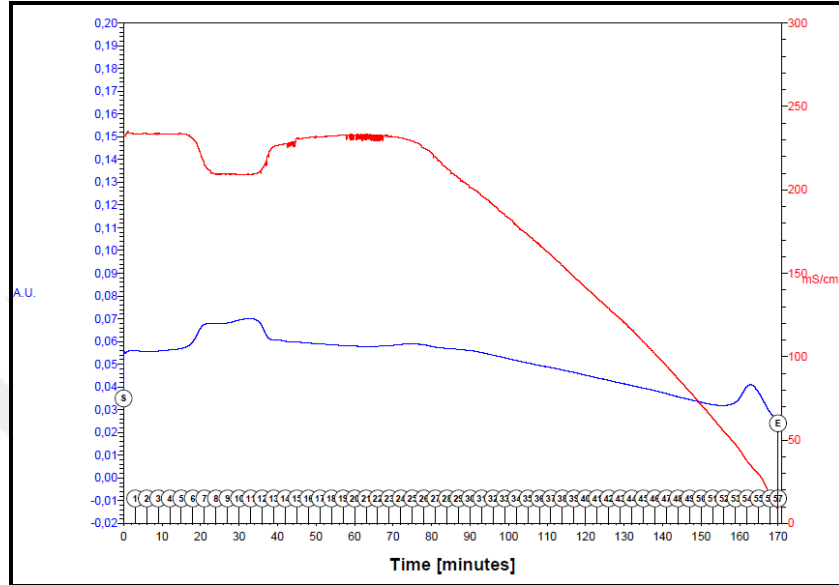


Şekil 81. W137F - V184S - V380F' ye ait İyon Değişim Kolon Kromatografisi sonrası edilen özüte ait analiz sonuçları (A: Protein miktarı tayini, B: GI aktivitesi tayini)

W137F - V184S - V380F GI' nın protein miktarı $R^2 = 0,9964$ doğrulukla $2,5445 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ bulunmuştur. Enzim özütü 10 kat sulandırılmış ve yapılan GI aktivite çalışması

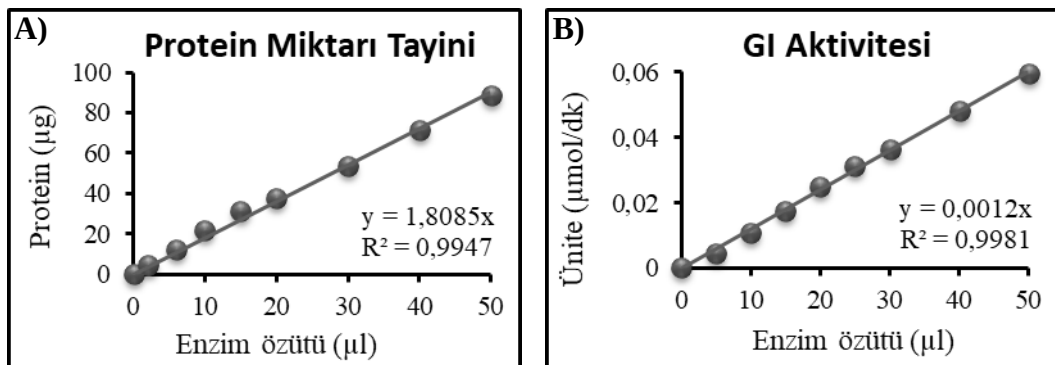
sonucunda, 1 μL enzim özütünde GI Aktivitesi $R^2 = 0,9974$ doğrulukla $0,0013 \times 10 = 0,013 \mu\text{mol/dk}$ (Ünite) bulunmuştur (Şekil 81).

3.7.4.4. Fenil Sefaroz Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması



Şekil 82. W137F - V184S - V380F' ye ait Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi uygulaması grafiği

W137F - V184S - V380F mutant enzimin hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi sonrası 54 - 57 nolu tüplerde aktivite olduğu belirlenmiştir (Şekil 82).



Şekil 83. W137F - V184S - V380F' ye ait Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları (A: Protein miktarı tayini, B: GI aktivitesi tayini)

Uygulama sonrası elde edilen enzim özütünün protein miktarı $R^2 = 0,9947$ doğrulukla $1,8085 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ bulunmuştur. Enzim özütü 10 kat sulandırılmış ve yapılan GI

aktivite çalışması sonucunda, 1 µL enzim özütünde GI Aktivitesi $R^2 = 0,9981$ doğrulukla $0,0012 \times 10 = 0,012$ µmol/dk (Ünite) olarak bulunmuştur (Şekil 83).

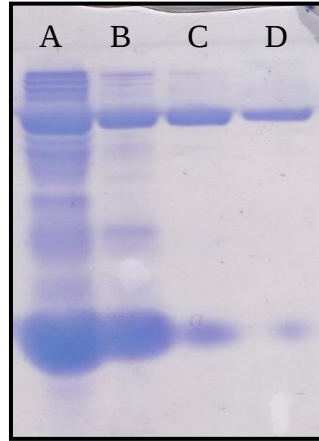
3.7.4.5.W137F - V184S - V380F Mutant GI' nin Saflaştırma Verileri

Tablo 20. W137F - V184S - V380F' nin Saflaştırma Basamaklarına ait Saflaştırma Tablosu

Saflaştırma Basamakları	Total Hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Total Protein (mg)	Aktivite (µmol/dk/µl)	Total Aktivite (µmol/dk)	S. Aktivite (µmol/dk/mg protein)	Verim	Saflaştırma katı
Kaba E.	18,5	6,61	122,37	0,010	185	1,5118	100	1
Isı Şoku	14,5	5,51	74,16	0,012	174	2,3462	94,1	1,55
İyon değişim	12	2,54	3,53	0,013	56	5,1091	84,3	3,38
Hidrofobik Etkileşim	10	1,81	18,09	0,012	120	6,6353	64,9	4,39

Tablo 20 incelenecek olursa saflaştırılan enzimin protein miktarı 6,61' den 1,81mg/ml' a düşürülmüş, spesifik aktivitesi 1,5118' den 6,6353 µmol/dk/mg protein' e %64,9 verim ile yükseltilmiştir. Enzim 10 mL hacime ulaştırılıp 4,39 kat saflaştırılmıştır.

3.7.4.6. W137F - V184S - V380F Mutant GI' nin Saflaştırılmasına ait SDS - PAGE Analizi



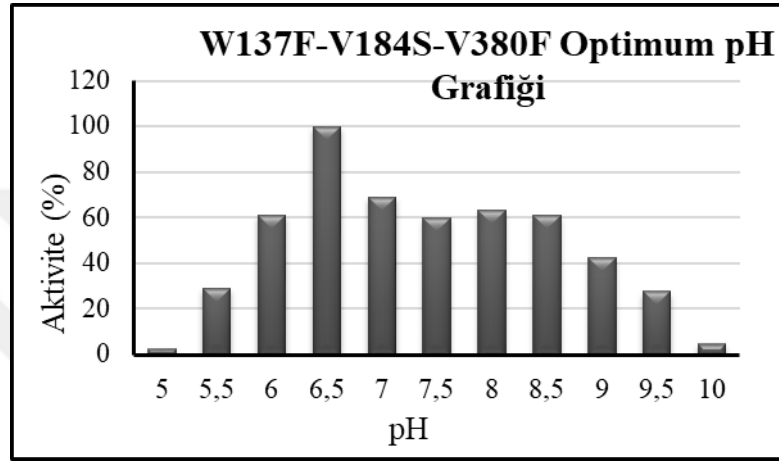
Şekil 84. W137F - V184S - V380F' nin Saflaştırılmasına ait SDS - PAGE analizi

Saflaştırılan W137F - V184S - V380F mutant enzim SDS - PAGE jel elektroforezi ile yürütüldükten sonra Şekil 84' te jel görüntüsü oluşturulmuştur. Kaba enzimin yüklendiği ((A)25 µL) kuyucuk incelendiğinde oluşan yoğun protein bantları Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi sonrası ((D) 25 µL) büyük oranda bertaraf

edilmiştir. Isıl işlem sonrası ((B) 25 µL) ve DEAE İyon Değişim Kromatografisi sonrası ((C) 25 µL) oluşan protein bantları kuyucuklarda görülmektedir.

3.7.5. W137F - V184S - V380F Mutant GI' nın Karakterizasyonu

3.7.5.1. W137F - V184S - V380F Mutant GI' nın Optimum pH Aralığı

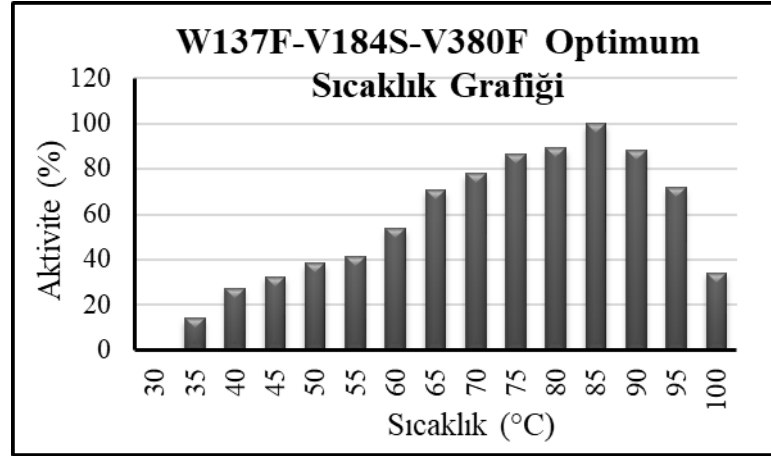


Şekil 85. W137F - V184S - V380F' nin Optimum pH Grafiği

W137F - V184S - V380F mutant GI' na ait optimum pH' ın belirlenmesi için farklı pH tamponları kullanılarak Şekil 84' te görülen grafik oluşturulmuştur. Enzim pH 5' te minimuma yakın bir aktivite göstermiştir ve pH 10' a gelindiğinde enzimin aktivitesi tamamen durmuştur.

3.7.5.2. W137F - V184S - V380F Mutant GI' nın Optimum Sıcaklık Aralığı

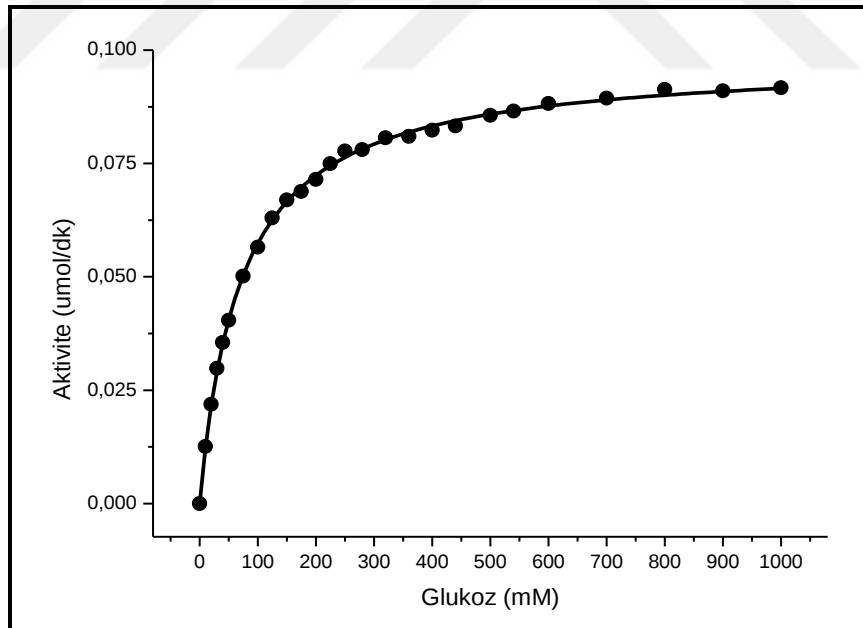
W137F - V184S - V380F mutant GI' na ait optimum sıcaklığın belirlenmesi için farklı sıcaklıklar kullanılarak Şekil 86' da görülen grafik oluşturulmuştur.



Şekil 86. W137F - V184S - V380F' nin Optimum Sıcaklık Grafiği

Enzim 30 - 35 - 40°C' de minimum aktivite göstermiş, 90°C' den itibaren de aktivitesinde giderek azalma olduğu görülmektedir. Grafikten de görüleceği üzere mutant enzimin en iyi çalıştığı sıcaklık 85°C' dir.

3.7.5.3. W137F - V184S - V380F Mutant GI' ya Ait Kinetik Veriler



Şekil 87. W137F - V184S - V380F mutant enzimine ait Michaelis - Menten eğrisi

W137F - V184S - V380F mutant GI' na ait kinetik parametrelerin belirlenmesi için yapılan GI aktivite çalışmalarından sonra OriginPro 8.1 analiz programı ile Şekil 87' deki Michaelis - Menten eğrisi oluşturuldu. Reaksiyonlarda 1 µL saf enzim özütü (1,81 µg protein) kullanıldı ve enzimin;

- K_m değeri $71,12 \pm 1,06$ mM,
- V_{max} değeri $54,18 \pm 0,19$ $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein ($R^2 = 0,9991$) olarak

hesaplandı.

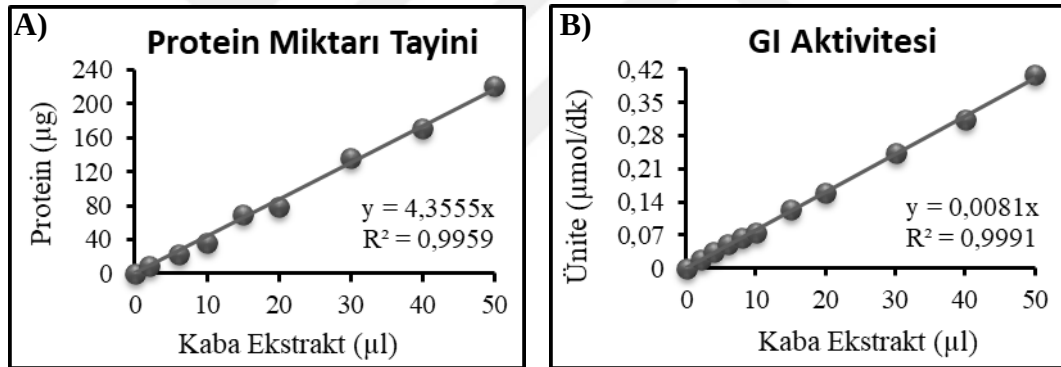
Bu veriler ile yapılan hesaplamalar sonucunda enzimin;

- k_{cat} değeri 45,20 1/sn,
- k_{cat}/K_m değeri 0,636 (katalitik etkinlik değeri) olarak hesaplandı.

3.7.6. W137F - V184S - I372V Mutant Enziminin Saflaştırması ve Karakterizasyonu

3.7.7. W137F - V184S - I372V Mutant GI' nın Saflaştırılması

3.7.7.1. Kaba Ekstrakt Uygulaması

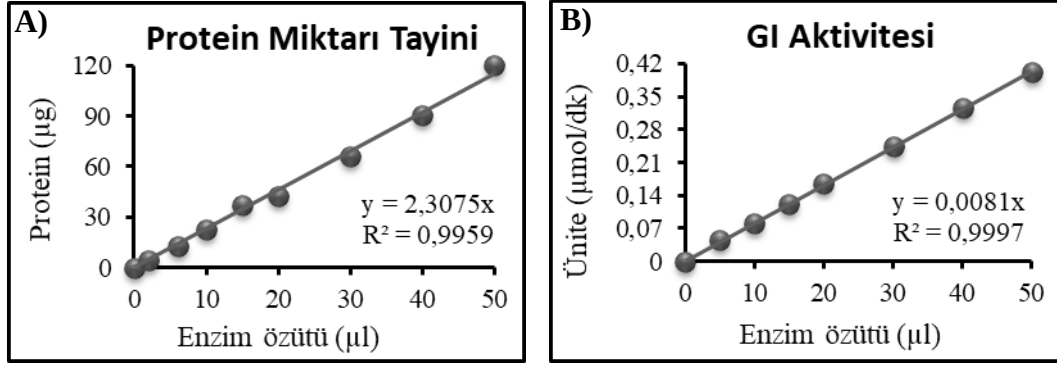


Şekil 88. W137F - V184S - I372V' nin Kaba ekstraktından elde edilen özüte özüte ait analiz sonuçları (A: Protein miktarı tayini, B: GI aktivitesi tayini)

W137F - V184S - I372V mutant GI' nın kaba ekstraktında yapılan ölçümlere göre Şekil 88' deki grafikler oluşturulmuştur. Buna göre kaba ekstraktın protein miktarı $R^2 = 0,9959$ doğrulukla $4,3555 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ olarak bulundu. Enzim özütü 5 kat sulandırıldı ve yapılan GI aktivite çalışması sonucunda, 1 μL enzim özütünde GI Aktivitesi $R^2 = 0,9991$ doğrulukla $0,0081 \times 5 = 0,0405 \mu\text{mol/dk}$ (Ünite) bulunmuştur.

3.7.7.2. Isı Şoku ile Denetrasyon Uygulaması

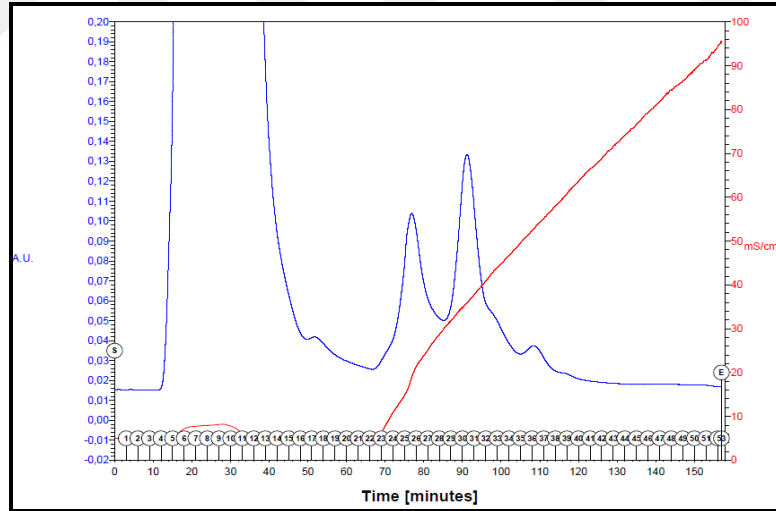
W137F - V184S - I372V mutant GI' na ısı şoku ile denetrasyonu sonrasında yapılan ölçümlere göre Şekil 89' daki grafikler oluşturulmuştur.



Şekil 89. W137F - V184S - I372V' nin Isı Şoku sonrası elde edilen özüte özüte ait analiz sonuçları (A: Protein miktarı tayini, B: GI aktivitesi tayini)

Enzim özütünün protein miktarı $R^2 = 0,9959$ doğrulukla $2,3075 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ bulunmuştur. Enzim özütü 5 kat sulandırılmış ve yapılan GI aktivite çalışması sonucunda, $1 \mu\text{L}$ enzim özütünde GI Aktivitesi $R^2 = 0,9997$ doğrulukla $0,0081 \times 5 = 0,0405 \mu\text{mol/dk}$ (Ünite) bulunmuştur.

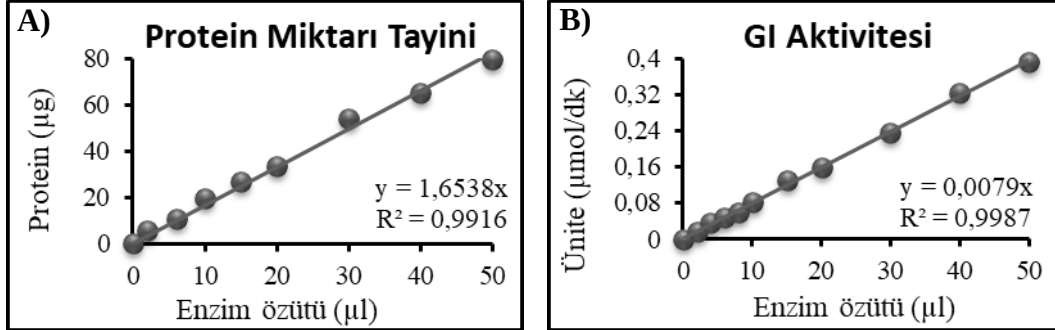
3.7.7.3. DEAE - İyon Değişim Kolon Kromatografisi Uygulaması



Şekil 90. W137F - V184S - I372V' ye ait İyon Değişim Kolon Kromatografisi uygulaması grafiği

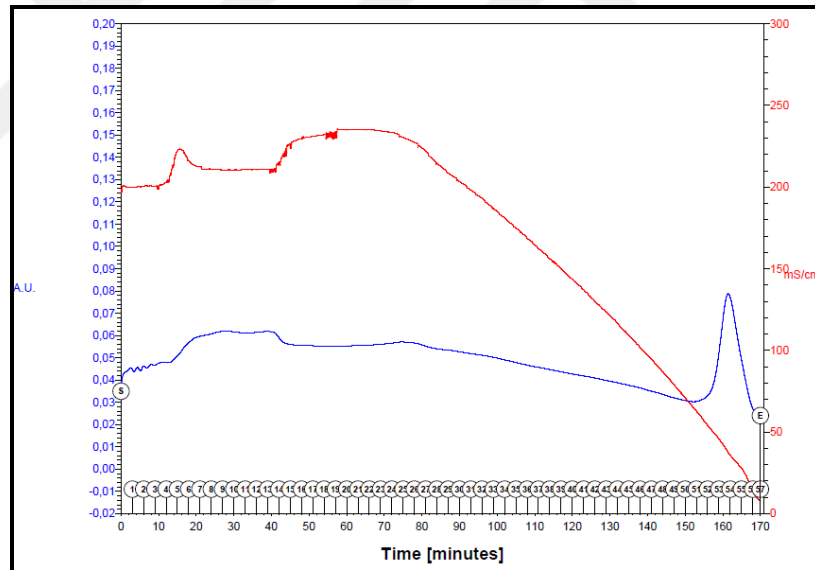
DEAE - İyon Değişim Kolon Kromatografisi uygulaması sonrası 29 - 34 nolu fraksiyonlarda GI aktivitesinin varlığına rastlanılmıştır (Şekil 90). Uygulama sonrası elde edilen enzim özütünün protein miktarı $R^2 = 0,9916$ doğrulukla $1,6358 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ bulunmuştur. Enzim özütü 5 kat sulandırılmış ve yapılan GI aktivite çalışması

sonucunda, 1 μL enzim özütünde GI Aktivitesi $R^2 = 0,9987$ doğrulukla $0,0079 \times 5 = 0,0395 \mu\text{mol/dk}$ (Ünite) olarak bulunmuştur (Şekil 91).



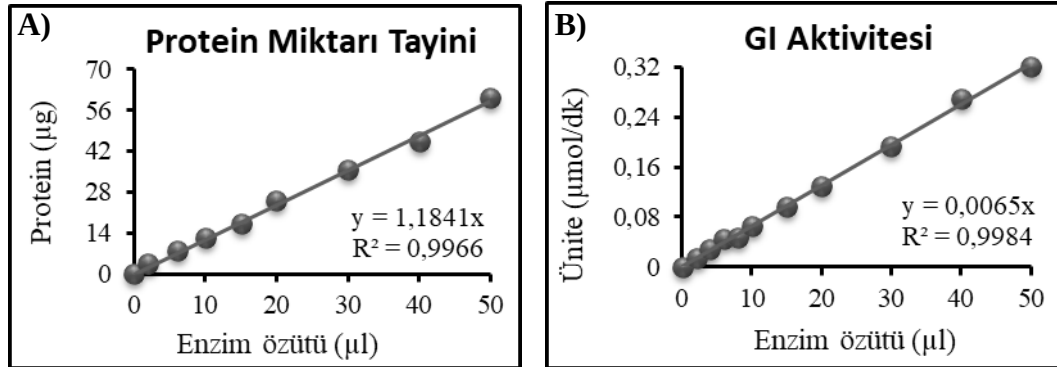
Şekil 91. W137F - V184S - I372V' ye ait İyon Değişim Kolon Kromatografisi sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları (A: Protein miktarı tayini, B: GI aktivitesi tayini)

3.7.7.4. Fenil Sefaroz Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması



Şekil 92. W137F - V184S - I372V' ye ait Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi uygulaması grafiği

Hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulaması sonrası 53 - 57 nolu fraksiyonlarda GI aktivitesinin varlığına rastlanılmıştır (Şekil 92). Uygulama sonrası elde edilen enzim özütündeki protein miktarı $R^2 = 0,9966$ doğrulukla $1,1841 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ bulunmuştur. Enzim özütü 5 kat sulandırıldı ve yapılan GI aktivite çalışması sonucunda, 1 μL enzim özütünde GI Aktivitesi $R^2 = 0,9984$ doğrulukla $0,0065 \times 5 = 0,0325 \mu\text{mol/dk}$ (Ünite) olarak hesaplanmıştır (Şekil 93).



Şekil 93. W137F - V184S - I372V' ye ait Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi sonrası elde edilen özüte ait analiz sonuçları (A: Protein miktarı tayini, B: GI aktivitesi tayini)

3.7.7.5. W137F - V184S - I372V Mutant GI' nin Saflaştırma Verileri

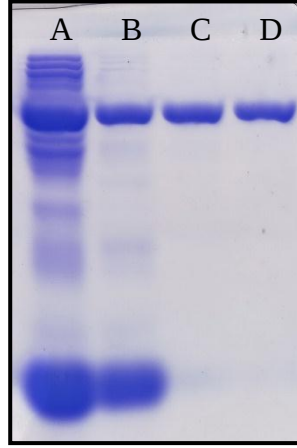
Tablo 21. W137F - V184S - I372V' nin Saflaştırma Basamaklarına ait Saflaştırma Tablosu

Saflaştırma Basamakları	Total Hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Total Protein (mg)	Aktivite (µmol/dk/µl)	Total Aktivite (µmol/dk)	S. Aktivite (µmol/dk/mg protein)	Verim	Saflaştırma katı
Kaba E.	18,5	4,36	80,58	0,0405	749,3	9,299	100	1
Isı Şoku	17	2,31	39,23	0,0405	688,5	17,551	91,9	1,89
İyon değişim	15,5	1,65	25,63	0,0395	612,3	23,884	81,7	2,57
Hidrofobik Etkileşim	15	1,18	17,76	0,0325	487,5	27,447	65,1	2,95

Tablo 21 incelenecek olursa saflaştırılan enzimin protein miktarı 4,36' dan 1,18 mg/ml' a düşürülmüş, spesifik aktivitesi 9,299' den 27,447µmol/dk/mg protein' e %65,1 verim ile yükseltilmiştir. Enzim 15 mL hacime ulaştırılıp 2,95 kat saflaştırılmıştır.

3.7.7.6. W137F - V184S - I372V Mutant GI' nin Saflaştırılmasına ait SDS - PAGE Analizi

Saflaştırılan W137F - V184S - I372V enzimine ait SDS - PAGE jel elektroforezi uygulaması sonrası elde edilen jel görüntüsü Şekil 94' te gösterilmiştir.

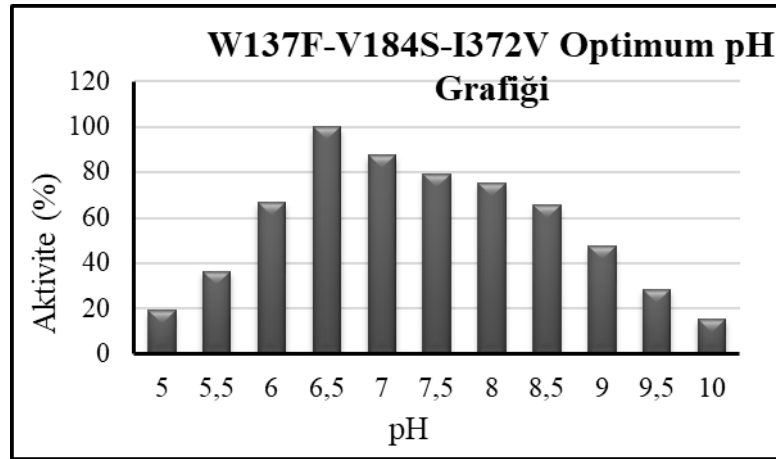


Şekil 94. W137F - V184S - I372V' nin saflaştırılmasına ait SDS - PAGE analizi

Kaba enzimin yüklendiği ((A) 25 µL) taraf incelendiğinde oluşan yoğun protein bantları Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi sonrası ((D) 25 µL) büyük oranda bertaraf edilmiştir. Isıl işlem sonrası ((B) 25 µL) ve DEAE İyon Değişim Kromatografisi sonrası ((C) 25 µL) oluşan protein bantları kuyucuklarda görülmektedir.

3.7.8. W137F - V184S - I372V Mutant GI' nin Karakterizasyonu

3.7.8.1. W137F - V184S - I372V Mutant GI' nin Optimum pH Aralığı

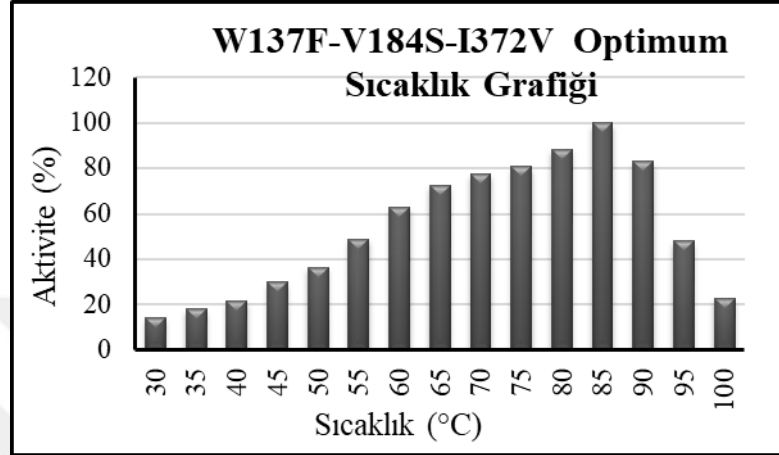


Şekil 95. W137F - V184S - I372V' nin Optimum pH Grafiği

W137F - V184S - I372V mutant GI' na ait optimum pH' ın belirlenmesi için farklı pH tamponları kullanılarak Şekil 95' te görülen grafik oluşturulmuştur. Enzim pH 5' te minimuma yakın bir aktivite göstermiştir ve pH 10' a gelindiğinde enzimin

aktivitesi tamamen durmuştur. Grafikten de görüleceği üzere enzim en iyi çalışma aralığı pH 6,5’ te göstermektedir.

3.7.8.2. W137F - V184S - I372V Optimum Sıcaklık Aralığı

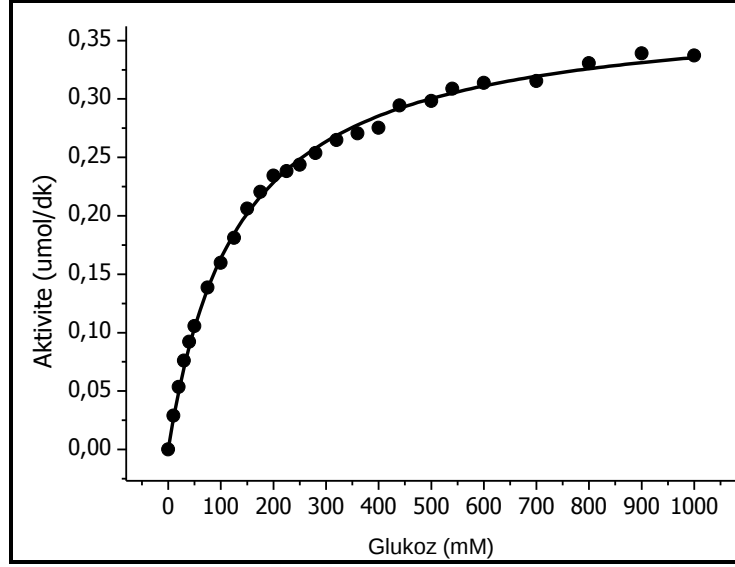


Şekil 96. W137F – V184S – I372V’nin Optimum Sıcaklık Grafiği

W137F - V184S - I372V mutant GI’ na ait optimum sıcaklığın belirlenmesi için farklı sıcaklıklar kullanılarak Şekil 96’ daki grafik oluşturulmuştur. Enzim 30 - 35 - 40°C’ de minimum aktivite göstermiş, 90°C’ den itibaren de aktivitesinde giderek azalma gerçekleşmiştir. Grafikten de görüleceği üzere mutant enzimin en iyi çalıştığı sıcaklık 85°C’ dir.

3.7.8.3. W137F - V184S - I372V Mutant GI’ ya Ait Kinetik Veriler

W137F - V184S - I372V mutant GI’ na ait kinetik parametrelerin belirlenmesi için yapılan GI aktivite çalışmalarından sonra OriginPro 8.1 analiz programı ile Şekil 97’ deki Michaelis - Menten eğrisi oluşturuldu.



Şekil 97. W137F - V184S - I372V mutant enzimine ait Michaelis - Menten eğrisi

Reaksiyonlarda 2 µL saf enzim özütü (2,36 µg protein) kullanıldı ve enzimin;

- K_m değeri $64,37 \pm 1,3$ mM,
- V_{max} değeri $99,05 \pm 0,44$ µmol/dk/mg protein ($R^2 = 0,9983$) olarak

hesaplandı.

Bu veriler ile yapılan hesaplamalar sonucunda enzimin;

- k_{cat} değeri 82,62 1/sn,
- k_{cat}/K_m değeri 1,283 (katalitik etkinlik değeri) olarak hesaplandı.

4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Anoxybacillus gonensis 55 - 60°C’ de optimum büyüme gösteren termofilik bir bakteridir (Belduz vd., 2003). Bu termofilik bakteri gerek kinetik parametreleri gerekse biyokimyasal özellikleri açısından endüstriyel olarak tercih edilebilir bir glukoz izomeraz enzimine sahiptir (AgoGI). Bu enzimi kodlayan 1326 nt’ lik gen (*xylA*) Karaoğlu 2010 tarafından bir ekspresyon vektörü olan pET28(a)+ vektörüne klonlanarak *E. coli* BL21 (DE3) içerisinde ekspres edilmiştir. İlgili enzim hem bu şekilde rekombinant olarak hem de *A. gonensis*’ ten yaban tip olarak saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Elde edilen verilere göre *A. gonensis* GI’ sı (yaban tip) 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 bulunmuştur. Bu veriler doğrultusunda enzimin k_{cat} değeri 36,47 (1/sn), katalitik etkinliğini gösteren k_{cat}/K_m değeri 0,250 olarak hesaplanmıştır. Klonlanan enzimin (rekombinat olarak üretilen) 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 hesaplanmıştır. Bu veriler doğrultusunda enzimin k_{cat} değeri 33,79 (1/sn), katalitik etkinliğini gösteren k_{cat}/K_m değeri 0,244 olarak hesaplanmıştır. Açığa çıkarılan aminoasit sırası göstermiştir ki *A. gonensis* GI’ sı Tip 2 glukoz izomerazlar sınıfına girmektedir (Karaoglu vd., 2013). Yapılan bu çalışmalar Karaoglu vd. (2013) ve Yanmis vd. (2014) tarafından uluslararası literatüre kazandırılmıştır.

Enzimin katalitik etkinliğini arttırmak maksadı ile aktif bölgede olduğu tahmin edilen H99D, H99Q, H99E, H99N, H99L, W137F, V184T ve V184S mutasyonları enzim üzerinde uygulanmıştır. Her bir mutasyon ayrı ayrı irdelenerek karakterize edilmiştir. Bu mutasyonlardan W137F mutasyonu sonucu *A. gonensis* GI’ sı K_m değerinde azalma, katalitik etkinliğinde ise önemli bir artış sağlanmıştır. Katalitik etkinlikte artışa sebep veren iki mutasyon enzim üzerinde birlikte denenerek W137F - V184S çifte mutasyonu ile enzimin katalitik etkinliği yaklaşık yaban tip enzime nazaran 10 kat daha artırılmıştır (Karaoğlu H., 2010).

Üretim maliyeti, enzimin endüstriyel alanda kullanımında oldukça önem arz etmektedir. GI’ lar genellikle HFCS üretiminde kullanılmakta olup, bu amaç için çoğunlukla termofilik organizmalardan elde edilen GI’ lar kullanılmaktadır. Bu

alandaki enzim uygulamaları, immobilize edilmiş bir şekilde, pH 7,5 - 8,5 aralığında ve 55 - 65°C' de yapılmaktadır.

Enzimin yarılanma ömrünü arttırmaktır şüphesiz ki endüstriyel uygulamalarda enzimin maliyetini azaltmanın diğer bir yoludur. Gerçekleştirilen bu tez kapsamında, kritik noktalar belirlenerek, *A. gonensis* G2^T glukoz izomerazının bölge özgün mutasyonlar ile ısıl kararlılığını ve yarılanma ömrünü artırılması çalışılmıştır. Enzimin termofilik karakter göstermesinde etkili olan kritik amino asitleri belirlemek için birçok termofilik ve mezofilik karakter gösteren organizmalara ait GI' ların amino asit sıraları birbirleriyle ve *A. gonensis* GI' sı ile karşılaştırılmıştır (Tablo 22).

Ayrıca enzimin üç boyutlu yapısı, PyMOL Software version 1.7.4 kullanılarak oluşturulmuş ve *Geobacillus stearothermophilus* GI ile karşılaştırılmıştır. Şekil 2' de görüleceği üzere, enzimlerin göstermiş oldukları sekonder yapı organizasyonları birbirine oldukça benzemekte olup α -heliks ve β - levha tabakaların birbirlerine göre konumları ve boyutları neredeyse aynı olduğu gözükmektedir.

Tablo 22' de de görüleceği üzere belirlenen noktalarda *A. gonensis* GI' sı termofilik karakterli GI' lardan çok mezofilik karakterli GI' lara benzemektedir. *A. gonensis* GI' sınnın 172' inci amino asidi izolösin olarak gözükmektedir ve 8 nolu α - heliks (H8) içerisinde konumlanmıştır. Termofilik karakter gösteren tüm GI' larda bu konumda valin amino asidi bulunmaktadır. Valinin incelenen mezofilik karakterli GI' larda hiç bulunmaması ve incelenen tüm termofilik karakterli GI' larda var olması bu bölgede valin amino asidinin enzimin termofilik karakterde olmasına etki ettiğinin bir göstergesi olduğu düşünülebilir. Dolayısıyla, yapılacak olan I372V mutasyonu *A. gonensis* GI' sınnın termofilik karakterinde bir artışa neden olabilir. Bu strateji göz önünde bulundurularak bu çalışmada, *A. gonensis* GI' sınnın ısıl kararlılığı arttırabileceği muhtemel olan 4 farklı noktada (323, 372, 380 ve 398. amino asitler) 5 farklı mutasyon yapılması planlanmıştır. Mutasyonlar başarılı şekilde gerçekleştirilmiş, mutant enzimler *E. coli* BL21(DE3) içerisinde ekspres edilmiştir. Isıl kararlılıkta artışa neden olan I372V ve V380F mutasyonları ikili olarak (I372V - V380F) aynı enzim üzerinde denemiş ve etkileri araştırılmıştır. Ayrıca bu mutasyonlar katalitik etkinliği arttıran W137F - V184S mutantı ile birlikte de aynı enzim üzerinde denenmiştir.

Tablo 22. Mutasyonların tasarlanmasında kullanılan GI' lara ait amino asit dizilimi karşılaştırması

		D398S	I323V	I372Q	I372V	V380F
Mezofilik mikroorganizmalara ait Tip2 GI'lar	<i>B. subtilis</i>	E	I	I	I	V
	<i>B. megaterium</i>	E	I	V	V	V
	<i>B. licheniformis</i>	E	I	L	L	V
	<i>E. coli</i>	K	I	I	I	R
	<i>K. pneumoniae</i>	N	I	I	I	R
	<i>H. influenzae</i>	Q	I	L	L	I
	<i>L.lactis</i>	N	I	I	I	I
	<i>R. flavefaciens</i>	A	V	I	I	F
	<i>T. halophilus</i>	E	V	K	K	I
	<i>S. xylosus</i>	E	I	I	I	I
	<i>L.pentosus</i>	A	V	K	K	L
	<i>L.brevis</i>	S	V	K	K	L
	A. gonensis G2T	D	I	I	I	V
Termofilik mikroorganizmalara ait Tip2 GI'lar	<i>C.thermosulfurogenes</i>	S	V	V	V	F
	<i>T. saccharolyticum</i>	S	V	V	V	F
	<i>C.thermohydrosulfuricum</i>	S	V	V	V	F
	<i>C.thermosaccharolyticum</i>	S	V	V	V	F
	<i>T. aquaticus</i>	S	V	V	V	F
	<i>T. neopalitana</i>	E	V	V	V	F
	<i>T. maritima</i>	E	V	A	A	F
α -heliks Yapıları		h	H6	H8	H8	H9

İlk denemelerde, yapılan tüm kinetik ve biyokimyasal deneylerde GI aktivite deneyi olarak Sistein - Karbozol - Sülfürik Asit metodu kullanılmıştır. Martin Schenk ve Hans Bisswanger (1998)' e göre Sistein - Karbozol - Sülfürik Asit metodu sonrası oluşan reaksiyonun sonlanmadığı tespit edilmiştir. Reaksiyon 30 dk sonunda bile az miktarda devam ettiğinde spektrofotometrede ölçümler alınıncaya kadar ki zamanda bir miktar reaksiyon gerçekleşmekte, bu durum da kinetik çalışmalar gibi aşırı hassasiyet isteyen çalışmalarda doğru ölçümlerin alınmasında zorluklar meydana getirmektedir. Bu sebeple GI aktivite deneyleri, Martin Schenk and Hans Bisswanger (1998)' in uyarladığı Seliwanoff reaksiyonu ile yapılmaya başlanmıştır. Bu yöntem ile analizi yapılan fruktoz tayininden daha tutarlı sonuçlar alınmıştır.

Mutant enzimler üretildiği konak organizmadan (*E. coli* BL21(DE3)) ısı şoku uygulaması ve kolon kromatografisi yöntemleri ile saflaştırılmıştır. Enzimlerin saflık dereceleri saflaştırma tabloları ve SDS - PAGE elektroforezi ile ayrı ayrı gösterilmiştir. Söz konusu mutasyonların enzimin diğer biyokimyasal parametrelerine (optimum pH ve sıcaklık, vb.) ve kinetik parametrelerine (K_m , V_{max} , k_{cat} ve k_{cat}/K_m) olan etkileri de araştırılmıştır. Dolayısıyla, bu çalışma, ısı kararlılığının arttırılmasının yanı sıra enzimin katalitik etkinliğinde geliştirmesine yönelik araştırmalar içermektedir. Elde edilen kinetik veriler Tablo 23’ de gösterilmektedir.

Tablo 23. Kinetik hesaplamalar

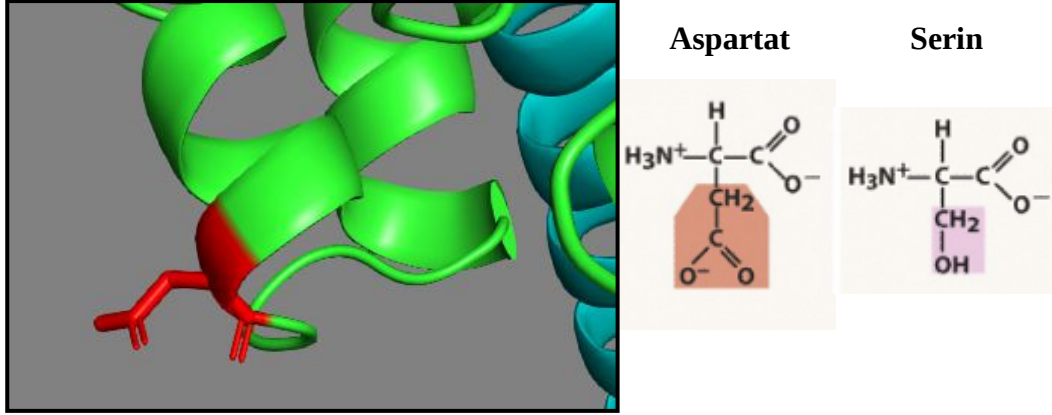
	K_m	V_{max}	k_{cat}	k_{cat}/K_m	Ortalama yarılanma ömrü	Kaynak
AgoGI-Wild-Type	146,08 ± 9,50	43,72 ± 1,01	36,47	0,250	19	(Karaoğlu, 2010 Karaoglu vd., 2013)
AgoGI-rec (Rekombinant)	138,37 ± 7,63	40,51 ± 0,81	33,79	0,244	19	(Karaoğlu, 2010 Karaoglu vd., 2013)
AgoGI (Rekombinant)	124,45 ± 2,99	39,6 ± 0,79	33,03	0,266	19	Bu Çalışma
D398S	122,05 ± 2,84	44,99 ± 0,30	37,53	0,308	19	Bu Çalışma
I323V	140,02 ± 3,43	40,52 ± 0,30	33,80	0,241	19	Bu Çalışma
I372Q	110,17 ± 3,09	22,65 ± 0,17	18,89	0,172	8	Bu Çalışma
I372V	132,11 ± 3,70	65,46 ± 0,55	54,60	0,413	31	Bu Çalışma
V380F	116,57 ± 4,37	37,22 ± 0,39	31,05	0,266	26	Bu Çalışma
V380F - I372V	174,72 ± 4,6	55,76 ± 0,49	46,51	0,265	27	Bu Çalışma
W137F - V184S	39,29 ± 2,87	99,71 ± 1,83	83,17	2,116	19	Karaoğlu, 2010
W137F - V184S - V380F	71,12 ± 1,06	54,18 ± 0,19	45,20	0,636	14	Bu Çalışma
W137F - V184S - I372V	64,37 ± 1,3	99,05 ± 0,44	82,62	1,283	30	Bu Çalışma

Tabloda da görüldüğü üzere *A. gonensis*’ e ait GI, Karaoğlu (2010) tarafından elde edilen kinetik verilere benzer veriler ile yeniden ve başarılı bir şekilde rekombinant olarak üretilerek karakterize edilmiştir.

4.1. Mutasyonların Değerlendirilmesi

Mutant enzimlere ait karakterizasyon sonrası yapılan mutasyonların enzimlerin kinetik ve biyokimyasal parametrelerine olan etkileri ilerleyen kısımlarda detaylı olarak tek tek anlatılmıştır.

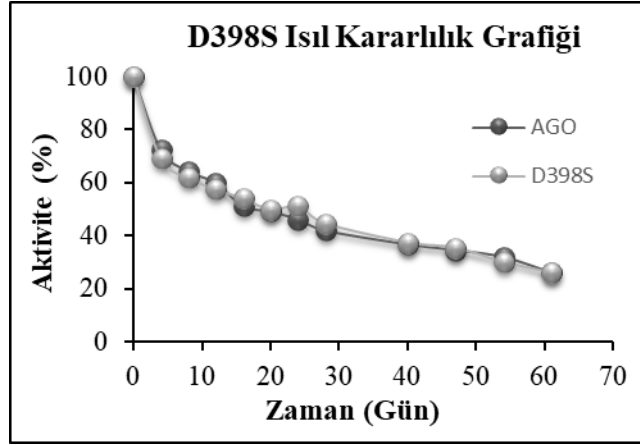
4.1.1. D398S Mutasyonunun Değerlendirilmesi



Şekil 98. D398S mutasyonuna ait üç boyutlu modelleme

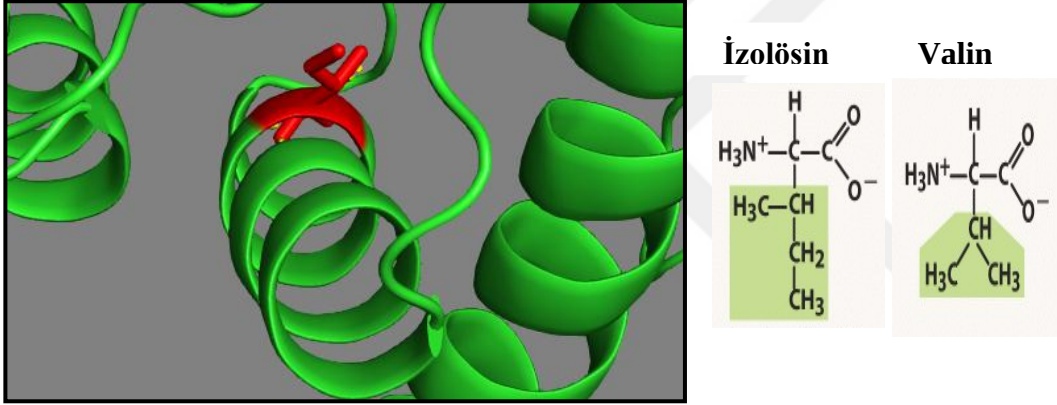
A. gonensis GI' sında 398. amino asit olan aspartat (D) serin (S) amino asidi ile değiştirilerek D398S mutasyonu gerçekleştirildi. Aspartat negatif yüklü hidrofilik bir amino asit iken serin yüksüz (- OH) grubu taşıyan hidrofilik karakterli bir amino asittir (Şekil 98). Her ne kadar bu mutasyon ile enzimde yük değişimi meydana getirilse de 398. amino asit enzimin H10 ve H11 heliksi arasında ve enzimin en uç kısmında yer almaktadır. D398 amino asidi enzimin herhangi başka bir amino asidi ile etkileşim içerisinde bulunmamaktadır. Bu durumda bu noktada yapılacak olan herhangi bir mutasyonun enzimin biyokimyasal ve kinetik parametrelerini etkilemesi pek mümkün görülmemektedir.

Tablo 23 ve Şekil 99 incelenecek olursa, beklenildiği üzere, D398S mutasyonu enzimin hiçbir biyokimyasal ve kinetik parametreleri üzerinde değişiklik meydana getirmemiştir.



Şekil 99. D398S' nin Isıl Kararlılık grafiği

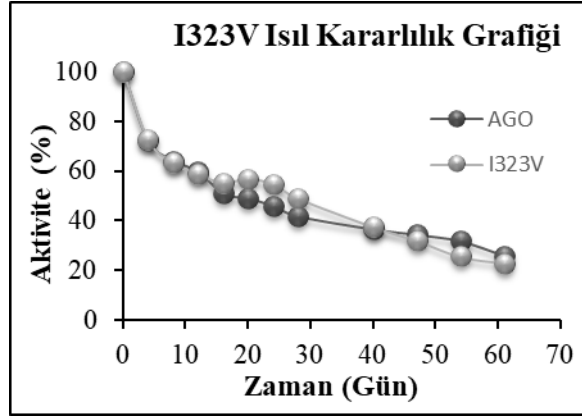
4.1.2. I323V Mutasyonunun Değerlendirilmesi



Şekil 100. I323V mutasyonuna ait üç boyutlu modelleme

A. gonensis GI'sında 323. amino asit olan izolösün (I) amino asidi valin (V) amino asidi ile değiştirilerek I323V mutasyonu gerçekleştirildi. 323. Amino asit H6 α - heliksinde bulunur ve etrafında etkileşim yapacağı bir hidrofobik bölge bulunmamaktadır (Şekil 100). Bu doğrultuda I323V mutasyonunun enzimin kinetik ve biyokimyasal parametrelerinden bir değişime neden olması beklenmemektedir.

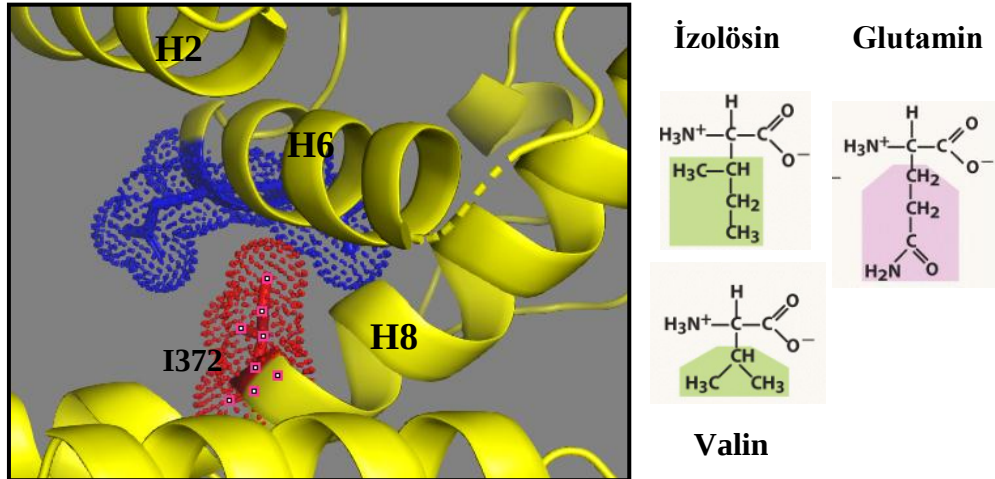
Tablo 23 ve Şekil 101 incelenecek olursa, beklenildiği üzere, I323V mutasyonu enzimin hiçbir biyokimyasal ve kinetik parametreleri üzerinde değişiklik meydana getirmemiştir. Şekil 101' de mutant enzimin yarılanma ömrü her ne kadar 27 gün gibi görülse de şeklin bütünü göz önüne alındığında ısı kararlılık olarak yaban tip enzimden farklılık göstermemektedir. Bu sebeple mutant enzimin yarılanma ömrü 19 gün olarak kabul edilmiştir.



Şekil 101. I323V' nin Isıl Kararlılık grafiği

4.1.3. I372V ve I372Q Mutasyonlarının Değerlendirilmesi

A. gonensis GI' sında 372. amino asit olan İzölösinin (I) Valin (V) amino asidi ile değiştirilmesi ile I372V mutasyonu gerçekleştirildi. I372 mutasyonu ile enzimin biyokimyasal ve kinetik parametrelerinde bir değişiklik beklenmemektedir. Her iki amino asit de hidrofobik karakterli olup izolösün amino asidi valinde bir metil grubu kadar daha uzundur. Şekil 102 incelenecek olursa bu metil grubunun fazlalığı H6 ve H8 α - helikslerinin birbirine kesiştiği yerde bulunmaktadır.

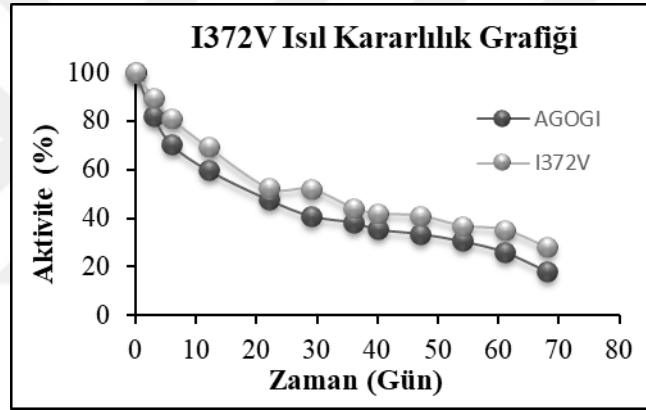


Şekil 102. I372V mutasyonuna ait üç boyutlu modelleme

Tablo 23 incelenecek olursa I372V mutasyonu ile beklenildiğinin aksine enzimin kinetik parametreleri oldukça değişmiştir. Özellikle V_{max} değerindeki 1,6 kat artış enzimin çevrim sayısı ve katalitik etkinlik değerlerini arttırmıştır. Benzer şekilde, Şekil

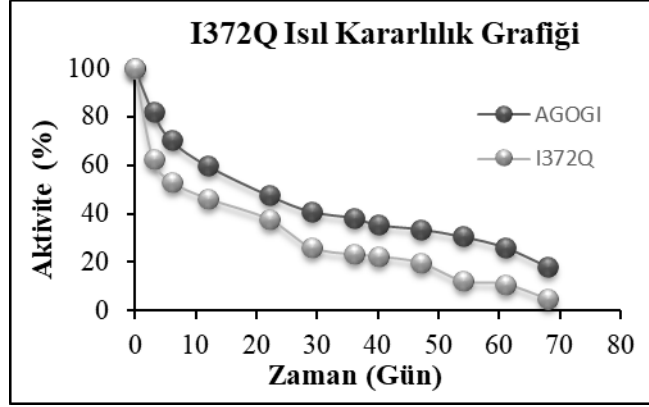
103 incelemek olursa, hiç beklenmediği halde enzimin ısı kararlılığı da artmıştır. Enzimin yarılanma ömrü 19 günden 31 güne artmıştır.

Her iki amino asitde hidrofobik karakterli olup izolösün amino asidi valinde bir metil grubu kadar daha uzundur. Şekil 102 incelenecek olursa bu metil grubunun fazlalığı H6 ve H8 α - helikslerinin birbirine kesiştiği yerde bulunmaktadır. I372V mutasyonu ile azaltılan metil grubu H6 ve H8 α - helikslerinin birbirlerine yaklaşmasına müsaade edebilmektedir. Enzimin kinetik ve biyokimyasal parametrelerdeki beklenmedik değişiklik H6 ve H8 α - helikslerinin birbirleri ile olan etkileşimlerinden kaynaklanıyor olabilir. Enzimin kristalleştirilerek 3 boyutlu yapısının analiz edilmesi ile ancak bu etkileşimler aydınlatılabilir.



Şekil 103. I372V' nin Isıl Kararlılık grafiği

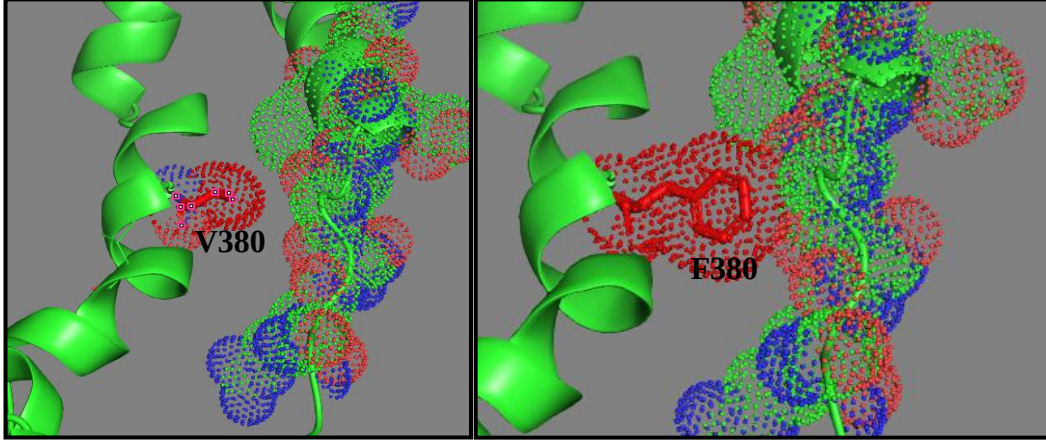
Benzer şekilde izolösinden çok daha uzun olan glutaminin H6 ve H8 α - helikslerinin birbirleri ile olan etkileşimlerini birbirinden uzaklaştırarak azalttığı için kinetik ve biyokimyasal parametrelerinde kötü yönde değişimler meydana gelmiştir. Bu sonuçta, 372. amino asidin H6 ve H8 α - helikslerinin birbirleri ile olan etkileşimlerinde rol oynadığı fikrini desteklemektedir.



Şekil 104. I372Q' nun ısı kararlılık grafiği

I372Q mutasyonu ile enzimin optimum pH değeri 6,5' dan 7' ye değişmiştir (Şekil 45). Enzimin pH değerindeki değişim birden çok aminoasitteki etkileşimlerin değişimi ile mümkündür. pH değişikliği 372. amino asidin H6 ve H8 α - helikslerinin birbirleri ile olan etkileşimlerinde rol oynadığı fikrini desteklemektedir. Enzimin totalinde meydana gelen etkileşim değişikliği, pH'nın değişmesine neden olmuştur. Şekil 104 incelenecek olursa enzimin yarılanma ömrü 19 günden 8 güne düşmüştür.

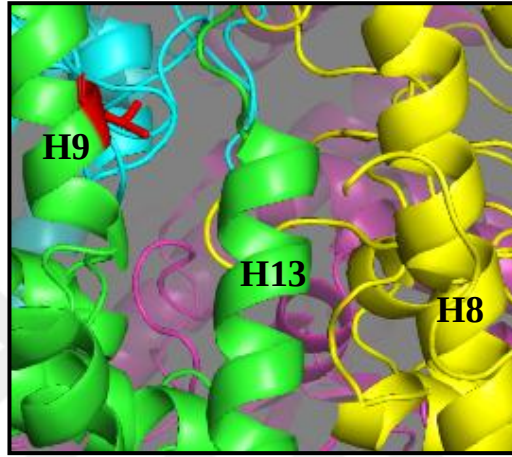
4.1.4. V380F Mutasyonunun Değerlendirilmesi



Şekil 105. V380F mutasyonuna ait üç boyutlu modelleme

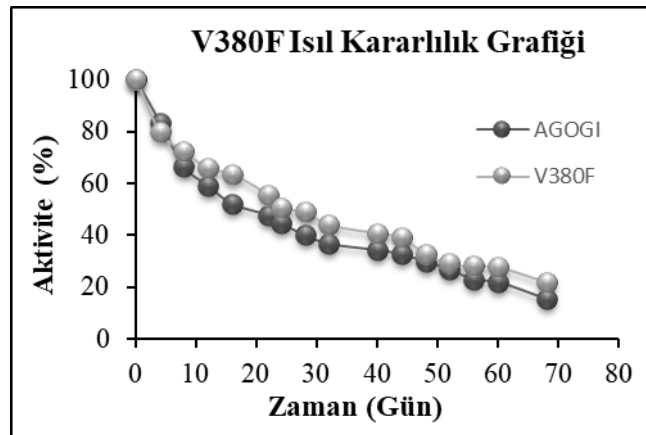
A. gonensis GI' sında 380. Valin (V) amino asiti Fenil alanin (F) amino asidi ile değiştirilerek V380F mutasyonu gerçekleştirildi. Valin amino asidi hidrofobik özellikte bir amino asittir. Fenilalanin hidrofobik özellikte ve valine göre oldukça daha uzun yan zincire sahip bir amino asittir. V380F mutasyonu aktif bölgeye uzak olduğundan dolayı enzimin K_m ve V_{max} ' sında bir değişiklik beklenmemektedir. Bu bölgede mutasyon ile

birlikte hidrofobik etkileşimin daha güçlü bir hale gelmesi mümkündür. Aynı karakterde aminoasit olmalarından ve aktif bölgeye olan uzaklığından dolayı V380F mutasyonunun enzimin kinetik ve biyokimyasal parametrelerinde bir gelişme göstermemesi beklenmektedir. Tablo 23 incelenecek olursa, beklendiği üzere, enzimin kinetik parametrelerinde önemli bir değişim olmamıştır fakat enzimin ısıl kararlılığı artmıştır. Enzimin yarılanma ömrü 19 günden 26 güne çıkmıştır (Şekil 107).



Şekil 106. V380F mutasyonun α - heliks tabakalara etkisi

Şekil 106 incelenecek olursa V380 H9 α - heliksi üzerinde bulunmaktadır. Fenil alanin ilavesi ile H9 - H13 tabakları arası açılmaya zorlanmış ve H13 α - heliksi diğer zincirin H8 heliksine yakınlanmıştır. Bu yaklaşma sonucu meydana gelen birçok yeni etkileşim enzimin ısıl kararlılığındaki beklenmedik artışın açıklaması olabilir.



Şekil 107. V380F' nın Isıl Kararlılık grafiği

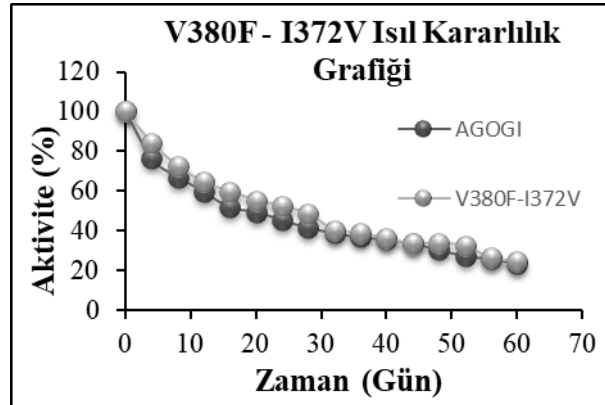
4.1.5. V380F - I372V Mutasyonunun Değerlendirilmesi

V380F ve I372V mutasyonları ile doğal enzimin ısı kararlılığında artış sağlanmıştı. Her iki mutasyon, birlikte, *A. gonensis* GI' si üzerinde denenerek ortak etkileri araştırıldı. V380F ve I372V mutasyonları tek başına yapıldıklarında enzimin K_m değerinde önemli bir değişime neden olmamıştı. Birlikte uygulandıklarında ise yaban tip enzime göre K_m değeri oldukça artmış ve substrata olan ilgi azalmıştır (Tablo 24). Her iki mutasyonda enzimin tersiyer yapısında köklü değişikliklere sebep verebilecekleri ilgili mutasyon bölümlerinde anlatılmıştır.

Tablo 24. V380F - I372V Mutasyonunun Değerlendirilmesi

	K_m	V_{max}	k_{cat}	k_{cat}/K_m	Ortalama yarılanma ömrü	Kaynak
AgoGI (Rekombinant)	124,45 ± 2,99	39,6 ± 0,79	33,03	0,266	19	Bu Çalışma
I372V	132,11 ± 3,70	65,46 ± 0,55	54,60	0,413	31	Bu Çalışma
V380F	116,57 ± 4,37	37,22 ± 0,39	31,05	0,266	26	Bu Çalışma
V380F - I372V	174,72 ± 4,6	55,76 ± 0,49	46,51	0,265	27	Bu Çalışma

V380F ve I372V mutasyonları birlikte uygulandıklarında enzimin ısı kararlılığı üzerine olan ayrı ayrı etkilerini daha ileriye taşıyamamıştır (Şekil 108).



Şekil 108. V380F - I372V' nin Isıl Kararlılık grafiği

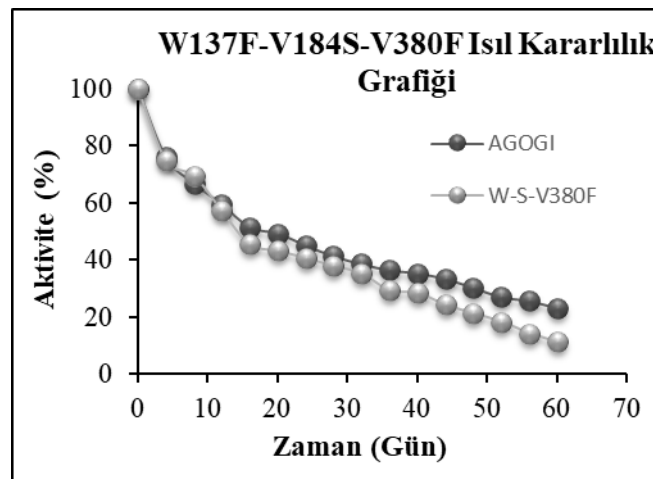
4.2. W137F - V184S - V380F Mutasyonunun Değerlendirilmesi

V380F mutasyonu ile yaban tip enzimin ısıl kararlılığı arttırılarak enzimin yarılanma ömrü 19 günden 26 güne yükseltilmiştir. Başarı elde edilen bu mutasyon katalitik etkinliği oldukça arttırılmış olan W137F - V184S mutantında denenerek, W137F - V184S - V380F üçlü mutasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Yeni oluşan mutant enzimin kinetik parametreleri yaban tip enzime göre üstün, W137F - V184S mutant enzimine göre düşük niteliktedir (Tablo 24). Fakat oluşan son mutant enzimin ısıl kararlılığı istenilen niteliklerde değildir.

Tablo 25. W137F - V184S - V380F mutasyonunun değerlendirilmesi

	K_m	V_{max}	k_{cat}	k_{cat}/K_m	Ortalama yarılanma ömrü	Kaynak
AgoGI (Rekombinant)	124,45 ± 2,99	39,6 ± 0,79	33,03	0,266	19	Bu Çalışma
V380F	116,57 ± 4,37	37,22 ± 0,39	31,05	0,266	26	Bu Çalışma
W137F - V184S	39,29 ± 2,87	99,71 ± 1,83	83,17	2,116	19	Karaoglu, 2010
W137F - V184S - V380F	71,12 ± 1,06	54,18 ± 0,19	45,20	0,636	14	Bu Çalışma

Enzimin yarılanma ömrü 14 gündür ve bu yaban tip enzimden daha karsız olduğunu göstermektedir (Şekil 109).



Şekil 109. W137F - V184S - V380F' nin Isıl Kararlılık Grafiği

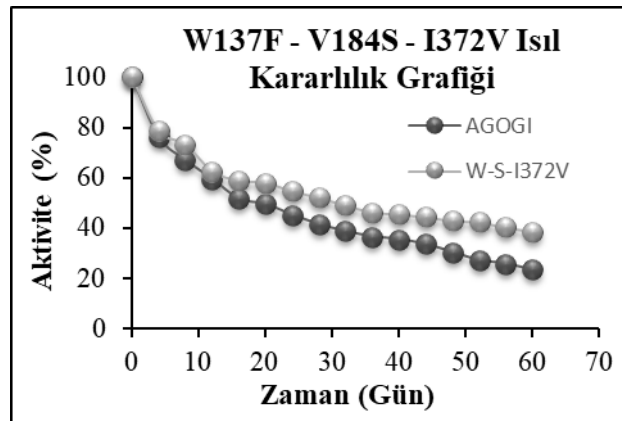
4.3. W137F - V184S - I372V Mutasyonunun Değerlendirilmesi

V101R mutasyonu ile yaban tip enzimin ısıl kararlılığı arttırılarak enzimin yarılanma ömrü 19 günden 31 güne yükseltilmiştir. Başarı elde edilen bu mutasyon katalitik etkinliği oldukça arttırılmış olan W137F - V184S mutantında denenerek, W137F - V184S - I372V üçlü mutasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Tablo 26’ da da görüldüğü üzere I372V mutantı ısıl kararlılığında, k_{cat} ve V_{max} değerlerinde bir bozulma olmadan W137F - V184S mutantı üzerine başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

Tablo 26. W137F - V184S - I372V mutasyonunun değerlendirilmesi

	K_m	V_{max}	k_{cat}	k_{cat}/K_m	Ortalama yarılanma ömrü	Kaynak
AgoGI (Rekombinant)	124,45 ± 2,99	39,6 ± 0,79	33,03	0,266	19	Bu Çalışma
I372V	132,11 ± 3,70	65,46 ± 0,55	54,60	0,413	31	Bu Çalışma
W137F - V184S	39,29 ± 2,87	99,71 ± 1,83	83,17	2,116	19	Karaoğlu, 2010
W137F - V184S - I372V	64,37 ± 1,3	99,05 ± 0,44	82,62	1,283	30	Bu Çalışma

Bu mutasyon ile hedeflenen; yüksek katalitik aktiviteye sahip ve daha ısıl kararlı bir enzim üretilmiştir (Şekil 110).



Şekil 110. W137F - V184S - I372V’ nin ısıl kararlılık grafiği

5. ÖNERİLER

V380F ve I372V mutasyonları ile başarılı sonuçlar alınmıştır. Bu mutasyonlar *A. gonensis* GI' sı üzerinde birlikte denerek ortak etkileri araştırılmıştır. Ayrıca bu mutasyonlar W137F - V184S mutasyonu ile birlikte denenerek etkileri araştırılmıştır. Fakat V380F - I372V mutasyonu W137F - V184S mutasyonu ile birlikte denenmemiştir. Bu 4 mutasyon bir enzim üzerinde aynı anda denenerek W137F - V184S - V380F - I372V mutant enziminin de karakterize edilmesi biyokimyasal ve kinetik parametreleri açısından daha üstün bir enzimin tasarlanması için önemli sonuçlar verebilir.

Mutasyon bölgeleri termofilik ve mezofilik karakterli bakterilerin amino asit dizilerinin birbirleriyle karşılaştırılmasına göre seçilmiştir. Mutasyon noktalarının enzimin üç boyutlu modellemesine göre dizayn edilmesi noktaların etkilerinin daha iyi sonuç vermesi yönünde faydalı olabilir. Mevcut sekonder yapıların aydınlatılarak bu yapıların birbirleriyle olan ilişkilerinde etkili olan amino asitlerin seçilmesi mutasyon noktalarının etkilerini arttıracaktır.

I373V mutasyonu enzim üzerinde köklü değişiklikler meydana getirmiştir. Bu durum 373. amino asit olan izolösinin enzimin şekillenmesinde kritik bir noktada olduğunun göstergesidir. Bu açıdan bu noktada değişik amino asitler ile meydana getirilecek mutasyonların çok farklı sonuçlar vereceği olasıdır. Bu sebeple I372H, I372S, I372D, I372G, I372A ve bunun gibi mutasyonlar bölgede denenebilir.

Benzer şekilde V380F mutasyonu da enzim üzerinde köklü değişiklikler meydana getirmiştir. 380. amino asit olan valin amino asidinin Fenil alanin amino asidine dönüştürülmesiyle enzimin şekillenmesinde kritik bir noktada olduğunun göstergesidir. Bu noktada yapılacak olan farklı amino asitler ile meydana getirilecek olan mutasyonların da çok farklı sonuçlar vereceği olasıdır. Bu sebeple V380H, V380S, V380D, V380G, V380A ve bunun gibi mutasyonlar bölgede denenebilir.

KAYNAKLAR

- Amore, R. and Hollenberg, C.P., 1989.** Xylose Isomerase from *Actinoplanes missouriensis*: Primary Structure of the Gene and the Protein. *Nucleic Acids Research*, 17, 18, 7515. DOI:10.1093/nar/17.18.7515.
- Antrim, R.L., Colilla, W. and Schnyder, B.J., 1979.** Glucose isomerase production of high fructose syrups. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2, 97-155.
- Bandlish, R.K., Michael, H.J., Epting, K.L., Vieille, C., Kelly R.M., 2002.** Glucose-to- fructose conversion at high temperatures with xylose (glucose) isomerases from *Streptomyces murinus* and two hyperthermophilic *Thermotoga* species. *Biotechnology and Bioengineering*, 80, 2, 185-194. DOI: 10.1002/bit.10362.
- Barredo, J.L., 2005.** Methods in Biotechnology. Microbial Enzymes and Biotransformations (Humana, Totowa, New Jersey), 17, 1-27, DOI: 10.1385/1592598463, ISBN: 978-1-59259-846-5.
- Bartfay, J., 1960.** Glucose Isomerase in Barley Malt. *Nature International Journal of Science*, 185, 924-925.
- Belfaqui, N. and Penninckx, M., 2000.** A bifunctional β -xylosidase-xylose isomerase from *Streptomyces* sp. EC 10. *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 1-2, 114-121. DOI: 10.1016/S0141-0229(00)00182-4.
- Bhat, M.K., 2000.** Cellulases and Related Enzymes in Biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18, 5, 355-383. DOI: 10.1016/S0734-9750(00)00041-0.
- Bhosale, S.H., Rao, M.B. ve Deshpande, V.V., 1996.** Molecular and Industrial Aspects of Glucose Isomerase. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 60, 2, 280-300.
- Bogumil, R., Kappl R., J. Huttermann, C., Sudfeldt ve H. Witzel., 1993.** X and Q-band Studies on the Two Mn²⁺-substituted Metal-Binding Sites of D-xylose Isomerase. *European Journal of Biochemistry*, 213, 1185–1192, DOI: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb17869.x.
- 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. DOI: 10.1016/0378-1119(92)90718-5.
- Bucke, C., 1983.** Glucose Transforming Enzymes, In W. Fogarty (Ed.), *Microbial Enzymes and Biotechnology*. Applied Science Publishers, 93–127.

- Burggraf, S., Fricke, H., Neuner, A., Kristjansson, J.K., Rouvier, P., Mandelco, L., Woese, C.R., Stetter, K.O., 1990.** *Methanococcus igneus* sp. nov., a novel hyperthermophilic methanogen from a shallow submarine hydrothermal system. *Systematic and Applied Microbiology*, 13, 263–269, DOI: 10.1016/S0723-2020(11)80197-9
- Bradford, M.M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 1-2, 248-254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Brock, T.D., 1997.** The value of basic research: Discovery of *Thermus aquaticus* and other extreme thermophiles. *Genetics*, 146, 1207–1210.
- Briggs, K.A., Lancashire, W.E. and Hartley, B.S., 1984.** Molecular Cloning, DNA Structure and Expression of the *Escherichia coli* D-Xylose Isomerase. *The EMBO Journal*, 3, 611–616. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1984.tb01856.x.
- Brown, S.H., Sjöholm, C., Kelly R.M., 1993.** Purification and characterization of a highly thermostable glucose isomerase produced by the extremely thermophilic eubacterium, *Thermotoga maritima*. *Biotechnology Bioengineering*, 41, 878-886. DOI: 10.1002/bit.260410907.
- Callens, M., Van Bastelaere, P.B., Vangrysperre, W.A., Kesters - Hilderson, H.L., 1992.** Binding characteristics of Mn^{2+} , Co^{2+} and Mg^{2+} ions with several D-xylose isomerases. *Biochemical Journal*, 286, 729-735.
- Carell, H.L., Glusker, J.P., Manfre, F., Tritsch, D. and Biellmann, J.F., 1989.** X-ray analysis of D-xylose isomerase at 1.9 Å: native enzyme in complex with substrate and with a mechanism-designed inactivator. *Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 12, 4440-4444. DOI: 10.1073/pnas.86.12.4440.
- Chang, C., Song, H.K., Park, B.C., Lee, D.S., Suh, S.W., 1999.** A thermostable xylose isomerase from *Thermus caldophilus*: biochemical characterization, crystallization and preliminary X-ray analysis. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 55(1), 294-296.
- Chauthaiwale, J.V. and Rao, M.B., 1994,** Production and Purification of Extracellular D-Xylose Isomerase from an *Alkaliphilic, Thermophilic Bacillus Sp.*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(12), 4495–4499.
- Chanyong, L. and Zeikus, G.J., 1991.** Purification and characterization of thermostable glucose isomerase from *Clostridium thermosulfurogenes* and *Thermoanaerobacter* strain B6A. *Biochemical Journal*, 1991, 273, 565-571, DOI: 10.1042/bj2730565.
- Chen, W.P., Anderson, A.W., 1979.** Purification, immobilization, and some properties of glucose isomerase from *Streptomyces flavogriseus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 38, 1111-1119.

- Chen, W.P., 1980.** Glucose isomerase. *Process Biochemistry*, 15, 30-35.
- Collyer, C.A. and Blow, D.M., 1990.** Observations of reaction intermediates and the mechanism of aldose-ketose interconversion by D-xylose isomerase. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, 87, 1362-1366. DOI: 10.1073/pnas.87.4.1362.
- CRA., 1994.** Corn Refining, the Process, the Products, Corn Refiners Association Inc.
- Crabb and Shetty., 1999.** W.D. Crabb, J.K. Shetty Commodity scale production of sugars from starches. *Current Opinion in Microbiology*, 2,3, 252-256. DOI: 10.1016/S1369-5274(99)80044-7.
- Danno, G., 1970.** Studies on the D-glucose-isomerizing enzyme from *Bacillus coagulans*, strain HN-68. *Agricultural and Biological Chemistry*, 34, 1795-1814. DOI: 10.1080/00021369.1970.10859848.
- Demirjian, D.C., Moris-Varas, F. and Cassidy, C.S., 2001.** Enzymes from *Extremophiles*, *Current Opinion in Chemical Biology*, 5, 144-151. DOI: 10.1016/S1367-5931(00)00183-6.
- Dekker, K., Yamagata, H., Sakaguchi, K. and Udaka, S., 1991.** Xylose (Glucose) Isomerase gene from the Thermophile *Thermus Thermophilus*: cloning, sequencing, and comparison with other thermostable xylose isomerases. *Journal of Bacteriology*, 173, 3078–3083.
- Ding, M., Teng, Y., Yin, Q., Chen, W., Zhao, F., 2009.** Identification, expression, and characterization of the highly conserved D-xylose isomerase in animals. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 41, 116-122. DOI: 10.1093/abbs/gmn013.
- Dische, Z. and Borenfreund, E., 1951.** A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugars and trioses. *Journal of Biological Chemistry*, 192(2), 583-7.
- 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 Research*, 16, 9337. DOI: 10.1093/nar/16.19.9337.
- Fujiwara, S., 2002.** Extremophiles: Developments of Their Special Functions and Potential Resources. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94, 518-525, DOI: 10.1016/S1389-1723(02)80189-X.
- Gaikwad, S.M., Rao, M.B. and Deshpande, V.V., 1992.** D-Glucose/Xylose Isomerase from *Streptomyces*. Differential Roles of Magnesium and Cobalt Ions, *Enzyme Microbial Technology*, 4, 317–320. DOI: 10.1016/0141-0229(92)90158-k.
- Gaikwad, S.M., Deshpande, V.V., 1992.** Immobilization of glucose isomerase on indion 48-R. *Enzyme and Microbial Technology*. 14, 8555–8558. DOI: 10.1016/0141-0229(92)90104-V.

- Gil-Jae Joo, Jae-Ho Shin¹, Gun-Young Heo¹, Young-Mog Kim and In-Koo Rhee., 2004.** Molecular Cloning and Expression of a Thermostable Xylose (Glucose) Isomerase Gene, *xylA*, from *Streptomyces chibaensis* J-59. The Journal of Microbiology, The Microbiological Society of Korea, 43, 34-37.
- Haki, G.D. and Rakshit, S.K., 2003.** Developments in Industrially Important Thermostable Enzymes: a Review. Bioresource Technology, 89, 17-34, DOI: 10.1016/S0960-8524(03)00033-6.
- Hartley, B.S., Hanlon, N., Jackson, R.J. ve Rangarajan, M., 2000.** Glucose Isomerase: Insights into Protein Engineering for Increased Thermostability. Biochimica et Biophysica Acta, 1543, 294-335.
- Henrik, K., Collyer, C.A. and Blow, D.M., 1989.** Structures of D-xylose isomerase from *Arthrobacter* strain B3728 containing the inhibitors xylitol and D-sorbitol at 2.5 Å and 2.3 Å resolution, respectively. Journal of Molecular Biology, 208, 129-147, DOI: 10.1016/0022-2836(89)90092-2.
- Henry, E.R., 1976.** High Fructose Corn Syrup: New Sweetener for the Baker. Baker's Digest, 50, 2, 25.
- Hess, J.M., Tchernajenko, V., Vieille, C., Zeikus, J.G. and Kelly, R.M., 1998.** *Thermotoga neapolitana* Homotetra-Meric Xylose Isomerase is Expressed as a Catalytically and Thermostable Dimer in *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology, 64, 2357-2360.
- Hobbs, L., 1986.** Corn Syrups. Cereal Foods World., 31, 12, 852, 854, 856, 858.
- Hogue-Angeletti, R.A., 1975.** Subunit structure and amino acid composition of xylose isomerase from *Streptomyces albus*. The Journal of Biological Chemistry, 250, 19, 7814-7818.
- Howling, D., 1992.** Glucose Syrup: Production, Properties and Applications. In: Schenck, F.W. and R.E. Hebeda (Ed.), "Starch Hydrolysis Products", VCH Publishers Inc., 277-316.
- Joo, G.J., Shin, J.H., Heo, G.Y., Kwak, Y.Y., Choi, J.H., Rhee, I.K., 2001.** Purification and characterization of a thermostable xylose (glucose) isomerase from *Streptomyces chibaensis* J-59. Journal of Applied Biological Chemistry, 44, 113-118.
- Joo, G.J., Shin, J.H., Heo, G.Y., Kim, Y.M., Rhee, I.K., 2005.** Molecular Cloning and Expression of a Thermostable Xylose (Glucose) Isomerase Gene, *xylA*, from *Streptomyces chibaensis* J-59. The Journal of Microbiology, 34-37, 43, 1.
- Joseph J., 1999.** The Humanure Handbook Chapter 3. Thermophilic Microorganisms 143 Forest Lane, Grove City, PA.

- Kim, J.H., Prabhu, P., Jeya, M., Tiwari, M.K., Moon, H.J., Singh, R.K., Lee, J.K., 2010.** Characterization of an L-arabinose isomerase from *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 1839-1847, DOI: 10.1007/s00253-009-2210-6.
- Karaoglu, H., Yanmis, D., Sal, F.A., Celik, A., Canakci, S., Belduz, A.O., 2013.** Biochemical characterization of a novel glucose isomerase from *Anoxybacillus gonensis* G2(T) that displays a high level of activity and thermal stability. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 97, 215–224, DOI: 10.1016/j.molcatb.2013.08.019.
- Kawai, Y., Konishi, H., Horitsu, H., Sakurai, H., Takamizawa, K., Suzuki, T. and Kawai, K., 1994.** Purification and Characterization of D-Xylose Isomerase from *Bifidobacterium adolescentis*, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58, 691-694, DOI: 10.1271/bbb.58.691.
- Kovalevsky, A. Y., Hanson, L., Fisher, S. Z., Mustyakimov, M., Mason, S. A., Forsyth, V. T., Blakeley, M. P., Keen, D. A., Wagner, T., Carrell, H. L., Katz, A. K., Glusker, J. P. and Langan, P., 2010.** Metal ion roles and the movement of hydrogen during reaction catalyzed by D-xylose isomerase: a joint x-ray and neutron diffraction study. *Structure*, 18, 688–699, DOI: 10.1016/j.str.2010.03.011
- Khire, J.M., Lachke, A.H., Srinivasan, M.C., Vartak, H.G., 1990.** Characterization of the purified extracellular D-xylose isomerase devoid of D-glucose isomerase from *Chainia sp.*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 23, 41-52.
- Kevin, L.E., Claire, V., Zeikus, J.G., Robert, M.K., 2005.** Influence of divalent cations on the structural thermostability and thermal inactivation kinetics of class II xylose isomerases. 20, 272,6, 1454-1464, DOI: 10.1111/j.1742-4658.2005.04577.x
- Knorr, D., 1987.** Modern Process Technology of HFCS. *Food Biotechnology*. Marcel Dekker (Ed.). 36, 280, ISBN: 0824775783
- Kristjansson, J. K. and Stetter K.O., 1991.** Thermophilic bacteria. In *Thermophilic Bacteria*, Kristjánsson, J.K. (Ed.). 1–18. Boca Raton: CRC Press. ISBN: 9780849352393- CAT# 5239
- Kristo, P., Saarelainen, R., Fagerstrom, R., Aho, S. and Korhola, M., 1996.** Protein purification, and cloning and characterization of the cDNA and gene for xylose isomerase of barley. *European Journal of Biochemistry*, 237, 240-246, DOI: 10.1111/j.1432-1033.1996.0240n.x
- Kwon, H.J., Kitada, M. and Horikoshi, K., 1987.** Biological Chemistry Purification and Properties of D-Xylose Isomerase from Alkalophilic *Bacillus* No. KX-6. *Agricultural and Biological Chemistry*. 51. 7, 1983-1989. DOI: 10.1080/00021369.1987.10868297.

- Lee, C., Bagdasarian, M., Meng, M. and Zeikus, J. G., 1990.** Catalytic Mechanism of Xylose (Glucose) Isomerase from *Clostridium thermosulfurogenes*. Characterization of the structural gene and function of active site histidine. The journal of Biological Chemistry. 265, 31, 19082-19090
- Lee, Y.E., Ramesh, M.V., Zeikus, J.G., 1993.** Cloning, sequencing and biochemical characterization of xylose isomerase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* strain B6A-RI. Journal of General Microbiology, 139, 1227–1234, DOI: 10.1099/00221287-139-6-1227
- Lehmbacher, A. and Bisswanger, H., 1990.** Isolation and Characterization of an Extremely Thermostable D-Xylose Isomerase from *Thermus Aquaticus* Hb8. Journal of General Microbiology, 136, 679-686, DOI: 10.1099/00221287-136-4-679
- Liu, S.Y., Wiegel, J., 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. Journal of Bacteriology, 178, 5938-5945, DOI: 10.1128/jb.178.20.5938-5945.1996
- Meadeu, P. G., J. Aduse-Opoku, J., Reizer, A., Reizer, Y. A., Lanceman, M. F. Martin and Mitchell, W. J., 1994.** The Xylose Isomerase-Encoding Gene (xylA) of *Clostridium thermosaccharolyticum*: Cloning, Sequencing and Phylogeny of XylA Enzymes. Gene, 141, 97–101, DOI: 10.1016/0378-1119(94)90134-1
- Schenk, M. and Bisswanger, H., 1998.** A microplate assay for D-xylose/ D-glucose isomerase. Enzyme and Microbial Technology, 22, 8, 721-723. DOI: 10.1016/S0141-0229(98)00003-9
- Madhavan, A., Tamalampudi, S., Ushida, K., Kanai, D., Katahira, S., Srivastava, A., Fukuda, H., Bisaria, V.S., Kondo, A., 2009.** Xylose isomerase from polycentric fungus *Orpinomyces*: gene sequencing, cloning, and expression in *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of xylose to ethanol. Applied Microbiology and Biotechnology, 82, 1067-1078, DOI: 10.1007/s00253-008-1794-6
- Meijnen, J.P., Winder J.H., Ruijsenaars H.J., 2008.** Engineering *Pseudomonas putida* S12 for efficient utilization of D-xylose and L-arabinose. Applied and Environmental Microbiology, 74, 5031–5037, DOI: 10.1128/AEM.00924-08
- Mireia, G.V., Cristóbal, A., Donald, G., Truhlar, J.G., 2002.** Hydride transfer catalyzed by xylose isomerase: Mechanism and quantum effects. Computational Chemistry, 24, 2, 51. DOI: 10.1002/jcc.10154
- Natake, M., Yoshimura, S., 1964.** Studies on glucose isomerase of bacteria. II. The glucose isomerizing activity of *Escherichia intermedia*, strain HN-500. Agricultural and Biological Chemistry, 28, 505–509, DOI: 10.1080/00021369.1964.10858271

- Pastine, O., Schoemaker, H.E. and Leisola, M., 1999.** Xylose Isomerase Katalyzed Novel Hexose Epimerization. *Biocatalysis and Biotransformation*, 17, 393-400, DOI: 10.3109/10242429909015238
- Pawar, S.A., Deshpande, V.V., 2000.** Characterization of acid- induced unfolding intermediates of glucose/xylose isomerase. *The Febs Journal*, 39, 6331-6338, DOI: 10.1046/j.1432-1327.2000.01686.x
- Pomeranz, Y., 1985.** Functional Properties of Foods. Academic Press Inc., 536, ISBN: 0-12-561281-8.
- Pubols, M.H., Zahnley, J.C. and Axelrod, B., 1963.** Partial Purification and Properties of Xylose And Ribose Isomerase in Higher Plants. *Plant Physiology*, 38, 457–461.
- Rangarajan, M. and Hartley, B.S., 1992.** Mechanism of D-Fructose Isomerization by *Arthrobacter* D-Xylose Isomerase. *Biochemical Journal*, 283, 223-233.
- Rasmussen, H., Cour, T.L., Nyborg, J. and Schulein, M., 1994.** *Acta crystallographica Section D*, 50, 124-131, DOI: 10.1107/S0907444993009540
- Ravikumar, S., Vikramathithan, J., Srikumar, K., 2011.** Purification and characterization of a novel thermostable xylose isomerase from *Opuntia vulgaris* mill. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164(5), 593-603, DOI: 10.1007/s12010-011-9160-z
- Rey, F., Jenkins, J., Janin, J., 1988.** Structural analysis of the 2.8 Å model of Xylose isomerase from *Actinoplanes missouriensis*. *Proteins*, 4(3), 165-72, DOI: 10.1002/prot.340040303
- Rozanov, A., Zagrebel'nyi, S., Beklemishchev, A., 2009.** Cloning of *Escherichia coli* K12 xylose isomerase (glucose isomerase) and studying the enzymatic properties of its expression product. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya*, 45(1), 38-44.
- Rose, S.P., Bradford, H.F., Chain, E.B., Cory, H.T., 1969.** Glucose and amino acid metabolism in some invertebrate nervous system. *Journal of Neurochemistry*, 16(3), 969-78, DOI: 10.1111/j.1471-4159.1969.tb08987.x
- Saari, G., Kumar, A., Kawasaki, G., 1987.** Sequence of the *Ampullariella* sp. strain 3876 gene coding for xylose isomerase. *Journal of Bacteriology*, 169, 612–618, DOI: 10.1128/jb.169.2.612-618.1987
- Sheeba, S., Gurjeet, S., Mimpal, S., 2018.** Glucose Isomerase Production and Its Application In Various Field . *International Journal of Scientific Research in Science and Technology*, 4, 5.
- Sanchez, S. and Smiley, K.L., 1975.** Properties of D- xylose Isomerase from *Streptomyces albus*. *Applied Microbiology*, 29(6), 745-750.

- Santa, H., Kammonen, J., Lehtonen, O., Karimäki, J., Pastinen, O., Leisola, M. and Turunen, O., 2005.** Stochastic boundary molecular dynamics simulation of L-ribose in the active site of *Actinoplanes missouriensis* xylose isomerase and its Val135Asn mutant with improved reaction rate. *Biochimica et Biophysica Acta Proteins and Proteomics*, 1749, 65 – 73, DOI: 10.1016/j.bbapap.2005.02.007
- Sapunova, L.I., Lobanok, A.G., Kazakevich, I.O., Shlyakhotko, E.A., Evtushenkov, A.N., 2006.** Biosynthetic features and properties of xylose isomerases from *Arthrobacter nicotianae*, *Escherichia coli*, and *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42, 3, 246-251.
- Suekane, M., Tamura, M. and Tomimura, C., 1978.** Physicochemical and Enzymatic Properties of Purified Glucose Isomerase from *Streptomyces olivochromogenes* and *Bacillus stearothermophilus*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 42, 909–917.
- Staudigl, P., Haltrich, D., Peterbauer, C.K., 2014.** L-Arabinose isomerase and D-xylose isomerase from *Lactobacillus reuteri*: characterization, coexpression in the food grade host *Lactobacillus plantarum*, and application in the conversion of D-galactose and D-glucose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(7):1617–1624, DOI: 10.1021/jf404785m
- Smith, C.A., Rangarajan, M. and Hartley, B.S., 1991.** D-Xylose (D-Glucose) Isomerase from *Arthrobacter* Strain Nrrl B3728. *Biochemical Journal*, 277, 255–261, DOI: 10.1042/bj2770255
- Srinivasan, M.C., Vartak, H.G., Powar, V.K. and Khire, J.M., 1983.** High Activity Extracellular Glucose/(Xylose) Isomerase from a *Chainia* Species. *Biotechnology Letters*, 5, 611-614.
- Takasaki, Y. and Tanabe, O., 1962.** Formation of Fructose from Glucose by Bacteria. I. Properties of Glucose Isomerase. *Hakko Kyokaishi*, 20, 449–455.
- Takasaki, Y. and 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. and Tanabe, O., 1964.** NAD-Linked D-Glucose Isomerizing and D-Mannose Isomerizing Enzyme from *Paracolonobacterium aerogenoides*, *Agricultural and Biological Chemistry*, 28, 740–741.
- Takasaki, Y. and Tanabe, O., 1966.** Studies on Isomerisation of Sugars by Bacteria. IX. NAD-Linked D-Glucose Isomerizing and D-Mannose Isomerizing Enzyme from *Paracolonobacterium aerogenoides*. *Agricultural and Biologicak Chemistry*, 30, 220–225.

- Umemoto, Y., Shibata, T., Araki, T., 2012.** D-Xylose isomerase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain XY-214, and D-xylulose production from beta-1,3-xylan. *Marine Biotechnology*, 14, 10-20, DOI: 10.1007/s10126-011-9380-9
- Tucker, M.Y., Himmel, M., Grohmann, K., Lastick, S., 1988.** Properties of genetically overproduced *E. coli* xylose isomerase. *Biotechnology Letters*, 10, 2, 79–84.
- Van der Maarel, M.J., Van der Veen, B. and Uitdehaag, J.C., 2002.** Properties and applications of starch-converting enzymes of the alphaamylase family. *Journal of Biotechnology*, 94, 137-155, DOI: 10.1016/S0168-1656(01)00407-2
- Van Tillbeurgh, H., Jenkins, J., Chiadmi, M., Janin, J. Wodak, S.J., Mrabet, N.T., Lambeir, A.M., 1992.** Protein engineering of xylose (glucose) isomerase from *Actinoplanes missouriensis*. 3. Changing metal specificity and the pH profile by site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, 31, 5467-5471.
- Vartak, H.G., Srinivasan, M.C., Powar, V.K., Rele, M.V. and Khire, J.M., 1984.** Characterisation of Extracellular Substrate Specific Glucose and Xylose Isomerases of *Chainia*, *Biotechnology Letters*, 6, 493–494–614, DOI: 10.1007/BF00139990
- Vongsuvanlert, V. and Tani, Y., 1988.** Purification and Characterization of Xylose Isomerase of a Methanol Yeast, *Candida Boidinii*, Which is Involved in Sorbitol Production from Glucose, *Agricultural and Biological Chemistry*, 52, 1817–1824.
- Vuolanto, A., Pastinen, O., Schoemaker, H., Leisola, M., 2002.** C-2 Epimer formation of tetrose, pentose and hexose sugars by xylose isomerase Biocatalaysis and Biotransformation, 20, 235-240, DOI: 10.1080/10242420290029463
- Wang, P.Y., Johnson, B.F. and Schneider, H., 1980.** Fermentation Of D- xylose by Yeasts Using Glucose Isomerase in The Medium to Convert D-Xylose to Dxylulose, *Biotechnology Letters*, 2, 273- 278.
- Mu, W., Wang, X., Xue, Q., Jiang, B., Zhang, T. and Miao, M., 2012.** Characterization of a thermostable glucose isomerase with an acidic pH optimum from *Acidothermus cellulolyticus*. *Food Research International*, 47, 364-367.
- Weber, P.** Fructose by Isomerisation of Glucose. U.K. Patent 1, 496, 309, 1976.
- Whitlow, M., Howard, A.J., Finzel, B.C., Poulos, T.L., Winborne, E. and Gilliland, G.L., 1991.** A metal-mediated hydride shift mechanism for xylose isomerase based on the 1.6 Å *Streptomyces rubiginosus* structures with xylitol and D-xylose. *Proteins*, 9, 153-173, DOI: 10.1002/prot.340090302
- Wilhelm, M. and C.P. Hollenberg., 1985.** Nucleotide Sequence of the *Bacillus subtilis* Xylose Isomerase Gene: Extensive Homology Between the *Bacillus* and the *Escherichia coli* enzyme. *Nucleic Acids Research*, 13, 5717–5722.

- Wulff, S.M. and Helgeson, D.L., 1987.** Preliminary Economic Feasibility Analysis of HFCS Processing in US with Emphasis on North Dakota. Agricultural Economics Report, No. 229.
- Xu, W., Yan, M., Xu, L., Ding, L. and Ouyang, P., 2009.** Engineering the activity of thermophilic xylose isomerase by site-directed mutation at subunit interfaces. *Enzyme and Microbiology Technology*, 44: 77–83, DOI: 10.1016/j.enzmictec.2008.10.015
- Xu, Z., Li, S., Feng, X., Liang, J., Hu, X., 2014.** L-Arabinose isomerase and its use for biotechnological production of rare sugars. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 8869-8878, DOI: 10.1007/s00253-014-6073-0
- Yamanaka, K., 1968.** Purification, Crystallization and Properties of the D-xylose Isomerase from *Lactobacillus brevis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 151-670-8, DOI: 10.1016/0005-2744(68)90015-6
- Yamanaka, K., 1975.** D-Xylose Isomerase from *Lactobacillus Brevis*. *Methods in Enzymology*, 41, 466-471, DOI: 10.1016/s0076-6879(75)41101-6
- Yanase, H., Nozaki, K., Okamoto, K., 2005.** Ethanol production from cellulosic materials by genetically engineered *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letters*, 27, 259–263, DOI: 10.1007/s10529-004-8295-1
- Yanmis, D., Karaoglu, H., Nigar, D., Sal, F.A., Canakci, S., Belduz, A.O., 2014.** Characterization of a novel xylose isomerase from *Anoxybacillus gonensis* G2T, *Turkish Journal of Biology*, Tubitak, 32, 586-592, DOI: 10.3906/biy-1403-76

ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Üsküdar’da doğdu. İlkokulu Mediha Tansel İlköğretim Okulu’nda, liseyi Ünye Anadolu Lisesi’nde tamamladı. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Su Ürünleri Mühendisliği Bölümünden 2015 yılında mezun oldu. Yine aynı sene içerisinde Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalında tezli yüksek lisans eğitimini bitirdi.

