

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

**TERMOFİLİK *Geobacillus thermodenitrificans* TH2 SUŞUNDAN GLUKOZ
İZOMERAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Leyla KONAK

EYLÜL 2011

TRABZON

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

**TERMOFİLİK *Geobacillus thermodenitrificans* TH2 SUŞUNDAN GLUKOZ
İZOMERAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Leyla KONAK

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"YÜKSEK LİSANS (KİMYA)"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 06.09.2011
Tezin Savunma Tarihi : 21.09.2011

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK

Trabzon 2011

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalında

Leyla KONAK tarafından hazırlanan

**TERMOFİLİK *Geobacillus thermodenitrificans* TH2 SUŞUNDAN GLUKOZ
İZOMERAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 06 /09 / 2011 gün ve 1420 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ

Üye : Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK

Üye : Doç. Dr. Sevgi KOLAYLI

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitüsü Müdürü

ÖNSÖZ

“Termofilik *Geobacillus thermodenitrificans* TH2 Suşundan Glukoz İzomeraz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu” adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında yapılmış olup, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans tez danışmanlığımı üstlenerek bu çalışmanın planlanıp değerlendirilmesinde desteğini ve bilgisini benden esirgemeyen, Biyokimya bilimini seçmemde ve sevmemdeki en büyük etkenlerden biri olan çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Başta tez çalışmalarım olmak üzere tüm lisansüstü eğitimim boyunca bilgi ve yardımlarını benden esirgemeyen, sabrı, hoşgörüsü ve ilgisiyle çalışmamı tamamlamama büyük katkıları olan sevgili hocam Yrd. Dç. Dr. Yakup KOLCUOĞLU’na sonsuz desteği için teşekkürü borç bilirim. Siz olmasaydınız her şey daha zor olurdu. Çalışmama olan değerli katkıları sebebiyle Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ ve Dr. Kadriye İNAN’a teşekkürü borç bilirim.

Çalışmalarım sırasında daima yanımda olan, karşılaştığım her türlü problemde ilk yardımına koşan, en yoğun anlarımda dahi bilgisini, zamanını ve desteğini benden hiç esirgemeyen değerli arkadaşım doktora öğrencisi Fulya ÖZ’e çok teşekkür ederim. Gerek çalışmalarım sırasında, gerekse özel yaşamımda daima yanımda gördüğüm, birlikte çalışmayı keyfe dönüştürdüğümüz ve yüksek lisans eğitimimin her anını birlikte geçirdiğim Biyokimya Lisansüstü Araştırma Laboratuvarı’ndaki tüm arkadaşlarıma, başta Yüksek Lisans öğrencisi arkadaşım Esra ÖZBEK’e olmak üzere, sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her anında, attığım her yeni adımda bana olan inançlarını daima hissettiğim, sonsuz sevgi ve destekleriyle bana kendimi her zaman şanslı hissettiren, küçük kızları olmaktan asla vazgeçemeyeceğim aileme teşekkürlerin en büyüğünü sunuyorum. Kocaman ve çok özel bir teşekkürü de hayatımdaki en özel insan olan biricik ablam Şafak KONAK TÜRKER hak ediyor, iyi ki varsın ve iyi ki benim ablamsın. Hepinizi çok seviyorum. Sizler benim en büyük şansımınsınız.

Leyla KONAK

Trabzon 2011

TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Termofilik *Geobacillus thermodenitrificans* TH2 Suşundan Glukoz İzomeraz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof.Dr. Ahmet ÇOLAK’ın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 06/09/2011

Leyla KONAK

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET.....	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ	XI
SEMBOLLER DİZİNİ.....	XII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Endüstriyel Enzim Kaynağı Olarak Mikroorganizmaların Seçilmesi	2
1.2.1. Termofilik Mikroorganizmalardan Elde Edilen Enzimler.....	3
1.3. Glukoz İzomeraz.....	4
1.3.1. GI'nın Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması.....	6
1.3.2. GI'nın Reaksiyon Mekanizması.....	8
1.3.3. GI İçin Aktif Bölge Çalışmaları.....	9
1.3.4. GI'nın Metal İyonu Gerksinimi ve İnhibitörler.....	9
1.3.5. GI'nın Substrat Özgünlüğü.....	9
1.3.6. GI'nın optimum Sıcaklık ve pH'sı	10
1.4. GI Üreten Mikroorganizmalar	10
1.5. Termofilik Bir Bakteri Olan <i>Geobacillus</i> 'lar	13
1.5.1. <i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	13
1.6. GI'nın Kullanım Alanları ve Endüstriyel Önemi	14
1.6.1. Etanol Üretimi	14
1.6.2. HFCS Üretimi	15
1.6.3. Kimyasal İzomerizasyona Karşı Enzimatik İzomerizasyon	17
1.7. Çalışmanın amacı ve Pratik Önemi.....	17
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	19
2.1. Kullanılan Materyaller.....	19

2.1.1.	Cihazlar.....	19
2.1.2.	Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler	20
2.1.3.	Kullanılan Mikroorganizma	20
2.1.4.	Mineralli Sıvı Besiyerinin Hazırlanması.....	20
2.1.5.	Kullanılan Tamponlar ve Çözeltiler	21
2.1.5.1.	Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	21
2.1.5.2.	Protein Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler	22
2.1.5.3.	Tampon Çözeltiler	23
2.1.5.4.	Enzim Aktivitesi Tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	25
2.2.	Deneysel Çalışmalar	25
2.2.1.	GI Aktivitesinin Tayini.....	25
2.2.2.	Ham Enzim Özütünün Hazırlanışı.....	26
2.2.3.	GI'nın Saflaştırılması.....	27
2.2.3.1.	Isı Şoku Uygulaması.....	27
2.2.3.2.	Aseton Çöktürmesi	27
2.2.3.3.	İyon Değişirme Kromatografisi.....	27
2.2.4.	Protein Tayini	28
2.2.5.	Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi	29
2.2.6.	SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi	30
2.2.7.	Saflaştırılan GI'nın Biyokimyasal Karakterizasyonu.....	31
2.2.7.1.	Enzim Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi.....	31
2.2.7.2.	Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	31
2.2.7.3.	Enzim Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi	31
2.2.7.4.	Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi	32
2.2.7.5.	Enzimin pH Kararlılığının İncelenmesi	32
2.2.7.6.	Enzimin Isıl Kararlılığının İncelenmesi.....	32
2.2.7.7.	Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi	33
3.	BULGULAR.....	34
3.1.	GI'nın Saflaştırılması.....	34
3.1.1.	Isı Şoku ve Aseton Çöktürmesi Uygulamaları.....	34
3.1.2.	Enzimin İyon Değişirme Kromatografisi ile Saflaştırılması.....	34
3.1.3.	Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi	36

3.1.4.	SDS Poliakrilamid Jel Elektrofözezi.....	36
3.1.5.	Safıaştırılan Enzimin Biyokimyasal Karakterizasyonu	37
3.1.5.1.	Enzim Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi.....	37
3.1.5.2.	Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	38
3.1.5.3.	Enzim Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi	39
3.1.5.4.	Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi	40
3.1.5.5.	Safıaştırılan Enzimin pH Kararlılığının İncelenmesi	42
3.1.5.6.	Safıaştırılan Enzimin Isıl Kararlılığının İncelenmesi.....	44
3.1.5.7.	Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi	45
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	47
5.	ÖNERİLER.....	52
6.	KAYNAKLAR.....	54
	ÖZGEÇMİŞ	

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

TERMOFİLİK *Geobacillus thermodenitrificans* TH2 SUŞUNDAN GLUKOZ İZOMERAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Leyla KONAK

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof.Dr. Ahmet ÇOLAK
2011, 60 Sayfa

Bu çalışmada Q-Sepharose iyon değişim kromatografisi kullanılarak termofilik bir bakteri olan *Geobacillus thermodenitrificans* TH2'den D-glukoz/D-ksiloz izomeraz enzimi saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Saf enzim, doğal poliakrilamid jel elektroforezinde tek bir band olarak gözlenmiştir. D-glukoz substratı varlığında enzimin optimum sıcaklık ve pH'sı sırasıyla 80 °C ve 7,5 olarak bulunmuştur. Saf enzimin 4 °C ve 50 °C'deki 72 saatlik inkübasyon sonrasında pH 7,5 ve 9,0'da oldukça kararlı olduğu gözlenmiştir. Saflaştırılan enzimin ısıl kararlılık profili incelendiğinde, 50°C'de 4 gün ve 4°C'de de 4 ay kararlılığını koruduğu belirlenmiştir. Saflaştırılan enzimin K_m ve V_{maks} değerleri Lineweaver-Burk eğrisinden sırasıyla 32 mM ve 4,684 U/mg protein olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, bazı metal iyonları varlığında, enzim aktivitesinin değişik oranlarda etkilendiği gözlenmiştir. Sonuç olarak, *G. thermodenitrificans* TH2'den saflaştırılan D-glukoz izomerazın literatürle uyumlu özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Termofilik, Glukoz izomeraz, *Geobacillus thermodinitrificans* TH2, İyon Değiştirme Kromatografisi, Karakterizasyon, Saflaştırma.

Master Thesis

SUMMARY

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF GLUCOSE ISOMERASE FROM
A THERMOPHILIC BACTERIUM, *Geobacillus thermodenitrificans* TH2

Leyla KONAK

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Chemistry Graduate Program
Supervisor: Prof. Ahmet ÇOLAK
2011, 60 Pages

In the present study, the D-glucose/D-xylose isomerase was purified from a thermophilic bacterium, *Geobacillus thermodenitrificans* TH2, by using a Q-Sepharose ion exchange column and characterized. The purified enzyme was observed as a single band on native polyacrylamide gel electrophoresis. In the presence of D-glucose as a substrate, the optimum temperature and pH of the enzyme were found to be 80 °C and 7.5, respectively. The purified enzyme was extremely stable, in pH 7,5 and 9,0 after 72 hour incubation at 4 °C and 50 °C. When the thermal stability profile of the purified enzyme was analyzed, it was determined that the enzyme was extremely stable 4 months and 4 days at 4 °C and 50 °C, respectively. The K_m and V_{max} values of the purified enzyme were calculated as 32 mM and 4,684U/mg protein, respectively, from the Lineweaver-Burk plot. Additionally, it was detected that some metal ions affect the enzyme activity at different rates. As a result, D-glucose isomerase from *G. thermodenitrificans* TH2 has similar features with the literature.

Key Words: Thermophilic, Glucose Isomerase, *Geobacillus thermodenitrificans* TH2, Ion Exchange Chromatography, Characterization, Purification.

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. D-Glukozun D-fruktoza, D-ksilozun da D-ksiluloza izomerizasyonu	5
Şekil 2. GI'nın alt birim yapısı	7
Şekil 3. Sınıf I ve sınıf II GI'ların yapıları.....	7
Şekil 4. Hidrojen kayması mekanizması	8
Şekil 5. İyon değişim kromatografisiyle <i>Geobacillus thermodenitrificans</i> TH2 glukoz izomerazının saflaştırılması.....	35
Şekil 6. Doğal-PAGE elektroforezi.....	36
Şekil 7. SDS-PAGE elektroforezi	37
Şekil 8. Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi	38
Şekil 9. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	39
Şekil 10. Enzim aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisi	40
Şekil 11. Glukoz varlığında GI'nın substrat doygunluk eğrisi.....	41
Şekil 12. Glukoz varlığında GI'nın Lineweaver-Burk eğrisi	41
Şekil 13. Saflaştırılan GI'nın +4 °C'deki pH kararlılık eğrisi.....	43
Şekil 14. Saflaştırılan GI'nın 50 °C'deki pH kararlılık eğrisi.....	43
Şekil 15. Saflaştırılan GI'nın 80 °C'deki pH kararlılık eğrisi.....	43
Şekil 16. Saflaştırılan GI'nın ısı kararlılık eğrisi.....	44

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. GI üreten bazı mikroorganizmalar.....	12
Tablo 2. Endüstriyel öneme sahip GI'ları üreten bazı mikroorganizmalar ve ürünlerin ticari adları.....	13
Tablo 3. Çalışmada kullanılan cihazlar.....	19
Tablo 4. Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları.....	21
Tablo 5. Protein Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları.....	22
Tablo 6. Kullanılan Tampon Çözeltiler ve Hazırlanışları.....	23
Tablo 7. Enzim Aktivitesi Tayininde Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları.....	25
Tablo 8. Doğal poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler ve bileşimleri...29	
Tablo 9. SDS poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler ve bileşimleri.....	30
Tablo 10. GI'a ait saflaştırma tablosu	35
Tablo 11. Bazı metal iyonlarının GI aktivitesi üzerine etkisi.....	46

SEMBOLLER DİZİNİ

APS	: Amonyum persülfat
BSA	: Bovin serum albumin
dd H ₂ O	: Çift destile su
FDA	: Amerikan gıda ve ilaç kurumu
GI	: Glukoz izomeraz
kDa	: Kilodalton
K_m	: Michaelis-Menten sabiti
MOPS	: 3-(N-morfolino)propansülfonic acid
OD	: Optik yoğunluk
rpm	: Dakikadaki dönüş sayısı
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TAE	: Tris-asetik asit-etilendiamintetraasetik asit
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
Tris	: Tris(hidroksimetil)aminometan
U	: Ünite
U/mg protein	: Ünite/miligram protein
V_{maks}	: Maksimum hız
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

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

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

Biyoteknolojinin endüstriyel enzimler ile ilgili alanında enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerlerinin çok yüksek olması nedeniyle yapılan araştırmalar daha da önem kazanmaktadır. Enzimlerin endüstriyel kullanım alanlarına göre dağılımına bakıldığında, %29'unun gıda sektöründe, %15'inin hayvan yemi sektöründe, %56'sının ise genel teknik alanlarda kullanıldığı görülmektedir (Kirk vd., 2002; Schallmey vd., 2004).

Sıcaklık, endüstri için temel unsurlardan biridir. Enzimlerin ise doğal biyokatalizörler olarak en bilinen dezavantajları yüksek sıcaklıklarda üç boyutlu yapılarının bozunması, dolayısıyla da aktivitelerini kaybetmeleridir. Ancak bazı mikroorganizmaların yüksek sıcaklıklarda yaşayabilmesi; bu sistemlerde bulunan enzim bileşenlerinin bu sıcaklıklarda dahi yapılarını korumaları ve böylelikle aktivite

gösterebilmelerinden kaynaklanır. Termofilik bakteriler, bu türden, sıcaklığa dayanıklı enzimleri içeren organizmalardır. Bu nedenle de endüstriyel amaçlar için kullanılabilecek potansiyel enzim kaynaklarını oluştururlar (Faiz, 2005).

Farklı endüstriyel süreçlerde kullanım alanı bulan başlıca enzimler, proteolitik enzimler, amilolitik enzimler, selülozlar, pektolitik enzimler, galaktozidazlar ve glukoz izomeraz (GI) olarak sıralanabilir.

GI olarak bilinen D-glukoz/ksiloz izomeraz (EC 5.3.1.5.), proteaz ve amilaz ile birlikte dünya enzim endüstrisinin en yüksek tonajlı üç enziminden biridir (Bhosale vd., 1996). Bu enzim; D-glukozun D-fruktoza, D-ksilozun da D-ksiluloza dönüşümlü izomerizasyonunu katalizler (Belfaquih ve Penninckx, 2000).

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

Bu çalışmanın amacı, endüstriyel öneme sahip GI enziminin *Geobacillus thermodenitrificans* TH2 suşundan izole edilip, saflaştırılması ve karakterize edilmesi ile endüstriyel kullanıma uygun ve daha üstün özelliklere sahip mikrobiyal kaynakların ortaya çıkarılmasıdır.

1.2. Endüstriyel Enzim Kaynağı Olarak Mikrobiyal Kaynakların Tercih Edilmesi

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikrobiyal kaynaklıdır. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel ve hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün

oluşturmamaları, daha kararlı ve ucuz olmaları, fazla miktarda üretilibilmeleridir (Wiseman, 1987). Ayrıca mikroorganizmalar bitki ve hayvanlara göre daha kolay genetik değişimlere tabii tutulabilirler. Endüstriyel öneme sahip birçok enzim, mikroorganizmalar tarafından hücre dışına salınır. Böylece enzim elde etmek için hücrenin parçalanmasına da gerek kalmaz (Walsh, 2002).

1.2.1. Termofilik Mikroorganizmalardan Elde Edilen Enzimler

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

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

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

Termofilik mikroorganizmalar yüksek büyüme oranları ve minimum kontaminasyon şansları sebebiyle endüstriyel açıdan çok önemlidirler. Bu organizmalardan elde edilen enzimlerin yüksek sıcaklık toleransı onları endüstriyel uygulamalar için cazip hala getirir. Ayrıca hücre dışı termozimler genellikle daha kararlı ve daha kolay saflaştırılabilir olmaları gibi özellikleri sebebiyle hücre içi enzimlere göre daha ilgi

çekicidirler. Çünkü bu özellikleri hücre dışı enzimlerin üretim maliyetlerini azaltır (Eveleigh, 1979).

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

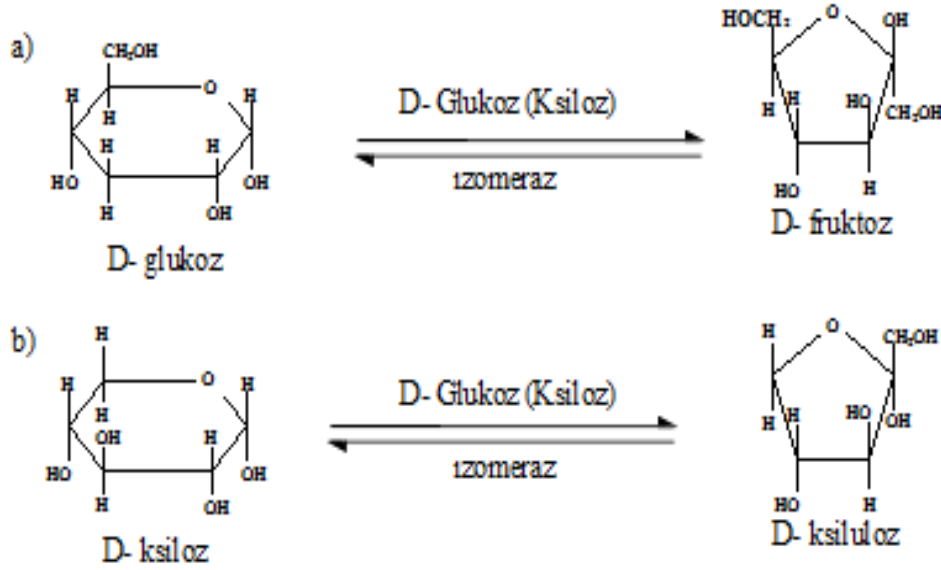
Enzimlerin endüstriyel kullanımlarını sınırlayan en önemli durum, yüksek sıcaklıklarda denatüre olmalarıdır. Termal denatürasyon iki şekilde açıklanabilir. İlki; düşük sıcaklıklarda proteinin katlanmış formu ile katlanmamış formu arasındaki dengenin katlanmış form yönüne kaymasıdır. İkincisi ise; yüksek sıcaklıklarda dönüşümsüz çökelmelerin ve kovalent değişimlerin olmasıdır. Termofilik mikroorganizmalar, yüksek sıcaklıklarda proteinlerin aktif konformasyonlarını sürdürerek bu problemin üstesinden gelirler. Yine de, enzimlerin termal kararlılık mekanizmalarının tam olarak belirlenmesi zordur. Çünkü bu mekanizmalar oldukça karmaşık ve fazladır (Arnold, 2001).

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

1.3. Glukoz İzomeraz

Glukoz izomeraz (GI) olarak da bilinen D-glukoz/D-ksiloz izomeraz (EC 5.3.1.5) , büyümeleri için ksilozu kullanan bakterilerde bulunan intrasellüler bir enzimdir (Chen,

1980). GI, *in vivo* koşullarda, D-ksilozun, D-ksiluloza ve *in vitro* koşullarda D-glukozun, D-fruktoza izomerizasyonunu katalizler (Çolak vd., 2011) (Şekil 1). Bu enzim çoğunlukla bakterilerden izole edilmekle beraber, bitkilerden ve mantarlardan izole edilmiş GI'lara da rastlamak mümkündür (Banerjee vd., 1994; Kristo vd., 1996; Harhangi vd., 2003).



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

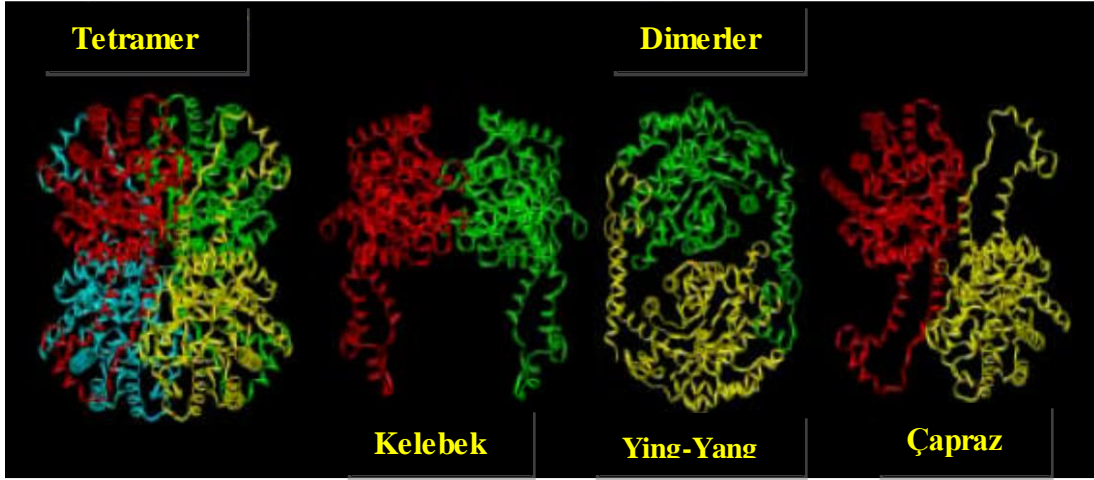
1957 yılında Marshall ve Kooi tarafından *Pseudomonas hydrophila*'dan izole edilen enzimin, glukozun izomerizasyonuna neden olduğunun keşfedilmesi sonrasında, şeker kamışından tatlandırıcı üretimi yerine, HFCS üretimi için bu enzimden yararlanılmaya başlanılmıştır (Marshall ve Kooi, 1957). Enzimin ilgisinin ksiloza, glukozdan 160 kat daha fazla olmasına rağmen, sahip olduğu kapasite enzimin ticari olarak önemli olmasına yetmiştir. Enzim üretimi için mikrobiyal büyüme ortamında ksiloza ihtiyaç duyulmuş, arsenatın varlığı ise enzim üretimini arttırmıştır (Chaing vd., 1981).

1.3.1. GI'n Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması

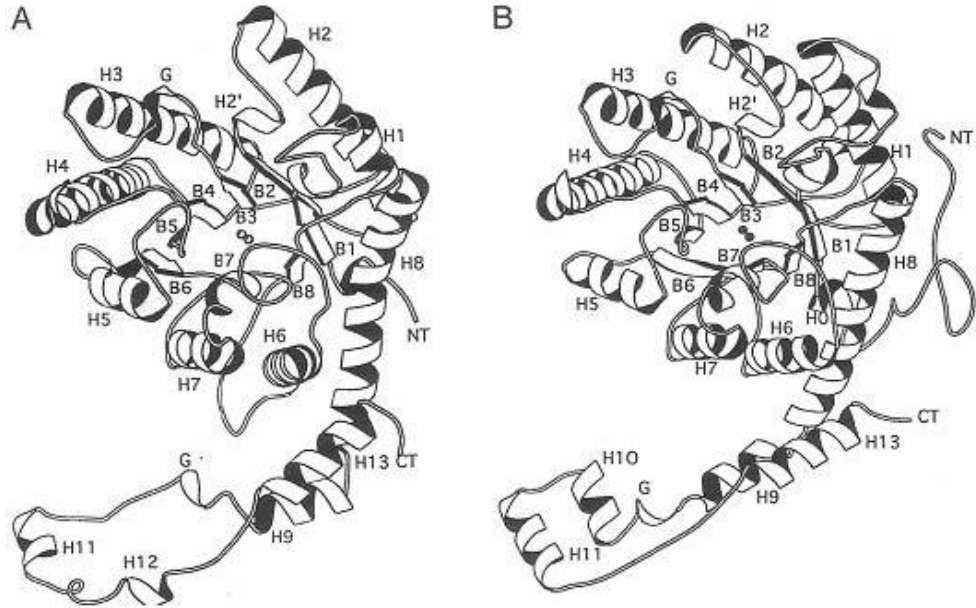
GI, yüksek sıcaklıklarda kararlı olup aktivitesi için NAD^+ ve ATP gibi pahalı kofaktörler gerektirmeyen bir enzimdir. Enzim, özellikle Mg^{2+} , Co^{2+} ve Mn^{2+} katyonlarının varlığında kararlı ve aktiftir. D-ksilozun izomerizasyonunda Mn^{2+} daha etkili iken, D-glukozun izomerizasyonunda Co^{2+} 'nin daha etkili olduğu, Mg^{2+} 'nin ise her iki izomerizasyonda da etkin olduğu gözlenmiştir. Ayrıca GI'nin Cu^{2+} tarafından güçlü; Ni^{2+} , Fe^{2+} ve Ca^{2+} tarafından ise zayıf olarak inhibe edildiği belirlenmiştir (Sripapundh vd., 2000).

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

GI'nin molekül kütlesi saflaştırıldığı mikroorganizmaya göre 52 kDa ile 191 kDa arasında değişmektedir (Chen, 1980). GI'nin alt ünitelerinin yapısı ve aminoasit dizilimi, enzimin 45-50 kDa'luk özdeş alt birimlerden oluşan bir tetramer veya dimer şeklinde olduğunu gösterir. Alt birimler birbirlerine kovalent olmayan etkileşimlerle bağlıdır ve aralarında disülfür köprüleri bulunmamaktadır. Ayrıca, *Bacillus* sp. hücre dışı GI'ı gibi trimer olarak belirlenen GI'lar da mevcuttur (Bhosale vd., 1996). Her bir alt birim, katalitik bölge, metal bağlanma bölgesi ve C- ucu sarmal bölgesini içeren $(\alpha/\beta)_8$ - silindir bölgelerinden oluşmaktadır (Hartley vd., 2000). Tetramer yapıyı, bir A- B/B*-A* simetrisi olarak gösterilebilen iki özdeş dimer oluşturmaktadır (Şekil 2). Şekil 2'de üç teorik dimer yapıları gösterilmiştir. Bunlardan en kararlı olan Ying-Yang (B- B*) dimeridir. Ancak, o da aktif bölge çevresindeki etkileşimlerden yoksundur. Kelebek dimeri, bu etkileşimleri de içermektedir (Hartley vd., 2000).



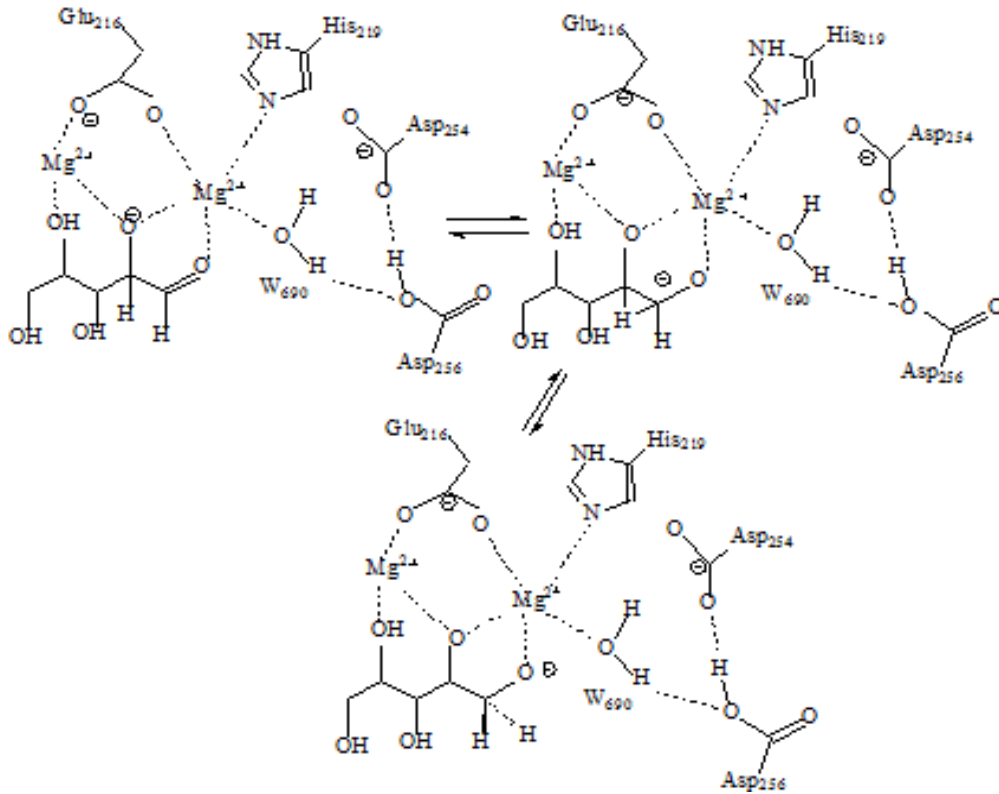
Şekil 2. GI'n alt birim yapısı (Tetramer ve Kuramsal Dimer Yapılanışı)
Kırmızı=Altbirim A, Yeşil=Altbirim B*, Mavi=Altbirim A*, Sarı=Altbirim B
(Vieille ve Zeikus, 2001)



Şekil 3. Sınıf I ve Sınıf II GI'ların yapıları. (A). *Arthrobacter* Sınıf I GI, (B). *T. thermosulfurogenes* Sınıf II GI, H = α -helices, NT = N- ucu, G = 3/10 helices, CT=C- ucu, B = β -kıyı (Hartley ve ark., 2000).

1.3.2. GI'n Reaksiyon Mekanizması

GI ile yapılan ilk çalışmalarda, enzimin şeker fosfat izomerazlara benzer bir fonksiyonu olduğu düşünülüp, bir endiol mekanizması ile reaksiyonları katalizlediği sanılmaktaydı (Rose vd., 1969). Ancak, daha sonra iki enzimin birbirinden çok farklı olduğu saptandı. Fosfat izomerazları aktiviteleri için herhangi bir metal kofaktöre ihtiyaç duymazlarken, GI aktivitesi için iki metal kofaktör gerekmektedir. Ayrıca GI, katalitik bölgesinde endiol mekanizması için gerekli olan uygun bir baz içermemektedir (Collyer ve Blow, 1990). Sonraki yıllarda yapılan çalışmalar, GI'nin etki mekanizmasının hidrojen kayma mekanizmasına dayandığını ve etki mekanizmasının temelini substrattaki halkanın açılması, C-2'den C-1'e hidrojen kayması ve halkanın tekrar kapanarak ürünün meydana gelmesinin oluşturduğunu göstermiştir (Alagöz, 2007).



Şekil 4. Hidrojen kayması mekanizması

1.3.3. GI İçin Aktif Bölge Çalışmaları

GI'nın aktif bölgesi ve bu bölgeyi çevreleyen kısımlardaki amino asit dizilimi X-ışını kristallografisi ile belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar, özellikle histidin ve karboksilat gruplarının aktif bölgedeki gerekliliğini ortaya çıkarmıştır (Callens vd., 1988; Gaikwad vd., 1988; Ghatge ve Deshpande, 1993). Enzimin, ksiloz ve glukoz için tek bir aktif bölgeye sahip olduğu ile ilgili çalışmalar yapılmış olmasına rağmen (Keleti vd., 1987), bu substratlar için enzimin iki farklı aktif bölgeye sahip olup olmadığı kesin olarak bilinmemektedir (Karaoğlu, 2004).

1.3.4. GI'nın Metal İyonu Gereksinimi ve İnhibitörler

GI'nın, kararlılığı ve aktivitesi için Mg^{2+} , Mn^{2+} ve Co^{2+} gibi bivalent katyonlara veya bunların değişik kombinasyonlardaki kullanımına ihtiyaç duyduğu uzun zamandır bilinmektedir. Co^{2+} ve Mg^{2+} aktivite için zorunlu olmakla birlikte fonksiyonları farklılıklar gösterir. Mg^{2+} , Co^{2+} göre daha etkin bir aktivatörken, Co^{2+} enzimin kuaterner yapısının korunmasını sağlayarak enzimin kararlı hale gelmesinden sorumludur (Bhosale vd., 1996).

GI'nın katalitik aktivitesi Ag^+ , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} ve Ca^{2+} iyonları tarafından değişik oranlarda inhibe edilmektedir (Bhosale vd., 1996).

1.3.5. GI'nın Substrat Özgünlüğü

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

Değişik mikroorganizmalarda immobilize halde ya da çözülmüş formda bulunan GI'ların, D-glukozu D-fruktoza dönüştürme oranı %26-59'dur. Enzimin K_m değeri

D-glukoz için 0,249 mM ile 5800 mM, D-ksiloz için ise 0,076 mM ile 89,4 mM arasında dağılım gösterir (Chen, 1980).

1.3.6. GI'nin Optimum Sıcaklık ve pH'sı

GI'nin optimum sıcaklığı çeşitli organizmalarda 60 °C ile 80 °C arasında farklılık gösterir ve bu değer Co^{+2} varlığında artar (Yanmış, 2008).

Optimum pH ise genellikle pH 7,0-9,0 arasında olmakla beraber daha asidik optimum pH değerlerine sahip GI'larda bilinmektedir. Örneğin, *Lactobacillus brevis*'ten izole edilen GI için optimum pH 6,0 iken, *Thermus aquaticus*'ten elde edilen GI için optimum pH 5,5 olarak belirlenmiştir ve bu durum endüstriyel uygulamalar için istenilen bir özelliktir.

1.4. GI Üreten Mikroorganizmalar

Endüstriyel uygulamalar için gerekli olan enzim miktarı oldukça fazladır. Bu nedenle, biyolojik sistemlerden izole edilen bir enzimin endüstriyel işlemlerde kullanılabilmesi için, ihtiyaç duyulan enzimin, nasıl ve hangi kaynaktan elde edileceği verilecek ilk ve belki de en önemli karardır. Bu kaynakların ticari olarak kullanılabilmesi, maliyetleri ve elde edilebilme kolaylığı gibi faktörlere ve biraz da toplumda kabul görmelerine bağlıdır (Faiz, 2005).

Endüstriyel açıdan taşıdığı önem sebebiyle yeni GI'ların geliştirilmesi için çeşitli çalışmalar yapılmış ve enzimin indüksiyonu, kararlılığı ve saflaştırılması üzerine odaklanılmıştır (Quax, 1993).

GI, yaygın olarak prokaryotik mikroorganizmalarda bulunur (Tablo 1). *Pseudomonas hydrophila*'da bulunmasından sonra birçok bakteri türünde GI aktivitesi saptanmıştır. Heterolaktik asidik bakteriler arasında *Lactobacillus brevis*'ten elde edilen GI, düşük pH değerlerinde aktifken yüksek sıcaklıklarda kararlılığını kaybetmesi sebebiyle endüstriyel amaçlar için uygun değildir (Yamanaka, 1975).

GI'nin hücre dışına salgılanan bir enzim olduğuna yönelik çalışmalar çok yaygın değildir. Bununla beraber *Streptomyces glaucescens* (Weber, 1976) ve *Streptomyces flavogriseus* (Chen vd., 1979) türlerinden elde edilen enzimin hücre dışı olduğu

açıklanmıştır. *Streptomyces* spp. türlerinin yanı sıra *Bacillus* türleri de yüksek miktarlarda GI üretmektedirler. *Chainia* sp. (Srinivasan vd., 1983) ve alkalotermofilik bir tür olan *Bacillus* sp'den (Chauthaiwale ve Rao, 1994) elde edilen hücre dışı GI'lar, jel filtrasyon, iyon değişim kromatografisi ve preperatif poliakrilamid jel elektroforezi gibi yaygın saflaştırma teknikleri ile homojen bir şekilde saflaştırılmışlardır. *Candida utilis* (Wang vd., 1980) ve *Candida boidinii* (Vongsuvanlert ve Tani, 1988) gibi birkaç mayada ve *Aspergillus oryzae* (Kerstens-Hilderson vd.; 1982) gibi bir mantarda da GI'nın varlığı tespit edilmiştir.

GI tüm aerobik organizmalarda karşımıza çıkmakla beraber malt, arpa ve buğday tohumunda da GI varlığı bildirilmiştir (Bhole vd., 1996; Pubols vd., 1963). GI üreten ve ticari olarak önemli olan birkaç mikroorganizma Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 1. GI üreten bazı mikroorganizmalar

GI Üreten Bazı Mikroorganizmalar	
<i>Actinomyces olivocinereus</i>	<i>Paracolobacterium aerogenoides</i>
<i>Actinomyces phaeochromogenes</i>	<i>Pseudonocardia</i> spp.
<i>Actinoplanes missouriensis</i>	<i>Pseudomonas hydrophila</i>
<i>Aerobacter aerogenes</i>	<i>Sarcina</i> spp.
<i>Aerobacter cloacae</i>	<i>Staphylococcus bibila</i>
<i>Aerobacter levanicum</i>	<i>Staphylococcus flavovirens</i>
<i>Arthrobacter</i> spp.	<i>Staphylococcus echinatus</i>
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Streptococcus acromogenes</i>
<i>Bacillus megabacterium</i>	<i>Streptococcus phaeochromogenes</i>
<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Streptococcus fracliae</i>
<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>Streptococcus roseochromogenes</i>
<i>Birevibacterium incertum</i>	<i>Streptococcus olivaceus</i>
<i>Birevibacterium pentosoaminoacidium</i>	<i>Streptococcus californicus</i>
<i>Chainia</i> spp.	<i>Streptococcus venuceus</i>
<i>Corynebacterium</i> spp.	<i>Streptococcus virginial</i>
<i>Cortobacterium helvolum</i>	<i>Streptomyces olivochromogenes</i>
<i>Escherichia freundii</i>	<i>Streptomyces venezaelie</i>
<i>Escherichia intermedia</i>	<i>Streptomyces wedmorensis</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptomyces griseolus</i>
<i>Flavobacterium arborescens</i>	<i>Streptomyces glaucescens</i>
<i>Flavobacterium devorans</i>	<i>Streptomyces bikiniensis</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Streptomyces rubiginosus</i>
<i>Lactobacillus buchneri</i>	<i>Streptomyces achinatus</i>
<i>Lactobacillus fermenti</i>	<i>Streptomyces cinnamonensis</i>
<i>Lactobacillus mannitopoeus</i>	<i>Streptomyces fradiae</i>
<i>Lactobacillus gayonii</i>	<i>Streptomyces albus</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Streptomyces griseus</i>
<i>Lactobacillus lycopersici</i>	<i>Streptomyces hivers</i>
<i>Lactobacillus pentosus</i>	<i>Streptomyces matensis</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Streptomyces nivers</i>

Tablo 2. Endüstriyel öneme sahip GI'ları üreten bazı mikroorganizmalar ve ürünlerin ticari adları

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

1.5. Termofilik Bir Bakteri Olan *Geobacillus*'lar

Yeryüzü veya toprak basilleri anlamını taşıyan *Geobacillus* türü, şimdiye kadar sistematigi yapılmış 16 türü içermektedir. Toprakta, kaplıcalarda ve okyanuslarda yaygın olarak bulunan *Geobacillus*'lar 30-70 °C arasındaki sıcaklıklarda büyürler. Bu bakteri sınıfının üyeleri gram pozitif veya değişken olup, hücreleri çubuk şeklinde, hareketli, elips veya silindirik şekilde terminal veya subterminal spora sahiptir. Koloni morfolojileri ve büyüklüğü değişkendir. Türün % G+C içeriği, % 48,2-58 arasında değişmekte olup, başlıca yağ asitleri, iso-C_{15:0}, iso-C_{16:0} ve iso-C_{17:0}'dir.

Literatürde *Geobacillus* cinsiyle yapılan birçok enzim çalışması mevcut olup, gün geçtikçe çalışmaların sayıları artmaktadır. Bunlardan bazıları, D-amino asit aminotransferaz (Lee vd., 2006), ksiloz izomeraz (Faiz vd., 2011), α-glukozidaz (Cihan vd., 2011), ksilanaz (Wu vd., 2006), proteaz (Zhu vd., 2007), maltojenik amilaz (Kolcuoğlu vd., 2010), termoalkalofilik esteraz (Tekedar ve Mohamed, 2011), 1,3-özgün lipaz (Ebrahimpour vd., 2011) şeklinde sıralanabilir.

1.5.1. *Geobacillus thermodeinitrificans*

Fakültatif bir aerobik termofilik bakteri türü olan *Geobacillus thermodenitrificans* filogenetik olarak *Firmicutes* türü ile bağlantılıdır. Patojen olmayan bu bakteri sınıfının üyeleri kamçılı ve tek membranlıdır. İlk olarak Kuzey Çin'de, 2000 m derinlik ve 73 °C sıcaklıktaki Dagang petrol sahasından izole edilmişlerdir. Türün sadece jeotermal alanlarda değil aynı zamanda ılıman bölgelerde ve soğuk habitatlarda da çevresel adaptasyonunun

güçlü olduğu bilinmektedir. 45-73 °C (optimum 65 °C) sıcaklıklarda büyüyen *Geobacillus thermodenitrificans*'lar, oksijen ve nitrat solunumu yapabilme yeteğine sahiptirler (Feng vd., 2007).

Endüstrinin gerektirdiği şartlara uyum açısından ısı kararlı GI kullanımı ekonomik ve teknik açıdan oldukça ilgi çekicidir. Bu nedenle, ısı kararlı GI'lar üretebilen yeni mikroorganizmalar bulmak önemlidir. *Geobacillus thermodenitrificans* TH2 incelenmiş ve önemli bir GI kaynağı olduğu belirlenmiştir.

1.6. GI'nın Kullanım Alanları ve Endüstriyel Önemi

Genetik mühendisliği ve ileri biyokimya uygulamaları için yapı-fonksiyon ilişkisi açısından oldukça ilgi çeken bir enzim olan GI, akademik çalışmalar için kullanımının yanı sıra HFCS ve hemiselülozlardan etanol üretimi gibi endüstriyel amaçlar için de yaygın olarak kullanılır (Alagöz, 2007).

1.6.1. Etanol Üretimi

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

GI, glukoz ve ksilozun izomerizasyonunu katalizler. Enzimin bu özelliği, mayalar tarafından alkole fermente edilebilen ksilozun ksilozdan üretilmesi için kullanılır. Yenilenebilir biyokütlenin fermente olabildiği şekerlere ve sonrasında etanole biyolojik çevrimi, hızla tükenen fosil yakıtlar göz önüne alınırsa oldukça önemlidir. Biyoküteller, %40 selüloz, %30 hemiselüloz ve %30 lignin içermektedir. Biyokütellerden ekonomik olarak yararlanılabilmesi selüloz ve hemiselülozun glukoz ve ksiloza hidroliz olmasına, daha sonra da mayalar tarafından etanole fermentasyonuna bağlıdır. Selülozun biyolojik çevrimi ile ilgili yapılan çok sayıda çalışma, lignoselülozun biyolojik çevriminin hızlı ve verimli olduğunu göstermiştir. Zira artıkların değerlendirilmesi ve hemiselüloz içeren

biyokütlelerden en etkili şekilde yararlanabilmek için tüm dünyanın ilgisi hemiselülozun fermentasyonuna kaymaktadır (Wang vd., 1980). Ksilan, hemiselülozun ana birleşenidir ve ksiloz ünitelerinin β -(1,4) bağlanmasıyla oluşmaktadır. Ksilanın enzimatik veya asidik yöntemlerle kolayca hidroliz edilmesiyle D-ksiloz üniteleri açığa çıkmaktadır. *Saccharomyces cerevisiae* gibi bazı mayalar heksozların etanole fermentasyonu verimli şekilde sağlarlar, fakat D-ksilozu kullanamazlar. *Candida utilis*, *Candida shehatae*, *Pachysolen tannophilus* ve *Pichia stipitis* gibi bazı mayalar da oksidoredüktatif yollarla pentozlar üretebilirler. Ancak bu organizmaların fermentasyon oranları oldukça düşüktür. Ayrıca bu organizmaların oksijenli ortamda etanolü katabolize etmeleri ve düşük etanol toleransları ticari kullanımlarını sınırlamaktadır (Dupress vd., 1987). *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* ve *Candida tropicalis* gibi mayalar tarafından ksilozun etanole fermentasyon sürecinde ise ksiloz metabolik engel olarak görülmektedir. Bu nedenle GI'nin kullanılmasıyla ksilozun ksiluloza izomerizasyonu sağlanmakta ve daha sonra ksiluloz etanole fermente edilmektedir (Chaing vd., 1981). Bugün bilimsel araştırmalar, KI (GI) geninin mayalara aktarılması ile ksilozun alkole kendiliğinden fermentasyonunun sağlanması çalışmaları üzerine yoğunlaşmaktadır.

1.6.2. HFCS Üretimi

Saf şekere talebin artması, üretim maliyetinin yüksek olması ve insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkisinin farkına varılmasıyla birlikte sukrozun yerine kullanılabilecek başka kaynaklar araştırılması zorunlu hale gelmiştir. Kalorisiz ve karbohidrat içermeyen sakkarin, siklamat, asesülfam-K, aspartam ve taumatin gibi yapay tatlandırıcılar bulunmakla birlikte, bu ürünlerin kullanımı, sağlıkla ilgili temel problemlerin yaşanmasına neden olmaları sebebiyle sınırlandırılmıştır. Alkolsüz içeceklerin depolanma süresini arttırmak için kullanılan aspartam, düşük pH'da yavaş hidroliz olduğundan dolayı içeceklerin tatlılık oranını düşürmektedir. Protein yapısında bir tatlandırıcı olan taumatin, sukrozdan 2000 kez daha tatlıdır ancak hoş olmayan bir tat verir. Sakkarinin ise epitelyum dokuda yapısal değişikliklere neden olduğu ve hamilelerde bebeğe geçip biriktiği belirlenmiştir. Son yıllarda çok sık kullanılan aspartamın aşırı tüketiminin beyin hasarı ve tümörlerine neden olduğu klinik çalışmalarla ortaya konulmuştur. Bir diğer yapay tatlandırıcı olan siklamatin fazla kullanımını ise ishale neden olmaktadır (Faiz, 2004).

HFCS, glukoz ve fruktozun dengede olduğu, tamamen tatsız olan nişastadan elde edilen bir tatlandırıcıdır. Meşrubat ve diğer pek çok gıda ürününde şeker kamışı yerine kullanılabilen bir tatlandırıcıdır. Sukrozdan 1,3 kez, glukozdan ise 1,7 kez daha tatlıdır. Glukozun tatlandırma kapasitesi sukrozun %70-75'i kadarken, fruktozun tatlandırma kapasitesi sukrozun yaklaşık iki katıdır (Barker, 1976).

Fruktoz, sukrozdan daha tatlı olması yanında tadı, rengi, viskoziteyi ve higroskopik özellikleri geliştirebilme yeteneğine sahiptir. Ayrıca metabolizmada glukozu göre daha yavaş emilir ve insülin müdahalesi olmaksızın metabolize edilir. Tüm bu özellikleri sebebiyle glukozun fruktoza izomerizasyonu endüstriyel açıdan çok önemlidir ve izomerizasyon prosesi yaygın olarak serbest ya da immobilize GI üzerinde çalışılmıştır.

HFCS, benzer tatlandırıcı ürünlere göre bir takım avantajlara sahiptir. Tatlandırma güçleri dikkate alınarak yapılan bir karşılaştırmaya bakacak olursak HFCS sukrozdan %10-20 daha ucuzdur ve fruktozun emiliminin yavaş olması sebebiyle daha az kalorilidir. HFCS'nin teknik bir avantajı da, glukoz ve fruktozun sukroz ile kıyaslandığında daha iyi bir çözünürlüğe sahip oluşudur. Dolayısıyla da kullanıldığı gıda ürünlerinde kristallenmeye daha az eğilimlidir. Bu durum HFCS'nin şekerleme, reçel, dondurma, konserve ürünleri, fırıncılık, turşu ve birçok yiyecek ürünü üretiminde kullanımına yol açmıştır (Misset vd., 1991).

İçeceklerde HFCS'nin yüksek tüketim oranı, birçok beslenme araştırmacısını HFCS ile tatlandırılmış ürün tüketimi ile obezite, diyabet veya benzer diğer kronik hastalıklar arasındaki olası ilişki üzerine odaklamıştır (Basciano vd., 2005; Bray vd., 2004). Son zamanlarda, gazlı içeceklerdeki HFCS'nin toksik ve kanserojen özellikli reaktif α -dikarbonil bileşiklerinin ana kaynağı olduğuna dair araştırmalar yapılmıştır. Ayrıca aynı araştırma ile tüketim ürünlerindeki reaktif α -dikarbonil bileşiklerinin konsantrasyonunun HFCS'nin saklama koşullarına ve üretildiği kaynağın farklılığına göre önemli ölçüde değiştiği bildirilmiştir (Lo vd., 2008). Aksine bazı çalışmalara göre ise HFCS ile tatlandırılmış ürünler obezite için önemli bir sebep değildir (Janket vd., 2003; Sun ve Empie, 2007).

1.6.3. Kimyasal İzomerizasyona Karşı Enzimatik İzomerizasyon

Glukozun fruktoza kimyasal izomerizasyonu uzun zamandır bilinen bir reaksiyon olup Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein transformasyonu olarak bilinen bir grup reaksiyondan oluşmaktadır. Bu reaksiyonlar genellikle yüksek sıcaklık ve pH değerlerinde meydana gelmektedirler. Fruktozu glukozdan üretme ihtimali Barker ve Somers (1983) tarafından çalışılmıştır. Fakat bu reaksiyon spesifik değildir ve psikoz gibi metabolik olmayan şekerler yanı sıra istenmeyen bazı farklı renkli ürünlerin oluşmasıyla sonuçlanır. Bu metodu kullanarak, fruktoz içeriğini %40'ın üzerinde tutmak çok zordur. Üstelik kimyasal olarak üretilen fruktoz lezzet bakımından düşük ve az tatlılığa sahiptir ki bu durum kolay bir şekilde düzeltilememekle birlikte kimyasal olarak üretilen fruktozun ticari olarak kullanılmasına da bir engel oluşturur. Öte yandan, fruktozun glukozdan enzimatik olarak elde edilmesinin reaksiyon spesifikliği, pH ve sıcaklık şartlarının ayarlanabilirliği ve yan ürün oluşmaması gibi bir takım avantajları bulunmaktadır. Bu nedenlerden dolayı, fruktozun glukozu enzimatik izomerizasyonu kimyasal izomerizasyonuna tercih edilmektedir (Karaoğlu, 2004).

1.7. Çalışmanın Amacı ve Pratik Önemi

Spesifik olmaları, yüksek verim, yan ürünlerin oluşmaması, reaksiyon ürünlerin canlı sistemler üzerinde toksik etkisinin bulunmayışı, biyoyumlu ve biyobozunur oluşları sebebiyle biyoteknolojik yöntemler gün geçtikçe artan bir şekilde kimyasal yöntemlere tercih edilir hale gelmiş ve özellikle enzimlerin kullanımının artması sonucunu doğurmuştur. Biyokatalizörler olarak enzimler oldukça spesifikler ve sadece tek bir stereospesifik ürün oluşturmak üzere reaksiyonların, katalizlenmemiş karşıtlarına göre çok daha hızlı gerçekleşmesini sağlar.

Enzimlerin kullanımıyla istenilen ürünlerin, yüksek saflık ve verimle, kimyasal yöntemlere göre çok daha kısa sürelerde sentezlenmesi mümkün olabilmektedir. Dolayısıyla ekonomik açıdan da değerlendirildiklerinde kimyasal yöntemlere göre enzimlerin sayısız avantajları vardır. Tüm bunlara ilaveten kimyasal yöntemlerden farklı olarak enzim katalizli reaksiyonlar daha ılımlı şartlarda (oda sıcaklığı ve basıncı, fizyolojik pH vb.) gerçekleşebilir. Böylelikle büyük oranda enerji tasarrufu ve ekonomi sağlanmış olur. Bu özelliklerinden dolayı artık günlük hayatımızda kullandığımız pek

çok üründe ve bu ürünlerin üretim aşamalarında enzimler önemli bir yer tutmaktadırlar (Faiz, 2008).

Termofilik organizmalar üzerinde yapılan çalışmalarla sıcaklığa dirençli yeni proteinlerin keşfedilmesini sağlamıştır. Bu proteinlerin yüksek sıcaklıklarda kararlılık göstermeleri, aktif olmaları ve hatta yüksek basınçlarda bile termal kararlılıklarını devam ettirebilmeleri endüstriyel açıdan bu tür enzimleri cazip kılmaktadır. Gıdadan temizlik, kozmetik, ilaç ve tekstil endüstrisine kadar birçok alanda oldukça fazla kullanım payına sahip olan enzimlerin bu alanlarda uygulanmasıyla hem daha düşük maliyetlerde, yüksek saflıkta ve bol miktarda ürün eldesi gerçekleşir ve hem de çevre kirliliğine neden olan atık ürünlerin miktarı oldukça azaltılmış olur (Faiz, 2005).

GI enziminin termofilik bakterilerden izole edilip, saflaştırılması ve ileri derecede karakterize edilmesi endüstriyel alanlarda kullanılabilecek gelişmiş ve uygun özelliklere sahip bir enzimin mikrobiyal kaynaklardan üretilmesini mümkün kılacaktır. Ayrıca enzimin optimum şartlarının belirlenmesi ve detaylı karakterizasyon çalışmaları ile yeni ve geniş bir kararlılık aralığına ve özelliklere sahip bir GI üretilebilecektir.

Bu çalışmanın amacı, endüstriyel öneme sahip GI enziminin *Geobacillus thermodenitrificans* TH2 suşundan izole edilip, saflaştırılması ve karakterize edilmesi ile endüstride kullanıma uygun ve daha üstün özelliklere sahip mikrobiyal kaynakların ortaya çıkarılmasıdır. Karakterizasyon çalışmaları süresince, optimum pH ve sıcaklık, pH ve ısı kararlılık, aktivite üzerindeki metal iyonu etkisi, substrat ve protein konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisi gibi bazı parametrelerin incelenmesi için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Böylelikle kullanılan termofilik bakterinin GI enzimi için endüstriyel işlemlerde ya da diğer alanlardaki uygulamalarda uygun bir kaynak olup olmadığı ortaya konabilecek ve yeni bir enzim, kinetik özellikleriyle birlikte endüstriye ve/veya literatüre kazandırılacaktır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Materyaller

2.1.1. Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Firma	Model
UV-Vis Spektrofotometre	Perkin Elmer	Lambda 25
Protein Elektroforezi	Owl Separation Systems	P8DS
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Zentrifugen	Rotina 35 R
Mikrosantrifüj	Sigma	1-14
Saf Su Cihazı	Sartorius	Arium 611UV
Jel Görüntüleme Sistemi	Kodak	Gel Logic 200 Imaging System
Mikrotüpler İçin Termal Sallayıcı	Boeco	TS-100 Thermo Shaker
pH Metre	InoLab	WTW pH 720
Sonikatör	Bandelin	Sonopuls HD3100
Hava Banyolu Çalkalayıcı	Barnstead/Lab-Line	MaxQ Mini 4450 Shaker
Vorteks	Thermolyne	Type 37600 Mixer
Buzdolabı	Profilo	BD4303ANFE
Terazi	Ohaus	Pioneer
Isıtıcı/Magnetik Karıştırıcı	HS31	Chiltren
Otoklav	Tomy	SX-700E
Güç Kaynağı	Thermo	EC 1000XL
Degaz Pompası	Vacuubrand	2C
Kollektör	Retriever	500
UV Dedektör	Retriever	UA-6
Peristaltik Pompa	Tris	--
Ultra Low Temperature Freezer	New Brunswick Scientific	U410
Steril Kabin	JSR	JSCB-1200SB

2.1.2. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler

Bovine serum albumin (BSA) , D-Glukoz, D-Fruktoz, Sodyum dodesil sülfat (SDS), nitrilotriasetik asit, Tetrametiletildiamin (TEMED), Karbozol, Gliserol, Sodyum molibdat dihidrat, Çinko sülfat monohidrat, Borik asit, Kalsiyum sülfat dihidrat, Magnezyum sülfat heptahidrat ve Q-Sepharose fast flow kimyasalları Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, USA) ; Sodyum asetat, Dipotasyum hidrojen fosfat, Potasyum dihidrojen fosfat, Sodyum hidroksit, Bakır (II) sülfat pentahidrat, Merkaptoetanol, Hidrojen klorür, Etanol, Tris, Glisin, Na⁺, Li⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Co²⁺ ve Ca²⁺ iyonlarının klorür tuzları, Etanol, Bakto tripton, Mangan sülfat monohidrat, Sodyum karbonat, Perklorik asit, Disodyum hidrojenfosfat dodeka hidrat ve Bromofenol mavisi kimyasalları Merck A.G. (Darmstadt, Germany) ; Akrilamid, Coomassie Brilliant Blue R-250 ve Amonyumpersulfat (APS) kimyasalları Fluka, Maya ekstreği Lab M , Sisteinhidroklorür ve MOPS kimyasalları AppliChem., Sülfürik asit Riedel-deHaen ve Asetonitril kimyasalı Carlo Erba Reagent , Amicon Ultracell Membrane 50.000 MWCO Millipore firmalarından temin edilmiştir. SDS-PAGE’inde kullanılan protein standartı ise SM0431 katalog numarası ile Fermentas firmasından temin edilmiştir.

2.1.3. Kullanılan Mikroorganizma

Çalışmada kullanılan termofilik mikroorganizma (*Geobacillus thermodenitrificans* TH2) Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü araştırmacılarının (Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ ve araştırma grubu) kültür stoklarından temin edildi. Çalışılan mikroorganizma, adı geçen araştırma grubu tarafından Aydın ili, Çamköy Çamur İlcasi’ndan izole edilmiş ve çeşitli morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlerle sistematigi yapılmış olup, 16S rRNA analizleri ile yeni bir *Geobacillus thermodenitrificans* suşu olduğu ortaya kondu.

2.1.4. Mineralli Sıvı Besiyerinin Hazırlanması

2,5 g maya ekstraktı, 2,5 g bakto tripton, 1,0 g nitrilotriasetik asit, 0,4 gr kalsiyum sülfat dihidrat, 2,0 g magnezyum sülfat heptahidrat, 15 mL 0,2 M Na₂HPO₄.12H₂O, 10 mL

0,2 M KH_2PO_4 , 0,5 mL 0,01 M demir (III) sitrat pentahidrat ve 5 mL eser element çözeltisi yaklaşık 900 mL saf suda çözüldükten sonra ortam pH'sı 1 N NaOH ile 7,5'a ayarlandı. Daha sonra çözeltinin hacmi 1000 mL'ye tamamlanarak 121 °C'de ve 1 atm basınç altında 20 dakika steril edildi.

Eser element çözeltisi 0,22 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,05 g $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,05 g H_3BO_3 , 2,5 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2,5 mg $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 0,46 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ saf suda çözülüp hacmi saf su ile 1000 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.

2.1.5. Kullanılan Tamponlar ve Çözeltiler

2.1.5.1. Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Protein tayininde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. Protein tayininde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları

Çözelti Adı	Çözeltinin Hazırlanışı
Lowry A Çözeltisi (0,1 N NaOH içinde % 2 (w/v) Na_2CO_3)	0,4 g NaOH ve 2,0 g Na_2CO_3 saf su ile çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
Lowry B Çözeltisi (% 1 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi)	1,0 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ saf su ile çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
Lowry C Çözeltisi (% 2 Na-K tartarat çözeltisi)	2,0 g Na-K tartarat saf su ile çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
Lowry D Çözeltisi	1 kısım Lowry B ve 1 kısım Lowry C karıştırılarak hazırlandı.
Lowry E Çözeltisi	0,25 mL Lowry D ile 25 mL Lowry A karıştırılarak hazırlandı.
Sığır Serum Albümin (BSA) Çözeltisi (1 mg/mL)	5,0 mg BSA saf su ile çözülüp hacmi 5 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
0,1 N NaOH içinde % 0,1 (w/v) SDS Çözeltisi	0,4 g NaOH ve 0,1 g SDS saf su ile çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.

2.1.5.2. Protein Elektroförezinde Kullanılan Çözeltiler

Protein elektroförezinde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 5. Protein elektroförezinde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları

Çözelti Adı	Çözeltinin Hazırlanışı
Ayırma Jeli Tamponu (1,5 M Tris- HCl)	5,42 g Tris 200 mL saf suda çözüldü, pH'sı 8,8' e ayarlanarak, hacmi 250 mL'ye tamamlandı ve 4°C'de saklandı.
Yığıma Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl)	0,28 g Tris 200 mL saf suda çözüldü, pH'sı 6,8'e ayarlanarak, hacmi 250 mL'ye tamamlandı ve 4°C'de saklandı.
SDS Çözeltisi (%10)	10 g SDS saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
Amonyum Persülfat (APS) Çözeltisi (%10)	1g APS saf suda çözülüp hacmi 10 mL'ye tamamlandı ve hazırlanan çözelti -20 °C'de saklandı.
N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin (TEMED)	Orijinal şişesinden kullanıldı.
Gliserol Çözeltisi (%80)	80 mL gliserolün hacminin saf su ile 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
Akrilamid/Bisakrilamid Çözeltisi (%30)	29,2 g akrilamid ve 0,8 g N,N'-metilen bisakrilamid saf suda çözülüp hacim 100 mL'ye tamamlandı ve 4°C'de saklandı.
Bromofenol Mavisi (%0,1)	10 mg bromofenol mavisi saf suda çözüldü ve hacmi 10 mL'ye tamamlandı.
SDS-PAGE Yükleme Çözeltisi	150 µL 1M Tris-HCl (pH 6,8), 400 µL %10 SDS, 100 µL %0,1 bromofenol mavisi, 250 µL %80 gliserol ve 60 µL β-merkaptöetanol'ün karıştırılmasıyla hazırlandı ve küçük kısımlara ayrılarak -20°C'de saklandı.

Tablo 5'in devamı

SDS-PAGE Yürütme Tamponu	7,2 g Tris ve 1,5 g glisin yaklaşık 480 mL saf suda çözüldükten sonra üzerine 10 mL SDS (%10) çözeltisi eklendi. pH 8,3'e ayarlandı ve çözelti hacmi 500 mL'ye tamamlandı.
Doğal PAGE Yükleme Çözeltisi	150 µL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 100 µL %0,1 bromofenol mavisi, 250 µL %80 gliserol ve 460 µL saf suyun karıştırılması ile hazırlandı ve küçük kısımlara ayrılarak -20 °C'de saklandı
Doğal PAGE Yürütme Tamponu	7,2 g Tris ve 1,5 g glisin yaklaşık 490 mL saf suda çözüldükten sonra pH 8,3'e ayarlandı ve çözeltinin hacmi 500 mL'ye tamamlandı.
Jel Boyama Çözeltisi	1 g Coomassie Brilliant Blue-R250'nin 62,5 mL glasiyal asetik asit ve 93,5 mL metanol içinde çözülmesi ile hazırlandı.
Boya Uzaklaştırma Çözeltisi	100 mL glasiyal asetik asit, 400 mL metanol ve 600 mL saf suyun karıştırılmasıyla hazırlandı.

2.1.5.3. Tampon Çözeltiler

Çalışmalarda kullanılan tampon çözeltiler ve hazırlanışları Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Kullanılan tampon çözeltiler ve hazırlanışları

Çözelti Adı	Çözeltinin Hazırlanışı
Asetat Tamponu (50mM, pH 4,0)	0,34 g sodyum asetat trihidrat yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı, 1 N Asetik Asit ile 4,0'a ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
Asetat Tamponu (50mM, pH 4,5)	0,34 g sodyum asetat trihidrat yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı, 1 N Asetik Asit ile 4,5'e ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
Asetat Tamponu (50mM, pH 5,0)	0,34 g sodyum asetat trihidrat yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı, 1 N Asetik Asit ile 5,0'a ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı

Tablo 6'nın devamı

Asetat Tamponu (50mM, pH 5,5)	0,34g sodyum asetat trihidrat yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı, 1 N Asetik Asit ile 5,5'e ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı
MOPS Tamponu (50mM, pH 6,0)	0,52 g MOPS yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı, 1 N NaOH ile 6,0'a ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
MOPS Tamponu (50mM, pH 6,5)	0,52 g MOPS yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı, 1 N NaOH ile 6,5'a ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
MOPS Tamponu (50mM, pH 7,0)	0,52 g MOPS yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı, 1 N NaOH ile 7,0'ye ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
MOPS Tamponu (50mM, pH 7,5)	0,52 g MOPS yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı, 1 N NaOH ile 7,5'e ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
Tris-HCl Tamponu (50mM, pH 8,0)	0,30 g Tris yaklaşık 45 mL saf suda çözülüp pH'sı, 1N HCl ile 8,0'a ayarlandı ve hacim 50 mL'ye tamamlandı.
Tris-HCl Tamponu (50mM, pH 8,5)	0,30 g Tris yaklaşık 45 mL saf suda çözülüp pH'sı, 1 N HCl ile 8,5'e ayarlandı ve hacim 50 mL'ye tamamlandı.
Tris-HCl Tamponu (50mM, pH 9,0)	0,30 g Tris yaklaşık 45 mL saf suda çözülüp pH'sı, 1 N HCl ile 9,0'a ayarlandı ve hacim 50 mL'ye tamamlandı.

2.1.5.4. Enzim Aktivitesi Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Enzim aktivitesi tayininde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7. Enzim aktivitesi tayininde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları

Çözelti Adı	Hazırlanışı
Glukoz Çözeltisi (2 M)	3,64 g glukoz reaksiyon tamponunda çözülüp hacim 10 mL’ye tamamlandı.
Karbozol (%0,12)	60 mg karbozol %96’lık etanolde çözülüp hacim 50 mL’ye tamamlandı.
Sistein Hidroklorür Çözeltisi (%1,5)	0,75 g sistein hidroklorür saf su ile çözülüp hacim 50 mL’ye tamamlandı.
Perklorikasit Çözeltisi (0,5M)	2,73 mL ticari perklorik asit alınıp son hacim saf suyla 50 mL’ye tamamlandı.
Sülfürik Asit Çözeltisi (%70)	36,5 mL %96’lık sülfürikasit alınıp son hacim saf su ile 50 mL’ye tamamlandı.

2.2. Deneysel Çalışmalar

2.2.1.GI Aktivitesinin Tayini

Ham enzim özütünde ve karakterizasyon çalışmalarında enzim aktivitesi, Belfaqui ve arkadaşları (2000) tarafından geliştirilmiş olan bir yöntemle spektrofotometrik olarak tayin edildi. Reaksiyon 5 µL enzim özütü kullanılarak, 100 mM Glukoz, 10 mM MgSO₄ ve 1 mM CoCl₂ içeren pH’sı 7,0 olan 50 mM MOPS tamponu içerisinde, son hacim 100 µL olacak şekilde 80 °C’deki 30 dk’lık inkübasyonla gerçekleştirildi. Inkübasyon süresi sonunda reaksiyon, 100 µL 0,5 M perklorik asit ilavesiyle durduruldu. Reaksiyon sonucunda açığa çıkan D-fruktoz miktarı Dishe ve arkadaşlarının (1951) geliştirmiş olduğu sistein-karbozol-sülfürik asit yöntemi ile belirlendi. Bu amaçla reaksiyon çözeltisi üzerine 40 µL %1,5’lik sistein hidroklorür ve 40 µL %0,12’lik karbozol ilave edildi. Karışım vortekslendikten sonra üzerine 1,2 mL %70’lik H₂SO₄ eklenerek tekrar vortekslendi. Oda

sıcaklığındaki 30 dk'lık inkübasyondan sonra ölçümler spektrofotometrede 560 nm dalga boyunda gerçekleştirildi. Reaksiyonda açığa çıkan fruktoz miktarı, hazırlanan fruktoz kalibrasyon eğrisine göre hesaplandı. Enzim aktivitesi reaksiyonlar sonucunda oluşan μmol göre hesaplandı ve bir enzim ünitesi dakikada oluşan μmol fruktoz miktarı olarak tanımlandı. Reaksiyonun gerçekleştirildiği tüm koşullar (reaksiyon sıcaklığı, reaksiyon pH'sı, substrat konsantrasyonu, enzim miktarı, metal iyonları derişimi) enzim karakterize edildikçe yeniden düzenlendi.

2.2.2. Ham Enzim Özütünün Hazırlanışı

Katı besiyerinden alınan bakteri, steril kabin içerisinde 10 mL mineralli besiyerine ekilerek 55 °C'deki hava banyolu çalkalayıcıda bir gece büyümeye bırakıldı. Elde edilen gece kültüründe O.D. ölçümü yapıldı ve bu kültürden 200 mL mineralli besiyerine O.D.'si 0,1 olacak şekilde tekrar ekim yapıldı. Kültür, O.D.'si 0,6-0,9 aralığına ulaşınca kadar 55 °C'deki hava banyolu çalkalayıcıda inkübe edildi. İstenilen O.D. değerine ulaşılmca, kültür son hacimde % 0,5 D-ksiloz içerecek şekilde % 20'lik D-ksiloz ile indüklendi ve 4-5 saat boyunca büyümeye bırakıldı. Büyütülen hücreler, 13.000 rpm'de 3 dk santrifüj edilerek çöktürüldü. Pellet 2 mL reaksiyon tamponu ile yıkanıp, 14.000 rpm'de 2 dk çöktürüldü ve süpernatant atıldı. Toplanan hücreler 5 mL reaksiyon tamponunda süspansiyeye edildikten sonra, %80 şiddetinde, 1 devirde 5 dakika boyunca sonikasyona maruz bırakılarak patlatıldı. Hücre özütünün 4 °C'de 10.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmesiyle elde edilen süpernatant, ham enzim özütü olarak kullanıldı. Ham özütte GI varlığından emin olabilmek için enzim aktivitesine bakıldı. GI aktivitesinden emin olunduktan sonra ham enzim özütünden protein konsantrasyonu ve spesifik aktiviteyi belirlemek, ayrıca, protein jel elektroforezinde kullanmak üzere, 500 μL 'lik bir kısım ayrılarak saflaştırma işlemlerine başlandı.

2.2.3. GI'nin Saflaştırılması

2.2.3.1. Isı Şoku Uygulaması

Elde edilen ham enzim özütü 15 dk süreyle 75 °C'de inkübe edilerek ısı şokuna maruz bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda denatüre olan proteinler, 14.000 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek çöktürüldü ve uzaklaştırıldı. Isı şoku sonrası enzimin aktivitesini koruduğundan emin olmak için süpernatantta tekrar GI aktivitesine bakıldı. GI aktivitesinin korunduğunun gözlenmesinden sonra, özüt için protein konsantrasyonu ile spesifik aktiviteyi belirlemek ve protein jel elektroforezinde kullanmak üzere 500 µL'lik bir kısım ayrılarak bir sonraki saflaştırma adımına geçildi.

2.2.3.2. Aseton Çöktürmesi

Isı şoku uygulamasından sonra ele geçen enzim özütü üzerine 1:1 oranında soğuk aseton yavaşça ilave edilerek karışım +4 °C'de yaklaşık 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda karışım +4 °C'de, 10.000 rpm'de 15 dk santrifüjlendi ve süpernatant atıldı. Pellet, aseton kalıntısının uzaklaşması için 1 gece +4 °C'de bekletildi. Elde edilen çökelti 5 mL reaksiyon tamponunda yeniden süspansiyon edildi. Aseton çöktürmesi sonrası enzimin aktivitesini koruduğundan emin olabilmek için özütte GI aktivitesine bakıldı. Aktivitenin korunduğunun gözlenmesinden sonra özüt için protein konsantrasyonu ile spesifik aktiviteyi belirlemek ve protein jel elektroforezinde kullanmak üzere 500 µL'lik bir kısım ayrılarak iyon değiştirme kromatografisi basamağına geçildi.

2.2.3.3. İyon Değişirme Kromatografisi

İyon değişim kromatografisi için 30 cm x 1,5 cm ebatlarında bir kolon ve kolon dolgu malzemesi olarak Q-Sepharose fast flow kullanıldı (Kongruang vd., 2002). Kolon dolgu malzemesi ve kullanılan tüm çözeltilerin gazının bir vakum pompası yardımıyla alınmasından sonra dolgu malzemesi pastör pipeti kullanılarak dikkatlice kolona paketlenildi. Paketleme işleminin ardından kolon, 250 mL 50 mM MOPS, pH 7,0 (10 mM MgSO₄ ve 1 mM CoCl₂ içerecek şekilde hazırlanmış) tamponunun geçirilmesi ile dengeye

getirildi. Sonra kolonun akış hızı 1 mL/dak olacak şekilde ayarlanıp ham enzim özütü kolona yüklendi ve özütteki proteinlerin kolonla etkileşmesi sağlandı. Tutunmayan proteinlerin uzaklaştırılabilmesi için kolondan 50 mM MOPS tamponu geçirilmeye devam edildi. Daha sonra NaCl gradient köprüsü kullanılarak kolonun tuz (NaCl) içeriği 0'dan 0,6 M'a kademeli şekilde çıkarıldı. Kolondan çıkan elüatlar her bir tüpte yaklaşık 4 mL elüat olacak şekilde cam tüpler içerisinde biriktirildi. Tüplerdeki protein miktarı, 280 nm dalga boyundaki absorbans ölçümleri ile belirlenip tüm elüatlar için GI aktivitesi tayini yapıldı. Elde edilen verilerle absorbans-tüp numarası grafiği çizildi. GI aktivitesinin yüksek olduğu tüpler için protein elektroforezi yapılarak benzer profil gösteren tüpler birleştirildi. Elde edilen enzim elüatları, Amicon Ultracel Membrane 50.000 MWCO Milipore kullanılarak konsantre edildi.

2.2.4. Protein Tayini

Örneklerdeki protein miktarı Lowry metoduyla belirlendi (Lowry vd., 1951). Protein standardı olarak sığır serum albumini (BSA) kullanıldı. Kalibrasyon grafiği için bir seri serum albumin çözeltisi hazırlandı. Tayinin gerçekleştirilmesi için aşağıdaki işlemler yapıldı.

- Kalibrasyon grafiği çizmek için hazırlanan BSA çözeltisinden (1 mg/mL) deney tüplerine sırasıyla 10, 20, 30, 40 ve 50 μ L ilave edildi. Bu şekilde BSA'nın son konsantrasyonu 20, 40, 60, 80 ve 100 μ g/mL olmaktadır.
- Ham enzim özütünden, ısı şoka maruz bırakılmış özütten, ısı şoku sonrası aseton çöktürmesi uygulanmış özütten ve saf enzim eluatından, 5 μ L başka bir deney tüpüne ilave edildi.
- Standartlara ve örneklerle son hacimler 500 μ L olacak şekilde 0,1 N NaOH içerisinde hazırlanan %0,1 (w/v) SDS çözeltisinden ilave edilip vortekslendi.
- 1 mL Lowry E çözeltisi her bir tüpe ilave edilip vortekslendi. Sonrasında oda sıcaklığında 5-10 dakika bekletildi.
- Standartlara ve numuneye saf su ile 1:1 oranında seyreltilmiş olan Folin Reaktifi'nden 100 μ L ilave edildi ve karanlık bir ortamda 30 dakika bekletildi.
- 650 nm'de absorbanslar okundu. Çıkan sonuçlara göre kalibrasyon grafiği çizilerek örneklerdeki protein konsantrasyonu hesaplandı.

2.2.5. Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez

Ham enzim özütünde, ısı şoka maruz bırakılmış özütte, ısı şoku sonrası aseton çöktürmesi uygulanmış özütte ve saf enzim eluatında GI enziminin varlığı doğal poliakrilamid jel elektrofrez ile ortaya konuldu. Doğal elektrofrez, sodyum dodesil sülfat (SDS) içermeyen ortamda ve 10x10 cm ebadındaki elektrofrez jeli kullanılarak gerçekleştirildi. Bu işlem için, %5'lik yığıma ve %10'luk ayırma jeli kullanıldı. Elektrofrezde kullanılan çözeltiler ve bileşimleri Tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 8. Doğal poliakrilamid jel elektrofrezinde kullanılan çözeltiler ve bileşimleri

Bileşenler	Yığıma Jeli (% 5, pH 6,8)	Ayırma Jeli (% 10, pH 8,8)
Yığıma Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl, pH 6,8)	0,5 mL	--
Ayırma Jeli Tamponu (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)	--	2,5 mL
%30 Akrilamid/Bisakrilamid	0,67 mL	3,3 mL
dd H ₂ O	2,74 mL	4,1 mL
%10 (APS)	0,04 mL	0,1 mL
TEMED	0,004 mL	0,004 mL

Hazırlanan jel donduktan sonra elektrofrez tankına yerleştirildi ve tank doğal elektrofrez yürütme tamponu ile dolduruldu. 1:1 oranında doğal elektrofrez yükleme boyası ile karıştırılan örnekler Hamilton şırınga kullanılarak kuyucuklara yüklendi. Daha sonra tank, buz dolu bir kap içine yerleştirilerek boya yığıma jelinden çıkana kadar yaklaşık olarak 20 dakika 20 mA'de, daha sonra da ayırma jelinin alt kısmına gelene kadar 1-1,5 saat 25 mA'de yürütüldü. Elektrik akımı kesildikten sonra jel sistemden dikkatlice çıkartıldı ve jel boyama işlemine geçildi.

Örneklerdeki saf enzimin varlığının ortaya konulması için yapılan doğal elektrofrez sonrası jel, Coomassie Brilliant Blue R-250 boyası ile boyandı. Bunun için jel, Coomassie Brilliant Blue R-250 boyama çözeltisi içerisinde yaklaşık olarak 10-15 dakika çalkalanarak bekletildi. Süre sonunda boyanan jel, boya uzaklaştırma çözeltisiyle 2-3 saat çalkalandı ve protein bantlarının görüntülenebilir hale getirilmesi sağlandı.

2.2.6. SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

Ham enzim özütünde ve saf enzim eluatında GI enziminin varlığı doğal poliakrilamid jel elektrofrez ile ortaya konulduktan sonra sodyum dodesil sülfat (SDS) poliakrilamid jel elektrofrez ile ilgili proteinin molekül ağırlığı ve farklı alt birim içerip içermediği belirlenmeye çalışıldı. SDS poliakrilamid jel elektrofrez Sambrook ve arkadaşlarına göre (1989), %5'lik yığıma jeli ve %12'lik ayırma jeli kullanılarak gerçekleştirildi. SDS-PAGE'te kullanılan çözeltiler ve bileşimleri Tablo 9'da verilmiştir.

Tablo 9. SDS poliakrilamid jel elektrofrezinde kullanılan çözeltiler ve bileşimleri

Bileşenler	Yığıma Jeli (% 0,5, pH 6,8)	Ayırma Jeli (% 12, pH 8,8)
Yığıma Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl, pH 6,8)	0,5 mL	--
Ayırma Jeli Tamponu (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)	--	2,5 mL
%30 Akrilamid/Bisakrilamid	0,67 mL	4,0 mL
% 10 (APS)	0,04 mL	0,1 mL
% 10'luk SDS	0,04 mL	0,1 mL
dd H ₂ O	2,7 mL	3,3 mL
TEMED	0,004 mL	0,004 mL

Jel hazırlandıktan sonra elektrofrez tankına yerleştirildi ve tank SDS yürütme tamponu ile dolduruldu. Yaklaşık 35 µg protein içeren örnekler, SDS yükleme çözeltisi ile karıştırılıp kaynar su banyosunda 5 dakika inkübe edildi. Böylelikle denatüre olan protein örnekleri, protein standartı ile birlikte Hamilton şırınga kullanılarak ayrı ayrı kuyucuklara yüklendi. Sonra boya, yığıma jelinden çıkana kadar yaklaşık olarak 20 dakika 20 mA'de, daha sonra da ayırma jelinin alt kısmına gelene kadar yaklaşık olarak 1-1,5 saat 25 mA'de yürütüldü. Elektrik akımı kesildikten sonra jel sistemden dikkatlice çıkarıldı ve boyama işlemine geçildi.

Örneklerdeki protein bantlarının gözlenebilmesi için jel, Coomassie Brilliant Blue R-250 boyama çözeltisi içinde yaklaşık olarak 10-15 dakika çalkalanarak bekletildi. Süre sonunda boyanan jel, boya uzaklaştırma çözeltisiyle 2-3 saat çalkalandı ve protein bantlarının görüntülenebilir hale getirilmesi sağlandı.

2.2.7. Safılaştırılan GI'nin Biyokimyasal Karakterizasyonu

2.2.7.1. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisini incelemek amacıyla farklı pH değerlerindeki tamponlar kullanılarak, 80 °C'de aktivite tayinleri yapıldı. Çalışmada kullanılan tamponların hepsi 50 mM olup, istenilen pH değerleri asetat tamponu (pH:4,0-5,5), MOPS (pH:6,0-7,5) ve Tris-HCl tamponu (pH:8,0-9,0) kullanımıyla sağlandı. Elde edilen veriler kullanılarak çizilen pH-Bağıl Aktivite (%) grafiğine göre GI için optimum pH değeri belirlendi.

Belirlenen optimum pH değeri, daha sonra yapılmış olan çalışmalarda reaksiyon pH'sı olarak kullanıldı.

2.2.7.2. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklığı belirlemek amacıyla, optimum pH değerinde 40-90 °C sıcaklık aralığındaki 10 °C'lik artışlarla aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen veriler kullanılarak çizilen Sıcaklık-Bağıl Aktivite (%) grafiğine göre GI için optimum sıcaklık değeri belirlendi.

Belirlenen optimum sıcaklık değeri, daha sonra yapılmış olan çalışmalarda reaksiyon sıcaklığı olarak kullanıldı.

2.2.7.3. Enzim Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisini incelemek amacıyla daha önce belirlenen optimum reaksiyon koşullarında substrat konsantrasyonu sabit tutularak, protein içeriği bilinen saf enzim elüatından belirli hacimlerde alınıp bir seri reaksiyon karışımı hazırlandı ve aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen sonuçlar grafiğe geçirilerek reaksiyon için optimum enzim konsantrasyonu belirlendi.

2.2.7.4. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Protein konsantrasyonu sabit tutularak gerçekleştirilen bu çalışmada, 2-250 mM nihai konsantrasyonda glukoz içerecek şekilde hazırlanan reaksiyon karışımları için optimum pH ve sıcaklık değerlerinde aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre substrat doygunluk eğrisi ve Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafiklerden yararlanılarak optimum substrat konsantrasyonu ile GI için K_m ve V_{maks} değerleri hesaplandı.

2.2.7.5. Enzimin pH Kararlılığının İncelenmesi

Saflaştırılan enzimin pH kararlılığının incelenmesi amacıyla, 50 mM konsantrasyonda hazırlanan MOPS (pH 7,5) ve Tris-HCl tamponu (pH 9,0) kullanıldı. İstenilen pH değerlerinde hazırlanan tampon çözeltiler ve saf enzim elüatı 1:1 oranında karıştırılıp, karışımların son pH'sı kullanılan tampon çözeltilerin pH'sına getirildi. Sonra her bir enzim-tampon karışımı +4 °C'de, 50 °C'de ve 80 °C'de 1, 2, 3, 4, 5 ve 15 gün boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda, seçilen pH ve sıcaklık değerlerinde aktivite tayinleri yapıldı. Daha sonra aynı şartlar altında hazırlanmış fakat inkübe edilmemiş enzim-tampon sistemleri kullanılarak tekrar aktivite tayinleri yapıldı ve elde edilen değerler %100 kabul edildi. Buna bağlı olarak farklı pH'lardaki tamponlar içerisinde inkübe edilen enzimin aktivitesi % kalan aktivite olarak hesaplandı.

2.2.7.6. Enzimin Isıl Kararlılığının İncelenmesi

Enzimin ısı kararlılığının incelenmesi amacıyla, MOPS tamponu (50 mM, pH 7,0) içerisindeki saf enzim elüatı, +4 °C'de, 50 °C'de ve 80 °C'de ayrı ayrı 1, 4, 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda enzim buz içine alınarak 5 dk bekletildi ve buzdan çıkarılıp oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. Sonra optimum şartlar altında aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Aynı şartlar altında ısı ile muamele edilmemiş enzim içinde aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen aktivite sonuçları %100 kabul edilerek, farklı sıcaklıklarda inkübe edilen enzimler için % kalan aktivite hesaplandı.

2.2.7.7. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi

GI aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek amacıyla Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} ve Cu^{2+} iyonlarının klorür tuzlarının 100 mM'lık stok çözeltileri kullanıldı. Reaksiyon karışımlarına son konsantrasyonları 5 mM olacak şekilde her bir metal iyonundan ilave edilerek optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Metal iyonu içermeyen karışımın aktivitesi %100 olarak kabul edilip metal iyonu ilavesi durumundaki % kalan aktiviteler hesaplandı.

3. BULGULAR

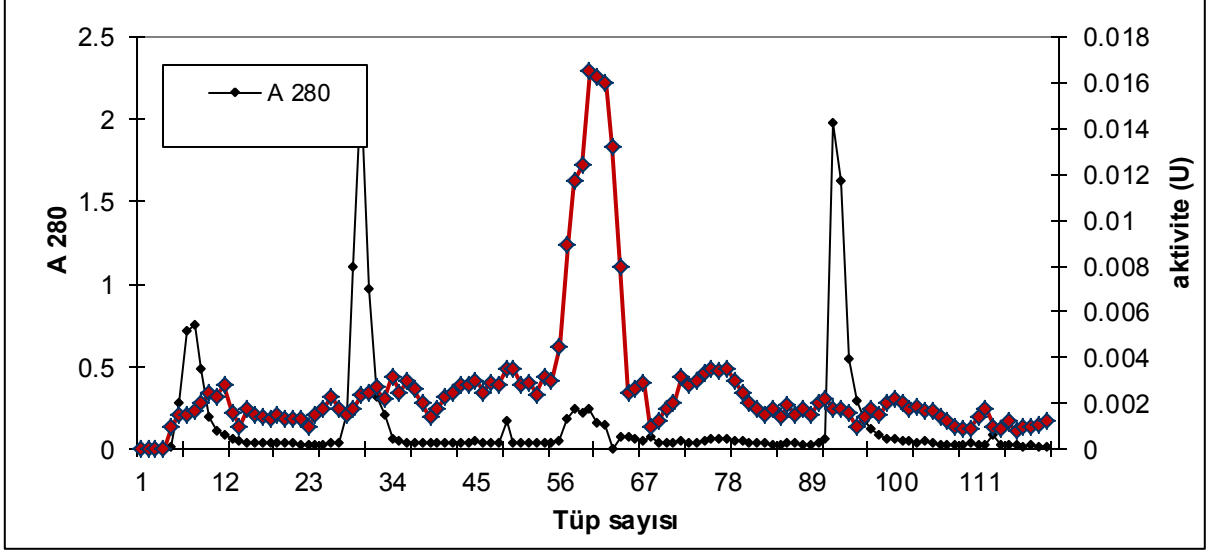
3.1. GI'nın Saflaştırılması

3.1.1. Isı Şoku ve Aseton Çöktürmesi Uygulamaları

Geobacillus thermodenitrificans TH2 suşundan elde edilen ham enzim özütü ile bu özüte ısı şoku ve aseton çöktürmesi uygulanması sonucu ele geçen özütte spesifik aktivite ve Lowry yöntemiyle protein konsantrasyonu tayinleri yapıldı. Bulgular Tablo 10'da gösterildi.

3.1.2. Enzimin İyon Değişirme Kromatografisi İle Saflaştırılması

Isı şoku ve aseton çöktürmesi işlemleri uygulanmış olan ham enzim özütüne ileri derecede saflaştırma için iyon değişirme kromatografisi uygulandı. Uygun şartlar altında tuz köprüsü ile kademeli olarak toplanan her bir fraksiyon için 280 nm'de spektrofotometrik olarak protein tayini yapıldı, ardından da 560 nm'de GI aktivitesine bakıldı. Elde edilen veriler doğrultusunda çizilen saflaştırma grafiği Şekil 5'te verilmiştir.



Şekil 5. İyon değişim kromatografisi ile *Geobacillus thermodenitrificans* TH2 glukoz izomerazının saflaştırılması

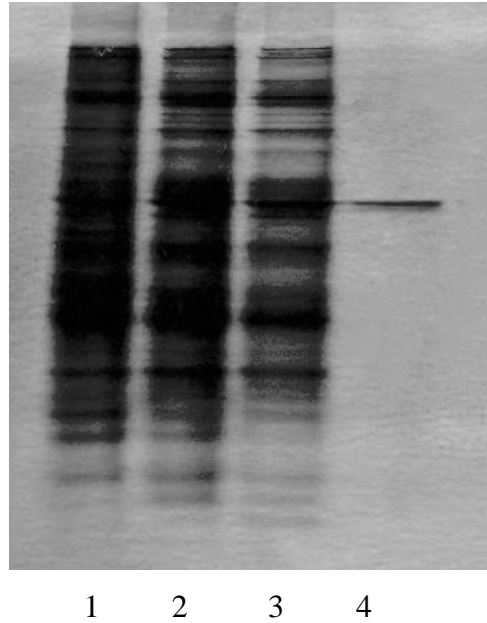
1'den 120'ye kadar numaralandırılan fraksiyon tüplerine eluatlar, 4'er mL halinde toplandı. 560 nm'de spektrofotometrik olarak yapılan aktivite tayini sonucuna en yüksek aktivitenin gözlemlendiği fraksiyonlar (59-63 numaralı tüpler) birleştirilerek oluşturulan saf enzim elüatında Lowry yöntemiyle protein tayini yapıldı, spesifik aktivite değeri hesaplandı. Bulgular Tablo 10'da gösterildi.

Tablo 10. GI'a ait saflaştırma tablosu

Saflaştırma Adımı	Hacim (mL)	Protein (mg/mL)	Aktivite (U)	Toplam Aktivite	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	Verim	Saflaştırma Katsayısı
Ham Enzim Özütü	5	7,3	0,199	99,5	2,73	100	1
Isı şoku	4,5	4,8	0,14	63	2,92	63	1,1
Aseton Çöktürmesi	5	2,3	0,16	80	6,9	80,4	2,53
İyon Değişirme Kromatografisi	4,5	0,3	0,199	89,6	66,3	90	24,3

3.1.3. Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofözezi (Doğal PAGE)

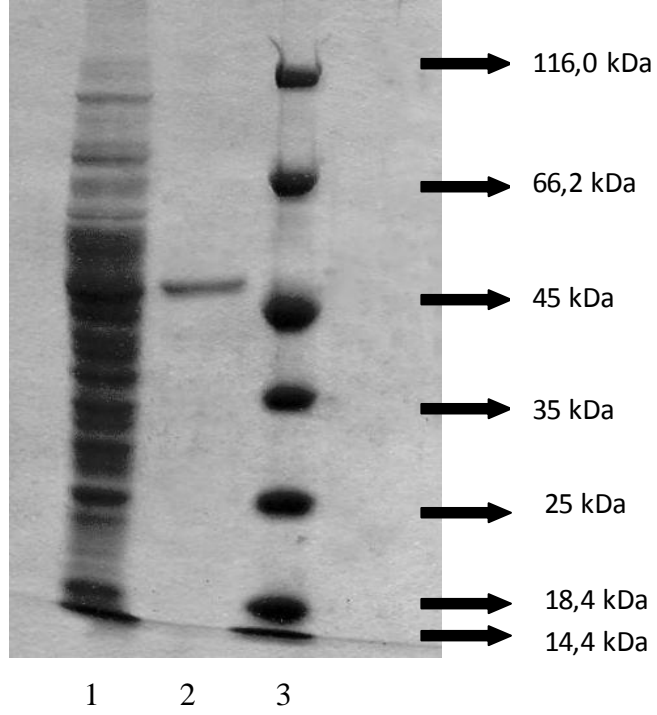
Geobacillus thermodenitrificans TH2'den elde edilen ham enzim özütünde, ısı şokuna maruz bırakılmış özütte, ısı şoku sonrası aseton çöktürmesi uygulanmış olan özütte ve iyon değıştirme kromatografisiyle sonrası elde edilen saf enzim elüatında GI enzimi varlığını ortaya koyabilmek için doğal poliakrilamid jel elektrofözezi yapıldı. Elektrofözez sonrası jelin Comassie Brilliant Blue R-250 ile boyanması sonucunda gözlenen tek bant (Şekil 6), enzimin başarılı bir şekilde saflaştırıldığını desteklemektedir.



Şekil 6. Doğal PAGE; 1. Ham enzim özütü, 2. Isı şokuna maruz bırakılmış özüt, 3. Isı şoku sonrası aseton çöktürmesi uygulanmış özüt, 4. Saf enzim elüatı

3.1.4. SDS Poliakrilamid Jel Elektrofözezi (SDS-PAGE)

Saflaştırılan GI'nın yaklaşık moleküler ağırlığı ve farklı alt birimler içerip içermediğinin belirlenebilmesi için SDS jel elektrofözezi yapıldı. Elektrofözez sonrası Comassie Brilliant Blue R-250 ile boyanan jelde saf enzim elüatı için gözlenen tek bant (Şekil 7), enzimin farklı alt birimler içermediğini göstermektedir. Ayrıca, protein standartının elektrofözez jelindeki ilerlemesi baz alınarak yapılan hesaplama göre, saflaştırılan protein için alt birimlerin yaklaşık moleküler ağırlığı 49 kDa olarak belirlendi.

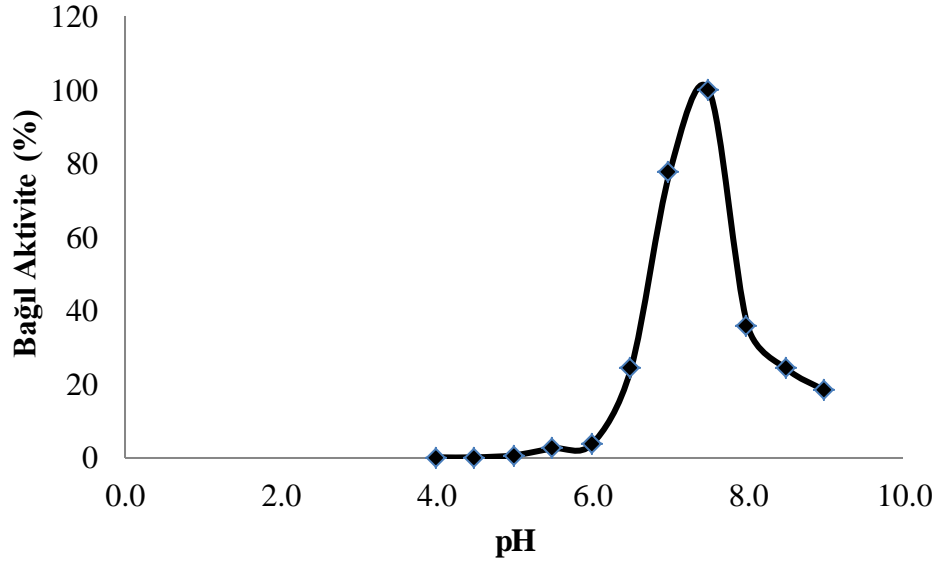


Şekil 7. SDS-PAGE; 1. Ham enzim özütü, 2.Saf enzim elüatı, 3. Protein standartı

3.1.5. Saflaştırılan Enzimin Biyokimyasal Karakterizasyonu

3.1.5.1. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

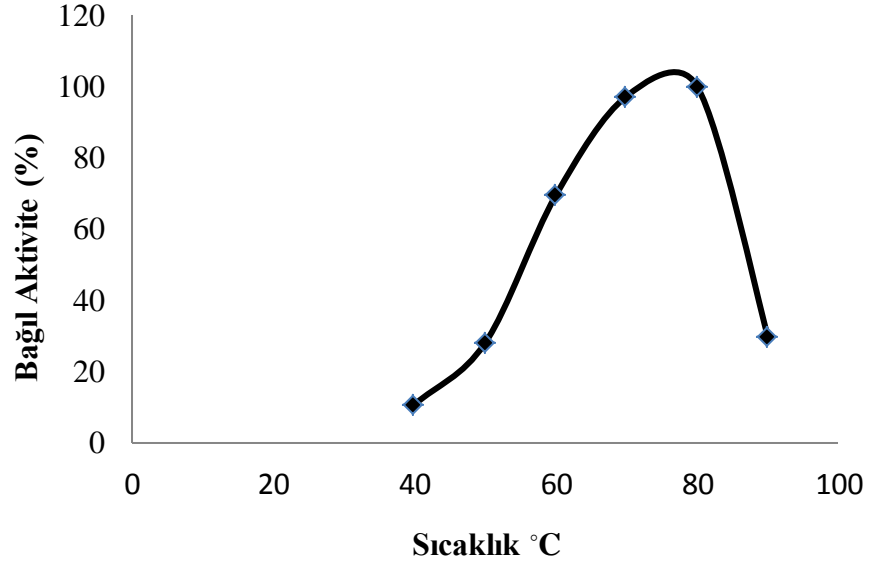
Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği pH değerini belirleyebilmek amacıyla farklı pH değerlerindeki (4,0-9,0) tamponların kullanılmasıyla aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen veriler kullanılarak pH-Bağlı Aktivite (%) grafiği çizildi (Şekil 8). Enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH değeri olan 7,5, GI için optimum pH olarak belirlendi.



Şekil 8. Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

3.1.5.2. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

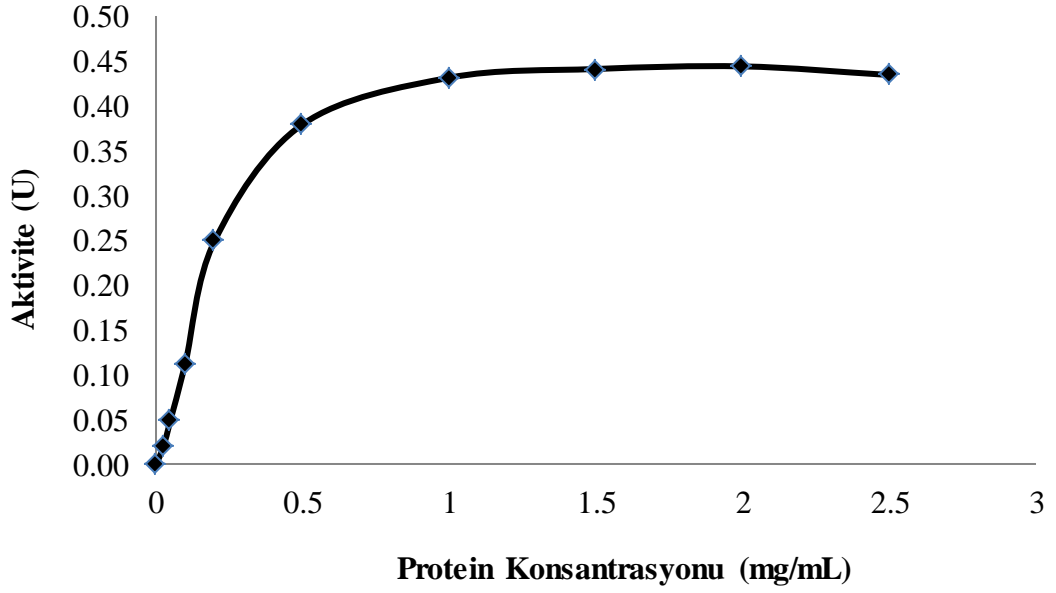
Sıcaklığın GI aktivitesi üzerindeki etkisini incelemek amacıyla 40-90 °C aralığındaki sıcaklıklarda 10 °C'lik artışlarla aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen veriler kullanılarak çizilen Sıcaklık-Bağlı Aktivite (%) grafiğine göre GI için optimum sıcaklık değeri 80 °C olarak belirlendi (Şekil 9).



Şekil 9. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

3.1.5.3. Enzim Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi

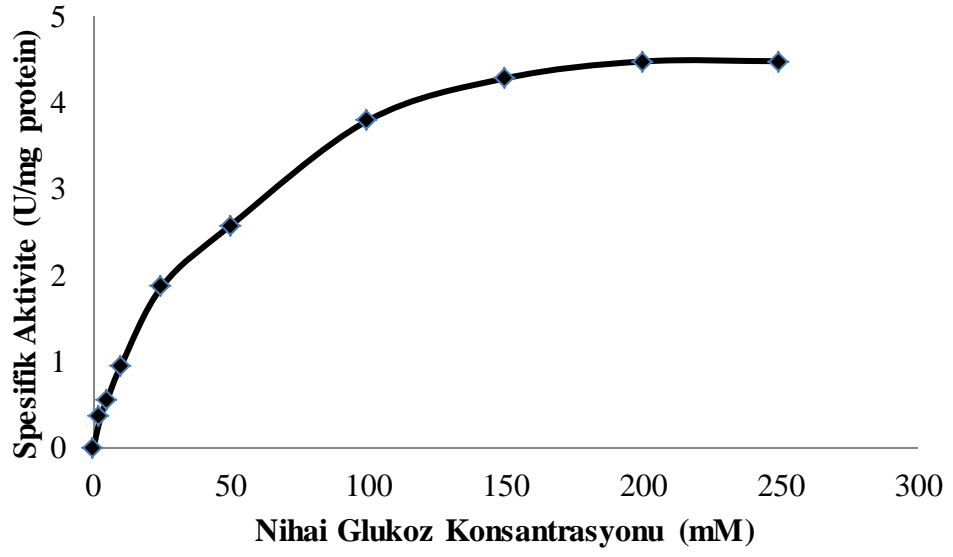
GI aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisini incelemek amacıyla sabit substrat konsantrasyonunda ayrı ayrı 0,025-2,5 mg/mL aralığındaki değerlerde son konsantrasyonda protein içerecek şekilde reaksiyon karışımları hazırlandı. Belirlenen optimum şartlar altında bu reaksiyon karışımları için aktivite tayinleri yapıldı. Daha sonra protein konsantrasyonuna karşı aktivite değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 10). Elde edilen hiperbolik eğriden de görülebileceği gibi, optimum şartlar altında ve 100 mM'lık substrat konsantrasyonunda maksimum aktivitenin gözlendiği enzim konsantrasyonu 1 mg/mL olarak belirlenmiştir.



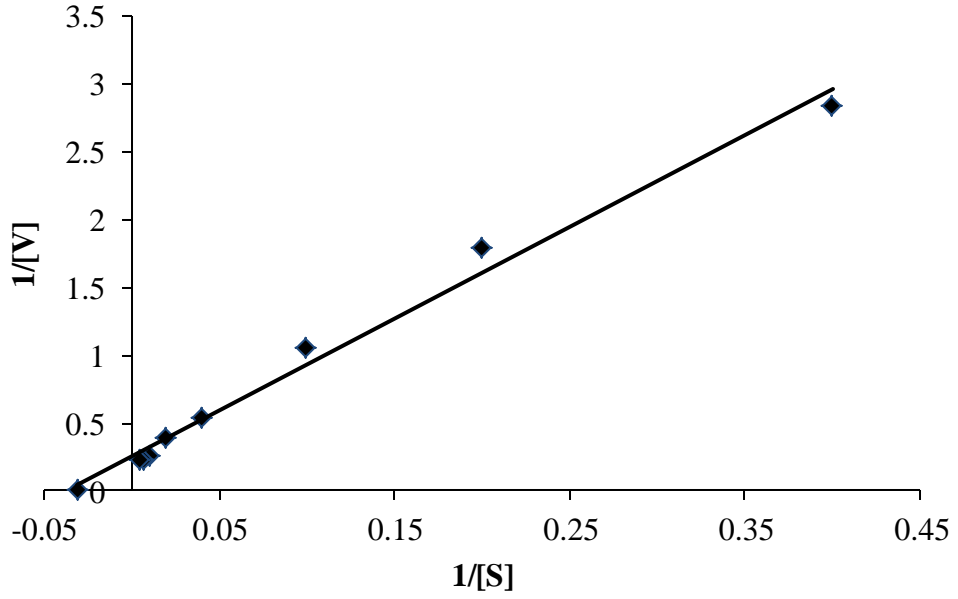
Şekil 10. Enzim aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisi

3.1.5.4. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Enzim aktivitesinin substrat konsantrasyonuyla değişimini incelemek ve saflaştırılan enzim için kinetik parametreleri hesaplamak amacıyla daha önce belirlenen optimum şartlar altında ve sabit protein konsantrasyonunda 2-250 mM aralığındaki son glukoz konsantrasyonu değerleri içerecek şekilde hazırlanan reaksiyon karışımlarında aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen veriler kullanılarak substrat doygunluk eğrisi (Şekil 11) ve Lineweaver-Burk grafiği (Şekil 12) çizildi. Substrat doygunluk eğrisi incelendiğinde, enzimin basit Michaelis-Menten kinetiğine uyumlu olduğu ve 200 mM substrat konsantrasyonu değerine kadar aktivitede bir artışın gözlemlendiği, ancak daha yüksek substrat konsantrasyon değerlerinde ise enzimin doygunluk noktasına ulaşması nedeniyle aktivitenin bu optimum değerde sabit kaldığı gözlemlendi. Bu nedenle, bundan sonraki karakterizasyon çalışmaları için optimum substrat konsantrasyonu 200 mM olacak şekilde ayarlandı. Lineweaver-Burk eğrisinden K_m ve V_{maks} değerleri sırasıyla 32 mM ve 4,68 U/mg protein olarak hesaplanmıştır.



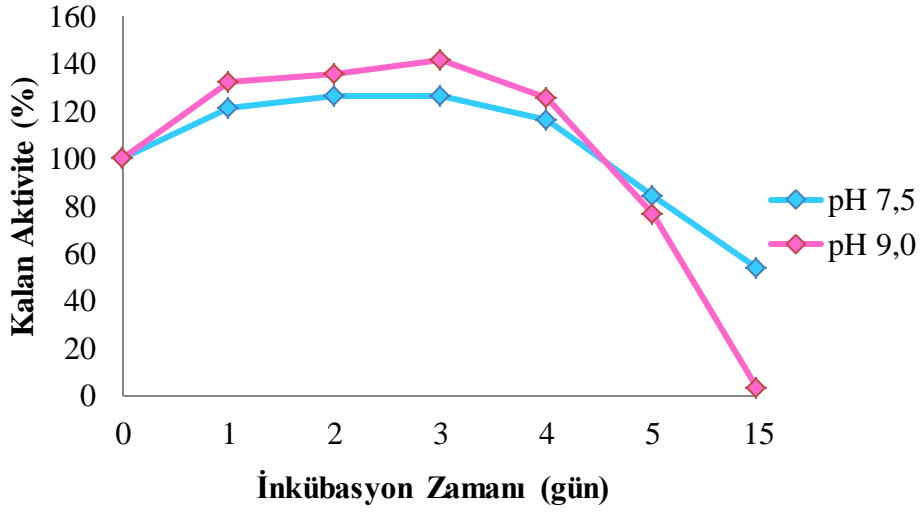
Şekil 11. Glukoz varlığında GI'nın substrat doygunluk eğrisi



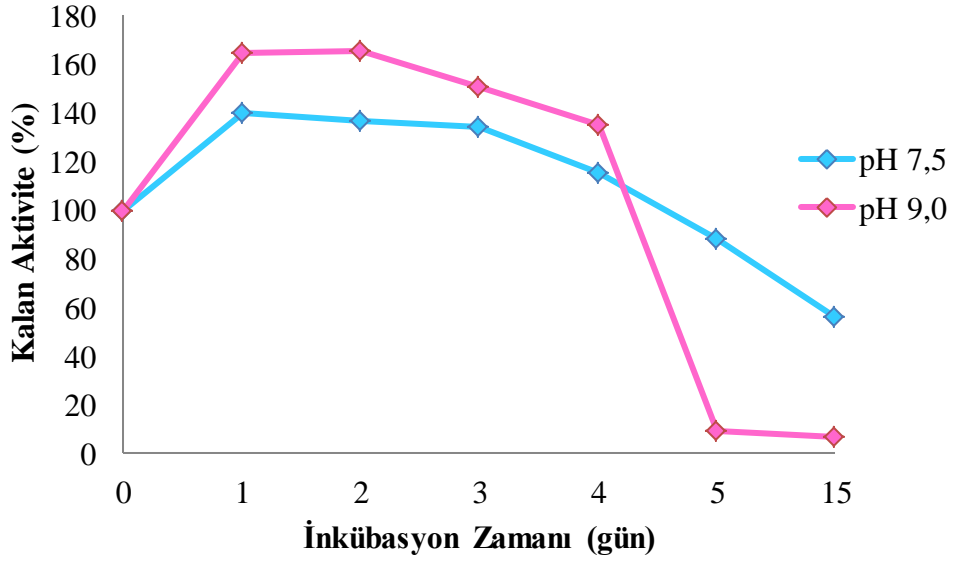
Şekil 12. Glukoz varlığında GI'nın Lineweaver-Burk eğrisi

3.1.5.5. Safılaştırılan Enzimin pH Kararlılığının İncelenmesi

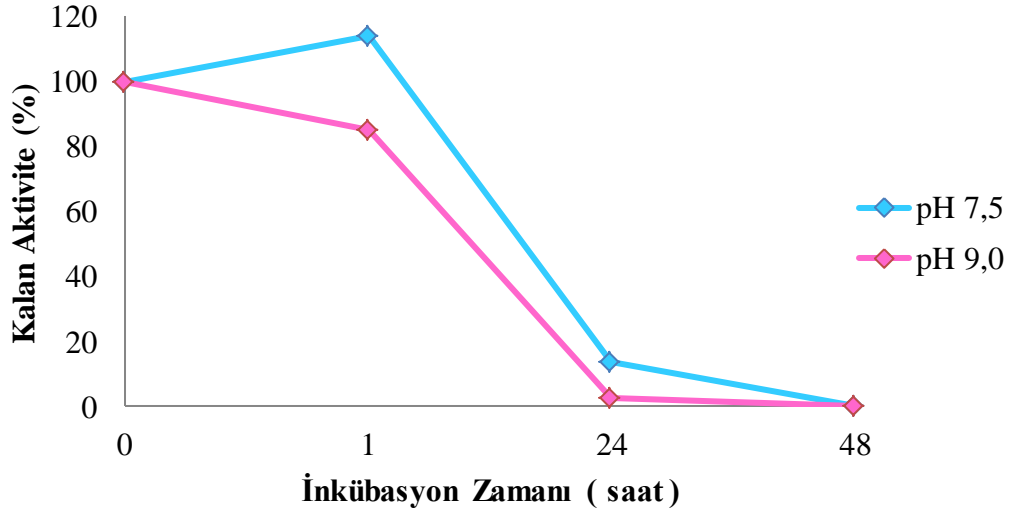
Enzimin pH kararlılığının incelenmesi amacıyla saf enzim elüatı 1:1 oranında pH'sı 7,5 ve 9,0 olan tamponlarla karılaştırılıp, karılaşımların son pH'sı kullanılan tampon çözeltilerin pH'sına getirildi. Her bir enzim-tampon karılaşımlarının +4 °C'de, 50 °C'de ve 80 °C'de 1, 2, 3, 4, 5 ve 15 gün süreyle inkübe edilmesi sonrası, aktivite tayinleri yapıldı. Ancak, 80 °C için yapılan pH kararlılık denemelerinde 1.günün sonunda enzim aktivitesinin tamamına yakınının inhibe olması sebebiyle bu sıcaklık değeri için GI'nın pH kararlılığı diğerlerinden farklı olarak 1, 24 ve 48 saatlik inkübasyonlar için incelenmiştir. Elde edilen verilerle, inkübe edilmemiş enzim aktivitesi % 100 kabul edilerek her bir sıcaklık için ayrı ayrı İnkübasyon Zaman-Kalan Aktivite (%) grafiği çizildi (Şekil 13, 14, 15). Grafiklerden de görülebileceği gibi, +4 °C'de 5 günlük inkübasyon sonrası enzim her iki pH değeri için de aktivitesini %80 oranında korumuştur. 15 günlük inkübasyon sonucunda ise pH 7,5'te kalan aktivite yaklaşık olarak %50 iken pH 9,0'da aktivite sıfırlanmıştır. 50 °C için yapılan pH kararlılık denemeleri verilerine göre, 4 günlük inkübasyon sonrası enzim aktivitesinin her iki pH değeri de tamamen korunduğu, 15 gün sonunda pH 9,0 için aktivitenin sıfırlandığı, pH 7,5 içinse kalan aktivitenin % 70 civarında olduğu görülmektedir. 80 °C'deki inkübasyonlar sonucunda ise, enzimin aktivitesinin pH 7,5'teki 1 saatlik inkübasyon sonrası %20 oranında artarken 24 saat sonrası %86 oranında azaldığı; pH 9,0 için 1 saatlik inkübasyon sonrası kalan aktivitenin %80, 24 saat sonrası ise %3 civarında olduğu gözlenmiştir. Her iki pH değeri içinde 48 saatlik inkübasyon, enzim aktivitesinin tamamının inhibe olmasıyla sonuçlanmıştır.



Şekil 13. Safaştırılan GI'nın +4 °C'deki pH kararlılık eğrisi



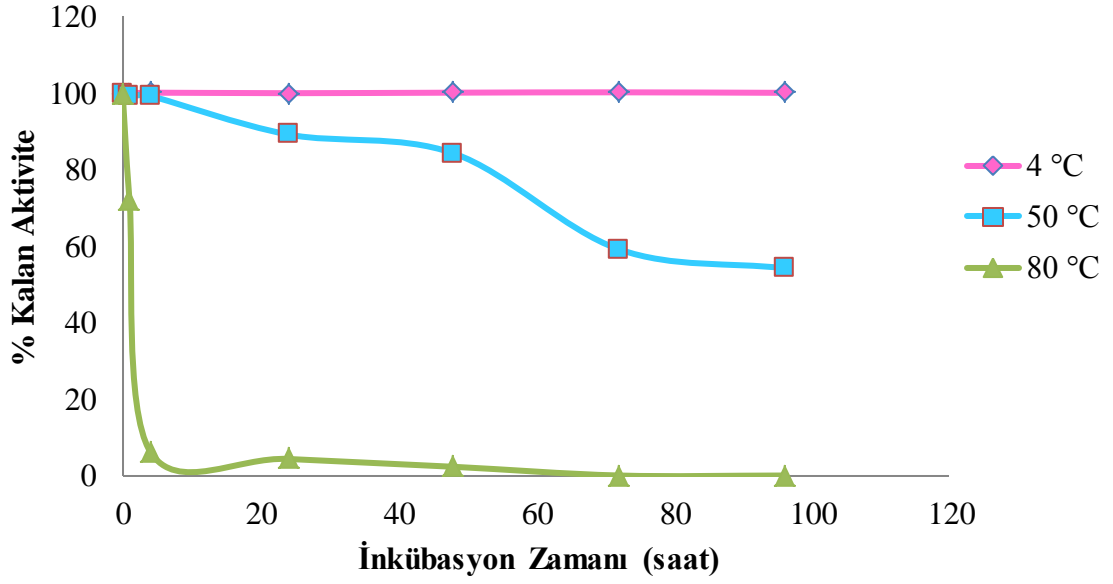
Şekil 14. Safaştırılan GI'nın 50 °C'deki pH kararlılık eğrisi



Şekil 15. Saflaştırılan GI'nın 80 °C'deki pH kararlılık eğrisi

3.1.5.6. Saflaştırılan Enzimin Isıl Kararlılığının İncelenmesi

Enzimin ısıl kararlılığının incelenmesi amacıyla, saf enzim elüatı MOPS tamponu (50 mM, pH 7,0) içerisinde ayrı ayrı +4 °C'de, 50 °C'de ve 80 °C'de 1, 4, 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası her bir elüat için optimum şartlarda aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Elde edilen verilerle inkübe edilmemiş enzim aktivitesi % 100 kabul edilerek İnkübasyon Zamanı-Kalan aktivite (%) grafiği çizildi (Şekil 16). Grafik incelendiğinde +4 °C'deki tüm inkübasyonlar sonrası, GI'nın aktivitesinin tamamını koruduğu, 50 °C'de 24 saatlik inkübasyon sonrası aktivitede azalmanın başladığı ve 96 saat sonunda kalan aktivitenin yaklaşık % 60 olduğu gözlenmektedir. 80 °C'de ise 1. saat sonunda aktivite %30 oranında inhibe olurken, 48 saatlik inkübasyondan sonra aktivitenin tamamına yakınının sıfırlandığı görülmektedir.



Şekil 16. Saflaştırılan GI'nın ısıl kararlılık eğrisi

3.1.5.7. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi

GI aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek amacıyla Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{+2} , Hg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} ve Cu^{2+} iyonlarının klorür tuzlarının 100 mM'lık stok çözeltileri kullanılarak, 5 mM nihai konsantrasyonda metal iyonu içeren reaksiyon karışımları hazırlanıp aktivite tayinleri yapıldı. Metal içermeyen karışımın aktivitesi %100 kabul edilerek metal varlığındaki aktiviteler Kalan aktivite (%) olarak hesaplandı (Tablo 11). Tablo 11'de de görüldüğü gibi Mg^{2+} , Mn^{2+} ve Co^{+2} iyonları varlığında enzim aktivitesinde ciddi artışlar meydana gelirken, diğer metal iyonları aktiviteyi farklı seviyelerde inhibe etmiştir.

Tablo 11. Bazı metal iyonlarının GI aktivitesi üzerine etkisi

Metal İyonu (5 mM)	% Kalan Aktivite
Yok	100
Mg ²⁺	155
Mn ²⁺	174
Co ²⁺	300
Hg ²⁺	5
Zn ²⁺	20
Ca ²⁺	64
Ni ²⁺	29
Fe ²⁺	25
Cu ²⁺	17

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Yapılan bu çalışmada Aydın ili, Çamköy Çamur İlçesi'nden izole edilen termofilik *Geobacillus thermodenitrificans* TH2 bakteri suşunda GI enzimi varlığı belirlenmiş, iyon değişirme kromatografisi ile enzim saflaştırıldı ve saflaştırılan enzimin biyokimyasal özellikleri ve bazı kinetik parametreleri ortaya konmaya çalışıldı.

Geobacillus thermodenitrificans TH2 suşundan ham enzim özütü hazırlandı ve ön saflaştırma işlemi olarak özüte ısı şoku ve soğuk asetonla çöktürme işlemleri uygulandı. Bu işlemler sonunda elde edilen enzim özütü Q-Sepharose Fast Flow kolonuna tatbik edildi ve enzimin iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılması gerçekleştirildi. Ham enzim özütünde enzimin spesifik aktivitesi 0,273 U/mg protein, ısı şoku ve ısı şoku sonrası aseton çöktürmesi uygulanmış olan özütlerde spesifik aktivite sırasıyla 0,292 U/mg protein ve 0,69U/mg protein, son olarakta iyon değişim kromatografisi sonucu saflaştırılan enzimin spesifik aktivitesi 6,63 U/mg protein olarak bulundu (Tablo 10). Bu sonuçlara göre enzim, %90 verimle 24,3 kat saflaştırılmıştır.

İyon değişim kromatografisi ile gerçekleştirilen saflaştırma işleminden sonra elde edilen saf enzim eluatu elektroforetik olarak analiz edildi. Hazırlanan %10'luk doğal poliakrilamid jel elektroforezine tatbik edilen saf enzim elüatının Commassie Brilliant Blue R-250 ile boyanması sonucu gözlenen tek bant, başarılı bir saflaştırma işleminin gerçekleştirildiğini desteklemektedir (Şekil 5).

İyon değişirme kromatografisi sonrası ele geçen saf enzim elüatı SDS poliakrilamid jel elektroforezi ile de incelendi (Şekil 6). Elektroforez sonucunda gözlenen tek protein bandı, saflaştırılan GI'nın tersiyer yapılı olduğunu ya da homolog birden fazla aynı tür alt birimden oluştuğunu ifade etmektedir. Ayrıca SDS-PAGE ile enzimin alt birimlerinin yaklaşık 49 kDa ağırlığında olduğu saptandı. Bu değer *Bifidobacterium adolescentis*'ten elde edilen ve alt birim ağırlığı 53 kDa olan trimer yapıdaki Sınıf II glukoz izomerazın molekül ağırlığına oldukça yakın bir değerdir (Kawai vd., 1994). *Thermoanaerobacterium JW/SL-YS 489* suşundan elde edilen, alt birim ağırlığı 50 kDa olan tetramer yapıdaki GI ve termofilik *Bacillus* sp. suşundan saflaştırılan ve alt birim ağırlığı 50 kDa olan trimer yapıdaki GI'ların varlığı da bildirilmiştir (Chauthaiwale ve Rao, 1994; Liu vd., 1996).

Optimum pH değeri enzim aktivitesinin ifade edilmesinde önemli olan bir faktördür. Nötral ya da hafif asidik pH optimumuna sahip yeni GI'ların keşfi, endüstriyel uygulamalar için önem taşımaktadır. Çünkü bu pH değerlerinde izomerizasyonun hızı daha yüksek reaksiyon oranlarına yol açacaktır (Lee ve Zeikus, 1991). *Geobacillus thermodenitrificans* TH2'den saflaştırılan GI için aktivitenin pH'ya olan bağlılığı pH 4,0-9,0 aralığında incelendi (Şekil 7). İnceleme sonucunda enzimin en yüksek aktiviteye sahip olduğu pH değeri 7,5 olarak bulundu. Ayrıca saflaştırılan GI'nın asidik ve bazik pH değerlerinde düşük, nötrale yakın pH değerlerinde ise nispeten daha yüksek aktiviteye sahip olduğu gözlemlendi. Literatürden elde edilen bilgiye göre glukoz substratı varlığında *Thermoanaerobacterium* sp. (Liu vd., 1996), *Actinoplanes missouriensis* (Van Tillbeurgh vd., 1992), *Lactobacillus brevis* (Yamanaka, 1975) ve *Thermus aquaticus* (Lehmbacher, 1990) GI'ları haricindeki diğer GI'ların optimum pH değeri pH 6,5'ten yüksektir. *Bacillus thermoantarticus* (Lama vd., 2001) GI'sı içinde optimum pH değeri 7,0'dır. Bu sonuçlara dayanılarak saflaştırılan GI optimum pH bakımından literatürdeki pek çok GI kadar iyidir. Ancak endüstriyel uygulamalar için daha asidik pH değerleri arzu edilmektedir.

Geobacillus thermodenitrificans TH2'den saflaştırılan enzimin aktivitesinin sıcaklıkla değişimi 40-90 °C aralığındaki sıcaklık değerlerinde incelendi (Şekil 8). Elde edilen sonuçlara göre enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık 80 °C olarak belirlendi. Yapılan çalışma, bağıl aktivitenin, 40-50 °C'de %30, 85 °C'de %50 ve 90 °C'de %40 civarında olduğunu göstermektedir. Literatürde yapılan incelemeler sonucunda saflaştırılan GI'nın optimum sıcaklığının, *Streptomyces* sp. (Inyang vd., 1995), *Bacillus* sp. (Chauthaiwale ve Rao, 1994), *Anoxybacillus gonensis* G2 (Karaoğlu, 2004), *Geobacillus caldxylolyticus* TK4 (Faiz, 2008) ve *Streptomyces chibaensis* J-59 (Joo vd., 2005) GI'ları ile benzerlik gösterdiği görüldü. Çalışılan farklı GI'lar için optimum sıcaklık, *Thermotoga neapolitana*'da 95 °C (Hess vd., 1998), *Thermus thermophilus*'ta ve *Bacillus thermoantarcticus*'ta 90 °C (Lonn vd., 2002; Lama vd., 2001) olarak belirlenmiştir. Bunun dışındaki diğer GI'lar genel olarak, 60 °C ile 75 °C arasında bir sıcaklık optimumuna sahiptirler (Bhosale vd., 1996). Tüm bu verilere dayanılarak *Geobacillus thermodenitrificans* TH2 GI'sının oldukça termofilik bir enzim olduğu söylenebilir. Endüstride HFCS prosesinde fruktozun son konsantrasyonu/glukoz dengesi yüksek oranda sıcaklığa bağlıdır ve sıcaklık arttıkça denge fruktoz lehine döner. Bu nedenle de

ulaşılabilir en yüksek fruktoz seviyesi için yüksek sıcaklık optimumuna sahip GI'lar geliştirilmesi oldukça önemlidir. *Geobacillus thermodenitrificans* TH2 GI'sı, sahip olduğu yüksek sıcaklık optimumu ile endüstriyel ihtiyaca cevap verebilecek bir potansiyele sahiptir.

Saflaştırılan enzim için aktivitenin enzim konsantrasyonuna bağlılığı incelendiğinde 1 mg/mL'lik konsantrasyona kadar reaksiyon karışımındaki enzim miktarının artışının aktiviteyi arttırdığı görüldü (Şekil 9). Daha yüksek konsantrasyon değerlerinde ise GI aktivitesinin enzim miktarından bağımsız olduğu ve belli bir konsantrasyondaki enzim miktarına ulaşıldıktan sonra da aktivitenin enzim miktarından etkilenmediği belirlendi.

GI aktivitesinin substrat konsantrasyonuyla olan ilişkisini incelemek amacıyla protein konsantrasyonu sabit tutularak değişen konsantrasyonlarda substrat içeren bir dizi reaksiyon karışımında aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen verilerle çizilen Lineweaver-Burk eğrisinden (Şekil 11.) K_m ve V_{maks} değerleri sırasıyla, 32 mM ve 4,68 U/mg protein olarak bulundu. K_m değeri enzimin substratına olan ilgisinin bir ölçüsüdür ve bu değer ne kadar küçük olursa, enzimin substratına karşı olan ilgisi de o kadar fazladır. Literatür taraması sonucu elde edilen verilere bakıldığında *Streptomyces albus* (Sanchez ve Smiley, 1975) ve *Arthrobacter* sp. (Smith vd., 1991) GI'sı için K_m değeri 86 mM, *Bacillus coagulans* (Danno, 1970) için 90 mM, *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* (Liu vd., 1996) 120 mM, *Clostridium thermosulfurogenes* (Lee vd., 1990) için 130 mM, *Bacillus* sp. (Chauthaiwale ve Rao, 1994) için 142 mM, *Streptomyces olivochromogenes* (Suekare vd., 1978) için 250 mM, *Antiroplanes missouriensis* (Jenkins vd., 1992) için 290 mM, *Bifidobacterium adolescentis* (Kawai vd., 1994) için 298 mM, *Streptomyces* sp. (Inyang vd.,1995) için 400 mM , *Lactobacillus brevis* (Yamanaka, 1975) için de 920 mM olduğu görülmektedir. Bu değerler göz önünde bulundurularak *Geobacillus thermodenitrificans* TH2'den saflaştırılan GI'nın K_m değerinin birçok mikroorganizmanın K_m değerine göre düşük olduğu söylenebilir. Diğer yandan *Streptomyces flavogriseus* (Chen vd., 1979) GI'sı için K_m değeri 0,279 mM, *Geobacillus caldxylolyticus* TK4 (Faiz, 2008) için 20,58 mM ve *Anoxybacillus gonensis* G2 (Karaoğlu, 2004) için 15,24 mM olarak bildirilmiştir. Bu değerlere bakılacak olursa da, bahsi geçen GI'ların glukozaya olan ilgilerinin *Geobacillus thermodenitrificans* GI'sına göre daha yüksek olduğu söylenebilir.

Saf enzim elüatının optimum pH değerinde, +4 °C’de, 50 °C’de ve 80 °C’de ayrı ayrı 1, 4, 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca inkübe edilmesi ve inkübasyon süreleri sonunda aktivitede olan değişimlerin incelenmesiyle *Geobacillus thermodenitrificans* GI’sının ısıl kararlılığı incelendi (Şekil 15). Elde edilen sonuçlar incelendiğinde enzimin optimum sıcaklığı olan 80 °C’deki 1 saatlik inkübasyon sonrası GI’nın aktivitesinin %70’ini koruduğu görülmüştür. 50 °C’deki inkübasyonlarda da 4 saat sonunda aktivitenin tamamına yakını korunmuş olup, sırasıyla 48 ve 96 saatlik inkübasyonlardan sonra kalan aktivite değerleri %85 ve %60 olarak bulundu. +4 °C’de ise enzimin yüksek oranda kararlı olup aktivitesini aylarca koruduğu saptandı. Bu durum özellikle enzimin saklanma koşullarının belirlenmesi açısından büyük bir avantaj sağlar. Enzimin ısıl kararlılığını literatürle kıyaslanacak olursa *Geobacillus stearothermophilus* GI’sının 75 °C’de 1 saat, *Bacillus coagulans*’ın 50 °C’de 1 saat, *Streptomyces olivochromogenes*’in 30 °C’de 30 dakika, *Thermoanaerobacterium* sp.’nin 60 °C’de 5 saat, *Arthrobacter nicotianae*’nin 70 °C’de 2 saat kararlı oldukları görülür. Bu sonuçlara bakılarak, *Geobacillus thermodenitrificans* TH2 GI’sının genel olarak ısıl kararlı olduğu ancak özellikle +4 °C’de oldukça yüksek bir ısıl kararlılığa sahip olduğu söylenebilir.

Geobacillus thermodenitrificans TH2’den saflaştırılan GI’nın pH kararlılığını incelemek amacıyla saf enzim elüatı 1:1 oranında pH’sı 7,5 ve 9,0 olan tamponlarla karıştırılıp, karışımların son pH’sı kullanılan tampon çözeltilerin pH’sına getirildi. Her bir enzim-tampon karışımının +4 °C’de, 50 °C’de ve 80 °C’de 1, 2, 3, 4, 5 ve 15 gün süreyle inkübe edilmesi sonrası, belirlenen şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı (Şekil 12, 13). 80 °C için yapılan pH kararlılık denemelerinde 1. günün sonunda enzim aktivitesinin tamamına yakınının inhibe olması sebebiyle bu sıcaklık değeri için GI’nın pH kararlılığı diğerlerinden farklı olarak 1, 24 ve 48 saatlik inkübasyonlar için incelenmiştir (Şekil 14). Elde edilen verilere göre +4 °C ve 50 °C’de, her iki pH değerindeki 1 günlük inkübasyon sonrasında enzim aktivitesinde gözlenen artış, saflaştırılan enzimin bu sıcaklık, pH ve inkübasyon seviyelerinde başlangıç haline göre daha kararlı bir üç boyutlu yapı kazandığına ve kazanılan bu yapının da enzim-substrat etkileşiminin daha etkin olmasına yol açtığına atfedilir. +4 °C’de 5 günlük inkübasyon sonrası enzim her iki pH değeri için de aktivitesini %80 oranında korumuştur. 15 günlük inkübasyon sonucunda ise pH 7,5’te kalan aktivite yaklaşık olarak %50 iken pH 9,0’da aktivite sıfırlanmıştır. 50 °C için yapılan pH kararlılık denemeleri verilerine göre, 4 günlük inkübasyon sonrası enzim aktivitesinin

her iki pH değerinde de tamamen korunduğu, 15 gün sonunda pH 9,0 için aktivitenin sıfırlandığı, pH 7,5 içinse kalan aktivitenin %70 civarında olduğu görüldü. 80 °C'deki inkübasyonlar sonucunda ise, enzimin aktivitesinin pH 7,5'teki 1 saatlik inkübasyon sonrası %20 oranında artarken, 24 saat sonrası %40 oranında azaldığı; pH 9,0 için 1 saatlik inkübasyon sonrası kalan aktivitenin %80, 24 saat sonrası ise %3 civarında olduğu gözlenmiştir. Her iki pH değeri için de 48 saatlik inkübasyon, enzim aktivitesinin tamamının inhibe olmasıyla sonuçlandı. Elde edilen veriler literatürle kıyaslandığında *Bifidobacterium adolescentis* GI'sınının pH 6,0'da 80 °C'de 18 saat bekletildiğinde aktivitesini %50, *Bifidobacterium adolescentis* GI'sının aynı sıcaklıkta pH 7,0'da 18 saat sonunda aktivitesini %100 koruduğu gözlenmiştir (URL-1). Elde edilen verilere bakıldığında saflaştırılan GI'nın özellikle +4 °C'de her iki pH değerinde de oldukça kararlı bir halde bulunduğu söylenebilir.

Birçok enzim, etkinlik gösterebilmek için kofaktör olarak metal iyonlarına ihtiyaç duyar. Metal iyonları farklı koordinasyon sayılarına, yaptıkları bileşiklerde farklı koordinasyon geometrisine ve Lewis asidi potansiyeline sahip olmaları gibi sebeplerle, proteinlerin farklı bölgelerine bağlanabilirler. Bunun sonucu olarak da enzim aktivitesini farklı şekilde etkileyebilirler (Bock vd., 1999; Di Tusa vd., 2001). GI'nın maksimum aktivite için Mg^{2+} , Co^{2+} ve Mn^{2+} gibi bivalent katyonlara veya bunların kombinasyonlarına ihtiyaç duyduğu bilinmektedir (Bhosale vd., 1996). Saflaştırılan enzimin aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisini incelemek için yapılan çalışmada elde edilen bulgular literatürle tam bir uyum göstermektedir. Yapılan alışmalarda GI aktivitesinin Mg^{2+} , Co^{2+} ve Mn^{2+} varlığında artarken, Hg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} ve Cu^{2+} varlığında aktivitenin değişik oranlarda inhibe olduğu gözlendi.

5. ÖNERİLER

Bu çalışmada yeni bir termofilik tür olan *Geobacillus thermodenitrificans* TH2 bakteri suşundan glukoz izomeraz enzimi saflaştırıldı ve biyokimyasal özellikleri açısından karakterize edildi. Endüstrinin ihtiyaç duyduğu önemli enzimlerden biri olan GI üzerine, HFCS ve hemiselülozlardan etanol üretimi gibi endüstriyel proseslerdeki rolü sebebiyle, birçok araştırma yapılmakta ve özellikle ısı kararlılığı yüksek olan GI'ların üretimi için yeni mikrobiyal kaynakların ortaya çıkarılmasına önem verilmektedir. Endüstrinin yeni üretilen GI'lardaki en büyük beklentisi yüksek ısı kararlılık göstermeleri ve nötral ya da hafif asidik pH optimumuna sahip olmalarıdır.

Son zamanlarda enzim üretimini daha verimli hale getirebilmek için çeşitli teknolojiler geliştirilmiştir. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanlardan biri rekombinant DNA teknolojisidir. Bu teknoloji sayesinde enzimleri kodlayan genleri izole etmek, bu genlerin üzerinde çalışmak ve genetik mutasyonlar yaparak enzimlerin özelliklerini iyileştirmek, günümüzde artık olanaklı hale gelmiştir. Ayrıca bu gibi ileri teknolojik yöntemlerle GI enziminin daha kontrollü ve daha bol üretilmesi sağlanabilir. Bu sebeple, *Geobacillus thermodenitrificans* TH2 glukoz izomerazı uygun bir konakçıya klonlanarak, bol miktarda ekspres edilmesi ve saflaştırma işleminin daha kolay hale getirilmesi sağlanabilir. Bunun yanında, çeşitli mutasyon teknikleri kullanılarak, saflaştırılan enzimin optimum pH'sı nötral ya da hafif asidik pH değerlerine düşürülebilirken ısı kararlılığı da arttırılabilir.

Saflaştırılan GI'nın glukozu karşı yüksek K_m 'ye sahip olması endüstriyel kullanım açısından önemini azaltacağı için, enzimin K_m 'sini düşürmeye yönelik mutasyonlar yapılarak substrata olan ilgisi arttırılabilir. Böyle bir durumda yapılan mutasyonların optimum pH, optimum sıcaklık, ısı ve pH kararlılığı üzerindeki etkileri de incelenmelidir.

Glukoz izomeraz kullanımı oldukça pahalı olan bir enzimdir ve pek çok endüstriyel süreçte geri kazanım ihtimali oldukça düşüktür. Ayrıca substratı olan glukozu karşı ilgisinin düşük olması sebebiyle de reaksiyonlarda bol miktarda kullanımı gerekmektedir. Bu nedenle enzimin immobilize edilerek defalarca kullanımı proseslerdeki maliyeti azaltacaktır. Böylelikle, enzimin kararlılığı da artabileceği için saflaştırılan enzim, immobilizasyon sonrası ileri derecede karakterize edilebilir.

Yapılan çalışmalarda saflaştırılan enzimin -20  C'de saklandıktan sonra özölüp kullanılmasının aktivitede kayıplara neden olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle enzimin -20  C yerine +4  C'de saklanması daha doğrudur.

Bunlara ilave olarak, saflaştırılan enzimin HPLC gibi bir yöntemle kesin molekül ağrılığı belirlenebilir. Molekül yapısı ve izoelektrik noktasının bulunmasıyla da diğer bazı biyokimyasal özellikleri ortaya koyulabilecektir.

6. KAYNAKLAR

- Alagöz, D., 2007. B-Glaktosidaz ve Glukoz İzomeraz'ın Eupergit Desteğe Kovalent İmmobilizasyonu ve İmmobilize Enzimlerin Laktoz Hidrolizi ve Glukoz İzomerizasyonunda kullanılması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Amelunxen, R.E. ve Lins, M., 1968. Comparative Thermostability of Enzymes from *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus cereus*, Arch. Biochem. Biophys., 125,765-771.
- Arnold, F.H., 2001. Combinatorial and Computational Challenges for Biocatalyst Design, Nature, 409, 253-257.
- Banerjee, S., Archana, A. ve Satyanarayana, T., 1994. Xylose Metabolism in a Thermophilic Mold *Malbranchea pulchella* var. *Sulfurea Tmd-8*, Curr. Microbiol., 29, 349-352.
- Barker, S. A., Somers, P. J. ve Hatt B. W. (Boehringer Mannheim GmbH), 1983. Fructose, U.S. Patent, 3, 875, 140, <http://www.uspto.gov/>.
- Basciano, H., Federico, L. ve Adeli, K., 2005. Fructose, Insulin Resistance and Metabolic Dyslipidemia. Nutrition and Metabolism, London, 2,5.
- Belfaouh, N. ve Penninckx, M.,2000. A bifunctional β -xylosidase-xylose isomerase from *Streptomyces* sp. EC 10, Enzyme Microb. Technol., 27, 114-121.
- Bhat, M.K., 2000. Cellulases and Related Enzymes in Biotechnology, Biotechnology Advances, 18, 355-383.
- Bhosale, S. H., Rao, M. B. ve Deshpande, V. V., 1996. Molecular and Industrial Aspects of Glucose Isomerase, Microbiol. Rev., 60, 280-300.
- Bock, W. C., Katz, A. G., Markham, G. D. ve Glusker, J. P., 1999. Manganese as a Replacement for Magnesium and Zinc: Functional Comparasion of the Divalent Ions. J. Am. Chem. Soc., 121, 7360-7372.
- Callens, M., Kersters-Hilderson, H., Vangrysperre, W. ve Debruyne, C. K., 1988. D- Xylose isomerase from *Streptomyces Violaceoruber*: Structural and Catalytic Roles of Bivalent metal Ions. Enzyme Microb. Technol., 10, 695–700.
- Chaing L. C., Gong, C. S., Chen, L. F. ve Tsao, G. T., 1981. D-Xylulose Fermentation to Ethanol by *Saccharomyces Cerevisiae*, Appl. Environ. Microbiol., 42, 284-289.

- Chauthaiwale, J. V. ve Rao, M. B., 1994. Production and Purification of Extracellular D-Xylose Isomerase From An Alkaliphilic, Thermophilic *Bacillus* sp. , Appl. Environ. Microbiol., 60, 4495-4499.
- Chen, W. P., Anderson, A. W. ve Han, Y. W., 1979. Production of Glucose Isomerase by *Streptomyces flavogriseus*, Appl. Environ. Microbiol., 37, 2, 324-331.
- Cihan, A.C., Ozcan, B., Tekin, N. ve Cokmus, C., 2011. *Geobacillus thermodenitrificans* Subs. Calidus, Subs. Nov., a Thermophilic and α -Glucosidase Producing Bacterium Isolated from Kizilcahamam, Turkey, Journal of General and Applied Microbiology, 57, 83-92.
- Collyer, C. A. ve Blow, D. M., 1990. Observations of Reaction Intermediates and The Mechanism of Aldose-Ketose Interconversion by D-Xylose Isomerase, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 87, 1362-1366.
- Demirjian, D.C., Moris-Varas, F. ve Cassidy, C.S., 2001. Enzymes from Extremophiles, Current Opinion in Chemical Biology, 5, 144-151.
- Di Tusa, C. A., Christensen, T., McCall, K. A., Fierke, C. A. ve Toone, E. J., 2001. Thermodynamics of Metal Ion Binding.1.Metal Ion Binding by Wild-Type Carbonic Anhydrase, Biochemistry, 40, 533-534.
- Dupreez, J. C. ve Prior, B. A., 1985. A Quantitative Screening of some Xylose Fermenting Yeast Isolates, Biotechnol. Lett., 7, 241-246.
- Ebrahimpour, A., Rahman, R.N.Z.R.A., Basri, M. ve Salleh, A.B., 2011. High Level Expression and Characterization of a Novel Thermostable, Organic Solvent Tolerant, 1,3-regioselective Lipase from *Geobacillus* sp. Strain ARM, Bioresource Technology, 102, 6972-6981.
- Eveleigh, D.E. ve Montenecourt, B.S., 1979. Increasing Yields of Extracellular Enzymes. Adv. Appl. Microbiol. 25, 57-74.
- Faiz, Ö., 2005. Yeni Bir Termofilik Bakterinin, *Anoxybacillus gonensis* A4, Hücre Dışı Lipaz/Esteraz Yeteneğinin İncelenmesi ve Karakterizasyonu, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Faiz, Ö., 2008. Termofilik *Geobacillus caldoxyloliticus* TK4 suşundan Glukoz İzomeraz Geninin Klonlanması, Ekspresyonu ve Karakterizasyonu, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Faiz, Ö., Colak, A., Kolcuoğlu, Y. ve Ertunga, N.S., 2011. Cloning, Expression and Characterization of Xylose Isomerase from Thermophilic *Geobacillus caldoxysilyticus* TK4 Strain, Turkish Journal of Biochemistry, 36, 1, 6-14.

- Feng L., Wang W., Cheng J., Ren Y., Zhao G., Gao C., Tang Y., Liu X., Han W., Peng X., Liu R. and Wang L. , 2007. Genome and Proteome of Long-Chain Alkane Degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 Isolated from a Deep-subsurface Oil Reservoir, U.S.A., Proc. Natl. Acad. Sci. 104, 5602-5607.
- Fujiwara, S., 2002. Extremophiles: Developments of Their Special Functions and Potential Resources. Journal of Bioscience and Bioengineering. 94, 518-525.
- Gaikwad, S. M., More, M. W., Vartak, H. G. ve Deshpande, V. V., 1988. Evidence for the Essential Histidine Residue at the Active site of Glucose/ Xylose isomerase from *Streptomyces*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 155, 270–277.
- Ghatge, M. S., ve Deshpande, V. V., 1993. Evidence for Specific Interaction of Guanidine Hydrochloride with Carboxy Groups of Enzymes/Proteins. Biochem. Biophys. Res. Commun., 193, 979–984.
- Gül-Güven, R., 2007. Sıcak Su Kaynaklarından Bakteri İzolasyonu, Tanımlanması ve *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *rittmanii*'nin β -galaktozidaz Enziminin Saflaştırılması, Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.
- Haki, GD. Ve Rakshit, Sk., 2003. Developments In Industrially Important Thermostable Enzymes: a Review. Bioresour Technol. 89, 17-34.
- Harhangi, H. R., Akhmanova, A. S., Emmens, R., Van Der Drift, C., De Laat, W. T. A. M., Van Dijken, J. P., Jetten, M. S. M., Pronk, J.T . ve Den Camp, H. J. M. O., 2003. Xylose Metabolism in the Anaerobic Fungus *Piromyces* sp. Strain E2 Follows the Bacterial Pathway, Arch. Microbiol., 180, 134-141.
- Hartley, B. S., Hanlon, N., Jackson, R. J. ve Rangarajan, M., 2000. Glucose Isomerase: Insights into Protein Engineering for Increased Thermostability, Biochim. Biophys. Acta., 1543, 294-335.
- Hausler, H. ve Stutz, A. E., 2001. D-Xylose (D -Glucose) Isomerase and Related Enzymes in Carbohydrate Synthesis, Top. Curr. Chem., 215, 77-114.
- Hahn-Hagerdal, B., , Wahlbom, F. , van Zyl, W.H., Cordero Otero, R. ve Jönsson, L.J., 2001. Metabolic engineering of *Saccharomyces* for xylose utilisation. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 73, 53-84.
- Hess, J. M., Tchernajenko, V., Vieille, C., Zeikus, J. G. ve Kelly, R. M., 1998. *Thermotoga neapolitana* Homotetra-Meric Xylose Isomerase is Expressed as a Catalytically and Thermostable Dimer in *Escherichia coli*, Appl. Environ. Microbiol. 64, 2357-2360.

- Inyang, C. U., Gebhart, U., Obi, S. K. ve Bisswanger, H., 1995. Isolation And Characterization Of A D-Glucose/Xylose Isomerase From A New Thermophilic Strain *Streptomyces* sp. (Plc) Appl. Microbiol. Biotechnol., 43, 632-638.
- Janket, S. J., Manson, J.E., Sesso, H., Buring, J.E. ve Liu, S., 2003. A Prospective Study of Sugar Intake and Risk of Type 2 Diabetes in Women. Diabetes Care, 26, 1008-1015.
- Joo, G. J., Shin, J. H., Heo, G. Y., Kim, Y. M. ve Rhee, I. K., 2005. Molecular Cloning and Expression of a Thermostable Xylose (Glucose) Isomerase Gene, *xylA*, from *Streptomyces chibaensis* J-59, J. Microb., 43, 34-37.
- Karaoğlu, H., 2004. *Anoxybacillus gonensis* Glukoz (D-Ksiloz) İzomeraz Geninin Klonlanması, İzolasyonu ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Kawai, Y., Konishi, H., Horitsu, H., Sakurai, H., Takamizawa, K., Suzuki, T. ve Kawai, K., 1994. Purification and Characterization of D-Xylose Isomerase from *Bifidobacterium dolescentis*, Biosci Biotechnol Biochem., 58, 691-694.
- Keleti, T., Leocini, R., Pagani, R. ve Marinello, E., 1987. A Kinetic Method for Distinguishing Whether an Enzyme has one or two active sites for two different substrates: rat liver L-threonine dehydratase has a single active site for threonine and serine. Eur. J. Biochem., 170, 179-183.
- Kerstens-Hilderson, H., Claeysens, M., Van Doorslaer, E., Saman, E. ve De Bruyne, C.K., 1982. Methods in Enzymology, 83, 631-639.
- Kirk, O., Borchert, T. V. ve Fuglsang, C. C., 2002. Industrial Enzyme Applications, Curr.Opin. Biotechnol., 13, 345-351.
- Kristjansson, M.M. and Asgerisson, B., 2002. Properties of Extremophilic Enzymes and Their Importance in Food Science and Technology. Handbook of Food Enzymology (ed. J.R. Whitaker), NY, USA, p. 77-99.
- Kristo, P., Saarelainen, R., Fagerstrom, R., Aho, S. ve Korhola, M., 1996. Protein purification, and Cloning and Characterization of the cDNA and Gene for Xylose Isomerase of Barley, Eur. J. Biochem., 237, 240-246.
- Koffler, H., 1957. Protoplasmic Differences between Mesophiles and Thermophiles, Bacterial Rev., 21, 227-232.

- Kolcuoğlu, Y., Colak, A., Faiz, O. ve Belduz, A.O., 2010. Cloning, Expression and Characterization of Highly Thermo- and pH- Stable Maltogenic Amylase from a Thermophilic Bacterium *Geobacillus caldxylosilyticus* TK4, Process Biochemistry, 45, 821-828.
- Lama L., Nicolaus, B., Calandrelli, V., Romano, I., Basile, R. ve Gambacorta, A., 2001. Purification and Characterization of Thermostable Xylose (Glucose) Isomerase from *Bacillus thermoantarcticus*, J. Microbial Biotechnol., 27, 234-40.
- Lee, C., Bagdasarian, M., Meng, M. ve Zeikus, J. G., 1990. Catalytic Mechanism Xylose (Glucose) Isomerase from *Clostridium thermosulfurogenes*, J. Biol. Chem. 265,19082-19090.
- Lee, S.G, Hong, S.P., Song, J.J., Kim, S.J., Kwak, M.S. ve Sung, M.H., 2006. Functional and Structural Characterization of Thermostable D-Amino Acid Aminotransferases from *Geobacillus* spp., Applied and Environmental Microbiology, 72, 1588-1594.
- Lehmbacher, A. ve Bisswanger, H., 1990. Isolation and Characterization of an Extremely Thermostable D-Xylose Isomerase from *Thermus aquaticus* HB8, J. Gen. Microbiol., 136, 679-686.
- Li, W. F., Zhou, X. X. ve Lu, P., 2005. Structural Features of Thermozyms, Biotechnol. Adv., 23, 271-281
- Liu, S. Y., Wiegel, J. ve Gherardine, F. C., 1996. Purification And Cloning of A Thermostable Xylose (Glucose) İsomerase With An Acidic pH Optimum From *Thermoanaerobacterium* Strain Jw/S1-Ys 489, J. Bacteriol., 178, 5938-5945.
- Lo, C. Y., Wang, Y., Tan, D., Pan, M. H. ve Sang, S., 2008. Reactive Dicarbonyl Compounds in Carbonated Beverages Containing High Fructose Corn Syrup. Food Chemistry, 107, 1099-1105.
- Marshall, R. O. ve Kooi, E. R., 1957. Enzymatic Conversion of D-glucose to D-fructose, Science, 125, 648-649.
- Misset, O., Labout, J., Wilms, J., Van Eekelen, C.A.G. ve Busnach, H. A., 2001. High Fructose Corn Cyrup. Biotechnological Innovation in Food Processing. Oxford: Butterworth.
- Pubols, M. H., Zahnley, J. C. ve Axelrod, B., 1963. Partial Purification and Properties of Xylose and Ribose Isomerase in Higher Plants, Plant Physiol., 38, 4, 457-461.
- Quax, W.J., 1993. Thermostable Glucose Isomerase, Trende Food Sci. Technol., 4, 31-34.

- Rose, I. A., O'conell, E. L. ve Mortlock, R. P., 1969. Stereochemical Evidence for a Cis-Enediol Intermediate in Mn-Dependent Aldose Isomerases, Biochim. Biophys. Acta., 178, 376.
- Sauve, V. ve Sygush, J., 2001. Molecular Cloning, Expression, Purification and Characterization of Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase from *Thermus aquaticus*, Protein Expression Purif., 21, 293-302.
- Schallmey, M., Singh, A. ve Ward, O. P., 2004. Developments in the Use of *Bacillus* Species for Industrial Production, Can. J. Microbiol., 50, 1-17.
- Sökmen, B.B., 2005. Kayısı (*Armeniaca vulgaris* Lam.) Tohumlarından Lipazın Saflaştırılması ve Çeşitli Taşıyıcılara İmmobilize Edilmesi, Doktora Tezi, İ.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Srinivasan, M. C., Vartak, H. G., Powar, V. K. ve Khire, J. M., 1983. High Activity Extracellular Glucose(Xylose) isomerase from a *Chainia* species. Biotechnol. Lett., 5, 611-614.
- Sripappundh, D., Vieille, C. ve Zeikus, J.G., 2000. Molecular Determinants of Xylose Isomerase Thermal Stability and Activity: Analysis of Thermozyms by Site-directed Mutagenesis. Protein Engineering, 13,259-265.
- Tekedar, H.C. ve Mohamed, G.Ş., 2011. Molecular Cloning, Over Expression and Characterization of Thermoalkalophilic Esterases Isolated from *Geobacillus* sp., Extremophiles, 15, 203-211.
- Vieille, C. ve Zeikus, G. J., 2001. Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability , Microbiol. Mol. Biol. Rev., 65, 1-43.
- Vangrysperre, W., Vandamme, J., Vandekerckhove, J., Debruyne, C. K., Cornelis, R. ve Kerstershilderson, H., 1990. Localization of the Essential Histidine and Carboxylate Group in D-Xylose Isomerases, Biochem. J., 265, 699-705.
- Vongsuvanlert, V. ve Tani, Y., 1988. Purification and Characterization of Xylose Isomerase of a Methanol Yeast, *Candida Boidinii*, Which is Involved in Sorbitol Production From Glucose. Agric. Biol. Chem., 52, 1817-1824.
- Walsh, G., 2002. proteins: Biochemistry and Biotechnology, Wiley, Newyork.
- Wang, P. Y., Johnson, B. F. ve Scneider, H., 1980. Fermentation Of D- xylose by Yeasts Using Glucose Isomerase in The Medium to Convert D-Xylose to D-Xylulose, Biotechnol. Lett., 2, 273-278.
- Weber, P., 1976. Fructose by Isomerisation of Glucose, U.K. Patent, 1, 496, 309

- Wintrode, P. L., Miyazaki, K. ve Arnold, F. H., 2001. Patterns of Adaptation in a Laboratory Evolved Thermophilic Enzyme, Biochim. Biophys. Acta., 1549, 1-8.
- Wiseman, A., 1987. Handbook of Enzymes Biotechnology, Second Edition, John Wiley Sons, New York.
- Wu, S., Liu, B. ve Zhang, X., 2006. Characterization of a Recombinant Thermostable Xylanase from Deep-Sea Thermophilic *Geobacillus* sp. MT-1 in East Pacific, Applied Microbiology and Biotechnology, 72, 1210-1216.
- Yamanaka, K. 1975. D-xylose Isomerase from *Lactobacillus brevis*, Methods Enzymol.,41, 466-471.
- Yanmış, D., 2008. *Anoxybacillus gonensis* G2T Ksiloz İzomeraz Geninin Klonlanması, Gen Ürününün Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Zhu, W., Cha, D., Cheng, G., Peng, Q. ve Shen, P., 2007. Purification and Characterization of a Thermostable Protease from a Newly Isolated *Geobacillus* sp. YMTC 1049, Enzyme and Microbial Technology, 40, 1592-1597.
- URL-1, http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=5.3.1.5, 15 Haziran 2008.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Trabzon'a doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Trabzon'da tamamladı. 2004-2008 yılları arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nde lisans öğrenimi gördü. 2008 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nde yüksek lisans programına başladı. Orta derecede İngilizce bilmektedir.