

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***Anoxybacillus gonensis* G2^T KSILOZ İZOMERAZ GENİNİN KLONLANMASI,
GEN ÜRÜNÜNÜN SAFLAŞTIRILMASI ve KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Derya YANMIŞ

**OCAK 2008
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***Anoxybacillus gonensis* G2^T KSİLOZ İZOMERAZ GENİNİN KLONLANMASI,
GEN ÜRÜNÜNÜN SAFLAŞTIRILMASI ve KARAKTERİZASYONU**

Derya YANMIŞ

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nce
“Yüksek Lisans (Biyoloji)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 07.01.2008
Tezin Savunma Tarihi : 31.01.2008**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ
Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ahmet ÇOLAK**

Enstitü Müdür V. : Doç. Dr. Salih TERZİOĞLU

Trabzon 2008

ÖNSÖZ

Anoxybacillus gonensis G2^T bakterisinde ksiloz izomeraz (=Glukoz izomeraz) enziminin (*AgoG2KI*) klonlanması, saflaştırılması ve karakterizasyonu konulu tez çalışması, kısmen KTÜ Araştırma Fonu 2003.111.4.7 numaralı araştırma projesinden sağlanan imkânlarla, kısmen de 104T472 nolu TÜBİTAK Proje desteği ile KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında, Biyoloji bölümü, Moleküler Biyoloji laboratuvarında yapılmıştır.

Çalışmalarımı yürütürken gerek deneyler sırasında gerekse tezimin yazımı sırasında her türlü değerli bilgisini ve fikirlerini benimle paylaşan ve her türlü desteği benden esirgemeyerek bana yardımcı olan danışman hocam Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ'e, hocam Yrd. Doç. Sabriye ÇANAKÇI'ya sonsuz teşekkürü bir borç bilirim. Tüm yüksek lisans eğitimim sürecinde bana sürekli bir şeyler öğretmeye çabalayan ve sıkıntılı anlarımda yanımda olan hocam Prof. Dr. Edip KEHA'ya, sevgili ağabeyim Hakan KARAOĞLU ve sevgili eşi Handan KARAOĞLU başta olmak üzere arkadaşlarım Dilşat ÇOLAK'a, Mutlu GÜLTEPE'ye, Amerika'da olmasına rağmen desteğini yanımda hissettiğim Uğur UZUNER'e, Pınar YEŞİLGİL'e, Esra ERBAŞ'a, Fulya AY'a, Murat KAÇAĞAN'a, Zeliha CEVHER'e, Kadriye İNAN'a, Elif SEVİM'e, yine maddi ve manevi her türlü desteklerini benden esirgemeyen hocalarım Yusuf BEKTAŞ'a, Cemal SANDALLI'ya ve Fatih Şaban BERİŞ'e teşekkür ederim. Cihaz kullanımında gösterdikleri anlayışın yanı sıra bilgi ve deneyimlerini de her fırsatta benimle paylaşan tüm Biyoloji Bölümü Laboratuvarları Hocaları ve çalışanlarına, Kimya Bölümü Biyokimya Laboratuvarı hocaları ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Ayrıca bana her zaman inanan ve her zaman varlıklarıyla bana güç veren, haklarını hiç bir zaman ödeyemeyeceğim sevgili annelerime, babama, protein saflaştırma çalışmalarına yardımcı olan ablam Nuriye EFE başta olmak üzere tüm kardeşlerime, tüm akrabalarım ve dostlarıma teşekkür ederim. Varlıklarıyla ve neşeleriyle beni aydınlatan sevgili Biyoloji Bölümü ve Biyoloji Öğretmenliği Bölümü öğrencilerine teşekkür ederim.

Son olarak her zaman yaptıklarıyla ve varlığıyla onurlandığım, yaptıklarımla ve varlığımla onurlandırmaya çalıştığım en iyi dostum, hayat arkadaşım, sevgili eşim Yalçın YANMIŞ'a yaptığı her şey için sonsuz teşekkür ederim.

Derya YANMIŞ
Trabzon 2008

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER	III
ÖZET	VI
SUMMARY	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ	IX
SEMBOLLER DİZİNİ	X
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Ksiloz İzomeraz'ın Önemi	3
1.2.1. Tatlandırıcı Olarak Yüksek İçerikli Fruktoz Şurubunun (HFCS) Avantajları	3
1.2.1.1. HFCS (High Fructose Corn Syrup) Üretimi	4
1.2.2. Etanol Üretimi	5
1.3. KI Elde Edilebilen Organizmalar	5
1.4. KI Üretimi	6
1.4.1. Enzimin Veriminin Arttırılması	6
1.4.2. Fermentasyon Ortamının Optimizasyonu	9
1.4.2.1. İndükleyici	9
1.4.2.2. Azot kaynağı	9
1.4.2.3. pH ve Sıcaklık Optimizasyonu	10
1.4.2.4. Metal İyon Gereksinimi	10
1.4.3. Ksiloz İzomeraz'ın İmmobilizasyonu	11
1.4.3.1. Hücreden Çıkarılmış Enzimin İmmobilizasyonu	11
1.4.3. Tüm Hücre İmmobilizasyonu	12
1.4.4. Ksiloz İzomeraz'ın Saflaştırılması	12
1.5. Glukoz İzomerazın Özellikleri	13
1.5.1. Substrat Spesifikliği	13
1.5.2. Metal İyonu Gereksinimi ve İnhibitörler	13

1.5.3.	Alt Ünite Yapısı	14
1.5.4.	Optimum Sıcaklık ve pH	14
1.5.5.	Aktif Bölge Çalışmaları	15
1.6.	KI'nın Çalışma Mekanizması	15
1.6.1.	Ksiloz İzomeraz'ın Kimyasal Modifikasyonu	16
1.6.2.	X-Işını Kristallografisi.....	17
1.6.3.	İzotopik Değişim.....	18
1.6.4.	Trioz-fosfat İzomeraz ile Ksiloz İzomeraz'ın Karşılaştırılması	18
1.7.	GI'nın Genetik Mühendisliği	19
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR	20
2.1.	Kullanılan Kimyasallar	20
2.2.	<i>Anoxybacillus gonensis</i> G2 ^T 'de KI Varlığının Belirlenmesi	20
2.3.	<i>Anoxybacillus gonensis</i> G2 ^T 'de KI Geninin Baz Diziliminin Belirlenmesi.....	20
2.3.1.	Genomik DNA izolasyonu	20
2.3.2.	Genin Baz Diziliminin Ters PCR (inverse PCR) Yöntemi ile Belirlenmesi	21
2.3.3.	Genin pET-28a(+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması.....	22
2.4.	Gen Ürününün Elde Edilmesi ve Saflaştırılması	24
2.4.1.	Karakterizasyon Deneğinde Kullanılan KI Aktivite Deneyi	24
2.4.2.	Protein Tayini.....	24
2.4.3.	Hücre Üretimi.....	25
2.4.4.	Hücrelerin Patlatılması ve Protein Ekstratının Elde Edilmesi	25
2.4.5.	KI'nın Saflaştırılması	26
2.4.5.1.	Isı Şoku Uygulaması.....	26
2.4.5.2.	İyon Değişimi Kromatografisi	26
2.4.5.3.	Hidroforobik Etkileşim Kromatografisi.....	27
2.5.	KI'nın Karakterizasyonu	27
2.5.1.	Deneğinde Kullanılacak Enzim Miktarının Belirlenmesi	27
2.5.2.	Enzim Kinetiği	28
2.5.3.	Optimum Sıcaklık.....	28
2.5.4.	Optimum pH	28
2.5.5.	Isıl Kararlılık.....	29
2.5.6.	pH Kararlılığı	29
2.5.7.	Aktivatör Etkisi	29

2.5.8.	İnhibitör Etkisi	30
2.5.9.	HPLC İle Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi	30
3.	BULGULAR	31
3.1.	KI Aktivitesi.....	31
3.2.	<i>Anoxybacillus gonensis</i> G2 ^T KI Geninin Baz Diziliminin Açığa Çıkarılması	31
3.3.	Genin pET-28a(+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması.....	32
3.4.	KI'nın Saflaştırılması	33
3.4.1.	Hücre Özütü Elde Edilmesi ve Isı Şoku Uygulamaları	33
3.4.2..	İyon Değişimi Kolon Kromatografisi	33
3.4.3..	Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi	34
3.5.	KI'nın Karakterizasyonu	35
3.5.1.	Deneyleerde Kullanılacak Enzim miktarının Belirlenmesi.....	35
3.5.2.	Enzim Kinetiği	35
3.5.3.	Optimum Sıcaklık.....	37
3.5.4.	Optimum pH	38
3.5.5.	Isıl Kararlılık	39
3.5.6.	pH Kararlılığı	40
3.5.7.	Aktivatör Etkisi	41
3.5.8.	İnhibitör Etkisi	42
3.5.9.	HPLC ile Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi	43
3.5.9.	İzoelektrik Noktası Tayini	43
4.	TARTIŞMA	44
5.	SONUÇLAR	48
6.	ÖNERİLER.....	50
7.	KAYNAKLAR	51
8.	EKLER	57
ÖZGEÇMİŞ		

ÖZET

D-ksiloz izomeraz (D-ksiloz ketol-izomeraz, E.C. 5.3.1.5) yaygın olarak D-glukoz izomeraz olarak da adlandırılır. Ksiloz izomeraz (KI) hücre içinde D-ksilozun D-ksiluloza izomerizasyonunu, hücre dışında D-glukozun D-fruktoza izomerizasyonunu katalizler. KI, endüstriyel olarak oldukça önemli bir enzimdir. Çünkü enzim hem D-glukozu D-fruktoza izomerize ederek HFCS üretiminde kullanılır hem de D-ksilozu alkole fermente olabilen D-ksiluloza izomerize etmesi nedeniyle önemlidir. Sahip olduğu yüksek ticari önem nedeniyle enzimin mikroorganizma kaynakları, özellikleri, çalışma mekanizması, özelliklerinin iyileştirilmesi ve immobilizasyonu gibi konular yoğun bir şekilde çalışılmaktadır.

Gönen Kaplıca'sından izole edilmiş termofilik bir mikroorganizma olan *Anoxybacillus gonensis* G2^T KI aktivitesine sahiptir.

Bu çalışma; *Anoxybacillus gonensis* G2^T KI pET-28a(+) ekspresyon vektörüne klonlanmasını, gen ürününün ekspres edilmesini, saflaştırılmasını ve saf enzimin biyokimyasal özellikleri belirlenmesini içermektedir.

Bu çalışmada, KI gen ürünü *E. coli* BL21(DE) suşunda ekspres edildikten sonra ışı şoku, iyon değişimi kolon kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulamalarıyla saflaştırıldı ve elde edilen saf enzim karakterize edildi. Enzimin optimum çalışma sıcaklığı 85°C, optimum pH değeri 6,5 olarak bulundu. K_m değeri 25 ±2 mM olarak, V_{max} değeri 0,12958±0,002 µmol/dk olarak bulundu. Enzimin aktivite göstermek için Co^{2+} , Mg^{2+} ve Mn^{2+} metal iyonlarından en az birine ihtiyaç duyduğu, ancak en yüksek aktiviteyi Mn^{2+} varlığında gösterdiği bulundu. Ca^{+2} , Hg^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} ve Cu^{+2} bivalent metal iyonlarının inhibitör etki gösterdiği belirlenmiştir. Enzimin optimum çalışma sıcaklığı olan 85°C'de (pH 6,5), 50 saat sonunda enzim aktivitesinin yarıya düştüğü, pH 6 ve 6,5'da (4°C) enzimin aktivitesini kaybetmediği belirlendi. Enzimin moleküler ağırlığı HPLC ile 180 kDa olarak belirlendi.

Anahtar kelimeler: *Anoxybacillus gonensis*, D-ksiloz izomeraz, enzim saflaştırma, enzim karakterizasyonu

SUMMARY

Cloning of *Anoxybacillus gonensis* G2^T Xylose Isomerase Gene and Purification and Characterization of Gene Product

D-xylose isomerase (D-xylose ketol isomerase; E.C. 5.3.1.5) is commonly referred to as D-glucose isomerase. It catalyzes intracellular isomerization of D-xylose to D-xylulose and extracellular isomerization of D-glucose to D-fructose. XI is an industrially important enzyme since it has capacity to produce a high-fructose corn-enriched syrup (HFCS) by the isomerization of D-glucose to D-fructose. KI has also being examined for the isomerization of D-xylose to D-xylulose, which can be fermented to ethanol. Because of the industrial value of this enzyme, microbial sources of the enzyme, biochemical properties, mechanism of action, improvement of properties, and immobilization have being extensively examined.

Anoxybacillus gonensis G2^T, a thermophilic microorganism isolated from Gönen Thermal Springs, owns activity of XI.

In the present work, *Anoxybacillus gonensis* G2^T *xylA* gene was cloned into pET-28a(+) expression vector. Gene product was expressed and purified. The biochemical properties of the enzyme was determined.

In the present work; after the gene product was expressed in *E.coli* BL21(DE), XI was purified by classical purification methods such as heat treatment, ion-exchange chromatography and hydrophobic-interaction chromatography. The pure enzyme was characterized. The optimum temperature for enzyme activity was 85 °C, the optimum pH for enzyme activity 6,5. K_m and V_{max} values for xylose were 25±2 mM and 0,12958±0,002 µmol/dk respectively. It was found that at least one of the divalent metallic cations Co²⁺, Mg²⁺, and Mn²⁺ was essential for activity of xylose isomerase. In addition to these results, the maximum activity of the enzyme was observed in the presence of Mn²⁺. Ca⁺², Hg⁺², Ni⁺², Zn⁺², Fe⁺², and Cu⁺² were determined as inhibitors for activity of XI. It was found that at the end of 50 hours at 85 °C (pH 6,5) XI lost half of its activity and the enzyme was stable at pH 6 and 6,5 at 4 °C. Molecular weight of enzyme was determined by HPLC as 180 kDa.

Key Words: : *Anoxybacillus gonensis*, D-xylose isomerase, enzyme purification, characterization

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. D-glukozun D-fruktoza, D- ksilozun da D- ksiluloza KI aracılığıyla dönüşümlü izomerizasyonu	1
Şekil 2. Hidrit Kayması Mekanizması.....	16
Şekil 3. İyon Değişimi Kromatografisi Sonrası Aktivite Görülen Fraksiyonların SDS-PAGE’de Jel Görüntüsü	33
Şekil 4. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi Sonrası Aktivite Görülen Fraksiyonların SDS-PAGE’de Jel Görüntüsü	34
Şekil 5. Enzim Miktarı-KI Aktivite Grafiği	35
Şekil 6. <i>A. gonensis</i> G2 ^T KI’sının ksiloz varlığında Michaelis-Menten Grafiği	36
Şekil 7. <i>A. gonensis</i> G2 ^T KI’sının ksiloz varlığında Lineweaver-Burk Grafiği	36
Şekil 8. Optimum Sıcaklık - Aktivite Grafiği.....	37
Şekil 9. pH - KI Aktivite Grafiği	38
Şekil 10. KI’nın Sıcaklık Kararlılığının Zamana Karşı Değişim Grafiği.	39
Şekil 11. KI’nın pH Kararlılığının Zamana Karşı Değişim Grafiği	40
Şekil 12. KI Aktivitesi Üzerine Farklı Konsantrasyonlardaki Farklı Metal İyonlarının Aktivatör Etkisi	41
Şekil13. KI Aktivitesi Üzerine Farklı Metal İyonlarının inhibitör etkisi.....	42

TABLULAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Çeşitli mikroorganizmalardan elde edilen KI'nın verimliliği	7
Tablo 2. KI üreten mikroorganizmalar	8
Tablo 3. İnverse PCR Primerleri	22
Tablo 4. <i>A. gonensis</i> G2 ^T , <i>Saccharococcus caldxylosilyticus</i> , ve <i>E.coli</i> HB101 suşunda KI aktivitesi	31
Tablo 5. <i>A. gonensis</i> G2 ^T KI 'nın Saflaştırma Tablosu.....	34
Tablo 6. <i>A. gonensis</i> G2 ^T KI 'ya Farklı Metal İyonlarının Farklı Konsantrasyonlarda İkili Etkisi.....	42

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

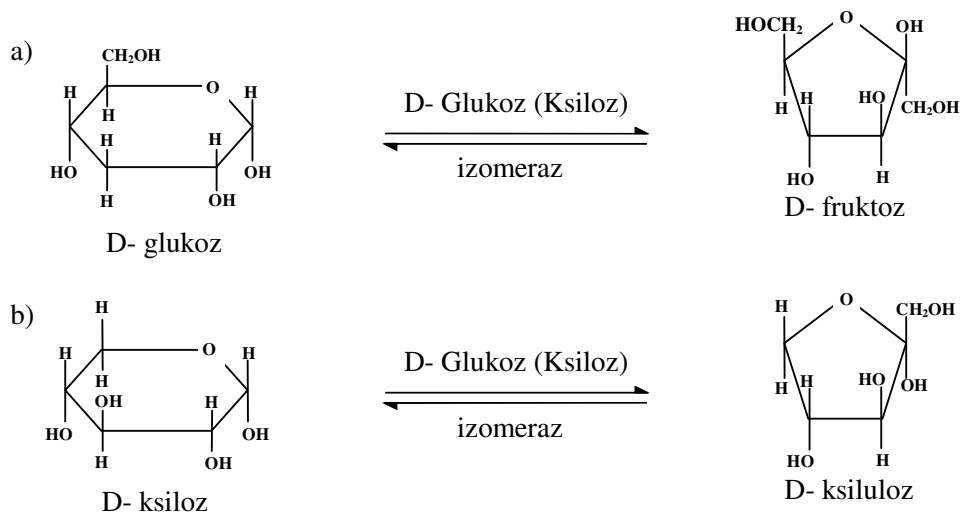
AgoG2KI	: <i>A. gonensis</i> G2 ^T Ksiloz İzomeraz
BSA	: Sığır Serum Albumini
dNTP	: Deoksinükleotit Trifosfat
G2 ^T	: G2 izolatu Tip Suşu
GI	: Glukoz izomeraz
HFCS	: Yüksek içerikli Fruktoz Şurubu (High Fructose Corn Syrup)
KI	: Ksiloz İzomeraz
MOPS	: 3-(N-morfolino) propanosülfonik asit
NAD	: Nikotin Amid Adenindinükleotit
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
TE	: Tris-EDTA Tamponu
UV	: Ultraviyole

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

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

Ksiloz izomeraz (KI), amilaz ve proteazın içinde bulunduğu dünya enzim endüstrisinin en yüksek tonajlı üç enziminden biridir (Bhosale ve ark., 1996). Wiseman'a göre Glukoz izomeraz gelecekte tüm endüstriyel enzimler içinde en önemli enzim olabilir (Wiseman, 1975). Bu enzim, adlandırılmasından da anlaşıldığı gibi D-glukozun D-fruktoza, D-ksilozunda D-ksiluloza dönüşümlü olarak izomerizasyonunu katalizler (Şekil1).



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

Ksilozun ksiluloza dönüşümü çürümüş bitki materyalleri üzerinde yayılım gösteren saprofitik bakterilerin beslenmede kullandıkları bir reaksiyondur. Ayrıca bu reaksiyon hemiselülozun etanole dönüşmesine de yardımcı olur. Glukozun fruktoza izomerizasyonu yüksek-fruktoz mısır şurubu (=High Fructose Corn Syrup: HFCS) üretiminde kullanıldığı için büyük bir ticari öneme sahiptir. 1976 yıllarına kadar dünyada kullanılan ana tatlandırıcı kaynağı %40'ı şeker pancarından, %60'ı şeker kamışından üretilen sukrozdu. Ancak glukoz izomerizasyonunun başarılı bir şekilde keşfedilmesi günümüzde yaygın olarak kullanılan tatlandırıcıların yani fruktoz şuruplarının kökenini oluşturmuştur. Glukoz izomeraz kullanarak HFCS üretimi ilk olarak Japonya'da gerçekleştirilmiştir. 1958'deki Küba Devrimi'nden sonra Amerika'da ortaya çıkan sukroz kaynağı sıkıntısından sonra HFCS üretimine çare olarak başvurulmuştur. O yıllardan günümüze kadar GI en önemli endüstriyel enzimlerden biri olma özelliğini sürdürmektedir.

1957 yılında Marshall ve Kooi tarafından *Pseudomonas hydrophila*'dan izole edilen enzimin glukoz izomerizasyon kapasitesinin keşfi, şeker kamışından tatlandırıcı üretiminin yerini HFCS üretiminin almasının başlangıç noktası olmuştur (Marshall ve ark., 1957). Enzimin ilgisinin glukozdan 160 kat daha düşük olmasına rağmen, sahip olduğu kapasite enzimin ticari olarak önemli olmasına yetmiştir. Enzim üretimi için büyüme ortamında ksiloza ihtiyaç duyulmuştur, arsenatın varlığı ise enzim üretimini arttırmıştır. Daha sonra, ksilozdan bağımsız bir ksiloz izomeraz aktivitesi *Escherichia intermedia*'da bulunmuştur (Natake ve ark., 1964). Bu enzim sadece arsenat varlığında fosforillenmemiş şekerleri izomerize eden bir fosfoglukoz izomerazdır (E.C.5.3.1.9.). Takasaki ve Tanabe, glukozu özel, NAD bağlı bir glukoz izomerazı *Bacillus megaterium* AI'dan izole etmiştir (Takasaki ve ark., 1962; Takasaki ve ark. 1963). Hem glukozun hem mannozun fruktoza izomerizasyonu sağlayan benzer bir glukoz izomeraz *Paracolobacterium aerogenoides*'ten izole edilmiştir (Takasaki ve ark., 1964; Takasaki ve ark., 1966). Heterolaktik asit bakterilerinin ürettiği glukoz izomeraz indükleyici olarak ksiloza ihtiyaç duymaktadır ve yüksek sıcaklıklarda çok kararsızdır. Tüm bu glukoz izomeraz tipleri içinde ticari kullanım için en uygun olan enzim E.C. 5.3.1.5. kodlu enzimdir. Bu enzim sıcaklığa karşı kararlıdır ve aktivite göstermek için NAD⁺ veya ATP gibi pahalı kofaktörlere ihtiyaç duymaz. Enzimatik glukoz izomerizasyonu endüstriyel ölçekte ilk defa 1967'de Amerika'da Clinton Corn Processing tarafından başarılmıştır. İmmobilize GI ticari olarak 1974'de üretilmiştir. HFCS'ye duyulan ihtiyacın iyice artmasıyla 1980'li yıllarda Batı Dünyası'daki büyük nişasta işleme işletmeleri GI

teknolojilerine zorunlu olarak geçiş yapmışlardır. Günümüzde, GI yiyecek endüstrisinde büyük bir ticaret hacmine sahiptir (Bhosale ve ark., 1996).

Enzimin katalizlediği diğer bir reaksiyon olan ksilozun ksiluloza izomerizasyonu da endüstriyel olarak potansiyel uygulama alanı bulabilecek bir özelliktir. D-ksiloz, bakteriler, mayalar ve mantarlar tarafından fermente edilebilen lignoselülotik biokütlenin temel bileşenidir (Walfrıdsson ve ark., 1996). Bakteriler ksilozu ilk olarak ksiluloza izomerize ederek kullanırlar ve bu süreci ksiloz izomeraz enzimi ile pentoz fosfat yoluna girmeden önce gerçekleştirirler. Yeryüzündeki bitki biokütlesinin neredeyse % 40'ı hemiselülozdur ve birçok mikroorganizma tek karbon kaynağı olarak hemiselülozu kullanarak bu biokütlenin üzerinde yaşar (Lama ve ark., 2001). Hücre dışı enzimler polimerleri D-ksilozu parçalarlar. D-ksiloz ise hücre içine taşınarak D-ksiluloza izomerize edilir. Daha sonra D-ksiluloz, D-ksiluloz-5-fosfat'a fosforile edilerek ya pentoz fosfat yoluna (Dekker ve ark., 1976) ya da fosfoketoz yoluna (Lama ve ark., 2001) girer.

KI endüstriyel olarak çok önemli bir enzim olduğu için, bu enzim hakkındaki birçok bilgi patentlenmiştir. Ancak enzim yoğun olarak çalışıldığı için, literatürde de birçok çalışmaya rastlamak mümkündür.

1.2. Ksiloz İzomeraz'ın Önemi

KI, gelişmiş biyokimyasal, protein ve genetik mühendisliği yöntemleriyle yapısı ve fonksiyonları arasındaki ilişki çalışılmaya uygun bir enzimdir. Bu nedenle akademik olarak ilginç bir çalışma modeli sunar. Bunun yanında hemiselülozdan alkol üretimi konusunda uygulama potansiyelinin olması ve HFCS üretimindeki kullanımı nedeniyle ilgiyle araştırılmaktadır.

1.2.1. Tatlandırıcı Olarak Yüksek İçerikli Fruktoz Şurubunun (HFCS) Avantajları

Saf şekerin üretiminin maliyetinin çok yüksek olması, sükroz tüketiminin insan sağlığı üzerine olan olumsuz etkileri, saf şeker talebin artmasına rağmen sükrozun yerini alabilecek başka bir seçeneğin araştırılmasını zorunlu hale getirmiştir. Sakkarin, siklamat, asesülfam-K, aspartam ve taumatin gibi kalorisiz ve karbonhidrat olmayan yapay birçok tatlandırıcı keşfedilmiştir. Ancak sağlık uzmanları tarafından sahip oldukları

sakıncalar farkedilmiştir ve kullanımları bu nedenle reddedilmiştir. Aspartam meşrubatlarda kullanıldığında uzun süre depolama sonrası bir süre sonra meşrubatın tadında azalma meydana geldiği gözlenmiştir. Çünkü aspartam düşük pH'da yavaş yavaş hidrolize olmaktadır. İdeal bir protein tatlandırıcı olan taumatin sükrozdan 2000 kat daha tatlıdır. Ancak sahip olduğu hoş olmayan tat nedeniyle kullanılamamaktadır. HFCS, glukoz ve fruktozun eşit miktarlarının karışımı yani (1:1) oranıyla karışımı sükrozdan 1,3 kat, glukozdan 1,7 kat daha tatlıdır. Glukozun tatlandırma kapasitesi sükrozun tatlandırma kapasitesinin %70-75'i kadardır. Fruktozun tatlandırma kapasitesi ise sükrozun iki katıdır (Barker, 1976). HFCS tamamen tatsız olan nişastadan üretilmektedir. Tatlandırma gücü değerlendirilerek karşılaştırma yapılırsa HFCS sükrozdan %10-20 daha ucuzdur. HFCS'nin sükroz gibi kristallenme problemine sebep olmaması diğer bir tercih nedenidir. Tüm bunlara ek olarak, D-fruktoz diabetik tatlandırıcı olarak da çok önemli bir rol oynar. Çünkü sadece fruktoz midede oldukça yavaş bir biçimde emilir ve kandaki glukoz seviyesine herhangi bir etkide bulunmaz.

1.2.1.1. HFCS Üretimi

Zenginleştirilmiş HFCS'nin (%55 fruktoz) meşrubat üreticileri tarafından sükrozun yerine tercih edilmesiyle HFCS pazarı basamak basamak büyümüştür. Amerika'da HFCS üretimi için en çok kullanılan ham madde ıslak öğütme yöntemiyle üretilmiş mısır nişastasıdır. Nişastadan HFCS üretimi işlemi 3 ana basamaktan oluşur: (i) Nişastanın alfa-amilaz kullanılarak sıvılaştırılması (ii) Nişastanın amiloglukozidaz ve bir parçalayıcı enzim kullanılarak şekerleştirilmesi (iii) Glukoz izomeraz kullanılarak glukozun fruktoza izomerizasyonu. Bu işlem basamakları sonucunda sükrozdan çok daha fazla tatlandırma kapasitesine sahip glukoz ve fruktoz karışımından oluşan mısır şurubu elde edilir. Buğday ve pirinç farklı bölgelerde az miktarda kullanılan diğer nişasta kaynaklarıdır. HFCS üretiminin maliyetine karar verirken mısır öğütme yönteminin yan ürünleri önemlidir. Dünya yıllık HFCS tüketiminin 1995'te kuru ağırlık olarak 10 milyon tona ulaştığı tahmin edilmektedir (deRaadt ve ark., 1994). Günümüzde Amerika'da neredeyse HFCS sükrozun yerini tamamen almıştır.

1.2.2. Etanol Üretimi

KI, hem hücre içinde ksilozun izomerizasyonunu hem de hücre dışında glukozun izomerizasyonunu katalizler. Enzimin bu özelliği mayalar tarafından alkole fermente edilebilen ksilulozun ksilozdan izomerize edilerek üretilmesinde kullanılır. Fossil yakıtların hızla tükenmekte olduğu göz önüne alınırsa, yenilenebilir biokütlenin fermentasyon yolu ile alkol üretiminin ham maddesi olabilecek şekerlere dönüştürülebilmesi oldukça önemli bir olaydır. Biyokütle %40 selüloz, %30 hemiselüloz ve %30 ligninden oluşur. En ekonomik şekilde biyoetanol üretimi selüloz ve hemiselülozun glukoz ve ksiloza hidrolizi ve bunların hemen ardından mayalarla alkole fermente edilmesi şeklinde gerçekleştirilebilir. Günümüze kadar, araştırma çalışmaları yoğun bir şekilde selülozun biyolojik indirgenmesi üzerine yoğunlaşmıştır. Daha sonra lignoselülozun ve tarımsal suların biyolojik indirgenmesinin etkili bir şekilde biokütlenin hemiselüloz bileşenlerini üretebildiğinin fark edilmesi, dikkatin hemiselüloz fermentasyonuna kaymasına neden olmuştur (Wang ve ark., 1980). Ksilan, hemiselülozun ana bileşenidir ve $\beta(1,4)$ bağlarıyla birbirine bağlanmış ksiloz birimlerinden oluşur. D-ksiloz ksilanın enzimatik veya asidik parçalanmasıyla kolayca üretilebilir. *Saccharomyces cerevisiae* gibi endüstriyel maya türleri genellikle heksozları verimli bir şekilde fermente edebilirler, fakat D-ksiloz bu fermentasyon sonucunda üretilmemiş olur. *Pachysolen tannophilus*, *Pichia stipitis*, *Candida utilis* ve *Candida shehatae* gibi birkaç maya türü oksidoredüktatif yollarla pentozlar üretebilirler. Ancak bu organizmaların fermentasyon miktarları oldukça düşüktür (duPreez ve ark., 1985). Ayrıca, bu organizmaların etanole olan düşük toleransı ve oksijenin varlığında etanolü katabolize etmeleri, bu mayaların ticari uygulamalarda kullanılmasını engeller (duPreez ve ark., 1987). KI, ksilozdan ksiluloz üretilmesinde de kullanılır, ancak ksiluloz *Saccharomyces cerevisiae* gibi mayaların ksilozu alkole fermentasyonunu sağlayan metabolik yol için bir engelleyicidir (Chaing ve ark., 1981). D-ksilozun D-glukoza göre alkole fermentasyon oranı çok daha düşük olmasına rağmen bugün bilimsel araştırmalar KI geninin mayalara aktarılmasıyla ksilozun alkole kendiliğinden fermentasyonunun sağlanması üzerine yoğunlaştırılmıştır.

1.3. KI Elde Edilebilen Organizmalar

KI, prokaryotlar arasında oldukça yaygın bir şekilde bulunmaktadır. *Pseudomonas hydrophila*'da keşfinden sonra, bir çok bakteri ve *Actinomycetes* türünde arsenat

yokluğunda KI aktivitesi belirlenmiştir. Heterolaktik asidik bakterilerden *Lactobacillus brevis* en yüksek miktarda enzimi ürettiyordu. Fakat bu enzim düşük pH'da aktif olmasına rağmen yüksek sıcaklıkta kararlı olmadığından ekonomik uygulamalar için uygun bir enzim değildi. KI'nın hücre dışına salgılanması çok nadir rastlanan bir durum olmuştur. Hücre dışı KI'nın *Streptomyces glaucescens* ve *S. flavogriseus* tarafından üretildiği bildirilmiştir (Batt ve ark., 1986; Beck ve ark., 1988). Bu organizmalarda enzimin hücreden salınması, hücre duvarının kısmi parçalanması ve hücre duvarı geçirgenliğinin değişmesinde görev yapar. Bir hücre dışı KI *Chania* sp. (Bejar ve ark., 1994) ve bir alkolotermofilik olan *Bacillus* sp.'den (Bengston ve ark., 1974) iyon-değişimi kromatografisi, jel filtrasyonu kromatografisi gibi bir dizi saflaştırma tekniğiyle saflaştırılmıştır. Birçok *Bacillus* ve *Streptomyces* türü iyi KI üreticisidirler. KI'nın, *Candida utilis* ve *Candida boidinii* gibi birkaç mayada bulunduğu belgelenmiştir (Blacklow ve ark., 1988; Blow ve ark., 1990). *Aspergillus oryzae* KI aktivitesine sahip olduğu bildirilmiş tek mantardır. KI'nın arpa maltında ve buğday tohumunda da varlığı rapor edilmiştir (Blow ve ark., 1992; Bogumil ve ark., 1993). Bazı KI üreticileri Tablo-2'de verilmiştir. KI, ticari olarak çok büyük bir öneme sahip olduğu için yeni bulunan birçok KI üreticisi organizma ve bu organizmalarla geliştirilmiş süreçler hakkındaki bilgileri patent altına almıştır (Boguslawski ve ark., 1982; Bok ve ark., 1984; Bor ve ark., 1992; Briggs ve ark., 1984).

1.4. KI Üretimi

Endüstriyel uygulamalar için ksiloz izomeraz seçerken göz önünde bulundurulmuş en önemli kriterlerden biri enzimin üretim maliyetidir. Bu yüzden ksiloz izomeraz üretmek için gerekli fermantasyon şartlarını en uygun ve en ekonomik hale getirmek için oldukça yoğun çalışmalar yapılmıştır. Araştırmalar üç temel noktaya odaklanmıştır: 1) Enzimin verimliliğinin artırılması 2) Fermantasyon ortamının hem ksilozun yerine kullanılacak daha ucuz bir ham maddenin kullanılarak hem de Co^{2+} iyonları ortamdaki kaldırılmasını sağlayarak optimize edilmesi 3) Enzimin immobilize edilmesi.

1.4.1. Enzimin Verimliliğinin Artırılması

Tablo 1'de KI üreten birçok organizmadan ve sahip oldukları KI verimliliklerinden bazı örnekler verilmiştir. KI üretim verimlilikleri 1,000'den 35,000 U/L'ye kadar çeşitlilik

gösterir. Enzimin sahip olduğu özelliklerin iyileştirilmesi ve verimliliğinin artırılabilmesi için geleneksel mutasyonlar ve rekombinant DNA teknolojisi yöntemleri kullanılmıştır. Ticari öneme sahip birçok suş enzim üretim seviyesini arttırmak ve enzim üretimini sürekli kılmak için birçok mutasyona uğratılmışlardır. *Streptomyces wedmorensis*'in etilenamin ve N-metil-N-nitro-N-nitrozguanidin ile mutasyona uğratılmasıyla enzim üretim seviyesi %60 artırılmıştır (Brownell, 1982). *Streptomyces olivochromogenes*'in UV ile mutasyona uğratılması mutant suşta %70 aktivite artışı sağlamıştır (Bucke, 1981). *Bacillus coagulans*'un 2-deoxyglukoza dayanıklılığı baz alınarak elde edilen mutantlarının aktivitesi ana hücrenin iki katı aktivite gösterir. En yüksek verimliliği laktozda gösteren iki kat verimli sürekli mutantlardan birinin glukoz üzerinde ksilozdan daha yüksek verim verdiği Lee tarafından bildirilmiştir (Bucke, 1983). *Streptomyces acidodurans*'a çoklu UV ışınları uygulayarak birçok sürekli ve verimli enzim üreten mutantlar izole edilmişlerdir (Callens, 1988). Mutantlardan biri etil metansülfonat ile elde edilmiştir. Bu mutant sadece glukoz üzerinde büyütüldüğünde aynı koşullarda ana hücre 10 U ml⁻¹ üretirken, 1,500 U ml⁻¹ üretmiştir (Bok ve ark., 1984).

Ayrıca suşların genetik manipulasyonlarla geliştirilmeleri mümkündür. Rekombinant DNA teknolojisi arzu edilen proteinin geninin izole edilmesi ve manipule edilmesi konusunda oldukça başarılı yöntemlere sahiptir. Günümüzde endüstriyel enzimlerin %50'den fazlası genetik olarak değiştirilmiş mikroorganizmalardan elde edilmektedir (Callens ve ark., 1986).

Tablo 1. Çeşitli mikroorganizmalardan elde edilen KI'nın verimliliği

Organizma	Verim (U/litre)	Deneme Sıcaklık pH (C°)		Kaynaklar
<i>Actinoplanes missouriensis</i>	2,500-35,200	75	7,0	Anheuser-Busch Inc., 1974
<i>Bacillus licheniformis</i>	10,500	70	-	Boguslawski ve Rynski, 1982
<i>Streptomyces wedmorensis</i>	560-2500	70	7,2	duPreez ve ark., 1987
<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	4,800-11,440	60	7,5	Armbruster ve ark., 1973

Tablo 2. KI üreten mikroorganizmalar

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

1.4.2. Fermentasyon Ortamının Optimizasyonu

KI genellikle havalandırılmalı fermentasyon ortamlarında üretilir. Fermentasyon ortamının optimizasyonu, KI üretimi için ekonomik olarak uygun olan en iyi koşulları bulmak için oldukça yoğun çalışılmıştır. Araştırmalar özellikle 1) ksiloz yerine kullanılabilinecek daha ucuz bir indükleyicinin bulunması 2) Enzim verimi üzerine daha ucuz azot kaynaklarının etkisinin değerlendirilmesi 3) Maksimum enzim üretimi için pH ve sıcaklık optimizasyonunun yapılması 4) Fermentasyon ortamında Co^{2+} iyonları yerine başka bivalent metal iyonlarının kullanılması, konuları üzerine yoğunlaşmıştır. Farklı mikroorganizmaların tümü için birden kullanılabilinecek tek bir mükemmel fermentasyon ortamı kompozisyonu yoktur. Her organizmanın maksimum enzim üretimi için ihtiyaç duyduğu fermentasyon ortamı kendine hastır (Callens ve ark., 1988).

1.4.2.1. İndükleyici

KI üreten organizmaların çoğu enzim üretimi için zorunlu olarak D-ksiloz indüklemesine ihtiyaç duyarlar. Ancak, ksiloz hem pahalıdır hem ticari amaçla kullanım için pratik değildir. Nişasta, glukoz, sorbitol veya gliserol ksilozun yerine %75'lik verimle kullanılabilir (Carrell, 1989). Takasaki ve Tanabe *Streptomyces* YT-5 suşunun ksilan üzerinde veya ksilan içeren mısır koçanı veya buğday kepeği üzerinde büyüyebildiğini bildirmiştir (Callens ve ark.,1988). GI üreten organizmalardan hangisinin seçileceği hangisinin daha ucuz ortamda büyüdüğüne bakılarak yapılır. Günümüzde, birçok organizma ksiloz yerine glukozu kullanan KI üretmektedir. Bunlar arasında *Actinoplanes* suşları, *Bacillus coagulans*'ın mutant suşları ve *Streptomyces olivochromogenes* vardır. İndükleyici olarak ksiloza ihtiyaç duymayan organizmalar üretmek için kullanılan başka bir yaklaşım KI üreten mutantlar oluşturmaktır. Başka bir yaklaşım ise, *xyIA* genini güçlü *Streptomyces* promotorunun önüne klonlamaktır.

1.4.2.2. Azot Kaynağı

Azot kaynağı her enzim üreten kaynak için ayrı ayrı optimize edilmesi gereken çok önemli bir faktördür. GI üretimi için genellikle karışık azot kaynakları kullanılmasına

rağmen, özel bir azot kaynağı gerekliliği organizmadan organizmaya değişir. *Bacillus coagulans* için pepton, maya ekstratı, amonyum tuzları kullanmak uygunken, üre ve nitrat kullanmak uygun değildir (Yoshimura ve ark., 1966). Kaynatılmış mısır suyunun ucuz ve uygun bir azot kaynağı olduğu bazı araştırmacılar tarafından bulunmuştur (Anheuser-Busch Inc. 1974; Hafner ve ark., 1985). Fakat kullanımının sezonluk olması mısır suyunun kullanımını sınırlandırmıştır. Hala mısır suyunun yerini alabilecek daha uygun bir azot kaynağı araştırılmaktadır. Soya unu, mısır suyundan %50 daha zengin bir azot kaynağıdır (Shieh, 1977). Fermentasyon ortamına bazı aminoasitlerin eklenmesi *Streptomyces violaceoruber*'in enzim üretimini arttırmıştır (Vaheri ve ark., 1977; Vandamme ve ark., 1981). *Streptomyces coelicolor*'da yapılan mutasyonla maya ekstratına oranla mısır suyundan daha fazla yararlanması sağlanmıştır (Hafner ve ark., 1985).

1.4.2.3. pH ve Sıcaklık Optimizasyonu

Azot kaynaklarının doğası ortamın pH'sını etkiler, buna bağlı olarak enzimin verimi etkilenir. KI üretimi çoğu kez pH kontrolü yoksa pH 7,0-8,0 arasında gerçekleştirilir. *Streptomyces spp.*, *Arthrobacter sp.* ve *Actinoplanes missouriensis* yaklaşık 30°C'de yaşar (Anheuser-Busch Inc. 1974). Termofilik *Bacillus spp.* 50-60°C'de yaşarlar (Brownell, C. E., 1982). KI üretimi için kullanılan kültür tipine bağlı olarak fermentasyon periyodu 6 saatten 48 saate kadar değişir.

1.4.2.4. Metal İyon Gereksinimi

Optimum KI üretimi için fermentasyon ortamında bivalent katyonlara ihtiyaç vardır. Ancak, bu ihtiyacın karşılanması için gerekli olan metal iyon kaynağı organizmadan organizmaya göre değişir. *Streptomyces YT-5* suşu için Co^{2+} gerekliken, *Bacillus coagulans* için Mn^{2+} veya Mg^{2+} gereklidir (Outtrup, 1974; Yoshimura ve ark., 1966). Genellikle kobalt mesofilik *Streptomyces* türleri için kullanılırken, termofilik türler için kullanılmazlar. KI üretimi yapılan fermentasyon ortamına Co^{2+} iyonu ilavesinin azaltılması, Co^{2+} 'lı HFCS tüketiminin insan sağlığına verdiği zarar ve harcanan besi yerinin atılmasının çevreye verdiği zarar düşünülünce oldukça önemli bir konudur. *Arthrobacter spp.*, *Streptomyces olivaceus* ve *Streptomyces olivochromogenes*'in bazı

mutant suşları gibi bazı organizmalar optimum enzim üretimi için Co^{2+} 'ya ihtiyaç duymazlar (Anheuser-Busch Inc. 1974; Reynolds, J. H., 1973).

1.4.3. Ksiloz İzomerazın İmmobilizasyonu

KI üretiminin maliyetini azaltmanın yollarından biri KI'yı defalarca geri alıp, onu verimli bir biçimde tekrar tekrar kullanmaktır. KI'nın immobilizasyonu enzimin tekrar kullanımı için oldukça iyi bir fırsat sunar. KI immobilizasyonu için oldukça geniş bir literatür mevcuttur. KI için en geniş pazar, enzimin immobilize hali içindir (Hemmingsen, 1979; Pedersen, 1993; Verhoff, 1985). KI bir hücre içi enzim olduğundan ve glukoza yüksek Km 'yi telafi etmek için yüksek miktarlarda enzim gerektiğinden KI kullanımı çok pahalıdır. Bu yüzden, endüstriyel uygulamalar için KI'nın immobilize edilmesi çok önemlidir. KI immobilizasyonuna yönelik bir çok metod tanımlanmıştır (Antrim, 1979). Ancak, sadece birkaç tanesi ekonomiktir ve ticari HFCS üretimi için uygun olan aktivitesi yüksek enzim sağlar. KI immobilizasyonu için iki temel yöntem kullanılmaktadır: 1) Hücreden çıkartılmış enzimin immobilizasyonu 2) Tüm hücrenin immobilizasyonu

1.4.3.1. Hücreden Çıkartılmış Enzimin İmmobilizasyonu

Yapısı korunmak için immobilize edilmiş çözünebilir enzimler, tüm hücrenin immobilize edildiği durumların tersine tekrar tekrar kullanım için oldukça uygun olan akışkan bir özellik gösterirler. *Streptomyces phaeochromogenes* ve *Lactobacillus brevis*'ten elde edilen KI'lar DEAE-Selüloza immobilize edilmiştir (Bucke, 1981). DEAE-Selüloza immobilize edilmiş olan KI Clinton Corn Processing Company tarafından HFCS üretmek için kullanılmaktadır. *Streptomyces sp.*'den porlu alüminyum okside immobilize edilmiş KI'nın yarılanma ömrü 49 gündür ve sürekli kullanım için uygundur.

Kontrollü gözenekli alüminyum okside immobilize edilmiş KI'nın Co^{+2} varlığında kullanımı avantajlıdır. Çünkü Co^{+2} daha sonra ardışık muamelelerle ortadan kaldırılabilir. Amerikan Biyoteknoloji Araştırma Birimleri'nden biri olan Monsanto, KI'yı geniş porlu polietilen disklerinden dimetilsülfoksit içindeki poliakrilonitril solusyonunu sızdırarak immobilize edip, sonunda da glutaraldehit ile sabitlemiştir. *Streptomyces* KI'sının selüloz asetat filamentlerine yakalanması sonucu gerçekleştirilen etkin başka bir prosedür tanımlanmıştır, benzer bir yöntem KI ve amiloglukozidaz'ın birlikte immobilize edilmesi

için kullanılmıştır (Bucke, 1981).

1.4.3.2. Tüm Hücre İmmobilizasyonu

KI, bir hücre içi enzim olduğundan ticari uygulamalar için tüm hücrenin immobilize edilmesi de uygun bir seçenektir. KI'ya sahip hücreler spreylenerek kurutuldu ve ilk kez Clinton Corn Processing Company tarafından ticari amaçla HFCS üretmek üzere kullanıldı. *Streptomyces*'in fermentasyon ortamına magnezyum hidroksit gibi inorganik tuzların eklenmesi veya *Arthrobacter* için doğru yöntemlerdir (Reynolds, 1973). Novo Industries bu amaçla tüm hücrenin polimerik materyal içine tutturularak immobilize edilmesini kullandı. *Streptomyces sp. NCIM 2730* suşuna ait KI, Indion 48-R üzerine immobilize edilmiştir ve bu sayede enzimin pH ve ısıl kararlılığı artmıştır (Gaikwad ve ark., 1992).

Günümüzde HFCS üreticisi bir çok ticari kuruluşun kullanmakta olduğu immobilize etme yöntemlerinin ayrıntıları patentli olarak yayınlanmıştır (Armbruster ve ark., 1973; Barker, 1976; Barker ve ark., 1973; Bengston ve ark.,1973; Reynolds, 1973). Bu konudaki genel talep, modern teknolojinin sürekli sistemde, yüksek sıcaklıkta (65°C), düşük pH'da, Co^{+2} iyonlarına gerek kalmadan immobilize KI üretilmesi yönündedir.

1.4.4. Ksiloz İzomeraz'ın Saflaştırılması

Farklı birçok mikroorganizmadan KI üretimi için birçok yöntem yayınlanmıştır. Ancak, sadece bunlardan birkaçı homojen ve tam saf olarak KI elde edilebilmesi için saflaştırma yöntemlerini tanımlamaktadır. Enzimin immobilize edilmiş şekilde kullanıldığı ticari uygulamalar için enzimin saflaştırılmasına ve konsantre edilmesine gerek yoktur. Enzimin saflaştırılması akademik çalışmalar için önemlidir. Çünkü, bu çalışmaların içinde kimyasal modifikasyonlar, yapı-görev ilişkileri ve özellikleri bulunmaktadır.

KI hücre dışı salgılandığı nadir birkaç durum dışında genellikle hücre içi bir enzimdir. Enzim mikroorganizmlardan sonikasyon, öğütme, homojenizasyon gibi mekanik parçalamayla ya da lizozim, katyonik deterjan, toluen kullanılarak hücrenin parçalanması sonucu çıkartılabilir (Chen, 1980a). KI'nın affinite kromatografisi ile saflaştırılması üzerine de literatür mevcuttur. Bir affinite adsorbantı olan ksilitol-Sefaroz *Streptomyces spp.*'den

KI saflaştırmak için kullanılmıştır (Chen, 1980b). Silika jel üzerine immobilize edilmiş ksiloz veya mannitol ile birleştirilmiş Biojel-P 100 gibi diğer afinite matrisleri de kullanılmıştır. Ghatge ve arkadaşları, *Streptomyces sp. NCIM 2730* suşundan tek basamakta hızlı bir şekilde immunoafinite ile saflaştırma işlemini rapor etmişlerdir (Ghatge ve ark., 1991).

1.5. Ksiloz İzomeraz'ın Özellikleri

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

1.5.1. Substrat Spesifikliğı

KI'nın pentozları, heksozları, şeker alkollerini, şeker fosfatlarını izomerize etme yeteneğı oldukça geniş bir biçimde araştırılmıştır. KI'nın farklı mikroorganizmalardan elde edilmesine göre substrat spesifikliğı değişiklik gösterir, ancak enzim D-riboz, L-arabinoz, L-ramnoz, D-alloz ve 2-deoksiglukoz gibi bir çok şeker substrat olarak kullanılabilir. KI'nın en yaygın substratları ise D-glukoz ve D-ksilozdur. Enzimin maksimum izomerizasyon gerçekleştirdiğı substratlar glukoz ve ksiloz gibi ekvatorial düzlemindeki 3. ve 4. karbonlarında hidroksil grubu taşıyan substratlardır. Farklı mikroorganizmalardan çözülmüş veya immobilize formda bulunan KI'ların D-glukozu D-fruktoza dönüştürme oranı %26-59 arasında dağılım gösterir. Enzimin *K_m* değeri D-glukoz için 0,086 ile 0,920 M arasında, D-ksiloz için 0,005 ile 0,093 M arasında dağılım gösterir (Chen, 1980b).

1.5.2. Metal İyon İhtiyacı ve İnhibitörleri

KI maksimum aktivite için Mg^{2+} , Co^{2+} veya Mn^{2+} gibi divalent katyonlara veya bunların kombinasyonlarına ihtiyaç duyar. Aktivite için hem Mg^{2+} hem de Co^{2+} gereklidir, ikisinin sahip olduğı görevler farklıdır. Mg^{2+} , Co^{2+} 'dan daha iyi bir aktivatörken, Co^{2+} enzimin istenilen kuartern yapıda kararlı kalması için gereklidir (Callens ve ark., 1988;

Callens ve ark., 1986). Danno tarafından *Bacillus coagulans*'tan elde edilen KI üzerinde doğrudan metal iyonu bağlanma çalışmaları yapılmıştır (Danno, 1971).

KI'nın katalitik aktivitesi Ag^+ , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , ve Ni^{2+} ve yüksek oranda kullanıldığında Ca^{2+} ile inhibe olur. KI'nın diğer bilinen inhibitörleri xylitol, arabitol, sorbitol, mannitol, liksoz ve Tris'tir (Bucke, 1983; Smith ve ark., 1991).

1.5.3. Altünite Yapısı

KI'nın sedimentasyon sabitleri 7,55-11,45 arasında, moleküler ağırlıkları 52.000-191.000 arasında dağılım gösterir (Chen, 1980a). KI'nın alt ünite yapısı ve aminoasit kompozisyonu üzerine yapılan çalışmalar, enzimin birbirine benzer ve aynı olan dört altüniteden ya da iki altüniteden birbirlerine nonkovalent bağlarla bağlanarak oluştuğunu göstermiştir. Bu altüniteler arasında disülfit bağları bulunmaz. *Bacillus sp.*'den bir trimer olan bir hücre dışı KI'da izole edilmiştir (Chauthaiwaleve Rao, 1994). Basuki ve arkadaşları *Streptomyces phaeochromogenes*'den elde edilen bir KI'nın izoenzimlerini rapor etmişlerdir (Basuki, 1992). Bulunan KI izoenzimleri, N-terminal aminoasitleri ve tripsin, *Achromobacter* proteaz I ve siyanür bromid ile sindirilebilen peptid çiftleri bakımından farklıdırlar. İzoenzimlerin herbiri farklı dört altüniteden oluşmaktadır.

Arthrobacter ve *Streptomyces spp.*'den elde edilen KI'larda üre, guanidin hidroklorid, SDS, gibi denatüranların ve ısıtmanın aktiviteye etkisi çalışılmıştır (Gaikwad ve ark., 1992; Rangarajan ve ark., 1992). *Streptomyces sp. NCIM 2730* suşundan katlanmamış yapıda çözülmüş tetramerik KI göstermiştir ki; monomer yapılar inaktifken, tetramer ve dimer bölgeler aktiftir. KI'nın tam katlanma yolunda tam katlanmış (=molten-globule) ara bir şeklinin varlığı ilk defa gösterilmiştir (Ghatge, 1994). Bozulmamış tersiyer yapı biyolojik aktivite için sekonder yapıdan daha etkindir ve gereklidir.

1.5.4. Optimum Sıcaklık ve pH

KI'nın optimum sıcaklığı 60 °C'den 80 °C'ye kadar dağılım gösterir ve optimum sıcaklık Co^{2+} varlığında artar.

Optimum pH genellikle pH 7,0 – 9,0 arasındadır. *Lactobacillus brevis*'ten izole edilen KI pH 6,0 – 7,0 arasında optimum pH'ya sahiptir ve bu durum ticari uygulamalar

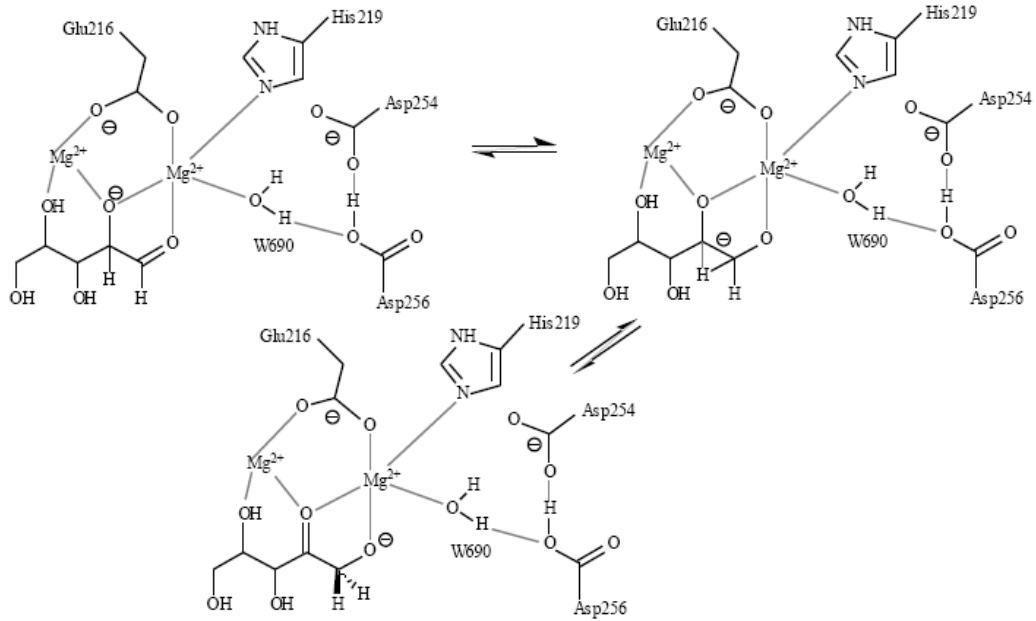
için arzu edilen bir özelliktir.

1.5.5. Aktif-Bölge Çalışmaları

KI enziminin aktif bölgesindeki veya aktif bölgesinin yakınındaki aminoasitlerin özelliklerinin belirlenmesi, gruba özel kimyasal modifiye ediciler ve X-ışın kristallografisi ile başarılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda özellikle histidin ve karboksilat gruplarının bu bölgedeki gerekliliği kanıtlanmıştır (Callens ve ark., 1988; Gaikward ve ark., 1988; Ghatge ve Deshpande, 1993). Fonksiyonel aminoasit rezidülerinin yapısal çevresi kimyasal modifikasyonlarla ve KI'nın ardışık kademeli peptid haritalaması ile belirlenmiştir (Vangrysterre ve ark., 1990). KI'nın hem glukozun hem ksilozun izomerizasyonundan sorumlu olduğu çok uzun zamandır bilinmektedir. Ancak bu reaksiyonlar aynı bölgede mi gerçekleşiyor, yoksa farklı bölgede mi bilinmiyordu. Hem glukozun hem ksilozun izomerizasyonu için bir aktif bölgenin olduğu Keleti ve arkadaşları tarafından geliştirilen kinetik metod kullanılarak gösterildi (Keleti ve ark., 1987).

1.6. KI'nın Çalışma Mekanizması

Enzimin sahip olduğu ticari öneme rağmen, KI'nın yapısı ve çalışma mekanizması hakkında çok az bilgi mevcuttur. KI'nın çalışma mekanizması araştırmacılar için oldukça ilgi çekici bir konudur. Daha önceki çalışmalara göre, KI'nın şeker fosfat izomerazlara benzer bir biçimde çalıştığı ve en-diol mekanizmasını takip ettiği sanılmaktaydı (Rose ve ark., 1969). Oysa ki sonradan yapılan çalışmalar göstermiştir ki; enzim hidrür kayması mekanizması ile çalışmaktadır (Şekil 2).



Şekil 2. Hidrür kayması mekanizması

Enzimin yapısı ve fonksiyonu arasındaki ilişkiyi çalışmak için aktif bölgenin düzenlenişini bilmek zorunludur. KI'nın aktif bölgesini çalışmak ve çalışma mekanizmasını şematize etmek için farklı farklı yaklaşımlar kullanıldı. Bu yaklaşımlar: 1) Kimyasal modifikasyon, 2) X-ışını kristalografisi, 3) İzotop değişimi'dir. KI'nın çalışma mekanizması için önerilen mekanizma substratın halkasının açılması, C-2'den C-1'e hidrür kayması yoluyla izomerizasyon ve ürünün halkasının kapanması şeklindedir.

1.6.1. Ksiloz İzomeraz'ın Kimyasal Modifikasyonu

Amino asit monomerlerinin özel kimyasal ajanlarla kimyasal modifikasyonu enzimlerin aktif bölgelerinin incelenmesi için kolay yöntemdir. KI'nın aktif bölgesinde histidin varlığı dietilpirokarbonatın enzimin inaktivasyonuna olan etkisi nedeniyle anlaşılmıştır (Vangryster ve ark., 1983). Daha sonra, farklı *Lactobacillus* spp. ve *Streptomyces* spp.'lerden elde edilen enzimlerin aktif bölgelerinde histidin zorunlu olarak bulunduğu dair başka kanıtlarda bulundu (Gaikwad ve ark., 1988). Dietilpirokarbonat ile gerçekleştirilen inhibisyon hidroksilamin ile düzeltilebilir. Enzimin aktivitesinin kimyasal modifikasyon sırasında tamamen korunması substrat ve substrat analogu ksilitol

kullanılarak sağlanır. Histidin hidrojen transferlerine yardım eden, proton çekici baz olarak bilinir. Enzimde aspartat ve glutamat rezidüleri varlığı enzimin Woodward's reagent K ve guanidinhidroklorid ile inaktivasyonu sonucu rapor edilmiştir (Ghatge ve ark., 1993; Vangryspere ve ark., 1989). Karboksilat rezidülerinin katılımı, metal iyon kofaktörlerinin bağlanmasında olur (Callens ve ark., 1988). Korunmuş ve korunmamış GI'nın kimyasal modifikasyonu ve ardışık peptid haritalaması sonucunda aktif bölgenin tanımı konusunda ortak bir dizilime karar verilmiştir. Bu dizilim Phe-His-Xaa-Asp-Xaa-Xaa-Pro-Xaa-Gly'dir (173). KI'nın kimyasal modifikasyonu ile elde edilen bilgiler X-ışın kristallografisi çalışmaları ile tamamlanmıştır.

1.6.2. X-Işını Kristallografisi

X-ışınları kristallografisi proteinlerin üç boyutlu yapılarının, enzimlerin substratları ve inhibitörleriyle oluşturdukları komplekslerin gerçek görüntülerini verir. *Actinomyces*, *Arthrobacter*, *Actinoplanes* ve *Bacillus* türleri enzimin çalışma mekanizmasının anlaşılabilmesi için metal iyonlarının, inhibitörlerin varlığında ve yokluğunda farklı seviyede çözünürlüklerde X-ışını kristallografisiyle çalışılmıştır. Çünkü KI, tek substrat-tek ürün enzimidir ve enzimin sahip olduğu K_m 'den yüksek bir substrat konsantrasyonunda Michaelis kompleksini doğrudan gözlemlemek mümkündür. Birçok *Streptomyces* türünden elde edilmiş olan KI yapıları tam olarak bilinmektedir. Bu enzimlerin hepsinin aktif bölgeleri birbirine çok fazla benzerdir. *Streptomyces rubiginosus*'dan elde edilen KI'nın yapısı 4 Å çözünürlükte belirlendi. Enzimin trioz-fosfat izomerazlarda olduğu gibi sekiz β -iplik- α -heliks [$(\alpha/\beta)8$] ünitesinden oluştuğu anlaşıldı (Carell ve ark., 1984).

S. olivochromogenes'in metalle aktive edilmiş KI'sının X-ışınları kristallografisiyle yapılmış son çalışmaları göstermiştir ki; izomerizasyon iki metal kofaktörle ve bu kofaktörlerin hidrür kaymasını gerçekleştirmek için glutamat rezidüsü üzerinden köprülenmesiyle katalizlenmektedir. Her aktif bölgedeki iki gerekli Mg iyonundan, Mg^{2+} 1,8 Å tarafından ayrılmış iki farklı alternatif pozisyonda gözlenmiştir. Metal iyonlarının substratın varlığında gözlemlenen hareketleri substrat bağlanmasından sonra izomerizasyondan önce gözlenmiştir (Lavie ve ark., 1994). Lineer ve genişletilmiş formlardaki substratlarla enzimin ve metal kofaktörlerin etkileşimi gözlenmiştir. Carell ve arkadaşları *S. rubiginosus*'ın KI'sında şekerlerin büyüklüğüne bağlı olarak substrat ve

inhibitörlerin farklı birçok şekilde bağlandığını göstermiştir. Ayrıca *Bacillus coagulans* (Rasmussen, 1994) ve *Actinoplanes missouriensis* KI'larının da kristallografi çalışmaları rapor edilmiştir.

1.6.3. İzotopik Değişim

KI için elde edilen kristallografi verileri enzimin çalışması için proton transfer mekanizması ve hidrür kayma mekanizmasının olduğunu göstermiştir. Ancak, enzimin çalışma mekanizmasını açıklamak için sadece yapısal veriler yetersizdir. KI'daki proton transfer mekanizmasındaki belirsizliğin nedeni ürüne trityumlu su girişi sırasında çözücü değişiminin olmamasıydı (Rose ve ark., 1969). Ancak, korunmuş aktivitede hızlı proton transferinin olmadığıda söylenememişti. Allen ve arkadaşları yüksek sıcaklıklarda, uç pH'larda ve guanidin hidroklorid varlığında proton transfer sisteminin varlığını açığa kavuşturmak için izotopik değişim deneyleri yaptılar. Yaptıkları NMR (=nükleer manyetik rezonans) çalışmaları proton transfer mekanizmasının varlığını desteklemedi. *Actinoplanes missouriensis*'den elde edilen yaban tip ve mutant tip D-ksiloz izomeraz ile yapılan son çalışmalar, açık ve genişletilmiş aldöz substratında 2-OH'dan O-1'e proton transferinde su molekülünün, Trp-690'ın, Asp-255'in, ve Glu-186'nın yaşamsal önemini açığa çıkarmıştır (Van Bastelaere ve ark., 1995).

1.6.4. Trioz-Fosfat İzomeraz ile Ksiloz İzomerazın Karşılaştırılması

Daha önceleri Trioz-fosfat izomerazların çalışma mekanizmasının Ksiloz izomerazların çalışma mekanizmasına benzer olduğu düşünülüyordu. TIM gliseraldehit-3-fosfatın ve dihidroksiaseton fosfatın bir enediol aracısının şekillenmesi vasıtasıyla, enzimdeki tek bir bazın katıldığı proton transfer mekanizmasıyla ara indirgenmelerini katalizler (Albery ve ark., 1976; Reider ve ark., 1959). Ksiloz izomerazın çalışma gücü TIM'dan 5 kat daha düşüktür (Blacklow ve ark., 1988). KI'nın ve TIM'ın üç boyutlu yapıları α -helikslerle bağlanmış 8 paralel uzanmış β -katlanmaları'na sahip olmaları yönünden benzetilmiştir. Her iki enziminde aktif bölgeleri β -levhalarının sonunda C-terminal ucunda bulunmaktadır. Ancak α ve β katlanmaları KI'da TIM'da olduğundan çok daha fazla uzundur ve KI'nın üçüncü β -katlanması TIM'ın birinci β -katlanmasına denk

geldiği zaman süper pozisyon meydana gelir. TIM'ın substratı açık zincirli trioz fosfattır, KI ise kapalı şekerlere bağlanır ve halkalarının açılmasını katalizler. TIM divalent metal iyonlarına ihtiyaç duymazken, KI divalent metal iyonlarına ihtiyaç duyar. KI ve TIM farklı çalışma mekanizmalarına sahiptirler. TIM bir enediol mekanizmasıyla, KI hidrür kayması mekanizmasıyla çalışır.

1.7. KI'nın Genetik Mühendisliği

Rekombinant DNA teknolojisinde meydana gelen gelişmeler bir çok proteinin geninin başarılı bir şekilde izolasyonuna ve izole edilen genin birçok yöntemle manipülasyonuna imkân sağlamıştır. KI üretimini arttırmanın yollarından biri KI genini belirlemek ve bu geni *lac*, *tac*, veya *pL* gibi güçlü promotorlara sahip çoklu kopyalı bir vektör sistemine klonlamaktır. KI geni şu temel amaçlarla klonlanmıştır: 1) KI enziminin üretimini arttırmak 2) Mayalar tarafından ksilozun etanole doğrudan çevrilmesini sağlamak 3) Biyoteknolojik uygulamalar için enzimin özelliklerinin değiştirmek ve iyileştirmek. Moleküler klonlama ve KI ekspresyonu hem heterolog hem homolog konaklarda ve mayalarda gerçekleştirilmiştir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Materyal ve Kimyasallar

Tripton (Merck V441613949), Yeast Ekstrak (Merck VM175053), NaCl (Merck K34243404), D-Ksiloz (SigmaY4625), D-Ksiluloz (Sigma X4625), MOPS (AppliChem A29470100), MnSO₄ (AnalaR 10153), Lizozim (Gerbu 250501), Perklorik asit (Merck 518), Sistein (AppliChem), Karbozol (Sigma C-5132), Sülfürik asit (Riedel-deHaen), Etil alkol, Kanamisin (Bioanalyse), IPTG (Sigma 15502), Amfisilin (Bioanalyse), *NcoI* (NEB), *MboI* (NEB), *HinfI* (NEB), *AvaII* (NEB), *BamHI* (NEB), *HindIII* (NEB), *SacI* (NEB), *PstI* (NEB), *Sa3AI* (NEB), *SaII* (NEB), *PspGI* (NEB), *AvaI* (NEB), *BfaI* (NEB), *XbaI* (NEB), *EcoRI* (NEB), T4 DNA ligaz (NEB), Taq DNA polimeraz (Promega), Genomik DNA İzolasyon Kiti, Jelden Çıkarma Kiti, EDTA (Merck 84211000), dNTP seti (Promega), pGEM-T Easy klonlama vektörü, HisTag saflaştırma kiti (Promega), pET-28a(+) Ekspresyon Vektörü, CaCl₂ (Aktar Kimya), X-gal (Appllichem A10070005), Commassie Brilliant Blue G-250, etanol, fosforik asit, BSA (NEB), DEAE-Sepharose (Sigma), Phenyl sepharose 6 (Sigma), Amonyom sülfat (Merck A734116), Sodyum asetat (Merck TA867065), K₂HPO₄ (Merck 1,050,211), KH₂PO₄ (Merck 1,050,212), Tris (Melfoid Lab 14271), CoCl₂ (Appllichem 25,559-9)

2.2. *A. gonensis* G2^T' de KI Varlığının Belirlenmesi

A. gonensis G2^T (AgoG2KI)' de KI varlığı belirlemek için, bakteri 100 ml sıvı besi yeri (LB) içerisine ekilerek 55°C'de O.D.'si 0,45-0,6 oluncaya kadar inkübe edildi. Bu değere ulaştınca, kültür son hacimde % 0,5'lik D-Ksiloz ihtiva edecek şekilde D-ksiloz ile uyarıldı ve 4-5 saat boyunca büyümeye bırakıldı. Kültür 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek çöktürüldü. Elde edilen pellet 250 µl reaksiyon tamponunda (Reaksiyon tamponu: 1 mM MnSO₄ içeren 50 mM MOPS tamponu pH 7) çözüldü. Üzerlerine 100 µg lizozim ilave edilerek 30 dk kadar 37°C'de inkübe edildi. Sonrasında, %80 şiddetinde, 1 devirde ölçekle 5 dakika boyunca Sartorius Labsonic sonikatör aleti kullanılarak hücreler patlatıldı. Elde edilen hücre solüsyonu 14800 rpm'de 15 dk boyunca santrifüj edildi. Pellet kısmı atılarak süpernatant alındı. Elde edilen hücre özütünde KI aktivitesi Belfaquih ve

arkadaşları (2000) tarafından geliştirilen yöntem kullanılarak araştırıldı. Reaksiyon 5 µl hücre özütü kullanılarak, 100 mM Ksiloz, 1 mM MnSO₄ içeren 50 mM MOPS pH 7 tamponunda, 100 µl son hacimde, 85°C'de, 30 dk, Biometra Personal Cyler PCR cihazında gerçekleştirildi. Reaksiyon 100 µl 0,5 M perklorik asit ilavesi ile sonlandırıldı. Reaksiyon sonunda açığa çıkan D-ksiluloz miktarı Dishe ve arkadaşlarının geliştirmiş olduğu sistein-karbozol-sülfürik asit yöntemi ile belirlendi. Negatif kontrol olarak ksiloz izomeraz mutanlığı olan *E.coli* HB101 suşu ve pozitif kontrol olarak ksiloz izomeraz bakımından pozitif olduğu bilinen *Saccharococcus caldxylosilyticus* bakterisi kullanılmıştır.

2.3. *A. gonensis* G2^T KI Geninin Baz Diziliminin Belirlenmesi

2.3.1. Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu Promega Genomik DNA İzolasyon Kiti kullanılarak yapıldı. *A. gonensis* G2^T bakterisi 3 ml LB besiyerine ekildi ve 55°C'de gece boyunca bir sulu çalkalayıcıda inkübe edildi. Büyümüş olan gece kültürü 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Hücreler 480 µl 50 mM EDTA içerisinde çözüldü. 120 µl 10 mg/mL lizozim ilave edildi, hafifçe pipetleyerek karıştırıldı ve 37°C'de 60 dk inkübe edildi. Elde edilen karışım 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Tüpe 600 µl *Nuclei Lysis* solüsyonu eklendi ve hafifçe pipetle karıştırıldı. Karışım 80°C'de 5 dk inkübe edildi ve oda sıcaklığına soğutulduktan sonra 3 µl *RNase* solüsyonu eklendi. Tüp 2-5 kez alt-üst edildi ve 37°C'de 30 dk inkübe edildi. Karışım oda sıcaklığına soğuduktan sonra 200 µl *Protein Precipitation* solüsyonu eklendi ve 20 sn vortekslendikten sonra 5 dk süreyle buza bırakıldı. 5 dk sonunda 13.000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Süpernatant içinde 600 µl izopropanol bulunan yeni bir ependorfa aktarıldı. Ependorf pellet oluşuncaya kadar alt üst edildi ve 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Süpernatant döküldü ve kurutma kağıdı kullanarak tüm süpernatant sıvısının alındığından emin olundu. Ependorfa 600 µl oda sıcaklığında % 70'lik etanol eklendi ve alt üst edildikten sonra 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Pipetörle süpernatant uzaklaştırıldı ve etanolün tamamının uzaklaşması için ependorfa 15 dk 37°C'de bekletildi. Ependorfa 100 µl *DNA Rehydration* solüsyonu eklendi ve 65°C'de 1 saat inkübe edildi. Bu bir saatlik inkübasyon süresi boyunca periyodik olarak tüpler dibe vurulmak suretiyle DNA çözüldü. Genomik DNA izolasyonu tamamlandıktan sonra, elde edilen DNA kullanılacağı zaman kadar +4 °C'de saklandı.

2.3.2. Genin Baz Diziliminin Ters PCR (Inverse PCR) Yöntemi ile Belirlenmesi

AgoG2KI geninin 530 baz çiftlik bir kısmı daha önce yapılan çalışmalar ile belirlenmişti (Karaoğlu,H., 2004). Genin tamamının baz dizilimini belirlemek için ters PCR (İnverse PCR) yöntemi kullanıldı. Sırası bilinen gen kısmının uçlarına komplementer bir şekilde ileri ve geri yönde inverse-PCR primerleri oluşturuldu. Tasarlanan primerler şu şekildedir:

XylaIF02: 5'-ACGTTTCATAGCCTTCACG-3'

XylaIF01: 5'-AGACGCGGTTTCGTTTGAACC-3'

XylaIR02: 5'-AGGCGGATTGAACTTTGATGC -3'

XylaIR01: 5'-GCATAGTCAACCGCCATATGC-3'

Genomik DNA baz sırası belirli olan 530 baz çiftlik parçayı kesmeyen *NcoI*, *MboI*, *HinfI*, *AvaII*, *BamHI*, *HindIII*, *SacI*, *PstI*, *Sa3AI*, *Sall*, *PspGI*, *AvaI*, *BfaI* ve *XbaI*, *EcoRI* restriksiyon endonükleazlar ile bir gece boyunca inkübe edilerek kesildi, her bir kesimin kendi üzerine yapışması (self-ligasyon) sağlandı ve DNA fragmentleri halkalaştırıldı. Self ligasyon reaksiyonu, 2,5 µg kesilmiş DNA, 40 µl 10X tampon, 1 U T4 DNA ligaz enzimi içerecek şekilde 400 µl son hacimde 16°C'de bir gece boyunca gerçekleştirildi. Ligasyon sonrası DNA'lar etanol çöktürmesi ile çöktürülerek 20 µl TE tamponu içerisinde çözüldükten sonra PCR reaksiyonlarında kullanıldı.

Dizayn edilen primer çiftleri kullanılarak yapılan PCR reaksiyonu 200 µl'lik ince duvarlı PCR tüpleri içerisinde, 50 µl'lik son hacimde gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı 1X PCR tamponu, 200 µM dNTP, 2,5 mM MgCl₂, her bir primerden 25 pmol, 10-40 ng kalıp genomik DNA ve 1 U *Taq* DNA polimeraz içerecek şekilde hazırlandı. Reaksiyon şartları, 95°C'de 1 dakika ön denatürasyon sonrasında, 35 döngü olacak şekilde; 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 56°C'de 30 saniye bağlanma, 72°C'de 1,5 dakika uzama ve döngü sonunda 72°C'de 5 dakika son uzama safhası şeklinde gerçekleştirildi. Ürünler % 1,2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek sonuçlar görüntülendi. Elde edilen parçalar, baz dizilimini belirlenmek üzere, pGEM-T Easy klonlama vektörüne klonlandı ve baz dizilim analizi yapıldı. Elde edilen sonuçlar Genbank'ta taranarak parçaların bir ksiloz izomeraz genine ait olduğu belirlendi. Elde edilen ek parçalarla baz dizilimi belli olan parça birleştirilerek bu genin doğruluğu Genbank'ta diğer enzimler ile karşılaştırılarak kontrol

edildi. Bu yeni parçanın uç kısımlarından yeni bir çift primer daha sentezlenerek yukarıda anlatılan işlemler tüm genin baz dizilimi açığa çıkarılıncaya kadar tekrarlandı. Bu amaç ile tasarlanan primerler Tablo 3’de gösterilmiştir.

Tablo 3. İverse PCR primerleri

Primerin Adı	Primerin baz dizini
XYLAIF3	: 5'- AGC AGC AAA GGT GAA AAA AGG-3'
XYLAIF04	: 5'- TGG ACT AAA AGT GGC GTA TCG-3'
XYLAIF05	: 5'- ATC ATT GAT GGG AAG GCC GAC- 3'
XYLAIR03	: 5'- TGC CAR TAV GCR AYV GMR ADD CG-3
XYLAIR04	: 5'- TCC AAA GCA ACT TGG TTT TGC-3'
XYLAIR05	: 5'- TGC ACC ATG TAC AAA ACG AGG-3'
XYLAIR06	: 5'- GCG CAA ATG CTC CTC CAT CG-3'
XYLAIR07	: 5'- GGC CAA TTC CTT CTG TAT AGC- 3'

2.3.3. Genin pET-28a(+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

Geni, HisTag kuyruğu içerecek şekilde klonlayabilmek için *NcoI* ve *HindIII* restriksiyon endonükleaz enzimlerini içeren şu primerler tasarlandı:

Xyla_Ex_F1: 5'-CGA GCT CCA TGG CGT ATT TTG AAA ACG-3'
NcoI

Xyla_Ex_R1: 5'-CCA AGC TTA CGA GCT ACA CAA ACT TC-3'
HindIII

A.gonensis G2^T genomik DNA'sı ve bu primer çiftleri kullanılarak ters PCR kısmında anlatılan PCR reaksiyonu şartları kullanılarak KI geni üretildi. Üretilen bu genin uç kısımlarında *NcoI* ve *HindIII* restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleri bulunmaktadır. Üretilen bu parça, enzimlerle kesilebilmesi için PCR temizleme kiti ile temizlendi. Hem pET-28a(+) ekspresyon vektörü hem de temizlenen PCR ürünü, *NcoI* ve *HindIII* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesildi. Kesim reaksiyonu, 1X enzim tamponu içerisinde, 1 U enzim varlığında 37°C’de 1 gece boyunca gerçekleştirildi. Kesim ürünleri

% 0,7'lik agaroz jelde yürütüldü. Lineer hale getirilen vektör ve uç kısımlarından kesilen PCR ürününün bulunduğu bantlar jelden kesilip alındı ve bir Jelden Çıkarma Kiti aracılığı ile temizlendi. Temizlenen ürünler ligasyon işlemi ile halkalaştırıldı. Ligasyon; 1 µl 10X tampon, 1 U T4 DNA ligaz enzimi içerecek şekilde 10 µl son hacimde 16°C'de bir gece boyunca gerçekleştirildi.

Ligasyon ürünü CaCl₂ transformasyon metoduyla *E.coli* JM101 suşuna aktarıldı. Transformasyon için, 200 µl alıcı konak hücre içeren tüpe 1 µl ligasyon ürünü eklendi ve tüp, 30 dakika buz içinde bekletildi. İnkübasyon sonrasında daha önceden hazırlanan 42°C su banyosunda 2 dakika bekletilerek plazmidin hücre içine geçmesi sağlandıktan sonra her bir tüpe 200 µl LB besi yeri eklendi. Tüpler 37°C'de iki saat bekletildikten sonra daha önce hazırlanmış olan LBA petrilere (50 µg/ml kanamisin içeren) yayılarak 37°C'de 1 gece inkübe edildi. pET-28a(+) ekspresyon vektör sisteminde *lac* operon sistemi bulunmadığından X-gal ve IPTG kullanarak mavi-beyaz koloni oluşturma imkânı bulunmamaktadır. Bu sebepten ötürü petri üzerinde oluşan kolonilerin hangisinin *xylA* geni taşıdığını belirlemek için kolonilerden rastgele seçim yoluyla tarama yapıldı. Seçilen koloniler 3 ml (50 µg/ml kanamisin içeren) LB besiyeri içinde bir gece boyunca 37°C'de inkübe edildi. Üretilen hücrelerden Promega plazmit izolasyon kiti ile vektör plazmitler izole edildi. İzole edilen plazmitler *NcoI* ve *HindIII* restriksiyon endonükleaz ile kesilerek klonlamanın olup olmadığı kontrol edildi. Klonlamanın başarılı olduğu plazmit DNA'sı, *E.coli* BL21(DE) suşuna yukarıda anlatılan CaCl₂ transformasyon yöntemi ile aktarıldı. Aktarılan hücrelerde KI aktivitesi araştırıldı.

Genin HisTag kuyruğu içermeyecek şekilde klonlayabilmek için *NcoI* ve *BamHI* restriksiyon endonükleaz enzimlerini içeren şu primerleri tasarlandı:

Xyla_Ex_F1: 5'-CGA GCT CCA TGG CGT ATT TTG AAA ACG-3'
NcoI

Xyla_Ex_R2: 5'-CGG ATC CGT TAC TAT CAT TAA CGA GC-3'
BamHI

Bu primer çifti ile yukarıda anlatılan prosedür kullanılarak *AgoG2KI* geni HisTag kuyruğu içermeyen pET-28a(+) ekspresyon vektörüne klonlanıp *E.coli* BL21(DE3) suşuna aktarıldı. Bu sistemde üretilen hücre özütünde KI aktivitesi araştırıldı.

2.4. Gen Ürününün Elde Edilmesi ve Saflaştırılması

2.4.1. Karakterizasyon Deneylerinde Kullanılan KI Aktivite Deneyi

Karakterizasyon deneylerinde kullanılan KI aktivite deneyi Belfaqui ve arkadaşları (2000) tarafından geliştirilmiş olan bir yöntemdir. Reaksiyon 5 µl hücre özütü kullanılarak, 100 mM Ksiloz, 1mM MnSO₄ içeren 50 mM MOPS pH 7 tamponunda, 100 µl son hacimde, 85°C'de, 30 dk, Biometra Personal Cycler PCR cihazında gerçekleştirildi. Reaksiyon 100 µl 0,5 M perklorik asit ilavesi ile sonlandırıldı. Reaksiyon sonunda açığa çıkan D-ksiluloz miktarı Dishe ve arkadaşlarının (1951) geliştirmiş olduğu sistein-karbozol-sülfirik asit yöntemi ile belirlendi. Reaksiyon çözeltisi üzerine 40 µl %1,5'lik sistein hidroklorür konuldu. Bunu takiben 40 µl % 0,12'lik karbozol konuldu. Oluşan karışım vortekslendikten sonra üzerine 1,2 ml %70'lik sülfirik asit ilave edilerek vortekslendi. Karışım 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Ölçümler 545 nm dalga boyunda gerçekleştirildi. 30. dk'da yapılan ilk ölçümün ardından yapılan her bir ölçümde 1 dk ara ile gerçekleştirildi. Reaksiyonlarda açığa çıkan Ksiluloz miktarını hesaplamak için ksiluloz standardı hazırlandı ve standart grafik spektrofotometreye yüklenerek, sonraki açığa çıkan ksiluloz miktarı hesaplamaları için kullanıldı. Enzim aktivitesi reaksiyon sonrası açığa çıkan ksiluloz miktarına göre µmol/dk cinsinden hesaplandı. Reaksiyonun gerçekleştirildiği tüm koşullar (reaksiyon sıcaklığı, reaksiyon pH'sı, substrat konsantrasyonu, metal iyonları derişimi, enzim miktarı) enzim karakterize edildikçe yeniden düzenlenmiştir.

2.4.2. Protein Tayini

Protein konsantrasyonu tayini Bradford'un 1976 yılında geliştirdiği yöntemle yapılmıştır. 1000 ml boya solusyonu hazırlanırken 100 mg Commassie Brilliant Blue G-250 boyası önce 50 ml % 95'lik etanol içinde iyice çözülerek, üzerine 100 ml %85'lik fosforik asit eklendi. Daha sonra oluşan karışım saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti karanlık bir yerde filtre kağıdı ile filtre edildi. Bu boya ile ilk olarak BSA (Bovin Serum Albumin) kullanılarak 595 nm dalga boyunda protein konsantrasyonu standardı grafiği oluşturuldu. Standart grafik için 1, 2, 5, 10, 15, 20, 40, 50, 60, 80, 100 µg BSA içeren çözeltiler 0,15 mM NaCl ile 100 µl'ye tamamlandı. Her bir örneğin üzerine 5 ml

hazırlanan boyadan eklenildi. Protein ve boya karışımları vortekslendi ve oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. Standart grafik oluşturulduktan sonra, örneklerin ölçümü yapılırken 10 µl örnek 0,15 mM NaCl ile 100 µl'ye tamamlandı ve üzerine 5 ml boya eklendi. Protein ve boya karışımı vortekslendikten sonra oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. Süre sonunda standart grafiğin yüklendiği Agilent 8453E UV-visible Spectroscopy System cihazı kullanılarak 595 nm'de ölçümler yapıldı ve protein konsantrasyonu µg/µl cinsinden hesaplandı.

2.4.3. Hücre Üretimi

KI genini içeren klonlardan biri 50 µg/ml kanamisin içeren 20 ml LB'ye ekilerek gece boyu büyümeye bırakıldı ve oluşan kültürün O.D. ölçümü yapıldı. Bu kültür kullanılarak, 300 ml 50 µg/ml kanamisin içeren normal LB'ye 600 nm'de O.D. 0,1 olacak şekilde tekrar ekim yapıldı. Kültürün O.D.'si 0,6-0,9 olduktan sonra son hacimde 1 mM IPTG olacak şekilde, IPTG eklenerek enzim üretimi indüklendi. İndükleme yapıldıktan sonra kültür yaklaşık 4 saat daha büyütüldü. Büyütülen hücreler 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek çöktürüldü.

2.4.4. Hücrelerin Patlatılması ve Protein Ekstratının Elde Edilmesi

Elde edilen pellet 250 µl reaksiyon tamponunda (1 mM MnSO₄ içeren 50 mM MOPS tamponu pH 7) çözüldü. Üzerlerine 0,1 mg lizozim ilave edilerek 30 dk kadar 37°C'de inkübe edildi. Sonrasında, %80 şiddetinde, 1 devirde 5 dk boyunca Sartorius Labsonic sonikatör aleti kullanılarak hücreler patlatıldı. Elde edilen hücre solüsyonu 14800 rpm'de 15 dk boyunca santrifüj edildi. Pellet kısmı atılarak süpernatant alındı. Ekim için kullandığımız klonun doğruluğundan emin olmak için süpernatantda tekrar KI aktivitesi bakıldı. KI aktivitesinden emin olduktan sonra kaba ekstratta protein konsantrasyonunu, spesifik aktiviteyi belirlemek ve protein jel elektroforezinde kullanmak üzere 100 µl örnek ayrılarak enzim saflaştırma işlemlerine başlanıldı.

2.4.5. KI'nın Saflaştırılması

2.4.5.1. Isı Şoku Uygulaması

Elde edilen ham ekstrat 15 dk süreyle 75 °C'de bekletildi. Parçalanmış proteinleri uzaklaştırmak için 15 dk 14800 rpm'de santrifüj yapıldı. Süpernatant alındı, çöken kısım uzaklaştırıldı. Enzimin aktivitesini koruduğundan emin olmak için süpernatantda tekrar KI aktivitesi bakıldı. KI aktivitesinden emin olduktan sonra kaba ekstratta protein konsantrasyonunu, spesifik aktiviteyi belirlemek ve protein jel elektroforezinde kullanmak üzere 100 µl örnek ayrılarak iyon değişimi kromatografisi basamağına geçildi.

2.4.5.2. İyon Değişimi Kromatografisi

İyon değişimi Kromatografisi için 50 cm uzunluğunda ve 1,5 cm çapında bir kolon kullanıldı. Bu çalışmada kolon malzemesi olarak DEAE-Sepharose (Anyon değiştirici) kullanıldı. Kolon malzemesinin ve deneyde kullanılan tüm tamponların gazı bir vakum pompasında alındı ve sonrasında oda sıcaklığına geldikten sonra bir pastör pipeti kullanılarak kolona yavaş bir şekilde dolduruldu. Doldurma işlemi bittikten sonra kolon 250 ml tampon (1 mM MnSO₄, 50 mM MOPS, pH 7) ile dengeye getirildi. Özütleme kolondan geçirilerek içerisinde bulunan proteinlerin kolon dolgu malzemesine bağlanmaları sağlandı. Sonrasında kolondan 50 ml daha tampon geçirilerek kolona tutunmayan proteinler uzaklaştırıldı. Daha sonra kolonun tuz (NaCl) içeriği 0 molardan 0,6 molara kadar çıkarıldı. Bunun için 200 ml'lik NaCl gradient köprüsü kullanıldı. Tamponun akış hızı 1 ml/dk olarak ayarlanmış ve kolondan çıkan fraksiyonlar cam tüpler içinde 3,5 ml olacak şekilde toplandı. Elde edilen tüm tüplerde protein tayini Bradford yöntemine göre belirlenmiş içerisinde protein olduğu belirlenen tüplerde ksiloz izomeraz aktivitesi arandı. Aktivite tespiti yapılan örnekler toplanarak SDS-PAGE elektroforezinde gösterildi.

2.4.5.3. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi

Hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi için 20 cm uzunluğunda ve 0,75 cm çapında bir kolon kullanıldı. Bu çalışmada kolon malzemesi olarak Phenyl sepharose 6 (Sigma) kullanıldı. Kolon malzemesinin ve deneyde kullanılan tüm tamponların gazı bir vakum pompası yardımıyla alındı ve sonrasında oda sıcaklığına geldikten sonra bir pastör pipeti kullanılarak kolona yavaş bir şekilde dolduruldu. Kolon doldurma işlemi bittikten sonra 1,3 M amonyum sülfat içeren 100 ml tampon (1 mM MnSO₄, 50 mM MOPS, pH 7) ile dengeye getirildi. Özüt ise 2,6 M amonyum sülfat içeren tampon ile bire bir oranında karıştırıldı ve böylelikle özütünde amonyum sülfat içeriği 1,3 M olacak şekilde ayarlandı. Özütün kolondan geçirilmesi ile yüksek amonyum sülfat konsantrasyonunda proteinler hidrofobik kolon malzemesine bağlanmışlardır. Daha sonra kolonun amonyum sülfat içeriği 1,3 molardan 0 molara düşürüldü. Bunun için bir 100 ml'lik amonyum sülfat gradient köprüsü kullanıldı. Tamponun akış hızı 0,5 ml/dk olarak ayarlanmış ve kolondan çıkan fraksiyonlar cam tüpler içerisinde 3,5 ml olacak şekilde toplandı. Elde edilen tüm tüplerde protein tayini Bradford yöntemine göre belirlendi. İçerisinde protein olduğu belirlenen tüplerde ksiloz izomeraz aktivitesi arandı. Aktivite tespiti yapılan örnekler toplanarak SDS-PAGE elektroforezinde gösterildi.

Yapılan saflaştırma işlemlerine ait saflaştırma tablosu hazırlandı. Verimlilik, her bir saflaştırma sonrası üründe bulunan toplam enzim ünitesinin ham özütteki toplam enzim ünitesine bölümünün 100 katı alınarak hesaplandı. Saflaştırma katı her saflaştırma basamağına ait örneğin spesifik aktivitesinin, ham özütün spesifik aktivitesine bölünmesiyle hesaplandı

2.5. KI'nın Karakterizasyonu

2.5.1. Deneylerde Kullanılacak Enzim Miktarının Belirlenmesi

Deneylerde kullanılacak enzim miktarını belirlemek için enzim reaksiyon tamponuyla protein konsantrasyonu 0,1673 µg/µl olacak şekilde seyreltildi. Seyreltilen enzimlerle 1 µl, 2 µl, 3 µl, 4 µl, 5 µl, 6 µl, 8 µl, 10 µl, 15 µl, 20 µl, 30 µl, 40 µl, 60 µl enzim miktarlarıyla reaksiyonlar gerçekleştirildi. Reaksiyon 1 mM MnSO₄ içeren 50 mM MOPS (pH 7) tamponunda 100 mM ksiloz varlığında 85°C'de 30 dk süre ile gerçekleştirildi.

Reaksiyonlar sonucunda enzim miktarı – aktivite (%) grafiği oluşturularak karakterizasyon çalışmalarında kullanılacak enzim miktarı belirlendi.

2.5.2. Enzim Kinetiği

AgoG2KI'nin ksiloz için sahip olduğu K_m değeri ve bu değere bağlı olarak bulunan diğer kinetik veriler 2,5 ve 150 mM aralığında ksiloz kullanılarak yapılan bir dizi reaksiyon ile belirlendi. Deneyler 0,502 μ g enzim kullanılarak, 1 mM $MnSO_4$ iğereren 50 mM MOPS (pH 7) tamponunda, 100 μ l son hacimde, 85°C'de, 30 dk, Biometra Personal Cycler PCR cihazında geręekleřtirildi. Reaksiyonlar sonucu oluşan ksiloz miktarındaki artışa göre hazırlanan Linewear-Burk eğrisi kullanılarak (Linewear ve Burk, 1934) Michealis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız V_{max} değerleri belirlendi. K_m ve V_{max} değerleri Linewear-Burk eğrisinde x ve y eksenlerinin keştiği noktalara karşılık gelen değerlerin tersi bulunarak belirlendi.

2.5.3. Optimum Sıcaklık

A. gonensis G2^T KI'nın en iyi ęalıřtıđı sıcaklık değerleri, 100 mM ksiloz (substrat doygunluk değerleri), 1 mM $MnSO_4$, 50 mM MOPS (pH 7) tamponu içerisinde 0,502 μ g enzim kullanılarak 27, 35, 41, 50, 55, 58, 65, 70, 75, 78, 84, 90, 95, 100°C'lerde BioRAD PCR cihazında geręekleřtirilen aktivite deneyleriyle bulundu. İlk olarak 84 - 90°C aralığı belirlendi. Daha sonra sıcaklık noktasını daha hassas bir biçimde belirlemek için 84, 85, 86, 87, 90°C'lerde deney tekrarlanarak optimum reaksiyon sıcaklığı belirlendi. Enzim aktivitesi için belirlenen optimum sıcaklık daha sonraki deneylerde reaksiyon sıcaklığı olarak kullanıldı.

2.5.4. Optimum pH

A. gonensis G2^T KI'nın en iyi ęalıřtıđı pH'yı bulmak için 1 mM $MnSO_4$ iğereren pH'sı 5,0 ve 5,5 olan 50 mM asetat tamponu; pH'sı 6,0 ve 6,5 olan 50 mM fosfat tamponu; pH'sı 7,0, 7,5, 8,0, 8,5 ve 9,0 olan 50 mM Tris tamponu; pH'sı 9,5, 10 olan 50 mM glisin tamponları kullanılarak aktivite deneyleri geręekleřtirildi. Reaksiyonlar 0,502 μ g enzim

kullanılarak 100 mM ksiloz varlığında 100 µl son hacimde ve 85°C'de 30 dk boyunca gerçekleştirildi. Gözlenen optimum pH daha sonraki deney şartlarında kullanılacak olan reaksiyon pH'sı olarak belirlendi.

2.5.5. Isıl Kararlılık

A. gonensis G2^T KI'nın ısı kararlılığını belirlemek için saflaştırılan enzim özütü 25 (oda sıcaklığı), 55 (*A.gonensis* G2^T'nin optimum büyüme sıcaklığı), 80, 85 (enzimin optimum çalışma sıcaklığı), 90 ve 95°C'lerde inkübe edildi. Çeşitli zamanlarda bu tüplerden örnekler alınarak, optimum çalışma şartlarında (25 mM ksiloz, 1 mM MnSO₄ varlığında 100 µl son hacimde ve 85°C'de 30 dk boyunca pH 6,5 olan MOPS tamponunda) aktivite ölçümü yapıldı ve enzimin kalan aktivitesi hesaplandı.

2.5.6. pH Kararlılığı

AgoG2KI'nin pH kararlılığını belirlemek için saf enzim özütü, 1 mM MnSO₄ içeren pH'sı 5,0 ve 5,5 olan 50 mM asetat tamponu; pH'sı 6,0 ve 6,5 olan 50 mM fosfat tamponu; pH'sı 7,0, 7,5, 8,0, 8,5 ve 9,0 olan 50 mM Tris tamponu; pH'sı 9,5, 10 olan 50 mM glisin tamponlarında +4°C'de (buzdolabında) inkübe edildi. Çeşitli zaman aralıklarında inkübe edilen enzimlerden alınarak optimum çalışma şartlarında (25 mM ksiloz varlığında 100 µl son hacimde ve 85°C'de 30 dk boyunca pH 6,5 olan MOPS tamponunda) aktivite ölçümü yapıldı ve enzimin kalan aktivitesi hesaplandı. İlk anda alınan aktivite ölçümü % 100 kabul edildi.

2.5.7. Aktivatör Etkisi

Genel olarak, Co⁺², Mn⁺² ve Mg⁺² bivalent metal iyonlarının KI'lar için aktivatör oldukları bilinmektedir (Bhosale ve ark.,1996). Bu metal iyonlarının *AgoG2KI*'i üzerinde olan aktivatör etkisi optimum reaksiyon şartlarında (100 mM substrat konsantrasyonu, pH 6,5, 85°C'de 30 dk) incelendi. Her bir metal iyonu, reaksiyon karışımında 1, 5, 10 ve 30 mM nihai konsantrasyonda kullanılarak en etkin oldukları konsantrasyon belirlendi. Deneyin ikinci aşamasında, Co⁺², Mn⁺² ve Mg⁺² bivalent metal iyonlarının farklı

konsantrasyonlarda ikili kullanılmalarının KI aktivitesi üzerine olan etkisi araştırıldı. KI aktivitesi üzerine; Mg^{2+} (10 mM) ile Co^{2+} (1 mM), Mg^{2+} (30 mM) ile Co^{2+} (5 mM), Mn^{2+} (10 mM) ile Co^{2+} (1 mM), Mn^{2+} (30 mM) ile Co^{2+} (5 mM) iyonlarının etkisi belirlendi.

2.5.8. İnhibitor Etkisi

AgoG2KI aktivitesi üzerine metal iyonlarının inhibitör etkisi; Cd^{+2} , Ca^{+2} , Hg^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} ve Cu^{+2} bivalent metal iyonlarının klorür ve sülfat tuzları ile gerçekleştirildi. Reaksiyonlar, enzimin çalıştığı optimum reaksiyon şartlarında (25 mM substrat konsantrasyonu, pH 6,5, 85°C’de 30 dakika) 1 mM inhibitör metal iyonu varlığında gerçekleştirildi.

2.5.9. HPLC ile Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi

Saf enzimin moleküler ağırlığı, Superdex™ 200 10/300 GL (Amersham (katolog no:17-5175-01)) jel filtrasyonu kolonu, 50 mM fosfat tamponu kullanılarak, hareketli fazın akış hızı 0,5 ml/dk olacak şekilde Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile belirlendi. Elüsyonu yapılan bileşikler UV ile belirlendi. Moleküler ağırlık işaretçileri olarak; Karbonik anhidraz (29 kDa), BSA (66 kDa), Alkol dehidrogenaz (150 kDa), β -amilaz (200 kDa), Apoferritin (443 kDa) kullanıldı. KI enziminin geldiği dk belirlenerek, molekül ağırlığı hesaplandı.

3. BULGULAR

3.1. KI Aktivitesi

A. gonensis G2^T, *Saccharococcus caldxylosilyticus* ve *E. coli* HB101 suşunda KI aktivitesi Belfaqui ve arkadaşları (2000) tarafından geliştirilen yöntem kullanılarak araştırıldı. KI aktivitesi reaksiyon sonucunda oluşan ksiluloz miktarının spektroskopik olarak belirlenmesi üzerinden ünite olarak hesaplandı. Bir ünite enzim aktivitesi; 85°C’de dakikada 1 µmol ksiluloz açığa çıkartan enzim miktarı olarak hesap edildi. İncelemeler sonucunda, *A. gonensis* G2^T ve *Saccharococcus caldxylosilyticus*’un KI aktivitesine sahip olduğu, negatif mutanlığı olan *E. coli* HB101 suşunun KI aktivitesi göstermediği tespit edildi (Tablo4).

Tablo 4. *A. gonensis* G2^T, *Saccharococcus caldxylosilyticus* ve *E. coli* HB101 suşunda KI aktivitesi

Bakteri	Aktivite (µmol/dak)
<i>A. gonensis</i> G2 ^T	0,101
<i>S. caldxylosilyticus</i>	0,00152
<i>E. coli</i> HB101	0

3.2. *A.gonensis* G2^T KI Geninin Baz Diziliminin Belirlenmesi

*Ago*G2KI geninin 530 baz çiftlik bir kısmı daha önce yapılan çalışmalar ile belirlenmişti (Karaoğlu, H., 2004). Tasarlanan primer çiftleri ile ilk seferde 530 baz çiftlik kısma 5’ yönünde 182 nükleotit (*Mbo*I restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılarak), 3’ yönde ise 56 nükleotit (*Hin*fI restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılarak) ilave edildi. İlave edilen parçalar ile 768 baz çiftlik bir kısmın baz dizilimi açığa çıkarılmış oldu. Bu yeni parçanın uç kısımlarından yeni bir çift primer daha sentezlenerek yukarıda anlatılan

işlemler tekrarlandı. Yeni elde edilen parçaların ilavesiyle 1073 bp'lik bir kısmın baz dizilimi belirlendi. Bu son parçanın uçlarından sentezlenen yeni primerler ile tekrarlanan deneyler sonucunda sekansı bilinen kısmın uzunluğu 1273 bp'ye kadar uzatıldı ve genin 5' bölgesi yakalandı. Sentezlenen başka bir primer ile de genin son kısmının baz dizilimi de açığa çıkarılmış oldu. Böylelikle yapılan çalışmalar sonucunda *Anoxybacillus gonensis*'e ait 1326 bp'lik ksiloz izomeraz geninin baz dizilimi tamamıyla belirlendi. Elde edilen baz dizilimi Ek 1'de gösterilmiştir.

Elde edilen genin baz dizilimi Genbank'taki diğer bakterilerin KI genleriyle aminoasit dizilimleri dikkate alınarak karşılaştırıldı. Bu karşılaştırma sonuçlarına göre AgoG2KI geni dikkate alındığında; *Bacillus stearotherophilus* ve *Geobacillus stearotherophilus*'a %90, *Geobacillus thermodenitrificans* ve *Geobacillus kaustophilus*'a %89, *Bacillus halodurans*'a %79, *Bacillus clausii*'e %78, *Bacillus cereus*'a %76, *Bacillus subtilis*'e %76, *Bacillus megaterium*'a %77, *Bacillus coagulans*'a %75 ve daha birçok bakterinin KI genine de %70'in üzerinde benzerlik göstermektedir.

3.3. Genin pET-28a(+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

Baz dizilimi belirlenen *A. gonensis* G2^T KI geni Xyla_Ex_F1 ve Xyla_Ex_R1 primerleri kullanılarak pET-28a(+) ekspresyon vektörüne HisTag kuyruğu içerecek şekilde klonlandı. Bu gen *E.coli* BL21(DE3) suşunda ekspres edildi. Ancak, bu hücreden izole edilen hücre özütünde yapılan KI aktivite çalışmalarında aktivitenin çok düşük olduğu gözlemlendi. (spesifik aktivite: 0,05 U/mg). Aktivitenin düşük gözlenmesi nedeniyle gen, Xyla_Ex_F1 ve Xyla_Ex_R2 primerleri kullanılarak, pET-28a(+) ekspresyon vektörüne HisTag kuyruğu içermeyecek şekilde klonlandı. Bu gen *E.coli* BL21(DE3) suşunda ekspres edildi. Yapılan KI aktivite deneyi sonucunda yüksek aktivite gözlemlendi (spesifik aktivite: 3,18 U/mg). Bu işlemden sonra, ekspres olan gen ürünü HisTag kuyruğu içermediği için, saflaştırma işlemlerine HisTag saflaştırma kiti ile değil, ısı şoku ve kolon kromatografisi yöntemleriyle devam edildi.

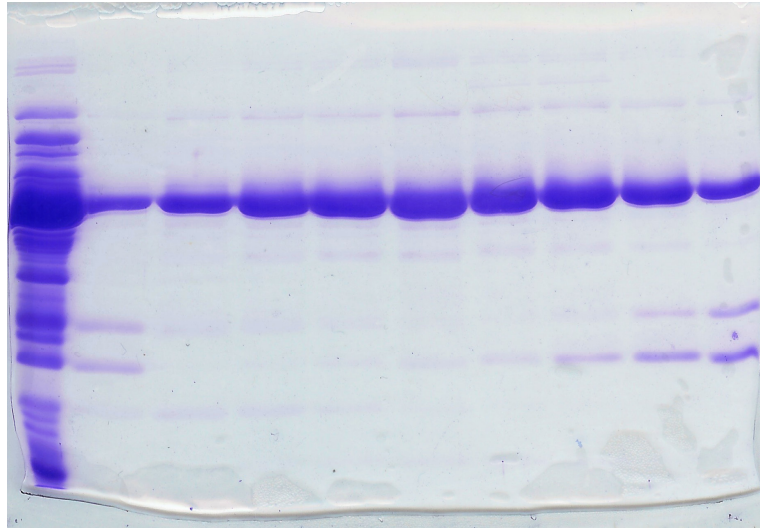
3.4. KI'nın Saflaştırılması

3.4.1. Hücre Özütü Elde Edilmesi ve Isı Şoku Uygulamaları

Elde edilen hücre özütünde ve bu özütün ısı şoku uygulamasından elde edilen özütte protein konsantrasyonu tayini ve spesifik aktivite tayini yapıldı. Elde edilen veriler Tablo 5'te gösterildi.

3.4.2. İyon Değişimi Kolon Kromatografisi

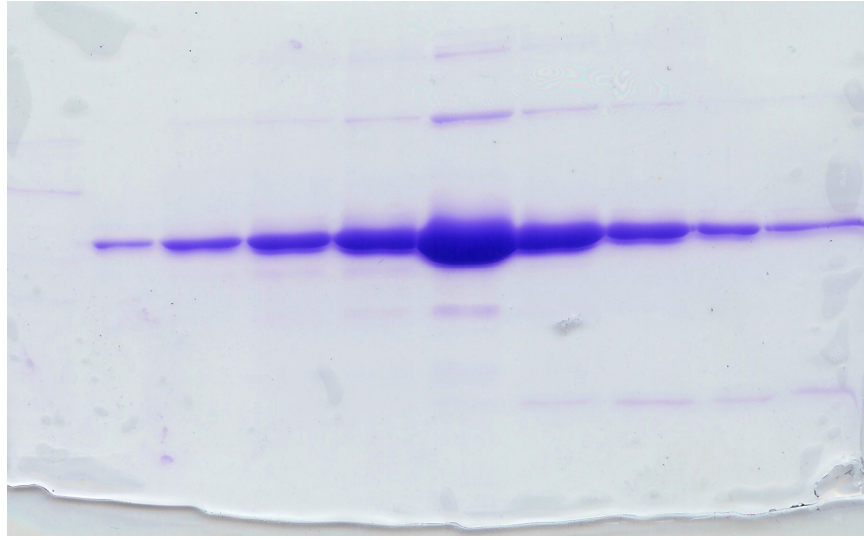
Isı şoku uygulamasından sonra elde edilen hücre özütü iyon değişimi kolon kromatografisinden geçirildikten sonra, aktivite görülen fraksiyonlar SDS-PAGE'de yürütüldü ve aktivitenin yüksek gözlemlendiği fraksiyonlar birleştirildi. Fraksiyonlar birleştirildikten sonra, kısmen saflaştırılmış özütte protein konsantrasyonu tayini ve spesifik aktivite tayini yapıldı. Bulunan veriler Tablo 5'te, elde edilen jel görüntüsü Şekil 3'te verildi.



Şekil 3. İyon değişim kromatografisi sonrası aktivite görülen fraksiyonların SDS-PAGE jel görüntüsü

3.4.3. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi

İyon değişimi kolon kromatografisi uygulamasından sonra elde edilen kısmen saflaştırılmış özüt, hidrofobik kolon kromatografisinden geçirildikten sonra, aktivite görülen fraksiyonlar SDS-PAGE’de yürütüldü ve uygun görülen fraksiyonlar birleştirildi. Fraksiyonlar birleştirildikten sonra, saflaştırılmış enzimin konsantrasyon tayini ve spesifik aktivite tayini yapıldı. Bulunan veriler Tablo5’te, elde edilen jel görüntüsü Şekil 4’te verildi.



Şekil 4. Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonrası aktivite görülen fraksiyonların SDS-PAGE jel görüntüsü

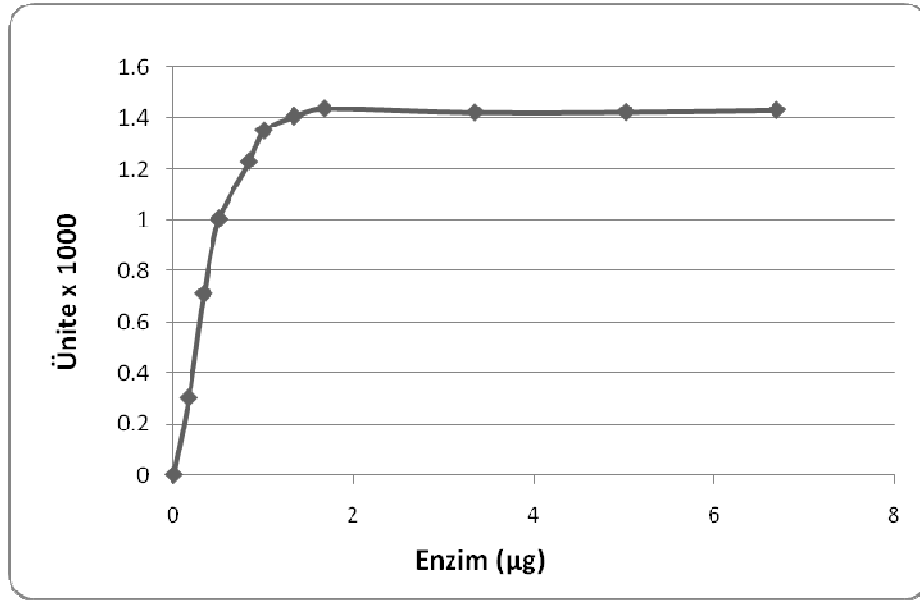
Tablo 5. A α G2KI’nın saflaştırma tablosu

Saflaştırma basamağı	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite (U)	Spesifik aktivite (U/mg)	Verimlilik (%)	Saflaştırma katsayısı
Ham ekstrat	20,88	66,39	3,18	100	1
Isı şoku	4,624	63,67	13,77	95,89	4,330
İyon değişimi	2,15	57,8	26,88	87,05	8,45
Hidrofobik etkileşim	1,39	48,56	34,94	73,14	10,98

3.5. KI'nın Karakterizasyonu

3.5.1. Deneysel Kullanılacak Enzim Miktarının Belirlenmesi

Substrat miktarı sabit tutularak, kademeli olarak enzim miktarı artırıldı ve enzim artışına karşılık gelen aktivite hesaplandı. Deneysel kullanılacak enzim miktarının 0,5 μg olmasına karar verildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 5'te görülmektedir.



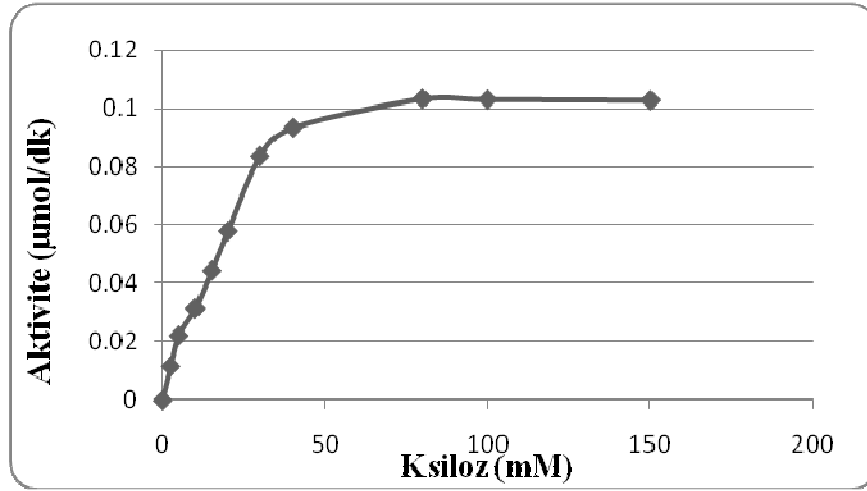
Şekil 5. Enzim miktarı -KI aktivite grafiği

Enzim miktarı-KI aktivite grafiğinde enzim miktarının ve aktivitenin doğrusal artış gösterdiği yani enzimin yarı doymun olduğu bir noktadaki enzim miktarı deneysel kullanılmak üzere seçildi.

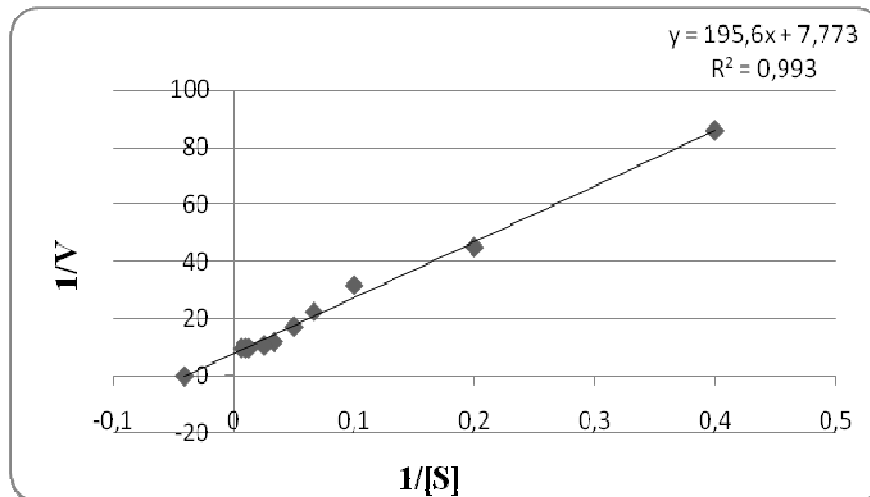
3.5.2. Enzim Kinetiği

Enzim kinetiği deneyleri 0,5 μg enzim kullanılarak gerçekleştirildi. *AgoG2KI*'nin ksiloz varlığında substrat-aktivite grafiği çizilerek enzimin basit Michaelis-Menten kinetiğine uyduğu tespit edildi (Şekil 6). Ksiloz'un substrat olduğu reaksiyonda ksiloz için

çizilen Lineweaver-Burk eğrilerinin oluşturduğu doğrunun x-ksenini kestiği nokta $-1/K_m$ 'ye eşitlenerek K_m değeri 25 ± 2 mM, y-ksenini kestiği nokta ise $1/V_{max}$ 'a eşitlenerek V_{max} değeri $0,12958 \pm 0,002$ $\mu\text{mol/dak}$ olarak hesaplandı (Şekil 7). Michaelis-Menten grafiği incelendiğinde, 100 mM ksiloz enzimin substrat doygunluğuna ulaştığı nokta olarak belirlendi. Bu aşamadan sonra yapılan tüm karakterizasyon çalışmalarında, substrat konsantrasyonu olarak 100 mM ksiloz kullanıldı.



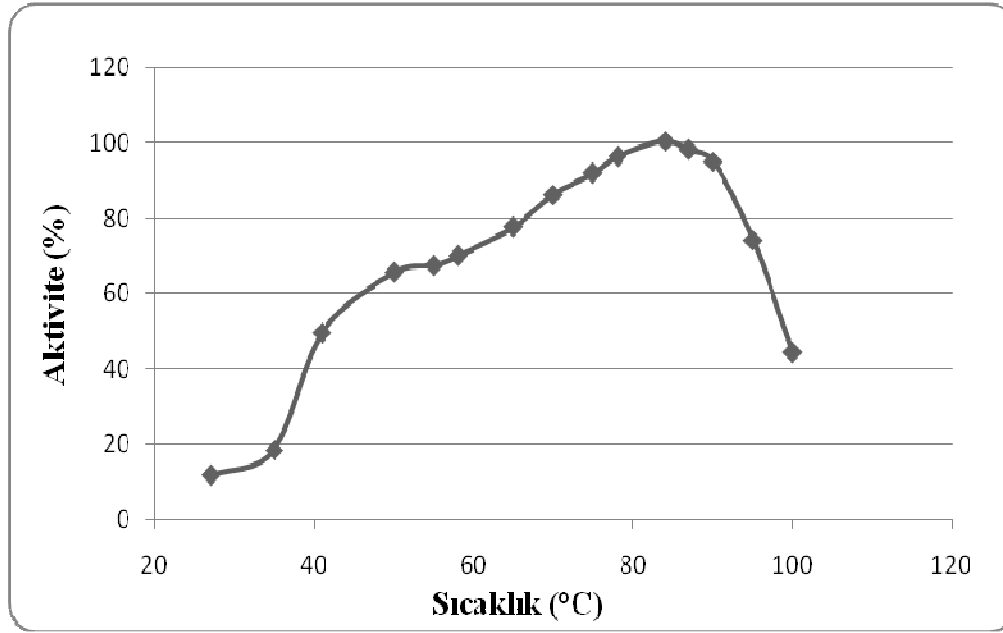
Şekil 6. AgoG2KI'nın ksiloz varlığında Michaelis-Menten grafiği



Şekil 7. AgoG2KI'nın ksiloz varlığında Lineweaver- grafiği

3.5.3. Optimum Sıcaklık

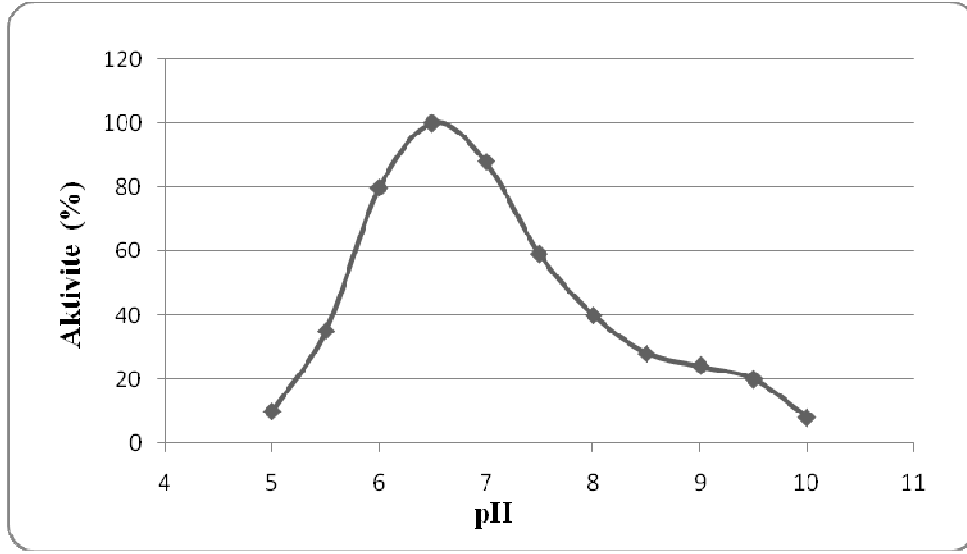
AgoG2KI'inin 27, 35, 41, 50, 55, 58, 65, 70, 75, 78, 84, 87, 90, 95, 100°C'lerde aktivitesi ölçülerek enzimin çalışmasına sıcaklığın etkisi araştırıldı ve sıcaklık-aktivite grafiği oluşturuldu. Oluşturulan ilk grafiğe göre 84-87°C aralığında bulunan aktivite değerlerinin birbirine oldukça yakın olduğu gözlemlendi. Bu nedenle daha doğru bir optimum sıcaklık belirlemek için deney 84, 85, 86 ve 87°C'lerde tekrarlandı. Bu sıcaklıklarda ölçülen aktivitelere göre oluşturulan sıcaklık-aktivite grafiği Şekil 8'de gösterildi. Sonuç olarak enzimin optimum sıcaklığı 85°C olarak belirlendi, sonraki deneylerde reaksiyonlar bu sıcaklıkta gerçekleştirildi.



Şekil 8. Optimum Sıcaklık- Aktivite grafiği

3.5.4. Optimum pH

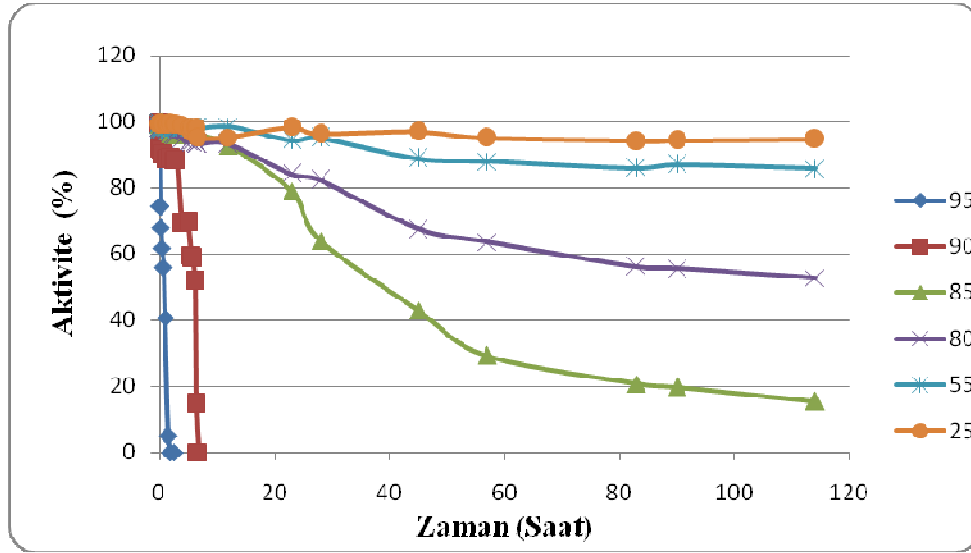
pH'nın KI aktivitesi üzerine etkisi pH 4 - 9,5 aralığındaki tamponlarda gerçekleştirilen bir seri reaksiyon ile incelendi. Elde edilen aktivite ölçümlerine göre pH-Aktivite grafiği oluşturuldu. Şekil 9'da da görüldüğü üzere KI aktivitesi en yüksek 6,5 pH'ya sahip tamponda gözlemlendi.



Şekil 9. pH - KI aktivite grafiği

3.5.5. Isıl Kararlılık

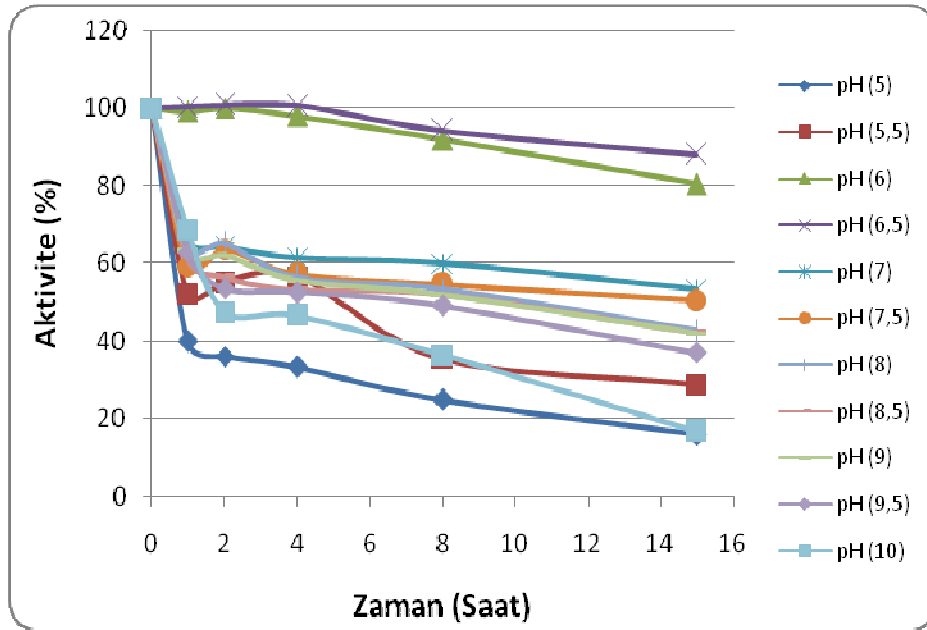
AgoG2KI'ının 95, 90, 85, 80, 55 °C'lerde ve oda sıcaklığında 0. dk'dan itibaren farklı zaman aralıklarında aktivite ölçümleri alındı ve alınan bu ölçümler değerlendirilerek bu sıcaklıklarda enzimin kararlılığı belirlendi (Şekil 10). Yapılan deney sonucunda enzimin oda sıcaklığında aktivitesini kaybetmediği belirlendi. 95 ve 90°C'lik uygulamalarda enzimin 4-6 saat gibi kısa bir sürede tüm aktivitesini kaybettiği belirlendi. Şekil 9'da da görüldüğü gibi enzimin optimum çalışma sıcaklığı olan 85°C'lik uygulamalarda ise 50 saat sonunda enzim aktivitesinin yarıya düştüğü belirlendi. Oda sıcaklığında ise enzimin kararlılığını koruduğu belirlendi.



Şekil 10. *KI*'ın sıcaklık kararlılığının zamana karşı değişim grafiği

3.5.6. pH Kararlılığı

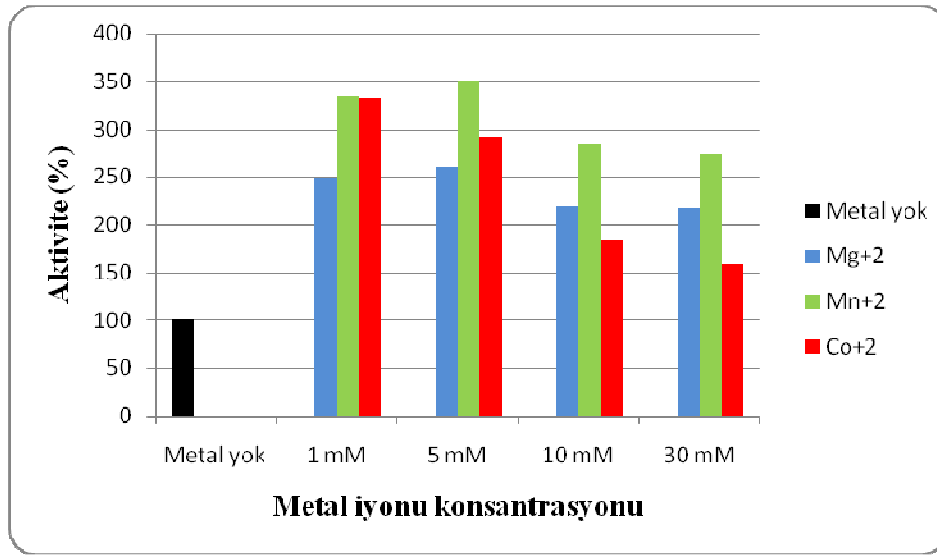
AgoG2KI'ın pH kararlılığını belirlemek için saf enzim özütü pH'sı 5 ile 10 arasında değişen tamponlar içerisinde +4°C'de (buzdolabında) inkübe edildi. İnkübasyon sonrası yapılan aktivite denemeleri sonucunda enzimin, 6 ve 6,5 pH'larda oldukça kararlı olduğu belirlendi. Daha yukarı (pH 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 ve 10) ve aşağı pH değerlerinde (pH 5, 5,5 ve 6) ise enzim aktivitesinin 15 günün sonunda yarıya indiği belirlendi (şekil 11). Enzim aktivitesinin % olarak zamana göre değişiminin grafiğini çizerken ilk alınan aktivite değeri % 100 kabul edildi.



Şekil 11. KI'ın pH kararlılığının zamana karşı değişim grafiği

3.5.7. Aktivatör Etkisi

Co^{+2} , Mg^{+2} ve Mn^{+2} gibi bivalent katyon iyonlarının KI aktivitesi üzerine olan etkisi, 1, 5, 10 ve 30 mM konsantrasyonlarda metal iyonu varlığında bir dizi reaksiyon ile belirlendi (Şekil 12). Yapılan Deneyler sonucunda enzimin Co^{+2} , Mg^{+2} ve Mn^{+2} iyonları yok iken oldukça düşük aktivite gösterdiği, yani KI aktivitesi için bivalent bir metal iyonuna ihtiyaç duyulduğu belirlendi. Ayrıca en yüksek aktivite 5 mM Mn^{+2} varlığında gözlemlendi.



Şekil 12. KI aktivitesi üzerine farklı konsantrasyonlardaki farklı metal iyonlarının aktivatör etkisi

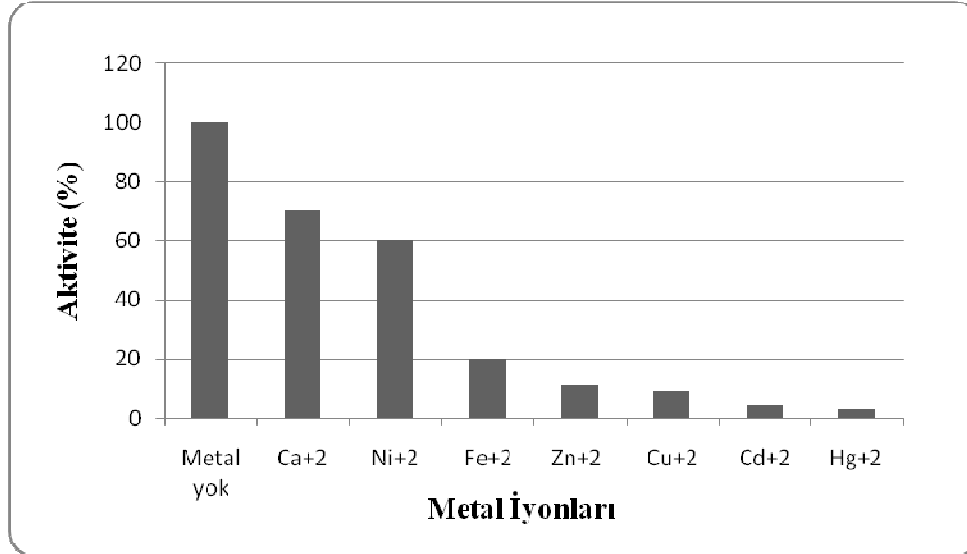
Deneyin ikinci aşamasında, KI aktivitesi üzerine Mg^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} iyonlarının farklı konsantrasyonlardaki karışımlarının etkisi araştırıldı. Enzimin metal iyonu olmadan gösterdiği aktivite değeri %100 kabul edildi. Diğer metal iyonları kombinasyonlarının KI aktivitesi üzerine etkisi % aktivite üzerinden hesaplandı. Sonuçlar Tablo 6'da görülmektedir.

Tablo 6. *A. gonensis* G2^T KI'a farklı metal iyonlarının farklı konsantrasyonlarda ikili etkisi

Metal İyonu	% Aktivite
Metal İyonu yokken	100
Mg ²⁺ (10 Mm) - Co ²⁺ (1 Mm)	325
Mg ²⁺ (30 Mm) - Co ²⁺ (5 Mm)	203
Mn ²⁺ (10 Mm) - Co ²⁺ (1 Mm)	257
Mn ²⁺ (30 Mm) - Co ²⁺ (5 Mm)	287

3.5.8. İnhibitor Etkisi

*Ago*G2KI aktivitesi üzerine metal iyonlarının inhibitör etkisi; Cd²⁺, Ca²⁺, Hg²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺ ve Cu²⁺ bivalent metal iyonlarının klorür ve sülfat tuzları ile gerçekleştirildi. Şekil 13'de de görüldüğü gibi Cd²⁺, Hg²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺ ve Cu²⁺ metal iyonları *Ago*G2KI aktivitesinin % 20'nin altına düşürmüştür.



Şekil 13. KI aktivitesi üzerine farklı metal iyonlarının inhibitör etkisi

3.5.9. HPLC ile Moleküler Ağırlığın Belirlenmesi

Yapılan HPLC İşleminde, 20,5. dk'da Apoferritin (443 kDa), 23. dk'da β -amilaz (200 kDa), 24,3. dk'da Ksiloz İzomeraz (180 kDa), 25. dk'da Alkol dehidrogenaz (150 kDa), 27. dk'da 66 kDa BSA, 32. dk'da Karbonik anhidraz (29 kDa) elüe edildi. 24,3. dk'da elüe edilen KI'nın moleküler ağırlığı 180 kDa olarak hesaplandı.

3.5.9. İzoelektrik Noktası Tayini

A. gonensis G2^T KI'sının izoelektrik noktası TagIdent ExPASy adlı internet tabanlı ücretsiz bilgisayar yazılımı ile aminoasit dizilimi kullanılarak teorik olarak hesaplandı. *A. gonensis* G2^T KI'sının izoelektrik noktası 6.1 olarak belirlendi.

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada Gönen kaplıcalarından izole edilen *A. gonensis* G2^T'a ait KI enzimini kodlayan genin klonlanmasına ve enzimin biyokimyasal özelliklerinin ve kinetik parametrelerinin ortaya konulmasına çalışılmıştır.

A. gonensis G2^T KI geninin 530 baz çiftlik bir kısmı daha önce yapılan çalışmalar ile belirlenmişti (Karaoğlu, H., 2004). Bu tez kapsamında öncelikle, genin tüm baz dizilimi açığa çıkarılmıştır. Sonrasında, *A. gonensis* G2^T KI'sı Genbank'taki diğer bakterilerin KI genleriyle aminoasit dizilimleri dikkate alınarak karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonuçlarına göre *AgoG2KI*'sı amino asit dizilimleri bakımından; *Bacillus stearothermophilus* ve *Geobacillus stearothermophilus*'a %90, *Geobacillus thermodenitrificans* ve *Geobacillus kaustophilus*'a %89, *Bacillus halodurans*'a %79, *Bacillus clausii*'e %78, *Bacillus cereus*'a %76, *Bacillus subtilis*'e %76, *Bacillus megaterium*'a %77, *Bacillus coagulans*'a %75 ve daha birçok bakterinin KI genine de %70'in üzerinde benzerlik göstermektedir. Genel olarak bakıldığında KI'lar aminoasit dizilimlerine göre iki grup altında sınıflandırılırlar (Bhosale ve ark.,1996). Tip1 KI'lar N-Terminal ucunda 30 ila 40 aminoasitlik bir fazlalık parça bulunmaktadır ve bu enzimler birbirlerine aminoasit dizilimi bakımından oldukça benzerdir. Genbank'ta yapılan bu karşılaştırma sonucunda *AgoG2KI*'sının Tip1 KI'lara benzerlik gösterdiği görülmektedir.

A. gonensis G2^T KI geni Xyla_Ex_F1 ve Xyla_Ex_R1 primerleri kullanılarak pET-28a(+) ekspresyon vektörüne, C-terminalinde HisTag kuyruğu içerecek şekilde klonlanmış ve *E.coli* BL21(DE3) suşunda ekspres edilmiştir. Ancak, bu hücreden izole edilen hücre özütünde yapılan KI aktivite çalışmalarında aktivitenin çok düşük olduğu gözlenmiştir. Bu durumda proteinin karboksil ucuna taktığımız HisTag kuyruğunun proteinin aktivitesi üzerinde olumsuz bir etki yaptığı anlaşılmıştır. Bu sebepten enzimi vektör içerisine HisTag kuyruğu olmadan klonlanmasına karar verilmiş ve Xyla_Ex_F1 ve Xyla_Ex_R2 primerleri kullanılarak, pET-28a(+) ekspresyon vektörüne klonlanmıştır. Klonlama sonrası elde edilen hücre özütünde yüksek KI aktivitesi gözlenmesi bir önceki klonlamadaki aktivite kaybına sebebin HisTag kuyruğu olduğunu göstermektedir.

Yukarıda anlatıldığı şekilde elde edilen hücre özütü mezofilik olan *E.coli* BL21 hücresinden elde edilmiştir. Dolayısı ile ekspresyon vektöründen çoğaltılan enzimimiz dışında diğer tüm proteinler mezofilik karakterde olduklarından dolayı kısa süreli bir sıcak

şoku uygulamasında mezofilik karakterdeki proteinlerin çok büyük bir bölümü denatüre olmaktadır. Termofilik karakterli enzimimiz ise bu durumdan etkilenmemektedir. Kuyruksuz KI enzimi içeren hücre özütüne, HisTag ile saflaştırma yapmayacağımızdan dolayı, daha fazla saflaştırma sağlayabilmek için 15 dakika 75°C'lik bir ısı şoku uygulaması yapılmıştır. Isı şoku sonrası parçalanan tüm proteinler 14.800 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek uzaklaştırıldı. Böylelikle kolon kromatografisi öncesi 4,3 katlık bir ön saflaştırma işlemi yapılmıştır.

Karakterizasyon çalışmaları enzim aktivasyonu üzerinden yapılmaktadır. Bu çalışmada enzim aktivasyonu, reaksiyon sonucu açığa çıkan D-ksiluloz miktarına göre belirlenmektedir. Dolayısı ile ksiloz izomeraz enzimin karakterizasyonun yapılabilmesi için reaksiyon sonrasında açığa çıkan D-ksiluloz miktarının belirlenmesi gerekmektedir. Oluşan D-ksiluloz miktarı Dische ve arkadaşlarının (1951) geliştirdikleri sistein-karbozol-sülfirik asit metoduyla belirlenmektedir. Açığa çıkan D-ksiluloz, bu reaksiyon sonrasında, pembe-mor renkli bir ürüne dönüşmektedir. Bir çözelti içerisindeki D-ksiluloz miktarı 540 nm dalga boyunda yapılan spektroskopik ölçümler sonrası oluşturulan D-ksiluloz standardından belirlenebilmektedir. Reaksiyon sonrasında özellikle analiz yapılacak örnek içerisinde yüksek miktarda D-ksiluloz bulunması durumunda yüksek miktarlarda renkli ürün oluşmaktadır. Bu durum ise özellikle belli bir yoğunluktan sonra spektrofotometrede gerçek değerinin altında ölçüm alınmasına sebep olmaktadır. Lambert-Beer Kanunu olarak bilinen bu durum sonucunda artan D-ksiluloz içeriğine karşı belli bir noktadan sonra alınan ölçümlerin gerçeği yansıtmadığı saptanmıştır. Bu sonuca, yüksek miktarlarda enzim içeren ekspresyon vektörü ile elde edilen ve saflaştırılan enzim özütü ile yapılan çalışmalar sonrasında varılmıştır. Bu özütü ile yapılan deneyler sonucunda reaksiyon sonrası oluşan çözeltinin en az 30 kat hatta bazen 50 kat seyreltilmesi gerektiği tespit edilmiştir. Seyreltme işlemi reaksiyon bittikten sonra yapılmalıdır. Enzimi seyreltmek çözüm değildir. Çünkü özellikle substrat olan D-ksilozun konsantrasyonunu arttırdığımızda D-ksilozdan meydana gelen renklenme (ki D-ksilozda D-ksiluloza nazaran çok az da olsa belli bir oranda renk oluşturmaktadır) D-ksilulozdan meydana geleni baskılamaktadır. Enzimi seyreltmeksizin reaksiyon bittikten sonra yapılan seyreltme işleminde D-ksiloz da D-ksiluloz ile birlikte seyreceği için deneyin sonuçlarını etkilememektedir.

Yapılan optimum pH çalışmaları sonucunda *A. gonensis* G2^T KI'nın optimum pH değeri 6,5 olarak bulunmuştur. *Thermoanaerobacterium* sp. (Liu ve ark., 1996), *Actinoplanes missouriensis* (Van Tillbeurgh ve ark., 1992), *Lactobacillus brevis*

(Yamanaka, 1975) ve *Thermus aquaticus* (Lehmbacher, 1990) KI'ları haricindeki diğer KI'ların optimum pH değeri 6,5'ten daha yüksektir. Bu özelliği ile enzimi birçok mikroorganizmanın KI'sına göre, daha asidik bir ortamda çalışmaktadır.

A. gonensis G2^T KI'ın optimum çalışma sıcaklığı 85°C olarak bulunmuştur. Literatürde yapılan incelemelerde ise benzer şekilde *Streptomyces* sp. (Inyang ve ark., 1995) ve *Bacillus* sp. (Chauthaiwale ve ark., 1994) türlerine ait KI'ın optimum çalışma sıcaklıklarının da 85°C olduğu görülmektedir. *Thermotoga neapolitana* KI'ının ise optimum 95°C'de çalıştığı belirtilmiştir. (Hess ve ark., 1998). Bu KI'lar haricindeki diğer KI'lar genel olarak optimum 60°C ile 80°C arasında aktivite göstermektedirler (Bhosale ve ark., 1996). Bu verilere dayanılarak, 85°C'lik optimum çalışma sıcaklığı ile *A. gonensis* G2^T KI'sının oldukça termofilik bir enzim olduğu söylenebilir.

KI, D-ksilozdan etanol üretiminde endüstriyel olarak kullanılmaktadır. D-ksilozdan etanol üretiminde düşük fermentasyon oranı gözlenmesine ve düşük ürün verimliliği elde edilmesine rağmen şu anda ksilozun izomerizasyonunu ve etanole fermentasyonunu eş zamanda sağlamak amacıyla KI geninin mayalara transfer edilmesi çalışmaları hızla artmaktadır (Chaing ve ark., 1981; Chan ve ark., 1989; Gong ve ark., 1981; Schneider ve ark., 1981; Wang ve ark., 1980). Fakat böylesi bir çalışma optimum çalışma sıcaklığı 85°C olan *A. gonensis* G2^T KI'sı için uygun değildir. Ancak, optimum çalışma sıcaklığı 90°C olan *Thermus thermophilus* KI'ının etanol üretmek amacıyla, yapılan mutasyonlarla optimum sıcaklığının 60°C'ye düşürülerek *Saccharomyces cerevisiae*'ye aktarıldığı (Löhn ve ark., 2003) rapor edilmiştir. Böyle bir çalışma AgoG2KI içinde mümkün gibi gözükmektedir.

Yapılan kinetik çalışmalar sonucunda *A. gonensis* G2^T KI'ının K_m değeri 25±2 mM olarak hesaplanmıştır. Enzim veri bankasından (BRENDA) yapılan karşılaştırmalar sonucundan (*Bacillus coagulans* KI K_m değeri 1,1 mM, *Lactobacillus lactis* KI K_m değeri 2,25 mM, *Thermus thermophilus* KI K_m değeri 3,44 mM, *Bacillus* sp. KI K_m değeri 6,6 mM, *Thermus aquaticus* KI K_m değeri 15 mM) D-ksiloz substratı ile ilgili bu değer oldukça yüksek bir değer olduğu görülmektedir. Buradan *A. gonensis* G2^T KI'sının D-ksilozla olan ilgisinin diğer KI'lar ile karşılaştırıldığında genel olarak daha az olduğu söylenebilir.

Yapılan kararlılık çalışmaları sonucuna *A. gonensis* G2^T KI'sının gerek pH gerekse ısı olarak oldukça kararlı olduğu ortaya çıkmıştır. Enzimin optimum çalışma sıcaklığı olan 85°C'lik uygulamalarda, 50 saat sonunda enzim aktivitesinin yarıya düştüğü belirlenmiştir.

Oda sıcaklığında ise enzimin kararlılığını koruduğu belirlendi. Literatürde yapılan karşılaştırmalarda (*Bacillus coagulans* KI'sı pH 9'da, 50°C'de, 60 dk'lık uygulamalarda %20 aktivite kaybetmektedir, *Bacillus coagulans* KI'sı pH 4'te, 50°C'de, 60 dk'lık uygulamalarda tamamen inaktiftir; *Bacillus sp.* KI'sı 80°C'de 10 dk kararlıdır; *Bacillus sp.* KI'sı 60°C'de 60 dk sonunda %35 aktivite kaybetmektedir; *Bifidobacterium adolescentis* KI'sı pH 6'da, 8°C'lik, 18 saatlik uygulamalarda %50 aktivite kaybetmektedir) diğer KI'lara göre oldukça kararlı olduğu gözükmektedir.

Ksiloz, *Saccharomyces cerevisiae*'yı da içeren birçok maya tarafından iki basamaklı bir işlemle fermente edilmektedir. Bu işlemde, ilk olarak ksiloz KI ile hücre dışında ksiluloza izomerize edilir. İkinci basamakta, ksiluloz mayalarla etanole fermente olur. Bu nedenle, ucuz KI üretimi endüstriyel kullanım açısından önemlidir. Bu çalışmada, KI enziminin *E.coli* BL21(DE3) suşuna pET-28a(+) ekspresyon vektörüyle aktarılmış olması bize enzimi çok üretme şansı verdiği için *A. gonensis* G2^T KI'sı endüstriyel olarak önemlidir. Ancak, enzimin ksiloza karşı K_m değerinin mutasyonlarla düşürülmesi gerekmektedir.

Bu tezde ilk kez bir *Anoxybacillus* KI'sı incelenmiştir ve bu cins içerisindeki diğer bakteri suşlarında yapılacak KI enzimi çalışmaları için yol gösterici olduğundan akademik yönden de önemlidir.

5. SONUÇLAR

Bu çalışma da *A. gonensis* G2^T KI geninin tamamının baz dizilimi belirlendi ve ekspresyon vektörüne klonlandı. Gen ekspres edildikten sonra, gen ürünü olan enzim saflaştırıldı. Saflaştırılan KI'nın kinetik parametreleri, optimum pH'sı, pH ve ısı kararlılığı, aktivatörleri ve inhibitörleri belirlendi.

Anoxybacillus gonensis G2^T 'nin KI aktivitesine sahip olduğu Belfaquih ve arkadaşlarının (2000) geliştirmiş olduğu aktivite deneyi kullanılarak gösterildi. *A. gonensis* G2^T'nin yüksek KI aktivitesine sahip olduğu saptandı.

Yüksek KI aktivitesine sahip olduğu saptanan *A. gonensis* G2^T'nin daha önce belirlenmiş olan 530 baz çiftlik kısmına ek olarak, genin geriye kalan kısmı da bulunarak KI geninin 1326 bp'lik baz dizilimi tamamen belirlendi. Elde edilen baz dizilimi Genbank'taki diğer bakterilerin KI genleriyle aminoasit dizilimleri dikkate alınarak karşılaştırıldı.

Baz dizilimi belirlenen *A. gonensis* G2^T KI geni pET-28a(+) ekspresyon vektörüne HisTag kuyruğu içerecek şekilde klonlandı. Bu gen *E.coli* BL21(DE3) suşunda ekspres edildi. Ancak, bu hücreden izole edilen hücre özütünde yapılan KI aktivite çalışmalarında aktivitenin çok düşük olduğu gözlemlendi (spesifik aktivite: 0,05 U/mg). Aktivitenin düşük gözlenmesi nedeniyle gen, pET-28a(+) ekspresyon vektörüne HisTag kuyruğu içermeyecek şekilde klonlandı. Bu gen *E.coli* BL21(DE3) suşunda ekspres edildi. Yapılan KI aktivite deneyi sonucunda yüksek aktivite gözlemlendi (spesifik aktivite: 3,18 U/mg). Yani, HisTag kuyruğu KI aktivitesini önemli derecede azaltmıştır

Ekspres edilen gen ürünü ısı şoku uygulaması, iyon değişimi ve hidrofobik değişim kromatografisiyle %73,14 verimle, 10,98 kat saflaştırıldı.

Karakterizasyon deneylerinde kullanılacak enzim miktarı 0,5 µg olarak belirlendi. Yapılan kinetik çalışmalar sonucu KI'nın D-ksiloz için K_m değeri 25±2 mM, V_{max} değeri 0,12958 ±0,002 µmol/dk olarak hesaplandı. Literatürde yapılan karşılaştırma sonucu KI'nın D-ksiloz için K_m 'sinin çok yüksek olduğu belirlendi. Enzimin optimum çalışma sıcaklığı 85 °C, optimum çalışma pH'sı 6,5 bulundu. Yapılan deney sonucunda enzimin oda sıcaklığında ve optimum pH'sında (pH 6,5) aktivitesini kaybetmediği belirlendi. *A. gonensis* G2^T'nin büyüme sıcaklığı olan 55°C'lik uygulamada, optimum pH'sında (pH 6,5) enzimin çok az bir aktivite kaybıyla kararlılığını koruduğu belirlendi. Enzimin optimum

çalışma sıcaklığı olan 85°C'lik uygulamalarda ise 50 saat sonunda enzim aktivitesinin yarıya düştüğü belirlendi. 95 ve 90°C'lik uygulamalarda enzimin 4-6 saat gibi kısa bir sürede tüm aktivitesini kaybettiği belirlendi. Enzimin, 6 ve 6,5 pH'larda oldukça kararlı olduğu belirlendi. Daha yukarı ve aşağı pH değerlerinde ise enzim aktivitesinin 15 günün sonunda yarıya indiği belirlendi. KI'nın aktivite göstermek için Co^{+2} , Mg^{+2} ve Mn^{+2} bivalent katyon iyonlarından birine ihtiyaç duyduğu belirlendi. Ancak en çok aktiviteyi 5 mM Mn^{+2} iyonu varlığında gösterdiği belirlendi.

Yapılan inhibitör deneyleri sonucunda Cd^{+2} , Hg^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} ve Cu^{+2} metal iyonlarının *AgoG2KI* aktivitesini % 20'nin altına düşürdüğü belirlendi.

Teorik olarak yapılan hesaplamalar ile enzimin izolektrik noktası 6.1 bulundu.

Yapılan HPLC sonucunda *AgoG2KI* moleküler ağırlığı 180 kDa olarak hesaplandı.

6. ÖNERİLER

KI, hücre içinde D-ksilozu D-ksiluloza izomerize eder. Enzimin bu özelliği mayalar tarafından alkole fermente edilebilen ksilulozun üretilmesinde kullanılır. Fosil yakıtlarının hızla tükenmekte olduğu göz önüne alınırsa, yenilenebilir biokütlenin fermentasyon yolu ile alkol üretiminin ham maddesi olabilecek şekerlere dönüştürülebilmesi oldukça önemli bir olaydır. Bu nedenle daha önce çalışılmamış *A. gonensis* G2^T KI enzimini çalışarak, endüstriyel açıdan önemli bir enzim açığa çıkarmak amaçlandı. Ancak, enzimin ksiloza karşı yüksek K_m 'ye sahip olması endüstriyel kullanım açısından değerini azaltmaktadır. Bu nedenle enzimin ksiloza karşı K_m 'sini düşürmeye yönelik mutasyonların yapılması faydalı olacaktır. Enzimin pH ve ısıl kararlılığının çok yüksek olduğu gözlenmiştir. Eğer K_m 'yi düşürmeye yönelik mutasyonlar gerçekleştirilirse, bu mutasyonların pH ve ısıl kararlılığa etkisinin araştırılması gerekmektedir.

Günümüzde bilimsel araştırmalar, KI geninin mayalara aktarılmasıyla ksilozun alkole kendiliğinden fermentasyonunun sağlanması üzerine yoğunlaşmıştır. *A. gonensis* G2 geninin mayalara transfer edilerek, etanol üretiminde kullanılabilmesi için enzimin 85 °C olan optimum çalışma sıcaklığının mutasyonlar aracılığıyla düşürülmesi gerekmektedir.

Ksilozun hücre dışında KI ile ksiluloza izomerize edildikten sonra mayalar tarafından etanole fermente edilmesi de etanol üretmek için araştırılan diğer bir yaklaşımdır. Bu nedenle KI üretim maliyetini düşürmek amacıyla, KI'nın tekrar tekrar kullanımını sağlamak için enzimi immobilize etmek faydalı olabilir.

Yapılan çalışmalarda, *AgoG2KI*'ın -20°C'de saklandıktan sonra, çözülmesinin enzimde aktivite kaybına neden olduğu saptanmıştır. Bu nedenle enzimin -20°C yerine 4 °C'de saklanması uygundur. Enzimi -20°C'de saklayabilmek için ise saklama tamponu içeriğinin belirlenmesi gereklidir.

Bu çalışmada enzimin pH ve ısıl kararlılığına farklı metal iyonlarının etkisi araştırılmamıştır. Farklı metal iyonlarının pH ve ısıl kararlılığa etkisinin çalışılması faydalı olacaktır.

KI'nın karakterizasyon çalışmasının tamamlanabilmesi için: izoelektrik focusing yöntemi ile enzimin izoelektrik noktasının bulunması gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

- Albery, W. J. ve Knowles, J. R., 1976., Free energy profile of the reaction catalyzed by triose phosphate isomerase. Biochemistry, 15, 5627–5631.
- Amore, R., Wilhelm, M. ve Hollenberg, C. P., 1989. The fermentation of xylose an analysis of the expression of *Bacillus* And *Actinoplanes* xylose isomerase genes in yeast. Appl. Microbiol. Biotechnol., 30, 351–357.
- Anheuser-Busch Inc. April 1974., Method of making glucose isomerase and using same to convert glucose to fructose, U.K. Patent, 1, 399, 408.
- Antrim, R. L., Colilla, W. ve Schnyder, B. J. 1979., Glucose isomerase production of high fructose syrups. Appl. Biochem. Bioeng., 2, 97–155.
- Armbruster, F. C., Heady, R. E. ve Cory, R. P. (Cpc International Inc.), March 1973. Xylose (Glucose)-İsomerase enzyme compositions. Ger. Offen, 2, 245, 402.
- Barker, S. A., 1976. Pure fructose syrups. Process Biochem, 11, 20–25.
- Barker, S. A., 1976. Pure fructose syrups. Process Biochem, 11, 20–25.
- Barker, S. A., Somers, P. J. ve Hatt B. W. (Boehringer Mannheim Gmbh), 1973. Fructose, U.S. Patent, 3, 875, 140.
- Basuki, W., Iizuka, M., Ito, K., Furuichi, K. ve Minamiura, N., 1992. Evidence for the existence of isoenzymes of glucose isomerase from *Streptomyces phaeochromogenes*. Biosci. Biotechnol. Biochem, 56, 180–185.
- Batt, C. A., O’neill, E., Novak, S. R., Ko, J. ve Sinskey, A., 1986. Hyperexpression of *Escherichia coli* xylose isomerase. Biotechnol. Prog., 2, 140–144.
- Beck, C. F. ve Warren. R. A. J., 1988. Divergent promoters, a common form of gene organization. Microbiol. Rev., 52, 318–326.
- Bejar, S., Belghith, K., Gargouri, R. ve Ellouz, R., 1994. Construction of a new strain of streptomyces violaceoniger, having strong, constitutive and stable glucose isomerase activity. Biotechnol. Lett., 16, 1259–1264.
- Belfaquih, N. ve Penninck, M. J., 2000. A bifunctional Xylosidase-Xylose isomerase from *Streptomyces* sp. Ec 10. Enzyme and Microbial Tech., 27, 114-121.
- Bengston, B. L. ve Lamm. W. R., 1973. Procède du isomerisation du glucose et du fructose, French Patent, 2, 172, 882.
- Bhosale, S. H., Rao, M. B. ve Deshpande, V. V., 1996. Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. Microbiol. Rev., 60, 280-300.
- Blacklow, S. C., Raines, R. T., Lim, W. A., Zamore, P. D. ve Knowles, J. R., 1988. Triosephosphate isomerase catalysis is diffusion controlled. Biochemistry, 27, 1158–1167.

- Blow, D. M., Collyer, C. A., Goldberg J. D. ve Smart, O. S., 1992. Structure and mechanism of D-xylose isomerase, *Faraday Discuss*, 93, 67–73.
- Blow, D. M. ve Collyer, C. A., 1990. Structure, mechanism, and engineering of xylose isomerase, Sixth International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms.
- Bogumil, R., Kappl, J., Huttermann, C. ve Witzel, H., 1993. X and Q-band EPR studies on the two Mn²⁺-substituted metal-binding sites of D-xylose isomerase. *Eur. J. Biochem.*, 213, 1185–1192.
- Boguslawski, G. ve Rynski, M. J., 1982. Novel Strain Of *Bacillus Licheniformis* Useful in production of glucose isomerase and method of screening *Bacillus* mutants for the ability to produce glucose isomerase in the absence of xylose, U.S. Patent, 4, 355, 103.
- Bok, S. K., Seidman, W. ve Wopat, P. W., 1984. Selective isolation of acidophilic *Streptomyces* strains for glucose isomerase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 1213–1215.
- Bor, Y., Moraes, C., Lee, S., Crosby, W. L., Sinskey, A. J. ve Batt, C. A., 1992. Cloning and sequencing the *Lactobacillus brevis* encoding xylose isomerase gene. *Gene*, 114, 127–131.
- Briggs, K. A., Lancashire, W. E. ve Hartley, B. S., 1984. Molecular cloning, DNA structure and expression of the *Escherichia coli* D-Xylose isomerase. *Embo J.*, 3, 611–616.
- Brownell, C. E., December 1982. Process for producing glucose isomerase. U.S. patent 4, 348-480.
- Bucke, C., 1983. Glucose Transforming Enzymes, P. 93–127. In W. Fogarty (Ed.), *Microbial Enzymes and Biotechnology*, Applied Science Publishers, London.
- Bucke, C., 1981. Industrial Glucose Isomerase, P. 147–171. In A. Wiseman (Ed.). *Topics In Enzyme And Fermentation Biotechnology*, Vol. 1. Industrial Glucose Isomerase, Ellis Horwood, Chichester, United Kingdom.
- Callens, M., Kersters-Hilderson, H., Van Opstal, O. ve Debruyne C. K., 1986. Catalytic properties Of D-Xylose isomerase from *Streptomyces violaceoruber*. *Enzyme Microb. Technol.*, 8, 696–700.
- Callens, M., Kersters-Hilderson, H., Vangrysperre, W. ve Debruyne, C. K., 1988. D-Xylose isomerase from *Streptomyces Violaceoruber*: Structural and catalytic roles of bivalent metal ions. *Enzyme Microb. Technol.*, 10, 695–700.
- Carell, H. L., Rubin, B. H., Hurley, T. J. ve Glusker, J. P., 1984. X-Ray crystal structure of d-xylose isomerase at 4 Å resolution. *J. Biol. Chem.*, 259, 3230–3236.

- Carrell, H. L., Glusker, J. P., Burger, V., Manfre, F., Tritsch, D. ve Biellman, J. F., 1989. X-Ray Analysis Of D-Xylose İsomerase At 1.9 Å: Native enzyme in complex with substrate and with a mechanism-designed inactivator. Proc. Natl. Acad. Sci., 86, 4440–4444.
- 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.
- Chan, E., Ueng, P. P. ve Chen, L. F., 1989. Metabolism of D-Xylose in *Schizosaccharomyces pombe* cloned with a Xylose-isomerase gene. Appl. Microbiol. Biotechnol., 31, 524–528.
- 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., 1980A. Glucose İsomerase. Process Biochem., 15, 30–35.
- Chen, W. P., 1980B. Glucose İsomerase. Process Biochem., 15, 36–41.
- Danno, G., 1971. Studies on D-glucose isomerizing enzyme from *Bacillus coagulans*, strain Hn-68. VI. the role of metal ions on the isomerization of D-Glucose And D-Xylose by the enzyme. Agric. Biol. Chem., 35, 997–1006.
- Deraadt, A., Ebner, M., Ekhart, C. W., Fechter, M., Lechner, A., Strobl, M. ve Stutz, A. E., 1994. Glucose İsomerase (EC 5.3.1.5) as a reagent in carbohydrate synthesis: success and failures with the isomerisation of nonnatural derivatives of D-Glucose into the corresponding 2-Ketoses. Catalysis Today, 22, 549–561.
- Dische, Z. ve Borenfreund, E., 1951. A new spectrophotometric method for the detection and determination of ketosugars and trioses. J. Biol. Chem., 192, 583-587.
- Dupreez, J. C. ve Prior, B. A., 1985. A Quantitative screening of some xylose fermenting yeast isolates. Biotechnol. Lett., 7, 241–246.
- Dupreez, J. C., Bosch, M. ve Prior, B. A., 1987. Temperature profiles of growth and ethanol tolerance of the xylose fermenting yeasts *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 25, 521–525.
- 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.
- Gaikwad, S. M., Rao, M. B. ve Deshpande, V. V., 1992. D-Glucose/Xylose isomerase from streptomyces. differential roles of magnesium and cobalt ions. Enzyme Microb. Technol., 4, 317–320.
- Gaikwad, S. M., Rao, M. ve Deshpande, V., 1992. Structure-Function relationship of glucose/xylose isomerase from *Streptomyces*: Evidence for the occurrence of inactive dimer. Enzyme Microb. Technol., 15, 155–157.

- Ghatge, M. S., Phadtare, S. U., Bodhe, A. M. ve Deshpande, V. V., 1994. Unfolding and refolding of glucose/xylose isomerase from *Streptomyces* sp. NCIM 2730. Enzyme Microb. Technol., 16, 323–327.
- 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.
- Ghatge, M. S., Mawal, Y., Gaikwad, S. M. ve Deshpande, V., 1991. Immunoaffinity purification of glucose/xylose isomerase from *Streptomyces*. Appl. Biochem. Biotechnol., 31, 11–20.
- Gong, C. S., Chen, L. F., Flickinger, M. C., Chiang, L. C. ve Tsao, G. T., 1981. Production of ethanol from D-Xylose by using D-Xylose isomerase and yeasts. Appl. Environ. Microbiol., 41, 430–346.
- Hafner, E. W. ve Jackson, D. M., July 1985. Constitutive glucose isomerase producer. U.S. Patent 4, 532, 208.
- Hemmingsen, S. H., 1979. Development of an immobilized glucose isomerase for industrial application. Appl. Biochem. Bioeng., 2, 157–181.
- 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.
- Karaoğlu, H., 2004. *Anoxybacillus gonensis* Glukoz (D-Ksiloz) izomeraz geninin klonlanması, izolasyonu ve karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- 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.
- 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*. Microbial Biotechnol., 27, 234–40.
- Lavie, A., Allen, K. N., Petsko, G. A. ve Ringe, D., 1994. X-ray crystallographic structures of D-xylose isomerase substrate complexes position the substrate and provide evidence for metal movements during catalysis. Biochemistry, 33, 5469–5480.
- 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.
- Liu, S.Y., Wiegel, J. ve Gherardine, F. C., 1996. Purification and cloning of a thermostable xylose (glucose) isomerase with an acidic pH optimum from *Thermoanaerobacterium* strain Jw/SI-Ys 489. J. Bacteriol., 178, 5938–5945.

- Marshall, R. O. ve Kooi, E. R., 1957. Enzymatic conversion of D-glucose to D-fructose. Science, 125, 648–649.
- Outtrup, H., 1974. New Glucose İsomerase by fermentation, German Patent Application, 2, 400, 323.
- Pedersen, S., 1993. Industrial aspects of immobilized glucose isomerase. Bioprocess Technol., 16, 185–208.
- Rangarajan, M., Asboth, B. ve Hartley, B. S., 1992. Stability of *Arthrobacter* D-Xylose isomerase to denaturants and heat. Biochem., J., 285, 889–898.
- Rasmussen, H., 1994. Crystallization and preliminary investigation of xylose isomerase from *Bacillus coagulans*. Acta. Crystallogr. Sect., D 50, 231–233.
- Reider, S. V. ve Rose, I. A., 1959. The mechanism of the triosephosphate isomerase reaction. J. Biol. Chem., 234, 1007–1010.
- Reynolds, J. H., 1973. Precipitated nylon as an enzyme support: A-Galactosidase Reactor, P. 63–70. In A. C. Olsen And C. L. Cooney (Ed.), *Immobilised Enzymes In Food And Microbial Processes*, Plenum Press, New York.
- Rose, I. A., O'conell, E. L. ve Mortlock, R. P., 1969. Stereochemical evidence for a cis-enediol intermediate in Mn-dependent Aldose İsomerases. Biochim. Biophys. Acta., 178, 376.
- Schneider, H., Wang, P. Y. ve Johnson, B. F., 1981. Current Developments In Yeast Research, P. 81–85. Pergamon Press, Toronto.
- Shieh, K. K., 1977. Media containing molasses and Soy flour for producing Glucose isomerase and method, U.S. Patent 4, 003, 793.
- Smith, C. A., Rangarajan, M. ve Hartley, B. S., 1991. D-Xylose (D-Glucose) isomerase from *Arthrobacter* strain Nrl B3728. Biochem., J., 277, 255–261.
- Takasaki, Y. ve Tanabe, O., 1966. Studies on sugar isomerisation enzyme. production and utilization of glucose isomerase from *Streptomyces* sp. Agric. Biol. Chem., 30, 1247–1253.
- Takasaki, Y. ve Tanabe, O., 1962. Formation of fructose from glucose by bacteria. I. Properties of glucose isomerase. Hakko Kyokaishi, 20, 449–455.
- Takasaki, Y. ve Tanabe, O., 1963. Isomerization of sugars by bacteria. I. Cultural conditions for glucose isomerizing bacteria. Hakko Kyokaishi, 23, 41–47.
- Takasaki, Y. ve Tanabe, O., 1964. NAD-linked D-glucose isomerizing and D-mannose isomerizing enzyme from *Paracolobacterium aerogenoides*. Agric. Biol. Chem., 28, 740–741.
- Telefoncu, A., 1986. Temel ve Uygulamalı Enzimoloji (Telefoncu, A. Ed.) pp.1.
- Vaheri, M. ve Kauppinen, V., 1977. Improved microbial glucose isomerase production. Proc. Biochem., 12, 5–8.

- Van Bastelaere, P. B. M., Kirsters-Hilderson, H. L. M. ve Lambeir, A. M., 1995. Wild type and mutant D-xylose isomerase from *Actinoplanes missouriensis*: metal ion dissociation constants and kinetic parameters of deuterated and non-deuterated substrates and solvent-isotope effects. Biochem. J., 307, 135–142.
- Vandamme, E. J., Delaporte, A., De Vocht, M. ve Van Hoe, L., 1981. Production of D(1) Xylose isomerase by *Streptomyces violaceus ruber* Abh. Akad. Wiss. Ddr. Abt., Math. Naturwiss. Technol., P. 193–208.
- Van Tillbeurgh, H., Jenkins, J., Chiadmi, M., Janin, J., Wodak, S.J., Mrabet, N. T. ve Lambeir, A.M., 1992. Protein Engineering of Xylose (glucose) isomerase from *Actinoplanes missouriensis*. 3. changing metal specificity and the pH profile by site-directed mutagenesis. Biochemistry, 31, 5467-5471.
- Vangryspere, W., Van Damme, J., Vandekerckhove, C., de Bruyne, K., Cornelis, R. ve Kersters-Hilderson, H., 1990. Localization of the essential histidine and carboxylate group in D-xylose isomerases. Biochem. J., 265, 699–705.
- Vangryspere, W., Callens, M., Kersters-Hilderson, H. ve deBruyne, C. K., 1989. Reaction of Woodward's reagent K with D-xylose isomerases. Biochem. J., 260, 163–169.
- Verhoff, F. H., Boguslawski, G., Lantero, O. J., Schlager, S. T. ve Jao, Y. C., 1985. Glucose isomerase, p. 837–859, In M. Moo-Young (ed.), *Comprehensive Biotechnology*, vol. 3. Pergamon Press, New York.
- Wang, P. Y., Johnson, B. F. ve Schneider, H., 1980. Fermentation of D-Xylose by yeasts using glucose isomerase in the medium to convert D-Xylose to D-Xylulose. Biotechnol. Lett., 2, 273–278.
- Wiseman, A., 1975. *Handbook of enzyme biotechnology*. Ellis Horwood Ltd., Chichester, United Kingdom.
- Yamanaka, K., 1975. D-Xylose isomerase from *Lactobacillus brevis*. Methods Enzymol., 41b, 466-471.
- Yoshimura, S., Danno, G. ve Natake, M., 1966. Studies on d-glucose isomerizing activity of d-xylose grown cells from *Bacillus coagulans* Strain Hn-68. Agric. Biol. Chem., 30, 1015–1023.

8.EKLER

8.1 Ek1. A. *gonensis* G2^T KI Geninin Aminoasit ve Baz Dizilimi

M A Y F E N V D K V V Y E G P A S E
ATG GCG TAT TTT GAA AAC GTT GAC AAA GTG GTG TAT GAA GGC CCG GCA TCG GAA
N P L A F K F Y N P E E K V G D K T
AAT CCG CTT GCG TTT AAG TTT TAT AAT CCG GAA GAA AAA GTC GGG GAT AAA ACG
M E E H L R F S V A Y W H T F V G D
ATG GAG GAG CAT TTG CGC TTT TCG GTG GCG TAT TGG CAC ACA TTT GTT GGG GAT
G A D P F G V G T A İ R P W N R Y S
GGG GCA GAC CCG TTT GGG GTT GGT ACG GCG ATC CGC CCG TGG AAC CGA TAC AGC
G M D L A K A R V E A A F E L F D K
GGA ATG GAT TTG GCA AAA GCG CGT GTG GAG GCA GCG TTT GAG TTA TTT GAT AAG
L N İ P F F C F H D V D İ A P E G A
CTA AAC ATT CCA TTT TTC TGC TTC CAC GAT GTC GAT ATT GCC CCA GAA GGA GCG
T L K E T Y Q N L D T İ V D M İ E E
ACG TTA AAA GAA ACG TAT CAA AAC TTA GAT ACG ATT GTT GAT ATG ATC GAA GAA
Y M K T S K T K L L W N T A N L F T
TAC ATG AAA ACA AGC AAA ACC AAG TTG CTT TGG AAT ACA GCT AAT TTA TTT ACA
H P R F V H G A A T S C N A D V F A
CAT CCT CGT TTT GTA CAT GGT GCA GCC ACT TCT TGC AAT GCA GAT GTG TTT GCG
Y A A A K V K K G L E İ A K R L G A
TAT GCA GCA GCA AAG GTG AAA AAA GGC TTA GAA ATT GCC AAA CGA CTT GGT GCA
E N Y V F W G G R E G Y E T L L N T
GAA AAC TAT GTA TTC TGG GGC GGG CGT GAA GGC TAT GAA ACG TTG TTA AAT ACA
N M K L E L D N L A R F L H M A V D
AAT ATG AAG CTC GAA CTG GAC AAT TTA GCC CGC TTT TTG CAT ATG GCG GTT GAC
Y A K E İ G F D G Q F L İ E P K P K
TAT GCG AAA GAA ATT GGC TTT GAC GGG CAA TTT TTA ATT GAG CCA AAA CCA AAA
E P T K H Q Y D F D V A T A L A F L
GAA CCA ACG AAG CAT CAA TAC GAC TTT GAT GTT GCA ACA GCA TTA GCG TTT CTA
Q T Y G L K D Y F K F N İ E A N H A
CAG ACG TAT GGA CTA AAA GAT TAT TTC AAA TTC AAC ATT GAA GCA AAC CAT GCG
T L A G H T F E H E L R V A R İ H G
ACA TTG GCA GGT CAT ACA TTT GAA CAT GAA CTT CGC GTA GCG CGC ATT CAC GGA
M L G S V D A N Q G D P L L G W D T
ATG CTC GGT TCG GTC GAT GCC AAC CAA GGC GAC CCG TTG CTT GGC TGG GAT ACC
D E F P T D L Y S T T L A M Y E İ L
GAC GAA TTC CCA ACA GAC TTG TAT TCT ACT ACT CTT GCG ATG TAC GAA ATT TTA
Q N G G L G K G G L N F D A K V R R
CAA AAT GGC GGA CTC GGA AAA GGC GGA TTG AAC TTT GAT GCG AAA GTA AGA CGC
G S F E P E D L F Y A H İ A G M D S
GGT TCG TTT GAA CCA GAA GAC TTA TTC TAC GCC CAT ATT GCC GGA ATG GAT AGC
F A İ G L K V A Y R L İ E D R V F E
TTT GCG ATT GGA CTA AAA GTG GCG TAT CGT TTA ATT GAG GAT CGT GTG TTT GAA
S V V E E R Y K S Y T E G İ G R D İ
TCA GTT GTT GAG GAA CGG TAT AAA AGC TAT ACA GAA GGA ATT GGC CGG GAT ATC
İ D G K A D F H T L E A Y A L N L R
ATT GAT GGG AAG GCC GAC TTC CAT ACA CTA GAG GCA TAT GCA TTA AAT CTT CGC
D İ S N R S G R Q E R L K T L L N Q
GAT ATT TCC AAT CGT TCA GGA CGG CAA GAA CGT CTG AAA ACG TTG CTT AAC CAA
Y L L E V C V A R
TAT TTA CTT GAA GTT TGT GTA GCT CGT TAA

ÖZGEÇMİŞ

01.02.1980 tarihinde Sivas'ın Koyulhisar İlçesi'nin Yukarıkale Köyü'nde doğdu. İlkokulu İzmir Malazgirt İlköğretim Okulu'nda, ortaokulu İzmir Suphi Koyuncuoğlu Ortaokulunda, liseyi İzmir Hayrettin Duran Lisesi'nde okudu. 1998-2004 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği'nde öğrenim gördü. 2004 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı. İyi derecede İngilizce, orta derecede Almanca bilir.