

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

*Anoxybacillus gonensis* KSİLOZ İZOMERAZ H99E MUTANTININ  
SAFLAŞTIRILMASI ve KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Esra ERBAŞ

NİSAN 2008  
TRABZON

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***Anoxybacillus gonensis* KSİLOZ İZOMERAZ H99E MUTANTININ  
SAFLAŞTIRILMASI ve KARAKTERİZASYONU**

**Esra ERBAŞ**

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

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 10.03.2008  
Tezin Savunma Tarihi : 24.04.2008**

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

**Enstitü Müdür V. : Doç. Dr. Salih TERZİOĞLU**

**Trabzon 2008**

## ÖNSÖZ

*Anoxybacillus gönensis* ksiloz izomeraz H99E mutantının saflaştırılması ve karakterizasyonu konulu tez çalışması Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Çalışmalarımı yürütürken gerek deneyler sırasında gerekse tezimin yazımı sırasında her türlü değerli bilgisini ve fikirlerini benimle paylaşan, desteği benden esirgemeyerek yardımcı olan danışman hocam Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ'e, hocam Yrd. Doç. Sabriye ÇANAKÇI' YA sonsuz teşekkürü bir borç bilirim. Yüksek lisans eğitimim sürecinde benden her türlü bilgisini ve yardımlarını esirgemeyen Hakan KARAOĞLU'na, bilgilerini benimle paylaşan ve desteklerini hep yanımda hissettiğim Yusuf BEKTAŞ'a, Fatih Şaban BERİŞ'e ve Cemal SANDALLI'ya ve arkadaşlarım Dilşat ÇOLAK'a, Derya YANMIŞ, Kadriye İNAN'a, Mutlu GÜLTEPE'ye, Uğur UZUNER'e Fulya AY'a, Murat KAÇAĞAN'a, Pınar YEŞİLGİL'e, Elif SEVİM'e, Zeliha CEVHER'e teşekkürü bir borç bilim. Yine değerli bilgi, deneyimlerini benimle paylaşan ve gerek cihaz gerekse malzeme kullanımı konusunda göstermiş oldukları anlayıştan ötürü Mikrobiyoloji Laboratuvarı Hocaları ve çalışanlarına, Bitki Fizyolojisi laboratuvarı hocaları ve çalışanlarına, Botanik Laboratuvarı hocaları ve çalışanlarına, Zooloji Laboratuvarı hocası ve çalışanlarına, Kimya Bölümü Biyokimya Laboratuvarı hocaları ve çalışanlarına teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Ayrıca benden maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve haklarını hiç bir zaman ödeyemeyeceğim sevgili anneme, babama, kardeşlerime ve tüm dostlarıma teşekkür ederim. Ayrıca sekiz yıldır kahrımı çeken değerli dostum sevgili Hatice NAR'a, tüm Biyoloji Bölümü elemanlarına ve gerek izin gerekse manevi desteklerini hep üzerimde hissettiğim Trabzon Gümrük ve Muhafaza Başmüdürlüğü bünyesinde çalışan gümrük muhafaza başta olmak üzere herkese çok teşekkür ederim.

Son olarak varlığıyla, yaptıklarıyla bana güç veren her zaman yanımda olan en iyi arkadaşım, değerli eşim Alper KIZILTAŞ'a yaptığı her şey için teşekkür ederim.

Esra ERBAŞ

Trabzon 2008

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER .....	III
ÖZET .....	V
SUMMARY .....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	VII
TABLolar DİZİNİ .....	VIII
SEMBOLLER DİZİNİ .....	III
1. GENEL BİLGİLER	
1.1. Giriş.....	1
1.2. Ksiloz İzomeraz ve HFCS (High Fructose Corn Syrup.....	2
1.3. Ksiloz İzomerazın Yapısı, Sekans Homolojisi ve Reaksiyon Mekanizması .....	4
1.4. Termodinamik ve Termal Kararlılıkları .....	6
1.5. Ksiloz İzomeraz Enziminin Genetik Mühendisliği.....	7
1.5.1. Isıl Kararlılık Mutasyonları .....	7
1.5.2. Aktif Bölge Mutasyonları .....	8
1.5.3. Anoxybacillus gonensis ve KI (KI) Açısından Önemi.....	8
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	10
2.1. Kullanılan Materyal ve Kimyasallar .....	10
2.2. Genin Klonlanması ve Mutasyon.....	10
2.3. Gen Ürünlerinin Elde Edilmesi ve Saflaştırılması .....	11
2.3.1. Glukoz ve Ksiloz İzomeraz Aktivitesi DeneYleri .....	11
2.3.2. Protein Tayini.....	12
2.3.3. Hücre Özütünün Elde Edilişi .....	13
2.3.4. Sıcak Şoku Uygulaması.....	13
2.3.5. İyon Değişimi Kromatografisi .....	13
2.3.6. Hidrofobik Kolon Kromatografisi .....	14
2.3.7. KI H99E'nin Karakterizasyonu .....	15
2.3.7.1. Enzim Kinetiği .....	15

2.3.7.2.	Optimum Sıcaklık .....	15
2.3.7.3.	Optimum pH .....	16
2.3.7.4.	Isıl Kararlılık .....	16
2.3.7.5.	pH Kararlılığı .....	16
3.	BULGULAR .....	17
3.1.	KI H99E'nin Saflaştırılması .....	17
3.1.1.	Hücre Özütünün Elde Edilmesi ve Isı Şoku Uygulaması.....	17
3.1.2.	İyon Değişimi Kolon Kromatografisi .....	17
3.1.3.	Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi.....	17
3.1.4.	KI H99E'nin Karakterizasyonu .....	20
3.1.4.1.	Enzim Kinetiği .....	20
3.1.4.1.1.	Mutasyonların $K_m$ ve $V_{max}$ Üzerine Olan Etkisi .....	20
3.1.4.2.	Optimum Sıcaklık .....	25
3.1.4.3.	Optimum pH .....	27
3.1.4.4.	Isıl Kararlılık .....	30
3.1.4.5.	pH Kararlılığı .....	31
4.	TARTIŞMA .....	33
5.	SONUÇLAR .....	36
6.	ÖNERİLER.....	37
7.	KAYNAKLAR .....	38

## 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/GI 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. Bu çalışma *Aoxybacillus gönensis* ksiloz H99E mutantının saflaştırılmasını ve karakterizasyonunu içermektedir. Bu çalışmada mutant tip gen ürünü ışık şoku, iyon değişimi kolon kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulamalarıyla saflaştırıldı ve elde edilen saf enzim karakterize edildi. KI H99E mutantının glukoz izomeraz ve ksiloz izomeraz aktivitesi için optimum sıcaklıkları 85°C olarak ölçüldü. KI H99E mutantının glukoz izomeraz ve ksiloz izomeraz aktivitesi için optimum pH'ları da 6,5 olarak ölçüldü. KI H99E mutantının glukoz aktivitesi için  $K_m$ 'si  $589,97 \pm 10$  mM,  $V_{max}$   $5,92 \pm 2$   $\mu\text{mol/dk/mg}$  hesaplandı. KI H99E mutantının ksiloz aktivitesi için  $K_m$  değeri  $31,88 \pm 10$  mM,  $V_{max}$  değeri  $6,52 \pm 2$   $\mu\text{mol/dk/mg}$  olarak hesaplandı. KI H99E mutantının optimum çalışma sıcaklığı olan (85°C) ve optimum pH'da (pH 6,5), glukoz izomeraz aktivitesinin yarısını 2 saatte kaybettiği belirlendi. Ksiloz izomeraz aktivitesinin ise 3,5-4 saat sonunda yarıya düştüğü belirlendi. Ayrıca pH 6 ve 6,5'da (4°C) 10 saat sonunda KI H99E mutantının glukoz izomeraz ve ksiloz izomeraz aktivitesini kaybetmediği belirlendi.

**Anahtar kelimeler:** D-ksiloz izomeraz, D-glukoz izomeraz, enzim, saflaştırma, mutasyon, enzim karakterizasyonu

## SUMMARY

### **Purification and Characterization of *Anoxybacillus gonensis* Xylose Isomerase H99E Mutation**

D-xylose isomerase (D-xylose ketol isomerase; E.C. 5.3.1.5) is commonly referred to as D-glucose isomerase. It catalyzes isomerization of D-xylose to D-xylulose intracellular and D-glucose to D-fructose extracellular. 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. XI has also been examining 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 been extensively studying.

In the present work, *Anoxybacillus gönensis* xylose isomerase H99E mutant was purified and characterized. In this work, mutant type gen production purified by classical purification methods such as heat treatment, ion-exchange chromatography and hydrophobic-interaction chromatography. The XI H99E mutant was characterized. The optimum temperature for XI mutant's glucose and xylose activity was 85 °C, the optimum pH was 6,5.  $K_m$  and  $V_{max}$  values for XI H99E mutant's glucose activity were  $589,97 \pm 10\text{mM}$  and  $5,92 \pm 2 \mu\text{mol/dk/mg}$ .  $K_m$  and  $V_{max}$  values for XI H99E mutant's xylose activity were  $31,88 \pm 10\text{mM}$  and  $6,52 \pm 2 \mu\text{mol/dk/mg}$ . It was found that at the end of 2 hours at 85 °C (pH 6,5) reduced activity of XI H99E mutant's xylose activity to half and also it was found that at the end of 3,5-4 hours at 85 °C (pH 6,5) reduced activity of XI H99E mutant's xylose activity to half and the enzyme was stable in pH 6 and 6,5 at 4 °C.

**Key Words:** *Anoxybacillus gonensis*, D-xylose isomerase, prufication of enzyme, characterization of enzyme, mutation

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

Şekil 1.	D-ksilozun, D- ksiluloza , D- glukozun D-fruktoza İzomerizasyonu.....	3
Şekil 2.	D-Niştastadan HFCS üretimi .....	4
Şekil 3.	Safılaştırma sonrası aktivite görülen fraksiyonların SDS-PAGE jel görüntüsü.....	19
Şekil 4	KI H99E mutantının glukoz izomeraz için Michaelis-Menten grafiği .....	21
Şekil 5.	Yaban tip enzimin glukoz izomeraz için Michaelis-Menten grafiği .....	21
Şekil 6.	KI H99E Mutantının ksiloz izomeraz için Michaelis-Menten grafiği .....	22
Şekil 7.	Yaban tip enzimin ksiloz izomeraz için Michaelis-Menten grafiği .....	22
Şekil 8.	Yaban tip enzimin glukoz izomeraz için Lineweaver- grafiği .....	23
Şekil 9.	KI H99E Mutantının glukoz izomeraz için Lineweaver- grafiği .....	23
Şekil 10.	KI H99E mutantının ksiloz izomeraz için Lineweaver- grafiği .....	24
Şekil 11.	Yaban tip enzimin ksiloz izomeraz için Lineweaver- grafiği .....	24
Şekil 12.	KI H99E mutantının ksiloz izomeraz aktivitesine sıcaklığın etkisi.....	25
Şekil 13.	Yaban tip enzimin ksiloz izomeraz aktivitesine sıcaklığın etkisi.....	26
Şekil 14.	KI H99E mutantının glukoz izomeraz aktivitesine sıcaklığın etkisi .....	26
Şekil 15.	Yaban tip enzimin glukoz izomeraz aktivitesine sıcaklığın etkisi .....	27
Şekil16.	KI H99E mutantının ksiloz izomeraz aktivitesine pH'nın etkisi.....	28
Şekil17.	Yaban tip enzimin glukoz izomeraz aktivitesine pH'nın etkisi .....	28
Şekil18.	KI H99E mutantının glukoz izomeraz aktivitesine pH'nın etkisi .....	29
Şekil 19.	Yaban tip enzimin ksiloz izomeraz aktivitesine pH'nın etkisi.....	29
Şekil 20.	KI H99E mutasyonunun glukoz izomeraz aktivitesi için sıcaklık kararlılığı .....	30
Şekil 21.	KI H99E mutasyonunun ksiloz izomeraz aktivitesi için sıcaklık kararlılığı.....	31
Şekil 22.	KI H99E mutantının glukoz izomeraz aktivitesi için pH kararlılığı.....	32
Şekil 23.	KI H99E mutantının ksiloz izomeraz aktivitesi için pH kararlılığı.....	32



## TABLO DİZİNİ

### Sayfa No

Tablo 1. Mutant Tip Enzimin Saflaştırma Tablosu .....	19
---	----

## SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

GI	: Glukoz izomeraz
HFCS	: Yüksek içerikli Fruktoz Şurubu (High Fructose Corn Syrup)
KI	: Ksiloz İzomeraz
MOPS	: 3-(N-morfolino) propanosülfonik asit
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
E	: Glutamik asit
H	: Histidin

## 1.GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Canlılarda meydana gelen biyokimyasal reaksiyonları gerçekleştiren katalizörlere enzim denir. Enzimler hücre içerisinde meydana gelen binlerce tepkimenin hızını ve özgülüğünü düzenlerler. Çoğu kez hücre dışında da etkinliklerini korurlar. Canlı hücrelerde reaksiyonlar genellikle 0–50°C; çoğunlukla da 20–42°C arasında meydana gelir. Bu sıcaklıkta reaksiyonların oluşması biyokatalizör denen enzim ya da fermentlerle olur. Bu, aktivasyon enerjisinin düşürülmesi ile başarılıdır. Önceleri "E n z i m" terimi, sindirim kanalındaki gibi bir çözelti ya da sıvı içerisinde etki ettiği durumlar için kullanılırdı [1]; buna karşın "Ferment = Maya" terimi ise hamur mayasında olduğu gibi, hücreye bağlı olduğu durumlarda kullanılmıştır. Buchner (1897) [1] , fermentlerin de hücre dışında etki ettiğini bulunca iki terim arasındaki farklılık ortadan kalkmış oldu. Bugün yaygın olarak kullanılan enzimlerden bazıları şunlardır: proteolitik enzimler, amilolitik enzimler, glukoz izomeraz (GI), pektolitik enzimler, selülazlar, galaktozidazlardır.

Bunlardan glukoz (ksiloz) izomeraz (E.C.5.3.1.5) besin ve içecek endüstrisinde sükröz gibi tatlı olan şeker karışımlarının mikrobiyal üretiminde önemli bir role sahiptir ve glukozu geri dönüşümlü olarak fruktoza çevirir. Ayrıca birçok mikroorganizma tarafından hücre-içi (intracellular) karakterde sentezlenmekte ve özellikle fruktoz içeren mısır şuruplarının üretiminde kullanılmaktadır. Enzim birçok mikroorganizma tarafından yüksek verimlilikte sentezlenir bunlara örnek olarak; *Actinomyces phaeochromogenes*, *Aerobacter aerogenes*, *Actinoplanes missourienses*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus stearothermophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Pseudomonas hydrophila*, *Streptomyces phaeochromogenes*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces bikiniensis* türlerini vermek mümkündür [2]. Özellikle, *Bacillus*, *Arthrobacter* ve *Streptomyces* türleri'nden elde edilen glikoz izomerazlar, ticari değere sahiptir [3].

Glukoz (ksiloz) izomeraz üreten mikroorganizmaların genellikle mezofilik ve termofilik karakterde olduğu ve enzim üretiminin, bakteri üremesinin idofaz (*Streptomyces* türleri) ile triofaz (*Bacillus* türleri) evrelerinde yüksek miktarlarda sentezlendiği saptanmıştır [4]. Yine yüksek verimlilikte enzim üretimi için inkübasyon sıcaklığını 28–30 °C, pH'nın 7,0-8,5 olduğu saptanmıştır [5]. Glukoz izomeraz enzimi, aldo formundaki (glukoz) basit şekerleri keto formuna (fruktoz) izomerize eder ve katalitik aktivitesi için  $Mg^{+2}$  ve  $Co^{+2}$  gibi divalent

katyonlara gereksinim duyar [6]. Magnezyum, enzimin katalitik aktivitesinde aktivatör olarak rol oynarken, kobalt, enzimin sıcaklığa karşı dayanıklılığını arttırmaktadır [7]. Fakat kobaltın tepkime reaksiyonlarında kullanılması bu katyonun toksik ve çevresel tehlike arz etmesi nedeniyle pek tercih edilmemektedir. [8]. Bu yüzden, glukoz izomerazı  $\text{Co}^{+2}$  katyonuna ihtiyaç duymayan mikroorganizmalardan üretimi amaçlanmıştır. Bu çerçevede yapılan araştırmalarda bazı *Aerobacter* türlerinden (*A. aerogenes*) kobalta gereksinim duymayan enzim üretimi gerçekleştirilmiştir [9]. Yine,  $\text{Ca}^{+2}$  glukoz izomeraz için inhibitör bir katyon olarak bilinmektedir [10].

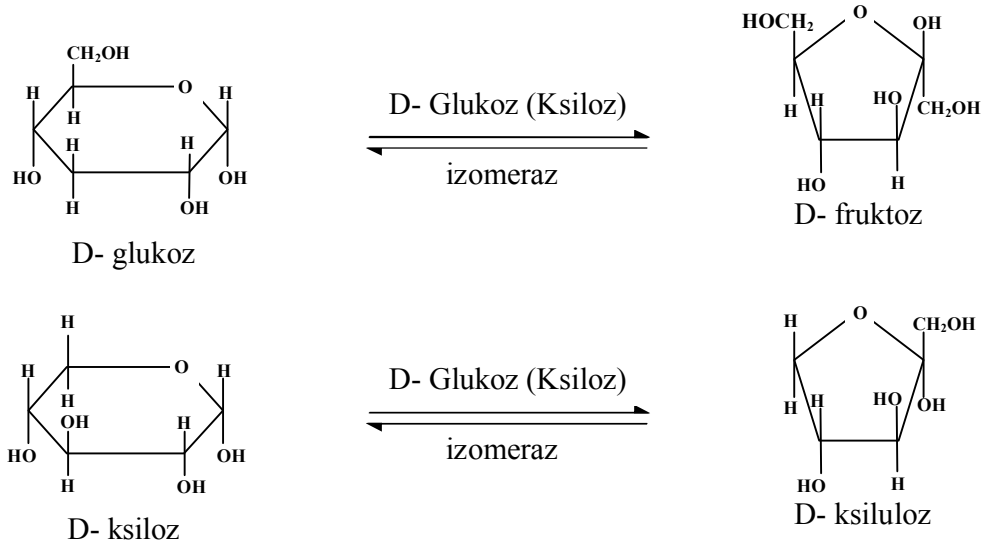
Birçok mikroorganizma glukoz izomeraz üretiminde indükleyici madde olarak ksiloza gereksinim duymaktadır [11]. Ticari açıdan glukoz izomeraz üretiminde saf ksiloz pahalı olması nedeniyle pek tercih edilmez. Bu nedenle yapılan bazı araştırmalar, ksilozun yerine geçebilecek mısır kabuğu, mısır koçanı, ksilan ve saman gibi yapılarında ksiloz bulunan bitkisel kaynaklı maddelerin enzim üretiminde kullanılabileceğini göstermiştir [12].

Son yıllarda yapılan çalışmalarda glukoz izomerazın fungus kökenli üretimi hedeflenmiştir [13]. Çünkü fungus kökenli glukoz izomerazların fruktoz şuruplarının üretiminde kullanılması halinde bazı avantajlar oluşmaktadır. Birincisi, enzimin hücre-dışı karakterde olması ticari olarak enzim üretiminde özellikle enzim saflaştırılmasında bazı saflaştırma adımlarını ortadan kaldırır. İkincisi fungus kaynaklı glukoz izomerazın reaksiyon ortamında kobalta gereksinim duymamasıdır.

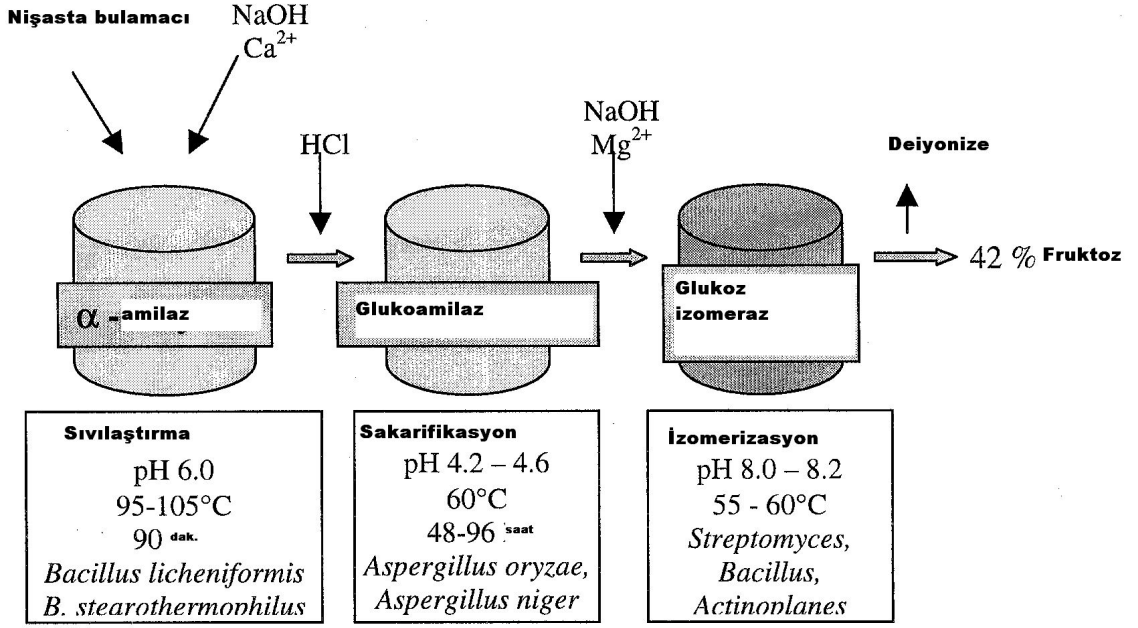
## 1.2. Ksiloz İzomeraz Ve Hfcr(High Fructose Corn Syrup)

Günümüzde ksiloz izomeraz (KI) (D-ksiloz ketol izomeraz; EC 5.3.1.5) glukoz izomeraz olarak da bilinir. KI hücre içinde D-ksilozun D-ksiluloza hücre dışında da D-glukozun D-fruktoza izomerizasyonunu gerçekleştirir,(Şekil 1). Ksilozun ksiluloza dönüşümü bakteride beslenme ihtiyacı yaratır ve böylece hem bitki materyallerinin parçalanarak bozunmasına hem de hemiselülozun etanole dönüşümü gerçekleşmiş olur. Yine günümüzde yenilenebilir kaynakların fermente edilebilen şeker ve etanole dönüştürülmesi hızla tüketilen fosil yakıtlar açısından önemli bir gelişmedir. Glukozun fruktoza dönüşümü yüksek fruktoz mısır şurup (HFCS) [14] endüstrisinde ticari açıdan büyük öneme sahiptir. KI yiyecek endüstrisinde ve en fazla üretilen üç değerli enzimden biri olması açısından önemli bir enzimdir. Diğer iki enzim ise amilaz ve proteazdır [15]. Mısır nişastasından HFCS üretimi üç önemli adımı kapsar (Şekil 2): (1) Nişastanın  $\alpha$ -amilazla sıvılaştırılması, (2) Nişastanın

amiloglukosidaz ve parçalayıcı enzimlerle sakarifikasyonu, (3) Glukozun glukoz (ksiloz) izomerazla izomerizasyonu. Bu işlemler neticesinde son ürün glukoz, fruktoz ve çok güzel bir tat veren sükroz karışımını içeren mısır şurubudur. Glukoz –fruktoz karışımında oran 1:1 dir ve bu karışım sükrozdan 1,3, glukozdan da 1,7 kat daha tatlıdır. Ayrıca fiyat olarak da diğerlerine göre daha ekonomiktir. HFCS de kristalizyon açısından problem olmadığından daha çok tercih edilir, hatta fruktoz diyabetik tatlandırıcılarda kullanılır. Çünkü mide de çok yavaş absorbe edilir ve kandaki glukoz seviyesine etki etmez. HFCS' ler, meşrubat, kabartma tozu, konserve ve şekerleme endüstrisinde yaygın olarak kullanılır.



**Şekil 1.** D-ksilozun D-ksiluloza , D-glukozun D-fruktoza izomerizasyonu



Şekil 2. D-Nişastadan HFCS üretimi

### 1.3. Ksiloz İzomerazın Yapısı, Sekans Homolojisi Ve Reaksiyon Mekanizması

Bugüne kadar KI'ların yapı-görev ilişkilerini aydınlatmak amacıyla çeşitli organizmalardan KI kodlayan gen sıraları karşılaştırılmıştır. KI'lar aminoasit sıralarına ve N-terminal uçtaki [16] 40–50 birimlik monomerlerine göre iki sınıfa ayrılır. Sınıf I KI'lar 390 aminoasit içerirler, bunlara örnek organizmalar şunlardır: *Streptomyces* spp., *Actinoplanes* spp., *Ampullarielle* sp., *Artrobacter* spp. ve *Thermus thermophilus*.

Sınıf II KI'lar ise 440 aminoasit içerirler, bunlara örnek olarak şunlardır: *Escherichia coli*, *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* ve *Thermotoga* spp. KI monomerleri sekiz heliksle sarılmış  $\beta$  silindirlerine paralel sekiz zincir içerir ve C terminal kuyruğu uzatılmıştır. Bu durum KI'nın komşu monomerlerle ilişki kurmasında geniş imkânlar sağlar. Aktif bölgedeki çukur silindirin girişindeki açıklıkla tanımlanmaya çalışılmıştır. Bu bölgeler aynı zamanda hidrofobik rezidülerde sıralanmıştır. Çukurun alt tarafında ise aspartat, glutamat ve histidin rezidüleri bulunur. Bu rezidüler bivalent iyonlarla ( $Co^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  ve  $Mn^{+2}$ ) [17] koordineli çalışır. *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neopolitana*, *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Escherichia coli*, *Actinoplanes missouriensis*, *Streptomyces rubiginous*, *Arthrobacter* sp'.nın sekans homolojileri incelenmiştir. Bunlardan

üçü sınıf I KI, beşi ise sınıf II KI içeriyor. Yapılan çalışmalar sonucunda sınıf I ve sınıf II enzimleri arasındaki düşük sekans homolojisine rağmen amino asitlerin substrata bağlanma bölgeleri (H100, T140, E231, K233, D338), metal iyon bağlanma bölgeleri (E231, E267, H270, D295, D306, D308, D338) ve katalizlemede etkili olan bölgelerinin (H100, D103, D338) tamamen korunduğu gözlenmiştir. KI'ların alt ünite yapıları ve amino asit içerikleri hakkında yapılan çalışmalar, KI'ların non-kovalent bağlarla birbirine bağlı tetramer veya dimer, birbirine benzer alt ünitelerden oluştuğunu ve disülfit bağlarından yoksun olduğunu göstermiştir. Günümüzde en iyi bilinen KI'lar moleküler ağırlığı her alt ünite başına 45-50 kDa olan homotetramerlerdir. KI'da enzimin katalitik aktivitesi ve kararlılığı için her monomerde iki divalent katyon bulunması gerekir. Yapılan çalışmalarda KI'larda iki ayrı metal bağlanma bölgesi (M1 ve M2) aydınlatılmıştır: 1) Bu bölgedeki metal iyonu dört karboksilat grubuyla koordine edilir. 2) M2 bölgesinde ise metal bir imidazol ve üç karboksilat grubuyla koordine edilir [17]. Buna göre bu metallerin hem yapısal hem de katalitik metaller olduğu düşünülmüştür. Fakat bu görüşler son zamanda yapılan çalışmalarda değerini yitirdi. Buna göre her iki metalde katalizlemeye girmektedir. [18]. Metal özgünlüğü enzim tipine ve substratın yapısına bağlıdır. Örneğin *Thermus aquaticus* sınıf I KI'dır ve  $Mn^{+2}$  varlığında glukozu daha verimli bir şekilde izomerize ederken ksiloza karşı aktivitesi  $Co^{2+}$  varlığında daha fazladır [19]. Yine sınıf II KI'lardan olan *Bacillus coagulans* KI'ı  $Mn^{+2}$  varlığında ksilozu çok iyi izomerize ederken fruktoza karşı aktivitesi  $Co^{2+}$  varlığında daha fazladır [20]. Ksiloz izomerazın kataliz mekanizmasının aydınlatılması için *Arthrobacter* ve *Streptomyces* enzimlerinde X-ray kristallografik çalışmalar [21] ve *Thermoanaerobacterium thermosulfirigenes* 'in [22] XylA geninde site-directed mutasyonlar yapılmıştır. Elde edilen biyokimyasal sonuçlar katalitik mekanizmanın aydınlatılmasına imkân vermiştir. Buna göre aldozun ketoza dönüşümü KI ile olur. Substrat halka form içinde bağlanır, substrat halka açıklığı oluşur, linear ara ürünün izomerizasyonu gerçekleşir, halka kapanır ve ürün salıverilir. Tüm bu adımlar hidrit kayması [23] mekanizması yardımıyla ilerler. Bunun yanında D-glukoz ve D-ksilozun atomik konfigürasyonları glukoz molekülündeki  $-CH_2OH$  grubu dışında birbirine benzerdir. Hidroksimetil grubunun glukoz ve ksiloz izomerazın katalitik aktivitesindeki farklılığın sorumlusu olduğu düşünülüyor.

#### 1.4. Termozimler Ve Termal Kararlılıkları

Termozimler, termofilik (50-80 °C de yaşayan mikroorganizmalar) ve hipertermofilik (80°C nin üstündeki sıcaklıklarda yaşayan mikroorganizmalar) mikroorganizmalardan elde edilirler. Termozimler yüksek sıcaklıklarda gelişmiş yapı-görev özelliklerine sahiptir [24]. Termozimler moleküler biyolojide (örneğin Taq DNA Polimeraz), nişasta endüstrisinde (örneğin  $\alpha$ -amilaz, glukoz izomeraz) kullanılır. Ayrıca organik sentez, tanı bilimi, kağıt hamuru ve kağıt üretimi ve hayvansal besin üretimi gibi yüksek kararlılık isteyen uygulamalarda mükemmel katalitik enzimlerdir. Bu enzimlerin birçok biyoteknolojik faydaları vardır, bunlar (1) Mezofilik konaklarda ekspres edilebilirler böylece yüksek sıcaklık uygulamasıyla enzimi saflaştırmak daha kolay olur, (2) Yüksek sıcaklarda kimyasal ajanlara karşı ısıl kararlılığı oldukça fazladır, (3) Yüksek sıcaklıklarda gerçekleşen enzimatik reaksiyonlarla yüksek substrat konsantrasyonu, düşük viskozite, düşük kontaminasyon oranı ve yüksek reaksiyon oranı sağlanmış olur.

Termozimlerdeki ısıl kararlılığı sağlayan ve üzerinde çalışılan mekanizmalar şunlardır [24]: (1) Hidrofobik etkileşimler, (2) Aromatik etkileşimler, (3) Tuz köprüleri, (4) Disülfid köprüleri, (5) Hidrojen bağları, (6) Metal bağlanma bölgeleri, (7) Konformasyonel zincirin uzatılması, (8) Heliks kararlılığı, (9) Loop kararlılığı, (10) Kovalent etkileşimlere karşı direnç, (11) Hidrofobik yüzeyde çözücü girişinin azaltılması ve verimliliğin korunması, (12) Prolin substitüsyonu ile entropinin azaltılması, (13) Post-translasyonel modifikasyonlar.



## 1.5. Ksiloz İzomeraz Enziminin Genetik Mühendisliği

### 1.5.1. Isıl Kararlılık Mutasyonları

Farklı mikroorganizmalardan elde edilen KI'ların aktif bölgelerinde aromatik amino asitlerin olduğu gözlenmiş, bu amino asitlerin arasındaki hidrofobik etkileşimlerin monomerleri aktif dimerlerle birleştiren önemli güçlerden biri olduğu düşünülmüştür [25]. Ayrıca Meng ve ark. (1993) [26] *Thermoanaerobacterium thermosulfigenes* bakterisinde yaptığı çalışmalarda kofaktör olarak  $\text{Co}^{2+}$  iyonu içeren ısıl kararlılığa sahip aromatik rezidüer (Trp 48, Phe 59, Trp 138, Phe 144 ve trp 187) bulmuştur. Bunlardan Trp187His ve Phe144Lys mutantlarının  $75^{\circ}\text{C}$ 'de sıcaklık muamelesine dayanıklı olmadığı gözlenmiştir. Bu da Trp187 ve Phe144 rezidülerinin hidrofobik karakterlerinin yüksek sıcaklıklarda enzim yapısının korunmasında etkili olduğunun bir göstergesidir. Bununla birlikte Trp138 rezidüsün küçük hidrofobik rezidüerle sübtitüsyonu enzimin ısıl kararlılığını aktiviteyi etkilemeden  $85^{\circ}\text{C}$  ye çıkardığı gözlenmiştir. Bu çalışmada Trp138'deki indol grubu enzimin aktif bölgesindeki kaviteye doğru bir çıkıntı oluşturdu ve Trp138'in Phe, Met veya Ala ile yerdeğişimi sonucu hidrofobik yüzeydeki aktif bölgenin çevresi daraltılmış oldu. Böylece enzimin ısıl kararlılığı arttırıldı. Buna karşılık Trp48Arg mutasyonu enzimin aktivisinde herhangi bir değişikliğe sebep olmadığı fakat ısıl kararlılığı %60 oranında arttırdığı gözlendi. Yine Phe95His mutantının yaban tipe göre ısıl kararlılığının ve yarı ömrünün daha az olduğu anlaşıldı. Cha et al.(1994)[27] *Streptomyces rubiginosus* KI'nın His219 rezidüsünde enzimin ısıl kararlılığı ve aktivitesinin araştırılması amacıyla site-directed mutasyon yaptı. Bu rezidü tüm KI'larda korunmuştur. Enzimin üç boyutlu yapısı üzerinde yapılan çalışmalar His219'un enzimin aktif bölgesindeki M2'nin oktahedral koordinasyonun bir parçası olduğunu gösterdi. His219'un Ser, Glu ve Asn ile yaptığı sübtitüsyonlarınsa enzimin  $k_{\text{cat}}$  değerinde sadece %0,3–0,5 artışa sebep olduğu gösterildi. Fakat bu çalışmada  $K_m$  değerleri 30–50 kat arttığı görüldü. His219Lys mutantı aktivitede önemli bir değişikliğe neden olmadı.

### 1.5.2. Aktif Bölge Mutasyonları

Birçok aktif bölge mutasyonu enzim aktivitesini azaltır veya yok eder. Bazıları da başarılı olur [28]. Buna örnek bir çalışmayı Meng ve ark. (1990) [29] *Thermoanaerobacterium thrmosulfirigenes* KI'nda site-directed mutasyon ile yaptı. Substrat bağlanma bölgesini yeniden dizayn ederek enzimin substrat tercihi ksilozdan glukozla değiştirildi. *Arthrobacter* KI'da ise altı karbonlu yarışmacı inhibitöre sahip enzimin yapısı incelenmiştir. Buna göre hidroksimetil grubu substrat bağlanma çukuruna karşı yerleşmiştir. Bu bölgeler aynı zamanda Met87, Thr89 ve Val184 rezidülerine komşudur. Bu rezidülerin KI'larda oldukça korunmuş olduğu ve TTKI'daki Trp138, Thr140 ve Val185 ile uyduğu gözlenmiştir. Bu nedenle Trp138'in Phe ile yerdeğişimi glukoz için yüksek katalitik aktiviteye sahip bir enzim üretir. Ayrıca ksiloz için  $K_m$  değerini yükseltir ve enzimin katalitik aktivitesini azaltır.

### 1.5.3. *Anoxybacillus gonensis* ve GI (KI) Açısından Önemi

*Anoxybacillus gonensis* bakterisi Balıkesir Gönen Kaplıcası'ndan 2003 yılında Beldüz ve ark. tarafından izole edilerek literatüre kazandırılmış yeni bir termofilik bakteri türüdür. Çomak şekilli, gram pozitif, kendine özgü hareketli ve spor oluşturabilen, 0,75 x 5,0 µm büyüklüğünde bir bakteridir. Besi ortamında oluşturduğu koloniler, pürüzlü ve krem renkli görünümündedir. Önemli biyokimyasal özellikleri, zayıf katalaz-pozitif, oksidaz-pozitif, nişasta ve jelatini parçalayabilen, karbon kaynağı olarak glukoz, glikojen, raffinöz, sukroz, ksiloz, fruktoz ve mannitol kullanabilme yeteneğindedir. % 4 NaCl içeren sıvı besiyerinde büyüeyebilen *A. gonensis* bakterisinin pH aralığı 6,0-10,0 olarak belirlenmiştir. Termofilik bir organizma olması dolayısıyla, büyüme sıcaklık aralığı, 55-60°C'dir. Oksijen kullanımını açısından fakültatif anaerobiktir ( Beldüz ve ark., 2003 ) [30].

Çeşitli mikroorganizmalardan izole edilen GI'ların enzimatik ve biyokimyasal özellikleri yoğun bir şekilde çalışılmıştır. Enzimin pH ve ısıl karalılığı, metal iyon gereksinimi, substrat spesifikliğı gibi spesifik özellikleri hakkındaki bilgiler enzimin inhibe olmasını engellemek için ve HFCS üretiminde ticari olarak uygulanabilirliğini değerlendirmek açısından önemlidir. GI'lar aminoasit dizilimlerine göre iki grup altında sınıflandırılırlar (Bhosale ve ark.,1996) [15]. Tip1 GI'lar N-Terminal ucunda 30 ila 40 aminoasitlik bir fazlalık parça bulunmaktadır ve bu enzimler birbirlerine aminoasit dizilimi bakımından oldukça benzerdir. *A. gonensis*

G2<sup>T</sup>'ye yakın türlerin GI genlerinin Tip1 GI sınıfına girmesinden dolayı *A. gonensis* G2<sup>T</sup> GI'sını yakalamak için tasarlanan dejenerat primerler Tip1 GI genine sahip bakterilerde yapılan karşılaştırmalar sonucu belirlenmiştir. *A. gonensis* G2<sup>T</sup>'den, bu primerler kullanılarak gerçekleştirilen PCR reaksiyonu sonucu elde edilen parçanın baz diziliminin diğer organizmalara ait GI'lar ile karşılaştırılması ile bu parçanın Tip1 GI'lara yüksek benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. *A. gonensis* G2<sup>T</sup> GI'sı optimum 85°C'de aktivite gösterdiği bulunmuştur. *A. gonensis* G2<sup>T</sup> GI'sının pH ve ısıl kararlılığına bakıldığında enzimin oldukça kararlı bir yapıya sahip olduğu görülmektedir. +4 °C'de 300 saat bekletilen enzimin aktivitesinde bir azalma olmadığı gözlenmiştir. *A. gonensis* G2<sup>T</sup> GI'sı en iyi şekilde Co<sup>+2</sup> varlığında çalıştığı belirlenmiştir. Cd<sup>+2</sup>, Ca<sup>+2</sup>, Sn<sup>+2</sup>, Hg<sup>+2</sup>, Ni<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup>, Fe<sup>+2</sup> ve Cu<sup>+2</sup> bivalent metal iyonlarının, *A. gonensis* G2<sup>T</sup> GI aktivitesi üzerinde inhibitör etkisi gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda *A. gonensis* G2<sup>T</sup> GI'sının alt birimlerinin moleküler ağırlığı 43.000 olarak hesaplandı [31]. Termofilik bir bakteri olan *A. gonensis* G2<sup>T</sup> GI'sı üzerinde yapılan bu araştırmada enzimin endüstriyel uygulamalarda arzu edilen; glukoz için düşük  $K_m$  değerine sahip olma, düşük pH değerlerinde ve yüksek sıcaklıklarda yüksek aktivite ile çalışabilme ve yüksek ısıl ve pH kararlılığı gibi biyokimyasal özelliklere sahip olduğu tespit edildi. Bu özellikler göz önüne alındığında, *A. gonensis* G2<sup>T</sup> GI'sının endüstriyel kullanım için ideal bir enzim olduğu sonucu açığa çıkmaktadır

## 2.YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1.Kullanılan Materyal ve Kimyasallar

Trypton (Merck V441613949), Yeast Ekstrak (Merck VM175053), NaCl (Merck K34243404), D-Ksiloz (Sigma Y4625), D-Ksiluloz (Sigma X4625), MOPS (AppliChem A29470100), MnSO<sub>4</sub> (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), EDTA (Merck 84211000), CaCl<sub>2</sub> (Aktar Kimya), X-gal (Applichem A10070005), Commassie Brilliant Blue G-250, Etanol, Fosforik asit, DEAE-Sepharose (Sigma), Phenyl sepharose 6 (Sigma), Amonyom sülfat (Merck A734116), Sodyum asetat (Merck TA867065), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck 1,050,211), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck 1,050,212), Tris (Melfoid Lab 14271), CoCl<sub>2</sub> (Applichem 25,559-9)

### 2.2.Genin Klonlanması ve Mutasyon

Daha önce moleküler biyoloji laboratuvarında *A.gonensis XylA* geni pET28a+ ekspresyon vektörüne klonlanan ve genin 99. Amino asitini (histidin) kodlayan bazlar değiştirilerek glutamik asitli enzim üreten klonlar yapılmıştı. Mutant geni içeren pET28a+ *E.coli* BL21(DE3) hücelerine aktarılıp ekspreslenerek mutant KI enzimi ( KI H99E) elde edildi. Mutasyon çalışmaları şu şekilde gerçekleştirildi. *E.coli* BL21 içerisinde bulunan His Tag kuyruğu içermeden klonlanan geni taşıyan vektör (pETG2GI), 1 gece büyütüldüğü kültürden plazmit izolasyon kiti kullanılarak izole edildi. pETG2GI, ilgili mutasyon primerleri ile PCR'da çoğaltıldı. Bu amaçla yapılan PCR'da Taq DNA polimeraz yerine 25kb' e kadar zincir sentezleyebilen yüksek doğruluğa sahip bir DNA polimeraz enzimi kullanıldı (Roche'un Expand long Range dNTP packs). Kalıp olarak ilgili vektörün kullanıldığı PCR'da, PCR ile sentezlenen zincirler metillenmemiş haldedir fakat vektörün kendisi metillidir. PCR sırasında vektörün her iki zinciri de kalıp olarak kullanılmaktadır. Bu reaksiyon tamamlandıktan sonra PCR ürünü, PCR temizleme kiti ile temizlendi. Böylelikle kesim reaksiyonu için uygun hale getirilmiş oldu. Sonrasında 50 µl son hacimde 10 ünite DpnI enzimi ile 37°C'de kesildi. DpnI enzimi GATC dizisini tanıdığı yerden A'nin metillenmiş halini keser. Dolayısı ile reaksiyon sonunda ana plazmitten gelen DNA zinciri bu

enzim ile kesilirken yeni üretilen zincirde kesim meydana gelmez. Reaksiyon sonrası kesim ürünü herhangi bir ligasyon işlemine tabi tutulmaksızın doğrudan CaCl<sub>2</sub> transformasyon metodu ile E.coli DH5 $\alpha$  suşuna aktarıldı. (Üretilen PCR fragmentlerinin iki ucu birbirine homolog olduğundan hücrede bu uçlar rekombine olarak PCR ürünü bir plazmit halini alır.) Kanamisin ihtiva eden LB katı besiyerine ekilerek buradan büyüyen hücrelerden plazmit izolasyonu yapıldı. İzole edilen plazmitler sekans ettirilerek mutasyonun olup olmadığı araştırıldı. Mutasyonlarının her biri başarılı bir şekilde gerçekleştirildi [36].

### **2.3.Gen Ürünlerinin Elde Edilmesi ve Saflaştırılması**

#### **2.3.1. Glukoz ve Ksiloz İzomeraz Aktivitesi Deneyleri**

Karakterizasyon deneylerinde kullanılan glukoz ve ksiloz aktivite deneyi Belfaquih ve arkadaşları (2000) [30] tarafından geliştirilmiş bir yöntemdir. Reaksiyon 10  $\mu$ l enzim kullanılarak, 200 mM Glukoz, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5 mM CoCl<sub>2</sub> 20 mM MOPS pH 6,5 tamponunda, 100  $\mu$ l son hacimde, 85°C’de, 30 dk BioRAD Thermal Cycler cihazında gerçekleştirildi. Reaksiyonun durdurulması için 100  $\mu$ l 0,5 M perklorik asit eklendi. Reaksiyon sonunda açığa çıkan D-fruktoz miktarı Dishe ve arkadaşlarının (1951) [32] geliştirmiş olduğu sistein-karbozol-sülfürik asit yöntemi ile belirlendi. Elde edilen numune üzerine 40  $\mu$ l %1,5’lik sistein hidroklorür konuldu. Bunu takiben 40  $\mu$ l % 0,12’lik karbozol konuldu. Oluşan karışım vortekslendikten sonra üzerine 1 dk ara ile 1,2 ml %70’lik sülfürik asit ilave edilerek vortekslendi. Yani, 30. dk’da yapılan ilk ölçümün ardından yapılan herbir ölçümde 1 dk ara ile gerçekleştirildi. Ölçümler 560 nm dalga boyunda yapıldı. Reaksiyonlarda açığa çıkan fruktoz miktarını hesaplamak için fruktoz standardı hazırlandı ve standart grafik spektrofotometreye yüklenerek, daha sonra açığa çıkan fruktoz miktarı hesaplamaları için kullanıldı. Enzim aktivitesi reaksiyon sonrası açığa çıkan fruktoz miktarına göre  $\mu$ mol/dk cinsinden hesaplandı.

Ksiloz izomeraz için de tüm bu yapılan işlemler aynıdır. Ksiloz için kullanılan tampon 100 mM Ksiloz, 1 mM MnSO<sub>4</sub>, 50 mM MOPS içerir ve pH’sı 6,5’tur. Yine reaksiyonda 10  $\mu$ l enzim kullanıldı ve reaksiyon 85°C’de, 30 dk, BioRAD Thermal Cycler cihazında gerçekleştirildi. Reaksiyonu durdurmak için 100  $\mu$ l 0,5 M perklorik asit eklendi. Reaksiyon sonunda açığa çıkan D-ksiluloz miktarı Dishe ve arkadaşlarının (1951) geliştirmiş olduğu sistein-karbozol-sülfürik asit yöntemi ile belirlendi. Reaksiyon çözeltisi üzerine 40  $\mu$ l

%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 sülfürik asit ilave edilerek vortekslendi. Karışım 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Ölçümler 540 nm dalga boyunda gerçekleştirildi. 30. dk'da yapılan ilk ölçümün ardından yapılan her bir ölçüm 1 dk ara ile gerçekleştirildi. Reaksiyonlarda açığa çıkan ksiluloz miktarını hesaplamak için ksiluloz standardı hazırlandı ve standart grafik spektrofotometreye kaydedilerek, reaksiyonlardan açığa çıkan ksiluloz miktarı hesaplamaları için kullanıldı. Enzim aktivitesi reaksiyon sonrası açığa çıkan ksiluloz miktarına göre µmol/dk cinsinden hesaplandı.

### **2.3.2. Protein Konsantrasyonu Tayini**

Protein konsantrasyonu tayini, Bradford'un 1976 [33] yılında geliştirdiği yöntemle yapılmıştır. 1000 ml boya solüsyonu hazırlamak için, 100 mg Commassie Brilliant Blue G-250 boyası önce 50 ml % 95'lik etanol içinde iyice çözüldü, üzerine 100 ml %85'lik fosforik asit eklendi. Daha sonra saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti karanlık bir yerde filtre kâğıdı ile filtre edildi. Bu boya ile BSA (Bovine 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 numunenin üzerine 5 ml hazırlanan boyadan eklendi, 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. Daha sonra standart grafiğin yüklendiği Agilent 8453E UV-visible Spectroscopy System cihazı kullanılarak 595 nm'de ölçümler yapıldı ve protein konsantrasyonu µg/µl cinsinden hesaplandı.

### 2.3.3. Hücre Özütünün Elde Edilişi

KI H99E mutant genini taşıyan plazmitler *E.coli* DH5 $\alpha$  suşundan izole edilerek ekspresyonun yapılacağı *E.coli* BL21 (DE3) suşuna CaCl<sub>2</sub> transformasyon metodu ile aktarıldı. Daha sonra aktarılan petriden tek koloni seçilerek 50  $\mu$ g/ml kanamisin içeren 30 ml sıvı LB'ye ekilerek gece boyu büyümeye bırakıldı ve oluşan kültürün O.D.'si ölçüldü. Bu kültürden 250 ml 50  $\mu$ g/ml kanamisin içeren sıvı LB'ye 600 nm'de O.D. 0,1 olacak şekilde tekrar ekim yapıldı. O.D.'si 0,6–0,9'ulaşınca son hacimde 1 mM IPTG olacak şekilde, IPTG ilave edilerek indüklendi. İndükleme yapıldıktan sonra kültür 4–4,5 saat büyütüldü. Büyütülen hücreler 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek çöktürüldü.

Elde edilen pellet 1 ml reaksiyon tamponund (pH'sı 6,5 olan 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,5 mM CoCl<sub>2</sub>, 50 mM MOPS tamponu) çözüldü. Daha sonra %80 şiddetinde, 10 saniye %100 şiddetinde, 1 devirde 5 dk Sartorius Labsonic sonikatör kullanılarak patlatıldı. Elde edilen hücre solüsyonları 15300 rpm'de 15 dk boyunca santrifüj edildi. Pellet kısmı atılarak daha sonraki işlemlerde kullanmak amacıyla her bir özütten 150  $\mu$ l örnek ayrılarak saflaştırma işlemlerine geçildi.

### 2.3.4. Sıcak Şoku Uygulaması

Elde edilen kaba ekstrakt 20 dk süreyle 85 °C'de bekletildi. Denatüre olan proteinleri uzaklaştırmak için 20 dk 14800 rpm'de santrifüjlendi. Süpernatant alındı, çöken kısım uzaklaştırıldı. Daha sonra yapılacak çalışmalar için 150  $\mu$ l örnek ayrıldı. Sıcaklık şoku uygulamasıyla enzim kısmi olarak saflaşmış oldu.

### 2.3.5. İyon Değişimi Kromatografisi

İyon değişimi kromatografisi için uzunluğu 50 cm ve çapı 1,5 cm olan bir kolon kullanıldı. Kolon malzemesi olarak DEAE-Sepharose (Anyon değiştirici) kullanıldı. Kolon malzemesinin ve deney için kullanılan tüm tamponların gazı vakum pompasında alındı ve oda sıcaklığına geldikten sonra bir pastör pipeti kullanılarak kolona yavaşça dolduruldu. Doldurma işlemini takiben kolon 300 ml tampon (1 mM MnSO<sub>4</sub>, 50 mM MOPS, pH 7) ile dengeye getirildi. Enzim kolondan geçirilerek içerisinde bulunan proteinlerin kolon dolgu

malzemesine bağlanmaları sağlandı. Bu işlemi takiben kolondan 50 ml daha tampon geçirilerek kolona tutunmayan proteinlerin uzaklaştırılması sağlandı. Daha sonra kolonun tuz (NaCl) içeriği 0 molardan 0,6 molara çıkarıldı. Tuz konsantrasyonunun dengeli bir şekilde artmasını sağlamak amacıyla toplam hacim 200 ml olacak şekilde NaCl tuz gradiyenti kullanıldı. Tamponun akış hızı 1 ml/dk olarak ayarlandı ve kolondan çıkan fraksiyonlar cam tüpler içerisinde ve her bir tüpte 3,5 ml olacak şekilde toplandı. Elde edilen tüm tüplerin protein tayini Bradford yöntemine göre belirlendi ve içerisinde protein olduğu belirlenen tüplerde glukoz izomeraz aktivitesi arandı. İçerisinde aktivite olan numuneler toplanarak birleştirildi ve yoğunlaştırılması amacıyla filtreden geçirildi ve diğer işlemlerde kullanmak amacıyla 2 ml örnek ayrıldı.

### **2.3.6. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi**

Hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi için uzunluğu 20 cm ve çapı 0,75 cm olan bir kolon kullanıldı. Kolon malzemesi olarak Phenyl sepharose 6 (Sigma) kullanıldı. Kolon malzemesinin, deneyde kullanılan tüm tamponların ve suyun gazı vakum pompasında alındı ve oda sıcaklığına geldikten sonra bir pastör pipeti kullanılarak kolona yavaşça dolduruldu. Bu işlem bittikten sonra 1,3 M amonyum sülfat içeren 300 ml tampon (1 mM MnSO<sub>4</sub>, 50 mM MOPS, pH 6,5) ile dengeye getirildi. Enzim, 2,6 M amonyum sülfat içeren tampon ile bire bir oranında karıştırıldı böylece enzimde amonyum sülfat içeriği 1,3 M olacak şekilde ayarlandı. Enzimin kolondan geçirilmesi ile yüksek amonyum sülfat konsantrasyonunda proteinler hidrofobik kolon malzemesine bağlandılar. Bu işlemle iyon değişim kromatografisindeki işlemin aksine tuz konsantrasyonu düşürüldü. Kolonun amonyum sülfat içeriği 1,3 molardan 0 molara indirildi. Bunun için toplam hacim 150 ml olacak şekilde amonyum sülfat gradiyenti kullanıldı. Tamponun akış hızı 1 ml/dk olarak ayarlandı ve kolondan çıkan fraksiyonlar cam tüpler içerisinde ve her bir tüpte 1 ml olacak şekilde toplandı. Elde edilen tüm tüplerde protein tayini Bradford yöntemine göre yapıldı. İçerisinde protein olduğu belirlenen tüplerde aktivite arandı. İçerisinde aktivite bulunan numuneler toplanarak SDS-PAGE elektroforezinde gösterildi. H99E mutasyonunun ksiloz izomeraz enziminin karakteristik özellikleri üzerine etkisini araştırmak amacıyla 5 ml enzim ayrılarak 20 mM ph'sı 6,5 olan 2 litre reaksiyon tamponunda diyaliz edildi.



### 2.3.7. KI H99E Mutantının Karakterizasyonu

#### 2.3.7.1. Enzim Kinetiği

KI H99E mutantının glukoza ilgisi ( $K_m$ ) değeri ve bu değere bağlı kinetik özellikler 2,5-150 mM aralığında glukoz kullanılarak yapılan deneyler sonrasında belirlendi. Deneyler, 5 mM MgSO<sub>4</sub> ve 0,5 mM CoCl<sub>2</sub> içeren 50 mM MOPS (pH 6,5) tamponunda, 100 µl son hacimde, 85°C'de, 30 dk, Biometra Personal Cycler PCR cihazında yapıldı. Reaksiyonlar sonucunda oluşan glukoz miktarındaki artışa göre hazırlanan Linewear-Burk eğrisi kullanılarak 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 kestiği noktalara karşılık gelen değerlerin tersi bulunarak belirlendi. Ksiloz izomeraz içinse 2-120 mM aralığında ksiloz kullanılarak  $K_m$  değeri belirlendi. Deneyler, 1 mM MnSO<sub>4</sub> içeren 50 mM MOPS (pH 6,5) tamponunda, 100 µl son hacimde, 85°C'de, 30 dk, Biometra Personal Cycler PCR cihazında yapıldı.

#### 2.3.7.2. Optimum Sıcaklık

KI H99E mutasyonunun glukoz ve ksiloz izomeraz aktivitesinin çalışma sıcaklığı üzerine etkisi, GI için; 200 mM glukoz içeren 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,5mM CoCl<sub>2</sub> ve 20 mM MOPS pH 6,5 tamponu içerisinde ve KI aktivitesi için pH'sı 6,5 olan 100 mM ksiloz 1 mM MnSO<sub>4</sub> 50 mM MOPS tamponu içerisinde 25, 37, 55, 60, 70, 80, 85, 90, 95'lerde BioRAD Thermal Cycler cihazında yapılan aktivite deneyleriyle bulundu.

#### 2.3.7.3. Optimum pH

KI H99E mutasyonunun GI ve KI aktivitesinin pH'sı üzerine etkisi, pH 5 – 5,5 aralığı için 50 mM asetat tamponunda; pH 6 – 7,0 aralığı için 50 mM fosfat tamponunda; pH 7,5 – 9,0 aralığı için 50 mM Tris-HCL tamponunda ve pH 9,5–10 aralığı için 50 mM glisin tamponunda, 200 mM glukoz ve 100 mM ksiloz konsantrasyonunda, 85°C'de 30 dakika, BioRAD Thermal Cycler cihazında yapıldı. Mutant enzimin glukoz ve ksiloz aktivitesi için

optimum pH yaban tip enzimdeki gibi 6,5°C olarak belirlendi. KI H99E mutasyonunun optimum pH'da herhangi bir değişikliğe neden olmadığı gözlemlendi.

#### **2.3.7.4. Isıl Kararlılık**

KI H99E mutantının ısıl kararlılığını belirlemek için saflaştırılan enzim özütü 85 °C'de inkübe edildi. Çeşitli zamanlarda örnekler alınarak, optimum çalışma şartlarında aktivite ölçümü yapıldı ve enzimin kalan aktivitesi hesaplandı.

#### **2.3.7.5. pH Kararlılığı**

KI H99E mutantının pH kararlılığını belirlemek için saf enzim özütü, 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 enzimlerden örnekler alınarak optimum çalışma şartlarında aktivite ölçümü yapıldı ve enzimin kalan aktivitesi hesaplandı. İlk anda ölçülen aktivite % 100 kabul edildi.

### **3.BULGULAR**

#### **3.1. KI H99E'nin Saflaştırılması**

##### **3.1.1. Hücre Özütü Eldesi ve Isı Şoku Uygulamaları**

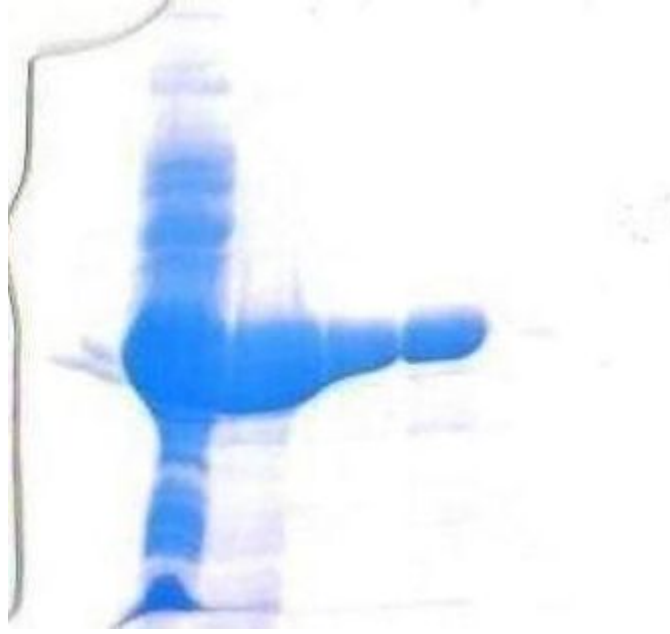
Elde edilen özütlerin ve bunların ısı şoku uygulamalarından elde edilen özütlerde protein konsantrasyonu tayini ve spesifik aktiviteleri belirlendi. Bulunan veriler Tablo 1'de, elde edilen SDS-PAGE görüntüsü Şekil 3'te verildi.

##### **3.1.2. İyon Değişimi Kolon Kromatografisi**

Isı şoku uygulamasından sonra elde edilen özütler iyon değişimi kolon kromatografisinden geçirildikten sonra KI aktivitesi belirlenen fraksiyonlar birleştirilerek elde edilen enzim ekstraktlarının protein konsantrasyonu ve spesifik aktiviteleri belirlendi. Bulunan veriler Tablo 1'de, elde edilen SDS-PAGE görüntüsü Şekil 3'te verildi.

##### **3.1.3. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi**

İyon değişimi kolon kromatografisi uygulamasından sonra elde edilen kısmen saflaştırılmış özütler hidrofobik kolon kromatografisinden geçirildikten sonra, aktivite görülen fraksiyonları birleştirildi ve SDS-PAGE'de yürütüldü. Fraksiyonlar birleştirildikten sonra, saflaştırılmış enzimlerin protein konsantrasyonları ve spesifik aktiviteleri belirlendi. Bulunan veriler Tablo 1de, elde edilen SDS-PAGE görüntüsü Şekil 3'te verildi.



**Şekil 3.** Saflaştırma sonrası aktivite görülen fraksiyonların SDS-PAGE jel görüntüsü

(1) Kaba ekstrakt, (2) Isı şoku sonrası, (3) İyon değişim sonrası, (4) hidrofobik kolon sonrası

Saflaştırma basamağı	Hacim (ml)	[Protein] (mg/ml)	T. protein (mg)	T. aktivite (U)	spesifik aktivite (U/mg)	Verim	Saflaştırma katı
Hücre özütü	6,1	35,74	218	2100	9,63	100	1.00
Isı-şoku	5,1	15,29	78	1986	25,4	94,57	2.64
İyon değişimi	24,5	1.22	30	1412	47,06	67,23	4.88
Hidrofobik etkileşim	16	1,43	23	1200	52,17	57,14	5.41

**Tablo 1.** KI H99E'nin Saflaştırma Tablosu (Glukoz izomeraz esas alınarak hazırlanmıştır).

### 3.1.4. KI H99E'nin Karakterizasyonu

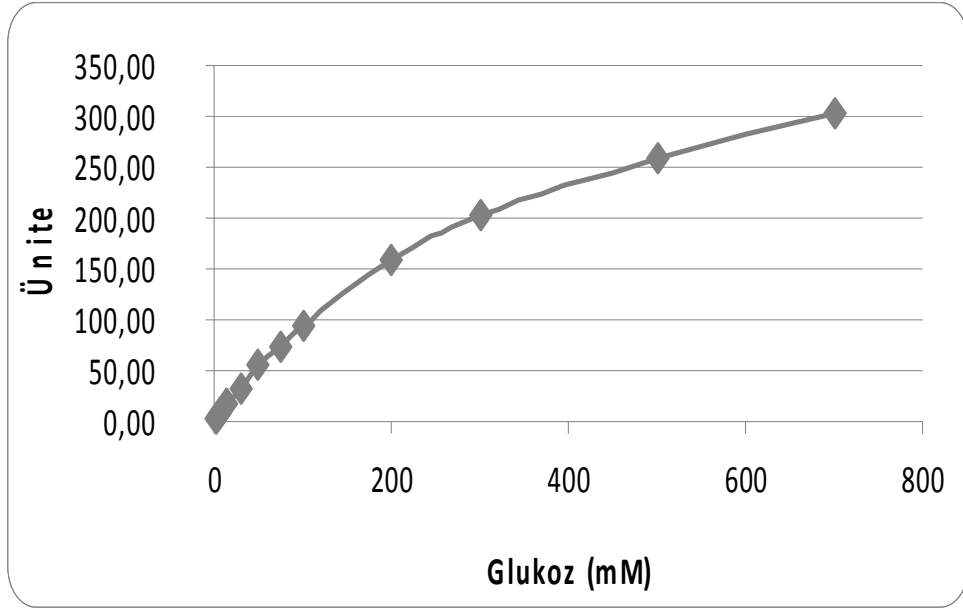
#### 3.1.4.1. Enzim Kinetiği

KI H99E mutantının glukoz izomeraz aktivitesinin substrat-aktivite grafiği çizilerek enzimin basit Michaelis-Menten kinetiğine uyduğu tespit edildi. Glukozun substrat olduğu reaksiyonda glukoz izomeraz aktivitesi için çizilen Lineweaver-Burk eğrilerinin oluşturduğu doğrunun x-eksenini kestiği nokta  $-1/K_m$ 'ye eşitlenerek  $K_m$  değeri  $589,97\text{mM} \pm 10$  y-eksenini kestiği nokta ise  $1/V_{max}$ 'a eşitlenerek  $V_{max}$  değeri  $5,92 \pm 2 \mu\text{mol/dak/mg}$  olarak hesaplandı.

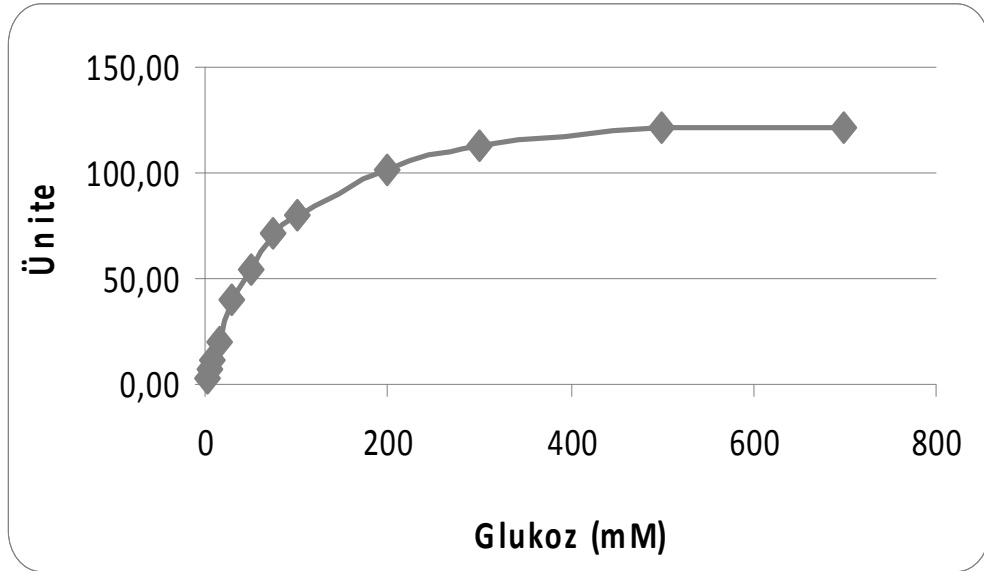
KI H99E mutantının ksiloz izomeraz aktivitesi için  $K_m$  değeri  $31,88 \pm 10 \text{ mM}$ ,  $V_{max}$  değeri  $6,524 \pm 2 \mu\text{mol/dk/mg}$  olarak hesaplandı.

#### 3.1.4.1.1. Mutasyonun $K_m$ ve $V_{max}$ üzerine etkisi

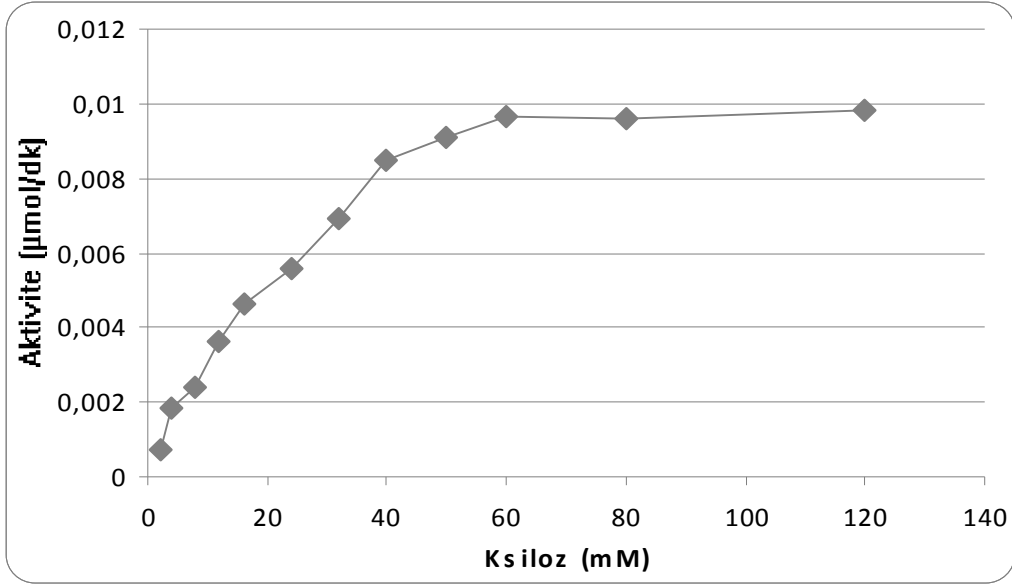
Yapılan çalışmalar sonucunda yaban tip enzimin ksiloz izomeraz aktivitesine ait  $K_m$  değeri  $25 \pm 2 \text{ Mm}$  [37] iken mutant tip enzimin ksiloz izomeraz aktivitesine ait  $K_m$  değeri  $31,88 \pm 10 \text{ mM}$  olarak saptandı. Buna göre  $K_m$  değerinde yaklaşık 1,2 kat artış görüldü. Yine yaban tip enzimin glukoz izomeraz aktivitesine ait  $K_m$  değeri  $100,27 \pm 10 \text{ mM}$  [36] iken mutant tip enzimin glukoz aktivitesine ait  $K_m$  değeri  $589,97 \pm 10\text{mM}$  olarak saptandı. Buna göre  $K_m$  değerinde yaklaşık 5,8 kat bir artış görüldü. Ayrıca  $V_{max}$  değerleride değişti. Yaban tip enzimin ksiloz izomeraz aktivitesine ait  $V_{max}$  değeri  $25,73 \pm 2 \mu\text{mol/dk/mg}$  iken mutant tip enzimin ksiloz izomeraz aktivitesine ait  $V_{max}$  değeri  $6,52 \pm 2 \mu\text{mol/dk/mg}$  olarak saptandı. Buna göre  $V_{max}$  değerinde yaklaşık 3,9 kat düşüş gözlemlendi. Yine yaban tip enzimin glukoz izomeraz aktivitesine ait  $V_{max}$  değeri  $21,71 \pm 2 \mu\text{mol/dk/mg}$  iken mutant tip enzimin glukoz aktivitesine ait  $V_{max}$  değeri  $5,92 \pm 2 \mu\text{mol/dk/mg}$  olarak saptandı. Buna göre  $V_{max}$  değerinde yaklaşık 1,6 kat düşüş gözlemlendi.



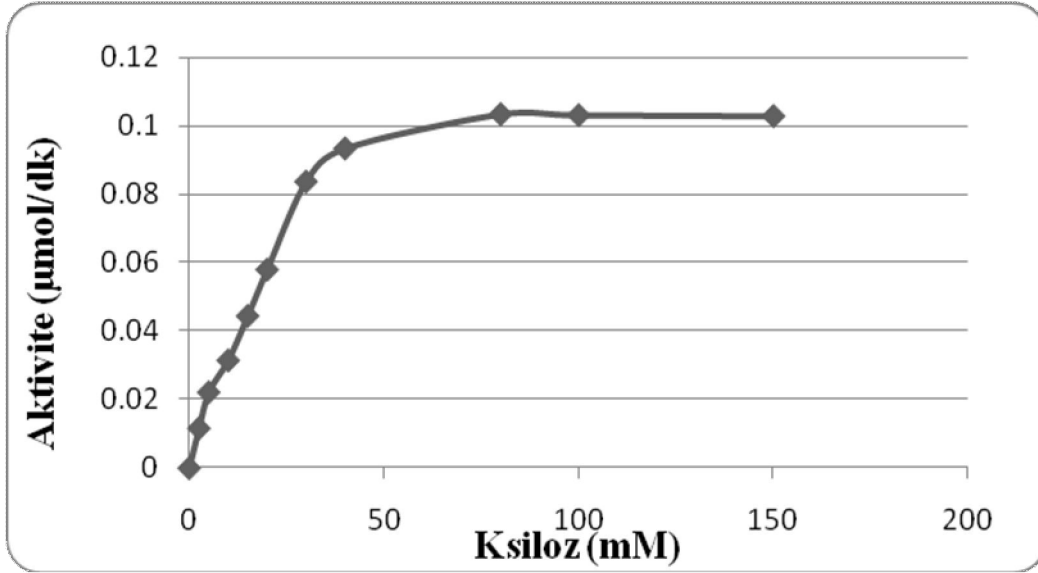
Şekil 4. KI H99E mutantının glukoz izomeraz aktivitesine ait Michaelis-Menten grafiği



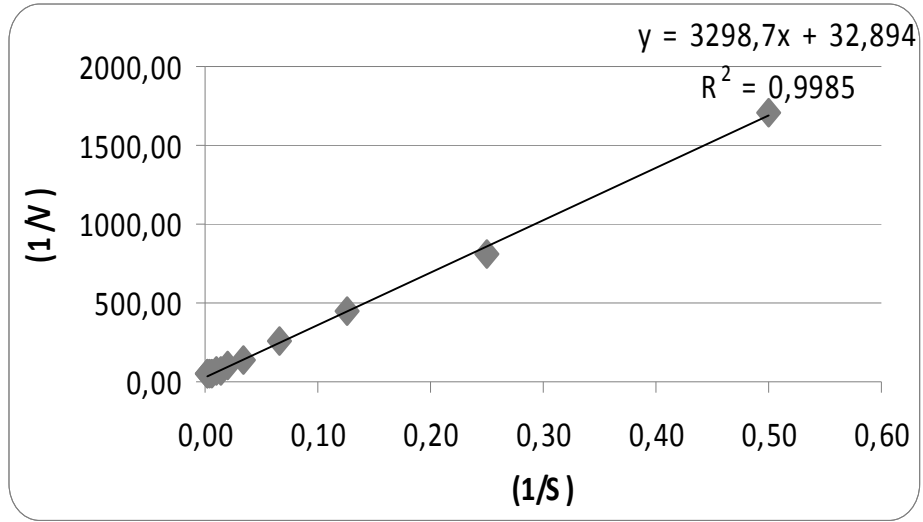
Şekil 5. Yaban tip enzimin glukoz izomeraz aktivitesine ait Michaelis-Menten grafiği



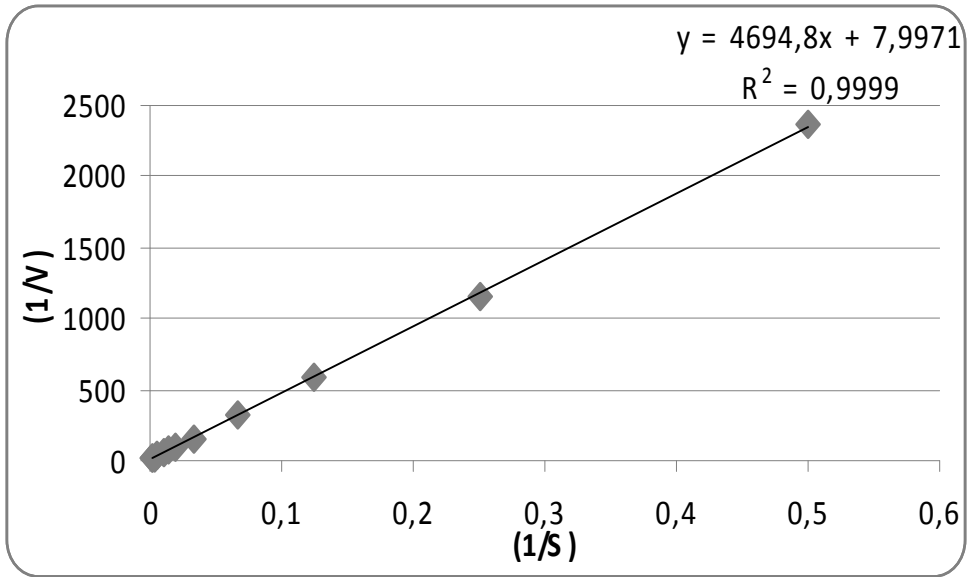
Şekil 6. KI H99E Mutantının ksiloz izomeraz aktivitesine ait Michaelis-Menten grafiği



Şekil 7. Yaban tip enzimin ksiloz izomeraz aktivitesine ait Michaelis-Menten grafiği [37]

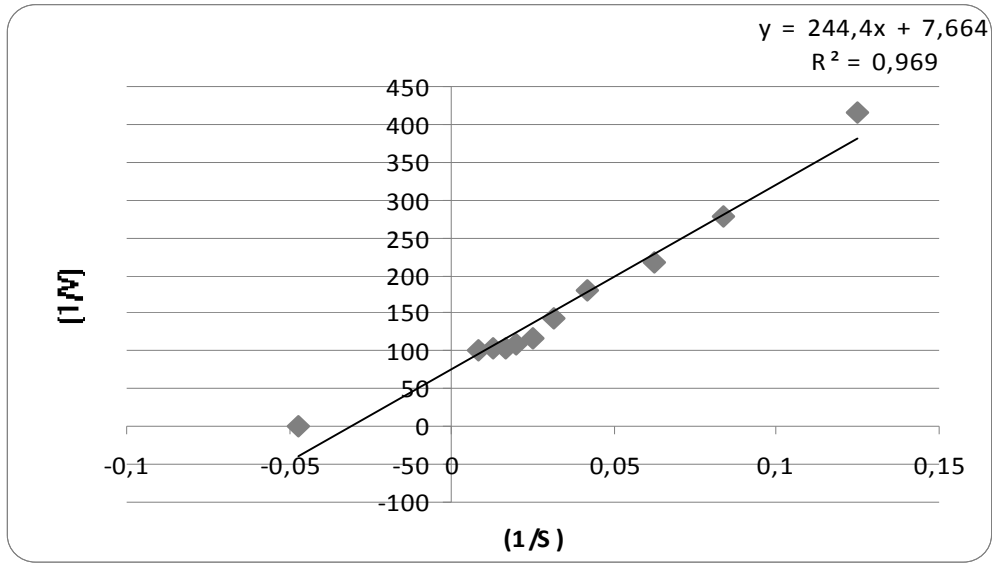


Şekil 8. Yaban tip enzimin glukoz izomeraz aktivitesine ait Lineweaver grafiği

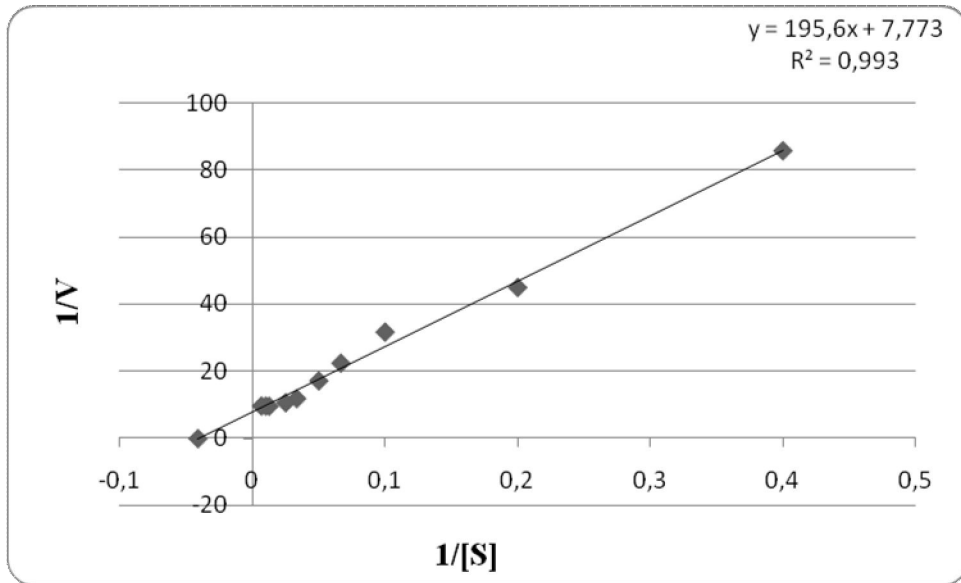


Şekil 9. KI H99E mutantının glukoz izomeraz aktivitesine ait Lineweaver grafiği





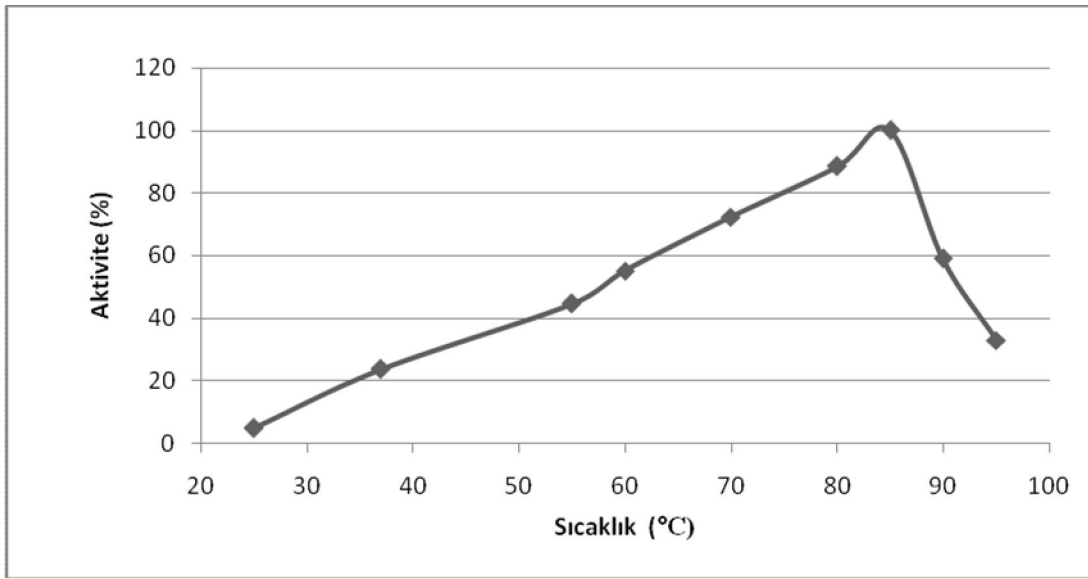
Şekil 10. KI H99E mutantının ksiloz izomeraz aktivitesine ait Lineweaver-grafigi



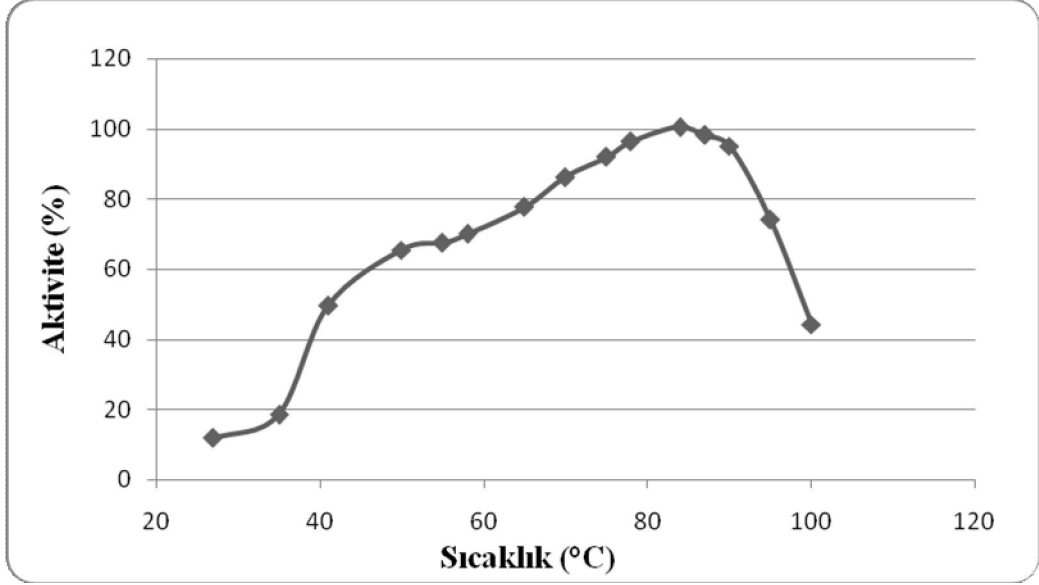
Şekil 11. Yabancı tip enzimin ksiloz izomeraz aktivitesine ait Lineweaver-grafigi [37]

### 3.1.4.2. Optimum Sıcaklık

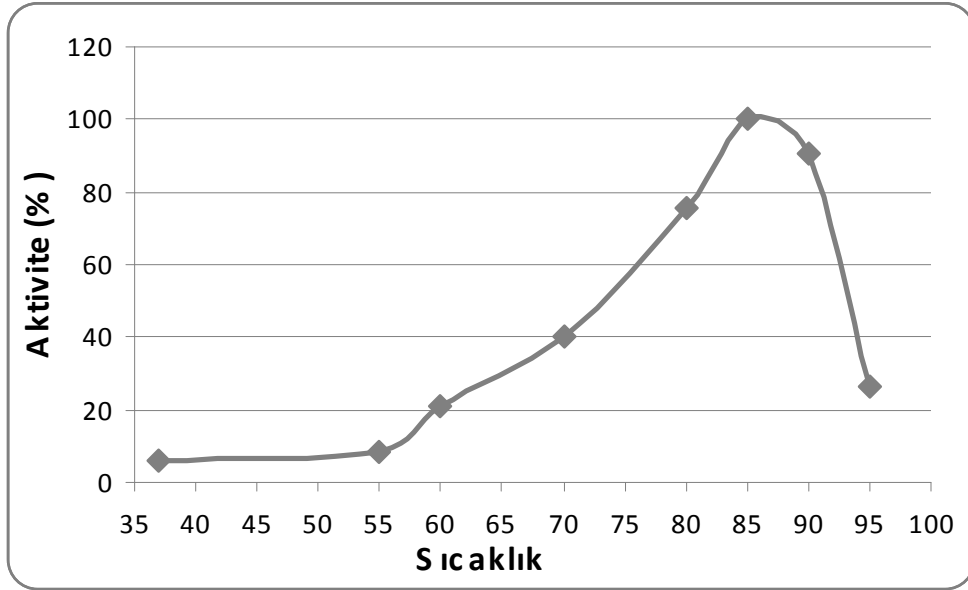
KI H99E mutasyonunun KI ve GI aktivitesinin çalışma sıcaklığı üzerine etkisi, (1mM MgSO<sub>4</sub>, 0,5m MCoCl<sub>2</sub>, 20 mM MOPS pH 6,5) 20 mM MOPS tamponu içerisinde 25, 37, 55, 60, 70, 80, 85, 90, 95°C'lerde BioRAD Thermal Cyclor cihazında yapılan aktivite deneyleriyle bulundu. KI H99E mutantının glukoz ve ksiloz izomeraz aktivitelere ait optimum çalışma sıcaklığı yaban tip enzimdeki gibi 85°C olarak belirlendi. Mutasyonun optimum sıcaklıkta herhangi bir değişikliğe neden olmadığı gözlemlendi.



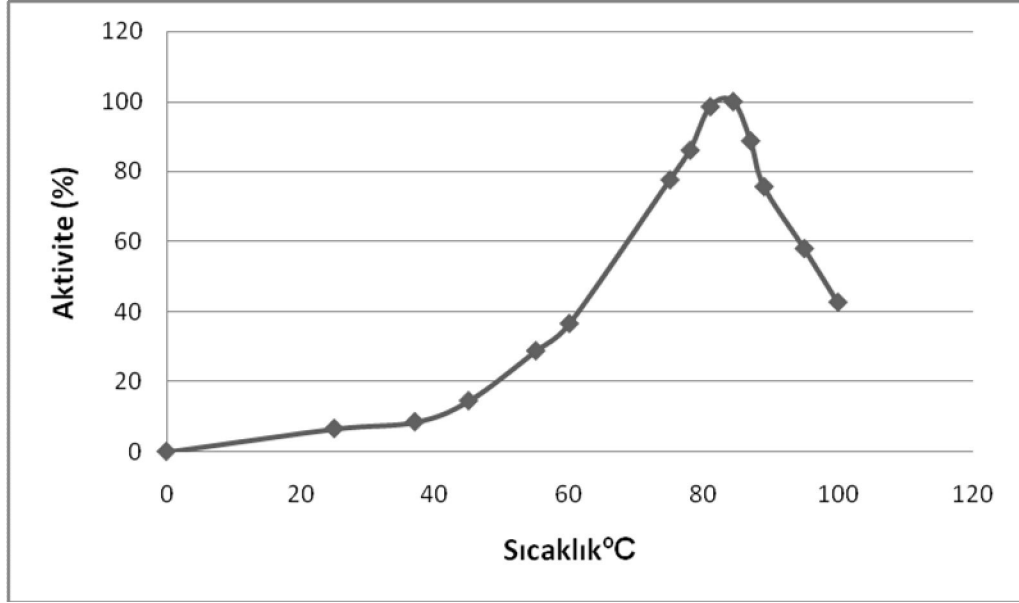
Şekil 12. KI H99E mutantının ksiloz izomeraz aktivitesine ait sıcaklığın etkisi



Şekil 13. Yaban tip enzimin ksiloz izomeraz aktivitesine sıcaklığın etkisi [37]



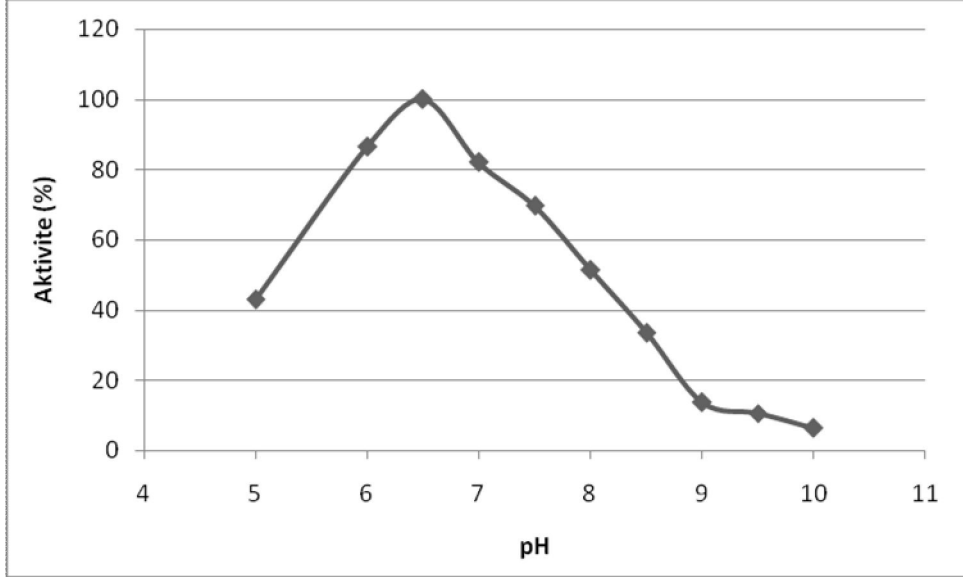
Şekil 14. KI H99E mutantının glukoz izomeraz aktivitesine ait sıcaklığın etkisi



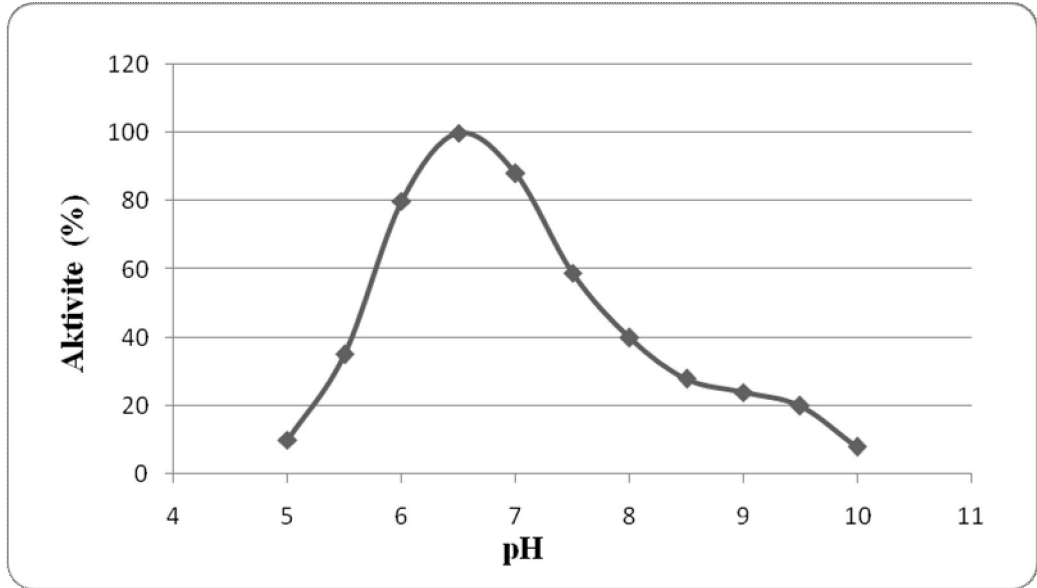
Şekil 15. Yaban tip enzimin glukoz izomeraz aktivitesine sıcaklığın etkisi

### 3.1.4.3. Optimum pH

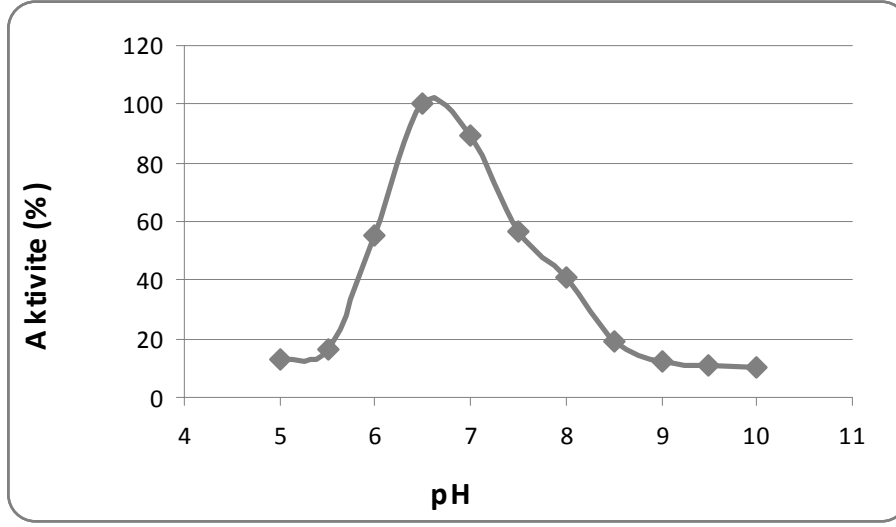
KI H99E mutasyonunun GI ve KI aktivitesinin pH'sı üzerine etkisi, pH 5 – 5,5 aralığı için 50 mM asetat tamponunda; pH 6 – 7,0 aralığı için 50 mM fosfat tamponunda; pH 7,5 – 9,0 aralığı için 50 mM Tris-HCL tamponunda ve pH 9,5–10 aralığı için 50 mM glisin tamponunda, 200 mM glukoz konsantrasyonunda, 85°C'de 30 dakika, BioRAD Thermal Cycler cihazında yapıldı. Mutant enzimin glukoz ve ksiloz aktivitesi için optimum pH yaban tip enzimdeki gibi 6,5°C olarak belirlendi. KI H99E mutasyonunun optimum pH'da herhangi bir değişikliğe neden olmadığı gözlemlendi.



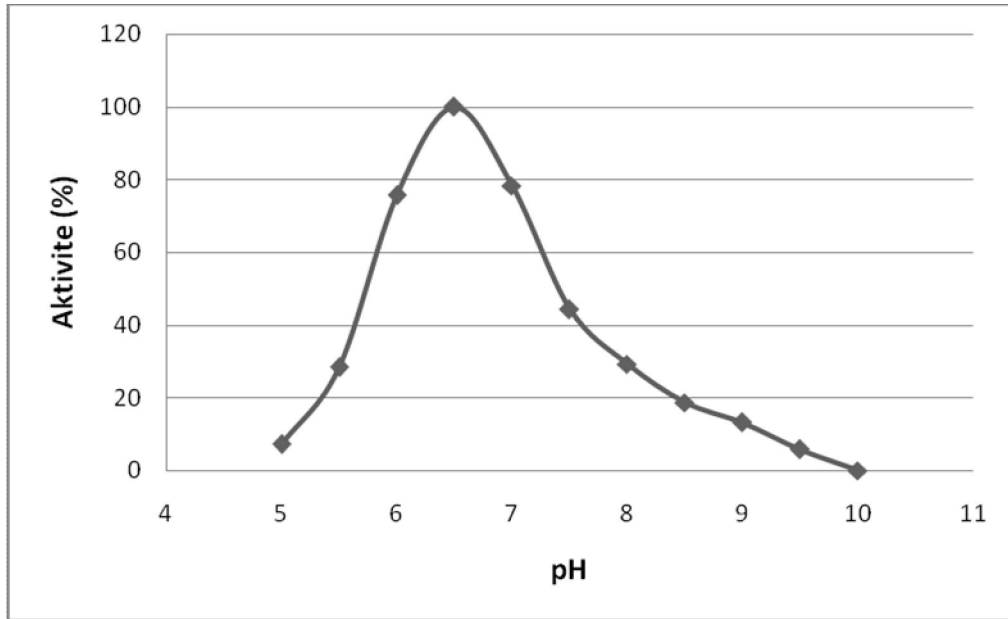
Şekil 16. KI H99E mutantının ksiloz izomeraz aktivitesine ait pH'nın etkisi



Şekil 17. Yaban tip enzimin ksiloz izomeraz aktivitesine ait pH'nın etkisi [37]



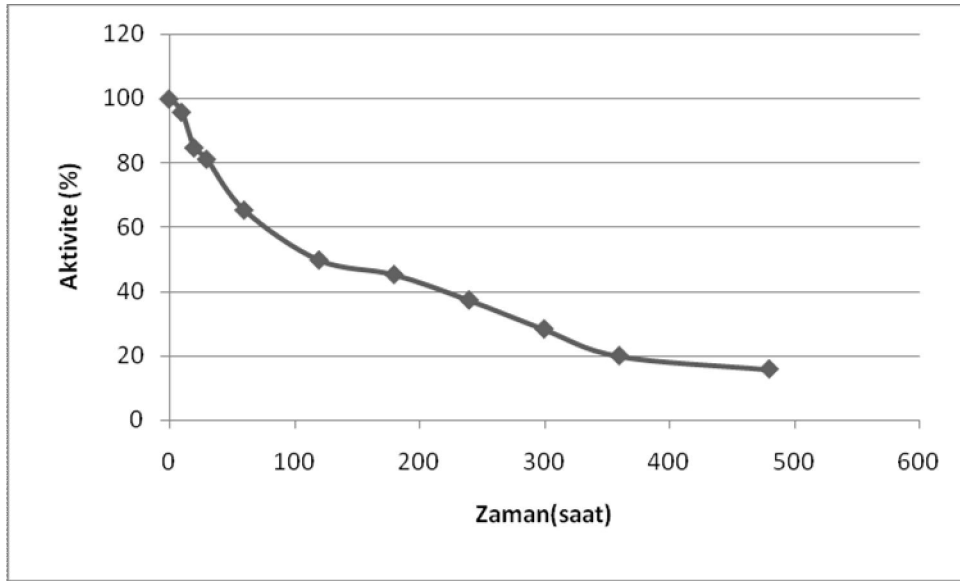
Şekil 18. KI H99E mutantının glukoz izomeraz aktivitesine ait pH'nın etkisi



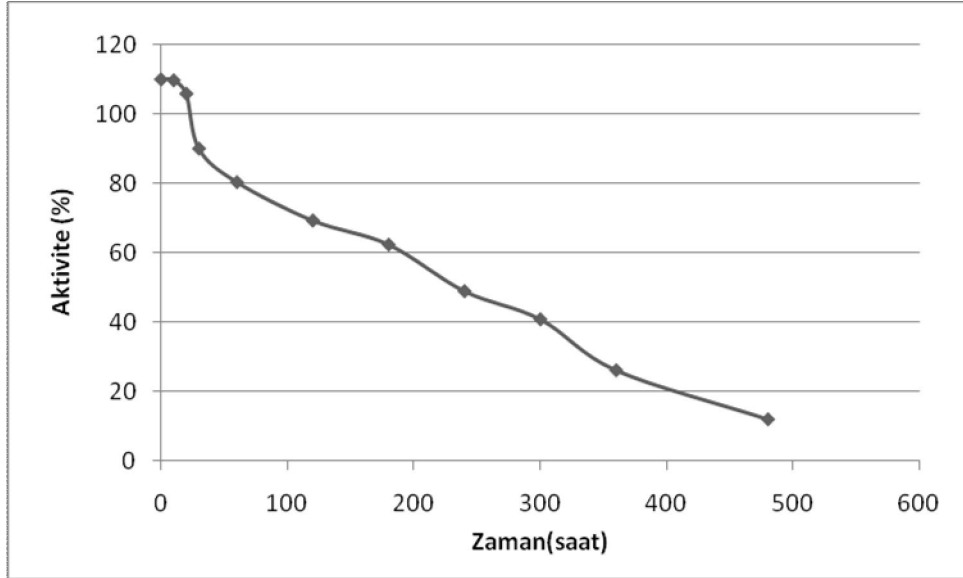
Şekil 19. Yaban tip enzimin glukoz izomeraz aktivitesine ait pH'nın etkisi [36]

### 3.1.4.4. Isıl Kararlılık

KI H99E mutantının ısıl kararlılığını belirlemek için saflaştırılan enzim özütü 85 °C’de inkübe edildi. Çeşitli zamanlarda örnekler alınarak, optimum çalışma şartlarında aktivite ölçümü yapıldı ve enzimin kalan aktivitesi hesaplandı. 85°C’lik uygulamada mutant tip enzimin yaban tip enzimdekine nazaran ısıl kararlılığında düşüş gözlenmiştir. KI H99E mutantının glukoz izomeraz aktivitesinin ısıl kararlılığının yarısı 2 saatte kaybettiği belirlendi. Aynı enzimin ksiloz izomeraz aktivitesinin yarısını 3,5–4 saat sonunda kaybettiği belirlendi. Ksiloz izomeraz aktivitesi bakımından ısıl kararlılığındaki düşüşün çok fazla olduğu yani KI H99E mutasyonun enzimin 85°C’de ısıl kararlılığının önemli ölçüde azalmasına neden olduğu gözlemlendi.



**Şekil 20.** KI H99E mutasyonunun glukoz izomeraz aktivitesinin sıcaklık kararlılığı üzerine etkisi

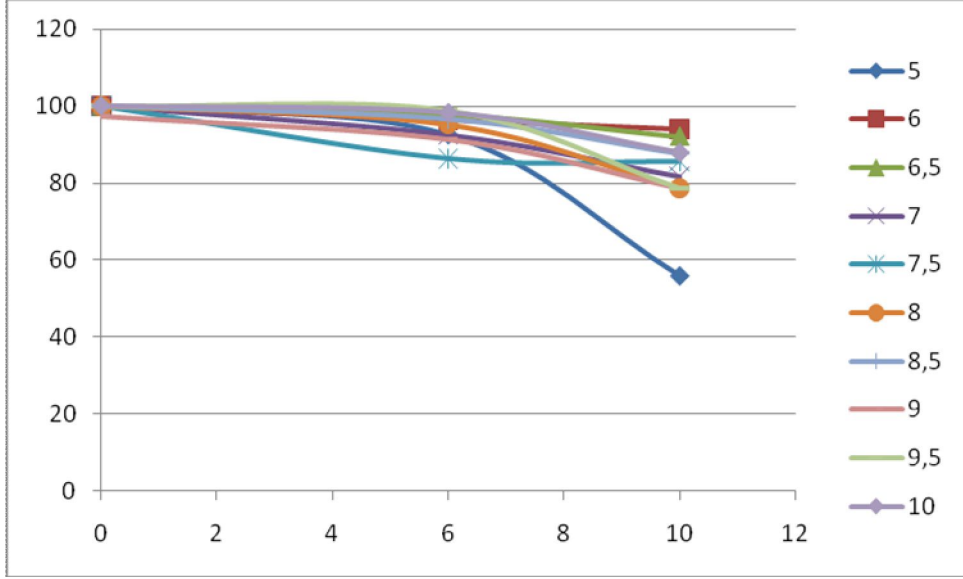


**Şekil 21.** KI H99E mutasyonunun ksiloz izomeraz aktivitesinin sıcaklık kararlılığı üzerine etkisi

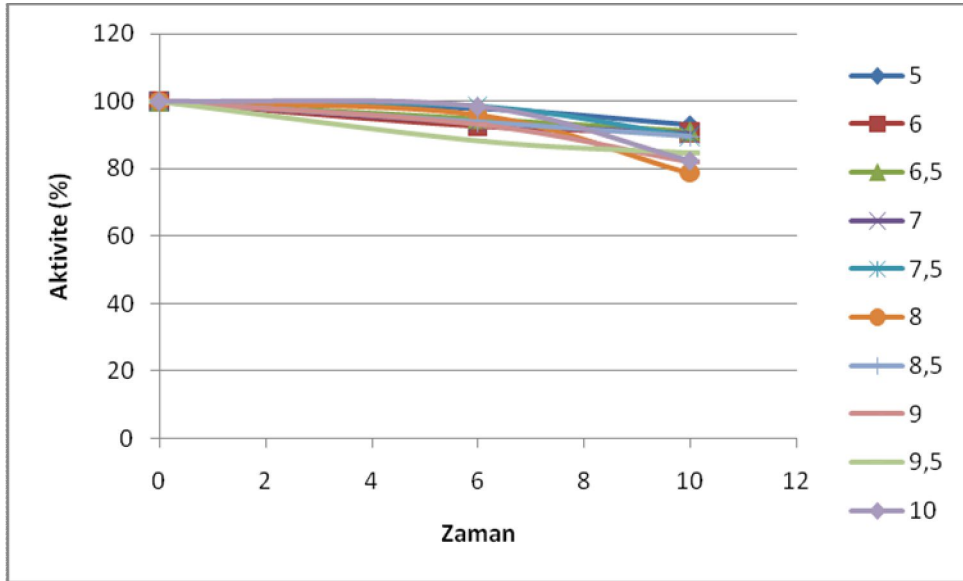
#### 3.1.4.5. pH Kararlılığı

KI H99E mutantının pH kararlılığını belirlemek için saf enzim özütü, 1 mM MnSO<sub>4</sub> içeren pH'sı 5,0-5,5 olan 50 mM asetat tamponu; pH'sı 6,0-6,5 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 enzimlerden örnekler alınarak optimum çalışma şartlarında aktivite ölçümü yapıldı ve enzimin kalan aktivitesi hesaplandı. İlk anda alınan aktivite ölçümü % 100 kabul edildi. Yapılan aktivite denemeleri sonucunda GI ve KI aktivitelerinin pH 6 ve 6,5 'da yaban tip enzimdeki gibi kararlı olduğu belirlendi. Mutasyonun GI ve KI aktivitelerinin pH kararlılığı üzerinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı gözlemlendi.





**Şekil 22.** KI H99E mutantının GI aktivitesinin pH kararlılığı değişim grafiği



**Şekil 23.** KI H99E mutantının KI aktivitesinin pH kararlılığı değişim grafiği

#### 4.TARTIŞMA

Daha önce KTÜ Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji laboratuvarında *A.gonensis XylA* geni pET28a+ ekspresyon vektörüne klonlanan ve genin 99. Amino asitini (histidin) kodlayan bazlar değiştirilerek glutamik asitli enzim üreten klonlar yapılmıştı. Bu mutant geni içeren pET28a+ *E.coli* BL21(DE3) hücelerine aktarılıp ekspreslenerek mutant KI enzimi ( KI H99E) saflaştırıldı [36].

Bu tez kapsamında ise KI H99E mutant enzimi saflaştırıldı, bu enzimin glukoz izomeraz ve ksiloz izomeraz aktiviteleri karakterize edilerek, yaban tip enzimle karşılaştırıldı. Burada amaç yapılan H99E mutasyonu yaparak enzimin endüstriyel uygulamalarda arzu edilen; glukoz ve ksiloz için düşük  $K_m$  değerine sahip olma, düşük pH değerlerinde ve yüksek sıcaklıklarda yüksek aktivite ile çalışabilme ve yüksek ısı ve pH kararlılığı gibi biyokimyasal özelliklere sahip olmasını sağlamaktır. H99E mutasyonun glukoz izomeraz ve ksiloz izomeraz aktivitesinin karakteristik özelliklerini önemli derecede ancak olumsuz yönde değiştirdiği belirlendi. Örneğin yaban tip enzimin ksiloz izomeraz aktivitesine ait  $K_m$  değeri  $25 \pm 2$  mM iken mutant tip enzimin ksiloz izomeraz aktivitesine ait  $K_m$  değeri  $31,88 \pm 10$  mM olarak saptandı. Buna göre  $K_m$  değerinde yaklaşık 1,2 kat artış görüldü. Yine yaban tip enzimin glukoz izomeraz aktivitesine ait  $K_m$  değeri  $100,27 \pm 10$  mM iken mutant tip enzimin glukoz aktivitesine ait  $K_m$  değeri  $589,97 \pm 10$  mM olarak saptandı. Buna göre  $K_m$  değerinde yaklaşık 5,8 kat bir artış görüldü. Ayrıca  $V_{max}$  değerleride değişti. Yaban tip enzimin ksiloz izomeraz aktivitesine ait  $V_{max}$  değeri  $25,73 \pm 2$   $\mu\text{mol/dk/mg}$  iken mutant tip enzimin ksiloz izomeraz aktivitesine ait  $V_{max}$  değeri  $6,52 \pm 2$   $\mu\text{mol/dk/mg}$  olarak saptandı. Buna göre ksiloz izomeraz aktivitesine ait  $V_{max}$  değerinde yaklaşık 3,9 kat düşüş gözlemlendi. Yine yaban tip enzimin glukoz izomeraz aktivitesine ait  $V_{max}$  değeri  $21,71 \pm 2$   $\mu\text{mol/dk/mg}$  iken mutant tip enzimin glukoz aktivitesine ait  $V_{max}$  değeri  $5,92 \pm 2$   $\mu\text{mol/dk/mg}$  olarak saptandı. Buna göre glukoz izomeraz aktivitesine ait  $V_{max}$  değerinde yaklaşık 1,6 kat düşüş gözlemlendi. Mutant enzimlerin aktivitesinin optimum sıcaklığı  $85^\circ\text{C}$  olarak saptandı. Optimum pH'ları da değişmedi ve 6,5 olarak ölçüldü. KI H99E mutantının glukoz izomeraz aktivitesinin ısı kararlılığının yarısını 2 saat sonunda kaybettiği belirlendi. Mutant tip enzimin ksiloz izomeraz aktivitesinin ısı kararlılığının yarısını 3,5 – 4 saat sonunda kaybettiği belirlendi. Yaban tip enzime nazaran mutant enzimin ksiloz izomeraz aktivitesinin ısı kararlılığındaki düşüşün çok fazla olduğu gözlemlendi. Literatürde yapılan incelemelerde benzer şekilde His 271'deki bir

mutasyonun KI'nın ısı kararlılığında düşüşe neden olduğu belirtildi. Bunun nedeni bu bölgenin enzimin aktif bölgesindeki metal iyonlarından biri için ligand görevi görmesi olduğu belirtildi. Buna rağmen mutasyon enzimin yapısında önemli bir değişikliğe neden olmadı [34]. Aslında bugüne kadar KI kararlılığında metal bağlanma bölgelerinin önemi ayrıntılı bir şekilde araştırılmamıştır [24]. Fakat bu konuya ilişkin bazı yaklaşımlar öne sürülmüştür. Örneğin site-directed mutasyonlar metal bağlanma bölgelerini doldururlar. Böylece M1 ve M2 bölgelerinin yapısını bozarlar [27]. *Streptomyces rubiginosus* KI'ndaki His220 mutasyonu M2 bölgesini etkilemiştir. Benzer bir durumda *E.coli* KI'nda gözlenmiştir. His271 (M2'ye bağlı) mutasyonu enzimin yapısını önemli derecede bozmuştur [34]. Diğer nokta mutasyonları aktif bölgedeki monomerlerdeki konformasyonel değişimi tetikliyor ve böylece KI'ların yapılarının bozulmasını sağlıyor [35]. Metal iyonları büyük ihtimalle enzimin kararlı yapısındaki aktif bölgeyi kapatmada rol oynuyor, metal iyonlarının eksikliğinde de kararlı yapı bozuluyor. H99E mutasyonu sonucu enzimin ısı kararlılığındaki düşüşün metal bağlanma bölgesindeki konformasyonel değişime bağlı olduğu söylenebilir ve bu durum mutasyonun enzimin aktif bölgesinde yapıldığına dair bir kanıt olabilir. Yapılan araştırmada *Cha et al.(1994)* [27] *Streptomyces rubiginosus* KI'nın His219 rezidüsünde enzimin ısı kararlılığı ve aktivitesinin araştırılması amacıyla site-directed mutasyon yaptı. Bu rezidü tüm KI'larda korunmuştur. Enzimin üç boyutlu yapısı üzerinde yapılan çalışmalar His219'un enzimin aktif bölgesindeki M2'nin oktahedral koordinasyonun bir parçası olduğunu gösterdi. His219'un Ser, Glu ve Asn ile yaptığı süstitüsyonlarda  $K_m$  değerleri 30–50 kat arttı. Yine Meng et al. , (1990) aktif bölge çalışmalarına [29] *Thermoanaerobacterium thrmosulfirigenes* KI'nda site-directed mutasyon yaptı. Substrat bağlanma bölgesini yeniden dizayn ederek enzimin substrat tercihi ksilozdan glukozla değiştirdi. *Arthrobacter* KI'da ise altı karbonlu yarışmacı inhibitöre sahip enzimin yapısı incelendi. Buna göre hidroksimetil grubunun substrat bağlanma bölgesine karşı yerleşmiş olduğu görüldü. Bu bölgeler aynı zamanda Met87, Thr89 ve Val184 rezidülerine komşudur. Bu rezidülerin KI'larda oldukça korunmuş olduğu ve TTKI'daki Trp138, Thr140 ve Val185 ile uyduğu gözlenmiştir. Bu nedenle Trp138'in Phe ile yer değişimi glukoz için yüksek katalitik aktiviteye sahip bir enzim üretir. Ayrıca ksiloz için  $K_m$  değerini yükseltir ve enzimin katalitik aktivitesini azaltır. Buna göre H99E mutasyonun enzimin aktif bölgesinde olduğu görülmektedir. Ancak enzimin metal bağlanma bölgelerinden birinde veya ikisinde konformasyonel değişime neden olduğundan dolayı enzimin yaban tipe nazaran ısı kararlılığı önemli derecede düştü,  $K_m$  değeri arttı ve  $V_{max}$  değeri düştü..

Mutant tip enzimde pH kararlılığı açısından GI ve KI aktivitelerinin pH 6 ve 6,5'da kararlılığını koruduğu gözlemlendi. Mutasyonun GI ve KI aktivitelerinin pH kararlılığı üzerinde etki göstermediği gözlemlendi.

Bu çalışma H99E mutasyonun ve bu mutasyonun karakterlerinin ortaya çıkarılması açısından başarılı olmuştur

## 5.SONUÇLAR

*A. gonensis XylA* geninin pET28a+ ekspresyon vektörüne aktararak HisTag içermeyecek şekilde klonlandı ve pETG2 G1 H99 olarak adlandırıldı. Daha sonra *E. coli* BL21 hücrelerine aktararak ekspresyonu sağlandı. His99E mutant enzimi mutasyonun enzimin glukoz izomeraz ve ksiloz izomeraz aktiviteleri üzerine etkisinin araştırılması amacıyla saflaştırıldı. Daha önce yaban tip enzimin glukoz izomeraz aktivitesinin  $K_m$ 'si  $100,27 \pm 10$  mM ve  $V_{max}$  değeri  $21,71 \mu\text{mol/dk/mg}$  [36], ksiloz izomeraz aktivitesinin  $K_m$  değeri  $25 \pm 2$  mM ve  $V_{max}$  değeri  $25,73 \mu\text{mol/dk/mg}$  [37] olarak bulunmuştu. Yapılan karakterizasyon çalışmalarında mutant tip enzimin ksiloz izomeraz aktivitesine ait  $K_m$  değeri  $31,88 \pm 10$  mM,  $V_{max}$  değeri  $6,52 \pm 2 \mu\text{mol/dk/mg}$  ve glukoz izomeraz aktivitesi için  $K_m$  değeri  $589,97 \pm 10$  mM,  $V_{max}$  değeri  $5,92 \mu\text{mol/dk/mg}$  olarak belirlendi. Mutant enzimin glukoz ve ksiloz izomeraz aktivitesinin optimum pH'ları 6,5 olarak ölçüldü. Yine mutant enzimin glukoz ve ksiloz izomeraz aktivitesinin optimum sıcaklıkları  $85^\circ\text{C}$  olarak saptandı. Yapılan ısı kararlılığı çalışmalarında KI H99E mutasyonunun enzimin 2 saat sonunda glukoz izomeraz aktivitesinin yarısını kaybettiği belirlendi. KI H99E mutasyonun enzimin ksiloz izomeraz aktivitesini ise 3,5-4 saat sonunda yarıya indirdiği belirlendi. KI H99E mutasyonunun pH kararlılığı açısından GI ve KI aktivitelerine bakıldığında, pH 6 ve 6,5'da kararlılığını koruduğu gözlemlendi. KI H99E mutasyonun enzimin pH kararlılığı üzerinde etki göstermediği gözlemlendi.

## 6.ÖNERİLER

Bu çalışma kapsamında enzimin ısıl kararlılığının azalmasındaki neden araştırılmalıdır.  $K_m$  değerlerindeki artışın ve  $V_{max}$  değerlerindeki azalışın sebebi daha ayrıntılı araştırılabilir. Yine KI H99E mutasyonunun substrat spesifikliği, metal iyon ihtiyacı ve inhibitörleri araştırılmalıdır.

## 7.KAYNAKLAR

1. Demirsoy, Ali. Enzimlerin Yapısı ve İşleyişi,
2. Chen, W.P. Glucose Isomerase. Process Biochemistry, june/july 1-5 august/september (1980) 5-11.
3. Scallet, B. L, Shieh, K. Ehrental, I.ve Slepshak, L. Studies in the isomerization of D-glucose. Die starke,26 (1994) 405–408.
4. Sanchez, S. ve Smiley, K.L. Properties of D-xylose isomerase from *Streptomyces albus*. AppliedMicrobiology,29,6 (1975) 745-750
5. Park, Y.K. ve Thoma, M. Some interrelation between microbial xylanase and glucose isomerase production. Journal Applied Microbiology, 20 (1974) 67-69
6. Chen,W.P., Anderson,A.W. ve Han,Y. WProduction of glucose isomerase by *Streptomyces flavogriseus*. Applied and Environmental Microbiology,37,2 (1979) 324-331
7. Takazaki, Y. Japanese Patent,73 (1973) 49–951.
8. Chou, C. C., M,R. ve Tsao,G.T. Studies on glucose isomerase from a *Streptomyces sp.* App.Environment Microbial.32,4 (1976) 489-493
9. Tsamura, N., Hagi, M. ve Sato, T. Enzymatic conversion of D-glucose to D-fructose; II.Properties of the enzyme from *S.phaeochromonogenes*. (1965)
10. Aschengen, N. Production of glucose/fructose syrup. Process Biochem.10,4 (1975) 17-23.
11. Gong, C. S., Chen,L. ve Tsao, G. T. Purification and properties of glucose isomerase of *A.missouriensis*. Biotechnology and Bioengineering.12 (1980) 833-845
12. Takazaki, Y., Yosugi, K. ve Kanbayashi, A. Glucose isomerase ,In Perlman (ed) fermentation advances. Acemic.Press.Inc.New York, (1969) 561-570.
13. Han, Y. W., Lee, J. S. ve Anderson, A. W. Chemical composition and digestibility of ryegass srtaw. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 23 (1975) 928-931
14. Sağlam, N. Fungus kökenli glukoz izomeraz enzimi izerine çalışmalar. Bilim uzmanlığı tezi, Hacettepe Üniversitesi, G.Biyoloji Bilim Dalı-Ocak (1982)
15. Bhosale, S. H., Rao, M. B. ve Deshpande, V. V. Molecular and Industrial Aspects Of Glucose İsomerase, Microbiol. Rev, 60 (1996) 280-300.

16. Vangrype, W., Callens, M., Kersters-Hilderson, H. ve De bruyne, C.K. Evidence for an essential histidine residue in D-xylose isomerases. Biochem.J. 250 (1988) 153-160.
17. Whitlow, M., Howard, A. C., Finzel, B. C. Poulos, T. L., Winborne, E. ve Gilliland, G. L. A metal mediated hydride shift mechanism for xylose isomerase based on the 1,6A' Streptomyces rubiginous structures with xylitol and D-xylose. Protein 9 (1991) 153-173.
18. Allen, K. N., Lavie, A., Glasfeld, A., Tanada, T. N., Gerrity, D. P., Carlson, S. C., Farber, G. K., Petsko, G. A. ve Ringe, D. Isotopic exchange plus substrate and inhibitor kinetics of D-xylose isomerase do not support a protein-transfer mechanism. Biochemistry 33 (1994) 1481-1487.
- Jenkins, J., Janin, J., Rey, F., Chiadmi, M., Van Tilbeurgh, H., Lasters, I., DeMaeyer, M., VanBelle, D., Wodak, S., Lauwereys, M., Stanssens, P., Mrabet, N. T., Snauwaert, J., Matthyssens, G. ve Lambeir, G. A. Protein engineering of xylose (glucose) isomerase from *Actinoplanes missouriensis*. 1. Crystallography and site directed mutagenesis of metal binding sites. Biochemistry 31 (1992) 5449-5458
19. Lehmbacher, A. ve Bisswanger, H. Isolation And Characterization Of An Extremely Thermostable D-Xylose Isomerase From *Thermus Aquaticus* Hb8, J. Gen. Microbiol. 136 (1990) 679-686.
20. Marg, G. A. ve Clark, D. S. Activation of the glucose isomerase by divalent cations; evidence for two distinct binding sites. Enzyme Microb. Technol. 12 (1990) 367-373
21. Farber, G. K., Glasfeld, A., Tiraby, G., Ringe, D. ve Petsko, G. A. Crystallographic studies of the mechanism of xylose isomerase. Biochemistry 28 (1989) 7289-7297.
- Collyer, C. A., Henrick, K. ve Blow, D. M. Mechanism for aldose-ketose interconversion by D-xylose isomerase involving ring opening followed by a 1,2-hydride shift. J. Mol. Biol. 212 (1990) 211-235
22. Lee, C., Bagdasarian, M., Meng, M. ve Zeikus, J. G. Catalytic mechanism of xylose (glucose) isomerase from *Clostridium thermosulfurogenes*. J. Biol. Chem. 265 (1990a) 19082-19090
23. Farber, G. K., Glasfeld, A., Tiraby, G., Ringe, D. ve Petsko, G. A. Crystallographic studies of the mechanism of xylose isomerase. Biochemistry 28 (1989) 7289-7297.
- Collyer, C. A., Henrick, K. ve Blow, D. M. Mechanism for aldose-ketose interconversion by D-xylose isomerase involving ring opening followed by a 1,2-hydride shift. J. Mol. Biol. 212 (1990) 211-235
- Lee, C., Bagdasarian, M., Meng, M. ve Zeikus, J. G. Catalytic mechanism of xylose (glucose) isomerase from *Clostridium thermosulfurogenes*. J. Biol. Chem. 265 (1990a) 19082-19090



24. Vieille, C. ve Zeikus, J. G. Thermozyms: identifying molecular determinants of protein structural and functional stability. Trends Biotechnol. 14 (1996) 183-190
- Vieille, C. ve Zeikus, J. G. Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 65 (2001) 1-43
25. Collyer, C. A., Henrick, K. ve Blow, D.M. Mechanism for aldose-ketose interconversion by D-xylose isomerase involving ring opening followed by a 1,2-hydride shift. J. Mol. Biol. 212 (1990) 211-235
- Whitlow, M., Howard, A. C., Finzel, B. C. Poulos, T.L., Winborne, E. ve Gilliland, G. L. A metal mediated hydride shift mechanism for xylose isomerase based on the 1,6A Streptomyces rubiginosus structures with xylitol and D-xylose. Protein 9 (1991) 153-173.
26. Meng, M., Bagdasarian, M. ve Zeikus, J.G. Thermal stabilization of xylose isomerase from Thermoanaerobacterium thermosulfirigenes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 8459-8463.
27. Cha, J., Cho, Y., Whitaker, R.D., Carrel, H. L., Glusker, J.P., Karplus, P.A. ve Batt, C. A. Perturbing the metal site of His-220 on enzyme stability. J. Biol. Chem. 269 (1994) 2687-2694.
- Meng et al. 1990
28. Hartley, B. S., Hanlon, N., Jackson, R.J. ve Rangarajan, M. Glucose isomerase: insights into protein engineering for increased thermostability. Biochim. Biophys. Acta. 1543 (2000) 294-335
29. Genetic Engineering of xylose isomerase thermozyms for enhanced activity, stability and utility by Dinlaka Sriprapundh, 2002.
30. Belduz, A. O., Dulger, S. ve Demirbag, Z., *Anoxybacillus gonensis* sp. Nov., a moderately thermophilic, xylose-utilizing, endospore-forming bacterium, International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 53 2003 1315-1320
31. Karaoğlu, H., *Anoxybacillus gonensis* Glukoz (D-Ksiloz) izomeraz Geninin Klonlanması, İzolasyonu ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 2004.
32. Dische, Z. ve Borenfreund, E. A New Spectrophotometric Method for The Detection and Determination of Ketosugars and Trioses. J. Biol. Chem., 192, (1951) 583-587.
33. Bradford ve Arkadaşları, 1976.
34. Batt, C. A., Jamieson, A. C. ve Vandeyar, M. A. Identification of essential histidine residues in the active site of Escherichia coli xylose (glucose) isomerase, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990) 618-622.

35. Varsani, L., Cui, T., Rangarajan, M., Hartley, B. S., Goldberg, J., Collyer, C. ve Blow, D. M. *Arthrobacter* D-xylose isomerase: protein-engineered subunit interfaces. Biochem.J. 291 (1993) 575-583.
36. Karaoğlu, H. ve Belduz, A.O., Yayınlanmamış Veri. TRABZON: Karadeniz Teknik Üniversitesi, 2007.
37. Yanmış, Derya., *Anoxybacillus gonensis* G2<sup>T</sup> bakterisinde ksiloz izomeraz (=Glukoz izomeraz) enziminin (*AgoG2KI*) klonlanması, saflaştırılması ve karakterizasyonu konulu Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 2008.

## **ÖZGEÇMİŞ**

28.03.1982 tarihinde İstanbul'un Üsküdar ilçesinde doğdu. İlkokul ve ortaokulu İstanbul Çakmak İlköğretim Okulu'nda, liseyi İstanbul Halide Edip Adivar Lisesi'nde okudu. 2000–2004 yılları arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde öğrenim gördü. 2004 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı. Yabancı dili İngilizcedir.