

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**W137F/V184S ve W137F/V184T ÇİFT MUTANT *Anoxybacillus gonensis* G2  
KSİLOZ İZOMERAZININ SAFLAŞTIRILMASI ve KARAKTERİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Zümrüt ÖZTEKİN**

**AĞUSTOS 2012**  
**TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**W137F/V184S ve W137F/V184T ÇİFT MUTANT *Anoxybacillus gonensis* G2  
KSİLOZ İZOMERAZININ SAFLAŞTIRILMASI ve KARAKTERİZASYONU**

**Zümrüt ÖZTEKİN**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde  
“YÜKSEK LİSANS (BİYOLOJİ)”  
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 16.07.2012  
Tezin Savunma Tarihi : 13.08.2012**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ**

**Trabzon 2012**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Biyoloji Anabilim Dalında**

**Zümrüt ÖZTEKİN tarafından hazırlanan**

***Anoxybacillus gonensis* G2 ÇİFT MUTANT W137F/V184S ve W137F/V184T  
KSİLOZ İZOMERAZLARININ SAFLAŞTIRILMASI ve KARAKTERİZASYONU**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 24/07/2012 gün ve 1455 sayılı  
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

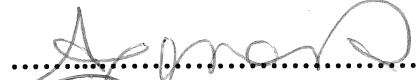
**olarak kabul edilmiştir.**

**Jüri Üyeleri**

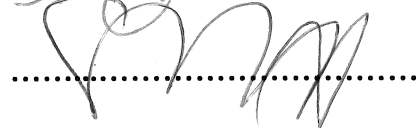
**Başkan : Prof. Dr. Eşref Edip KEHA**



**Üye : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ**



**Üye : Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI**



**Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ**

**Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ

*Anoxybacillus gonensis* G2 ksiloz izomerazının W137F/V184S ve W137F/V184T çift mutasyonları ile biyokimyasal özelliklerinin ve kinetik parametrelerinin değiştirilmesini içeren bu araştırma, 2009 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Çalışmanın sürdürülebilmesi ve başarıyla sonuçlanabilmesi için maddi destek sağlayan K.T.Ü. Rektörlüğü'ne ve Bilimsel Araştırmalar Projeleri Başkanlığı'na; yüksek lisans tezimin konusunun seçiminde, çalışmaların her basamağında, verilerin değerlendirilmesi ve yorumlanmasında, çalışmanın sonuçlanmasında değerli yorumları ile yol gösteren hocam Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ'e; çalışmanın her aşamasında değerli önerilerini ve yorumlarını esirgemeyen hocam Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI'ya teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Çalışmanın laboratuvar ve deney aşamalarında her an yanımda olan ve beni engin bilgisi ve tecrübesiyle yönlendiren, bana çalışmalar esnasında her zaman destek olan hocam Yrd. Doç. Dr. Hakan KARAOĞLU'na, çalışmanın her aşamasında yardımını esirgemeyen Arş. Gör. Fulya AY ŞAL'a yardımlarından ötürü çok teşekkür ederim. Başta Yrd. Doç. Dr. Kadriye İnan ve Arş. Gör. Dilşat Nigar ÇOLAK olmak üzere tüm Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'nda çalışmış ve halen çalışmakta olan bütün laboratuvar arkadaşlarıma her türlü destekleri için çok teşekkür ederim.

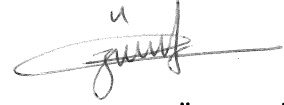
Ayrıca hayatım boyunca bana maddi ve manevi destek olan, her zaman beni dinleyip yüreklendiren, bana cesaret veren, tüm zorluklara rağmen güçlü olmayı öğreten sevgili aileme sonsuz teşekkürler. Son olarak tüm sevdiklerime ve uzakta olsalar bile yürekleri hep benimle olan herkese çok teşekkür ederim.

Zümrüt ÖZTEKİN

Trabzon, 2012

## TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Anoxybacillus gonensis* G2 Çift Mutant W137F/V184S ve W137F/V184T Ksiloz İzomerazlarının Safılaştırılması ve Karakterizasyonu” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ ‘ün sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.  
16/07/2012



Zümrüt ÖZTEKİN

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa No</b>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET .....	VIII
SUMMARY .....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XII
SEMBOLLER DİZİNİ .....	XIII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş .....	1
1.2. Ksiloz İzomeraz Elde Edilebilen Organizmalar .....	4
1.3. Ksiloz İzomeraz Enziminin Önemi .....	6
1.3.1. HFCS Üretimindeki Önemi .....	6
1.3.2. Etanol Üretimindeki Önemi.....	7
1.4. KI Üretimi.....	8
1.4.1. Enzimin Verimliliğinin Arttırılması .....	8
1.4.2. Fermentasyon Ortamının Optimum Hale Getirilmesi .....	9
1.4.2.1. pH ve Sıcaklık Optimizasyonu .....	9
1.4.2.2. Metal İyon Gereksinimi .....	9
1.4.2.3. Ksiloz İzomeraz Enziminin Üretilmesini Arttıran İndükleyici Ajanlar .....	10
1.4.2.4. Azot Kaynağı .....	11
1.4.3. Ksiloz İzomeraz Enziminin Saflaştırılması .....	11
1.4.4. Ksiloz İzomerazın İmmobilizasyonu .....	12
1.5. Ksiloz İzomeraz'ın Özellikleri .....	12
1.5.1. Optimum pH ve Sıcaklık .....	13
1.5.2. Metal İyon İhtiyacı ve İnhibitörleri .....	13
1.5.3. Substrat Özgünlüğü .....	13
1.5.4. Aktif-Bölge Çalışmaları.....	14
1.5.5. Alt Ünite Yapısı.....	14
1.6. KI'nın Çalışma Mekanizması .....	15
1.7. Ksiloz İzomeraz Enziminin Genetik Mühendisliği .....	16

1.7.1.	Isıl Kararlılık Mutasyonları .....	17
1.7.2.	Aktif Bölge Mutasyonları .....	18
1.8.	<i>Anoxybacillus gonensis</i> G2 <sup>T</sup> Ksiloz İzomeraz Çalışmaları .....	18
1.9.	Genin Klonlanması ve Mutasyon Çalışmaları .....	18
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	21
2.1.	Kullanılan Materyal ve Kimyasallar.....	21
2.2.	Tamponların Hazırlanması .....	21
2.3.	Gen Ürününün Elde Edilmesi ve Saflaştırılması .....	22
2.3.1.	Mutant Enzimlerin Üretilmesi .....	22
2.3.2.	Ham Hücre Ekstratının Elde Edilmesi.....	23
2.3.3.	W137F/V184S ve W137F/V184T Çifte Mutant KI'ların Saflaştırılması .....	23
2.3.3.1.	Isı Şoku Uygulaması.....	23
2.3.3.2.	İyon Değişim Kromatografisi .....	24
2.3.3.3.	Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi.....	24
2.3.3.4.	Metal İyonlarının Uzaklaştırılması .....	25
2.4.	Biyokimyasal Çalışmalar .....	26
2.4.1.	Protein Konsantrasyonu Tayini .....	26
2.4.2.	Ksiloz İzomeraz Aktivite Deneyi .....	26
2.5.	Mutant Enzimlerin Karakterizasyonu.....	27
2.5.1.	Reaksiyonlarda Kullanılacak Enzim Miktarının Belirlenmesi .....	27
2.5.2.	Enzim Kinetiği.....	28
2.5.3.	Optimum Sıcaklık.....	28
2.5.4.	Optimum pH .....	29
2.5.5.	Mutasyonların Isıl Kararlılığı Üzerine Etkisi .....	29
2.5.6.	Mutasyonların pH Kararlılığı Üzerine Etkisi .....	29
2.5.7.	Aktivatör Etkisi.....	30
2.5.8.	İnhibitör Etkisi .....	30
2.6.	SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	30
3.	BULGULAR.....	31
3.1.	KI W137F/V184S ve KI W137F/V184T'nin Saflaştırılması.....	31
3.1.1.	Hücre Özütü Elde Edilmesi ve Isı Şoku Uygulamaları .....	31
3.1.2.	İyon Değişimi Kolon Kromatografisi .....	31
3.1.3.	Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi.....	31
3.2.	KI W137F/V184S ve KI W137F/V184T'nin Karakterizasyonu.....	33

3.2.1.	Deneylerde Kullanılacak Enzim Miktarının Belirlenmesi .....	33
3.2.2.	Enzim Kinetiği.....	33
3.2.2.1.	KI W137F/V184S'nin Enzim Kinetiği.....	33
3.2.3.	Optimum Sıcaklık.....	35
3.2.3.1.	KI W137F/V184S'nin Optimum Sıcaklığı.....	35
3.2.3.2.	KI W137F/V184T'nin Optimum Sıcaklığı.....	36
3.2.4.	Optimum pH .....	37
3.2.4.1.	KI W137F/V184S'nin Optimum pH'sı .....	37
3.2.4.2.	KI W137F/V184T'nin Optimum pH'sı .....	37
3.2.5.	Mutasyonların Isıl Kararlılığı Üzerine Etkisi .....	38
3.2.5.1.	KI W137F/V184S'nin Isıl Kararlılığı.....	38
3.2.5.2.	KI W137F/V184T'nin Isıl Kararlılığı .....	39
3.2.6.	Mutasyonların pH Kararlılığı Üzerine Etkisi .....	39
3.2.6.1.	KI W137F/V184S'nin pH Kararlılığı.....	39
3.2.6.2.	KI W137F/V184T'nin pH Kararlılığı.....	40
3.2.7.	Aktivatör Etkisi.....	41
3.2.7.1.	Aktivatörlerin KI W137F/V184S Üzerine Etkisi .....	41
3.2.7.2.	Aktivatörlerin KI W137F/V184T Üzerine Etkisi .....	42
3.2.8.	İnhibitör Etkisi .....	43
3.2.8.1.	İnhibitörlerin KI W137F/V184S Üzerine Etkisi .....	43
3.2.8.2.	İnhibitörlerin KI W137F/V184T Üzerine Etkisi .....	44
4.	TARTIŞMA.....	45
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	52
6.	KAYNAKLAR .....	53
7.	EKLER .....	60

ÖZGEÇMİŞ



## Yüksek Lisans Tezi

### ÖZET

#### *Anoxybacillus gonensis* G2 ÇİFT MUTANT W137F/V184S ve W137F/V184T KSİLOZ İZOMERAZLARININ SAFLAŞTIRILMASI ve KARAKTERİZASYONU

#### Zümrüt ÖZTEKİN

Karadeniz Teknik Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ  
2012, 59 Sayfa, 1 Sayfa Ek

Bu çalışma, Gönen Kaplıcası'ndan izole edilmiş olan termofilik *A. gonensis* G2 suşuna ait Ksiloz İzomeraz (KI) W137F/V184S ve KI W137F/V184T çift mutasyonlu enzimlerin saflaştırılmasını ve karakterizasyonunu kapsamaktadır. KI W137F/V184S için;  $K_m = 91,13 \pm 10,54$  mM;  $V_{max} = 31,71 \pm 1,1$   $\mu\text{mol/dk/mg}$  protein;  $K_{cat}/K_m = 1,161$  olarak bulundu. KI W137F/V184T için ise;  $K_m = 25,94 \pm 3,73$  mM;  $V_{max} = 7,66 \pm 0,37$   $\mu\text{mol/dk/mg}$  protein;  $K_{cat}/K_m = 0,985$  olarak hesaplandı. KI W137F/V184S ve KI W137F/V184T için optimum sıcaklık 85°C, optimum pH 7,5 olarak belirlendi. KI W137F/V184S 70°C'de yarım saatten sonra aktivitesini hızlı bir şekilde kaybetmiştir. KI W137F/V184T ise aktivitesinin yarısını 80°C'de yarım saatte kaybetmiştir. KI W137F/V184S'nin en iyi pH 8'de kararlı kaldığı, KI W137F/V184T'nin ise, yüksek pH değerlerinde (pH 8 - 9,5) kararlı kaldığı görüldü. KI W137F/V184S'nin en yüksek aktivitesi 10 mM  $\text{Mg}^{+2}$  varlığında gözlemlendi. KI W137F/V184T'nin ise, en yüksek aktivitesi 10 mM  $\text{Mn}^{+2}$  varlığında gözlemlendi.  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Hg}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$  ve  $\text{Cu}^{+2}$  bivalent metal iyonlarının her iki mutant KI üzerinde inhibitör etki gösterdiği belirlendi.

**Anahtar Kelimeler:** *Anoxybacillus gonensis*, D-ksiloz izomeraz, mutasyon, enzim saflaştırması, enzim karakterizasyonu

Master Thesis

SUMMARY

PURIFICATION and CHARACTERIZATION of W137F/V184S and W137F/V184T  
DOUBLE MUTANT of *Anoxybacillus gonensis* G2 XYLOSE ISOMERASE

Zümrüt ÖZTEKİN

Karadeniz Technical University  
The Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Biology Graduate Program  
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ  
2012, 59 Pages, 1 Pages Appendix

This study includes purification and characterization of Xylose Isomerase (XI) of *Anoxybacillus gonensis* G2 with double mutations (W137F/V184S and W137F/V184T). For XI W137F/V184S,  $K_m$ ,  $V_{max}$  and  $K_{cat}/K_m$  values were calculated as  $K_m = 91,13 \pm 10,54$  mM;  $V_{max} = 31,71 \pm 1,1$   $\mu\text{mol}/\text{dk}/\text{mg}$  protein;  $K_{cat}/K_m = 1,161$ . Also for XI W137F/V184T,  $K_m$ ,  $V_{max}$  and  $K_{cat}/K_m$  values were calculated as  $K_m = 25,94 \pm 3,73$  mM;  $V_{max} = 7,66 \pm 0,37$   $\mu\text{mol}/\text{dk}/\text{mg}$  protein;  $K_{cat}/K_m = 0,985$ . The optimum temperature and optimum pH for both mutant XI were determined as 85°C and pH 7,5 respectively. At 70°C, after 30 minutes XI W137F/V184S lost its activity rapidly. At 80°C, after 30 minutes XI W137F/V184T lost half of its activity. XI W137F/V184S was stable at pH 8, while XI W137F/V184T was stable at alkaline pH values. The maximum activity of XI W137F/V184S and XI W137F/V184T were observed in presence of 10 mM  $\text{Mg}^{+2}$  and 10 mM  $\text{Mn}^{+2}$  respectively.  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Hg}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$  and  $\text{Cu}^{+2}$  were determined as inhibitors for activities of XI W137F/V184S and XI W137F/V184T.

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

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

Şekil 1.	Ksiloz İzomerazın İzomerizasyon Mekanizması a) Glukoz izomeraz aktivitesi aracılığıyla D-glukozun D-fruktoza dönüşümlü izomerizasyonu b) Ksiloz izomeraz aktivitesi aracılığıyla D-ksilozun D-ksiluloza dönüşümlü izomerizasyonu.....	2
Şekil 2.	KI'nın çalışma mekanizması. a) cis-enediol. b) Proton transfer. c) Hidrid-shift. Kutular stereospesifik olarak transfer edilen hidrojen atomlarını göstermektedir.....	16
Şekil 3.	KI W137F/V184S'nin saflaştırma sonrası SDS-PAGE jel görüntüsü a) saflaştırılmış enzim b) markır c) iyon değişimi kolon kromatografisi d) ısı şoku e) kaba ekstrat.....	32
Şekil 4.	KI W137F/V184T'nin saflaştırma sonrası SDS-PAGE jel görüntüsü a) kaba ekstrat b) ısı şoku c) iyon değişimi kolon kromatografisi d) saflaştırılmış enzim.....	33
Şekil 5.	KI W137F/V184S mutanı'nın ksiloz varlığında Michaelis-Menten grafiği.....	34
Şekil 6.	KI W137F/V184T mutanı'nın ksiloz varlığında Michaelis-Menten grafiği.....	35
Şekil 7.	KI W137F/V184S'nin optimum sıcaklık-aktivite grafiği.....	36
Şekil 8.	KI W137F/V184T'nin optimum sıcaklık-aktivite grafiği .....	36
Şekil 9.	KI W137F/V184S'nin optimum pH-aktivite grafiği .....	37
Şekil 10.	KI W137F/V184T'nin Optimum pH-Aktivite grafiği.....	38
Şekil 11.	KI W137F/V184S'nin ısı kararlılık grafiği, (Isı ile muamele edilmemiş enzime göre kalan aktiviteler).....	38
Şekil 12.	KI W137F/V184T'nin ısı kararlılık grafiği, (Isı ile muamele edilmemiş enzime göre kalan aktiviteler).....	39
Şekil 13.	KI W137F/V184S'nin pH kararlılığının zamana bağlı değişim grafiği, (İlk anda alınan aktivite ölçümüne göre kalan aktiviteler) .....	40
Şekil 14.	KI W137F/V184T'nin pH kararlılığının zamana bağlı değişim grafiği, (İlk anda alınan aktivite ölçümüne göre kalan aktiviteler) .....	41
Şekil 15.	KI W137F/V184S aktivitesi üzerine farklı konsantrasyonlardaki metal iyonlarının aktivatör etkisi.....	42
Şekil 16.	KI W137F/V184T aktivitesi üzerine farklı konsantrasyonlardaki metal iyonlarının aktivatör etkisi.....	43
Şekil 17.	KI W137F/V184S aktivitesi üzerine farklı metal iyonlarının inhibitör etkisi.....	44

Şekil 18.	KI W137F/V184T aktivitesi üzerine farklı metal iyonlarının inhibitör etkisi.....	44
Şekil 19.	Tip 1 ve Tip 2 ksiloz izomerazlarda aktif bölgede olduğu düşünülen korunmuş amino asitler.....	46

## TABLolar DİZİNİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Tablo 1. KI üreten mikroorganizmalar .....	5
Tablo 2. Mutasyonların gerçekleştirilmesinde kullanılan primerler .....	19
Tablo 3. KI W137F/V184S'nin saflaştırma tablosu, (GI esas alınarak hazırlanmıştır).....	32
Tablo 4. KI W137F/V184T'nin saflaştırma tablosu, (GI esas alınarak hazırlanmıştır).....	32
Tablo 5. Yaban tip ve mutant enzimlerin kinetik parametreler açısından karşılaştırılmaları .....	46
Tablo 6. Çeşitli mikroorganizmalara ait KI'nın ksiloz için Km değerleri .....	47
Tablo 7. Çeşitli mikroorganizmalara ait KI'nın ksiloz için Kcat değerleri .....	48

## SEMBOLLER DİZİNİ

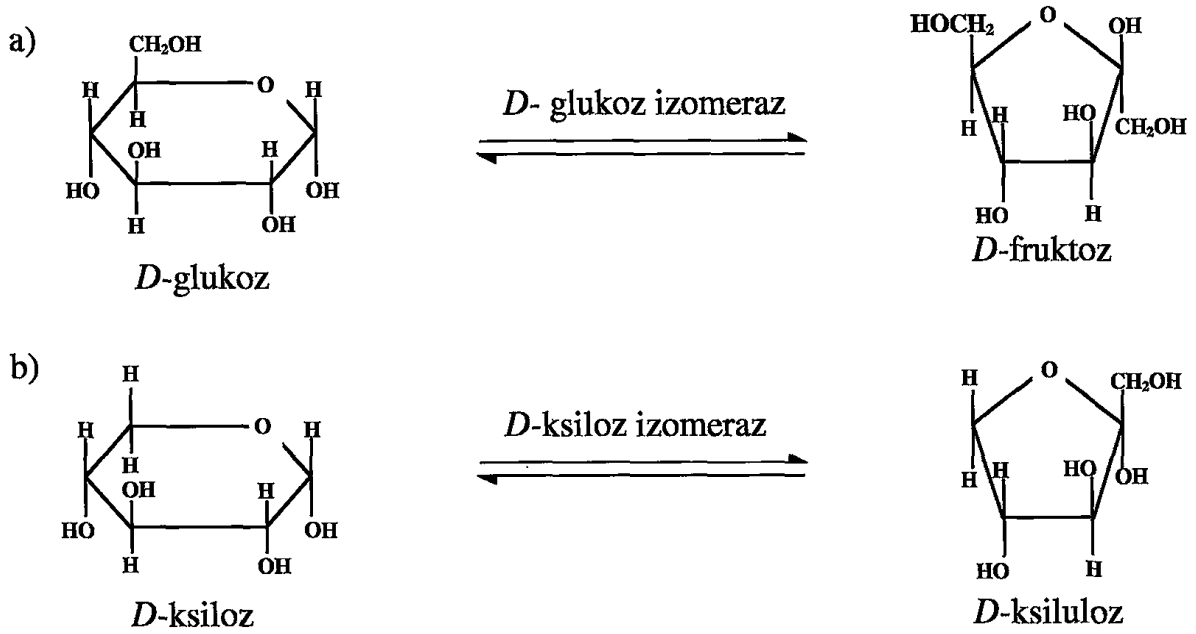
<b>ATP</b>	: Adenozin trifosfat
<b>BSA</b>	: Sığır Serum Albumini
<b>DEAE</b>	: Dietilaminoetil selüloz
<b>dNTP</b>	: Deoksinükleotittrifosfat
<b>FDA</b>	: Yiyecek ve İlaç Denetim Kurumu (Food and Drug Administration)
<b>G2<sup>T</sup></b>	: <i>Anoxybacillus gonensis</i> türü tip suşu (G2)
<b>GI</b>	: Glukoz İzomeraz
<b>HFCS</b>	: Yüksek İçerikli Fruktoz Şurubu (High Fructose Corn Syrup)
<b>IPTG</b>	: Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
<b>KI W137F/V184S</b>	: Mutant Ksiloz İzomeraz Enzimi
<b>KI W137F/V184T</b>	: Mutant Ksiloz İzomeraz Enzimi
<b>KI</b>	: Ksiloz izomeraz
<b>LB</b>	: Luria Broth Besiyeri
<b>MOPS</b>	: 3-(N-morfolino) propanosülfonik asit
<b>NAD</b>	: Nikotin amid adenininükleotit
<b>PCR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
<b>pETG2GI</b>	: <i>A.gonensis</i> Ksiloz İzomeraz Genini Taşıyan Vektör
<b>pGI- W137F/V184S</b>	: Mutant Geni İçeren pET28a+ Vektörü
<b>pGI- W137F/V184T</b>	: Mutant Geni İçeren pET28a+ Vektörü
<b>SDS-PAGE</b>	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel
<b>UV</b>	: Ultraviyole
<b><i>xylA</i></b>	: Ksiloz İzomeraz Geni

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Enzimler, biyolojik katalizörler olarak bilinen ve biyolojik reaksiyonların hızını arttıran protein yapıda bileşiklerdir. Enzimlerle gerçekleşen reaksiyonların canlı ortamına uygun, ılımlı koşullar altında meydana gelmesi nedeniyle, bu reaksiyonlar sonucu canlılığa herhangi bir zarar gelmemektedir. Ayrıca yeterli koşulların sağlanması sonucunda enzimler katalitik etkilerini gösterebilmektedir. Bu sayede, enzimlerden doğal ortamlarının dışında yer alan pek çok alanda da yararlanılabilmek imkânı ortaya çıkmaktadır. Bu imkânlar doğrultusunda, enzimler hakkında elde edilen bilgiler pratik uygulamalara imkân verdiğince enzimlerin değişik alanlarda çeşitli amaçlarla kullanımı hayata geçmektedir (Telefoncu, 1986). Günümüzde yaygın olarak kullanılan bazı enzimler şunlardır: pretolitik enzimler, amilolitik enzimler, ksiloz izomeraz (glukoz izomeraz), pektolitik enzimler, selulozlar, galaktosidazlar.

D-Ksiloz izomeraz enzimi endüstriyel açıdan önemli olan enzimler arasında yerini almakta ve enzim endüstrisinin en yüksek tonajlı üç enziminden biri olarak kabul edilmektedir (Bhosale vd., 1996). D-Ksiloz izomeraz enzimi, D-ksilozun D-ksiluloza geri dönüşümlü olarak izomerizasyonunu katalizlemektedir. Bu reaksiyon, pentoz fosfat döngüsünü takiben gerçekleşen ksiloz metabolizmasının ilk basamağında gerçekleşmektedir. D-ksiloz izomeraz enzimi ayrıca glukozun fruktoza olan izomerizasyonunu da katalizlemektedir (Şekil 1).



Şekil 1. Ksiloz İzomerazın İzomerizasyon Mekanizması a) Glukoz izomeraz aktivitesi aracılığıyla *D*-glukozun *D*-fruktoza dönüşümlü izomerizasyonu b) Ksiloz izomeraz aktivitesi aracılığıyla *D*-ksilozun *D*-ksiluloza dönüşümlü izomerizasyonu

Ksilozun ksiluloza dönüşümü, çürümüş bitki materyalleri üzerinde yayılım gösteren saprofitik bakterilerin beslenmede kullandıkları bir reaksiyon olmasının yanı sıra hemiselülozun etanole dönüşmesine de yardımcı olmaktadır. Yüksek-fruktoz mısır şurubu (High Fructose Corn Syrup: HFCS) üretiminde glukozun fruktoza izomerizasyon reaksiyonu kullanıldığı için ksiloz (glukoz) izomeraz ayrıca ticari olarak büyük bir öneme sahiptir. Dünyada kullanılan ana tatlandırıcı kaynağının 1976 yıllarına kadar %40'ının şeker pancarından, %60'ının şeker kamışından üretilen sukroz olduğu bilinmektedir. Fakat günümüzde yaygın olarak kullanılan tatlandırıcıların yani fruktoz şuruplarının keşfi ve ilk kez Japonya tarafından glukoz izomeraz enziminin kullanılarak HFCS üretiminin başarılı bir şekilde gerçekleştirilmesiyle birlikte glukoz izomeraz enziminin endüstriyel olarak önemli hale gelmesinin temelleri atılmıştır. Bunun ardından, 1958'deki Küba Devrimi'nden sonra Amerika'da ortaya çıkan sukroz kaynağı sıkıntısından dolayı HFCS üretimine çare olarak başvurulması ile daha da önemli bir hale gelen glukoz izomeraz enzimi, o yıllardan günümüze kadar 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 vd., 1957). Enzim üretimi sırasında bakterinin büyüme ortamında ksiloza ihtiyaç duyduğu ve arsenat varlığında enzim üretiminde artışın gözlemlendiği belirtilmektedir. Bu enzim ksiloza glukozdan daha spesifiktir. Sonraki yıllarda ksilozdan bağımsız olarak *Escherichia intermedia*' da bir ksiloz izomeraz aktivitesi tespit edilmiştir. *Escherichia intermedia*'dan elde edilen enzim ise ksiloz varlığına ihtiyaç duymayan sadece arsenat varlığında fosforillenmemiş şekerlerin izomerizasyonunu katalizleyen bir fosfoglikoz izomerazdır (E.C.5.3.1.9.). Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda *Bacillus megaterium* AI bakterisinden NAD bağlı bir glukoz izomeraz izole edilmiştir (Takasaki vd., 1962; Takasaki vd., 1963). Yeni tipte glukoz izomeraz enzimlerinin keşfi *Paracolobacterium aerogenoides*'ten izole edilmesiyle devam etmiştir. Bu bakteriden izole edilen glukoz izomeraz enzimi, hem glukozun hem mannozun fruktoza izomerizasyonu sağlamaktadır (Takasaki vd., 1964; Takasaki vd., 1966). Tüm bu çalışmaların yanında büyüme ortamında ksiloza ihtiyaç duyan ve yüksek sıcaklıklarda kararlılığını yitiren glukoz izomeraz enzimi heterolaktik bakterilerden elde edilmiştir. Tüm bu enzimlerin yanı sıra ticari öneme sahip ve en uygun olan glukoz izomeraz enzimi E.C. 5.3.1.5. kodlu enzimdir. Bu enzim sıcaklığa karşı kararlılığını kaybetmez ve aktivite gösterebilmek için pahalı kofaktörlere ihtiyaç duymaz (NAD<sup>+</sup> veya ATP gibi). Glukozun fruktoza enzimatik olarak izomerizasyonunun endüstriyel alanda ilk uygulaması ABD'de Clinton Corn Processing Co. tarafından 1967 yılında yapılmıştır. İmmobilize KI ise 1974 yılında kullanılmaya başlanmıştır. KI, bugün meşrubat, fırıncılık, konserve yapımı ve şekerleme endüstrisinde en büyük pazar payına sahip olan bir enzimdir (Tsumura vd.,1965) (Bhosale vd., 1996).

Ticari anlamda üretilen ksiloz izomeraz enzimi aslında D- ksiloz- ketol izomeraz enzimidir. Enzim üretiminde mikroorganizma ksiloz veya bitkisel hemiselüloz içeren ortamlarda çoğaltılır. Enzimin katalizlediği bu reaksiyon ksilozun ksiluloza izomerizasyonudur. D-ksiloz, bakteriler, mayalar ve mantarlar tarafından fermente edilebilen lignoselülotik biokütlenin temel bileşenini oluşturmaktadır (Walfrıdsson vd., 1996). Bakteriler pentoz fosfat yoluna girmeden önce ksiloz izomeraz enzimi sayesinde ksilozun ksiluloza izomerizasyonunu gerçekleştirerek ksilulozu kullanırlar. Hücre dışı enzimler polimerleri D-ksiloza 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 vd., 1976) ya da fosfoketoz yoluna girer (Lama vd., 2001). Yeryüzündeki bitki biokütlesinin neredeyse % 40'ı hemiselülozdur ve birçok

mikroorganizma tek karbon kaynağı olarak hemiselülozu kullanarak bu biokütlenin üzerinde yaşar (Rehm ve Weed, 1982). Hemiselülozu karbon kaynağı olarak kullanan organizmaların ksiloz izomeraz enzimi de hemiselülozu alkole dönüştüren reaksiyonu katalizlediğinden endüstriyel olarak öneme sahiptir (Lehmacher ve Bisswanger, 1990). Birçok mikroorganizma ksiloz izomeraz üretiminde indükleyici madde olarak ksiloza gereksinim duymaktadır (Gong vd., 1980). Ticari açıdan glukoz izomeraz üretiminde saf ksiloz pahalı olması nedeniyle çok fazla tercih edilmemektedir. Bu nedenle, yapılan bazı araştırmalar, ksilozun yerine geçebilecek mısır kabuğu, mısır koçanı, ksilan ve saman gibi yapılarında ksiloz bulunan bitkisel kaynaklı maddelerin enzim üretiminin uyarılmasında kullanılabileceğini göstermektedir (Takasaki vd., 1969).

## 1.2. Ksiloz İzomeraz Elde Edilebilen Organizmalar

KI enziminin prokaryotlarda oldukça yaygın bir şekilde bulunduğu bilinmektedir. *Pseudomonas hydrophila*'da keşfinden sonra, birçok bakteri ve *Actinomyces* türünde arsenat yokluğunda KI aktivitesi belirlenmiştir. Heterolaktik asidik bakterilerden *Lactobacillus brevis*'den elde edilen KI en yüksek miktarda enzimi üreten bakteriydi. Fakat *Lactobacillus brevis*'den elde edilen enzim düşük pH'da aktif olmasına rağmen yüksek sıcaklıkta kararlı olmadığından ekonomik uygulamalar için uygun bir enzim değildi. Hücre dışına nadir olarak salgılanan KI enzimi *Streptomyces glaucescens* ve *S. flavogriseus* tarafından üretilmektedir (Batt vd., 1986; Beck vd., 1988). Bu organizmalarda enzimin hücreden salınması, hücre duvarının kısmi parçalanması ve hücre duvarı geçirgenliğinin değişmesinde görev yapmaktadır. Diğer bir hücre dışı KI *Chania* sp. (Bejar vd., 1994) ve bir alkolotermofilik olan *Bacillus* sp.'den (Bengston vd., 1974) iyon-değişimi kromatografisi, jel filtrasyonu kromatografisi gibi bir dizi saflaştırma tekniğiyle saflaştırılmıştır. Birçok *Bacillus* ve *Streptomyces* türü önemli miktarlarda KI üreticisidirler. KI'nın, *Candida utilis* ve *Candida boidinii* gibi birkaç maya türünde de bulunduğu belirtilmektedir (Blacklow vd., 1988; Blow vd., 1990). KI aktivitesine sahip olduğu bildirilmiş tek mantar ise *Aspergillus oryzae*'dir. KI'nın arpa maltında ve buğday tohumunda da var olduğu tespit edilmiştir (Blow vd., 1992; Bogumil vd., 1993). KI, ticari olarak çok büyük bir öneme sahip olmasından dolayı yeni bulunan birçok KI üreten organizma ve bu organizmalarla geliştirilmiş süreçler hakkındaki bilgiler patent altına

alınmıştır (Boguslawski vd., 1982; Bok vd., 1984; Bor vd., 1992; Briggs vd., 1984). Bazı KI üretici mikroorganizmalar Tablo- 1’de verilmiştir.

Tablo 1. KI üreten mikroorganizmalar

<i>Aerobacter aerogenes</i>	<i>Paracolobacterium aerogenoides</i>
<i>Aerobacter cloacae</i>	<i>Pseudomonas hydrophila</i>
<i>Aerobacter levanicum</i>	<i>Pseudonocardia</i> spp.
<i>Actinoplanes missouriensis</i>	<i>Sarcina</i> spp.
<i>Actinomyces olivocinereus</i>	<i>Shoenoplectus californicos</i>
<i>Arthrobacter</i> spp.	<i>Spondylus achinatus</i>
<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Staphylococcus albus</i>
<i>Bacillus megabacterium</i>	<i>Staphylococcus bibila</i>
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Streptococcus acromogenes</i>
<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>Streptococcus venuceus</i>
<i>Brevibacterium pentosoaminoacidium</i>	<i>Streptococcus virginial</i>
<i>Brevibacterium incertum</i>	<i>Streptomyces bikiniensis</i>
<i>Chainia</i> spp.	<i>Streptomyces cinnamonensis</i>
<i>Cortobacterium helvolum</i>	<i>Streptomyces echinatus</i>
<i>Corynebacterium</i> spp.	<i>Streptomyces flavovirens</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptomyces fracliae</i>
<i>Escherichia intermedia</i>	<i>Streptomyces fradiae</i>
<i>Escherichia freundii</i>	<i>Streptomyces glaucescens</i>
<i>Flavobacterium devorans</i>	<i>Streptomyces griseus</i>
<i>Flavobacterium arborescens</i>	<i>Streptomyces hivers</i>
<i>Lactobacillus buchneri</i>	<i>Streptomyces matensis</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Streptomyces niveus</i>
<i>Lactobacillus gayonii</i>	<i>Streptomyces olivaceus</i>
<i>Lactobacillus lycopersici</i>	<i>Streptomyces olivochromogenes</i>
<i>Lactobacillus mannitopoeus</i>	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>
<i>Lactobacillus pentosus</i>	<i>Streptomyces roseochromogenes</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Streptomyces rubiginosus</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Streptomyces venezaelie</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Streptomyces wedmorensis</i>
<i>Microbispora rosea</i>	<i>Streptosporangium album</i>
<i>Microellobosporia flavea</i>	<i>Streptosporangium oulgare</i>
<i>Micromonospora coerulea</i>	<i>Spirulina platensis</i>
<i>Mycobacterium</i> spp.	<i>Thermopolyspora</i> spp.
<i>Nocardiosis corallia</i>	<i>Thermus</i> spp.
<i>Nocardiosis dassonvillei</i>	<i>Xanthomonas</i> spp.
<i>Nocardia asteroides</i>	<i>Zymononas mobilis</i>

### 1.3. Ksiloz İzomeraz Enziminin Önemi

Ksiloz izomeraz enzimi termofilik enzimlerin yapı ve işlevleri arasında bulunan ilişkiyi biyokimya ve genetik mühendisliği teknikleriyle araştırabilmek için iyi bir model olmaktadır. Bunun yanı sıra endüstride potansiyel bir uygulama alanına sahiptir. Hemiselülozdan etanol üretilmesi ve glukoz izomerizasyonu yönü ile HFCS üretiminde yaygın olarak kullanılmasından ötürü endüstriyel alanda sahip olduğu ilgi her geçen gün gittikçe artmaktadır (Yanmış, 2008).

#### 1.3.1. HFCS Üretimindeki Önemi

Glukozun fruktoza izomerizasyonu yüksek fruktoz mısır şurubu (HFCS) endüstrisinde ticari açıdan büyük öneme sahiptir. Yapılan çalışmalarda saf şekerin üretiminin maliyetinin çok yüksek olması nedeniyle ve sükroz tüketiminin insan sağlığı üzerinde olumsuz etkilerinin bulunmasından dolayı, saf şekere olan talebin artmasına rağmen sukrozun yerini alabilecek başka seçeneklerin araştırılmasını gerektirmiştir. Yapılan araştırmalarda, sakkarin, siklamat, asesülfam-K, aspartam ve taumatin gibi kalorisiz ve karbohidrat olmayan yapay birçok tatlandırıcı bulunmuştur. Fakat bu tatlandırıcılar üzerinde yapılan diğer çalışmalarda ise sağlık uzmanları tarafından insan sağlığına zararları olduğu belirtilmiş ve kullanımları yasaklanmıştır. Tatlandırıcı olarak meşrubat yapımında kullanılan aspartamın düşük pH'da yavaş yavaş hidrolize olmasından dolayı belli bir zaman sonra meşrubatların tatlarının kaybolduğu bildirilmiştir. Tautamin ise her ne kadar sükrozdaki 2000 kat daha tatlı bir tatlandırıcı olmasına rağmen tadının hoş olmamasından dolayı tercih edilememektedir. HFCS üretiminde ise glukoz ve fruktozun eşit miktarlarının karışımı yani (1:1) oranıyla karışımı sükrozdaki 1,3 kat, glukozdan 1,7 kat daha tatlıdır. Glukozun tatlandırma kapasitesi sükrozun tatlandırma kapasitesinin %70-75'i kadarı olmasına rağmen fruktozun tatlandırma kapasitesi sükrozun iki katıdır (Barker, 1976). HFCS tamamen tatsız olan nişastadan üretilmektedir. Tatlandırma gücü göz önüne alınarak bir karşılaştırma yapıldığında HFCS'nin sükrozdaki %10-20 daha ucuz olduğu anlaşılmaktadır. HFCS'nin diğer bir tercih nedeni ise sukroz gibi kristallenme problemine sebep olmamasıdır. Tüm bunlara ek olarak, sadece fruktozun midede oldukça yavaş bir biçimde emilmesinden ve kandaki glukoz seviyesine herhangi bir etkide bulunmamasından dolayı, D-fruktoz diabetik tatlandırıcı olarak da çok önemli bir rol oynar. Fruktoz şurupları

tatlı bir tat verme özelliklerinin yanında gıda endüstrisinde gıdalarda lezzetin geliştirilmesinde de önemlidir. Sakkarozaya göre fruktozun dil üzerinde algılanması çok daha yoğundur. Bu nedenle gıdalarda karakteristik olarak ön plana çıkarılan lezzet özelliklerinin algılanmasında önemli derecede etkilidir (Howling, 1992).

### 1.3.2. Etanol Üretimindeki Önemi

Fosil yakıtların hızla tükenmekte olduğu göz önüne alınırsa, yenilenebilir biokütlenin fermentasyon yolu ile alkol üretiminin ham maddesi olabilecek şekerlere dönüştürülebilmesi oldukça önemli bir olaydır. Biokütle %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. Yakın zamana kadar, çalışmalar yoğun olarak selülozun biyolojik indirgenmesi üzerine yoğunlaşmıştı. Sonraki yıllarda lignoselülozun ve tarımsal suların biyolojik indirgenmesinin etkili bir şekilde biokütlenin hemiselüloz bileşenlerini üretebildiğinin fark edilmesi, dikkatin hemiselüloz fermentasyonuna kaymasına neden olmuştur (Wang vd., 1980). Ksilan, hemiselülozun ana bileşeni olmakla birlikte  $\beta$  (1,4) bağlarıyla birbirine bağlanan ksiloz birimlerinden oluşmaktadır. D-ksiloz, ksilanın enzimatik veya asidik parçalanmasıyla üretilir. *Saccharomyces cerevisiae* gibi endüstriyel maya türleri genellikle heksozları verimli bir şekilde fermente ederler, fakat D-ksiloz bu fermentasyon sonucunda üretilmez. *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 vd., 1985). Ayrıca, bu organizmaların etanole olan düşük toleransı ve oksijenin varlığında etanolü katabolize etmeleri, bu mayaların endüstriyel alanda kullanılmasını engellemektedir (duPreez vd., 1987). KI, ksilozdan ksiluloz üretilmesinde de kullanılır, ancak ksiluloz *Saccharomyces cerevisiae* gibi mayaların ksilozun alkole fermentasyonunu sağlayan metabolik yol için bir engelleyicidir (Chaing vd., 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 yoğunlaşmıştır.

## 1.4. KI Üretimi

Enzimin endüstriyel alanda daha uygun bir şekilde kullanılabilir duruma getirilebilmesindeki çalışmaların temelini enzim üretimindeki maliyetin düşürülmesi oluşturmaktadır. Bu nedenle ksiloz izomeraz enzimi üretmek için gerekli fermantasyon şartlarını en uygun ve en ekonomik hale getirmek amacıyla pek çok çalışma yapılmıştır. KI enziminin bu şartları yerine getirmesi amacıyla yapılan çalışmalar üç temel başlık altında toplanabilir: 1) Enzimin verimliliğinin artırılması 2) Fermantasyon ortamının hem ksilozun yerine kullanılacak daha ucuz bir ham maddenin kullanılarak hem de  $\text{Co}^{2+}$  iyonları ortamdaki kaldırılmasını sağlayacak şekilde optimize edilmesi 3) Enzimin immobilize edilmesi.

### 1.4.1. Enzimin Verimliliğinin Artırılması

KI enziminin sahip olduğu özelliklerin hem iyileştirilmesi hem de verimliliğinin artırılabilmesi amacıyla geleneksel mutasyonlardan ve rekombinant DNA teknolojisi yöntemlerinden yararlanılmıştır. Ticari öneme sahip birçok suş enzim üretim seviyesini arttırmak ve enzim üretimini sürekli kılmak için birçok mutasyona uğratılmışlardır. Bunlardan *Streptomyces wedmorensis*'in etilenamin ve N-metil-N-nitro-N-nitrozguanidin ile mutasyona uğratılmasıyla enzim üretim seviyesinin %60 oranında arttığı görülmüştür (Brownell, 1982). *Streptomyces olivochromogenes*'in UV ile mutasyona uğratılması ile de mutant suşta KI aktivitesinde %70 oranında artış olduğu belirtilmektedir (Bucke, 1981). *Bacillus coagulans* ile yapılan bir diğer çalışmada ise *Bacillus coagulans*'un 2-deoxyglukoza dayanıklılığı temel alınarak elde edilen mutantlarının aktivitesi ana hücrenin iki katı aktivite göstermiştir. En yüksek verimliliği laktozda gösteren iki kat verimli sürekli mutantlardan birinin glukoz üzerinde ksilozdan daha yüksek verim verdiği Lee tarafından belirtilmektedir (Lee, 1976). *Streptomyces acidodurans*'a çoklu UV ışınları uygulayarak birçok sürekli ve verimli enzim üreten mutantlar izole edilmiştir (Callens, 1988). Etil metansülfonat ile elde edilen mutantlardan biri ve sadece glukoz üzerinde büyütüldüğünde aynı koşullarda ana hücre  $10 \text{ U ml}^{-1}$  üretirken,  $1,500 \text{ U ml}^{-1}$  ürettiği tespit edilmiştir (Bok vd., 1984). Ayrıca suşların genetik manipulasyonlarla geliştirilmeleri mümkündür. Rekombinant DNA teknolojisi arzu edilen proteinin geninin izole edilmesi ve manipüle edilmesi konusunda oldukça başarılı yöntemlere sahiptir. Günümüzde endüstriyel olarak

kullanılan enzimlerin %50'den fazlasının genetik olarak değiştirilmiş mikroorganizmalardan elde edildiği bilinmektedir (Callens vd., 1986).

#### **1.4.2. Fermentasyon Ortamının Optimum Hale Getirilmesi**

KI enzimi, genel olarak bakıldığında havalandırılmalı fermentasyon ortamlarında üretilmektedir. Fermentasyon ortamının optimum hale getirilmesi, yani KI üretimi esnasında ekonomik olarak en iyi koşulları bulmak için oldukça fazla çalışma yapılmıştır. Fermentasyon ortamının optimizasyon çalışmaları özellikle 1) Maksimum enzim üretimi için pH ve sıcaklık optimizasyonunun yapılması 2) Fermentasyon ortamında  $Co^{2+}$  iyonları yerine başka bivalent metal iyonlarının kullanılması 3) Ksiloz yerine kullanılabilinecek daha ucuz bir indükleyicinin bulunması 4) Enzim verimi üzerine daha ucuz azot kaynaklarının etkisinin değerlendirilmesi, konuları üzerine yoğunlaşmıştır. Her organizmanın maksimum enzim üretimi için ihtiyaç duyduğu fermentasyon ortamı kendine özgüdür (Callens vd., 1988). Farklı mikroorganizmaların hepsine birden kullanılabilinecek düzeyde olan tek bir mükemmel fermentasyon ortamı yoktur.

##### **1.4.2.1. pH ve Sıcaklık Optimizasyonu**

KI üretimi genel olarak eğer bir pH kontrolü yoksa pH 7,0-8,0 arasında gerçekleştirilmektedir. Optimum sıcaklık ise organizmanın büyüme koşullarına göre değişiklik göstermektedir. Örneğin, *Streptomyces spp.*, *Arthrobacter sp.* ve *Actinoplanes missouriensis* yaklaşık 30°C'de yaşar (Anheuser-Busch Inc. 1974). Termofilik *Bacillus spp.* ise 50-60°C'de yaşar (Brownell, 1982). KI üretimi için kullanılan kültür tipine bağlı olarak fermentasyon periyodunun 6 saatten 48 saate kadar değişim gösterdiği belirtilmektedir.

##### **1.4.2.2. Metal İyon Gereksinimi**

Organizmalar optimum KI üretimi için fermentasyon ortamında bivalent katyonlara ihtiyaç duymaktadır. Ancak, bu ihtiyacın karşılanması için gerekli olan metal iyon kaynağı organizmadan organizmaya değişiklik göstermektedir. Örneğin, *Streptomyces YT-5* suşu

için  $\text{Co}^{2+}$  gerekiyken, *Bacillus coagulans* için  $\text{Mn}^{2+}$  veya  $\text{Mg}^{2+}$  gerekli olmaktadır (Outtrup, 1974; Yoshimura vd., 1966). Genellikle kobalt metal iyon olarak mezofilik *Streptomyces* türleri tarafından kullanılırken, termofilik türler tarafından kullanılmazlar. KI üretimi yapılan fermentasyon ortamına  $\text{Co}^{2+}$  iyonu ilavesinin azaltılmaya çalışılması ya da tamamen gereksiniminin ortadan kaldırılması,  $\text{Co}^{2+}$ 'lı HFCS tüketiminin insan sağlığı üzerine olan zararları ve kullanılmış besiyerinin atılmasının çevreye verdiği zararlar düşünüldüğünde oldukça önemli bir konu olmaktadır. Öte yandan, *Arthrobacter spp.*, *Streptomyces olivaceus* ve *Streptomyces olivochromogenes*'in bazı mutant suşları gibi bazı organizmalar optimum enzim üretimi için  $\text{Co}^{2+}$ 'ya ihtiyaç duymamaktadır (Anheuser-Busch Inc. 1974; Reynolds, 1973).

#### 1.4.2.3. Ksiloz İzomeraz Enziminin Üretilmesini Arttıran İndükleyici Ajanlar

Ksiloz izomeraz enzimi üreten organizmaların büyük bir çoğunluğu enzimin üretimi için besiyeri ortamında ksiloza ihtiyaç duyarlar. Fakat ekonomik olarak bakıldığında ksiloz oldukça pahalı olmasının yanı sıra kullanımı da ekonomik olarak pratik değildir. Glukoz, sorbitol, nişasta veya gliserol, ksilozun ksiloz izomeraz enzimi üzerindeki etkisinin %75'ine varan bir etkiyle kullanılabilir (Drazic vd., 1980). GI üreten organizmalardan hangisinin seçileceği hangisinin daha ucuz ortamda büyüdüğüne bakılarak yapılır. Günümüzde, birçok organizma ksiloz yerine glukozu kullanan KI üretmektedir. Bu organizmaların başında *Actinoplanes*, *Bacillus coagulans* ve *Streptomyces olivochromogenes* gibi çeşitli suşlar gelmektedir. Bu indükleyicilerin yanı sıra *Streptomyces* YT-5 suşunun buğday kepeği ve mısır koçanı gibi ksilan ya da ksilan içeren diğer materyallerin varlığındaki ortamlarda büyüebilmektedirler (Takasaki ve Tanabe, 1966). Mutasyon çalışmaları sayesinde esas indükleyici olarak ksiloza ihtiyaç duymayan KI üretebilen bakterilerin elde edildiği yaklaşımları bulunmaktadır. Bunların yanı sıra *Actinoplanes missouriensis*'in mutant olmayan tiplerinden biri Gist Brocades tarafından ticari olarak KI üretiminde kullanılmaktadır. Başka bir yaklaşım ise, *xyIA* genini güçlü *Streptomyces* promotörünün önüne klonlamaktır.



#### 1.4.2.4. Azot Kaynağı

Azot kaynağı her enzim üreten organizma için ayrı ayrı özel olarak optimize edilmesi gereken en önemli faktörlerden biridir. KI üretimi için genellikle karışık azot kaynakları kullanılmasına rağmen, özel bir azot kaynağı gerekliliği organizmadan organizmaya değişir. Örneğin, *Bacillus coagulans* için pepton, maya ekstraktı, amonyum tuzları kullanmak uygun iken, üre ve nitrat kullanmak uygun olmamaktadır (Yoshimura vd., 1966). Ucuz ve uygun bir azot kaynağı olarak kaynatılmış mısır suyunun kullanılması bazı araştırmacılar tarafından bulunmuştur (Anheuser- Busch Inc. 1974; Hafner vd., 1985). Fakat kullanımının sezonluk olması mısır suyunun kullanımını sınırlandırmıştır. Bu sınırlama nedeniyle mısır suyunun yerini alabilecek daha uygun kullanımlı bir azot kaynağı son zamanlarda dahi araştırılmaktadır. Soya unu, mısır suyundan %50 daha zengin bir azot kaynağıdır (Shieh, 1977). Fermentasyon ortamına belirli bazı aminoasitlerin eklenmesi *Streptomyces violaceoruber*'in KI enziminin üretimini arttırmıştır (Vaheri vd., 1977; Vandamme vd., 1981). Diğer yapılan araştırmalarda, *Streptomyces coelicolor*'da yapılan mutasyon ile KI enziminin maya ekstraktına oranla mısır suyunu daha fazla tercih etmesi sağlanmıştır (Hafner vd., 1985).

#### 1.4.3. Ksiloz İzomeraz Enziminin Saflaştırılması

Birçok mikroorganizmada KI enziminin değişik yöntemlerle üretimi gerçekleştirilmektedir. Fakat bu yöntemlerden sadece birkaç tanesi tamamen saf olarak KI enziminin elde edilmesi için kullanıma uygun haldedir. Enzimin tekrar tekrar kullanılmasıyla ticari öneme sahip olan en yaygın yöntem enzimin immobilize halinde üretilmesidir. Bu sayede enzimin ayrıca saflaştırılması ve yoğunlaştırılması gibi basamaklara ihtiyaç duyulmamaktadır. Ticari olarak immobilize edilmiş haldeki KI enziminin değeri büyük olmasına rağmen, akademik boyutta yapılan çalışmalarda enzimin saf olarak elde edilmesi büyük öneme sahiptir. Çünkü yapılan bu çalışmaların içinde kimyasal modifikasyonlar, yapı-görev ilişkileri ve özellikleri bulunmaktadır. Bu çalışmalar için de enzimin saf olarak elde edilmesi gerekmektedir. Daha önceden enzimin sadece bazı organizmalar tarafından hücre dışına salgılandığı belirtilmişti. Geri kalan organizmalar KI enzimini hücre içi olarak üretmektedirler. Bu nedenle KI enziminin saflaştırılmasında hücrenin sonikasyon, öğütme, homojenizasyon gibi mekanik parçalaması ya da lizozim,

katyonik deterjan, toluen kullanılarak kimyasal parçalanması yöntemleri kullanılmaktadır (Chen, 1980a). Literatürde ayrıca KI enziminin saflaştırılmasında affinite kromatografisi kullanıldığı da belirtilmektedir. Bir affinite adsorbantı olan ksilitol-sefaroze *Streptomyces* spp.'den KI saflaştırmak için kullanılmıştır (Chen, 1980b). Silika jel üzerine immobilize edilmiş ksiloz veya mannitol ile birleştirilmiş Biojel-P 100 gibi diğer affinite matrisleri de kullanılmıştır. *Streptomyces* sp. NCIM 2730 suşundan tek basamakta hızlı bir şekilde immunoafinite ile saflaştırma işlemi rapor edilmiştir (Ghatge vd., 1991).

#### 1.4.4. Ksiloz İzomerazın İmmobilizasyonu

Bir önceki kısımda belirtildiği gibi, ticari olarak maliyeti azaltacak şekilde KI enziminin kullanılmasını, yani bu enzimin defalarca geri alınıp tekrardan verimli bir şekilde kullanılmasını sağlayacak yöntem KI enziminin immobilize hale getirilmesidir. Literatür bilgilerine bakıldığında KI enziminin immobilize olarak kullanıldığına dair bilgiler çok geniş çaptadır. Enzimin immobilize halinin kullanımı, ticari boyutta ekonomik olmasından dolayı önemli hale gelmesi nedeniyle pazarda daha çok tercih edilmektedir (Hemmingsen, 1979; Pedersen, 1993; Verhoff, 1985). KI enziminin hem hücre içi bir enzim olması hem de glukoza olan yüksek  $K_m$ 'yi telafi etmek için yüksek miktarlarda enzim gerektiğinden KI kullanımı çok pahalı olmaktadır. Bu nedenle, endüstriyel uygulamalar için KI'nın immobilize edilmesi çok önemlidir. Daha önce yapılan çalışmalara bakıldığında, KI enziminin immobilizasyonuna yönelik birçok metod tanımlanmıştır (Antrim, 1979). Ancak, bu immobilizasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlardan sadece birkaç tanesi ekonomiktir ve ticari yönden HFCS üretiminde kullanılmak üzere yüksek aktiviteli enzim elde edilmesine imkan verir.

#### 1.5. Ksiloz İzomeraz'ın Özellikleri

Değişik mikroorganizmalardan elde edilen KI enziminin enzimatik ve biyokimyasal özellikleri yoğun bir şekilde çalışılmıştır. KI enziminin; pH ve ısıl kararlılığı, metal iyonlarına olan gereksinimi, substrata olan özgünlüğü gibi özellikleri hakkında bilgi sahibi olmak, enzimin inhibe olmasını engellemek ve HFCS üretiminde ticari olarak uygulanabilirliğini değerlendirmek için önemlidir (Karaoğlu, 2004).

### 1.5.1. Optimum pH ve Sıcaklık

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. KI'nın optimum sıcaklığı 60°C'den 80°C'ye kadar dağılım gösterir ve optimum sıcaklık  $Co^{2+}$  varlığında artar. *Streptomyces* spp., *Bacillus* spp., *Actoplanes missouriensis* ve *Thermus thermosulfrogenes*'e ait KI enzimleri yüksek sıcaklıklarda kararlı oldukları halde *Lactobacillus* ve *Escherichia* spp.'ye ait KI enzimleri yüksek sıcaklıklarda çok az kararlı kalırlar (Karaoğlu, 2004).

### 1.5.2. Metal İyon İhtiyacı ve İnhibitörleri

Ksiloz İzomeraz enzimi, maksimum aktivite gösterebilmek için başlıca üç divalent katyona ihtiyaç duymaktadır. Bunlar  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  veya  $Mn^{2+}$  katyonları ya da bunların kombinasyonlarından oluşmaktadır. Birçok KI enziminin aktivitesi için hem  $Mg^{2+}$  hem de  $Co^{2+}$  katyonları gereklidir. Bu iki katyonun sahip olduğu görevler birbirinden farklıdır.  $Mg^{2+}$  iyi bir aktivatör etkiye sahipken  $Co^{2+}$  KI enziminin kuarterner yapısında kararlı bir şekilde kalması için gerekmektedir (Callens vd., 1988; Callens vd., 1986). KI'nın katalitik aktivitesi  $Ag^+$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  ve  $Ni^{2+}$  metal iyonları ile tamamen inhibe olmaktadır. Ayrıca  $Ca^{2+}$  ile enzimin aktivitesinde tamamen kayıp olmamasına rağmen önemli derece düşüş olmaktadır. KI'nın diğer bilinen inhibitörleri ksilitol, arabitol, sorbitol, mannitol, liksoz ve Tris'tir (Bucke, 1983; Smith vd., 1991).

### 1.5.3. Substrat Özgünlüğü

KI enziminin pentoz, heksoz, şeker alkolleri ve şeker fosfatlarını izomerize etme kabiliyeti geniş ve yoğun bir biçimde araştırılmıştır (Karaoğlu, 2004). Bilindiği üzere KI birçok farklı organizma tarafından üretilmektedir. Enzimin elde edildiği organizmanın türüne göre substrat spesikliği de değişiklik göstermektedir. KI enzimi, D-riboz, L-arabinoz, L-ramnoz, D-alloz ve 2-deoksiglukoz gibi birçok şeker substrat olarak kullanabilmektedir. Buna karşın KI'nın en yaygın olarak kullandığı substratlar D-glukoz ve D-ksilozdur. KI'nın maksimum izomerizasyon gösterdiği substratlar ise glukoz ve

ksiloz gibi ekvatorial düzlemindeki 3. ve 4. karbonlarında hidroksil grubu taşıyan substratlardır. Farklı mikroorganizmalardan çözünmüş veya immobilize formda bulunan KI'ların D-glukozu D-fruktoza dönüştürme oranı %26-59 arasında dağılım gösterir. Enzimin *K<sub>m</sub>* 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).

#### 1.5.4. Aktif-Bölge Çalışmaları

X-ışın kristallografisi ve gruba özel kimyasal modifiye ediciler sayesinde KI enziminin aktif bölgesindeki veya aktif bölgesinin yakınındaki aminoasitlerin özelliklerinin belirlenmesi başarılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda özellikle histidin ve karboksilat gruplarının enzimin aktivitesi için bu bölgelerde gerekli olduğu kanıtlanmaktadır (Callens vd., 1988; Gaikwad vd., 1988; Ghatge ve Deshpande, 1993). KI enzimi bilindiği üzere hem glukozun hem de ksilozun izomerizasyonundan sorumludur. Ancak KI'nın her iki substrat için tek bir aktif bölgeye mi, yoksa farklı iki aktif bölgeye mi sahip olduğu uzun yıllar boyunca araştırma konusu olmuş fakat kesin bir bilgiye ulaşılamamıştır. Ancak Keleti ve arkadaşları tarafından kinetik metot kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda KI'nın her iki substrat için tek bir aktif bölgeye sahip olduğu gösterilmiştir (Keleti vd., 1987).

#### 1.5.5. Alt Ünite Yapısı

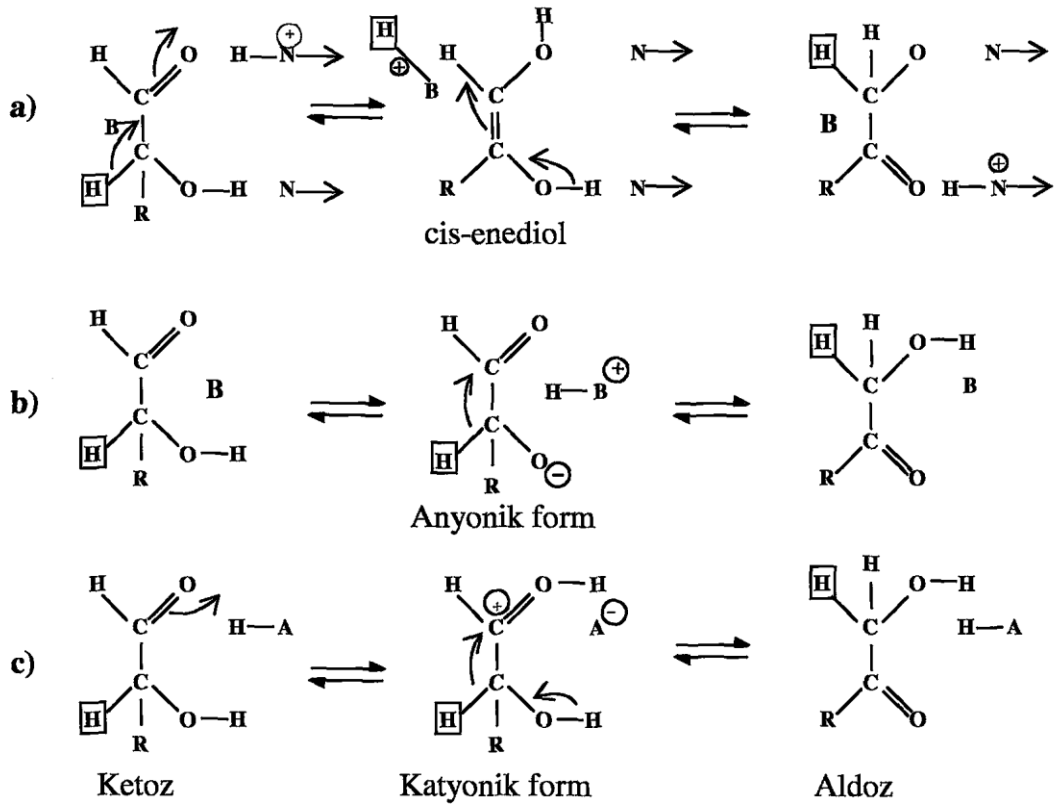
KI enziminin sedimentasyon sabitleri 7,55- 11,45 arasında değişiklik gösterirken, moleküler ağırlığı 52.000- 191.000 arasında dağılım göstermektedir (Chen, 1980a). Enzimin alt ünite yapısı ve aminoasit kompozisyonu üzerine yapılan çalışmalar göstermektedir ki KI enzimi birbirine benzeyen ya da aynı olan dört alt ünitelerden oluşmakta ya da iki alt ünitenin birbirlerine kovalent olmayan bağlarla bağlanması sonucu oluşmaktadır ve bu alt üniteler arasında disülfid bağları bulunmamaktadır. Bunların yanı sıra, *Bacillus* sp'den hücre dışı olarak elde edilen KI enziminin üç alt birimden meydana geldiği bulunmuştur (Chauthaiwaleve ve Rao, 1994). Ayrıca Basuki ve arkadaşları *Streptomyces phaeochromogenes*'den elde ettikleri KI izoenziminin sahip olduğu dört alt ünitenin birbirinden farklı olduğunu bulmuşlardır (Basuki, 1992). Bulunan KI

izoenzimleri, N-terminal aminoasitleri ve tripsin, *Achromobacter* proteaz I ve siyanür bromid ile sindirilebilen peptid çiftleri bakımından farklıdır. *Arthrobacter* ve *Streptomyces* spp.'den elde edilen KI'lar ile yapılan çalışmalar ise göstermiştir ki molekülün biyolojik aktivitesinde dimer ya da tetramerler rol oynarken, monomer üniteler tek başlarına herhangi bir biyolojik aktiviteye sahip değildir (Gaikwad vd., 1992; Rangarajan vd., 1992).

### 1.6. KI'nın Çalışma Mekanizması

KI enzimi ticari olarak büyük bir öneme sahiptir, fakat KI'nın yapısı ve çalışma mekanizması hakkında elde edilen bilgi çok azdır. Bu nedenle KI'nın çalışma mekanizması birçok araştırmacı tarafından ilgiyle araştırılmaktadır. İlk başlarda yapılan çalışmalar sonucunda KI'nın şeker fosfat izomerazlara benzer bir biçimde çalıştığı ve en-diol mekanizmasını takip ettiği düşünülmekteydi (Rose vd., 1969). Fakat sonradan yapılan çalışmalar enzimin hidride-shift mekanizması ile çalıştığını göstermiştir (Whitlow vd., 1991) (Şekil 2). Bu mekanizmada, hidrid iyonunun ya nötral H atomu ve elektron olarak ya da proton ve iki elektron olarak transfer edildiği kabul edilmektedir. Teoriye göre hidrojen, ekspres edilen H<sup>-</sup> olarak transfer edilir. Basit olarak reaksiyon;

$$\text{H}_3\text{CH} + \text{CH}_3^+ \longrightarrow \text{H}_3\text{C}^+ + \text{HCH}_3$$
 şeklinde gösterilir ve kompleks olan hidride-shift prosedürünü özetlemektedir. Bu reaksiyonun temelinde birbirine belli bir uzaklıkta bulunan CH<sub>4</sub> molekülünden CH<sub>3</sub><sup>+</sup> karbonyum iyonuna, bağlantılı olan iki karbon arasında hidrojenin hareket etmesi yatmaktadır.



Şekil 2. KI'nın çalışma mekanizması. a) cis-enediol. b) Proton transfer. c) Hidrid-shift. Kutular stereospesifik olarak transfer edilen hidrojen atomlarını göstermektedir.

Enzimin yapı ve fonksiyonu arasındaki ilişkiyi çalışmak için aktif bölgenin düzenlenişi hakkında bilgi sahibi olmak son derece önemlidir. KI'nın aktif bölgesini çalışmak ve çalışma mekanizmasını şematize etmek için farklı yaklaşımlar denenmiştir. Bu yaklaşımlar: 1) Kimyasal modifikasyon, 2) X-ışını kristallografisi, 3) İzotop değişimi'dir. KI'nın çalışma mekanizması için önerilen mekanizma substrat halkasının açılması, hidritin C-2'den C-1'e kaydırılması ve halkanın kapanması şeklinde gerçekleşmektedir.

### 1.7. Ksiloz İzomeraz Enziminin Genetik Mühendisliği

Rekombinant DNA teknolojisi sayesinde birçok proteini kodlayan gen başarılı bir şekilde izole edilmekte ve izole edilen bu genin birçok yöntem kullanılarak manipülasyonu gerçekleştirilebilmektedir. Endüstriyel alanda kullanılan enzimlerin %50'sinden fazlasının geni modifikasyona uğratılmıştır (Hodgson, 1994). KI üretimini arttırmanın yollarından biri KI genini belirlemek ve bu geni *lac*, *tac*, veya *pL* gibi güçlü promotorlara sahip çok

kopyalı bir vektör sistemine klonlamaktır. KI geninin klonlanmasının amaçları: 1) KI enziminin üretimini arttırmak 2) Mayalar tarafından ksilozun etanole doğrudan çevrilmesini sağlamak 3) Biyoteknolojik uygulamalar için enzimin özelliklerini değiştirmek ve iyileştirmek. Moleküler klonlama ve KI ekspresyonu hem heterolog, hem homolog konaklarda ve mayalarda gerçekleştirilmiştir.

### 1.7.1. Isıl Kararlılık Mutasyonları

Yapılan çalışmalar sonucunda, farklı mikroorganizmalardan elde edilen KI'ların aktif bölgelerinde aromatik amino asitlerin olduğu belirlenmiştir (Collyer vd., 1990). Ayrıca kofaktör olarak  $Co^{2+}$  iyonunu kullanan *Thermoanaerobacterium thermosulfigenes* bakterisi ksiloz izomerazı Trp 48, Phe 59, Trp 138, Phe 144 ve Trp 187 amino asitleri üzerinde mutasyon çalışmaları yapılarak bu amino asitlerin ısı kararlılık üzerindeki etkileri belirlenmeye çalışılmıştır (Meng vd., 1993). Yapılan bu çalışmalar ile Trp187His ve Phe144Lys mutantlarının  $75^{\circ}C$ 'de sıcaklık muamelesine dayanıklı olmadığı ve enzimin aktivitesini kaybettiği gösterilmiştir. Buradan Trp187 ve Phe144 amino asitlerinin hidrofobik karakterlerinin yüksek sıcaklıklarda enzim yapısının korunmasında etkili olduğu sonucu çıkarılmıştır. Bunlara ilave olarak, Trp138 amino asitinin Phe, Ala ya da Met gibi daha küçük hidrofobik yan gruplara sahip amino asitlerle mutasyonu ile enzimin ısı kararlılığını  $85^{\circ}C$  de %43 ile %91 oranında arttırdığı gözlenmiştir. Ayrıca Trp48Arg mutasyonunun enzimin aktivitesinde herhangi bir değişiklik yapmadan ısı kararlılığı %60 oranında arttırdığı gözlenmiştir. Yapılan bir diğer çalışmada ise Phe95His mutantının yaban tipe göre ısı kararlılığının ve yarı ömrünün daha az olduğu anlaşılmıştır (Cha vd., 1994). *Streptomyces rubiginosus* KI'nın His219 rezidüsünde enzimin ısı kararlılığı ve aktivitesinin araştırılması amacıyla site-directed mutasyon yapılmıştır. His219'un Ser, Glu ve Asn ile yaptığı süstitüsyonların enzimin  $K_{cat}$  değerinde sadece %0,3–0,5 artışa sebep olduğu belirtilmiştir. Fakat bu çalışmada  $K_M$  değerlerinin 30–50 kat arttığı görülmüştür. His219Lys mutantının ise aktivitede önemli bir değişikliğe neden olmadığı ifade edilmiştir. (Hartley vd., 2000)

### 1.7.2. Aktif Bölge Mutasyonları

KI enziminin aktif bölgesinde bulunan amino asitlerin belirlenmesinin ardından enzim aktivitesini arttırmak amacıyla birçok aktif bölge mutasyonu çalışması yapılmıştır. Bu çalışmalardan bazıları aktiviteyi azaltarak bazıları ise arttırarak sonuçlanmaktadır (Hartley vd., 2000). Gerçekleştirilen bir çalışmada, *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*'den elde edilen KI'nın yapılan site-directed mutasyon ile substrat bağlanma bölgesi değiştirilmiş ve sonuç olarak enzimin substrat tercihi ksilozdan glukozaya yönelmiştir. Bu çalışmada, Trp138'in Phe ile yer değişimi glukoz için yüksek katalitik aktiviteye sahip bir enzimin üretilmesine neden olmuştur. Ayrıca ksiloz için  $K_M$  değerini yükseltmiş ve enzimin katalitik aktivitesini azaltmıştır. Bu mutant enzimin ksiloz molekülünün girebilmesi için geniş bir aktif bölgeye sahip olduğunu fakat mutasyonun ksilozun bağlanma etkinliğini zayıflattığını göstermektedir.

### 1.8. *Anoxybacillus gonensis* G2<sup>T</sup> Ksiloz İzomeraz Çalışmaları

Laboratuvarımızda daha önceden *Anoxybacillus gonensis* G2 ksiloz izomerazının yaban tipi saflaştırılmış ve saflaştırılan enzimin kinetik parametreleri, optimum sıcaklık ve pH'sı, pH ve ısıl kararlılıkları, aktivatörleri ve inhibitörleri belirlenmiştir (Yanmış, 2008). Yapılan bu çalışmalar sonucunda *Anoxybacillus gonensis* G2 ksiloz izomerazının yüksek KI aktivitesine sahip olduğu anlaşılmıştır. Yaban tip enzimin optimum olarak 85 °C'de, pH 6,5'da çalıştığı sonucuna varılmıştır. Cd<sup>+2</sup>, Hg<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup>, Fe<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup> metal iyonlarının enzimin aktivitesini %20'nin altına düşürdüğü sonucuna varılmıştır. Yüksek sıcaklıklarda ve pH 6 ile 6,5 arasında da aktivitesini koruduğu anlaşılmıştır. Yapılan metal iyonu ihtiyacı çalışmalarında ise Co<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup> ve Mn<sup>+2</sup>'yi aktivatör olarak kullandığı fakat en iyi aktiviteyi 5 mM'lık Mn<sup>+2</sup> varlığında gösterdiği anlaşılmıştır (Yanmış, 2008).

### 1.9. Genin Klonlanması ve Mutasyon Çalışmaları

*Anoxybacillus gonensis* G2 ksiloz izomerazının biyokimyasal özelliklerinin ve kinetik parametrelerinin geliştirilmesi amacıyla daha önceden moleküler biyoloji laboratuvarımızda, *Anoxybacillus gonensis* *xylA* geni pET28a+ ekspresyon vektörüne



klonlandı. Genin 137. amino asitini (triptofan) kodlayan nükleotidler değiştirilerek fenilalaninli ve 184. amino asiti (valin) kodlayan bazlar değiştirilerek serinli enzim üreten çifte mutasyonlu klonlar yapıldı. Mutant geni içeren pET28a+ (pGI-W137F/V184S) *E.coli* BL21 hücrelerine aktarılıp, ekspreslenerek mutant KI enzimi (KI W137F/V184S) elde edildi (Bhosale vd., 1996).

Aynı şekilde ksiloz izomeraz enziminin 137. amino asiti (triptofan) kodlayan bazlar değiştirilerek fenilalaninli ve 184. amino asiti (valin) değiştirilerek treoninli enzim üreten çifte mutasyonlu klonlar oluşturuldu. Mutant geni içeren pET28a+ (pGI- W137F/V184T) *E.coli* BL21 hücrelerine aktarılıp ekspreslenerek mutant KI enzimi (KI W137F/V184T) elde edildi.

Bu amaç doğrultusunda mutasyonları gerçekleştirebilmek için Tablo 2’de belirtilen primer çiftleri kullanıldı. Yapılan mutasyon çalışmaları “QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent, Stratagene, Santa Clara, CA, USA)” protokolüne göre gerçekleştirildi.

Tablo 2. Mutasyonların gerçekleştirilmesinde kullanılan primerler

W137F_F01	5'-AAC CAA gTT gCT TTT CAA TAC AgC TAA TTT ATT TAC AC-3'
W137F_R01	5'-gTg TAA ATA AAT TAg CTg TAT TgA AAA gCA ACT Tgg TT-3'
V184S_F01	5'-ggT gCA gAA AAC TAT TCA TTC Tgg ggC ggg C-3'
V184S_R01	5'-gCC CgC CCC AgA ATg AAT AgT TTT CTg CAC C-3'
V184T_F01	5'-ggT gCA gAA AAC TAT ACC TTC Tgg ggC ggg C-3'
V184T_R01	5'-gCC CgC CCC AgA Agg TAT AgT TTT CTg CAC C-3'

\*K= G ve T      \*M= C ve A

*E.coli* BL21 içerisinde bulunan *A.gonensis* G2 ksiloz izomeraz genini taşıyan vektör (pETG2GI), 1 gece büyütüldüğü kültürden plazmit izolasyon kiti kullanılarak izole edildi. İlgili mutasyon primerleri ile pETG2GI, PCR aracılığı ile çoğaltıldı. Bu amaçla yapılan PCR’da Taq DNA polimeraz yerine 25 kb’a kadar zincir sentezleyebilen yüksek doğruluğa sahip bir DNA polimeraz (Roche Expand Long Range DNA Polimeraz) enzimi kullanıldı. 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. Böylece PCR ürünü, kesim reaksiyonu için uygun hale getirilmiş oldu. Bunun ardından 50 µl son hacimde 10 ünite *DpnI* enzimi ile 37 °C’de 2

saat boyunca kesildi. *DpnI* enzimi metillenmiş GATC dizisini 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  $\text{CaCl}_2$  transformasyon metodu ile *E.coli* DH5 $\alpha$  suşuna aktarıldı. (Üretilen PCR fragmentlerinin iki ucu birbirine komplementer olduğundan, hücrede bu uçlar rekombine olur ve PCR ürünü bir plazmit halini alır). Kanamisin ihtiva eden LB katı besiyerine ekilerek buradan büyüyen hücrelerden plazmit izolasyonu yapıldı. İzole edilen plazmitler sekans ettirilerek ilgili mutasyonların olup olmadığı araştırıldı. Sekans sonuçlarına göre mutasyonların her birinin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği görüldü.

Bu tez çalışması kapsamında yukarıda belirtilen Ksiloz İzomeraz mutantlarının (W137F/V184T ve W137F/V184T) ekspresyonu, saflaştırılması ve karakterizasyonu amaçlanmıştır.

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Kullanılan Materyal ve Kimyasallar

Tripton (Merck V441613949), Yeast Ekstrakt (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 (Melford Lab 14271), CoCl<sub>2</sub> (Applichem 25,559-9).

### 2.2. Tamponların Hazırlanması

Asetat tamponu (pH 5; 50 mM; 50 ml): 0,34 g Sodyum Asetat (CH<sub>3</sub>COONa.3H<sub>2</sub>O) tartılır, bir miktar suda çözülür, Asetik asit ile pH ayarı yapıldıktan sonra su ile 50 ml'ye tamamlanır.

Asetat tamponu (pH 5,5; 50 mM; 50 ml): 0,34 g Sodyum Asetat (CH<sub>3</sub>COONa.3H<sub>2</sub>O) tartılır, bir miktar suda çözülür, Asetik asit ile pH ayarı yapıldıktan sonra su ile 50 ml'ye tamamlanır.

Asetat tamponu (pH 6; 50 mM; 50 ml): 0,34 g Sodyum Asetat (CH<sub>3</sub>COONa.3H<sub>2</sub>O) tartılır, bir miktar suda çözülür, Asetik asit ile pH ayarı yapıldıktan sonra su ile 50 ml'ye tamamlanır.

MOPS tamponu (pH 6,5; 50 mM; 50 ml): 0,52 g MOPS (C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>4</sub>S) tartılır, bir miktar suda çözülür, NaOH ile pH ayarı yapıldıktan sonra su ile 50 ml'ye tamamlanır.

MOPS tamponu (pH 7; 50 mM; 50 ml): 0,52 g MOPS (C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>4</sub>S) tartılır, bir miktar suda çözülür, NaOH ile pH ayarı yapıldıktan sonra su ile 50 ml'ye tamamlanır.

MOPS tamponu (pH 7,5; 50 mM; 50 ml): 0,52 g MOPS (C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>4</sub>S) tartılır, bir miktar suda çözülür, NaOH ile pH ayarı yapıldıktan sonra su ile 50 ml'ye tamamlanır.

MOPS tamponu (pH 8; 50 mM; 50 ml): 0,52 g MOPS (C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>4</sub>S) tartılır, bir miktar suda çözülür, NaOH ile pH ayarı yapıldıktan sonra su ile 50 ml'ye tamamlanır.

Tris-HCl tamponu (pH 8,5; 50 mM; 50 ml): 0,3 g Tris (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>5</sub>) tartılır, bir miktar suda çözülür, HCl ile pH ayarı yapıldıktan sonra su ile 50 ml'ye tamamlanır.

Tris-HCl tamponu (pH 9; 50 mM; 50 ml): 0,3 g Tris (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>5</sub>) tartılır, bir miktar suda çözülür, HCl ile pH ayarı yapıldıktan sonra su ile 50 ml'ye tamamlanır.

Glisin tamponu (pH 9,5; 50 mM; 50 ml): 0,18 g Glisin (NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH) tartılır, bir miktar suda çözülür, NaOH ile pH ayarı yapıldıktan sonra su ile 50 ml'ye tamamlanır.

Glisin tamponu (pH 10; 50 mM; 50 ml): 0,18 g Glisin (NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH) tartılır, bir miktar suda çözülür, NaOH ile pH ayarı yapıldıktan sonra su ile 50 ml'ye tamamlanır.

Glisin tamponu (pH 10,5; 50 mM; 50 ml): 0,18 g Glisin (NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH) tartılır, bir miktar suda çözülür, NaOH ile pH ayarı yapıldıktan sonra su ile 50 ml'ye tamamlanır.

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

#### **2.3.1. Mutant Enzimlerin Üretilmesi**

KI W137F/V184S mutant genini taşıyan plazmitler (pGI-W137F/V184S) ve KI W137F/V184T mutant genini taşıyan plazmitler (pGI-W137F/V184T) *E.coli* DH5 $\alpha$  suşundan izole edilerek ekspresyonun yapılacağı *E.coli* BL21 (DE3) suşuna CaCl<sub>2</sub> transformasyon metodu ile aktarıldı. Mutant KI genini içeren klonlardan bir tanesi 250 ml'lik erlende 50  $\mu$ g/ml kanamisin içeren 50 ml LB'ye ekilerek gece boyu büyümeye bırakıldı ve oluşan kültürün O.D. ölçümü yapıldı. Bu kültür kullanılarak, 50  $\mu$ g/ml kanamisin içeren 500 ml 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 eklendi. Bu sayede enzim üretimi indüklenmiş oldu. İndükleme yapıldıktan sonra kültür yaklaşık olarak 4 saat daha büyütüldü. Büyütülen hücreler falkonlarda 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek çöktürüldü.

### 2.3.2. Ham Hücre Ekstratının Elde Edilmesi

Elde edilen pellet, pH 6,5’da hazırlanan 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM CoCl<sub>2</sub>, 50 mM MOPS tamponu içeren 1 ml reaksiyon tamponunda çözüldü. Daha sonra hücreler %80 şiddetinde, 10 saniye %100 şiddetinde, 1 devirde 5 dk Sartorius Labsonic M (BBI-8535035) kullanılarak sonike edildi. Elde edilen hücre solüsyonları 14800 rpm’de 15 dk boyunca santrifüj edildi. Pellet kısmı atıldıktan sonra, ekim için kullandığımız klonun doğruluğundan emin olmak için süpernatantta tekrar KI aktivitesi bakıldı. KI aktivitesinin var olduğuna emin olunduktan sonra kaba ekstrattan protein konsantrasyonunu, spesifik aktiviteyi belirlemek ve protein jel elektroforezinde kullanmak üzere 300 µl örnek ayrılarak enzim saflaştırma işlemlerine başlandı.

### 2.3.3. W137F/V184S ve W137F/V184T Çifte Mutant KI’ların Saflaştırılması

#### 2.3.3.1. Isı Şoku Uygulaması

Laboratuvarımızda daha önceden yapılan KI enziminin saflaştırılma çalışmalarından yola çıkılarak, elde edilen kaba ekstrat 15 dk süreyle 85 °C’de bekletildi. Denatüre olan proteinleri uzaklaştırmak için 15 dk 14800 rpm’de santrifüj yapıldı. Çöken kısım uzaklaştırılarak süpernatant alındı. Enzimin aktivitesini koruduğundan emin olmak için süpernatantta tekrar KI aktivitesi bakıldı. KI aktivitesinden emin olduktan sonra kaba ekstratta protein konsantrasyonunu, spesifik aktiviteyi belirlemek ve protein jel elektroforezinde kullanmak üzere 300 µl örnek ayrılarak iyon değişimi kromatografisi basamağına geçildi. *A. gonensis* G2<sup>T</sup> *xylA*’nın kodladığı ksiloz izomeraz oldukça termofilik karakterli bir enzimdir. *E.coli* BL21/pETG2GI sistemi ile üretilen KI enzimi de (ki buna mutant enzimler de dâhil) termofilik karakter taşımaktadır. Dolayısı ile ekspresyon vektöründen ifade edilen enzimimiz dışında diğer tüm proteinler (*E.coli* BL21 hüresine ait) mezofilik karakterde olduklarından dolayı kısa bir sıcak şoku uygulamasında bu proteinlerin çok büyük bir bölümü denatüre olmaktadır. Termofilik karakterli KI enzimi ise bu durumdan etkilenmemektedir. Denatüre olan proteinler, santrifüjleme ile çöktürülerek uzaklaştırılabildi ve böylece KI enziminin saflaştırılma basamaklarından ilki gerçekleştirilmiş oldu.

### 2.3.3.2. İyon Değişim Kromatografisi

İyon değişim kromatografisi için 30 cm uzunluğunda ve 1,5 cm çapında bir kolon kullanıldı. Kolon malzemesi olarak DEAE-Sepharose Fast Flow (Sigma) kullanıldı. Kolon malzemesi ve deneyde kullanılan tüm tamponların gazları vakum pompası kullanılarak alındı. Gazı alınmış olan kolon malzemesi oda sıcaklığına getirildikten sonra bir pastör pipeti yardımıyla yavaş bir şekilde kolona dolduruldu. Kolon, 0,5 mM CoCl<sub>2</sub> ve 5 mM MgSO<sub>4</sub> içeren 20 mM MOPS (pH:6,5) içeren 250 ml tampon ile dengeye getirildi. Sıcaklık uygulamasından elde edilen enzim içeren örnek kolona akış hızı 1 ml/dk olacak şekilde yüklendi. Numunenin kolona yüklenmesinden sonra, tutunmayan proteinlerin kolondan uzaklaştırılması için 25–30 ml kadar tampon kolondan geçirildi. Kolondan çıkan örnekler bir tüp içerisinde biriktirilip bu tüp içerisinde ksiloz izomeraz aktivitesi arandı. Daha sonra kolonun NaCl konsantrasyonu sıfırdan başlayarak 0,6 Molara kadar yükseltildi. Bunun için 0–0,6 M NaCl gradient köprüsü kullanıldı (İki beher içerisine 200 ml tampon koyulup kaplardan birisinin içerisine 0,6 M olacak şekilde NaCl ilave edildi. Beherler arasındaki tampon geçişi ince bir cam boru ile sağlandı. Peristaltik pompa 0 Molar tuz içeren tampondan sıvı çektikçe, 0,6 M tuz içeren beher içerisindeki tamponun 0 M tuz içeren behere geçişi sağlandı ve böylelikle tuz konsantrasyonu dereceli olarak arttırıldı). Kolondan çıkan fraksiyonlar 3,0 ml olacak şekilde cam tüpler içerisinde biriktirildi. Fraksiyonlardaki protein miktarı 280 nm dalga boyunda yapılan ölçümler sonucu belirlendi. Ayrıca tüm fraksiyonlarda ksiloz izomeraz aktivitesine bakıldı. KI aktivitesi bulunan fraksiyonlar bir araya toplandı. Toplanan enzim özütü (saflaştırma tablosu için gerekli verilere ulaşıldıktan sonra) 50000 Dalton MWCO vivaspin consantrator kullanılarak 7500Xg'de 10 dk santrifüj edilerek yoğunlaştırıldı (Lama vd., 2001). Aktivite tespiti yapılan örnekler toplanarak SDS-PAGE elektroforezinde gösterildi.

### 2.3.3.3. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi

Hidrofobik etkileşim kolon kromotografisi için 20 cm uzunluğunda ve 0,75 cm çapındaki bir kolon kullanıldı. Bu çalışmada kolon malzemesi olarak Phenyl sepharose 6 (Sigma) Fast Flow kullanıldı. Kolon malzemesinin gazı vakum pompası ile alındı ve oda sıcaklığına geldikten sonra bir pastör pipeti kullanılarak kolona yavaş bir şekilde dolduruldu. Kolon doldurma işlemi bittikten sonra 1,3 M amonyum sülfat içeren 100 ml

tampon (0,5 mM CoCl<sub>2</sub> ve 5 mM MgSO<sub>4</sub> içeren 20 mM MOPS tamponu (pH 6,5)) ile kolon reçinesi dengeye getirildi. İyon değişim kromatografisinden elde edilen enzim özütü ise 2,6 M amonyum sülfat içeren tampon ile bire bir oranında seyreltilerek özütün amonyum sülfat içeriğinin 1,3 M olması sağlandı. Özüt kolona yüklenerek yüksek amonyum sülfat konsantrasyonunda proteinlerin hidrofobik kolon malzemesine bağlanması sağlandı. Daha sonra kolonun amonyum sülfat içeriği 1,3 molardan 0 molara düşürüldü. Bunun için 100'er ml'lik amonyum sülfat gradient köprüsü kullanıldı. Tamponun akış hızı 0,5 ml/dk olarak ayarlanarak kolondan çıkan fraksiyonlar cam tüpler içinde 1,7 ml olacak şekilde toplandı. Fraksiyonlardaki protein miktarı 280 nm dalga boyunda yapılan ölçümler sonucu belirlendi. Ayrıca tüm fraksiyonlarda ksiloz izomeraz aktivitesi araştırıldı. KI aktivitesi bulunan fraksiyonlar bir araya toplandı. Bir araya getirilen bu enzim solüsyonu ile karakterizasyon çalışmaları başlatıldı (Lama vd., 2001). Aktivite gösteren fraksiyonlar toplanarak SDS-PAGE'e yüklendi ve elektroforez işlemi gerçekleştirildi.

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.

#### **2.3.3.4. Metal İyonlarının Uzaklaştırılması**

Kobalt klorür ve magnezyum sülfat metal iyonları, enzimin glukoz izomeraz aktivitesi için kofaktör olarak çalışmaktadırlar. Enzimin ksiloz izomeraz aktivitesi için ise kofaktör olarak mangan sülfat gereklidir. Bu sebepten dolayı enzimin preparasyonunun glukoz izomeraz kofaktörlerinden arındırılması gerekmektedir. Bunun için, W137F/V184S ve W137F/V184T mutasyonlarının ksiloz izomeraz enziminin karakteristik özellikleri üzerine etkisini araştırmak amacıyla içerisinde 0,2 M EDTA içeren (Kobalt klorür ve magnezyum sülfat metal iyonlarını uzaklaştırmak için) 2 litre 20 mM MOPS pH 6,5 tamponuna karşı bir gece boyunca diyaliz edildi (Smith vd., 1991). Böylece enzimimiz, glukoz izomeraz için aktivatör olarak kullanılan kobalt klorür ve magnezyum sülfat metal iyonlarından arındırılmış oldu. Saflaştırma işlemleri esnasında kobalt klorür ve magnezyum sülfat kullanılmasının sebebi ise bu metal iyonları ile enzimin daha kararlı

olarak saflaştırılabilmesidir. Çünkü enzimimiz kobalt ilavesi ile daha kararlı hale gelmekte ve saflaştırma sonrasında kararlı olarak kalabilmektedir. Saflaştırma öncesinde tamponlar kobaltdan arındırılarak saflaştırma yapılırsa, enzim hem glukoz hem de ksiloz aktivitesinde önemli kayıplara uğramaktadır. Bundan sonraki çalışmalarda ksiloz izomeraz aktivitesi için reaksiyon tamponu olarak, 1 mM mangan sülfat içeren 50 mM MOPS pH 7,5 tamponu kullanıldı.

## **2.4. Biyokimyasal Çalışmalar**

### **2.4.1. Protein Konsantrasyonu Tayini**

Yapılan bütün çalışmalarda protein miktarının tayini Bradford (1976)'ya göre yapıldı. 100 ml boya çözeltisi hazırlamak için 10 mg Commasie Brilliant Blue G-250, 5 ml %95'lik etanol içerisinde iyice çözülerek üzerine 10 ml %85'lik fosforik asit ilave edildi ve saf su ile 100 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti filtre kağıdı ile karanlık bir ortamda süzülerek temizlendi. Hazırlanan boya, boyanın yapısının güneş ışığından etkilenip bozulmaması amacıyla karanlık bir ortamda ve kahverengi cam şişe içerisinde saklanmalıdır.

Hazırlanan kalibrasyon eğrisinde standart olarak bovin serum albumin (BSA) kullanıldı. Kalibrasyon eğrisi için; 2, 4, 6, 10, 15, 20, 40, 60, 80 µg BSA içeren çözeltiler 0,15 M'lık NaCl ile 100 µl'ye tamamlandı. Ardından üzerine 5 ml yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan boya çözeltisinden ilave edildi ve nazikçe vorteksenerek 10 dakika oda sıcaklığında beklemeye bırakıldı. Elde edilen örnekler için BSA yerine değişik miktarlarda hücre ekstratı kullanılarak aynı işlemler gerçekleştirildi. Bekleme süresinin sonunda Agilent 8453E UV-visible Spectroscopy System cihazı kullanılarak 595 nm'de ölçümler yapıldı ve protein miktarı µg/µl cinsinden hesaplandı (Bradford, 1976).

### **2.4.2. Ksiloz İzomeraz Aktivite Deneyi**

KI aktivite deneyi Belfaquih ve arkadaşları (2000) tarafından geliştirilmiş olan bir yöntemdir. Reaksiyon 15 µl hücre özütü kullanılarak, (W137F/V184S için 250 mM, W137F/V184T için 100 mM) Ksiloz, 1 mM MnSO<sub>4</sub> içeren 50 mM MOPS pH 7,5



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-sülfürik asit yöntemi ile belirlendi. Reaksiyon çözeltisi üzerine 40 µl %1,5'lik sistein hidroklorür konuldu. Bunu takiben 40 µl % 0,12'lik karbozol ilave edildi. Oluşan karışım vortekslendikten sonra üzerine 1,2 ml %70'lik sülfürik asit ilave edilerek tekrar vortekslendi. Karışım 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Ölçümler 540 nm dalga boyunda gerçekleştirildi. Reaksiyonlarda açığa çıkan ksiluloz miktarını hesaplamak için ksiluloz standardı hazırlandı ve standart grafik spektrofotometreye yüklenerek daha 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 düzenlendi.

## **2.5. Mutant Enzimlerin Karakterizasyonu**

### **2.5.1. Reaksiyonlarda Kullanılacak Enzim Miktarının Belirlenmesi**

Deneyleerde kullanılacak enzim miktarını belirlemek için; 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 MnSO<sub>4</sub> içeren 50 mM MOPS (pH 7,5) tamponunda 200 mM ksiloz varlığında 85°C'de 30 dk süre ile gerçekleştirildi. Reaksiyonlar sonucunda enzim miktarı – aktivite (%) grafiği oluşturularak karakterizasyon çalışmalarında kullanılacak enzim miktarı belirlendi. Enzim miktarını belirlerken dikkat edilmesi gereken en önemli husus belirlediğimiz enzim miktarını kullandığımızda daha sonraki çalışmalarda Lambert-Beer kanununa göre ölçüm sonuçlarında verilerin gerçek değerlerinin altında görünmesine neden olacak bir enzim miktarı seçmemek. Bu nedenle enzim miktarı-KI aktivite grafiğinde enzim miktarının ve aktivitenin doğrusal artış gösterdiği yani enzimin yarı doygun olduğu bir noktadaki enzim miktarı deneyleerde kullanılmak üzere seçildi. Bu enzim miktarı her iki mutasyon için de 15 µl olarak belirlendi.

### 2.5.2. Enzim Kinetiği

KI W137F/V184S ve KI W137F/V184T mutasyonlarının ksiloz izomeraz enziminin ksiloza olan ilgisini belirlemek amacıyla 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 ve 500 mM ksiloz kullanılarak reaksiyonlar gerçekleştirildi. Deneyle, 1 mM Mangan sülfat içeren 50 mM MOPS (pH 7,5) tamponunda, 100 µl son hacimde, 85°C’de, 30 dk, Biometra Personal Cycler PCR cihazında yapıldı. Ksiloz izomeraz aktivitesi açığa çıkan ksiluloz miktarının belirlenmesi ile hesaplandı. Ölçümler sırasında ksilozdan kaynaklanan interferans sorunu; aynı derişimde ksiloz içeren krler kullanılarak ortadan kaldırıldı. Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ) ve maksimum hız ( $V_{max}$ ) değerleri OriginPro 8.1-analiz programı kullanılarak çizilen Michaelis-Menten eğrisi ile belirlendi. Ayrıca Michaelis-Menten eğrisi kullanılarak çalışmaların bundan sonraki kısımlarında kullanılacak olan substrat miktarı belirlendi. Bu amaç doğrultusunda Michelis-Menten eğrisinde enzimin sustrata doyduğu alandan seçilen substrat miktarı bir sonraki çalışmalar için kullanılacak olan substrat miktarı olarak belirlendi.

### 2.5.3. Optimum Sıcaklık

KI W137F/V184S ifte mutasyonunun ksiloz izomeraz enziminin en iyi çalışma sıcaklığı üzerine etkisi, pH’sı 7,5 olan 1 mM MnSO<sub>4</sub> içeren 50 mM MOPS tamponu içerisinde 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100°C’de 250 mM ksiloz konsantrasyonunda (Michelis-Menten eğrisinde enzimin substrata doyduğunu gösteren grafiğin düzleştiği kısımdan seçilerek belirlendi) BioRAD Thermal Cycler cihazında yapılan aktivite deneyleriyle bulundu. Aynı Şekilde, KI W137F/V184T ifte mutasyonunun ksiloz izomeraz enziminin en iyi çalışma sıcaklığı üzerine etkisi, pH’sı 7,5 olan 1 mM MnSO<sub>4</sub> içeren 50 mM MOPS tamponu içerisinde 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100°C’de, 100 mM ksiloz konsantrasyonunda (substrat doygunluk değer) BioRAD Thermal Cycler cihazında yapılan aktivite deneyleriyle belirlendi. Mutant enzim aktivitesi için belirlenen optimum sıcaklık daha sonraki deneylerde reaksiyon sıcaklığı olarak kullanıldı ( Lee vd., 1990).

#### **2.5.4. Optimum pH**

KI W137F/V184S ve KI W137F/V184T çifte mutasyonlarının ksiloz izomeraz aktivitesinin pH'sı üzerine etkisi, pH 5 - 5,5 - 6 aralığı için 50 mM asetat tamponunda; pH 6,5 - 8 aralığı için 50 mM MOPS tamponunda; pH 8,5 - 9,0 aralığı için 50 mM Tris-HCL tamponunda ve pH 9,5 -10,5 aralığı için 50 mM glisin tamponunda, KI W137F/V184S için 250 mM, KI W137F/V184T için 100 mM ksiloz konsantrasyonunda, 85°C'de 30 dakika, BioRAD Thermal Cycler cihazında gerçekleştirilen deneyler sonucunda belirlendi. Belirlenen optimum pH daha sonraki karakterizasyon deney şartlarında kullanılacak olan reaksiyon pH'sı olarak belirlendi (Lee vd., 1989).

#### **2.5.5. Mutasyonların Isıl Kararlılığı Üzerine Etkisi**

KI W137F/V184S ve W137F/V184T çifte mutasyonlu ksiloz izomeraz enziminin ısıl kararlılığını belirlemek için saflaştırılan enzim özütü 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100°C'lerde 30 dakika boyunca inkübe edildi. Bu tüplerden örnekler alınarak, optimum çalışma şartlarında (KI W137F/V184S için 250 mM, KI W137F/V184T için 100 mM ksiloz, 1 mM MnSO<sub>4</sub> varlığında 100 µl son hacimde ve 85°C'de 30 dk boyunca pH 7,5 olan MOPS tamponunda) aktivite ölçümü yapıldı ve enzimin kalan aktivitesi hesaplandı (Lee vd., 1989).

#### **2.5.6. Mutasyonların pH Kararlılığı Üzerine Etkisi**

Mutant enzimlerin pH kararlılığını belirlemek için enzimler, 1 mM MnSO<sub>4</sub> içeren; 50 mM asetat tamponunda pH 5 - 6; 50 mM MOPS tamponunda pH 6,5 - 8; 50 mM Tris-HCL tamponunda pH 8,5 - 9,0 değerlerinde ve 50 mM glisin tamponunda pH 9,5-10,5 değerlerinde 85°C'de inkübe edildi. Çeşitli zaman aralıklarında inkübe edilen enzimlerden 15'er µl alınarak optimum çalışma şartlarında aktivite ölçümü yapıldı ve enzimin kalan aktivitesi hesaplandı (Tilbeurgh vd., 1992). İlk anda alınan aktivite ölçümü % 100 olarak kabul edildi.

### 2.5.7. Aktivatör Etkisi

Genel olarak,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  ve  $\text{Mg}^{+2}$  bivalent metal iyonlarının KI'lar için aktivatör oldukları bilinmektedir (Belfaquih vd., 2000). Bu metal iyonlarının mutant enzimler üzerinde olan aktivatör etkisi optimum reaksiyon şartlarında incelendi. Her bir metal iyonu, reaksiyon karışımında 1, 5, 10 ve 30 mM nihai konsantrasyonda kullanılarak etkin oldukları konsantrasyon belirlendi (Vieille vd., 2001).

### 2.5.8. İnhibitör Etkisi

Mutant enzimler üzerine metal iyonlarının inhibitör etkisi;  $\text{Cd}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Hg}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$  ve  $\text{Cu}^{+2}$  bivalent metal iyonlarının klorür ve sülfat tuzları ile gerçekleştirildi. Reaksiyonlar, enzimin çalıştığı optimum reaksiyon şartlarında 1 mM nihai konsantrasyonda inhibitör metal iyon varlığında gerçekleştirildi.

## 2.6. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Protein jel elektroferezleri, Hoeffler SE 600 marka elektroferezde %12'lik jel kullanılarak 15 mA'lık akım altında gerçekleştirildi. *A. gonensis* G2 KI'nın moleküler ağırlığını hesaplamak için; *A. gonensis* G2 KI'ı moleküler ağırlığı belli olan bir protein markırı ile SDS poliakrilamid jel elektroforezi yöntemi ile her bir örnekten 100 µg protein kullanılarak yürütüldü. Her bir örnek üzerlerine eşit miktarda muamele tamponu (0,15 M Tris-HCl pH 6,8; %4 SDS; %20 Gliserol; %6 β-merkaptolanol) ilave edildi. Sonrasında 90°C'de 5 dakika bekletilerek ve %12'lik sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jeline (SDS-PAGE) yüklendi ve 15 mA akım altında, yürütme boyası jelden çıkana kadar yürütüldü (Maniatis ve ark. 1982). Yürütme işlemi sonrasında jel, Commasie Brilliant Blue (%0,125 Commasie Billant Blue R-250, %50 Metanol, %10 Asetik Asit) boyası ile 2-4 saat boyandı ve hemen ardından yıkama çözeltisinde (Solusyon 1: %36 Metanol, %9 Asetik Asit) 3-4 saat yıkanarak bir bilgisayar tarayıcısı ile fotoğraflandı.

### **3. BULGULAR**

#### **3.1. KI W137F/V184S ve KI W137F/V184T'nin Saflaştırılması**

##### **3.1.1. 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 Glukoz İzomeraz aktivitesi ile yapıldı. SDS-PAGE'de yürütüldü. KI W137F/V184S için elde edilen veriler Tablo 3'de, elde edilen jel görüntüsü Şekil 3'te gösterildi. KI W137F/V184T için elde edilen veriler Tablo 4'te, elde edilen jel görüntüsü Şekil 4'te gösterildi.

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

Isı şoku uygulamasının ardından elde edilen hücre özütü, iyon değişimi kolon kromatografisinden geçirildi ve fraksiyonlarda aktivite taraması yapıldı. Aktivitenin yüksek olarak gözlemlendiği fraksiyonlar birleştirildi. Fraksiyonlar birleştirildikten sonra, kısmen saflaştırılmış özütte protein konsantrasyonu tayini ve spesifik aktivite tayini Glukoz İzomeraz aktivitesi ile yapıldı. SDS-PAGE'de yürütüldü. KI W137F/V184S için elde edilen veriler Tablo 3'de, elde edilen jel görüntüsü Şekil 3'te gösterildi. KI W137F/V184T için elde edilen veriler Tablo 4'de, elde edilen jel görüntüsü Şekil 4'te gösterildi.

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

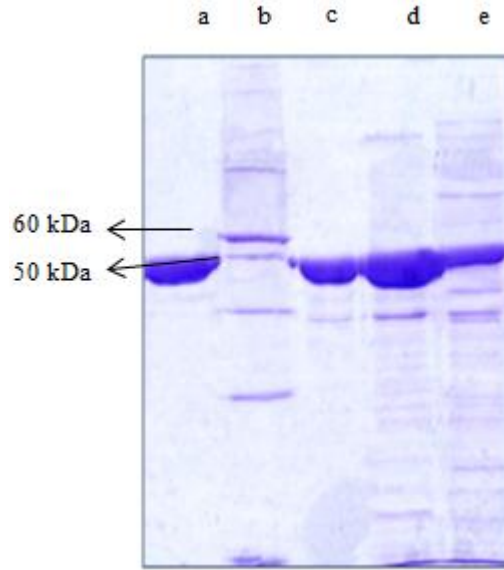
İyon değişimi kolon kromatografisi uygulamasından sonra elde edilen kısmen saflaştırılmış özüt, hidrofobik kolon kromatografisinden geçirildikten sonra fraksiyonlarda aktivite taraması yapıldı. Aktivite görülen fraksiyonlar birleştirildi. Fraksiyonlar birleştirildikten sonra, saflaştırılmış enzimin konsantrasyon tayini ve spesifik aktivite tayini GI aktivitesi ile yapıldı. SDS-PAGE'de yürütüldü. KI W137F/V184S için elde edilen veriler Tablo 3'de, elde edilen jel görüntüsü Şekil 3'te gösterildi. KI W137F/V184T için elde edilen veriler Tablo 4'de, elde edilen jel görüntüsü Şekil 4'te gösterildi.

Tablo 3. KI W137F/V184S'nin saflaştırma tablosu, (GI esas alınarak hazırlanmıştır).

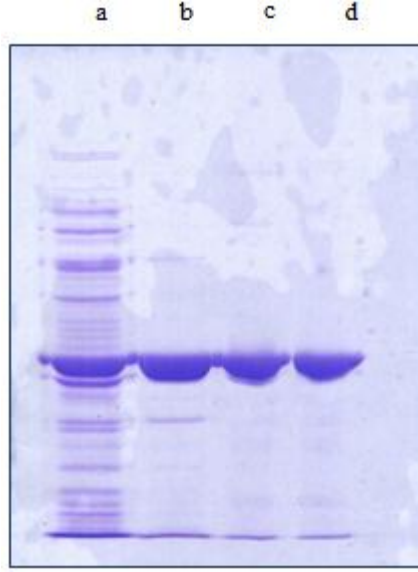
Saflaştırma basamağı	Hacim (ml)	[Protein] (mg/ml)	T.protein (mg)	T.aktivite (U)	S.aktivite (U/mg)	Verim	Saflaştırma katı
Hücre özütü	11,5	21,25	244,4	2957	12,10	100,0	1,00
Isı bozunum	9	7,75	69,8	1904	27,30	64,4	2,26
İyon değişimi (DEAE-S.)	48	1,00	48,0	1624	33,84	54,9	2,80
Hidrofobik etkileşim	36	0,62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

Tablo 4. KI W137F/V184T'nin saflaştırma tablosu, (GI esas alınarak hazırlanmıştır).

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



Şekil 3. KI W137F/V184S'nin saflaştırma sonrası SDS-PAGE jel görüntüsü a) saflaştırılmış enzim b) markır c) iyon değişimi kolon kromatografisi d) ısı şoku e) kaba ektrat



Şekil 4. KI W137F/V184T'nin saflaştırma sonrası SDS-PAGE jel görüntüsü a) kaba ekstrat b) ısı şoku c) iyon değişimi kolon kromatografisi d) saflaştırılmış enzim

### 3.2. KI W137F/V184S ve KI W137F/V184T'nin Karakterizasyonu

#### 3.2.1. Deneylerde Kullanılacak Enzim Miktarının Belirlenmesi

Substrat miktarı sabit tutularak, kademeli olarak enzim miktarı artırıldı ve enzim artışına karşılık gelen aktivite hesaplandı. Enzim miktarı-KI aktivite grafiğinde enzim miktarının ve aktivitenin doğrusal artış gösterdiği yani enzimin yarı doymuş olduğu bir noktadaki enzim miktarı deneylerde kullanılmak üzere seçildi, böylece enzimden kaynaklanan Lambert-Beer kanununa göre verilerin gerçek değerinin altında görülmesinin önüne geçildi. Buna göre her iki mutant enzim için de aktivite çalışmalarında 15  $\mu$ l (0,4  $\mu$ g) enzim kullanılmasına karar verildi.

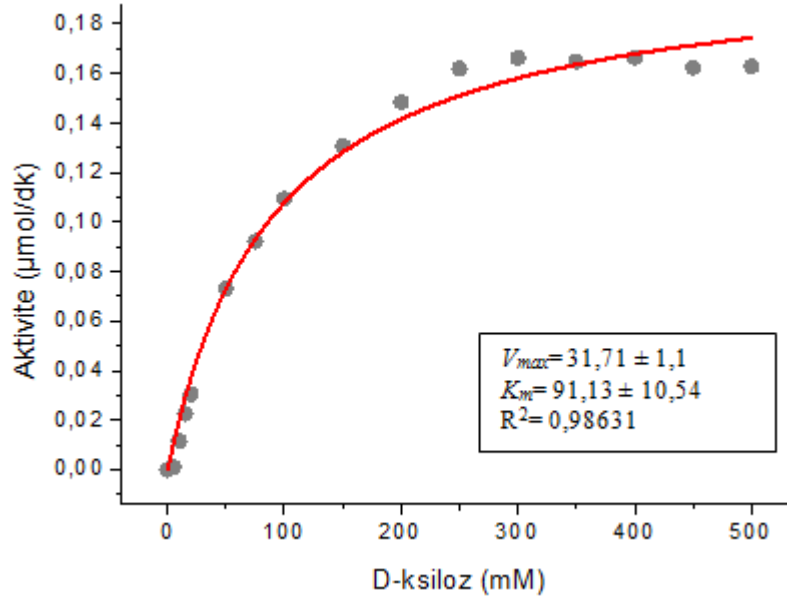
#### 3.2.2. Enzim Kinetiği

##### 3.2.2.1. KI W137F/V184S'nin Enzim Kinetiği

KI W137F/V184S mutanı için enzim kinetiği deneyleri 0,4  $\mu$ g enzim kullanılarak gerçekleştirildi. KI W137F/V184S mutantının ksiloz varlığında substrat-aktivite grafiği

çizilerek enzimin basit Michaelis-Menten kinetiğine uyduğu tespit edildi. Hazırlanan Michaelis-Menten grafiğinden elde edilen veriler doğrultusunda; KI W137F/V184S mutantının ksiloz için  $K_m$  değeri  $91,13 \pm 10,54$  mM ve  $V_{max}$  değeri ise  $31,71 \pm 1,1$   $\mu\text{mol/dk/mg}$  protein olarak hesaplandı (Şekil 5). Bu veriler doğrultusunda enzimin  $K_{cat}$  değeri  $105,82$  (1/sn), katalitik etkinliğini gösteren  $K_{cat}/K_m$  değeri  $1,161$  olarak hesaplandı.

Ayrıca Michaelis-Menten eğrisi kullanılarak çalışmaların bundan sonraki kısımlarında kullanılacak olan substrat miktarı belirlendi. Bu amaç doğrultusunda Michaelis-Menten eğrisinde enzimin sustrata doyduğu alandan seçilen substrat miktarı KI W137F/V184S için  $250$  mM olarak belirlendi.



Şekil 5. KI W137F/V184S mutantı'nın ksiloz varlığında Michaelis-Menten grafiği

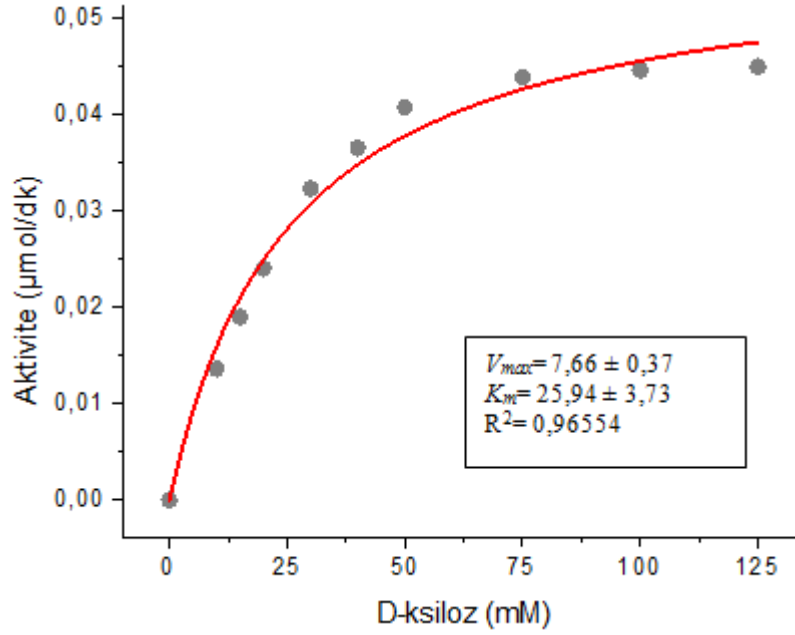
### 3.2.2.2. KI W137F/V184T'nin Enzim Kinetiği

KI W137F/V184T mutantı için enzim kinetiği deneyleri  $0,5$   $\mu\text{g}$  enzim kullanılarak gerçekleştirildi. KI W137F/V184S mutantı'nın ksiloz varlığında substrat-aktivite grafiği çizilerek enzimin basit Michaelis-Menten kinetiğine uyduğu tespit edildi. Hazırlanan Michaelis-Menten grafiğinden elde edilen veriler doğrultusunda; KI W137F/V184T mutantının ksiloz için  $K_m$  değeri  $25,94 \pm 3,73$  mM ve  $V_{max}$  değeri ise  $7,66 \pm 0,37$



$\mu\text{mol/dk/mg}$  protein olarak hesaplandı (Şekil 6). Bu veriler doğrultusunda enzimin  $K_{cat}$  değeri 25,55 (1/sn), katalitik etkinliğini gösteren  $K_{cat}/K_m$  değeri 0,985 olarak hesaplandı.

Ayrıca Michaelis-Menten eğrisi kullanılarak çalışmaların bundan sonraki kısımlarında kullanılacak olan substrat miktarı belirlendi. Bu amaç doğrultusunda Michaelis-Menten eğrisinde enzimin sustrata doyduğu alandan seçilen substrat miktarı KI W137F/V184T için 100 mM olarak belirlendi.

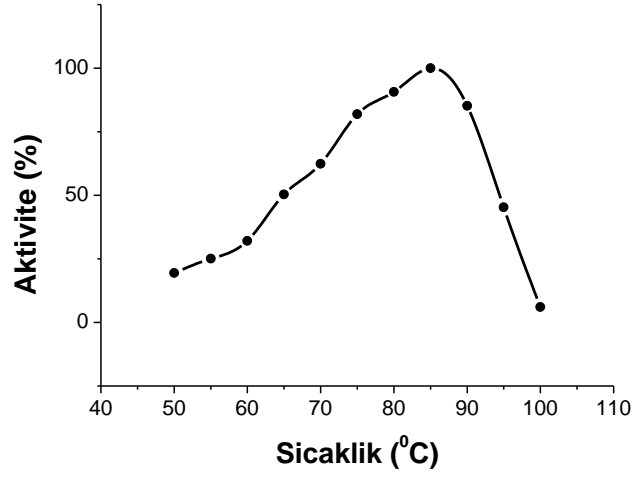


Şekil 6. KI W137F/V184T mutanıtı'nın ksiloz varlığında Michaelis-Menten grafiği

### 3.2.3. Optimum Sıcaklık

#### 3.2.3.1. KI W137F/V184S'nin Optimum Sıcaklığı

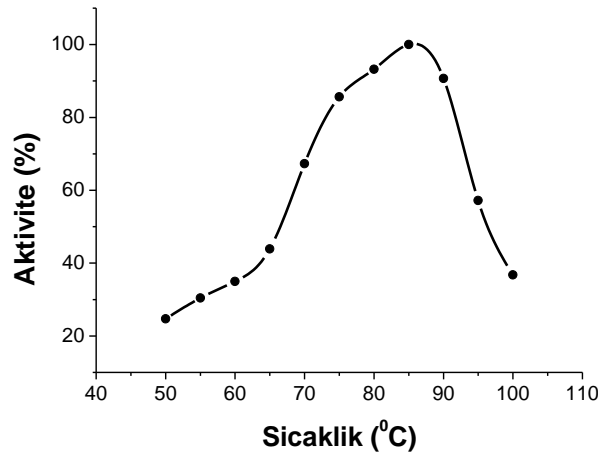
KI W137F/V184S'nin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100°C'lerde aktivitesi ölçülerek enzimin çalışmasına sıcaklığın etkisi araştırıldı ve sıcaklık-aktivite grafiği oluşturuldu. Bu sıcaklıklarda ölçülen aktivitelere göre oluşturulan sıcaklık-aktivite grafiği Şekil 7'de gösterildi. Sonuç olarak enzimin optimum sıcaklığı 85°C olarak belirlendi, sonraki deneylerde reaksiyonlar bu sıcaklıkta gerçekleştirildi.



Şekil 7. KI W137F/V184S'nin optimum sıcaklık-aktivite grafiği

### 3.2.3.2. KI W137F/V184T'nin Optimum Sıcaklığı

KI W137F/V184T'nin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100°C'lerde aktivitesi ölçülerek enzimin çalışmasına sıcaklığın etkisi araştırıldı ve sıcaklık-aktivite grafiği oluşturuldu. 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.

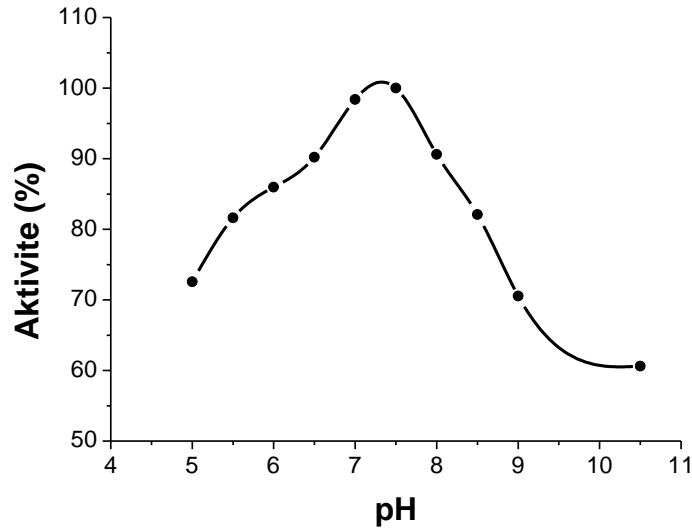


Şekil 8. KI W137F/V184T'nin optimum sıcaklık-aktivite grafiği

### 3.2.4. Optimum pH

#### 3.2.4.1. KI W137F/V184S'nin Optimum pH'sı

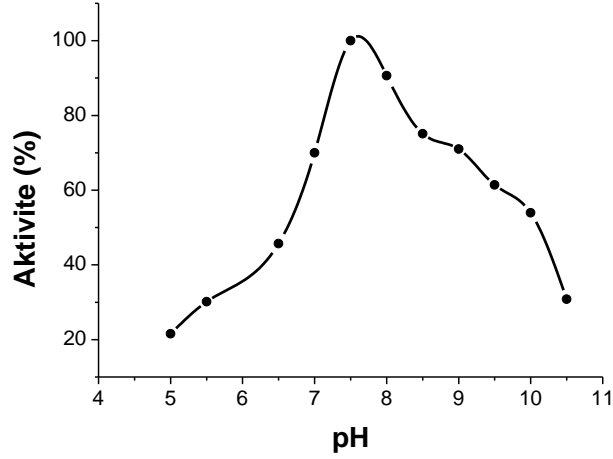
pH'nın KI aktivitesi üzerine etkisi pH 5-10,5 aralığındaki tamponlarda gerçekleştirilen bir seri reaksiyon ile incelendi. Elde edilen aktivite ölçümlerine göre pH-Aktivite grafiği oluşturuldu. Şekil 9'da görüldüğü gibi KI aktivitesi en yüksek 7,5 pH'ya sahip tamponda gözlemlendi.



Şekil 9. KI W137F/V184S'nin optimum pH-aktivite grafiği

#### 3.2.4.2. KI W137F/V184T'nin Optimum pH'sı

pH'nın KI aktivitesi üzerine etkisi pH 5-10,5 aralığındaki tamponlarda gerçekleştirilen bir seri reaksiyon ile incelendi. Elde edilen aktivite ölçümlerine göre pH-Aktivite grafiği oluşturuldu. Şekil 10'da görüldüğü gibi KI aktivitesi en yüksek 7,5 pH'ya sahip tamponda gözlemlendi.

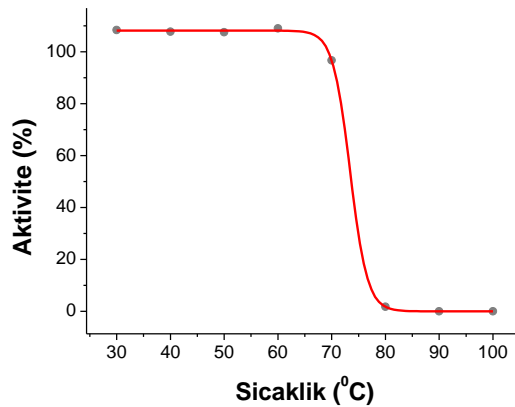


Şekil 10. KI W137F/V184T'nin Optimum pH-Aktivite grafiği

### 3.2.5. Mutasyonların Isıl Kararlılığı Üzerine Etkisi

#### 3.2.5.1. KI W137F/V184S'nin Isıl Kararlılığı

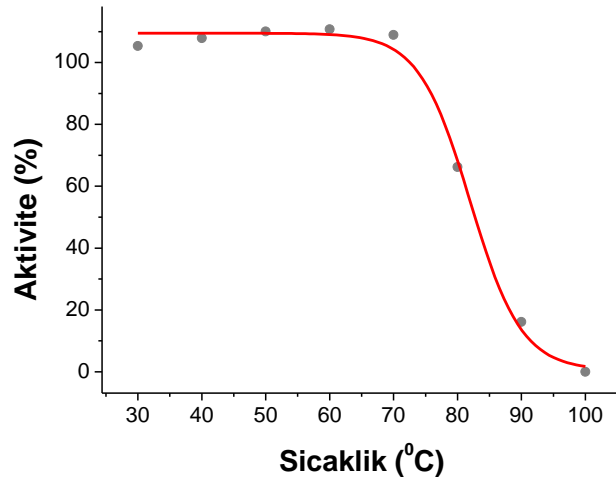
KI W137F/V184S'nin ısıl kararlılığını belirlemek için saflaştırılan enzim özütü 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100°C'lerde 30 dakika boyunca inkübe edildi. Bunun ardından optimum reaksiyon şartlarında reaksiyon gerçekleştirildi ve aktivite ölçümleri alındı. Alınan bu ölçümler değerlendirilerek bu sıcaklıklarda enzimin kararlılığı belirlendi. Yapılan deney sonucunda, Şekil 11'de görüldüğü gibi enzimin 70 °C'den sonra yarım saatlik bekleme süresinin ardından aktivitesi hızlı bir şekilde kaybettiği belirlendi. Isı muamelesine maruz kalmamış enzimin aktivite ölçüm sonucu %100 olarak kabul edildi.



Şekil 11. KI W137F/V184S'nin ısıl kararlılık grafiği, (Isı ile muamele edilmemiş enzime göre kalan aktiviteler).

### 3.2.5.2. KI W137F/V184T'nin Isıl Kararlılığı

KI W137F/V184T'nin ısıl kararlılığını belirlemek için saflaştırılan enzim özütü 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100°C'lerde 30 dakika boyunca inkübe edildi. Bunun ardından optimum reaksiyon şartlarında reaksiyon gerçekleştirildi ve aktiviteleri ölçüldü. Alınan bu ölçümler değerlendirilerek bu sıcaklıklarda enzimin kararlılığı belirlendi. Yapılan deney sonucunda, Şekil 12'de görüldüğü gibi enzimin 80 °C'den sonra yarım saatlik bekleme süresinin ardından aktivitesinin yarısını kaybettiği 90 °C'de büyük bir çoğunluğunu kaybettiği belirlendi. 100 °C'de ise enzim aktivitesini tamamen kaybetmektedir. Isı muamelesine maruz kalmamış enzimin aktivite ölçüm sonucu %100 olarak kabul edildi.

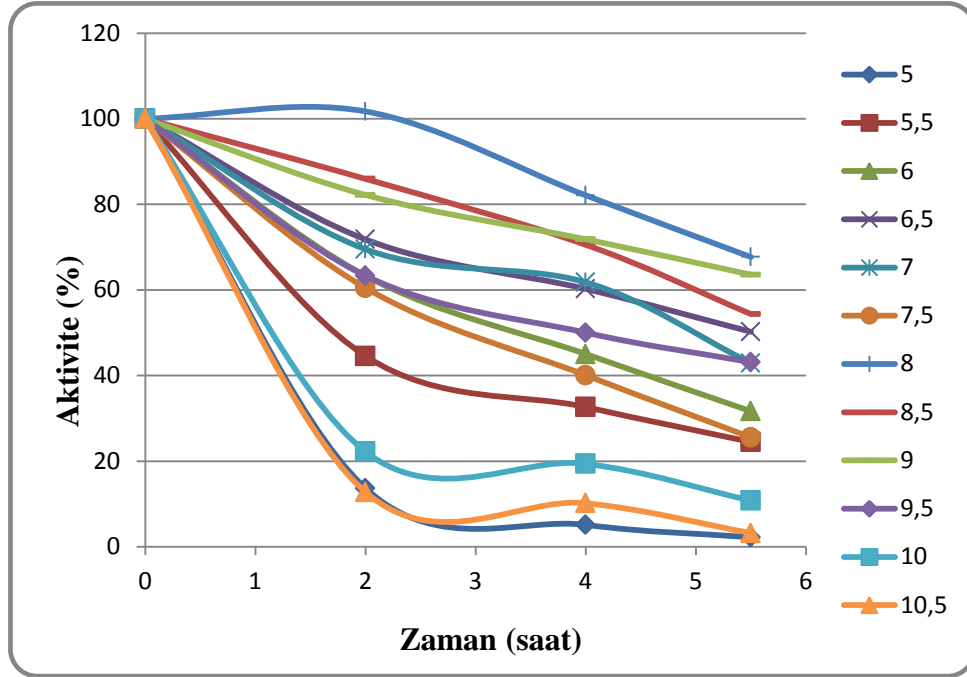


Şekil 12. KI W137F/V184T'nin ısıl kararlılık grafiği, (Isı ile muamele edilmemiş enzime göre kalan aktiviteler).

### 3.2.6. Mutasyonların pH Kararlılığı Üzerine Etkisi

#### 3.2.6.1. KI W137F/V184S'nin pH Kararlılığı

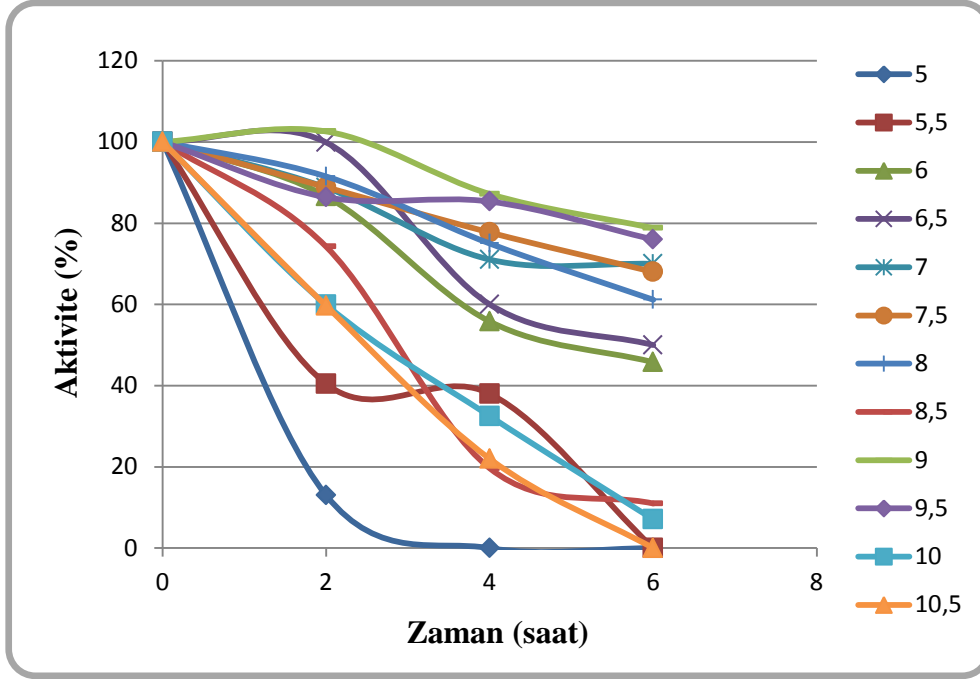
KI W137F/V184S'nin pH kararlılığını belirlemek için saf enzim özütü pH'sı 5 ile 10,5 arasında değişen tamponlar içerisinde 85°C'de 2, 4, 6 saat boyunca inkübe edildi. Çeşitli zaman aralıklarında inkübe edilen enzimlerden alınarak optimum çalışma şartlarında aktivite ölçümü yapıldı ve enzimin kalan aktivitesi hesaplandı (Şekil 13). İlk anda alınan aktivite ölçümü % 100 olarak kabul edildi. Enzimin en yüksek kararlılığı pH 8'de gösterdiği belirlendi.



Şekil 13. KI W137F/V184S'nin pH kararlılığının zamana bağlı değişim grafiği, (İlk anda alınan aktivite ölçümüne göre kalan aktiviteler).

### 3.2.6.2. KI W137F/V184T'nin pH Kararlılığı

KI W137F/V184T'nin pH kararlılığını belirlemek için saf enzim özütü pH'sı 5 ile 10,5 arasında değişen tamponlar içerisinde 85°C'de 2, 4, 6 saat boyunca inkübe edildi. Çeşitli zaman aralıklarında inkübe edilen enzimlerden alınarak optimum çalışma şartlarında aktivite ölçümü yapıldı ve enzimin kalan aktivitesi hesaplandı (Şekil 14). İlk anda alınan aktivite ölçümü % 100 olarak kabul edildi. Enzimin yüksek pH'larda daha kararlı olduğu görüldü.

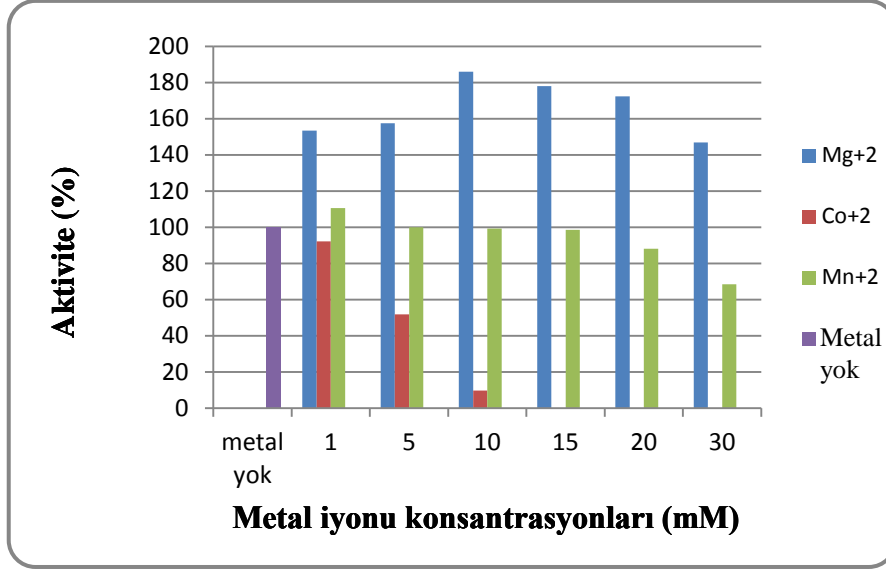


Şekil 14. KI W137F/V184T'nin pH kararlılığının zamana bağlı değişim grafiği, (İlk anda alınan aktivite ölçümüne göre kalan aktiviteler).

### 3.2.7. Aktivatör Etkisi

#### 3.2.7.1. Aktivatörlerin KI W137F/V184S Üzerine Etkisi

$\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  ve  $\text{Mn}^{+2}$  gibi bivalent katyon iyonlarının KI W137F/V184S aktivitesi üzerine olan etkisi, 1, 5, 10, 15, 20 ve 30 mM konsantrasyonlarda metal iyonu varlığında bir dizi reaksiyon ile belirlendi (Şekil 15). Yapılan çalışmalar sonucunda KI W137F/V184S çifte mutasyonu sonucu 1 mM metal iyonu varlığında sadece  $\text{Mg}^{+2}$  metal iyonunun aktiviteyi önemli ölçüde arttırdığı belirlendi. 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM ve 30 mM metal iyonu konsantrasyonlarında  $\text{Co}^{+2}$  ve  $\text{Mn}^{+2}$  metal iyonlarının herhangi bir aktivatör etkiye sahip olmadığı gözlemlendi. Bunun yanı sıra en yüksek aktivite 10 mM  $\text{Mg}^{+2}$  varlığında gözlemlendi.

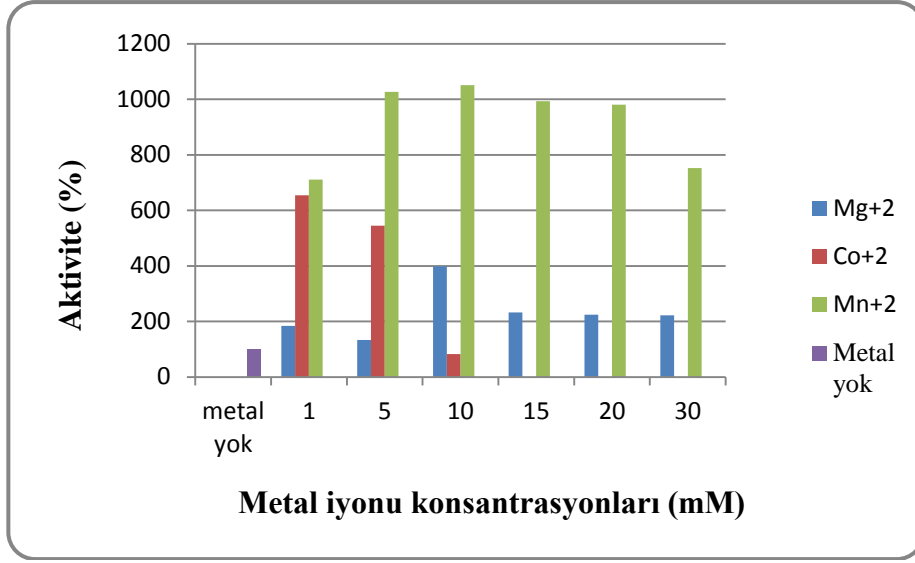


Şekil 15. KI W137F/V184S aktivitesi üzerine farklı konsantrasyonlardaki metal iyonlarının aktivatör etkisi

### 3.2.7.2. Aktivatörlerin KI W137F/V184T Üzerine Etkisi

$\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  ve  $\text{Mn}^{+2}$  gibi bivalent katyon iyonlarının KI W137F/V184T aktivitesi üzerine olan etkisi, 1, 5, 10, 15, 20 ve 30 mM konsantrasyonlarda metal iyonu varlığında bir dizi reaksiyon ile belirlendi (Şekil 16). Yapılan çalışmalar sonucunda KI W137F/V184T aktivitesi için aktivatör olarak  $\text{Mn}^{+2}$  metal iyonuna ihtiyaç duyduğu belirlenmiştir. Ayrıca en yüksek aktivite 10 mM  $\text{Mn}^{+2}$  varlığında gözlenmiştir.



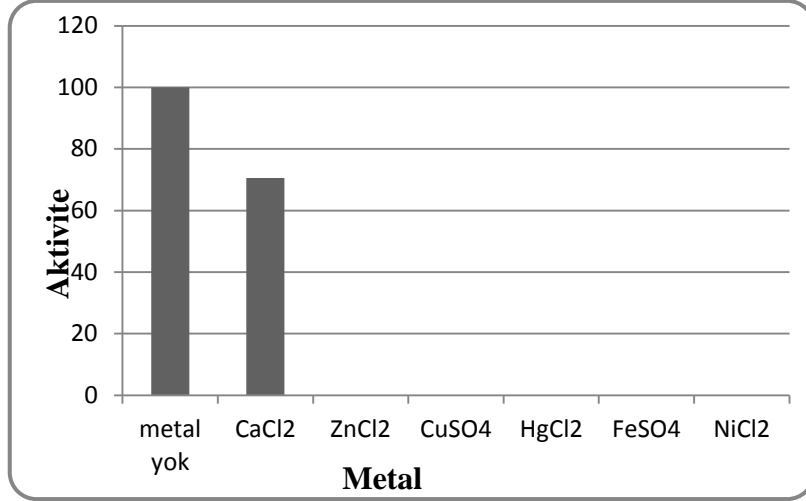


Şekil 16. KI W137F/V184T aktivitesi üzerine farklı konsantrasyonlardaki metal iyonlarının aktivatör etkisi

### 3.2.8. İnhibitör Etkisi

#### 3.2.8.1. İnhibitörlerin KI W137F/V184S Üzerine Etkisi

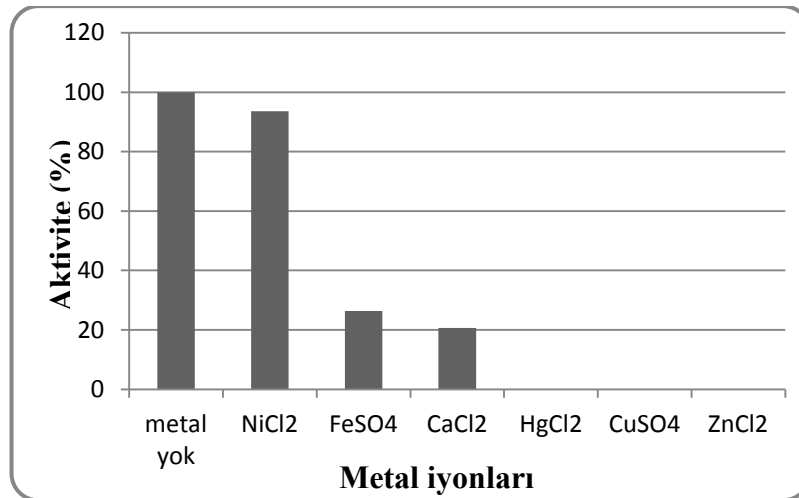
KI W137F/V184S aktivitesi üzerine metal iyonlarının inhibitör etkisi;  $Ca^{+2}$ ,  $Hg^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$  bivalent metal iyonlarının klorür ve sülfat tuzları ile gerçekleştirildi. Şekil 17'de görüldüğü gibi  $Hg^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$  metal iyonları KI W137F/V184S aktivitesinin tamamen kaybolmasına neden olmuştur.  $Ca^{+2}$  ise %30 oranında aktiviteyi düşürmüştür.



Şekil 17. KI W137F/V184S aktivitesi üzerine farklı metal iyonlarının inhibitör etkisi

### 3.2.8.2. İnhibitörlerin KI W137F/V184T Üzerine Etkisi

KI W137F/V184T aktivitesi üzerine metal iyonlarının inhibitör etkisi;  $Ca^{+2}$ ,  $Hg^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$  bivalent metal iyonlarının klorür ve sülfat tuzları ile gerçekleştirildi. Şekil 18’de görüldüğü gibi  $Hg^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$  metal iyonları KI W137F/V184T aktivitesinin tamamen kaybolmasına neden olmuştur.  $Ni^{+2}$ ’nin enzim aktivitesini önemli derecede etkilemediği,  $Fe^{+2}$  ve  $Ca^{+2}$ ’nin ise aktiviteyi %80 civarında azalttığı anlaşılmıştır.



Şekil 18. KI W137F/V184T aktivitesi üzerine farklı metal iyonlarının inhibitör etkisi

#### 4. TARTIŞMA

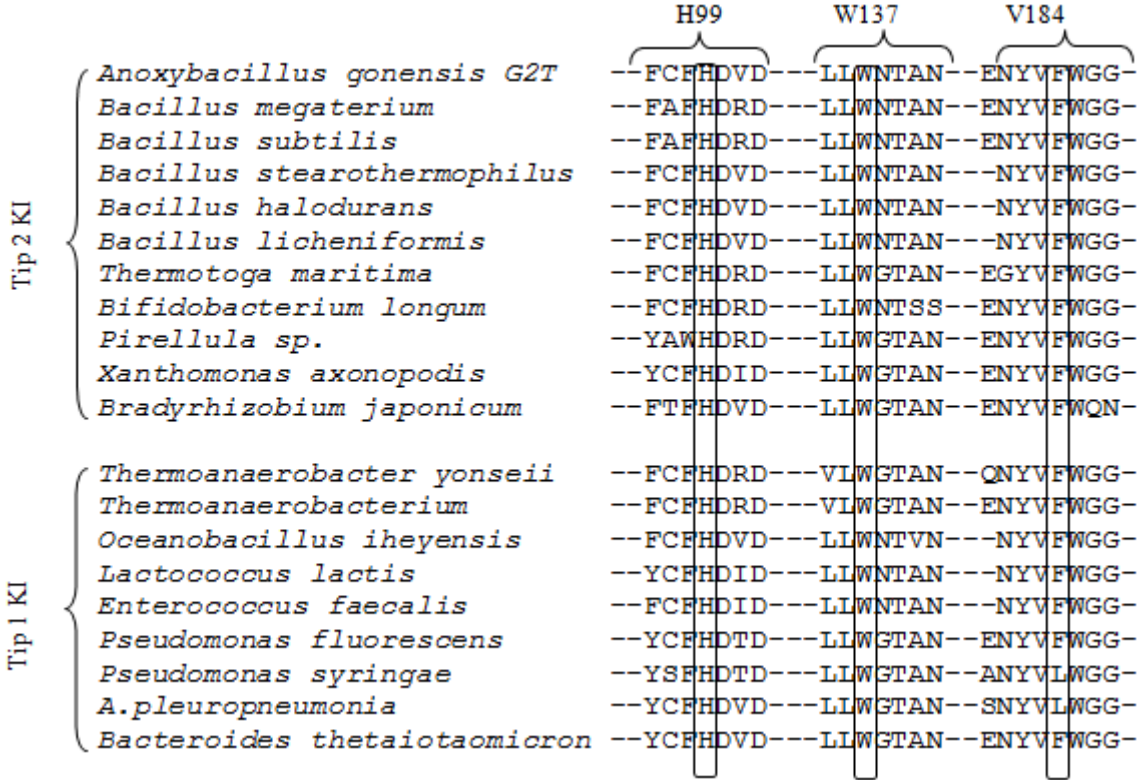
Bu çalışma kapsamında, daha önce Gönen kaplıcalarından izole edilen *A. gonensis* G2<sup>T</sup>’ye ait KI enziminin kinetik parametrelerinin ve ısıl kararlılığının geliştirilmesi amacıyla yapılan özgün mutasyon çalışmaları sonucunda elde edilen W137F/V184S ve W137F/V184T çifte mutasyonlu KI enzimlerinin karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

*A. gonensis* G2<sup>T</sup> KI enziminin tüm baz dizilimi daha önce yapılan çalışmalar sonucunda açığa çıkarılmış ve başarılı bir şekilde klonlama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bunun ardından yapılan literatür taramaları sonucunda bütün KI enzimleri için ortak olan ve aktif bölgede var olduğu düşünülen aminoasitler üzerinde W137F/V184S ve W137F/V184T çifte mutasyon çalışmaları ile enzimin biyokimyasal özelliklerinin geliştirilmesi amacıyla çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Şekil 21’de KI enziminin aktif bölgesinde olduğu düşünülen aminoasit sıraları gösterilmektedir. Bu mutasyonlar ile genel olarak enzimin  $K_m$  değerinde azalma,  $V_{max}$  değerinde bir artış ve ısıl kararlılığında ise bir yükselme hedeflenmiştir. *A. gonensis* G2<sup>T</sup> KI yaban tip ve mutant KI’lara ait sonuçlar Tablo 5’te gösterilmektedir.

Mutant enzimin saflaştırma çalışmalarında ilk olarak 80°C’de 15 dakikalık bir ısı şoku muamelesi gerçekleştirilmiştir. Enzimin mezofilik bir bakteriye klonlanmasından dolayı ısı şoku sayesinde mezofilik bakteriye ait proteinlerin büyük bir çoğunluğu denatüre olmaktadır. Bu sayede enzimin hidrofobik ve iyon değişim kromatografileri ile saflaştırma basamaklarında kolaylık sağlanmaktadır. Enzimin saflaştırma basamakları kobalt kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bunun nedeni ise enzimin kobalt iyonu ile daha kararlı olarak saflaştırılmasıdır.

Mutant enzimlerin karakterizasyon çalışmaları enzimin aktivite hesaplamaları ile gerçekleştirilmiştir. Bunun için Dische ve arkadaşları (1951) tarafından uygulanan sistein-karbozol-sülfirik asit yöntemi kullanılmıştır. Açığa çıkan ksiluloz miktarının spektrofotometrik yöntemle ölçülmesi ile enzimin karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ksilozun ksilolüza olan dönüşüm reaksiyonunda ortaya pembe renk çıkmaktadır. Spektrofotometrede yapılan ölçümlerde ksilulozun fazla renk vermesinden dolayı reaksiyon ölçülememekte ve Lambert-Beer kanununa göre sonuçlar gerçek değerlerin altında görünmekteydi. Bu nedenle, elde edilen veriler doğruyu yansıtmamaktaydı. Bu sorun ise spektrofotometrede yapılan ölçümler sırasında ışık yolunun kısaltılması (1 mm

ışık yollu quartz küvet kullanılarak) ile aşılmıştır. Bu sayede seyreltme işlemi yapmaya gerek kalmadan olası pipetleme kaynaklı hataların önüne geçilmiştir.



Şekil 19. Tip 1 ve Tip 2 ksiloiz izomerazlarda aktif bölgede olduğu düşünülen korunmuş amino asitler

Tablo 5. Yaban tip ve mutant enzimlerin kinetik parametreler açısından karşılaştırılmaları

Ksiloiz İzomeraz	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein)	$K_{cat}$ (1/sn)	Katalitik etkinlik ( $K_{cat}/K_m$ )
AgoG2KI-yt	16,07 $\pm$ 1,68	16,62 $\pm$ 0,781	55,45	3,45
AgoG2KI-rec	14,27 $\pm$ 0,68	20,12 $\pm$ 0,43	80,56	5,64
W137F/ V184S	91,13 $\pm$ 10,54	31,71 $\pm$ 1,1	105,82	1,161
W137F/ V184T	25,94 $\pm$ 3,73	7,66 $\pm$ 0,37	25,55	0,985

*Clostridium thermosulfurogenes* KI'sında yapılan W139F/V186S ve W139F/V186T çifte mutasyonları ile enzim katalitik etkinliği enzimin ilgisini ksilozdan glukozaya çevirerek sırasıyla 2 kat ve 5 kat olacak şekilde artırılmış, fakat ksiloiz kısmında ters etkiye neden olmuştur (Bhosale vd.,1996). Laboratuvarımızda yapılan daha önceki çalışmalar sonucunda 139. sıradaki triptofan amino asitinin bizim dizimizde 137. sıradaki amino asite; 186.

sıradaki triptofan amino asitinin bizim dizimizde 184. sıradaki amino asite karşılık geldiği belirlenmiştir. Triptofan amino asiti, fenilalanine göre daha hidrofobik bir yan zincire sahiptir; ayrıca hidrofobik karakterli valin amino asiti hidrofilik karakterde olan serin ve treonin amino asitine değiştirilerek katalitik etkinlik ve ısı kararlılığı üzerine olan etkileri belirlenmiştir. *Clostridium thermosulfurogenes*'e benzer olarak *A. gonensis* G2 KI'sında yapılan W137F/ V184S mutasyonu enzimin ilgisini glukozu değiştirmiştir.

Yapılan kinetik incelemelerde, *A. gonensis* G2<sup>T</sup> KI'nın ksiloz için düşük  $K_m$  değerine sahip olduğu, dolayısı ile enzimin ksiloza olan ilgisinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Tablo 6'da da görüldüğü üzere, *A. gonensis* G2<sup>T</sup> KI'sının  $K_m$  değerinin birçok mikroorganizma ile karşılaştırıldığında düşük bir değerde olduğu görülmektedir. Yapılan mutasyon çalışmaları sonucunda ise her iki mutasyonda da mutant *A. gonensis* G2 KI'sının  $K_m$  değerlerinin arttığı ve özellikle W137F/ V184S mutanti diğer organizmalar ile karşılaştırıldığında elverişsiz bir sonuç elde edildiği anlaşılmaktadır.

Tablo 6. Çeşitli mikroorganizmalara ait KI'nın ksiloz için  $K_m$  değerleri

Mikroorganizma	$K_m$ (mM)	Kaynaklar
<i>Bacillus</i> sp.	0,076	(Kwon ve vd., 1987)
<i>Streptomyces flavogriseus</i>	0,078	(Chen ve vd., 1979)
<i>Thermus aquaticus</i>	15	(Inyang ve vd., 1995)
<i>A. gonensis</i> G2 <sup>T</sup>	16,07	Bu Çalışma
<i>Streptomyces</i> sp.	35	(Lehmacher ve vd., 1990)

Çeşitli organizmalar ile karşılaştırıldığında, *A. gonensis* G2<sup>T</sup> KI'nın ksiloz için düşük sayılabilecek bir  $K_{cat}$  değerine sahip olduğu belirlenmiştir (Tablo 7). Yapılan mutasyonlar göz önüne alındığında ise yaban tipe göre W137F/V184S mutasyonundan elde edilen  $K_{cat}$  değerinin yükseldiği görülmektedir. Ancak mutasyonun katalitik etkinliğine bakıldığında yükselen  $K_m$  değerinden dolayı yaban tip enzime göre bir düşüş olduğu görülmektedir. W137F/ V184T mutasyonunun ise hem  $K_{cat}$  değerini hem de enzimin katalitik etkinliğini düşürdüğü belirlenmiştir.

Tablo 7. Çeşitli mikroorganizmalara ait KI'nın ksiloz için  $K_{cat}$  değerleri

Mikroorganizma	$K_{cat}$ (1/sn)	Kaynaklar
<i>Bacillus sp.</i>	230	(Chauthaiwale ve vd., 1994)
<i>Lactococcus lactis</i>	184	(Park ve vd., 2004)
<i>Anoxybacillus gonensis G2<sup>T</sup></i>	55,45	Bu Çalışma
<i>Actinoplanes missouriensis</i>	17,3	(Jenkins ve vd., 1992)
<i>Arthrobacter sp.</i>	8,88	(Smith ve vd., 1991)
<i>Thermus aquaticus</i>	8,6	(Lehmacher ve vd., 1990)

Ayrıca her iki çift mutasyonlu enzimin her ikisinin de glukoz izomeraz özelliği açısından yapılan kinetik incelemelerde, W137F/V184S ve W137F/V184T mutasyonlarının enzimin substrata olan ilgisini ksilozdan glukozla doğru çevirdiği anlaşılmaktadır (Karaoğlu, 2010). Her iki mutasyon da enzimin KI kısmında kinetik yönden GI'ya göre negatif sonuçlar vermektedir. Bu nedenle KI enziminin ksiloza olan substrat ilgisini arttırmaya yönelik başka mutasyon çalışmaları da gerçekleştirilmelidir.

W137F/V184S ve W137F/V184T mutasyonlarının optimum sıcaklığını belirlemek için yapılan çalışmalarda mutasyonların optimum sıcaklıkta herhangi bir değişime neden olmadığı görülmektedir. Yaban tip enzim gibi her iki mutasyonun da optimum sıcaklığı 85°C'dir. Literatürde yapılan incelemelerde ise benzer şekilde *Streptomyces sp.* (Inyang vd., 1995) ve *Bacillus sp.* (Chauthaiwale vd., 1994) türlerine ait KI'nın optimum çalışma sıcaklıklarının da 85°C olduğu görülmektedir. *Thermotoga neapolitana* KI'nın ise optimum 95°C'de çalıştığı belirtilmiştir (Hess vd., 1998). Diğer KI'lar genel olarak optimum 60°C ile 80°C arasında aktivite göstermektedirler (Bhosale vd., 1996). Bu verilere dayanarak, mutant enzimlerin termofilik karakterde birer enzim oldukları söylenebilir. Ksiloz izomeraz enziminin D-ksilozdan etanol üretiminde kullanıldığı bilinmektedir. Ksilozun izomerizasyonunu ve etanole fermentasyonunu eş zamanlı olarak sağlamak amacıyla KI geninin mayalara transfer edilmesi çalışmaları mevcuttur (Chaing vd., 1981; Gong vd., 1981; Schneider vd., 1981; Wang vd., 1980). Fakat mutant *A. gonensis G2* KI enzimlerinin optimum sıcaklığı 85°C'dir ve bu mezofilik karakterde olan mayalara aktarıldığında yüksek verimlilikte çalışmayacağını gösterir. Fakat literatürde *Thermus thermophilus*'da yapılan mutasyonlar ile optimum sıcaklığı 90°C olan termofilik karakterli ksiloz izomerazın optimum sıcaklığının 60°C'ye düşürüldüğü ve bu sayede *Saccharomyces cerevisiae*'ye aktarıldığı görülmektedir. *A. gonensis G2*'de de farklı mutasyonlar ile

optimum sıcaklık düşürülebilir ve böylece *Saccharomyces cerevisiae*'ye aktarılarak hem ksilozun izomerizasyonu hem de etanol üretimi eş zamanlı olarak gerçekleştirilebilir.

Optimum pH'ya baktığımız da ise her iki mutasyonun da optimum çalışma pH'sını yaban tipe göre yükselttiği gözlenmiştir. Yaban tipin optimum pH'sı 6,5 iken mutasyonların her ikisi de optimum olarak pH 7,5'da aktivite göstermektedir. Optimum pH'daki bu değişimin nedeni yapılan mutasyonların enzimin aktif bölgesinde olmasına rağmen, metal iyonunun bağlanma bölgesine yakın olmasından dolayı bir yandan aktivite için gerekli olan metal iyonu türünü değiştirirken, bir yandan da optimum pH değerini değiştirebilir (Tilbeurgh vd., 1992). Literatürde bulunan çalışmalara bakıldığında, ksiloz izomeraz enziminde  $Mn^{+2}$  iyonunun çalışma şartları olarak asidik ortamı seçmesine karşın,  $Mg^{+2}$ 'nin daha çok nötral değerlerde enzimle etkileşime girdiği ve aktivite gösterdiği görülmektedir. Bu nedenle optimum pH'da olan değişimin, ihtiyaç duyulan metal iyonu türünün değişimi ile paralel olabileceği düşünülmektedir (Tilbeurgh vd., 1992). Fakat W137F/V184T mutasyonu bu duruma uymamaktadır. Çünkü W137F/V184T mutasyonu, metal iyonu olarak  $Mn^{+2}$ 'yi kullanırken optimum olarak pH 7,5'da çalışmaktadır. Bunun nedeni olarak yapılan mutasyonda valin amino asitinin, tirozin aminoasitine dönüştürülmesi ile metal bağlanma bölgesinin bu mutasyondan etkilenmediği düşünülebilir. Buradan sonuç olarak, optimum pH'daki değişimin 137. noktadaki amino asitin değişimi ile alakalı, metal iyonu tercihindeki değişiminin ise 184. noktadaki amino asitin değişimi ile alakalı olduğu düşünülebilir. Literatüre bakıldığında bazı amino asitlerin optimum pH ve metal iyonlarında değişime neden olduğu görülmektedir (Bhosale vd.,1996). Bunlara ilave olarak, glukoz izomereaz enzimi için pH'nın asidik olması endüstriyel kullanımı açısından bir avantaj olarak görülmesine rağmen ksiloz izomeraz için böyle bir ayırım bulunmamaktadır.

$Mn^{+2}$  metal iyonunun birçok KI enziminin aktivitesinde aktivatör olarak önemli bir rol oynadığı yapılan literatür taramalarından bilinmektedir (Danno, 1970). Bu çalışmada yapılan W137F/V184S mutasyonunda ise aktivatör olarak en iyi sonucu  $Mg^{+2}$  metal iyonu göstermektedir.  $Mg^{+2}$  metal iyonunun KI enziminin aktivitesi için gerekli olduğu bazı organizmalar mevcut olmakla birlikte, *A.gonensis* G2<sup>T</sup> KI enzimi ile daha önceden yapılan çalışmalardan bilinmektedir ki, *A.gonensis* G2<sup>T</sup> KI enzimi aktivitesi için aktivatör olarak  $Mn^{+2}$  metal iyonuna ihtiyaç duymaktadır (Yanmış, 2008). KI W137F/V184S mutant enziminin aktivatör gereksinimi ise bu mutasyon ile  $Mg^{+2}$  yönünde değişmiştir. Enzimin GI aktivitesi açısından ise,  $Mg^{+2}$  metal iyonu, en yüksek aktivite için gerekli olan bir

iyondur. W137F/V184S kinetik çalışmalarının sonuçlarına paralel olarak enzimin  $Mg^{+2}$  de en iyi aktiviteyi göstermesi enzimin substrata olan ilgisinin ksilozdan glukoza yöneldiğini göstermektedir. Ayrıca yapılan bu mutasyonun aktif bölgede olup substrat ilgisini değiştirip katalitik etkinliğini etkilemesinin yanında, bu mutasyon enzimin metal bağlanma bölgesine yakın olabilir ve böylece metal iyonu gereksinimini de değiştirebilir (Tilbeurgh vd., 1992). KI W137F/V184T mutasyonunda ise, yaban tip KI enzime benzer olarak, mutant enzimin aktivitesi için aktivatör olarak  $Mn^{+2}$  metal iyonunun varlığına ihtiyaç duymaktadır.

KI enzimi üzerinde etkili olduğu bilinen çeşitli inhibitörlerin mutant enzimlerin aktivitesi üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Yapılan aktivite çalışmaları sonucunda, W137F/V184S mutasyonunun,  $Ca^{+2}$  metal iyonu varlığında yaban tip enzime benzer olarak %30 oranında, diğer inhibitörler varlığında ise yaban tipe göre oldukça fazla olarak aktivitesini kaybetmiştir. Yaban tip gibi, W137F/V184T mutantı da,  $Ca^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$  ve  $Ni^{+2}$  metal iyonlarının varlığında önemli derecede aktivite kaybına uğramamıştır (Yanmış, 2008).

W137F/V184S mutasyonunun ısı kararlılık çalışmaları sonucunda  $30^{\circ}C-70^{\circ}C$  sıcaklıkları arasında enzimin yarım saat ısıya maruz bırakılması sonucunda aktivitesinde bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir. Fakat yarım saat boyunca  $75^{\circ}C$ 'lik sıcaklığa maruz kalması sonucu aktivitesinin %50'lik kısmını kaybettiği görülmüştür.  $80^{\circ}C$ 'nin üzerindeki sıcaklıklarda ise KI W137F/V184S mutant enzimi aktivitesini kaybetmiştir. Yapılan W137F/V184T mutasyonunda ise  $30^{\circ}C-80^{\circ}C$  sıcaklıkları arasında enzimin aktivitesinde bir değişiklik olmazken  $85^{\circ}C$ 'de aktivitesi %50 oranında azalmıştır.  $90^{\circ}C$  ve  $100^{\circ}C$ 'lerde ise KI W137F/V184T mutant enziminin aktivitesi tamamen kaybedilmiştir. Mutant enzimlerin yüksek sıcaklıklarda kararlı kalması endüstriyel kullanımı açısından olumlu sonuçlar ortaya çıkarmıştır. Literatürde yapılan karşılaştırmalara göre *Bacillus* sp. KI'sı  $80^{\circ}C$ 'de 10 dk kararlı kalmakla birlikte  $60^{\circ}C$ 'de 60 dk'da aktivitesinin %35'ini kaybetmektedir. Öte yandan, *Bacillus coagulans* KI'sı pH 9'da,  $50^{\circ}C$ 'de, 60 dk'lık uygulamanın ardından %20 aktivite kaybetmektedir, ayrıca pH 4'te,  $50^{\circ}C$ 'de, 60 dk'lık uygulama sonucunda tamamen inaktif hale gelmiştir. Bu bakımdan yapılan mutasyonların ardından mutant enzimlerin her ikisinin de ısı kararlılığı bakımından diğerlerine göre daha iyi bir durumda olduğu söylenebilir.

pH değerlerinin mutant enzimlerin üzerine olan etkisini belirlemek için mutant enzimlerin değişik pH aralıklarında 2, 4, 6 saat boyunca bekletilmiştir. Yapılan çalışmalar



sonucunda KI W137F/V184S mutanđı 6 saat sonunda pH 8 değerinde aktivitesinin ancak %20'lik kısmını kaybetmiştir. KI W137F/V184T mutanđının ise 6 saatlik zamanın sonunda yüksek pH değerlerinde aktivitesini korumuştur. Nötral pH değerlerinde, yani mutanđ enzimlerin optimum olarak çalıştığı pH değerlerinde kararlı olarak kalması endüstriyel kullanımlarında avantaj olarak gösterilebilir.

Yapılan mutasyon çalışmaları sonucunda, mutanđ enzimlerin optimum pH 7,5 ve 85°C'de çalıştıkları belirlenmiştir. Her iki mutasyon da enzimin ısıl kararlılığında bir değişime sebep olmazken, katalitik etkinliğini ve aktivitesini yaban tip enzime göre negatif yönde etkilemiş ve sonuç olarak enzimin substrata olan ilgisini ksilozdan glukoza yönelttiği sonucuna varılmıştır.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma kapsamında daha önceden laboratuvarımızda *Anoxybacillus gonensis* G2 ksiloz izomeraz geninde yapılmış olan W137F/V184S ve W137F/V184T çifte mutasyonlarının karakterizasyonu yapılmıştır. İlk olarak ksiloz izomeraz enzimini kodlayan gen pET28a+ ekspresyon vektörüne klonlandı ve *E.coli* BL21(DE3) suşunda fazla miktarda üretildi. Bunun ardından izole edilerek kolon kromatografisi yöntemiyle saflaştırıldı ve biyokimyasal karakterizasyon çalışmalarına geçildi. Çalışmalardan elde edilen verilere göre, KI W137F/V184S mutasyonunun  $K_m$  değeri  $91,13 \pm 10,54$  mM,  $V_{max}$  değeri  $31,71 \pm 1,1$   $\mu\text{mol/dk/mg}$ , katalitik etkinliği 1,16 olarak belirlendi. KI W137F/V184T mutasyonunun  $K_m$  değeri  $25,94 \pm 3,73$  mM,  $V_{max}$  değeri  $7,66 \pm 0,37$   $\mu\text{mol/dk/mg}$ , katalitik etkinliği ise 0,98 olarak hesaplandı. Laboratuvarımızda daha önceden yapılan çalışmalara göre *Anoxybacillus gonensis* G2<sup>T</sup> ksiloz izomeraz enziminin  $K_m$  değeri  $16,07 \pm 1,68$  mM,  $V_{max}$  değeri  $16,62 \pm 0,781$   $\mu\text{mol/dk/mg}$ , katalitik etkinliği ise 3,45 olarak belirlendi. Ayrıca klonlanan enzimin  $K_m$  değeri  $14,27 \pm 0,68$  mM,  $V_{max}$  değeri  $20,12 \pm 0,43$   $\mu\text{mol/dk/mg}$ , katalitik etkinliği ise 5,64 olarak hesaplanmıştır.

Elde edilen veriler karşılaştırıldığında W137F/V184S mutasyonunda yaban tip enzime göre  $V_{max}$  değerinin yükselmesi iyi bir sonuç olarak görülmesine karşın  $K_m$  değerinin de yükselmesi ve dolayısıyla enzimin katalitik etkinliğinde azalmaya neden olmasından dolayı yapılan bu W137F/V184S mutasyon çalışması enzim üzerinde negatif etkiye neden olmuştur. Aynı şekilde W137F/V184T mutasyonu sonuçları incelendiğinde katalitik etkinliğin yaban tip enzime göre azaldığı belirlenmiştir. W137F/V184S ve W137F/V184T mutasyonlarının *Anoxybacillus gonensis* G2 glikoz izomeraz enziminin katalitik etkinliği üzerine etkilerine bakıldığında bu iki mutasyonun ksiloz izomeraz enzimin substrata olan ilgisinin ksilozdan glukozu doğru yöneldiği anlaşılmaktadır (Karaoğlu, 2010).

Ksiloz izomeraz enziminin, ksiloza olan ilgisini ve katalitik etkinliğini arttırmak amacıyla daha değişik mutasyon çalışmaları yapılmalıdır. Ayrıca endüstriyel alanda kullanımını geliştirebilmek için enzimin immobilizasyon çalışmaları yapılabilir.

## 6. KAYNAKLAR

- Anheuser-Busch Inc., 1974. April 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, Applied Biochemistry and Bioengineering, 2, 97–155.
- Basuki, W., Iizuka, M., Ito, K., Furuichi, K. ve Minamiura, N., 1992. Evidence for the existence of isoenzymes of glucose isomerase from *Streptomyces phaeochromogenes*, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 56, 180–185.
- Batt, C. A., O’neill, E., Novak, S. R., Ko, J. ve Sinskey, A., 1986. Hyperexpression of *Escherichia coli* xylose isomerase, Biotechnology Progress, 2, 140–144.
- 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, Biotechnology Letters, 16, 1259–1264.
- Belfaquih, N. Ve Penninck M. J., 2000. A Bifunctional B-Xylosidase-Xylose Isomerase From *Streptomyces* Sp. Ec 10, Enzyme and Microbial Technology, 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, Microbiological Reviews, 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. ve Collyer, C. A., 1990. Structure, mechanism, and engineering of xylose isomerase, Sixth International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms.
- 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.
- Bogumil, R., Kappl, J., Huttermann, C. ve Witzel, H., 1993. Xand Q-band EPR studies on the two Mn<sup>2+</sup>-substituted metal-binding sites of D-xylose isomerase, European Journal of Biochemistry, 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, Applied Environmental Microbiology, 47, 1213-1215.
- Bor, Y., Moraes, C., Lee, S., Crossby, W. L, Sinskey, A. J. ve Batt, C. A., 1992. Cloning and sequencing the *Lactobacillus brevis* encoding xylose isomerase gene, Gene, 114, 127–131.
- Bradford, M.M., 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein dye binding, Analytical Biochemistry, 72, 248-254
- Briggs, K. A., Lancashire, W. E. ve Hartley, B. S., 1984. Molecular cloning, DNA structure and expression of the *Escherichia coli* D-Xylose isomerase, Embo Journal, 3, 611–616.
- Brownwell, C. E., December 1982. Process for producing glucose isomerase. U.S. Patent 4, 348-480.
- Bucke, C., 1981. Industrial Glucose isomerase In A. Wiseman (Ed.). topics in enzyme and fermentation biotechnology, P. 147–171, vol. 1. Industrial glucose isomerase, Ellis Horwood, Chichester, United Kingdom.
- Bucke, C., 1983. Glucose transforming enzymes, P. 93–127. In W. Fogarty (Ed.), *Microbial Enzymes and Biotechnology*, Applied Science Publishers, London.
- Callens, M., Kersters-Hilderson, H., Van Opstal, O. ve Debruyne C. K., 1986. Catalytic properties Of D-Xylose isomerase from *Streptomyces violaceoruber*, Enzyme and Microbial Technology, 8, 696–700.
- Callens, M., Kersters-Hilderson, H., Vangrýsperre, W. ve Debruyne, C. K., 1988. DXylose isomerase from *Streptomyces Violaceoruber*: Structural and catalytic roles of bivalent metal ions, Enzyme and Microbial Technology, 10, 695–700.
- Cha, J., Cho, Y., Whitaker, R.D., Carrel, H. L., Glusker, J.P., Karplus, P.A. ve Batt, C. A., 1994. Perturbing the metal site of His-220 on enzyme stability, The Journal of Biological Chemistry. 269, 2687-2694.
- Chaing, L. C., Gong, C. S., Chen, L. F. ve Tsao, G. T., 1981. D-Xylulose fermentation to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*, Applied and Environmental Microbiology, 42, 284–289.

- Chauthaiwale, J. V. ve Rao, M. B., 1994. Production and purification of extracellular D-xylose isomerase from an alkaliphilic, thermophilic *Bacillus* sp., Applied and Environmental Microbiology, 60, 4495–4499.
- Chen, W. P., 1980A. Glucose Isomerase, Process Biochemistry, 15, 30–35.
- Chen, W. P., 1980B. Glucose Isomerase, Process Biochemistry, 15, 36–41
- Chen, W.P. ve Anderson, A.W., 1979. Purification, immobilization, and some properties of glucose isomerase from *Streptomyces flavogriseus*, Applied and Environmental Microbiology, 38, 1111-1119
- Collyer, C. A., Henrick, K. ve Blow, D.M., 1990. Mechanism for aldose-ketose interconversion by D-xylose isomerase involving ring opening followed by a 1,2- hydride shift, Journal of Molecular Biology, 212, 211-235
- Danno, G., 1970. Studies on the D-glucose-isomerizing enzyme from *Bacillus coagulans*, strain HN-68. Part V. Comparative study on the three activities of D-glucose, D-xylose and D-ribose isomerization of the crystalline enzyme, Agricultural Biology and Chemistry, 34, 1805-1814
- Dekker K., Yamagata H., Sakaguchi K., ve Udaka S., 1991. Xylose (Glucose) isomerase gene from the thermophile *Thermus thermophilus*: cloning, sequencing, and comparison with other thermostable xylose isomerases, Journal of Bacteriology, 3078-3083
- Dische, Z. ve Borenfreund, E., 1951. A New Spectrophotometric method for the detection and determination of ketosugars and trioses, The Journal of Biological Chemistry, 192, 583-587.
- Drazic, M., Golubic, Z. ve Czimek, S., 1980. Isomerization of glucose to fructose using microbial enzymes, Period Biol, 82 481-484
- Dupreez, J. C. ve Prior, B. A., 1985. A quantitative screening of some xylose fermenting yeast isolates, Biotechnology Letters, 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*, Applied Microbiology and Biotechnology, 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*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 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 and Microbial Technology, 4, 317–320.

- Ghatge, M. S., Mawal, Y., Gaikwad, S. M. ve Deshpande, V., 1991. Immunoaffinity purification of glucose/xylose isomerase from *Streptomyces* sp., Applied Microbiology and Biotechnology, 31, 11–20.
- Ghatge, M. S., ve Deshpande, V. V., 1993. Evidence for specific interaction of guanidine hydrochloride with carboxy groups of enzymes/proteins, Biochemical and Biophysical Research Communications, 193, 979–984.
- Gong, C. S., Chen, L. ve Tsao, G. T., 1980. Purification and properties of glucose isomerase of *A. missouriensis*, Biotechnology and Bioengineering, 12, 833-845.
- Hafner, E. W. ve Jackson, D. M., July 1985. Constitutive glucose isomerase producer. U.S. Patent 4, 532, 208.
- Hartley, B. S., Hanlon, N., Jackson, R.J. ve Rangarajan, M., 2000. Glucose isomerase: insights into protein engineering for increased thermostability, Biochimica et Biophysica Acta, 1543, 294-335
- Hemmingsen, S. H., 1979. Development of an immobilized glucose isomerase for industrial application, Applied Biochemistry and Bioengineering, 2, 157–181.
- Hodgson, J., 1994. The Changing bulk biocatalyst market: Recombinant DNA techniques have changed bulk enzyme production dramatically, Bio/ Technology, 12, 789-790
- Howling, D. 1992. Glucose syrup: Production, properties and applications. In: Schenck, F.W. and R.E. Hebeda (EDS), “Starch Hydrolysis Products”, VCH Publ. Inc., 277-316, New York.
- Inyang, C.U., Gebhart, U., Obi, S.K.C. ve Bisswanger, H., 1995. Isolation and characterization of a D-glucose/xylose isomerase from a new thermophilic strain *Streptomyces* sp., (PLC) Applied Microbiology Biotechnology 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.
- Karaoğlu, H., 2010. *Anoxybacillus gonensis* glukoz izomerazının genetik manipulasyonlarla bazı biyokimyasal özelliklerinin geliştirilmesi. Doktora 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, European Journal of Biochemistry, 170, 179–183.

- Kitada, M., Dobashi, Y., Horikoshi, K., 1989. Enzymatic properties of D-xylose isomerase from a thermophilic alkalophile, *Bacillus* TX-3, Agricultural Biology and Chemistry, 53, 1461-1468
- Kwon, H.J., Kitada, M., Horikoshi, K., 1987. Purification and properties of the D-xylose isomerase from alkalophilic *Bacillus* No. KX-6, Agricultural Biology and Chemistry, 51, 1983-1989
- 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*, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 27, 234–240.
- Lee, C., Bhatnagar, L., Meng, M. ve Zeikus, J. G., 1989. Catalytic mechanism of Xylose (Glucose) Isomerase from *Clostridium thermosulfurogenes*, The journal of Biological Chemistry., 265, 19082-19090.
- Lee, C., Bhatnagar L., Saha B. C., Lee Y.-E., Takagi M., Imanaka T., Bagdasarian M. ve Zeikus J. G., 1990. Cloning and expression of the *Clostridium thermosulfurogenes* glucose isomerase gene in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, Applied and Environmental Microbiology, 56, 2638–2643.
- Lee, C., 1976. Preparation and Use of Glucose Isomerase, U. S. Patent. 4, 061, 539.
- Lehmacher, A., ve Bisswanger H., 1990. Isolation and caharcterization of an extremely thermostable D-xylose isomerase from *Thermus aquaticus* HB 8, Journal of General Microbiology. 136, 679-686
- Lehmacher, A. ve Bisswanger, H., 1990. Comparative kinetics of D-xylose and D-glucose isomerase activities of the D-xylose isomerase from *Thermus aquaticus* HB8, Biological Chemistry Hoppe-Seyler, 371, 527-536
- Liu, S.Y., Wiegel, J., Gherardine, F.C., 1996. Purification and cloning of a thermostable xylose (glucose) isomerase with an acidic pH optimum from *Thermoanaerobacterium* strain JW/SL-YS 489, Journal of Bacteriology, 178, 5938-5945
- Lonn, A.; Gardonyi, M.; van Zyl, W.; Hahn-Hagerdal, B.; Otero, R.C., 2002. Cold adaptation of xylose isomerase from *Thermus thermophilus* through random PCR mutagenesis. Gene cloning and protein characterization, European Journal of Biochemistry 269, 157-163
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. ve Sambrook, J., 1982. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor, Newyork,.
- Marshall, R. O. ve Kooi, E. R., 1957. Enzymatic conversion of D-glucose to D-fructose, Science, 125, 648–649.

- Meng, M., Bagdasarian, M. ve Zeikus, J.G., 1993. Thermal stabilization of xylose isomerase from *Thermoanaerobacterium thermosulfirigenes*, Proceedings of the National Academy of Science, USA, 90, 8459-8463.
- Meng, M., Lee, C., Bagdasarian, M. ve Zeikus, J. G., 1991. Switching substrate preference of thermophilic xylose isomerase from D-xylose to D-glucose by redesigning the substrate binding pocket, Proceedings of the National Academy of Science, USA, 88, 4015–4019
- Outtrup, H., 1974. New glucose isomerase by fermentation, German Patent Application, 2, 400, 323.
- Park, J.H., Batt, C.A., 2004. Restoration of a defective *Lactococcus lactis* xylose isomerase, Applied and Environmental Microbiology, 70, 4318-4325
- Pedersen, S., 1993. Industrial aspects of immobilized glucose isomerase, Bioprocess Technology, 16, 185–208
- Rangarajan, M., Asboth, B. ve Hartley, B. S., 1992. Stability of *Arthrobacter* D-Xylose isomerase to denaturants and heat, Biochemical Journal, 285, 889–898.
- Rehm, H. J. ve Reed, G., 1982. Ethanol from pentoses. In *Biotechnology*, vol. 3, pp. 318-323. Edited by H.-J. Rehm & G. Reed. Weinheim: Verlag Chemie.
- 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.
- 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 Nrll B3728, Biochemical Journal, 277, 255–261.
- Suekane, M., Tamura, M. ve Tomimura, C. H., 1978. Physico-chemical and enzymatic properties of purified glucose isomerases from *Streptomyces olivochromogenes* and *Bacillus stearothermophilus*, Agricultural Biology and Chemistry, 42, 909-917
- Takasaki, Y. ve Tanabe, O., 1966. Studies on sugar isomerisation enzyme. Production and utilization of glucose isomerase from *Streptomyces* spp., Agricultural Biology and Chemistry, 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 *Paracolonobacterium aerogenoides*, Agricultural Biology and Chemistry, 28, 740–741.
- Takasaki, Y., Yosugi, K. ve Kanbayashi, A., 1969. Glucose isomerase, In Perlman (ed) fermentation advances, 561-570, Academic.Press.Inc., New York.
- Telefoncu, A., 1986. Temel ve uygulamalı enzimoloji (Telefoncu, A. Ed.) pp.1.
- Tilbeurgh, H. V., Jenkins J., Chiadmi M., Janin J., Wodak S. J., Mrabet N. T., ve Lambier A., 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.
- Tsumura, N., Hagi M., ve Sato T., 1965. Enzymatic conversion of D-glucose to D-fructose. Part II. Properties of the enzyme from *Streptomyces phaeochromogenes*, Agricultural Biology and Chemistry, 29, 1129- 1134.
- Vaheri, M. ve Kauppinen, V., 1977. Improved microbial glucose isomerase production, Process of Biochemistry, 12, 5–8.
- Vandamme, E. J., Delaporte, A., De Vocht, M. ve Van Hoe, L., 1981. Production of D(1) Xylose isomerase by *Streptomyces violaceusruber* Abh. Akad. Wiss. Ddr. Abt., Math. Naturwiss. Technol., 193–208.
- 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.
- Vieille C., Epting K. L., Kelly R. M. ve J. Zeikus G., 2001. Bivalent cations and amino-acid composition contribute to the thermostability of *Bacillus licheniformis* xylose isomerase, European Journal of Biochemistry, 268, 6291–6301
- 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, Biotechnology Letters, 2, 273–278.
- Whitlow, M., Howard, A. C., Finzel, B. C. Poulos, T.L., Winborne, E. ve Gilliland, G. L., 1991. A metal mediated hybride shift mechanism for xylose isomerase based on the 1,6A° *Streptomyces rubiginous* structures with xylitol and D-xylose, Protein, 9, 153-173.
- Yanmış D., 2008. *Anoxybacillus gonensis* G2<sup>T</sup> ksiloz izomeraz geninin klonlanması, gen ürününün saflaştırılması ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Trabzon.
- 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, Agricultural Biology and Chemistry, 30, 1015–1023.

## 7. EKLER

### Ek 1. *A. gonensis* G2<sup>T</sup> Ksiloz İzomeraz'ının Amino Asit 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 A K V K K G L E İ A K R L G A**  
TAT 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

Zümrüt ÖZTEKİN, 10.01.1983 yılında Bartın'da doğdu. İlkokulu 1989- 1994 yılları arasında Bartın Cumhuriyet İlkokulu'nda tamamladıktan sonra ortaokul ve lise hayatına 1994 yılında Bartın Davut Fırıncıoğlu Anadolu Lisesi'nde başlayıp, 2001 yılında Zonguldak Atatürk Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2001 yılında yüksek öğrenimine Karadeniz Teknik Üniversitesi, Ortaöğretim Fen Matematik Alanları Eğitimi, Biyoloji Öğretmenliği programında başladı ve 2006 yılında lisans eğitiminden mezun olduktan sonra 2007 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ danışmanlığında tezli yüksek lisans programına başladı. Halen bu alanda eğitimine devam etmektedir. Yüksek lisans öğrenimi boyunca çeşitli poster sunumlarında bulundu.

### Ulusal Poster Bildirileri

1. **ÖZTEKİN Z.**, AY F., BELDÜZ A.O., ÇOLAK D.N: İNAN K., SEVİM E.Ç. Termofilik *Anoxybacillus* sp. PDF21 suşu Bakteriyosinin Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi. XVI. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi. 13-16 Aralık 2009. Antalya.
2. KARAOĞLU H., **ÖZTEKİN Z.**, AY F., BELDÜZ A.O., ÇANAKÇI S. *Anoxybacillus gonensis* G2 suşunun Ksiloz İzomerazının Biyokimyasal ve Kinetik Parametrelerinin W137F/V184S Çifte Mutasyonları İle Geliştirilmesi. 20. Ulusal Biyoloji Kongresi. 21-25 Haziran 2010. Denizli.
3. **ÖZTEKİN Z.**, ÇOLAK D.N., AY F., BELDÜZ A.O., ÇANAKÇI S., İNAN K., SEVİM E. Ç., Termofilik *Anoxybacillus* sp. PDF18 suşundan İzole Edilen Bakteriyosinin Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi. 20. Ulusal Biyoloji Kongresi. 21-25 Haziran 2010. Denizli.

### Uluslararası Poster Bildirileri

1. **ÖZTEKİN Z.**, AY ŞAL F., KARAOĞLU H., ÇOLAK D.N., BELDÜZ A.O. Purification and Characterization Of W137F/V184T Double Mutations On *Anoxybacillus gonensis* G2 Xylose Isomerase. 20th International Symposium on Environmental Biogeochemistry 27-30 September 2011. İstanbul.