

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**TERMOFİLİK *GEOBACILLUS CALDOXYLOSILYTICUS* TK4'TEN ELDE
EDİLEN REKOMBİNANT GLUKOZ İZOMERAZIN BAZI ÖZELLİKLERİNİN
MUTASYONLA GELİŞTİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

Kimyager Çiğdem AYNA

MART 2016

TRABZON



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

**TERMOFİLİK *GEOBACILLUS CALDOXYLOSILYTICUS* TK4'TEN ELDE EDİLEN
REKOMBİNANT GLUKOZ İZOMERAZIN BAZI ÖZELLİKLERİNİN
MUTASYONLA GELİŞTİRİLMESİ**

Çiğdem AYNA

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde

"DOKTOR (KİMYA)"

Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 29 / 02 / 2016

Tezin Savunma Tarihi : 28 / 03 / 2016

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK

Trabzon 2016

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Kimya Anabilim Dalında
Çiğdem AYNA Tarafından Hazırlanan**

**TERMOFİLİK *GEOBACILLUS CALDOXYLOSILYTICUS* TK4'TEN ELDE EDİLEN
REKOMBİNANT GLUKOZ İZOMERAZIN BAZI ÖZELLİKLERİNİN
MUTASYONLA GELİŞTİRİLMESİ**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 08 /03/2016 gün ve 1643 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
DOKTORA TEZİ
olarak kabul edilmiştir.**

Jüri Üyeleri

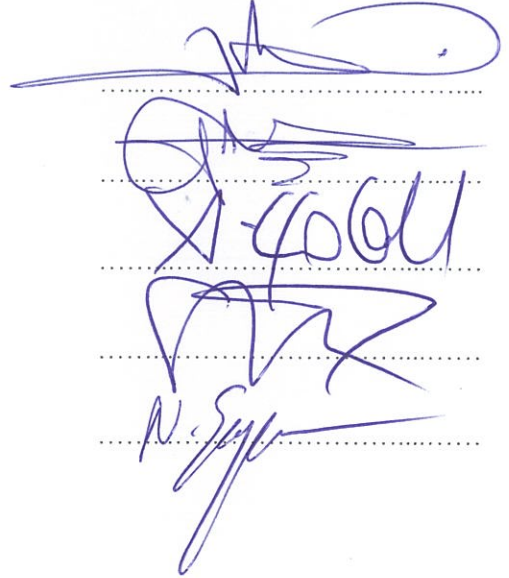
Başkan : Prof. Dr. Ali KILINÇ

Üye : Prof. Dr. İsmet YILMAZ

Üye : Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK

Üye : Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI

Üye : Doç. Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA



Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“Termofilik *Geobacillus caldoxylosilyticus* TK4'ten Elde Edilen Rekombinant Glukoz İzomerazın Bazı Özelliklerinin Mutasyonla Geliştirilmesi” adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Doktora tezi olarak hazırlanmıştır.

Araştırma konusunun seçimi, gerek çalışmaların yürütülmesi gerekse tezimin yazımı sırasında her türlü değerli bilgisini ve fikirlerini benimle paylaşan ve her türlü desteği benden esirgemeyerek bana yardımcı olan danışman hocam, Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK’a, önerilerini aldığım diğer tez izleme komitesi üyeleri hocalarım sayın Doç. Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA’ya ve sayın Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI’ya, tezin hazırlanmasında ve geliştirilmesinde büyük katkısı olan, yardımlarını ve deneyimlerini benden esirgemeyen sevgili hocalarım Doç. Dr. Yakup KOLCUOĞLU’na ve Doç. Dr. Melike YILDIRIM AKATIN’a, Biyokimya Laboratuvarında çalışan tüm arkadaşlarıma teşekkürü ve minneti bir borç bilirim. Ayrıca KTÜ-YUAM çalışanlarına teşekkür ederim.

Doktora tez süresince beni anlayışla karşılayan, nazımı çeken canım arkadaşlarıma ve dostlarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmama sağladıkları maddi destekten ötürü TÜBİTAK’a (Proje No: 109T985) teşekkürlerimi sunarım.

Maddi, manevi ellerinden gelen her türlü desteği esirgmeden sunan, her zaman inanan, her zaman yanımda olan ve benim bu günlere gelmemde en büyük katkıyı sağlayan sevgili AİLEM’e sonsuz minnet duygularımı sunuyorum.

Çiğdem AYNA
Trabzon, 2016

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “Termofilik *Geobacillus caldoxylosilyticus* TK4'ten Elde Edilen Rekombinant Glukoz İzomerazın Bazı Özelliklerinin Mutasyonla Geliştirilmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK'ın 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. 28/03/2016

Çiğdem AYNA

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ.....	XI
KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ	XII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. Glukoz İzomeraZ	2
1.3. Glukoz İzomeraZın Endüstriyel Önemi	4
1.4. Glukoz İzomeraZın Özellikleri	6
1.4.1. Optimum Sıcaklık ve pH	6
1.4.2. Substrat Özgünlüğü	6
1.4.3. Alt Ünite Yapısı.....	7
1.4.4. Glukoz İzomeraZların DNA Dizi Benzerliğı	8
1.4.5. Aktif Bölge Çalışmaları ve Reaksiyon Mekanizması	9
1.4.6. Metal İyonu Gereksinimi.....	11
1.4.7. Glukoz İzomeraZ Üzerine Yapılan Mutasyon Çalışmaları.....	13
1.5. Yüksek İçerikli Fruktoz Şurubunun (HFCS) Avantajları, Üretimi ve Kullanım Alanları	15
1.6. Etanol Üretimi	16
1.7. Termofiller ve Termofilik Enzimlerin Özellikleri.....	17
1.8. Endüstriyel GI'lar	21
1.9. <i>Geobacillus caldoxylyticus</i> TK4 Suşunun Bazı Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri	21
1.10. Çalışmanın Amacı ve Pratik Önemi	22
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	25

2.1.	Kullanılan Materyaller.....	25
2.1.1.	Cihazlar.....	25
2.1.2.	Enzimler	26
2.1.3.	Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler	26
2.1.4.	Primerler	26
2.1.5.	Kullanılan Suşlar	27
2.1.6.	Luria-Bertani Sıvı ve Katı Besiyerlerinin Hazırlanması	27
2.1.7.	Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar	27
2.1.7.1.	Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	27
2.1.7.2.	Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler	28
2.1.7.3.	SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler.....	28
2.1.7.4.	Tampon Çözeltiler	29
2.1.7.5.	Enzim Aktivitesi Tayininde Kullanılan Çözeltiler	30
2.1.7.6.	Diğer Çözeltiler	30
2.2.	Mutasyon Çalışmaları.....	31
2.2.1.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) İçin Kalıp DNA'nın Elde Edilmesi	31
2.2.2.	Plazmit DNA İzolasyonu.....	31
2.2.3.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Mutant Genlerin Çoğaltılması.....	32
2.2.4.	PCR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	33
2.2.5.	Kalıp DNA'nın Ortamdan Uzaklaştırılması	33
2.2.6.	Mutant Vektörlerin Konakçı Hücreye Aktarılması	34
2.2.6.1.	Kompotent Hücre Hazırlanması	34
2.2.6.2.	Transformasyon	34
2.2.7.	Mutant Plazmitlerin Seçimi, İzolasyonu ve Sıra Analizi	35
2.2.8.	DNA Sıralarının İncelenmesi	35
2.2.9.	Mutant Genlerin Ekspresyonu	35
2.2.10.	<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysE'de Ekspres Edilen Mutant Proteinlerin Saflaştırılması.....	35
2.3.	Enzim Karakterizasyonu Çalışmaları	37
2.3.1.	Protein Tayini	37
2.3.2.	SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE).....	37
2.3.3.	Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	38
2.3.4.	Optimum pH Değerlerinin Belirlenmesi	39

2.3.5.	Optimum Sıcaklıkların Belirlenmesi	39
2.3.6.	Enzim Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi	39
2.3.7.	Bazı Kinetik Parametrelerin İncelenmesi	40
2.3.8.	Enzimlerin pH Kararlılıklarının İncelenmesi	40
2.3.9.	Enzimlerin Isıl Kararlılıklarının İncelenmesi	40
2.3.10.	Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi	41
3.	BULGULAR	42
3.1.	Mutant Primerlerin Tasarlanması	42
3.2.	PCR ile Mutant Genlerin Çoğaltılması, Saflaştırılması ve Transformasyonu	42
3.3.	Mutant Genlerin Ekspresyonu ve Proteinlerin Saflaştırılması	44
3.4.	Mutant Enzimlerin Biyokimyasal Karakterizasyonu	44
3.4.1.	SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi	44
3.4.2.	Optimum pH'nın Belirlenmesi	46
3.4.3.	Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi	46
3.4.4.	Enzim Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi	47
3.4.5.	Bazı Kinetik Parametrelerin İncelenmesi	49
3.4.6.	Enzimin pH Kararlılığının İncelenmesi	50
3.4.7.	Enzimin Isıl Kararlılığının İncelenmesi	52
3.4.8.	Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi	54
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA	56
5.	ÖNERİLER	64
6.	KAYNAKLAR	65

ÖZGEÇMİŞ

Doktora Tezi

ÖZET

TERMOFİLİK *GEOBACILLUS CALDOXYLOSILYTICUS* TK4'TEN ELDE EDİLEN
REKOMBİNANT GLUKOZ İZOMERAZIN BAZI ÖZELLİKLERİNİN
MUTASYONLA GELİŞTİRİLMESİ

Çiğdem AYNA

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK
2016, 79 Sayfa

Bölge spesifik mutasyonlar yapılarak daha yüksek sıcaklık ve düşük pH değerlerinde çalışabilen, glukozu karşı daha ilgili ve daha yüksek pH ve ısı kararlılığına sahip glukoz izomerazın elde edilmesi amaçlanan bu çalışmada pET-28a(+) vektörüne önceden klonlanmış *Geobacillus caldoxylosilyticus* TK4GI geni üzerinde bölge özgün mutasyonları olan H99Q, V184T, D102N ve H99Q/D102N mutasyonları yapılmış, elde edilen mutant genler BL21(DE3)pLysE konakçı hücresine aktarılıp ekspres edilerek mutant proteinler nikel afinite kromatografisi ile saflaştırılmış ve her bir enzimin biyokimyasal karakterizasyonu yapılmıştır. Yapılan mutasyon çalışmaları sonucunda enzimin optimum sıcaklık ve K_m değerinde artma, optimum pH ve V_{max} değerinde ise azalma görülmüştür. Rekombinant enzimle karşılaştırıldığında özellikle pH 6,0'daki pH kararlılığında artma meydana gelmiştir. Literatürdeki ısı kararlılık çalışmalarıyla kıyaslandığında, özellikle depolama sıcaklığı olan 4 °C'de bir miktar artış gözlenmiştir. Ayrıca en yüksek enzim aktivitelerinin genel olarak Co^{2+} , Cu^{2+} ve Mn^{2+} varlığında olduğu gözlenmiş ve bazı metal iyonlarının inhibisyonuna karşı daha dirençli hale gelmiştir. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, yapılan mutasyonlarla enzimin optimum pH, optimum sıcaklık, pH kararlılığı ve depolama şartlarındaki ısı kararlılığında istenilen yönde iyileşmeler elde edilirken, enzimin substratına duyduğu ilginin ve maksimum enzim aktivitesinin kısmen azaldığı belirlenmiştir. Bu çalışma TÜBİTAK (109T985) tarafından desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Glukoz izomeraz, *Geobacillus*, Termofilik, Mutasyon

PhD. Thesis

SUMMARY

DEVELOPMENT OF SOME PROPERTIES OF A RECOMBINANT GLUCOSE ISOMERASE FROM *GEOBACILLUS CALDOXYLOSILYTICUS* THERMOPHILIC BY MUTATION

Çiğdem AYNA

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Chemistry Graduate Program
Advisor: Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK
2016, 79 Pages

In this study, it was aimed to obtain a glucose isomerase which 1) work at higher temperature and 2) lower pH value, 3) has more affinity to glucose, more 4) pH and 5) thermal stable by performing four site-directed mutations. H99Q, V184T, D102N ve H99Q/D102N mutations were performed for *Geobacillus caldoxylosilyticus* TK4GI gene that was previously cloned to pET-28a(+) vector. The obtained mutant genes were overexpressed in a BL21(DE3)pLysE host cell. Mutant proteins were purified by nickel affinity chromatography. Biochemical characterization of all mutant enzymes was examined. The findings are that the mutations mentioned above induced 1) an increase in optimum temperatures and 3) K_m values of mutant proteins but 2) a decrease at optimum pHs and V_{max} values, 4) an increase in the pH stability at pH 6.0 compared to recombinant enzyme, 5) to be more stable in temperatures especially at 4 °C compared to literature. Also in general, the highest activities of mutant enzymes were observed in the presence of Co^{2+} , Cu^{2+} and Mn^{2+} and mutant enzymes were more resistant to inhibition of some metal ions. In conclusion, optimum pH, optimum temperature, pH stability and stability at storage temperature value of recombinant enzyme was improved as aimed, but affinity to substrate and maximum enzyme activity slightly decreased. This study was supported by the grant from TUBITAK (109T985).

Key Words: Glucose isomerase, *Geobacillus*, Thermophilic, Mutation

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.	Endüstriyel enzim marketinin global hasılatı (2009-2016).....	2
Şekil 2.	<i>D</i> -glukozun <i>D</i> -fruktoza, <i>D</i> -ksilozun da <i>D</i> -ksiluloza GI aracılığıyla Dönüşümlü izomerizasyonu	3
Şekil 3.	GI'nın alt birim yapısı.....	7
Şekil 4.	Sınıf I ve Sınıf II GI'ların yapıları.	9
Şekil 5.	GI tarafından katalizlenen reaksiyonun mekanizması	10
Şekil 6.	GI için önerilmiş reaksiyon mekanizması (Kovalevsky vd., 2010).....	11
Şekil 7.	Doğal GI'nın metal bağlanmış aktif bölgesi	12
Şekil 8.	<i>G. caldoxylolyticus</i> TK4 GI'sının amino asit sırasının, <i>G. stearothermophilus</i> , <i>G. thermodenitrificans</i> , <i>G. kaustophilus</i> , <i>B. coagulans</i> GI'larının amino asit sıraları ile karşılaştırılması.	43
Şekil 9.	PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü	43
Şekil 10.	TK4GI, TK4GIM1, TK4GIM2, TK4GIM3 ve TK4GIM4 proteinlerinin aminoasit sıralarının karşılaştırılması	44
Şekil 11.	%12'lik SDS-PAGE elektroforezi	45
Şekil 12.	TK4GI ve mutant enzimlerin aktiviteleri üzerine pH'nın etkisi	46
Şekil 13.	TK4GI ve mutant enzimlerin aktiviteleri üzerine sıcaklığın etkisi	47
Şekil 14.	Enzim aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisi.....	48
Şekil 15.	TK4GI ve mutant enzimlerin Lineweaver-Burk grafikleri	49
Şekil 16.	pH 7,5 ve 4 °C'deki pH kararlılık eğrisi	51
Şekil 17.	pH 7,5 ve 80 °C'deki pH kararlılık eğrisi	51
Şekil 18.	pH 6,0 ve 4 °C'deki pH kararlılık eğrisi	52
Şekil 19.	pH 6,0 ve 80 °C'deki pH kararlılık eğrisi	52
Şekil 20.	80 °C'deki ısıl kararlılık eğrisi.....	53
Şekil 21.	4 °C'deki ısıl kararlılık eğrisi.....	53

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Ticari öneme sahip GI'ları üreten bazı mikroorganizmalar ve ürünlerinin (GI) ticari adları (Bhosale vd., 1996)	21
Tablo 2. <i>G. caldxylyticus</i> TK4 suşunun bazı biyokimyasal özellikleri	22
Tablo 3. Kullanılan cihazlar.....	25
Tablo 4. Kullanılan enzimler	26
Tablo 5. Kullanılan kimyasal madde ve malzemeler.....	26
Tablo 6. Polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) kullanılan primerler	26
Tablo 7. Klonlama ve ekspresyonda kullanılan <i>E.coli</i> suşları	27
Tablo 8. PCR bileşenleri	32
Tablo 9. <i>DpnI</i> enzimi ile kesim	33
Tablo 10. SDS-PAGE'nin bileşenleri	38
Tablo 11. TK4GI ve mutant proteinlerin kinetik parametrelerinin karşılaştırılması	50
Tablo 12. Bazı metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	54
Tablo 13. Çeşitli mikroorganizmalara ait GI'nın glukoz için K_m değerleri.....	59

KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ

atm	: Atmosfer
bç	: Baz çifti
BSA	: Sığır serum albümini
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleotriphosfat
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
FDA	: Food and Drug Administration
g	: Gram
IPTG	: İzopropil-β-D-1-tiyogalaktopiranozid
kDa	: Kilodalton
M	: Molar
mA	: miliamper
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
N	: Normal
NAD ⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotid
nm	: Nanometre
OD	: Optik yoğunluk
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: Dakikadaki dönüş sayısı
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametiletilediamin
TIM	: Trioz-Fosfat izomeraz
Tris	: Tris(hidroksimetil)aminometan
U	: Enzim ünitesi
V _{max}	: Maksimum hız

v/v	: Hacim/hacim
w/v	: Ağırlık/hacim
X-ray	: Röntgen radyasyonu
<i>xyIA</i>	: Glukoz/ksiloz izomeraz geni
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre



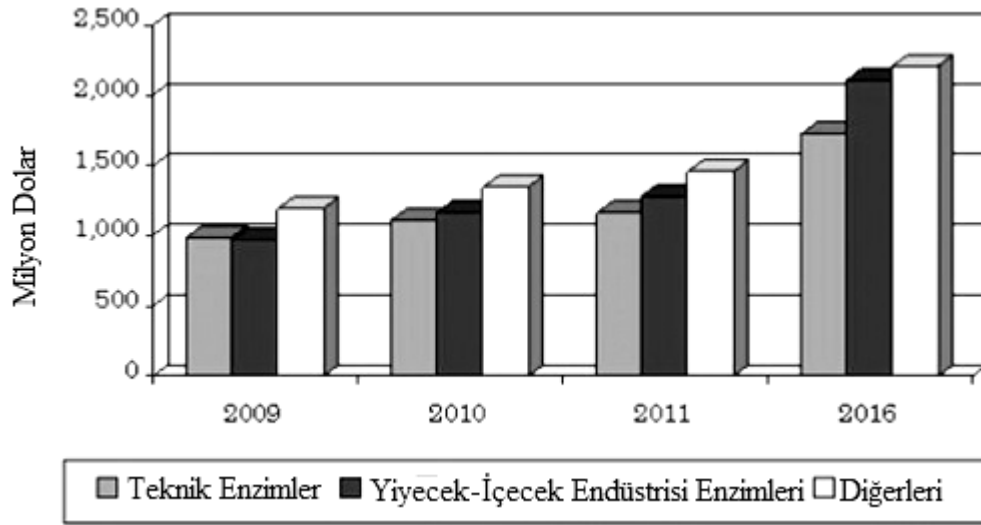
1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Enzimler, biyolojik sistemlerdeki reaksiyonların canlılığa zarar vermeyecek ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan biyokatalizörler olarak tanımlanırlar. Bununla beraber gerekli koşulların sağlanması durumunda etkilerini gösterebiliyor olmaları, enzimlerden doğal ortamlarının dışındaki pek çok alanda yararlanabilme imkânı ortaya çıkarmaktadır. Bu doğrultuda enzimler hakkında elde edilen bilgiler pratik uygulamalara imkân verdikçe enzimlerin değişik alanlarda çeşitli amaçlarla kullanımı hayata geçmektedir (Telefoncu, 1986).

Enzimler, substratları ürün denilen maddelere çevirirler. Bu işlemi, aktivasyon enerjisini düşüren kompleks ara ürün oluşumu üzerinden gerçekleştirirler. Enzimler, reaksiyonları inorganik katalizleyiciler gibi katalizleyebilirler. Enzimatik reaksiyonlar spesifik ve etkili olma özelliklerinden dolayı, endüstriyel uygulamalarda önemli bir potansiyele sahiptirler (Singhania vd., 2010).

Biyoteknolojinin endüstriyel enzimler ile ilgili alanında enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerlerinin çok yüksek olması nedeniyle yapılan araştırmalar daha da önem kazanmaktadır. Enzimlerin endüstriyel kullanım alanlarına göre dağılımına bakıldığında, %29'unun gıda sektöründe, %15'inin hayvan yemi sektöründe, %56'sının ise genel teknik alanlarda kullanıldığı görülmektedir (Kirk vd., 2002; Schallmey vd., 2004). Endüstrideki enzimlerin %90'ından fazlası, üretkenlik ve verimliliği arttırmak için rekombinant sistemlerle üretilmektedir (Cherry ve Fidantsef, 2003). BBC araştırmacılarının yayınlamış olduğu rapora göre, global endüstriyel enzim hasılatı 2010 yılında 3,6 milyon dolar iken 2016 yılına kadar bu değer 6 milyon dolara ulaşması beklenmektedir. Endüstriyel enzimlerin en büyük market payına sahip olan yiyecek ve içecek endüstrisinde kullanılan enzimlerinin hasılatı 2010 yılında 1,2 milyon dolar iken 2016 yılında bu rakamın 2,1 milyon dolara ulaşması beklenmektedir (Şekil 1), (Yaman, 2014).



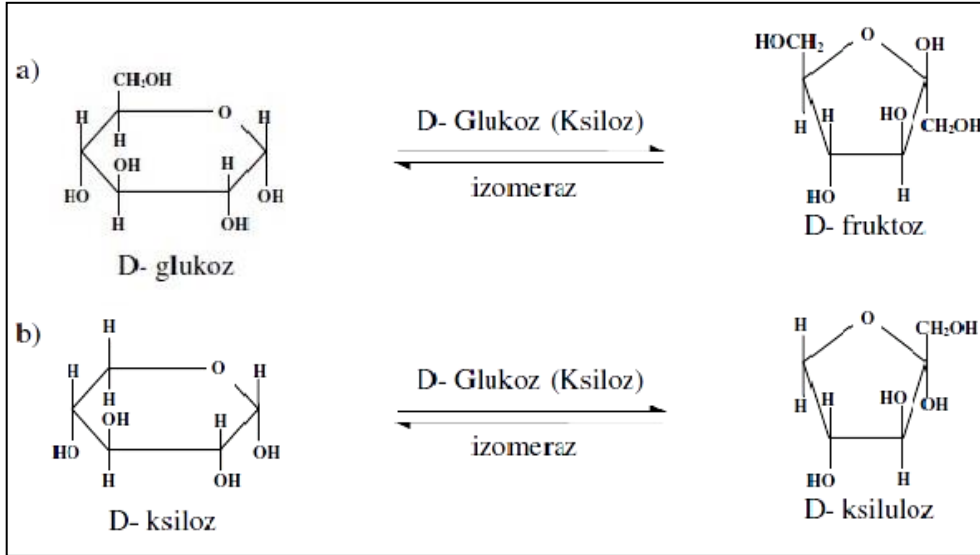
Şekil 1. Endüstriyel enzim marketinin global hasılatı (2009-2016)

Endüstride yaygın kullanım alanı bulunan enzimlerden bazıları şunlardır: glukoz izomeraz (GI), proteolitik enzimler, selülazlar, galaktozidazlar ve amilolitik enzimlerdir.

1.2. Glukoz İzomeraz

Glukoz (ksiloz) izomeraz (GI) (E.C.5.3.1.5) besin ve içecek endüstrisinde sukroz gibi tatlı olan şeker karışımlarının mikrobiyal üretiminde önemli bir role sahiptir ve hem *D*-ksilozun *D*-ksiluloza hem de *D*-glukozun *D*-fruktoza dönüşümlü izomerizasyonunu katalizler (Şekil 2). Ayrıca birçok mikroorganizma tarafından hücre-içi (intracellular) karakterde sentezlenmekte ve özellikle fruktoz içeren mısır şuruplarının üretiminde kullanılmaktadır.

GI, bugüne kadar, toprak, deniz ve tatlı sularda yaşayabilen aerobik ve anaerobik birçok mikroorganizmada incelenmiştir (Chen, 1980a). Bunlara örnek olarak; *Actinomyces phaeochromogenes*, *Aerobacter aerogenes*, *Actinoplanes missourienses*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus stearothermophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Pseudomonas hydrophila*, *Streptomyces phaeochromogenes*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces bikiniensis* türlerini vermek mümkündür (Chen, 1980b). Özellikle, ticari öneme sahip olanlar, *Bacillus*, *Arthrobacter* ve *Streptomyces* türlerinden elde edilen GI'lardır (Scallet vd., 1974).



Şekil 2. *D*-glukozun *D*-fruktoza, *D*-ksilozun da *D*-ksiluloza GI aracılığıyla dönüşümlü izomerizasyonu

GI, ilk kez Marshall ve Kooi tarafından 1957 yılında *Pseudomonas hydrophila*'dan saflaştırılmıştır. Bu enzim ksiloza glukozdan daha spesifiktir ve büyüme ortamında ksiloza ihtiyaç duyduğu ve üretiminin arsenat varlığıyla artırılabilirdiği gösterilmiştir. Takasaki ve Tanabe, *Bacillus megaterium*'den NAD^+ bağımlı ve glukozu özgü bir GI'yi (EC 5.3.1.18) izole ederek literatüre kazandırmışlardır (Takasaki ve Tanabe, 1962, 1963). Daha sonraları ksilozdan bağımsız olarak, ksiloz izomeraz aktivitesi *Escherichia intermedia*'da bulunmuştur (Natake ve Yoshimura, 1964). *Paracolobacterium aerogenoides*'den izole edilen GI'nin glukoz ve mannozun fruktoza izomerizasyonunu gerçekleştirdiği anlaşılmıştır (Takasaki ve Tanabe, 1964, 1966). 1965 yılında yapılan bir başka çalışmada ise elde edilen ksiloz izomerazın (EC 5.3.1.5) ne arsenata ne de NAD^+ 'ye ihtiyaç duymadığı ortaya konulmuştur (Tsumura ve Sato, 1965).

Sonrasında yapılan çalışmalarda GI'nin amino asit sırası, protein yapısı ve kinetik özellikleri ortaya konulmuştur (Hogue-Angeletti, 1975; Schray ve Mildvan, 1972). Buna ek olarak GI'nin katalitik mekanizmasını aydınlatmak için yapılan çalışmalarda, farklı metal iyonlarının katalitik aktivitedeki önemi ortaya konulmuştur (Asboth ve Naray-Szabo, 2000; Bogumil vd., 2000; Farber vd., 1989; Kovalevsky vd., 2010; Rozanov vd., 2009; Van Tilbeurgh vd., 1992).

Bacillus subtilis (Lee vd., 1990b), *Bacillus brevis* ve *E. coli* (Dekker vd., 1992), *Streptomyces lividans* (Tan vd., 1989), *Schizosaccharomyces pombe* (Chan vd., 1989) ve *Saccharomyces cerevisiae* (Moes vd., 1996) gibi birçok mikroorganizma GI üretimi için

kullanılmıştır. İlk kez GI kodlayan gen 1983 yılında *E. coli*'den saflaştırılmıştır (Ho vd., 1983). Ayrıca, doğal üretici suşlardan GI kodlayan genlerin farklı tiplerde ki *Escherichia coli* suşlarında ekspresyonunu sağlanan birçok çalışma vardır (Angardi ve Çalık, 2013; Dekker vd., 1992; Kaneko vd., 2001; Lee vd., 1993; Rhimi vd., 2007; Sariyar vd., 2004).

Dekker ve arkadaşları tarafından ısılabararlı bir GI, termofilik bir mikroorganizma olan *Thermus thermophilus*'dan izole edilmiştir (Dekker vd., 1991). Bir diğer çalışmada, *Thermotoga maritima*'dan saflaştırılan GI, gösterdiği yüksek çalışma sıcaklığından dolayı endüstriyel olarak önemli bir enzim olarak tanımlanmıştır (Brown vd., 1993). Vieille ve arkadaşları GI enzimini *Thermogata neapolitana*'dan izole etmiş ve *E. coli* içersine klonlamışlardır (Vieille vd., 1995). Ekonomik olarak önemini artırmak için, amino asit dizisi, hidrofobikliği, sülfid bağları ve tuz köprüleri açısından GI'nın ısıya dayanıklılık özellikleri birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır (Hartley vd., 2000; Zhu vd., 1997). Bu çalışmaları değerlendiren diğer araştırmacılar, GI'nın ısılabararlılığını geliştirmeye çalışmışlardır (Chang vd., 1999; Hartley vd., 2000; Xu vd., 2009).

Günümüzde glukoz (ksiloz) izomerazın ticari üretiminde, indükleyici olarak glukoz (ksiloz)'a ihtiyaç duymayan mikroorganizmalar tercih edilmektedir (Wingard vd., 2012). GI üretimi genellikle 2-3 gün süren örtülü aerobik mayalanma ile gerçekleştirilmektedir (Bhasin ve Modi, 2012; Bhosale vd., 1996).

1.3. Glukoz İzomerazın Endüstriyel Önemi

GI, glukozun fruktoza izomerizasyonunu katalizlediği için endüstriyel alanda, özellikle yüksek fruktoz içerkli şurup (High Fructose Corn Syrup: HFCS) üretiminde, ticari bir öneme sahiptir. 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. FDA (2000)'e göre fruktoz şurupları; %42 veya %55 fruktoz içeren tatlı, besleyici sakkarit karışımı olup, mısır nişastası glukozunun GI enzimi kullanılarak fruktoza dönüştürülmesi ile elde edilen bir üründür. Ayrıca %90 fruktoz içeren üçüncü bir tipi de bulunmakta olup, dünyada sınırlı kullanıma sahiptir (Knorr, 1987). Enzimin ilgisinin glukozu ksilozdan 160 kat daha düşük olmasına rağmen, sahip olduğu kapasite enzimin ticari olarak önemli olmasına yetmiştir (Natake ve Yoshimura, 1964).

Yiyecek endüstrisinde HFCS'ye olan talep her geçen gün artmış ve 1980'e kadar batı dünyasındaki tüm şekerlerle uğraşan büyük şirketler GI teknolojisine başvurmaya başlamıştır. Bugün, enzim, yiyecek endüstrisinde en büyük marketlerde yerini almıştır (Bhosale vd., 1996). Sahip olduğu endüstriyel önemden dolayı bugüne kadar birçok organizmanın GI enzimi incelenmiş (Brown vd., 1993; Chen, 1980a; Lee vd., 1990a; Suekane vd., 1978) ve birçok bakterinin *xyIA* geni gen bankasındaki yerini almıştır (Amore, R ve Hollenberg, 1989; Bor vd., 1992; Briggs vd., 1984; Collyer ve Blow, 1990; Dekker vd., 1991; Drocourt vd., 1988; Lee vd., 1990a; Lee vd., 1993; Meaden vd., 1994; Saari vd., 1987; Wilhelm ve Hollenberg, 1985).

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

HFCS üretiminde mezofilik organizmalardan elde edilen GI'lar, immobilize edilmiş bir şekilde 55-65 °C'de pH 7,5 ile 8,5 aralığında kullanılmaktadır (Drazic vd., 1980). Bu şartlar altında enzim ile %40-42 oranında fruktoz üretilebilmektedir. Fakat endüstriyel uygulamalarda kullanılan HFCS'de %55 fruktoz içeriği aranmaktadır. Dolayısı ile bu oran kromatografik olarak %55 seviyelerine getirilmektedir. Fakat bu işlem üretim maliyetini arttırmaktadır (Bejar vd., 1994). Sıcaklığın artmasıyla fruktoz/glukoz dengesi fruktoz tarafına kaymakta böylece pahalı olan kromatografik saflaştırmaya gerek kalmamaktadır (Amore vd., 1989; Du Preez ve Prior, 1985). Bu yüzden bu uygulamalarda yüksek sıcaklıklarda çalışan termofilik mikroorganizmalardan elde edilen enzimler tercih edilmektedir (Blacklow vd., 1988). Fakat yüksek pH değerlerinde yüksek sıcaklık uygulamaları, istenmeyen mannoz, psikoz ve diğer asidik yan ürünlerin oluşumuna sebep olduğu için, düşük pH değerlerinde çalışan bir enzime ihtiyaç duyulmaktadır (Bartfay,

1960). Bu ihtiyaçlardan dolayı bugüne kadar birçok termofilik ve asidik karakterli bakterilerin GI'sı araştırılmıştır.

Mevcut GI'lar üzerinde mutasyonlar meydana getirilerek, enzimin özelliklerinin geliştirilmesi için araştırmalar yapılmıştır. Bölgeye özgün mutasyonlarla çeşitli mikroorganizmalara ait birçok GI için, ısıl kararlılığın artırılması, optimum pH değerinin düşürülmesi, substrat tercihinin değiştirilmesi sağlanmış olup, ayrıca çeşitli amino asitlerin molekül içerisindeki fonksiyonunun belirlenmesi ve alt üniteler arasındaki etkileşimlerin ortaya çıkarılması yönünde birçok endüstriyel ve bilimsel öneme sahip çalışma gerçekleştirilmiştir (Amore vd., 1989). Ayrıca GI enzimi hakkındaki birçok bilgi patentlendirilmiştir.

1.4. Glukoz İzomerazın Özellikleri

1.4.1. Optimum Sıcaklık ve pH

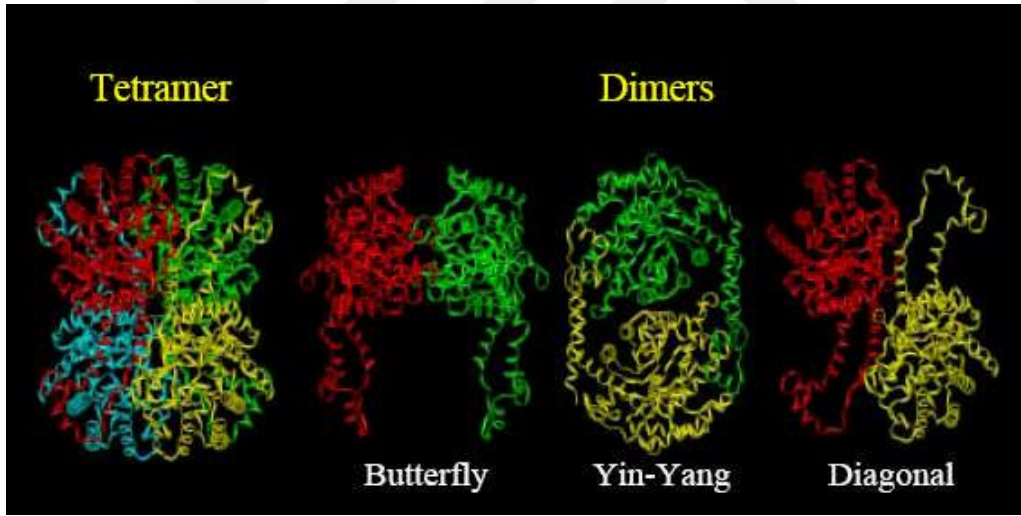
Enzimi üreten mikroorganizmaya bağılı olarak enzimin optimum çalışma sıcaklığı, 60-110 °C, optimum pH değeri ise 6,5 ve 9,0 aralığında değişim göstermektedir. *Streptomyces* spp., *Bacillus* spp gibi termofilik türlerden izole edilen GI'lar, *Lactobacillus* ve *Escherichia* spp. gibi mezofilik türlerden elde edilenlerle karşılaştırıldığında, yüksek sıcaklıklarda daha iyi stabiliteye sahip oldukları görülmektedir (Bhosale vd., 1996; Brown vd., 1993).

1.4.2. Substrat Özgünlüğü

Farklı mikroorganizmalardan elde edilen GI'lar farklı substrat özgünlüğü gösterirler. Enzim, *D*-riboz, *L*-arabinoz, *L*-ramnoz, *D*-alloz ve 2-deoksiglukoz gibi birçok şekeri substrat olarak kullanabilir (Hausler ve Stutz, 2001). Enzimin maximum izomerizasyon gerçekleştirdiğı substratlar, glukoz ve ksiloz gibi ekvatorial düzlemindeki 3. ve 4. karbonlarında hidroksil grubu taşıyan substratlardır (Bhosale vd., 1996).

1.4.3. Alt Ünite Yapısı

Genel olarak bakıldığında birbirine benzeyen 2, 4 veya nadir olarak 3 altbirimden oluşurlar ve molekül ağırlıkları 44 kDa ile 191 kDa arasında değişim göstermektedir. Bu altbirimler birbirlerine kovalent olmayan etkileşimlerle bağlıdır ve aralarında disülfür bağları bulunmamaktadır (Chauthaiwale ve Rao, 1994; Ghatge vd., 1994). Her bir alt birim, katalitik bölge, metal bağlanma bölgesi ve C- ucu sarmal bölgesini içeren sekiz β -tabaka- α -heliks $[(\alpha/\beta)_8]$ ünitesinden, silindir ya da TIM silindir bölgelerinden oluşmaktadır (Carrell vd., 1984; Hartley vd., 2000). Tetramer yapı, bir AB/B*-A* simetrisi olarak gösterilebilen iki özdeş dimerden oluşmaktadır. Üç teorik dimer yapılanışı yine Şekil 3'de gösterilmiştir. Bunlardan en kararlı olan Ying-yang (B-B*) dimeridir. Ancak, o da aktif bölge çevresindeki etkileşimlerden yoksundur. Kelebek dimeri, bu etkileşimleri de içermektedir (Hartley vd., 2000).



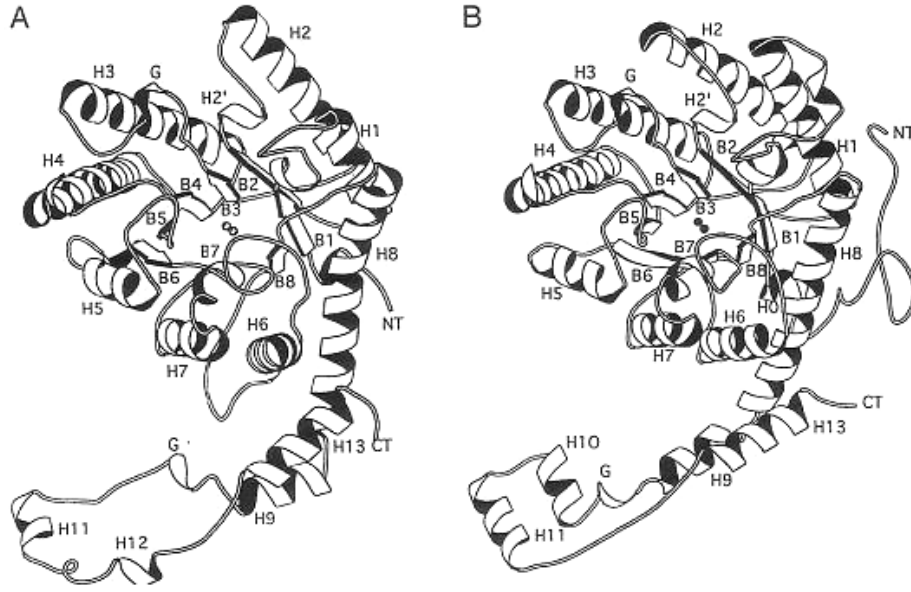
Şekil 3. GI'nın alt birim yapısı. Tetramer ve kuramsal dimer yapılanış. Kırmızı=Altbirim A, Yeşil=Altbirim B*, Mavi=Altbirim A*, Altbirim=Altbirim B (Vieille ve Zeikus, 2001).

Basuki ve arkadaşları, *Streptomyces phaeochromogenes*'den elde ettikleri enzimlerin, GI'nın izoenzimleri olduğunu ve bu izoenzimlerin herbirinin farklı dört altbirimden oluştuğunu rapor etmişlerdir (Basuki vd., 1992). *Arthrobacter* ve *Streptomyces* türlerinde yapılan çalışmalarda monomer ünitelerin tek başlarına herhangi bir biyolojik aktiviteye sahip olmadıkları ortaya konulmuştur (Gaikwad vd., 1993; Rangarajan ve Hartley, 1992).

1.4.4. Glukoz İzomerazların DNA Dizi Benzerliği

Birçok organizmadan elde edilen GI (*xylA*) genlerinin amino asit dizilimleri, GI'ların yapı ve işlevleri arasındaki ilişkiyi aydınlatmak için karşılaştırılmıştır. Yapılan bu çalışmalar sonucunda GI'lar, N-terminal ucunda 40-50 amino asitlik bir bölgenin olup olmamasına göre 2 sınıfa ayrılmışlardır (Vangrysperre vd., 1988). Sınıf I GI'lar yaklaşık 390 amino asitten oluşup yüzeysel birimlerde birkaç sekans farklılığı ile beraber kendi aralarında yüksek homoloji gösterirler (Şekil 4), (Bhosale vd., 1996). Bu sınıf GI üreten organizmalara örnek olarak *Streptomyces olivochromogenes* (Farber vd., 1987), *Arthrobacter* strain B3728 (Henrick vd., 1989), *Actinoplanes missouriensis* (Jenkins vd., 1992), *Ampullariella* sp. strain 3876 (Saari vd., 1987) ve *Thermus thermophilus* (Dekker vd., 1991) verilebilir. Sınıf II GI'lar ise yaklaşık 440 amino asitten meydana gelmişlerdir. N-terminal ucunda 40-50 amino asitlik bir bölgeye sahiptirler ve bu gruba dahil enzimlerin amino asit dizilimleri birbirlerine az benzerler (Bhosale vd., 1996). Bu sınıf GI'ya sahip olan bakterilere örnek olarak *E. coli*, *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* ve *Thermotoga* spp. türleri verilebilir (Hess vd., 1998). Sınıf 2 GI'lar 8 sarmal ile çevrelenmiş birbirine paralel 8 β -levhadan ve diğer monomerlerle ilişkide bulunan uzamış bir C-terminal kuyruktan meydana gelirler (Şekil 4). Enzimin aktif bölgesi açık bir fıçı şeklinde bir cepten meydana gelir ve bu cebin alt tarafında, genel olarak hidrofobik amino asitler ile Mg^{2+} , Mn^{2+} ve Co^{2+} gibi divalent katyonlar ile birlikte çalışan glutamik asit, aspartik asit ve histidin gibi amino asitler bulunmaktadır (Whitlow vd., 1991).

Sınıf I GI'lar kendi aralarında yüksek homoloji göstermenin yanında benzer katalitik aktivite ve optimum sıcaklık sergilerlerken, Sınıf II GI'lar, geniş aralıkta sekans homolojisi ve değişken aktivite ve optimum sıcaklık sergilemektedirler (Hartley vd., 2000) Sınıf 1 ve Sınıf 2 glukoz izomerazlar arasında amino asit dizilimi açısından büyük farklılıklar olmasına rağmen genel olarak; substrat ile ilişkide H100, T140, E231, K233, D338, metal iyonunun bağlanmasında E231, E267, H270, D295, D306, D308, D338 ve katalitik işlemlerde ise H100, D103, D338'in büyük ölçüde korunduğu görülmektedir. Uzak olan türlerin karşılaştırmalarında bile enzimin aktif bölgesine ait içeriğin birbirine oldukça yakın olduğu görülebilmektedir (Hess vd., 1998).



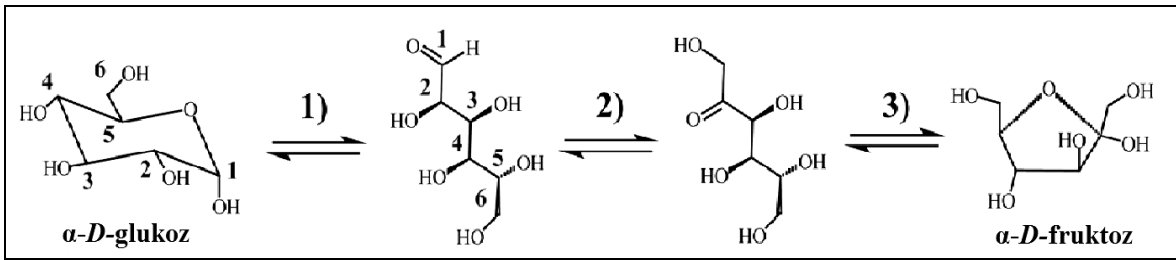
Şekil 4. Sınıf I ve Sınıf II GI'ların yapıları. (A). *Arthrobacter* Sınıf I GI, (B). *T. thermosulfurogenes* Sınıf II GI. H1= α -heliksler, G=3/10 heliksler B= β -levha, CT=C- ucu, NT=N- ucu (Hartley vd., 2000).

1.4.5. Aktif Bölge Çalışmaları ve Reaksiyon Mekanizması

İlk zamanlar, GI'ların, şeker fosfat izomerazlara benzer bir şekilde enediol mekanizması ile işlev gördükleri sanılmaktaydı (Rose vd., 1969). Ancak sonradan iki enzimin birbirinden çok farklı olduğu belirlendi. Fosfat izomerazlar, herhangi bir kofaktöre ihtiyaç duymazken, GI aktivitesi için iki metal kofaktör gerekmektedir. GI, katalitik bölgede enediol mekanizması için gerekli olan uygun bir baz içermemektedir (Collyer ve Blow, 1990).

Önceleri, GI'nın katalitik mekanizmasının histidin yönlendirmeli genel baz katalizli olduğuna inanılırdı (Carrell vd., 1989). GI'nın katalitik etkinliğini arttırmak için, amino asit diziliminin bilinmesi önemlidir. *E. coli* GI'sının aktif bölgesinde yapılan bölge spesifik mutasyonların etkisi Batt ve arkadaşları tarafından bulunmuştur (Batt vd., 1990) ve iki korunmuş histidin bölgesinin (His-101 and His-271) katalitik etkinlik için gerekli olduğu tanımlanmıştır. Daha sonra, X-ray kristalografî çalışmaları ve bölge spesifik mutasyonla elde edilmiş *xyIA* geninden ekspres edilen termofilik enzimlerin biyokimyasal özellikleri değerlendirildiğinde alternatif bir mekanizmanın olduğu görülmüştür. Bu mekanizma metal iyon destekli hibrit kayması olarak tanımlanmıştır (Collyer ve Blow, 1990; Collyer vd., 1990; Farber vd., 1989; Henrick vd., 1989; Lee vd., 1990a). Oran belirleyici

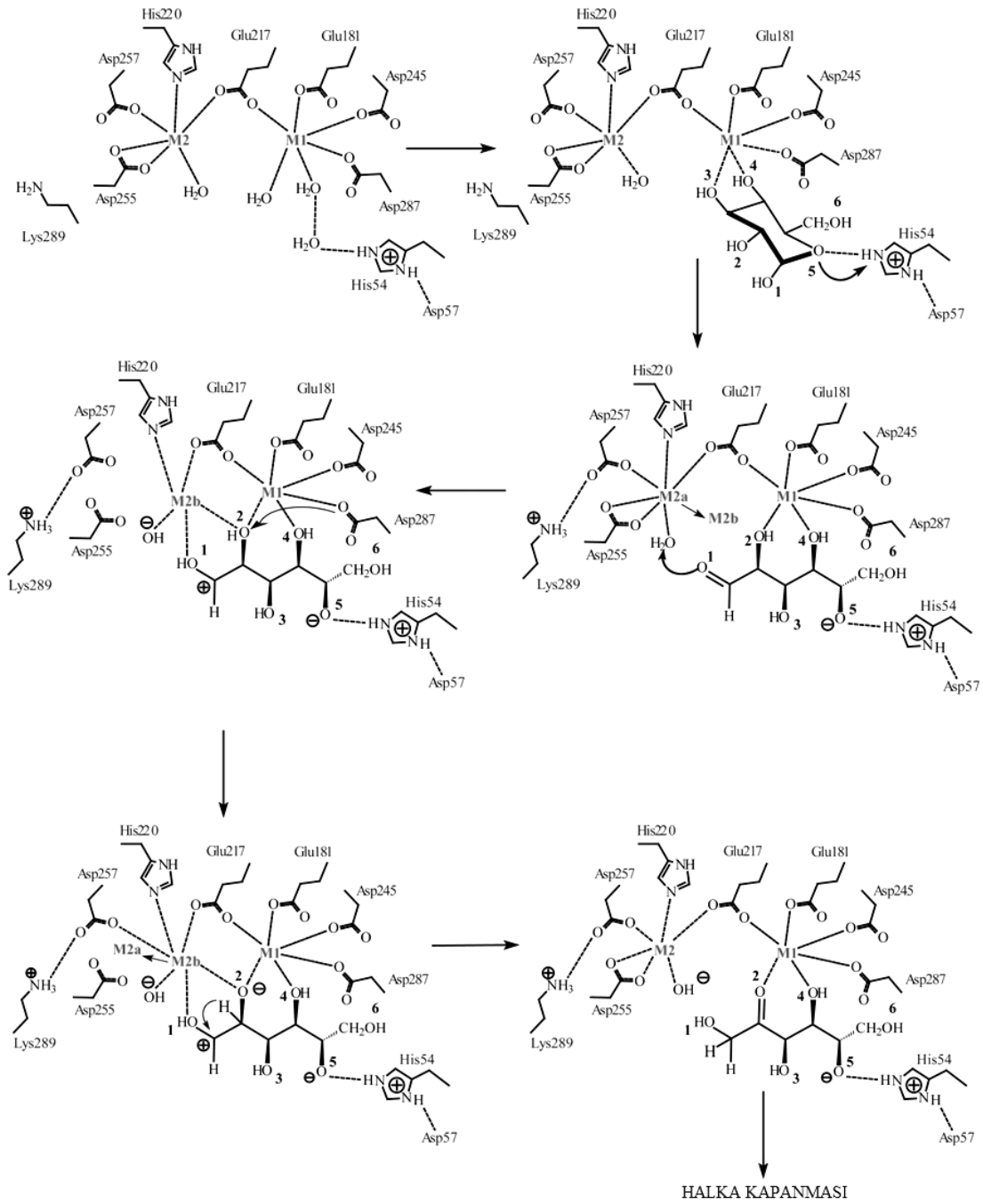
basamağın halka açılması değil izomerizasyon basamağı olduğu anlaşılmıştır (Lee vd., 1990a). Sonraki yıllarda Meilleur ve arkadaşları hidrojen atomlarının lokalizasyonunu keşfetmişlerdir. Yaptıkları çalışma ile, izomerizasyon reaksiyonunun, asit katalizli halka açılmasının takip ettiği His-53 amino asidinin çift proton ile protonlanması ile başlatıldığı ortaya konulmuştur (Meilleur vd., 2006). Bu çalışmalardan sonra, Kovalevsky ve arkadaşları, çalışmalarında tersinir izomerizasyon reaksiyonunun üç adımda gerçekleştiğini göstermiştir (Şekil 5): halka açılması, izomerizasyon ve halka kapanması (Kovalevsky vd., 2010).



Şekil 5. GI tarafından katalizlenen reaksiyonun mekanizması. (1) halka açılması, (2) izomerizasyon, ve (3) halka kapanması (Kovalevsky vd., 2010).

Bu modele göre (Şekil 6), reaksiyonun başlangıcı ve devamı süresince birçok kritik amino asidin yardımıyla enzimin aktif bölgesinde konformasyonel değişimler meydana gelir. İlk basamakta, halkalı aktif şeker substratı ve GI'nın aktif bölgesi birbirine bağlanır. Burada farklı düzende su moleküllerinin bulunuşu, substrat ile GI'nın bağlanmasının doğru açıda olmasını kolaylaştırır.

Bir sonraki adımda, His-53 protonunu geçici olarak O5'e verir ve C1-O5 bağı kırıldıktan sonra verdiği protonu geri alarak halkanın açılmasını sağlar. Halka açılırken, nötral Lys-289 protonlanır ve bir protonunu Asp-257'ye aktarır. Ardından O1, Lys-183'ün yardımıyla izomerizasyonun gerçekleşmesi için doğru pozisyonda konumlanır. İkinci basamakta izomerizasyon gerçekleşir. Bu basamak boyunca, proton, C2'den C1'e ve O2'den O1'e aktarılır. M1'in tekrar O3 ve O4 ile koordinasyonu sonucu, zincir halka formunu alır. His-53 esasen halka açılmasının tersi olacak şekilde halka kapanmasını katalizler. Sonuç olarak halka kapanır ve ürün salınır.



Şekil 6. GI için önerilmiş reaksiyon mekanizması (Kovalevsky vd., 2010).

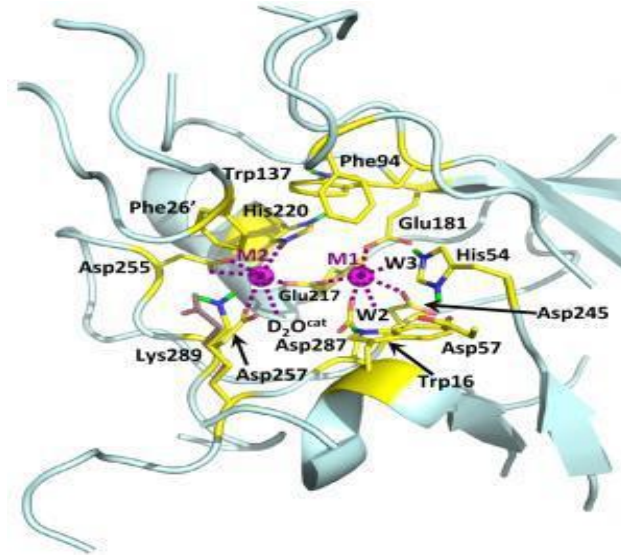
1.4.6. Metal İyonu Gereksinimi

Glukoz izomeraz enzimi, aldo formundaki (glukoz) basit şekerleri keto formuna (fruktoz) izomerize eder ve katalitik aktivitesi için Mg^{2+} ve Co^{2+} gibi divalent katyonlara gereksinim duyar (Chen vd., 1979). Magnezyum, enzimin katalitik aktivitesinde aktivatör olarak rol oynarken, kobalt, enzimin sıcaklığa karşı dayanıklılığını arttırmaktadır

(Takasaki, 1973). Fakat kobaltın tepkime reaksiyonlarında kullanılması bu katyonun toksik ve çevresel tehlike arz etmesi nedeniyle pek tercih edilmemektedir (Chou vd., 1976). Bu yüzden, GI'nın, Co^{2+} katyonuna ihtiyaç duymayanının mikroorganizmalardan üretimi amaçlanmıştır. Bu çerçevede yapılan araştırmalarda bazı *Aerobacter* türlerinden (*A. aerogenes*) kobalta gereksinim duymayan enzim üretimi gerçekleştirilmiştir (Tsumura ve Sato, 1965).

İlk raporlar, *Streptomyces* enzimlerinin, Mg^{2+} ve Co^{2+} iyonlarının her ikisine ihtiyaç duyduğunu göstermiştir. Fakat 1972 yılında yayınlanan bir patente göre *Arthrobacter* türlerinden elde edilen enzimlerin sadece Mg^{2+} 'ya ihtiyaç duydukları belirtilmiştir. Şu anda tüm bu enzimlerin benzer metal iyonu gereksinimleri olduğu söylenebilir. Fakat aktivite ve kararlılık, pH, sıcaklık, substrat ve diğer iyonlara bağlıdır (Bhosale vd., 1996). *Streptomyces griseofuscus*'tan elde edilen enzim için Mg^{2+} 'nin en iyi aktivatör olduğu fakat Co^{2+} 'nın sıcaklığa ve asit direncine karşı en iyi dengeleyici olduğu bildirilmiştir (Kasumi vd., 1982).

GI katalitik aktivitesi, Ag^+ , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} ve Ca^{2+} iyonları tarafından çeşitli oranlarda inhibe olmaktadır (Bhosale vd., 1996). GI enzimi, herbirine iki metal atomu bağlanan 4 monomerin biraraya gelmesiyle oluşan homotetramer formunda aktiftir (Jänis vd., 2008).



Şekil 7. Doğal GI'nın metal bağlanmış aktif bölgesi

X-ray kristalografi ile nötron difraksiyon tekniğinin birlikte kullanılmasıyla, *Streptomyces rubiginosus*'dan elde edilen GI'nın metal bağlanma bölgesi üzerinde çalışılmıştır. GI'nın tam aktivitesi için divalent iki metal atomunun gerekliliği belirlenmiş ve ilgili bölgeler iyonlara olan afinitelerine göre isimlendirilmiştir. Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} ve Pb^{2+} iyonlarına ilgisi bulunan metal bölgesi M1, divalent metal iyonlarına daha geniş afinite gösteren metal bölgesi M2 olarak ifade edilmiştir. Doğal GI'nın metal bağlanmış aktif bölgesi Şekil 7'de gösterilmiştir (Kovalevsky vd., 2010).

1.4.7. Glukoz İzomeraz Üzerine Yapılan Mutasyon Çalışmaları

Glukozun fruktoza kimyasal dönüşümü, geçtiğimiz yüzyıldan beri bilinmekte olup, Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein transformasyonu olarak adlandırılan reaksiyonlardan bir tanesini oluşturmaktadır. Bu reaksiyonlar genellikle yüksek sıcaklık ve pH'da gerçekleşmektedir. Glukozdan kimyasal olarak fruktoz üretmenin olabilirliği çalışılmış, ancak bu reaksiyonun spesifik olmadığı görülmüştür. Ayrıca, yüksek sıcaklık ve pH değerlerinde çalışıldığında psikoz gibi metabolize edilemeyen şekerler ve renkli ürünler oluşmaktadır. Ayrıca, bu metot ile %40'dan daha yüksek konsantrasyonda fruktoz elde etmek çok zordur. Üstelik kimyasal olarak üretilen fruktoz lezzetli değildir ve daha az tatlıdır. Bu nedenle ticari olarak kullanılamaz. Diğer taraftan glukozun fruktoza enzimatik dönüşümü, reaksiyon özgünlüğü, istenilen pH ve sıcaklıkta dönüşüm ve yan ürünlerin oluşmaması gibi avantajlara sahiptir. Bütün bu nedenlerden dolayı enzimatik dönüşüm tercih edilmekte ve GI içeren prosesler endüstriyel uygulamalarda gittikçe artan bir hızla yerini almaktadır (Barker, 1976; Marshall ve Kooi, 1957).

Bunun yanı sıra mevcut enzimler üzerinde mutasyonlar meydana getirilerek, enzimin özelliklerinin geliştirilmesi için araştırmalar yapılmıştır. Bu kapsamda, bölge özgün mutasyonlarla çeşitli mikroorganizmalara ait birçok glukoz izomerazın; termal kararlılığının artırılması, optimum pH değerinin düşürülmesi, substrat tercihinin değiştirilmesi, çeşitli aminoasitlerin molekül içerisindeki fonksiyonunun belirlenmesi ve alt üniteler arasındaki etkileşimlerin ortaya çıkarılması yönünde birçok endüstriyel ve bilimsel öneme sahip çalışma gerçekleştirilmiştir (Bhosale vd., 1996). Örneğin; ısıl kararlılığın artırılması amacıyla yapılan çalışmalarda, *Clostridium thermosulfurogenes*'a ait GI üzerinde gerçekleştirilen W15R mutasyonu ile enzimin 80 °C'deki ısıl kararlılığı %60 (Meng vd., 1993), yarılanma ömrü ise %30 arttırılmıştır (Quax vd., 1991).

Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes GI'sında meydana getirilen W139F, M, A (Meng vd., 1993) ve Q58P mutasyonları ile enzimin termofilik karakterinde artış meydana gelirken, A62P ve Q58P/A62P mutasyonlarının ise ısıl kararlılığı olumsuz etkilediği tespit edilmiştir (Sriprapundh vd., 2000). *Thermotoga neapolitana* GI'sının üzerinde yapılan mutasyon çalışmalarında ise P58Q, P62A ve P58Q/P62A mutasyonları sonucu ısıl kararlılık azalırken, W138F, W138F/V185T, V185T/L282P ve V185T/L282P/F186S mutasyonları sonucunda enzimin daha kararlı hale geldiği rapor edilmiştir (Sriprapundh vd., 2000, 2003). K252R mutasyonu ile *Thermus thermophilus* GI'sının ısıl kararlılığı arttırılmışken (Hartley vd., 2000), D256R mutasyonu sonucunda kararlılıkta düşüş gözlenmiştir (Patel vd., 2012).

Enzimin substrat olan glukozu ilgisinin artırılması amacıyla yapılan çalışmalarda, *C. thermosulfurogenes* ksiloz izomerazı üzerinde yapılan W139F mutasyonu ile K_m değeri düşürülmüş ve k_{kat} değeri arttırılmıştır. Yine aynı enzimde W139F-V186S ve W139F-V186T mutasyonları, enzimin katalitik etkinliğini sırasıyla 2 ve 5 kat arttırmıştır (Meng vd., 1991). *Thermotoga neapolitana* GI'sı üzerinde yapılan P58Q, P62A, P58Q/P62A mutasyonları sonucunda ve k_{kat}/K_m değerleri azalırken, W138F, V185T ve W138F/V185T mutasyonları sonucunda K_m değerlerinde düşüş, k_{kat}/K_m değerlerinde artış gözlemlenmiştir (Sriprapundh vd., 2000). *Streptomyces* sp. SK GI'sı üzerine yapılan mutasyon çalışmaları sonucunda enzimin K_m değerinde artış görülürken, V_{max} ve k_{kat}/K_m değerlerinde azalma meydana gelmiştir (Hajer vd., 2014).

Optimum pH değerinin azaltılması amacıyla yapılan çalışmalarda, *Actinoplanes missouriensis*'e ait glukoz izomerazda gerçekleştirilen E186Q mutasyonu ile optimum pH değeri 7,5'ten 6,5'e düşürülmüştür (Van Tilbeurgh vd., 1992). Sriprapundh ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptıkları çalışma sonucu elde edilen mutant enzimlerin pH değerlerinde bir değişiklik meydana gelmemiştir. *Streptomyces* sp. SK GI'sı üzerine yapılan W16H mutasyonu sonucu enzimin optimum pH değeri 6,5'ten 6,0'a kaymıştır (Hajer vd., 2014).

Optimum sıcaklık değeri ile ilgili yapılan çalışmalara bir örnek olarak Sriprapundh ve arkadaşlarının 2000 yılında TNXI üzerine yaptıkları mutasyon çalışmaları gösterilebilir. Bu çalışmalar sonucunda elde ettikleri mutant proteinlerin optimum sıcaklık değerlerinde düşüş görülmüştür. *Thermus thermophilus* GI'sının D256R mutasyonu sonucunda optimum sıcaklık değeri değişmemiştir (Patel vd., 2012).

1.5. Yüksek İçerikli Fruktoz Şurubunun (HFCS) Avantajları, Üretimi ve Kullanım Alanları

Rafine şekere talebin artması, üretim maliyetinin yüksek olması ve insan sağlığına sukrozun ve şekerin fazla tüketiminin olumsuz etkisinin farkına varılmasıyla birlikte sukrozun yerine kullanılacak başka kaynaklar araştırılmıştır. Kalorisiz ve karbohidrat içermeyen sakkarin, siklamat, asesülfam-K, aspartam ve taumatin gibi yapay tatlandırıcılar bulunmaktadır. Fakat bunlar sağlıkla ilgili temel problemlerin yaşanmasına neden olmaktadır. Alkolsüz içeceklerin depolanma süresini arttırmak için kullanılan aspartam, düşük pH'da yavaş hidroliz olduğundan dolayı içeceklerin tatlılık oranını düşürmektedir. Taumatin protein yapısında bir tatlandırıcıdır ve sukrozdan 2000 kez daha tatlıdır. Fakat hoş olmayan bir tat verir. HFCS ise glukoz ve fruktozun dengede olduğu ve nişastadan elde edilen bir tatlandırıcıdır. Sukrozdan 1,3 kez ve glukozdan da 1,7 kez daha tatlıdır (Barker, 1976). 1976'ya kadar, yiyeceklerde tatlandırıcı madde olarak sakkaroz (sukroz) kullanılmaktaydı. GI'nın keşfi ve özellikle 1958 yılındaki Küba devrimi sonrası meydana gelen sukroz yokluğu sebebiyle, fruktoz şuruplarının kullanımı hız kazanmıştır (Bhosale vd., 1996).

Marketlere HFCS'nin girmesi, alkolsüz içecek üreticileri tarafından sakkaroz yerine HFCS ve zenginleştirilmiş HFCS'nin (%55 fruktoz içeriğine sahip) kullanılmasıyla, dereceli olarak gerçekleştirilmiştir. ABD'de, HFCS üretiminde en çok kullanılan ham materyal ıslak öğütme işlemiyle imal edilen mısır nişastasıdır. Nişastadan HFCS üretimi üç ana işlemi kapsamaktadır. Bunlar; α -amilaz kullanarak nişastanın sıvılaştırılması, amiloglukozidaz ve bir dallanmayı parçalayan enzim ile nişastanın şekere dönüştürülmesi ve GI ile glukozun fruktoza dönüştürülmesidir. Oluşan son ürün glukoz ve fruktozdan oluşan bir karışım şurubudur ve bu nedenle sakkarozdan daha tatlıdır. Buğday, tapyoka ve pirinç gibi diğer nişasta kaynakları dünyanın diğer kısımlarında küçük bir oranda kullanılmaktadırlar (De Raadt vd., 1994). HFCS'nin tatlı olmayan nişastadan imal edildiği düşünüldüğünde ve tatlandırma gücü temel alındığında sakkarozdan %10-20 kadar daha ucuzdur. Aynı zamanda HFCS sakkarozda olduğu gibi kristalleşme problemi meydana getirmez. Üstelik D-fruktoz diyabetik bir tatlandırıcı olarak rol oynamaktadır. Çünkü sadece fruktoz midede çok yavaş bir şekilde emilir ve kandaki glukoz seviyesine bir etki yapmaz (Bhosale vd., 1996). GI'nın en baskın kullanıldığı alan HFCS üretimidir. Her yıl immobilize GI kullanılarak 10^7 ton HFCS üretilmektedir (DiCosimo vd., 2013).

Fruktoz şurupları tatlı (Pomeranz, 1985), düşük viskozite ve daha az kristalleşme gibi özellikleri sebebiyle kullanıcıya depolama ve taşıma işlemleri sırasında avantaj sağlayan (Inglett, 1974) çok fonksiyonlu ürünlerdir. Fruktoz şuruplarının önemli işlev özellikleri, fermente edilebilir şekerler açısından zengin olmalarıdır (Henry, 1976). Dondurma viskozitesi değişimleri üzerinde yapılan çalışmalar fruktoz şuruplarının kullanımıyla bu ürünlerin viskozitesinin arttığını göstermiştir. Fruktoz şurubu, dondurmaya eriyebilirlik, dokuda pürüzsüzlük ve hacim kazandırmaktadır (Anon, 1979). Nemi tutarak kurumayı önlemeleri (Pomeranz, 1985), ozmotik basınçlarının yüksek olması (Hobbs, 1986) ve lezzeti geliştirici özellikleri (CRA, 1994) sebebiyle fruktoz şurupları, sıklıkla gazlı ve gazsız içecekler, fırın ürünleri, çeşitli hububat ürünleri, süt mamulleri ve işlenmiş gıdalarda kullanılabilir (Wulff ve Helgeson, 1987). Mayonez ve salata sosları gibi ürünlerde fruktoz şuruplarının kullanımı ile emülsiyon stabilitesi artmakta (Inglett, 1974) ve enerji değeri de düşürülebilmektedir (Reeder, 1978). Fruktoz şuruplarının su aktivitesini azaltıcı özelliğinden yararlanılmakta ve salamura ürünlerde kullanılabilir (Hobbs, 1986). Ayrıca fruktoz şuruplarının sebze, çorba, domates sosları ve meyve gibi konserve ürünlerde de kullanımı yaygınlaşmaktadır (Anon, 1993; Hebeda, 1987; Nabors ve Gelardi, 1991). Fruktoz şurupları; ekmek, bisküvi, kek, kurabiye, tart dolguları ve jölelerde kullanılabilir (Pomeranz, 1985). Keklerde sakkaroz yerine fruktoz şurupları kullanımı, içerdiği yüksek indirgen şekerler sebebiyle esmerleşmeyi arttırmakta ve kekin tazelik süresini uzatmaktadır (Johnson vd., 1989). Ekmekte fruktoz şurupları fermente edilebilir substrat olup, kabuk rengine ve lezzete katkıda bulunmakta ve raf ömrünü uzatmaktadır (Kulp vd., 1991). İndirgen şekerler içerisinde en iyi bisküvi rengi fruktoz şurupları ile elde edilmiştir (Manohar ve Rao, 1997). Fruktoz şurupları tatlı tat verme özelliklerinin yanı sıra gıdalarda lezzetin gelişmesinde de rol oynar. Fruktozun dil üzerinde algılanma yoğunluğu sakkarozla göre çok daha yüksektir ve hissedilme süresi kısadır.

1.6. Etanol Üretimi

GI'nın ksilozu ksiluloza dönüşümünü katalizlemesinden dolayı etanol üretimi, enzimin bir diğer önemli kullanım alanıdır. Fosil yakıtların hızla tükenmekte olduğu göz önüne alınırsa, yenilenebilir biyokütlenin fermente edilebilir şekerlere ve alkole dönüştürülmesi önemlidir. Biyokütle %40 selüloz, %30 hemiselüloz ve %30 ligninden oluşur. En ekonomik şekilde biyoetanol üretimi, selüloz ve hemiselülozun glukoz ve

ksiloza hidrolizi ve bunların hemen ardından mayalarla alkole fermente edilmesi şeklinde gerçekleştirilebilir. GI kullanılarak ksilozun ksiluloza çevrimi ve daha sonra yüksek oranlarda ksilulozun mayalanması bazı mantarlarla gerçekleştirilmiştir. Bu mantarlara örnek olarak *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* ve *Candida tropicalis* verilebilir (Chan vd., 1989; Chiang vd., 1981b; Chiang vd., 1981a; Gong vd., 1981; Schneider vd., 1981; Wang vd., 1980a; Wang vd., 1980b).

Araştırmacılar tarafından selülozun biyolojik çevrimi ile ilgili birçok çalışma yapılmış ve lignoselülozun biyolojik çevriminin hızlı ve verimli olduğunun farkına varılmıştır. Zirai artıkların değerlendirilmesi ve hemiselüloz içeren biyokütlelerden etkili şekilde yararlanabilmek için tüm dünyanın ilgisi hemiselülozun fermentasyonuna kaymaktadır (Wang vd., 1980a; Wang vd., 1980b).

Ksilan, hemiselülozun ana bileşenidir ve $\beta(1,4)$ bağlarıyla birbirine bağlanmış ksiloz birimlerinden oluşur. *D*-ksiloz, ksilanın enzimatik veya asidik parçalanmasıyla kolayca üretilebilir. *Saccharomyces cerevisiae* gibi endüstriyel maya türleri, genellikle heksozları verimli bir şekilde fermente edebilirler, fakat *D*-ksiloz bu fermentasyon sonucunda üretilmemiş olur. *Pachysolen tannophilus*, *Pichia stipitis*, *Candida utilis* ve *Candida shehatae* gibi birkaç maya türü oksidoredüktatif yollarla pentozlar üretebilirler. Ancak bu organizmaların mayalanma miktarları oldukça düşüktür (Du Preez ve Prior, 1985). Ayrıca, bu organizmaların etanole olan düşük toleransı ve oksijenin varlığında etanolü katabolize etmeleri, bu mayaların ticari uygulamalarda kullanılmasını engeller (Du Preez vd., 1987). Yukarıda bahsi geçen mayaların ksilozun etanole mayalanma prosesinde bir takım engellerle karşılaşmaktadır. Bu nedenle GI'nın kullanılmasıyla ksilozun ksiluloza izomerizasyonu sağlanmakta ve daha sonra ksiluloz etanole fermente edilmektedir (Chiang vd., 1981a).

1.7. Termofiller ve Termofilik Enzimlerin Özellikleri

Termofiller genel olarak 45 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ve hatta kaynar sularda bile yaşayabilen bakteri grubudur (Brock, 1985). Termofilik organizmalar, termotolerant veya termofil, hipertermofil ve ekstrem termofil olmak üzere üç grup içerisinde sınıflandırılmaktadırlar (Burhan vd., 2003). Hipertermofiller 80-110 °C arasında yaşayabilen canlılardır. Kara ve denizdeki sıcak ortamlardan izole edilen bu organizmalardan elde edilen enzimler (hipertermofilik enzimler) yüksek ısıl kararlılığa

sahiptirler ve 70 °C'nin üzerinde optimal aktivite göstermektedirler. Bu enzimlerden bazıları 110 °C'nin üzerinde de aktivitelerini koruyabilmektedirler (Vieille vd., 1996). Termofilik organizmaların en iyi büyüdüğü sıcaklık aralığı ise 50 °C ile 80 °C arasındadır. Bu organizmalardan elde edilen enzimler (termofilik enzimler) hipertermofilik ve mezofilik enzimlerin arasında bir ısıl kararlılık özelliği gösterirler ve genellikle 60 °C ve 80 °C arasında optimum aktiviteye sahiptirler. Termofilik ve hipertermofilik enzimler yüksek sıcaklıklarda aktif olduklarından dolayı genellikle 40 °C'nin altındaki sıcaklıklarda aktivite göstermezler (Vieille ve Zeikus, 2001).

Termofilik bakterilerin doğal yaşam alanları, dünya üzerinde çok geniş yayılım gösterir. En yaygın ve erişilebilir alanları, termal alanlar, kaplıcalar ve jeotermal sıcak topraklardır. Termofiller, ayrıca derin kara ve okyanus dipleri gibi daha az ulaşılabilir jeotermal alanlarda da bulunmaktadır (Takami vd., 1997). Termofillerin en fazla çalışılan doğal yaşam alanları kaplıcalardır (Hugenholtz vd., 1998).

Bütün organizmaların bünyelerindeki enzimler ve proteinler, yapılarını, içerisinde yaşadıkları ortamın sıcaklığına göre adapte etmek zorundadırlar. Bu olay canlıların protein döngülerindeki hayat sürelerini ve yüksek sıcaklık yüzünden meydana gelebilecek olan bozulmalarını göz önüne alarak biyolojik aktivitesinin de çok yüksek seviyede olmasını belirlemektedir. Termofilik mikroorganizmaların, ekstrem şartlarda örneğin yüksek sıcaklıklarda yaşamaları için kazandıkları olağan dışı kabiliyetler, bunların yapısal ve fonksiyonel adaptasyonlarına dayanmaktadır (Dinçer, 2005). Bu adaptasyonları sağlayabilmesi için gerekli olan faktörlerden bazılarını şu şekilde sıralayabiliriz:

1) DNA yapısı: Reverse giraz (RG) enzimi, bütün hipertermofillerde, bazı termofilik bakterilerde ve arkeobakterilerde bulunur. RG, pozitif süper sarmal DNA oluşmasını ve bağlantı sayısında aşırılık olmasını sağlar (Duguet, 1995; Forterre vd., 1996). Bağlantı sayısındaki aşırılık, yüksek sıcaklıklarda DNA'nın fonksiyonel halde kalması için gereklidir. Ayrıca DNA'ya bağlanan histon ve histon benzeri proteinler yüksek sıcaklıklarda DNA'nın çift zincirli yapıda kalmasında önemli rol oynamaktadırlar (López-García, 1999). 1994 yılında yapılan bir çalışmada, yüksek tuz konsantrasyonunun, çift zincirli DNA'yı 107 °C'de termal degradasyona karşı koruduğu gösterilmiştir. Tuzlar tarafından DNA'nın termal degradasyona karşı korunması, termofilik bakterilerin yaşamı ile ilgilidir. Çünkü termofilik bakteriler, hücre içi yüksek tuz konsantrasyonuna sahiptirler (Marguet ve Forterre, 1994).

2) RNA yapısı: Galtier ve arkadaşları (1999) yapmış oldukları çalışmada, rRNA'nın G-C içeriği ile optimum büyüme sıcaklıkları arasında pozitif bir ilişkinin olduğunu göstermiştir. Ayrıca baz modifikasyonları ve protein bağlanma bölgelerindeki değişmelerin RNA'ları kararlı hale getirdiği belirtilmektedir (Fang vd., 2001). Termofilik bir bakteri üzerinde yapılan bir çalışmada, transfer RNA geninin bir bazındaki tek bir atomun değişmesi yüzünden bakterinin ısıya karşı direnç özelliği kazandığı kaydedilmiştir (Watanabe vd., 1976).

3) Protein yapısı: Son zamanlara kadar proteinlerin yüksek sıcaklığa karşı kararlı hale gelmeleri üzerinde birçok biyofiziksel çalışma yapılmıştır. Yapılan bu çalışmalarda proteinlerin ısıya karşı dirençli hale getirilmesinde 15 farklı fizikokimyasal faktörün etkili olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu faktörlerden bazıları, hidrojen bağları, proteinlerin iç kısımlarındaki hidrofobik paketlenmeler, sarmal ikiz kutup kararlılığı ve tuz köprülerinin en iyi şekilde kullanımınıdır. Haney ve arkadaşlarının (1999) termofilik *Methanococcus jannaschii*'den izole edilen 115 adet termofilik protein ile mezofilik *Methanococcus* türlerindeki bu 115 adet proteinin homoloğu olan protein sıralarını karşılaştırdılar. Yaptıkları karşılaştırma sonucunda, termofilik proteinlerin daha fazla sayıda alt birim içerdiğini, alt birimlerde çokça hidrofobik ve yüklü amino asitler (özellikle Glutamat, Arginin ve Lisin) ve daha az sayıda da polar amino asitler bulunduğunu tespit etmişlerdir. Bir proteinin hidrofobikliği, toplam polar olmayan yüzey alanı dışında kalan gömülü polar olmayan yüzey alanının fonksiyonu olarak hesaplanır (Tsai ve Nussinov, 1997a, 1997b). Hidrofobik etki proteinin katlanmasında etkin bir güce sahiptir. Bu nedenle de termofilik proteinler mezofilik proteinlere göre daha büyük bir merkeze sahiptirler (Haney vd., 1997).

Yapılan bazı çalışmalar sonucunda termofilik proteinlerdeki tuz köprüsü sayısı, mezofilik proteinlere oranla yaklaşık %70 daha fazladır. Tuz köprülerinin sayısı ile proteinin termal kararlılığı arasında kuvvetli bir korelasyon bulunmaktadır. Bunun nedeni tuz köprülerinin yüksek sıcaklıklarda daha kararlı olması ve yüksek sıcaklıklardaki tuz köprülerini kırmak için daha fazla enerjiye ihtiyaç duyulmasıdır. Böylece tuz köprüleri yüksek sıcaklıklarda protein çözülmesine karşı kinetik kararlılık sağlar. Şaperonlar olarak bilinen özelleşmiş proteinler, bu organizmalar tarafından bolca üretilmekte ve denatürasyondan sonra proteinlerin tekrar doğal formlarında katlanmasına ve fonksiyonlarını tekrar kazanmalarına yardımcı olmaktadır (Das ve Gerstein, 2000).

Termofilik proteinler mezofilik proteinler ile karşılaştırıldığında, bunların daha fazla halka delesyonuna maruz kaldığı görülür ve bu yüzden termofilik proteinler mezofilik

proteinlerden daha kısadır. Halka delesyonu proteinin üç boyutlu yapılarının entropisini düşürerek, serbest enerjisini yani proteinin kararlılığını arttırmış olur (Thompson ve Eisenberg, 1999). Aynı zamanda termofilik proteinler üç boyutlu yapısına katlanırken, daha küçük ve daha az sayıda oyuklar oluşturabilecek daha etkili bir paketlemeye sahiptirler (Russell vd., 1997, 1998) ve disülfür bağlarını, tuz köprülerini ve metal koordinasyonunu genel olarak termal kararlılığı sağlamak için kullanırlar (Vieille ve Zeikus, 2001).

4) Hücre membran yapısı: Termofillerin hücre membranları doymuş yağ asitlerinden oluşmuştur. Doymuş yağ asitleri hücreye hidrofobik bir ortam sağlar ve bu durum yüksek sıcaklıklarda hücrenin yaşama şansını artırır (Herbert ve Sharp, 1992).

Yüksek sıcaklıklarda gerçekleşen reaksiyonların ilgi çekici olmasının temelinde; reaksiyon hızının artması, ortam viskozitesinin düşmesi, substrat çözünürlüğünün artması, kontaminasyon ihtimalinin düşmesi ve termofil ve hipertermofil enzimlerinin sıcaklığa tabi tutularak daha kolay saflaştırılabilmesi gibi sebepler yatmaktadır (Stetter, 1996). Termal kararlılıktan başka termofillerden elde edilen enzimlerin organik çözücülerdeki denatürasyona karşı dayanıklılıkları onların sudaki ısı kararlılıkları ile ilişkilidir (Owusu ve Cowan, 1989). Bu nedenle termal kararlı enzimler sadece sulu ortam da değil, organik ortamda da kullanılmak için çekicidirler.

Termofilik ve hipertermofilik organizmalardan elde edilen enzimlere termofilik enzimler denilmektedir. Termofilik enzimler eşsiz bir yapı işlev özelliğine sahiptirler (Vieille vd., 1996; Vieille ve Zeikus, 2001). Bu enzimler günümüzde moleküler biyoloji uygulamalarında (*Taq* DNA polimeraz), nişasta endüstrisinde (α -amilaz, glukoz izomeraz) ve yüksek kararlılık isteyen organik ürünlerin sentezi, teşhis ve tanı işlemleri, kâğıt endüstrisi ve hayvanların beslenmelerinde kullanılan ürünlerin sentezi gibi daha birçok endüstri kollarında yoğun olarak kullanılmaktadır (Vieille vd., 1996). Özellikle endüstriyel uygulamalarda, yüksek sıcaklıklarda aktif olarak çalışabilen enzimler mezofilik ve psikrofilik enzimlere göre büyük avantajlara sahiptirler. Bu enzimler mezofilik bir organizma içerisinde sentezlenebildiklerinden enzimin saflaştırma aşamalarında kolaylık sağlamaktadır. Bu enzimler yüksek sıcaklıklara ve aktiviteleri denatüre edici ajanlara karşı oldukça kararlıdır ve yüksek substrat konsantrasyonlarında iyi bir şekilde çalışırlar. Ayrıca çalışma ortamının diğer mikrobiyal kontaminasyonlardan etkilenme olasılığı oldukça düşüktür (Karaoğlu, 2010).

1.8. Endüstriyel GI'lar

GI üreten ve ticari olarak önemli olan birkaç organizma Tablo 1'de verilmiştir. GI'nın büyük bir ticari önemi olmasından dolayı enzimi üreten birçok yeni organizma ve bu enzimin kullanımında geliştirilen birçok yöntem hakkındaki bilgi patentleşmiştir (Boguslawski ve Rynski, 1982; Hafner, 1985; Hafner ve Jackson, 1985; Iizuka vd., 1971; Lee, 1976; Miles Laboratories Inc., 1972; Outtrup, 1974; Shieh, 1977; Weber, 1976).

Tablo 1. Ticari öneme sahip GI'ları üreten bazı mikroorganizmalar ve ürünlerinin (GI) ticari adları (Bhosale vd., 1996).

Üretici	Ticari Adı	Organizma
Gist Brocades and Anheuser-Busch Inc.	Maxazyme	<i>Actinoplanes missouriensis</i>
Novo-Nordisk	Sweetzyme	<i>Bacillus coagulans</i>
Miles Kali-Chemie	Optisweet	<i>Streptomyces rubiginosus</i>
Finnsugar	Spezyme	<i>Streptomyces rubiginosus</i>
Nagase	Swetase	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>
		<i>Arthrobacter sp.</i>
		<i>Streptomyces olivaceus</i>

1.9. *Geobacillus caldoxylolyticus* TK4 Suşunun Bazı Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

Geobacillus caldoxylolyticus TK4 Suşu Çanakkale Kestanbol Kaplıcası'ndan elde edilen su örneklerinden izole edilmiştir ve 14283 kodlu numarayla National Collections of Industrial Food and Marine Bacteria'da stoklanmıştır. Bakteri izolasyonu, zenginleştirme kültürleri yapılarak ve membran filtresinden geçirilerek gerçekleştirilmiştir. Çanakkale Kestanbol Kaplıcası, Çanakkele ilinin Ezine ilçesinin sınırları içerisinde bulunup bu ilçeye uzaklığı 10 km, Çanakkale'ye olan uzaklığı ise 50 km'dir. Kestanbol Kaplıcası'nın yerden çıkış sıcaklığı 71 °C'dir. İzolatın tür tayininin yapılabilmesi için çeşitli morfolojik, boyama, fizyolojik, biyokimyasal, genetiksel ve kemotaksonomik testler yapılmış ve elde edilen sonuçlar Tablo 2'de verilmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda termofilik izolatın

basil morfolojisine sahip olduğu, spor oluşturabildiği ve katalaz enzimi uretebildiği gızlenmiştir (Dulger, 2003).

Tablo 2. *G. caldxylolyticus* TK4 suşunun bazı biyokimyasal ozellikleri

Özellik	Sonuç	Özellik	Sonuç
Gram Boyama	+/-	Anaerobik Büyüme	-
Spor Boyama	+	Glukoz fermantasyonu	+
Katalaz Üretimi	+	Mannitol fermantasyonu	+
Jelatin Hidrolizi	+	Arabinoz fermantasyonu	+
Nişasta Hidrolizi	+	Ksiloz fermantasyonu	+
VP Testi	-	%2-5 NaCl'de büyüme	+
Sitrat Kullanımı	-	%7 NaCl'de büyüme	-
Propiyonat Kullanımı	+	30, 37 °C'de Büyüme	-
İndol testi	-	40, 70, 75 °C'de Büyüme	+

1.10. Çalışmanın Amacı ve Pratik Önemi

Enzimlerin endüstriyel uygulamaları gün geçtikçe yaygınlaşmakta ve katalitik potansiyelleri yalnız analitik amaçlar için değil aynı zamanda sentetik amaçlar ve modifikasyonlar için de değerlendirilmektedir. Bu kapsamda gıda sektörü olmak üzere, ilaç sanayi, kimya sanayi, deri ve tekstil sanayi gibi birçok sanayi dalında enzimlerden yararlanılma imkânı ortaya çıkmaktadır.

Sıcaklık, endüstri için temel unsurlardan biridir. Endüstriyel süreçler için yüksek sıcaklıkta gerçekleşen reaksiyonların ilgi çekici olmasının bir takım sebepleri vardır. Sıcaklığın artırılması, organik bileşiklerin çözünürlüğü ve biyolojik olarak kullanımları üzerinde olumlu etkilere sahiptir. Sıcaklığın artması, viskozitenin düşmesini ve organik bileşiklerin difüzyon katsayısının artmasını da beraberinde getirir. Böylelikle reaksiyonlar daha yüksek hızlarda gerçekleştirilir. Mezofilik ve psikrofilik enzimlerin en bilinen dezavantajları yüksek sıcaklıklarda üç boyutlu yapılarının bozunması, dolayısıyla da aktivitelerini kaybetmeleridir. Bu nedenle endüstriyel uygulamalarda, yüksek sıcaklıklarda aktif olarak çalışabilen enzimler tercih edilmektedir. Termofilik bakteriler, bu türden, sıcaklığa dayanıklı enzimleri içeren organizmalardır ve bu nedenle genetik mühendisliği ve

biyoteknoloji açısından oldukça önemlidirler. Termofilik enzimlerin pH değişikliklerine, yüksek sıcaklıklara ve denatüre edici ajanlara karşı gösterdikleri kararlılık ve bu yüksek sıcaklıkta ve yüksek substrat konsantrasyonlarında iyi bir şekilde çalışabilme özelliklerinin getirdiği pek çok avantajlardan dolayı, termofilik enzimler birçok endüstriyel alanda tercih edilmektedirler. Çalışma ortamının diğer mikrobiyal kontaminasyonlardan etkilenme olasılığı da oldukça düşüktür.

Endüstriyel olarak özellikle ısıya dayanıklı enzimlerin saflaştırılması çok önemli olduğundan termofilik bakterilerden enzim izolasyonu, karakterizasyonu ve klonlanması üzerine ilgi gittikçe artmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisi ile enzimlerin üzerinde mutasyonlar yardımıyla stereoseçiciliği, substrat özgünlüğü ve genel performansı değiştirilebilmekte ve amaca uygun enzimlerin daha kolay ve bol miktarda üretimi sağlanabilmektedir.

Son yıllarda, enzimlerin, ekstrem sıcaklıklar ve pH'lar, organik çözücüler gibi farklı şartlar altında kararlılık ve performans kazandırabilmek veya substrat özgünlüklerini değiştirerek, yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin geliştirilmesini sağlamak amacıyla birçok mutasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Böylece, yaban tip proteinde bulunmayan özellikler proteine kazandırılabilmekte ve böylece endüstriyel kullanım amaçlarına uygun özelliklerde enzimler elde edilebilmektedir.

Glukoz izomeraz (GI), glukozun fruktoza izomerizasyonunu katalizlediği için HFCS (High Fructose Corn Syrup: %42 veya 55 fruktoz içeren tatlı sakkarit karışımı) üretiminde, birincil endüstriyel öneme sahip olan bir enzimdir. Endüstriyel uygulamalar için özellikle %55 fruktoz içeriği gerekmektedir. Bu oran kromatografi ya da yüksek sıcaklık ile sağlandığında yüksek maliyet ve istenmeyen yan ürün oluşumuyla sonuçlanır. Bu nedenle şurup üretimi için düşük pH ve yüksek sıcaklıklarda çalışan termofilik mikroorganizmalardan elde edilen enzimler tercih edilmektedir. Bu ihtiyaçlardan dolayı birçok termofilik ve asidik karakterli bakterilerin GI'ları araştırılmış ve çeşitli mutasyonlarla özellikleri geliştirilmeye çalışılmıştır.

Tübitak (109T985) tarafından desteklenen bu çalışmada, pET-28a(+) vektörüne klonlanmış olan rekombinant *Geobacillus. caldodoxylosilyticus* TK4GI geni (Faiz vd., 2011) üzerinde, bölge spesifik mutasyonlar yapılarak glukozu karşı daha ilgili, daha yüksek sıcaklık ve düşük pH değerlerinde çalışabilen, daha yüksek pH ve ısıl kararlılığa sahip GI'nın elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla yola çıkılarak elde edilen mutant genler

uygun bir konakçı hücrede ekspres edilmiş, mutant enzimler saflaştırılmış ve biyokimyasal karakterizasyonları yapılmıştır.



2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Materyaller

2.1.1. Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Firma	Model
UV-Vis Spektrofotometre	Perkin Elmer	Lambda 25
Protein Elektroforezi	Biorad	Mini PROTEAN-Tetra Sistem
DNA Elektroforezi	Owl Separation Systems	Easy Cast B1A
PCR	Bio-Rad	MJ Mini Personal
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Zentrifugen	Rotina 35 R
Mikrosantrifüj	Sigma	1-14
Saf Su Cihazı	Sartorius	Arium 611UV
Jel Görüntüleme Sistemi	Kodak	Gel Logic 200 Imaging System
Mikrotüpler İçin Termal Sallayıcı	Boeco	TS-100 Thermo Shaker
pH Metre	InoLab	WTW pH 720
Sonikatör	Bandelin	Sonopuls HD3100
Hava Banyolu Çalkalayıcı	Barnstead/Lab-Line	MaxQ Mini 4450 Shaker
Su Banyolu Çalkalayıcı	Memmert	WNB 7-45
Vorteks	Thermolyne	Type 37600 Mixer
Buzdolabı	Profilo	BD4303ANFE
Terazi	Ohaus	Pioneer
Isıtıcı/Magnetik Karıştırıcı	HS31	Chiltren
Otoklav	Tomy	SX-700E
Güç Kaynağı	Thermo	EC 1000XL
Ultra Low Temperature Freezer	New Brunswick Scientific	U410
Steril Kabin	JSR	JSCB-1200SB
Buz Makinesi	Hoshizaki	FM-80EE
Derin Dondurucu	Regal	RDD1280
Mikrodalga Fırın	Regal	RMD-17

2.1.2. Enzimler

Tablo 4. Kullanılan enzimler

Enzim	Firma	Konsantrasyon
<i>DpnI</i>	Thermo Scientific	10 U/ μ l
Fast PCR Enzime Mix	Thermo Scientific	5 U/ μ l

2.1.3. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler

Tablo 5. Kullanılan kimyasal madde ve malzemeler

Kimyasal Madde/Malzeme	Firma
Kimyasal maddeler ve çözücüler	Fluka, Sigma-Aldrich, Merck
Plazmid DNA İzolasyon Kiti (Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification Systems)	Promega
PCR Ürünlerini Temizleme Kiti (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System)	Promega
Protein Saflaştırma Kiti (MagneHis Protein Purification System)	Promega
DNA Standardı (10 kbç DNA Ladder)	Thermo Scientific
SDS-PAGE Standardı (Broad Range Protein Molecular Weight Markers)	Thermo Scientific

2.1.4. Primerler

Tablo 6. Polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) kullanılan primerler

Primer Adı	Baz Sırası	Sentezleyen Firma
H99Q F	5'-cattcgtctgtttccaggatgtggatatcgc-3'	IDT
H99Q R	5'-gcgatatccacatcctggaacagacgaatg-3'	IDT
V184T F	5'-gattaggagcggaaaactacacattttggggcggac-3'	IDT
V184T R	5'-gtccgccccaaaatgtgtagtttccgctcctaac-3'	IDT
D102N F	5'-ctgtttccatgatgtgaatcgcctccagaaggag-3'	IDT
D102N R	5'-ctccttctggagcgaatccacatcatggaacag-3'	IDT
H99Q/D102N F	5'-ctgtttccaggatgtgaatcgcctccagaaggag-3'	IDT
H99Q/D102N R	5'-ctccttctggagcgaatccacatcctggaacag-3'	IDT

2.1.5. Kullanılan Suşlar

Tablo7. Klonlama ve ekspresyonda kullanılan *E.coli* suşları

Tür	Suş	Kullanım Amacı
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α	Klonlama hücresi
<i>Escherichia coli</i>	BL21(DE3)pLysE	Ekspresyon hücresi

2.1.6. Luria-Bertani Sıvı ve Katı Besiyerlerinin Hazırlanması

- Luria-Bertani Besiyerinin (LB) Hazırlanması: 10,0 g bakto-tripton, 5,0 g maya ekstrağı ve 5,0 g NaCl yaklaşık 990 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile titre edilerek 7,5'e ayarlandı. Sonra çözeltinin hacmi 1000 mL'ye tamamlandı ve 121 °C'de, 1 atm basınç altında 20 dakika bekletilerek steril edildi.
- Luria-Bertani Agar Besiyerinin (LB Agar) Hazırlanması: 10,0 g bakto-tripton, 5,0 g maya ekstrağı, 5,0 g NaCl ve 15,0 g agar yaklaşık 990 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile titre edilerek 7,5'e ayarlandı. Sonra çözeltinin hacmi 1000 mL'ye tamamlandı ve 121 °C'de, 1 atm basınç altında 20 dakika bekletilerek steril edildi.

2.1.7. Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar

2.1.7.1. Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler

- Lowry A Çözeltisi (0,1 N NaOH içinde %2 (w/v) Na₂CO₃): 0,4 g NaOH ve 2,0 g Na₂CO₃ saf su ile çözümlü hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- Lowry B Çözeltisi (%1 CuSO₄.5H₂O çözeltisi): 1,0 g CuSO₄.5H₂O saf su ile çözümlü hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- Lowry C Çözeltisi (%2 Na-K tartarat çözeltisi): 2,0 g Na-K tartarat saf su ile çözümlü hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- Lowry D Çözeltisi: 1 kısım Lowry B ve 1 kısım Lowry C karıştırılarak hazırlandı.
- Lowry E Çözeltisi: 0,5 mL Lowry D ile 25 mL Lowry A karıştırılarak hazırlandı.

- Sığır Serum Albümin (BSA) Çözeltisi (1 mg/mL): 5,0 mg BSA saf su ile çözülüp hacmi 5 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- 0,1 N NaOH içinde %0,1 (w/v) SDS Çözeltisi: 0,4 g NaOH ve 0,1 g SDS saf su ile çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.

2.1.7.2. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler

- EDTA Çözeltisi (0,5 M, pH 8,0): 18,61 g EDTA.2H₂O yaklaşık 80 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1N NaOH ile 8,0'a ayarlandı ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- Tris-Asetik Asit-EDTA Çözeltisi (50X TAE): 24,2 g Tris, 5,7 mL glasiyal asetik asit ve 10 mL 0,5 M EDTA (pH 8,0) çözeltisinin saf su ile iyice karıştırılıp hacminin 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Jel Hazırlama ve Yürütme Tamponu (1X TAE): 20 mL 50x TAE çözeltisinin hacminin saf su ile 1000 mL'ye tamamlanması ile elde edildi.
- Etidiyum Bromür Çözeltisi (5 mg/mL): 50 mg etidiyum bromür saf suda çözülerek hacmi 10 mL'ye tamamlandı.

2.1.7.3. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler

- Ayırma Jeli Tamponu (1,5 M Tris-HCl): 45,42 g Tris, 200 mL saf suda çözülüp, pH'sı 8,8'e ayarlanarak hacmi 250 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- Yıgma Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl): 30,28 g Tris, 200 mL saf suda çözülüp, pH'sı 6,8'e ayarlanarak, hacmi 250 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- Amonyum Persülfat (APS) Çözeltisi (%10): 1,0 g APS saf suda çözülüp hacmi 10 mL'ye tamamlandı ve hazırlanan çözelti -20 °C'de saklandı.
- TEMED: Orijinal şişesinden kullanıldı.
- Akrlamid/Bisakrlamid Çözeltisi (%30): 29,2 g akrilamid ve 0,8 g N,N'-metilen bisakrlamid saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- Bromofenol Mavisi (%0,1): 10,0 mg bromofenol mavisi saf suda çözüldü ve hacmi 10 mL'ye tamamlandı.
- SDS Çözeltisi (%10): 10 g SDS saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

- SDS-PAGE Yükleme Çözeltisi: 150 μ L 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 400 μ L %10 SDS, 100 μ L %0,1 bromofenol mavisi, 250 μ L %80 gliserol ve 60 μ L β -merkaptoetanol'ün karıştırılması ile hazırlandı ve küçük kısımlara ayrılarak -20 °C'de saklandı.
- SDS-PAGE Yürütme Tamponu: 7,2 g Tris ve 1,5 g glisin yaklaşık 480 mL saf suda çözüldükten sonra üzerine 10 mL SDS (%10) çözeltisi ilave edildi. pH 8,3'e ayarlandı ve çözeltinin hacmi 500 mL'ye tamamlandı.
- Jel Boyama Çözeltisi: 1,0 g Coomassie Brilliant Blue R250'nin 62,5 mL glasiyal asetik asit ve 93,5 mL metanol içinde çözülmesi ile hazırlandı.
- Boya Uzaklaştırma Çözeltisi: 100 mL glasiyal asetik asit, 400 mL metanol ve 600 mL saf suyun karıştırılmasıyla hazırlandı.

2.1.7.4. Tampon Çözeltiler

- Asetat Tamponu (50 mM, pH 4,5): 0,34 g sodyum asetat trihidrat yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N asetik asit ile 4,5'e ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- Asetat Tamponu (50 mM, pH 5,0): 0,34 g sodyum asetat trihidrat yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N asetik asit ile 5,0'a ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- Asetat Tamponu (50 mM, pH 5,5): 0,34 g sodyum asetat trihidrat yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N asetik asit ile 5,5'e ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- MOPS Tamponu (50 mM, pH 6,0): 0,52 g MOPS yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile 6,0'a ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- MOPS Tamponu (50 mM, pH 6,5): 0,52 g MOPS yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile 6,5'e ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- MOPS Tamponu (50 mM, pH 7,0): 0,52 g MOPS yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile 7,0'a ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

- MOPS Tamponu (50 mM, pH 7,5): 0,52 g MOPS yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile 7,5'e ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- MOPS Tamponu (50 mM, pH 8,0): 0,52 g MOPS yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile 8,0'a ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

2.1.7.5. Enzim Aktivitesi Tayininde Kullanılan Çözeltiler

- Karbazol (%0,12): 0,06 g karbazolün etanolde çözülüp hacminin 50 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Sülfürik Asit (%70): 73 mL %96'lık sülfürik asit üzerine yavaş yavaş saf suyun ilave edilip hacminin 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Glukoz Çözeltisi (1M): 1,802 g glukozun saf suda çözülüp hacminin 10 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Sistein Hidroklorür Çözeltisi (%15): 0,75 g sistein hidroklorürün saf suda çözülüp hacminin 50 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Perklorik asit Çözeltisi (0,5 M): 2,15 mL ticari perklorik asit alınıp son hacim saf suyla 50 mL'ye tamamlandı.

2.1.7.6. Diğer Çözeltiler

- Kanamisin Çözeltisi (25 mg/mL): 250 mg kanamisin sülfatın (Kanamisin A) saf suda çözülüp hacminin 10 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı. Hazırlanan çözelti filtre ile steril edilip küçük kısımlara bölünerek -20 °C'de saklandı.
- IPTG Çözeltisi (0,2 mg/mL): 2g IPTG'nin saf suda çözülüp hacminin 10 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı. Hazırlanan çözelti filtre ile steril edilip küçük kısımlara bölünerek -20 °C'de saklandı.
- Kalsiyum Klorür Çözeltisi (0,1 M): 1,47 g CaCl₂ dihidratın saf suda çözülüp hacminin 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı. Hazırlanan çözelti otoklavda steril edilip 4 °C'de saklandı.

- Lisozim Çözeltisi (10 mg/mL): 10 mg lisozimin saf suyla çözülüp hacminin 1 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.

2.2. Mutasyon Çalışmaları

Enzimin biyokimyasal özelliklerini endüstriyel uygulamalara daha uygun hale getirebilmek için, aktif bölgede olduğu belirlenen 3 ayrı amino asitte; H99Q, V184T, D102N ve H99Q/D102N mutasyonlarının yapılması ve bu mutasyonların sonucunda enzimin K_m ve optimum pH değerinde azalmanın, V_{max} , optimum sıcaklık, ısı ve pH kararlılığında ise bir artışın olması planlanmıştır.

2.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) İçin Kalıp DNA'nın Elde Edilmesi

pET-28a(+) vektörüne klonlanmış olan yaban tip *Geobacillus caldodoxylosilyticus* TK4 GI protein genini (pETTK4GI) (Faiz vd., 2011) içeren *E. coli* BL21(DE3)pLysS gliserol stok kültüründen, 50 µg/mL kanamisin içeren LB agar besiyerine yayma ekim yapıldı. 37 °C'de büyütülerek elde edilen kolonilerden öze yardımıyla LB besiyerine ekim yapıldı ve çalkalayıcı hava banyosunda 37 °C'de inkübe edilerek gece kültürü hazırlandı.

2.2.2. Plazmit DNA İzolasyonu

Plazmid DNA izolasyonu, plazmid DNA izolasyon kiti (Promega) kullanılarak gerçekleştirildi.

- 1-5 mL gece kültürü, 10.000 x g'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Eppendorf tüp ters çevrilip, kâğıt bir havlu üzerine bastırılarak ortamda kalan fazla besiyerinin tamamen uzaklaşması sağlandı.
- Bakteri peltesinin üzerine 250 µL Hücre Süspansiyon Çözeltisi (Cell Resuspension Solution) ilave edilip vortekslenerek hücrelerin tamamen çözünmesi sağlandı.
- 250 µL Hücre Lizis Çözeltisi (Cell Lysis Solution) ilave edildikten sonra 4 kere altüst edildi. Hücre süspansiyonu berraklaşana kadar (yaklaşık 5 dakika) oda sıcaklığında bekletildi.

- 10 µL Alkali Proteaz Çözeltisi (Alkaline Protease Solution) ilave edildikten sonra 4 defa altüst edilip oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi.
- 350 µL Nötralizasyon Çözeltisi (Neutralization Solution) ilave edildikten sonra hemen 4 kere altüst edildi.
- Elde edilen bakteriyal lizat 14.000 x g'de oda sıcaklığında 10 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant, toplama tüpü üzerine yerleştirilmiş olan minikolon içine aktarılarak 14.000 x g'de oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edildi. Minikolondan toplama tüpüne geçen sıvı uzaklaştırıldı.
- Minikolona 750 µL Kolon Yıkama Çözeltisi (Column Wash Solution) ilave edildi ve 14.000 x g'de oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpüne geçen sıvı uzaklaştırıldı.
- Minikolona 250 µL Kolon Yıkama Çözeltisi ilave edilerek 14.000 x g'de oda sıcaklığında 2 dakika santrifüj edildi.
- Minikolon, temiz bir eppendorf tüpüne yerleştirildi ve minikolon içine 100 µL Nükleaz İçermeyen Su (Nuclease-Free Water) ilave edildi. 14.000 x g'de oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edilerek elde edilen plazmid DNA çözeltisi -20 °C'de saklandı.

2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Mutant Genlerin Çoğaltılması

pETTK4GI plazmitleri ve ilgili mutasyon primerleri kullanılarak PCR işlemleri yapılmıştır (Tablo 8).

Tablo 8. PCR bileşenleri

Bileşen	Kullanılan Miktar
dNTP karışımı (10 mM)	5 µL
İleri primer	2 µL
Geri primer	2 µL
Long PCR enzim karışımı	1 µL
10X Long PCR tamponu MgCl ₂ ile birlikte	5 µL
Plazmit DNA	2 µL
Nükleaz içermeyen su	33 µL

2.2.4. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

PCR ürünlerinin saflaştırılması için PCR ürünü temizleme kiti (Promega) kullanıldı.

- PCR ürününü içeren reaksiyon karışımına, eşit hacimde Membran Bağlanma Çözeltisi (Membrane Binding Solution) ilave edilip karıştırıldı ve elde edilen karışım toplama tüpü üzerine yerleştirilmiş olan minikolon içine aktarıldı.
- Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildikten sonra 16.000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi ve minikolondan toplama tüpüne geçen sıvı uzaklaştırıldı.
- Minikolona 700 µL Membran Yıkama Çözeltisi (Membrane Wash Solution) ilave edildi ve 16.000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Minikolondan toplama tüpüne geçen sıvı uzaklaştırıldı.
- Yıkama işlemi, 500 µL yıkama çözeltisi kullanılarak tekrarlandı. 16.000 x g'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Minikolondan toplama tüpüne geçen sıvı uzaklaştırıldı ve yıkama çözeltisinden gelen etanolün tamamen uzaklaşması için 1 dakika daha santrifüj edildi.
- Minikolon, temiz bir eppendorf tüpüne alınıp minikolon içine 50 µL nükleaz içermeyen su ilave edildi. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildikten sonra 16.000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Saf PCR ürünü 4 °C'de saklandı.

2.2.5. Kalıp DNA'nın Ortamdan Uzaklaştırılması

- Kalıp DNA olarak ilgili vektörün kullanıldığı PCR'da, vektörün kendisi organizma tarafından metillenmiş durumda olup, sentezlenen yeni zincirler metillenmemiş durumdadır. Bu nedenle, kalıp olarak kullanılan yaban tip geni içeren vektörü ortamdan uzaklaştırmak amacıyla, saflaştırılmış PCR ürünü 20 µL son hacimde olacak şekilde *DpnI* enzimi ile kesildi (Tablo 9).

Tablo 9. *DpnI* enzimi ile kesim

Bileşen	Kullanılan Miktar
Saf PCR ürünü	10 µL
Tango buffer	2 µL
<i>DpnI</i>	2 µL
Nükleaz içermeyen su	6 µL

2.2.6. Mutant Vektörlerin Konakçı Hücreye Aktarılması

2.2.6.1. Kompetent Hücre Hazırlanması

Kompetent hücreler kalsiyum klorür metoduna göre hazırlandı (Maniatis vd., 1982). Klonlama işlemleri için *E. coli* DH5 α suşundan, ekspresyon yapmak amacıyla ise *E. coli* BL21(DE3)pLysE suşundan kompetent hücre hazırlandı.

- 3 mL LB besiyerine, daha önceden LB agar besiyerinde büyütülmüş olan *E. coli* suşundan ekim yapıldı ve çalkalayıcı hava ya da su banyosunda 37 °C'de inkübasyon yapılarak gece kültürü hazırlandı.
- Hazırlanan gece kültüründen 30 mL LB besiyerine aşılama yapıldı ve 600 nm'deki optik yoğunluk 0,4-0,6 arasında bir değere ulaşıncaya kadar yaklaşık 2 saat 37 °C'de büyütüldü.
- Bu değere ulaşan hücre kültürü, steril bir tüpe konularak 4 °C'de 4.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- Tüp içine 10 mL 0,1 M CaCl₂ ilave edildi ve hücre peltesi, yavaşça pipetlenerek süspansiyon haline getirildi.
- 30 dakika buz içinde bekletildikten sonra 4 °C'de 4.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- Pellet, 2 mL 0,1 M CaCl₂ çözeltisinde süspansiyon edilerek 200 μ L'lik kısımlar halinde steril eppendorf tüplerine bölündü.
- Kompetent hücreler, 2 saat buzda bekletilerek transformasyona hazır hale getirildi.

2.2.6.2. Transformasyon

- Eppendorf tüp içinde bulunan kompetent hücelere 3-5 μ L, saflaştırılmış PCR ürünlerinin *DpnI* enzimi ile uygun şartlar altında kesilmesiyle elde edilen mutant vektörler ilave edildi ve 30 dakika buz içinde bekletildi.
- 2 dakika 42 °C'de bekletmek suretiyle plazmidin hücre içine girmesi sağlandı.
- Buz içine alınan hücelere 200 μ L LB besiyeri eklenerek 37 °C'de 1 saat bekletildi.

- Bu sürenin sonunda tüp içindeki süspansiyeye karışım, 50 µg/mL kanamisinli LB agar içeren, 45 µL IPTG sürülüp iyice kurutulmuş petrilere yayma ekim yapılarak ekildi ve 37 °C'de 1 gece bekletilerek plazmidi içeren hücrelerin büyümesi sağlandı.

2.2.7. Mutant Plazmitlerin Seçimi, İzolasyonu ve Sıra Analizi

Mutant plazmitleri içeren kolonilerden kanamisinli LB besiyerine ekilerek 37 °C'de büyütüldü ve gece kültürleri hazırlandı. Her bir mutasyon için plazmit izolasyonu yapıldı ve izole edilen plazmitler, ilgili mutasyonların olup olmadığını araştırmak için sıra analizi yapılmak üzere Macrogen Inc. (Güney Kore)'ye gönderildi.

2.2.8. DNA Sıralarının İncelenmesi

Macrogen Inc.'den gelen DNA sıraları öncelikle protein sırasına dönüştürüldü (URL-1, 01 Ocak 2016) ve daha sonra ClustalO programı (URL-2, 01 Ocak 2016) yardımıyla incelendi.

2.2.9. Mutant Genlerin Ekspresyonu

Mutant genler *E. coli* BL21(DE3)pLysE konakçı hücresine aktarıldı. Bunun sonucunda oluşan rekombinant plazmitleri içeren koloniler kanamisin içeren LB besiyerine ekilerek 37 °C'de büyütüldü ve gece kültürleri hazırlandı. Ertesi gün, hazırlanan bu gece kültürü %1 (v/v) olacak şekilde 50 µg/mL kanamisin içeren LB'ye aktararak OD₆₀₀=0,6-0,8 olana kadar büyütme işlemine devam edildi. İstenilen optik yoğunluğa ulaşıldığında nihai konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde IPTG ilave edilerek indüklendi ve 37 °C'de 3 saat inkübe edildi.

2.2.10. *E. coli* BL21(DE3)pLysE'de Ekspres Edilen Mutant Proteinlerin Saflaştırılması

Üç saat indüklemeden sonra hücreler, 4 °C’de 10.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek toplandı. Toplanan hücreler, 1 mL 50 mM MOPS (pH 6,5) tamponunda süspansiyone edilip, süspansiyona 0,5 mg/mL içerecek şekilde lizozim ilave edildi. 37 °C’de 30 dakika bekletildikten sonra, %80 şiddetinde, 1 devirde 5 dakika boyunca sonikasyona maruz bırakılarak hücreler patlatıldı. Daha sonra 4 °C’de 10.000 rpm’de 20 dakika santrifüj edildi ve elde edilen süpernatant, ham enzim özütü olarak kullanıldı. Ön saflaştırma işlemi için ham enzim özütü 70 °C’de 5 dakika bekletildi ve 4 °C’de 10.000 rpm’de 20 dakika santrifüj edilerek denatüre olan proteinlerin uzaklaştırılması sağlandı.

Ekspres edilen protein, N ucunda 6 tane histidin birimi içerdiğinden dolayı, paramagnetik nikel parçacıkları içeren “MagneHis Protein Purification System (Promega)” kullanılarak saflaştırıldı. Bu amaçla aşağıdaki basamaklar takip edildi.

- Isı şoku yapılarak *E. coli*’den gelen proteinlerin kısmen uzaklaştırılmış olduğu eppendorf tüp içindeki 1 mL ham özüte, nikel bağlanmayı kolaylaştırmak için son konsantrasyonu 500 mM olacak şekilde NaCl ilave edildi ve iyice karıştırıldı.
- 1 mL’lik protein karışımına 120 µL vortekslenmiş Ni ilave edilip, oda sıcaklığında 2 dakika alt üst edilerek karıştırıldı. Bu işlem ile N-ucunda bulunan 6 tane histidinden dolayı mutant protein +2 yüklü nikel iyonlarına bağlanarak özütten ayrılması sağlandı.
- Ni parçalarını tüpün kenarına toplamak için tüp manyetik tutucuya yerleştirildi ve 30 saniye bekletildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı.
- Manyetik tutucudan alınan eppendorf tüp içine 1000 µL Bağlanma/Yıkama tamponu (Binding/Wash Buffer) ilave edildi. 2 dakika boyunca alt üst edilerek Ni parçalarının yıkanması sağlandı ve tüp 30 saniye manyetik tutucuda tutulduktan sonra süpernatant atıldı.
- Yıkama işlemi 750 µL Bağlanma/Yıkama tamponu kullanılarak iki defa daha tekrarlandı.
- Ni parçaları üzerine 250 µL elüsyon tamponu (Elution Buffer) ilave edildi ve tüp oda sıcaklığında 2 dakika alt üst edildikten sonra manyetik tutucuya yerleştirildi ve 30 saniye bekletildikten sonra süpernatant yani saf enzim dikkatlice alınıp 4 °C’de saklandı.

2.3. Enzim Karakterizasyonu Çalışmaları

2.3.1. Protein Tayini

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

- Kalibrasyon grafiği çizmek için hazırlanan BSA çözeltisinden (1 mg/mL) deney tüplerine sırasıyla 10, 20, 30, 40 ve 50 µL ilave edildi. Bu şekilde BSA'nın son konsantrasyonu 20, 40, 60, 80 ve 100 µg/mL olmaktadır.
- Saf enzim eluatından 5 µL başka bir deney tüpüne ilave edildi.
- Standartlara ve örneğe son hacimler 500 µL olacak şekilde 0,1 N NaOH içerisinde hazırlanan %0,1 (w/v) SDS çözeltisinden ilave edilip vortekslendi.
- 1 mL Lowry E çözeltisi her bir tüpe ilave edilip vortekslendi. Sonrasında oda sıcaklığında 5-10 dakika bekletildi.
- Standartlara ve numuneye saf su ile 1:1 oranında seyreltilmiş olan Folin reaktifi'nden 100 µL ilave edildi ve karanlık bir ortamda 30 dakika bekletildi.
- 650 nm'de absorbanslar okundu. Çıkan sonuçlara göre kalibrasyon grafiği çizildi ve örneğin protein konsantrasyonu hesaplandı.

2.3.2. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

SDS-PAGE'de analiz edilecek protein örneği SDS ve bir indirgeyici ajan varlığında ısıtılarak denatüre edilir ve deterjan ile kaplanır. SDS kabuğu proteine polipeptid zincirinin büyüklüğüne bağlı olarak negatif bir yük kazandırır. Bu şekilde hazırlanan örnek poliakrilamid jele yüklenir ve yüksek voltaj uygulanarak proteinlerin pozitif elektroda göç etmeleri sağlanır. Proteinler büyüklüklerine bağlı olarak negatif yük kazandıklarından dolayı sadece moleküler ağırlıklarına göre birbirinden ayrılırlar. Bir proteinin molekül ağırlığı protein standartlarının jeldeki hareketleri ile karşılaştırılarak hesaplanabilir.

SDS-PAGE, Sambrook ve arkadaşlarına (1989) göre %5'lik yığıma jeli ve %12'lik ayırma jeli kullanılarak gerçekleştirildi (Tablo 10).

Jel hazırlandıktan sonra tanka yerleştirildi ve tank SDS yürütme tamponu ile dolduruldu. Yaklaşık 35 µg saf protein SDS yükleme çözeltisi ile karıştırılıp kaynar su banyosunda 5 dakika inkübe edildi. Bu şekilde denatüre olan proteinler Hamilton şırıngası yardımı ile kuyucuklara yüklendi. Boya, yığıma jelinden çıkana kadar yaklaşık olarak 20 dakika 20 mA'da, daha sonra da ayırma jelinin alt kısmına gelene kadar yaklaşık olarak 1-1,5 saat 25 mA'da yürütüldü. Jel, jel boyama çözeltisi içine alındı ve yavaş bir şekilde sallanarak 10 dakika bekletildi. Boyanan jel, fazla boya uzaklaşp protein bantları görünür hale gelene kadar boya uzaklaştırma çözeltisi ile muamele edildi.

Tablo 10. SDS-PAGE'nin bileşenleri

Bileşenler	Yığıma Jeli (%5, pH 6,8)	Ayırma Jeli (%12, pH 8,8)
Yığıma Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl, pH 6,8)	0,5 mL	--
Ayırma Jeli Tamponu (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)	--	2,5 mL
%30 Akrilamid/Bisakrilamid	0,67 mL	4,0 mL
dd H ₂ O	2,74 mL	3,3 mL
%10 (APS)	0,04 mL	0,1 mL
%10 SDS	0,04 mL	0,1 mL
TEMED	0,004 mL	0,004 mL

2.3.3. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak belirlendi. Reaksiyon belirli bir miktar enzim özütü kullanılarak, 100 mM glukoz, 10 mM MgSO₄ ve 1 mM CoCl₂, pH'sı 7,0 olan 50 mM MOPS tamponu içerisinde, son hacim 100 µL olacak şekilde 80 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Reaksiyon, inkübasyon süresi sonunda, 100 µL 0,5 M perklorik asit ilavesi ile durduruldu. Reaksiyon sonunda açığa çıkan fruktoz miktarı Dische ve Borenfreund'un (1951) geliştirmiş olduğu sistein-karbazol-sülfürik asit yöntemi ile belirlendi. Reaksiyon çözeltisinin 20 µL'sinin üzerine sırasıyla 40 µL %1,5'lik sistein hidroklorür ve 40 µL %0,12'lik karbazol konuldu. Karışım vortekslendikten sonra üzerine 1,2 mL %70'lik sülfürik asit ilave edildi ve tekrar vortekslendi. 60 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra spektrofotometrede 560 nm dalga boyunda ölçümler gerçekleştirildi.

Fruktoz miktarı, hazırlanan fruktoz kalibrasyon eğrisine göre hesaplandı. Enzim aktivitesi reaksiyonlar sonucunda oluşan mikromol fruktoza göre hesaplanmış olup, bir enzim ünitesi dakikada oluşan mikromol fruktoz miktarı olarak tanımlanmıştır. Spesifik aktivite ise mg protein başına enzim ünitesi olarak bildirilmiştir.

2.3.4. Optimum pH Değerlerinin Belirlenmesi

Mutant enzimlerin optimum pH değerlerini belirleyebilmek amacıyla farklı pH değerlerindeki tamponlar kullanıldı ve bu pH değerlerindeki aktivite tayinleri 0,3 mg/mL enzim ve 100 mM substrat konsantrasyonlarında ve 80 °C'de gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan tamponların (pH 4,5-8,0) tamamının konsantrasyonu 50 mM olup farklı pH değerleri için sırasıyla asetat tamponu (pH 4,5-5,5) ve MOPS tamponu (pH 6,0-8,0) kullanıldı. Elde edilen bu aktivite değerleri kullanılarak pH-%bağlı aktivite grafikleri çizildi ve enzimlerin en yüksek aktiviteye sahip oldukları pH değerleri tespit edildi (Faiz vd., 2011).

2.3.5. Optimum Sıcaklıkların Belirlenmesi

Aktivitenin maximum olduğu sıcaklık değerlerini belirlemek için optimum pH değerinde 60-95 °C aralığında 5 °C'lik artışlarla, 0,3 mg/mL enzim ve 100 mM substrat konsantrasyonlarında enzim aktiviteleri tayin edildi. Elde edilen bu aktivite değerleri kullanılarak sıcaklık-%bağlı aktivite grafikleri çizildi ve her bir enzimin optimum sıcaklığı tespit edildi (Yildirim vd., 2009).

2.3.6. Enzim Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi

Bu çalışmada, substrat konsantrasyonu (100 mM glukoz) sabit tutularak, protein içeriği bilinen saf enzim özütünden belirli hacimlerde alınarak 0,1-3,0 mg/mL enzim içeren reaksiyon karışımları hazırlandı. Değişen protein miktarı ile aktivite ilişkisi incelendi (Kolcuoğlu vd., 2010).

2.3.7. Bazı Kinetik Parametrelerin İncelenmesi

Mutant enzimlere ait K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenebilmesi için her bir mutant enzimin sabit enzim konsantrasyonunda (TK4GI, TK4GIM1, TK4GIM2 ve TK4GIM4 için 2 mg/mL, TK4GIM3 için 1,5 mg/mL) ve optimum pH değerlerindeki MOPS tamponu içinde TK4GI ve TK4GIM1 için 2-500 mM, TK4GIM2 ve TK4GIM3 için 5-500 mM ve TK4GIM4 için 10-500 mM son konsantrasyonda glukoz içeren reaksiyon karışımları hazırlandı. Bu karışımlar kullanılarak TK4GI için 80 °C ve diğer mutant enzimler için 85 °C'de aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Her bir enzim için Lineweaver-Burk grafiği çizilerek K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı (Ertunga vd., 2009).

2.3.8. Enzimlerin pH Kararlılıklarının İncelenmesi

Enzimlerin pH kararlılığını incelemek amacıyla, saf enzim çözeltileri 1:1 oranında, 50 mM pH 6,0 ve 7,5 tamponları ile ayrı ayrı karıştırıldı. Enzim-tampon karışımları 4 ve 80 °C'de belirli süre bekletildikten sonra optimum şartlar altında aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Kalan aktiviteler, herhangi bir ön inkübasyon işlemi uygulanmamış enzimlerin uygun şartlarda belirlenen aktivite değerleri ile karşılaştırılarak hesaplandı (Faiz vd., 2011).

2.3.9. Enzimlerin Isıl Kararlılıklarının İncelenmesi

TK4GI ve mutant enzimlerin ısıl kararlılıklarını incelemek amacıyla MOPS tamponu içerisindeki (pH 6,5) saf enzimler ayrı ayrı, belli bir süre 4 ve 80 °C'de inkübe edildi. İnkübe edilen enzimler buz içinde 5 dakika bekletildikten sonra oda sıcaklığına gelmeleri beklendi ve önceden belirlenen optimum şartlarda aktivite tayinleri gerçekleştirildi. %kalan aktiviteler, herhangi bir ön inkübasyon işlemi uygulanmamış enzimlerin optimum şartlar altında belirlenen aktivite değerleri ile karşılaştırılarak hesaplandı (Konak vd., 2014).

2.3.10. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi

GI aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek amacıyla Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Na^+ , Li^+ ve Cu^{2+} iyonlarının klorür tuzlarının 100 mM'lık stok çözeltileri kullanıldı. Reaksiyon karışımlarına son konsantrasyonları 1 ve 5 mM olacak şekilde her bir metal iyonundan ilave edilerek optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Metal iyonu içermeyen karışımın aktivitesi %100 olarak kabul edilip metal iyonu ilavesi durumunda %kalan aktiviteler hesaplandı (Ayna vd., 2013).



3. BULGULAR

3.1. Mutant Primerlerin Tasarlanması

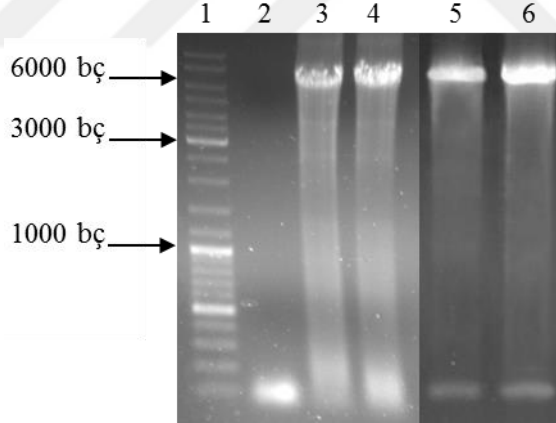
G. caldxylosilyticus TK4 GI'sının bilinen amino asit sırasıyla literatürde daha önceden farklı bakteri suşlarında (*Geobacillus stearothermophilus*, *Geobacillus thermodenitrificans*, *Geobacillus kaustophilus*, *Bacillus coagulans*) bildirilmiş GI amino asit sıralarının ClustalO (URL-2) programıyla karşılaştırılması sonucu substrat bağlanma cebi ve katalitik etkinlikte rol oynayan amino asitler tespit edilmiştir (Şekil 8). Literatürde GI üzerinde yapılan mutasyon çalışmaları incelendiğinde, çalışmaların özellikle bu bölgelerde yoğunlaştığı görülmektedir. Bu bölgelerde spesifik mutasyonlar yapılarak glukoza karşı daha ilgili, daha yüksek sıcaklık ve düşük pH değerlerinde çalışabilen bir GI'nın elde edilmesi amaçlanmaktadır. Bu amaçla, katalitik etkinlikte rol oynayan ve amino asit sırasında 99. sırada yer alan His amino asidinin H99Q mutasyonu, 102. sırada yer alan Asp amino asidinin D102N mutasyonu, aynı mutasyonun, daha önce yapılan H99Q mutasyonunu içeren gen üzerine yapılmasıyla H99Q/D102N çift mutasyonu ve amino asit sırasında 184. sırada yer alan ve substrat bağlanma cebinde bulunan Val amino asidinin V184T mutasyonunun yapılması hedeflenmektedir. Bahsedilen mutasyonların gerçekleştirilmesi amacıyla, uygun primerler tasarlandı ve sentezletirildi (Tablo 6).

3.2. PCR ile Mutant Genlerin Çoğaltılması, Saflaştırılması ve Transformasyonu

Planlanan mutasyonların gerçekleştirilmesi için, pET-28a(+) vektörüne klonlanmış TK4GI genini içeren *E. coli* BL21(DE3)pLysS gliserol stoğundan 50 µg/mL kanamisin içeren LB besiyerine ekim yapıp, hücreler 37 °C'de büyütüldü. Elde edilen gece kültüründen kit kullanılarak plazmit DNA izolasyonu yapıldı ve elde edilen plazmit, PCR için kalıp DNA olarak kullanıldı. Yapılan PCR işlemleri sonrasında istenilen büyüklükteki bantların varlığı agaroz jel elektroforezi yardımıyla tespit edildi (Şekil 9).

<i>G. stearothermophilus</i>	TFTGDGSDPFGAGNMIRPWNKYSGMDLAKARVEAAFEFFFEKLNIPFFCFH	99
<i>G. caldoxylolyticus</i> _TK4	TFTGDGSDPFGAGNMIRPWNKYSGMDLAKVRVEAAFEFFFEKLNVPFFCFH	99
<i>G. thermodenitrifican</i>	TFTGDGSDPFGVGNMIRPWDKYSGMDLAKARVEAAFEFFFEKLNVPFFCFH	99
<i>G. kaustophilus</i> _HTA42	TFTGDGSDPFGVGNMIRPWNTYSGMDLAKARVEAAFEFFFEKLNVPFFCFH	99
<i>B. coagulans</i> _36D1	TFTESGTDPPFGAGSKIRPWDRFTGMDLAKARVEAAFEFFFEKLGPNPYFCFH	100
	** . . *:****.* . ****: ::*****.*****:****. *:****	
<i>G. stearothermophilus</i>	DVDIAPEGETLKETYKNLDIIVDMIEEYMKTSKTKLLNNTANLFTHPRFV	149
<i>G. caldoxylolyticus</i> TK4	DVDIAPEGETLKETYKNLDIIVDMIEEYMKTSKTKLLNNTANLFTHPRFV	149
<i>G. thermodenitrificans</i>	DVDIAPEGETLSETYKNLDEIVDMIEEYMKTSKTKLLNNTANLFSHPRFV	149
<i>G. kaustophilus</i> HTA42	DVDIAPEGETLSETYKNLDEIVDMIEEYMKTSKTKLLNNTANLFSHPRFV	149
<i>B. coagulans</i> 36D1	DRDIAPEGDTLRETNKNLDVIVAMIKDYMKTSKVKLLNNTANMFTNPRFV	150
	* *.****:* * * **** ** **::*****.*****:***:***:	
<i>G. stearothermophilus</i>	HGAATSCNADVFAYAAAQVKKGLEIAKRLGAENYVFWGGREGYETLLNTD	199
<i>G. caldoxylolyticus</i> TK4	HGAATSCNADVFAYAAAQVKKGLEIAKRLGAENYVFWGGREGYETLLNTD	199
<i>G. thermodenitrificans</i>	HGAATSCNADVFAYAAAQVKKGLEIAKRLGAENYVFWGGREGYETLLNTD	199
<i>G. kaustophilus</i> HTA42	HGAATSCNADVFAYAAAQVKKGLEIAKRLGAENYVFWGGREGYETLLNTD	199
<i>B. coagulans</i> 36D1	HGAASSCNADVFAYAAAQVKKGLEIVGKELGAENYVFWGGREGYETLLNTD	200
	****.* ****:*****:*****:.*.*****:*****:*****:	

Şekil 8. *G. caldoxylolyticus* TK4 GI'sının amino asit sırasının, *G. stearothermophilus*, *G. thermodenitrificans*, *G. kaustophilus*, *B. coagulans* GI'larının amino asit sıraları ile karşılaştırılması. Kırmızı renk ile boyalı aminoasitler substrat bağlanma cebini oluşturan, sarı renk ile boyalı amino asitler katalitik etkinlikte rol oynayan amino asitlerdir (Faiz vd., 2011).



Şekil 9. PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü. 1. Standart, 2. Kontrol, 3. H99Q için PCR ürünü, 4. V184T için PCR ürünü, 5. D102N için PCR ürünü, 6. H99Q/D102N için PCR ürünü

Elde edilen PCR ürünleri ayrı ayrı PCR saflaştırma kiti kullanılarak Agaroz jelden saflaştırıldı. Kalıp olarak kullanılan vektörü ortamdan uzaklaştırmak amacıyla, saflaştırılmış PCR ürünleri, *DpnI* enzimi ile uygun şartlar altında kesildi. Mutant vektörler, $CaCl_2$ transformasyon metodu ile *E. coli* DH5 α konakçı hücrelerine aktarıldı. Kanamisin

ihativa eden LB agar besiyerine ekilerek, büyütülen kolonilerden her bir mutasyon için plazmit izolasyonu yapıldı ve izole edilen plazmitler, ilgili mutasyonların olup olmadığını araştırmak için sıra analizi yapılmak üzere Macrogen Inc. (Güney Kore)'ye gönderildi. Gelen DNA sıra analizi sonuçlarının incelenmesi neticesinde beklenen mutasyonların gerçekleştiği tespit edildi (TK4GIM1, TK4GIM2, TK4GIM3 ve TK4GIM4) (Şekil 10).

```

TK4GI      AGNMIRPWNKYSGMDLAKVRVEAAFEFFFEKLNDFVCFH Q D V N I A P E G E T L K E T Y K N L D I I 120
TK4GIM1    AGNMIRPWNKYSGMDLAKVRVEAAFEFFFEKLNDFVCF Q D V N I A P E G E T L K E T Y K N L D I I 120
TK4GIM2    AGNMIRPWNKYSGMDLAKVRVEAAFEFFFEKLNDFVCFH Q D V N I A P E G E T L K E T Y K N L D I I 120
TK4GIM3    AGNMIRPWNKYSGMDLAKVRVEAAFEFFFEKLNDFVCFH Q D V N I A P E G E T L K E T Y K N L D I I 120
TK4GIM4    AGNMIRPWNKYSGMDLAKVRVEAAFEFFFEKLNDFVCF Q D V N I A P E G E T L K E T Y K N L D I I 120
*****:*.*****

TK4GI      E N Y V F W G G R E G Y E T L L N T D M K L E L D N L A R F L H M A V D Y A K E I G F D G Q F L I E P K P K E P T K H Q 240
TK4GIM1    E N Y V F W G G R E G Y E T L L N T D M K L E L D N L A R F L H M A V D Y A K E I G F D G Q F L I E P K P K E P T K H Q 240
TK4GIM2    E N Y V F W G G R E G Y E T L L N T D M K L E L D N L A R F L H M A V D Y A K E I G F D G Q F L I E P K P K E P T K H Q 240
TK4GIM3    E N Y V F W G G R E G Y E T L L N T D M K L E L D N L A R F L H M A V D Y A K E I G F D G Q F L I E P K P K E P T K H Q 240
TK4GIM4    E N Y V F W G G R E G Y E T L L N T D M K L E L D N L A R F L H M A V D Y A K E I G F D G Q F L I E P K P K E P T K H Q 240
***.*****

```

Şekil 10. TK4GI, TK4GIM1, TK4GIM2, TK4GIM3 ve TK4GIM4 proteinlerinin aminoasit sıralarının karşılaştırılması. Sarı renk H99Q, yeşil renk V184T ve pembe renk D102N mutasyonudur. "*" Aynı amino asit birimlerini, "." ve ":" benzer amino asit birimlerini ifade etmektedirler

3.3. Mutant Genlerin Ekspresyonu ve Proteinlerin Saflaştırılması

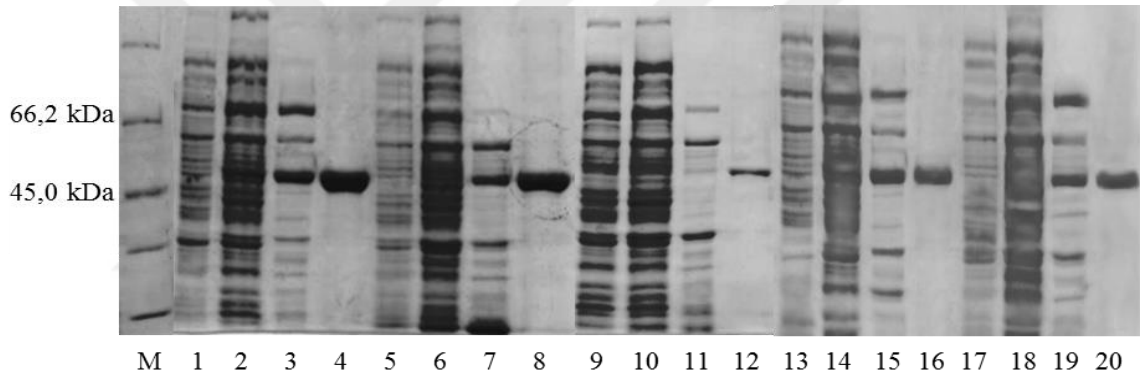
Mutasyon işlemlerinin olumlu bir şekilde gerçekleştiğinin tespit edilmesinin ardından, elde edilen mutant proteinlerin (TK4GIM1, TK4GIM2, TK4GIM3 ve TK4GIM4) karakterizasyon çalışmalarına başlanabilmesi için, mutant genler, *E. coli* BL21(DE3)pLysE konakçı hücrelerine aktarıldı ve indüklemeye için gerekli işlemlerden geçirilerek elde edilen proteinler, "MagneHis Protein Purification System (Promega)" kullanılarak saflaştırıldı.

3.4. Mutant Enzimlerin Biyokimyasal Karakterizasyonu

3.4.1. SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi

Protein ekspresyonu ve saflaştırma işleminin doğrulanması, TK4GI ve mutant enzimlerin yaklaşık molekül ağırlığı ve farklı alt birimler içerip içermediği sodyum dodesil

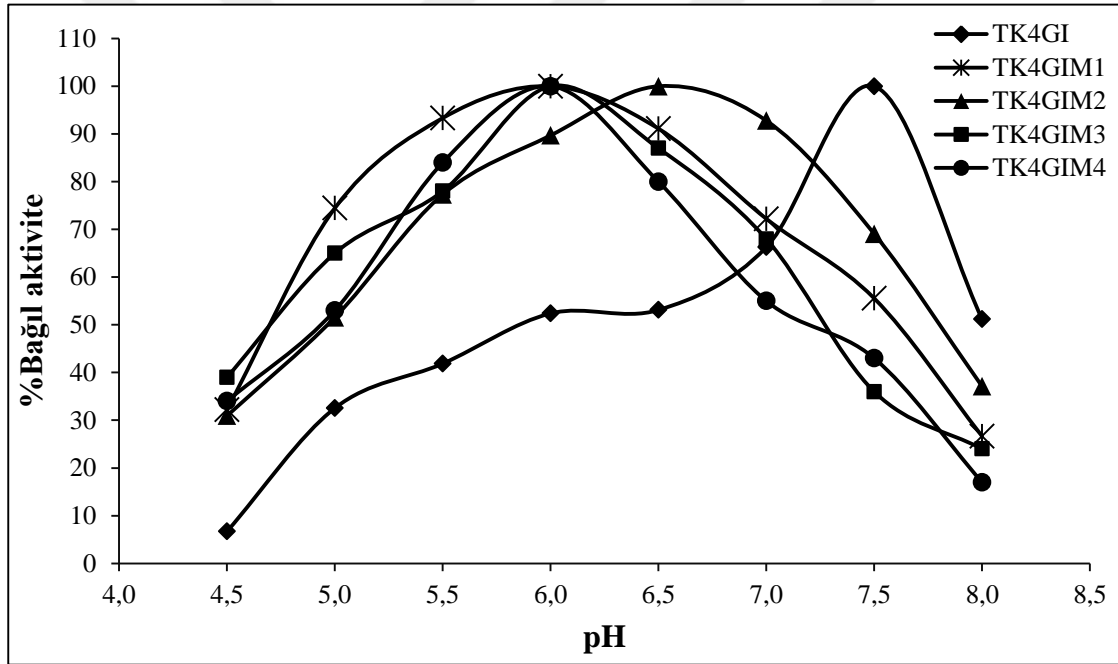
sülfat (SDS) jel elektroforezi ile tespit edilmiştir. Yaklaşık 35 µg protein %12'lik SDS-PAGE jeline yüklenerek elektroforez yapıldı. Elektroforez jelinin Coomassie Brilliant Blue R250 ile boyanıp fazla boyanın uzaklaştırılması sonucunda proteinlerin ekspres edildiği ve kullanılan kit ile etkili bir biçimde saflaştırıldığı tespit edildi (Şekil 11). Ayrıca TK4GI, TK4GIM1, TK4GIM2, TK4GIM3 ve TK4GIM4 enzimleri için yaklaşık 50 kDa civarında birer protein bandı gözlemlendi. Amino asit sırası, başlama sinyalinin önceki polihistidin kuyruğu ve diğer amino asitleri göz önüne alınarak yapılan teorik hesaplama sonucunda (URL-3) TK4GI, TK4GIM2 ve TK4GIM3'ün molekül ağırlıkları 52,57 kDa olarak bulunurken TK4GIM1 ve TK4GIM4 için 52,56 kDa olarak bulunmuştur. Dolayısıyla teorik ve deneysel molekül ağırlıklarının birbirine oldukça yakın olduğu görülmektedir.



Şekil 11. %12'lik SDS-PAGE elektroforezi. M: Moleküler ağırlık standartları, 1: TK4GI genini içeren indüklenmemiş rekombinant *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücre içi özütü, 2: TK4GI genini içeren 3 saat indüklenmiş rekombinant *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücre içi özütü, 3: İndüklenmeden sonra elde edilen özütün ısı şok sonrası durumu, 4: Saf TK4GI, 5: TK4GIM1 genini içeren indüklenmemiş rekombinant *E. coli* BL21(DE3)pLysE hücre içi özütü, 6: TK4GIM1 genini içeren 3 saat indüklenmiş rekombinant *E. coli* BL21(DE3)pLysE hücre içi özütü, 7: İndüklenmeden sonra elde edilen özütün ısı şok sonrası durumu, 8: Saf TK4GIM1, 9: TK4GIM2 genini içeren indüklenmemiş rekombinant *E. coli* BL21(DE3)pLysE hücre içi özütü, 10: TK4GI genini içeren 3 saat indüklenmiş rekombinant *E. coli* BL21(DE3)pLysE hücre içi özütü, 11: İndüklenmeden sonra elde edilen özütün ısı şok sonrası durumu, 12: Saf TK4GIM2, 13: TK4GIM3 genini içeren indüklenmemiş rekombinant *E. coli* BL21(DE3)pLysE hücre içi özütü, 14: TK4GIM3 genini içeren 3 saat indüklenmiş rekombinant *E. coli* BL21(DE3)pLysE hücre içi özütü, 15: İndüklenmeden sonra elde edilen özütün ısı şok sonrası durumu, 16: Saf TK4GIM3, 17: TK4GIM4 genini içeren indüklenmemiş rekombinant *E. coli* BL21(DE3)pLysE hücre içi özütü, 18: TK4GIM4 genini içeren 3 saat indüklenmiş rekombinant *E. coli* BL21(DE3)pLysE hücre içi özütü, 19: İndüklenmeden sonra elde edilen özütün ısı şok sonrası durumu, 20: Saf TK4GIM4

3.4.2. Optimum pH'nın Belirlenmesi

Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisini incelemek amacıyla 50 mM Asetat (pH 4,5-5,5) ve 50 mM MOPS (pH 6,0-8,0) tamponları kullanılarak bir seri aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen sonuçlar grafiğe geçirildi ve TK4GI enziminin optimum pH'sı 7,5 iken TK4GIM1, TK4GIM3 ve TK4GIM4 mutant enzimlerin optimum pH'ları 6,0 fakat TK4GIM2 mutant enziminin optimum pH'sı ise 6,5 olarak gözlemlendi. Ayrıca TK4GIM1, TK4GIM3 ve TK4GIM4'ün pH 5,5 ve 6,5, TK4GIM2'nin ise pH 6,0 ve 7,0'daki aktivilerine bakıldığında, %75 ile %90 arasında değişiklik gösterdiği görülmüştür (Şekil 12).

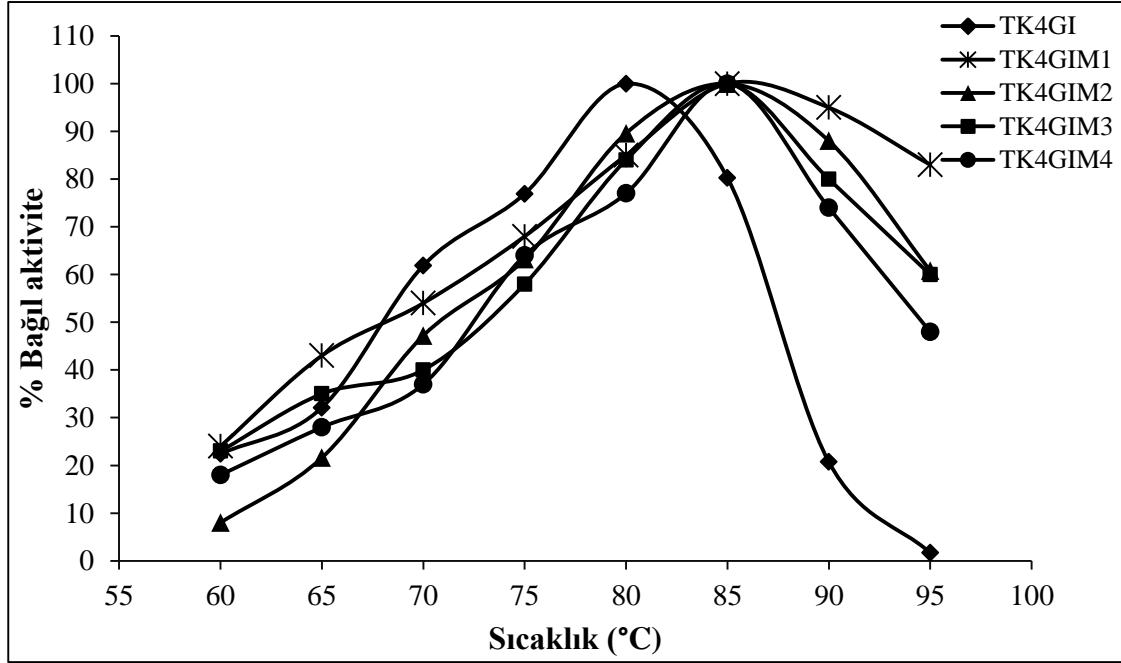


Şekil 12. TK4GI ve mutant enzimlerin aktiviteleri üzerine pH'nın etkisi

3.4.3. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

Aktivite üzerine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla, her bir enzimin optimum pH değerinde 5 °C' lik artışlarla birlikte 60-95 °C arasındaki sıcaklıklarda aktivite tayinleri yapıldı ve optimum sıcaklıklar belirlendi. Elde edilen sonuçların grafiğe geçirilmesi neticesinde, TK4GI enzimin optimum sıcaklığı 80 °C iken TK4GIM1, TK4GIM2, TK4GIM3 ve TK4GIM4 mutant enzimlerinin optimum sıcaklıkları 85 °C olarak belirlendi.

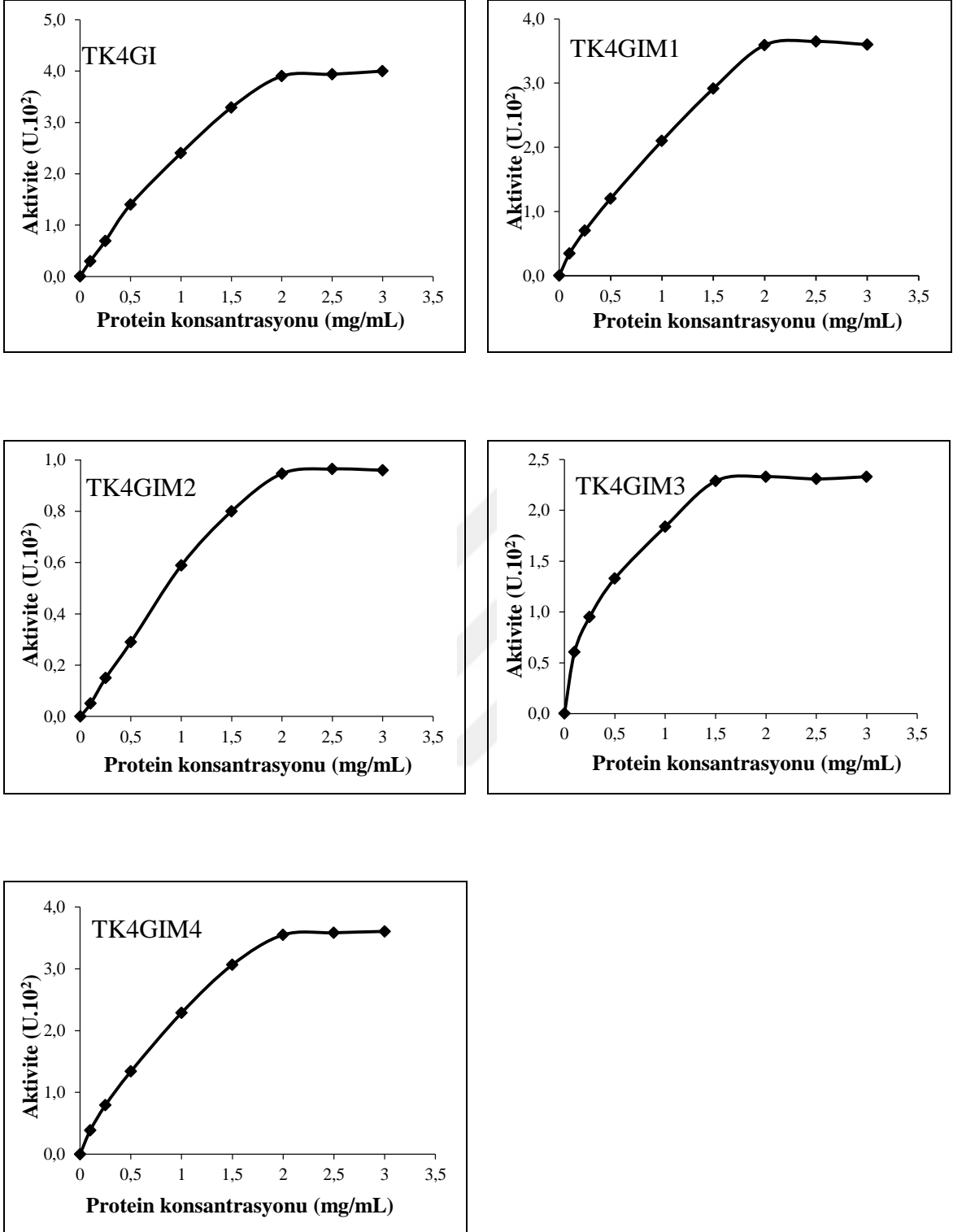
Ayrıca mutant enzimlerin 80 ve 90 °C’de gösterdikleri aktivite değerleri %75 ile %95 arasında değişiklik göstermekte olup TK4GIM1 enziminin 95 °C’deki aktivitesinin %85 olduğu görülmüştür (Şekil 13).



Şekil 13. TK4GI ve mutant enzimlerin aktivite değerleri üzerine sıcaklığın etkisi

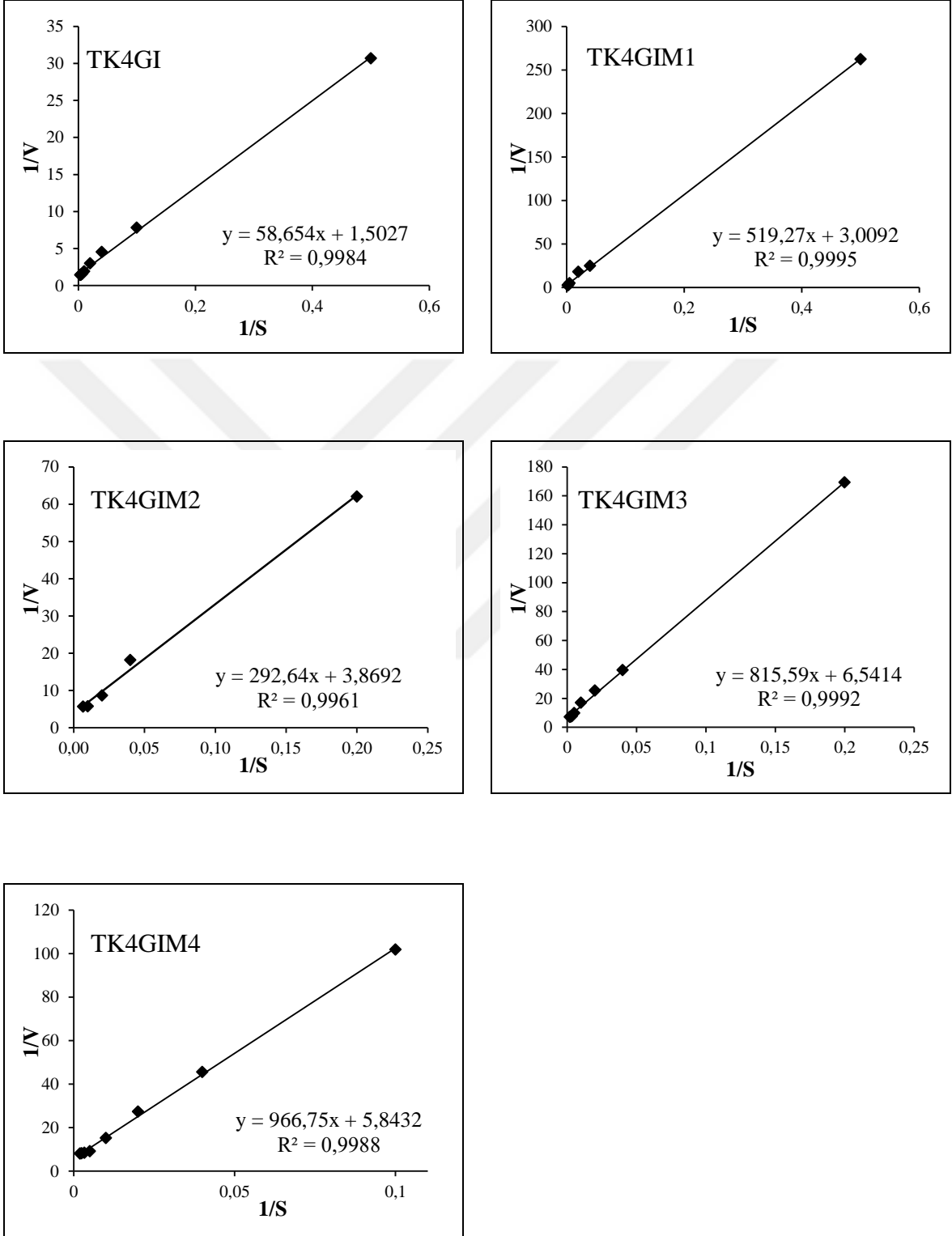
3.4.4. Enzim Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine protein miktarının etkisini incelemek üzere substrat konsantrasyonu sabit tutularak farklı protein konsantrasyonlarında reaksiyon karışımları hazırlandı. Reaksiyon karışımlarında, 0,1-3 mg/mL son konsantrasyonda protein içerecek şekilde enzim çözeltileri kullanılarak aktivite tayinleri yapıldı. Ölçülen aktivite değerlerine karşı protein konsantrasyon değerleri grafiğe geçirildi. Şekil 14’den de görüldüğü gibi 100 mM glukoz substratı varlığında hem TK4GI hem de TK4GIM1, TK4GIM2 ve TK4GIM4’de optimum protein konsantrasyonu 2,0 mg/mL olarak belirlenirken, TK4GIM3’de bu değer 1,5 mg/mL olarak bulundu.



Şekil 14. Enzim aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisi

3.4.5. Bazı Kinetik Parametrelerin İncelenmesi



Şekil 15. TK4GI ve mutant enzimlerin Lineweaver-Burk grafikleri

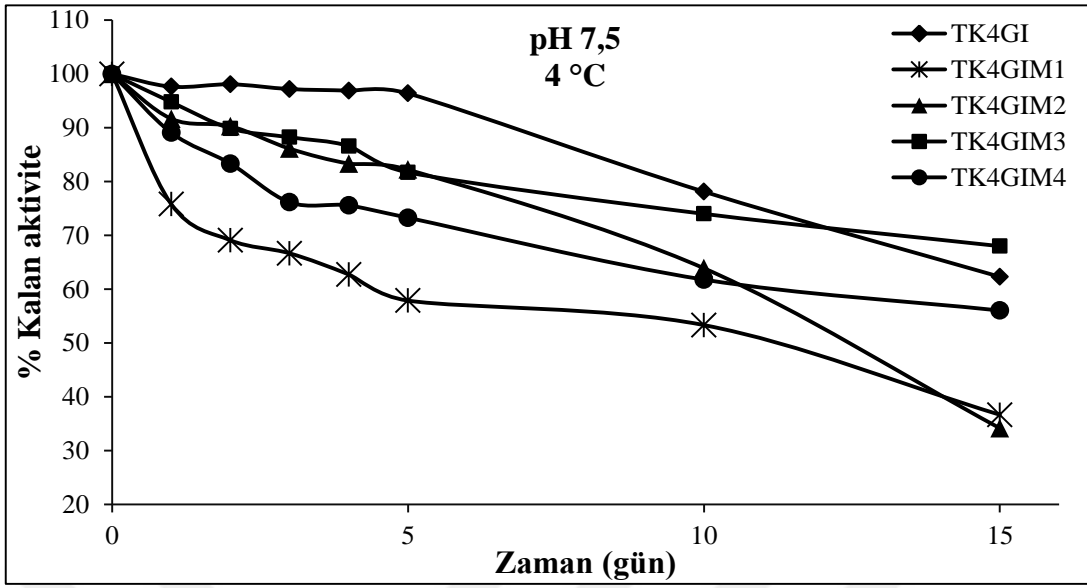
Enzim aktivitesinin substrat konsantrasyonu ile değişimini incelemek amacı ile daha önceden belirlenen optimum şartlarda ve sabit protein konsantrasyonunda farklı substrat konsantrasyonları kullanılarak aktivite tayini gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilerden Lineweaver-Burk (Şekil 15) grafikleri çizilmiştir. Grafiklerden yola çıkarak elde edilen K_m ve V_{maks} değerleri tablo haline getirilmiştir (Tablo 11).

Tablo 11. TK4GI ve mutant proteinlerin kinetik parametrelerinin karşılaştırılması

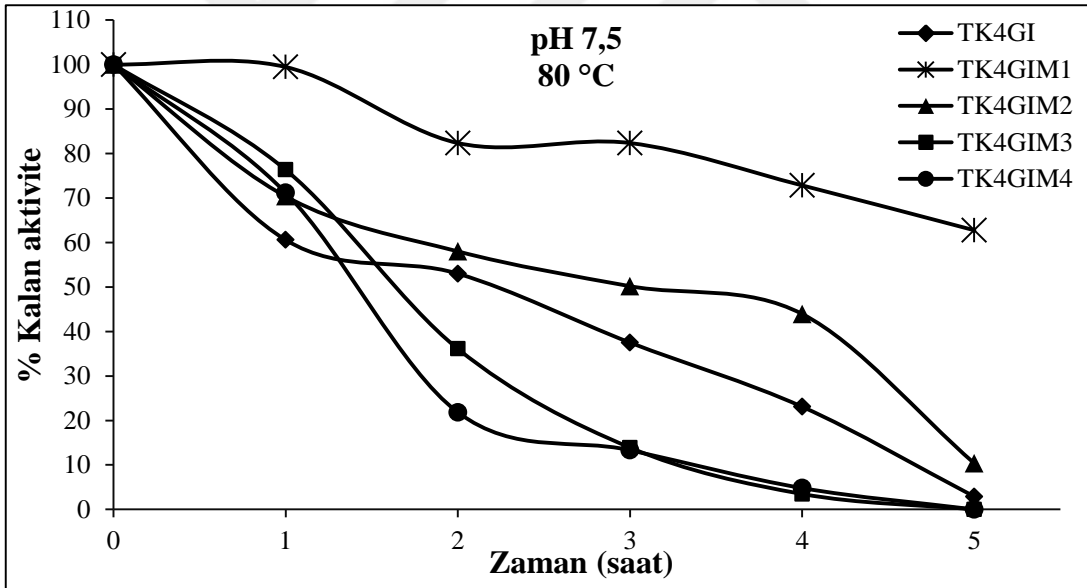
Enzim	K_m (mM)	V_{maks} (U/mg protein)
TK4GI	39,03	0,66
TK4GIM1	172,56	0,33
TK4GIM2	75,63	0,26
TK4GIM3	124,68	0,15
TK4GIM4	165,45	0,17

3.4.6. Enzimin pH Kararlılığının İncelenmesi

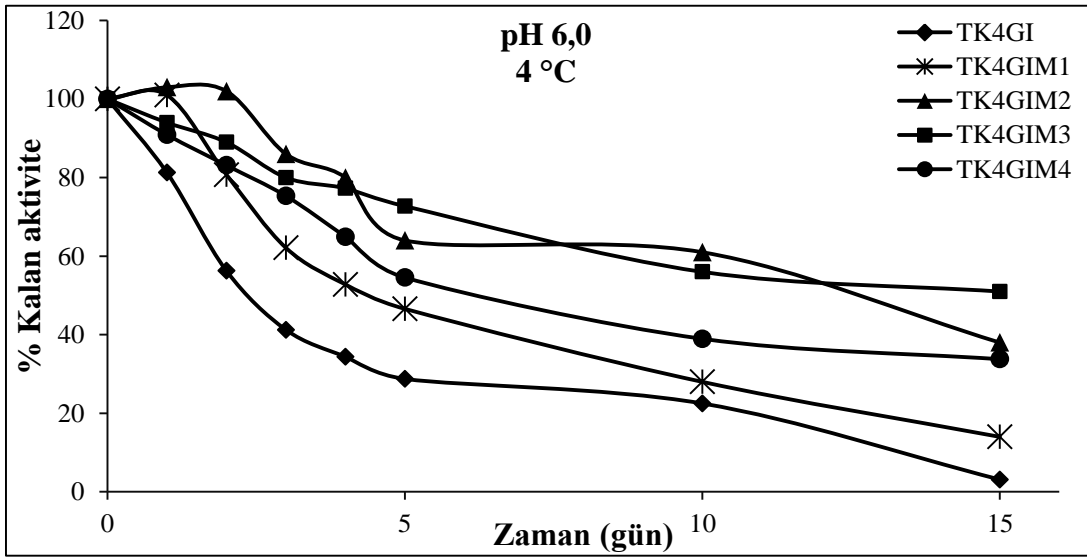
Enzimlerin pH kararlılığını incelemek amacıyla, saf enzim eluatları, 1:1 oranında, derişimi 50 mM olan pH 6,0 ve 7,5 MOPS tamponları ile karıştırıldı. Enzim-tampon karışımları 4 ve 80 °C’de 1-15 gün boyunca bekletildikten sonra optimum şartlar altında aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Kalan aktiviteler, herhangi bir ön inkübasyon işlemi uygulanmamış enzimlerin uygun şartlarda belirlenen aktivite değerleri ile karşılaştırılarak hesaplandı. Daha sonra inkübasyon zamanına karşı %kalan aktiviteler grafiğe geçirilmiştir (Şekil 16-19). 4 °C’de, beşinci günün sonunda pH 6,0’a nazaran pH 7,5’deki kalan aktivitelerin daha yüksek olduğu görülmüştür. En dramatik azalış pH 6,0’da TK4GI’da görülürken, her iki pH değeri için mutant enzimlerin aktivitelerinde %20-50 arasında kayıplar yaşandığı tespit edilmiştir. On beşinci günün sonunda ise pH 6,0’da TK4GI ve TK4GIM1’in aktivitesi neredeyse sifira ulaşmışken, TK4GIM3 aktivitesinin %50’sini koruyabilmiştir. pH 7,5’de TK4GIM1 ve TK4GIM2 aktivitelerinin %30’unu gösterirken, en az kayıp %30 ile TK4GIM3’de gözlenmiştir. 80 °C’de birinci saatin sonunda her iki pH’da da en yüksek aktiviteyi TK4GIM1, en düşük aktiviteyi TK4GI göstermiştir. Beşinci saatin sonunda kalan aktivitelere bakıldığında ise pH 7,5’de %60 ile en yüksek değeri TK4GIM1’in, pH 6,0’da %20 ile TK4GIM1 TK4GIM2 ve TK4GIM3’ün gösterdiği görülmektedir.



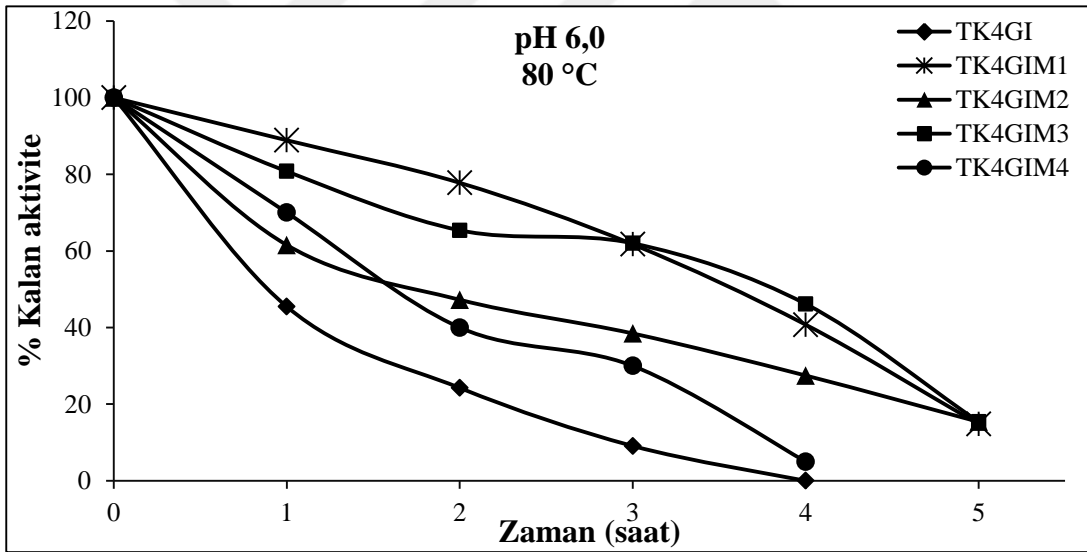
Şekil 16. pH 7,5 ve 4 °C'deki pH kararlılık eğrisi



Şekil 17. pH 7,5 ve 80 °C'deki pH kararlılık eğrisi



Şekil 18. pH 6,0 ve 4 °C'deki pH kararlılık eğrisi

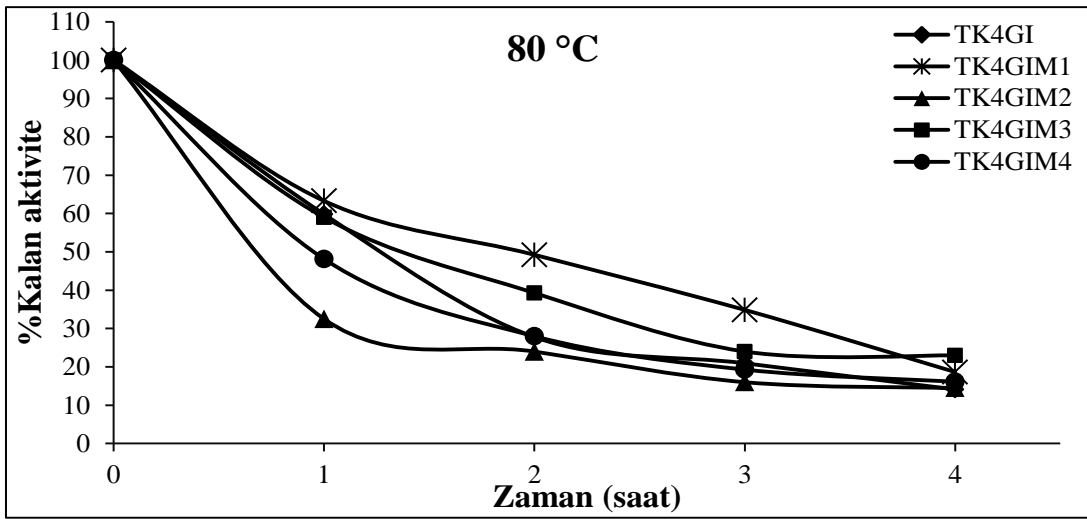


Şekil 19. pH 6,0 ve 80 °C'deki pH kararlılık eğrisi

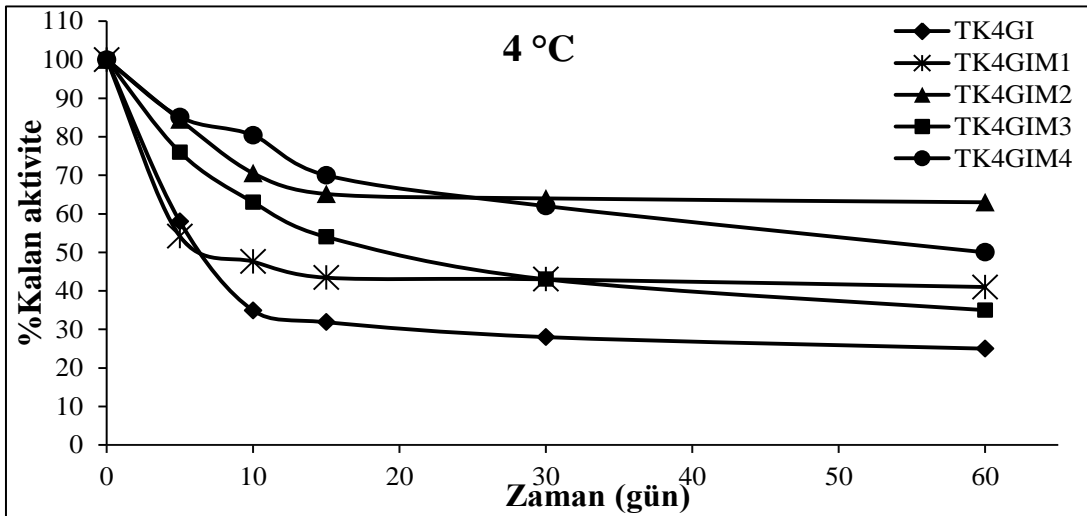
3.4.7. Enzimin Isıl Kararlılığının İncelenmesi

Enzimin ısıl kararlılığı, MOPS tamponu (50 mM, pH 6,5) içindeki saf enzimin 4 ve 80 °C'lerde farklı zaman aralıkları boyunca bekletilmesi ve bu sürelerin sonunda, gerekli işlemlerden sonra optimum şartlar altında aktivite tayinlerinin gerçekleştirilmesi ile incelendi. Isı ile hiç muamele edilmemiş enzimin aktivitesi %100 olarak kabul edilerek, bekletilen enzimlerin %kalan aktiviteleri hesaplandı ve zaman-%Kalan aktivite grafleri

çizildi (Şekil 20-21). 80 °C'de TK4GI, TK4GIM1 ve TK4GIM3'ün aktiviteleri birinci saatte %60'ını, TK4GIM4 aktivitesinin %50'sini korurken bu oran TK4GIM2 için %30 olarak belirlenmiştir. 4 saatin sonunda ise aktivitelerin %80 oranında azaldığı belirlendi. 4 °C'de on beş günlük periyot sonunda kalan aktiviteler şu şekildedir; TK4GI için %30, TK4GIM1 için %40, TK4GIM2 için %70, TK4GIM3 için %35 ve TK4GIM4 için %50. 60 günlük zaman diliminden sonra TK4GIM3 ve TK4GIM4'ün aktivitelerinde %10'luk bir azalma görülmesine karşın diğer enzimlerin aktivitelerini aynı oranda korudukları anlaşılmıştır.



Şekil 20. 80 °C'deki ısıl kararlılık eğrisi



Şekil 21. 4 °C'deki ısıl kararlılık eğrisi

3.4.8. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi

Tablo 12. Bazı metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi

Metal İyonu	TK4GI %Kalan aktivite		TK4GIM1 %Kalan aktivite		TK4GIM2 %Kalan aktivite		TK4GIM3 %Kalan aktivite		TK4GIM4 %Kalan aktivite	
	1 mM	5mM	1 mM	5mM	1 mM	5mM	1 mM	5mM	1 mM	5mM
Yok	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Ca ²⁺	75	65	141	81	60	300	151	161	77	108
Co ²⁺	310	450	450	145	690	510	694	833	571	476
Cu ²⁺	117	125	75	344	430	730	833	1111	875	1619
Li ⁺	101	127	130	69	10	250	36	133	36	105
Mg ²⁺	120	169	57	89	20	470	297	481	170	363
Mn ²⁺	150	240	207	257	680	890	446	619	827	1162
Na ⁺	87	63	239	165	20	10	72	131	97	86
Ni ²⁺	125	110	75	194	70	270	249	599	106	747
Zn ²⁺	83	110	80	125	70	450	271	617	181	463

GI aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek amacı ile Na⁺, Li⁺, Mn²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Ni²⁺ ve Ca²⁺ iyonlarının klorür tuzları kullanıldı. Reaksiyon karışımındaki metal iyonlarının son konsantrasyonları 1 mM ve 5 mM olacak şekilde düzenlendi ve optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Metal iyonu içermeyen karışımın aktivitesi %100 olarak kabul edildi ve iyon varlığındaki aktivite %kalan aktivite olarak hesaplanarak tablo haline getirildi (Tablo 12). Tabloda görüldüğü gibi TK4GI enzimi aktivitesi, 1 ve 5 mM metal konsantrasyonu varlığında Na⁺ ve Ca²⁺ hariç artmıştır. TK4GIM1 mutant proteininin metal iyonları varlığında davranışını inceleyecek olursak, Co²⁺, Na⁺, Ca²⁺ ve Li⁺ metal iyonlarının derişimi arttırıldığında farklı oranlarda aktivite kayıpları olmuştur. TK4GIM2 aktivitesi, 1 mM nihai konsantrasyonda Na⁺, Li⁺, Mg²⁺ ve

Zn²⁺ iyonlar varlığında oldukça düşük iken konsantrasyon arttırıldığında Na⁺ metali hariç diğer aktivitelere önemli ölçüde artışlar gözlenmiştir. TK4GIM3 aktivitesi sadece 1 mM Na⁺ ve Li⁺ varlığında düşüş göstermiştir. Bunun yanında aktivitenin, 5 mM Co²⁺ ve Cu²⁺ iyonlarının varlığındaki artışı oldukça fazladır. TK4GIM4 aktivitesinde, düşük konsantrasyondaki Na⁺, Ca²⁺ ve Li⁺ iyonları varlığında, azalış gözlemlenirken, yüksek Cu²⁺ ve Mn²⁺ konsantrasyonunda muazzam bir artma, Na⁺ varlığında azalma ve Ca²⁺ ve Li⁺ varlığında ise kayda değer bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. TK4GIM3 mutasyonunda hafif bir artış gözlenmesine rağmen, diğer mutant enzimlerin aktivitelerinde Co²⁺ iyonunun konsantrasyonunun artmasıyla kayıpların meydana geldiği gözlemlenmiştir.



4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Endüstriyel alanda özellikle gıda sektöründe; daha verimli, daha uzun bir yarılanma ömrüne sahip, daha yüksek sıcaklık ve daha düşük pH değerlerinde çalışabilen glukoz izomeraz (GI)'lara ihtiyaç duyulmuş ve bundan dolayı günümüze kadar birçok asidik ve termofilik karakterli bakterinin GI geni üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Bugün dahi istenen özelliklere sahip GI'lara ihtiyaç bulunmaktadır.

Bugün günümüzde hali hazırda kullanılan endüstriyel GI'lardan büyük bir çoğunluğu mutasyonlarla geliştirilmişlerdir. Bu çalışma kapsamında da rekombinant *Geobacillus caldxylosilyticus* TK4 glukoz izomeraz (TK4GI)'ının endüstriyel olarak daha çok arzu edilen bir enzim haline getirebilmesi için mutasyonlarla geliştirilmesi amaçlandı. Genel olarak bundan önceki birçok çalışmada yapıldığı gibi birkaç temel unsur üzerinde durulmuştur. Bunlardan birincisi enzimin katalitik etkinliğini arttırmak yani, daha düşük K_m değerine ve daha yüksek V_{max} değerine sahip bir enzim oluşturmak, ikincisi ise ısı kararlılığı yüksek, yüksek sıcaklık ve düşük pH'larda optimum aktivite gösteren bir enzim meydana getirmektir. Literatürde mevcut olan mutasyonlar göz önünde bulundurularak H99Q, V184T, D102N ve H99Q/D102N mutasyonları yapıldı ve mutant enzimler saflaştırılıp karakterize edilerek özellikleri yaban tip rekombinant enzimle karşılaştırıldı.

SDS jel elektroforezi ile enzimin tek bir tür alt birimden oluştuğu ortaya konuldu (Şekil 11). SDS jel elektroforezi sonuçlarına göre proteinin tek bant halinde olması, enzimin tersiyer yapılı veya homolog birden fazla alt birimin organizasyonu ile oluştuğunu gösterir. Ekspres edilen rekombinant ve mutant proteinlerin alt birim molekül ağırlığı yaklaşık olarak 50 kDa olarak hesaplandı. Amino asit sırası, başlama sinyalinden önceki polihistidin kuyruğu ve diğer amino asitleri göz önüne alınarak yapılan teorik hesaplama sonucunda ise (URL-3) TK4GI, TK4GIM2 ve TK4GIM3'ün molekül ağırlıkları 52,57 kDa olarak bulunurken TK4GIM1 ve TK4GIM4 için 52,56 kDa olarak bulundu. Dolayısıyla teorik ve deneysel molekül ağırlıklarının birbirine oldukça yakın olduğu görülmektedir. Bu değer *Bifidobacterium adolescentis*'ten klonlanan ve alt birim ağırlığı 53,0 kDa olan trimer yapıdaki Sınıf II glukoz izomerazın molekül ağırlığına oldukça yakın bir değerdir (Kawai vd., 1994). *Thermoanaerobacterium JW/SL-YS 489* (Liu vd., 1996) ve *Anoxybacillus gonensis* G2^T (Karaoglu vd., 2013) suşlarından klonlanan ve alt birim ağırlığı 50,0 kDa

olan ve termofilik *Bacillus* sp. suşundan saflaştırılan ve alt birim ağırlığı 50,00 kDa olan trimer yapıdaki glukoz izomerazların varlığı bildirilmiştir (Chauthaiwale ve Rao, 1994).

Karakterizasyon çalışmaları enzim aktivitesi üzerinden yapılmaktadır. Bu çalışmada enzim aktivitesi, reaksiyon sonucu açığa çıkan fruktoz miktarına göre belirlenmektedir. Dolayısı ile GI enziminin karakterizasyonunun yapılabilmesi için reaksiyon sonrasında açığa çıkan fruktoz miktarının belirlenmesi gerekmektedir. Oluşan fruktoz miktarı Dische ve Borenfreund'un (1951) geliştirdikleri sistein-karbozol-sülfirik asit metoduyla belirlenmektedir. Açığa çıkan fruktoz, bu reaksiyon sonrasında, pembe-mor renkli bir ürüne dönüşmektedir. Bir çözelti içerisindeki fruktoz miktarı 560 nm dalga boyunda yapılan spektroskopik ölçümler sonrası oluşturulan fruktoz standardından belirlenebilmektedir.

Yapılan optimum pH çalışmaları sonucunda TK4GI'nin optimum pH değeri 7,5, TK4GIM1, TK4GIM3 ve TK4GIM4 mutant enzimlerin optimum pH'ları 6,0 ve TK4GIM2 mutant enziminin optimum pH'sı ise 6,5 olarak bulunmuştur (Şekil 12). Ayrıca her bir mutant enzimin optimum pH değeri genel olarak pH 5,5-7,0 arasında bir omuz profili oluşturduğundan enzimlerin yüksek aktivite göstererek çalışabileceği pH aralığının genişlediği görülmüştür. *Lactobacillus brevis* (Yamanaka, 1975), *Thermus aquaticus* (Lehmacher ve Bisswanger, 1990) ve *Thermoanaerobacterium* sp. (Liu vd., 1996)'den elde edilen yaban tip GI'lar ile *Streptomyces* sp. SK (Hlima vd., 2013) ve *Anoxybacillus gonensis* G2^T (Karaoglu vd., 2013)'den elde edilen yaban tip ve rekombinant GI'ları haricindeki literatürde görebildiğimiz diğer GI'ların optimum pH değerleri 6,5'ten daha yüksektir. Bu özelliği ile enzimi birçok mikroorganizmanın GI'sına göre, daha asidik bir ortamda çalışabilir hale getirmek, yapılan mutasyonlar ile birlikte mümkün olmuştur. Buna benzer çalışmalara literatürde rastlamak mümkündür. Örneğin, *Actinoplanes missouriensis* GI geni üzerinde yapılan mutasyon çalışması ile birlikte enzimin optimum pH'sı 7,3 (Mg²⁺) ve 7,9 (Mn²⁺)'dan 6,25'e inmiştir (Van Tilbeurgh vd., 1992). *Thermotoga neapolitana* XI geni üzerinde yapılan 3A2 (V185T/L282P) ve 1F1(V185T/L282P/F186S) mutasyonları sonucu enzimin pH 5,5'te göstermiş olduğu aktivite pH 7,0'dekinden daha yüksektir (Sriprapundh vd., 2003). *Streptomyces* sp. SK GI geni üzerine yapılan W16H mutasyonu ile enzimin optimum pH değeri 6,5'an 6,0'a düşürülmüştür (Hajer vd., 2014).

GI'nin optimum sıcaklığı, genel olarak çeşitli organizmalarda 60 ile 110 °C arasında değişiklik göstermektedir (Bhosale vd., 1996; Brown vd., 1993). Örneğin, sığır iştakbesi metagenomik kütüphanesinden klonlanan ve *Saccharomyces cerevisiae* konak hücresinde

ekspres edilen XI'nın çalışma sıcaklığı 60 °C (Hou vd., 2016), *Streptomyces* sp. SK'dan elde edilen yaban tip ve rekombinant GI'ların optimum çalışma sıcaklıklarının sırasıyla 95 ve 85 °C olduğu tespit edilmiştir (Hlima vd., 2013). Benzer şekilde *Streptomyces* sp. (Inyang vd., 1995) ve *Bacillus* sp.(Chauthaiwale ve Rao, 1994)'den elde edilen yaban tip ve *Anoxybacillus gonensis* G2^T (Karaoglu vd., 2013)'den elde edilen yaban tip ve rekombinant GI'ların optimum çalışma sıcaklıklarının da 85 °C olduğu gösterilmiştir. *Thermotoga neapolitana*'dan elde edilen rekombinant GI'nın ise optimum 95°C'de çalıştığı gösterilmiştir (Hess vd., 1998). TK4GI üzerine yapılan mutasyon çalışmaları sonucu enzimin optimum sıcaklığının 80 °C'den 85 °C'ye yükseldiği görülmüştür. Ayrıca 80-90 °C'de mutant enzimler yüksek aktivite gösterdiğinden bu sıcaklıklarda da aktivite tayininin yapılabileceği tespit edilmiştir. Özellikle TK4GIM1 mutant enziminin göstermiş olduğu %85'lik bağıl aktivite ile 95 °C'de de rahatlıkla çalışılabilir olduğu anlaşılmıştır (Şekil 13). Mutasyon işlemleri ile sıcaklıkta değişikliklerin meydana geldiği benzer çalışmalar literatürde de mevcuttur. Örneğin, *Thermotoga neapolitana* XI (TNXI) üzerine yapılan Pro58Gln, Pro62Ala, Pro58Gln/Pro62Ala ve Trp138Phe mutasyonları ile *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* XI (TTXI) üzerine yapılan Ala62Pro ve Gln58Pro/Ala62Pro mutasyonları enzimin optimum çalışma sıcaklığında ortalama 10 °'lik bir azalmaya sebebiyet vermiştir. Diğer yandan TNXI üzerine yapılan Val185Thr ve Trp138Phe/Val185Thr mutasyonları sonucu optimum sıcaklıkta 2°'lik bir artış görülmüştür (Sriprapundh vd., 2000). *T. thermophilus* XI geni üzerinde yapılan F163L (M-1024) ve E372G (M-1026) rastgele mutasyonları sonucu enzimin optimum çalışma sıcaklığı 5 °C artmıştır (Lönn vd., 2002). Birkaç istisna haricindeki diğer GI'lar genel olarak optimum 60 ile 80 °C arasında aktivite göstermektedirler. Bu verilere dayanılarak, 85°C'lik optimum çalışma sıcaklığı ile yapılan mutasyonların bu parametrede başarılı olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 13).

Yapılan kinetik incelemelerde, TK4GI'nın glukoz için düşük K_m (39,03 mM) değerine sahip olduğu, dolayısı ile enzimin glukozla olan ilgisinin yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 15). Bu ilgiyi daha da arttırmak adına H99Q, V184T, D102N ve H99Q/D102N, mutasyonların yapılması planlanmıştır. 184 nolu amino asit olan valin, polar ve yüksüz karakterlerde olan treonin amino asidi ile yer değiştirilmiştir. Burada amaç substrat enzim kompleksi oluşumunda substrata proton sağlayabilecek yan zincirleri substrat bağlanma bölgesine ilave edilmesidir. 99 nolu pozitif yüklü histidin amino asidi ile hidrofilik karakterli glutamin amino asidi ile yer değiştirilmiştir. Korunmuş bölgede

bulunan ve H99 amino asidi ile etkileşimde olan 102 nolu aspartat amino asidinin, negatif yükü kaldırarak histidinin iyonlaşmasını etkilediği ve halka açılmasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Halka açılmasını kolaylaştırmak adına aspartat ile asparagin amino asidi yer değiştirilmiştir. Şekil 15 ve Tablo 11 incelendiğinde, yapılan mutasyonlar neticesinde enzimin K_m değeri artmış ve V_{max} değerinde azalma meydana gelmiştir. Yani enzimin katalitik etkinliği ve substrata duyduğu ilgi azalmıştır. Benzer şekilde sonuçlanan çalışmalar literatürde mevcuttur. Bu çalışmada mutant enzimlerin K_m ve V_{max} değerlerinde beklenen sonuçlar gözlenememiş olmakla birlikte Tablo 13'den de görüldüğü gibi literatürde belirtilen birçok GI enzimine göre yine de daha yüksek bir substrat ilgisine sahip olduğu anlaşılmaktadır.

Tablo 13. Çeşitli mikroorganizmalara ait GI'nın glukoz için K_m değerleri

Mikroorganizma	K_m (mM)	V_{max} (U/mg protein)	Kaynaklar
<i>G. caldxylosilyticus</i> TK4 TK4GI H99Q V184T D102N H99Q/D102N	39,03 172,56 75,63 124,68 165,45	0,66 0,33 0,26 0,15 0,17	Bu çalışma
<i>Streptomyces albus</i> Yaban tip	86	1,23	(Sanchez ve Smiley, 1975)
<i>Lactobacillus brevis</i> Yaban tip	920	-	(Yamanaka, 1975)
<i>Streptomyces olivochromogenes</i> <i>Bacillus stearothermophilus</i> Her ikisinde yaban tip	250 220	5,33 5,96	(Suekane vd., 1978)
<i>TTXI</i> Yaban tip	110	12,8	(Meng vd., 1991)
<i>Actinoplanes missouriensis</i> Yaban tip pH	290	-	(Lambeir vd., 1992)
<i>Actinoplanes missouriensis</i> Yaban tip pH 7,4 D57N mutant pH 7,3	230 250	- -	(Van Bastelaere vd., 1995)
<i>Thermoanaerobacterium saccharolyticum</i> B6A-RI <i>Thermoanaerobacterium</i> strain JW/SL-YS 489 Her ikisinde yaban tip	120 130	6,3 6	(Liu vd., 1996)
TNXI Yaban tip	143,4	15,1	(Sriprapundh vd., 2000)

Tablo 13'ün devamı

<i>Anoxybacillus gonensis</i> G2 ^T Rekombinant V184T H99Q	138,37 247,69 167,50	40,51 59,08 8,24	(Karaoğlu, 2010)
<i>Acidothermus cellulolyticus</i> Rekombinant	400	6,41	(Mu vd., 2012)
<i>Streptomyces</i> sp. SK Yaban tip Rekombinant	368 207	30,3 34,2	(Hlima vd., 2013)

Rekombinant ve mutant enzimlerin pH kararlılıkları, saf enzimin pH 6,0 ve 7,5'deki tamponlar içinde 4 ve 80 °C'de farklı zaman aralıklarında inkübasyona bırakılmasıyla incelendi. pH 7,5'deki kararlılıkları incelersek, 4 °C'de beşinci günün sonunda TK4GI aktivitesinin %100'e yakını korurken, TK4GIM1 %60 ve TK4GIM2, TK4GIM3 ve TK4GIM4 ise %80'ine yakını korumuştur. Onbeşinci gün sonunda TK4GI ve TK4GIM4 aktivitelerinin yaklaşık %60'ını gösterirken, TK4GIM3 %70, TK4GIM1 ve TK4GIM2 %40'ını koruyabilmiştir (Şekil 16). Bu sonuçlara bakılarak, pH 7,5 tamponunda ve 4 °C'de TK4GIM1 ve TK4GIM2'nin TK4GI'dan daha az, TK4GIM3'ün %10 daha fazla ve TK4GIM4'ün aynı miktarda kararlı oldukları çıkarımında bulunulabilir. Aynı pH'nın 80 °C'deki kararlılıklarına bakıldığında ise birinci saatin sonunda TK4GIM1 aktivitesinin tamamını korurken, TK4GI ve TK4GIM2 yaklaşık %65, TK4GIM3 ve TK4GIM4 yaklaşık %70 aktivite göstermektedirler. Beşinci saatin sonunda ise TK4GI, TK4GIM3 ve TK4GIM4 proteinleri aktivitelerinin neredeyse tamamını kaybederken, TK4GIM1 aktivitesinin yaklaşık %65'ini, TK4GIM2 yaklaşık %10'unu korumayı başarabilmiştir (Şekil 17). Burada ise 4 °C'de elde edilen sonuçların tersini görmek mümkündür. Elde edilen mutant enzimlerin (TK4GIM3 ve TK4GIM4 hariç) bu koşullarda ki kararlılıkları TK4GI enziminden daha yüksektir.

pH 6,0'daki kararlılıkları incelersek 4 °C'de birinci gün sonunda TK4GIM1 ve TK4GIM2 aktivitelerini korurken TK4GI enzim aktivitesinin %20'sini, TK4GIM3 ve TK4GIM4 aktivitelerinin yaklaşık %10'unu, kaybetmiştir. 15 günlük periyot sonrasında TK4GI aktivitesinin tamamını kaybederken TK4GIM1'in %20, TK4GIM2'nin %40, TK4GIM3'ün %50 ve TK4GIM4'ün %35'lik aktivitelerinin geriye kaldığı anlaşılmaktadır (Şekil 18). Aynı pH'nın 80 °C'deki kararlılıklarına bakıldığında ise birinci saatten itibaren aktivitelerde sabit bir düşüş gözlenmiştir. Dördüncü saatte TK4GI ve TK4GIM4'ün

aktivitelerinin tamamını kaybettiği görülmüş olup, beşinci saatte diğer üç mutasyonun aktivitelerinden geriye yaklaşık %20'lik kısmın kaldığı görülmüştür (Şekil 19). Bu durumda, pH 6,0'da TK4GIM4 hariç diğer mutant enzimlerin TK4GI'dan daha kararlı olduğu söylenebilir.

pH kararlılık parametresiyle ilgili literatürde farklı çalışmalar mevcuttur. Örneğin; *Bifidobacterium adolescentis*'den elde edilen *D*-ksiloz izomeraz enzimi 8 °C'de 18 saat süreyle pH'sı 6,0 ile 9,0 arasında olan tamponlarda bekletilmiş ve bu süre sonunda aktivitesinin %70'ini korumuştur (Kawai vd., 1994). *Arthrobacter* sp. B-5 hücrelerinden saflaştırılan ve immobilize edilen GI enzimi, 80 °C'de pH 7,0-8,0 arasındaki tamponlarda bekletildiğinde birinci saat sonunda aktivitesinin %80'ini koruduğu görülmüştür (Sapunova vd., 2002). *Acidothermus cellulolyticus* 11B'den elde edilen rekombinant GI enzimi 80 °C'de pH'sı 6,0 ve 7,5 olan tamponlarda belirli bir süre bekletildiğinde, dördüncü saatin sonunda aktivitesinin sırasıyla %90 ve %70'ini koruduğu gözlemlenmiştir (Mu vd., 2012). *Anoxybacillus gonensis* G2^T'den klonlanan GI, 4 ve 80 °C'de farklı pH'lardaki tamponlar içerisinde bekletilerek kararlılık çalışmaları yapılmıştır. 4°C'de, onikinci gün sonunda ve pH 5,0-9,0 aralığında enzim aktivitesini %80-95 oranında korumuştur. 80 °C'de ise 8 saatlik süre sonunda enzimin kalan aktivitesi pH 8,0 ve 9,0'da en yüksek değerde gözlemlenmiştir (Karaoglu vd., 2013).

Bir enzimin pH kararlılığı, onun çözeltisi halinde ne kadar süre depolanabileceği ve reaksiyon pH'sında yapısını ve aktivitesini ne kadar koruyabileceğini belirlemede önemli bir parametredir. Bu bilgidan yola çıkarak yapılan mutasyon çalışmalarının sonucunda her iki pH değerinde ve 4 °C'de uzun süre enzimin saklanabileceği, 80 °C'de ise kısıtlı zamanlarda çalışılabileceği anlaşılmıştır.

Enzimin ısıl kararlılığını belirlemek amacıyla, saf enzim eluatları (50 mM pH 6,5 MOPS) 4 ve 80 °C'de farklı zaman aralıklarında inkübe edilmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, 80 °C'de birinci saatin sonunda hızlı bir düşüş gözlenmiş olup, TK4GIM2 mutant proteininin kalan aktivitesinin diğer dört proteinlere göre daha az olduğu, diğer mutant proteinlerin kalan aktivitelerinin %50-60 arasında değişkenlik gösterdiği görülmüştür. Dördüncü saatin sonunda kalan aktiviteler, TK4GIM1 ve TK4GIM3 için yaklaşık %20, TK4GI, TK4GIM2 ve TK4GIM4 için ise yaklaşık %15 civarındadır (Şekil 20). 4 °C'de altmışıncı gün sonunda kalan aktiviteler TK4GI için %30, TK4GIM1 için %40, TK4GIM2 için %60, TK4GIM3 için %35 ve TK4GIM4 için %50'dir. (Şekil 21). Bu sonuçlara bakıldığında yapılan mutasyonların enzimin depolama sıcaklığındaki

kararlılığının belli bir miktar arttırdığı görülmektedir. Literatüre bakıldığında ise bu oranların düşük olduğu anlaşılmaktadır. Örneğin; *Thermus aquaticus* HB8 organizmasından saflaştırılan *D*-ksiloz izomeraz enziminin 4 °C'deki ısıl kararlılığına bakıldığında kırkıncı gün sonunda enzim aktivitesinin %100'ünü koruduğu görülmektedir (Lehmacher ve Bisswanger, 1990).

Literatür incelendiğinde benzer sonuçlarla karşılaşılmaktadır. Liu ve arkadaşlarının (1996) *Thermoanaerobacterium* strain JW/SL-YS 489'dan klonladıkları glukoz izomerazın 80 °C'deki ısıl kararlılık çalışmasının beşinci saatinin sonunda aktivitesinin %10 kadarını koruduğu görülmüştür. *Streptomyces chibaensis* J-59'den klonlanan glukoz izomeraz enziminin 90 °C'deki ısıl kararlılığına bakıldığında ikinci saatin sonunda aktivitenin %20'sinin kaldığı görülmektedir (Joo vd., 2005). *Acidothermus cellulolyticus* GI'sı 80 °C'de aktivitesinin % 20'sinin dördüncü saat sonunda koruyabilmiştir (Mu vd., 2012). *Thermus thermophilus* HB8 GI'sı üzerinde yapılan mutasyon çalışmaları sonucunda elde edilen mutant proteinlerin ısıl kararlılıkları incelenmiş ve düşüş gözlenmiştir (Patel vd., 2012). *Streptomyces* sp. SK GI'sı ve bundan elde edilen mutant proteinler üzerinde yapılan kararlılık çalışmaları sonucunda, 85 °C'de ve 90 dk sonunda yaban tip GI aktivitesinin %40'ını korurken, mutant tiplerde bu oran %20 ile sınırlı kalmıştır (Hajer vd., 2014).

Birçok enzim, etkinlik gösterebilmek için kofaktör olarak metal iyonlarına ihtiyaç duyar. Metal iyonları farklı koordinasyon sayılarına, yaptıkları bileşiklerde farklı koordinasyon geometrisine ve Lewis asidi potansiyeline sahip olmaları gibi sebeplerle, proteinlerin farklı bölgelerine bağlanabilirler. Bunun sonucu olarak da enzim aktivitesini farklı şekilde etkileyebilirler (Bock vd., 1999; DiTusa vd., 2001). Saflaştırılan enzimler üzerine Na^+ , Li^+ , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} ve Ca^{2+} iyonlarının etkisi 1 mM ve 5 mM nihai konsantrasyonlarda olacak şekilde incelendi (Tablo 12). TK4GI ve TK4GIM3'ün aksine diğer üç mutant enzimin aktiviteleri Co^{2+} iyonunun derişimi arttırıldığında düşüş göstermektedir. Buna rağmen Co^{2+} nin düşük derişimlerinin bile elde edilen enzimlerin aktivitesi üzerinde ne derece artışa sebebiyet verdiği tablodan anlaşılmaktadır. Benzer sonuçlara literatürde rastlamak mümkündür (Chauthaiwale ve Rao, 1994; Kawai vd., 1994; Sukumar vd., 2013). TK4GI ve TK4GIM1 için Ca^{2+} ve TK4GI için Ni^{2+} hariç literatürde bulunan bazı sonuçların aksine (Bucke, 1983; Karaoglu vd., 2013; Mu vd., 2012; Smith vd., 1991) artan Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} ve Ca^{2+} iyonları derişimi enzimleri inhibe etmemiştir. Aksine aktivitelerini artırıcı yönde etki göstermiştir (Lee vd., 2015; Mu vd., 2012). Enzim aktivitesi üzerine +1 yüklü iyonların etkisini incelemek üzere

Na⁺ ve Li⁺ iyonlarıyla çalışılmıştır. Na⁺'nın düşük derişimi TK4GIM1 aktivitesinin, yüksek derişimi ise TK4GIM3 aktivitesinin yükselmesine neden olmuştur. Diğer proteinlerin üzerinde inhibe edici etkiye sahip olduğu anlaşılmıştır. TK4GIM1'in aksine Li⁺ iyon derişiminin artmasıyla diğer proteinlerin aktivitelerinde yükselme gözlemlenmiştir. Cu²⁺ ve Mn²⁺ iyonlarının artan derişimi ile mutant proteinlerin aktiviteleri üzerine yaptığı etki yadsınamayacak kadar fazladır.

Elde edilen bütün bu veriler göz önüne alındığında, *G. caldxylosilyticus* TK4 GI'sı üzerinde yapılan 3 farklı bölge ve 1 çift spesifik mutasyonla enzimin optimum pH ve sıcaklığında beklenen yönde iyileşmeler elde edilirken K_m ve V_{max} değerlerinde hedeflenen amaca ulaşılammıştır. Yapılan mutasyonlarla pH kararlılıklarında özellikle pH 7,5'te TK4GIM1 (80 °C'de) ve TK4GIM3 (4 °C'de) için artışlar meydana gelmekle birlikte, pH 6,0'da her iki sıcaklık ve tüm mutant enzimler için rekombinant enzime göre artışlar tespit edilmiştir. Enzimin ısıl kararlılığı ise özellikle depolama sıcaklığı olan 4 °C'de bir miktar artmıştır. Bunlara ilave olarak, mutant GI enzimlerinin yaban tip enzime karşılaştırıldığında bazı metal iyonlarına karşı daha dirençli hale geldiği de rahatlıkla söylenebilmektedir.

5. ÖNERİLER

Bu çalışma kapsamında rekombinant *Geobacillus caldxylosilyticus* TK4 glukoz izomeraz (TK4GI)'ını endüstriyel olarak daha potansiyel kullanıma sahip bir enzim haline getirilebilmek için mutasyonlarla geliştirilmesi amaçlanmış ve yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen mutant enzimler karakterize edilmiştir. Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde yapılan çalışmalara ilave olarak yapılabilecek diğer çalışmalar aşağıdaki gibi sıralanabilir:

1) Jel filtrasyon veya diğer bazı kromatografik tekniklerle doğal proteinin kütlesi belirlenip, alt birim sayısı belirlenebilir.

2) Moleküler modelleme çalışmalarıyla enzimde mutasyon yapılacak noktaları seçiminde bir basamak öteye gidilebilir. Böylelikle K_m ve V_{max} ve reaksiyon şartlarındaki ısı kararlılığı arttırmak için enzimin özelliklerinde yapılması planlanan iyileştirmeler daha detaylı ele alınabilir.

3) Enzimin bazı özelliklerinde istenen yönde değişikliklerin gerçekleşmesi için başka mutasyonlar planlanıp gerekli çalışmalar sürdürülebilir.

4) Enzimlerin sürekli kullanılabilirliklerini ve kararlılıklarını arttırmanın diğer bir yolu da immobilizasyon yöntemidir. Bu nedenle, ileri bir çalışma ile rekombinant ve bazı mutant enzimlerin immobilizasyonu incelenebilir.

6. KAYNAKLAR

- Amore, R. ve Hollenberg, C., 1989. Xylose Isomerase from *Adinoplanes missouriensis*: Primary Structure of the Gene and the Protein, Nucleic Acids Research, 17, 18, 7515-7515.
- Amore, R., Wilhelm, M. ve Hollenberg, C.P., 1989. The Fermentation of Xylose-an Analysis of the Expression of *Bacillus* and *Actinoplanes* Xylose Isomerase Genes in Yeast, Applied Microbiology and Biotechnology, 30, 4, 351-357.
- Angardi, V. ve Çalık, P., 2013. Beet Molasses Based Exponential Feeding Strategy for Thermostable Glucose Isomerase Production by Recombinant *Escherichia coli* BL21 (DE3), Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 88, 5, 845-852.
- Anon, 1979. New Applications Expand HFCS Markets Increase Demand and Tighten Supplies, [Translated New Applications Expand HFCS Markets Increase Demand and Tighten Supplies], Food Product Development, 13, 12, 38.
- Anon, 1993. Multifunctional Sweeteners, [Translated Multifunctional Sweeteners], Baking and Snack, 15, 4, 31-34.
- Asboth, B. ve Naray-Szabo, G., 2000. Mechanism of Action of *D*-Xylose Isomerase, Current Protein and Peptide Science, 1, 3, 237-254.
- Ayna, Ç., Kolcuoglu, Y., Oz, F., Colak, A. ve Ertunga, N.S., 2013. Purification and Characterization of a pH and Heat Stable Esterase from *Geobacillus* sp. TF17, Turkish Journal of Biochemistry-Turk Biyokimya Dergisi, 38, 3, 329-336.
- Barker, S., 1976. Pure Fructose Syrups, Process Biochemistry, 11, 10, 20.
- Bartfay, J., 1960. Glucose Isomerase in Barley Malt, Nature, 185, 924-925.
- Basuki, W., Iizuka, M., Ito, K., Furuichi, K. ve Minamiura, N., 1992. Evidence for the Existence of Isozymes of Glucose Isomerase from *Streptomyces phaeochromogenes*, Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 56, 2, 180-185.
- Batt, C.A., Jamieson, A.C. ve Vandeyar, M.A., 1990. Identification of Essential Histidine Residues in the Active Site of *Escherichia coli* Xylose (Glucose) Isomerase, Proceedings of the National Academy of Sciences, 87, 2, 618-622.
- 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, 12, 1259-1264.
- Bhasin, S. ve Modi, H., 2012. Optimization of Fermentation Medium for the Production of Glucose Isomerase Using *Streptomyces* sp. SB-P1, Biotechnology Research International, 10.

- Bhosale, S.H., Rao, M.B. ve Deshpande, V.V., 1996. Molecular and Industrial Aspects of Glucose Isomerase, Microbiological Reviews, 60, 2, 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, 4, 1158-1165.
- Bock, C.W., Katz, A.K., Markham, G.D. ve Glusker, J.P., 1999. Manganese as a Replacement for Magnesium and Zinc: Functional Comparison of the Divalent Ions, Journal of the American Chemical Society, 121, 32, 7360-7372.
- Bogumil, R., Kappl, R. ve Huttermann, J., 2000. Role of the Binuclear Manganese (II) Site in Xylose Isomerase, Metal Ions in Biological Systems, 37, 365-405.
- Boguslawski, G. ve Rynski, M.J., 1982. Novel Strain of *Bacillus licheniformis* Useful in the Production of Glucose Isomerase and Method of Screening *Bacillus* Mutants for Ability to Produce Glucose Isomerase in the Absence of Xylose, Patent No: 4,355,103, Washington DC., U. S. Patent.
- Bor, Y.-C., Moraes, C., Lee, S.-P., Crosby, W.L., Sinskey, A.J. ve Batt, C.A., 1992. Cloning and Sequencing the *Lactobacillus brevis* Gene Encoding Xylose Isomerase, Gene, 114, 1, 127-132.
- Briggs, K., Lancashire, W.E. ve Hartley, B.S., 1984. Molecular Cloning, DNA Structure and Expression of the *Escherichia coli* D-Xylose Isomerase, The EMBO Journal, 3, 3, 611.
- Brock, T.D., 1985. Life at High Temperatures, Science, 230, 4722, 132-138.
- Brown, S.H., Sjøholm, C. ve Kelly, R.M., 1993. Purification and Characterization of a Highly Thermostable Glucose Isomerase Produced by the Extremely Thermophilic Eubacterium, *Thermotoga maritima*, Biotechnology and Bioengineering, 41, 9, 878-886.
- Bucke, C., 1983. Glucose-transforming Enzymes, In W. Fogarty (Ed.), *Microbial Enzymes and Biotechnology*, Applied Science Publishers, London, 93-127.
- Burhan, A., Nisa, U., Gökhan, C., Ömer, C., Ashabil, A. ve Osman, G., 2003. Enzymatic Properties of a Novel Thermostable, Thermophilic, Alkaline and Chelator Resistant Amylase from an Alkaliphilic *Bacillus* sp. Isolate ANT-6, Process Biochemistry, 38, 10, 1397-1403.
- Carrell, H., Glusker, J.P., Burger, V., Manfre, F., Tritsch, D. ve Biellmann, J.-F., 1989. X-ray Analysis of D-Xylose Isomerase at 1.9 Å: Native Enzyme in Complex with Substrate and with a Mechanism-designed Inactivator, Proceedings of the National Academy of Sciences, 86, 12, 4440-4444.
- Carrell, H., Rubin, B.H., Hurley, T.J. ve Glusker, J.P., 1984. X-ray Crystal Structure of D-Xylose Isomerase at 4-Å Resolution, Journal of Biological Chemistry, 259, 5, 3230-3236.

- Chan, E.-C., Ueng, P.P. ve Chen, L.F., 1989. Metabolism of *D*-Xylose in *Schizosaccharomyces pombe* Cloned with a Xylose Isomerase Gene, Applied Microbiology and Biotechnology, 31, 5-6, 524-528.
- Chang, C., Park, B.C., Lee, D.-S. ve Suh, S.W., 1999. Crystal Structures of Thermostable Xylose Isomerases from *Thermus caldophilus* and *Thermus thermophilus*: Possible Structural Determinants of Thermostability, Journal of Molecular Biology, 288, 4, 623-634.
- Chauthaiwale, J. ve Rao, M., 1994. Production and Purification of Extracellular *D*-Xylose Isomerase from an Alkaliphilic, Thermophilic *Bacillus* sp, Applied and Environmental Microbiology, 60, 12, 4495-4499.
- Chen, W.-P., 1980a. Glucose Isomerase (A Review), Process Biochemistry, 15, 5, 30-35.
- Chen, W.-P., 1980b. Glucose Isomerase (A Review), Process Biochemistry, 15, 5, 36-41.
- Chen, W., Anderson, A. ve Han, Y., 1979. Production of Glucose Isomerase by *Streptomyces flavogriseus*, Applied and Environmental Microbiology, 37, 2, 324-331.
- Cherry, J.R. ve Fidantsef, A.L., 2003. Directed Evolution of Industrial Enzymes: An Update, Current Opinion in Biotechnology, 14, 4, 438-443.
- Chiang, L.-C., Gong, C.-S., Chen, L.-F. ve Tsao, G.T., 1981b. *D*-Xylulose Fermentation to Ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*, Applied and Environmental Microbiology, 42, 2, 284-289.
- Chiang, L.-C., Hsiao, H., Ueng, P., Chen, L. ve Tsao, G., 1981a. Ethanol Production from Xylose by Enzymic Isomerization and Yeast Fermentation, Biotechnology and Bioengineering Symp., Purdue Univ., West Lafayette, IN, USA, 263-274.
- Chou, C., Ladisch, M. ve Tsao, G., 1976. Studies on Glucose Isomerase from a *Streptomyces* Species, Applied and Environmental Microbiology, 32, 4, 489-493.
- Collyer, C. ve Blow, D., 1990. Observations of Reaction Intermediates and the Mechanism of Aldose-ketose Interconversion by *D*-Xylose Isomerase, Proceedings of the National Academy of Sciences, 87, 4, 1362-1366.
- Collyer, C., Henrick, K. ve Blow, D., 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, 1, 211-235.
- CRA, 1994. Corn Refining, the Process, the Products, [Translated Corn Refining, the Process, the Products], Corn Refiners Association Inc.
- Das, R. ve Gerstein, M., 2000. The Stability of Thermophilic Proteins: A Study Based on Comprehensive Genome Comparison, Functional & Integrative Genomics, 1, 1, 76-88.

- De Raadt, A., Ebner, M., Ekhart, C., Fechter, M., Lechner, A., Strobi, M. ve Stütz, A., 1994. Glucose Isomerase (EC 5.3. 1.5) as a Reagent in Carbohydrate Synthesis: Success and Failures with the Isomerisation of Non-natural Derivatives of D, Catalysis Today, 22, 3, 549-561.
- Dekker, K., Sugiura, A., Yamagata, H., Sakaguchi, K. ve Udaka, S., 1992. Efficient Production of Thermostable *Thermus thermophilus* Xylose Isomerase in *Escherichia coli* and *Bacillus brevis*, Applied Microbiology and Biotechnology, 36, 6, 727-732.
- 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, 173, 10, 3078-3083.
- Dekker, R. ve Richards, G., 1976. Hemicellulases: Their Occurrence. Purification. Properties. and Mode of Action, Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, 32, 277-352.
- DiCosimo, R., McAuliffe, J., Poulou, A.J. ve Bohlmann, G., 2013. Industrial Use of Immobilized Enzymes, Chemical Society Reviews, 42, 15, 6437-6474.
- Dinçer, B., 2005. Termofilik Bakterilerdeki Katalaz Aktivitesinin İncelenmesi, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Dische, Z. ve Borenfreund, E., 1951. A New Spectrophotometric Method for the Detection and Determination of Keto Sugars and Trioses, Journal of Biological Chemistry, 192, 2, 583-587.
- DiTusa, C.A., Christensen, T., McCall, K.A., Fierke, C.A. ve Toone, E.J., 2001. Thermodynamics of Metal Ion Binding. 1. Metal Ion Binding by Wild-type Carbonic Anhydrase, Biochemistry, 40, 18, 5338-5344.
- Drazic, M., Golubic, Z. ve Cizmek, S., 1980. Isomerization Glucose to Fructose Using Microbial Enzymes, Periodicum Biologorum, 82, 4, 481-484.
- Drocourt, D., Bejar, S., Calmels, T., Reynes, J.P. ve Tiraby, G., 1988. Nucleotide Sequence of the Xylose Isomerase Gene from *Streptomyces violaceoniger*, Nucleic Acids Research, 16, 19, 9337.
- Du Preez, J., Bosch, M. ve Prior, B., 1987. Temperature Profiles of Growth and Ethanol Tolerance of the Xylose-fermenting Yeasts *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*, Applied Microbiology and Biotechnology, 25, 6, 521-525.
- Du Preez, J. ve Prior, B., 1985. A Quantitative Screening of Some Xylose-fermenting Yeast Isolates, Biotechnology Letters, 7, 4, 241-246.
- Duguet, M., 1995. Reverse Gyrase, In F. Eckstein vd. (Eds.), *Nucleic Acids And Molecular Biology*, Springer, Berlin, 9, 84-114.

- Dülger, S., 2003. Gönen, Kestanbol ve Diyadin Kaplıcalarından Termofilik Bakteri İzolasyonu, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Ertunga, N.S., Cakmak, Ü., Colak, A., Faiz, Ö. ve Sesli, E., 2009. Characterisation of Esterolytic Activity from Two Wild Mushroom Species, *Amanita vaginata* var. *vaginata* and *Tricholoma terreum*, Food Chemistry, 115, 4, 1486-1490.
- Faiz, Ö., Colak, A., Kolcuoglu, Y. ve Ertunga, N.S., 2011. Cloning, Expression and Characterization of Xylose Isomerase from Thermophilic *Geobacillus caldoxylosilyticus* TK4 Strain, Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry-Turk J Biochem], 36, 1, 6-14.
- Fang, X.-W., Golden, B., Littrell, K., Shelton, V., Thiyagarajan, P., Pan, T. ve Sosnick, T., 2001. The Thermodynamic Origin of the Stability of a Thermophilic Ribozyme, Proceedings of the National Academy of Sciences, 98, 8, 4355-4360.
- Farber, G.K., Glasfeld, A., Tiraby, G., Ringe, D. ve Petsko, G.A., 1989. Crystallographic Studies of the Mechanism of Xylose Isomerase, Biochemistry, 28, 18, 7289-7297.
- Farber, G.K., Petsko, G.A. ve Ringe, D., 1987. The 3.0 Å Crystal Structure of Xylose Isomerase from *Streptomyces olivochromogenes*, Protein Engineering, 1, 6, 459-466.
- Forterre, P., Bergerat, A. ve Lopez-Garcia, P., 1996. The Unique DNA Topology and DNA Topoisomerases of Hyperthermophilic Archaea, FEMS Microbiology Reviews, 18, 2, 237-248.
- Gaikwad, S., Rao, M. ve Deshpande, V., 1993. Structure-Function Relationship of Glucose/Xylose Isomerase from *Streptomyces*: Evidence for the Occurrence of Inactive Dimer, Enzyme and Microbial Technology, 15, 2, 155-157.
- Galtier, N., Tourasse, N. ve Gouy, M., 1999. A Nonhyperthermophilic Common Ancestor to Extant Life Forms, Science, 283, 5399, 220-221.
- Ghatge, M.S., Phadatare, S.U., Bodhe, A.M. ve Deshpande, V.V., 1994. Unfolding and Refolding of Glucose/Xylose Isomerase from *Streptomyces* sp. NCIM 2730, Enzyme and Microbial Technology, 16, 4, 323-327.
- Gong, C.-S., Chen, L.-F., Flickinger, M.C., Chiang, L.-C. ve Tsao, G.T., 1981. Production of Ethanol from *D*-Xylose by Using *D*-Xylose Isomerase and Yeasts, Applied and Environmental Microbiology, 41, 2, 430-436.
- Hafner, E.W., 1985. *Streptomyces* Mutant Works in the Absence of Xylose, Patent No: 4,551,430, Washington DC., U. S. Patent.
- Hafner, E.W. ve Jackson, D.M., 1985. Constitutive Glucose Isomerase Producer, Patent No: 4,532,208, Washington DC., U. S. Patent.

- Hajer, B.H., Dorra, Z.A., Monia, M., Samir, B. ve Nushinb, A., 2014. Probing the Role of Helix α 1 in the Acid-tolerance and Thermal Stability of the *Streptomyces* sp. SK Glucose Isomerase by Site-directed Mutagenesis, Journal of Biotechnology, 173, 1-6.
- Haney, P., Konisky, J., Koretke, K., Luthey-Schulten, Z. ve Wolynes, P., 1997. Structural Basis for Thermostability and Identification of Potential Active Site Residues for Adenylate Kinases from the Archaeal Genus *Methanococcus*, Proteins Structure Function and Genetics, 28, 1, 117-130.
- Haney, P.J., Badger, J.H., Buldak, G.L., Reich, C.I., Woese, C.R. ve Olsen, G.J., 1999. Thermal Adaptation Analyzed by Comparison of Protein Sequences from Mesophilic and Extremely Thermophilic *Methanococcus* Species, Proceedings of the National Academy of Sciences, 96, 7, 3578-3583.
- 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 (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1543, 2, 294-335.
- Hausler, H. ve Stutz, A., 2001. D-Xylose (D-Glucose) Isomerase and Related Enzymes in Carbohydrate Synthesis, Topics in Current Chemistry, 215, 77-114.
- Hebeda, R.E., 1987. Corn Sweeteners, In S. A. Watson vd. (Eds.), *Corn: Chemistry and Technology*, American Association of Cereal Chemists, USA, 501-534.
- Henrick, K., Collyer, C. ve Blow, D., 1989. Structures of D-Xylose Isomerase from *Arthrobacter* Strain B3728 Containing the Inhibitors Xylitol and D-Sorbitol at 2.5 Å and 2.3 Å Resolution, Respectively, Journal of Molecular Biology, 208, 1, 129-157.
- Henry, R., 1976. High Fructose Corn Syrup New Sweetener for the Baker.
- Herbert, R.A. ve Sharp, R., 1992. *Molecular Biology and Biotechnology of Extremophiles*, Blackie & Son Ltd., UK.
- Hess, J.M., Tchernajenko, V., Vieille, C., Zeikus, J.G. ve Kelly, R.M., 1998. Thermotoga Neapolitana Homotetrameric Xylose Isomerase is Expressed as a Catalytically Active and Thermostable Dimer in *Escherichia coli*, Applied and Environmental Microbiology, 64, 7, 2357-2360.
- Hlima, H.B., Ayadi, D., Aghajari, N. ve Bejar, S., 2013. Differential Properties of Native and Tagged or Untagged Recombinant Glucose Isomerases of *Streptomyces* sp. SK and Possible Implication of the Glycosylation, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 94, 82-87.
- Ho, N., Rosenfeld, S., Stevis, P. ve Tsao, G., 1983. Purification and Characterization of the D-Xylose Isomerase Gene from *Escherichia coli*, Enzyme and Microbial Technology, 5, 6, 417-420.
- Hobbs, L., 1986. Corn Syrups, Cereal Foods World, 31, 12, 852-858.

- Hogue-Angeletti, R., 1975. Subunit Structure and Amino Acid Composition of Xylose Isomerase from *Streptomyces albus*, Journal of Biological Chemistry, 250, 19, 7814-7818.
- Hou, J., Shen, Y., Jiao, C., Ge, R., Zhang, X. ve Bao, X., 2016. Characterization and Evolution of Xylose Isomerase Screened from the Bovine Rumen Metagenome in *Saccharomyces cerevisiae*, Journal of Bioscience and Bioengineering, 121, 2, 160-165.
- Hugenholtz, P., Pitulle, C., Hershberger, K.L. ve Pace, N.R., 1998. Novel Division Level Bacterial Diversity in a Yellowstone Hot Spring, Journal of Bacteriology, 180, 2, 366-376.
- Iizuka, H., Ayukawa, Y., Suekane, M. ve Kanno, M., 1971. Production of Extracellular Glucose Isomerase by *Streptomyces*, Patent No: 3,622,463, Washington DC., U. S. Patent.
- Inglett, G.E., 1974. Symposium: Sweeteners, Westport, Connecticut, AVI Pub. Co.
- Inyang, C., Gebhart, U., Obi, S. ve Bisswanger, H., 1995. Isolation and Characterization of a D-Glucose/Xylose Isomerase from a New Thermophilic Strain *Streptomyces* sp.(PLC), Applied Microbiology and Biotechnology, 43, 4, 632-638.
- Jänis, J., Pasanen, S., Rouvinen, J. ve Vainiotalo, P., 2008. Characterization of the pH-dependent Dissociation of a Multimeric Metalloprotein *Streptomyces rubiginosus* Xylose Isomerase by ESI FT-LCR Mass Spectrometry, Journal of Mass Spectrometry, 43, 10, 1376-1380.
- Jenkins, J., Janin, J., Rey, F., Chiadmi, M., Van Tilbeurgh, H., Lasters, I., De Maeyer, M., Ven Belle, D. ve Wodak, S.J., 1992. Protein Engineering of Xylose (Glucose) Isomerase from *Actinoplanes missouriensis*. 1. Crystallography and Site-directed Mutagenesis of Metal Binding Sites, Biochemistry, 31, 24, 5449-5458.
- Johnson, J., Harris, C. ve Barbeau, W., 1989. Effects of High-Fructose Corn Syrup Replacement For Sucrose on Browning, Starch Gelatinization and Sensory Characteristics of Cakes, Cereal Chemistry (USA), 66, 3, 155-157.
- Joo, G.-J., Shin, J.-H., Heo, G.-Y., Kim, Y.-M. ve Rhee, I.-K., 2005. Molecular Cloning and Expression of a Thermostable Xylose (Glucose) Isomerase Gene, *xylA*, from *Streptomyces chibaensis* J-59, The Journal of Microbiology, 43, 1, 34-37.
- Kaneko, T., Saito, K., Kawamura, Y. ve Takahashi, S., 2001. Molecular Cloning of Acid-stable Glucose Isomerase Gene from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 by a Simple Two-Step PCR Method, and its Expression in *Escherichia coli*, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 65, 5, 1054-1062.
- Karaoglu, H., Yanmis, D., Sal, F.A., Celik, A., Canakci, S. ve Belduz, A.O., 2013. Biochemical Characterization of a Novel Glucose Isomerase from *Anoxybacillus gonensis* G2^T that Displays a High Level of Activity and Thermal Stability, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 97, 215-224.

- Karaoğlu, H., 2010. *Anoxybacillus gonensis* Glukoz İzomerazının Genetik Manipulasyonlarla Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin Geliştirilmesi, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Kasumi, T., Hayashi, K. ve Tsumura, N., 1982. Roles of Magnesium and Cobalt in the Reaction of Glucose Isomerase from *Streptomyces griseofuscus* S-41, Agricultural and Biological Chemistry, 46, 1, 21-30.
- Kawai, Y., Konishi, H., Horitsu, H., Sakurai, H., Takamizawa, K., Suzuki, T. ve Kawai, K., 1994. Purification and Characterization of D-Xylose Isomerase from *Bifidobacterium adolescentis*, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 58, 4, 691-694.
- Kirk, O., Borchert, T.V. ve Fuglsang, C.C., 2002. Industrial Enzyme Applications, Current Opinion in Biotechnology, 13, 4, 345-351.
- Knorr, D., 1987. Modern Process Technology of HFCS, *Food Biotechnology: Biotechnological Processes in Food Production*, Dept. of Food Science, University of Delaware, USA, 1, 36, 225-248.
- Kolcuoğlu, Y., Colak, A., Faiz, O. ve Belduz, A.O., 2010. Cloning, Expression and Characterization of Highly Thermo- and pH- Stable Maltogenic Amylase from a Thermophilic Bacterium *Geobacillus caldoxylosilyticus* TK4, Process Biochemistry, 45, 6, 821-828.
- Konak, L., Kolcuoğlu, Y., Ozbek, E., Colak, A. ve Ergenoglu, B., 2014. Purification and Characterization of an Extremely Stable Glucose Isomerase from *Geobacillus thermodenitrificans* TH2, Applied Biochemistry and Microbiology, 50, 1, 25-29.
- Kovalevsky, A.Y., Hanson, L., Fisher, S.Z., Mustyakimov, M., Mason, S.A., Forsyth, V.T., Blakeley, M.P., Keen, D.A., Wagner, T. ve Carrell, H., 2010. Metal Ion Roles and the Movement of Hydrogen During Reaction Catalyzed by D-Xylose Isomerase: A Joint X-ray and Neutron Diffraction Study, Structure, 18, 6, 688-699.
- Kulp, K., Lorenz, K. ve Stone, M., 1991. Functionality of Carbohydrate Ingredients in Bakery Products, Food Technology, 45, 3, 136-142.
- 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 and Biotechnology, 27, 4, 234-240.
- Lambeir, A.M., Lauwereys, M., Stanssens, P., Mrabet, N.T., Snauwaert, J., Van Tilbeurgh, H., Matthyssens, G., Lasters, I. ve De Maeyer, M., 1992. Protein engineering of xylose (glucose) isomerase from *Actinoplanes missouriensis*. 2. Site-directed mutagenesis of the xylose binding site, Biochemistry, 31, 24, 5459-5466.

- Lee, C., Bagdasarian, M., Meng, M.H. ve Zeikus, J., 1990a. Catalytic Mechanism of Xylose (Glucose) Isomerase from *Clostridium thermosulfurogenes*. Characterization of the Structural Gene and Function of Active Site Histidine, Journal of Biological Chemistry, 265, 31, 19082-19090.
- Lee, C., Bhatnagar, L., Saha, B., Lee, Y., Takagi, M., Imanaka, T., Bagdasarian, M. ve Zeikus, J., 1990b. Cloning and Expression of the *Clostridium thermosulfurogenes* Glucose Isomerase Gene in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, Applied and Environmental Microbiology, 56, 9, 2638-2643.
- Lee, C.K., 1976. Preparation and Use of Glucose Isomerase, Patent No: 4, 61, 539, Washington DC., U. S. Patent.
- Lee, D.G., Choi, D.J. ve Park, J.K., 2015. Ketoisomeric Conversion of Glucose Derived from Microalgal Biomasses, Process Biochemistry, 50, 6, 941-947.
- Lee, Y.-E., Ramesh, M.V. ve Zeikus, J.G., 1993. Cloning, Sequencing and Biochemical Characterization of Xylose Isomerase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* Strain B6A-RI, Journal of General Microbiology, 139, 6, 1227-1234.
- Lehmacher, A. ve Bisswanger, H., 1990. Isolation and Characterization of an Extremely Thermostable D-Xylose Isomerase from *Thermus aquaticus* HB 8, Journal of General Microbiology, 136, 4, 679-686.
- Liu, S.-Y., Wiegel, J. ve Gherardini, F.C., 1996. Purification and Cloning of a Thermostable Xylose (Glucose) Isomerase with an Acidic pH Optimum from *Thermoanaerobacterium* Strain JW/SI-YS 489, Journal of Bacteriology, 178, 20, 5938-5945.
- López-García, P., 1999. DNA Supercoiling and Temperature Adaptation: A Clue to Early Diversification of Life?, Journal of Molecular Evolution, 49, 4, 439-452.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. ve Randall, R.J., 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, The Journal of Biological Chemistry, 193, 1, 265-275.
- Lönn, A., Gardonyi, M., van Zyl, W., Hahn-Hägerdal, B. ve Otero, R.C., 2002. Cold Adaptation of Xylose Isomerase from *Thermus thermophilus* Through Random PCR Mutagenesis, European Journal of Biochemistry, 269, 1, 157-163.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. ve Sambrook, J., 1982. Molecular cloning: a laboratory manual, (Vol. 545), Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, NY.
- Manohar, R.S. ve Rao, P.H., 1997. Effect of Sugars on The Rheological Characteristics of Biscuit Dough and Quality of Biscuits, Journal of the Science of Food and Agriculture, 75, 3, 383-390.
- Marguet, E. ve Forterre, P., 1994. DNA Stability at Temperatures Typical for Hyperthermophiles, Nucleic Acids Research, 22, 9, 1681-1686.

- Marshall, R.O. ve Kooi, E.R., 1957. Enzymatic Conversion of *D*-Glucose to *D*-Fructose, Science, 125, 3249, 648-649.
- Meaden, P.G., Aduse-Opoku, J., Reizer, J., Reizer, A., Lanceman, Y.A., Martin, M.F. ve Mitchell, W.J., 1994. The Xylose Isomerase-Encoding Gene (*xyIA*) of *Clostridium thermosaccharolyticum*: Cloning, Sequencing and Phylogeny of XylA Enzymes Gene, 141, 1, 97-101.
- Meilleur, F., Snell, E.H., Van der Woerd, M.J., Judge, R.A. ve Myles, D.A., 2006. A Quasi-Laue Neutron Crystallographic Study of *D*-Xylose Isomerase, European Biophysics Journal, 35, 7, 601-609.
- Meng, M., Bagdasarian, M. ve Zeikus, J.G., 1993. Thermal Stabilization of Xylose Isomerase from *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*, Nature Biotechnology, 11, 10, 1157-1161.
- 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 Sciences, 88, 9, 4015-4019.
- Miles Laboratories Inc., 1972. Production of Glucose Isomerase, Patent No: 1, 376, 787, 123, U. K. Patent.
- Moes, C.J., Pretorius, I.S. ve van Zyl, W.H., 1996. Cloning and Expression of The *Clostridium thermosulfurogenes D*-Xylose Isomerase Gene (*xyIA*) in *Saccharomyces cerevisiae*, Biotechnology Letters, 18, 3, 269-274.
- Mu, W., Wang, X., Xue, Q., Jiang, B., Zhang, T. ve Miao, M., 2012. Characterization of a Thermostable Glucose Isomerase with an Acidic pH Optimum from *Acidothermus cellulolyticus*, Food Research International, 47, 2, 364-367.
- Nabors, L.O.B. ve Gelardi, R.C., 1991. Alternative sweeteners, 2 ed., Marcel Dekker Inc, 110, 136.
- Natake, M. ve Yoshimura, S., 1964. Studies on Glucose Isomerase of Bacteria: Part II. The Glucose Isomerizing Activity of *Escherichia Intermedia*, Strain HN-500 Part III. The Mode of Action of Glucose Isomerase from *Escherichia Intermedia*, Strain HN-500, Agricultural and Biological Chemistry, 28, 8, 505-516.
- Outtrup, H., 1974. New Glucose Isomerase by Fermentation, Patent No: 2, 400, 323, German Patent Application.
- Owusu, R.K. ve Cowan, D.A., 1989. Correlation Between Microbial Protein Thermostability and Resistance to Denaturation in Aqueous: Organic Solvent Two-phase Systems, Enzyme and Microbial Technology, 11, 9, 568-574.
- Patel, D.H., Cho, E.J., Kim, H.M., Choi, I.S. ve Bae, H.-J., 2012. Engineering of The Catalytic Site of Xylose Isomerase to Enhance Bioconversion of a Non-preferential Substrate, Protein Engineering, Design and Selection, 25, 7, 331-336.

- Pomeranz, Y., 1985. Functional Properties of Food Components, Academic Press, Orlando, FL (USA).
- Quax, W.J., Mrabet, N.T., Luiten, R.G., Schuurhuizen, P.W., Stanssens, P. ve Lasters, I., 1991. Enhancing the Thermostability of Glucose Isomerase by Protein Engineering, Nature Biotechnology, 9, 8, 738-742.
- Rangarajan, M. ve Hartley, B.S., 1992. Mechanism of *D*-Fructose Isomerization by *Arthrobacter D*-Xylose Isomerase, Biochemical Journal, 283, 223-233.
- Reeder, C., 1978. Light Foods Appease Weight-conscious Americans, Food Product Development, 12, 3, 35-36, 40.
- Rhimi, M., Messaoud, E.B., Borgi, M.A. ve Bejar, S., 2007. Co-expression of *L*-Arabinose Isomerase and *D*-Glucose Isomerase in *E. coli* and Development of an Efficient Process Producing Simultaneously *D*-Tagatose and *D*-Fructose, Enzyme and Microbial Technology, 40, 6, 1531-1537.
- Rose, I.A., O'Connell, E.L. ve Mortlock, R.P., 1969. Stereochemical Evidence for a cis-Enediol Intermediate in Mn-Dependent Aldose Isomerases, Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology, 178, 2, 376-379.
- Rozanov, A., Zagrebely, S. ve Beklemishev, A., 2009. Cloning of *Escherichia coli* K12 Xylose Isomerase (Glucose Isomerase) Gene and Studying the Enzymatic Properties of its Expression Product, Applied Biochemistry and Microbiology, 45, 1, 31-37.
- Russell, R.J.M., Ferguson, J.M., Hough, D.W., Danson, M.J. ve Taylor, G.L., 1997. The Crystal Structure of Citrate Synthase from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* at 1.9 Å Resolution, Biochemistry, 36, 33, 9983-9994.
- Russell, R.J.M., Gerike, U., Danson, M.J., Hough, D.W. ve Taylor, G.L., 1998. Structural Adaptations of the Cold-active Citrate Synthase from an Antarctic Bacterium, Structure, 6, 3, 351-361.
- Saari, G., Kumar, A., Kawasaki, G., Insley, M. ve O'hara, P., 1987. Sequence of the *Ampullariella* sp. Strain 3876 Gene Coding for Xylose Isomerase, Journal of Bacteriology, 169, 2, 612-618.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. ve Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning, Vol. 2, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanchez, S. ve Smiley, K.L., 1975. Properties of *D*-Xylose Isomerase from *Streptomyces albus*, Applied Microbiology, 29, 6, 745-750.
- Sapunova, L., Lobanok, A., Parakhnia, E. ve Kazakevich, I., 2002. Xylose (Glucose) Isomerase Reactivity of Immobilized *Arthrobacter* sp., Mikrobiologiya, 72, 3, 395-399.

- Sarıyar, B., Özkan, P., Kırdar, B. ve Hortaçsu, A., 2004. Expression and Translocation of Glucose Isomerase as a Fusion Protein in *E. coli*, Enzyme and Microbial Technology, 35, 2, 105-112.
- Scallet, B., Shieh, K., Ehrental, I. ve Slapshak, L., 1974. Studies in the Isomerization of D-Glucose, Starch-Stärke, 26, 12, 405-408.
- Schallmeyer, M., Singh, A. ve Ward, O.P., 2004. Developments in the Use of *Bacillus* Species for Industrial Production, Canadian Journal of Microbiology, 50, 1, 1-17.
- Schneider, H., Wang, P. ve Johnson, B., 1981. Current Developments in Yeast Research, Pergamon Press, Toronto, 81-85.
- Schray, K.J. ve Mildvan, A.S., 1972. Kinetic and Magnetic Resonance Studies of the Mechanism of D-Xylose Isomerase I. Binary and Ternary Complexes with Manganese (II), Substrates and Inhibitors, Journal of Biological Chemistry, 247, 7, 2034-2037.
- Shieh, K.K., 1977. Media Containing Molasses and Soy Flour for Producing Glucose Isomerase and Method, Patent No: 4,003,793, Washington DC., U. S. Patent.
- Singhania, R.R., Patel, A.K. ve Pandey, A., 2010. The Industrial Production of Enzymes, In W. Soetaert vd. (Eds.), *Industrial Biotechnology: Sustainable Growth and Economic Success*, John Wiley & Sons, 207-215.
- Smith, C.A., Rangarajan, M. ve Hartley, B.S., 1991. D-Xylose (D-Glucose) Isomerase from *Arthrobacter* Strain NRRL B3728. Purification and Properties, Biochemical Journal, 277, 255-261.
- Sriprapundh, D., Vieille, C. ve Zeikus, J.G., 2000. Molecular Determinants of Xylose Isomerase Thermal Stability and Activity: Analysis of Thermostables by Site-directed Mutagenesis, Protein Engineering, 13, 4, 259-265.
- Sriprapundh, D., Vieille, C. ve Zeikus, J.G., 2003. Directed Evolution of *Thermotoga neapolitana* Xylose Isomerase: High Activity on Glucose at Low Temperature and Low pH, Protein Engineering, 16, 9, 683-690.
- Stetter, K.O., 1996. Hyperthermophilic Prokaryotes, FEMS Microbiology Reviews, 18, 2, 149-158.
- Suekane, M., Tamura, M. ve Tomimura, C., 1978. Physico-chemical and Enzymatic Properties of Purified Glucose Isomerases from *Streptomyces olivochromogenes* and *Bacillus stearothermophilus*, Agricultural and Biological Chemistry, 42, 5, 909-917.
- Sukumar, M., Jeyaseelan, A., Sivasankaran, T., Mohanraj, P., Mani, P., Sudhakar, G., Arumugam, V., Bakthavachalu, S., Ganeshan, A. ve Susee, M., 2013. Production and Partial Characterization of Extracellular Glucose Isomerase Using Thermophilic *Bacillus* sp. Isolated from Agricultural Land, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2, 1, 45-49.

- Takami, H., Inoue, A., Fuji, F. ve Horikoshi, K., 1997. Microbial Flora in the Deepest Sea Mud of the Mariana Trench, FEMS Microbiology Letters, 152, 2, 279-285.
- Takasaki, Y., 1973. Patent No: 73, 49-951, Japan, J. Patent.
- 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, Kogyo Gijutsu-in Hakko Kenkyusho Kenkyu, 23, 41-47.
- Takasaki, Y. ve Tanabe, O., 1964. Nad-linked *D*-Glucose-isomerizing and *D*-Mannose-isomerizing Enzyme from *Paracolobacterum aerogenoides*, Agricultural and Biological Chemistry, 28, 10, 740-741.
- Takasaki, Y. ve Tanabe, O., 1966. Studies on Isomerization of Sugars by Bacteria: Part IX Nad-linked *D*-Glucose-isomerizing and *D*-Mannose-isomerizing Enzyme from *Paracolobacterum aerogenoides*, Agricultural and Biological Chemistry, 30, 3, 220-225.
- Tan, H., He, S., Zhuang, Z., Xue, Y. ve Zhang, Q., 1989. Cloning and Expression of *E. coli* Glucose Isomerase Gene in *Streptomyces lividans*, Yi Chuan Xue Bao=Acta Genetica Sinica, 17, 5, 390-397.
- Telefoncu, A., 1986. Temel ve Uygulamalı Enzimoloji, Ege Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi yayını (Der), 59.
- Thompson, M.J. ve Eisenberg, D., 1999. Transproteomic Evidence of a Loop-deletion Mechanism for Enhancing Protein Thermostability, Journal of Molecular Biology, 290, 2, 595-604.
- Tsai, C. ve Nussinov, R., 1997a. Hydrophobic Folding Units Derived from Dissimilar Monomer Structures and Their Interactions, Protein Science, 6, 1, 24-42.
- Tsai, C. ve Nussinov, R., 1997b. Hydrophobic Folding Units at Protein-protein Interfaces: Implications to Protein Folding and to Protein-protein Association, Protein Science: a Publication of the Protein Society, 6, 7, 1426.
- Tsumura, N. ve Sato, T., 1965. Enzymatic Conversion of *D*-Glucose to *D*-Fructose: Part VI. Properties of the Enzyme from *Streptomyces phaeochromogenus*, Agricultural and Biological Chemistry, 29, 12, 1129-1134.
- URL-1, www.expasy.ch/tools/dna.html, 01 Ocak 2016.
- URL-2, www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/, 01 Ocak 2016.
- URL-3, www.expasy.org/tools/pi_tool.html, 01 Ocak 2016.

- Van Bastelaere, P., Kersters-Hilderson, H. ve Lambeir, A., 1995. Wild-type and Mutant D-Xylose Isomerase from *Actinoplanes missouriensis*: Metal-ion Dissociation Constants, Kinetic Parameters of Deuterated and Non-deuterated Substrates and Solvent-isotope Effects, Biochemical Journal, 307, 1, 135-142.
- Van Tilbeurgh, H., Jenkins, J., Chiadmi, M., Janin, J., Wodak, S.J., Mrabet, N.T. ve Lambeir, A.m., 1992. Protein Engineering of Xylose (Glucose) Isomerase from *Actinoplanes missouriensis*. 3. Changing Metal Specificity and the pH Profile by Site-directed Mutagenesis, Biochemistry, 31, 24, 5467-5471.
- Vangryselperre, W., Callens, M., Kersters-Hilderson, H. ve De Bruyne, C.K., 1988. Evidence for an Essential Histidine Residue in D-Xylose Isomerases, Biochemical Journal, 250, 153-160.
- Vieille, C., Burdette, D.S. ve Zeikus, J.G., 1996. Thermozyms, Biotechnology Annual Review, 2, 1-83.
- Vieille, C., Hess, J.M., Kelly, R.M. ve Zeikus, J.G., 1995. *xylA* Cloning and Sequencing and Biochemical Characterization of Xylose Isomerase from *Thermotoga neapolitana*, Applied and Environmental Microbiology, 61, 5, 1867-1875.
- Vieille, C. ve Zeikus, G.J., 2001. Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses and Molecular Mechanisms for Thermostability, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 65, 1, 1-43.
- Walfridsson, M., Bao, X., Anderlund, M., Lilius, G., Bülow, L. ve Hahn-Hägerdal, B., 1996. Ethanolic Fermentation of Xylose with *Saccharomyces Cerevisiae* Harboring the *Thermus Thermophilus xylA* Gene, Which Expresses an Active Xylose (Glucose) Isomerase, Applied and Environmental Microbiology, 62, 12, 4648-4651.
- Wang, P.Y., Johnson, B. ve Schneider, H., 1980a. Fermentation of D-Xylose by Yeasts Using Glucose Isomerase in the Medium to Convert D-Xylose to D-Xylulose, Biotechnology Letters, 2, 6, 273-278.
- Wang, P.Y., Shopsis, C. ve Schneider, H., 1980b. Fermentation of a Pentose by Yeasts, Biochemical and Biophysical Research Communications, 94, 1, 248-254.
- Watanabe, K., Oshima, T. ve Nishimura, S., 1976. Cd Spectra of 5-methyl-2-thiouridine in Trnafmet from an Extreme Thermophile, Nucleic Acids Research, 3, 7, 1703-1714.
- Weber, P., 1976. Fructose by Isomerisation of Glucose, Patent No: 1, 496, 309, U. K. Patent.
- Whitlow, M., Howard, A.J., Finzel, B.C., Poulos, T.L., Winborne, E. ve Gilliland, G.L., 1991. A Metal-mediated Hydride Shift Mechanism for Xylose Isomerase Based on the 1.6 Å *Streptomyces rubiginosus* Structure with Xylitol and D-Xylose, Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 9, 3, 153-173.

- Wilhelm, M. ve Hollenberg, C.P., 1985. Nucleotide Sequence of the *Bacillus subtilis* Xylose Isomerase Gene: Extensive Homology Between the *Bacillus* and *Escherichia coli* Enzyme, Nucleic Acids Research, 13, 15, 5717.
- Wingard, L.B., Katchalski-Katzir, E. ve Goldstein, L., 2012. Enzyme Technology: Applied Biochemistry and Bioengineering, Vol. 2, Academic Press, New York, 116-120.
- Wulff, S.M. ve Helgeson, D.L., 1987. Preliminary Economic Feasibility Analysis of High Fructose Corn Syrup Processing in the United States with Emphasis on North Dakota, North Dakota State University, Department of Agribusiness and Applied Economics, USA.
- Xu, W., Yan, M., Xu, L., Ding, L. ve Ouyang, P., 2009. Engineering the Activity of Thermophilic Xylose Isomerase by Site-directed Mutation at Subunit Interfaces, Enzyme and Microbial Technology, 44, 2, 77-83.
- Yaman, S., 2014. A Comparative Study for the Production of Recombinant Intracellular Glucose Isomerase by *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*, Yüksek Lisans Tezi, O.D.T.Ü., Biyoteknoloji Bölümü, Ankara.
- Yamanaka, K., 1975. D-Xylose Isomerase from *Lactobacillus brevis*, Methods in Enzymology, 41, 466.
- Yildirim, M., Colak, A., Col, M. ve Canakci, S., 2009. A New Recombinant Phosphotriesterase Homology Protein from *Geobacillus caldoxylosilyticus* TK4: An Extremely Thermo- and pH- Stable Esterase, Process Biochemistry, 44, 12, 1366-1373.
- Zhu, G., Teng, M., Wu, C., Hang, J., Wang, C., Xu, C. ve Wang, Y., 1997. Mutation of G138P Enhanced the Thermostability of D-Glucose Isomerase, Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 30, 6, 607-610.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında İstanbul'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Tekirdağ'ın Çorlu ilçesinde tamamladı. 2003-2008 yılları arasında KTÜ, Fatih Eğitim Fakültesi, Kimya Öğretmenliği Bölümü'nde lisans öğrenimi gördü. 2011 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimini tamamladı ve aynı yıl doktora başladı. 2012 yılında Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden mezun oldu. 2012 yılından bu yana KTÜ Prof. Dr. Saadettin GÜNER Yakıt Uygulama ve Araştırma Merkez'inde Uzman olarak çalışmaktadır. Yabancı dili İngilizce'dir.

