

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**TERMOFİLİK *Geobacillus caldoxyloticus* TK4 SUŞUNDAN GLUKOZ
İZOMERAZ GENİNİN KLONLANMASI, EKSPRESYONU VE
KARAKTERİZASYONU**

DOKTORA TEZİ

Özlem FAİZ

**KASIM 2008
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**TERMOFİLİK *Geobacillus caldoxyloliticus* TK4 SUŞUNDAN GLUKOZ
İZOMERAZ GENİNİN KLONLANMASI, EKSPRESYONU VE
KARAKTERİZASYONU**

Kimyager Özlem FAİZ

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"Doktora (Kimya)"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 11.11.2008
Tezin Savunma Tarihi : 28.11.2008**

**Tez Danışmanı : Doç. Dr. Ahmet ÇOLAK
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Murat KÜÇÜK
Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI
Jüri Üyesi : Prof.Dr. Azmi TELEFONCU
Jüri Üyesi : Prof.Dr. Nagihan Sağlam ERTUNGA**

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Salih TERZİOĞLU

Trabzon 2008

ÖNSÖZ

Geobacillus caldxylolyticus TK4 (*G. caldxylolyticus* TK4) suşundan glukoz izomeraz enzimini kodlayan genin klonlanması, ekspresyonu, saflaştırılması ve karakterizasyonu amacıyla gerçekleştirilen bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında yapıldı, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında “Doktora Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Doktora başlama heyecanımı ilk onunla tattığım, çalışmalarım ve akademik hayatım boyunca desteğini, hoşgörüsünü ve bilgisini esirgemeyen danışman hocam, sayın Doç. Dr. Ahmet ÇOLAK’a minnet ve şükranlarımı sunarım.

Bilimsel birikimlerini benden esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ ve sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI’ya, biyoloji bölümündeki arkadaşım doktora öğrencisi Hakan KARAOĞLU’na teşekkürlerimi sunuyorum.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA’ya, Arş. Gör. Melek ÇOL’a, Arş. Gör. Melike YILDIRIM’a, Öğr. Gör. Yakup KOLCUOĞLU’na çok teşekkür ediyorum.

Gerek çalışmalarım esnasında gerek özel yaşantımda, desteklerini her zaman hissettiren anneme, babama ve kız kardeşlerime teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tez çalışması, aynı zamanda, TÜBİTAK tarafından desteklenen 106T696 no’lu proje çalışmalarının da bir kısmını oluşturmaktadır. Bu nedenle doktora çalışmalarımı destekleyen TÜBİTAK’a da sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Özlem FAİZ

Trabzon 2008

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET.....	VII
SUMMARY.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER DİZİNİ.....	XII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Enzim Kaynağı Olarak Mikroorganizmaların Tercih Edilmesi.....	5
1.3. Termozimler.....	5
1.4. Endüstriyel Enzimlerin Üretim Kaynakları.....	10
1.5. Glukoz İzomeraz.....	10
1.5.1. GI'nın Sınıflandırılması.....	11
1.5.2. GI'nın Yapısı.....	11
1.5.3. GI'nın Katalitik Mekanizması.....	13
1.5.4. GI'nın Metal İyonu Gereksinimi.....	13
1.5.5. Optimum Sıcaklık ve pH.....	14
1.5.6. GI'nın Substrat Spesifikliği.....	15
1.5.7. Çeşitli Glukoz İzomerazların Baz Sırası ve Amino Asit Benzerliği.....	15
1.5.8. GI Üreten Organizmalar.....	16
1.5.9. Kimyasal İzomerizasyona Karşı Enzimatik İzomerizasyon.....	18
1.5.10. Tatlandırıcı Olarak Yüksek İçerikli Fruktöz Şurubunun (HFCS) Avantajları.....	18
1.5.11. Etanol Üretimi.....	20
1.6. <i>Geobacillus caldoxylolyticus</i> TK4 Suşunun Bazı Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri.....	21
1.7. Çalışmanın Amacı ve Pratik Önemi.....	21
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	24
2.1. Kullanılan Materyaller.....	24

2.1.1.	Cihazlar	24
2.1.2.	Enzimler	25
2.1.3.	Kimyasal Madde ve Malzemeler	25
2.1.4.	Primerler	26
2.1.5.	Kullanılan Suşlar	26
2.1.6.	Plazmidler	26
2.1.7.	Lãria-Bertani Sıvı ve Katı Besiyerlerinin Hazırlanması	30
2.1.8.	Çözeltiler	31
2.1.8.1.	Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler	31
2.1.8.2.	Agaroz Jel Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler	31
2.1.8.3.	Protein Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler	32
2.1.8.4.	Tampon Çözeltiler	33
2.1.8.5.	Enzim Aktivitesi Tayininde Kullanılan Çözeltiler	33
2.1.8.6.	Diğer Çözeltiler	34
2.2.	Genomik DNA Kütüphanesinin Oluşturulması	35
2.2.1.	<i>G. caldxylolyticus</i> TK4 Suşunun Büyütülmesi	37
2.2.2.	Genomik DNA İzolasyonu	37
2.2.3.	Plazmid DNA İzolasyonu	38
2.2.4.	DNA Konsantrasyonunun Ölçülmesi	39
2.2.5.	Genomik DNA ve pUC18 Plazmid DNA'sının <i>EcoR</i> I ile Kesimi	39
2.2.6.	DNA Agaroz Jel Elektrofrezisi	40
2.2.7.	DNA'nın Etanol ile Çöktürülmesi	40
2.2.8.	Genomik DNA Parçalarının pUC18 Vektörüne Ligasyonu	41
2.2.9.	Kompotent Hücre Hazırlanması	41
2.2.10.	Transformasyon	42
2.2.11.	Rekombinant Plazmidlerin Seçimi, İzolasyonu ve DNA Sıra Analizi	43
2.2.12.	DNA Sıralarının İncelenmesi	43
2.3.	GI Geninin Eksik Kalan Baş Kısmının İvers PCR ile Bulunması	43
2.3.1.	İvers PCR İçin Primer Tasarlanması	43
2.3.2.	Genomik DNA'nın Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi	44
2.3.3.	DNA Parçalarının Ligasyonu	44
2.3.4.	İvers PCR	44
2.3.5.	PCR Ürünlerinin Saflaştırılması	45

2.3.6.	PCR Ürünlerinin pGEM-T Easy Vektörüne Ligasyonu.....	47
2.3.7.	<i>E. coli</i> JM101'e Transformasyon, Rekombinant Plazmidlerin Seçimi İzolasyonu ve DNA Sıra Analizi	47
2.4.	GI Geninin pET-28a(+) Vektörüne Klonlanması ve Genin Ekspresyonu	47
2.4.1.	GI Geninin Tamamını Çoğaltmak ve Ekspresyon Vektörüne Klonlamak İçin Primer Tasarlanması	47
2.4.2.	GI Geninin Tamamının PCR İle Çoğaltılması	48
2.4.3.	PCR Ürünü ve pET-28a(+) Vektörünün <i>Nhe</i> I ve <i>Hind</i> III İle Kesilmesi.....	48
2.4.4.	Kesik PCR Ürününün Kesik pET-28a(+) Vektörüne Ligasyonu	49
2.4.5.	Rekombinant pET-28a(+) Vektörünün <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS Hücrelerine Transformasyonu	50
2.4.6.	GI'nın <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS'de Ekspresyonu	50
2.5.	<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS'de Ekspres Edilen GI'nın Saflaştırılması	50
2.5.1.	SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE).....	51
2.5.2.	Protein Tayini	52
2.6.	Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	53
2.6.1.	GI Enzim Aktivitesinin Tayini ve Karakterizasyonu	53
2.6.1.1	GI Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi.....	53
2.6.1.2.	GI Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	54
2.6.1.3.	GI Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi	54
2.6.1.4.	GI Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi.....	54
2.6.1.5.	GI'nın Isıl Kararlılığının İncelenmesi	54
2.6.1.6.	GI'nın pH Kararlılığının İncelenmesi	55
2.6.1.7.	GI Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi.....	55
3.	BULGULAR	56
3.1.	Genomik DNA Kütüphanesinin Oluşturulması	56
3.2.	Glukoz İzomeraz (GI) Geninin Eksik Kalan Son Kısımının İvers PCR ile Bulunması.....	56
3.3.	GI Geninin pET-28a(+) Vektörüne Klonlanması, Ekspresyonu ve Saflaştırılması	58
3.4.	GI'nın Biyokimyasal Karakterizasyonu	64
3.4.1.	Protein Tayini	64
3.4.2.	SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE).....	64
3.4.3.	Glukoz Substratı ile Aktivite Tayini	65
3.4.4.	GI Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi.....	65

3.4.5.	GI Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	66
3.4.6.	GI Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi	67
3.4.7.	GI Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi	68
3.4.8.	GI'nın Isıl Kararlılığının İncelenmesi	70
3.4.9.	GI'nın pH Kararlılığının İncelenmesi	70
3.4.10.	GI Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi	71
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	73
5.	ÖNERİLER	79
6.	KAYNAKLAR.....	81

ÖZGEÇMİŞ

ÖZET

TUBİTAK 106T696 nolu proje tarafından desteklenen bu çalışmada, *Geobacillus caldoxylolyticus* TK4 (*G. caldoxylolyticus* TK4) suşundan D-glukoz/D-ksiloz izomeraz (GI) geni klonlandı, protein histidin kuyruğu (6xhis tag) ile *Escherichia coli*'de ekspres edildi ve enzimin bazı biyokimyasal özellikleri incelendi. Genomik DNA kütüphanesi oluşturularak ve invers polimeraz zincir reaksiyonu ile GI geninin 1326 bp'lik tam DNA sırası elde edildi. Bu sıra amino asit sırasına (441 amino asit) çevrildikten sonra BLAST programı kullanılarak diğer organizmalardaki GI'larla karşılaştırılması sonucu yapıldı. Bunun sonucunda, çalışılan enzimin *Geobacillus stearothermophilus* GI'sı amino asit sırasına % 97 oranında benzerlik gösterdiği belirlendi. Gen, pET28a(+) vektörüne klonlandı ve protein, *E.coli* BL21(DE3)pLysS suşunda N- ucunda bir histidin kuyruğu ile ekspres edildi. Ekspres edilen protein nikel kolonu ile tek basamakta saflaştırıldı. SDS-PAGE, enzimin ya tek bir alt birim ya da aynı molekül ağırlığına sahip birden fazla alt birim içerdiğini ortaya koydu. Histidin kuyruğu içeren proteinin alt birim ağırlığı 52,64 kDa, histidin kuyruğu içermeyen proteinin alt birim ağırlığı 50,18 kDa olarak hesaplandı. Rekombinant proteinin bazı biyokimyasal özellikleri spektrofotometrik olarak belirlendi. Optimum GI aktivitesi, pH'ın ve sıcaklığın bir fonksiyonu olarak, glukoz substratı kullanılarak belirlendi. Enzimin optimum pH'sı 6,5 olarak bulundu ve enzimin optimum sıcaklığı, 80 ° C olarak belirlendi. pH 4,0-9,0 aralığında, 4 ° C'de 15 gün bekletildikten sonra, rekombinant GI'nın, oldukça kararlı olduğu gözlemlendi. Isıl kararlılık eğrisi incelendiğinde, enzim, aynı süre 60 ° C ve 70 ° C'de bekletildiğinde, aktivitesini % 80'nin üzerinde korudu. Glukoz varlığında, rekombinant GI'nın K_m ve V_{maks} değerleri, Lineweaver-Burk eğrisi yardımıyla, sırasıyla, 20,58 mM ve 0,67 U/mg protein olarak belirlendi. 5 mM'lık son konsantrasyonda, Co^{2+} , Mg^{2+} ve Mn^{2+} varlığında enzim aktivitesi kayda değer ölçüde arttı.

Bütün bu veriler, *G. caldoxylolyticus* TK4'ten klonlanan GI'nın diğer GI'lara benzer özelliklere sahip olduğunu desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: *Geobacillus caldoxylolyticus*, Glukoz İzomeraz, Termofilik, His-Tag, Karakterizasyon

SUMMARY

Cloning, Expression and Characterization of Glucose Isomerase Gene From Thermophilic *Geobacillus caldoxylolyticus* TK4 Strain

In this study, supported by TUBITAK (Project number is 106T696), D-glucose/D-xylose isomerase (GI) gene of *Geobacillus caldoxylolyticus* TK4 (*G. caldoxylolyticus* TK4) strain, was cloned, sequenced and expressed with 6x histidine Tag in *Escherichia coli* and some biochemical properties of the recombinant enzyme were investigated. The whole DNA sequence of GI gene consisting of 1326 bp was determined by constructing genomic DNA library and performing inverse PCR. Sequence alignments were done by using BLAST programme. The results indicated the amino acid sequence of GI gene was similar to *Geobacillus stearothermophilus* GI in the ratio of 97%. The gene was cloned into pET28a(+) vector and expressed with his-tag in *E.coli* BL21(DE3)pLysS strain. The enzyme was purified in one step with nickel column. SDS-PAGE showed that the enzyme was composed of either one subunit or more than one subunit that have the same molecular weight. The calculated subunit molecular weight of the protein and his-tagged protein were 50.18 and 52.64 kDa, respectively. Some biochemical properties of the recombinant protein were determined spectrophotometrically. The GI activity as a function of pH and temperature was determined using glucose as substrate. The optimum pH and temperature of the enzyme were found to be 6.5 and 80 °C, respectively. At the pH range of 4.0-9.0, after 15 days incubation, the enzyme activity was stimulated. When thermostability data were examined, it was seen that the enzyme nearly retained of its original activity after 3 hours incubation at 60 °C and 70 °C. In the presence of glucose as substrate the K_m and V_{maks} values of the recombinant enzyme were determined by Lineweaver-Burk curve as 20.58 mM and 0.67 U/mg protein, respectively. It was seen that the activity was highly stimulated in the presence of 5 mM Co^{2+} , Mg^{2+} and Mn^{2+} .

All these data support that GI cloned from *Geobacillus caldoxylolyticus* TK4 has similar properties to other GIs.

Key Words: *Geobacillus caldoxylolyticus*, Glucose Isomerase, Thermophilic, His-Tag, Characterization

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. D-glukozun D-fruktoza, D- ksilozun da D- ksiluloza GI aracılığıyla dönüşümlü izomerizasyonu	3
Şekil 2. GI'nın alt birim yapısı	12
Şekil 3. Sınıf I ve Sınıf II GI'ların yapıları.....	12
Şekil 4. Hidrür kayması mekanizması	14
Şekil 5. pUC18 vektörünün çoklu klonlama bölgesini (MCS), replikasyon orijinini, lacZ genini ve ampisilin direnç genini içeren harita	27
Şekil 6. pGEM-T Easy vektörünün haritası.....	28
Şekil 7. pGEM-T Easy vektörünün promotörü ve çoklu klonlama bölgesi	28
Şekil 8. pET-28a(+) vektörünün haritası	29
Şekil 9. pET-28a(+) vektörünün lac operatörünü, ribozom bağlanma bölgesini(rbs), His Tag ve T7 Tag bölgelerini gösteren sırası.....	30
Şekil 10. <i>G. caldoxylolyticus</i> TK4 genomik DNA'sının <i>EcoR</i> I ile esilerek genomik DNA kütüphanesinin oluşturulmasının şematik gösterimi	36
Şekil 11. GI geninin son kısmını yakalamak için gerçekleştirilen invers PCR'ın şematik gösterimi.....	46
Şekil 12. GI geninin tamamını çoğaltmak için tasarlanan ileri ve geri primerlerin nükleotid sıraları	48
Şekil 13. <i>G. caldoxylolyticus</i> TK4 genomik DNA'sının GI genini içeren parçası	57
Şekil 14. İvers PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü.	58
Şekil 15. GI geninin pET-28a(+) vektörüne klonlandığı bölgenin şematik gösterimi	58
Şekil 16. PCR ile tamamı çoğaltılan GI geninin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü.	59
Şekil 17. <i>G. caldoxylolyticus</i> TK4 GI'sının DNA ve protein sırası.	60
Şekil 18. <i>G. caldoxylolyticus</i> TK4 GI'sının amino asit <i>G. stearothermophilus</i> , <i>G. thermodenitrifican</i> , <i>G. kaustophilus</i> , <i>B. halodurans</i> , <i>B. coagulans</i> GI'larının amino asit sıraları ile karşılaştırılması	61
Şekil 19. SDS-PAGE elektroforezi.....	65
Şekil 20. GI aktivitesi üzerine pH'nın etkisi	66
Şekil 21. GI aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi	67
Şekil 22. GI aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisi	68
Şekil 23. Glukoz varlığında GI'nın substrat doyumluk eğrisi	69

Şekil 24. Glukoz varlığında GI'nın Lineweaver-Burk eğrisi	69
Şekil 25. GI'nın ısı kararlılık eğrisi	70
Şekil 26. GI'nın pH kararlılık eğrisi	71

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Bazı önemli termofilik ve hipertermofilik enzimlerin kaynakları ve endüstriyel uygulama alanları.....	7
Tablo 2. GI üreten bazı mikroorganizmalar.....	17
Tablo 3. Ticari öneme sahip GI'ları üreten bazı mikroorganizmalar ve ürünlerinin ticari adları.....	18
Tablo 4. Kullanılan cihazlar.....	24
Tablo 5. Kullanılan enzimler.....	25
Tablo 6. Kullanılan kimyasal madde ve malzemeler.....	25
Tablo 7. Polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) kullanılan primerler.....	26
Tablo 8. Klonlama ve ekspresyonda kullanılan <i>E. coli</i> suşları.....	26
Tablo 9. Klonlama ve ekspresyonda kullanılan plazmidler.....	26
Tablo 10. Protein tayininde kullanılan çözeltiler ve içerikleri / hazırlanışları.....	31
Tablo 11. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler ve içerikleri / hazırlanışları.....	31
Tablo 12. SDS-PAGE'de kullanılan çözeltiler ve içerikleri / hazırlanışları.....	32
Tablo 13. Kullanılan tampon çözeltiler ve içerikleri / hazırlanışları.....	33
Tablo 14. Enzim aktivitesi tayininde kullanılan çözeltiler ve içerikleri / hazırlanışları.....	33
Tablo 15. Çalışmada kullanılan çözeltiler ve içerikleri / hazırlanışları.....	34
Tablo 16. İnvers PCR bileşenleri.....	45
Tablo 17. İnvers PCR için reaksiyon şartları.....	45
Tablo 18. PCR'in bileşenleri.....	49
Tablo 19. PCR reaksiyon şartları.....	49
Tablo 20. SDS-PAGE'in bileşenleri.....	52
Tablo 21. GI aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi.....	72

SEMBOLLER DİZİNİ

amp	: Ampisilin
APS	: Amonyum persülfat
bp	: Baz çifti
BSA	: Bovin serum albumin
dd H ₂ O	: Çift destile su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deosinükleozit trifosfat
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
FDA	: Amerikan gıda ve ilaç kurumu
gDNA	: Genomik DNA
GI	: Glukoz izomeraz
IPTG	: İzopropiltiyo- β -galaktozid
Kb	: Kilo baz
kDa	: Kilodalton
K_m	: Michaelis-Menten sabiti
LB	: Lauria-Bertani
LBA	: Lauria-Bertani agar
MOPS	: 3-(N-morfolino)propansülfonic acid
OD	: Optik yoğunluk
rpm	: Dakikadaki dönüş sayısı
RNA	: Ribonükleik asit
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TAE	: Tris-asetik asit-etilendiamintetraasetik asit
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
Tm	: Erime sıcaklığı
Tris	: Tris(hidroksimetil)aminometan
U	: Ünite
U/mg protein	: Ünite/miligram protein
V_{maks}	: Maksimum hız
X-gal	: 5-bromo-4-kloro-3-indol- β -galaktozid
μ g	: Mikrogram
μ L	: Mikrolitre

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Enzimler, hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen, protein yapısındaki moleküllerdir. Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler, çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere günlük ve ekonomik hayata girmiştir (Wiseman, 1987).

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). Son yıllarda stratejik alan şeklinde değerlendirilen rekombinant DNA teknolojisinden yararlanılarak enzim üretimi büyük boyutlara ulaşmış ve kullanımı giderek yaygınlaşmıştır (Gessesse, 1998).

Bugün başlı başına bir endüstri konusu olan enzimlerin, insanlar tarafından ilk kullanımı antik dönemlere kadar dayanmaktadır. O dönemlerde enzimler peynir, mayalı ekmek, bira, şarap, sirke gibi gıdaların üretimi ile deri, çivit ve keten işlemede kullanılıyordu (Kirk vd., 2002).

Sıcaklık, endüstride vazgeçilmez bir unsurdur. Biyokatalizör olarak enzimlerin en bilinen dezavantajı yüksek sıcaklıklarda bozunmaları ve dolayısıyla aktivitelerini kaybetmeleridir. Ancak bazı mikroorganizmaların yüksek sıcaklıklarda büyüebilmesi; bu sistemlerde mevcut enzim bileşenlerinin bu sıcaklıklarda bile yapılarını korumaları ve dolayısıyla aktivite gösterebilmelerinden kaynaklanır. Termofilik bakteriler bu türden, sıcaklığa dayanıklı enzimleri içeren organizmalardır ve endüstrilerde kullanılacak potansiyel enzim kaynaklarını oluştururlar (Faiz, 2005). Bu enzimlerin termofilik mikroorganizmalardan elde edilmesi ve özelliklerinin araştırılması kuşkusuz bu enzimlerin kullanım alanlarını daha da genişletecektir.

Genetik çalışmalar, endüstriyel enzim sektörünü önemli ölçüde etkilemeye devam etmektedir. 1980'lerde ana enzim şirketleri, seçilmiş enzimleri rekombinant yollarla üretmek için araştırma programları oluşturmuşlardır. İlk rekombinant ürün 1980'lerin ikinci yarısında elde edilmiş olup, bugün ise endüstriyel enzimlerin çoğu rekombinant DNA

teknolojisi ile üretilmektedir. Endüstriyel enzimlerin rekombinant yollarla üretilmesinin, rekombinant olmayan yollarla üretilmesine göre birçok avantajı vardır. Bu avantajlar şu şekilde sıralanabilir;

- Birçok proteinin, doğal üretimi tehlikeli ve patojenik türlerden sağlanmaktadır. Bu tür organizmalardan, son ürününe, insan sağlığını etkileyecek toksik kontaminantlar karışabilir. Toksik ya da patojenik olmayan organizmalarda rekombinant üretim bu olumsuz etkiyi ortadan kaldırır.
- Daha yüksek ekspresyon seviyeleri elde edilir
- Ürün genelde daha yüksek bağıl saflık gösterir
- Ekonomik olarak çekicidir
- Enzim, özelliklerinin protein mühendisliği ile değiştirilmesine olanak sağlar (Walsh, 2002).

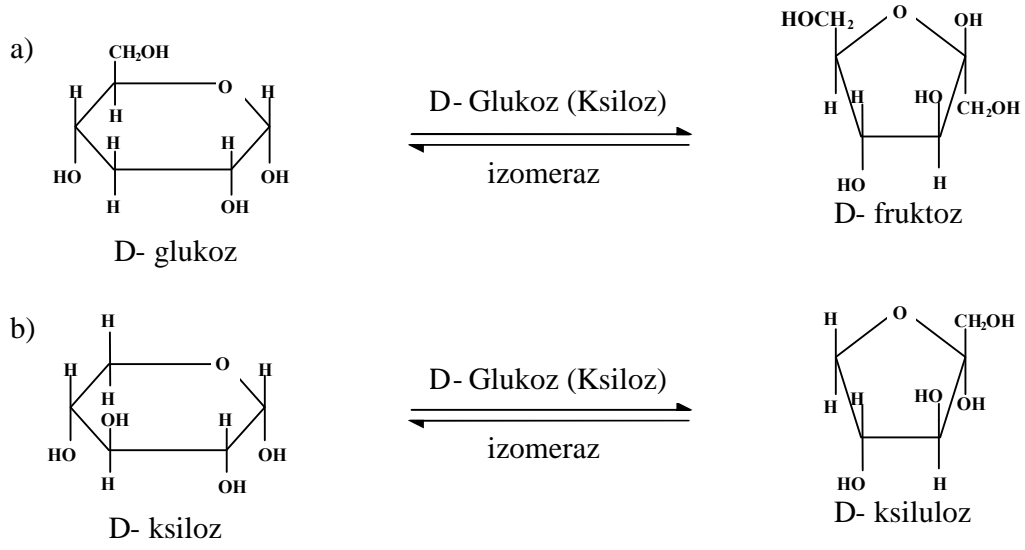
Hedef genin güçlü bir promotor altına yerleştirilmesi rekombinant ürünün yüksek seviyede ekspresyonu ile sonuçlanır. Genelde toplam hücre proteininin % 20-30'u civarındaki ekspresyon seviyesine ulaşılmaktadır, ancak toplam hücre proteininin % 50'sine ulaşan bir ekspresyon seviyesi de birkaç defa gözlenmiştir. Hedef enzimin yüksek seviyede rekombinant üretiminin önemli ekonomik ve teknik avantajları vardır;

- Fermantasyon hacimleri küçültülebilir. Bu durum işlem maliyetini düşürür. Fermantasyon ya da işlem hacminin küçülmesi atık ve yan ürün miktarını düşürür. Bu da hem maliyeti hem de bu istenmeyen ürünlerin çevreye verdiği zararı azaltır.
- Yüksek seviyede ekspresyon hedef proteinin ilk aşamada daha saf bir şekilde elde edilmesine olanak sağlar (Walsh, 2002).

Değişik endüstriyel alanlarda yaygın kullanım bulan enzimlerden bazıları şunlardır: proteolitik enzimler, amilolitik enzimler, glukoz izomeraz (GI), pektolitik enzimler, selülazlar, galaktozidazlardır.

GI olarak bilinen D-glukoz\ ksiloz izomeraz (EC 5.3.1.5), amilaz ve proteaz ile birlikte dünyanın en yüksek tonajlı üç enziminden birisidir (Bhosale vd., 1996).

GI; D-glukozun D-fruktoza, D-ksilozun da D-ksiluloza dönüşümlü izomerizasyonunu katalizler (Şekil 1). Ksilozun ksiluloza dönüşümü çürümüş bitki materyalleri üzerinde yayılım gösteren saprofilik bakterilerin beslenme ihtiyaçlarını karşılamak için kullandıkları bir yoldur. Ayrıca bu reaksiyon hemiselülozun etanole dönüşmesine de yardımcı olur.



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

Glukozun fruktoza izomerizasyonunun ticari önemi yüksek fruktoz içerikli mısır şurubu (=High Fructose Corn Syrup: HFCS) üretiminin sağlanmasından kaynaklanmaktadır. 1976 yılına kadar yiyeceklerde tatlandırıcı ana madde olarak şeker kamışı (% 60) ve şeker pancarından (% 30) elde edilen sukroz kullanılmaktaydı. Glukozun fruktoza izomerizasyonunun keşfi ile günümüz tatlandırıcılarının (fruktoz şuruplarının) ortaya çıkması sağlanmıştır. GI kullanarak HFCS üretimi, ilk olarak Japonya'da gerçekleştirilmiştir. 1958'deki Küba Devrimi'nden sonra Amerika'da ortaya çıkan sukroz kaynağı sıkıntısını gidermek için çare olarak HFCS üretimine başvurulmuştur. O yıllardan günümüze kadar GI, en önemli endüstriyel enzimlerden biri olma özelliğini sürdürmektedir (Bhosale vd., 1996).

1957 yılında Marshall ve Kooi tarafından *Pseudomonas hydrophila*'dan izole edilen enzimin glukoz izomerizasyon kapasitesinin keşfi, şeker kamışından tatlandırıcı üretiminin yerini HFCS üretiminin almasının başlangıç noktası olmuştur (Marshall ve Kooi, 1957). FDA (2000)'e göre, fruktoz şurupları; % 42 veya % 55 fruktoz içeren tatlı, besleyici sakkarit karışımı olup, mısır nişastası glukozunun glukoz izomeraz enzimi kullanılarak fruktoza dönüştürülmesi ile elde edilen bir üründür. Ayrıca % 90 fruktoz içeren üçüncü bir tip de bulunmakta olup, dünyada sınırlı kullanıma sahiptir (Bucke vd., 1983). Fruktoz şurupları, tatlı (Dahl vd., 1994), düşük viskozite ve daha az kristallenme gibi özellikleri sebebiyle kullanıcıya depolama ve taşıma işlemleri sırasında avantaj sağlayan (Briggs vd., 1984) çok fonksiyonlu ürünlerdir. Enzimin ilgisinin, ksiloza glukozdan 160 kat daha fazla

olmasına rağmen, sahip olduğu kapasite, enzimin ticari olarak önemli olmasına yetmiştir. Enzim üretimi için büyüme ortamında ksiloza ihtiyaç duyulmuştur, arsenatın varlığı ise enzim üretimini arttırmıştır.

Enzimatik olarak glukozun izomerizasyonu, ilk kez endüstriyel olarak 1957 yılında Amerika'da Clinton Corn Processing Co. tarafından başarılmıştır. 1974 yılına gelindiğinde immobilize edilmiş GI, artık ticari olarak elde edilebilir hale getirilmiştir. Gıda endüstrisinde HFCS' ye olan talep her geçen gün artmış ve 1980'e kadar batı dünyasında şekerlerle uğraşan tüm büyük şirketler GI teknolojisine başvurmaya başlamıştır. 80'li yılların sonlarına doğru enzim, yiyecek endüstrisinde en büyük marketlerde yerini almıştır (Amore vd., 1989). Sahip olduğu endüstriyel önemden dolayı bugüne kadar bir çok organizmanın GI enzimi incelenmiş (Batt vd., 1985; Callens vd., 1988) ve bir çok bakterinin *xylA* (ksiloz izomeraz) geni Gen Bank'taki yerini almıştır (Armbruster vd., 1973; Bengston vd., 1973; Albery ve Knowles, 1976; Barker, 1976; Barker vd., 1983; Beck ve Warren, 1988; Carrell vd., 1984; Carrell vd., 1989; Gaikwad vd., 1992; Deraadt vd., 1994).

HFCS üretiminde mezofilik organizmalardan elde edilen GI, 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 (Dupreez vd., 1985; Amore vd., 1989). 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.

Enzimin katalizlediği diğer bir reaksiyon olan ksilozun ksiluloza izomerizasyonu da endüstride kullanılabilecek bir özelliktir. Bakteriler, mayalar ve mantarlar tarafından fermente edilebilen lignoselülotik biyokütlenin temel bileşeni D-ksiloz'dur (Walfridsson vd., 1996). Bakteriler, ksilozu kullanabilmek için ilk aşamada onu ksiluloza izomerize

ederler. Bu basamağı 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.

Mevcut GI'lar üzerinde mutasyonlar meydana getirilerek, enzimin özelliklerinin geliştirilmesi için araştırmalar yapılmıştır. Bölgeye özgün mutasyonlarla çeşitli mikroorganizmalara ait birçok GI için, ısı 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.

1.2. Enzim Kaynağı Olarak Mikroorganizmaların Tercih Edilmesi

Birçok rekombinant olmayan protein, mikrobiyal kaynaklardan elde edilmektedir. Bunlar genelde toksik ya da patojen olmayan, antibiyotik üretmeyen organizmalardır. Mikroorganizmalar, kısa zamanda fazla miktarda enzim üretimi sağladıkları için ilgi görmektedirler. Ayrıca mikroorganizmalar bitki ve hayvanlara göre daha kolay genetik manipülasyonlara tabii tutulabilirler. Endüstriyel öneme sahip birçok enzim mikroorganizmalar tarafından hücre dışına salınmaktadır. Böylece enzim eldesi için hücrenin parçalanmasına gerek kalmamaktadır (Walsh, 2002).

1.3. Termodizimler

Dünya üzerinde yaşayan canlıları, bakteriler (öbakteriler), arkebakteriler ve ökaryotlar (Woese vd., 1990) olmak üzere üç sınıf altında toplamak mümkündür. Bakteriler, havada, toprakta, suda yaşayabilen çomak, filament veya disk şeklinde olan mikroorganizmalardır. Bakteriler, yaşayabildikleri sıcaklık aralıklarına göre sakrofiller,

mezofiller, termofiller ve hipertermofiller olmak üzere dört ana gruba ayrılır. Sakrofiller -10 °C'ye kadar olan sıcaklıklarda yaşayabilirler ancak bunların en iyi büyüebildiği sıcaklık 15 °C civarındadır. Mezofiller normal ortam sıcaklığında (20-45 °C) büyüebilir ve insanlar için patojen olan mikroorganizmalar bu gruba girerler. Termofiller ise 45-80 °C arasındaki sıcaklıklarda büyüebilirler (Brock, 1985). Termofilik bakterilerin çoğunu *Bacillus* (Ash vd., 1991; Rainey vd., 1994) ve *Thermus* gibi iki esas cins oluşturmaktadır. Hipertermofiller ise 80 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda büyüebilirler.

Termofilik bakterilerin çeşitliliği çok az olmakla birlikte çeşitliliğin artırılması gerekmektedir. Genel olarak, bilinen termofilik bakteriler, mezofil ortamlara kolay bir şekilde adapte olabilmektedirler. Bu nedenle, dünya üzerinde yaşayan tüm bakterilerin atalarının termofilik bakteriler olduğu öne sürülmektedir (Madigan vd., 2000). Termofilik bakteriler tabii olarak kaplıcalarda, tropik topraklarda, gübre yığınlarında, gübreyi oluşturan dışkılarda, çöplerde ve bazı belli başlı yerlerde bulunurlar.

Termofilik mikroorganizmaların, ekstrem şartlarda örneğin yüksek sıcaklıklarda yaşamaları için kazandıkları olağan dışı kabiliyetler, bu organizmaların yapısal ve fonksiyonel adaptasyonlarına dayanır. Termofillerin hücre duvarının yapı taşı olan doymuş yağ asitleri, hücre için hidrofobik bir çevre sağlayarak yüksek sıcaklığa karşı bakteriye dirençlilik kazandırmaktadır (Herbert ve Sharp, 1992). Hipertermofillerin hücre duvarında ise eterle bağlanmış lipidler bulunmaktadır. Bu yapı, yüksek sıcaklığa karşı yağ asitlerine oranla daha fazla dirençlilik sağlamaktadır (De Rosa vd., 1994).

Termofiller tarafından üretilen enzimler termozimler olarak bilinirler (termoenzimler) (Li vd., 2005). Termozimler biyoteknolojide kullanım açısından oldukça avantajlıdır. Çünkü; ısı şoku ile saflaştırılmaları daha kolaydır, çözücü ve guanidinyum hidroklorür gibi denatüre edici ajanlara karşı daha dayanıklıdır, mikrobiyal kontaminasyonlara daha az duyarlıdır ve reaksiyon hızları mezofil organizmalardan elde edilen enzimlere (mezozimler) göre daha yüksektir.

Ekstrem çevrelerde yaşayan mikroorganizmalar, diğer mikroorganizmaların büyüemediği veya çok az büyüebildiği şartlarda büyüme kapasitesine sahip olduğundan, çevre etkenleri ile mikrobiyal hayat arasındaki ilişkilerin araştırılmasında önemli bir potansiyele sahiptir (Dülger, 2003). Termofilik organizmaları da içine alan ekstremofilik organizmalar yüksek sıcaklık, aşırı pH, yüksek tuz konsantrasyonu ve yüksek basınçlı ortamlarda yaşamaya uyum sağlamıştır. Termofilik ve hipertermofilik organizmalardan

elde edilen enzimlerden bazıları, elde edildikleri organizmalar ve endüstriyel kullanım alanları Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Bazı önemli termofilik ve hipertermofilik enzimlerin kaynakları ve endüstriyel uygulama alanları (Andrade vd., 1999; Vieille ve Zeikus, 2001; Gomes ve Stainer, 2004).

Enzim	Opt. Sıcaklık (°C)	Kaynağı	Uygulamaları Alanları
α -amilaz	70	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Nişastanın hidrolizi
	95-105	<i>Bacillus licheniformis</i>	Nişastanın hidrolizi
	70-80	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Nişastanın hidrolizi
	100	<i>Pyrococcus furiosus</i>	Nişastanın hidrolizi
	100	<i>Pyrococcus woesei</i>	Nişastanın hidrolizi
	97	<i>Pyrodictium abyssii</i>	Nişastanın hidrolizi
	120	<i>Methanococcus jannaschii</i>	Nişastanın hidrolizi
β -amilaz	75	<i>Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes</i>	Maltoz üretimi
	95	<i>Thermotoga maritima</i>	Maltoz üretimi
Glukoamilaz	70	<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>	Glukoz üretimi
Pullulanaz	98	<i>Pyrococcus furiosus</i>	Glukoz üretimi
	100	<i>Pyrococcus woesei</i>	Glukoz üretimi
	75-85	<i>Bacillus flavocaldarius</i>	Glukoz üretimi
	90	<i>Thermotoga maritima</i>	Glukoz üretimi
Glukoz izomeraz	80	<i>Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes</i>	Fruktoz üretimi
	100-110	<i>Thermotoga maritima</i>	Fruktoz üretimi
Endoglukanaz	100	<i>Pyrococcus furiosus</i>	Glukanın hidrolizi
Ksilanaz	100	<i>Thermotoga sp.</i>	Ksilanın hidrolizi
			Meyve suyu sanayi Kağıt sanayi
Sellobiyohidrolaz	105	<i>Thermotoga sp.</i>	Selülozun hidrolizi
	105	<i>Thermotoga maritima</i>	Selülozun hidrolizi
Kitinaz	80	<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	Kitin hidrolizi
β -galaktozidaz	80	<i>Thermotoga maritima</i>	Laktosuz süt üretimi
β -glukozidaz	102-105	<i>Pyrococcus furiosus</i>	Glukokonjugat sentezi
β -ksilozidaz	75	<i>Thermoanaerobacterium saccharolyticum</i>	Ksiloz üretimi
Fitaz	70	<i>Bacillus sp.</i>	Fitatın hidrolizi
Keratinaz	80	<i>Fervidobacterium pennavorans</i>	Tüyün hidrolizi
Proteaz S	85-95	<i>Pyrococcus furiosus</i>	Protein hidrolizi
Serin Proteaz	90	<i>Thermus sp.</i>	Nükleik asit saflaştırma
Esteraz	100	<i>Pyrococcus furiosus</i>	Ester sentezi
Taq polimeraz	70	<i>Thermus aquaticus</i>	PCR teknolojisi

Mezofilik organizmalara ait proteinlerin üç boyutlu yapıları yüksek sıcaklıkta önemli derecede bozunur. 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 kullanımıdır. Das ve Gerstein (2000) yaptıkları bir çalışmada, termofilik organizmaların hem genomik hem de α -sarmal yapılarında mezofilik organizmalardan çok daha fazla yüklü alt birimlere sahip olduklarını tespit etmişlerdir. Ayrıca Haney vd. (1999) yaptıkları çalışmada 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 içerdiği, alt birimlerde çokça hidrofobik ve yüklü amino asitlere (özellikle Glutamat, Arginin ve Lisin) ve daha az sayıda da polar amino asitlere sahip olduğunu tespit ettiler. Bu araştırmacılar proteinlerin ısıya karşı dirençli hale gelebilmesi için hidrofobik etkileşimler yanında hidrojen, disülfür ve iyonik bağlardaki küçük değişmelerin meydana gelmesinin yeterli olduğunu önerdiler (Haney vd., 1999). Yapılan bir çalışmada (Matsumura vd., 1984), kanamisin nükleotidiltransferaz genindeki tek bir nükleotidin değişmesinin, üretilen proteinde tek bir aminoasidin değişmesine ve böylece bakterinin ısıya karşı olan dirençliliğinin 10 °C kadar artmasına sebep olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Enzim fonksiyonları organizmanın büyüme sıcaklığı tarafından düzenlenir. Mezozimler 20-40 °C arasında en iyi şekilde çalışır ve yüksek sıcaklıklarda denatüre olurlar. Buna karşın termozimler de organizmanın büyüyebildiği sıcaklıkta en etkin şekilde çalışır ve denatürasyon bu sıcaklık derecesinin çok üzerinde meydana gelir. Termofilik enzimler mezofilik organizmaların yaşadığı sıcaklıklarda sıcaklıklarda çok yavaş çalışır ve bu sıcaklıklarda ve donma durumunda çok kararlı bir şekilde bulunabilirler. (Koffler, 1957; Amelunxen ve Lins, 1968).

Yüksek sıcaklıklarda gerçekleşen reaksiyonların ilgi çekici olmasının temelinde, aşağıda belirtilen sebepler bulunmaktadır.

- Reaksiyon hızının artması
- Ortam viskozitesinin düşmesi
- Substrat çözünürlüğünün artması

- Kontaminasyon ihtimalinin düşmesi (Brock vd., 1986).

Ayrıca, termofil ve hipertermofil enzimler sıcaklığa tabii tutularak daha kolay saflaştırılabilmeleri gibi sebepler bulunmaktadır (Stetter, 1996).

Isıl kararlılıktan başka, termofillerden elde edilen enzimlerin organik çözücü içinde denatürasyona karşı dayanıklılıkları onların sudaki ısıl kararlılıkları ile ilişkilidir (Owusu ve Cowan, 1989). Bu nedenle ısıl kararlı enzimler sadece sulu ortamda değil, organik ortamda da kullanmak için çekicidirler.

Enzimlerin endüstriyel kullanımlarını sınırlayan iki özellik; yüksek sıcaklıklarda denatüre olmaları ve reaksiyonu katalizleyebilmeleri için bir çözücüye olan ihtiyaçlarıdır. Bu yüzden, protein mühendisliği, enzimlerin ve rekombinant proteinlerin biyoteknolojide geniş bir alanda kullanımlarının sağlanması açısından oldukça önemlidir (Hao ve Berry, 2004). Termal denatürasyon genellikle iki şekilde izah edilebilir. Birincisi; düşük sıcaklıklarda proteinin katlanmış formu ile katlanmamış formu arasındaki dengenin katlanmamış form yönüne kayması. İkincisi; yüksek sıcaklıklarda tersinir olmayan çökelmelerin ve kovalent modifikasyonların olmasıdır. Termofilik organizmalar, proteinlerin aktif konformasyonlarını yüksek sıcaklıklarda sürdürerek bu problemin üstesinden gelirler. Yine de, enzimlerin termal kararlılık mekanizmalarının tam olarak anlaşılması zordur. Çünkü, bu mekanizmalar oldukça karışık ve fazladır (Arnold, 2001).

Termofilik ve mezofilik proteinlerin amino asit sıralarının ve yapılarının karşılaştırılması sonucu termofilik proteinlerin, termal denatürasyondan sakınmak için mezofilik homologlarından farklı olarak bazı ilave yapısal özelliklere sahip oldukları belirlenmiştir (Vieille ve Zeikus, 2001). Yapılan çalışmalar, termofilik enzimlerin, bazı amino asitleri tercih etmede, öncelik gösterdiğini belirlemiştir (Cambillau ve Claverie, 2000). Bu enzimler genellikle mezofilik benzerlerinden daha kısa yüzey loplarna sahiptir (Wintrode vd., 2001) ve disülfür bağları, tuz köprüleri ve metal koordinasyonu genel olarak termal kararlılığı sağlamak için kullanılır (Vieille ve Zeikus, 2001). Ayrıca proteinin içindeki hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağları termal kararlılık için önemli etkileşimlerdir (Sauve ve Sygusch, 2001).

Kararlı ikincil yapı elementlerinin, çalışılan proteinin içine dahil edilmesi (Villegas vd., 1996) veya termofilik enzim üretmek için doğal termofilik enzimlerin yapısının taklit edilmesi ve termal kararlılığın artırılması üzerine yapılan çalışmalardan bazıları başarılı sonuçlar vermiştir. Örneğin, siklodekstrin glikoziltransferazın termal kararlılığı tuz köprülerinin katılımı ile artmakta iken (Leemhuis vd., 2004) trioz fosfat izomerazın termal

kararlılığı amino asit içeriğinin değiştirilmesi ile artmaktadır (Ahern vd., 1987). Bu başarılarla rağmen, protein mühendisliğinin, çalışılan enzimin tam ve kesin yapısal bilgilerinin eksikliğinden doğan bazı problemleri vardır. Homolog proteinlerin çoklu sıra karşılaştırmalarından elde edilen korunmuş bir sıranın, doğal proteinlerden daha fazla termal kararlılık gösterdiği belirlenmiş ve “korunmuş içerik” olarak adlandırılan bu sıra yeni termal kararlı proteinlerin üretilmesi için kullanılmıştır (Lehmann ve Wyss, 2001).

1.4. Endüstriyel Enzimlerin Üretim Kaynakları

Tanımlanmış ve karakterize edilmiş birkaç bin enzimden yaklaşık 30 tanesi 1980 yılında ticari olarak üretilmekte ve kullanılmakta iken, günümüzde bu rakam ikiye katlanmıştır ve her geçen yıl sayıları daha da artmaktadır. Bu enzimler mikroorganizmalar, bitkiler ve hayvanlar tarafından üretilmektedir. Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir bu enzimlerin yaklaşık % 90'ı bu organizmalardan sağlanmaktadır (Godfrey ve West, 1996). Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleridir (Wiseman, 1987). Enzim üretiminde mikroorganizmaların bu kadar yüksek bir paya sahip olması, üretimi artırmak için modifiye edilmiş mikroorganizmaların kullanımını zorunlu hale getirmiştir. Bu amaçla genetik mühendisliği teknikleri ile rekombinant suşlar geliştirilmiş ve enzim üretiminde kullanılmaya başlanmıştır. Enzim üretiminde *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus oryzae* gibi mikroorganizmalar en yaygın kullanılan enzim kaynaklarıdır (Glazer ve Nikaido, 1995).

1.5. Glukoz İzomeraz

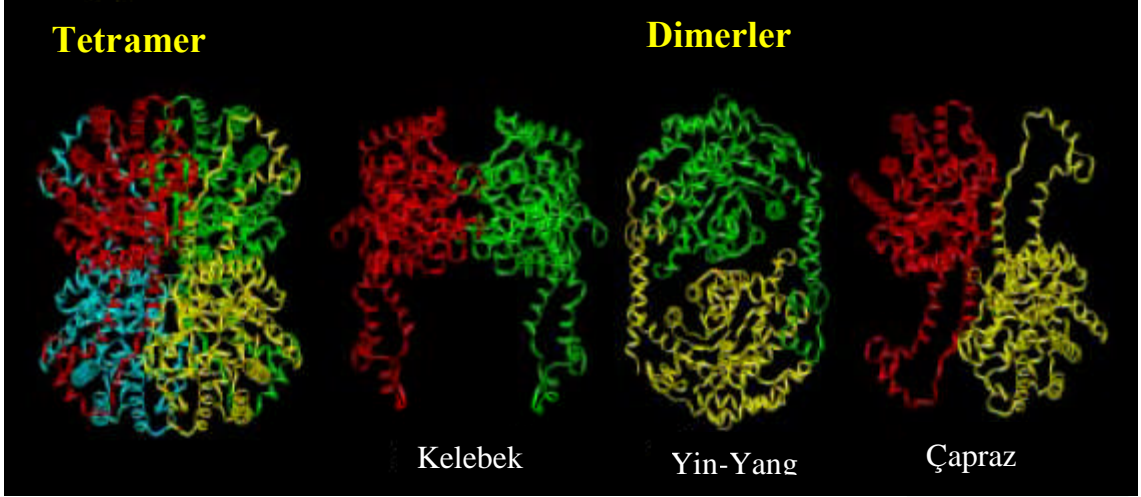
Glukoz izomeraz (GI) olarak da bilinen D-glukoz\ ksiloz izomeraz (EC 5.3.1.5), *in vivo* ortamda ksilozun, daha sonra fosforillenerek pentoz fosfat yoluna transfer edilen ksiluloza dönüşümünü katalizler. Bu enzim çoğunlukla bakterilerden izole edilmiştir. Bunun yanında bitkilerden ve mantarlardan izole edilmiş olanlara da rastlamak mümkündür (Banerjee vd, 1994; Kristo vd., 1996; Harhangi vd., 2003).

1.5.1. GI'nın Sınıflandırılması

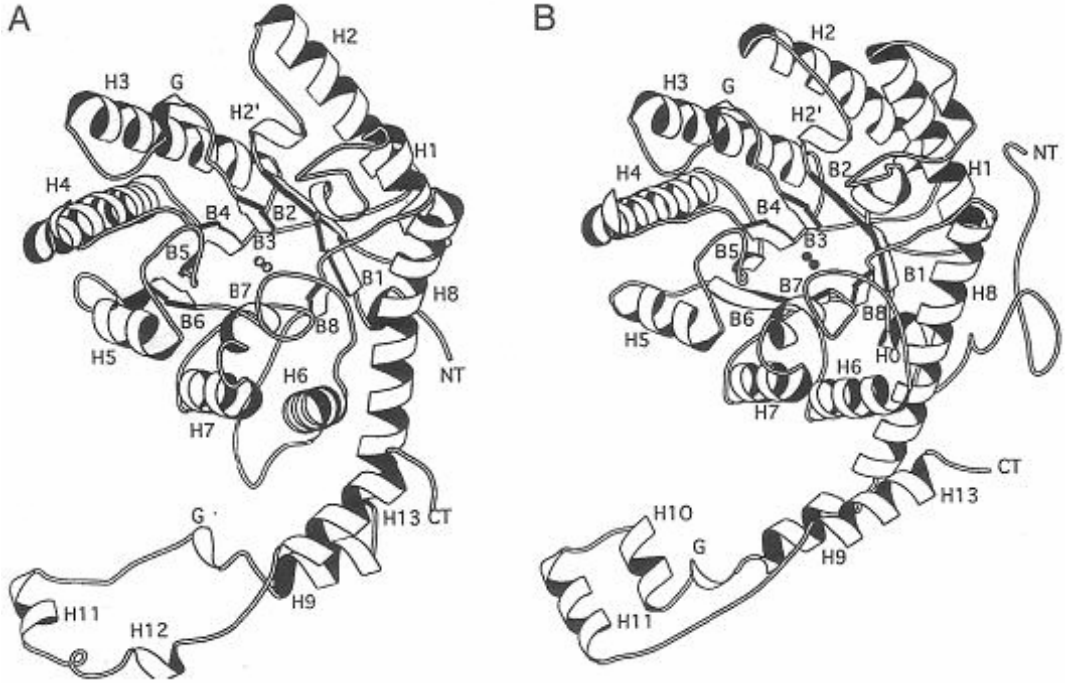
GI'ları, büyüklüklerine, amino asit sırası benzerliklerine, metal iyonu tercihlerine göre Sınıf I ve Sınıf II olmak üzere iki grup altında toplamak mümkündür (Vangrype vd., 1990). Sınıf I GI'lar yaklaşık 390 amino asitten oluşup, çoğunlukla alt birim bağlantı noktalarında değil de yüzeysel birimlerde birkaç sekans farklılığı ile beraber kendi aralarında yüksek homoloji gösterirler (Bhosale vd., 1996). Sınıf II GI'lar, fazladan 45-55 amino asit birimi içerirler. 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 sergilerler (Hartley vd., 2000). Birinci grupta bulunan GI'ların, bu grup enzimlere *Actinoplanes*, *Ampullariella* ve *Streptomyces* GI'ları örnek verilebilir, N-Terminal ucunda 30 ila 40 amino asitlik bir fazlalık bulunmamaktadır ve bu enzimler birbirlerine amino asit dizilimi bakımından oldukça benzerdirler. *B.subtilis* ve *E.coli* enzimlerini de kapsayan ikinci grup GI'lar böyle bir amino asit eklentisine sahipler ve bu gruba dahil enzimlerin amino asit dizimleri birbirlerine az benzerler. *Clostridium thermosulfurogenes*, *Lactobacillus pentosus* ve *B. Subtilis* GI'ları baz yaklaşık olarak 440 amino asitten meydana gelirler. *S. violaceoniger*, *S. griseofuscus*, *A. missouriensis* ve *Ampullariella* spp. GI'ları birbirlerine amino asit ve baz dizilimi bakımından benzerdir ve yaklaşık 390 amino asitten meydana gelmişlerdir (Bhosale vd., 1996).

1.5.2. GI'nın Yapısı

Birçok GI 45-50 kDa'luk özdeş altbirimlerden oluşan tetramer ya da dimer olarak bulunur. Alt birimler birbirlerine kovalent olmayan etkileşimlerle bağlıdır ve alt birimler arasında disülfür bağları bulunmamaktadır. Bunun yanında, *Bacillus* sp. hücre dışı GI'sı gibi trimer olarak belirlenen GI'lar da mevcuttur (Bhosale vd., 1996). Her bir alt birim, katalitik bölge, metal bağlama bölgesi ve C- ucu sarmal bölgesini içeren $(\alpha/\beta)_8$ - silindir ya da TİM silindir bölgelerinden oluşmaktadır (Hartley vd., 2000). Tetramer yapı, bir A-B/B*-A* simetrisi olarak gösterilebilen iki özdeş dimerden oluşmaktadır (Şekil 2). Üç teorik dimer yapıları yine Şekil 2'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 2.. GI'nın alt birim yapısı. Tetramer ve kuramsal dimer yapıları. Kırmızı = Altbirim A, Yeşil = Altbirim B*, Mavi = Altbirim A*, Altbirim = Altbirim B (Vieille ve Zeikus, 2001).



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

Birçok farklı GI'nın kristal yapısı aydınlatılmıştır (Şekil 3). Kristallendirilmiş ilk GI'lar Sınıf I'e aitti ve bunlar *Streptomyces rubiginosus*, *Arthrobacter B3728*, *Streptomyces olivochromogenes*, *Actinoplanes missouriensis* ve *Streptomyces murinus*'ten elde edilen enzimlerdir. Daha sonra *Bacillus stearotherophilus*, *Thermoanaerobacterium*

thermosulfurigenes ve *Thermotoga neapolitana*'den elde edilen GI'ların yapıları aydınlatılmıştır (Bhosale vd., 1996).

1.5.3. GI'nın Katalitik Mekanizması

İlk zamanlar, GI'ların, şeker fosfat izomerazlara benzer bir şekilde endiol mekanizması ile işlev gördükleri sanılmaktaydı (Rose vd., 1969). Her iki enzimin de aynı tersiyer yapı motifine sahip olduğu ve aktif bölgede benzer reaksiyonları katalizlediği bilinmektedir (Sinnot, 1998).

Ancak sonradan iki enzimin birbirinden çok farklı olduğu belirlendi. Fosfat izomerazları, herhangi bir kofaktöre ihtiyaç duymazken, GI aktivitesi için iki metal kofaktör gerekmektedir. GI, katalitik bölgede endiol mekanizması için gerekli olan uygun bir baz içermemektedir (Collyer ve Blow, 1990). Sonradan yapılan çalışmalar, enzimin hidrür kayması mekanizması ile çalıştığını göstermektedir (Şekil 4).

1.5.4. GI'nın Metal İyonu Gereksinimi

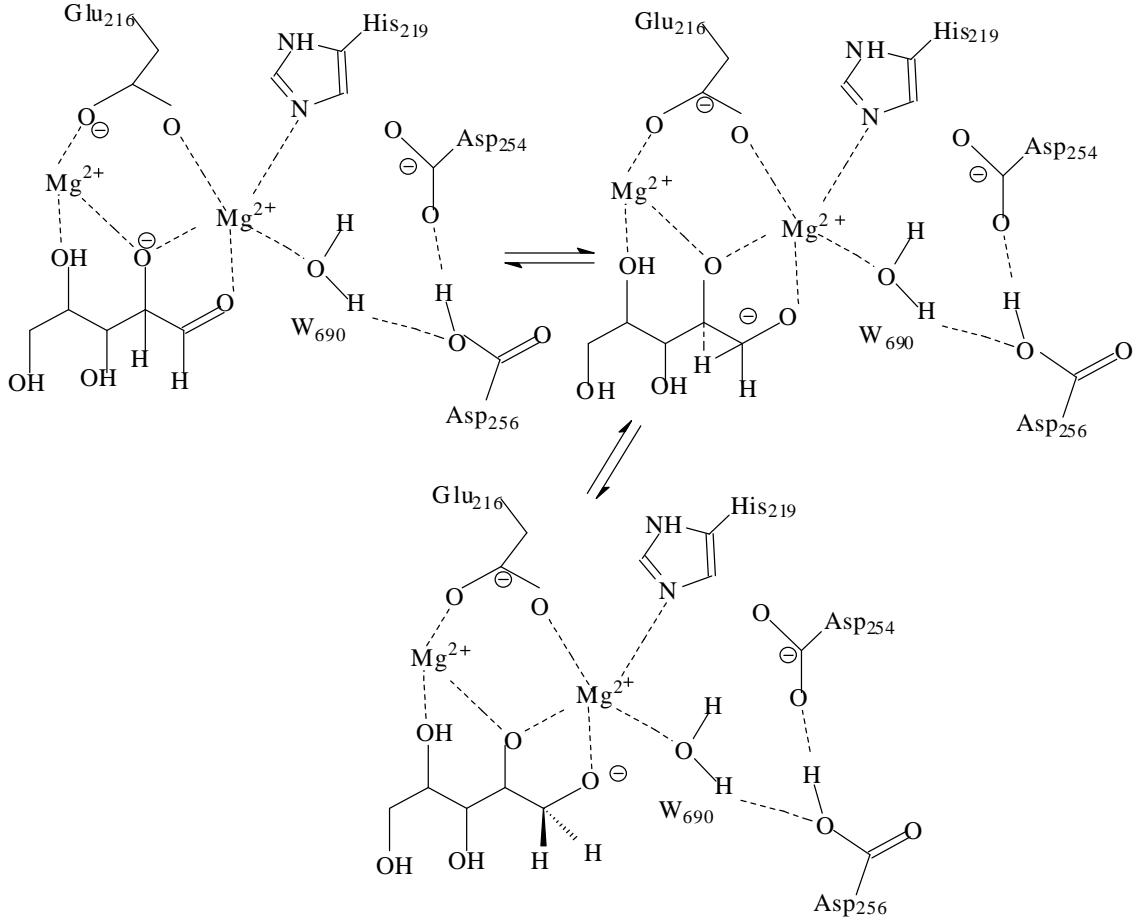
GI'nın, aktivitesi ve kararlılığı için Mg^{2+} , Mn^{2+} ve Co^{2+} ,ya ya da bu iyonların kombinasyonlu kullanımlarına ihtiyaç duyduğu uzun zamandır bilinmektedir. Mg^{2+} ve Co^{2+} aktivite için zaruri olmalarına karşın fonksiyonları farklıdır. Aktivatör olarak Mg^{2+} iyonu, Co^{2+} iyonundan üstündür buna karşın, Co^{2+} enzimin kuarterner yapısının korunmasında rol oynamaktadır (Bhosale vd., 1996).

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).

Genellikle kobalt, mezofilik *Streptomyces* türleri için kullanılırken, termofilik türler için kullanılmaz. GI üretimi yapılan fermentasyon ortamına Co^{2+} iyonu ilavesinin

azaltılması, Co^{2+} 'lı HFCS tüketiminin insan sağlığına verdiği zarar ve harcanan besiyerinin atılmasının çevreye verdiği zarar düşünülünce oldukça önemli bir konudur.

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



Şekil 4. Hidrür kayması mekanizması

1.5.5. Optimum Sıcaklık ve pH

GI'nın optimum sıcaklığı $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ile $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ arasında değişiklik göstermektedir ve optimum sıcaklık Co^{2+} varlığında artar (URL-1, 2008).

Optimum pH, genellikle pH 7,0-9,0 arasındadır. *Lactobacillus brevis*'ten izole edilen GI'nın optimum pH'ı 6,0, *Thermus aquaticus*'ten elde edilen GI optimum pH'ı ise 5,5 olarak belirlenmiştir ve bu durum ticari uygulamalar için arzu edilen bir özelliktir (Yamanaka, 1975; Lehmbacher ve Bisswanger, 1990).

1.5.6. GI'nın Substrat Spesifikliği

Fizyolojik substratı yanında, GI aktivitesi, farklı şeker ve şeker türevleri için de test edilmiştir. GI'nın farklı mikroorganizmalardan elde edilmesine göre substrat spesifikliği değişiklik gösterir, ancak enzim D-riboz, L-arabinoz, L-ramnoz, D-alloz ve 2-deoksiglukoz gibi bir çok şekeri substrat olarak kullanabilir (Hausler ve Stutz, 2001). Enzimin maksimum izomerizasyon gerçekleştirdiği substratlar glukoz ve ksiloz gibi ekvatorial düzlemindeki 3. ve 4. karbonlarında hidroksil grubu taşıyan substratlardır (Bhosale vd., 1996).

Farklı mikroorganizmalarda çözülmüş veya immobilize formda bulunan GI'ların D-glukozu D-fruktoza dönüştürme oranı % 26-59 arasında dağılım gösterir. Enzimin K_m değeri D-glukoz için 0,249 mM ile 5800 mM arasında, D-ksiloz için 0,076 mM ile 89,4 mM arasında dağılım gösterir (URL-1, 2008).

1.5.7. Çeşitli Glukoz İzomerazların Baz Sırası ve Amino Asit Benzerliği

GI'nın yapısı ve işlevi arasındaki ilişkiyi açıklamak için bir çok organizmanın *XylA* geni araştırılıp baz dizimleri birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Birçok mikroorganizmadan elde edilen GI'ların baz dizilimi ve amino asit dizilimi belirlenmiş ve gen Gen Bank'taki yerini almıştır. Genel olarak ısıya duyarlı ve dirençli olmak üzere iki tip GI bulunmaktadır. *B. subtilis* ve *E. coli* GI'ları ısı olarak kararsız iken *Streptomyces* türlerine ait GI'lar ise kararlıdır (Lee vd., 1990; Lokman vd. 1991). Mezofilik ve termofilik organizmalardan elde edilen GI'ların amino asit içerikleri incelendiğinde, aktif bölgede genel olarak D → E, Q → H ve G → P amino asit değişikliklerinin bulunduğu görülmüştür (Volkin ve Klivanov, 1983; Volkin ve Klivanov, 1989).

DNA'nın G+C içeriği ve fizyokimyasal özellikleri bakımından GI'lar, iki grup altında toplanırlar. Dört *Streptomyces* türü, *Thermus thermophilus*, *Actinoplanes missouriensis*, *Ampullariella* spp ve *Arthrobacter* spp'den elde edilen GI'lar yüksek G+C içeriğine sahipken üç *Bacillus* türü, *Staphylococcus xylosus*, iki *Lactobacillus* türü, *E.coli* ve *Klebsiella pneumoniae*'ye ait GI'lar ise düşük G+C içeriğine sahiptirler. *Streptomyces*, *Bacillus* ve *E.coli*'ye ait GI'lar düşük amino asit benzerliğine sahip olmasına rağmen, enzimin substrata bağlanmasında ve metal iyonlarına bağlanmasında rol oynayan amino asitler oldukça korunmuştur. Çalışılan bütün GI'larda, enzimin aktif bölgesinde kararlı bir

yapının oluşmasında rol oynayan bitişik glutamik asit ve prolin amino asitleri arasında gerçekleşen *cis* peptid bağı oldukça korunmuştur. Bu nedendir ki bütün GI'ların aktif bölgesindeki yapı benzerdir (Bhosale vd., 1996).

1.5.8. GI Üreten Organizmalar

Endüstriyel uygulamalar için bol miktarda enzim gereklidir. Bu nedenle, biyolojik sistemlerden izole edilen bir enzimin endüstriyel işlemlerde kullanılabilmesi için ihtiyaç duyulan enzimin nasıl ve hangi kaynaktan elde edileceği, verilecek ilk ve belki de en önemli karardır. Bu kaynakların ticari olarak kullanılabilmeleri, maliyetleri ve elde edilebilme kolaylığı gibi faktörlere ve biraz da toplumda kabul görmelerine bağlıdır.

GI, prokaryotik mikroorganizmalarda geniş bir şekilde bulunmaktadır (Tablo 2). *Pseudomonas hydrophila*'da bulunmasından sonra birçok bakteri ve *Actinomycetes* türünde GI aktivitesi saptanmıştır. Heterolaktik asidik bakterileri arasında *Lactobacillus brevis*'ten elde edilen GI, düşük pH değerlerinde aktif iken yüksek sıcaklıklarda kararlı değildir. Bu yüzden de ekonomik olarak bu mikroorganizmadan yararlanmak elverişli değildir (Yamanaka, 1975).

Streptomyces glaucescens (Weber, 1976) ve *S. flavogriseus* (Chen vd., 1979) türlerinden elde edilen GI'nın hücre dışı olduğu rapor edilmiştir. Burada enzimin hücre içerisinden dışarı salınmasının, hücre duvarının geçirgenliğindeki bir değişiklik ve hücrenin kısmi lizisi ile meydana geldiği kabul edilmiştir. *Chainia* sp. (Srinivasan vd., 1983) ve alkalotermofilik bir tür olan *Bacillus* sp'den (Chauthaiwale ve Rao, 1994) elde edilen hücre dışı GI'lar, jel filtrasyon, iyon değişim kromatografisi ve preparatif poliakrilamid jel elektroforezi gibi yaygın saflaştırma teknikleri ile homojen bir şekilde saflaştırılmışlardır. *Streptomyces* spp. türlerinin yanı sıra *Bacillus* türleri de yüksek miktarlarda GI üretmektedirler. *Candida utilis* (Wang vd., 1980) ve *Candida boidinii* (Vongsuvanlert ve Tani, 1988) gibi birkaç mayada da GI'nın varlığı tespit edilmiştir. Çimlenmiş arpada (Bartfay, 1960) ve buğday tohumunda da (Pubols vd., 1963) GI'nın var olduğu gösterilmiştir. GI üreten ve ticari olarak önemli olan birkaç mikroorganizma Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 2. GI üreten bazı mikroorganizmalar

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

Tablo 3. Ticari öneme sahip GI'ları üreten bazı mikroorganizmalar ve ürünlerinin ticari adları

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

1.5.9. Kimyasal İzomerizasyona Karşı Enzimatik İzomerizasyon

Glukozun fruktoza kimyasal olarak dönüşümü geçen 100 yıldır bilinen bir reaksiyondur ve Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein transformasyonu olarak bilinen bir grup reaksiyondan oluşmaktadır. Bu reaksiyonlar genellikle yüksek sıcaklık ve pH değerlerinde gerçekleşmektedirler. Glukozdan fruktoz üretme ihtimali Barker ve Somers (1983) tarafından çalışılmıştır (Barker ve Somers, 1983). Fakat bu reaksiyon spesifik değildir ve psikoz gibi metabolik olmayan şekerler ve arzu edilmeyen diğer bazı renkli ürünlerin oluşmasına neden olur. Bu metodu kullanarak fruktoz içeriğini % 40'ın üzerinde tutmak çok zordur. Üstelik kimyasal olarak üretilen fruktoz lezzet bakımından düşük ve az tatlılığa sahiptir ve bu durum kolay bir şekilde düzeltilemez. Bu durum kimyasal olarak üretilen fruktozun ticari olarak kullanılmasına bir engeldir. Diğer taraftan fruktozun glukozdan enzimatik olarak elde edilmesinin bir takım avantajları vardır ki bunlar; reaksiyon spesifikliği, pH ve sıcaklık şartlarını çevreleyen gereksinim ve yan ürün oluşmamasıdır. Bu nedenlerden dolayı, fruktozun glukozu enzimatik izomerizasyonu kimyasal izomerizasyonuna tercih edilmektedir ve bugün GI'yı kapsayan işlemler endüstriyel marketlerde hatırı sayılır bir artışa maruz kalmıştır (Karaoğlu, 2004).

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

Vücudumuzun başlıca enerji kaynağını oluşturan karbonhidratlar sınıfında yer alan şeker vazgeçemediğimiz tatlardan biridir. Şeker ve şekerli gıdaları aşırı miktarda tüketmek

ise bu besinlerin yüksek enerji değerleri nedeniyle obezitenin en önemli nedenlerinden biridir. Ayrıca obeziteyi takip eden şeker hastalığı, hipertansiyon, kalp - damar hastalıkları da unutulmamalıdır. Diş çürüklerinin de altında yatan en önemli neden şüphesiz şekerli besinlerin çok tüketilmesidir. Özellikle obezite ve şeker hastalığı gibi durumlarda şeker tüketimi sınırlandırılmakta, şekerin yerine kalorisi düşük veya olmayan bazı yapay tatlandırıcılar kullanılmaktadır.

Enerji vermeyen bu tatlandırıcılar aynı zamanda besleyici değeri olmayan, çok düşük kalorili veya alternatif tatlandırıcılar olarak da bilinmektedir. Tatlandırıcılar tek başına veya besinlerin içinde kullanılmaya başlanmadan önce FDA tarafından yoğun olarak test edilmektedir. Her şeyden önce iyi bir tatlandırıcı; şeker gibi ağızda tatlı tat bırakmalı, herhangi bir şekilde ağızda acı - metalik tat bırakmamalıdır. Kolay çözünmeli ve çözüldükten sonra renksiz, kokusuz, ısıya dayanıklı ve kalorisi düşük olmalıdır.

Saf şekerin üretim maliyetinin çok yüksek olması ve sukroz tüketiminin insan sağlığı üzerine olan olumsuz etkileri, saf şekere olan talebi artırmasına rağmen, sukrozun yerini alabilecek başka bir seçeneğin araştırılmasını da zorunlu hale getirmiştir. Sakkarin, siklamat, asesülfam-K, aspartam ve taumatin gibi kalorisiz ve karbonhidrat olmayan yapay birçok tatlandırıcı üretilmiş ancak bu tatlandırıcıların sağlık problemleri oluşturmaları kullanımlarını sınırlandırmıştır. Aspartam, düşük pH'da yavaş yavaş hidrolize olduğundan meşrubatlarda tatlandırıcı olarak kullanıldığında uzun süre depolama sonrasında meşrubatın tadında (şeker) azalma meydana geldiği gözlenmiştir. İdeal bir protein tatlandırıcı olan taumatin sukrozdan 2000 kat daha tatlıdır. Ancak, sahip olduğu hoş olmayan tat nedeniyle kullanılamamaktadır. Sakkarinin epitel dokuda yapısal değişikliklere neden olduğu ve hamile annelerde bebeğe geçip birikme yaptığı belirlenmiştir. Son yılların en gözde ve en fazla kullanılan yapay tatlandırıcısı olan aspartam'ın da baş dönmesi, baş ağrısı gibi belirtileri bildirilmiştir. Aspartam'ın aşırı tüketiminin ileride beyin tümörleri ve beyin hasarına neden olduğu klinik çalışmalarla ortaya konulmuştur. Diğer bir yapay tatlandırıcı olan siklamat'ın aşırı kullanımı ishale neden olmaktadır. Yapılan araştırmalar sonucu, erkek farelerde mesane tümörleri geliştiği tespit edilmiştir.

HFCS, glukoz ve fruktozun eşit miktarlarının karışımı, sukrozdan 1,3 kat, glukozdan 1,7 kat daha tatlıdır. Glukozun tatlandırma kapasitesi sukrozun tatlandırma kapasitesinin % 70-75'i kadardır. Fruktozun tatlandırma kapasitesi ise sukrozun iki katıdır (Barker, 1976). HFCS, tamamen tatsız olan nişastadan üretilmektedir. Tatlandırma gücü

değerlendirilerek karşılaştırma yapılırsa HFCS, sukrozdan % 10-20 daha ucuzdur. HFCS'nin sukroz gibi kristallenme problemine sebep olmaması diğer bir tercih nedenidir. Tüm bunlara ek olarak, D-fruktoz diabetik tatlandırıcı olarak da çok önemli bir rol oynar. Çünkü sadece fruktoz midede oldukça yavaş bir biçimde emilir ve kan glukoz seviyesini etkilemez.

Marketlere HFCS'nin girmesi, soft 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. 1995 yılı itibariyle dünyadaki yıllık HFCS kullanımı kuru ağırlık olarak 10 milyon tona ulaşmıştır (Deraadt vd., 1994).

1.5.11. Etanol Üretimi

GI, ksilozun ve glukozun izomerizasyonunu katalizler. Enzimin bu özelliği, mayalar tarafından alkole fermente edilebilen ksilulozun ksilozdan üretilmesinde kullanılır. 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. Günümüze kadar, yapılan çalışmalar yoğun bir şekilde selülozun biyolojik indirgenmesi üzerine yoğunlaşmıştır. Daha sonra lignoselülozun ve tarımsal suların biyolojik indirgenmesinin etkili bir şekilde biyokütlenin hemiselüloz bileşenlerini üretebildiğinin fark edilmesi, dikkatin hemiselüloz fermentasyonuna kaymasına neden olmuştur (Wang vd., 1980). Ksilan, hemiselülozun ana bileşenidir ve $\beta(1,4)$ bağlarıyla birbirine bağlanmış ksiloz birimlerinden oluşur. D-ksiloz ksilanın enzimatik veya asidik parçalanmasıyla kolayca üretilir. *Saccharomyces cerevisiae* gibi endüstriyel maya türleri, genellikle heksozları verimli bir şekilde fermente

edebilirler, fakat D-ksiloz bu fermentasyon sonucunda üretilmemiş olur. *Pachysolen tannophilus*, *Pichia stipitis*, *Candida utilis* ve *Candida shehatae* gibi birkaç maya türü oksidoredüktatif yollarla pentozlar üretebilirler. Ancak bu organizmaların fermentasyon miktarları oldukça düşüktür (Dupreez ve Prior, 1985). Ayrıca, bu organizmaların etanole olan düşük toleransı ve oksijenin varlığında etanolü katabolize etmeleri, bu mayaların ticari uygulamalarda kullanılmasını engeller (Dupreez vd., 1987). GI, ksilozdan ksiluloz üretilmesinde de kullanılır, ancak ksiluloz *Saccharomyces cerevisiae* gibi mayaların ksilozu alkole fermentasyonunu sağlayan metabolik yol için bir engelleyicidir (Chaing vd., 1981). D-ksilozun D-glukoza göre alkole fermentasyon oranı çok daha düşük olmasına rağmen, bugün bilimsel araştırmalar, KI geninin mayalara aktarılmasıyla ksilozun alkole kendiliğinden fermentasyonunun sağlanması üzerine yoğunlaştırılmıştır.

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

Geobacillus caldoxylolyticus TK4 (*G. caldoxylolyticus* TK4) Çanakkale Kestanbol Kaplıcasından alınan 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, Çanakkale ilinin Ezine ilçesinin sınırları içerisinde bulunup bu ilçeye uzaklığı 10 km, Çanakkale'ye olan uzaklığı ise 50 km'dir. Kestanbol Kaplıcasının yerden çıkış sıcaklığı 71 °C'dir. İzolatın, tür tayininin yapılabilmesi için çeşitli morfolojik, boyama, fizyolojik, biyokimyasal, genetiksel ve kemotaksonomik testler yapılmıştır. Yapılan incelemeler sonucunda termofilik izolatın basil morfolojisine sahip olduğu, spor oluşturabildiği ve katalaz enzimi üretebildiği, glukoz, mannitol, arabinoz ve ksiloz fermentasyonu gerçekleştirdiği ve % 2-5 NaCl'de büyüebildiği gözlenmiştir ve yapılan 16S rRNA gen analizlerinden *Geobacillus* olduğu ortaya çıkarılmıştır (Dülger, 2003).

1.7. Çalışmanın Amacı ve Pratik Önemi

Spesifik olmaması, verim düşüklüğü, yan ürünlerin sayısının fazla olması, ürünlerin canlı sistemler üzerinde toksik etkisinin olması, dolayısıyla biyoyumlu ve biyobozunur

olmama gibi nedenlerle kimyasal yöntemlerin yerini biyoteknolojik yöntemlere terk etmesine neden olmuş ve özellikle enzimlerin kullanımının artmasını sağlamıştır. Enzimler oldukça spesifiktirler ve sadece tek bir stereospesifik ürün oluşturmak üzere, reaksiyonları, katalizlenmemiş reaksiyonlara göre çok daha hızlı katalizleyebilirler. Enzimler kullanılarak istenilen kıymetli ürünlerin, yüksek saflıkta ve verimle, kimyasal yöntemlere göre çok daha kısa sürelerde sentezlenmesi mümkün olabilmektedir. Dolayısıyla ekonomik açıdan da değerlendirildiklerinde kimyasal yöntemlere göre enzimlerin sayısız avantajları vardır. Ayrıca kimyasal yöntemlerden farklı olarak enzimler varlığında reaksiyonlar ılımlı şartlarda (oda sıcaklığı ve basıncı, fizyolojik pH vb.) gerçekleştirilir, böylece büyük oranda enerji tasarrufu ve ekonomi de sağlanmış olur. Başlıca bu özelliklerinden dolayı artık günlük hayatımızda kullandığımız pek çok üründe ve bu ürünlerin fabrikasyon aşamalarında enzimler önemli bir yer tutmaya başlamışlardır.

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

Gelişen teknoloji ile birlikte, canlı sistemlerde bulunan biyomoleküllerin (proteinler, enzimler, hormonlar vs.), insanlığın yararına birçok alanda kullanımı, günden güne artmaktadır. Bu tür biyomoleküllerin canlı sistemlerin dışındaki kullanım alanlarına (endüstriyel, bilimsel araştırmaya yönelik vs.) uyarlanması her ne kadar uzun bir emek ve maddi olarak destek isteyen bir iş olsa da uygulamaya geçilmesi durumunda getireceği faydaların çok daha fazla olduğu açıktır.

TUBİTAK, 106T696 nolu proje kapsamında gerçekleştirilen bu çalışmada, Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı araştırmacılarından sayın Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ, sayın Yrd. Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI tarafından çeşitli özellikleri tanımlanmış olan *Geobacillus caldoolyolyticus* TK4 termofilik bakteri suşundan genomik kütüphanesinin oluşturulması ve rekombinant plazmidlerin sıralarının incelenmesi sonucu belirlenmiş olan bir endüstriyel enzimi kodlayan genin izolasyonu, konakçı hücreye aktarılması ve ekspresyonu hedeflenmiştir. Bu bilgiler ışığında, *G. caldoolyolyticus*

TK4'ten izole edilen genomik DNA'nın *EcoR* I enzimiyle kesilmesiyle hazırlanan DNA parçalarının yine aynı enzimle kesilen bir vektöre (pUC18) aktarılmasıyla genomik kütüphane oluşturulmuştur. Oluşturulan bu rekombinant DNA'lar *E. coli* 'de artırılmış ve sıra analizine gönderilmiştir. Elde edilen DNA ve protein sıraları BLAST programı yardımıyla incelenmiştir. Bu inceleme sonunda, çeşitli enzimleri kodlayan genlere değişik oranlarda benzerlik gösteren gen parçalarının varlığı görülmüş olmakla birlikte, endüstriyel öneme sahip olan D-glukoz\ksiloz izomeraz (EC 5.3.1.5) enzimini kodlayan gen ilgi çekici bulunmuştur. GI'nın endüstriyel ve çokça uygulama alanı bulabilen bir enzim olması, bu tezde neden GI'nın çalışıldığının bir cevabı olmaktadır. GI'nın klonlanması ve ayrıntılı bir şekilde karakterize edilmesi, bu enzimin dünyanın en yüksek tonajlı üç enzimden biri olması ve gıda endüstrisinde özellikle glukozun fruktoza izomeriazsyonu ile yüksek fruktoz içerikli mısır şurubu üretilmesinin sağlanması açısından önem arz etmektedir.

Bu nedenle, bu çalışmada adı geçen ve bir kısmı belirlenmiş olan gen parçasından (GI) yola çıkılarak *G. caldxylolyticus* TK4 suşundan genin tam sırasının belirlenmesi, bu genin klonlanması ve ekspres edilen enzimin saflaştırılıp karakterize edilmesi planlanmıştır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Materyaller

2.1.1. Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 4’te verilmiştir.

Tablo 4. Kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Firma	Model
Spektrofotometre	Perkin Elmer	Lambda 25
PCR	Bio-Rad	MJ Mini Personal
DNA Elektroforezi	Owl Separation Systems	Easy Cast B1A
Protein Elektroforezi	Owl Separation Systems	P8DS
Santrifüj	Hettich Zentrifüjen	Rotina 35 R
Mikrosantrifüj	Sigma	1-14
Jel Görüntüleme Sistemi	Kodak	Gel Logic 200 Imaging System
Kuru Hava Banyolu İnkübatör	Nüve	EN400
Mikrotüpler İçin Termal Sallayıcı	Boeco	TS-100 Thermo Shaker
Saf Su Cihazı	Sartorius	Arium 611UV
Su Banyolu Çalkalayıcı	Memmert	WNB 7-45
Ligasyon Fırını	Nüve	ES110
Hava Banyolu Çalkalayıcı	Barnstead/Lab-Line	MaxQ Mini 4450 Shaker
pH Metre	InoLab	WTW pH 720
Otoklav	Tomy	SS-325
Sonikatör	Bandelin	Sonopuls HD3100
Buz Makinesi	Hoshizaki	FM-80EE
Vorteks	Thermolyne	Type 37600 Mixer
Derin Dondurucu	Regal	RDD1280
Terazi	Ohaus	Pioneer
Mikrodalga Fırın	Regal	RMD-17
Güç Kaynağı	Heathkit	IP-17
Steril Kabin	Tezsan	—

2.1.2. Enzimler

Çalışmada kullanılan Enzimler Tablo 5’te verilmiştir.

Tablo 5. Kullanılan enzimler

Enzim	Firma	Konsantrasyonu
<i>EcoR</i> I	Fermentas	10 U/ μ L
<i>Nhe</i> I	Fermentas	10 U/ μ L
<i>Hind</i> III	Fermentas	10 U/ μ L
T4 DNA Ligaz	Promega	3 U/ μ L
T4 DNA Ligaz, HC	Promega	20 U/ μ L
GoTaq Flexi DNA Polimeraz	Promega	5 U/ μ L

2.1.3. Kimyasal Madde ve Malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasal madde ve malzemeler Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 6. 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
Genomik DNA İzolasyon Kiti (Wizard Genomic DNA Purification Kit)	Promega
pGEM-T Vektör Sistemi (pGEM-T Easy Vector System I)	Promega
PCR Ürünlerini Temizleme Kiti (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System)	Promega
Protein Saflaştırma Kiti (MagneHis Protein Purification System)	Promega
DNA Standardı (1 kb DNA Ladder)	Promega
SDS-PAGE Standardı (Broad Range Protein Molecular Weight Markers)	Promega

2.1.4. Primerler

Polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) kullanılan primerler Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7. Polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) kullanılan primerler

Primer Adı	Baz Sırası	Tm (°C)	Sentezleyen Firma
XylF1	5'- TTGAACATGAACTGCGAGTAGC-3'	55,5	IDT
XylF2	5'-GGCTAGCATGTCTTATTTCAACACCATCAACG-3'	60,9	IDT
XylR1	5'- TCATAGGATATGGCGTTGATGG-3'	54,4	IDT
XylR2	5'-CAAGCTTGTCACCTAACGGTTGCACAACTTCAAGC-3'	64,8	IDT

2.1.5. Kullanılan Suşlar

Klonlama ve ekspresyonda kullanılan *Escherichia coli* (*E. coli*) suşları Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8. Klonlama ve ekspresyonda kullanılan *E. coli* suşları

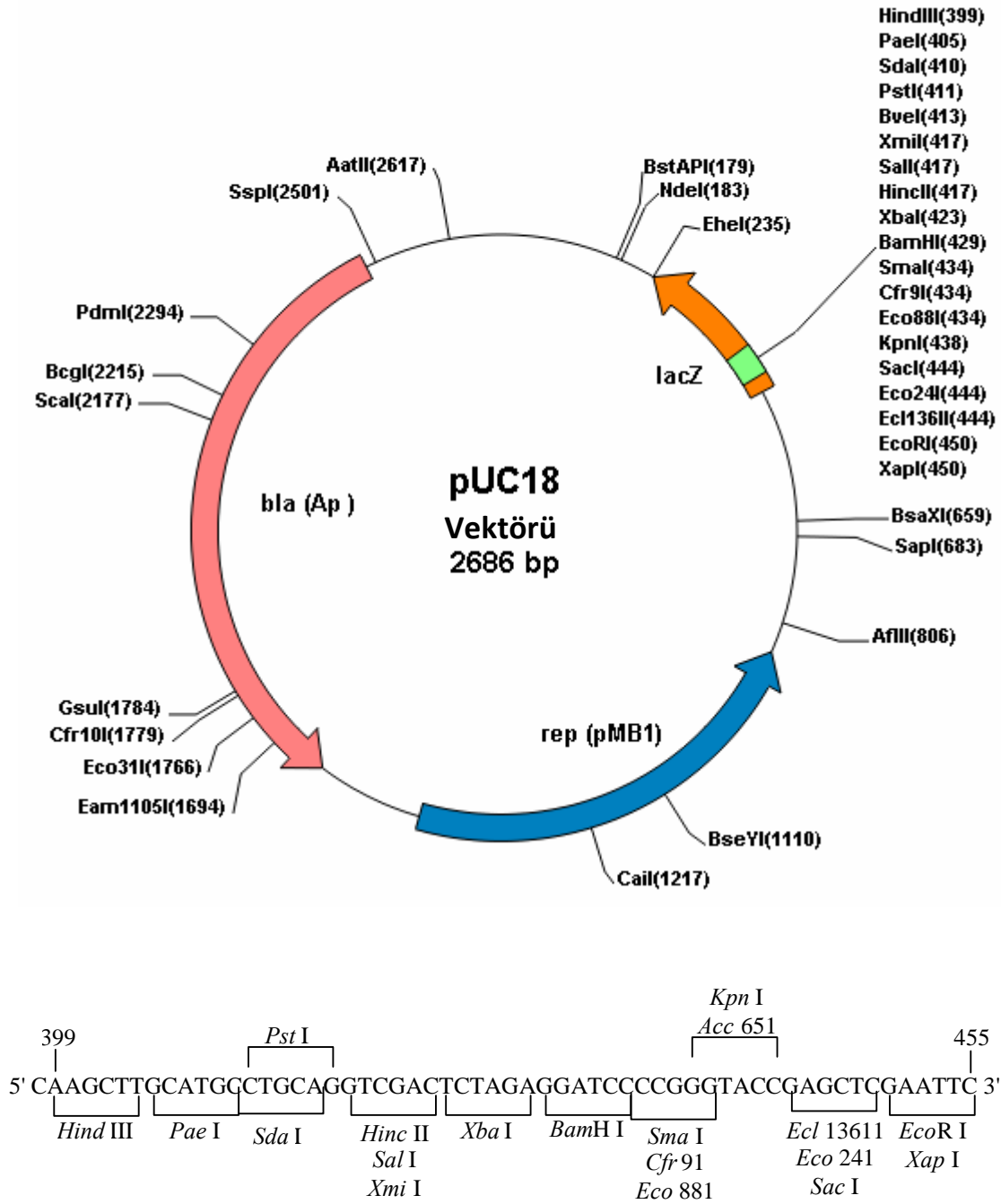
Tür	Suş	Genotip	Kullanım Amacı
<i>Escherichia coli</i>	JM101	<i>supE thi-1 Δ(lac-proAB)</i> [F' <i>traD36 proAB lac^fZΔM15</i>]	Konak hücre
<i>Escherichia coli</i>	BL21(DE3)pLysS	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (<i>r_B</i> ⁻ , <i>m_B</i> ⁻), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , $λ$ (DE3), pLysS, Cm ^r	Ekspresyon hücresi

2.1.6. Plazmidler

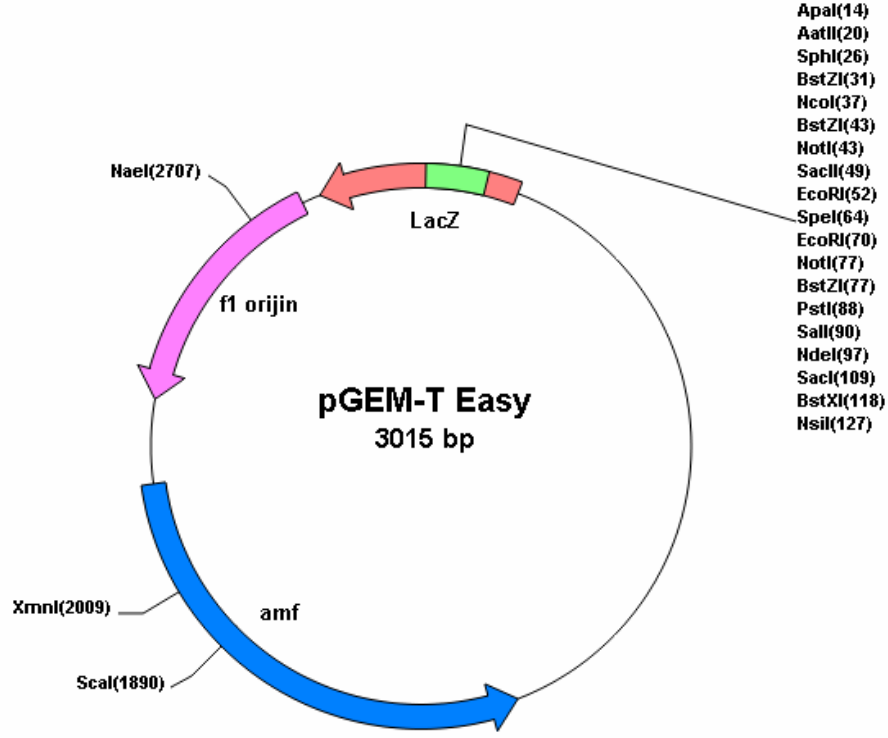
Klonlama ve ekspresyonda kullanılan plazmidler Tablo 9’da verimiştir.

Tablo 9. Klonlama ve ekspresyonda kullanılan plazmidler

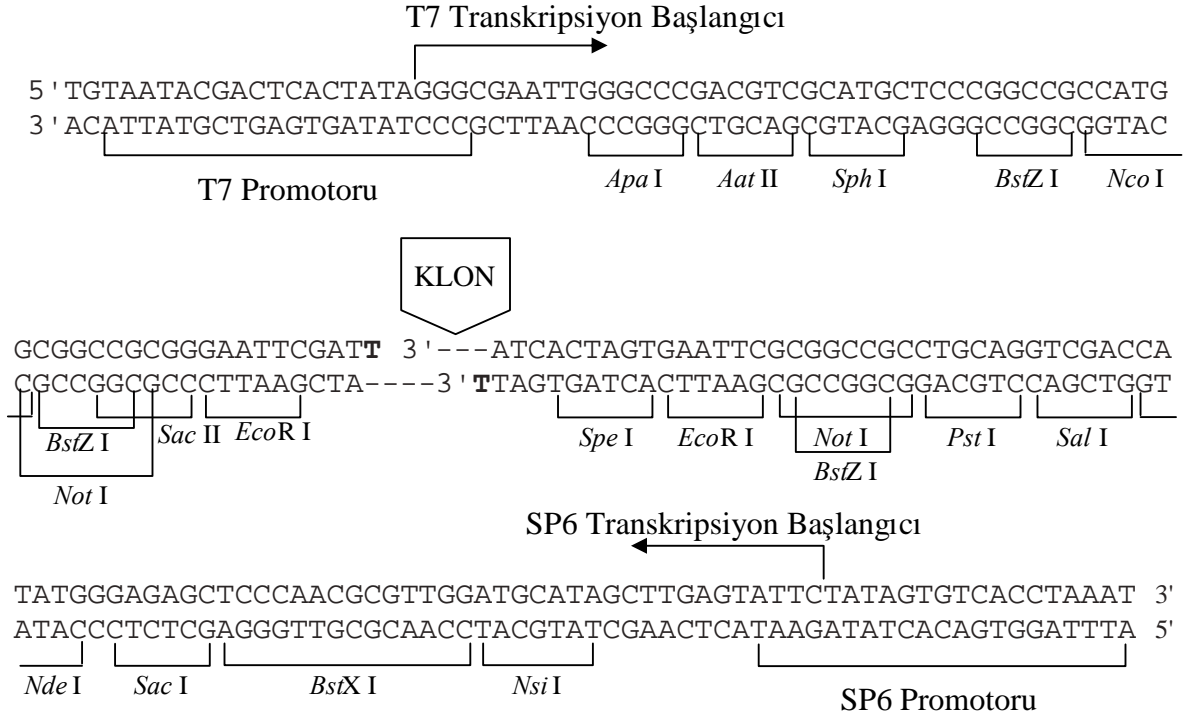
Plazmid Adı	Firma	Kullanım Amacı
pUC18	Promega	Genomik DNA kütüphanesi oluşturmak için
pGEM-T	Promega	İnvers PCR ürünlerini klonlamak için
pET-28a(+)	Novagen	Ekspresyon vektörü olarak



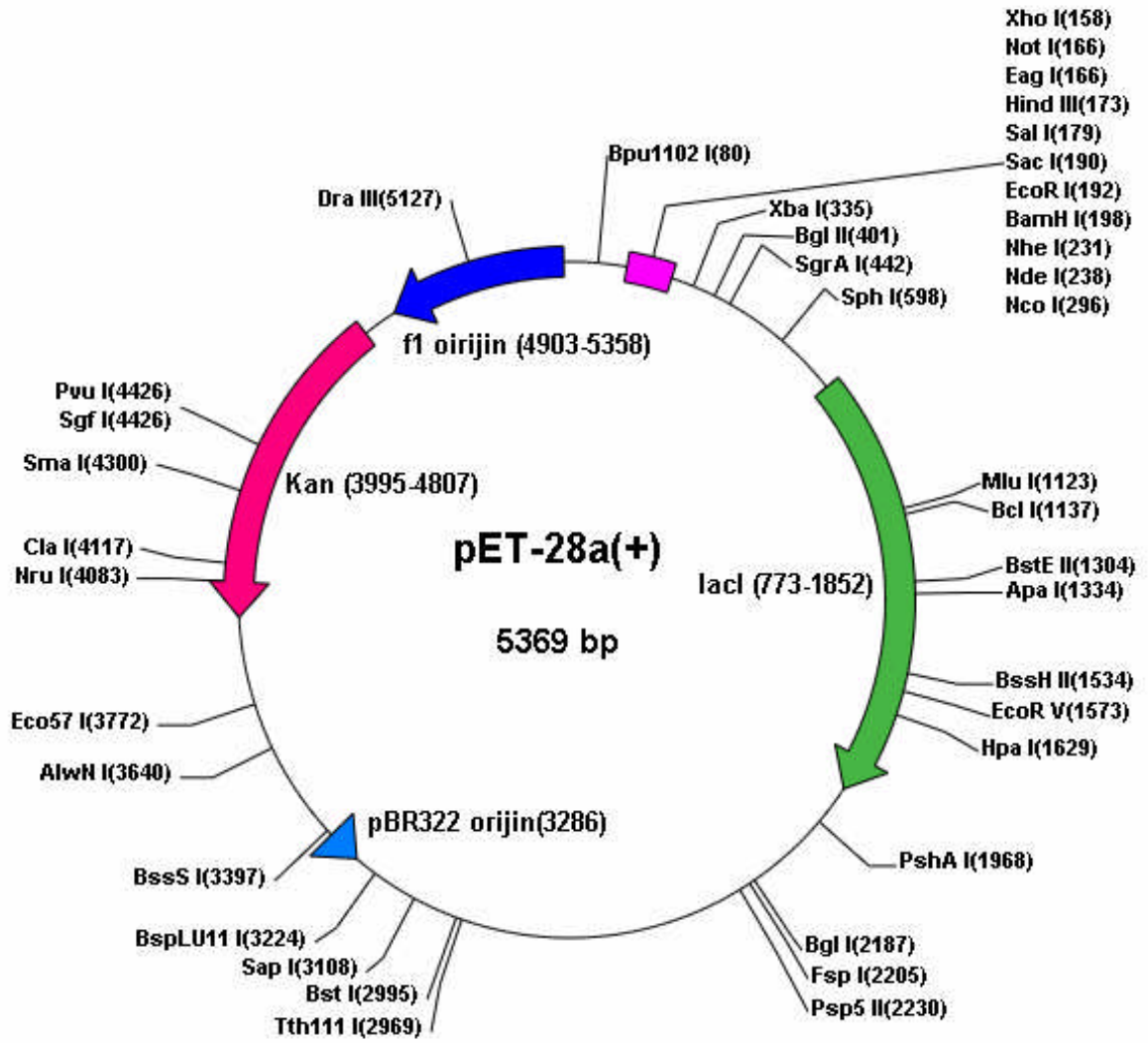
Şekil 5. pUC18 vektörünün çoklu klonlama bölgesini (MCS), replikasyon orijini, LacZ genini ve amfisilin direnç genini içeren harita (URL-2, URL-3)



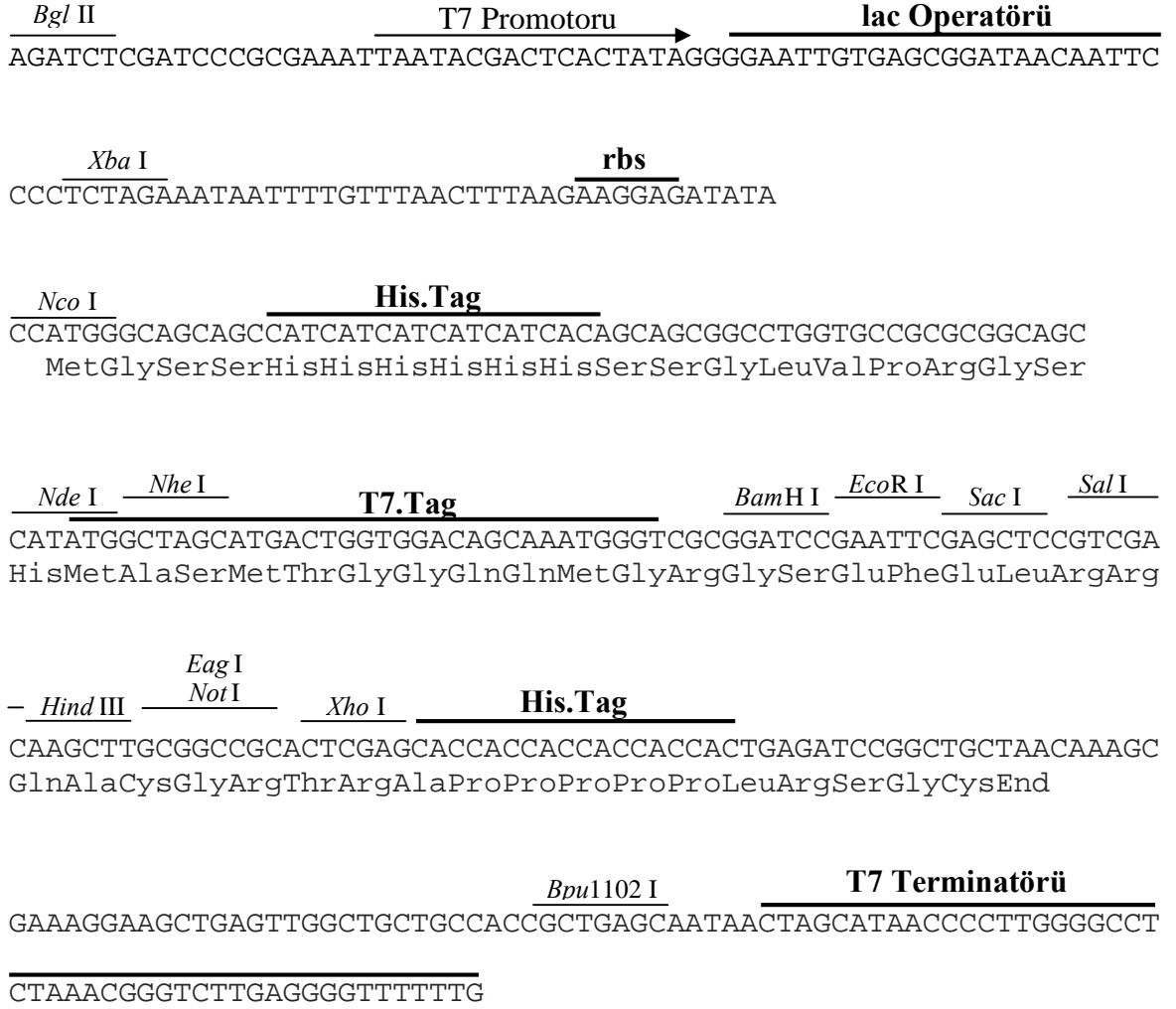
Şekil 6. pGEM-T Easy vektörünün haritası (URL-2, URL-4).



Şekil 7. pGEM-T Easy vektörünün promotörü ve çoklu klonlama bölgesi. Üst zincir T7 RNA polimeraz tarafından sentezlenen RNA sırasını, alt zincir ise SP6 RNA polimeraz tarafından sentezlenen RNA sırasını ifade etmektedir (URL-5, 2008).



Şekil 8. pET-28a(+) vektörünün haritası (URL-2 ve URL-6)



Şekil 9. pET-28a(+) vektörünün lac operatörünü, ribozom bağlanma bölgesini (rbs), His Tag ve T7 Tag bölgelerini gösteren sırası (URL-6, 2008).

2.1.7. Lãria-Bertani Sıvı ve Katı Besiyerlerinin Hazırlanması

Lãria-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 (Maniatis vd.,1989).

Lãria-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 7,5'e ayarlandı. Daha sonra çözeltinin hacmi 1000 mL'ye tamamlandı ve 121 °C'de, 1 atm basınç altında 20 dakika bekletilerek steril edildi (Maniatis vd.,1989).

2.1.8. Çözeltiler

2.1.8.1. Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Protein tayininde kullanılan çözeltiler, içerikleri ve hazırlanışları Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10. Protein tayininde kullanılan çözeltiler ve içerikleri / hazırlanışları

Çözelti Adı	Çözeltinin Hazırlanışı
Lowry A Çözeltisi (0,1 N NaOH içinde % 2 (w/v) Na ₂ CO ₃)	0,4 g NaOH ve 2,0 g Na ₂ CO ₃ saf su ile çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
Lowry B Çözeltisi (% 1 CuSO ₄ .5H ₂ O çözeltisi)	1,0 g CuSO ₄ .5H ₂ O saf su ile çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
Lowry C Çözeltisi (% 2 Na-K tartarat çözeltisi)	2,0 g Na-K tartarat saf su ile çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
Lowry D Çözeltisi	1 kısım Lowry B ve 1 kısım Lowry C karıştırılarak hazırlandı.
Lowry E Çözeltisi	0,5 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.

2.1.8.2. Agaroz Jel Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler

Agaroz jel elektrofrezinde kullanılan çözeltiler, içerikleri ve hazırlanışları Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 11. Agaroz jel elektrofrezinde kullanılan çözeltiler ve içerikleri / hazırlanışları

Çözelti Adı	Çözeltinin Hazırlanışı
Jel Yükleme Boyası (6X)	25,0 mg bromofenol mavisi ve 3 mL gliserol saf su ile iyice karıştırılıp hacmi 10 mL'ye tamamlandı.
EDTA Çözeltisi (0,5 M, pH 8,0)	18,61 g EDTA.2H ₂ O yaklaşık 80 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N 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.
Etidyum Bromür Çözeltisi (5 mg/mL)	50 mg etidyum bromür saf suda çözülerek hacmi 10 mL'ye tamamlandı.

2.1.8.3. Protein Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler

Protein elektrofrezinde kullanılan çözeltiler, içerikleri ve hazırlanışları Tablo 12’de verilmiştir.

Tablo 12 . SDS PAGE’de kullanılan çözeltiler ve içerikleri / hazırlanışları

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

2.1.8.4. Tampon Çözeltiler

Kullanılan tampon çözeltiler, içerikleri ve hazırlanışları Tablo 13’de verilmiştir.

Tablo 13. Kullanılan tampon çözeltiler ve içerikleri / hazırlanışları

Çözelti Adı	Çözeltinin Hazırlanışı
Asetat Tamponu (50 mM, pH 4,0-5,5)	0,34 g sodyum asetat trihidrat yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH’sı 1 N Asetik Asit ile istenilen pH’a ayarlandı ve hacmi 50 mL’ye tamamlandı.
MOPS Tamponu (50 mM, pH 6,0-7,5)	0,52 g MOPS yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH’sı 1 N NaOH ile istenilen pH’a ayarlandı ve hacmi 50 mL’ye tamamlandı.
Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 8,0-9,0)	0,30 g Tris yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH’sı 1 N HCl ile istenilen pH’a ayarlandı ve hacmi 50 mL’ye tamamlandı.

2.1.8.5. Enzim Aktivitesi Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Enzim aktivitesi tayininde kullanılan çözeltiler, içerikleri ve hazırlanışları Tablo 14’te verilmiştir.

Tablo 14. Enzin aktivitesi tayininde kullanılan çözeltiler ve içerikleri / hazırlanışları

Çözelti Adı	Çözeltinin Hazırlanışı
Karbazol (% 0,12)	0,06 g karbazolün etanolde çözülüp hacminin 50 mL’ye tamamlanması ile hazırlandı.
Sülfürik Asit (% 70)	72 mL sülfürik asit üzerine yavaş yavaş saf suyun ilave edilip hacminin 100 mL’ye tamamlanması ile hazırlandı.
Glukoz Çözeltisi (1 M)	1,80 g glukozun saf suda çözülüp hacminin 10 mL’ye tamamlanması ile hazırlandı.
Sistein Hidroklorür Çözeltisi (% 1,5)	0,75 g sistein hidroklorürün saf suda çözülüp hacminin 50 mL’ye tamamlanması ile hazırlandı.

2.1.8.6. Diğer Çözeltiler

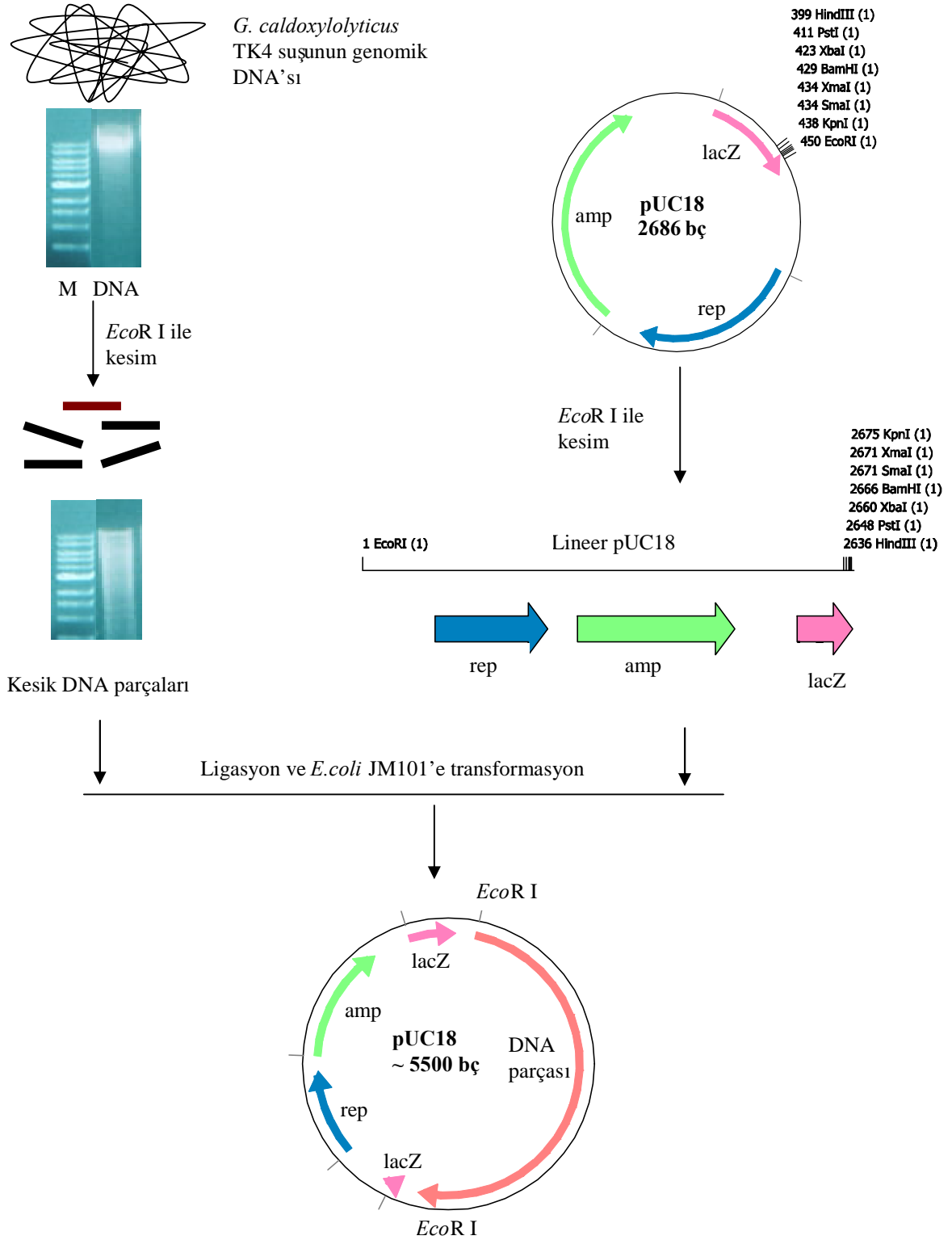
Çalışmada kullanılan çözeltiler, içerikleri ve hazırlanışları Tablo 15'te verilmiştir.

Tablo 15. Çalışmada kullanılan çözeltiler ve içerikleri / hazırlanışları

Çözelti Adı	Çözeltinin Hazırlanışı
Ampisilin Çözeltisi (25 mg/mL)	250 mg ampisilin saf suda çözülüp hacminin 10 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı. Hazırlanan çözelti filtre ile steril edilip küçük kısımlara bölünerek -20 °C'de saklandı.
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 g/mL)	2 g 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.
X-gal Çözeltisi (20 mg/mL)	200 mg X-gal'ın dimetilformamid (DMF) ile çözülüp hacminin 10 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı. Hazırlanan çözelti küçük kısımlara bölünerek -20 °C'de saklandı.
Sodyum Asetat Çözeltisi (3 M, pH 5,2)	20,41 g sodyum asetat trihidrat yaklaşık 40 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N asetik asit çözeltisi ile 5,2'ye ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
Etanol Çözeltisi (% 96)	96 mL etanolün hacminin saf suyla 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
Etanol Çözeltisi (% 70)	70 mL etanolün hacminin saf suyla 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
Kalsiyum Klorür Çözeltisi (0,1 M)	1,47 g CaCl ₂ dihidratın saf suda çözülüp hacminin 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı. Hazırlanan çözelti otoklavda steril edilip 4 °C'de saklandı.
EDTA Çözeltisi (50 mM)	1,86 g EDTA.2H ₂ O yaklaşık 80 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile 8,0' e ayarlandı ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
Lisozim Çözeltisi (10 mg/mL)	10 mg lisozimin saf suyla çözülüp hacminin 1 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.

2.2. Genomik DNA Kütüphanesinin Oluşturulması

Genomik DNA kütüphanesi oluşturulmak amacıyla, öncelikle *Geobacillus caldoxylolyticus* TK4 (*G. caldoxylolyticus* TK4) bakterisinden genomik DNA izolasyonu gerçekleştirildi ve elde edilen genomik DNA *EcoR* I enzimi ile kesildi. Kesilen DNA parçaları yine aynı restriksiyon enzimi ile kesilmiş olan pUC 18 plazmidine yapıştırıldı ve elde edilen rekombinant plazmidler *E. coli* JM101 konakçı hücrelerine aktarıldı (Şekil 10).



Şekil 10. *G. caldoxylolyticus* TK4 genomik DNA'sının *EcoR* I ile kesilerek genomik DNA kütüphanesinin oluşturulmasının şematik gösterimi

2.2.1. *G. caldoxylolyticus* TK4 Suşunun Büyütülmesi

G. caldoxylolyticus TK4 bakterisi, gliserol stok kültürden LB Agar besiyerine yayma ekim yapılarak ekildi ve bir gece 60 °C’de bekletilerek büyütüldü. Büyüyen kolonilerden öze yardımıyla bir tane alınıp LB besiyerine ekildi ve çalkalayıcı hava ya da su banyosunda 60 °C’de inkübasyon yapılarak kültürü hazırlandı (Dülger, 2003).

2.2.2. Genomik DNA İzolasyonu

G. caldoxylolyticus TK4 bakterisinden genomik DNA izolasyonu, genomik DNA izolasyon kiti (Promega)” kullanılarak yapıldı.

- 1 mL gece kültürü 1,5 mL’lik eppendorf tüpüne aktarıldı.
- 13.000 x g’de 2 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- Pelte 480 µL 50 mM EDTA çözeltisinde çözüldü. 120 µL lizozim çözeltisi (10 mg/mL stok) ilave edilerek hafifçe pipetlendi.
- 37 °C’de 1 saat inkübe edildi. 13.000 x g’de 2 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı.
- Tüpe 600 µL Nüklei Lizis Çözeltisi (Nüklei Lysis Solution) ilave edildi ve pelte süspansiyon olana kadar dikkatlice pipetlendi.
- Süspansiyon, hücrelerin lizis olması için 80 °C’de 5 dakika inkübe edildi ve oda sıcaklığına soğutuldu.
- Hücre lizatına 3 µL RNaz Çözeltisi (RNase Solution) ilave edilerek dikkatlice 2-5 kez altüst edildi.
- 37 °C’de 60 dakika bekletildikten sonra oda sıcaklığına soğutuldu.
- RNaz muamelesi yapılmış hücre lizatına 200 µL Protein Çöktürme Çözeltisi (Protein Precipitation Solution) ilave edildi. Çözeltinin hücrelerle iyice karışması için 20 saniye yüksek hızda vortekslendi.
- Numune buz üzerinde 5 dakika bekletildi ve 13.000 x g’de 3 dakika santrifüj edildi.
- DNA’yı içeren süpernatant, 600 µL oda sıcaklığındaki izopropanol içeren 1,5 mL’lik temiz bir eppendorf tüpüne aktarıldı.
- DNA iplikçikleri görünene kadar yavaşça altüst edilerek karıştırıldı.

- 13.000 x g'de 2 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı ve eppendorf tüp, temiz ve emici bir kâğıt üzerinde kurutuldu. 600 µL oda sıcaklığındaki % 70'lik etanol ilave edildi ve yavaşça altüst edilerek DNA'nın yıkanması sağlandı.
- 13.000 x g'de 2 dakika santrifüj edildi ve etanol dikkatlice uzaklaştırıldı.
- Eppendorf tüp temiz ve emici bir kâğıt üzerinde kurutuldu ve oda sıcaklığında 10-15 dakika daha bekletilerek etanolün tamamen uzaklaşması sağlandı.
- Elde edilen DNA üzerine 50 µL DNA Rehidrasyon Çözeltisi (DNA Rehydration Solution) ilave edilerek 65 °C'de 1 saat inkübe edildi. Bu bir saatlik inkübasyon süresi boyunca eppendorf tüplere aralıklı olarak hafifçe vurularak çözelti karıştırıldı.
- Genomik DNA kullanılacağı zamana kadar -20 °C'de saklandı.

2.2.3. Plazmid DNA İzolasyonu

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

- pUC18 plazmidini içeren *E.coli* JM101 hücrelerinden 50 µg/mL ampisilin içeren LB besiyerine ekim yapıldı ve 37 °C'de bir gece çalkalayıcı hava ya da su banyosunda inkübasyon yapılarak gece kültürü hazırlandı.
- 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.

2.2.4. DNA Konsantrasyonunun Ölçülmesi

Genomik ve plazmid DNA çözeltilerinin konsantrasyonu, nükleotidlerin heterosiklik halkalarının 260 nm dalga boyundaki ışığı maksimum absorbe etme özelliğinden yararlanılarak ölçüldü (Temizkan ve Arda, 2004). DNA çözeltisi, saf su ile 100 kat seyreltilerek 260 nm'de absorbans okundu. 1 absorbans değeri, çift iplikli DNA için 50 µg/mL'ye karşılık gelmektedir. DNA konsantrasyonunu hesaplanmasında aşağıdaki (1) eşitliği kullanıldı.

$$\text{DNA } (\mu\text{g/mL veya ng}/\mu\text{L}) = 260 \text{ nm'deki absorbans} \times \text{Seyrelme Faktörü} \times 50 \quad (1)$$

2.2.5. Genomik DNA ve pUC18 Plazmid DNA'sının *EcoR* I ile Kesimi

İzole edilen genomik DNA ve pUC18 plazmid DNA'sı 50 µL son hacimde olacak şekilde *EcoR* I ile ayrı ayrı kesildi.

genomik DNA/pUC18	10 µg
10X <i>EcoR</i> I tamponu	5 µL
<i>EcoR</i> I (10 U/µL)	2 µL
Nükleaz içermeyen su	Son hacim 50 µL'ye tamamlandı

Reaksiyon karışımı, 37 °C'de 8 saat inkübe edildikten sonra karışım enzimin deaktivasyonu için 65 °C'de 20 dakika daha inkübe edildi. Sonuçlar agaroz jel elektroforezinde incelendi.

2.2.6. DNA Agaroz Jel Elektroforezi

DNA elektroforezinin temeli negatif yüklü DNA'nın bir matriks üzerinde büyüklüğüne göre ayrılması esasına dayanır. DNA elektroforezi genellikle agaroz kullanılarak gerçekleştirilir. Agaroz jel elektroforezi yapmak amacıyla aşağıdaki yöntem takip edildi (URL-7, 2008)

- % 1'lik agaroz jel dökmek için 0,3 g agaroz tartıldı ve 30 mL 1X TAE tamponu içinde mikrodalga fırında 1 dakika bekletilerek eritildi.
- Sıcak agaroz çözeltisi, 50-55 °C'ye gelinceye kadar oda sıcaklığında biraz bekletildi ve 3 µL etidiyum bromür ilave edilip iyice karıştırıldıktan sonra jel tablasına döküldü.
- Jel donduktan sonra, elektroforez kabı 1X TAE ile doldurulup her bir kuyucuğa ayrı bir yerde karıştırılmış olan 1 µL jel yükleme boyası ve 5 µL DNA yüklendi.
- Yaklaşık 1 saat boyunca 100 mA'de elektrik akımı uygulandı.
- Jel görüntüleri, jel görüntüleme cihazında Kodak Molecular Imaging System programı yardımıyla incelenip kaydedildi.

2.2.7. DNA'nın Etanol ile Çöktürülmesi

Restriksiyon enzimleri ile kesimden sonra çözelti, içindeki proteinlerin uzaklaştırılması ve DNA'nın saflaştırılması amacıyla etanol ile çöktürme işlemi yapıldı. Bu amaçla aşağıdaki yöntem takip edildi (URL-8, 2008).

- DNA çözeltisi üzerine tuz konsantrasyonunu 0,3 M'a ayarlamak için 1/10 kadar 3 M sodyum asetat (pH 5,2) ilave edilip iyice karıştırıldı.

- Son hacmin 2,5 katı kadar % 96'lık soğuk etanol ilave edildi ve iyice karıştırıldıktan sonra -20 °C'de 1 saat bekletildi.
- Oda sıcaklığında 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi ve süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.
- DNA peltesi üzerine 500 µL % 96'lık soğuk etanol ilave edilerek hafifçe karıştırıldı ve 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı.
- Yıkama işlemi, 500 µL % 70'lik soğuk etanol ile tekrarlandı. 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüjden sonra süpernatant uzaklaştırıldı.
- Eppendorf içindeki DNA, etanolün tamamen uzaklaşması için oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.
- Pelte halindeki DNA, 25 µL nükleaz içermeyen suda çözülerek -20 °C'de saklandı.

2.2.8. Genomik DNA Parçalarının pUC18 Vektörüne Ligasyonu

EcoR I ile kesilen genomik DNA'dan elde edilen parçalar yine aynı enzimle kesilen pUC18 vektörüne T4 DNA Ligaz enzimi yardımıyla yapıştırıldı.

genomik DNA <i>EcoR</i> I	3 µL
pUC18 kesiği <i>EcoR</i> I	1 µL
10X ligaz tamponu	1 µL
T4 DNA Ligaz (3 U/µL)	3 µL
Nükleaz içermeyen su	2 µL

Reaksiyon karışımı 16 °C'deki ligasyon inkübatörde 1 gece bekletildi.

2.2.9. Kompetent Hücre Hazırlanması

Kompetent hücreler kalsiyum klorür metoduna göre hazırlandı (Maniatis vd.,1989). Genomik DNA kütüphanesi oluşturmak amacıyla ve diğer klonlama işlemleri için *E. coli* JM101 suşundan, ekspresyon yapmak amacıyla ise *E. coli* BL21(DE3)pLysS 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 optik yoğunluk 0,1 olacak şekilde, 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 koyularak 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 µL'lik kısımlar halinde steril eppendorf tüplerine bölündü.
- Kompetent hücreler, 2 saat buzda bekletilerek transformasyona hazır hale getirildi.

2.2.10. Transformasyon

Rekombinant olan ve olmayan pUC18 vektörlerini birbirinden ayırabilmek için 2.2.8. nolu kısımda anlatıldığı şekilde elde edilen ligasyon ürünü hazırlanan kompetent hücrelere aktararak çoğaltıldı. Bunun için aşağıdaki yöntem takip edildi (Maniatis vd.,1989).

- Eppendorf tüp içinde bulunan kompetent hücrelere 3-5 µL ligasyon ürünü ilave edildi ve 30 dakika buz içinde bekletildi.
- 2 dakika 42 °C'de bekletmek suretiyle plazmidin hücre içine girmesi sağlandı.
- Buz içine alınan hücrelere 200 µL LB besiyeri eklenerek 37 °C'de 1 saat bekletildi.
- Bu sürenin sonunda tüp içindeki süspansiyon karışım, 50 µg/mL ampisilinli LB agar içeren, sırasıyla ayrı ayrı 45 µL IPTG ve 45 µL X-gal sürülüp iyice kurutulmuş petrilere yayma ekim yapılarak ekildi ve 37 °C'de 1 gece bekletilerek plazmidi içeren hücrelerin büyümesi sağlandı.

2.2.11. Rekombinant Plazmidlerin Seçimi, İzolasyonu ve DNA Sıra Analizi

Petridelerde büyüyen mavi ve beyaz kolonilerden sadece beyaz olanlar seçildi ve 50 µg/mL ampisilin içeren LB besiyerine ekilerek 37 °C'de bir gece büyütülüp gece kültürleri hazırlandı. Elde edilen gece kültürlerinden 900 µL alınıp 300 µL % 80'lik gliserol çözeltisi ile karıştırılarak gliserol stoğu hazırlandı ve bu stoklar gerektiğinde kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı. Hazırlanan gece kültürlerinden aynı zamanda kit kullanılarak plazmid izolasyonu yapıldı. İzole edilen plazmidler DNA sıra analizi için Macrogen Inc.(Güney Kore)'ye gönderildi.

2.2.12. DNA Sıralarının İncelenmesi

Macrogen Inc.'den gelen DNA sıraları öncelikle protein sırasına dönüştürüldü (URL-9, 2008) ve daha sonra BLAST programı (URL-10, 2008) yardımıyla incelendi.

2.3. GI Geninin Eksik Kalan Baş Kısmının İvers PCR ile Bulunması

İvers PCR, DNA sırası bilinen bir bölgenin hemen yan tarafının DNA'sının *in vitro* olarak çoğaltılması için kullanılan bir metottur (Ochman vd., 1988). Bu metodta normal PCR'daki yönün tersi şekilde yönelmiş olan primerler kullanılarak PCR yapılır. Bu primerler için kullanılan DNA kalıbı, restriksiyon enzimi ile elde edilmiş DNA parçalarının T4 DNA Ligaz enzimi yardımıyla bir çember oluşturmak üzere kendi üzerine yapışması ile elde edilir.

2.3.1. İvers PCR İçin Primer Tasarlanması

GI geninin başında bulunan yaklaşık 399 bazlık kısmın DNA sırasının invers PCR yardımıyla bulunabilmesi için bilinen DNA sırasından faydalanarak 1 tane ileri (XylF1) ve 1 tane geri (XylR1) olmak üzere 2 tane primer tasarlandı (Tablo 7).

2.3.2. Genomik DNA'nın Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi

G. caldoxylolyticus TK4 genomik DNA'sı XylF1/XylR1 primer çifti arasında kalan, sırası bilinen bölgeyi kesmeyen *Pst* I ve *Hinf* I enzimleri ile ayrı ayrı kesildi.

gDNA	10 µg
10X R tamponu	5 µL
Enzim (10 U/µL)	2 µL
Nükleaz içermeyen su	Son hacim 50 µL'ye tamamlandı

Reaksiyon karışımı, 16 °C'de 8 saat inkübe edildikten sonra enzimin deaktivasyonu için 80 °C'de 20 dakika daha inkübe edildi.

2.3.3. DNA Parçalarının Ligasyonu

Etanol ile çöktürülerek temizlenmiş olan *Pst* I ve *Hinf* I kesikleri, DNA parçalarının her birinin kendi üzerine yapışarak dairesel forma dönüşmesi için T4 DNA Ligaz enzimi kullanılarak yapıştırıldı (Maniatis vd.,1989).

Kesik genomik DNA karışımı	50 µL (yaklaşık 10 µg)
10X ligaz tamponu	50 µL
T4 DNA Ligaz (3 U/µL)	3 µL
Nükleaz içermeyen su	397 µL

Reaksiyon karışımı 22 °C'de 1 gece bekletildikten sonra etanol çöktürmesi yapılarak protein ve diğer bileşenler uzaklaştırıldı. Böylelikle invers PCR için kalıp DNA elde edilmiş oldu.

2.3.4. İvers PCR

İvers PCR için kalıp DNA, primer çiftleri (XylF1/XylR1), dNTP karışımı, tampon ve DNA polimerazın ilavesi ile ayrı ayrı reaksiyon karışımları hazırlandı (Tablo 16) ve uygun şartlarda (Tablo 17) PCR yapıldı. Sonuçlar % 1'lik agaroz jelde incelendi. GI geninin son kısmını yakalamak için gerçekleştirilen invers PCR'ın şematik gösterimi Şekil 11'de verilmiştir.

Tablo 16. İnvrs PCR bileşenleri

Bileşen	Kullanılan Miktar
dNTP karışımı (10 mM)	1 µL
İleri primer	1 µL (20 pmol)
Geri primer	1 µL (20 pmol)
MgCl ₂ çözeltisi (25 mM)	4 µL
5X GoTaq Flexi reaksiyon tamponu	10 µL
GoTaq Flexi DNA polimeraz (5 U/µL)	0,25 µL
Kalıp DNA	1 µg
Nükleaz içermeyen su	Son hacim 50 µL'ye tamamlandı

Tablo 17. İnvrs PCR için reaksiyon şartları

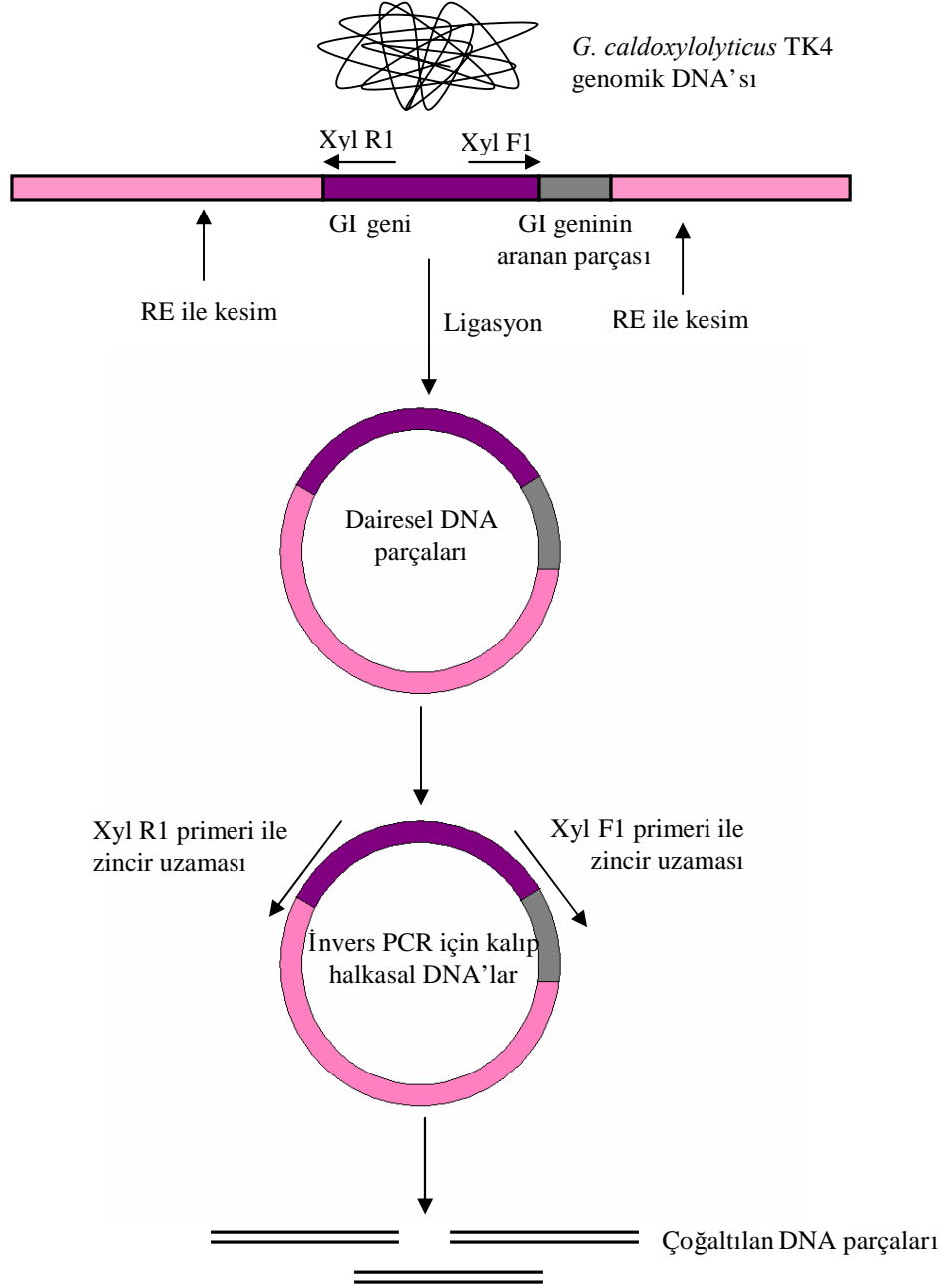
	Sıcaklık (°C)	Zaman (dakika)	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95	2	1
Denatürasyon	94	1	
Primer Bağlanması	50	1	36
Uzama	72	2	
Son Uzama	72	5	1

2.3.5. 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 μ L 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.



Şekil 11. GI geninin son kısmını yakalamak için gerçekleştirilen invers PCR'in şematik gösterimi

2.3.6. PCR Ürünlerinin pGEM-T Easy Vektörüne Ligasyonu

PCR ürünleri, pGEM-T Easy klonlama vektörüne, T4 DNA Ligaz enzimi yardımı ile yapıştırıldı.

Saf PCR ürünü	3,5 µL
2X ligaz tamponu	5 µL
pGEM-T Easy vektörü	0,5 µL
T4 DNA Ligaz (3 U/µL)	1 µL

Reaksiyon karışımları, 16 °C’de bir gece bekletilerek ligasyon gerçekleştirildi.

2.3.7. *E. coli* JM101’e Transformasyon, Rekombinant Plazmidlerin Seçimi, İzolasyonu ve DNA Sıra Analizi

Ligasyon ürünleri, *E. coli* JM101 hücresine aktararak rekombinat plazmidler çoğaltıldı. IPTG ve X-gal içeren ampisilinli LB Agar içeren petrilerde büyüyen beyaz koloniler seçilerek alındı ve 50 µg/mL ampisilin içeren LB besiyerine ekilerek 37 °C’de bir gece büyütülüp gece kültürleri hazırlandı. Elde edilen gece kültürlerinden 900 µL alınıp 300 µL % 80’lik gliserol çözeltisi ile karıştırılarak gliserol stoğu hazırlandı ve bu stoklar gerektiğinde kullanılmak üzere -20 °C’de saklandı. Hazırlanan gece kültürlerinden aynı zamanda kit kullanılarak plazmid izolasyonu yapıldı. İzole edilen plazmidler DNA sıra analizi için Macrogen Inc.(Güney Kore)’ye gönderildi.

2.4. GI Geninin pET-28a(+) Vektörüne Klonlanması ve Genin Ekspresyonu

2.4.1. GI Geninin Tamamını Çoğaltmak ve Ekspresyon Vektörüne Klonlamak İçin Primer Tasarlanması

GI geninin tamamını PCR ile çoğaltıp pET-28a(+) vektörüne aktarabilmek amacıyla bir set ileri (XylF2) ve geri primer (XylR2) tasarlandı (Tablo 7). İleri primer, başlama kodonundan önce *Nhe* I kesim bölgesi, geri primer ise gene ait DUR kodonundan sonra tekrar bir DUR kodonu ve *Hind* III kesim bölgesi içerecek şekilde tasarlandı (Şekil 12).

XylF2: 5'-GGCTAGCAT^{Met}GTCTTATTTCAACACCATCAACG-3'
Nhe I

XylR2: 5'-CAAGCTTGT^{DUR}CACTTA^{DUR}ACGGGTTGCACAAACTTCAAGC-3'
Hind III

Şekil 12. GI geninin tamamını çoğaltmak için tasarlanan ileri ve geri primerlerin nükleotid sıraları. GI geni için ileri primer (XylF2), başlama kodonundan önce *Nhe I* kesim bölgesini içerecek şekilde, geri primer (Xyl R2) ise gene ait DUR kodonundan sonra tekrar bir DUR kodonu ve *Hind III* kesim bölgesi içerecek şekilde tasarlandı.

2.4.2. GI Geninin Tamamının PCR İle Çoğaltılması

Genomik DNA, primerler, dNTP karışımı, tampon ve DNA polimerazın ilavesi ile bir reaksiyon karışımı hazırlandı (Tablo 18) ve uygun programa (Tablo 19) ayarlanan PCR cihazında reaksiyon gerçekleştirildi. PCR ürünleri % 1'lik agaroz jelde yürütüldü ve UV ışık altında incelendi.

2.4.3. PCR Ürünü ve pET-28a(+) Vektörünün *Nhe I* ve *Hind III* İle Kesilmesi

PCR ürünü temizleme kiti (Promega) kullanılarak saflaştırıldı. Daha sonra saf PCR ürünü ve pET-28a(+) vektörü *Nhe I* ve *Hind III* ile kesilerek her iki uçtan da sarkık uçların oluşması sağlandı.

PCR ürünü/pET-28a(+) vektörü	10 µL (yaklaşık 1 µg)
10X Buffer B	4 µL
10X BSA	0,5 µL
<i>Nhe I</i> (10 U/µL)	1 µL
<i>Hind III</i> (10 U/µL)	1 µL
dd H ₂ O	33,5 µL

Reaksiyon karışımları 37 °C'de 8 saat inkübe edildikten sonra, 80 °C'de 20 dakika daha bekletilerek enzimlerin inaktivasyonu sağlandı.

Tablo 18. PCR'ın bileşenleri

Bileşen	Kullanılan Miktar
dNTP karışımı (10 mM)	1 µL
İleri primer	1 µL (20 pmol)
Geri primer	1 µL (20 pmol)
MgCl ₂ çözeltisi (25 mM)	4 µL
5X Yeşil GoTaq Flexi reaksiyon tamponu	10 µL
GoTaq Flexi DNA polimeraz (5 U/µL)	0,25 µL
gDNA	1 µg
Nükleaz içermeyen su	Son hacim 50 µL'ye tamamlandı

Tablo 19. PCR reaksiyon şartları

	Sıcaklık (°C)	Zaman (dakika)	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95	2	1
Denatürasyon	94	1	
Primer Bağlanması	59	1	36
Uzama	72	2	
Son Uzama	72	5	1

2.4.4. Kesik PCR Ürününün Kesik pET-28a(+) Vektörüne Ligasyonu

Her iki uçtan da restriksiyon enzimleri ile kesilen DNA'lar etanol ile çöktürülerek agroz jelden PCR ürünü temizleme kiti (Promega) kullanılarak saflaştırıldı. T4 DNA Ligaz enzimi ile PCR ürünü pET-28a(+) vektörüne yapıştırıldı (Maniatis vd.,1989).

PCR ürünü <i>Nhe I/Hind III</i>	10 µL
pET-28a(+) vektörü <i>Nhe I/Hind III</i>	5 µL
10X ligaz tamponu	2,5 µL
T4 DNA Ligaz, HC (20 U/µL)	0,5 µL
Nükleaz içermeyen su	7,0 µL

Reaksiyon karışımı 16 °C'de 1 gece inkübe edildi.

2.4.5. Rekombinant pET-28a(+) Vektörünün *E. coli* BL21(DE3)pLysS Hücrelerine Transformasyonu

Ligasyon ürünü, önceden hazırlanan *E. coli* BL21(DE3)pLysS kompetent hücrelerine aktarıldı. Rekombinant vektörü içeren bu hücreler, 45 µL IPTG eklenip iyice yayılarak kurutulmuş olan 50 µg/mL kanamisinli LB agar içeren petrilerin üzerine yayma ekim yapılarak ekildi. 37 °C'de 1 gece bekletilerek plazmidi içeren hücrelerin büyümesi sağlandı. Bu ortamda büyüyen tüm koloniler seçilerek alındı ve 50 µg/mL kanamisin içeren LB besiyerine ekilerek 37 °C'de büyütülüp gece kültürleri hazırlandı. Elde edilen gece kültürlerinden gliserol stoğu hazırlandı ve plazmid izolasyonu yapıldı. İzole edilen plazmidler *Hind* III ve *Nhe* I enzimleri ile kesilerek gen parçasını içerip içermedikleri kontrol edildi.

2.4.6. GI'nın *E. coli* BL21(DE3)pLysS'de Ekspresyonu

Rekombinant pET-28a(+) vektörünü içeren *E. coli* BL21(DE3)pLysS gliserol stoğundan 50 µg/mL kanamisin içeren 3 mL LB besiyerine ekim yapıldı ve 37 °C'de 1 gece büyütülerek gece kültürü 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.

2.5. *E. coli* BL21(DE3)pLysS'de Ekspres Edilen GI'nın 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 6,0) tamponunda süspansiyon edilip, süspansiyona 0,5 mg/mL içerecek şekilde lizozim ilave edildi. 37 °C'de 30 dakika bekletildikten sonra hücreler % 80 şiddetinde, 1 devirde 5 dakika boyunca sonikasyona maruz bırakılarak 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 75 °C'de 10 dakika bekletildi ve denatüre olan proteinlerin 4 °C'de 10.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek uzaklaştırılması sağlandı.

Ekspres edilen GI, N- ucunda 6 tane histidin birimi içerdiğinden dolayı, nikel parçacıkları içeren “MagneHis Protein Purification System (Promega)” kullanılarak aşağıda belirtildiği gibi saflaştırıldı.

- Isı şoku yapılarak *E. coli*'den gelen proteinlerin kısmen uzaklaştırılmış olduğu eppendorf tüp içindeki 1 mL ham özüte 120 µL vortekslenmiş Ni ilave edilip, oda sıcaklığında 2 dakika alt üst edilerek karıştırıldı. Bu işlem ile N-ucunda bulunan 6 tane histidinden dolayı rekombinant 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.

2.5.1. SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (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 yığma jeli ve % 12'lik ayırma jeli kullanılarak gerçekleştirildi (Tablo 20).

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'de, daha sonra da ayırma jelinin alt kısmına gelene kadar yaklaşık olarak 1-1,5 saat 25 mA'de 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 20. SDS-PAGE'in bileşenleri

	% 5'lik Yığıma Jeli Bileşenleri (mL)	% 12'lik Ayırma Jeli Bileşenleri (mL)
Saf su	2,7	3,3
% 30'luk akrilamid/bisakrilamid	0,67	4,0
1,0 M Tris (pH 6,8)	0,5	---
1,5 M Tris (pH 8,8)	---	2,5
% 10'luk SDS	0,04	0,1
% 10'luk APS	0,04	0,1
TEMED	0,004	0,004

2.5.2. Protein Tayini

Protein tayini, Lowry yöntemiyle yapıldı (Lowry vd., 1951). Protein standardı olarak sığır serum albumini (BSA) kullanıldı. Farklı konsantrasyonlardaki sığır serum albumin çözeltisi, kalibrasyon grafiği için hazırlandı. Protein tayini için aşağıdaki işlemler yapıldı:

- BSA standartları, kör ve enzim elüatı 5'er mL Lowry C çözeltisi ile karıştırıldı.
- Oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.
- 0,5 mL Lowry D çözeltisi hızla tüplere eklendi ve vortekslendi.
- Tüpler 30 dakika karanlıkta bekletildi.
- 660 nm'de absorbanslar ölçüldü.
- Standart eğri grafiği hazırlanarak örneğin protein konsantrasyonu belirlendi.

2.6. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

2.6.1. GI Aktivitesinin Tayini ve Karakterizasyonu

GI aktivitesi spektrofotometrik olarak belirlendi. Reaksiyon 5 µl saf enzim kullanılarak, 100 mM Glukoz, 10 mM MgSO₄ ve 1 mM CoCl₂ pH'ı 7,0 olan 50 mM MOPS tamponu içerisinde, son hacim 100 µL olacak şekilde 60°C'de 30 dakika inkübe edildi. Reaksiyon, inkübasyon süresi sonunda, 0,5 M perklorik asit ilavesi ile durduruldu. Reaksiyon sonunda açığa çıkan fruktoz miktarı Dishe ve arkadaşlarının (1951) geliştirmiş olduğu sistein-karbozol-sülfürik asit yöntemi ile belirlendi. Reaksiyon çözeltisinin 20 µL'sinin üzerine sırasıyla 40 µL % 1,5'lik sistein hidroklorür ve bunu takiben 40 µL % 0,12'lik karbozol konuldu. Karışım vortekslelendikten sonra üzerine 1,2 ml % 70'lik sülfürik asit ilave edildi ve tekrar vortekslelendi. 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra spektrofotometrede 560 nm dalga boyunda ölçümler gerçekleştirildi. Fruktoz miktarı, hazırlanan fruktoz kalibrasyon eğrisine göre hesaplandı. Reaksiyonun gerçekleştirildiği tüm koşullar (reaksiyon sıcaklığı, reaksiyon pH'sı, substrat konsantrasyonu, enzim miktarı) enzim karakterize edildikçe yeniden düzenlenmiştir. Bir enzim ünitesi dakikada oluşan mikromol fruktoz olarak tanımlandı.

2.6.1.1. GI Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

GI aktivitesi üzerine pH'nın etkisini incelemek amacıyla aktivitenin ölçüldüğü rutin yöntemde kullanılan tampon yerine belirli pH değerlerinde tamponlar kullanıldı ve bu pH değerlerindeki aktivite tayinleri 60 °C'de gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan tamponların tamamı 50 mM konsantrasyonda olup farklı pH değerleri için sırasıyla asetat tamponu (pH 4,0-5,5), MOPS tamponu (pH 6,0-7,5) ve Tris-HCl tamponu (8,0-9,0) kullanıldı. Sonuçların değerlendirilmesi ile optimum pH değeri belirlendi.

Gözlenen optimum pH değeri daha sonra yapılacak olan optimum sıcaklık, pH ve ısı kararlılık, metal iyonu etkisi ve kinetik parametrelerin belirlenmesi gibi çalışmalarda reaksiyon pH'sı olarak kullanılmıştır.

2.6.1.2. GI Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

GI'nın en iyi aktivite gösterdiği sıcaklık, optimum pH değerinde 40-100 °C aralığında 10 °C'lik artışlarla yukarıda anlatıldığı şekilde belirlendi. Enzim aktivitesi için belirlenen optimum sıcaklık daha sonraki deneylerde reaksiyon sıcaklığı olarak kullanıldı.

2.6.1.3. GI Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi

Bu çalışmada substrat konsantrasyonu sabit tutulup, protein içeriği bilinen saf enzim özütünden belirli hacimlerde alınıp bir seri reaksiyon karışımı hazırlandı. Değişen protein miktarı ile aktivite ilişkisi incelendi.

2.6.1.4. GI Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

GI aktivitesinin K_m ve V_{maks} değerlerinin belirlenebilmesi için MOPS tamponu (50 mM, pH 6,5) içinde 2-200 mM son konsantrasyonda glukoz içeren reaksiyon karışımları hazırlandı. Bu karışımlar kullanılarak sabit enzim konsantrasyonunda aktivite tayinleri gerçekleştirildi ve Lineweaver-Burk grafiği çizilerek K_m ve V_{maks} değerleri hesaplandı.

2.6.1.5. GI'nın Isıl Kararlılığının İncelenmesi

Rekombinant enzimin ısı kararlılığını incelemek amacıyla, MOPS tamponu (50 mM, pH 6,5) içindeki saf enzim 60, 70, 80 ve 90 °C'lerdeki su banyolarında 1 saatlik zaman dilimlerinde 3 saate kadar bekletildi. Bu sürenin sonunda enzim çözeltisi buz içine alınarak 5 dakika bekletildi ve buzdan çıkartılıp oda sıcaklığına kadar ısınması beklendi. Daha sonra optimum şartlar altında aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Isı ile hiç muamele edilmemiş enzimin aktivitesi % 100 olarak kabul edilerek bekletilen enzimlerin % kalan aktiviteleri hesaplandı.

2.6.1.6. GI'nın pH Kararlılığının İncelenmesi

Enzimin pH kararlılığını incelemek amacıyla, saf enzim 1:1 oranında hepsi 50 mM olan pH 5,0-9,0 arasındaki tamponları ile karıştırıldı. Enzim-tampon karışımları 4 °C 1, 5, 10, 15 gün boyunca bekletildikten sonra optimum şartlar altında aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Aynı şekilde hazırlanmış fakat 4 °C'de bekletilmemiş enzim-tampon karışımlarının optimum şartlar altında aktiviteleri bakılarak bu değerler % 100 olarak kabul edildi ve bu değerlerden faydalanılarak bekletilen enzimlerin % kalan aktiviteleri hesaplandı.

2.6.1.7. GI 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+} , Sn^{2+} ve Cu^{2+} iyonlarının klorür tuzlarının 100 mM'lık stok çözeltileri kullanıldı. Reaksiyon karışımlarına son konsantrasyonları 5 mM olacak şekilde her bir metal iyonundan ilave edilerek optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Metal iyonu içermeyen karışımın aktivitesi % 100 olarak kabul edilip metal iyonu ilavesi durumunda % kalan aktiviteler hesaplandı.

3. BULGULAR

3.1. Genomik DNA Kütüphanesinin Oluşturulması

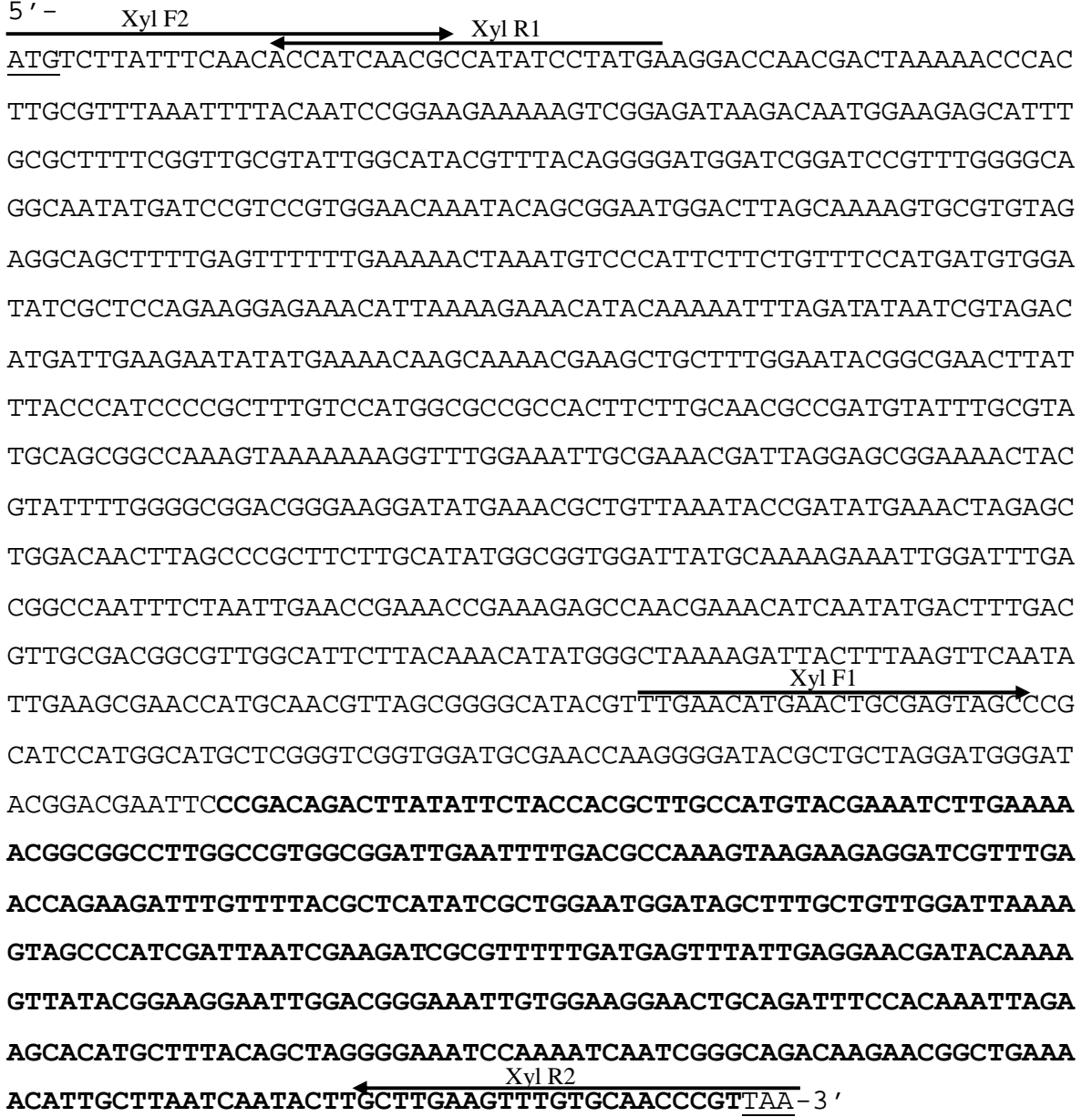
Genomik DNA kütüphanesi oluşturmak için, *Geobacillus caldoolyolyticus* TK4 (*G. caldoolyolyticus* TK4) genomik DNA'sı *EcoR* I restriksiyon enzimi ile kesilerek elde edilen fragmentler pUC18 plazmidine klonlandı ve *Escherichia coli* JM101 hücrelerine aktarıldı. Yaklaşık 250 rekombinant plazmid, izole edilerek uygun şartlarda saklandı. Bu klonlardan 50 tanesinden plazmid izolasyonu yapıldı ve bu plazmidlerin DNA sıraları belirlendi. DNA sıraları protein sırası haline dönüştürüldükten sonra BLAST programı ile incelendi ve 43 ve 96 nolu klonların içindeki DNA parçaları uygun şekilde birleştirildiğinde oluşan sıranın, *Geobacillus stearothermophilus* ksiloz izomerazına % 96 oranında benzerlik gösterdiği tespit edildi. Ayrıca genin baş kısmından yaklaşık 927 baz çiftinin sırasının belli olduğu ama bu bölgeden itibaren 399 bazlık kısmın eksik olduğu belirlendi (Şekil 13).

3.2. Glukoz İzomeraz (GI) Geninin Eksik Kalan Son Kısmının İvers PCR ile Bulunması

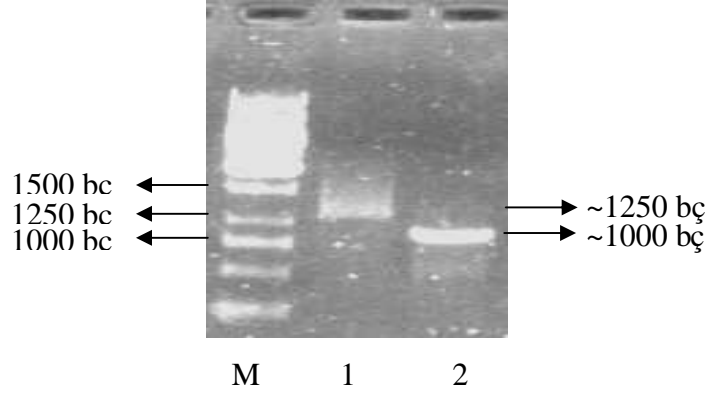
GI geninin son kısmında bulunan yaklaşık 400 bazlık kısmının DNA sırasının, invers polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile bulunabilmesi için *G. caldoolyolyticus* TK4 genomik DNA'sı, *Hinf* I ve *Pst* I enzimleri ile uygun şartlar altında kesilerek, DNA parçaları oluşturuldu. *Hinf* I ve *Pst* I kesiği DNA parçalarının her birinin kendi üzerine yapışarak dairesel forma dönüşmesi için T4 DNA Ligaz enzimi kullanılarak ligasyon yapıldı ve ligasyon ürünü etanol ile çöktürülerek invers PCR için kalıp DNA hazır hale getirilmiş oldu. XylF1/XylR1 ileri ve geri primerleri ve kalıp DNA kullanılarak invers PCR yapıldı. Sonuçların % 1'lik agaroz jelde incelenmesi ile yaklaşık 1000 ve 1250 bazlık DNA parçalarının varlığı gözlemlendi (Şekil 14).

Elde edilen PCR ürünleri saflaştırıldıktan sonra pGEM-T Easy vektörüne klonlandı ve rekombinant vektör *E. coli* JM101'e aktarıldı. Büyüyen beyaz kolonilerden izole edilen plazmidler, DNA sıra analizine gönderildi. Elde edilen DNA sıralarının protein sırası haline dönüştürüldükten sonra BLAST programı ile incelenmesi sonucunda, genin

eksik olan yaklaşık 399 bazlık son kısmının DNA sırasının belirlendiği tespit edildi (Şekil 13).



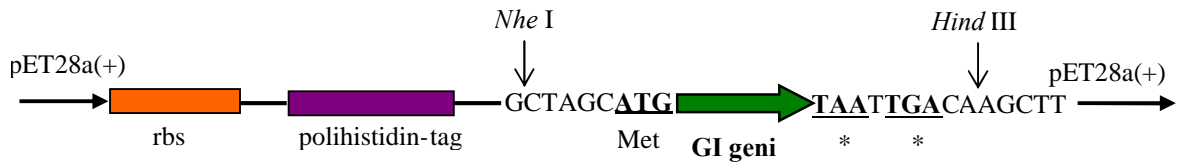
Şekil 13. *G. caldoxylolyticus* TK4 genomik DNA'sının GI geninin sekansı. Koyu yazılan DNA sırası invers PCR ile bulunan kısmı ifade etmektedir. Üstü çizili kodonlar genin Metiyonun (ATG) ve DUR (TAA) kodonlarını göstermektedir. Oklarla gösterilen bölgeler invers PCR için kullanılan primerlerin (XylF1, XylR1) tam DNA sıralarını ve genin tamamını çoğaltmak için kullanılan primerlerin (XylF2 ve XylR2) DNA sıralarının bir kısmını göstermektedir.



Şekil 14. İners PCR ürünlerinin % 1'lik agaroz jeldeki görüntüsü. M: 1 kb'lik DNA standardı, 1: *Hinf* I ile kesilerek oluşturulan DNA kalıbının PCR ürünü, 2: *Pst* I ile kesilerek oluşturulan DNA kalıbının PCR ürünü

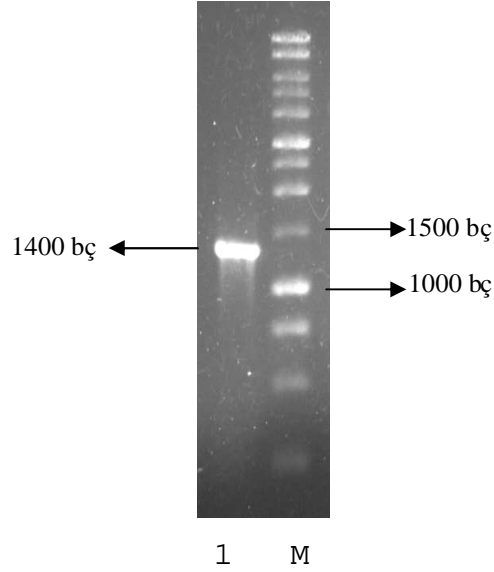
3.3. GI Geninin pET-28a(+) Vektörüne Klonlanması, Ekspresyonu ve Saflaştırılması

GI geninin tam sırasının incelenmesi sonucu, genin ekspresyonu için seçilen pET-28a(+) vektörüne klonlanması ve ekspresyonu için uygun primerler dizayn edildi (Xyl F2 ve Xyl R2). pET-28a(+) vektörü ribozom bağlanma bölgesi (rbs)'nden sonra ve *Nde* I kesim bölgesinin hemen önünde 6 tane histidin kodlayan kodon (polihistidin-tag) içermektedir. GI geninin tamamı PCR ile çoğaltıldıktan sonra 5'-ucundan *Nhe* I ve 3'-ucundan ise *Hind* III ile kesilip yine aynı enzimlerle kesilen pET-28a(+) vektörüne klonlandığı durumda rekombinant vektör GI'nin başlama kodonundan hemen önce 6 tane histidin kodlayan kodon içerecektir (Şekil 15). Bu şekilde GI, N- ucunda 6 tane histidin amino asidi (histidin kuyruğu) içerecek şekilde ekspres edilecektir.



Şekil 15. GI geninin pET-28a(+) vektörüne klonlandığı bölgenin şematik gösterimi. Turuncu ile gösterilen bölge ribozom bağlanma bölgesini (rbs), mor ile gösterilen bölge 6 tane histidin birimini, yıldızla gösterilen kodonlar ise "DUR" sinyallerini göstermektedir.

GI geninin tamamını çoğaltabilmek için tam DNA sırası dikkate alınarak bir set primer (XylF2/XylR2) tasarlandı ve sentezletirildi. *G. caldxylolyticus* TK4 genomik DNA'sı ve bu primerler kullanılarak yapılan PCR sonucunda yaklaşık 1000-1500 bazlık bir DNA parçasının varlığı gözlemlendi (Şekil 16).



Şekil 16. PCR ile tamamı çoğaltılan GI geninin % 1'lik agaroz jeldeki görüntüsü. 1: PCR ile çoğaltılan GI geni, M: 1 kb'lik DNA standardı

Elde edilen PCR ürünü *Nhe* I ve *Hind* III enzimi ile kesilip, yine aynı enzimlerle kesilen pET-28a(+) vektörüne klonlandı. Rekombinant vektör *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücrelerine aktarıldı, elde edilen kolonilerden istenilen fragmanı içerenler seçildi ve bu klonu içeren koloninin gece kültürü hazırlanarak gerektiğinde kullanılmak üzere gliserol stok yapıldı. Stok kültür -20 °C'de saklandı.

GI geninin tam DNA sırası protein sırasına dönüştürüldükten sonra (Şekil 17) BLAST programında incelendi ve amino asit sırasının GI olarak bilinen D-glukoz\ksiloz izomerazlara (EC 5.3.1.5) yüksek oranda benzerlik gösterdiği saptandı (URL-10).

G. caldxylolyticus TK4 GI'sının amino asit sırası ClustalW programı (URL-11) kullanılarak *G. stearothermophilus*, *G. thermodenitrificans*, *G. kaustophilus*, *B. halodurans*, *B. coagulans* amino asit sıraları ile karşılaştırıldı ve korunmuş bölgeleri tespit edildi (Şekil 18).

5' -

atgtcttattttcaacacccatcaacgccatatcctatgaaggaccaacgactaaaaaccca
M S Y F N T I N A I S Y E G P T T K N P
cttgcgttttaaatTTTtacaatccggaagaaaaagtcggagataagacaatggaagagcat
L A F K F Y N P E E K V G D K T M E E H
ttgcgcttttcggttgcgtattggcatacgtttacaggggatggatcggatccgtttggg
L R F S V A Y W H T F T G D G S D P F G
gcaggcaatatgatccgtccgtggaacaaatacagcggaatggacttagcaaaagtgcgt
A G N M I R P W N K Y S G M D L A K V R
gtagaggcagcttttgagttttttgaaaaactaaatgtcccattcctctgtttccatgat
V E A A F E F F E K L N V P F F C F H D
gtggatcgcctccagaaggagaaacattaaaagaaacatacaaaaatttagatataatc
V D I A P E G E T L K E T Y K N L D I I
gtagacatgattgaagaatatatgaaaacaagcaaaacgaagctgctttggaatacggcg
V D M I E E Y M K T S K T K L L W N T A
aacttattttaccatccccgctttgtccatggcgccgacttcttgcaacgccgatgta
N L F T H P R F V H G A A T S C N A D V
tttgcgatgcagcggccaaagtaaaaaaaggtttggaaattgcgaaacgattaggagcg
F A Y A A A K V K K G L E I A K R L G A
gaaaactacgtatTTTtggggcggacgggaaggatatgaaacgctgttaaataccgatatg
E N Y V F W G G R E G Y E T L L N T D M
aaactagagctggacaacttagcccgttcttgcatatggcgggtggattatgcaaaagaa
K L E L D N L A R F L H M A V D Y A K E
attggatttgacggccaatttctaattgaaccgaaaccgaaagagccaacgaaacatcaa
I G F D G Q F L I E P K P K E P T K H Q
tatgactttgacgttgcgacggcgttggcattccttacaacatatgggctaaaagattac
Y D F D V A T A L A F L Q T Y G L K D Y
ttaaagttcaatattgaagcgaaccatgcaacgtttagcggggcatacgtttgaacatgaa
F K F N I E A N H A T L A G H T F E H E
ctgcgagtagcccgcacatccatggcatgctcgggtcgggtggatgcaaccaaggggatagc
L R V A R I H G M L G S V D A N Q G D T
ctgctaggatgggatacggacgaattccccgacagacttatattctaccacgcttgccatg
L L G W D T D E F P T D L Y S T T L A M
tacgaaatccttgaaaaacggcggccttggccgtggcggattgaattttgacgccaagta
Y E I L K N G G L G R G G L N F D A K V
agaagaggatcgtttgaaccagaagattttgTTTTacgctcatatcgctggaatggatagc
R R G S F E P E D L F Y A H I A G M D S
tttgcgtttggattaaaagtagcccatcgattaatcgaagatcgcgTTTTgatgagttt
F A V G L K V A H R L I E D R V F D E F
attgaggaacgatacaaaaagttatacggaaaggaattggacgggaaattgtggaaggaact
I E E R Y K S Y T E G I G R E I V E G T
gcagatttccacaaattagaagcacatgctttacagctaggggaaatccaaaatcaatcg
A D F H K L E A H A L Q L G E I Q N Q S
ggcagacaagaacggctgaaaacattgcttaataacttgccttgaagtttgtgcaacc
G R Q E R L K T L L N Q Y L L E V C A T
cgt**taa**- 3'

R ●●●

Şekil 17. *G. caldoxylolyticus* TK4 GI'sının DNA ve protein sırası. (●●●) ile gösterilen kodon genin DUR kodonunu temsil etmektedir.

<i>G. stearothermophilus</i>	-MPYFDNISTIAAYEGPASKNPLAFKFYNPEEKVGDKTMEEHLRFSVAYWH	49
<i>G. caldoxylolyticus_T</i>	-MSYFNTINAIISYEGPTTKNPLAFKFYNPEEKVGDKTMEEHLRFSVAYWH	49
<i>G. termodenitrifican</i>	-MAYFPNIGKIAAYEGPESRNPFAFKFYNPEEKVGGKTMEEHLRFSVAYWH	49
<i>G. kaustophilus_HTA42</i>	-MAYFPNIGTIPYEGPESRNPFAFKFYNPDEKVGKTMEEHLRFSVAYWH	49
<i>B. coagulans_36D1</i>	MMAYFPNVSKITYSGKQLKSGLSFNHYNPKELVGGKTMEEQLRFSVAFWH	50
	.: : : *. * . :*:.*.* * . .*.* *:*****:***	
<i>G. stearothermophilus</i>	TFTGDGSDPFGAGNMIRPWNKYSGMDLAKARVEAAFEFFFEKLNIPFFCFH	99
<i>G. caldoxylolyticus_T</i>	TFTGDGSDPFGAGNMIRPWNKYSGMDLAKVRVEAAFEFFFEKLNVPFFCFH	99
<i>G. termodenitrifican</i>	TFTGDGSDPFGVGNMIRPWDKYSMDLAKARVEAAFEFFFEKLNVPFFCFH	99
<i>G. kaustophilus_HTA42</i>	TFTGDGSDPFGVGNMIRPWNTYSGMDLAKARVEAAFEFFFEKLNVPFFCFH	99
<i>B. coagulans_36D1</i>	TFTESGTDPEGAGSKIRPWRFTGMDLAKARVEAAFEFFFEKLGNPYFCFH	100
	** . .*:*****.* . ***: :*:***** .*****:***** . *:*****	

Şekil 18. *G. caldoxylolyticus* TK4 GI'sının amino asit *G. stearothermophilus*, *G. shermodenitrifican*, *G. saustophilus*, *S. halodurans*, *B. coagulans* GI'larının amino asit sıraları ile karşılaştırılması. Kırmızı renk ile boyalı amino asitler substrat bağlanma cebini oluşturan, sarı renk ile boyalı amino asitler katalitik etkinlikte rol oynayan, mavi renk boyalı amino asitler metal bağlanma bölgesini oluşturan amino asitlerdir. Gri renk ile boyalı amino asitler katalitik etkinlikte rol oynarlar aynı zamanda metal bağlamaya katkıda bulunurlar. Yeşil renk ile boyalı amino asitler substrat bağlanma cebini oluşturan ve aynı zamanda metal bağlamada etkili olan amino asitlerdir. "*" Aynı amino asit birimlerini, "." ve ":" benzer amino asit birimlerini ifade etmektedirler.

Şekil 18'in devamı

G. stearothermophilus DVD IAPEGETLKETYKNLDI IVDMIEEYMKTSKTKLLWNTANLFTHPRFV 149
G. caldoxylolyticus TK4 DVD IAPEGETLKETYKNLDI IVDMIEEYMKTSKTKLLWNTANLFTHPRFV 149
G. termodenitrificans DVD IAPEGETLSEYKLNDE IVDMIEEYMKTSKTKLLWNTANLFSHPRFV 149
G. kaustophilus HTA42 DVD IAPEGETLSEYKLNDE IVDMIEEYMKTSKTKLLWNTANLFSHPRFV 149
B. coagulans 36D1 DRD IAPEGDTLRETNKNLDVIVAMIKDYMKTSKVKLLWNTANMFTNPRFV 150
 * *:****:* * :* **** ** *::*****.*****:*::**:*

G. stearothermophilus HGAATSCNADVFAAAAQVKKGLEIAKRLGAENYVFWGGREGYETLLNTD 199
G. caldoxylolyticus TK4 HGAATSCNADVFAAAAQVKKGLEIAKRLGAENYVFWGGREGYETLLNTD 199
G. termodenitrificans HGAATSCNADVFAAAAQVKKGLEIAKRLGAENYVFWGGREGYETLLNTD 199
G. kaustophilus HTA42 HGAATSCNADVFAAAAQVKKGLEIAKRLGAENYVFWGGREGYETLLNTD 199
B. coagulans 36D1 HGAASSCNADVFAAAAQVKKGLEIVGKELGAENYVFWGGREGYETLLNTD 200
 *****: * *****:*****:*****: . * .*****:*****:*****:

G. stearothermophilus MKLELDNLARFLHMAVDYAKEIGFDGQFLI EPK PKEPTKHQYDFDVATRL 249
G. caldoxylolyticus TK4 MKLELDNLARFLHMAVDYAKEIGFDGQFLI EPK PKEPTKHQYDFDVATAL 249
G. termodenitrificans MKLELDNLARFFHMAVDYAKEIGFDGQFLI EPK PKEPTKHQYDFDVATAL 249
G. kaustophilus HTA42 MKLELDNLARFLHMAVDYAKEIGFDGQFLI EPK PKEPTKHQYDFDVATAL 249
B. coagulans 36D1 LKLEQDNLARFFHMAVDYAKEIGFDAQFLLEPK PKEPTKHQYDFDAATTI 250
 :*** *****:*****:*****.***:*****:*****.*** :

G. stearothermophilus AFLQTYGLKDYFKFNI EANHATLAGHTFEHEL RVARIHGMLGSVDANQGD 299
G. caldoxylolyticus TK4 AFLQTYGLKDYFKFNI EANHATLAGHTFEHEL RVARIHGMLGSVDANQGD 299
G. termodenitrificans AFLQTYGLKDYFKFNI EANHATLAGHTFEHEL RVARIHGMLGSVDANQGD 299
G. kaustophilus HTA42 AFLQTYGLKDYFKFNI EANHATLAGHTFEHEL RVARIHGMLGSVDANQGD 299
B. coagulans 36D1 AFLKTYDLQHFKNLE EANHATLAGHTFEHEIRVARTHGLLGSVDANQGD 300
 :*. * .::*****:*****:*****:*** * .:***:*****

Şekil 18'in devamı

<i>G. stearothermophilus</i>	MLLGWDTDEFPTDLYSTTLAMYEILKNGGLGRGGLNFD	AKVRRGSFEPED	349
<i>G. caldoxylolyticus</i> TK4	TLLGWDTDEFPTDLYSTTLAMYEILKNGGLGRGGLNFD	AKVRRGSFEPED	349
<i>G. termodenitrificans</i>	MLLGWDTDEFPTDLYATTLAMYEILQNGGLGRGGLNFD	AKVRRGSFEPED	349
<i>G. kaustophilus</i> HTA42	TLLGWDTDEFPTDLYTTTLAMYEILQNGGLGRGGLNFD	AKVRRGSFEPED	349
<i>B. coagulans</i> 36D1	PLLGWDTDEFPTDLYSTTLAMYEVLKNGGLGRGGLNFD	AKTRRASFTDED	350
	*****:*****:*:* .***:***** .** .** :*		
<i>G. stearothermophilus</i>	LFYAHIAGMDSFAVGLKVAHRLIEDRVFDEFIEERYKSYTEGIGREIVEG		399
<i>G. caldoxylolyticus</i> TK4	LFYAHIAGMDSFAVGLKVAHRLIEDRVFDEFIEERYKSYTEGIGREIVEG		399
<i>G. termodenitrificans</i>	LFYAHIAGMDSFAIGLKVAHRLLEDRVFEQFIEERYKSYTEGIGREIVEG		399
<i>G. kaustophilus</i> HTA42	LFYAHIAGMDSFAIGLKVAHRLLEDRVFEQFIEERYKSYTEGIGREIVEG		399
<i>B. coagulans</i> 36D1	LFYAHIAGMDSFALGLKVANRLIEDRVFDAFIEERYSSYKEGIGADIVSG		400
	: .** .*** .* .*		
<i>G. stearothermophilus</i>	TADFHKLEAHALQLGEIQNQSGRQERLKTLLNQYLLEVCAAR----		441
<i>G. caldoxylolyticus</i> TK4	TADFHKLEAHALQLGEIQNQSGRQERLKTLLNQYLLEVCATR----		441
<i>G. termodenitrificans</i>	TADFHKLEQYALQLGEIRNTSGRLERLKTLLNQYLLEVSVPKARL		445
<i>G. kaustophilus</i> HTA42	TADFKKLEEYALQLGDIRNTSGRLERLKTLLNQYLLEVSAPSGSRS		445
<i>B. coagulans</i> 36D1	KADFKSLENYILDKKEIINQSGRLEQLKNTLNHYIVQEAYQSVNA-		445
	::: .** : * . :* : ** : *:* **:*:* .		

E.coli BL21(DE3)pLysS suşunda ekspres edilen GI proteini N- ucunda 6 tane histidin içerdiğinden dolayı nikel parçacıkları kullanılarak saflaştırıldı. GI'daki bu histidin birimlerinin azotları nikel parçacıkları ile etkileşerek GI'nın diğer proteinlerden ayrılmasını sağlamaktadır.

3.4. GI'nın Biyokimyasal Karakterizasyonu

3.4.1. Protein Tayini

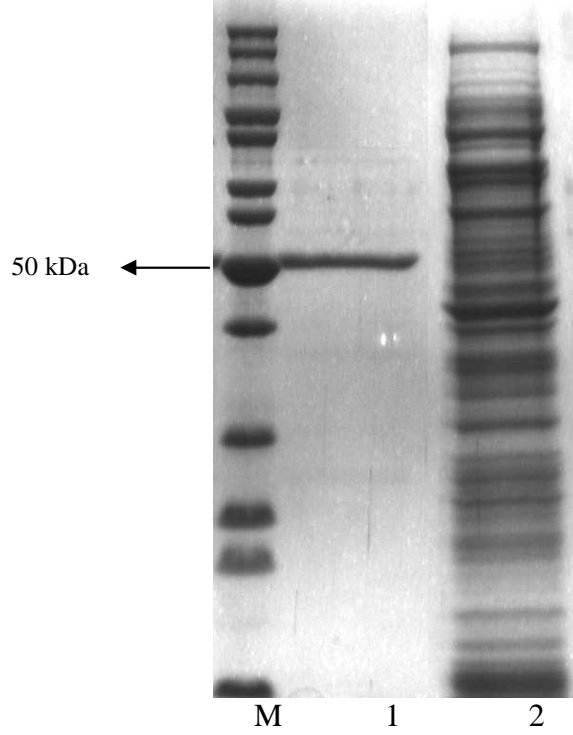
Protein tayini Lowry (1951) metoduna göre gerçekleştirildi ve protein standardı olarak BSA kullanıldı. Saflaştırılan GI'ların protein miktarlarının yaklaşık olarak 4,0 ile 8,0 mg/mL arasında olduğu belirlendi.

3.4.2. SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

GI'nın yaklaşık moleküler ağırlığı ve farklı alt birimler içerip içermediği sodyum dodesil sülfat (SDS) jel elektrofrez ile tespit edilmiştir.

Yaklaşık 35 µg protein % 12'lik SDS-PAGE jeline yüklenerek elektrofrez yapıldı. Elektrofrez jelinin Coomassie Brilliant Blue R250 ile boyanıp fazla boyanın uzaklaştırılması sonucunda GI geninin *E. coli*'de ekspres edildiği ve kullanılan kit ile etkili bir biçimde saflaştırıldığı tespit edildi (Şekil 19).

Amino asit sırasından faydalanarak yapılan teorik hesaplamada (URL-12, 2008) GI'nin molekül ağırlığı 50,18 kDa olarak bulundu. Fakat GI geni pET-28a(+) vektöründe ekspres edildiğinden dolayı başlama sinyalinden önceki polihistidin ve diğer amino asitlerin de göz önüne alınması gerekmektedir. Bu şekilde yapılan hesaplama sonucunda pET-28a(+) vektöründe ekspres edilen GI'nın moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 52,64 kDa olarak bulundu. Dolayısıyla teorik ve deneysel molekül ağırlıklarının birbirine oldukça yakın olduğu görülmektedir.



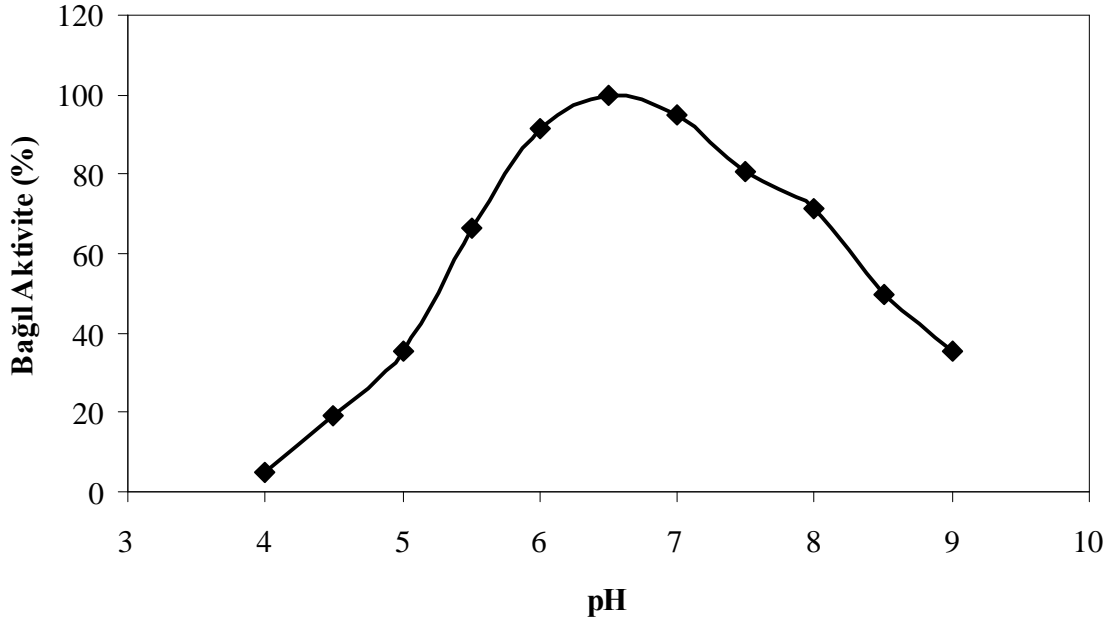
Şekil 19. SDS-PAGE elektroforezi. M: Moleküler ağırlık standartları, 1: Saf protein, 2: IPTG ile 3 saat indüklenmiş rekombinant *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücre içi özütü

3.4.3. Glukoz Substratı ile Aktivite Tayini

G. caldxylolyticus TK4 GI'sının glukoz varlığında enzimin spesifik aktivitesi 0,35 U/mg protein olarak belirlendi. *G. caldxylolyticus* TK4 suşundan klonlanan ve *E. coli*'de ekspres edilen GI'nın detaylı bir şekilde karakterizasyonu için aktivite üzerine pH, sıcaklık, substrat konsantrasyonu, protein konsantrasyonu, metal iyonu etkisi incelendi. Ayrıca enzimin ısıl ve pH kararlılığı belirlendi.

3.4.4. GI Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

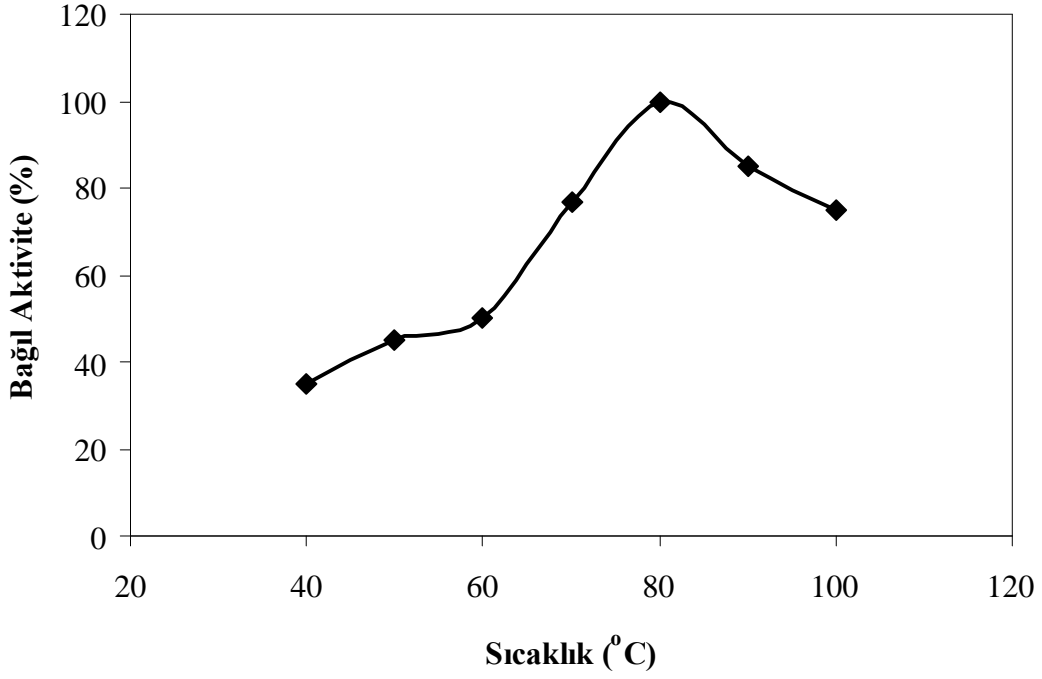
GI aktivitesi üzerine pH'ın etkisi ve en yüksek etkinlik gösterdiği pH'ın belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada, pH 4,0-9,0 arasında tamponlarla reaksiyon karışımları hazırlandı. Her bir tamponla hazırlanan reaksiyon karışımları için aktiviteler belirlenerek pH değerlerine karşılık gelen aktivitelerle bir pH-% Bağlı Aktivite eğrisi elde edildi (Şekil 20). Enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değeri 6,5 olarak belirlendi.



Şekil 20. GI aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

3.4.5. GI Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

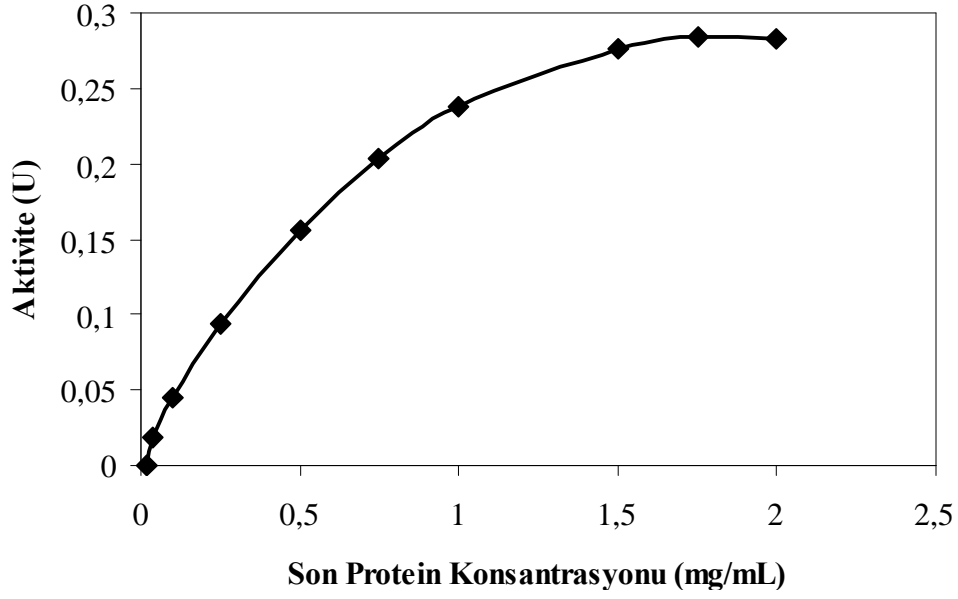
Sıcaklığın GI'nın aktivitesi üzerine etkisi ve optimum sıcaklığın tayini çalışması 10 °C'lik artışlarla olmak üzere 40-100 °C arasındaki sıcaklıklarda aktivite tayinleri yapılarak incelendi ve Sıcaklık-% Bağlı Aktivite grafiği çizildi (Şekil 21). GI aktivitesinin 80 °C'de optimuma ulaştığı ve enzimin 90 °C'de ve 100 °C'de optimum aktivitesinin sırasıyla yaklaşık % 85'ini ve % 75'ini koruduğu gözlemlendi. Buna göre, çizilen grafik, saf proteinler için tipik olan ve tek bir maksimumun olduğu bir eğri şeklindedir.



Şekil 21. GI aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

3.4.6. GI Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi

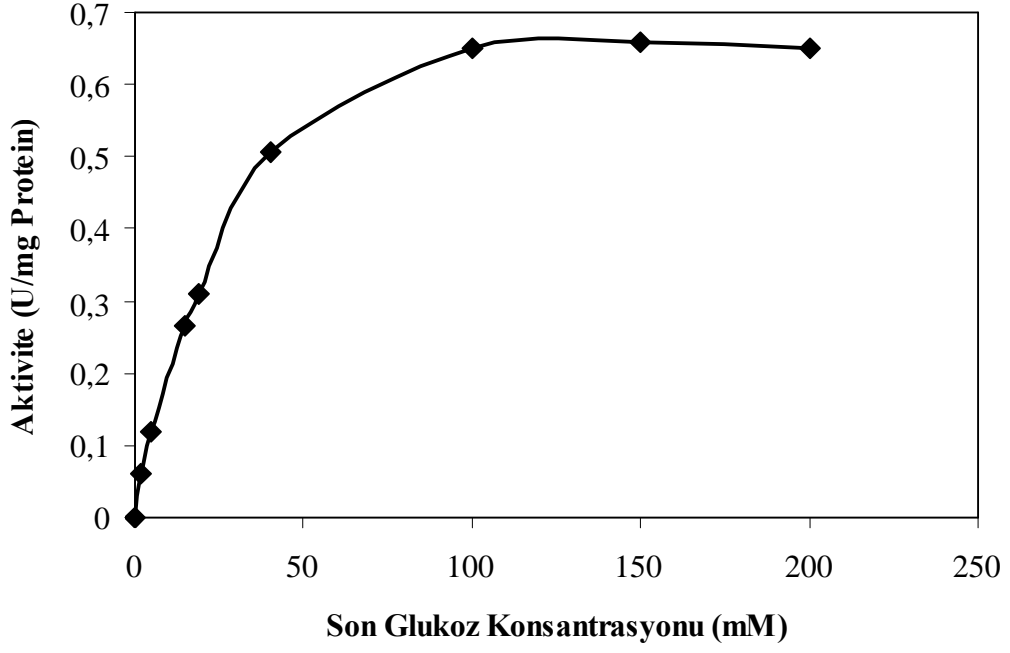
Sabit substrat konsantrasyonunda GI aktivitesinin protein miktarına bağımlılığını incelemek amacıyla reaksiyon karışımında ayrı ayrı 0,02-2 mg/mL arasındaki değerlerde son konsantrasyonda protein içerecek şekilde enzim çözeltileri kullanılarak aktivite tayinleri yapıldı. Daha sonra protein konsantrasyonuna karşı aktivite değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 22). Şekil 22'deki hiperbolik eğriden de görüleceği gibi, 100 mM substrat konsantrasyonunda maksimum aktivitenin gözlendiği optimum enzim konsantrasyonu 1,75 mg/mL olarak belirlendi.



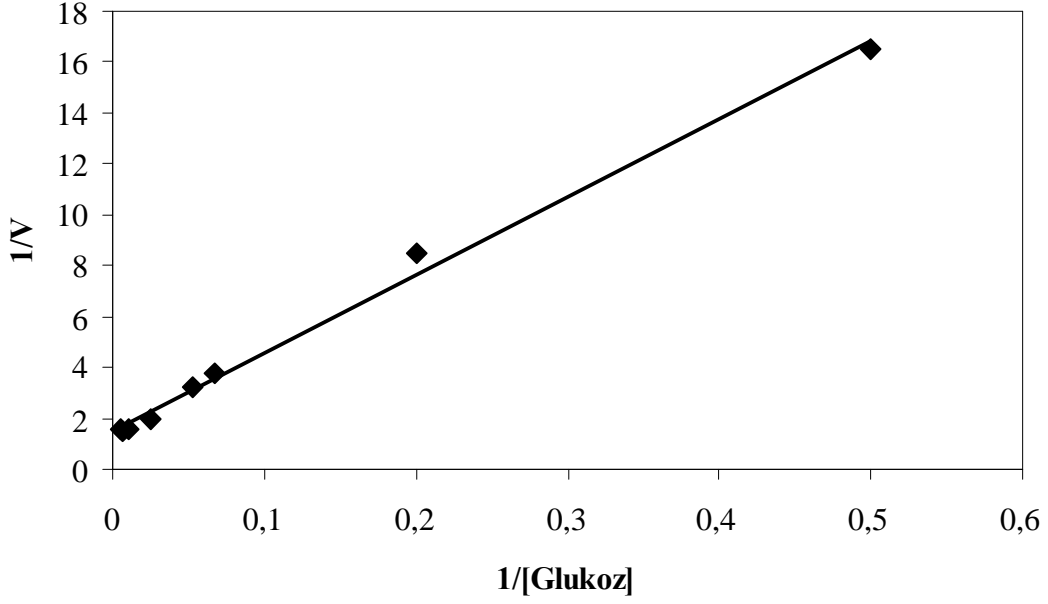
Şekil 22. GI aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisi

3.4.7. GI Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

GI aktivitesinin çeşitli kinetik verilerle ifade edilmesi amacı ile sabit enzim konsantrasyonunda ve 2-200 mM son glukoz konsantrasyonunda aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Elde edilen veriler kullanılarak substrat doygunluk eğrisi (Şekil 23) ve Lineweaver-Burk (Şekil 24) grafiği çizildi. Substrat doygunluk eğrisi incelendiğinde, enzimin basit Michaelis-Menten kinetiğini takip ettiği belirlendi ve 100 mM substrat konsantrasyonu değerine kadar aktivitede bir artış gözlemlendi, ancak daha yüksek substrat konsantrasyon değerlerinde ise enzimin doygunluk noktasına ulaşması nedeniyle aktivitenin bu optimum değerde sabit kaldığı gözlemlendi. Bu nedenle, bundan sonraki karakterizasyon çalışmalarında reaksiyon karışımındaki substrat konsantrasyonu, 100 mM olacak şekilde ayarlandı. Lineweaver-Burk eğrisinden ise K_m ve V_{maks} değerleri sırasıyla 20,58 mM ve 0,67 U/mg protein olarak tespit edildi.



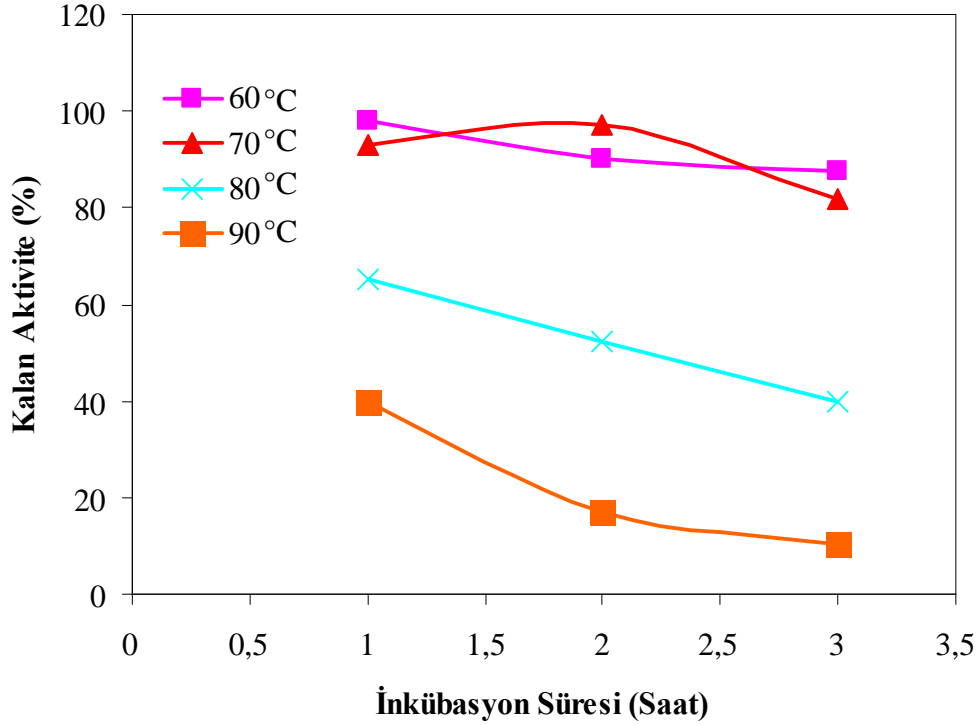
Şekil 23. Glukoz varlığında GI'nın substrat doygunluk eğrisi



Şekil 24. Glukoz varlığında GI'nın Lineweaver-Burk eğrisi

3.4.8. GI'nın Isıl Kararlılığının İncelenmesi

Enzimin ısıl kararlılığı, MOPS tamponu (50 mM, pH 6,5) içindeki saf enzimin 60, 70, 80 ve 90 °C'lerdeki su banyolarında 1, 2 ve 3 saat 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 grafiği çizildi (Şekil 25). Enzimin aktivitesinin 80 ve 90 °C'lerde birinci saatten itibaren hızlıca düştüğü, 3 saatin sonunda ise aktivitenin sırasıyla % 60 ve % 90 oranında azaldığı belirlendi.

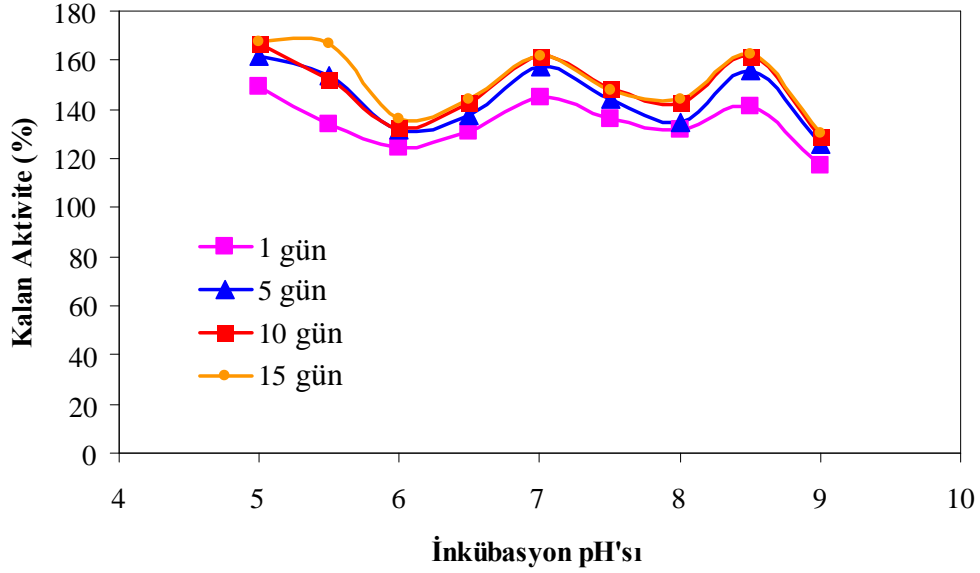


Şekil 25. GI'nın ısıl kararlılık eğrisi

3.4.9. GI'nın pH Kararlılığının İncelenmesi

Enzimin pH kararlılığını incelemek amacıyla, saf enzim 1:1 oranında pH 5,0-9,0 arasındaki tamponlarla karıştırılarak ayrı ayrı 4 °C'de 1, 5, 10 ve 15 gün bekletildikten sonra, sonra optimum şartlar altında aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Aynı şekilde

hazırlanmış fakat hiç bekletilmemiş enzim-tampon karışımlarının optimum şartlar altında aktiviteleri bakılarak bu değerler % 100 olarak kabul edildi ve bu değerlerden faydalanarak bekletilen enzimlerin % kalan aktiviteleri hesaplandı. Daha sonra inkübasyon pH'sına karşı % kalan aktiviteler grafiği geçirildi (Şekil 26).



Şekil 26. GI'nin 4 °C'deki pH kararlılık eğrisi

Şekil 26'dan da görüldüğü gibi enzim farklı pH'lardaki tamponlar içinde 4 °C'de inkübe edildiğinde aktivitede herhangi bir azalma olmamakta hatta önemli ölçüde artış olmaktadır.

3.4.10. GI Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi

GI aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek amacı ile Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} ve Cu^{2+} , Sn^{2+} ve Ni^{2+} iyonlarının klorür tuzlarının reaksiyon karışımındaki son konsantrasyonları 5 mM olacak şekilde optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Metal iyonu içermeyen karışımın aktivitesi % 100 olarak kabul edilip metal iyonu ilavesi durumunda % kalan aktiviteler hesaplandı (Tablo 20).

Tablo 21. GI aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi

Metal İyonu (5 mM)	% Kalan Aktivite
Yok	100
Mg ²⁺	160
Mn ²⁺	210
Zn ²⁺	25
Ca ²⁺	75
Co ²⁺	300
Cu ²⁺	05
Sn ²⁺	80
Ni ²⁺	20

Tablo 21' den de görüldüğü gibi Mg²⁺, Mn²⁺ ve Co²⁺ varlığında GI'aktivitesinde dikkate değer bir artış gözlemlendi. Zn²⁺, Ca²⁺, Cu²⁺, Sn²⁺, Ni²⁺, varlığında ise farklı oranlarda inhibisyon gözlemlendi.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Hayatın var olabilmesi için gerekli doğal katalizörler olan enzimler, farklı organizmalardaki davranışları ve özellikleri açısından 2 asırdır incelenmektedir.

Isıya dayanıklı enzimlerin, yüksek sıcaklıklarda büyüeyebilen organizmalardan elde edildiği bilinmektedir. Termofillerin, mezofillere göre yüksek ısı kararlılığı, onların biyolojik uygulamalar için özel uygulama alanı bulmalarına yol açmıştır (Faiz, 2005).

Gerçekleştirilen çalışmada, Çanakkale Kestanbol kaplıcasından izole edilen, çeşitli morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal, moleküler ve DNA hibridizasyonu analizi ile yeni bir tür olduğu ortaya konulan *Geobacillus caldoxylolyticus* TK4 (*G. caldoxylolyticus* TK4) suşundan, glukoz izomeraz geni, indüklenebilir T7 RNA polimeraz promotörü içeren pET28a(+) vektörüne klonlanıp, *Escherichia coli*'de (*E. coli*) ekspres edilmiştir. Ekspres edilen enzim saflaştırılıp, glukoz izomeraz (GI) aktivitesi spektroskopik olarak ortaya konulmuştur.

G. caldoxylolyticus TK4 genomik DNA'sının *EcoR* I enzimi kesikleri ile genomik DNA kütüphanesi oluşturularak yakalanan D-glukoz izomeraz geninin, 927 bazlık kısmı klon 43 ve klon 96'nın içinde bulunmaktadır. Bu da genin *EcoR* I kesim bölgesi içerdiğini göstermektedir. İnvers PCR ile geri kalan parçanın yakalanması ile birlikte genin 1326 baz ve 441 amino asitten oluştuğu tespit edilmiştir (Şekil 13).

Amino asit sırasının BLAST programı kullanılarak diğer organizmalardaki GI'larla karşılaştırılması sonucu, *G. caldoxylolyticus* TK4 GI'sı amino asit sırasının *Geobacillus stearothermophilus* GI'sının amino asit sırasına % 97, *Geobacillus thermodenitrificans* GI'sının amino asit sırasına % 92, *Geobacillus kaustophilus* GI'sının amino asit sırasına % 92, *Bacillus clausii* GI'sının amino asit sırasına % 79, *Bacillus halodurans* GI'sının amino asit sırasına % 78 benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

GI'lar amino asit dizilimlerine göre iki grup altında sınıflandırılırlar (Bhosale vd., 1996). Sınıf II GI'lar N-ucunda 45 ila 50 amino asitlik bir fazlalık parçaya sahiptirler ve yaklaşık 440 amino asitten oluşmuşlardır (Hartley vd., 2000). *G. caldoxylolyticus* TK4 GI'sı da 441 (DUR kodonu dahil) amino asite sahiptir. Bu nedenle, *G. caldoxylolyticus* TK4 GI'sı, *Klebsiella* (Feldmann vd., 1992), *Escherichia* (Lawlis vd., 1984), *Lactobacillus* (Bor, 1993), *Clostridium* (Meaden vd., 1994), *Bacillus* (Rasmussen vd., 1994),

Staphylococcus (Sizemore vd., 1991) GI'ları gibi N-ucunda 45-50 amino asitlik fazlalığa sahip olduğundan Sınıf II GI'lara dahildir.

SDS jel elektroforezi ile enzimin tek bir tür alt birimden oluştuğu ortaya konuldu (Şekil 19). 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 protein, histidin kuyruğu içerdiğinden alt birim molekül ağırlığı 52,64 kDa olarak, histidin kuyruğu içermeyen orijinal protein alt birim ağırlığı ise 50,18 kDa olarak hesaplandı. Bu değerler SDS-PAGE elektroforez sonuçları ile de desteklenmektedir. Deneysel olarak rekombinant enzimin alt birim molekül ağırlığı yaklaşık olarak 52,12 kDa civarında bulundu. Bu değer *Bifidobacterium adolescentis*'ten klonlanan ve alt birim ağırlığı 53,00 kDa olan trimer yapıdaki Sınıf II glukoz izomerazın molekül ağırlığına oldukça yakın bir değerdir (Kawai vd., 1994). *Thermoanaerobacterium JW/SL-YS 489* suşundan klonlanan ve alt birim ağırlığı 50,00 kDa olan tetramer yapıdaki ve termofilik *Bacillus* sp. suşundan saflaştırılan ve alt birim ağırlığı 50,00 kDa olan trimer yapıdaki glukoz izomerazların varlığı bildirilmiştir (Chauthaiwale ve Rao, 1994; Liu vd., 1996).

Clustal W programı kullanılarak yapılan karşılaştırmada *G. caldxylolyticus* TK4 GI'sının amino asit sırası, *G. stearothermophilus*, *G. thermodenitrifican*, *G. kaustophilus*, *B. halodurans*, *B. coagulans* amino asit sıraları ile karşılaştırıldı (Şekil 18). Sonuçlar incelendiğinde, *G. caldxylolyticus* TK4 GI'sının diğer GI'lar gibi katalitik etkinlikte rol oynayan histidin99, aspartat102, aspartat294, aspartat335 amino asitlerinin, metal bağlamada etkili olan glutamat230, glutatmat266, histidin269, aspartat294 amino asitlerinin ve substrat bağlama cebini oluşturan triptofan48, fenilalanin59, treonin139, fenilalanin143, treonin144, triptofan186, glutamat230 ve lizin232 amino asitlerinin korunmuş olduğu görülmektedir (Hartley vd., 2000).

GI geninin tamamının pET28a(+)'ya klonlanması ile elde edilen rekombinant vektör *E.coli*'ye aktarıldı, bu hücrede histidin kuyruğu içeren bir fizyon proteini olarak ekspres edildi ve nikel kolonu ile tek adımda saflaştırıldı. Histidin kuyruğu ile klonlanan enzimler ve histidin kuyruğu içermeyecek şekilde klonlanan enzimlerin aktivitelerinde farklılıklar olduğu ve histidin kuyruğu ile klonlanan enzimlerin daha düşük aktivite gösterebildiği rapor edilmiştir (Lee vd., 1997). Spektroskopik olarak yapılan testlerde de saflaştırılan proteinin GI aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Bu da histidin kuyruğunun proteinin katlanması ve metal iyonu bağlaması açısından aktiviteyi tamamıyla kaybettirecek etki

etmediğini göstermektedir. Ancak daha kesin sonuçlara, polihistidin kuyruğu içermeksizin elde edilen rekombinatın enzimin aktivitesinin belirlenmesiyle ulaşılabılır.

Enzimlerde, optimum pH değerleri, kullanılan materyalin kaynağına, kullanılan substrata ve enzimin kullanılan formuna (immobilize ya da serbest) göre değişiklik gösterdiği için, pH, enzim aktivitesinin ifadesinde önemli bir faktördür. Rekombinant enzimle gerçekleştirilen aktivite testleri ile enzimin bazı biyokimyasal özelliklerinin ortaya konulması amaçlandı. Histidin kuyruğu içeren rekombinant proteinin GI aktivitesinin pH'ya bağımlılığı 4,0-9,0 pH değerleri arasında incelendiğinde, grafiğin tek bir pik verdiği ve optimum pH'nın 6,5 olduğu gözlemlendi (Şekil 20). pH'ın enzim aktivitesi üzerine etkisini gösteren bu grafiğe göre, enzimin, nötral ve hafif asidik pH değerlerinde, glukozu fruktoza izomerize etme yeteneği yüksektir. Literatürden tespit edildiği kadarıyla, glukoz substratı varlığında, *Thermoanaerobacterium* sp. (Liu vd., 1996), *Actinoplanes missouriensis* (Van Tillbeurgh vd., 1992), *Lactobacillus brevis* (Yamanaka, 1975) ve *Thermus aquaticus* (Lehmbacher, 1990) GI'ları haricindeki diğer GI'ların optimum pH değerinin 6,5'ten yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca pH 6,0'da çalışılan enzimin aktivitesi oldukça yüksektir. Bu durumda rekombinant protein ile pH 6,5'te çalışılabileceği gibi pH 6,0'da da çalışmak mümkündür. Rekombinant enzim, bu özelliği ile özellikle endüstriyel olarak arzu edilen asidik pH değerlerine, birçok mikroorganizmanın GI'sına göre, daha yakındır.

Rekombinant enzimin aktivitesinin sıcaklıkla değişimi, 40-100 °C aralığında incelendi. Elde edilen sonuçlara göre, enzimin optimum sıcaklığı 80 °C olarak belirlendi (Şekil 21). Enzim aktivitesinin, 50-60 °C aralığında % 50 civarında olduğu ve enzimin 90 °C'de yaklaşık % 80 oranında ve 100 °C yaklaşık % 70 oranında bir bağıl aktiviteye sahip olduğu tespit edildi. Enzim aktivitesi 40 °C'de ise yaklaşık % 70 oranında azalmaktadır. Rekombinant GI'nın optimum sıcaklığı *Streptomyces* sp. (Inyang vd., 1995), *Bacillus* sp. (Chauthaiwale ve Rao, 1994), *Anoxybacillus gonensis* G2 (Karaoğlu, 2004) ve *Streptomyces chibaensis* J-59 (Joo vd., 2005) GI'ları ile benzerlik göstermekle beraber, diğer GI'lar için optimum sıcaklık, *Thermotoga neapolitana*'da 95 °C (Hess vd., 1998), *Thermus thermophilus*'ta ve *Bacillus thermoantarcticus*'ta 90 °C (Lonn vd., 2002; Lama vd., 2001) olarak belirlenmiştir. Bu GI'lar haricindeki diğer GI'lar genel olarak, 60°C ile 75°C arasında bir sıcaklık optimumuna sahiptirler(Bhosale vd.,1996). Endüstride, enzim katalizli izomerizasyon reaksiyonlarında, yüksek sıcaklık uygulamaları, glukoz-fruktoz dengesini fruktoz lehine kaydıracağı için, yüksek sıcaklık optimumuna sahip enzimlerin bu

amaçla kullanımı avantaj sağlamaktadır. Çalışılan rekombinant GI, bu yönüyle de literatürde bildirilen bir çok enzimle benzerlik göstermektedir.

Rekombinant enzim için aktivitenin enzim konsantrasyonuna bağımlılığı incelendiğinde, 1,75 mg/mL'lik protein içeriğine kadar, GI aktivitesinin arttığı, daha yüksek protein konsantrasyonlarında ise, GI aktivitesinin enzim miktarından bağımsız olduğu belirlendi (Şekil 22). Sonuç olarak, maksimum enzim miktarına ulaşıldıktan sonra, glukozun izomerizasyon hızının, enzim miktarından bağımsız olarak gerçekleştiği söylenebilir.

Rekombinant enzimin kinetik değerlerinin ve optimum substrat konsantrasyonunun belirlenmesi çalışması glukoz substratı varlığında yapıldı. Çizilen substrat-doygunluk grafiğinden, rekombinant GI'nın basit Michealis-Menten kinetiğine uyduğu açıkça görüldü (Şekil. 23). Çizilen bu grafikten yararlanarak, enzimin optimum substrat konsantrasyonu 100 mM olarak belirlendi. 100 mM substrat konsantrasyonunda, enzimin substratı ile doygunluğa ulaştığı ve bundan sonraki konsantrasyonlarda hızın değişmediği saptandı. Enzimin kinetik verileri olan Michealis-Menten (K_m) ve maksimum hız (V_{maks}) değerleri, çizilen Lineweaver-Burk eğrisinden sırasıyla, 20,58 mM ve 0,67 U/mg protein olarak belirlendi (Şekil. 24). K_m değeri, substratın enzime olan ilgisinin bir göstergesidir. Bu değer ne kadar küçük olursa, enzimin substrata karşı ilgisi o kadar fazladır. Buna göre rekombinant GI'nın glukozla ilgisi, *Actinoplanes missouriensis*, *Actinoplanes missouriensis*, *Actinoplanes missouriensis*, *Streptomyces sp. 32*, *Streptomyces sp. 1*, *Clostridium thermosulfurogenes*, *Streptomyces olivochromogenes*, *Arthrobacter sp.*, *Arthrobacter sp.*, *Clostridium thermosulfurogenes*, *Streptomyces rubiginosus*, *Streptomyces rubiginosus*, *Thermus thermophilus*, *Clostridium thermosulfurogenes*, *Streptomyces rubiginosus*, *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*, *Bacillus coagulans*, *Streptomyces albus* ve *Streptomyces chibaensis* GI'larından oldukça fazladır (URL-1). Yine aynı substrat varlığında, *Streptomyces flavogriseus* GI'sı için K_m 0,297 mM olarak bildirilmiştir (Chen ve Anderson, 1979). Bu GI'nın glukozla ilgisinin ise *G. caldoolyolyticus* TK4 GI'sından daha fazla olduğu görülmektedir.

Rekombinant enzimin, 60-90 °C aralığında, saatte bir aktivite tayini yapılmak suretiyle, toplam üç saat bekletilmesi sonunda, kalan aktiviteleri belirlenerek, ısı kararlılığı incelendi (Şekil 25). Optimum sıcaklık olan 80 °C'de bir saatlik inkübasyon sonunda, enzim aktivitesi % 60'ın üzerinde korundu. 60 °C'de ve 70 °C'de, bir saatlik bekletme sonunda, enzim, aktivitesini % 90'nın üzerinde korurken, 3 saatlik bekletme

sonunda aktivite kaybı % 20'nin altındadır. Enzimin 90 °C'de bekletilmesi ile aktivitesi hızla azalmış ve üç saatlik bekletme sonunda aktivitesinin ancak % 10'unu koruyabildiği görülmüştür. *Geobacillus stearothermophilus* GI'sının 75 °C'de bir saat, *Bacillus coagulans* 50 °C'de bir saat, *Streptomyces olivochromogenes* 30 °C'de 30 dakika, *Thermoanaerobacterium sp.* 65 °C'de en az beş saat, *Chainia sp.* 70 °C'de 10 dakika, *Arthrobacter nicotianae* 70 °C'de 2 saat kararlı oldukları bildirilmiştir (URL-1). Yüksek sıcaklıklarda enzim aktivitesindeki düşmeler, sıcaklığın etkisi ile enzimin üç boyutlu yapısında negatif değişmelerin olmasından kaynaklanabilmektedir.

Rekombinant GI'nın +4 °C'deki pH kararlılığı incelendiğinde, enzimin oldukça kararlı bir yapıya sahip olduğu görülmektedir, hatta çalışılan tüm pH'larda 1, 5, 10 ve 15 günlük bekletme süreleri sonunda enzim aktivitesinin en az % 20 oranında arttığı gözlemlendi (Şekil. 26). Herhangi bir GI için böyle bir literatür bilgisine rastlanmadı. Aktivitede bir azalma olmaması, enzimin, saklanma koşullarının belirlenmesi açısından oldukça önemlidir. *G. caldxylolyticus* TK4 GI'sı çalışılan pH aralığında uzun bir süre rahatlıkla depolanabilir. Bu durum, bize, inkübasyonla, enzimin yapısının mükemmelleşmesinin sağlandığını düşündürmektedir. Ancak, değişen pH'larda kalan aktivitenin hep % 100'ün üzerinde fakat sinüzoidal bir biçimde değişmesi, burada ayrıca tampon iyonlarının enzime etkileşerek aktiviteyi etkilediği sonucunu ortaya çıkarmaktadır. Bu nedenle, ileriki bir çalışmayla tampon iyonlarının da aktivite üzerine etkisi incelenmelidir. *Bifidobacterium adolescentis* GI'sı 8 °C'de, pH 6'da, 18 saat bekletildiğinde, aktivitesinde % 50 azalma gözlemlenmiştir. *Bifidobacterium adolescentis* GI'sının aynı sıcaklıkta pH 7'de 18 saatlik bekletme sonucunda kararlılığını koruduğu gözlemlenmiştir (URL-1).

Bazı enzimler, aktiviteleri için kofaktör olarak metal iyonlarına ihtiyaç duyarlar. Metal iyonları farklı koordinasyon sayılarına, yaptıkları bileşiklerde farklı koordinasyon geometrisine ve Lewis asidi potansiyeline sahip olabilirler. Bu sebeple metal iyonları proteinler karşısında farklı ligand özellikleri gösterebilir ve proteinlerin farklı bölgelerine bağlanabilirler. Bunun sonucunda da enzim aktivitesini farklı şekilde etkileyebilirler (Bock vd., 1999; Di Tusa vd., 2001). GI aktivitesi üzerine etkisi incelenen metal iyonlarından Co^{+2} , Mg^{2+} ve Mn^{2+} , nin aktiviteyi önemli ölçüde artırdıkları gözlemlendi (Tablo 21). GI'nın maksimum aktivite için Mg^{2+} , Co^{2+} veya Mn^{2+} gibi divalent katyonlara veya bunların kombinasyonlarına ihtiyaç duyduğu bilinmektedir (Bhosale vd., 1996). Aktivite için hem Mg^{2+} hem de Co^{2+} gereklidir, ikisinin sahip olduğu görevler farklıdır. Mg^{2+} , Co^{2+} , dan daha iyi bir aktivatörken, Co^{2+} enzimin istenilen kuarterner yapıda kararlı kalması için gereklidir

(Callens vd., 1988). Dolayısıyla yapılan çalışmada gözlenen sonuçlar, literatürle uyum içerisindedir. GI katalitik aktivitesi, Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} ve Sn^{2+} varlığında çeşitli oranlarda (Cu^{2+} % 95, Ni^{2+} % 80 ve Zn^{2+} % 75) inhibe olmuştur. GI'nın metal iyonlarına karşı benzer davranışları daha önce bildirilmiştir (Bucke, 1983; Smith vd., 1991).

Glukoz izomeraz enzimi hücre içi bir enzimdir ve glukozla ilgisi düşük olduğu için reaksiyonlarda çok yüksek miktarlarda enzim kullanımına ihtiyaç vardır. Bu da maliyeti artırmaktadır. Endüstriyel uygulamalarda kullanılan HFCS'de % 55 fruktoz içeriği aranmaktadır. Ancak, HFCS üretiminde mezofilik organizmalardan elde edilen glukoz izomeraz, immobilize edilmiş bir şekilde 55-65 °C'de pH 7,5 ile 8,5 aralığında kullanılmaktadır ve bu şartlar altında enzim ile % 40-42 oranında fruktoz üretilmektedir. Bu nedenle, fruktoz oranı kromatografik olarak % 55 seviyelerine getirilir. Fakat bu işlem de üretim maliyetini arttırır. Sıcaklığın artmasıyla fruktoz-glukoz dengesi fruktoz tarafına kaymakta böylece pahalı olan kromatografik saflaştırmaya gerek kalmamaktadır. Bu yüzden bu uygulamalarda yüksek sıcaklıklarda çalışan termofilik mikroorganizmalardan elde edilen enzimler tercih edilmektedir (Hartley vd., 2000). Fakat yüksek pH değerlerinde yüksek sıcaklık uygulamaları, istenmeyen mannoz, psikoz ve diğer asidik yan ürünlerin oluşumuna sebep verdiği için düşük pH değerlerinde çalışan bir enzime ihtiyaç bulunmaktadır (Bucke, 1983). Bu ihtiyaçlardan dolayı bugüne kadar birçok termofilik ve asidik karakterli bakterilerin glukoz izomerazı araştırılmıştır (Bhosale vd., 1996). Termofilik bir bakteri olan *G. caldoolyolyticus* TK4 GI'sı üzerinde yapılan bu çalışmada, bu enzimin asidik pH optimumuna ve 80 °C sıcaklık optimumuna sahip, enzimin endüstriyel kullanım için avantajlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca düşük pH ve 50-70 °C'lerde enzimin yüksek ısı kararlılığı, endüstriyel uygulamalar açısından, çalışılan enzimi cazip kılmaktadır.

5. ÖNERİLER

Bu çalışma, yeni bir tür olan *Geobacillus caldolyolyticus* TK4 (*G. caldolyolyticus* TK4) suşunun glukoz izomeraz geninin bir vektöre klonlanıp *Escherichia coli*'de (*E. coli*) ekspres edilmesi açısından önem arz etmektedir. İzlenen yol enzim üretimini daha kolay hale getirmiştir. Çünkü bu şekilde gen indüklenebilir bir promotörün altında olduğundan bolca ekspres edilebilir. Ayrıca histidin kuyruğu içerdiğinden tek basamakla nikel kolonu ile saflaştırılabilir. Bu da enzimin saf halde eldesi açısından oldukça önemlidir. Pekçok endüstriyel, analitik ve klinik proseste, enzimler substrat çözeltisi ile karıştırılırlar ve ürüne dönüştürüldükten sonra ekonomik olarak geri kazanılamazlar. Enzimlerin sadece bir kere kullanılmaları, pahalı olmaları nedeni ile büyük masraflara neden olmaktadır. Bu nedenle immobilize olarak defalarca kullanılmaları ekonomik olarak daha makul olmakla birlikte enzimatik prosesler sürekli olarak da yapılabilmektedir. İmmobilizasyon ayrıca enzimlerin kararlılığını artıran bir yöntemdir. Bu çalışmada, elde edilen enzim immobilize edilerek, ileri derecede karakterize edilebilir ve kararlılığı artırılabilir. Bu sayede enzimin endüstriyel açıdan kullanımı kolaylaştırılabilir. Rekombinant DNA teknolojisinin modifiye edilmiş proteinlerin üretiminde büyük rolü vardır. Bölge spesifik mutasyonlarla, çalışmada saflaştırılan enzimin optimum pH değeri 6,5'ten daha aşağıya düşürülebilir ve optimum sıcaklık değeri ve ısı kararlılığı yükseltilebilir. Ayrıca, enzimin glukozu karşı yüksek K_m 'ye sahip olması endüstriyel kullanım açısından değerini azaltmaktadır. Bu nedenle enzimin glukozu karşı K_m 'sini düşürmeye yönelik mutasyonların yapılması faydalı olacaktır. Eğer K_m 'yi düşürmeye yönelik mutasyonlar gerçekleştirilirse, bu mutasyonların optimum sıcaklık, optimum pH, pH ve ısı kararlılığı etkisinin araştırılması gerekmektedir.

Yapılan çalışmalarda, rekombinant enzimin -20 °C'de saklandıktan sonra, çözülmesinin enzimde aktivite kaybına neden olduğu saptanmıştır. Bu nedenle enzimin -20 °C yerine 4 °C'de saklanması uygundur.

Metal iyonları enzim aktivitesinin görülebilmesi için gerekli oldukları kadar, enzimin pH ve ısı kararlılığı üzerine de etki gösterirler. Enzimim ısı kararlılığının iyi olmadığı düşünülürse, ısı kararlılığına farklı metal iyonlarının etkisini araştırmak uygun olacaktır.

Endüstriyel işlemler belirli sıcaklıklarda ve pH değerlerinde gerçekleştirilirler ve enzimlerin çalışılan sıcaklık ve pH'larda aktivitelerini korumaları istenir. Bu çalışmada enzimin pH kararlılığı, sadece +4 °C de incelenmiş, fakat enzim aktivitesinin optimum sıcaklığında veya reaksiyon sıcaklığına yakın sıcaklıklarda incelenmemiştir. Bu nedenle, rekombinant enzimin optimum sıcaklığında, pH kararlılığının incelenmesi uygun olacaktır.

Ayrıca, rekombinant proteinin molekül ağırlığı, molekül yapısı ve izoelektrik odaklama yöntemi ile enzimin izoelektrik noktasının bulunması bazı biyokimyasal özelliklerini ortaya koymak adına yarar sağlayacaktır.

Rekombinant enzim güçlü bir promotörün altında histidin kuyruğu ile ekspres edilmiştir. Histidin kuyruğu enzimin saflaştırılmasını kolaylaştırmasına rağmen, enzim aktivitesini olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Bu nedenle, enzimin Histidin kuyruğu içermeyecek şekilde ekspres edilmesi ve sonrasında karakterizasyon çalışmaları ile enzimin spesifik aktivitesinin, V_{maks} ve K_m değerlerinin, pH ve ısıl kararlılığının yeniden belirlenmesi çalışılabilir.

Bu bilgiler ışığında, tüm GI'lar gibi bu çalışmada elde edilen rekombinat enzim, endüstriyel uygulamaları nedeniyle birçok araştırmacıya konu olacak gibi görülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Ahern, T. J., Casal, J. I., Petsko, G. A., Klibanov ve A. M., 1987. Control of Oligomeric Enzyme Thermostability by Protein Engineering, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 675-679.
- Albery, W. J. ve Knowles, J. R., 1976., Free Energy Profile of The Reaction Catalyzed by Triose Phosphate İsomerase. Biochemistry, 15, 5627-5631.
- Amelunxen, R.E. ve Lins, M., 1968. Comperative Thermostability of Enzymes from *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus cereus*, Arch. Biochem. Biophys., 125, 765-771.
- Amore, R., Wilhelm, M. ve Hollenberg, C.P., 1989. The Fermentation of Xylose- An Analysis of The Expression of Bacillus and Actinoplanes Xylose İsomerase Genes in Yeast. Appl. Microbiol. Biotechnol., 30, 351-357.
- Andrade, C. M. M. C., Pereira, N. ve Antranikian, G., 1999. Extremely Thermophilic Microorganisms and Their Polymer-hydrolytic Enzymes, Rev. Microbiol., 30, 287-298.
- Armbruster, F. C., Heady, R. E. ve Cory, R. P. (Cpc International Inc.),, March 1973. Xylose (Glucose)-İsomerase Enzyme Compositions. Ger. Offen. 2, 245, 402.
- Arnold, F.H., 2001. Combinatorial and Computational Challenges for Biocatalyst Design, Nature, 409, 253-257.
- Ash, C., Farrow, J. A. E., Wallbanks, S. ve Collins, M. D., 1991. Phylogenetic Heterogeneity of the Genus *Bacillus* Revealed by Comperative Analysis of Small-Subunit-Ribosomal RNA Sequences, Lett. Appl. Microbiol., 13, 265-269.
- Banerjee, S., Archana, A. ve Satyanarayana, T., 1994. Xylose metabolism in a Thermophilic Mold *Malbranchea pulchella* var. *Sulfurea* Tmd-8, Curr. Microbiol., 29, 349-352.
- Barker, S. A., 1976. Pure Fructose syrups, Process Biochem., 11, 20-25.
- Barker, S. A., Somers, P. J. ve Hatt B. W. (Boehringer Mannheim Gmbh), 1983. Fructose, U.S. Patent, 3, 875, 140, <http://www.uspto.gov/>.
- Bartfay, J., 1960. Glucose-İsomerase in Barley Malt. Nature, 26, 924-925.
- Batt, C. A., O'neill, E., Novak, S. R., Ko, J. ve Sinskey, A., 1986. Hyperexpression of *Escherichia coli* Xylose İsomerase, Biotechnol. Prog., 2, 140-144.
- Beck, C. F. ve Warren. R. A. J., 1988. Divergent Promoters, a Common form o Gene Organization, Microbiol. Rev., 52, 318-326.

- Bejar, S., Belghith, K., Gargouri, R. ve Ellouz, R., 1994. Construction of A New Strain of *Streptomyces Violaceoniger*, Having Strong, Constitutive and Stable Glucose Isomerase Activity, Biotechnol. Lett. 16, 1259-1264.
- Bengston, B.L. ve Amm. W.R., 1973. Procédé Du Isomerisation du Glucose et du Fructose, French Patent, 2, 172, 882, <http://www.frenchpatent.com/>.
- Bhosale, S. H., Rao, M. B. ve Deshpande, V. V., 1996. Molecular and Industrial Aspects of Glucose Isomerase, Microbiol. Rev., 60, 280-300.
- Blacklow, S. C., Raines, R. T., Lim, W. A., Zamore, P. D. ve Knowles, J. R., 1988. Triosephosphate Isomerase Catalysis is Diffusion Controlled, Biochemistry, 27, 1158-1167.
- Bock, W. C., Katz, A. G., Markham, G. D. ve Glusker, J. P., 1999. Manganese as a Replacement for Magnesium and Zinc: Functional Comparison of the Divalent Ions. J. Am. Chem. Soc., 121, 7360-7372.
- Bor, Y., Moraes, C., Lee, S., Crosby, W. L., Sinskey, A. J. ve Batt, C. A., 1992. Cloning and Sequencing the *Lactobacillus brevis* Encoding Xylose Isomerase Gene, Gene, 114, 127-131.
- Briggs, K. A., Lancashire, W. E. ve Hartley, B. S., 1984. Molecular Cloning, DNA Structure and Expression Of The *Escherichia Coli* D-Xylose Isomerase, Embo J., 3, 611-616.
- Brock, T. D., 1985. Life at High Temperatures, Science, 230, 132-138.
- Bucke, C., 1983. Glucose Transforming Enzymes, Applied Science Publishers, London. 93-127.
- Callens, M., Kersters-Hilderson, H., Vangrysperre, W. ve Debruyne, C. K., 1988. D-Xylose Isomerase from *Streptomyces Violaceoruber*: Structural and Catalytic Roles of Bivalent Metal Ions, Enzyme Microb. Technol., 10, 695-700.
- Cambillau, C. ve Claverie, J. M., 2000. Structural and Genomic Correlates of Hyperthermostability, J. Biol. Chem., 275, 32388-32386.
- Carrell, H. L., Glusker, J. P., Burger, V., Manfre, F., Tritsch, D. ve Biellman, 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, Proc. Natl. Acad. Sci., 86, 4440-4444.
- Carrell, H. L., Rubin, B. H., Hurley, T. J. ve Glusker, J. P., 1984. X-Ray Crystal Structure of D-Xylose Isomerase at 4 Å Resolution, J. Biol. Chem., 259, 3230-3236.
- Chaing, L. C., Gong, C. S., Chen, L. F. ve Tsao, G. T., 1981. D-Xylulose Fermentation to Ethanol by *Saccharomyces Cerevisiae*, Appl. Environ. Microbiol., 42, 284-289.

- Chauthaiwale, J. V. ve Rao, M. B., 1994. Production and Purification of Extracellular D-Xylose İsomerase From An Alkaliphilic, Thermophilic *Bacillus* Sp, Appl. Environ. Microbiol., 60, 4495-4499.
- Chen, W. P. ve Anderson, A. W., 1979. Purification, Immobilization, and Some Properties of Glucose İsomerase from *Streptomyces flavogriseus.*, Appl. Environ. Microbiol., 38, 6, 1111-1119.
- Chen, W. P., Anderson, A. W. ve Han, Y. W., 1979 Production of Glucose İsomerase by *Streptomyces flavogriseus*, Appl. Environ. Microbiol., 37, 2, 324-331.
- Collyer, C. A. ve Blow, D. M., 1990. Observations of Reaction Intermediates and The Mechanism of Aldose-Ketose İnterconversion by D-Xylose İsomerase, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 87, 1362-1366.
- Dahl, M. K., Degenkolb, J. ve Hillen, W., 1994. Transcription of the Xyl Operon is Controlled in *Bacillus subtilis* by Tandem Overlapping Operators Spaced by Four Base-Pairs, J. Mol. Biol., 28, 3, 413-424.
- Das, R. ve Gerstein, M., 2000. The Stability of Thermophilic Proteins: A Study Based on Comprehensive Genome Comparison, Funct. Integr. Genomics, 1, 76-88.
- De Rosa, M., Morana, A., Riccio, A., Gambacorta, A., Trincone A. ve Incani, O., 1994. Lipids of the Archae: A New Tool fo Bioelectronics, Biosen. Bioelectron., 9, 669-675.
- Dekker, R. F. H. ve Richards, G. N., 1976. Hemicellulases: Their Occurrence, Purification, Properties, and Mode of Action, Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 32, 27-32.
- Deraadt, A., Ebner, M., Ekhardt, C. W., Fechter, M., Lechner, A., Strobl, M. ve Stutz, A. E., 1994. Glucose İsomerase (EC 5.3.1.5) As a Reagent in Carbohydrate Synthesis: Success and Failures with The İsomerisation of Nonnatural Derivatives of D-Glucose iİnto The Corresponding 2-Ketoses, Catalysis Today, 22, 549-561.
- Di Tusa, C. A., Chiristensen, 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, 5338-5344.
- Dishe, Z. ve Borenfreund, E., 1951. A New Spectrophotometric Method for the Detection and Determination of Keto Sugars and Trioses, J. Biol. Chem., 192, 583-587.
- Drazic, M., Golubic, Z. ve Czimek, S., 1980. Isomerization of Glucose to Fructose Using Microbial Enzymes, Period. Biol., 82, 481-484.
- Dupreez, J. C., Bosch, M. ve Prior, B. A., 1987. Temperature Profiles of Growth and Ethanol Tolerance of The Xylose Fermenting Yeasts *Candida Shehatae* and *Pichia Stipitis*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 25, 521-525.

- Dupreez, J. C. ve Prior, B. A., 1985. A Quantitative Screening of some Xylose Fermenting Yeast Isolates, Biotechnol. Lett., 7, 241-246.
- Dülger, S., 2003. Gönen, Kestanbol ve Diyadin Kaplıcalarından Termofilik Bakteri İzolasyonu, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Faiz, Ö., 2005. Yeni Bir Termofilik Bakterinin, *Anoxybacillus gonensis* A4, hücre Dışı Lipaz/Esteraz Yeteneğinin İncelenmesi ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Feldman, S. D., Sahm, H., Sprenger. ve G. A., 1992. Cloning and Expression of the Genes for Xylose Isomerase and Xylulokinase from *Klebsiella pneumoniae* 1033 in *Escherichia coli* K12, Mol. Gen. Genet., 234, 201-210.
- Gaikwad, S.M., Rao, M. ve Deshpande, V., 1992. Structure-Function Relationship of Glucose/Xylose Isomerase from *Streptomyces*: Evidence for The Occurrence of Inactive Dimer, Enzyme Microb. Technol., 15, 155-157.
- Gessesse, A., 1998. Purification and Properties of Two Thermostable Alkaline Xylanases From an Alkaliphilic *Bacillus* sp., App. Environ. Microbiol., 64, 3533-3535.
- Glazer, A. N. ve Nikaido, H., 1995. Microbial Enzymes. Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology, W.H. Freeman and Company, USA.
- Godfrey, T. ve West, S., 1996. Introduction to Industrial Enzymology. Industrial Enzymology, (Second Edition). Ed. by T. Godfrey and S. West. Stockton Press, New York.
- Gomes, J. ve Steiner, W., 2004. The Biocatalytic Potential of Extremophiles and Extremozymes, Food Technol. Biotechnol., 42, 4, 223-235.
- Haney, P. J., Badger, J. H., Buldak, G. L., Reich, C. I., Woese, C. R. ve Olsen, G., 1999. Thermal Adaptation Analysed by Comparison of Protein Sequences from Mesophilic and Extremely Thermophilic *Methanococcus* species, Proc. Natl. Acad. Sci., 96, 3578-3583.
- Harhangi, H. R., Akhmanova, A. S., Emmens, R., Van Der Drift, C., De Laat, W. T. A. M., Van Dijken, J. P., Jetten, M. S. M., Pronk, J.T. ve Den Camp, H. J. M. O., 2003. Xylose Metabolism in the Anaerobic Fungus *Piromyces* sp. Strain E2 Follows the Bacterial Pathway, Arch. Microbiol., 180, 134-141.
- Hartley, B. S., Hanlon, N., Jackson, R. J. ve Rangarajan, M., 2000. Glucose Isomerase: Insights into Protein Engineering for Increased Thermostability, Biochim. Biophys. Acta., 1543, 294-335.
- Hausler, H. ve Stutz, A. E., 2001. D-Xylose (D-Glucose) Isomerase and Related Enzymes in Carbohydrate Synthesis, Top. Curr. Chem., 215, 77-114.

- Herbert, R. ve Sharp, R., 1992. *Molecular Biology and Biotechnology of Extremophiles*. Chapman and Hall, NY.
- Hess, J. M., Tchernajenko, V., Vieille, C., Zeikus, J. G. ve Kelly, R. M., 1998. *Thermotoga neapolitana* Homotetra-Meric Xylose İsomerase is Expressed as a Catalytically and Thermostable Dimer in *Escherichia coli*, Appl. Environ. Microbiol., 64, 2357-2360.
- Inyang, C. U., Gebhart, U., Obi, S. K. ve Bisswanger, H., 1995. Isolation And Characterization Of A D-Glucose/Xylose Isomerase From A New Thermophilic Strain *Streptomyces* Sp. (Plc) Appl. Microbiol. Biotechnol., 43, 632-638.
- Joo, G. J., Shin, J. H., Heo, G. Y., Kim, Y. M. ve Rhee, I. K., 2005. Molecular Cloning and Expression of a Thermostable Xylose (Glucose) Isomerase Gene, *xylA*, from *Streptomyces chibaensis* J-59, J. Microb., 43, 34-37.
- Karaoğlu, H., 2004. *Anoxybacillus gonensis* Glukoz (D-Ksiloz) İzomeraz Geninin Klonlanması, İzolasyonu ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Kasumi, T., Hayashi, K. ve Tsumura, N., 1982. Roles of Magnesium and Cobalt in the Reaction of Glucose Isomerase from *Streptomyces griseofuscus* S-41, Agric. Biol. Chem., 46, 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 dolescentis*, Biosci Biotechnol Biochem., 58, 691-694.
- Kirk, O., Borchert, T. V. ve Fuglsang, C. C., 2002. Industrial Enzyme Applications, Curr. Opin. Biotechnol., 13, 345-351.
- Koffler, H., 1957. Protoplasmic Differences between Mesophiles and Thermophiles, Bacterial Rev., 21, 227-232.
- Kristo, P., Saarelainen, R., Fagerstrom, R., Aho, S. ve Korhola, M., 1996. Protein purification, and Cloning and Characterization of the cDNA and Gene for Xylose İsomerase of Barley, Eur. J. Biochem., 237, 240-246.
- Lama L., Nicolaus, B., Calandrelli, V., Romano, I., Basile, R. ve Gambacorta, A., 2001. Purification and Characterization of Tthermostable Xylose (Glucose) İsomerase from *Bacillus thermoantarcticus*, J. Microbial Biotechnol., 27, 234-40.
- Lawlis, V. B., Dennis, M. S., Chen, E. Y., Smith, D. H. ve Henner, D. J., 1984. Cloning and sequencing of the xylose İsomerase and the Xylulose Kinase Genes of *Escherichia coli*, Appl. Environ. Microbiol., 47, 15-21.
- Lee, C., Bagdasarian, M., Meng, M. ve Zeikus, J. G., 1990. Catalytic Mechanism Xylose (Glucose) İsomerase from *Clostridium thermosulfurogenes*, J. Biol. Chem. 265, 19082-19090.

- Lee, Y. L., Chang, R. C. ve Shaw, J. F., 1997. Facile purification of a C-terminal extended His-tagged *Vibrio mimicus* arylesterase and characterization of the purified enzyme, J. Am. Oil Chem. Soc., 74, 1371-1376.
- Leemhuis, H., Rozeboom, H. J., Dijkstra, B. W. ve Dijkhuizen, L., 2004. Improved Thermostability of *Bacillus circulans* Cyclodextrin Glycosyltransferase by the Introduction of a Salt Bridge, Proteins, 54, 128-134.
- Lehmann, M. ve Wyss, M., 2001. Engineering Proteins for Thermostability: The Use of Sequence Alignments Versus Rational Design and Directed Evolution, Curr. Opin. Biotechnol., 12, 371-375.
- Lehmbacher, A. ve Bisswanger, H., 1990. Isolation and Characterization of an Extremely Thermostable D-Xylose Isomerase from *Thermus aquaticus* HB8, J. Gen. Microbiol., 136, 679-686.
- Li, W. F., Zhou, X. X. ve Lu, P., 2005. Structural Features of Thermozyms, Biotechnol. Adv., 23, 271-281
- Liu, S. Y., Wiegel, J. ve Gherardine, F. C., 1996. Purification And Cloning of A Thermostable Xylose (Glucose) Isomerase With An Acidic pH Optimum From *Thermoanaerobacterium* Strain Jw/SI-Ys 489, J. Bacteriol., 178, 5938-5945.
- Lokman, B. C., van Santen, P., Verdoes, J. C., Kruse, J., Leer, R.J ., Posno, M. ve Pouwels, P. H., 1991. Organization and Characterisation of Three Genes Involved in D-Xylose Catabolism in *Lactobacillus pentosus*, Mol. Gen. Genet., 230, 161-169.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N.J ., Farr, A. L. ve Randall, R. J., 1951. Protein Mesurement with the Folin Phenol Reagent, J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- Lönn, A., Gardonyi, M., Willem V. Z., Bärbel, H. H. ve Cordero, O. R., 2002. Cold Adaptation of Xylose Isomerase from *Thermus thermophilus* Through Random PCR Mutagenesis: Gene Cloning and Protein Characterization, Eur. J Biochem., 269, 157-163.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. ve Parker, J., 2000. Biology of Microorganisms, Prentice-Hall Inc., New Jersey.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. ve Sambrook, J., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Marshall, R. O. ve Kooi, E. R., 1957. Enzymatic conversion of D-glucose to D-fructose, Science, 125, 648-649.
- Maturama, M., Katakura, T., Imanaka, T. ve Aiba, S., 1984. Enzymatic and Nucleotide Sequence Studies of a Kanamycin- Inactivating Enzyme Encoded by a Plasmid from Thermophilic Bacilli in Comparison with that Encoded by Plasmid pUB110, J. Bacteriol., 160, 413-420.

- Meaden, P. G., Andrise-Opoku, J., Reizer, J., Reizer, A., Lanceman, Y. A., Martin, M. F. ve Mitchell, W. J., 1994. The Xylose Isomerase Encoding Gene (Xyl A) of *Clostridium hermosaccharolyticum*: Cloning, Sequencing and Phylogeny of Xyl A Enzymes, Gene, 141, 97-101.
- Ochman, H., Gerber A. S. ve Hartl D. L., 1988. Genetic Applications of an Inverse Polymerase Chain Reaction, Genetics, 120, 621-623.
- 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 Microbiol. Tech., 11, 568-574.
- Pubols, M. H., Zahnley, J. C. ve Axelrod, B., 1963. Partial Purification and Properties of Xylose and Ribose Isomerase in Higher Plants, Plant Physiol., 38, 4, 457-461.
- Rainey, F. A., Fritze, D. ve Stackebrandt, E., 1994. The Phylogenetic Diversity of Thermophilic Members of the Genus *Bacillus* as Revealed by 16S rDNA Analysis, FEMS Microbiol. Lett., 115, 205-212.
- Rasmussen, H., 1994. Crystallization and Preliminary Investigation of Xylose isomerase from *Bacillus coagulans*, Acta. Crystallogr. Sect., 50, 231-233.
- Rose, I. A., O'Connell, E. L. ve Mortlock, R. P., 1969. Stereochemical Evidence for a Cis-Enediol Intermediate in Mn-Dependent Aldose Isomerases, Biochim. Biophys. Acta., 178, 376.
- Sambrook, J. ve Russell, D. W., 2001. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory New York.
- Sauve, V. ve Sygush, J., 2001. Molecular Cloning, Expression, Purification and Characterization of Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase from *Thermus aquaticus*, Protein Expression Purif., 21, 293-302.
- Schallmeyer, M., Singh, A. ve Ward, O. P., 2004. Developments in the Use of *Bacillus* species for Industrial Production, Can. J. Microbiol., 50, 1-17.
- Sinnot, M. L., 1998. Comprehensive Biological Catalysis, Academic Press, New York, 254-271.
- Sizemore, C., Buchner, E., Rygus, T., Witke, C., Gotz, F. ve Hilgen, W., 1991. Organization, Promoter Analysis, and Transcriptional Regulation of The *Staphylococcus Xylosus* Xylose Utilization Operon, Mol. Gen. Genet. 227, 377-384.
- Smith, C. A., Rangarajan, M. ve Hartley, B. S., 1991. D-Xylose (D-glucose) Isomerase from *Arthrobacter* Strain NRRL B3728, Biochem. J., 277, 255-261.

- Srinivasan, M. C., Vartak, H. G., Powar, V. K. ve Khire, J. M., 1983. High Activity Extracellular Glucose/(Xylose) isomerase from a *Chainia* species. Biotecnol. Lett., 5, 611-614.
- Stetter, K. O., 1996. Hyperthermophilic Procaryotes, FEMS Microbiol Rev., 18, 149-158.
- Temizkan, G. ve Arda, N., 2004. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, Nobel Tıp Kitapevleri, Genişletilmiş 2. Baskı, İstanbul.
- URL-1, http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=5.3.1.5, 15 Haziran 2008.
- URL-2, <http://www.bio-log.biz/index.php?page=plasm>, 15 Kasım 2008
- URL-3, <http://www.fermentas.com/techinfo/nucleicacids/mappuc1819.htm>, Fermentas Life Sciences, 1 Mart 2006.
- URL-4, www.promega.com/tbs/tm042/tm042.pdf#search='pGEMTeasyvectormap', pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems Technical Manual, TM042, Promega, 01 Ekim 2008.
- URL-5, www.promega.com/tbs/tm042/tm042.pdf#search='pGEMTeasyvectormap', pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems Technical Manual, TM042, Promega, 05 Ekim 2008.
- URL-6, www.emdbiosciences.com/docs/docs/PROT/TB074.pdf, Novagen Vector Tables, Novagen, 01 Ekim 2008.
- URL-7, www.termpaperslab.com/term-papers/45808.html, 01 Kasım 2008.
- URL-8, www.research.umbc.edu/~jwolf/m5.htm, 01 Kasım, 2008.
- URL-9, www.expasy.ch/tools/dna.html, 15 Haziran 2007.
- URL-10, www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi, 15 Haziran 2007.
- URL- 11, www.ebi.ac.uk/clustalw/, 10 Kasım 2008.
- URL- 12, www.expasy.org/tools/pi_tool.html, 10 Kasım 2008.
- Van Tillbeurgh, H., Jenkins, J., Chiadmi, M., Janin, J., Wodak, S. J., Mrabet, N. T. ve Lambeir, A. M., 1992. Protein Engineering of Xylose (Glucose) İsomerase From *Actinoplanes Missouriensis*. 3. Changing Metal Specificity And The pH Profile By Site-Directed Mutagenesis, Biochemistry, 31, 5467-5471.
- Vangrysterre, W., Vandamme, J., Vandekerckhove, J., Debruyne, C. K., Cornelis, R. ve Kerstershilderson, H., 1990. Localization of the Essential Histidine and Carboxylate Group in D-Xylose İsomerasen, Biochem. J., 265, 699-705.

- Vieille, C. ve Zeikus, G. J., 2001. Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 65, 1-43.
- Villegas, V., Viguera, A. R., Aviles, F. X. ve Serrano, L., 1996. Stabilization of Proteins by Rational Design of Alpha-Helix Stability Using Helix/Coil Transition Theory, Fold. Des., 1, 29-34.
- Volkin, A. M. ve Klibanov, A. M., 1989. Mechanism of Thermoinactivation of Immobilized Glucose Isomerase, Biotechnol. Bioeng. 33, 1104-1111.
- Volkin, D. B. ve Klibanov, A. M., 1983. Immobilized Cells as Practical Catalysts. Science, 219, 722-727.
- Vongsuvanlert, V. ve Tani, Y., 1988. Purification and Characterization of Xylose Isomerase of a Methanol Yeast, *Candida Boidinii*, Which Is Involved in Sorbitol Production From Glucose. Agric. Biol. Chem., 52, 1817-1824.
- Walfridsson, M., Bao, X., Anderland, 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, Appl Environ Microbiol., 62, 4648-4651.
- Walsh, G., 2002. proteins: Biochemistry and Biotechnology, Wiley, Newyork.
- Wang, P. Y., Johnson, B. F. ve Schneider, H., 1980. Fermentation Of D-xylose by Yeasts Using Glucose Isomerase in The Medium to Convert D-Xylose to D-Xylulose, Biotechnol. Lett., 2, 273-278.
- Weber, P., 1976. Fructose by isomerisation of glucose, U.K. Patent, 1, 496, 309, <http://www.ipo.gov.uk/tm/t-find/t-find-text/>.
- Wintrode, P. L., Miyazaki, K. ve Arnold, F. H., 2001. Patterns of Adaptation in a Laboratory Evolved Thermophilic Enzyme, Biochim. Biophys. Acta., 1549, 1-8.
- Wiseman, A., 1987. Handbook of Enzymes Biotechnology, Second Edition, John Wiley Sons, New York.
- Woese, C. R., Kandler, O. ve Wheelis, M. L., 1990. Towards a Natural System of Organisms: Proposal for the Domains *Archea*, *Bacteria* and *Eucarya*, Proc. Natl. Acad. Sci., 97, 4576-4579.
- Yamanaka, K. 1975. D-xylose Isomerase from *Lactobacillus brevis*, Methods Enzymol., 41, 466-471.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Trabzon'da doğdu. İlköğrenimini Fransa'da, orta öğrenimini Trabzon'da tamamladı. 1998-2002 yılları arasında KTÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölüm'ünde Lisans öğrenimini tamamladı. 2002-2005 yılları arasında KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalında Yüksek lisans programını tamamladı. 2005 yılında KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalında Doktora Programına girdi.

2002-2008 yılları arasında KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'ne bağlı olarak Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölüm'ünde araştırma görevlisi olarak görev yaptı. İyi derecede Fransızca ve İngilizce bilmektedir.