

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Hypocrea jecorina* SAF KÜLTÜRÜNDEN GLUTAMAT OKSİDAZ
ENZİMİNİN ÜRETİMİ**

FATİH MEHMET EYNUR

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA PROGRAMI**

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. EMİNE KARAKUŞ**

İSTANBUL, 2013

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Hypocrea jecorina* SAF KÜLTÜRÜNDEN GLUTAMAT OKSİDAZ
ENZİMİNİN ÜRETİMİ**

Fatih Mehmet EYNUR tarafından hazırlanan tez çalışması 11/06/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Emine KARAKUŞ
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Emine KARAKUŞ
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi

Yard. Doç. Dr. Mesut KARAHAN
Üsküdar Üniversitesi

Bu alışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün 2011-01-02-KAP07 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bu çalışmada bana her türlü desteği sağlayan ve ömrüm boyunca yanımda kalacağına söz veren sevgili eşim Sayın Sevil YAŞAR EYNUR'a ;

Bana olan inancımı hep hissettiren değerli hocam Sayın Doç. Dr. Emine KARAKUŞ'a;

Beni 'yakın olsun İzmir olsun' deyip Biyokimya Bölümünü seçmemi sağlayan canım Anneme ve her daim yaptığım her iyi şeyi destekleyen ve kötü sonuçlarında telkin eden saygı değer Babama.

Tüm samimiyetimle teşekkür eder, sonsuz saygı ve sevgilerimi sunarım.

Haziran 2013

Fatih Mehmet EYNUR

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ.....	viii
KISALTIMA LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xii
ÖZET.....	xiii
ABSTRACT	xiv

BÖLÜM 1

GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı	1
1.3 Hipotez	1

BÖLÜM 2

ENZİMLER	2
2.1 Genel Bilgi	2
2.2 Enzimlerin İsimlendirilmesi	4
2.2.1 Önerilen İsim	4
2.2.2 Sistemik İsim.....	4
2.3 Enzimlerin Aktif Bölgeleri.....	5
2.4 Enzim Aktivitesi Tayini	6
2.5 Enzim Aktivitesi Üzerine Etki Eden Faktörler.....	7
2.5.1 Substrat Konsantrasyonu.....	7
2.5.2 Enzim Miktarı.....	8
2.5.3 pH Etkisi.....	8
2.5.4 Sıcaklık Etkisi.....	8
2.5.5 Kofaktör Konsantrasyonu.....	9
2.6 Enzim Kinetiği.....	9
2.6.1 Michaelis-Menten Eşitliği.....	9
2.6.2 K_M ve v_{max} Değerlerinin önemi.....	14
2.7 Glutamat Oksidaz Enzimi	14

BÖLÜM 3

AMİNOASİTLER.....	21
3.1 Genel Bilgi	21
3.2 Aminoasitlerin Yapısı ve Özellikleri	22
3.2.1 İç Tuz Formu.....	24
3.3 Aminoasitlerin Amino Gruplarının Metabolizması	25
3.3.1 Transaminasyon.....	25
3.3.2 Oksidatif Deaminasyon.....	25
3.4 Glutamat.....	25
3.4.1 Genel Bilgi.....	25
3.4.2 Glutamat ve Fonksiyonları.....	27
3.4.3 Glutamat ve GABA.....	30

BÖLÜM 4

MANTARLAR	32
4.1 Genel Bilgi	32
4.2 Küf Mantarları	34
4.3 <i>Hypocrea Jecorina</i> ve <i>Trichoderma Reesei</i> ile bağlantısı	34

BÖLÜM 5

MATERYAL METOD	37
5.1 Çalışmada Kullanılan Küf Suşları	37
5.2 Kullanılan Cihazlar	37
5.3 Kullanılan Çözeltiler	38
5.3.1 Patates Dekstroz Agar (PDA) Katı Besiyeri Çözeltisi.....	38
5.3.2 Sıvı Besiyeri.....	38
5.3.3 Bovin Serum Albumin (BSA) Stok Çözeltisi.....	38
5.3.4 Glutamat Çözeltisi	38
5.3.5 Tris-HCl Tamponu (0.05M pH 8.5).....	38
5.3.6 Nessler Reaktifi (K_2HgI_4).....	39
5.3.7 Trikloroasetik asit (TCA) Çözeltisi	39
5.3.8 Bradford Reaktifi	39
5.4 Kültür Ortamı	39
5.4.1 Katı Besiyeri.....	39
5.4.2 Kültür Suşlarının Üretilmesi.....	40
5.4.3 Sıvı Besiyeri.....	40
5.4.3.1 Substrat konsantrasyonu etkisi.....	41
5.5 Bradford Yöntemi ile Protein Miktar Tayini.....	41
5.6 Enzim Aktivitesi Tayini	43
5.7 Amonyum Standart Grafiğinin Çizilmesi	44
5.8 Optimum pH'nın Belirlenmesi.....	46
5.9 Optimum Tampon Derişiminin Belirlenmesi	46
5.10 Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi	47
5.11 Enzim Termal Kararlılığı	47
5.12 Enzimin Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi.....	47
5.13 Depolama Kararlılığı.....	47

5.14 Formüller ve Hesaplamalar	47
5.14.1 Protein Miktarının Hesaplanması.....	47
5.14.2 Enzim Aktivitesinin Hesaplanması.....	48
5.14.3 Spesifik Aktivitenin Hesaplanması.....	48

BÖLÜM 6

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	49
6.1 Giriş.....	49
6.2 <i>Hypocrea jecorina</i> saf kültüründen Glutamat Oksidaz Homojenatı Eldesi	50
6.3 Enzim Aktivitesi Tayini	50
6.4 Protein Tayini	50
6.5 Substrat Konsantrasyonunun Enzim Üretimi Üzerine Etkisi.....	51
6.6 Enzim Aktivitesine Etki Eden Parametreler.....	52
6.6.1 pH'nın Etkisi.....	52
6.6.2 Tampon Derişiminin Etkisi.....	54
6.6.3 Sıcaklığın Etkisi.....	55
6.7 Enzimin Termal Kararlılığı	57
6.8 Enzimin Aktivasyon Enerjisi ve Yarı ömrünün Hesaplanması	58
6.9 Enzimin Depolanma Süresince Kararlılığı.....	62

BÖLÜM 7

SONUÇ VE ÖNERİLER.....	64
KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ.....	72

SİMGE LİSTESİ

α	Alfa
g	gram
L	Litre
μL	Mikrolitre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	milimolar
M	Molarite
M_A	Mol kütleli
v_{\max}	Maksimum reaksiyon hızı
K_M	Michaelis-Menten sabiti
nm	Nanometre
v_o	Reaksiyon başlangıç hızı
ΔG	Serbest enerji
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat
%	Yüzde
t	Zaman

KISALTMA LİSTESİ

ATP	Adenozin trifosfat
ADP	Adenozin difosfat
BSA	Bovin Serum Albumin
DNA	Deoksiribonükleik asit
EC	Enzyme Commission
EU	Enzim Ünitesi
FAD	Flavin adenin dinükleotid
P _i	Fosfat
GABA	Gamma-aminobütirik asit
GSH	Glutasyon
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
NAD ⁺	Nikotinamid adenin dinükleotid
PDA	Patates dekstroz agar
TCA	Trikloroasetik asit
MSG	Monosodyum Glutamat

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1	Glutamat oksidazın 3 boyutlu kristal yapısı.....2
Şekil 2.2	Enzimin substratla bağlanma şekilleri3
Şekil 2.3	Enzimlerin aktif bölgesi5
Şekil 2.4	Etkileşme sonucu uygunluk modeli (<i>induced fit</i>).....6
Şekil 2.5	Enzim denatürasyon ve renatürasyonu9
Şekil 2.6	Enzimatik reaksiyonun hızına substrat konsantrasyonunun etkisi 10
Şekil 2.7	Glutamat oksidaz enziminin dahil olduğu enzim sınıfı 15
Şekil 2.8	L-glutamat enziminin katalizlediği reaksiyon..... 15
Şekil 2.9	Dilimizin ayırt ettiği tatlar..... 16
Şekil 2.10	Dildeki tat alıcıları 17
Şekil 2.11	Glutamat oksidaz enziminin yapısı 17
Şekil 2.12	Histidin metabolizması 18
Şekil 3.1	Polipeptid zinciri ve amino asitler21
Şekil 3.2	Amino asitlerin yapısal özellikleri.....22
Şekil 3.3	Amino asitlerin iç tuz formu24
Şekil 3.4	İç tuz oluşum reaksiyonu24
Şekil 3.5	Karaciğer-sitoplazmasında meydana gelen deaminasyon reaksiyonları25
Şekil 3.6	Glutamatın yapısı.....26
Şekil 3.7	Glutamatın üç boyutlu yapısı26
Şekil 3.8	Glutamat metabolizması sonucu elde edilen ürünler.....29
Şekil 3.9	Glutaminin glutamat üzerinden diğer bileşiklere dönüşümü29
Şekil 3.10	Glutamatın amonyak metabolizmasındaki yeri30
Şekil 4.1	<i>Trichoderma reesei</i> 'nin taksonomisi.....35
Şekil 4.2	Farklı ortamlardaki <i>Trichoderma Reesei</i> türlerinin görüntüleri.....36
Şekil 5.1	Nessler reaktifinin amonyak ile meydana getirdiği reaksiyon.....39
Şekil 5.2	Hazırlanan katı besiyerleri40
Şekil 5.3	<i>Hipochrea Jecorina</i> sıvı besiyerlerinde üretim esnasındaki durumları.....41
Şekil 5.4	Bradford reaktifi ilave edildikten sonra farklı konsantrasyonlarda BSA çözeltilerinin genel görünümü.....42
Şekil 5.5	Bovın serum albumin (BSA) standart grafiği43
Şekil 5.6	Standart grafiği için kullanılan farklı konsantrasyondaki NH ₄ Cl çözeltileri45
Şekil 5.7	Amonyum klorür standart grafiği.....45
Şekil 5.8	Tampon derişiminin aktiviteye etkisinin incelenmesi46
Şekil 6.1	Bradford yöntemiyle protein tayin grafiği 51
Şekil 6.2	Farklı L-glutamat konsantrasyonlarında <i>Hypocrea jecorina</i> saf kültürü elde edilen glutamat oksidaz enzim aktivite değerleri 52

Şekil 6.3	<i>Hypocrea jecorina</i> saf kültüründen üretilen glutamat oksidaz enzim aktivite-lerine karşı değişen pH'nın etkisi	53
Şekil 6.4	<i>Hypocrea jecorina</i> saf kültüründen elde edilen glutamat oksidaz enzim akti-vitesine farklı tampon derişimlerinin etkisi	55
Şekil 6.5	<i>Hypocrea jecorina</i> saf kültüründen elde edilen glutamat oksidaz enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi.....	56
Şekil 6.6	<i>Hypocrea jecorina</i> 'dan üretilen glutamat oksidaz enziminin termal kararlılığı	57
Şekil 6.7	Aktivasyon enerjisinin bulunması için Arrhenius grafiği.....	59
Şekil 6.8	<i>Hypocrea jecorina</i> saf kültüründen elde edilen glutamat oksidaz enziminin 60 ⁰ C-80 ⁰ C arasında elde edilen Arrhenius Grafiği.....	60
Şekil 6.9	<i>Hypocrea jecorina</i> 'dan üretilen glutamat oksidaz enziminin Lineaweaver-Burk Grafiği.....	61
Şekil 6.10	+4 ⁰ C depolama koşullarında glutamat oksidaz enzimi aktivitelerinin zamanla değişimi	62

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2.1 Enzim sınıfları	5
Çizelge 2.2 Glutamat oksidaz üretiminde kullanılan mikroorganizmalar	19
Çizelge 3.1 Esansiyel ve esansiyel olmayan amino asitler	21
Çizelge 3.2 Glutamat amino asidinin iyonlaşabilir gruplarının pK değerleri	26
Çizelge 3.3 Belli başlı gıdalarda glutamat miktarları	27
Çizelge 3.4 Bazı nörotransmitterler ve kanıtlanmış işlemleri	31
Çizelge 5.1 Bradford yönteminde kullanılan BSA çözeltilerinin hazırlanması	42
Çizelge 5.2 Glutamat oksidaz aktivitesinin belirlenmesi için izlenen yol	44
Çizelge 5.3 Amonyum klorür (NH ₄ Cl) standart çözeltilerinin hazırlanması	44
Çizelge 6.1 <i>Hypocrea jecorina</i> saf kültüründen elde edilen enzim homojenatı sayısal parametreleri	51
Çizelge 6.2 <i>Hypocrea jecorina</i> saf kültüründen üretilen glutamat oksidaz enziminin farklı pH'larda elde edilen sayısal parametreleri	53
Çizelge 6.3 <i>Hypocrea jecorina</i> saf kültüründen üretilen glutamat oksidaz enziminin farklı tampon derişimlerinden elde edilen sayısal parametreleri	54
Çizelge 6.4 <i>Hypocrea jecorina</i> saf kültüründen üretilen glutamat oksidaz enziminin farklı sıcaklıklarda elde edilen sayısal parametreleri	56
Çizelge 6.5 <i>Hypocrea jecorina</i> saf kültüründen üretilen glutamat oksidaz enziminin farklı sıcaklıklarda elde edilen inaktivasyon hız sabitleri ve yarı ömürleri	59
Çizelge 6.6 <i>Hypocrea jecorina</i> saf kültüründen üretilen glutamat oksidaz enziminin farklı glutamat konsantrasyonlarında elde edilen sayısal parametreleri	61

***Hypocrea jecorina* SAF KÜLTÜRÜNDEN GLUTAMAT OKSİDAZ ENZİMİNİN ÜRETİMİ**

Fatih Mehmet EYNUR

Kimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Emine KARAKUŞ

L-Glutamat Oksidaz (L-Glutamat Oksidaz EC 1.4.3.11), L-glutamati alfa ketoglutarat ve amonyum iyonuna dönüştüren reaksiyonu katalizleyen önemli bir enzimdir. Azot metabolizmasında önemli bir role sahiptir. Son yıllarda bu enzime olan ilgi terapötik ve endüstriyel kullanım alanlarından dolayı artmıştır. Terapötik açıdan karaciğer ve kalp hastalıklarındaki etkilerinin incelenmesi bu enzimin aktivitesine dayandırılmaktadır. Ayrıca hazır gıdalardaki mono sodyum glutamat içeriğinin ileri ki yaşlarda Alzheimer hastalığını tetiklediği göz önünde bulunursa glutamat oksidazın aktivitesinin incelenip biyosensör üretimine ışık tutması büyük önem arz etmektedir.

Glutamat oksidaz aktivitesi yaygın olarak bitkilerde, hayvansal dokularda ve bakteri, maya ve küfleri kapsayan mikroorganizmalarda gözlenmiştir. *Hypocrea jecorina* saf kültüründen glutamat oksidaz enziminin mikrobiyal olarak üretimi, üretilen enzimin optimum koşullarının belirlenmesi ve kinetik parametrelerinin hesaplanması hedeflenmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen glutamat oksidaz enziminin optimum pH değeri 8.5 ve optimum sıcaklığı 37 - 40°C olarak bulunmuştur. Ayrıca üretilen glutamat oksidaz enziminin termal kararlılığı ve depolama kararlılığının oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. *Hypocrea jecorina* saf kültüründen üretilen enzimin kinetik parametreleri olan K_M ve v_{max} değerleri Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek sırasıyla K_M değeri 2.58 mM ve v_{max} değeri 83.33 U/mgprotein olarak bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Glutamat oksidaz, *Hypocrea jecorina*, enzim üretimi, L-glutamat oksidaz

ABSTRACT

GLUTAMATE OXIDASE ENZYME PRODUCTION from *Hypocrea jecorina* PURE CULTURE

Fatih Mehmet EYNUR

Department of Chemistry

MSc. Thesis

Adviser: Assoc. Prof. Dr. Emine KARAKUŞ

L-glutamate oxidase (L-glutamate oxidase EC 1.4.3.11) is the important enzyme that catalyzes the deamination of L-glutamate to alpha-ketoglutarate and ammonium ions. It has an important role in the nitrogen metabolism. Recently, L-glutamate oxidase has received much attention with respect to its therapeutic and industrial applications. Therapeutically in many of liver and heart diseases effects in metabolism are effected with this enzyme activities. Also in mass food production industry the content of mono sodium glutamate (MSG) had very important role in Alzheimer diseases. In this case to analysing the amount of MSG with this enzyme's activity and for biosensor research this study is highlighted. Glutamate oxidase activity is widely distributed in plants, animal tissues and microorganisms including bacteria, yeast and fungi. It has aimed that microbial production of L-glutamate oxidase enzyme from *Hypocrea jecorina* pure culture, determination of optimum conditions and calculation of kinetic parameters of these produced enzymes. As a result of work, it was determined optimum pH value as 8.5 and optimum temperature as 37-40°C for L-glutamate oxidase enzyme produced microorganism. K_M and V_{max} values, the kinetic parameters of enzyme produced *Hypocrea jecorina* pure culture, was determined as 2.58 mM, K_M value and, 83.33 U/mg protein of V_{max} value by plotted Lineweaver-Burk graph, respectively.

In addition, thermal stability and storage stability of L-glutamate oxidase enzyme produced from microorganism specy was determined as very high.

Keyword: L-Glutamate Oxidase, *Hypocrea jecorina*, enzyme production, L-glutamate.

YILDIZ TECHNICAL UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

1.1 Literatür Özeti

Glutamat Oksidaz, L-glutamatu alfa-ketoglutarata dönüştüren reaksiyonu katalizleyen önemli bir enzimdir. Glutamat oksidaz aktivitesi geniş olarak bitkilerde, hayvansal dokularda ve bakteri, maya ve küfleri kapsayan mikroorganizmalarda gözlenmiştir. Mikrobiyal L-glutamat oksidazın glutamatın amonyak metabolizmasındaki anahtar rolünü vurgulamak ve günümüzde çokça kullanılan gıda aromalarındaki glutamat miktarının analiz edilebilmesi adına biyosensör uygulamalarına ışık tutması bu enzime karşı olan önemi artırmıştır [1]. Mikrobiyal olarak L-glutamat oksidaz enzimi üretimi için literatürde *Aspergillus ustus*, *Streptomyces sp.*, *Streptomyces violascens.*, *Streptomyces endus*, *Candida Boidinii*, *Orconectes Limosus*, *Aspergillus ustus*, *Hebeloma spp.* ve *Laccaria Bicolor* gibi mikroorganizmaların kullanıldığı belirtilmiştir.

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmada *Hypocrea jecorina* mikroorganizması kullanılarak glutamat oksidaz enziminin mikrobiyal olarak üretiminin gerçekleştirilmesi ve karakterizasyon çalışmaları yapılması amaçlanmıştır. Glutamat oksidaz enziminin optimum çalışma koşullarını belirlemek amacıyla tampon konsantrasyonu, pH, sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Ayrıca enzimin K_M ve v_{max} değerleri hesaplanarak termal kararlılığı belirlenmiştir.

1.3 Hipotez

Hedeflediğimiz tüm çalışmalarımız amacına ulaşarak ürettiğimiz glutamat oksidaz enziminin optimum koşulları belirlenmiş olup ileride amonyum iyonu tayini için biyosensör hazırlamada başarılı bir şekilde kullanılması için bir temel oluşturmaktadır. Çalışmalarımız glutamat biyosensörü hazırlama doğrultusunda devam edecektir. Literatürde *Hypocrea jecorina* türünden glutamat oksidaz enziminin üretimine rastlanmamış olması çalışmamızın özgün olduğunu göstermektedir.

ENZİMLER

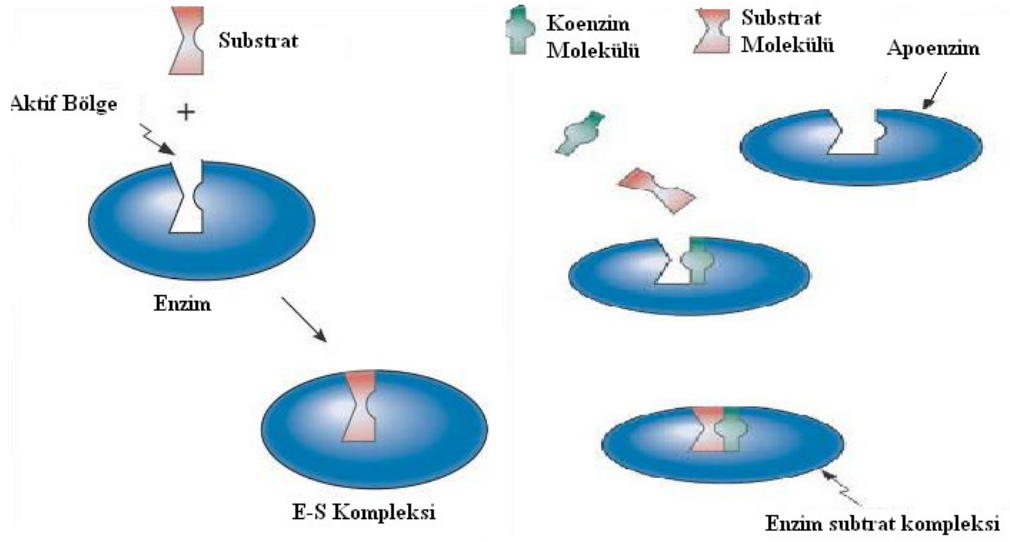
2.1 Genel Bilgi

Çok çeşitlilik gösteren, en fazla özelleşmiş olan ve katalitik aktiviteye sahip olan biyokatalizör etkili protein moleküllerine enzimler adı verilir. Hücre içindeki organik biyomoleküllerin kimyasal reaksiyonlarının hemen hemen hepsi enzimler tarafından katalizlenmektedir. Bugüne kadar çeşitli düzeydeki organizmalardan farklı kimyasal reaksiyonları katalizleyen 2000 kadar enzim keşfedilmiştir [2]. Enzimler DNA dizisindeki bilgilerin amino asit dizisine dönüştürülmesi ile sentezlenirler. Aminoasitler yapılarında karboksil grubu ($-\text{COOH}$), amino grubu ($-\text{NH}_2$) ve değişken bir R grubuna sahiptirler [3]. Bilinen 20 çeşit aminoasit vardır. Enzimlerin birbirinden farklı olmalarının nedeni aminoasit dizilimlerinin farklı olmasıdır (Şekil 2.1). Enzimin aminoasit dizilimi üç boyutlu yapısını ve hangi reaksiyonu katalizleyeceğini belirler[4].



Şekil 2.1 Glutamat oksidazın 3 boyutlu kristal yapısı [5]

Kimyasal termodinamik, dengenin $\Delta G^{\circ} = -RT \ln K$ eşitliğine göre bir kimyasal reaksiyonun serbest enerjisi ile bağlantılı olduğunu öğretir. Reaksiyonlar, denge konsantrasyonları ayarlanıncaya kadar devam ederler ki bu durumda serbest enerji $\Delta G = 0$ dır. Kataliz, serbest enerjide bir değişme olmayıp sonucu belirleyen adımın aktivasyon enerjisinin düşürülmesidir. Bu, enzimin, enzim-substrat kompleksine bağlanmış substrat ile etkileşmesi sayesinde oluşur [7]. Enzimlerin ayırıcı özelliklerinden biri de substrat seçiciliğidir. Her biri farklı bir substrata bağlanarak bu substratın ürüne dönüşmesine yardımcı olurlar. Şekil 2.2 enzimin substratına bağlanma şekillerini göstermektedir [4].



Şekil 2.2 Enzimin substratla bağlanma şekilleri: (a) Enzim-substrat (b) Enzim-substrat-kofaktör ilişkisi [6]

Bazen kofaktör bu bağlanmaya yardımcı olabilmektedir. Enzimle substratı arasındaki bağ kovalent değildir. Enzimin aktif merkezi substratın dış yüzeyinin aynadaki görüntüsü gibidir ve birbirlerini bütünlerler. Dört çeşit enzim substrat ilişkisi vardır [4]:

- Elektrostatik ilişkiler
- Hidrojen bağları
- Polar olmayan (Van der Waals) bağlar
- Hidrofobik ilişkiler

Sadece canlılar tarafından sentezlenebilen enzimler hücre içindeki reaksiyonları düzenleme özelliklerinin yanı sıra hücre dışında da faaliyet gösterebilirler. Enzimler, protein yapısına bağlanabilen ancak kendisi protein yapıda olmayan organik ve anorganik moleküller de içerebilirler. Bu tarz karmaşık yapılarda enzimin protein kısmı “apoenzim”, protein olmayan kısmı ise “koenzim” olarak adlandırılır. İkisinin oluşturduğu yapıya ise “holoenzim” denir [8]. Enzimlerin üç boyutlu yapısında yapılan çalışmalar göstermiştir ki enzimler katalitik aktiviteden sorumlu “aktif bölge” olarak adlandırılan bir bölgeye sahiptir. Bu bölge enzimin %10–%20’lik kısmını meydana getirir [2].

Günümüzde enzimler mikrobiyoloji, biyokimya, tıp, mühendislik, botanik, temizlik maddeleri ve tarım gibi birçok alanda kullanılmaktadır [9]. Enzimler atık suların bertarafında, iyileştirilmesinde, renk gideriminde, tekstil atık sularının arıtımında, aktif çamur sisteminde ve ipek endüstrisinde biyoaktif peptidlerin parçalanmasında gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır [10].

2.2 Enzimlerin İsimlendirilmesi

Her enzime iki isim verilmiştir. Birincisi günlük kullanım için olan, kısa, önerilen isimdir. İkincisi enzimin detaylı olarak tanımlanması gerektiğinde kullanılan, daha kapsamlı sistematik isimdir [11].

2.2.1 Önerilen İsim

En sık kullanılan enzim isimlerinde reaksiyonun substratına, örneğin, glukozidaz, üreaz, sükröz, veya yapılan işin tanımına, örneğin, laktat dehidrogenaz ve adenilat siklaz, -az eki getirilmiştir. (Not: Bazı enzimler, ilgili enzimatik reaksiyon hakkında hiçbir ipucu vermeyen orijinal, sıradan isimlerini korurlar, örneğin, tripsin ve pepsin.) [11].

2.2.2 Sistematik İsim

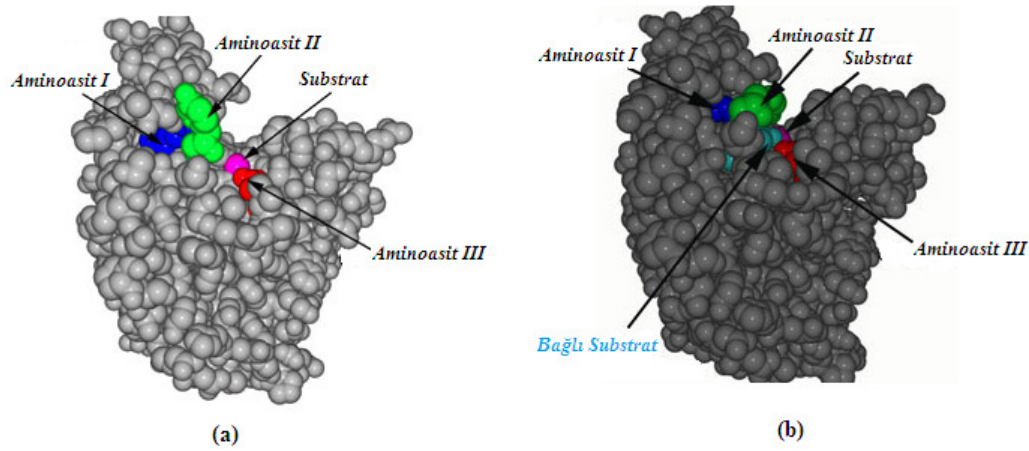
Uluslararası biyokimya ve moleküler biyoloji birliği (IUBMB) enzimlerin her birinin sayısız alt grup içeren altı ana sınıfa bölündüğü bir isimlendirme sistemi geliştirmiştir [6]. Her enzime sistematik kod numarası verilmiştir. Bu numara EC harflerinden sonra art arda gelen dört rakamdan meydana gelir. EC numarasını oluşturan dört rakamdan ilk rakam enzimin bağlı olduğu sınıfı gösterirken, ikinci rakam alt sınıfı, üçüncü rakam alt alt sınıfı ve dördüncü ise alt-alt sınıftaki seri numarasını gösterir. Enzim sınıfları ve reaksiyon tipleri Çizelge 2.1’de verilmiştir [9], [12].

Çizelge 2.1 Enzim sınıfları [7]

Enzim Sınıfları	Reaksiyon Tipi
Oksidoredüktazlar	İndirgenme-yükseltgenme reaksiyonları
Transferazlar	Fonksiyonel grupların transferleri
Hidrolazlar	Hidroliz reaksiyonları
Liyazlar	Çift bağlara ekleme
İzomerazlar	İzomerizasyon reaksiyonları
Ligazlar	ATP bölünmesiyle bağ oluşumu

2.3 Enzimlerin Aktif Bölgeleri

Bir enzimin aktif bölgesi, substratları (varsa kofaktörleri) bağlayan ve bağ yapım ile yıkımında görev yapan rezidüleri kapsar. Bunlara katalitik grup adı da verilir [12]. Aktif bölge substrata komplementer olan üç boyutlu bir yüzey yaratan aminoasit yan zincirleri içerir. Aktif bölge substratı bağlayarak bir enzim-substrat (ES) kompleksi meydana getirir (Şekil 2.3). ES, sonradan enzim ve ürüne parçalanarak enzim-ürün (EP)'e dönüşür [6].



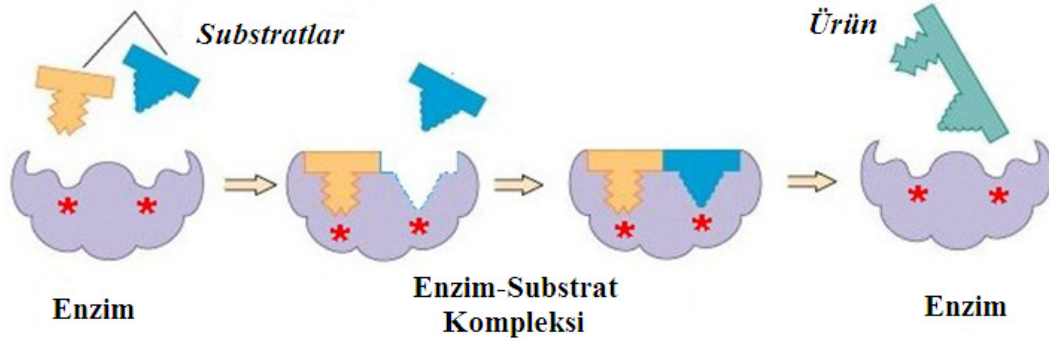
Şekil 2.3 Enzimlerin aktif bölgesi: (a) Substrata komplementer üç boyutlu bir yüzey meydana getiren aminoasit yan zincirleri, (b) Enzim-substrat (ES) kompleksi [13]

1. Aktif bölge, enzimin toplam hacmine oranla küçük bir kısmını oluşturur.
2. Aktif bölge, enzimin lineer yapısının değişik noktalarında bulunan grupların bir araya gelerek oluşturdukları üç boyutlu karmaşık bir bölgedir [12].
3. Substratlar enzimlere nispeten zayıf kuvvetle bağlanır. ES komplekslerinin denge sabitleri 10^{-2} – 10^{-8} M arasında değişir. Bu da 3 ile 12 kcal/mol arasında değişen bağ enerjilerine karşılık gelir. Halbuki kovalent bağların kuvveti 50 ile 110 kcal/mol arasındadır [12]. Bazı durumlarda ise enzim proteinindeki reaksiyon iki adımda

gerçekleşir. Bir reaksiyon ortağı (veya molekülün bir kısmı) önce ana valense göre protein bağlanır ve ancak ikinci adımdan sonra ara bileşikten ürün oluşumu gerçekleşir [7].

4. Aktif bölgeler bir yarıklık veya girinti içinde yer alırlar. Girinti içinde, bağlanma ve kataliz için gerekli polar gruplar vardır. Girintinin apolar karakteri substratın bağlanma gücünü de artırır [12].

5. Spesifik bir bağlanma, atomların aktif bölgede belirli tarzda düzenlenmeleri sonucu mümkün olur. Substrat bu bölgeye tam oturabilecek şekilde sahip olmalıdır. Enzimle substrat arasındaki bu anahtar-kilit modeli kataliz olayının stereospesifikliğini açıklamaktadır. Bununla birlikte, son zamanlarda yapılan çalışmalar bazı enzimlerin aktif bölgelerinin rijid bir yapıda olmadığını göstermiştir. Bu tip enzimlerde aktif bölgenin şekli substratın bağlanmasıyla değişikliğe uğramaktadır. Bölge yalnız bağlanmadan sonra substrata komplementer hale gelmektedir. Bu ikinci çeşit bağlanma modeline *etkileşme sonucu uygunluk modeli (induced fit)* (Şekil 2.4) adı verilir [12].



Şekil 2.4 Etkileşme sonucu uygunluk modeli (*induced fit*) [14]

2.4 Enzim Aktivitesi Tayini

Bir çözelti veya doku ekstraktı içindeki enzim miktarı, enzimin katalitik aktivitesinden faydalanarak bulunur. Bu iş için enzim hakkında şu bilgiler gerekmektedir [12]:

1. Katalizlenen reaksiyon denkleminin net stokiyometrisi,
2. Enzimin kofaktör veya metal iyonuna ihtiyacının olup olmadığı,
3. Substrat ve varsa kofaktörü için K_M değerleri,
4. Optimum pH'sı,

5.Enzimin kararlı ve aktivitesinin yüksek olduğu sıcaklık aralığı,

6.Substratın kayboluş veya ürünün oluşum hızlarının tespit edilebildiği basit bir analitik metod.

Bir çözelti içindeki enzim aktivitesi “enzim ünitesi” cinsinden verilir. 25°C’da ve optimal şartlarda 1 μmol (10^{-6} mol) substratı bir dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarına “enzim ünitesi” denir ve EU veya U şeklinde gösterilir [12].

Uluslararası ölçü sistemine göre zaman birimi “saniye”, madde miktarı birimi “mol” olduğundan bu sistemde enzim aktivite birimi kataldır. 1 katal enzim, belirli şartlar altında saniyede bir mol madde dönüşümüne sebep olur [12].

Bazı enzimler için özel ünite tanımları da vardır. “Spesifik aktivite” (özellik aktivite) terimi de mg protein başına düşen enzim ünitesi (U/mg protein) olarak tarif edilir. Bu, enzim saflığının bir ölçüsüdür ve enzim izolasyonu esnasındaki basamaklarda maksimum ve sabit bir değere ulaşır. Böylece enzimin saf halde elde edildiği anlaşılır [12].

Birim zamanda bir enzim molekülü tarafından dönüşüme uğratılan substrat moleküllerinin sayısını (veya aynı şey olan μmol enzim başına μmol substrat sayısını, yani molar aktiviteye turnover sayısı denir. Turnover sayısının hesaplanması için yalnız enzim aktivitesi değil, bağlı molekül kütlesi de bilinmelidir. Yüksek bir turnover sayısı katalizlenen reaksiyonun çok hızlı yürüdüğü anlamındadır [7].

2.5 Enzim Aktivitesi Üzerine Etki Eden Faktörler

2.5.1 Substrat Konsantrasyonu

Substrat konsantrasyonda yapılan artırma reaksiyon hızını artırır. Bunun nedeni, enzim moleküllerinin daha fazla substrat molekülleri ile çarpışarak reaksiyon yönünü ürünlere doğru ilerletmesidir [15]. Fakat bir noktadan sonra substrat konsantrasyonu ne kadar artarsa artsın hızın sabit kaldığı gözlenir. Bunun nedeni bütün enzimlerin dolu olması ve çalışmasıdır. Buna “maksimum hız (v_{max})” denir [4].

2.5.2 Enzim Miktarı

Enzimle katalizlenen reaksiyonlarda substrat konsantrasyonu yüksek miktarda ise, reaksiyonun başlangıç hızı (v_0), enzim konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak artarken reaksiyon hızı belli bir düzeye vardığında ise azalır [16].

2.5.3 pH Etkisi

Her enzim için aktivitelerin maksimum olduğu pH değerleri vardır. Bu değerlerin üzerinde ve altında aktivite düşer. Bununla birlikte bütün enzimlerin pH-aktivite eğrileri aynı şekilde değildir. Bir enzimin pH-aktivite ilişkisinde etkili olan faktörler [12]:

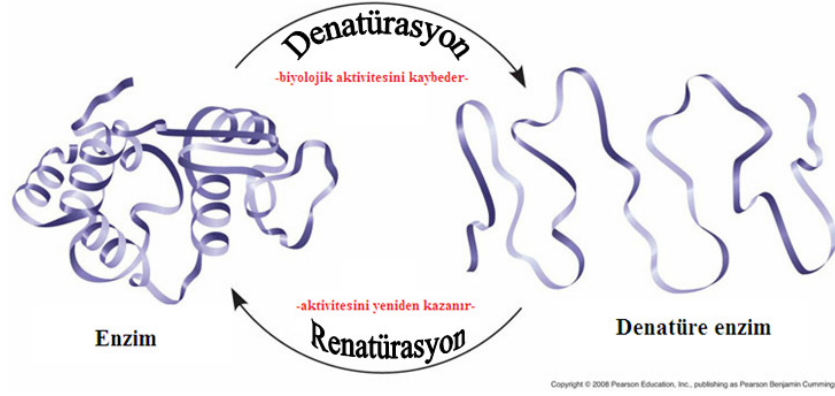
- 1.Substratı bağlamada görev alan ve enzimin aktif bölgesinde bulunan iyonlaşabilir grupların pK'sı,
- 2.Enzime bağlanma olayında görev gören substrat gruplarının pK'sı,
- 3.Enzim üzerindeki katalitik göreve sahip grupların pK'sı,
- 4.Enzimin biyolojik olarak aktif konformasyonunu belirleyen grupların pK'sı.

pH-aktivite eğrileri, her bir pH için substratla doyurulmuş enzim çözeltileri ile yapılan deneyler sonucu elde edilir. Çünkü bir çok enzimin K_M sabiti pH ile değişir [12].

Bir enzimin optimum pH'sı normal hücre içi ortamı pH'sı ile aynı değildir. Bu durum hücre içindeki enzim aktivitesinin kontrolünde, pH-aktivite ilişkisinin önemini göstermektedir [12].

2.5.4 Sıcaklık Etkisi

Sıcaklıktaki artış kimyasal reaksiyonlara katılan moleküllerin kinetik enerjilerinin artmasına ve reaksiyon hızının belli oranda yükselmesine yol açar. Enzimlerin katalizlediği reaksiyonlar da kimyasal reaksiyonlara benzer özellikler gösterir [4]. Isının daha da arttırılması sonucunda enzimin üç boyutlu yapısı bozularak denatürasyona bağlı olarak reaksiyon hızında bir azalma meydana gelir [4], [11]. Şekil 2.5'de bir enzimin denatürasyona uğramadan önceki ve sonraki yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.5 Enzim denatürasyon ve renatürasyonu [17]

Enzim yapısındaki bozulmalar aktif merkezin konfigürasyonunu değiştirir ve enzimin katalitik özelliği kaybolur. Reaksiyon hızı optimum sıcaklığa ulaşıncaya kadar artar, optimum sıcaklıkta en yüksek seviyeye ulaşır [18].

2.5.5 Kofaktör Konsantrasyonu

Bazı enzimler, enzimatik reaksiyon için gerekli olan bir nonprotein kofaktörle birleşirler. Sıklıkla karşılaşılan kofaktörler arasında metal iyonlar (Zn^{2+} , Fe^{2+}) ve koenzim olarak bilinen, genellikle vitamin türevi olan (NAD^+ , FAD, koenzim A) organik moleküller yer alır. Holoenzim, kofaktörüyle birlikte enzimi ifade eder. Apoenzim, holoenzimin protein kısmını ifade eder. Uygun kofaktör yoksa, apoenzim biyolojik aktivite gösteremez. Prostetik grup enzimden ayrılamayan sıkıca bağlı bir koenzimdir [11].

2.6 Enzim Kinetiği

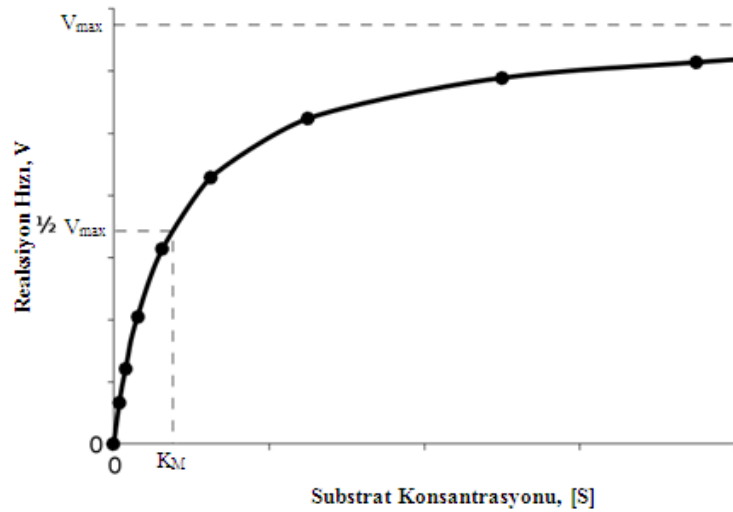
2.6.1 Michaelis-Menten Eşitliği

Enzim kinetiği, enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonların hızlarının incelendiği bir konudur. Kimyasal kinetiğin temel prensipleri burada da geçerlidir. Gerçi kimyasal kinetik, reaksiyon hızlarının kantitatif incelenmesini kapsamasının yanısıra reaksiyonların mekanikmalarıyla da ilgilenir. Fakat, burada enzim kinetiği başlığı altında daha çok biyokimyasal reaksiyonların hızları kantitatif olarak incelenerek ve buna etki eden faktörleri de ele alınacaktır [12].

Kimyasal reaksiyonların kinetiği ile ilgili genel prensiplerin enzimli reaksiyonlarda da uygulanır. Bununla beraber bu reaksiyonlarda bazı farklı özellikler vardır. Bunların en önemlisi enzimlerin substratlarına doyma olayıdır. Düşük substrat konsantrasyonunda,

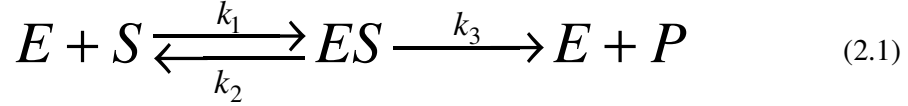
reaksiyon hızı substrat konsantrasyonu ile orantılı olarak artar, yani reaksiyon substrata göre birinci mertebededir. Substrat konsantrasyonu artırıldığında zaman, reaksiyon hızı artışında bir azalma gözlenir ve bu bölümde reaksiyon sıfırinci ile birinci mertebeler arasında karışık bir mertebeye sahip olur. Substrat daha da artırıldığında hız sabitleşir ve substrat konsantrasyonu ile değişmez. Bu bölümde reaksiyon sıfırinci mertebededir ve bütün enzim molekülleri substratla birleşmiş, yani doymuş haldedir. Bütün enzimler sözü edilen doyumluk özelliğini gösterirler. Ancak, her birisinin bu hale erişebilmeleri farklı substrat konsantrasyonlarında mümkün olur [12].

Enzimlerin biyolojik katalizörleri olduğunu biliyoruz. Kimyasal katalizörlerin reaktantlarla daha düşük enerjili geçiş kompleksleri oluşturduğunu biliyoruz. Enzimler de substratlarıyla ve bazen de koenzimleriyle kompleksler oluşturur (ES ile gösterilir). Doygunluk durumunda ortamdaki bütün enzim ES halindedir, yani $[E_T]=[ES]$ 'dir [12].



Şekil 2.6 Enzimatik reaksiyonun hızına substrat konsantrasyonunun etkisi [18]

1913 yılında Leonor Michaelis ve Maud Menten, enzimli reaksiyonların ilk basamağında bir ES oluşmasından ve enzimlerin doyumluk özelliğinden yola çıkarak, Şekil 2.6'daki grafiği verecek bir model geliştirdiler. Bu model bir çok enzimin kinetik özelliğini açıklamada başarılı olmuştur. Michaelis ve Menten, enzimli bir reaksiyonu Eşitlik 2.1'de verilen denklemle gösterdiler.



Buna göre; enzim (E) ve substratı (S) k_1 hız sabiti ile ES; enzim-substrat kompleksini oluşturmaktadır. ES kompleksinin iki yolu vardır: Ya k_2 hız sabiti ile tekrar E ve S'ye ayrışacak veya k_3 hız sabiti ile ürüne (P) dönüştürecektir. Burada ürünün tekrar ES kompleksine dönüşmeyeceği farz edilmektedir. Ürün konsantrasyonunun ihmal edilebilecek seviyede olduğu başlangıç durumunda, bu varsayım tamamen doğrudur. Yukarıdaki reaksiyonda ürünün oluşum hızı Eşitlik 2.2'de verilmektedir.

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_3[ES] \quad (2.2)$$

Burada ES terimini enzim ve substrat konsantrasyonları gibi bilinen değerler cinsinden göstermemiz gerekmektedir. ES'nin oluşma ve parçalanma hızları Eşitlik 2.3 ve 2.4'te verilmektedir.

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] \quad (2.3)$$

$$-\frac{d[ES]}{dt} = k_2[ES] + k_3[ES] \quad (2.4)$$

ES kompleksi konsantrasyonunun reaksiyon boyunca nisbeten sabit kaldığı, yapılan spektroskopik çalışmalarda bulunmuştur. Bu da ES kompleksi oluşma hızının parçalanma hızına eşit olmasıyla mümkündür. Böylece Eşitlik 2.5 elde edilir.

$$\frac{d[ES]}{dt} = -\frac{d[ES]}{dt} \quad (2.5)$$

$$k_1[E][S] = (k_2 + k_3)[ES] + [ES]$$

Buradan [ES] çekilip bir düzenleme yapılırsa Eşitlik 2.6 elde edilir.

$$[ES] = \frac{[E][S]}{(k_2 + k_3)/k_1} \quad (2.6)$$

Bu eşitlikteki sabitleri tek bir terimde toplamak için $(k_2+k_3)/k_1=K_M$ yazarız. Burada K_M 'ye Michaelis sabiti adı verilir. Bu sabit yerine konduğu zaman Eşitlik 2.7 elde edilir.

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_M} \quad (2.7)$$

Eşitlik 2.7'de pay'da bulunan [E] ve [S] terimleri incelenirse burada herhangi bir andaki S konsantrasyonunu başlangıçtaki ile aynı alabiliriz. Çünkü enzim konsantrasyonu substrat konsantrasyonundan pek çok defa küçük olduğundan reaksiyon boyunca S konsantrasyonunun değişmediğini kabul ederiz. Fakat serbest haldeki enzim konsantrasyonu ([E]), toplam enzim konsantrasyonu ($[E_T]$) ile [ES] arasındaki farka eşittir (Eşitlik 2.8).

$$[E] = [E_T] - [ES] \quad (2.8)$$

Bu ifadeyi Eşitlik 2.7'de [E]'nin yerine koyarsak Eşitlik 2.9 elde edilir.

$$[ES] = \frac{([E_T] - [ES])[S]}{K_M} \quad (2.9)$$

Eşitlik 2.9'u [ES] için çözdüğümüzde Eşitlik 2.10 elde edilir.

$$[ES] = [E_T] \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (2.10)$$

$v = k_3[ES]$ denkleminde [ES] yerine Eşitlik 2.10'da elde edilen denklem konursa Eşitlik 2.11 elde edilir.

$$v = k_3[E_T] \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (2.11)$$

$[E_T]=[ES]$ doygunluk halinde reaksiyon maksimum hızla yürür. Öyleyse $v_{\max} = k_3[E_T]$ olacaktır. Elde edilen bu denklem Eşitlik 2.11'de yerine koyulursa Eşitlik 2.11 elde edilir.

$$v = \frac{v_{\max}[S]}{[S] + K_M} \quad (2.11)$$

Bu eşitliğe Michaelis-Menten denklemi adı verilir ve Şekil 2.6'daki eğrinin kinetik özelliklerini ifade eder. Düşük substrat konsantrasyonlarında $K_M \gg [S]$ olacağından $[S]$ ihmal edilir ve denklem düzenlenir (Eşitlik 2.12).

$$v = \frac{v_{\max}}{K_M}[S] \quad (2.12)$$

Şekil 2.6'daki eğrinin başlangıç kısmı Eşitlik 2.12'deki v - $[S]$ ilişkisini göstermektedir. $[S] \gg K_M$ olduğu yüksek substrat konsantrasyonunda Eşitlik 2.11'deki K_M ihmal edilir ve $v = v_{\max}$ olur. Burada bütün enzim substratla doymuş ve artan $[S]$ ile hız değişmeyen bir sabit maksimum hıza ulaşmıştır.

Hızın $v_{\max}/2$ olduğu durumda, değerleri Michaelis-Menten eşitliğinde (Eşitlik 2.11) yerine koyarsak, $K_M = [S]$ sonucunu elde ederiz. Buradan K_M sabitinin tanımını, "maksimum hızın yarısına erişildiği andaki substrat konsantrasyonu" olarak açıklayabiliriz. Birimi de mol/L'dir.

Michaelis-Menten denklemi, enzimatik etkinin kantitatif incelenmesinde, bütün enzimler için temel bir fikirdir. Fakat bir çok enzim, bu eşitliğin çıkarılması esnasında kabul edilen ideal şartlara uymayabilir. Mesela birden fazla enzim-substrat kompleksinden sonra ürün oluşabilir. Yani reaksiyon Eşitlik 2.12'deki gibi tek basamakta değil, birden çok basamaklar halinde gerçekleşir.



Bunun dışında bazı reaksiyonlarda iki veya daha fazla sayıda substrat olabilir. Böyle bir durumda ES_1 , ES_2 ve ES_1S_2 gibi üç ayrı enzim-substrat kompleksi oluşabilir. Bu tip enzim reaksiyonlarının kinetik analizi çok karmaşıktır ve çözümleri bilgisayarlar aracılığıyla yapılır. Bununla birlikte bütün enzimlerin kinetiğinin analizinde başlangıçtaki Michaelis-Menten eşitliğinden faydalanılır (Eşitlik2.1).

2.6.2 K_M ve v_{max} Değerlerinin Önemi

Enzimlerin K_M değerleri birbirlerine göre farklılık gösterir. Bir çok enzim için bu değer 10^{-1} ile $10^{-6}M$ arasındadır. K_M değeri enzim konsantrasyonuna bağlı değildir. Substratın yapısı, pH, sıcaklık ve iyonik şiddetle değişebilir. Birden fazla substrata sahip enzimlerde, her substrat için ayrı bir K_M değeri vardır [12].

K_M değerinin iki anlamı vardır. Birincisi K_M , enzimin aktif bölgelerinin yarısının dolduğu substrat konsantrasyonudur. İkincisi, K_M değerinin hız sabitleriyle $K_M = (k_2 + k_3)/k_1$ şeklinde eşitliği bulunmaktadır. Bu eşitlikten faydalanarak anlaşılmaktadır ki K_M değeri, enzimin substratına olan ilgisinin bir ölçütüdür. Yüksek K_M zayıf bağlanmayı, düşük K_M kuvvetli bağlanmayı ifade eder [12].

Enzimlerin v_{max} değerleri de birbirlerinden çok farklıdır. Aynı zamanda substratın yapısı, pH, sıcaklık ve iyonik şiddetle de değişirler [12]. v_{max} enzimin katalitik aktivitesinin bir ifadesidir. Çünkü $v_{max} = k_3[E_T]$ ile verilen maksimum hıza belirli konsantrasyondaki enzimin substratıyla doyunluk durumunda erişilir. Doygunluğun çok üzerindeki substrat konsantrasyonlarında hız, enzim miktarıyla doğru orantılıdır [12].

2.7 Glutamat Oksidaz Enzimi

Sistemik olarak L-Glutamat: oksijen oksidoredüktaz olarak isimlendirilen enzimin diğer isimlendirme şekilleri de glutamat oksidaz, glutamik asit oksidaz ve L-glutamat oksidaz'dır [20]. Glutamat oksidaz enziminin prekürsörlerinin hidrolizi ile elde edilen üç boyutlu yapısı bize genel olarak L-amino asit oksidazların yapısı hakkında bilgi vermiştir. [5]. Glutamat oksidaz, katalizlediği kimyasal reaksiyona bağlı olarak enzim numaralandırma sistemine göre ise EC 1.4.3.11 şeklinde isimlendirilir. Şekil 2.7'de glutamat oksidazın ait olduğu enzim sınıfı şematize edilmiştir.

E.C. 1. ... Oksidoredüktazlar

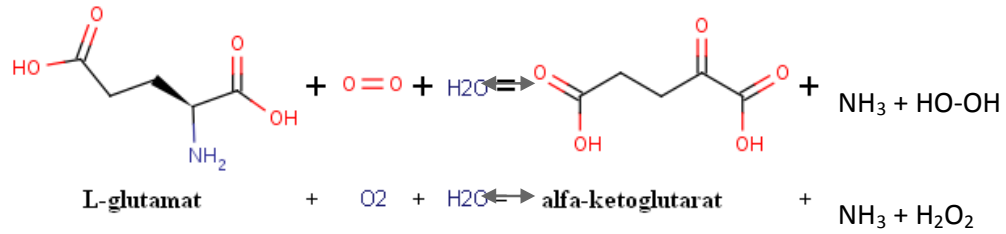
E.C. 1.4. ... CH-(NH)₂ Grubu verici enzimler

E.C. 1.4.3. ... Alıcı grubun Oksijen olduğu enzimler

E.C. 1.4.3.11 L-Glutamat Oksidaz

Şekil 2.7 Glutamat oksidaz enziminin dahil olduğu enzim sınıfı [21]

Bu enzim oksidatif aminsizleştirmeye uğrayarak L-glutamattan, alfa-ketoglutarat ve NH₃ oluşumunun katalizinden sorumludur (Şekil 2.8) [22].



Şekil 2.8 L-glutamat oksidaz enziminin katalizlediği reaksiyon [20]

Enzim, katalizlediği reaksiyon sonucu açığa çıkan alfa-ketoglutarat 'tan dolayı cysteine ve dolaylı olarak diabet hastalığının incelenmesinde önemli bir rol oynamaktadır [23]. Bunun yanında enzimin nerotoksin ilgili özelliğinden faydalanılarak biyosensör geliştirilmesi de sağlanmış bu şekilde nerotoksik aminoasit analizi için biyoanalitik çalışmalar yapılmıştır [24]. Enzim A-tipi Glutamat toksisitesinde önemli bir rol oynar. Bu duruma göre Gutamat oksidazın yüksek düzeylerinde A-tipi glutamat toksisitesinde önemli bir azalma kaydedilmiştir. Böylece oksidatif metabolik yollarda sinirsel iletimde yüksek toksisite oluşturan glutamatın enzim sayesinde azaldığı görülmüştür [25].

L-glutaminaz fermente gıdalarda glutamik asit içeriğinin artmasına sebep olur bu da gıdalarda lezzet artışını sağlar. L-glutaminaz glutamik asit sentezinde aktivite gösteren bir

enzimdir bu da Shoyu Koji¹'nin enzimik sindiriminde önemli bir katkı maddesidir. Çin yemeklerinde tat arttırıcı olarak kullanılan mono sodyum glutamatın (MSG; glutamik asidin endüstriyel kullanım formu) yerini L-glutaminaz almıştır. Bunun en büyük nedeni bazı insanların glutamata karşı alerjik fonksiyon göstermesidir [1]. Mono sodyum glutamat bazı insanlarda hırıltı, kalp atış hızında değişmeler ve nefes alma zorluğu gibi negatif etkilere sebep olduğuna dair tartışmalar bulunmaktadır [26].

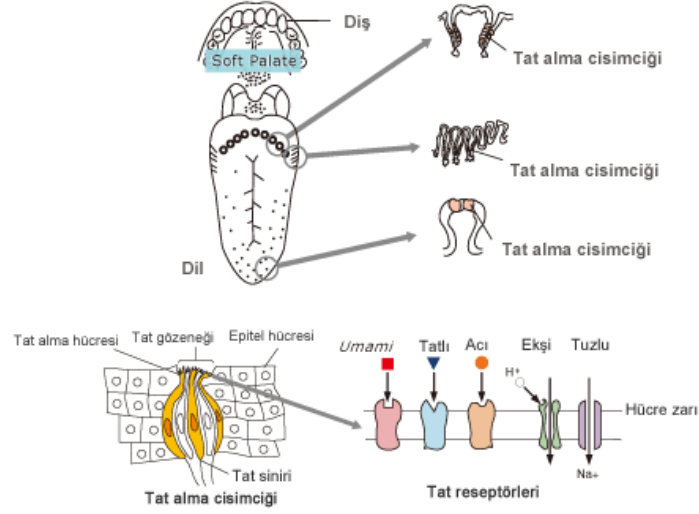
Glutamat miktarı glutamin enzimi içinde metabolik yolda bir öncül madde sentezini sağladığından önemlidir ve glutaminaz genellikle soya sosu gibi fermente gıdalarda lezzetli tadı denetleyen önemli bir enzim olarak kabul edilmektedir. Soya sosu yapımında lezzetli bir tat elde edebilmek için glutamik asit düzeyinin yüksek olması önemlidir. Gıdalarda ortamın glutamik asit derişimini artırarak tat verici özelliğinden dolayı gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılır. Bu benzersiz tat "umami" adı ile adlandırılmaktadır [1], [27], [28].

Dilimiz beş temel tadı birbirinden ayırt edebilir. Bunlar, tatlı, tuzlu, acı, ekşi ve umamidir (Şekil 2.9) [30]. Temel tat, öteki tatların kombinasyonu ile oluşturulamayacak, bağımsız bir tattır. Temel tatlardan umami, 1908'de Dr. Kikunae Ikeda tarafından keşfedilmiştir. Kendisi *kombu dashi* (esmer su yosunu verek özü) tadına odaklanmış ve tat bileşeninin glutamat olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu tada "umami" adını vermiştir [31]. Umami, Japonya'da yüzyıllardır bilinen bir tattır; ancak araştırmacılar, dildeki umami tat alıcılarını yeni keşfettiler (Şekil 2.10). Özellikle, glutamat içeren besinlerden umami duyumu alıyoruz [30]. Bu tadı, balık, et ürünleri, peynir, domates, bezelye, mısır gibi besinlerde buluruz [27], [30].



Şekil 2.9 Dilimizin ayırt ettiği tatlar [32]

¹ Shoyu; soya fasulyesi, kavrulmuş buğday, deniz tuzu ve kojiden (*Aspergillus oryzae*) yapılmış, soya sosu için kullanılan Japonca bir kelimedir. Nemli ortamda fermente olup gelişen sporlar benzersiz bir enzim üretirler. Bu yöntemle soya sosu üretimi Japonya'da 1600'lü yıllardan beri uygulanan bir yöntemdir [35].



Şekil 2.10 Dildeki tat alıcıları [31]

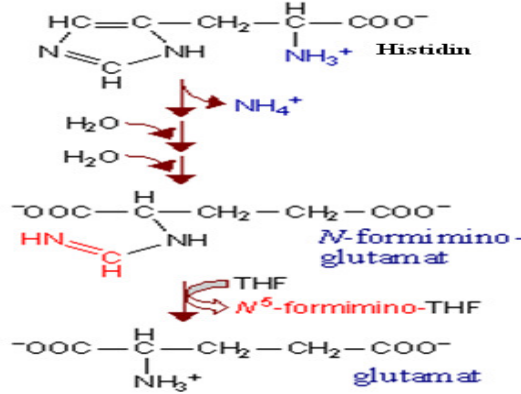
Glutamat oksidaz enziminin endüstriyel uygulamasının yanı sıra terapötik kullanım alanı da bulunmaktadır. Bu enzim biyolojik sıvılarda öncül reaksiyonlardaki aktiviteleri incelenmesini sağlayarak bir çok karaciğer ve kalp rahatsızlıklarının tedavisinde etkin rol oynar [33].



Şekil 2.11 Glutamat oksidaz enziminin yapısı [34]

Memeli hücrelerinde L-glutamat oksidaz enziminin (Şekil 2.11) eksikliğine bağlı dolaylı bir şekilde Histidinemi rahatsızlığına da neden olduğu bazı metabolik yollarla kanıtlanmıştır. Buna göre **Histidaz eksikliğine** bağlı kalıtsal bir hastalık olan Histidinemi'de plazmada ve idrarda histidin miktarı artar. Histidinin transaminasyonu ile oluşan imidazolpirüvik asit ve imidazolasetik asit gibi metabolitleri

idrarla atılır. En önemli belirtisi çocuklukta görülen konuşma kusurlarıdır. **FİGLU atılımı:** *Folat eksikliğinde ve glutamat-formimino transferaz eksikliğinde* idrarla FİGLU (N⁵-formiminoglutamat) atılımı artar. B₁₂ vitamini eksikliğinde de folat, N⁵-metiltetrahidrofolat şeklinde kalıp FH₄ şekline dönüşemez ve sonuçta FİGLU atılımı artar. [35] (Şekil 2.12)



Şekil 2.12 Histidin metabolizması. [35]

Glutaminaz enzimi barsağın ana solunum yakıtı olan amonyum ve glutamat ürünlerini oluşturur. Glutaminaz enzimi barsak metabolizmasının merkezinde görev alan enzimdir: Glutaminaz enziminin katalizlediği reaksiyon sayesinde amino gruplarının nakli kolaylaşır. Enerji verimine yönelik ya da pirimidin nükleotidlerin biyosentezinde de görev alır. Yapılan çalışmalarda barsakta glutamin yokluğunda köremler (atrofi) meydana geldiği gözlenmiştir [36].

Glutaminaz aktivitesi geniş olarak bitkilerde, hayvansal dokularda ve bakteri, maya ve küfleri kapsayan mikroorganizmalarda gözlenmiştir. Mikrobiyal L-glutaminazın antitümör aktivite özelliği fark edildiğinden beri bu maddeye karşı ilgi ve önemi artmıştır [1]. Glutaminaz enzimi fonksiyonlarının önemini özetlemek gerekirse, L glutaminaz enzimi antiretroviral¹ ajan olarak, L-glutamil transfer reaksiyonları ile theanine gibi bazı özel kimyasalların sentezinde, L-glutamin miktarının tayini için biyosensör uygulamalarında ve gıda endüstrisinde tat ve aroma artırıcı olarak geniş kullanım alanına sahiptir [38], [39]. Glutamat oksidaz enziminin literatürde farklı mikroorganizma türlerinden üretimi gerçekleştirilmiştir. Bunlardan bazıları Çizelge 2.2'de sunulmuştur.

¹ HIV virüsünün vücutta çoğalmasını ve etkinleşmesini engelleyen, tedavi eden.

Çizelge 2.2 Glutamat Oksidaz üretiminde kullanılan mikroorganizmalar

Bakteriler	Maya	Fungi
<i>Streptomyces sp.</i>	<i>Candida Boidinii</i>	<i>Aspergillus Ustus</i>
<i>Streptomyces violascens</i>		<i>Hebeloma spp.</i>
<i>Streptomyces endus</i>		<i>Laccaria Bicolor</i>

Sukhacheva ve arkadaşları (1999), *Streptomyces sp. Z-11-6* mikroorganizmasını kullanarak L-glutamat oksidaz enzimi üretmişlerdir. Bu doğrultuda; eklenen substratların nem içeriklerinin (%60), aşılana mikroorganizma konsantrasyonunun (5mL), karbon kaynaklarının (*glukoz, mısır ekstraktı*), azot kaynağının ($(NH_4)_2SO_4$.) ve inkübasyon sıcaklığının (26°C) enzim üretimine etkilerini çalışmıştır. Yaptıkları çalışmalar sonucu elde edilen optimum değerler şöyledir: Optimum sıcaklık 37 °C, bunabağlı pH kararlılığı ise 5,5 -9,5 değerleri arasında 60 dakika inkübasyon zamanı ile belirlenmiştir [33].

Supawadee Wachiratianchai ve arkadaşları (2004), *Streptomyces sp. 18G* mikroorganizmasını kullanarak hücre dışı L-glutamat oksidaz enzimini üretmişlerdir. Bu doğrultuda; aşılana mikroorganizma konsantrasyonunun (0.5ml), karbon kaynaklarının (*patates nişastası*), azot kaynaklarının (*yağı alınmış soya*) L-glutamat konsantrasyonunun (%0.005) ve inkübasyon sıcaklığının (27°C) enzim üretimine etkilerini çalışmıştır. Çalışma sonucu elde ettikleri optimum değerler şöyledir: Optimum inkübasyon sıcaklığı 37°C, optimum pH değeri 7.0-7.4 olarak bulmuşlardır [40].

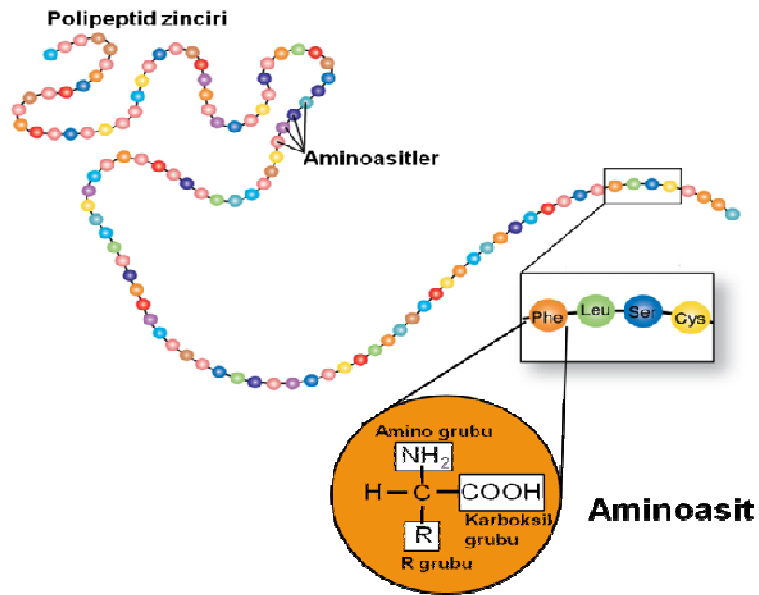
Chien-Yuan Chen ve arkadaşları (2001), *Streptomyces platensis NTU 3304*. mikroorganizmasını kullanarak katı ortam fermantasyonu metodu ile L-glutamat oksidaz enzimi üretmişlerdir. Çalışma sonucu elde ettikleri optimum değerler şöyledir: Optimum sıcaklık 25°C, optimum pH değeri 8.0 ve karbon kaynağı olarak en iyi değeri de patates nişastasında elde etmiştir [41].

Fukunaga ve Arkadaşları (1997), *Candida Boidinii* mikroorganizmasını kullanarak katı ortam fermantasyonu metodu ile L-glutamat oksidaz enzimi üretmiştir. Bu doğrultuda; agro-endüstriyel kaynakların (*malt ekstraktı, vb.*), aşılana mikroorganizma konsantrasyonunun (0.3mL), karbon kaynaklarının (*glukoz, mısır kamışı likörü*), pH değerinin (*pH 6.0*), azot kaynaklarının (*NH₄Cl, Pepton vb.*) ve inkübasyon sıcaklığını (30 °C) enzim üretimine etkilerini çalışmıştır. Yaptığı çalışmalar sonucu, pH değeri 7.0, aşılana mikroorganizma konsantrasyonu 3g olacak şekilde 30°C inkübasyon sıcaklığında 7 gün inkübe edilerek maksimum enzim aktivitesi elde edilmiştir [42].

AMİNO ASİTLER

3.1 Genel Bilgi

Proteinler yaşayan sistemler içinde en fazla miktarlarda bulunan ve en fazla fonksiyona sahip moleküllerdir [11]. Proteinler; şekil, büyüklük, yük, hidrojen bağı yapma kapasitesi ve kimyasal aktivite yönünden birbirinden farklı R gruplarını bulunduran yirmi çeşit amino asit ihtiva eder. Bakteriden insana kadar bütün türlerin, bütün proteinleri aynı yirmi amino asitten yapılmış olup, bu protein alfabeti yeryüzünde hayatın başlangıcından beri geçerliliğini sürdürmektedir. Proteinlerin birbirinden son derece farklı fonksiyonları, aynen ciltler dolusu kitabın 29 harften yazılması gibi, sözü geçen amino asitlerin değişik dizilişleri ile ortaya çıkmaktadır (Şekil 3.1) [12].



Şekil 3.1 Polipeptid zinciri ve amino asitler [43]

Yani bütün proteinler lineer amino asit polimerleri olarak ortak bir yapısal özelliğe sahiptirler. Proteinler inanılmayacak kadar çok çeşitli fonksiyon üstlenirler [6]. Hücre kuru ağırlığının %50'sinden fazlası proteindir [44].

Standart amino asitlerin hepsi vücutta metabolik ara ürünlerden sentez edilememektedir. Vücutta sentezlenemeyen, protein yapısı için besinlerle alınması zorunlu olan amino asitlere esansiyel amino asitler denir (Çizelge 3.1) [45].

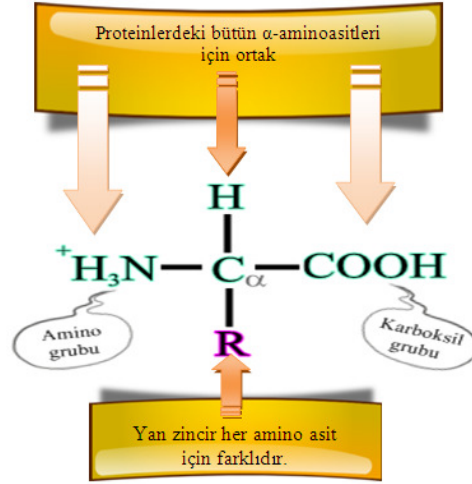
Vücutta metabolik ara ürünlerden sentez edilebilen amino asitler, esansiyel olmayan amino asitler olarak bilinirler(Çizelge 3.1) [45].

Çizelge 3.1 Esansiyel ve esansiyel olmayan amino asitler [45]

Esansiyel Amino asitler	Esansiyel Olmayan Amino asitler
Arginin*	Alanin
Histidin*	Asparagin
İzolösin	Aspartat
Lösin	Glutamat
Valin	Glutamin
Lisin	Glisin
Metiyonin	Prolin
Treonin	Serin
Fenilalanin	Sistein (Metiyoninden)
Triptofan	Tirozin (Fenilalaninden)
* Çocuklarda esansiyel olup yetişkinlerde olmayan amino asitler.	

3.2 Amino Asitlerin Yapısı ve Özellikleri

Amino asitler, bir asit ve bir amino grubu içeren bileşiklerdir [44]. α -Amino asitler, α -karbon atomuna bir amino grubu ($-\text{NH}_2$), bir karboksil grubu ($-\text{COOH}$), bir hidrojen atomu ($-\text{H}$) ve bir yan grubun ($-\text{R}$) bağlanmasından oluşurlar (prolin hariç) (Şekil 3.2) [12].



Şekil 3.2 Amino asitlerin yapısal özellikleri

Fizyolojik pH'da (yaklaşık pH 7.4) karboksil grubu dissosiyeye olarak negatif yüklü karboksil iyonunu ($-\text{COO}^-$) oluşturur ve amino grubu protonlanır ($-\text{NH}_3^+$). Proteinlerde bu karboksil ve amino gruplarının hemen hepsi peptid bağının yapısında yer alır ve kimyasal reaksiyonlara giremez (hidrojen bağı oluşumu hariç). Bu yüzden, bir amino asidin proteindeki rolünü belirleyen, yan zincirlerin yapısıdır. Bu nedenle amino asitleri yan zincirlerinin özelliklerine göre nonpolar ya da polar (yüksüz, asidik veya bazik) olarak sınıflandırılır [11].

A.Nonpolar yan zincirli amino asitler

Glisin (Gly, G)	Alanin (Ala, A)	Valin (Val, V)
Lösin (Leu, L)	İzolösin (Ile, I)	Fenilalanin (Phe, F)
Triptofan (Trp, W)	Metiyonin (Met, M)	Prolin (Pro, P)

B.Yüksüz polar yan zincirli amino asitler

Serin (Ser, S)	Treonin (Thr, T)	Tirozin (Tyr, Y)
Asparagin (Asn, N)	Sistein (Cys, C)	<i>Glutamin (Gln, Q)</i>

C.Asidik yan zinciri olan amino asitler

Aspartik Asit (Asp, D)	Glutamik Asit (Glu, E)
------------------------	------------------------

D.Bazik yan zinciri olan amino asitler

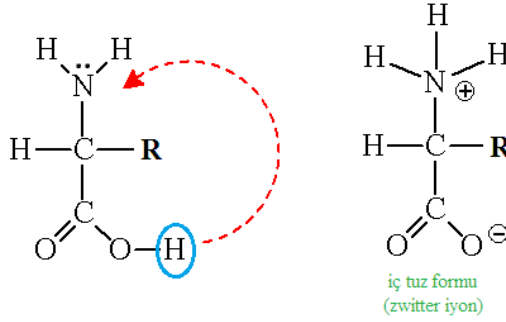
Histidin (His, H)

Lizin (Lys, K)

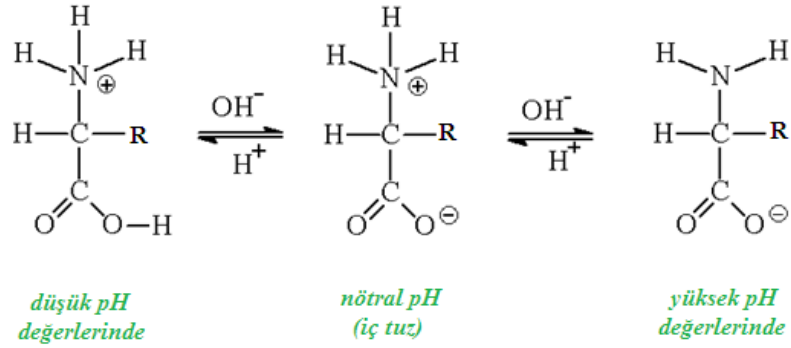
Arginin (Arg, R)

3.2.1 İç Tuz Formu

Karboksil grubu asit grubu olarak H^+ salıverebilir. Bazik amino grubu amonyağa benzer, H^+ iyonu bağlar. Her iki grup dissosiyasyon olursa Şekil 3.3'teki gibi bir iç tuz oluşur [7].



Şekil 3.3 Amino asitlerin iç tuz formu



Şekil 3.4 İç tuz oluşum reaksiyonu [46]

Belirli bir pH değerinde amino asidin iç tuz formu hakim olarak bulunur (Şekil 3.4). Bu nokta izoelektrik nokta olarak tanımlanır. İzoelektrik nokta asidik ve bazik grupların pK değerlerinden hesaplanır [7].

$$\frac{pK_1 + pK_2}{2} = \text{İzoelektrik nokta}$$

3.3 Amino Asitlerin Amino Gruplarının Metabolizması

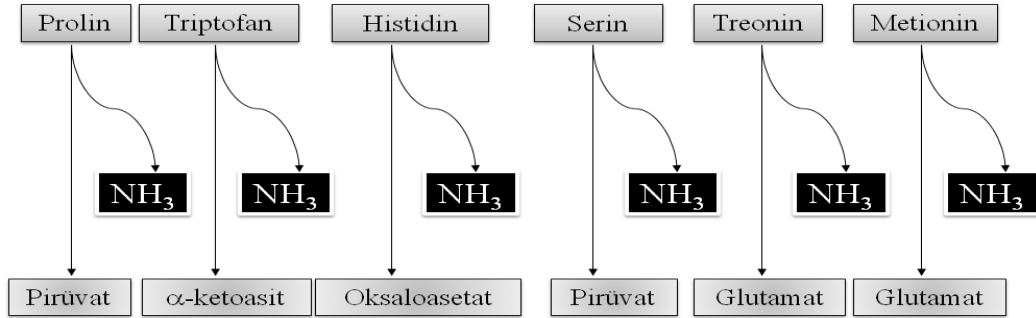
Amino asit katabolizmasının ilk basamağı alfa-amino grubunun ayrılmasıdır. Bu transaminasyon ile sağlanır. Glutamata aktarılan azot gruplarının serbestleştirilmesi olayı ise oksidatif deaminasyon ile sağlanır [44].

3.3.1 Transaminasyon

Bir amino asidin α -amino grubunun, bir α -keto aside naklidir. Reaksiyon sonunda serbest NH_3 açığa çıkmaz. Transaminasyon, nonesansiyel amino asitlerin biyosentezinde, birçok amino asidin yıkılımlında ve amino asitlerin değiş tokuşunda kullanılır [44].

3.3.2 Oksidatif Deaminasyon

Burada amino grubu, serbest amonyak halinde açığa çıkar. Başlıca karaciğer ve böbrekte ve sadece mitokondrilerde meydana gelir. Böylece amino asitlerin amino grupları amonyak halinde açığa çıkmış olur (Şekil 3.5) [44].

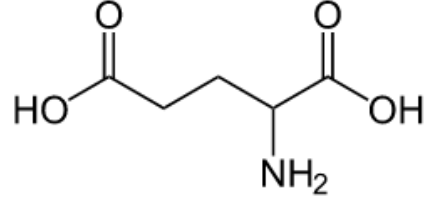


Şekil 3.5 Karaciğer-sitoplazmasında meydana gelen deaminasyon reaksiyonları [47]

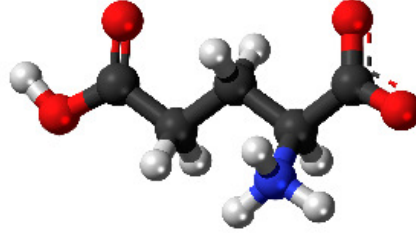
3.4 Glutamat

3.4.1 Genel Bilgi

Glutamat (2-Aminopentanedioic acid, Glu veya E) genetik olarak kodlanan 20 amino asitten biridir. Molekül formülü $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$ olup mol kütlesi $147.13 \text{ g.mol}^{-1}$ dir [48]. Yan zinciri, fonksiyonel grup olarak karboksil grubu içermektedir ve pH 4.1'den yüksek pH'larda negatif yüklenir. Kodu GAA ve GAG şeklindedir [48]. Glutamatın yapısı Şekil 3.6 ve Şekil 3.7'de, glutamata ait pK değerleri ise Çizelge 3.2'de görülmektedir.



Şekil 3.6 Glutamatın yapısı [48]



Şekil 3.7 Glutamatın üç boyutlu yapısı [48]

Çizelge 3.2 Glutamat amino asidinin iyonlaşabilir gruplarının pK değerleri (25°C'da) [12]

	pK ₁	pK ₂	pK _R	pI
Glutamat	2.19	9.47	4.25	3.22

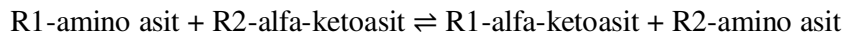
L -glutamik asit en çok proteinlerde bulunan farklı oranlarda ve her protein içeren gıdada mevcuttur. Kendisinin esansiyel olmayışı kaynak çeşitliliğini artırmaktadır. Aşağıdaki örnekler, ek olarak glutamik asit yüzdesi toplam proteine göre belirtilir ve 100 g gıdaya karşılık değerler için geçerlidir. Listede serbest özellikle zengin L -glutamat kaynağı sebze ve et ürünleri bulunmaktadır.

Çizelge 3.3 Belli başlı gıdalardaki toplam glutamat miktarları [48]

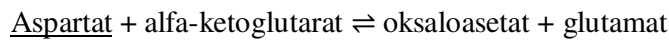
Gıda	Total Protein	Glutamik asit	Toplam Oranı
Sığır , çiğ	21.26 g	3191 mg	15.0%
Tavukgöğsü fileto , çiğ	23.09 g	3458 mg	15.0%
Somon , çiğ	20.42 g	2.830 mg	13.9%
Yumurta	12.58 g	1.676 mg	13.3%
Inek sütü , % 3.7 yağ	3.28 g	687 mg	20.9%
Ceviz	15.23 g	2.816 mg	18.5%
Tam buğday unu	13.21 g	4328 mg	32.8%
Mısır-buğday unu	6.93 g	1.300 mg	18.8%
Pirinç , soyulmamış	7.94 g	1.618 mg	20.4%
Bezelye kurutulmuş	24.55 g	4196 mg	17.1%
Domates püresi	1.65 g	658 mg	39.9%

3.4.2 Glutamat ve Fonksiyonları

Glutamat, hücre metabolizmasında anahtar moleküldür. İnsan vücudunda, besinsel proteinler sindirilerek amino asitlere parçalanırlar. Bu aminoasitler de, vücutta, diğer fonksiyonel rollerde metabolik bir yakıt gibi çalışırlar. Amino asit indirgenmesinde anahtar proses transaminasyondur. Transaminasyon esnasında, amino asitin amino grubu, transaminazla katalize olan alfa-ketoasite transfer olur. Tepkime şu şekilde gerçekleşir:



En yaygın alfa-ketoasit, sitrik asit döngüsünde ortaya çıkan alfa-ketoglutarattır. Alfa-ketoglutarat transaminasyonu sonucunda glutamat oluşur. Ortaya çıkan alfa-ketoasit genelde kullanışlıdır ve yakıt olarak kullanılabilir ya da daha sonraki metabolizma proseslerinde substrat olarak kullanılır. Bu proseslerden bazıları şöyledir:



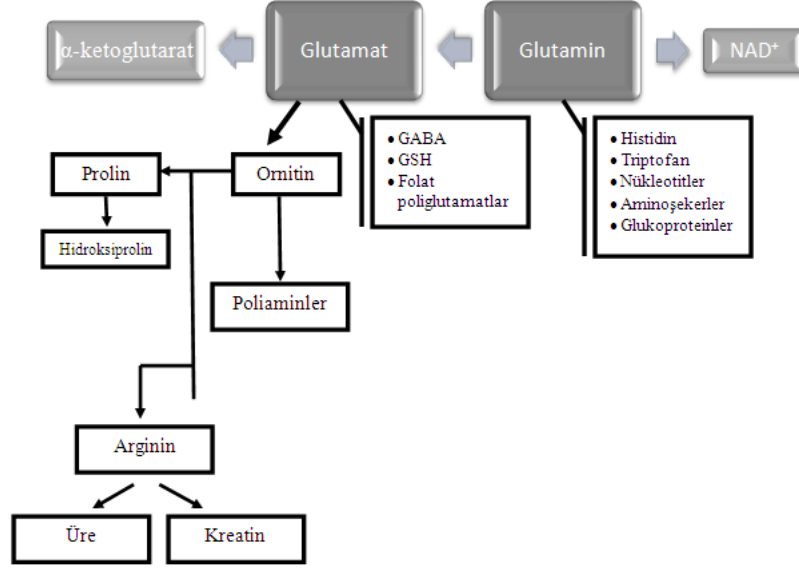
Pürivat ve oksaloasetat, hücre metabolizmalarının anahtar bileşenlerindedir ve substrat olarak veya glikoliz, glukonejeniz ve sitrik asit döngüsü gibi temel proseslerde ara ürün olarak görev yapar. Glutamat, fazla nitrojenin vücuttan atılmasında büyük rol oynar. Glutamat, suyla deaminasyon tepkimesi gerçekleştirir. Deaminasyon, glutamat dehidrojenazla katalizlenen oksidatif bir tepkimedir ve aşağıdaki gibidir:



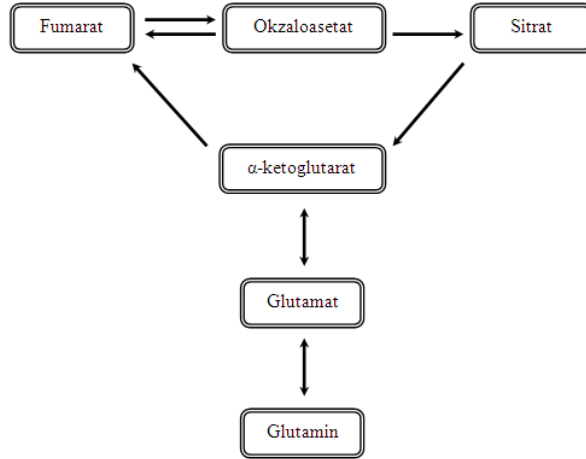
Amonyak, kareciğerde sentezlenen üre olarak vücuttan atılır. Böylece, transaminasyon, nitrojenin amino gruptan çıkartılmasını sağlayan, ara ürün olarak glutamat oluşturan ve sonunda vücuttan üre şeklinde atılmasını sağlayan deaminasyonla bağlantılıdır. Serbest glutamik asit, soya sosu içeren bir çok gıdada mevcuttur. İnsanların hissedebildiği 5 temel tadı da içerir. Glutamik asit genelde gıda katkı maddesi olarak ve sodyum tuzlarının, monosodyum glutamatın (MSG) yapısında tat geliştirici olarak kullanılır [49].

Glutamatın glutamin ile ilişkisinde glutamin beyinde beyin fonksiyonlarının sağlıklı çalışmasında görevli glutamik asite dönüştürülür ayrıca nörotransmitter gamma-aminobutirik asitin (GABA) seviyesini artırır [50] (Şekil 3.8).

Glutaminin özellikle nükleotit sentezinde, glutamat sentezinde ve antioksidan savunmada önemi olan glutatyon sentezinde, glikoneogenezde görev alır (Şekil 3.9). Böylece glutamin, ana solunum yakıtı ve hızlı bölünen hücrelerin metabolik prekürsörü (örneğin; enterosit ve bağışıklık hücreleri) olarak görev alır. Bunun yanında, glutamin, oksidatif stresin yarattığı hasara karşı doğal bir koruyucu ürün olarak görev alır [51], [52]. Ayrıca ısı-şok proteinlerinin sentezini uyarır. Bunlara ek olarak, glutamin hücre volümünün osmotik regülasyonunda önemli rol oynamaktadır. Hem hücre içi protein sentezini uyarır hem de proteinlerin fosforilasyonuna neden olduğu bildirilmiştir [53]. Glutamin, metabolik, antioksidan ve safra kesesi koruyucu etkileri bulunmaktadır. Bu etkiler direkt olarak glutamine veya ürünlerine (glutamikasit veya nükleotid) bağlanabilir [54]. İmmünöütrientlerden biri olan glutamin, bağırsak hücreleri ve lenfosit gibi hızlı çoğalan hücrelerin ana yakıt kaynağıdır [55].



Şekil 3.8 Glutamat metabolizması sonucu elde edilen ürünler [56]



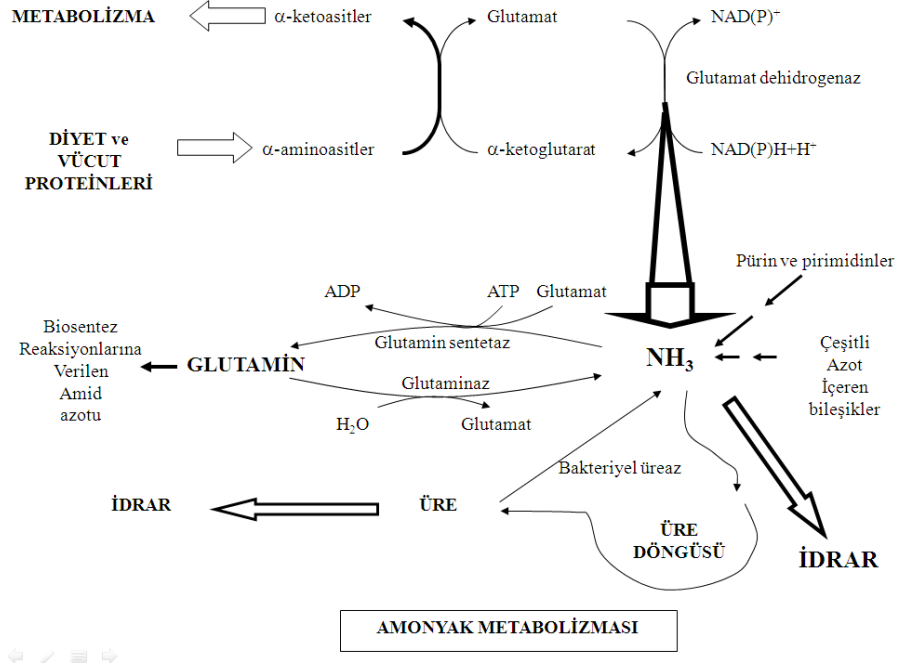
Şekil 3.9 Glutaminin glutamat üzerinden diğer bileşiklere dönüşümü [56]

Glutamin ile ilgili olarak bir çok çalışma yapılmıştır. Hafif olgularda parenteral beslenmede kullanımı sonucu [51];

1. Azot dengesi düzelir
2. Kas glutamin düzeyindeki düşüş azalır
3. İmmünite düzelir.
4. Hastanede yatış süresi azalır.

5. Gastrointestinal sistemin bariyer fonksiyonu düzelir.

Glutamin, amonyağın vücut içerisinde taşınma ve depolanma formudur. Enterositler için birincil, beyin için alternatif yakıt kaynağıdır. DNA ve protein sentezinde rol oynar. Amonyak metabolizmasının önemli bir bileşenidir. Glutamatın amonyak metabolizmasındaki yeri Şekil 3.10'de gösterilmektedir.



Şekil 3.10 Amonyak metabolizmasında glutamatın yeri [47]

3.4.3 Glutamat ve GABA

Beyinde temel uyarıcı nörotransmitter glutamat, temel baskılayıcı nörotransmitter ise GABA'dır. Her iki nörotransmitter de amino asit yapısındadır (amino asitler proteinlerin temel yapı taşlarıdır) ve beyinde yaygın olarak bulunurlar (Çizelge 3.4). Glutamat öğrenme ve hafızanın oluşması için gerekli bir nörotransmitterdir. Glutamatın bu rolü nöronlar arasındaki bağlantıları güçlendirmesine dayandırılmaktadır [57]. Fakat glutamatın aşırı salgılanması nöronlar açısından toksik etki gösterir ve hücre ölümüne yol açabilir. Bu nedenle, aşırı glutamat salgısına yol açan durumlarda (örn. beyin damarlarında tıkanma ya da beyin zedelenmesi gibi) glutamat aktivitesini bir glutamat antagonisti ile baskılamak beyinde oluşabilecek hasarı azaltabilmektedir [58].

Glutamatın aksine, GABA, merkezi sinir sisteminin temel baskılayıcı nörotransmitteridir. GABA reseptörlerinin uyarılması, hiperpolarizasyona neden olarak bu reseptörün bulunduğu hücrelerin aksiyon potansiyeli oluşturma olasılıklarını düşürür. Alkolün etkisi büyük oranda GABA reseptörleri üstündeki etkisine bağlıdır. Benzer şekilde, klinikte endişe azaltıcı ilaçların önemli bir bölümü de GABA iletimini arttırmak yoluyla etki göstermektedir.

Glutamat ile GABA aktivitesi arasındaki denge, merkezi sinir sistemimizin sağlıklı işleyişi için büyük bir öneme sahiptir. Örneğin, GABA reseptörlerini baskılamak epileptik nöbetlere (sara nöbetleri) neden olabilir. Bu nedenle epilepsinin bazı tiplerinde GABA/glutamat dengesinin glutamat lehine bozulduğu düşünülmektedir [59].

Çizelge 3.4. Bazı nörotransmitterler ve kanıtlanmış işlevleri [59].

Nörotransmitter	Fonksiyon	Olgu
Glutamat	Beyindeki temel uyarıcı nörotransmitterdir. Aktarılan bütün bilgiler glutamat aktivitesine bağlıdır. Bellek	Aşırı glutamat aktivitesi sara benzeri nöbetlere ve nöron hasarına yol açabilir.
GABA (γ-amino bütirik asit)	Beyindeki temel baskılayıcı nörotransmitterdir. Uyku, sakinleşme (sedasyon)	GABA etkinliğini arttıran ilaçlar sakinleştirici etki gösterir ve uykuya eğilim oluşturur.
Asetilkolin	Kasların hareketi, öğrenme ve bellek, organların otonom kontrolü	Alzheimer hastalığında asetilkolin sağlayan nöronların eksildiği gözlenmiştir.
Dopamin	Hareket, öğrenme, ödül, motivasyon	Parkinson hastalığında dopamin sağlayan nöronların eksildiği gözlenmiştir. Şizofrenide ise dopamin aktivitesinde artış gözlenir. (Her iki klinik tabloda dopamin farklı nöron topluluklarından kaynaklanır)
Serotonin	Duygu-durum, iştah, uyku, dürtüsellik	Serotonin seviyesindeki düşüş depresyon ve saldırganlık ile ilişkilendirilmiştir.
Norepinefrin	Uyanıklık ve dikkat	Depresyon, dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu, narkolepsi gibi merkezi sinir sistemini ilgilendiren farklı bozuklukların tedavisinde norepinefrin etkinliğini arttıran ilaçlar kullanılır

MANTARLAR

4.1 Genel Bilgi

Bugün dünyada, denizde, karada ve havada olmak üzere geniş bir yayılış alanına sahip mantarlar aşağı yukarı 110000 civarında türe sahiptirler [74]. Bir hücreli mikroskopik mantarlar olduğu gibi boyu metreleri bulanlar da vardır. Mantarlar esas olarak sporla üreyen (kriptogam) canlılar olduklarından üremelerini sağlayan sporları oluşturmak için meyve verirler [75].

Mantarlar, makrofungusların meyveleridir. Mantar terimi, esas olarak makrofungusların yenilebilir türleri için kullanılır [75], [76]. Çok eski zamanlardan beri besin olarak tüketilen mantarların yetiştirmeciliğine ilk defa 16.yy.'da Fransa'da başlanmıştır. Mevsime bağlı olarak doğada kendiliğinden yetişip yenilebilen mantarlar kırsal alanda yaşayan insanların önemli bir besin kaynağı durumundadır. Bugün bile insanlar doğadan topladıkları mantarları besin maddesi olarak tüketmektedir. Ancak doğadan toplanan mantarların bazılarının zehirli olması ve bunun kolay anlaşılabilmesi önemli tehlikelere yol açmakta kimi zaman ise ölümcül olmaktadır [77].

Çok yakın zamanlara kadar canlılar dünyası, bitkiler dünyası ve hayvanlar dünyası olarak ikiye ayrılıyor ve mantarlar da bitkiler dünyasına dahil ediliyorlardı. Ne var ki yapılan son araştırmalar sonucunda mantarların ne bitkiler dünyasına ne de hayvanlar dünyasına ait olmadığı, ayrı bir dünya olan mantarlar dünyasını oluşturduğu anlaşılmıştır. Bu değişikliğin nedeni mantarlarla bitkiler arasında temelde büyük farklılıkların olduğunun belirlenmesidir. Bu farklılıklardan en önemlisi ise mantarların yeşil renkli klorofil maddesine sahip olmamalarıdır. Bu madde bitkilere özgüdür ve

klorofil özümlemesi yapmaya ve bu yolla “karbonhidrat” yani besin maddesi oluşturmaya yarar [75].

Mantarlar, fotosentetik olmayan ökaryotik mikroorganizmalardır. Görünüm bakımından mantarlar iki tür yapı gösterirler. Bir kısmı çok hücreli iplikçikler oluşturarak gelişirler ki bunlara “küf”, bir kısmı ise tek tek hücreler şeklinde üreme gösterirler, bunlara da “maya” şeklinde mantarlar denir [78]. Bu organizmaların hücreleri hif (hypha) adı verilmiş dallanmış iplikler halindedir. Hifler bir arada miselyum adı verilen mantar vücudunu oluştururlar [79].Mantarların büyük bir grubunu çıplak gözle görülebilen küfler oluşturur. Ekmek, limon, portakal gibi besin maddeleri üzerinde ürediklerinde, onları kolay fark ederiz [78].

Mantarın insan sağlığı ile ilgili yararlarına kısaca birkaç örnek vermek gerekirse, özellikle yaşı ilerlemiş kimselerde hayvansal protein insan sağlığı bakımından sakınca yaratmaktadır. Hayvansal gıdalardan alınan aminoasitler damarlarda birikerek damar sertliği, buna bağlı olarak kalp rahatsızlığı, sinir sistemi bozuklukları, enfarktüs gibi ölümcül hastalıklara neden olmaktadır. Bu yüzden kırmızı etlerden çok beyaz etlerin yenmesi, doktorlar ve beslenme uzmanlarınca tavsiye edilmektedir. Mantarla alınan protein, hayvansal gıdaların yaptığı zararı ortadan kaldırmaktadır. Hatta mantarda bulunan vitaminler, antibiyotikler, hormonlar insan sağlığını korumaktadır. Dış ülkelerde hastaneler, poliklinikler, diyet merkezleri, şişman insanların zayıflamasında, kalp damar rahatsızlığı olanların beslenmesinde günlük almaları gereken protein miktarını mantarla karşılanmaktadır [80]. Penisilin antibiyotiği bir mantar tarafından üretilir. Bilindiği gibi Fleming tarafından ilk defa 1928 ‘de iki mikroorganizma arasındaki antagonizma görülmüş ve bundan yararlanarak II. Dünya savaşının sonlarına doğru ilk uygulamaya konulan antibiyotik olarak penisilin *Penicillium chrysogenum* fungus türünden üretilmeye başlanmıştır [74].

Giderek bir iş kolu haline gelen kültür mantarı yetiştiriciliği, mantarın taşıdığı besin değeri açısından iş koklu olmasının ötesinde sağlıklı beslenme açısından da büyük öneme sahiptir [81]. II. Dünya Savaşı’ndan sonra teknolojiye yeni gelişmelerden mantar üretim sektörü de etkilenmiş ve modern üretimin temelleri atılarak klimalı kapalı üretim tesisleri kurulmuştur. Kültür mantarı ülkemiz için oldukça yeni bir besin maddesi olup küçük üretim yerlerinde üretimi yapılmaktadır [82].

4.2 Küf Mantarları

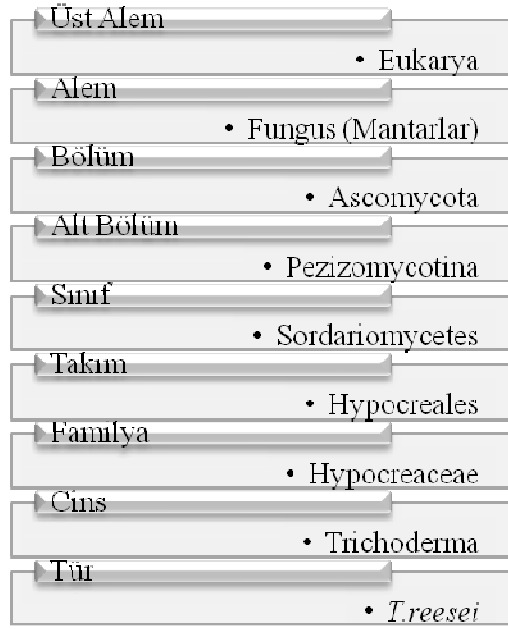
Küf mantarları, özellikle havada bulunan sporları nemli ve besinli ortamda çoğalarak meydana gelen mantarlardır. Binlerce çok küçük (mikroskobik) mantarın bir araya gelmesiyle oluşur. Küf yapmayı sağlarlar. Çevredeki atıkları çürüterek doğaya katkıda bulunurlar. Sütü ekşitirler, sirke yapımını sağlarlar. Ekmek yapımında da maya olarak kullanılırlar. Hastalık yapanları ise çok çeşitli hastalıklara yol açar. Hatta bu hastalıklar öldürücü olabilirler. Ayrıca küf mantarları sayesinde antibiyotik (penisilin) icat edilip milyonlarca insanın hayatı kurtulmuştur. Besinleri küflerken besinlere tutunurlar. Bunu hif denilen organlarıyla gerçekleştirirler. Bir kısmı hayvanlar ve insanların üzerinde parazit olarak yaşarlar [83].

Tek hücreli bakterilerden farklı olarak küfler çok hücreli yapılar oluşturur, bazen çıplak gözle bile görülebilir. Mikroskop altında küfler ince mantar şeklinde görünürler. Çoğu küfün yapısı; Üzerinde yaşadığı gıdanın iç yüzeylerine ulaşmak için ipliksi kökler (miseller), gıdanın üzerinde bulunan bir sap, bu sapın sonunda bulunan sporlar şeklindedir. Küfün görünen rengini bu sporlar vermektedir. Hava ile temas ettiğinde küf sporları, hindiba tohumları gibi havada asılı kalarak bir yerden bir yere taşınır. Küflerin çok ince iplikler şeklinde dalları ve kökleri bulunmaktadır. Gıda içinde bulunan köklerin görülmesi çok olup, gıdanın çok içlerine nüfuz edebilir. Küflü gıdaların aynı zamanda bakteri taşıma ihtimali de yüksektir [84].

Küfler hemen hemen her türlü çevrede, içerde ve dışarıda tüm mevsimlerde bulunur. Küf gelişimini sıcaklık ve nemli koşullar teşvik eder. Küfler dışarıda gölge, nemli ve çürüyen bitkilerin bulunduğu yerlerde, içerde ise yüksek nemli ortamlarda bulunurlar [84]. Ortam koşulları uygunluğunu yitirdiğinde küfler spor şeklinde ortama dağılır ve uygun koşulları bulduğunda tekrar gelişmeye başlar [84].

4.3 *Hypocrea Jecorina* ve *Trichoderma Reesei* ile bağlantısı

Bir ipliksi mantar türü olan *Trichoderma reesei*, *Hypocrea jecorina*'nın eşeysiz üreyen bir soyudur. 7 kromozomdan oluşan genomunun boyutu toplam 33 mega bazdır. Selülozu parçalayabilmesi *T. reesei*'yi endüstriyel açıdan önemli bir konuma taşımaktadır (Şekil 4.1) (örn. kumaş, kağıt, biyoyakıt üretimi) [85].

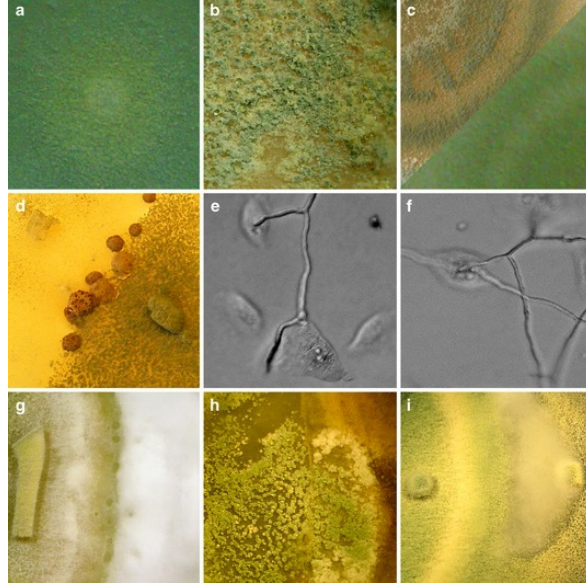


Şekil 4.1 *Trichoderma reesei*'nin taksonomisi

Trichoderma neredeyse 200 yıl önce küf suşları taksonuna dahil edildi. Taksona dahil edilen *Trichoderma* suşu *Trichoderma viride* idi ve *Trichoderma*'ya ait diğer suşların bu küf suşu ile akraba olmadığı düşünülüyordu. *Trichoderma* bunu takip eden 150 yıl boyunca zaman zaman mikotaksonomiyle ilgilenen bilim adamlarının dikkatini çektiyse de diğer bilim dallarının ilgi alanına giremedi. Bu mikroorganizma ilk olarak II. Dünya savaşı sırasında Amerikan ordusunun Solomon Adaları'nda kullandıkları malzemelerin (özellikle pamuklu materyallerin; çadır, paraşüt gibi) çürümeye başlamasını rapor etmesi üzerine yapılan uzun araştırmalar sonucunda keşfedildi. Bu çalışmalar sırasında izole edilen *Trichoderma "viride"* QM6a bu bölgedeki en selülitik küflerden biri olarak tanımlandı. Bu çalışmaların yapıldığı sırada bütün *Trichoderma* suşları "*T. viride*" olarak tanımlanıyordu. Yapılan morfolojik çalışmalar sonucu QM6a suşunun eşsiz biyolojik doğasının keşfedilmesi ve suşun izole eden araştırmacı Elwyn T. Reese onuruna "*T. reesei*" olarak adlandırılması için 20 yıl daha geçmesi gerekti [86], [87].

Elwyn Reese'nin Mary Madels ile Natick Enstitüsü'nde gerçekleştirdiği olağanüstü çalışmalar bu küfü ve onun çeşitli mutant suşlarını biyosentez alanındaki bir çok çalışmanın konusu haline getirmiştir.(Şekil 4.2) Bu küf yüksek miktarda salgılayabildiği selülaz ve hemiselülaz'larla selülozu glukoza kadar parçalayabilir. Selülozun ve diğer

polisakkaridlerin yapısının belirlenmesinde ve bu karbonhidratların katabolizmalarında rol alan mekanizmaların aydınlatılmasında rol alan bir çok çalışmanın da konusu haline getirdi. Reese ve Mandels'in bu çalışmaları sonucunda Amerika'daki, Avrupa'daki ve Asya'daki birçok laboratuvar 1960'ların sonunda baş gösteren "petrol krizi" sırasında *Trichoderma*'nın selüloolitik sistemini incelemeye başladı [85], [86].



Şekil 4.2 Farklı ortamlardaki *Trichoderma reesei* türlerinin görüntüsü a *T. Reesei* b Plakalar üzerinde üretilen *T. Atroviride* c *Hypochrea Jecorina* 'nın gün ışığı varlığında ve yokluğundaki üretim halleri d *T.reesei* 'nin tohumlama yapan türlerinin *H. Jecorina* ile görüntüsü (e.f.g.h.i) Diğer *Trichoderma* türlerinin farklı üreme koşullarındaki görüntüleri [88].

MATERYAL VE METOD

5.1 Çalışmada Kullanılan Küf Suşları

Bu çalışmada *Hypocrea jecorina* mikroorganizmaları kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan mikroorganizma *Hypocrea jecorina* , Viyana Teknik Üniversitesi, Biyokimyasal Teknoloji ve Mikrobiyoloji Enstitüsü tarafından temin edilmiştir.

5.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Cihazlar	Marka
1 Buzdolabı	Arcelik
2 Calkalamalı İnkübatör	VWR-Inkubating Mini Shaker
3 Etüv	Memmert
4 Hassas Terazı	Sartorius-Extend
5 Isıtıcılı Manvetik Karıştırıcı	VELP Scientifica-ARE
6 Isıtıcılı Manvetik Karıştırıcı	Chiltern-HS31
7 Mantolu Isıtıcı	Termal Laboratuvar Aletleri
8 Otoklav	Certoclav
9 Otomatik Pipet (10–100 uL)	Biohit Proline Plus
10 Otomatik Pipet (100–1000 uL)	Biohit Proline Plus
11 pH Metre	Sartorius-PB11
12 Su Banvosu	GFL
13 Saf / Ultra Saf su Cihazı	ELGA
15 Vortex Karıştırıcı	IKA Scientific-Vortex
16 UV-Vis Spektrofotometresi	Aeilent

5.3 Kullanılan Çözeltiler

5.3.1 Patates Dekstroz Agar (PDA) Katı Besiyeri Çözeltisi

39 g patates dekstroz agar tartılarak bir miktar destile su içinde çözülüp destile su ile 1 L'ye tamamlandı. Elde edilen heterojen karışım ısıtılarak homojen hâle getirildi. [41]

5.3.2 Sıvı Besiyeri

0,1 g glukoz, 0.1 g KH_2PO_4 , 0.05 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g KCl, ve 1 g L-glutamat tartılarak bir miktar destile su içinde çözülüp son hacim destile su ile 100 mL'ye tamamlandı [42].

5.3.3 Bovin Serum Albumin (BSA) Stok Çözeltisi

1 mg/mL bovin serum albumin (BSA) stok çözeltisinin hazırlanması için 10 mg BSA tartılarak bir miktar destile su içinde çözülüp toplam hacmi 10 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

5.3.4 Glutamat Çözeltisi

0.01M L-glutamat (186 g/mol) çözeltisinin hazırlanması için 1.86 g L-glutamat tartılarak pH=8,5 Tris HCL tamponunda 1L'ye tamamlanarak hazırlandı.

5.3.5 Tris HCl tamponu (0.05M pH 8.5)

Henderson-Hasselbalch eşitliğinden (Eşitlik 5.1) faydalanarak 0.05M Tris-HCl tamponu hazırlamak için gerekli olan Tris-HCL miktarı aşağıda belirtildiği şekilde hesaplandı. Normalde maddeye ait bir eşlenik tuz bulunmadığı için uygun derişimdeki madde miktarı hesaplanarak derişik NaOH ile tampon titre edildi.

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad \text{Henderson-Hasselbalch eşitliği (5.1)}$$

$$(1) 0,05M \text{ Tris-HCL} = (m/Ma)/V$$

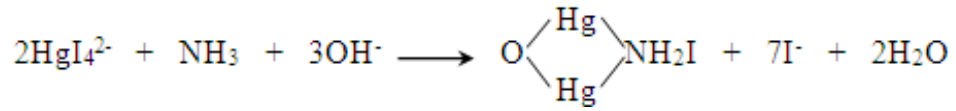
$$(2) 0,05M \text{ Tris-HCL} = (m/157,6g/mol)/0,05lt$$

$$(3) m = 0,093 \text{ g (Tris-HCL miktarı)}$$

Buna göre son çözelti derişik NaOH varlığında titre edilerek pH= 8,5'a ayarlandı.

5.3.6. Nessler Reaktifi (K₂HgI₄)

3 g HgCl₂ tartılarak 25 mL saf suda çözüldükten sonra çözeltiliye 3g katı KI ilave edildi. Kırmızı çökelek oluşuncaya kadar karıştırıldı. Oluşan katı HgI çözeltisi adi süzgeç kağıdı yardımı ile süzüldü. Süzülen katı ayrıca bir erlene alındı ve 10g katı NaOH soğuk ortamda ilave edildi ve çözeltili 50 ml'ye tamamlandı. Bu ekleme sonrası karışımın tamamen açık sarı renge dönüşmesi beklendi. İstenen renge dönüşen karışım tekrar adi süzgeç kağıdı ile süzüldü ve bu kez süzülen kısım amber şişeye alındı. Amonyum varlığında Nessler reaktifi ile meydana gelen reaksiyon Şekil 5.1'de gösterilmiştir. [60]



Şekil 5.1 Nessler reaktifinin amonyak ile meydana getirdiği reaksiyon

5.3.7. Trikloroasetik asit (TCA) Çözeltisi

1.5M trikloroasetik asit (163.39 g/mol) çözeltisinin hazırlanması için 12.26 g TCA tartılarak bir miktar destile su içinde çözülüp toplam hacmi 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Elde edilen çözelti kullanım esnasına kadar +4°C'da buzdolabında saklandı. [42]

5.3.8. Bradford Reaktifi

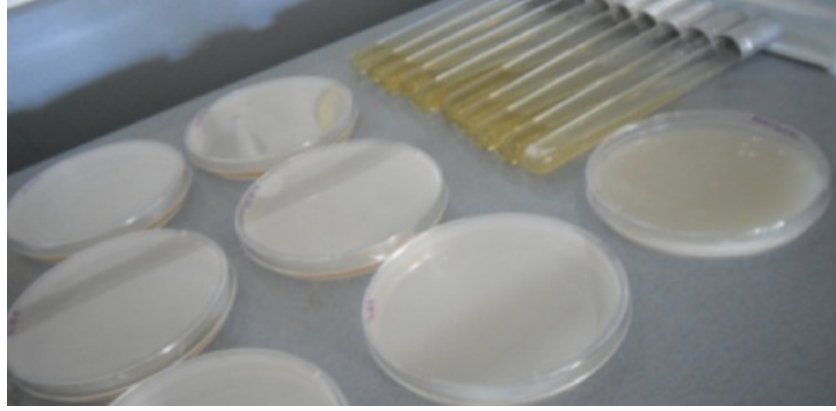
100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 tartılarak üzerine 50 mL %95'lik etanol ve 100 mL %85'lik o-fosforik asit eklendi. Hazırlanan çözelti manyetik karıştırıcı yardımı ile karıştırılıp toplam hacmi 1L'ye tamamlandı. Elde edilen çözelti amber şişeye süzülerek kullanım esnasına kadar +4°C'da buzdolabında saklandı.

5.4 Kültür Ortamı

5.4.1 Katı Besiyeri

Katı besiyeri ortamı olarak saf kültür olarak seçilen *Hypocrea jecorina* suşunun üreme ve canlılığını devam ettirmesi için patates dekstroza agar (PDA) hazırlandı. Bu amaçla 39 g PDA tartılıp suda çözülerek hacmi destile su ile 1 L'ye tamamlanarak hazırlanan çözelti otoklavda 121°C'de 20 dakika sterilizasyon işlemine tabi tutuldu. Sterilizasyon işlemi tamamlandıktan sonra otoklavdan alınan besiyeri için doğru uygulama şekli, besiyerinin 45°C'a soğutulması ve bu sıcaklıkta petri kutularına dökülmesidir. Bu amaçla hazırlanan besiyeri 45°C'a ayarlı su banyosuna alındı. Su banyosunda ısı alışverişi ile besiyerinin

sıcaklığı 45°C dökme sıcaklığına geldiğinde besiyeri çözeltisi petri kutularına pay edildi ve soğumaya bırakıldı. Katılaştıran besiyerleri kullanılmaya kadar +4°C'da buzdolabında saklandı (Şekil 5.2).



Şekil 5.2 Hazırlanan katı besiyerleri

5.4.2 Küf Suşlarının Üretilmesi

Küf suşlarının üretilmesi için Bölüm 5.4.1'de petrielerde hazırlanan katı besiyerleri kullanıldı. Her bir petri kabına steril bir öze yardımıyla üretilmek istenilen küf suşunun agarından kesilen ufak bir parça ekildi. Ekimi tamamlanmış petri kapları 30°C'a ayarlı etüvde 7 gün inkübe edildi. Sporlanması tamamlanan petri kaplarının ağızları parafilm ile kapatılarak 4°C'de buzdolabında saklandı. Bu işlem taze sporlara ihtiyaç duyuldukça tekrarlandı. 4°C'lik buzdolabında saklanan küf suşları ayda bir taze besiyerlerine aktararak küf suşlarının canlılığını sürdürmesi sağlandı. Yapılan tüm işlemler *Hypocrea jecorina* saf kültürü için belirtilen sırada gerçekleştirildi.

5.4.3 Sıvı Besiyeri

Çalışmada glutamat oksidaz enziminin gerçekleştirileceği sıvı besiyeri ortamı, El-Sayed [62] tarafından geliştirilen fermente ortamı uyarlanıp hazırlanarak kullanıldı. Sıvı besiyeri ortamı şu maddeleri içermektedir:

- % 0.1 Glukoz
- % 0.1 KH_2PO_4
- % 0.05 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- % 0.05 KCl
- % 1 L-glutamat

Besiyeri bileşenleri Bölüm 5.3.2’de belirtildiği şekilde hazırlanan çözelti 121°C’de 20 dakika sterilize edildi. Sterilizasyon işlemi sonunda sıvı besiyeri içeren erlenler 30°C’ye ayarlı su banyosunda 30 dakika inkübe edilerek her 1 mL’lik saf kültürü/100mL sıvı besiyeri olacak şekilde erlenlere eklenerek çalkalamalı inkübatörde 30°C’de 150 rpm’de 1 hafta inkübe edildi (Şekil 5.3).



Şekil 5.3 *Hypocrea jecorina* sıvı besiyerlerinde üretim esnasındaki durumları

5.4.3.1 Substrat konsantrasyonunun etkisi

Bölüm 5.4.3’de belirtilen modifiye sıvı besiyerinin hazırlanmasında yer alan substrat konsantrasyonunun belirlenmesi için %1 ile %4 arasında L-glutamat konsantrasyonuna sahip olacak şekilde sıvı besiyerleri hazırlanarak substrat konsantrasyonunun enzim üretimi üzerine etkisi yapılan aktivite tayinleri ile gerçekleştirildi.

5.5 Bradford Yöntemi ile Protein Miktar Tayini

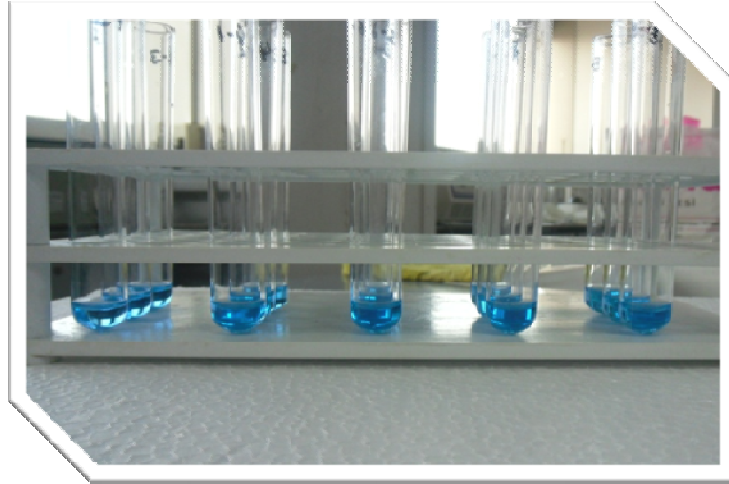
Her iki suştan elde edilen glutamat oksidaz enziminin protein miktarı Bradford yöntemi [63]. kullanılarak belirlendi. Yaygın olarak kullanılan bu yöntem, organik boyaların, proteinlerin asidik ve bazik gruplarıyla etkileşerek renk oluşturmasını esas alır. Boya bağlama temelli yöntemin en yaygını, Bradford tarafından geliştirilen ve Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının kullanıldığı yöntemdir. Bu boya kuvvetli bir asitte çözüldüğü zaman, protonlanmadan dolayı kırmızı-kahverengi arası bir renk alır. Bu boya, (+) yüklü bir proteine bağlandığında ise renk maviye dönüşür. Oluşan rengin UV – Görünür bölge spektrofotometresinde, 595 nm’de absorbanı ölçülerek protein tayini gerçekleştirilir [64].

Protein standart grafiğinin çizilmesi için bovin serum albuminin (BSA) 1.0 mg/mL'lik stok çözeltisi hazırlandı. Elde edilen stok çözeltinin seyreltilmesi ile 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 ve 0.05 mg/ml'lik standart çözeltileri hazırlandı. [64]

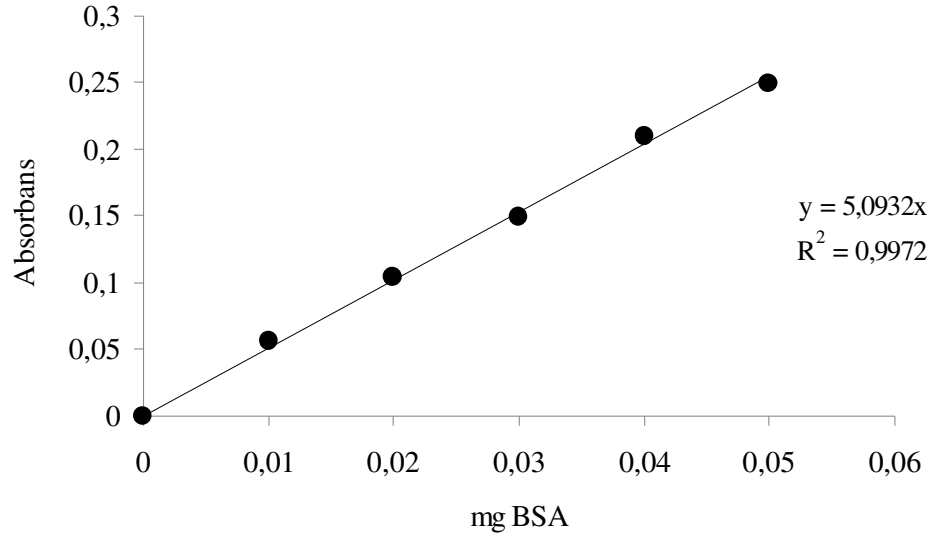
Çizelge 5.1 Bradford yönteminde kullanılan BSA çözeltilerinin hazırlanması

BSA Standart Çözeltileri (mg/mL)	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05
<i>BSA (Stok Çözelti), ml</i>	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
<i>Destile su, ml</i>	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5

Çizelge 5.1'de belirtildiği şekilde hazırlanan standart BSA çözeltilerinin her birinden 0.5 ml alınıp üzerine 5 ml Bradford reaktifi ilave edildikten sonra her biri için ayrı ayrı 595 nm dalga boyunda UV spektrofotometresi ile absorbans ölçümü yapıldı (Şekil 5.4) [63]. BSA konsantrasyonlarına karşı elde edilen absorbans değerleri grafiğe geçirilerek standart eğrisi çizildi (Şekil 5.5). Her bir BSA konsantrasyonu için işlem üç defa tekrarlandı.



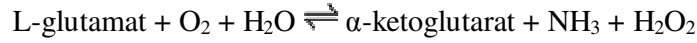
Şekil 5.4 Bradford reaktifi ilave edildikten sonra farklı derişimlerinde BSA çözeltilerinin genel görünümü



Şekil 5.5 Bovin serum albumin (BSA) standart grafiği

5.6 Enzim Aktivitesi Tayini

Glutamat oksidaz enzimi, substratı olan L-glutamatın α -ketoasiti ve NH_4^+ iyonlarına dönüşümünü katalizlemektedir.



Çalışmamızda *Hypocrea jecorina* saf kültürü suşundan üretmiş olduğumuz glutamat oksidaz enziminin aktivitesini belirlemek için enzimin reaksiyonu sonucu oluşan NH_4^+ iyonlarının ölçümüne dayalı metot kullanılmıştır [65].

Bu amaçla, 1,8 mL 0,01 M glutamat içeren 0,05 M pH=8,5 Tris-HCL tamponuna 0,2 ml ekstrasellüler enzim çözeltisi eklenerek hazırlanan çözeltilerde enzimatik reaksiyonun gerçekleşmesi için 37°C'da 30 dakika inkübe edildi. Reaksiyon 0,1 mL 1,5M TCA eklenerek durduruldu. Bu karışımdan alınan 1 ml'lik çözelti, 3,5 ml 0,05M pH=8,5 Tris-HCl tamponuna eklendikten sonra bu çözeltiliye 0,5 mL Nessler reaktifi ilave edildi. Enzimatik reaksiyon sonucu oluşan NH_4^+ iyonları ile Nessler reaktifinin etkileşmesi için 10 dakika bekletildikten sonra oluşan renk şiddeti 450 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Olay Çizelge 5.2' de özetlenmiştir. [66]

Çizelge 5.2 Glutamat aktivitesinin belirlenmesi için izlenen yol

1. Aşam	Kör	Numune Çözeltisi
		2.0 mL 0.01M L-Glutamat içeren
	0.05 M pH=8,5 Tris-HCL tamponu	0.05 M pH=8,5 Tris-HCL tamponu
		+ 0.2 mL enzim homojenatı
2. Aşama	37°C'da 30 dakika inkübasyon ve 0.1 mL 1.5M TCA ilavesi	
	1 mL karışım	1 mL karışım
	3.5 mL pH=8,5 Tris-HCl tamponu	3.5 mL pH=8,5 Tris-HCl tamponu
	0.5 mL Nessler reaktifi	0.5 mL Nessler reaktifi
10 dakika inkübasyon ile reaksiyonun gerçekleşmesi sağlanarak 450 nm'de absorban ölçümü yapıldı.		

5.7 Amonyum Standart Grafiğinin Çizilmesi

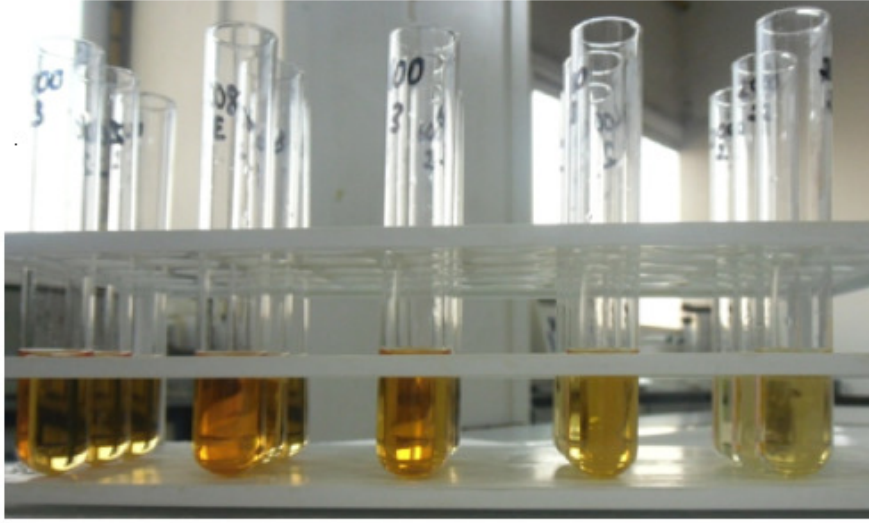
Glutamat oksidaz enziminin aktivitesini belirlemek için enzimatik reaksiyon sonucu oluşan NH_4^+ iyonlarının miktarının belirlenmesi gerekir. Bu amaçla, amonyum standart grafiği çizilerek enzim aktivitesinin sayısal değeri bulunabilir. Amonyum standart grafiğinin çizilmesi için 1000 mg/L'lik amonyum klorür (NH_4Cl) stok çözeltisi hazırlandı. Elde edilen stok çözeltinin seyreltilmesi ile 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 mg/L'lik standart çözeltileri hazırlandı (Çizelge 5.3). [61]

Çizelge 5.3 Amonyum klorür (NH_4Cl) standart çözeltilerinin hazırlanması

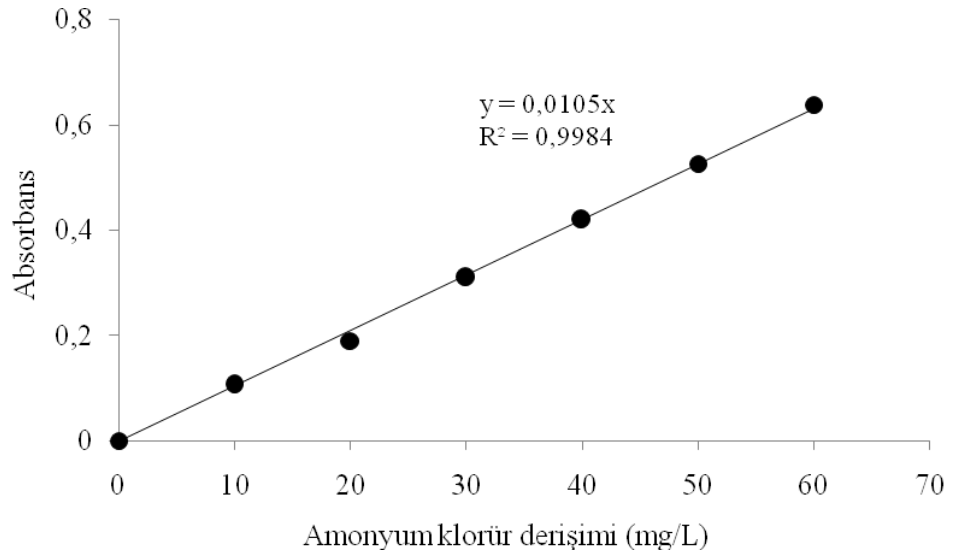
NH_4Cl Standart Çözeltileri (mg/L)	10	20	30	40	50	60
<i>NH_4Cl (Stok Çözelti), μL</i>	100	200	300	400	500	600
<i>Destile su, ml</i>	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4

Çizelge 5.3'de belirtildiği şekilde hazırlanan standart amonyum klorür çözeltilerinin her birinden 1 mL alınıp üzerine 3.5 mL 0.05 M pH=8,5 Tris-HCL tamponu ve 0.5 mL Nessler reaktifi ilave edildikten sonra reaksiyonun gerçekleşmesi için 10 dakika bekletildi (Şekil 5.6). 3.5 mL 0.05 M pH=8,5 Tris-HCL tamponu ve 0.5 ml Nessler reaktifinden oluşan köre karşı her biri için ayrı ayrı 450 nm dalga boyunda UV spektrofotometresi ile absorban değerleri ölçüldü [67]. Amonyum klorür

konsantrasyonuna karşı elde edilen absorbands değerleri grafiğe geçirilerek standart eğrisi çizilmiştir (Şekil 5.7). Her bir NH_4Cl konsantrasyonu için işlem üç defa tekrarlandı.



Şekil 5.6 Standart grafiği için kullanılan farklı konsantrasyondaki NH_4Cl çözeltileri



Şekil 5.7 Amonyum klorür standart grafiği

5.8 Optimum pH'nın Belirlenmesi

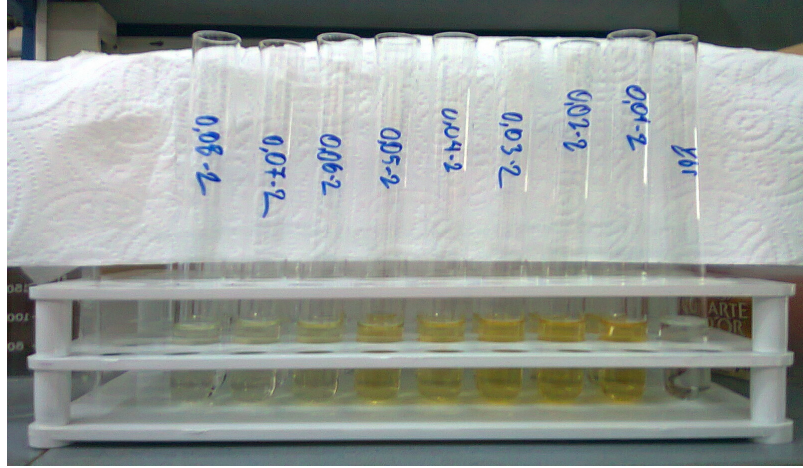
Her enzim için aktivitenin en yüksek olduğu bir pH değeri vardır. Bu değerin altında ve üzerinde aktivite duser. Enzimlerin maksimum aktivite gosterdiği pH değerine o enzimin optimum pH değeri denir.

Optimum pH değerinin belirlenmesi için pH aralığı 1.0 ile 14.0 arasında değişen tampon çözeltiler hazırlanarak aktivite tayini bu pH'larda gerçekleştirildi. Tampon çözeltiler olarak değişik pH'larda hazırlanmış Tris-HCl tamponu kullanıldı. Bu tamponlar hazırlanırken derişik NaOH çözeltileri ile titre edildi.

5.9 Optimum Tampon Derişiminin Belirlenmesi

Glutamat Oksidaz için belirlenen pH'da en uygun tampon derişimi Sukhacheva ve arkadaşlarının çalışmalarında 0,05 M olarak bulunduğundan çalışmada ortalama bir değer olarak Glutamat oksidaz için tampon derişimi 0,05 olarak alınmıştır.[33] Diğer taraftan bir enzimin ortamda en iyi aktivite göstereceği 3 boyutlu yapıyı korumasında Tampon derişiminin de çok büyük etkisi vardır.

Bu nedenle çalışmamızda 0,01 ile 0,08 M arasında Tris-HCl derişimleri değişen çözeltiler varlığında aktivite tayini yapıldı. (Şekil 5.8) Buna göre çalışmada hem glutamat içeren tampon çözeltileri hem de ikinci aşamada kullanılan aynı özellikteki tamponlar kullanıldı.



Şekil 5.8 Tampon derişiminin aktiviteye etkisinin incelenmesi

5.10 Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

Her enzim için aktivitenin en yüksek olduğu bir sıcaklık değeri vardır. Bu değerin altında ve üzerinde aktivite düşer. Enzimlerin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerine o enzimin optimum sıcaklık değeri denir.

Optimum sıcaklığın belirlenmesi için sıcaklık aralığı 20°C ile 70°C arasında değişen sıcaklık değerlerinde glutamat oksidaz enziminin aktivite tayini gerçekleştirildi.

5.11 Enzimin Termal Kararlılığı

Enzimin termal kararlılığının tayini için mikroorganizmadan elde edilen enzim homojenatı 25°C ile 80°C arasındaki sıcaklıklarda ayrı ayrı bekletilerek toplam 45 dakika süresince her 15 dakikada bir örnek alınarak glutamat oksidaz enziminin aktivite tayini yapılarak elde edilen sonuçlar grafiğe geçirildi. [68]

5.12 Enzimin Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

Enzimin maksimum hızı (v_{max}) ve Michaelis-Menten sabiti K_M 'nin bulunması için kinetik çalışmalar 10 ile 100 mM'lık glutamat çözeltileri (pH 8.5) kullanılarak yapılmıştır. Her derişime karşılık enzimin aktivitesinin belirlenmesi için spektrofotometrik olarak absorbansları kaydedilmiştir. Her bir absorbans değerine karşılık aktivite değerleri Şekil 5.7'den faydalanılarak hesaplanmıştır. Aktivite değerleri Lineweaver-Burk grafiğinde ($1/\dot{U}/\text{mg protein'e karşı } 1/[S]$) yerine konularak buradan K_M ve v_{max} değerleri bulunmuştur [69].

5.13 Depolama Kararlılığı

Sıvı besiyerinde üretilen enzim süzülerek enzim homojenatı elde edildi. Elde edilen homojenat +4°C'da depolandı. Depolama kararlılığının belirlenebilmesi için 86 gün boyunca değişik günlerde aktivite tayini yapıldı. [68]

5.14 Formüller ve Hesaplamalar

5.14.1 Protein Miktarının Hesaplanması

Şekil 5.5'de ki BSA standart grafiği kullanılarak mL'deki protein miktarları aşağıdaki denklem yardımıyla hesaplandı.

mg/mL Protein Miktarı Hesabı:

$$\text{Absorbans} = 5,0932 \times \text{BSA Konsantrasyonu (mg/mL)}$$

5.14.2 Enzim Aktivitesinin Hesaplanması

Bir ünite (U) glutamat oksidaz aktivitesi; standart koşullar altında bir dakikada glutamattan 1 µmol amonyum iyonu açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlandı ve enzim aktivitesi total ünite olarak U/mL cinsinden ifade edildi.

mg/L Amonyum Miktarı Hesabı:

$$\text{Absorbans} = 0,0105 \times \text{NH}_4\text{Cl Konsantrasyonu (mg/L)}$$

Şekil 5.7'deki standart NH₄Cl eğrisi kullanılarak bulunan amonyum iyonu konsantrasyonu aşağıdaki denklemde yerine yazılarak total ünite değeri (U/mL) hesaplandı.

$$\text{Total Ünite (U/mL)} = [(\text{mg amonyum iyonu /18}) \times (\text{son hacim}) \times (\text{SF/t})]$$

mg amonyum iyonu/L: Numunelerin absorbanlarına karşılık gelen amonyum iyonu miktarı; t : İnkübasyon zamanı (30 dakika); M_A : Açığa çıkan amonyum iyonunun molekül kütlesi (18 g/mol); SF : Seyreltme Faktörü.

5.13.3 Spesifik Aktivitenin Hesaplanması

Total ünite değerleri mL'deki protein miktarına bölünerek spesifik aktivite hesaplandı. Spesifik aktivite U/mg protein olarak verildi.

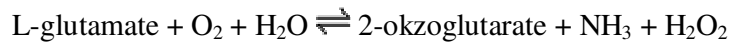
ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

6.1 Giriş

Glutamat oksidaz enzimi, azot metabolizmasında önemli bir role sahiptir. Son yıllarda Mono Sodyum Glutamat'ın endüstriyel kullanım alanlarından dolayı ve Alzheimer hastalığına etkisi incelendiğinde glutamat oksidazın biyomühendislik yönünden daha iyi incelenmesi gerektiğini bir kez daha kanıtlamıştır. Mono sodyum glutamatın fermente ve hazır gıdalarda da tat artırıcı özellik göstermekte rolü bulunmaktadır. Glutamat oksidaz aktivitesi yaygın olarak bitkilerde, hayvansal dokularda ve bakteri, maya ve küfleri kapsayan mikroorganizmalarda gözlenmiştir.

Hypocrea jecorina saf kültüründen glutamat oksidaz enziminin mikrobiyal olarak üretimi, üretilen enzimin optimum koşullarının belirlenmesi ve kinetik parametrelerinin hesaplanması hedeflenmiştir.

Glutamat oksidaz enzimi glutamati 2-okzoglutarat ve amonyum iyonuna dönüştüren reaksiyonu katalizleyen önemli bir enzimdir.



Glutamat oksidaz enziminin aktivitesinin belirlenmesinde yukarıdaki reaksiyon sonucu açığa çıkan amonyum iyonlarının ölçümü esas alınmıştır.

6.2 *Hypocrea jecorina* saf kültüründen Glutamat Oksidaz Enzim Homojenatı Eldesi

Glutamat oksidaz enziminin üretimi için Bölüm 5.4.3'de anlatıldığı gibi karbon kaynağı olarak %0.1 glukoz ihtiva eden, %0.1 KH_2PO_4 , %0.05 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, %0.05 KCl ve enzim üretimi için substrat olarak %1 L-glutamat eklenerek sıvı besiyeri oluşturulmuştur. Elde edilen çözelti otoklav ile sterilizasyon işlemine tabi tutulduktan sonra Bölüm 5.4.1'de anlatıldığı şekilde elde edilen *Hypocrea jecorina* saf kültürü sterilize olmuş besiyerlerine ayrı ayrı her 100 mL'lik hacme 1 mL mikroorganizma olacak şekilde aşılanmıştır. Aşılama işlemi sonrası besiyeri barındıran erlenler 30°C sıcaklığa ve 150 rpm çalkalama hızına sahip inkübatöre yerleştirilerek 7 gün inkübe edilmiştir.

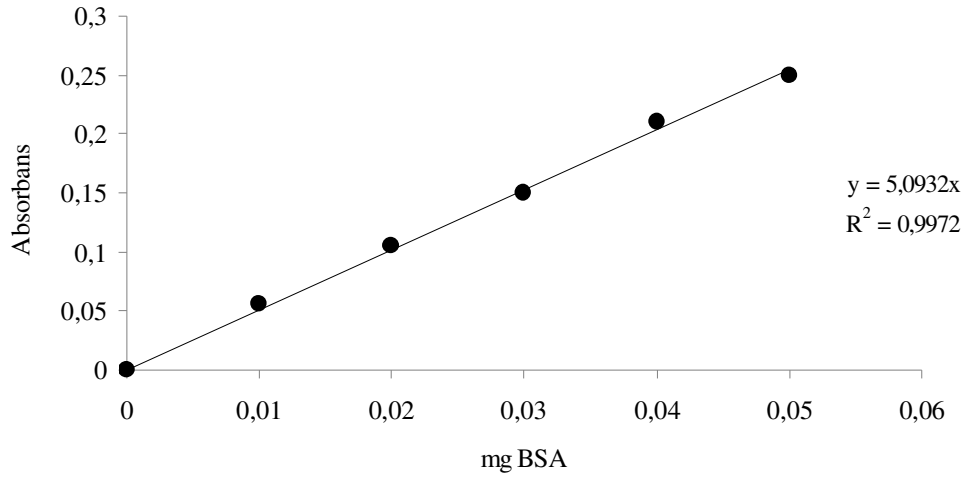
İnkübasyon işlemi sonunda erlenlerin içerisinde yer alan besiyerleri süzülükten sonra elde edilen çözelti enzim homojenatı olarak adlandırılmış ve enzim aktivitesi, spesifik aktive, optimum pH, optimum sıcaklık, optimum tampon derişimi, enzim kinetiği çalışmalarının yürütülmesi için kullanılmıştır. Analiz çalışmalarında kullanılacak enzim homojenatı +4°C'da, kullanılmayan ise -10°C'da buzdolabında depolanmıştır.

6.3 Enzim Aktivitesi Tayini

Bölüm 5.6'da anlatıldığı şekilde glutamat oksidaz enzimi aktivitesi, glutamat oksidaz enziminin reaksiyonu sonucu açığa çıkan NH_4^+ iyonlarının Nesslerizasyon reaksiyonu sonucu tayini esasına dayanmaktadır [67]. Tayin, 450 nm'de spektrofotometrik olarak mikroorganizmadan elde edilmiş enzim homojenatı için ayrı ayrı belirlenmiştir. Bölüm 5.5'de belirtildiği şekilde Bradford metodu (Bradford [63]) kullanılarak protein miktarları belirlenmiş, mg protein başına düşen aktivite değerleri hesaplanarak mikroorganizma türünden elde edilen glutamat oksidaz enzimi için spesifik aktivite miktarları tayin edilmiştir. Tüm hesaplamalar, spektrofotometrik olarak elde edilen absorbans değerleri Bölüm 5.13'te belirtilen formüller kullanılarak hesaplanmış ve elde edilen değerler Çizelge 6.1'de sunulmuştur.

6.4 Protein tayini

Bölüm 3.4.6'da anlatıldığı gibi ekstraksiyon ve saflaştırma işlemlerinin her basamağında Bradford yöntemiyle protein tayinleri yapılmıştır. Aşağıdaki Şekil 6.1'de görüldüğü gibi BSA (bovine serum albumin) kullanılarak standart grafikler hazırlanmıştır.



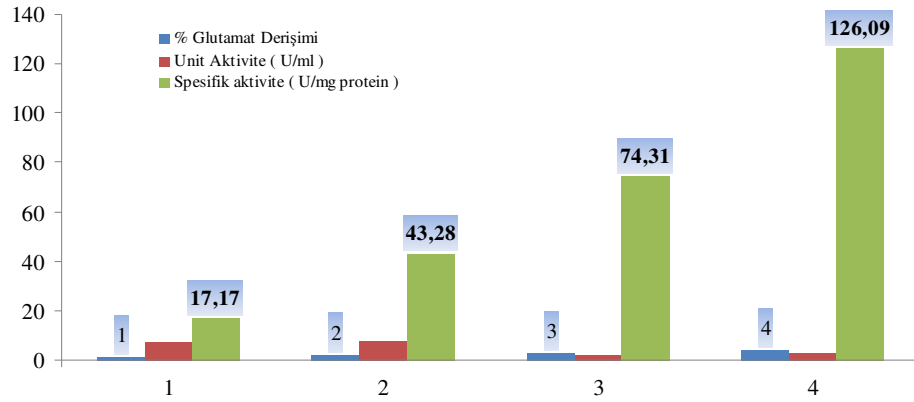
Şekil 6.1 Bradford yöntemiyle protein tayin grafiği

Çizelge 6.1 *Hypocrea jecorina* saf kültüründen elde edilen enzim homojenatı sayısal parametreleri

NH₄⁺ miktarı (mg/L)	Aktivite (U/mL)	Protein Miktarı (mg protein/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)
77.87	7.21	0.42	17.167

6.5 Substrat Konsantrasyonunun Enzim Üretimi Üzerine Etkisi

Substrat konsantrasyonunun *Hypocrea jecorina* saf kültürü ile elde edilmesi hedeflenen glutamat oksidaz enzimi üretimi üzerine etkisini belirleyebilmek için Bölüm 5.4.3'de belirtilen sıvı besiyerine %1 ile %4 arasında farklı konsantrasyonlarda L-glutamat ilave edilerek enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda alınan örneklerin Bölüm 5.6'da belirtildiği şekilde aktivite tayinleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar substrat miktarına (%) karşı total ünite (U/mL) ve spesifik aktivite (U/mg protein) değerleri grafiğe geçirilmiştir (Şekil 6.2).



Şekil 6.2 Farklı L-glutamat konsantrasyonlarında *Hypocrea jecorina* saf kültüründen elde edilen glutamat oksidaz enzim miktarları

Şekil 6.2 incelendiğinde, ortama eklenen substrat miktarı arttıkça glutamat oksidaz enzim aktivitesinin de arttığı görülmektedir. Ortama karbon kaynağı olarak eklenen glukozun tüketilmesinden sonra mikroorganizmalar glutamata yönelmiş, onu hem karbon hem de ihtiva ettiği iki azot atomundan dolayı azot kaynağı olarak kullanmış ve glutamat oksidaz enziminin üretimini gerçekleştirmiştir.

6.6 Enzim Aktivitesine Etki Eden Parametreler

6.6.1 pH'nın Etkisi

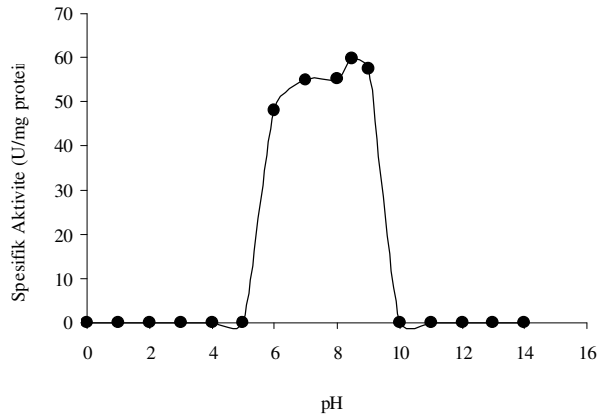
Enzimlerin maksimum aktivite gösterdikleri bir pH veya pH aralığı vardır. Bu optimum pH'nın altında ve üzerinde aktiviteleri düşer. Enzimler kuvvetli asit ve bazlara fazla dayanıklı değildirler. Ortam pH'sındaki aşırı olmayan değişiklikler enzimin ve çoğu kez de substratın iyonik durumunda değişikliklere neden olur. Enzimler kendileri için aşırı pH değerlerinde aktivitelerini kaybederler. Enzimlerin maksimum reaksiyon hızına sahip oldukları pH değerine optimum pH denir. Optimum pH'nın altında ve üstündeki pH'larda enzim veya substratta mevcut fonksiyonel grupların yapılarında değişimler oluşur ve reaksiyon hızı da değişime uğrar. Kovalent olmayan elektrostatik bağlar, hidrojen bağları, hidrofobik bağlar ve kovalent disülfid bağları enzimlerin üçüncül ve dördüncül yapılarını stabilize eder. Enzim üzerindeki pozitif ve negatif gruplar arasında oluşan elektrostatik bağlar pH'dan etkilenirler. Nötral pH'larda iyonlaşabilen yan gruplar $-COO^-$, H_3N^+ ve H_2N-C gruplarıdır ve bunlar kuvvetli elektrostatik bağlar oluşturabilirler. pH 3'ün altında karboksil grupları protonlanırlar ($-COOH$) ve elektrostatik bağ oluşturamazlar. pH 10'un

üzerinde ise amonyum grupları protonlanırlar (-NH₂) ve elektrostatik bağlar oluşturamazlar [70].

Glutamat oksidaz enziminin aktivitesine pH'nın etkisini incelemek için farklı pH'larda (1.0 ile 14.0 arasında) tampon çözeltileri hazırlanıp her bir pH değeri için elde edilen enzim homojenatında aktivite değerleri ölçülmüştür. Elde edilen sayısal değerler Çizelge 6.2 ve Şekil 6.3'te verilmiş, pH'ya karşı enzim aktivitesi (U/mg protein) değerleri grafiğe geçirilmiştir (Şekil 6.3).

Çizelge 6.2 *Hypocrea jecorina* saf kültüründen üretilen glutamat oksidaz enziminin farklı pH'larda elde edilen sayısal parametreleri

pH	Absorbans	NH ₄ ⁺ Miktarı (mg/L)	Total Ünite (U/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)
6.0	0.2590	24.67	4.57	48
7.0	0.2966	28.25	5.23	54,95
8.0	0.2977	28.35	5.26	55,19
8.5	0.3206	30.53	5.66	59,65
9.0	0.3102	29.54	5.47	57,5



Şekil 6.3 *Hypocrea jecorina* saf kültüründen elde edilen glutamat oksidaz enzim aktivitesine pH'nın etkisi.

Çizelge 6.2, ve Şekil 6.3'de görüldüğü gibi, pH 8.5'a kadar glutamat oksidaz enziminin aktivite değeri kademeli olarak artmıştır. pH 8.5'den sonra aktivite keskin bir düşüş

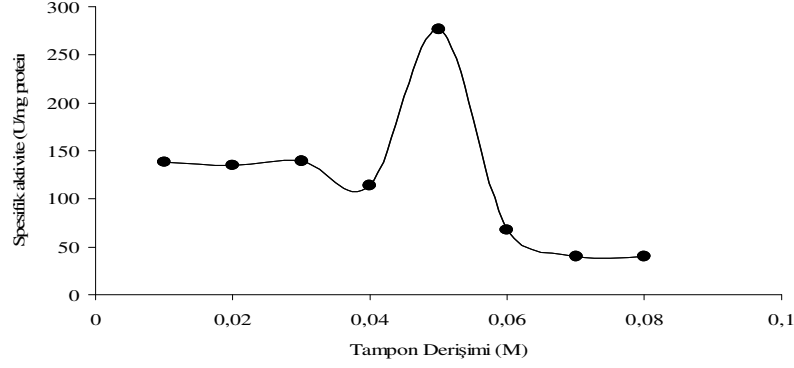
göstermiştir. Dolayısıyla mikroorganizma için elde edilen enzimin optimum çalışma pH'sı 8.5 olarak seçilmiştir. Enzimden pH 0-5 arasında ve pH 10-14 arasında herhangi bir aktivite elde edilememiştir.

6.6.2 Tampon Derişiminin Etkisi

Glutamat oksidaz enzim aktivitesine tampon derişiminin etkisini araştırmak için 8 farklı tampon derişiminde (0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07 ve 0,08M) ve enzimin optimum pH değerinde enzim aktivitesi tayini geręekleřtirilmiřtir. Optimum koşullarda hazırlanmış olan çözeltiler belirtilen sıcaklarda 30 dakika inkübe edilerek üretilen enzim aktivitesi belirlenmiştir. Elde edilen sayısal değerler Çizelge 6.3'te verilmiş, tampon derişimine (M) karşı enzim aktivitesi (U/mg protein) değerleri grafiğe geğirilmiştir (şekil 6.4).

Çizelge 6.3 *Hypocrea jecorina* saf kültüründen üretilen glutamat oksidaz enziminin farklı tampon derişimlerinde elde edilen sayısal parametreleri

Tampon Derişimi (M)	Absorbans	NH ₄ ⁺ Miktarı (mg/L)	Total Ünite (U/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)
0,01	0.3617	34.45	3,19	138.70
0,02	0.3564	33.94	3,1	134.78
0,03	0.3624	34.51	3,2	139.13
0,04	0.2973	28.31	2,62	113.91
0,05	0.6459	61.51	6,36	276.52
0,06	0.1757	16.73	1,55	67.39
0,07	0.1058	10.08	0,93	40.43
0,08	0.1059	10,09	0,93	40.43



Şekil 6.4 *Hypocrea jecorina* saf kültüründen üretilen glutamat oksidaz enziminin farklı tampon derişimlerinde aktivitesi.

Böhmer ve arkadaşları (1989), *Streptomyces Endus* türü mikroorganizmadan ürettikleri glutamat oksidaz enzimi için, Tris-HCl, fosfat ve sitrik asit / potasyum fosfat tamponlarında yaptıkları çalışmalarda, enzimin maksimum aktivite gösterdiği tampon konsantrasyonun 0.05 M olduğunu bulmuşlardır. Bu sonuç, tez çalışmasında bulmuş olduğumuz sonuçla aynıdır [89].

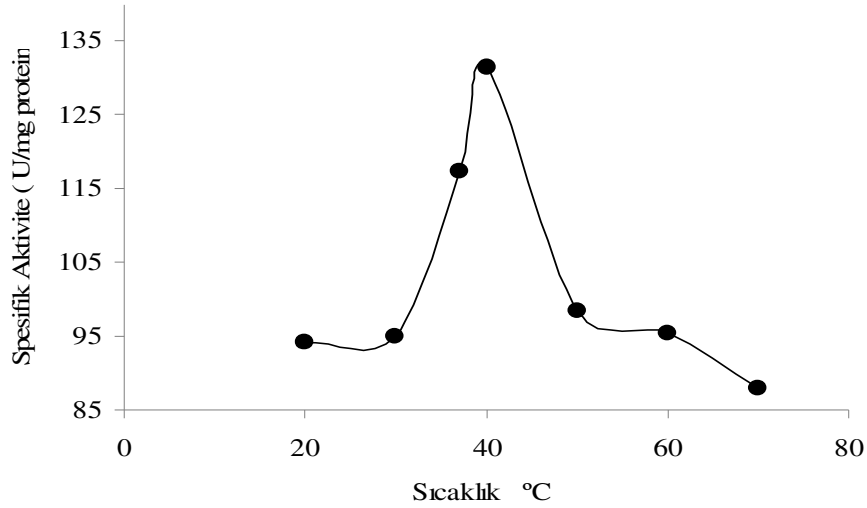
6.6.3 Sıcaklığın Etkisi

Kimyasal reaksiyonların hızı genellikle sıcaklıktaki artışla artar. Enzimlerle katalizlenen reaksiyonların hızları da sıcaklıkla artmakla birlikte, yüksek sıcaklıklarda enzimler protein yapılarından dolayı aktivitelerini kaybederler. Yüksek sıcaklıklar enzimatik reaksiyonda rol oynayan fonksiyonel grupların disosiyasyonunu etkileyebilir; enzimin aktivatörlere ve inhibitörlere ilgisini etkileyebilir; reaksiyonda substrat olabilecek oksijeninin çözünürlüğünü etkileyebilir. Bunların dışında, yüksek sıcaklık enzimleri inaktive edebilir. Reaksiyon hızının maksimuma eriştiği noktadaki sıcaklık derecesine optimum sıcaklık denir. Enzimlerin büyük çoğunluğunun optimum aktivitesi 30-40 °C'dir ve 45 °C'nin üzerinde denatürasyon başlar. Ancak yüksek sıcaklıklarda aktivite gösteren enzimlerde mevcuttur [9]

Glutamat oksidaz enzim aktivitesine sıcaklığın etkisini araştırmak için 7 farklı sıcaklıkta (20, 30, 37, 40, 50, 60 ve 70°C) ve enzimin optimum pH değerinde enzim aktivitesi tayini gerçekleştirilmiştir. Optimum koşullarda hazırlanmış olan çözeltiler belirtilen sıcaklıklarda 30 dakika inkübe edilerek üretilen enzim aktivitesi belirlenmiştir. Elde edilen sayısal değerler Çizelge 6.4'te verilmiş, sıcaklığa (°C) karşı enzim aktivitesi (U/mg protein) değerleri grafiğe geçirilmiştir (Şekil 6.5).

Çizelge 6.4 *Hypocrea jecorina* saf kültüründen üretilen glutamat oksidaz enziminin farklı sıcaklıklarda elde edilen sayısal parametreleri

Sıcaklık	Absorbans	NH ₄ ⁺ Miktarı (mg/L)	Total Ünite (U/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)
20	0.4937	94.07	8.71	94.14
30	0.4981	95.04	8.80	95.1
37	0.6196	117.29	10.86	117.37
40	0.6573	131.33	12.16	131.5
50	0.5169	98.45	9.11	98.45
60	0.2507	95.51	8.84	95.53
70	0.2309	87.96	8.14	87.98

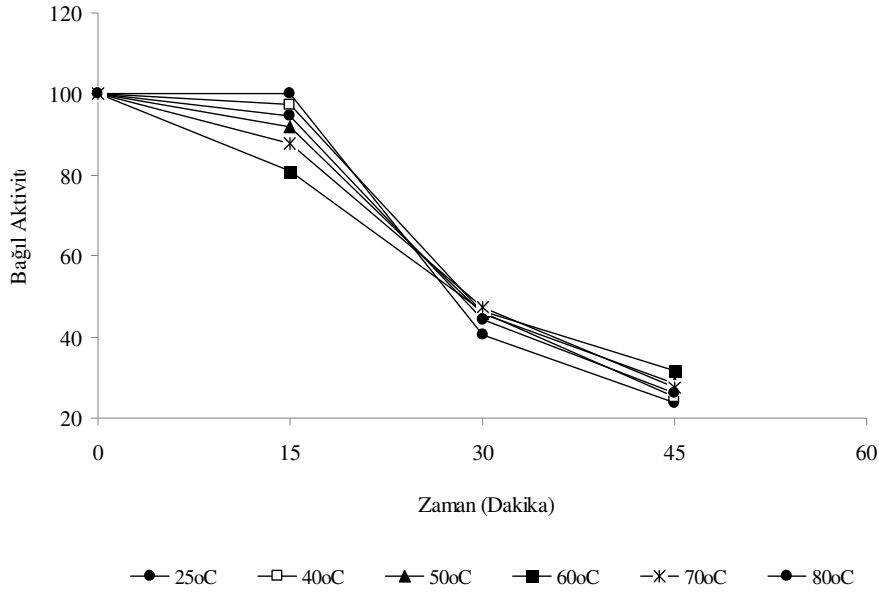


Şekil 6.5 *Hypocrea jecorina* saf kültüründen üretilen glutamat oksidaz enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi

Çizelge 6.4 ve Şekil 6.5'te görüldüğü gibi, üretilen glutamat oksidaz enziminin aktivitesi 40°C'ye kadar artmış, 40°C'den sonra enzim aktivitesi hızla düşmüştür. Glutamat oksidaz enzimi için optimum sıcaklık değeri 40°C olarak belirlenmiştir.

6.7 Enzim Termal Kararlılığı

Sıcaklığın enzim kararlılığına etkisini belirlemek için üretilen glutamat oksidaz enziminin, 25 °C'den 90 °C'ye kadar yedi farklı sıcaklıkta ayrı ayrı 0, 15, 30 ve 45 dakika süresince inkübe edilmesi sonucu enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Süre sonunda enzim hızlı bir şekilde su banyosundan çıkarılıp buz banyosunda soğutulmuş, ardından oda sıcaklığına getirildikten sonra enzim aktivitesi ölçülmüş, bağlı aktivite değerleri sıcaklığa karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 6.6).



Şekil 6.6 *Hypocrea jecorina*'dan üretilen glutamat oksidaz enziminin termal kararlılığı. Grafikten, enzimin yüksek sıcaklıklarda zamanla aktivite değerlerinde meydana gelen değişimler görülmektedir. Yüksek sıcaklıklara çıkıldıkça enzim aktiviteleri arasındaki farklar ilk 15 dakikadan sonra önce %60 daha sonraki 15 dakikalık periyotlar ile geriye kalan aktivitenin de %50 kadar ilerleyen inkübasyon sürelerinde azalmıştır.

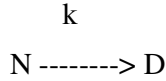
Supawadee Wachiratianchai ve arkadaşları (2004), *Streptomyces sp. 18G* mikroorganizmasından ürettikleri glutamat oksidaz enziminin termal kararlılığını 30°C'den 80°C'ye kadar 1 saat boyunca analiz edip grafiğe geçirmişlerdir. Çalışma sonucunda 80°C'da 1 saat inkübasyon sonucunda enzimin tamamen inhibe olduğunu belirtmişlerdir [40]. Çalışmamızda 70°C'a kadar yapılan ölçümlerde 45 dakika sonucunda enzim aktivitesinde % 80'e kadar bir kayıp görülmüştür. Bu da mikrobiyal üretimini gerçekleştirdiğimiz glutamat oksidaz enziminin termal kararlılığının farklı

mikroorganizmalara benzer ve matriksden bağımsız olabileceğini göstermektedir. Bu durum enzimle çalışılan biyo-analitik çalışmalarda hızlı ve yüksek yanıt alınabileceğini göstermektedir.

6.8 Enzimin Aktivasyon Enerjisi ve Yarı Ömrünün Hesaplanması

Sıcaklığa maruz kalmış enzim aktivitesindeki düşme incelenerek birinci dereceli inaktivasyon sabiti (k), aktivasyon enerjisi (Ea) ve yarı ömür ($t_{1/2}$) değerleri hesaplanmıştır. Bu değerlerin hesaplanması aşağıda özetlenmiştir.

Belli bir zaman süreci içerisinde doğal enzimin aktivitesindeki kayıplar ya da konsantrasyonundaki azalmalar birinci dereceden kinetiğe uyar ve aşağıdaki gibi ifade edilebilir.



Burada N doğal enzimi, D denatüre olmuş enzimi ve k ise (1/zaman) enzim için birinci dereceli inaktivasyon hız sabitini göstermektedir. Enzimlerin termal inaktivasyonu genellikle birinci dereceden reaksiyonla ifade edilir:

$$E_t = E_0^{-k.t} \quad \text{Eşitlik 6.1}$$

E_t , t anındaki enzim aktivitesi ve E_0 başlangıçtaki aktiviteyi, t ise sıcaklık uygulama süresini ifade eder. Sabit sıcaklıkta $\ln (E_t/E_0)$ 'ın süreye karşı grafiği çizildiğinde, doğrunun eğimi $-k$ 'dir.

Her kimyasal tepkimenin kendine özgü bir aktivasyon enerjisi vardır. Bir tepkimenin aktivasyon enerjisinin yüksek olması, o tepkimenin daha zor başlayacağı anlamına gelir. Oda sıcaklığında kendiliğinden gerçekleşmeyen bir tepkime, tepkimeye girenler ısıtılmak suretiyle aktivasyon enerjisine ulaşılarak gerçekleştirilebilir. Ayrıca bir katalizör yardımıyla da bir tepkimenin aktivasyon enerjisi düşürülebilir.

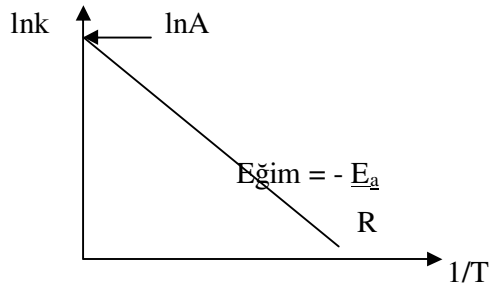
Enzimler biyokimyasal katalizörler olduklarından bir biyokimyasal tepkimenin aktivasyon enerjisini düşürerek hızını 10^4 ile 10^{14} kat artırmaktadırlar. [71]

Hypocrea jecorina 'dan ürettiğimiz glutamat oksidaz enzimi için termal kararlılık çalışmasından elde edilen grafiğin her bir sıcaklık için eğimleri belirlenerek her bir sıcaklıkta enzimin inaktivasyon hız sabitleri (k) ve yarı ömrü ($t_{1/2}$) belirlenmiştir (Çizelge 6.5).

Çizelge 6.5 *Hypocrea jecorina* saf kültüründen üretilen glutamat oksidaz enziminin farklı sıcaklıklarda inaktivasyon hız sabitleri ve yarı ömürleri.

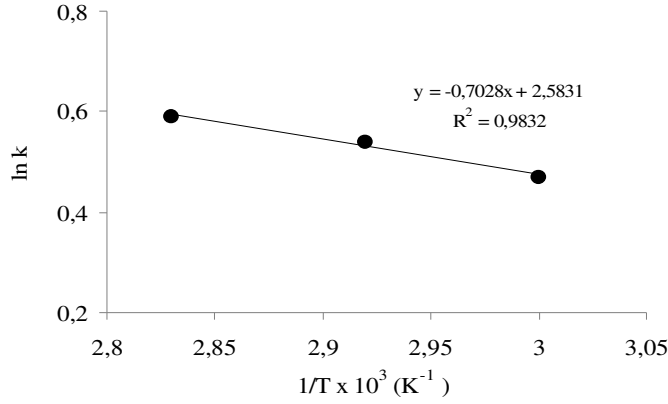
Sıcaklık (°C)	İnaktivasyon hız sabiti, k	$t_{1/2}$ (ln 2/ k)
60	1,598	0,43
70	1,717	0,40
80	1,811	0,38

Aktivasyon enerjisi, bir tepkimenin gerçekleşebilmesi için aşılması gereken enerji değeridir. Terim ilk kez 1889 yılında İsveçli kimyacı Svante Arrhenius tarafından kullanılmıştır. Enzimin aktivasyon enerjisini hesaplamak için Arrhenius eşitliği, $\ln k = A - E_a/RT$, kullanılmıştır. A: İntegrasyon sabiti, E_a : Aktivasyon enerjisi (cal mol^{-1}), R: Evrensel gaz sabiti ($1,99 \text{ cal mol}^{-1}$) ve T: Mutlak sıcaklık (K). Arrhenius ($\ln k - 1/T$) grafiği çizilerek enzimin aktivasyon enerjisinin bulunmuştur (Şekil. 6.7).



Şekil. 6.7 Aktivasyon enerjisinin bulunması için Arrhenius grafiği

Aktivasyon enerjisi, Şekil 6.8’de çizilen grafiğin eğiminden aşağıdaki hesaplama yapılarak $1,40 \text{ cal mol}^{-1}$ olarak bulunmuştur.



Şekil 6.8 *Hypocrea jecorina* saf kültüründen üretilen glutamat oksidaz enziminin 60 - 80°C arasında elde edilen Arrhenius grafiği

$$\ln k = -E_a/RT \quad \text{Eşitlik 6.2}$$

$\ln k / 1/T$ grafiğinin eğimi = $-0,7028 = -E_a / R = -E_a / 1,99 \rightarrow E_a = 1.40 \text{ cal mol}^{-1}$

Yarı ömür ($t_{1/2}$) değeri, enzim stabilitesinin belirlenmesinde yaygın bir şekilde kullanılan bir parametredir. Belli bir sıcaklıkta enzim aktivitesinin yarı yarıya azalması için gereken süredir. Enzimlerin ısı yolla inaktivasyonu çoğunlukla birinci dereceden kinetiğe uyduğundan aşağıdaki formülden kolaylıkla hesaplanabilir:

$$t_{1/2} = \ln 2/k \quad \text{Eşitlik 6.3}$$

Enzimin her sıcaklık için yarı ömrü Eşitlik 6.3'e göre hesaplanarak Çizelge 6.5'de sunulmuştur.

Enzim Kinetiği

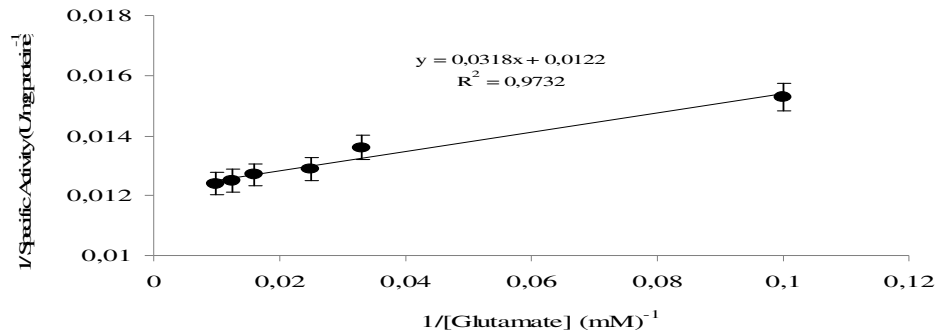
Biyokimyasal reaksiyonlar için enzimlerin kinetik parametrelerinin (K_M ve v_{\max} değerleri) belirlenmesi, enzimle yapılan çalışmaları hakkında önemli bilgi sağlaması bakımından çok önemlidir [71].

Maksimum hız, v_{\max} , enzim katalizinin ulaşabileceği en yüksek hız değeridir. Enzim bölgeleri substrat ile tam doygunluğa geçince maksimum hıza ulaşır. Michaelis-Menten sabiti, K_M , en yüksek hız değerinin yarısına ulaşmak için gerekli substrat miktarıdır, enzime ve substrata özgüdür, enzimin substrata olan ilgisini yansıtır. K_M 'si düşük olan bir enzim, substratına yüksek ilgi (affinite) gösterir [72].

Üretilen glutamat oksidaz enziminin kinetik parametreleri olan v_{\max} ve K_M değerlerinin hesaplanması Bölüm 5.11’de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Farklı glutamat konsantrasyonlarında glutamat oksidaz enzim aktivitesi belirlenmiş, elde edilen sayısal parametreler Çizelge 6.6’da verilmiştir. $1/[\text{glutamat}] \text{ (mM}^{-1}) - 1/\text{spesifik aktivite} \text{ ((U/mg protein)}^{-1})$ değerleri grafiğe geçirilerek Lineweaver–Burk grafiği elde edilmiştir (Şekil 6.9).

Çizelge 6.6 *Hypocrea jecorina* saf kültüründen üretilen glutamat oksidaz enziminin farklı glutamat konsantrasyonlarında elde edilen sayısal parametreleri

Glutamat Konsantrasyonu (mM)	Absorbans	NH ₄ ⁺ Miktarı (mg/L)	Protein Miktarı mg/ml protein	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	1/ [Spesifik Aktivite] (U/mg protein) ⁻¹
10	0,2153	20,51	0,029	65,52	0,0153
30	0,24123	22,97	0,028	73,45	0,0136
40	0,24461	23,3	0,028	77,14	0,0129
60	0,24961	23,77	0,028	78,57	0,0127
80	0,2538	24,17	0,028	80	0,0125
100	0,25616	24,4	0,028	80,71	0,0124



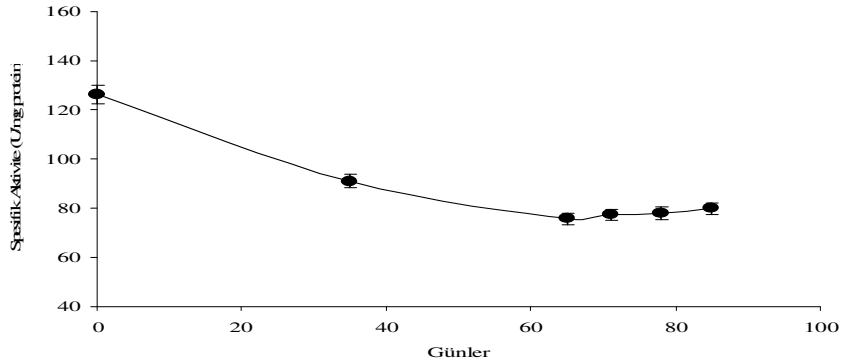
Şekil 6.9 *Hypocrea jecorina*’dan üretilen glutamat oksidaz enziminin Lineweaver-Burk grafiği

Şekil 6.9'da elde edilen grafik kullanılarak K_M ve v_{max} değerleri hesaplanmıştır. Lineweaver-Burk grafiğinden yararlanılarak bulunan K_M değeri 2.58 mM; v_{max} değeri ise 83,33 U/mg protein olarak bulunmuştur. $[S] > 100K_M$ aralığında (3. Bölge) yapılan çalışma bize doğru noktalarda kinetik çalıştığımızı göstermektedir. Buradan indirgenmiş substrat derişimine ulaşırsak $[S']$ değeri de 3,87 olarak bulunur.

Jiro Arima ve arkadaşları (2009), *Streptomyces sp. X-119-6* mikroorganizmasından ürettikleri glutamat oksidaz enziminin kinetik parametrelerini çalışmış ve Michaelis-Menten sabiti olan K_M 'yi 0,23 mM, olarak rapor etmişlerdir [73]. Çalışmamızda mikroorganizma türünden elde edilen K_M değerleri de literatürde yer alan değerlerin arasında bulunmaktadır. Bu da *Hypocrea jecorina* mikroorganizmasından elde edilen glutamat oksidaz enziminin substratına olan ilgisinin çok da düşük olmadığını göstermektedir. Literatürde farklı mikrobiyal üretimlerde K_M değerleri 1,1 – 3,8 mM olarak belirtilmiştir [33]. Ancak kinetik araştırmalarda ve Lineaveaver-Burk diyagramının elde edilmesi için Michaelis-Menten grafiğinin 3. Bölgesinin kullanılması gerektiğinden bu değerler elde edilmiştir.

6.9 Enzimin Depolanma Süresince Kararlılığı

Hypocrea jecorina mikroorganizması kullanılarak üretimi gerçekleştirilmiş glutamat oksidaz enzim homojenatı +4°C'da 86 gün boyunca aktivite değerleri takip edilerek depolama kararlılığı tayin edilmiştir (Şekil 6.10).



Şekil 6.10 +4°C'da depolama şartlarında glutamat oksidaz enzim aktivitesinin zamanla değişimi

Şekil 6.10'dan de görüldüğü gibi her iki türden elde edilmiş glutamat oksidaz enziminin 86 gün süresince +4°C'de depolanması sonucunda %40'dan fazla bir aktivite kaybı

görülmemiştir. Bu durum enzim ile yapılan biyo analitik çalışmalarda rahatlıkla kullanılabileceğini göstermektedir. Özellikle daha sonrası için planlamış olduğumuz glutamat oksidaz enzim biyosensörü hazırlanması için oldukça avantajlıdır. Arima ve arkadaşları 2009 yılında yaptıkları çalışmalarda, *Streptomyces* türünden izole ettikleri enzimlerin de birkaç aylık depolama kararlılığına sahip olduklarını belirtmişlerdir [73].

SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışmada *Hypocrea jecorina* saf kültüründen glutamat oksidaz enziminin mikrobiyal olarak üretimi, üretilen enzimin optimum koşullarının belirlenmesi ve kinetik parametrelerinin hesaplanması hedeflenmiştir.

Hypocrea jecorina saf kültürü kullanılarak üretilen glutamat oksidaz enziminin optimum pH değeri 8.5, optimum sıcaklığı 37-40°C olarak belirlenmiş, enzimin termal kararlılığının ve depolama kararlılığının oldukça yüksek olduğu bulunmuştur. Ayrıca mikroorganizmadan üretilen enzimin kinetik parametreleri olan K_M ve v_{max} değerleri Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek hesaplanmıştır.

Yapılan tüm çalışmalarımız amacına ulaşarak, mikrobiyal olarak üretilen glutamat oksidaz enziminin üretim koşulları, optimum koşulları ve kinetik parametreleri belirlendi. Literatürde mikrobiyal olarak glutamat oksidaz enziminin *Hypocrea jecorina* mikroorganizmasıyla üretiminin bulunmaması, çalışmamızın özgün olduğunu göstermektedir. Sunulan tez çalışmasında üretilen glutamat oksidaz enziminin aktivitesinin, optimum sıcaklığının, termal kararlılığının ve depolama kararlılığının yüksek olması, planlanmış olduğumuz, glutamat tayinine yönelik ve glutamat oksidaz enziminin immobilize edilerek biyosensör hazırlanması için temel oluşturması bakımından büyük önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Kashyap P., Sabu A., Pandey A., Szakacs G. ve Soccol C. R., (2002). "Extra-cellular L-glutaminase production by *Zygosaccharomyces rouxii* under solid-state fermentation", *Process Biochemistry*, 38:307–312.
- [2] Bugg, T.D.H., (2004). *Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry*, İkinci Baskı, Blackwell Publishing.
- [3] Dilsiz, N., (2004). *Moleküler Biyoloji*, Palme Yayıncılık, Ankara.
- [4] Tan, İ., (2008). "Bazı Ağır Metal ve Organik Kirleticilerin Laktat Dehidrogenaz Enzimi Üzerindeki Engelleyici Etkilerinin Belirlenmesi ve Enzim İnhibisyonuna Dayalı Biyosensör Geliştirilmesi", Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze.
- [5] National Center for Biotechnology Information, Glutamate Oxidase 3D structure, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?uid=2e1m> 30 Mart 2013
- [6] Fidancı (2009) Enzimler Ders Notları, Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi.
- [7] Telefoncu, A., (1992). *Tıp ve Fen Bilimciler için Biyokimya*, İkinci Baskı, Sermet Matbaası, Kırklareli.
- [8] Mal-Nam, K. ve Kyoung-Hwa, P., (2004). "Immobilization of enzymes for Klebsiella BOD sensor", *Sensor and Actuators*, 98:1–4.
- [9] Dinçkaya, E., *Enzimoloji Ders Notları*, (1997)
- [10] Jin-Hong W., Zhang, W., ve Shi-Ying X., (2007). "Enzymatic production of bioactive peptides from sericin recovered from silk industry wastewater", *Process Biochemistry*, 43:480–487.
- [11] Champe, P. C., ve Harvey, R. A., (1997). *Lippincott Illustrated Reviews Biochemistry*, İkinci Baskı, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul.

- [12] Keha, E. ve Küfrevioğlu, İ. (2011). Biyokimya, Sekizinci Baskı, Aktif Yayınevi, İstanbul.
- [13] Casiday, R. ve Frey, R., (1998). “Enzyme-Substrate Binding: Carboxypeptidase; Chemical-Kinetics Experiment”
<http://www.chemistry.wustl.edu/~edudev/LabTutorials/Carboxypeptidase/carboxypeptidase.html>, 15 Mayıs 2012.
- [14] Carr, S. M., (2009). “Induced-Fit Model of enzyme catalysis”,
http://www.mun.ca/biology/scarr/Induced-Fit_Model.html, 30 Mart 2013.
- [15] A level Notes, Factors affecting Enzyme Activity,
<http://alevelnotes.com/Enzymes/144#/?id=146>, 13 Mart 2013.
- [16] Ulakoğlu Zengin, E., Enzimler, İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Biyokimya ABD.
- [17] BioBeat, Biochem Must Knows,
<http://biobeat.wikispaces.com/01-+Biochem+Must+Knows>, 30 Mart 2013.
- [18] Hogg, S., (2005). Essential Microbiology, John Wiley, West Sussex.
- [19] Vikipedi Özgür Ansiklopedi, Enzim Kinetiği,
http://tr.wikipedia.org/wiki/Enzim_kineti%C4%9Fi, 30 Mart 2013.
- [20] Brenda, Glutamate Oxidase,
http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=1.4.3.11, 30 Mart 2013.
- [21] European Bioinformatics Institute, Enzyme Structures Database,
<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/enzymes/>, 1 Mayıs 2012.
- [22] Harper’s biochemistry,(2004)
- [23] Wu G., Fang Y., Yang S., Lupton J.R. ve Turner N. R.,(2004) “Glutathione Metabolism and Its implications for Health” American Society of nutritional Reviews, 489-492
- [24] G. Moges, N. Wodajo, L. Gorton, Yigzaw Y., Kalcher K., Belay A., Akalu G., B. M. Nair ve Solomon T., (2004) “Glutamate oxidase advances in the selective bioanalytical detection of the neurotoxic amino acid β -ODAP in grass pea: A decade of progress” Pure Appl. Chem., 75(4):765-775
- [25] Maher P. ve Devis J.B., (1996) “The role of Monoamine Metabolism in Oxidative Glutamate Toxicity” The journal of neuroscience 16(20):6394-6401
- [26] Jeon, J-M., Lee, H-I., Han, S-H., Chang, C-S. ve So, J-S., (2010). “Partial Purification and Characterization of Glutaminase from *Lactobacillus reuteri*

- KCTC3594”, Applied Biochemistry and Biotechnology, 162:146–154.
- [27] Weingand-Ziadé, A., Gerber-Décombaz, C. ve Affolter, M., (2003). “Functional characterization of salt-and termotolerant glutaminase from *Lactobacillus rhamnosus*”, Enzyme and Microbial Technology, 32:862–867.
- [28] Suzuki, H., Izuka, S., Miyakawa, N. ve Kumagai, H., (2002). “Enzymatic production of theanine, an “umami” component of tea from glutamine and ethylamine with bacterial α -glutamyltranspeptidase”, Enzyme Microbiology Technology, 31:884–889.
- [29] Tamari ve Shoyu, The Quality of Traditional Soy Sauce,
<http://www.care2.com/greenliving/tamari-shoyutamari-shoyu-soy-sauce.html>, 26 Aralık 2011.
- [30] Tübitak Bilim ve Teknik Dergisi, Beşinci Tat:Umami,
http://www.biltek.tubitak.gov.tr/bilgipaket/duyular/besinci_tat.swf, 19 Mayıs 2012.
- [31] Ajinomoto Group, Umami Global Web Sitesi,
<http://www.ajinomoto.com/features/aji-no-moto/tr/umami/index.html>, 20 Mayıs 2012.
- [32] Drink Factory, Enhancing Umami,
<http://drinkfactory.blogspot.com/2011/10/enhancing-umami.html>, 12 Mayıs 2012.
- [36] McCauley, R., Kong S-E., Heel, K., ve Hall J. C., (1999). “The role of glutaminase in the small intestine”, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 31:405–413.
- [37] Nandakumar, R., Yoshimmune, K., Wakayama, M. ve Moriguchi, M. (2003). “Microbial glutaminase: biochemistry, molecular approaches and applications in the food industry”, Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic, 23:87–100.
- [38] El-Sayed, A. S. A., (2009). “L-Glutaminase Production by *Trichoderma Koningii* Under Solid State Fermentation”, Indian J Mikrobiol, 49:243–250.
- [39] Iyer, P. ve Singhal, R. S., (2008). “Production of glutaminase (E.C.3.2.1.5) from *Zygosaccharomyces rouxii*: Statistical optimization using response surface methodology”, Bioresource Technology, 99:4300–4307.
- [40] Wachiratianchai S., Bhumiratana A. ve Udomsopagit S. (2004) “Isolation, purification, and characterization of L-glutamate oxidase from *Streptomyces* sp. 18G” Journal of Biotechnology 7(3).
- [41] Chen C., Wu W., Huang C., Lin M., Chang C., Huang H., Liao J., Chen L. ve Liu Y.,(2001) “A common precursor for the three subunits of L-glutamate oxidase encoded by *gox* gene from *Streptomyces platensis* NTU3304” Can. J.

Microbiol. 47: 269–275 (2001)

- [42] Fukunaga S., Yuno S., Takahashi M., Taguchi S., Kera Y., Odani S. ve Yamada R.* (2003). “Purification and Properties of D-Glutamate Oxidase from *Candida boidinii* 2201” *Journal of Fermentation and Bioengineering* 85(6):579-583.
- [43] National Human Genome Research Institute, http://www.genome.gov/glossary/resources/amino_acids_lg.jpg, 07 Mayıs 2012.
- [44] Kolancı, Ç., (2009). *Temel ve Klinik Biyokimya*, Birinci Baskı, İstanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul.
- [45] Altınışık, M., (2009). “Amino Asitlerin Biyosentezi ve Anaplerotik Reaksiyonlar”, ADÜTF Biyokimya AD.
- [46] University of Bristol, Glycine, <http://www.chm.bris.ac.uk/motm/glycine/glycineh.htm>, 07 Nisan 2012.
- [47] Akın, O., *Aminoasit Metabolizması*, Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı, Powerpoint Sunusu.
- [48] Wikipedia, Glutamate, <http://en.wikipedia.org/wiki/Glutamate> , 07 Nisan 2013.
- [49] Hammaddeler, Glutamat, http://www.hammaddeler.com/index.php?option=com_content&view=article&id=4298&Itemid=372 , 07 Nisan 2013.
- [50] Şifalı Bitkiler ve Doğal Tedavi, Glutamin, <http://sifalibitkilervedogaltedavi.com/index.php/amino-asitler/126-glutamin>, 16 Mayıs 2012.
- [51] Güven, M., (2007). “Metabolik Sorunların İnfeksiyona Etkisi”, *Yoğun Bakım Dergisi*, 7(1):54–60.
- [52] Lam, H., Kostov, Y., Rao, G., ve Tolosa, L., (2008). “Low-cost optical lifetime assisted ratiometric glutamine sensor based on glutamine binding protein”, *Analytical Biochemistry*, 383:61–67.
- [53] Konyalıoğlu, S. Ve Özyer, A., (2000). “Plazma Glutamin Düzeylerinin İki Yöntem ile Değerlendirilmesi”, *Ege Tıp Dergisi*, 39(1):1–4.
- [54] Preiser, J-C., Chioloro, R. ve Singer P., (2006). “Yoğun Bakımda Beslenme Desteği:Özel Substratların Kullanılması”, *Yoğun Bakım Dergisi*, 6(Ek 1):69–78.
- [55] Yurdakök, K., Yalçın, S. ve Tezcan, İ., (2001). “Akut Gastroenterit Vakalarında Glutamin Suplementasyonunun İshal Süresi ile İnterlökin-8 ve Sekretuar İga Düzeyleri Üzerine Etkisi”, Proje No: SBAG-2203.

- [56] Tapiero, H., Mathé, G., Couvreur, P. ve Tew, K. D., (2002). "II. Glutamine and glutamate", *Biomed Pharmacother*, 56:446–457.
- [57] Newpher & Ehrens, (2008) Psikoloji'ye giriş Anadolu Üniversitesi Yayınları
- [58] Çolak ve ark. (2003) Psikoloji'ye giriş Anadolu Üniversitesi Yayınları
- [59] Psikoloji'ye giriş Anadolu Üniversitesi Yayınları Yayın No: 2686 2012
- [60] Krug,F.J., Ruzicka J. ve Hansen H., (1979) "Determination of Ammonia in low concentrations with Nessler's Reagent by flow injection analysis" *Analyst* 104:47-54
- [61] Geckil H. ve Gencer S. (2004) "Production of L-Asparaginase in *Enterobacter aerogenes* expressing *Vitreoscilla hemoglobin* for efficient oxygen uptake" *Appl Microbiol Biotechnol*.
- [62] Elsayed M., Hassan M., Elshafei A., Haroun B. ve Othman A.(2010). "Optimization of Cultural and Nutritional Parameters for the Production of Laccase by *Pleurotus ostreatus* ARC280" *British Biotechnology Journal* 2(3): 115-132, 2012
- [63] Bradford, M. M., (1976). "Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analytical Biochemistry*, 72:248-254.
- [64] Karakuş, E., (2010). Protein Saflaştırma Yöntemleri, Yıldız Teknik Üniversitesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Ders Notları.
- [65] Nuutinen J., Timonen S., (2008). Identification of nitrogen mineralization enzymes, L-aminoacid oxidases, from the ectomycorrhizal fungi *Hebeloma* spp. and *Laccaria bicolor* *mycological research* 112(2008) 145 3 – 1464
- [66] Kenari D., Laleh S., Iran A. ve V. Maghsodi (2011) "Production of L-asparaginase from *Escherichia coli* ATCC 11303: Optimization by response surface methodology" *Food & Bioproducts Processing: Transactions of the Institution* ; 89(4):315
- [67] Imada, A.S.,Nakakama, K. ve Isono, M.,(1973). "Asparaginase and Glutaminase activities of microorganism", *Journal of General Microbiology*,76:85-99
- [68] Önez Z., (2006). "Üzüm (Vitis vinifera L.) izole edilen polifenol oksidaz enziminin özelliklerinin belirlenmesi" Ankara Üniversitesi.
- [69] Lineweaver, H. ve Burk, D., (1934). "The Determination of Enzyme Dissociation Constant", *Journal of American Chemical Society*, 56:658.

- [70] Whitaker, J.R. (2003) Enzyme catalyzed reactions: Experimental factors that affect rates, handbook of food Enzymology (Editörler ; Whitaker. J. R. , Voragen A.G.J. ve Wong D.W.S.) Marcel Dekker, New York 31-65.
- [71] Telefoncu, A., (1997), Biyokimya Ders Kitabı.
- [72] Bağrıyanık, D. B., (2011). Potansiyometrik Esaslı Glutamin Biyosensörü Tasarlanması ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [73] Arima J., Sasaki C., Sakaguchi C., Mizuno H., Tamura T., Kashima A., Kusakabe H., Sugio S. ve Inagaki K. (2005). "Structural characterization of L-glutamate oxidase from Streptomyces sp. X-119-6" FEBS Journal 276 (2009) 3894–3903 a 2009 The Authors Journal compilation 2009 FEBS
- [74] Öner M. 2001, Genel Mikrobiyoloji Ders Kitabı, Ege Üniversitesi Yayınları.
- [75] Demirci, Ö., (2010). "Avrupa Ülkelerinde ve Türkiye’de Mantar Sektörü ve İlgili Düzenlemeler", Orman Genel Müdürlüğü, 46. Dönem AB Temel Eğitim Kursu, Ankara.
- [76] Boztok, K. ve Atilla, F., (2012). "Zehirli Mantarlar", Türk Farmakoloji Derneği, Klinik Toksikoloji Çalışma Grubu, İkinci Sayı, 1–59.
- [77] Şen, S. ve Yalçın, M., (2010). "Dünya ve Türkiye’de Kültür Mantarcılığı ve Geliştirilmesi", III. Ulusal Karadeniz Ormancılık Kongresi, 20–22 Mayıs 2010, Artvin, 1208–1216.
- [78] Çotuk, A., (2003). Genel Mikrobiyoloji Laboratuvar Yöntemleri, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul.
- [79] Aktümsek, A. ve Konuk, M., (2002). Canlılar Bilimi, Birinci Baskı, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara.
- [80] Eren, E., Çetin, M., Türkler, L. ve Öz, O., (1995). Kültür Mantarı Yetiştiriciliğinde İklimlendirme ve Otomasyon
http://www.mmo.org.tr/resimler/dosya_ekler/a9b31f4d596fa52_ek.pdf?tipi=&tuuru=&sube=3, 24 Mart 2012.
- [81] Özkul, A., G., (1999). "Kültür Mantarı İklimlendirme Tesisatı", IV. Ulusal Tesisat Mühendisliği Kongresi, 4–7 Kasım 1999, İzmir, 611–617.
- [82] Tan, A. ve Ökten, E. M., (2008). "Kültür Mantarında Zararlı Nematodlar ve Savaşım Yöntemleri", Journal of Agricultural, 22(1):9 –16.
- [83] Vikipedi Özgür Ansiklopedi, Küf Mantarları,
http://tr.wikipedia.org/wiki/K%C3%BCf_mantarlar%C4%B1, 11 Mayıs 2012.
- [84] Gıda Bilimi, Gıdalardaki Küfler,
<http://www.gidabilimi.com/makaleler/34-makaleler/2335-gidalardaki-kufler>,

11 Mayıs 2012.

- [85] Vikipedi Özgür Ansiklopedi, *Trichoderma reesei*,
http://tr.wikipedia.org/wiki/Trichoderma_reesei, 23 Mayıs 2012.
- [86] Akel, E., (2009). *Trichoderma reesei*'ye Ait Bazı Enzimlerin Üretimini, Yenilenebilir Karbon Kaynağı Olarak Kullanılan D-Ksiloz ve L-Arabinoz Tarafından Baskılanması, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [87] Sandgren, M., Ståhlberg, J. ve Mitchinson, C., (2005). "Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes", *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 89:246–291.
- [88] Schuster A. ve Schnoll B.(2010),*Biology and biotechnology of Trichoderma* Applied Microbiology and Biotechnology July 2010, 87(3): 787–799.
- [89] Böhmer A., Müller A., Passarge M., Liebs P., Honeck H. ve Müller H. (1989) "A novel L-glutamate oxidase from *Streptomyces endus* Purification and properties" *Eur. J. Biochem.* 182: 327-332.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Fatih Mehmet EYNUR
Doğum Tarihi ve Yeri : 18.09.1984 Akhisar
Yabancı Dili : İngilizce / Almanca
E-posta : eynurbiyokimya@hotmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyokimya	Yıldız Teknik Üniversitesi	2013
Lisans	Biyokimya	Ege Üniversitesi	2006
Lise	Sayısal	Akhisar Anadolu Lisesi	2002

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2011 - ...	Altay Grup Klima San. Tic.A.Ş.	Analitik Cihazlar Departman Müdürü
2008-2011	İntertek Test Hizmetleri A.Ş.	Analist
2007-2008	Motec Madeni Yağlar / Akhisar	Fabrika Müdürü