ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gözde ERGÖÇEN

β-GLUKOZİDAZ ENZİMİNİN KAYISI (*PRUNUS ARMENIACA*) ÇEKİRDEKLERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

KİMYA ANABİLİM DALI

ADANA, 2013

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

β-GLUKOZİDAZ ENZİMİNİN KAYISI (*PRUNUS ARMENIACA*) ÇEKİRDEKLERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Gözde ERGÖÇEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu Tez 15/07/2013 Tarihinde Aşağıdaki Juri Üyeleri Tarafından Oybirliği İle Kabul Edilmiştir.

.....	.....	.....
Prof.Dr.S.Seyhan TÜKEL	Prof.Dr.Güzide YÜCEBİLGİÇ	Prof.Dr.Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Kimya Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç.Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FEF2012YL21

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

β-GLUKOZİDAZ ENZİMİNİN KAYISI (*PRUNUS ARMENİACA*) ÇEKİRDEKLERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Gözde ERGÖÇEN

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman :Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL
Yıl: 2013, Sayfa: 45
Jüri :Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL
:Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ
:Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ

Bu çalışmada, Malatya ili ve çevresinde bol miktarda yetiştirilen ve şimdiye kadar β-glukozidaz kaynağı olarak kullanılmamış olan *Prunus armeniaca* (kayısı) çekirdeklerinden β-glukozidaz enziminin saflaştırılması, kinetik özellikleri (K_m, V_{max}), termal ve depolama kararlılıklarının araştırılması amaçlanmıştır. Saflaştırılan β-glukozidaz'ın molekül ağırlığının 107 kDa olduğu ve herbiri birbirinin aynı 23 kDa kütleli 5 alt birimden oluştuğu belirlenmiştir. *Prunus armeniaca* β-glukozidaz'ının optimum pH değeri 5,0 ve optimum sıcaklığı 45°C' dir. β-glukozidaz'ın 5°C' deki termal kararlılığı ve 5°C' deki depolama kararlılığı denenen diğer sıcaklıklara (25 ve 50°C) göre daha yüksek bulunmuştur. K_m ve V_{max} kinetik parametreleri *p*-nitrofenil-β-D-glukopiranozit substratı için sırasıyla 1,95 mM ve 77,5 U/mg prot. bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: β-glukozidaz, saflaştırma, karakterizasyonu, kinetik parametre, *Prunus armeniaca*

ABSTRACT

MSc THESIS

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF β-GLUCOSIDASE FROM *PRUNUS ARMENIACA* SEEDS

Gözde ERGÖÇEN

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

Supervisor : Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL
Year: 2013, Pages: 45
Jury : Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL
: Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ
: Prof.Dr.Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ

In this study, we aimed to purify β-glucosidase from *Prunus armeniaca* (apricot) seeds which are abundant in Malatya (Turkey) and its surroundings and have not been used as β-glucosidase source up to now as well as, to determine kinetic parameters (K_m, V_{max}), thermal and storage stabilities of the purified β-glucosidase. The molecular weight of the purified enzyme was estimated as 107 kDa and the enzyme was consist of five identical subnits with the molecular weight of 23 kDa each. The optimal pH value of β-glucosidase was 5.0 and its optimal temperature was 45°C. β-Glucosidase preparations showed better thermal and storage stabilities at 5°C than those of other temperatures (25 and 50°C). Km and V_{max} values were 1.95 mM and 77.5 U/mg prot., respectively towards *p*-nitrophenyl-β-D-glucopyronoside.

Keywords: β-glucosidase, purification, characterization, kinetic parameters, *Prunus armeniaca*

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca engin bilgi ve deneyimi ile yardım ve önerilerini hiçbir zaman esirgemeyen, her konuda beni aydınlatan ve geliştirici açıklamaları ile çalışmalarım boyunca önümde bir ışık olan saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL' e sevgi ve emeklerinden dolayı sonsuz şükranlarımı sunarım.

Ayrıca saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ ve Doç. Dr. Ramazan BİLGİN' e ilgilerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Çalışmalarımda bilgi ve deneyimleri ile izlemem gereken yöntem ve metodlar hakkında sürekli beni bilgilendiren ve desteğini benden esirgemeyen değerli hocam Dr. Deniz YILDIRIM' a ve Dr. Dilek ALAGÖZ' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmalarım boyunca beni manevi olarak destekleyen arkadaşlarım Gülferah IŞIKLAR, Müge ŞENGÜL, Arş.Gör. Burcu DARENDELİ, Özge CAN, Arş.Gör. Ali TOPRAK, Yakup AKKOÇ, Duygu KÖSE, Hande SAKALLIOĞLU, Asım EĞİTMEN, Fatma ULUSAL, Burak KOCA ve Emre DEĞİRMEN' e çok teşekkür ederim.

Bütün eğitimim boyunca maddi ve manevi hiçbir desteği, ilgi ve sevgilerini benden esirgemeyen annem Nurten ERGÖÇEN' e, babam A. Hikmet ERGÖÇEN' e ve ablam S. Özge ERGÖÇEN' e sonsuz şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
TEŞEKKÜR III
İÇİNDEKİLER ..... ……IV
ÇİZELGELER DİZİNİ VI
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... ……VIII
1. GİRİŞ 1
1.1. β-Glukozidaz 1
1.2. Protein Saflaştırmanın Amacı 3
1.2.1. Protein Saflaştırma Stratejisi 4
1.2.1.1. Çöktürme 5
1.2.1.2. Kromatoğrafi 6
1.2.1.3. Hidrofobik Etkileşim Kromatoğrafisi 6
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 9
3. MATERYAL VE METOD 15
3.1. Materyal 15
3.1.1. *Prunus armeniaca* Çekirdeklerinin Toplanması 15
3.1.2. Kimyasallar 15
3.1.3. Araç ve Gereçler 15
3.2. Metod 16
3.2.1. β-Glukozidaz'ın Prunus armeniaca Çekirdeklerin Saflaştırılması 16
3.2.1.1. Çekirdeklerin Homojenizasyonu 16
3.2.1.2. Amonyum Sülfat ile Çöktürme 16
3.2.1.3. Hidrofobik Etkileşim Kromatoğrafisi 16
3.2.1.4. Protein Tayini 17
3.2.1.5. β-Glukozidaz Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi 18
3.2.1.6. Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi 18
3.2.1.7. SDS-PAGE Elektroforezi 19

3.2.1.8. Michealis-Menten Katsayısı (K_m) Ve Maksimum Hızın (V_{max}) Grafiksel Yöntemle Belirlenmesi 22
3.2.1.9. Aktiviteye pH'ın Etkisinin İncelenmesi 23
3.2.1.10. Aktiviteye Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi 23
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 25
4.1. Çekirdeklerin Homojenizasyonu ve Amonyum Sülfat ile Çöktürme Bulguları 25
4.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatoğrafisi Bulguları 25
4.3. β-Glukozidaz'ın Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi Sonuçları 27
4.4. β-Glukozidaz'ın Karakterizasyonu İle İlgili Bulgular 29
4.4.1. β-Glukozidaz'ın Aktivitesine pH'ın Etkisi İle İlgili Bulgular 29
4.4.2. β-Glukozidaz Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi İle İlgili Bulgular 30
4.4.3. β-Glukozidaz'ın Kinetik Parametreleri İle İlgili Bulgular 31
4.4.4. β-Glukozidaz'ın Termal Kararlılığı İle İlgili Bulgular 33
4.4.5. β-Glukozidaz'ın Depolama Kararlılığı İle İlgili Bulgular 33
4.5. Tartışma 35
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 39
5.1. Sonuçlar 39
5.2. Öneriler 40
KAYNAKLAR 41
ÖZGEÇMİŞ 45

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 1.1. Protein saflaştırma teknikleri özellikleri
(Erarslan ve ark., 2000) 5
Çizelge 3.1. % jel konsantrasyonlarına karşı eklenmesi gereken maddeler 20
Çizelge 4.1. Kayısı (*Prunus armeniaca*) çekirdeği β-glukozidaz'ı için
saflaştırma sonuçları 26
Çizelge 4.2. Çeşitli bitkilerin çeşitli toprak üstü organlarından saflaştırılan
β-glukozidaz' ların moleküler ağırlıkları ve aship olduğu alt
birim sayıları 37

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. Sellobiozun β-glukozidaz tarafından hidrolizi 1
Şekil 1.2. Bitkilerde gerçekleşen siyanojenez olayı 2
Şekil 3.1. Standart protein eğrisi 18
Şekil 3.2. Michealis-Menten grafiği 22
Şekil 3.3. Lineweaver-Burk grafiği 23
Şekil 4.1. Hidrofobik etkileşim kromatoğrafisi sonuçları 26
Şekil 4.2. Moleküler eleme kromatoğrafisi için standart protein grafiği 27
Şekil 4.3. β-Glukozidaz için örnek bir moleküler eleme kromatogramı Eldesi 28
Şekil 4.4. β-Glukozidaz için örnek bir SDS-PAGE sonucu 29
Şekil 4.5. β-Glukozidaz aktivitesinin pH' ya bağlı değişimi 30
Şekil 4.6. β-Glukozidaz aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi 31
Şekil 4.7. β-Glukozidaz için Michealis-Menten grafiği 32
Şekil 4.8. β-Glukozidaz için Lineweaver-Burk grafiği 32
Şekil 4.9. Kayısı (*Prunus armeniaca*) β-glukozidaz'ın bağıl aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı değişimi 33
Şekil 4.10. Kayısı (*Prunus armeniaca*) β-glukozidaz'ın bağıl aktivitesinin depolama süresine ve koşullarına bağlı değişimi 34

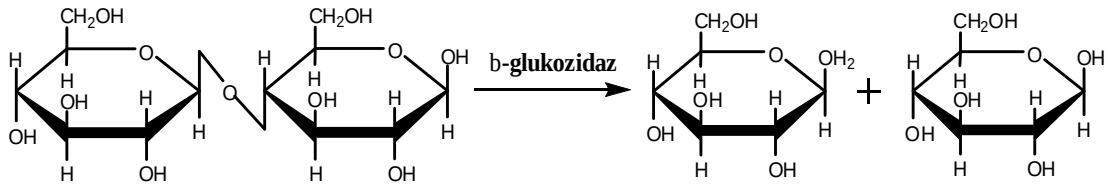
1.GİRİŞ

1.1. β-Glukozidazlar

Enzimler, metabolik reaksiyonları hızlandıran, protein yapısında biyolojik katalizörlerdir. Enzimler doğal ortamları dışında da uygun koşullar sağlandığında etkilerini gösterebilirler ve bundan dolayı pek çok kimyasal reaksiyonu hızlandırabilmek için enzimlerden yararlanılabilmektedir. Bu durumda enzimlerin yer aldıkları dokuların veya hücre kısımlarının belirlenmesi, biyokimyasal reaksiyonlardaki işlevlerinin ortaya çıkarılması, etki mekanizmalarının ve kinetik özelliklerinin tüm ayrıntılarıyla incelenmesi için enzimlerin saflaştırılarak elde edilmesi büyük önem taşımaktadır.

Sistematik adı β-D-glukozid glukohidrolaz (EC 3.2.1.21) olan β-glukozidazlar oligosakkaritlerdeki veya diğer glukoz bileşiklerindeki β-glukozid bağlarını hidroliz edebilen enzimlerdir (Esen ve ark., 2010). β-Glukozidazların mikroorganizmalar, hayvanlar ve bitkilerde yaygın olarak bulundukları ve biyolojik yollarda üç önemli görevlerinin olduğu bildirilmektedir (Esen, 1993).

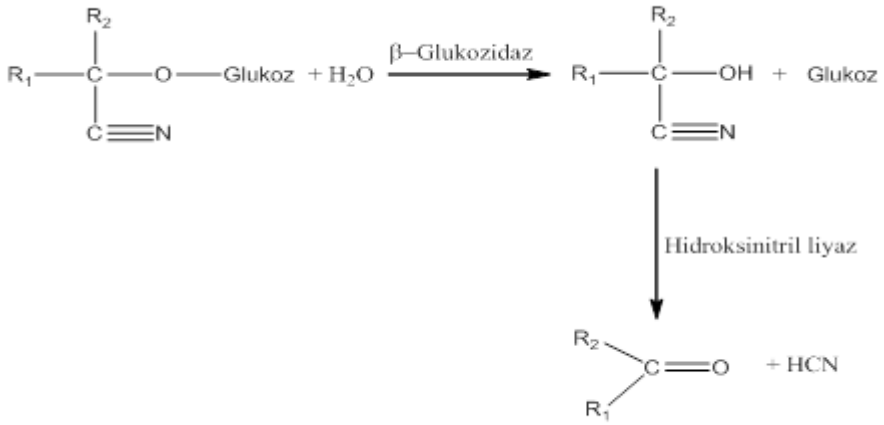
Bu görevlerden birisi, bakteri ve mantarlarda bulunan β-glukozidazların selülaz enzim sisteminin (sellobiohidrolaz, endo- β-glukonaz ve β-glukozidaz) bir parçası olarak selüloz ve sellobioz yıkılmasındaki rolüdür (Şekil 1.1) (Dembitsky ve ark., 2004).



Şekil 1.1. Sellobiozun β-glukozidaz tarafından hidrolizi.

İkincisi; endojen siyanojenik glikozitlerdeki β-glukozidik bağın hidrolizi ile aglikan ve siyanohidrinlerin oluşumunu katalizlemesidir (Geiger ve ark., 1999).

Doğada siyanohidrinler siyanojenik glikozitlerin aglikan kısmı olarak bulunurlar. Bu bileşikler HCN kaynağı olarak görev alırlar ve ayrıca azot transport metabolizmasında rol oynarlar. Bu olayın tümü siyanojenez olarak bilinmektedir (Şekil 1.2). Siyanojenezde oluşan HCN herbivoral ve fungal ataklar sonucu oluşan doku yaralanmalarında bitkiyi koruduğu, L-asparajinin biyosentezinde azot kaynağı olarak kullanıldığı bildirilmektedir (Hayona ve ark., 1997).



Şekil 1.2. Bitkilerde gerçekleşen siyanojenez olayı.

Bitki β-glukozidazların diğer önemli bir fonksiyonları da inaktif hormon-glukozid bileşiklerinden aktif hormon formlarını serbestleştirerek; sitokinin, giberellin ve oksin gibi bitki hormonlarının biyolojik aktivitelerinin düzenlenmesi ile ilgilidir (Ketudat ve ark., 2010).

In vivo fonksiyonları yukarıda kısaca özetlenen β-glukozidaz uygun *in vitro* koşulların sağlandığı durumlarda gıda detoksifikasyonunda, biyokütle dönüşümü, şarap ve içeceklerde lezzet geliştirmek için kullanılmaktadır (Brick ve ark., 1996). Bunlara ek olarak gıda, kozmetik, ilaç ve deterjan endüstrisinde kullanılan ticari öneme sahip çeşitli glikozitlerin sentezinde kullanılabilmektedir (Gerardi ve ark., 2001; Odoux ve ark., 2003). Zira pek çok β-glukozidazın antioksidan olma, kan glukoz düzeyini düşürme, zarları donma-çözülme hasarlarından koruma, tirozinazı inhibe etme gibi çeşitli ve önemli biyolojik aktiviteleri bulunmaktadır. Pek çok mikrobiyal β-glukozidaz glukoz tarafından inhibe edilirken (Yang ve ark., 2010) bitki kökenliler yüksek glukoz derişimlerine karşı toleranslı oldukları rapor edilmiştir (Odoux ve ark., 2003).

1.2. Protein Saflaştırmanın Amacı

Protein saflaştırmanın amacı saf protein elde etmek değil daha sonraki çalışmalar için kullanılabilecek bir protein preparatı hazırlamaktır. Bu çalışmalar; proteinin aktivitesinin araştırılması ve bu aktiviteden biyoteknolojik üretim, analitik veya tedavi edici amaçla yararlanılmasına yönelik olabileceği gibi, protein yapısının veya yapı fonksiyon ilişkisinin araştırılmasını da hedefleyebilir. Amaca uygun bir protein preparatı hazırlayabilmek için aşağıdaki hususların netleştirilmesi zorunludur.

- Gereksinim duyulan saf protein miktarı
- Ne düzeyde aktivite kaybının tolere edilebileceği
- Ne düzeyde saflık istendiği
- Saflaştırma işlemi için ne kadar zaman ve para harcanabileceği, v.b.

Biyoteknoloji devrimini yaşadığımız günümüzde kullanım amacına uygun gerekli protein miktarı birkaç mikrogram (klonlama çalışmaları) ile birkaç kilogram (endüstriyel ve farmasötik uygulamalar için) arasında değişir. Protein üretiminde zaman ve maliyet çok önemlidir. Gerekli protein miktarı ve saflık düzeyi kullanım amacına bağlıdır. Bilimsel araştırmalar için az miktarda protein yeterlidir fakat kesinlikle zararlı yabancı aktivite içermemelidir. Endüstriyel uygulamalar için büyük ölçekte üretim söz konusudur ve saflık ikinci derecede önem taşır. Tedavi edici uygulamalar için hazırlanan protein preperatının ise yüksek saflıkta olması gerekir (Hong ve ark., 2009).

Protein aktivitesinin belirlenmesi hedeflenmiş ise kesinlikle aktif formda elde edilmelidir. Bunun için çok az miktarda protein yeterlidir. Fakat amaç proteinin aktivitesinden yararlanmak ise daha fazla protein gerekecektir. Saflaştırmada kullanılacak her yeni adım zaman ve aktivite kaybına neden olacağı gibi verimi düşürüp maliyeti arttıracaktır (Ross ve ark., 1993).

Yapı araştırmalarında oldukça fazla miktarda ve yüksek saflıkta proteine gereksinim vardır. Bu durumda maliyet ve zaman ikinci derecede önemlidir. Fakat

yapı-fonksiyon ilişkisi araştırılıyorsa saflaştırma işlemi süresince aktivite kaybını minimize etmek için işlem süresinin olabildiğince kısaltılması gerekir.

Belirli bir miktar çıkış maddesinden elde edilecek saf protein miktarı saflaştırma adımlarının toplam verimine bağlıdır. Adım sayısı verim ile ters fakat saflık derecesi ile doğru orantılıdır. En az saflaştırma adımı ile amaca uygun saflıkta protein preparatı hazırlamak çok önemlidir.

Saflaştırma işlemleri süresince proteinin denatürasyondan korunması ve biyolojik aktivitesini yitirmesine özen gösterilmelidir. Bu şekilde hazırlanan protein preparatı her türlü çalışmada kullanılabilirken amaç yalnız polipeptid zincir dizisini (primer yapı) aydınlatmak ise daha sert koşullarda çalışmasında sakınca yoktur. Protein saflaştırılmasındaki adımlar denatürasyon ve proteolizi minimuma düşürecek şekilde seçilmelidir.

1.2.1. Protein Saflaştırma Stratejisi

Bir protein saflaştırılmasında uygun bir işlem dizisinin optimizasyonu çok önemlidir. En etkili, en hızlı, ve en ekonomik ayırma ve saflaştırma proseslerinin mevcut bilgiler yardımıyla belirlenmesi hedeflenir. Bu nedenle saflaştırılacak proteinin bulunduğu kaynaklar, özellikleri ve stabilitesinin iyice incelenmesi gerekir. Uygulanacak ayırma ve saflaştırıma teknikleri proteinin biyolojik aktivitesini olumsuz etkilememelidir.

Her saflaştırma basamağından sonra ilgilenilen proteinle ilgili analizler, onun saflık derecesi ve saflaştırma işleminin veriminin bilinmesi gerekir. Bunu belirlemenin en önemli yolu her aşamada proteinlerin aktivitelerini ölçmektir. Her analiz yöntemi mümkün olduğunca hızlı, basit ve özgün olmalıdır. Hızlı analizler saflaştırma basamakları arasındaki bekleme sürelerini ve dolayısıyla enzimin aktivite kaybetme olasılığını en aza indirecektir. Protein miktar tayinleri, her saflaştırıma basamağının verimi ve ilgilenilen proteinin spesifik aktivitesi ile ilgili bilgiler ve sonuçlar bir araya getirilerek gerekli bilgi bütünlüğü sağlanmış olur (Erarslan ve ark., 2000). Çizelge 1.1' de çeşitli protein saflaştırma teknikleri ve özellikleri verilmiştir.

Çizelge 1.1. Protein saflaştırma tekniklerinin özellikler (Erarslan ve ark., 2000).

Teknik	Dayandığı Özellik	Kapasite	Etkinlik	Verim	Maliyet
PH çöktürmesi	Yük	Yüksek	Çok düşük	Orta	Düşük
$(NH_4)_2SO_4$ çöktürmesi	Hidrofobisite	Yüksek	Çok düşük	Yüksek	Düşük
Ekstraksiyon	Değişik	Yüksek	Çok düşük	Yüksek	Düşük
Biyoafinite kromatoğrafisi	Biyoafinite	Yüksek	Yüksek	Değişebilir	Yüksek
İyon değişim kromatoğrafisi	Yük	Orta	Orta	Orta	Orta
Hidrofobik etkileşim kromatoğrafisi	Hidrofobisite	Orta	Orta	Orta	Orta
Kromatofokuslama (odaklama)	Yük/ pI	Düşük	Yüksek	Orta	Yüksek
Boya afinite kromatoğrafisi	Değişik	Orta	Yüksek	Orta	Orta
Ligand afinite kromatoğrafisi	Biyoaktivite	Orta-düşük	Çok yüksek	Düşük	Yüksek
Jel Geçirgenlik kromatoğrafisi	Molekül boyutu	Çok düşük	Düşük	Yüksek	Orta

Saflaştırmanın ilk adımlarında daha çok deriştirmeye yönelik (yüksek kapasiteli) teknikler kullanılmaktadır. Böylece ortamdaki suyun büyük kısmı uzaklaştırılmış olmaktadır. Çöktürme, ekstraksiyon ve kromatoğrafi teknikleri bu amaçla kullanılabilmektedir.

1.2.1.1. Çöktürme

Bir protein ya da protein grubunun diğerlerinden ayrılmasında çöktürme yöntemleri protein saflaştırma işlemlerinin çoğunda kullanılmaktadırlar. Çöktürme bir sonraki saflaştırma adımı ya da analiz öncesinde proteinlerin konsantre edilmesi amacıyla da kullanılmaktadır. Bir proteinin sulu bir çözücüdeki çözünürlüğü onun yüzeyindeki hidrofilik ve hidrofobik yüklü gruplarının dağılımı ile belirlenir. Yüzeydeki yüklü gruplar çözeltideki iyonik gruplarla etkileşirler.

Proteinlerin çöktürülmesi, pH değişimi, iyonik gücün düşürülmesi (salting in), iyonik gücün arttırılması (salting out) ve organik çözücülerle gerçekleştirilmektedir (Hidalgo ve ark., 1992).

1.2.1.2. Kromatoğrafi

Kromatoğrafi, bir numune içindeki bileşenlerin hareketli ve durgun fazlar arasında yapılan diferansiyel bir ayırma işlemidir. Uygulamaların çoğunda durgun faz bir kolon içine doldurulan küresel partiküllerden oluşmaktadır. Ayrılacak proteinlerin bir karışımı hareketli faza verilmekte ve bu fazın içinde kolon boyunca göç etmesi sağlanmaktadır. Katı fazla daha fazla etkileşimi olan proteinler hareketli faza daha fazla etkileşimi olan proteinlerden daha yavaş olacak şekilde göç etmekte ve bunun sonucunda ayırma olmaktadır.

Her saflaştırma yöntemi saflaştırılacak numunedeki bazı özelliklere gereksinim duymaktadır. Bu nedenle bir saflaştırma prosesinin tasarımında ardışık olarak kullanılacak tekniklerin uyumluluğu önemlidir. Örneğin amonyum sülfat ile yapılan bir tuz çöktürmesinden sonra proteini içeren çözeltinin tuz konsantrasyonu yüksek olduğundan tuz giderme işlemi yapılmadan iyon değiştirme kromatoğrafisinin kullanılması iyi sonuç vermez. Ancak hidrofobik etkileşim kromatoğrafisinin adsorpsiyonunu hızlandırmak için yüksek tuz konsantrasyonuna ihtiyaç duymaktadır. Bu nedenle amonyum sülfat çöktürmesinden sonra hidrofobik etkileşim kromatoğrafisinin kullanılması daha uygundur (Dikeman ve ark., 2004).

1.2.1.3. Hidrofobik Etkileşim Kromatoğrafisi

Hidrofobik etkileşim kromatoğrafisinde, yüzeyinde non-polar (metil veya oktil gibi) veya aril (fenil gibi) grubu bulunan destek materyali kullanılmaktadır. Proteinin hidrofobik bölgeleri ile destek materyalinde bulunan bu hidrofobik gruplar arasında hidrofobik etkileşimler olmaktadır. Her bir proteinin hidrofobisitesi farklıdır. Proteinler hidrofobik bağlanma gücüne göre gradient olarak azalan tuz derişimi içeren çözeltiler kullanılarak, kolondan elüe edilmektedirler. Kuvvetli olarak bağlanan proteinler daha az tuz derişimi içeren çözeltilerle elüe edilmektedirler (Donovan ve ark., 1998).

Avantajları; büyük örnek hacimleri ve yüksek protein miktarları ile çalışabilmesi, dayanıklı durgun faz olması, koşulların ayarlanabilmesi ve amonyum

sülfat çöktürmesi sonrası direkt kullanılabilmesidir. Dezavantajı ise bağlanma için yüksek tuz konsantrasyonunun çökmelere neden olabilmesidir.

Saflaştırmanın verimi protein tayini ile kaç kat saflaştırma gerçekleştirildiği ise birim protein kütlesi başına fonksiyonel aktivitesinin ölçülmesi ile bulunur. Protein saflık testi ve kaç yabancı protein içerdiği jel elektroforezi ile belirlenir. Safsızlıkların molekül kütleleri sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez SDS-PAGE ile tayin edilir ve safsızlıklar jel geçirgenlik kromatoğrafisi ile uzaklaştırılır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Patel ve ark., 1969, İlk kez sıçan (memeli) böbreğinde lizozomal glukoserebrozidaz ve sitozolik fraksiyonlarda sitozolik β-glukozidaz aktivitesini bulmuşlardır.

Schreier ve ark., 1987, *Carica* papaya meyve özündeki β-glukozidaz'ı ultra ince-tabaka izoelektrik odaklama (pI 5,2) yöntemleri ile saflaştırmışlardır. β-Glukozidaz'ın moleküler ağırlığı jel filtrasyonu ile 54 kDa ve SDS-PAGE ile 27 kDa bulunmuştur. Böylece iki alt üniteden oluştuğu belirtilmiştir. Optimum pH 5,0 ve optimum sıcaklığı da 50°C' dir. Bu enzimin aril-β-D-glukozidaz olduğu ve çok az derecede alkil-β-D-glukozidi hidrolizlediği gözlemlenmiştir. Glukotransferaz ve glukozidaz gibi " yan aktiviteleri" β-(β-galaktozidaz, β-ksilozidaz, α-arabinozidaz aktiviteleri) bulunmamaktadır. Enzim Ca^{2+}, Mn^{2+}, Mg^{2+} ve EDTA ile aktiftir. Ag^{+} ve Hg^{2+} ise güçlü inhibitörleridir. D-Glukano-1,5-lakton (K_i, 0.08 mM), 1-deoksi-D-glukoz (K_i, 6 mM), 1-deoksi-1-amino-β-D-glukoz ve glukal (K_i, her biri 8 mM) tersinir inhibitör etkisi sergilemiştir.

Chinchetru ve ark., 1989, çözünür β-glukozidaz enzimini koyun karaciğerinden konvansiyonel enzim fraksiyon işlemleri ile ayırmış ve saflaştırmışlardır. Saflaştırılmış β-glukozidaz'ın spesifik aktivitesi 5910 mU/mg protein bulunmuştur. Optimum pH değeri 4,5-5,5 arasında olduğu belirtilmiştir. Moleküler ağırlığı 95 kDa' dır. Çeşitli kimyasallar ile katalizör ve inhibitör özellikleri test edilmiştir. 1-5 laktonlar ve diklor metilen difosfonik asit disodyum tuzu güçlü inhibitörleri olduğu bulunmuştur. Ayrıca çalışmada β-glukozidaz ve β-galaktozidazın aktivasyon enerjileri hesaplanmıştır.

Lecas ve ark., 1991, Bu çalışmada β-glukozidaz olgun üzümden kısmi saflaştırmışlardır. Ultragel AcA 44 ve DEAE-Sepharose CL-6B kromatoğrafi yöntemleri uygulanmıştır. β-Glukozidaz aktivitesine ait iki farklı pik rapor edilmiştir. Her ikisi için; optimum pH 5,0 ve optimum sıcaklık 45°C' dir. Farklı substratlara göre K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır. 4-Nitrofenil-β-D-glukopiranozit substratı ile maksimum aktivite gözlemlenmiştir. Glukoz ve glukanolaktonun β-glukozidazın yarışmalı inhibitörleri (K_i, 170 mM ve 0,125 mM) olduğu bildirilmiştir.

Compos ve ark., 1993, Bu çalışmada mısır β-glukozidazının tohum çimlenmesi boyunca inaktif fitohormon-glikozid bileşiklerinden oksin ve diğer fitohormonların serbest hale geçmesini sağlayarak, bitki büyümesinde ve tohum çimlenmesinde önemli rol oynadığını bildirmişlerdir.

Özsoy N., 1995, Bu çalışmada Türkiye sahillerinde bulunan midye türü olan *Mytilus galloprovincialis'in* manto dokusunu β-glukozidaz kaynağı olarak araştırmışlardır. β-Glukozidaz aktivitesi gösteren fraksiyon, midye manto homojenizatının santrifüje edilmesiyle elde edilen ham ekstreden %40-60 amonyum sülfat konsantrasyonunda çöktürülmesi suretiyle ayrılmış, diyaliz edilmiş ve hidroksiapatit kolona uygulanmıştır. Bu fraksiyonun pH'sı 6.8 olan artan molaritede fosfat tamponu ile yapılan kolon kromatoğrafisi sonucunda enzimin 50 mM fosfat tamponu ile elüe edilebileceği bildirilmiştir. Bu işlemler sonrasında midye manto dokusu β-glukozidazı 13 kez saflaştırılarak elde edilmiştir. β-Glukozidazın en yüksek aktivitesini pH 4,8-5,0 değerleri arasında gösterdiği, optimum sıcaklığının ise 49°C olduğu, 4-nitrofenil-β-D-glukopiranozide karşı gösterdiği en yüksek reaksiyon hızının ve K_m değerinin sırasıyla $1.046x10^{-2}$ U ve 3,49 mM olduğu rapor edilmiştir.

Akiyama ve ark., 1997, Bu çalışmada çimlenmekte olan pirinçten β-glukozidaz amonyum sülfat ($(NH_4)_2SO_4$) çöktürmesi ve kromatoğrafi yöntemleri kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırma işleminde CM-Sepharose, Pollybuffer değiştirici 118, Concanavalin-A-Sepharose ve Bio-Gel P-100 kolonları kullanılmıştır. Enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile 56 kDa olarak bulunmuştur. Enzimin optimum pH 4,5 ve sıcaklığı 50°C' dir. Saflaştırılan β-glukozidazın β-(1-3) ve β-(1-4) bağlı oligosakkaritlere karşı transglukolizasyon aktivitesi gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Masayuki ve ark., 2000, *Secale cereale L.* (çavdar) fidesinden β-glukozidaz'ın izoelektrik çöktürme, anyon değişimi kromatoğrafisi ve jel filtrasyonu yöntemleri kullanarak saflaştırmışlardır. İzoelektrik nokta ve optimum reaksiyon sıcaklığı sırasıyla 4,9-5,1 ve 25-30°C' dir. SDS ve Native-PAGE analizleri çavdar fidesinde β-glukozidazın birçok izoenzimi olduğu gösterilmiştir. Her bir izoenzimin monomer molekül ağırlığı 60 kDa ve oligomer molekül ağırlığı ~300 kDa' dır.

Gerardi ve ark., 2000, *Prunus avium L*. (olgun kiraz) meyvesinden amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değiştirici ve moleküler eleme kromatoğrafi yöntemleriyle β-glukozidaz'ı saflaştırmışlardır. Enzimin monomer molekül ağırlığı ~68 kDa bulunmuştur. Enzimin asidik izoelektrik noktasına sahip olduğu belirtilmiştir. Biyokimyasal ve immunolokalizasyon çalışmaları sonucu kiraz β-glukozidazın esas olarak sitoplazmada ve apoplastta lokalize olduğunu gösterilmiştir. Meyvenin olgunlaşmasının hücre duvarı ile ilişkili olduğu da belirtilmiştir.

Pontoh J. ve Low N.H., 2002, β- Glukozidaz *Apis mellifera* ve bal kesesinden anyon ve katyon değiştirici reçineler bir arada kullanılarak, hidrofobik etkileşim ve jel filtrasyon kromatoğrafi yöntemleri ile saflaştırmışlardır. Buna ek olarak β-glukozidaz hipofarengeal salgı bezlerinden anyon değiştirici ve jel geçirgenlik kromatoğrafisi ile de kısmi olarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan β-glukozidaz glikoprotein boyama ile olumlu sonuç vermiştir. SDS-PAGE ile yalnızca tek bir alt üniteye sahip olduğu belirlenmiştir (72 kDa). IEF-PAGE ile pI değerleri 4,5-4,8 olarak belirtilmiştir. Enzimin optimum pH değeri 5,0 ve optimum sıcaklığı 50°C olarak bulunmuştur.

Turner ve ark., 2002, β-glukozidaz'ın selüloz bozulması dahil, biyolojik toprak kalitesi izlenmesi için önemli bir potansiyele sahip olduğu rapor edilerek; İngiltere ve Galler çevresindeki topraklarda fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri birbirine zıt 29 kalıcı β-glukozidaz aktivitesi test edilmiştir (kil içeriği %22-68; toplam karbon 29-80 mg g^{-1}; mikrobiyal karbon 412-3412 µg g^{-1}). Substrat konsantrasyonun (1,12 ve 6,12 µmol *para*-nitrofenil g^{-1} soil h^{-1}) topraktaki toplam karbon ve mikrobiyal karbon konsantrasyonu ile pozitif bir korelasyon çizdiği, biyolojik toprak kalitesini izlemede β-glukozidaz aktivitesini incelemenin bir yöntem olarak kullanılabileceği bu araştırmada belirtilmiştir.

Odoux ve ark., 2003, Bu çalışmada *Vanilla planifolia* (vanilya) tohumundan anyon değiştirici, hidrofobik etkileşim ve moleküler eleme kromatoğrafi yöntemleriyle β-glukozidaz'ı saflaştırmışlardır. Vanilya tohumlarından saflaştırılan β-glukozidazın aynı dört alt birimden (50 kDa) oluşan tetramer (201 kDa) yapıda olduğu bulunmuştur. Optimum pH değeri 6,5 ve optimum sıcaklığı 40°C olarak rapor edilmiştir. *p*-Nitrofenil- β-D-glukopiranozit ve glukovanilinin için K_m

değerleri sırasıyla 1,1 ve 20,0 mM; V_{max} değerleri de 4,5 ve 5,0 µkat.mg^{-1} bulunmuştur. Glukano-δ-lakton ve 1-deoksinojirimisin yarışmalı inhibitörleridir. K_i değerleri sırasıyla 60 ve 152 µM' dır. β-D-glukozidaz ve N-etilmalemid ile tamamen inhibe olmazken; 1,5-2 M 2-merkaptaetanol ve 1,4-ditiyoteritol ile tamamen inhibe edildiği rapor edilmiştir. *p*-Nitrofenil-β-D-fukopiranozit, *p*-nitrofenil-β-D-galaktopiranozit ve *p*-nitrofenil-β-D-ksilopiranozit ile enzim azalan aktivite gösterdiği bildirilmiştir.

Yılmaz T., 2005, Bu çalışmada *Aloe vera* L. Burm. (sarısabır) yapraklarının pulpa kısmından β-glukozidaz'ı kısmen saflaştırmış ve bazı kinetik özellikleri incelenmiştir. Yaprak pulpasının PBS (fosfatla tamponlanmış %0.9 NaCI, pH 7.4) ile homojenizasyonunun ardından santrifüj edilmesiyle ham ekstre hazırlanmıştır. β-Glukozidaz aktivitesi gösteren homojenatın %30-65 amonyum sülfat kesiti, diyaliz edildikten sonra, hidroksilapatit kolona uygulanmıştır. Elüsyon, kolondan artan molaritede Na-K fosfat tamponu (pH 7) geçirilerek gerçekleştirilmiş ve 200 mM tampon ile elüe edilmiştir. Kısmen saflaştırılan enzim poliakrilamid jel elektroforezinde iki protein ve bir aktivite bandı gösterdiği rapor edilmiştir. β-Glukozidaz aktivitesi üzerine sıcaklığın ve pH'nın etkileri incelendiğinde, enzimin en yüksek aktiviteyi 50°C'de ve pH 4,4'de gösterdiği bulunmuştur. Enzimin, 4-nitrofenil-β-D-glukopiranozide karşı K_m değeri 6,8x 10^{-4} M ve aynı substrata karşı V_{max} değeri ise 4,58 x 10^3 U olarak belirlenmiştir.

Demirkan G., 2009, Bu çalışmada, *Climacocystis borealis* mantarından elde edilen ham özütteki β-glukozidaz enzimi iyon değişim kromatoğrafi yöntemi kullanılarak saflaştırılmış ve ardından saf enzimin biyokimyasal karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ham özütün 4-metilum-belliferil-β-D-glukopiranozid (MUG) ile boyanan doğal elektroforezinde iki bant gözlenmiştir. Yapılan iyon değişim kromatoğrafisi sonucu yine aynı yöntemle boyanan Native-PAGE' de tek bant gözlenmiştir. *C. borealis'in* ham özütünden kromatoğrafi sonrasında saflaştırılarak elde edilen ß-glukozidaz enzimi için optimum pH 3,0 olarak bulunmuş olup, bu pH'da, 10°C'de ve 24 saat sonunda enzimin aktivitesini %85 oranında korunduğu gözlenmiştir. β-Glukozidaz enzimi için optimum sıcaklığın 60°C olduğu belirlenmiştir. β-Glukozidaz enzimi için *p*-nitrofenil-β-D-glukopiranozit (pNPG)

substratı varlığında V_{max} 72,46 U/mg ve K_m 8,96 mM olarak bulunmuştur. Bazı metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde, β-glukozidaz enziminin aktivitesinin Mn^{+2} iyonu mevcudiyetinde zayıf bir inhibisyona uğradığı, diğer metal iyonları durumunda ise aktivitenin önemli ölçüde değişmediği gözlenmiştir. Bazı kimyasalların enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde, β-glukozidaz enzim aktivitesinin farklı kimyasallar mevcudiyetinde farklı oranlarda değiştiği gözlemlenmiştir.

Kara H., 2010, zeytin meyvesinden β-glukozidaz enzimini saflaştırmışlardır. Saflaştırma işleminde önce amonyum sülfat çöktürmesi ardından hidrofobik etkileşim kromatoğrafisi metotları kullanılmıştır. Zeytin β-glukozidaz enzimi %54,9 verimle 154,8 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan zeytin β-glukozidaz enziminin SDS poliakrilamid jel elektroforezinde yaklaşık 65 kDa molekül ağırlığında tek bant şeklinde görüntülenmiştir. Söz konusu enzimin pNPG için K_m değeri 2,22 mM, ve V_{max} değeri 370,37 U' dir.β-Glukozidaz enzimlerinin genel inhibitörlerinden glukoz ve δ-glukonolaktonun, saflaştırılmış zeytin β-glukozidaz enzimi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Her iki bileşiğin enzim aktivitesi üzerinde kompetitif inhibisyon etkisi gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca zeytin tarımında yaygın kullanılan diazinon, deltamethrin saflaştırılmış zeytin β-glukozidaz enzimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Doğada sık karşılaşılan ağır metallerden Ag^{+}, Ni^{2+}, Cd^{2+}, Cu^{2+} ve Pb^{2+}'nun saflaştırılmış zeytin β-glukozidaz enzim aktivitesi üzerine *in vitro* etkileri araştırılmıştır. Bu ağır metallerden demirin enzim aktivitesi üzerinde aktivasyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. Ancak Cu^{2+}, Ag^{+}, Ni^{2+}, Cd^{2+} ve Pb^{2+} ağır metallerinin ise enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada inhibisyon etkisi gösteren ağır metallerin inhibisyon etki mekanizmaları da belirlenmiştir.

Turan A., 2011, Bu çalışmada *Armillaria mellea* makromantarından, β-glukozidaz enzimi, iyon değişim kromatoğrafisi ile kısmi olarak saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Farklı pH değerlerine sahip tamponlar kullanılarak hazırlanan ham özütlerde β-glukozidaz aktivitesini araştırılmış ve ekstraksiyon için uygun tampon belirlenmiştir. Hazırlanan ham özütte ve iyon değişim kromatoğrafisi sonrası elde edilen eluatlardan, β-glukozidaz varlığı, doğal poliakrimalid jel elektroforezi ve

substrat boyaması ile ortaya konulmuştur. Ham özütte üç bandın varlığı gözlenirken, iyon değişim kromatoğrafisi sonrası elde edilen çözeltide iki bandın varlığı gözlemlenmiştir. Kısmi olarak saflaştırılan enzim biyokimyasal olarak karakterize edilmiştir. Enzimin optimum pH'sı 4,0, optimum sıcaklığı ise 50°C olarak bildirilmiştir. 4°C'de 24 saat inkübasyondan sonra *A. mellea* β-glukozidaz'ının pH 3,0-6,0 aralığında ve pH 8,0'de oldukça kararlı olduğu rapor edilmiştir. Enzimin ısıl kararlılık profili incelendiğinde, 1 saat inkübasyondan sonra, 20-50°C aralığında oldukça kararlı olduğu gözlenmiştir. β-Glukozidaz enzimi için V_{max} ve K_m değerleri, p-nitrofenil-β-D-glukopiranozid (pNPG) substratı için sırasıyla 3,646 U/mg ve 0,295 mM olarak bulunmuştur. Ayrıca bazı metal iyonları ve kimyasal maddelerin enzim aktivitesini farklı şekillerde etkilediği tespit edilmiştir.

Chen ve ark., 2012, *Prunus domestica* (erik) tohumlarından glukoz-toleranslı β-glukozidaz amonyum sülfat çöktürme, hidrofobik etkileşim kromatoğrafisi ve iyon-değişim kromatoğrafisi ile saflaştırılmıştır. Enzimin moleküler kütlesi; SDS-PAGE ile 61 kDa ve jel filtrasyonu kromatoğrafisi ile 54 kDa olarak belirlenmiştir. İzoelektrik noktası pI 5,0 ve optimum pH 5,5 ve sıcaklığı 55°C' dir. Ag^{+} ve Hg^{2+} (5 mM) enzimin inhibitörleri olduğu belirtilmiştir. Saflaştırılan β-glukozidazın farklı substratlara karşı aktivitesi test edilmiştir. *p*-Nitrofenil-β-D-glukopiranozit ile K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 3,09 mM ve 122,1 µmol/dk mg bulunmuştur. *p*-Nitrofenil-β-D-fukopiranozit ile K_m 1,65 mM ve V_{max} 217,6 µmol/dk mg bulunmuştur. Sellobiyozun ise substratı olmadığı rapor edilmiştir. Glukano-δ-lakton ve glukoz enzimin yarışmalı inhibitörleri olduğu belirtilmiştir. K_i değerleri sırasıyla 0,033 ve 468 mM' dır.

Bu yüksek lisans tez çalışması kapsamında;

1) Şimdiye kadar β-glukozidaz kaynağı olarak kullanılmamış, kayısı (*Prunus armeniaca*) çekirdeklerinden β-glukozidaz'ın saflaştırılması,
2) Saflaştırılan β-glukozidaz'ın, kinetik özellikleri (K_m, V_{max}), termal ve depolama kararlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. *Prunus armeniaca* Çekirdeklerinin Toplanması

Malatya ili ve çevresinde bol miktarda yetiştirilen kayısı (*Prunus armeniaca*) meyveleri Ağustos ayında toplanmıştır. Çekirdekler meyve kısımlarından çıkarılmış ve kullanılıncaya kadar +4°C' de muhafaza edilmiştir.

3.1.2. Kimyasallar

Araştırmada kullanılan tüm reaktifler analitik saflıkta olup Merck veya Sigma-Aldrich firmalarından sağlanmıştır.

Amonyum sülfat ($(NH_4)_2SO_4$), sodyum hidroksit (NaOH), sodyum karbonat (Na_2CO_3) Coomassie Brillant Blue G 250, elektroforez için standart proteinler (Fermantes, SM 1811), etil alkol, sığır serum albümin, fosforik asit (%85, v/v), hidroklorik asit (%37, v/v), glasiyel asetik asit, metanol, 2-merkaptoetanol, 4-nitrofenil-β-D-glukopiranozid, sitrik asit monohidrat, aseton, Tris asit, Tris baz, TEMED (N,N,N′,N′-Tetramethylethylenediamine), akrilamid, N' N' -bis-metilen-akrilamid, amonyum persülfat, SDS, gliserol, bromofenol mavisi, bütanol.

3.1.3. Araç ve Gereçler

UV-Vis spektrofotometre (Shimadzu UV-1800), HPLC (Shimadzu, Classs Vp serisi), Biosuite 250 HR moleküler eleme kolonu (7,8x300 mm), HiPrep 16/10 Butil FF kolonu (1x20 cm) hidrofobik etkileşim kolonu, Econo pump gradient pompa ve fraksiyon kollektörü (Biorad), pH metre (HANNA 8417), magnetik karıştırıcı (Are), inkübatör (ES 500), elektroforez (Biorad), santrifüj, analitik terazi, otomatik pipet (Eppendorf), su trompu, girdap karıştırıcı, termostatlı çalkalayıcılı su banyosu, magnetik karıştırıcı.

3.2. Metot

3.2.1. β-Glukozidaz'ın Kayısı Çekirdeklerinden Saflaştırılması

3.2.1.1. Çekirdeklerin Homojenizasyonu

Sert kabuklarından çıkartılan çekirdek içlerinin her 1 gramına 8 mL -20°C' ye kadar soğutulmuş aseton eklenerek örnekler homojenize edilmiş ve homojenat su trompu yardımıyla vakum altında süzülmüştür. Böylece aseton ile birlikte fenolik bileşikler ve bazı lipitler de süzüntü ile birlikte uzaklaştırılmıştır. Filtre kağıdının üstünde kalan kısım tekrar blender haznesine alınarak işlem yukarıda anlatıldığı şekilde 3 kez tekrarlanmıştır. Son süzme işlemi sonucunda süzgeç kağıdında kalan katı ekstrakt asetonun uçurulması amacıyla 24 saat 5°C bekletildikten sonra kullanılmak üzere -20°C' de derin dondurucuda saklanmıştır.

3.2.1.2. Amonyum Sülfat ile Çöktürme

Aseton ekstraksiyonu işlemi sonucunda elde edilen katı ekstraktın her 1 gramı 5 mL sitrik asit-Na_2HPO_4 (50 mM, pH:5,5) içerisinde çözüldükten sonra elde edilen çözelti, 10000 rpm' de 20 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatanta %20-60' lık amonyum sülfat çöktürmesi uygulanmıştır. Amonyum sülfat çöktürmeleri sonucunda elde edilen her bir çökelti ve süpernatantın β-glukozidaz aktiviteleri ve protein miktarları Bradford (1976) yöntemiyle ölçülmüştür.

3.2.1.3. Hidrofobik Etkileşim Kromatoğrafisi

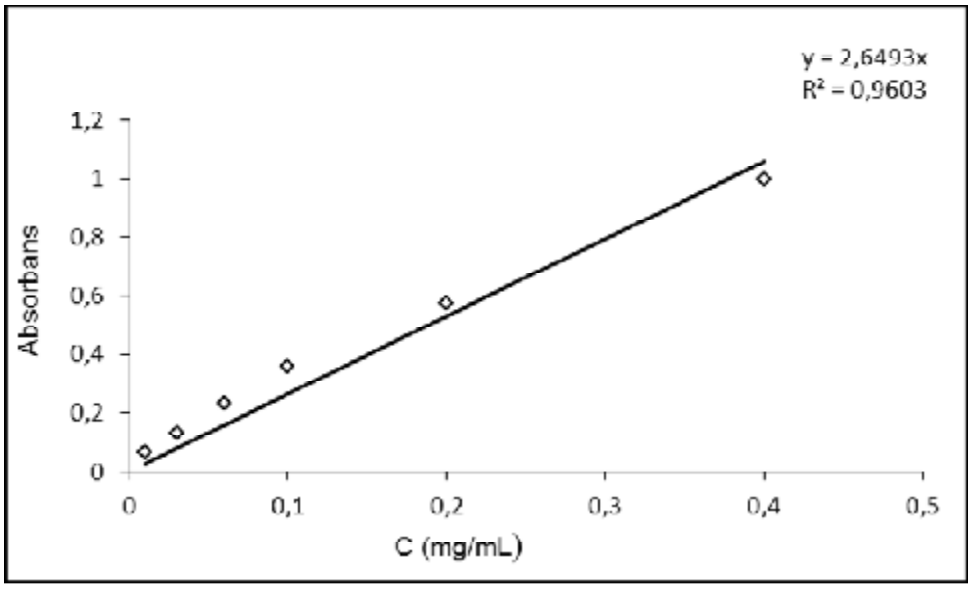
β-Glukozidaz'ın hidrofobik etkileşim kromatoğrafisi (HEK) ile ayrıştırılmasında dolgu maddesi olarak butil sefaroz içeren HiPrep 16/10 Butil FF kolonu (1x20 cm) kullanılmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen çökelti, 50 mM sitrik asit-Na_2HPO_4 (pH:5,5) içerisinde çözülerek hidrofobik etkileşim kromatoğrafisine uygulanmıştır. β-Glukozidaz'ın kolondan alınması için

%60-0 (w/v) aralığında farklı derişimlerde amonyum sülfat içeren 50 mM fosfat tamponu (pH 7,0) kolondan geçirilmiş ve toplanan eluatların 280 nm' deki absorbans değerlerine bakılmıştır. Protein içeren örneklerde β-glukozidaz aktivitelerine bakılarak, β-glukozidaz içeren eluatlar bir araya getirilmiştir.

3.2.1.4. Protein Tayini

Saflaştırılma işlemleri sırasında β-glukozidaz örneklerinin protein miktarları Bradford yöntemi (1976) ile belirlenmiştir. Bu yöntem Coomassie Brillant Blue G-250' nin fosforik asitli ortamda proteinlere bağlanması esasına dayanmaktadır. Oluşan kompleks 595 nm' de maksimum absorbans göstermektedir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı (2 dk) gelişmektedir. Bu yöntemin hassasiyeti 1– 100 mikrogram arasında değişmektedir.

Tayin işlemleri şöyle yapılmıştır; 1 mL' sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltisi tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL alınır. Saf su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 mL' ye tamamlanır. 5 mL Coomassie Blue reaktifi tüplere ilave edilir ve vorteks ile karıştırılır. 10 dk sonra 595 nm' de 3 mL' lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okunur. 0,1 mL saf su ve 5 mL Coomassie Blue reaktifinden oluşan karışım kör olarak kullanılır. Absorbans değerlerine karşılık gelen mikrogram protein değerleri ile standart grafik çizilir.



Şekil 3.1. Standart protein eğrisi

3.2.1.5. β-Glukozidaz Enzimin Aktivitesinin Belirlenmesi

β-Glukozidazın aktivitesinin belirlenmesinde Chen ve ark. (2012) tarafından önerilen ve ön çalışmalarda tarafımızca modifiye edilen yöntem kullanılmıştır. Bu yönteme göre; sitrat-fosfat (pH 5,5) tamponundan hazırlanmış ve aktivitesi ölçülecek enzimin substrat çözeltisinden (4-nitrofenil-β-D-glukopiranozid) 2,95 mL ve enzim çözeltisinden 50 µL ilave edilmiştir. Karışım 10 dakika süreyle 37°C' deki su banyosunda bırakılmış ve bu sürenin sonunda tüplere, reaksiyonu durdurmak için 3 mL 0,2 M Na_2CO_3 ilave edilmiştir. Oluşan çözelti alınıp UV spektrofotometresin de 410 nm dalga boyunda absorbansı ölçülmüştür. Enzim aktivitesi 37°C' de dakikada açığa çıkan µmol 4-nitrofenol (µmol 4-nitrofenol/dk) olarak; spesifik aktivite ise 37°C' de dakikada 1 mg enzim proteinin açığa çıkardığı µmol 4-nitrofenol (µmol 4-nitrofenol/dk/mg protein) olarak tanımlanmaktadır.

3.2.1.6. Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi

β-Glukozidaz'ın moleküler ağırlığı HPLC ile Biosuite 250 HR moleküler eleme kolonu (5µm, 7,8x300 mm) kullanılarak Diyot Array Dedektör (DAD) ile 220 nm' de belirlenmiştir. Hareketli faz olarak akış hızı 1 mL/dk olan 300 mM NaCl

içeren fosfat tamponu (100 mM, pH 7,0) kullanılmış ve analiz boyunca kolon sıcaklığı 30℃' de sabit tutulmuştur. Standart protein grafiğinin çizilmesinde moleküler ağırlıkları 26,6 kDa olan triozfosfat izomeraz, 36,5 kDa olan laktat dehidrojenaz, 48,5 kDa olan fumaraz, 58,5 kDa olan piruvat kinaz, 90 kDa olan laktoferrin, 116 kDa olan β-galaktozidaz ve 180 kDa olan α_2-makroglobulin standart proteinleri kullanılmıştır.

3.2.1.7. SDS-PAGE Elektroforezi

Stok Çözeltiler Ve Tamponlar

1) Akrilamid/Bis akrilamid : 29,2 g akrilamid 0,8 g N' N' -bis-metilen-akrilamid deiyonize suda çözülüp 100 mL' ye tamamlanır. Süzülüp, 4°C' de karanlıkta saklanır.

2) %10 (w/v) SDS : 10 g SDS, 90 mL deiyonize suda çözülüp, hafifçe çalkalanıp, 100 mL' ye tamamlanır.

3) 1,5M Tris-HCl, pH=8,8 : 15,125 g tris baz 3,94 g tris asit çözülüp pH' sına bakılır. pH=8,8' e asit yada baz ile ayarlanır, 100 mL' ye saf su ile tamamlanır, 4°C' de saklanır.

4) 0,5M Tris-HCl, pH=6,8 : 0,291 g tris baz 7,502 g tris asit çözülüp pH' sına bakılır. pH=6,8' e asit yada baz ile ayarlanır, 100 mL' ye saf su ile tamamlanır, 4°C' de saklanır.

5) Örnek Tamponu

3,55 mL deiyonize su

1,25 mL 0,5 M Tris-HCl, pH=6,8

2,5 mL gliserol

2,0 mL % 10 (w/v) SDS

+ 0,2 mL % 0,5(w/v) bromofenol mavisi

9,5 mL Toplam hacim

Kullanılışı: 25 µL β-merkaptoetanol kullanılacağı zaman 475 µL örnek tamponuna eklenir. Örnek bu karışım ile en az 1:2 oranında seyreltilip 95 ˚C' de 4 dakika ısıtılır.

6) Yürütücü Tampon, pH=8,3

3,03 g Tris baz

14,4 g Glisin

1 g SDS çözülüp 1000 mL' ye deiyonize su ile tamamlanır. pH'ı asit veya baz ile ayarlanmaz. 4˚C' de saklanır. Çökelme gözlenirse, kullanılmadan önce oda sıcaklığına kadar ısıtılır.

7) %10 APS (taze günlük) : 0,1 g amonyum persülfat 1 mL deiyonize suda çözülür.

Jelin Hazırlanması (10 mL):

TEMED ve % 10 APS hariç tüm ayıraçlar karıştırılarak monomer çözeltisi hazırlanır (çizelge 3.1). 15 dakika degaze edilir.

Çizelge 3.1. % jel konsantrasyonlarına karşı eklenmesi gereken maddeler.
*Ayırma Jeli (Alt jel) (%15) Tamponu = 1,5 M Tris-HCl, pH=8,8
*Konsantrasyon Jeli (Üst Jel) Tamponu = 0,5 M Tris-HCl, pH=6,8

% jel	Deiyonize su (mL)	%30 akrilamid/bis (mL)	Jel Tamponu* (mL)	%10(w/v) SDS (mL)
%4	6,1	1,3	2,5	0,1
%5	5,7	1,7	2,5	0,1
%6	5,4	2,0	2,5	0,1
%7	5,1	2,3	2,5	0,1
%8	4,7	2,7	2,5	0,1
%9	4,4	3,0	2,5	0,1
%10	4,1	3,3	2,5	0,1
%11	3,7	3,7	2,5	0,1
%12	3,4	4,0	2,5	0,1
%13	3,1	4,3	2,5	0,1
%14	2,7	4,7	2,5	0,1
%15	2,4	5,0	2,5	0,1

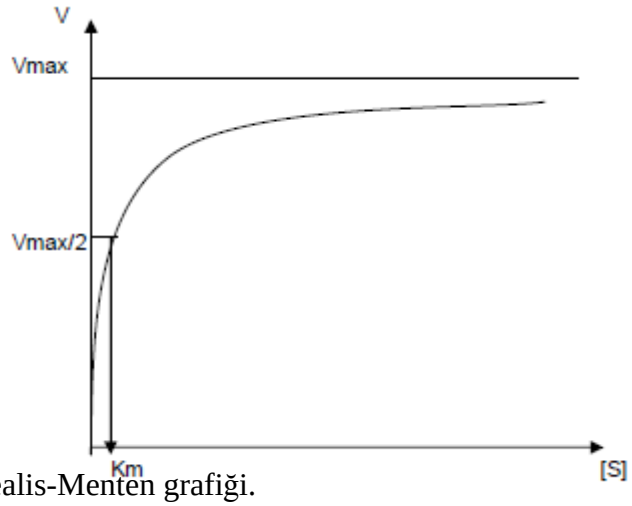
Jel dökmeden önce 10 ml monomer çözeltisi için:
Ayırma Jeli (Alt Jel) (%15) için:
50 µL % 10 APS
5 µL TEMED
Konsantrasyon Jeli (Üst jel) (%5) için:
50 µL % 10 APS
10 µL TEMED eklenip polimerleşmenin başlaması için hafifçe çalkalanır.

İlk önce alt jel hazırlanarak elektroforez plakaları arasına boşaltılır 45 dakika polimerizasyona bırakılır. Polimerizasyonun hızlanması için jelin üst kısmına su eklenerek hava ile teması önlenir. Jelleşme gerçekleştikten sonra jelin üstündeki su alınır. Üst jel için ayıraçlar hazırlanıp, alt jel üstüne dökülür. Elektroforez tarağı üst jel polimerleşmeden yerleştirilir. Elektroforez tarağı ile monomer çözeltisi arasında hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilir. 45 dakika polimerizasyona bırakılır. Polimerleşmeden sonra tarak jelden dikkatlice çıkarılır. Kuyucuklar oluşur. Örneklerden 10 µL (20 µg protein) eppendorf tüplerine alınıp üzerine 20 µL β-merkaptoetanol, örnek tamponu eklenip, 95°C' de 4 dakikaısıtılır. Elektroforez plakaları çıkarılıp, jel kasetinin içerisine yerleştirilip, tankın içine konur. Eppendrof tüplerindeki örnekler, kuyucuklara konulur. Jel kasetinin içine ve dışına yürütücü tampon eklenir. Elektroforez cihazı, 200 V' a ayarlanıp elektroforeze başlanır. Bromofenol mavisi jelin sonuna geldiğinde akım kesilir. SDS-PAGE için elektroforez yaklaşık 35 dakika sürer. Jel kasetinin içinden elektroforez plakaları çıkarılır. Cam plakalardan küçüğü çıkarılır. Jel, büyük cam plaka ile birlikte boyama çözeltisine konur. Boyama çözeltisi (Coomassie Blue): % 0,05 (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250' nin % 45 metanol (v/v), % 45 destile su (v/v), % 10 asetik asit (v/v) karışımından hazırlanır. Boyama için gerekli süre, jelin kalınlığı ve poliakrilamid konsantrasyonuna bağlıdır. % 10T değerinde bir jelin (0,5-1 mm kalınlıkta) yaklaşık 2 saat boyanması gerekirken, daha kalın ve/veya daha konsantre jeller için boyama süresi artırılmalıdır. Arıtma çözeltisi % 45 metanol (v/v), % 45 destile su (v/v), % 10 asetik asit (v/v) karışımından hazırlanır. Boyanın geri alınma işlemi 24 saat sürebilir. Arıtma çözeltisinin birkaç kez değiştirilmesi ile bu işlem

hızlandırılabilir. Arıtma çözeltisinden çıkarılan jel, % 10 gliserol çözeltisinde bekletilir.

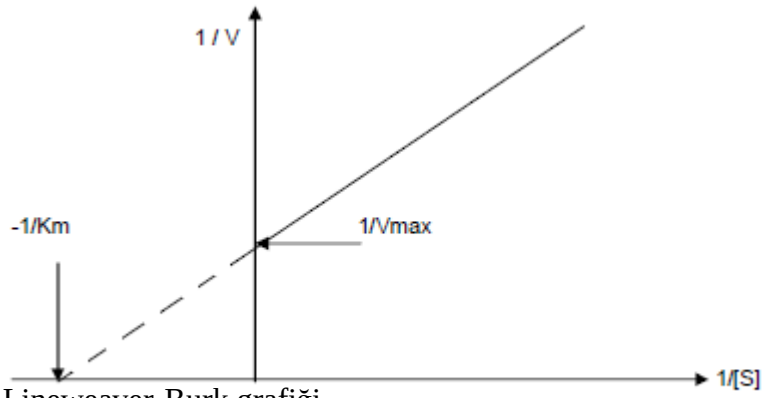
3.2.1.8. Michealis-Menten Katsayısı (K_m) Ve Maksimum Hızın (V_{max}) Grafiksel Yöntemle Belirlenmesi

Sabit konsantrasyondaki pek çok enzimin reaksiyon hızı substrat konsantrasyonuna bağlı olarak artmaktadır (Lineweaver ve ark., 1934). Eğer enzimin reaksiyon hızı (V), substrat konsantrasyonuna [S] karşı grafiğe geçirilirse şekil 3.2.' de olduğu gibi hiperbolik bir eğri ortaya çıkar. 1913 yılında Leonard Michealis ve Malid Menten bu hiperbolik eğrinin matematiksel olarak nasıl ifade edileceğini bir formüle bağlamışlardır (Rawn, 1989).



Şekil 3.2. Michealis-Menten grafiği.

Michealis-Menten eşitliği hiperbolik eğrinin denklemidir. V_{max}'ın değerini grafikten tam olarak tespit etmek zordur. Eğer Michealis-Menten eşitliği her iki tarafı 1' e bölünürse Lineweaver-Burk eşitliği olarak adlandırılan bir doğru denklemi elde edilir. 1/[S]' ye karşı 1/V grafiğe geçirilirse şekil 3.3.' de görüldüğü gibi K_m ve V_{max} değerleri kolaylıkla belirlenebilir.



Şekil 3.3. Lineweaver-Burk grafiği.

3.2.1.9. Aktiviteye pH'ın Etkisinin İncelenmesi

β-Glukozidazın aktivitesine pH'ın etkisini araştırmak için pH 4,0, 4,5, 5,0 ve 5,5 (50 mM asetat tamponu), pH 6,0 (50 mM sitrat tamponu), pH 6,5 ve 7,0 (50 mM fosfat tamponu) tampon çözeltileri içerisinde β-glukozidazın aktivitesine bakılarak optimum aktivite gösterdiği pH değeri belirlenecektir.

3.2.1.10. Aktiviteye Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi

β-Glukozidazın aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla enzim aktivitesi 10–60°C arasında değişen sıcaklıklarda her seferinde sıcaklık 10°C arttırılarak ölçülecektir.

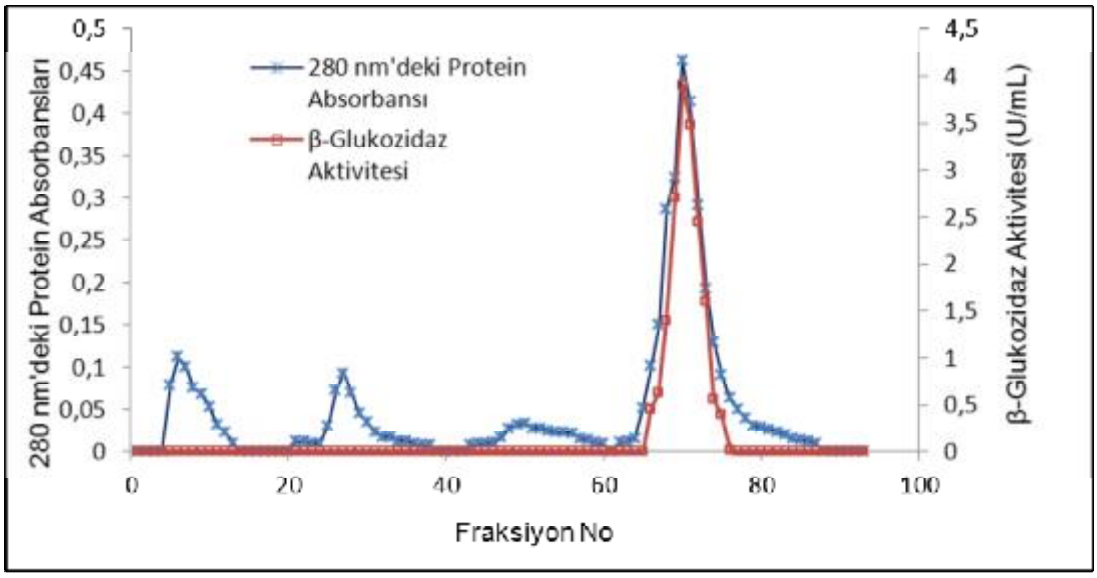
4.BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Çekirdeklerin Homojenizasyonu ve Amonyum Sülfat ile Çöktürme Bulguları

Çekirdeklerin -20°C' ye soğutulmuş aseton ile homojenizasyonu, asetonun uçurulması ve tampon ile çözülmesiyle elde edilen ham ekstrakta β-glukozidaz aktivitesi ve protein miktarı belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Aseton ekstraksiyonu sonrası elde edilen katı ekstraktın her 1 gramı 5 mL sitrik asit-Na_2HPO_4 (50 mM, pH:5,5) tamponunda çözülmüştür. $(NH_4)_2SO_4$ çöktürmesi yapıldığında ise en yüksek β-glukozidaz aktivitesinin %50' lik amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen çökeltide olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

4.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatoğrafisi Bulguları

%50' lik amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda elde edilen çökeltinin 50 mM sitrik asit-Na_2HPO_4 tamponu (pH 5,5) içerisindeki çözeltisi hidrofobik etkileşim kromatoğrafisine uygulanmış ve %60-0 amonyum sülfat içeren fosfat tamponu ile elüe edilen fraksiyonların 280 nm' deki protein absorbanslarına bakılmıştır. Absorbans veren eluatlarda β-glukozidaz aktivitesi ölçülerek, β-glukozidaz'ın tampon çözelti ile elüe edildiği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.1.' de grafik üzerinde gösterilmiştir. Şekil 4.1.' de görüldüğü gibi dört önemli protein bandının olduğu ancak 60-80 nolu fraksiyonlar arasında β-glukozidaz aktivitesinin gözlemlendiği bulunmuştur.



Şekil 4.1. Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonuçları.

Kayısı çekirdeği β-glukozidaz'ının saflaştırılması ile ilgili sonuç Çizelge 4.1.' de özetlenmiştir.

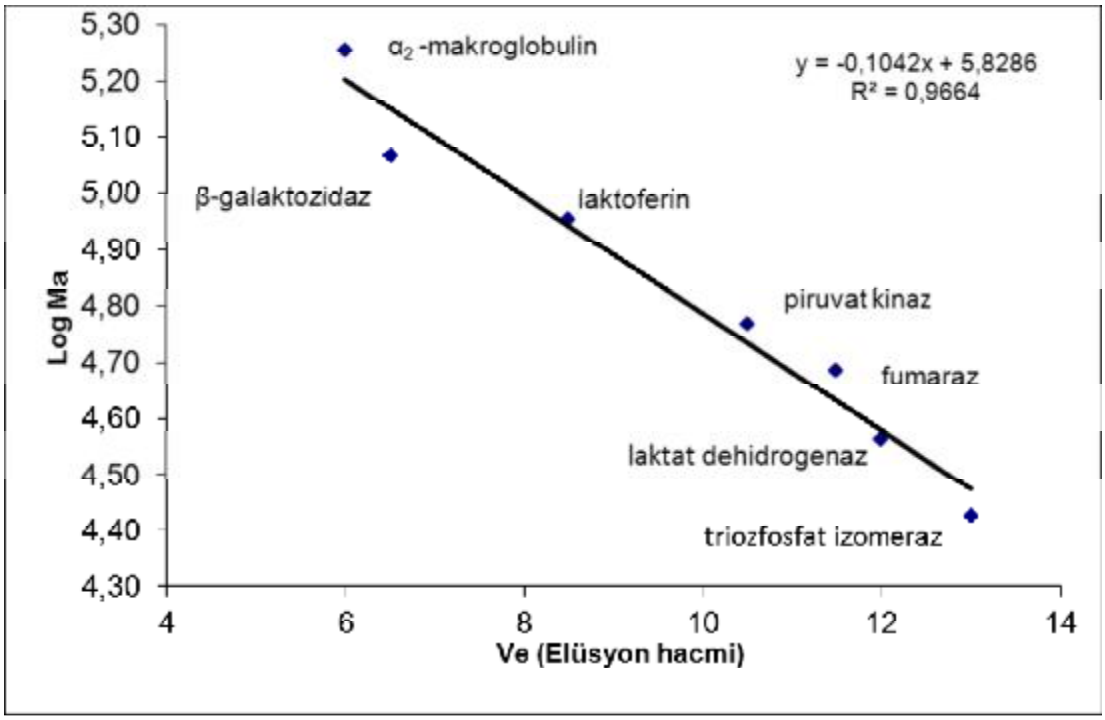
Çizelge 4.1. Kayısı (*Prunus armeniaca*) çekirdeği β-glukozidaz için saflaştırma sonuçları.

Saflaştırma basamağı	Hacim (mL)	Akt. (U/mL)	Protein (mg/mL)	Top.Prot. (mg)	Top.Akt. (U)	Spesifik Akt.(U/mL prot.)	Verim (%)	Saflaştırma Oranı
Ham β-glukozidaz ekstraktı	43	4	0,86	34,4	172	5	100	1
%50 Amonyum sülfat çöktürmesi	10	13,6	0,9	9	136	15	79	3
Hidrofobik etkileşim kromatoğrafisi sonrası	28	3,9	0,14	3,9	112	29	59	6

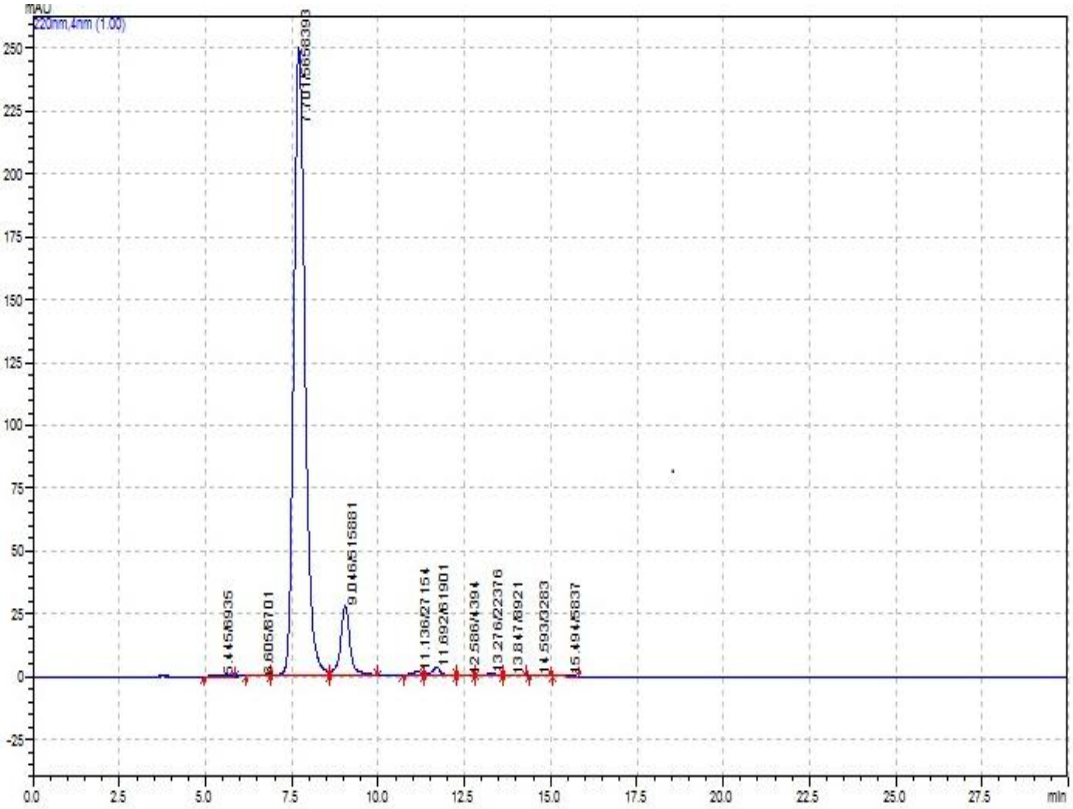
Saflaştırma çalışmalarının sonuçlarının verildiği Çizelge 4.1.' de görülecği gibi β-glukozidaz enzimi %59 verimle 6 kat saflaştırılmıştır.

4.3. β-Glukozidaz'ın Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi Sonuçları

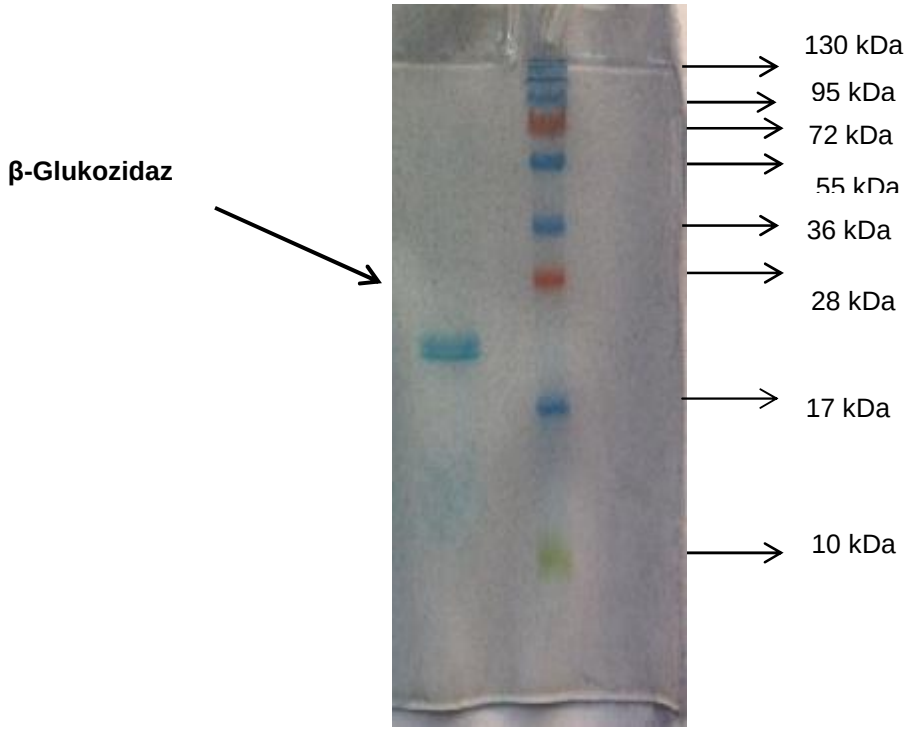
β-Glukozidaz'ın moleküler ağırlığının belirlenmesinde Biosuite 250 HR moleküler eleme kolonu kullanılmış, β-glukozidaz için alıkonma zamanı bulunmuş ve standart protein grafiği kullanılarak moleküler ağırlığı yaklaşık 107 kDa olarak belirlenmiştir (Şekil 4.2). Şekil 4.3.' de β-glukozidaz için moleküler eleme kromatoğrafisi sonucu elde edilen kromatogram örnek olarak verilmiştir. Bu sonuçların SDS-PAGE sonuçları ile birlikte değerlendirilmesiyle saflaştırılan β-glukozidaz'ın yaklaşık 23 kDa ağırlığında özdeş 5 alt üniteye sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.2. Moleküler eleme kromatoğrafisi için standart protein grafiği.



Şekil 4.3. β-glukozidaz için örnek bir moleküler eleme kromatogramı.

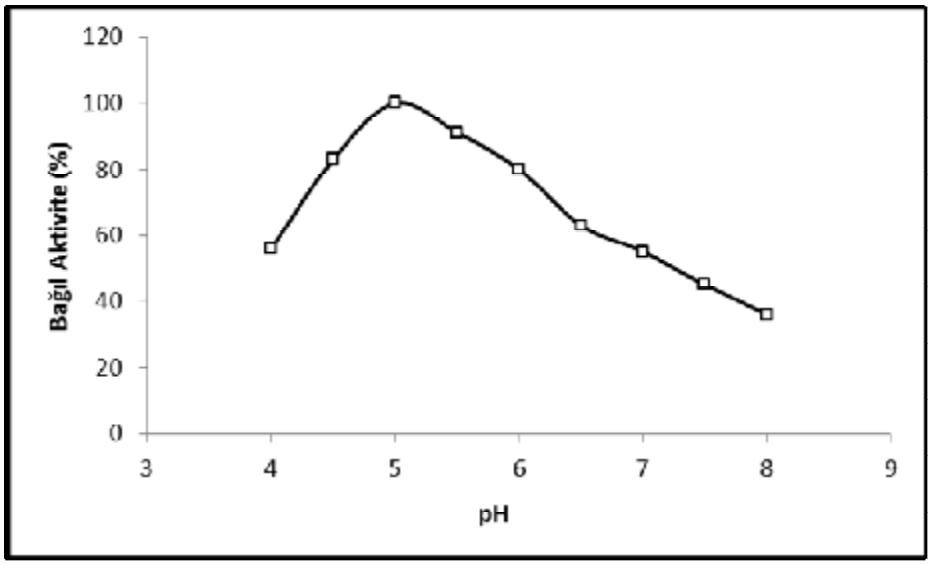


Şekil 4.4. β-Glukozidaz için örnek bir SDS-PAGE sonucu.

4.4. β-Glukozidaz'ın Karakterizasyonu İle İlgili Bulgular

4.4.1. β-Glukozidaz'ın Aktivitesine pH'ın Etkisi İle İlgili Bulgular

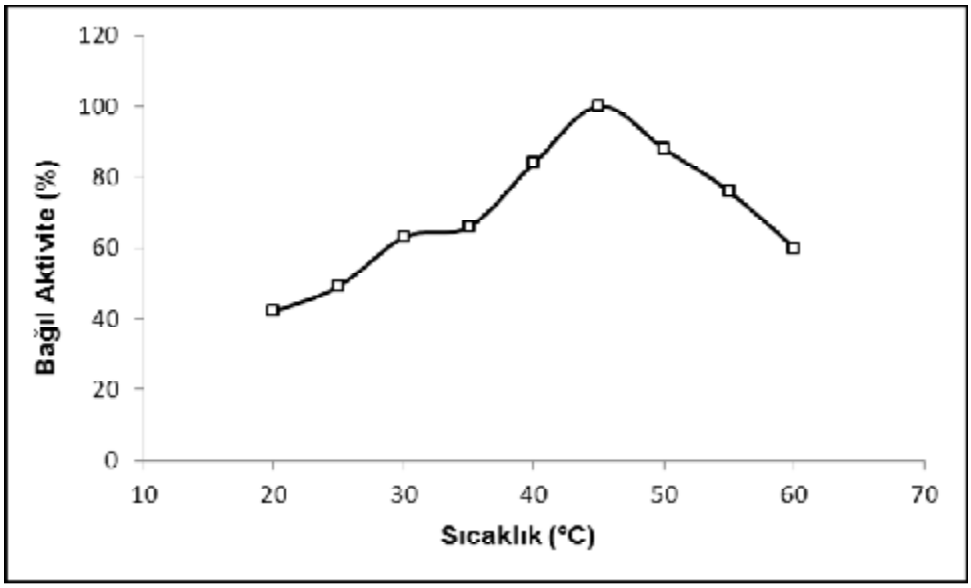
β-Glukozidaz aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi pH:4-8 aralığında incelenmiş bulgular Şekil 4.5.' de grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.5.' de görüldüğü gibi kayısı β-glukozidaz'ı için maksimum aktivite gösterdiği pH değeri 5,0' dir. pH 4' de maksimum aktivitenin ancak %56'sını göstermektedir. Diğer taraftan pH 6' da gözlenen aktivite maksimum aktivitesinin %80' i kadardır. pH 8' de enzim maksimum aktivitesinin ancak %36'sını gösterebilmektedir.



Şekil 4.5. β-Glukozidaz aktivitesinin pH ' ya bağlı değişimi.

4.4.2. β-Glukozidaz Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi İle İlgili Bulgular

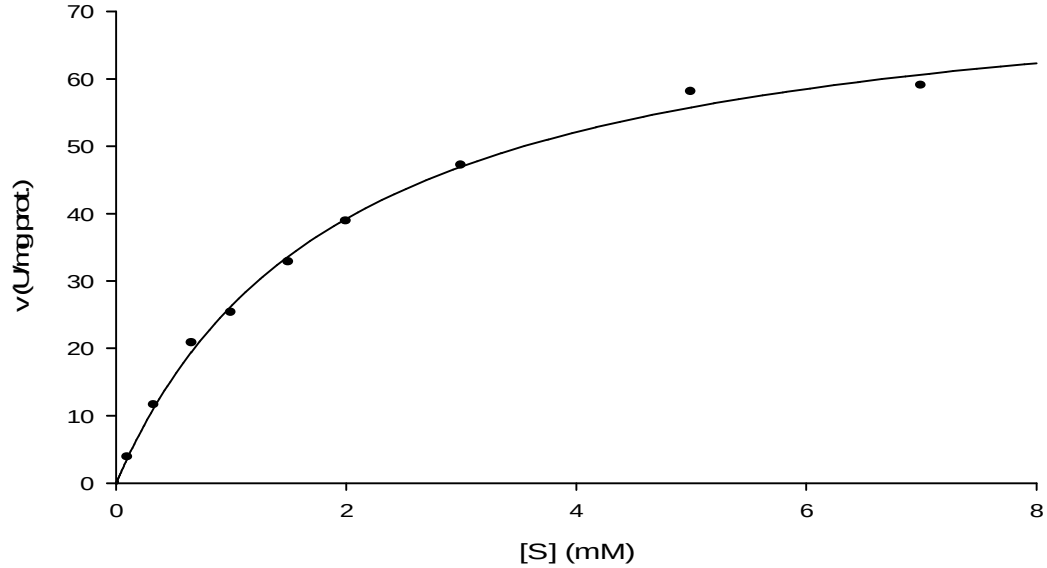
β-Glukozidaz aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi 10-60°C aralığında incelenmiş bulgular Şekil 4.6.' da grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.6.' da görüldüğü gibi kayısı β-glukozidaz'ı için maksimum aktivite gösterdiği optimum sıcaklık 45°C olarak belirlenmiştir. 20°C olduğunda maksimum aktivitenin ancak %42' sini göstermektedir. Diğer taraftan 60°C' de gözlenen aktivitenin maksimum %60' kadardır.



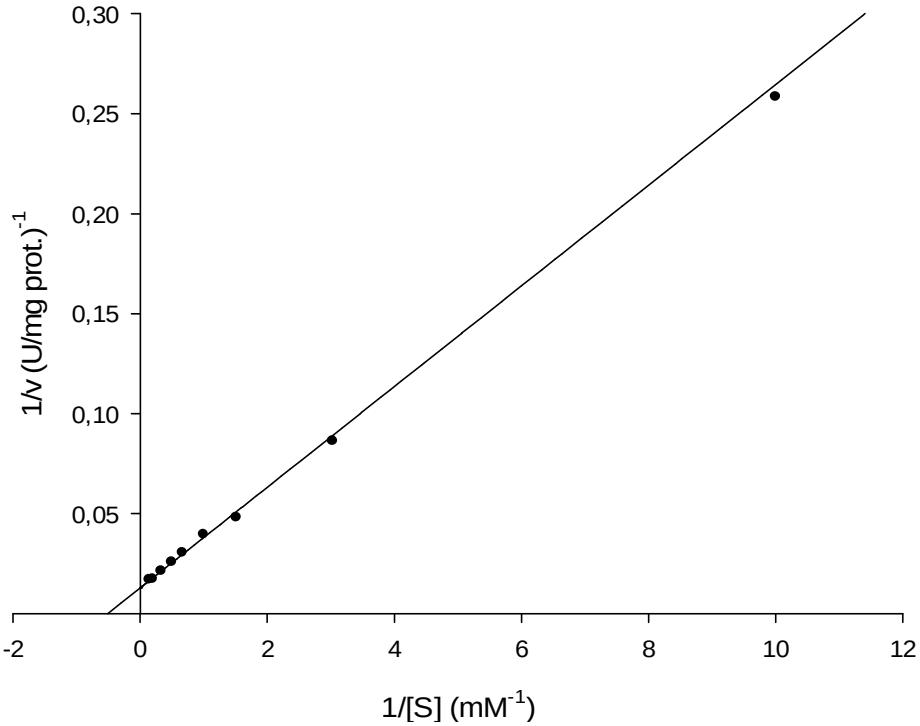
Şekil 4.6. β-Glukozidaz aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi.

4.4.3. β-Glukozidaz'ın Kinetik Parametreleri İle İlgili Bulgular

Belirlenen optimum pH ve sıcaklıkta (5,0 ve 45℃) 0,01-7,0 mM *p*-nitrofenil-β-D-glukopiranozit derişimleri kullanılarak ölçülen aktiviteler için Sigma Plot Enzim Kinetik Modül programı kullanılarak Michealis-Menten hız grafiği (Şekil 4.7.) ve Lineweaver-Burk grafiği çizilmiş (Şekil 4.8.) ve kinetik parametreler hesaplanmıştır. K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 1,95 mM ve 77,5 U/mg prot. olarak hesaplanmıştır.



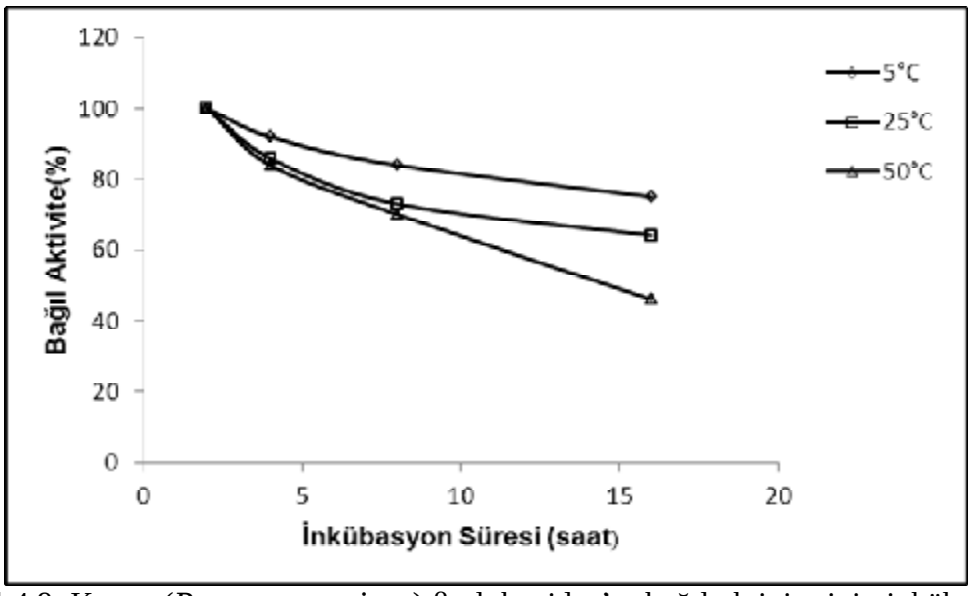
Şekil 4.7. β-Glukozidaz için Michealis-Menten grafiği.



Şekil 4.8. β-Glukozidaz için Lineweaver-Burk grafiği.

4.4.4. β-Glukozidaz'ın Termal Kararlılığı İle İlgili Bulgular

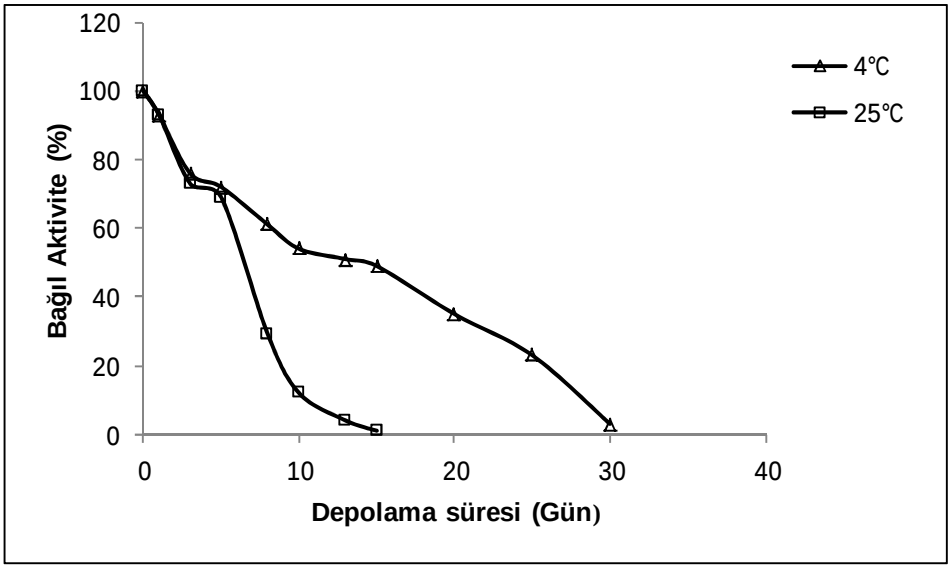
β-Glukozidaz örneği 5, 25 ve 50°C' de 2, 4, 8 ve 16 saat bekletildikten sonra kalan aktiviteleri ölçülmüş ve % bağıl aktiviteler hesaplanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.9.' da gösterilmiştir. Şekil 4.9.' da görüleceği gibi tüm inkübasyon süreleri için en yüksek kalan aktivite değerleri 5°C' de bekletilen örnekler için elde edilmiştir. 16 saat inkübasyon süresi sonunda 5°C' de aktivitenin %72' sini koruduğu gözlenmiştir. 25°C' de ve 50°C' de ise sırasıyla aktivitesinin %67 ve %54' ünü koruduğu bulunmuştur.



Şekil 4.9. Kayısı (*Prunus armeniaca*) β-glukozidaz'ın bağıl aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı değişimi.

4.4.5. β-Glukozidaz'ın Depolama Kararlılığı İle İlgili Bulgular

β-Glukozidaz örneğini oda sıcaklığında ve 4 ℃' de 50 Mm pH 5,5 fosfat tamponunda bekletilerek belirli günlerde kalan aktiviteleri ölçülmüştür. Kayısı β-glukozidaz örneğinin depolama süresine bağlı aktivite değişimleri Şekil 4.10.' da gösterilmiştir. Şekil 4.10.' da görüleceği gibi 25°C' de 15. gün sonunda aktivitesinin tamamen kaybolduğu gözlenirken; 4°C' de ise 30. günün sonunda enzimin başlangıç aktivitesinin kaybolduğu belirlenmiştir



Şekil 4.10. Kayısı (*Prunus armeniaca*) β-glukozidaz'ın bağıl aktivitesinin depolama süresine ve koşullarına bağlı değişimi.

4.5. Tartışma

Literatürde β-glukozidazın *Prunus* familyasına ait bazı bitkilerin çekirdeklerinden saflaştırılması ve karakterizasyonu ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Ancak *Prunus armeniaca* çekirdeklerinden saflaştırılması ve karakterizasyonu ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. β-Glukozidaz'ın saflaştırılması için yapılan ön çalışmalarda sırasıyla aseton ekstraksiyonu, $(NH_4)_2SO_4$ çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kromatoğrafisi denenmiştir. Şimdiye kadar β-glukozidaz kaynağı olarak kullanılmamış olan kayısı (*Prunus armeniaca*) çekirdeğinden β-glukozidaz enzimi %59 verimle 6 kat saflaştırılmıştır.

Literatürde çeşitli kaynaklardan çeşitli saflaştırma metodları kullanılarak yapılan β-glukozidaz'ın saflaştırılması ile ilgili çalışmaların sonuçları bulunmaktadır. Bu çalışmaların sonuçlarında oldukça farklı saflaştırma oranları ve verimleri rapor edilmiştir. Özsoy (1995*) Mytilus galloprovincialis'in* manto dokusu β-glukozidaz'ı saflaştırmak için ham ekstrakta sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi(%40-60), diyaliz ve hidrofobik etkileşim kolonu uygulamış ve enzim %6,7 verimle 13 kat saflaştırmıştır. Akiyama ve ark., (1997) çimlenmekte olan pirinçten β-glukozidaz enzimi amonyum sülfat (%50-80) çöktürmesi ve kromatoğrafi yöntemleri kullanılarak saflaştırılmıştır. CM-Sepharose, Pollybuffer değiştirici 118, Concanavalin-A-Sepharose ve Bio-Gel P-100 kolonları uygulanmış ve %14 verimle 383 kat saflaştırılmıştır. Gerardi ve ark., (2001) *Prunus avium L.* (olgun kiraz) meyvesinden amonyum sülfat çöktürmesi ($(NH_4)_2SO_4$), iyon değiştirici ve moleküler eleme kromatoğrafi yöntemleriyle β-glukozidaz'ı saflaştırmışlardır. β-Glukozidaz'ı %26 verimle 6,8 kat saflaştırdıklarını bildirmişlerdir. Pontoh ve ark., (2002) β-Glukozidaz *Apis mellifera* ve bal kesesinden anyon ve kayton değiştirici bir arada kullanılarak, hidrofobik etkileşim ve jel geçirgenlik olmak üzere 4 farklı kolon kromatoğrafisi uygulanmış ve %3,3 verimle 59,7 kat saflaştırmışlardır. Odoux ve ark., (2003) *Vanilla planifolia* (vanilya) tohumundan anyon değiştirici, hidrofobik etkileşim ve boyut eleme kromatoğrafi yöntemleri uygulanmış ve %8,4 verimle 7,2 kat saflaştırdıklarını rapor etmişlerdir.

Yılmaz (2005) *Aloe vera* yapraklarının pulpa kısmından β-glukozidaz'ı saflaştırmak için (% 30-65) amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz edildikten sonra hidroksilapatit kolona uygulandı. β-Glukozidaz'ın %17,7 verimle 28 kat saflaştırıldığı bildirilmiştir. Chen ve ark., (2012) *Prunus domestica* (erik) tohumlarından glukoz-toleranslı β-glukozidaz'ı saflaştırmak için (%0-60) $NH_4(SO_4)_2$ çöktürmesi ve sırasıyla Phenyl Sepharose CL-4B, Mono Q 5/50 GL kolon kromatoğrafisi yöntemlerini kullanmışlar ve β-glukozidaz'ı %5,4 verimle 59,2 kat saflaştırdıklarını bildirmişlerdir.

Prunus armeniaca (kayısı) çekirdeklerinden saflaştırdığımız β-glukozidaz'ın her birinin yaklaşık 23 kDa ağırlığında özdeş 5 alt üniteye sahip oldukları belirlenmiştir. Chen ve ark., (2012) *Prunus domestica* β-glukozidaz'ın 61 kDa ağırlığında ve tek bir alt birime sahip olduğunu bildirmişlerdir. Literatürde çeşitli bitkilerin çeşitli toprak üstü organlarından saflaştırılmış olan β-glukozidaz' lar için bildirilen moleküler ağırlıkları ve alt birimleri ile ilgili bazı örnekler Çizelge 4.2.' de verilmiştir. Çizelge 4.2.' den de görüleceği gibi çeşitli bitkisel kaynakların toprak üstü organlarından elde edilen β-glukozidaz' ların moleküler ağırlıkları oldukça geniş bir aralıktadır ve alt birim sayıları çeşitlilik göstermektedir.

Çizelge 4.2. Çeşitli bitkilerin çeşitli toprak üstü organlarından saflaştırılan β-glukozidaz' ların moleküler ağırlıkları ve sahip olduğu alt birim sayıları.

β-Glukozidaz	Bitki Organı	Moleküler ağırlık (kDa)	Alt birim sayısı	Literatür
Carica papaya	meyve	54	2	Schreier ve ark., 1987
Oryza sativa	tohum	56	1	Akiyama ve ark., 1997
Secale cereale L.	tohum	300	5	Masayuki ve ark., 2000
Soya fasulyesi	meyve	165	2	Hsieh ve ark., 2001
Prunus avium L.	meyve	68	1	Gerardi ve ark., 2001
Vanilla planifolia	tohum	201	4	Odoux ve ark., 2003
Prunus domestica	çekirdek	61	1	Chen ve ark., 2012

Saflaştırılan β-glukozidaz' a pH'ın etkisinin araştırılması ile ilgili çalışmalarımızda maksimum aktivitenin ölçüldüğü pH değeri 5,0 (50 mM asetat tamponu) bulunmuştur. Literatürde *Prunus domestica* ve *Prunus avium* L. gibi Prunus türü meyvelerin çekirdeklerinden saflaştırılan β-glukozidaz' lar için maksimum aktivitenin ölçüldüğü pH değerinin 5,0-5,5 arasında olduğu bildirilmiştir (Gerardi ve ark., 2001; Chen ve ark., 2012). Ancak literatürde çeşitli bitkilerden saflaştırılan β-glukozidaz için farklı optimum pH değerleri olduğu rapor edilmiştir. Masayuki ve ark., (2000) *Secale cereal* L. (çavdar) tohumundan saflaştırılan β-glukozidaz enzimi için optimum pH değeri 4,9-5,1 değerleri arasında olduğu bildirilmiştir. Hsieh ve ark., (2001) soya fasulyasinden saflaştırılan β-glukozidaz için optimum pH 6,0 olarak bulunmuştur. Odoux ve ark., (2003) *Vanilla planifolia* tohumundan saflaştırılan β-glukozidaz için de maksimum aktivitenin görüldüğü pH değeri 6,5 olduğu bildirilmiştir.

Çalışmamızda saflaştırılan β-glukozidaz için en uygun sıcaklığı 45°C olarak belirlenmiştir. Literatürde çeşitli kaynaklardan çeşitli saflaştırma metodları kullanılarak saflaştırılan β-glukozidaz için bildirilen optimum sıcaklık farklılıkları bulunmaktadır. Schreier ve ark., (1987) *Carica* papaya meyve özünden saflaştırlan β-glukozidaz'ın optimum sıcaklığı 50℃ olarak rapor edilmiştir. Lecas ve ark., (1991) olgun üzümden saflaştırılan β-glukozidaz için de en yüksek aktivite gözlemlenen sıcaklık 45℃ olduğu bildirilmiştir. Odoux ve ark., (2003) *Vanilla planifolia* tohumundan saflaştırılan β-glukozidaz için en uygun sıcaklık pH 7,0' de 40℃' dir. Chen ve ark., (2012) *Prunus domestica* (erik) tohumlarından glukoz-toleranslı β-glukozidaz için optimum sıcaklığı 55℃ olarak rapor etmişlerdir.

Saflaştırılan β-glukozidaz aktiviteleri için yapılan kinetik çalışmaların sonucunda K_m-V_{max} değerleri sırasıyla 1,95 mM ve 77,5 U/mg prot. olarak hesaplanmıştır. Literatürde çeşitli kaynaklardan saflaştırılan β-glukozidaz için yapılan kinetik çalışmalar sonucu bir çok farklı değerler rapor edilmiştir. Özsoy N., (1995) midye türü olan *Mytilus galloprovincialis'in* manto dokusu β-glukozidaz'ı için en yüksek reaksiyon hızının ve K_m değerinin sırasıyla 1.046 x 10^2U ve 3.49 mM olduğunu bildirmişlerdir. Masayuki ve ark., (2000) *Secale cereale L.* (çavdar) fidesinden saflaştırılan β-glukozidaz'ı K_m değeri 1,19 mM ve V_{max} 5870 nkat/mg prot. olarak hesaplanmıştır. Odoux ve ark., (2003) *Vanilla planifolia* tohumundan saflaştırılan β-glukozidaz için yapılan kinetic çalışmalar sonucunda K_m-V_{max} değerleri sırasıyla 1,1 mM ve 4,5 µkat.mg^{-1} olarak hesaplandığı rapor edilmiştir. Chen ve ark., (2012) *Prunus domestica* (erik) tohumlarından glukoz-toleranslı β-glukozidaz için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 3,09 mM ve 122,1 µmol/dk mg bulunmuştur. Bu tez çalışmasında kullandığımız β-glukozidaz kaynağı ile ilgili literatür bilgisi bulunmadığından dolayı β-glukozidaz için K_m ve V_{max} değerlerinin literatürdeki verilerle birebir karşılaştırılmaları mümkün olmamıştır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

1- Daha önceden β-glukozidaz kaynağı olarak kullanılmamış *Prunus armeniaca* çekirdeklerinden saflaştırılan β-glukozidaz'ın molekül ağırlığı 107 kDa olan 5 özdeş alt birimden oluştuğu belirlenmiştir.

2- *Prunus armeniaca* (kayısı) çekirdeklerinden β-glukozidaz %59 verimle 6 kat saflaştırılmıştır.

3- Saflaştırılan β-glukozidaz K_m değeri 1,95 mM ve V_{max} 77,5 U/mg prot. olarak belirlenmiştir.

4- Saflaştırılan β-glukozidaz için en yüksek aktivitenin gözlendiği optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 5,0 ve 45°C olarak belirlenmiştir.

5- Kayısı (*Prunus armeniaca*) çekirdeklerinden saflaştırılan β-glukozidaz'ın termal kararlılıkları karşılaştırıldığında; 5°C' de 16 saat sonunda β-glukozidaz aktivitesinin %72' sini, 25°C' de %67' si ve 50°C' de ise %54' ünü koruduğu belirlenmiştir.

6- Saflaştırılan β-glukozidaz farklı koşullarda depolandıklarında; 4°C' de bekletilen β-glukozidaz 30 günün sonunda aktivitesinin tamamını kaybederken oda sıcaklığında bekletilen 15 günün sonunda tüm aktivitesini kaybettiği belirlenmiştir.

5.2. Öneriler

1- Diğer *Prunus* türleri β-glukozidaz için uygun birer kaynak olarak kullanılabilir.

2- Bazı metal iyonlarının β-glukozidaz aktivitesi üzerine etkisi araştırılabilir.Aktivatörlerin ve inhibitörlerin varlığında aktivite karşılaştırılması incelenebilir.

3- Substrat kaynağı olarak doğada bulunan siyanohidrinlerin kullanımı önerilebilir. Farklı substratlar için K_m ve V_{max} değerleri belirlenebilir.

KAYNAKLAR

AKIYAMA, T., HANAE, K., and NATAO, S., 1997. Acell Wall-Bound β-Glucosidase From Germinated Rice: Purification And Properties. Phytochemistry, 48: 49-54.

BRADFORD, M., 1976. Arapid and sensitive method fort he quatitation of micrigram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.

BRICK, R., BRAVDO, B., SHOSEYOV, O., 1996. Detoxification of cassava by Aspergüllus niger B-1. Applied Microbial Biotechnol, 45: 411-414.

CHEN, L., Lİ, N., ZONG, MH., 2012. A glucose-tolerant β-glucosidase from Prunus Domestica seeds: Purification and characterization. Process Biochemistry, 47: 127-132.

CHINCHETRU, M.A., CABEZAS, J.A., CALVO, P., 1989. Prurification and characterization of a broad specificity β-glucosidase from sheep liver. International Journal of Biocheistry, 21:469-476.

COMPOS, N., BAKO, L.,BRZOBOHATY, B., FELDWISCH, J., ZETTL, R., BOLAND, W., PALME, K., 1993. Identification and characterization of a novel phytohormone conjugate spesific β-glucosidase activity from maize. American Chemical Society, 533: 205-213.

DEMBITSKY, VM., 2004. Astonishing diversity of natural surfactants: 1.Glycosides of fatty acids and alcohols. Lipids, 39: 933-953.

DEMİRKAN, G., 2009. Climacocystis borealis'den ß-glukozidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üni., Fen Bilimleri Enstitüsü., Trabzon.

DIKEMAN, C.L., BAUER, L.L., FAHEY, G.C., 2004. Carbohydrate composition of selected plum/prune preparations. J Agric Food Chemistry, 52: 853-859.

DONOVAN, J.L, MEYER, A.S., WATERHOUSE, A.L., 1998. Phenolic composition and antioxidant activity of prunes and prune juice (***Prunus domestica***). J Agric Food Chemistry, 46: 1247-1252.

ERARSLAN, A., 2000. Enzim Kinetiği Notları. TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi, Kocaeli, 84.

ESEN, A., 1993;2010. β-Glucosidases, overview. In: ESEN, A. (Ed), β-Glucosidase: Biochemistry and Molecular Biology. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 1-13.

GEIGER, G., FURRER, G., FUNK, F., BRANDL, H., SCHULIN, R., 1999. Heavymetal effects an β-glucosidase activity influnced by pH and buffer systems. Journal Enzyme Inhıb., 14: 365-379.

GERARDI, C., FEDERICA, B., ANGELO, S., GIUSEPPE. Z., 2001. Purification and characterization of a β-glucosidase abundantly expressed in ripe sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit. Plant Science, 160:795-805.

HAYANO, K., KATAMI, K., 1977. Extraction of β-glucosidase activity from pea-field soil. Soil Biological Biochemistry, 17: 553-557.

HIDALGO, M., STEINER, J., 1992. B-Glucosidase from *Penicillium purogenum:* purification and properties. Biotechnol. Applied Biochemistry, 15: 185-191.

HONG, M.R., KIM, Y.S., PARK, C.S., LEE, J.K., KIM, Y.S., and OH, D.K., 2009. Characterization of a recombinant β-glucosidase from the thermophilic bacterium *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 108: 36-40.

KARA, H., 2010. Beta-glukozidaz enziminin hidrofobik etkileşim kromatografisi ile Olea Europea meyvesinden saflaştırılması, karakterizasyonu ile bazı pestisit ve ağır metallere karşı afinitesinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesik Üniversitesi., Fen Bilimleri Enstitüsü., Balıkesir.

KETUDAT CAIRNS, JR., ESEN, A., 2010. β-Glucosidases. Cell Mol Life Science, 67: 3389-3405.

LAEMLI, U.K., 1970. Cleavage Of Structural Proteins During The Assembly Of The Head Of Bacteriophage T4. Nature, 22: 680-685.

LECAS, M., GUNATA, Z.Y., SOPIS, J.C., BAYONOVE, C.L., 1991. Purification and partial characteriation of β-glucosidase from grape. Phytochemistry, 30: 451-454.

LINEWEAVER, H., BURK, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. Journal American Chemical Society. 56: 658-666.

MASAYUKI, S., ATSUSHI, I., HAJIME, I., 2000. Purification and characterization of a β-glucosidase from rye (*Secale cereale* L.) seedlings. Plant Science, 155: 67-74.

ODOUX, E., CHAUWIN, A., BRILLOUET, J.M., 2003. Purification and characterization of vanilla bean (*Vanilla planifolia* Andrews) β-D-glucosidase. J Agric Food Chemistry, 51: 3168-3173.

ÖZSOY, N., 1995. Midye manto dokusu β-glukozidazı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversites., Sağlık Bilimleri Enstitüsü., İstanbul.

PATEL, V., TAPEL, A.L., 1969. B-Glucosidase and β-xylosidase of fat kidney. Biochemistry Biophysics Acta, 191:653-662.

PONTOH, J., LOW, N.H., 2002. Purification and characterization of β-glucosidase from honey bees (*Apis mellifera*). Insect Bochemistry and Molecular Biology, 32: 679-690.

ROSS, G.S., REDGWELL, E.A., 1993. Kiwifruit β-galactosidase isolation and activity against specific fruit cell-wall polysaccharides. Planta, 189: 499-506.

SCHREIER, H.J., SCHREIER, P., 1987. Purification and partial characterization of β-glucosdase from papaya fruit. Phytochemistry, 25: 2271-2274.

TURAN, A., 2011. Armillaria mellea mantarından beta-glukozidaz enziminin kısmi olarak saflaştırılması ve karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi., Fen Bilimleri Enstitüsü., Trabzon.

TURNER, B.L., HOPKINS, D.W., HAYGARTH, P.M., OSTLE, N., 2002. β-Glucosidase activity in pasture soils. Applied Soil Ecology, 20: 157-162.

YANG, L., NING, Z.S., SHI, C.Z., CHANG, Z.Y., HUAN, L.Y., 2004. Purification and characterization of an ısoflavone-conjugates-hydrolyzing β-glucosidase from endophtic bacterium. Journal Agric Food Chemistry, 52: 1940-1944.

YILMAZ, T., 2005. *Aloe vera* yaprak pulpası β-glukozidaz'ın saflaştırılması ve bazı özelliklerinin incelenmesi, İstanbul, 48s.

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Malatya' da doğdu. İlköğrenimine Celalettin Sayhan İlköğretim Okulu' nda başladı ve Başkent Üniversitesi Özel Başkent Koleji' nde tamamladı. Ortaokulu ve lise öğrenimini de Başkent Üniversitesi Özel Başkent Kolejinde tamamladı. 2006 yılında Çukurova Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü' nde üniversite eğitimine başladı ve 2010 yılında mezun oldu. 2011 yılında Çukurova Üniversitesi; Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı' nda yüksek lisansa başladı.