

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

***Climacocystis borealis*'den β -GLUKOZİDAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gamze DEMİRKAN

**EYLÜL 2009
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

***Climacocystis borealis*'den β -GLUKOZİDAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Kimyager Gamze DEMİRKAN

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

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 18.08.2009
Tezin Savunma Tarihi : 08.09.2009**

**Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ahmet ÇOLAK
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI**

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Salih TERZİOĞLU

Trabzon 2009

ÖNSÖZ

Mantardan enzim saflaştırılmasına yönelik hazırlanan bu çalışma K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans tez danışmanlığı üstlenerek, çalışmalarım sırasında her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen Sayın hocam Yrd.Doç.Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA'ya teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans eğitimimi Biyokimya Anabilim Dalında yapmamı sağlayan Sayın hocam Doç.Dr. Ahmet ÇOLAK'a teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım sırasında yaptıkları katkılardan dolayı Sayın Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ ve ekibine, Sayın Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI ve ekibine teşekkürlerimi sunarım. Mantar toplanmasında ve tanınmasındaki yardımlarından dolayı Sayın Prof. Dr. Ertuğrul SESLİ'ye teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Öğr. Gör. Dr. Yakup KOLCUOĞLU'na, Sayın Arş. Gör. Melike YILDIRIM'a ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Özlem FAİZ'e teşekkürlerimi sunarım.

Bu zor zamanlarımda her zaman yanımda olan, bana sabırla destek veren, benimle beraber tüm zorluklara katlanan sevgili eşim H.Murat DEMİRKAN'a, ve birtanem, canım oğlum Yiğit'ime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Her halime sabır gösteren, karşılıksız bir şekilde yanımda olan, benim için her türlü fedakarlığı yapan canım anneciğime ve çok uzaklarda da olsa gözleri ve sevgisi benimle olan rahmetli babacığima sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Gamze DEMİRKAN
Trabzon 2009

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET	VI
SUMMARY	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	IX
SEMBOLLER DİZİNİ	X
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. Selülozun Yapısı ve Genel Özellikleri	2
1.3. Selülazların Genel Özellikleri.....	3
1.3.1 Selülazların Sınıflandırılması	3
1.3.1.1 β -Glukozidazlar	4
1.3.2. Reaksiyon Mekanizmaları	5
1.3.3 Selülaz Aktivite Testleri	6
1.3.3.1 Toplam Selülaz Aktivitesi	6
1.3.3.2 Endoglukanaz Aktivitesi.....	6
1.3.3.3. Ekzoglukanaz Aktivitesi	7
1.3.3.4. β -Glukozidaz Aktivitesi.....	7
1.3.4. Selülaz Üretiminin İndüklenmesi ve İnhibisyonu	7
1.4. Selülazların Bulunduğu Organizmalar	8
1.5. Selülazların Kullanım Alanları	10
1.6. Mantarların Genel Özellikleri.....	11
1.6.1. <i>Climacocystis borealis</i> Makromantarının Özellikleri.....	12
1.7. Çalışmanın Amacı	13
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	15
2.1 Kullanılan Malzeme ve Cihazlar	15
2.1.1 Cihazlar	15

2.1.2	Kimyasal Madde ve Malzemeler	16
2.2.	Deneysel Çalışmalar	16
2.2.1	Çözeltiler ve Tamponlar	16
2.2.2.	Ham Enzim Özütünün Hazırlanması	18
2.2.3.	Enzim Aktivitesinin Tayini	18
2.2.4.	Protein Tayini	19
2.2.5.	Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez (PAGE) ve Aktivite Boyaması	20
2.3.	β -Glukozidaz Enziminin Saflaştırılması.....	20
2.3.1.	Gradientli Amonyum Sülfat Çöktürmesi	20
2.3.2.	Diyaliz.....	21
2.3.3.	Aseton Çöktürmesi	21
2.3.4.	İyon Değişim Kromatografisi	22
2.4.	Saf Enzimin Biyokimyasal Karakterizasyonu	23
2.4.1.	Enzim Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi.....	23
2.4.2.	Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	23
2.4.3.	Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi	23
2.4.4.	Enzimin pH Kararlılığının İncelenmesi.....	24
2.4.5.	Enzimin Isıl Kararlılığının İncelenmesi.....	24
2.4.6.	Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi.....	24
2.4.7.	Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasalların Etkisi	25
3.	BULGULAR.....	26
3.1.	Ham Enzim Özütünün Hazırlanması ve Aktivite Tayinleri	26
3.2.	Doğal Jel Elektrofrez ile <i>C. borealis</i> 'teki β -Glukozidaz Aktivitesinin Ortaya Konulması	26
3.3.	Enzimin Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve İyon Değişim Kromatografisi ile Saflaştırılması	26
3.3.1.	Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz	26
3.3.2	β -Glukozidaz Enziminin İyon Değişim Kromatografisi ile Saflaştırılması	27
3.4.	Enzimin Aseton Çöktürmesi ve İyon Değişim Kromatografisi ile Saflaştırılması	28
3.4.1	Aseton Çöktürmesi	28
3.4.2.	β -Glukozidaz Enziminin İyon Değişim Kromatografisi ile Saflaştırılması	28
3.4.3	Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez	29

3.5.	<i>C. borealis</i> 'den Saflaştırılan β -Glukozidaz Enziminin Biyokimyasal Karakterizasyonu	30
3.5.1.	Optimum pH	30
3.5.2.	Optimum Sıcaklık.....	31
3.5.3.	β -Glukozidaz Enziminin pH Kararlılığı	32
3.5.4.	β -Glukozidaz Enziminin Isıl Kararlılığı	32
3.5.5.	Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi	33
3.5.6.	Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi.....	34
3.5.7.	Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasalların Etkisi	35
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA	36
5.	ÖNERİLER.....	39
6.	KAYNAKLAR	41
	ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

Bu çalışmada, *Climacocystis borealis* mantarından elde edilen ham özütteki β -glukozidaz enzimi iyon değişim kromatografi yöntemi kullanılarak saflaştırılmış ve ardından saf enzimin biyokimyasal karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ham özütün 4-metilum-belliferil- β -D-glukopyranozid (MUG) ile boyanan doğal elektroforezinde iki bant gözlenmiştir. Yapılan iyon değişim kromatografisi sonucu yine aynı yöntemle boyanan doğal elektroforezinde tek bant gözlenmiştir. *C. borealis*'in ham özütünden kromatografi sonrasında saflaştırılarak elde edilen β -glukozidaz enzimi için optimum pH 3,0 olarak bulunmuş olup, bu pH'da, 10°C'de ve 24 saat sonunda enzimin aktivitesini %85 oranında koruduğu gözlenmiştir. β -glukozidaz enzimi için optimum sıcaklığın 60°C olduğu belirlenmiştir. β -glukozidaz enzimi için PNPG substratı varlığında $V_{maks}= 72,46$ 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.

Anahtar Kelimeler: β -glukozidaz, *Climacocystis borealis*, İyon Değişim Kromatografisi, Saflaştırma, Karakterizasyon

SUMMARY

Purification and Characterization of β -glucosidase from *Climacocystis borealis*

In this study, β -glucosidase extracted from a mushroom *Climacocystis borealis* was purified by using ion-exchange chromatography and then pure enzyme was characterized. Native electrophoresis stained by 4-Methylumbelliferyl β -D-glucopyranoside (MUG) of the crude extract from *C. borealis* showed two bands. β -glucosidase from *C. borealis* purified by ion-exchange chromatography and a single band was appeared on the native electrophoresis gel stained by MUG. β -glucosidase enzyme showed pH optimum value at pH 3.0. It was retained about % 85 of β -glucosidase activity after incubating at this pH point at 10°C for 24 hours. β -glucosidase showed temperature optimum at 60°C. In the presence of PNPG, the V_{\max} and K_m values were calculated 72.46 U/mg protein and 8.96 Mm, respectively. When investigated the effect of some metal ions on the enzyme activity, β -glucosidase activity inhibited in the presence of Mn^{2+} and wasn't exchange in the presence of other metal ions. When investigated the effect of some chemicals on the enzyme activity, it was seen that β -glucosidase activity vary different ratios in the presence of some chemicals.

Key Words: β -glucosidase, *Climacocystis borealis*, Ion-exchange Chromatography, Purification, Characterization

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Selüloz molekülünün yapısı	2
Şekil 2. Selülozun selüloz enzim sistemi ile glukozu hidrolizinin şematik gösterimi	5
Şekil 3. <i>C. borealis</i> makromantarının fruktifikasyon organları	12
Şekil 4. β -Glukozidaz enziminin saflaştırılmasına ait iyon değişim kromatografisi Grafığı	29
Şekil 5. <i>C. borealis</i> makromantarından saflaştırılan β -glukozidaz enziminin A)Substrat Boyama, B) Commasie Boyaması sonrası doğal jel Elektroforez görüntüsü	30
Şekil 6. <i>C. borealis</i> 'den saflaştırılan β -glukozidaz enzimine ait optimum pH grafiği	31
Şekil 7. <i>C. borealis</i> 'den saflaştırılan β -glukozidaz enzimine ait optimum Sıcaklık Grafığı.....	31
Şekil 8. <i>C. borealis</i> 'den saflaştırılan β -glukozidaz enzimine ait pH kararlılık grafiği ...	32
Şekil 9. <i>C. borealis</i> 'den saflaştırılan β -glukozidaz enzimine ait ısı kararlılık grafiği	33
Şekil 10. PNPG varlığında β -glukozidazın substrat doygunluk eğrisi	34
Şekil 11. PNPG varlığında β -glukozidaz aktivitesi için Lineweaver-Burk eğrisi	34

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Kullanılan cihazlar.....	15
Tablo 2. Kullanılan çözeltiler ve içerikleri / hazırlanışı	16
Tablo 3. Doğal poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler ve hacimleri.....	20
Tablo 4. Gradientli amonyum sülfat çöktürmesi ve spesifik aktivite değerleri.....	27
Tablo 5. <i>C. borealis</i> 'den saflaştırılan β -glukozidaz enzimine ait saflaştırma tablosu.....	28
Tablo 6. β -Glukozidaz enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi.....	35
Tablo 7. β -Glukozidaz enzimi aktivitesi üzerine kimyasalların etkisi	35

SEMBOLLER DİZİNİ

APS	: Amonyum persülfat
BSA	: Bovin serum albumin (Sığır Serum Albumini)
DTT	: Ditiyotritol
E.C.	: Enzim komisyonu
EDTA	: Etilendiamin tetraasetikasit
K_m	: Michaelis-Menten sabiti
mM	: Milimolar
MUG	: 4-metilumbelliferil- β -D-glukopiranosid
PAGE	: Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PNPG	: <i>p</i> - nitrofenil- β -D-glukopiranozid
[S]	: Substrat konsantrasyonu
TEMET	: N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
Tris	: Tris (hidroksimetil) aminometan
TX-114	: Triton X-114 deterjanı
V_{maks}	: Maksimum Hız
μ M	: Mikromolar
Asp	: Aspartat
Glu	: Glutamat

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Günümüzde enzim katalizli prosesler, daha hızlı, daha ekonomik, çevre dostu, ürün verimi oldukça yüksek ve safsızlık oluşumu oldukça düşük olduğundan, endüstriyel ve klinik uygulamalarda kimyasal reaksiyonlara kıyasla daha fazla tercih edilmektedirler. Enzim katalizli proseslere duyulan bu ilgi, zamanla dünya genelinde bir enzim pazarının ortaya çıkmasına ve bu alanda yapılan çalışmaların da artmasına neden olmuştur. Gün geçtikçe artan talepler, artık daha iyi özelliklere sahip ya da özellikleri geliştirilmiş enzimlere duyulan ihtiyacı da gözler önüne sermektedir. 2000 yılında yapılan bir araştırmaya göre, dünya enzim pazarının ticari potansiyelinin 1,6 milyar dolar olduğu rapor edilmiştir. Endüstriyel enzimlerin %60'ı Avrupa, geri kalan %40'luk bölümü ise Amerika ve Japonya tarafından üretilmektedir (Bhat, 2000).

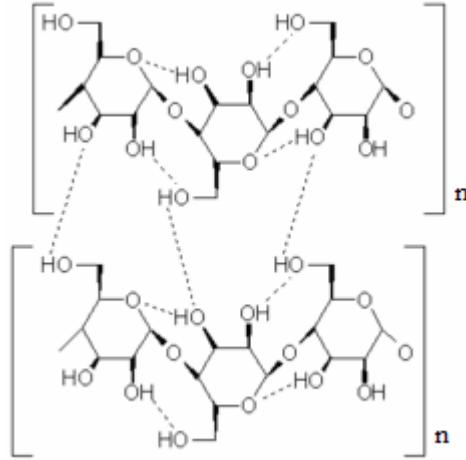
Ticari enzim piyasasında en çok üretilen ve kullanılan enzim sınıfı %75 ile hidrolazlardır. Selülazların da içinde olduğu karbohidrolazlar ise hidrolaz sınıfı içinde 2. büyük alt grubu oluşturmaktadır. Selülazlar, selüloz parçalayıcı enzim sisteminin genel adıdır ve bu enzim sistemi temelde üç bileşenden oluşmaktadır. Selüloz parçalanmasının bu üç enzimin sinerjik çalışmasıyla gerçekleştiği düşünülmektedir. Endoglukonazlar selülozun iç β -1,4-glikozidik bağlarını hidrolizle keserek yeni zincir uçlarının oluşmasını sağlar. Ekzoglukanazlar da oluşan bu yeni selüloz zincirlerini uçlardan keserek çözünür sellobiyoz birimleri oluştururlar. Nihai olarak β -glukozidazlar ise sellobiyoz birimlerini glukoz birimlerine hidrolizler (Bhat ve Bhat, 1997). Günümüzde ticari olarak kullanılan selülozik enzimler *Trichoderma* ve *Aspergillus* mantarlarından elde edilmektedirler (Godfrey ve West, 1996). Fakat endüstride selülaz kullanımını kısıtlayan en temel sebep enzim üretim maliyetlerinin yüksek, etkinliklerinin ise düşük olması ya da istenilen beklentilere tam olarak cevap verememesidir (Bhat, 2000).

Bu çalışmanın amacı ağaç üzerinde yetişen ve yenilmeyen bir makromantar türü olan *Climacocystis borealis*'ten endüstriyel ve ticari potansiyeli olan β -glukozidaz enziminin saflaştırılması, biyokimyasal özelliklerinin incelenmesidir.

1.2. Selülozun Yapısı ve Özellikleri

Selüloz doğada en bol bulunan karbohidrat polimeridir. Ayrıca çevrenin korunmasına yardım eden potansiyel bir yenilenebilir enerji kaynağıdır. Yenilenebilir bir kaynak olmasının sebebi selülozu oluşturan karbonun fotosentezle tekrar döngüye dahil edilebilmesinden kaynaklanmaktadır (Suto ve Tomita, 2001). Selüloz molekülü oldukça kararlı bir biyomoleküldür ve 25 °C'de β -glukozidik bağın kesimi için yarılanma ömrü 5-8 milyon yıldır (Wolfenden ve Snider, 2001). Fakat daha hızlı olan selülozun enzim katalizli biyodegradasyonu ise karbonun tekrar atmosfere dönmesi için oldukça önemlidir.

Selüloz, glukozun β -1,4-bağlarıyla oluşturduğu bir biyopolimerdir. Suda çözünmeyen sert bir yapıya sahiptir. Bitişik selüloz zincirleri ve selüloz tabakaları arasında Hidrojen ve van der Waals kuvvetleriyle oluşan paralel dizilim, güçlü, kararlı ve kristalimsi bir yapı oluşturur. Bu dizilim selüloz liflerinin oluşmasını sağlar (Demain vd., 2005).



Şekil 1. Selüloz molekülünün yapısı (URL-1).

Enzimatik olarak selülozun hidrolizi hem teknik hem de biyokimyasal açıdan oldukça önemlidir. Son yıllarda yaşanan yakıt krizlerinden sonra etanol, petrol yerine yakıt olarak daha önemli hale gelmeye başlamıştır. Mayalar kullanılarak selülozdan etanol üretimi çalışmaları halen devam etmektedir. Aynı zamanda fosil yakıtlarının kullanımından dolayı CO₂'nin artan emisyonunun iklimsel değişikliklere sebep olduğu düşünülürse yenilenebilir enerji kaynaklarından enerji üretimi gelecek için oldukça önemlidir.

Yenilenebilen bir karbon kaynağı olarak selülozik materyalin başarılı bir şekilde kullanımı selülaz üretimi ve selüloz materyalinin heksoz ve pentozlar gibi düşük molekül ağırlıklı ürünlere enzimatik hidrolizi için ekonomik olarak kullanışlı prosesler geliştirmeye bağlıdır. Selülaz üretimi, selülozik biyokütleden etanol üretimi esnasındaki en pahalı adımdır. Toplam maliyetin yaklaşık % 40'ı bu basamaktadır. Selülaz üretim teknolojisinin ticari kapasitesini zenginleştirmek için önemli derecede maliyet fiyatının azaltılması gerekmektedir (Spano, 1978).

1.3. Selülazların Genel Özellikleri

1.3.1. Selülazların Sınıflandırılması

Selülazlar başlıca bakteri, mantar ve protozoalar tarafından üretilen bir enzim sınıfıdır ve selülozun 1,4- β -D glikozidik bağlarının hidrolizini katalizlerler. Bunun yanında, bitki ve hayvan gibi diğer tip organizmalar tarafından da üretilirler. Birçok farklı çeşit selülaz enzimi bilinmektedir. Bunlar yapısal ve mekanistik olarak farklıdır. Bir grup mikroorganizma yüksek molekül ağırlıklı bir enzim kompleksi üretir. Selülozom olarak adlandırılan bu yapı, farklı selüloolitik enzimlerin bağlı bulunduğu selulozoma entegre olmuş proteinlerden oluşur. Oysa çoğu mantar ve bakteri birçok farklı tekli selüloolitik enzime sahiptir. Mantardaki selülaz sistemi bakteriyel sisteme göre daha az karmaşıktır. Bu grup enzimlerin EC numarası EC 3.2.1.1'dir. Tek bir enzim tam olarak selülozun parçalanmasını katalizleyemeyebilir. Bunun için genellikle birden fazla enzim gereklidir. Substrat olarak selülozun mevcudiyetinde başarılı bir şekilde büyüyen organizmalar, en az üç farklı enzimden oluşan bir selülaz kompleksi oluşturabilirler (Chapin vd., 2002).

Selülaz enzim sistemi çoğunlukla 3 farklı enzimden oluşmaktadır. Bunlar 1) Endoglukanazlar (EC 3.2.1.4, karboksimetil selülaz, endo-1,4- β -D-glukanaz), 2) Ekzoglukanazlar (EC 3.2.1.91, sellobiyohidrolazlar, ekzo-1,4- β -D-glukanaz) ve 3) β -Glukozidazlar (EC 3.2.1.21, β -glukozid glukohidrolaz) olarak sıralanabilir (Bhat ve Bhat, 1997).

Selüloolitik enzimler kesin olarak bir gruba dahildirler (endo- ve ekzoglukanaz gibi). Fakat bazı endoglukanazlar ekzoglukanaz aktivitesi de gösterirken (Kim, 1995), tersi

olarak bazı ekzoglukanazlar da endoglukanaz aktivitesi gösterebilirler. Fonksiyonel özellikler farklı enzimler arasında değişebilir. Bazı enzimler bir tip selüloolitik aktivite gösterirken, diğerleri değişen derecelerde çoklu selüloolitik aktivite gösterebilirler (Hilden ve Johansson, 2004).

Selülazların 3 boyutlu yapı ve primer yapı çalışmaları, bu enzimlerin genellikle asit baz katalizini takip ettiği ve aktif bölgelerinde ya iki Asp ya da bir Asp ve bir Glu olduğunu ve katalize katıldığını göstermiştir (Bhat ve Bhat, 1997).

1.3.1.1. β -Glukozidazlar

Selülaz enzim sisteminin bir bileşeni olan β -glukozidazlar sadece selooligosakkaritler ve sellobiyoz üzerinde aktivite gösterirler. Yani diğer iki enzim gibi selülozu substrat olarak kullanamazlar. Bu enzim glikozil hidrolaz ailesinin 1. ve 3. sınıfına dahildir. Katalitik yapılarının incelenmesi ve primer sıra benzerliklerine dayanarak glikozil hidrolazlar, yaklaşık 80 sınıfa ayrılmıştır. Farklı sınıflara ait olan glikozil hidrolazlar hem yapısal hem de substrat spesifikliği açısından birbirinden farklılıklar gösterebilir (Crennell vd., 2002). Bu sınıflandırmaya göre 1. sınıf 6-fosfo- β -galaktozidazı (EC 3.2.1.85), 6-fosfo- β -glukozidazı (EC 3.2.1.86), laktaz-filorizin hidrolazı (EC 3.2.1.108), mirosinazı (EC 3.2.3.1) ve ilaveten β -glukozidazı içermektedir (Guasch vd., 1999).

β -Glukozidazlar tarafından katalizlenen β -glikozidik bağlarının hidrolizi sonucu disakkarit, oligosakkarit ya da konjuge olmuş glukozidler oluşur. Bu yüzden doğada farklı rollere sahip β -glukozidazlar bulunur. Enzimatik sistemdeki mevcudiyetleri bitkinin biyokütlesinin yıkımını ve insanlarda Guacher's hastalığı gibi moleküler patolojilerin açığa çıkmasını sağlar. β -glukozidazların başka bir önemli özelliği de şekerlerin ve şeker türevlerinin spesifik enzimatik sentezi için önemli olan transglikozidasyon (glikozidik birimlerin transferi gibi) aktivitesine sahip olmasıdır (Guasch vd., 1999). Bu enzimler özellikle içkinin lezzetinin artırılmasında kullanılır (Bhat ve Bhat, 1997).

Bu enzimin diğer isimleri gentiobiyaz ve sellobiyazdır. β -Glukozidazlar substrat spesifikliğine göre 3 sınıfa ayrılırlar. Sınıf 1 enzimler glikozil β -glukozidaz ve aril β -glukozidaz aktiviteleri gösterir. Bu sınıf enzimler ayrıca sellobiyoz, laktoz ve β -*p*-nitrofenilglukozid, β -*p*-nitrofenilgalaktozid ve β -*p*-nitrofenilfruktozid ve diğer benzer

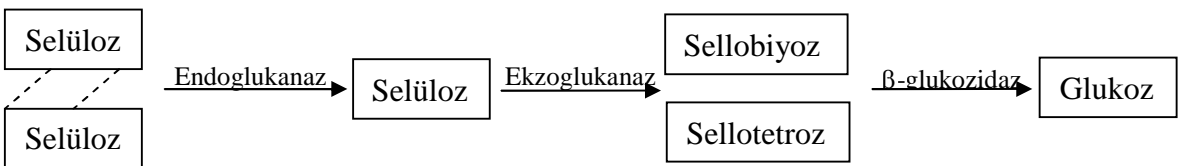
substratları hidrolizler. Sınıf 2 enzimler ise sadece glikozil β -glukozidaz aktivitesine sahiptir, bu yüzden sadece sellobiyoz ve laktozu hidroliz eder (gerçek sellobiyazlar). Sınıf 3 enzimler ise aril (veya alkil) β -glukozidaz aktivitesine sahiptir. Bu enzimler β -PNPG ve benzer substratlara karşı önemli bir aktivite gösterirler (Ponhot ve Low, 2002).

β -Glukozidaz, selülozun sakkarifikasyonunda en önemli hız sınırlayıcı basamaktır. Ayrıca, memeli lizozimlerindeki glikolipidlerin ve selülozun yıkımında ve bitkilerdeki glikozillenmiş flavonoidlerin kesiminde anahtar bir role sahiptir (Li vd., 2005).

β -Glukozidazlar organik ortamda β -glukozidik bağların oluşumunda kullanılır. Fakat hala bu alanda kullanılan β -glukozidaz enzimleri açısından bazı sınırlayıcı faktörler vardır. Bunlardan bazıları yüksek fiyat, düşük kararlılık ve tekrar kullanımlarda immobilizasyona duyulan ihtiyaçtır. Bu yüzden daha kararlı ve ucuz katalizörlere ihtiyaç vardır (Yu vd., 2007).

1.3.2. Reaksiyon Mekanizmaları

Enzimatik selüloz hidrolizi için geniş çapta kabul gören mekanizma endo- ve ekzoglukanaz ve β -glukozidaz tarafından oluşturulan sinerjik bir eylemdir. Endoglukanazlar (EC 3.2.1.4, karboksimetil selülaz, endo-1,4- β -D-glukanaz) selüloz zincirinin molekül içi ulaşılabilir β -1,4-glikozidik bağlarını hidrolizleyerek yeni zincir uçları oluşturur. Ekzoglukanazlar (EC 3.2.1.91, sellobiyohidrolazlar, ekzo-1,4- β -D-glukanaz) oluşan bu yeni selüloz zincirlerini uçlarından keserek çözünür sellobiyoz ve glukoz birimleri oluşturur. β -Glukozidazlar (EC 3.2.1.21, β -glukozid glukohidrolaz) ise sellobiyozu glukozla hidrolizler (Şekil 2) (Percival vd., 2006). Bu enzimler içinde aşamalı ve aşamalı olmayan tipler vardır. Aşamalı selülazlar sürekli tek bir polisakkarit zinciri ile etkileşimini sürdürür, aşamalı olmayan selülazlar ise bir polisakkarite önce bağlanıp sonra ayrılırlar ve daha sonra başka bir polisakkarite bağlanırlar (Chapin vd., 2002).



Şekil 2. Selülozun selüloz enzim sistemi ile glukozla hidrolizinin şematik gösterimi

β -glukozidazlar karbohidratlar üzerine etki eden enzimlerdir ve genel asit baz mekanizması ile oksijen nükleofilleri arasındaki glikozil transferini katalizlerler. Bu da anomerik yapının sabit tutulması ve bir kovalent glikozil-enzim ara ürününün oluşumu ile olur. Fizyolojik şartlar altında böyle bir transfer reaksiyonu genellikle β -glikozidik bağın disakkarit, oligosakkarit ya da konjuge olmuş glukozidlerin hidroliziyle sonuçlanır (Mc Carter vd., 1994).

1.3.3. Selüloz Aktivite Testleri

Selülozik substratların fiziksel heterojenliği ve farklı mikroorganizmalar tarafından üretilen selüloz sistemlerinin kompleksliği, selüloz aktivitelerinin ölçümü için birçok deneysel prosedürün gelişmesine neden olmuştur. Kullanılan doğal substratlardaki önemli yapısal farklılıklar, farklı selüloz bileşenlerinin aktivitelerinin ölçülmesi için ortaya konulan çeşitli prosedürler ve selüloz bileşenlerinin sinerjik hareketi, laboratuvar çalışmalarını zorlaştırmaktadır (Bhat ve Bhat, 1997). Bu yüzden selüloz aktivitesini ölçmek için kullanılan uygun substrat ve metodlar aşağıda verilmiştir.

Selüloz aktivitesini ölçmek için iki temel yaklaşım mevcuttur; 1) ayrı ayrı selüloz aktivitelerini (endo-, ekzoglukonaz ve β -glukozidaz) ölçmek ve 2) toplam selüloz aktivitesini ölçmek.

1.3.3.1. Toplam Selüloz Aktivitesi

Toplam selüloz aktivitesinin tayininde pamuk, filtre kağıdı ve hidroselüloz gibi selüloz içeren materyaller kullanılır ve enzim aktivitesi indirgen şekerlerin açığa çıkması ile belirlenir (Bhat ve Bhat, 1997).

1.3.3.2. Endoglukonaz Aktivitesi

Bu enzimin aktivitesi çoğunlukla yüksek polimerizasyon derecesine sahip çözünür bir selüloz türevidir, örneğin karboksi metil selüloz (CMS) gibi, ölçülür. Endoglukonaz aktivitesi substrat vizkozitesindeki azalmayla ya da indirgen şeker testiyle belirlenen indirgen uçların artışının ölçümüne dayanır (Percival vd., 2006).

1.3.3.3. Ekzoglukanaz Aktivitesi

Ekzoglukanazlar selüloz moleküllerinin ulaşılabilir uçlarını keserek glukoz ve sellobiyoz açığa çıkarır. *p*-nitrofenil- β -D-sellobiyozidin hidrolizi ile açığa çıkan *p*-nitrofenolün oluşum hızı tayin edilerek ekzoglukanaz aktivitesi tespit edilebilir (Percival vd., 2006). Ayrıca Avicel kullanılarak açığa çıkan indirgen şekerlerin belirlenmesiyle de tespit edilebilir (Bhat ve Bhat, 1997).

1.3.3.4. β -Glukozidaz Aktivitesi

4-metilumbelliferil- β -D-glukopiranozid ve β -naftil- β -D-glukopiranozid gibi substratların hidrolizlenmesiyle açığa çıkan floresan ya da *p*-nitrofenil β -D-1,4-glukopiranozid substratının hidrolizi ile açığa çıkan renkli ürünün (*p*-nitrofenol) ölçümüne dayanır (Percival vd., 2006). Ayrıca substrat olarak sellobiyozun kullanılması ve açığa çıkan glukozun tayini ile tespit edilebilir (Bhat ve Bhat, 1997).

1.3.4. Selülaz Üretimini İndüklenmesi ve İnhibisyonu

Selülazlar indüklenebilen enzim sistemleridir. Şimdiye kadar çalışılan tüm mikroorganizmalar en yüksek selülaz üretimini selüloz üzerinde büyüdüklerinde göstermişlerdir. Sellobiyoz, laktoz ve sophorozun da bazı mikroorganizmalarda selülaz sisteminin üretimini ya komple ya da tam olarak artırdığı bilinmektedir. Disakkaritlerin ve tiyosellobiyozun palmitat ve asetat esterleri de selülaz indükleyicileri olarak fonksiyon göstermektedir. Bunlara rağmen, selüloz birçok mikroorganizmada yüksek miktarda selülaz üretimi için en iyi karbon kaynağı olduğu tespit edilmiştir (Bhat ve Bhat, 1997).

Bu varsayım selülaz üretimini indüksiyonu ve regülasyonu açısından önemli bir sorunun ortaya çıkmasını sağlamıştır. Bu soru mikrobiyal hücrenin içine giremeyen ve çözünür olmayan bir substratın selülaz üretimini nasıl indüklediği ve regüle ettiğidir. Genel olarak mikroorganizmalarda kabul gören indüklenme şekli, ilk olarak selülozu çözünür şekerlere hidrolizleyen düşük seviyede sürekli selülaz üretimidir. Bu şekerler de gerçek indükleyicilere dönüşürler. Bu indükleyiciler ya doğrudan ya da dolaylı yollardan hücreye girerler ve DNA bağlanma proteinini etkileyerek selülaz gen ekspresyonunu artırır.

Ayrıca sellobiyoz da bazı mikroorganizmalarda selüloz sisteminin doğal indükleyicisidir. Yapılan çalışmalar sophorozun da genel bir indükleyici olamayacağı sonucunu ortaya koymuştur (Bhat ve Bhat 1997).

Protein sentezinin inhibitörlerini kullanarak gerçekleştirilen çalışmalar selüloz oluşumunun translasyonel seviyede regüle edildiği sonucunu ortaya koymuştur. mRNA seviyesinin ölçümüne dayanan kanıtlar selüloz oluşumunun pretranslasyonel seviyede olduğunu göstermiştir. *T. reesei*'de tüm selüloz indükleyicileri 3 temel selüloz (CBHI, CBH II ve endoglukanaz I) sabit bir oranda sentezini sağlar. Bütün bunlar bu üç selüloz bileşeninin ekspresyonunun koordineli olarak regüle edildiğini göstermektedir. Aksine, diğer mikroorganizmalardaki selüloz genlerinin transkripsiyonunun incelenmesi transkripsiyonun sıkı bir şekilde koordine edilmediğini göstermiştir. Kısacası, transkripte edilen selüloz geninin türü kadar, büyüme için kullanılan karbon kaynağına bağlı olarak transkripsiyon seviyesinde de önemli bir değişim vardır (Bhat ve Bhat, 1997).

Karbon katabolit baskılanması da bakteri ve mantardaki selüloz üretimini kontrol ettiği bilinen regülatör mekanizmalardan biridir. Bu durumda, selüloz hidrolizinin son ürünü selüler proteinle transkripsiyon seviyesindeki genle etkileşerek bir kompleks oluşturarak bir etkileşim yapar ve selüloz sentezini baskılar. *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Clostridium thermocellum*'da karbon katabolit baskılanması olur. Karbon katabolit baskılanması için kanıt, glikolitik mekanizma ile ilişkili diğer karbon kaynaklarının, glukozun ve gliserolün üzerinde büyümesi esnasında selüloz oluşmamasıdır (Bhat ve Bhat 1997).

İndüklenme, katabolit baskılama ve ürün inhibisyonu ve sınırlı karbon kaynağı mantar ve bakteride selüloz sentezinin regülasyon mekanizmasında yer aldığı belirlenmiş olmasına rağmen, selüloz sentezinin regülasyon mekanizması hakkında çok az şey bilinmektedir (Bhat ve Bhat 1997).

1.4. Selülozların Bulunduğu Organizmalar

Birçok mikroorganizma, selüloz enzimlerini üreterek ve bu enzimlerle selüloz molekülünü hidroliz ederek uygun şartlarda ürün oluşumu ve büyümeyi sağlarlar. Selülozlar ve hemiselülozlar (glikozil hidrolazlar) bakteri, mantar, maya ve aktinomisitler gibi geniş bir mikroorganizma grubu tarafından üretilmektedir. Buna paralel olarak yüksek

bitkiler, protozoalar, mantar ve bakterileri içeren geniş bir organizma grubunda birçok selüloolitik enzim sistemi çalışılmıştır.

Selülaz aktivitesi yönünden mantarlar oldukça zengin organizmalardır. Birçok mantar oldukça benzer enzimatik aktivitelere sahip birçok enzim üretir. Örneğin *Trichoderma* en az dört endoglukanaz, iki sellobiyohidrolaz ve üç endoglukanaz sentezler (Jorgensen vd., 2003). Şimdiye kadar selülazların en iyi çalışıldığı mantarlar *Trichoderma* ve *Aspergillus* türleridir (Sun ve Cheng, 2002). *Phanerochaete chrysosporium* IS. *Pulverulentum* (Eriksson, 1978), *Fusarium solani* (Wood ve McCrae, 1977), *Penicillium pinophilum* (Bhat vd., 1989), *Talaromyces emersonii* (McIntale ve Coughlan, 1980), *Trichoderma koningii* (Wood ve McCrae, 1982), *Trichoderma reesei* (Kyriakou vd., 1987; Kubicek vd., 1988), *Aspergillus terreus* (Mirzaakhmedov vd., 2007; Nazir vd., 2009), *Bipolaris sorokiniana* (Geimba vd., 1999) ve *Fusarium oxysporum* (Duan vd., 2006) mantarları şimdiye kadar selülaz enzimleri çalışılan türlerden bazılarıdır.

T. reesei'den hazırlanan ticari selülaz enzim karışımı oldukça popülerdir. Fakat bu enzim karışımı yüksek oranda endo- ve ekzo-glukanaz aktivitesi gösterirken, oldukça düşük β -glukozidaz aktivitesi gösterir (Rosgaard, 2006). Bu yüzden son zamanlarda *Aspergillus* türlerinden izole edilen selülaz enzimlerine ticari potansiyel kazandırma çalışmaları yapılmaktadır (Shaukat, 2002). Ayrıca son zamanlarda yapılan çalışmalar, *Penicillium* türlerinin de tam bir selülaz enzim sistemini içerdiğini ortaya koymuştur. Bu türlerin de *Trichoderma*'dan daha iyi β -glukozidaz ve total selülaz aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir (Krogh vd., 2004).

Şimdiye kadar bakteriler tarafından üretilen selülazlar hakkında da birçok çalışma yapılmış ve bu bakterilerdeki selülaz sistemlerinin birçok bileşeni klonlanmıştır (Oneil vd., 1986; Foong vd., 1991). Örneğin termofilik bir bakteri olan *Clostridium thermocellum* yüksek selülaz aktivitesine sahiptir ve bu enzimler kısmen termokararlı enzimlerdir (Beguin vd., 1985; Lemaire ve Beguin, 1993). Ayrıca *Bacillus* türleri bir grup ekstraselüler polisakkarit hidroliz eden enzim üretmektedirler (Priest, 1977). Bunun dışında selülazlar *Ruminococcus flavefaciens* (Latham vd., 1978), *Acetivibrio cellulolyticus* (Saddler ve Khan, 1981) ve *Flavobacterium johnsonae* (Okamoto vd., 2000) bakterilerinden de saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir.

Selülaz aktivitesine sahip sınırlı sayıda maya vardır. Bu türlerden biri *Cryptococcus* (Thongekkaew vd., 2008) diğeri ise *Pichia pastoris* mayasıdır (Turan ve Zheng, 2005).

Ayrıca geviş getiren hayvanlarda bulunan simbiyotik bakteriler de selülaaz aktivitesine sahiptir. Moleküler biyoloji tekniklerindeki son gelişmeler kendi selülaazını üreten termitler gibi bazı omurgasızların da varlığını ortaya koymuştur (Ledger vd., 2006).

1.5. Selülaazların Kullanım Alanları

Selülaazlar ve ilişkili polisakkaridazların lignoselülozu glukoz ve çözünür şekerlere dönüştürme potansiyelinin bilinmesinden dolayı bu enzimler üzerinde yapılan aktif araştırmalar 1950'li yıllarda başlamıştır (Bhat, 2000). 1970'li ve 80'li yıllarda bu enzimler üzerine yapılan temel ve uygulamalı araştırmalar ise enzim katalizli işlemlerde lignoselülozun çözünür şekerlere biyodönüşümünün oldukça zor ve ekonomik olmadığını ortaya koymuştur. Buna rağmen, selülaazlar, hemiselülaazlar ve pektinazlar üzerinde devam eden çalışmalar, bu enzimlerin birçok endüstriyel alandaki biyoteknolojik potansiyelini açığa çıkarmıştır (Bhat, 2000). Yukarıda da belirtildiği gibi bu enzimlerin yüksek maliyeti ve düşük verimi endüstriyel uygulamalar için başlıca problemdir. Bu yüzden pahalı olmayan substratları kullanabilen yeni enzimler üzerinde çalışmalar yapılmakta ve enzim etkinliğinin artırılması amaçlanmaktadır (Thongekkaew vd., 2008).

Fosil yakıtlarının hızla tükenmesi, sera gazı emisyonu ve fosil yakıtların tam olarak yanmaması sonucu oluşan hava kirliliği lignoselülozik materyalden biyoetanol üretimi üzerine ilginin artmasına neden olmuştur. Özellikle selülaazları kullanarak lignoselülozik materyalin enzimatik hidrolizi mümkündür. Böylece selülozik biyokütle glukozla çevrilir ve glukoz da etanol üretimi için kullanılır. Biyoetanol üretim proseslerinin ekonomik olması için ise kullanılan hidroliz enzimlerinin üretim maliyetlerinin düşürülmesi ve enzim etkinliklerinin artırılması gerekmektedir (Sun ve Cheng., 2002).

Bunun dışında selülaazların kullanım alanları;

- Tekstil endüstrisinde pamuğun yumuşatılması ve kotların taşlaması
- Selülozik giysilerin genel kalitesinin, parlaklığının ve pürüzsüzlüğünün artırılması
- Deterjan sektöründe renklerin korunması, temizleme ve çökmeyi önleyici olarak,
- Yiyecek endüstrisinde lapa yapımı
- Meyve suyu ve bira filtrasyonunda ve yağ ekstraksiyonunda veriminin artırılması

- Kağıt ve küspe endüstrilerinde akışkanlığın artırılması ve liflerin modifiye edilmesi
- Fırın ürünlerinin ve hayvan yemlerinin besinsel değerinin artırılması
- Geri dönüşüm kağıtlarının özelliklerinin geliştirilmesi (mürekkeplerin çıkarılması gibi)
- Kahvenin ticari olarak işlenmesi
- İlaç endüstrisi (insan midesinde bulunan bir selüloz formu olan fitobezoarların tedavisi gibi) olarak sıralanabilir (Kirk vd., 2002;; Parry vd., 2002; Cherry ve Fidantsef, 2003; Wang vd., 2005).

Ayrıca son yıllarda selüloolitik enzimler kullanılarak zirai, orman ve yiyecek işleme endüstrilerinin ürettiği selülozca zengin olan atıkların biyodönüşümü için yeni teknolojilerin geliştirilmesi çalışmaları da yapılmaktadır (Wang vd., 2005).

Farklı endüstri kollarında selülaz enzimlerinin kullanımına paralel olarak özellikle belirli kimyasal özelliklere sahip selüloolitik aktivite gösteren enzimlere büyük talep vardır (Wang vd., 2005).

1.6. Mantarların Genel Özellikleri

Eski zamanlardan beri mantarlar günlük beslenmenin yanı sıra, güzel aromaları ve tatları sebebiyle de insanlar tarafından tüketilmektedir. Mantarların tedavi edici amaçla kullanımı günden güne artmaktadır. Son yıllarda mantarlar fizyolojik olarak aktif bileşiklerin çekici bir kaynağıdır. Mantarlar başlıca gıda ve ilaç sanayinde kullanılmaktadır (Wasser ve Weis, 1999). Ekstraktların antiviral, hematolojik, antitümörjenik ve hipotensiv etkileri olduğu rapor edilmiştir (Chang ve Miles, 1989).

Yabani olarak yetişen mantarlar dünya çapında yaygındır. Dünya üzerinde var olan mantar türlerinin sayısı tam olarak bilinmemekle birlikte on binler civarında olduğu tahmin edilmektedir. Bilinen türlerin yüzde ondan daha az bir kısmının yenilebilir olduğu, buna yakın bir oranda türün ise zehirli olduğu düşünülmektedir (Toth, 1995). İnsanlar zehirli mantar türlerinden uzak durmayı deneme yanılma ile öğrenmişlerdir. Günümüzde gelişen kültürlenme teknikleri sayesinde yıl boyu oldukça büyük miktarlarda kültür mantarı üretilip satılmaktadır. Kültürü yapılan iki yaygın mantar türü *Agaricus bisporus* ve *Lentinus*

edodes'tir (Shiitake). *A. bisporus* batı toplumlarında, *L. edodes* ise uzak doğu ÷lkelerinde yaygındır (Miles ve Chang, 1997).

Mantar proteinlerinin sindirilme y÷zdeleri %72–83 arasındadır. Meyve ve sebzelerle kıyaslandığında, iyi bir lizin, arginin, histidin ve treonin kaynağıdırlar. İnsan beslenmesi için gerekli tüm aminoasitleri içermektedirler, buna rağmen triptofan seviyeleri kısmen dñşüktür. Ayrıca mantarlar sodyum, klor, bakır, demir, potasyum, brom, mangan, çinko, fosfor, kalsiyum, riboflavin, nikotinik asit ve folik asit gibi mineral ve vitaminler açısından da zengindirler (Boztok, 1990).

1.6.1. *Climacocystis borealis* Makromantarının Özellikleri

Climacocystis borealis (Fr.:Fr.)Kotl.&Pouzar mantarı ladin ağaçlarının gövde kısımlarında, kesilmiş olan ağaç gövdelerinin üzerinde oldukça yaygın bir şekilde bulunurlar. Bununla birlikte çam ve süpürge otu ağaçlarının gövdesinde de sanki zayıf bir parazitmiş gibi bulduklarında gör÷lmüştür. Yaygın olarak bulunma zamanı erken yaz ya da geç sonbahar dönemleridir.

Genellikle bulunduğu yere kısa bir uzantı ile bağlıdır. Bağlı olduğu yerden 30-120 mm çıkıntı yapmıştır ve bir taraftan diğer tarafa 5-120 mm'dir. Kalınlığı 15-30 mm'dir. Şapka yüzeyinin üstü kalbur ve pul pul, çizgili bir şekilde oluklu, düz olmayan bir yapıdadır.



Şekil 3. *C. borealis* makromantarının fr÷ktifikasyon organları

İlk oluşma döneminde rengi beyaz, olgunluk döneminde saman sarısıdır. İlk oluştuklarında kenarları şişkin, olgunluk dönemlerinde ise kenarları, keskin, dalgalı ve genellikle yüzeyden daha sarıdır. Yüzeyin alt kısmındaki por tabakası ilk oluştuklarında beyaz, olgunlaşma döneminde sarımtraktır. Por çeperleri açısız olup, ileri zamanlarda labirent şeklindedir. Şapka üzerindeki kanal şeklindeki yapıların genişlikleri 2-6 mm'dir. Şapka elastik ve etli bir yapıya sahiptir. Çift kat yapısı lifli ve oldukça sağlamdır. Şapka beyazdan kreme çalan bir renge sahiptir. Hoş kokulu olup, buruk mayhoş bir tadı vardır. Genellikle bir gövde üzerinde düzineler şeklinde toplu halde bulunurlar. Ancak nadiren de olsa tek başlarına görülebilirler (Kranzlin, 2005).

1.7. Çalışmanın Amacı

Enzim teknolojisinin günümüzde giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerlerinin çok yüksek olması nedeniyle biyoteknolojinin endüstriyel enzimlerle ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar daha da önem kazanmaktadır. Endüstriyel enzimler çok çeşitli proseslerde uygulanabilmelerinden dolayı özellikle mikrobiyal kökenli olanlar için gelen talep sürekli artmaktadır. Enzim katalizli reaksiyonlar, alternatifleri olan yorucu ve pahalı kimyasal reaksiyonlardan daha caziptir. Enzimler, gıda, süt ürünleri, ilaç sanayisi, deterjan, tekstil ve kozmetik endüstrileri gibi birçok alanda kullanılmaktadır.

Selülozlar üzerine yapılan çalışmalar son yüz yılda büyük bir hız kazanmıştır. Önemli ilerlemeler, selülozun üretiminin, selüloz yıkımının biyokimyasının anlaşılması, selüloz geninin ekspresyonu ve klonlanması ve bazı selülozların üç boyutlu yapısının belirlenmesi yönündedir. Ayrıca selülozların potansiyel endüstriyel uygulamaları da belirlenmiştir. Selülozların ticari potansiyelinin geliştirilmesi önündeki önemli engel selüloz üretiminin verimliliği, kararlılığı, özgünlüğü ve maliyetidir. Bu yüzden ileriki çalışmalar bu sorunları giderebilecek çalışmalara odaklanmalıdır. Çalışmalar, ayrıca mevcut ve yeni selülozların ticari potansiyellerinden yararlanmayı amaçlamalıdır (Bhat ve Bhat, 1997).

Bu çalışmanın amacı, Trabzon'un Hıdırnebi Yaylasından elde edilen *C. borealis* mantar türünden selüloz sisteminin bir enzimi olan β -glukozidazın kolon kromatografisi ile saflaştırılması ve saf enzimin biyokimyasal olarak karakterizasyonudur. Enzim aseton çöktürmesi ve iyon değişim kromatografisi ile Q-Sefaroz kullanılarak saflaştırılmıştır.

Enzimin karakterizasyon çalışması kapsamında optimum pH, optimum sıcaklık, ısı ve pH kararlılığı, metal iyonların ve çeşitli kimyasal maddelerin etkisi, substrat konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisi incelenerek bazı kinetik sonuçlara ulaşılmıştır. Böylece saflaştırılan enzimin biyokimyasal özellikleri ortaya konulmuştur.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Malzeme ve Cihazlar

2.1.1. Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Model	Firma
Spektrofotometre	Lambda 25	Perkin Elmer
Protein Elektroforezi	P8DS	Owl Separation Systems
Santrifüj	Rotina 35 R	Hettich Zentrifugen
Jel Görüntüleme Sistemi	Gel Logic 200 Imaging System	Kodak
Kuru Hava Banyolu İnkübatör	EN400	Nüve
Saf Su Cihazı	Arium 611UV	Sartorius
Ligasyon Fırını	ES110	Nüve
Kuru Havalı Çalkalayıcı	MaxQ Mini 4450 Shaker	Barnstead/Lab-Line
pH Metre	WTW pH 720	InoLab
Buz Makinesi	FM-80EE	Hoshizaki
Vorteks	Type 37600 Mixer	Thermolyne
Buzdolabı	BD4303ANFE	Profilo
Terazi	Pioneer	Ohaus
Amicon Ultracel Membrane	10.000 MWCO	Milipore
Otomatik Pipet (1–10µL /100–1000µL/ 1000–5000µL)	Acura 825	Socorex
Isıtıcı /Magnetik Karıştırıcı	HS31	Chiltren
Fraksiyon Toplayıcı	500	Retriever
UV Dedektörü	UA-6	UV/VIS Detector
Pompa	Tris TM	Teledyne Isco
Cam Kolon	1.5x10 cm,1.5x30 cm	Sigma
Vakum Pompası	PC101	Vacuubrand
Liyofilizatör	Benchtop K	Virtis

2.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler

Bu çalışmada substrat olarak kullanılan *p*- nitrofenil- β -D-glukopiranosid (PNPG), 4-metilyumbelliferil- β -D-glukopiranosid (MUG) ve kolon dolgu maddesi olarak kullanılan Q-Sepharose fast flow Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, USA)'dan temin edilmiştir.

2.2. Deneysel Çalışmalar

2.2.1. Çözeltiler ve Tamponlar

Gerçekleştirilen deneysel çalışmalar esnasında kullanılan çözeltiler, içerikleri ve hazırlanışları Tablo 2'de verilmiştir. Bütün çözeltiler çift destile saf su (dd H₂O) ile hazırlanmıştır.

Tablo 2. Kullanılan çözeltiler ve içerikleri / hazırlanışı

Çözelti Adı	İçerik / Hazırlanış
Tampon Çözeltiler	
Glisin-HCl Tamponu (50mM, pH 2,0-3,0)	3,75 g glisin suda çözülerek 1M HCl çözeltisi ile pH'sı ayarlanıp 1L'ye tamamlandı.
Sodyum-Asetat Tamponu (Na-Ac) (50mM, pH 4,0-5,0)	4,1 g sodyum asetat suda çözülerek 1M asetik asit çözeltisi ile pH'sı ayarlanıp 1L'ye tamamlandı.
Fosfat Tamponu (50mM, pH 6,0-8,0)	8,7 g K ₂ HPO ₄ 'ün 1L suda çözülmesi ile hazırlanan çözelti 6,8 g KH ₂ PO ₄ 'ün 1L suda çözülmesi ile hazırlanan çözelti ile titre edilerek pH'ı istenilen değere ayarlanarak hazırlandı.
Tris-HCl Tamponu (50mM, pH 9,0)	6,05 g tris bazı suda çözülerek 1M HCl çözeltisi ile pH'sı ayarlanıp 1L'ye tamamlandı.
A Çözeltisi (0,1 M sitrik asit monohidrat)	5,253 g sitrik asit monohidratın saf su ile çözülüp hacminin 250 ml'ye tamamlanması ile hazırlandı.
B Çözeltisi (0,2 M disodyum hidrojen fosfat dihidrat)	8,90 g Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O'nun saf su ile çözülüp hacminin 250 ml'ye tamamlanması ile hazırlandı.
Mcilvaine Tamponu (50 mM, pH 3,0)	80,3 ml A çözeltisi ile 19,7 ml B çözeltisi karışımından 20,8 ml alınıp saf su ile hacminin 50 ml'ye tamamlanması ile hazırlandı.
Mcilvaine Tamponu (50 mM, pH 4,0)	62 ml A çözeltisi ile 38 ml B çözeltisi karışımından 18,1 ml alınıp saf su ile hacminin 50 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
Mcilvaine Tamponu (50 mM, pH 5,0)	49 ml A çözeltisi ile 51 ml B çözeltisi karışımından 16,6 ml alınıp saf su ile hacminin 50 ml'ye tamamlanması ile hazırlandı.

Tablo 2'nin devamı

KCl-HCl Tamponu (50 mM,pH 1,0-2,0)	0,745 g KCl suda çözülerek 1M HCl çözeltisi ile pH'sı ayarlanıp 1L'ye tamamlandı.
Sodyum-Asetat Tamponu (50mM, pH 5,0)	4,1 g sodyum asetat suda çözülerek 1M asetik asit çözeltisi ile pH'sı ayarlanıp 1L'ye tamamlandı.
Sodyum-Asetat Tamponu (Na- Ac) (20mM, pH 5,5)	2.7216 g sodyum asetat suda çözülerek 1M asetik asit çözeltisi ile pH'sı ayarlanıp 1L'ye tamamlandı.
Asetat Tamponu (Tuzlu) (20mM, pH 5,5)	2.7216 g sodyum asetat suda çözülerek 1M asetik asit çözeltisi ile pH'sı ayarlanıp 100 ml'ye tamamlandı. Daha sonra bu tampon kullanılarak 1M'lık NaCl çözeltisi hazırlandı.
Asetat Tamponu (Tuzsuz) (20mM, pH 5,5)	2.7216 g sodyum asetat suda çözülerek 1M asetik asit çözeltisi ile pH'sı ayarlanıp 100ml'ye tamamlandı.
2M NaCl Çözeltisi	11,688 g NaCl suda çözülerek hacmi 100 ml'ye tamamlandı.
Etanol % 20'lik (v/v)	20 mL etanol ölçülüp hacmi 100 ml'ye tamamlandı.
Substrat Çözeltileri	
<i>p</i> - nitrofenil-β-D-glukopiranosid (25 mM stok çözelti)	0,1883 g PNPG ($M_A= 301,26$ g/mol) suda çözülerek hacmi 25 ml'ye tamamlandı.
<i>p</i> - nitrofenil -β-D-glukopyranosid (4mM)	0,012 g PNPG ($M_A= 301,26$ g/mol) 100 mM'lık asetat tamponunda çözülerek hacmi 100ml'ye yine aynı tamponla tamamlandı.
4-metilyumbelliferil-β-D-glukopiranosid (0,4 M stok çözelti)	3,383 g MUG ($M_A=3,383$ g/mol) 50 mM'lık sitrat-fosfat tamponunda çözülerek hacmi 100ml'ye yine aynı tamponla tamamlandı.
Lowry Protein Tayini Çözeltileri	
Lowry A	0,1 N NaOH içinde % 2 (w/v) Na ₂ CO ₃ çözeltisi
Lowry B	% 1 bakır sülfat çözeltisi
Lowry C	% 2 sodyum – potasyum tartarat çözeltisi
Lowry D	1 kısım Lowry B + 1 kısım Lowry C
Lowry E	0,25 ml Lowry D + 12,5 ml Lowry A
Lowry F	1 hacim Folin belirteci + 1 hacim su
Doğal Jel Elektrofrez Çözeltileri	
Ayırma Jel Tamponu (1,5 M Tris-HCl)	36,3 g Tris bazı 150 ml suda çözüldü, pH 8,8'e ayarlandı ve son hacim su ile 200 ml'ye tamamlandı.
Yığıma Jel Tamponu (1 M Tris-HCl)	24,2 g Tris bazı 150 ml suda çözüldü, pH 6,8'e ayarlandı ve son hacim su ile 200 ml'ye tamamlandı.

Tablo 2'nin devamı

% 10 Amonyum Persülfat (APS)	% 10 (w/v) APS çözeltisi su ile hazırlandı ve -20 °C'de saklandı.
N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin (TEMED)	Orijinal şişesinden kullanıldı.
% 30 Akrilamid/Bisakrilamid	% 29,2 (w/v) akrilamid ve % 0,8 (w/v) N, N'-metilen bisakrilamidin suda çözülmesiyle hazırlandı.
Doğal Jel Yükleme Tamponu	50 mM Tris-HCl (pH 6,8) % 0,1 Bromofenol mavisi % 20 gliserol (100 µl'lik hacimlerde tüplere bölünerek -20 °C'de saklandı)
Doğal Jel Yürütme Tamponu	25 mM Tris bazı, 250 mM glisin, Suda çözülerek pH 8,3'e ayarlandı
Coomassie Boyama Çözeltisi	1 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 100 mL glasiyal asetik asit, 300 mL metanol 600 mL su
Boya Uzaklaştırma Çözeltisi	100 mL glasiyal asetik asit, 300 mL metanol, 600 mL su
Substrat Boyama Çözeltisi (0,1 M 4-metilyum-belliferil-β-D-glukopiranosid)	0,34g 4 metilyumbelliferil-β-D- glukopiranosid 50 Mm'lık pH 5,0 sitrat-fosfat tamponunda çözülerek son hacim 10 ml'ye tamamlandı.
Diğer Çözeltiler	
0,1 M Na ₂ CO ₃ çözeltisi	1,06 g Na ₂ CO ₃ suda çözülerek son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

2.2.2. Ham Enzim Özütünün Hazırlanması

Climacocystis borealis'den 50 g alınarak sıvı azot içerisinde hücre membranlarının parçalanması için 15 dak bekletildi. Bu örneğe 2 mM EDTA, 1mM MgCl₂, 1mM PMSF içeren 50 mM Na-Ac tamponundan (pH 5,5) 100 ml ilave edilerek havanda dövüldü. Daha sonra bu karışım 4 katlı tülbentten süzüldü ve elde edilen süzüntüler 4 °C'de, 30 dak 20.000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant ham enzim özütü olarak kullanıldı. Çalışma süresince kullanılan ham enzim özütleri 1 ml'lik ependorf tüplerinde -20 °C'de saklandı.

2.2.3. Enzim Aktivitesinin Tayini

Enzim özütündeki β-glukozidaz aktivitesi hem spektrofotometrik yöntemle (Li vd., 2005) hem de elektroforetik yöntemle (Hu vd., 2007) tayin edildi. Spektrofotometrik

aktivite tayinleri PNPG substratı varlığında 410 nm'de gerçekleştirildi. Elektroforetik aktivite tayini ise MUG substratı varlığında doğal elektroforez yapılarak gerçekleştirildi.

Spektrofotometrik aktivite tayini için 200 µl enzim özütü üzerine 200 µl substrat çözeltisi ilave edildi. Karışım 37 °C'de 20 dak inkübe edildikten sonra reaksiyonu durdurmak için reaksiyon karışımına 1,2 ml 0,1 M'lık Na₂CO₃ çözeltisi ilave edildi. Kontrol tüpü ise aynı şekilde hazırlanan çözeltiliye, enzim özütü yerine eşit miktarda tampon çözelti ilave edilmesiyle hazırlandı. β-glukozidaz aktivitesisi için 1 ünite (U): 1 dakikada 1 µmol ürün oluşturan enzim miktarıdır. Özgün aktivite ise (U/mg), hazırlanan enzim özütündeki 1 mg protein başına hesaplanan enzim aktivitesi olarak tanımlanmıştır (Qin vd., 2007).

Elektroforetik aktivite tayini için kullanılan doğal PAGE için % 5'lik yığma ve %10'luk ayırma jeli kullanıldı. Ayırma jelinde % 0,1 (w/v) oranında olacak şekilde MUG çözeltisi kullanıldı. Elektroforez bitince jel, 3 kez 50 mM pH 5,0 sitrat-fosfat tamponuyla yıkandı. Yıkama işlemi bittikten sonra jel, % 0,1 (w/v) sitrat-fosfat tamponunda hazırlanmış MUG çözeltisinde 37 °C'de 20 dak inkübe edildi. İnkübasyon sonunda β-glukozidaz enziminin aktivitesinden sorumlu bantların varlığı UV ışık altında tespit edildi.

2.2.4. Protein Tayini

Özütteki protein miktarı Lowry metoduyla belirlendi. Protein standardı olarak sığır serum albumini (BSA) kullanıldı. Kalibrasyon grafiği için BSA'dan 10, 20, 30, 40 ve 50 µl alınarak üzerlerine % 0,1 SDS içeren 0,1 N NaOH çözeltisinden son hacim 500 µl olacak şekilde ilave edildi. Özütten 25 µl alındı ve hacmi % 0,1 SDS içeren 0,1 N NaOH ile 500 µl'ye tamamlandı.

Daha sonra hem BSA standartlarına hem de örneğe sırasıyla 1'er ml Lowry E karışımı ilave edilerek tüpler hemen vortekslendi ve 10 dak oda sıcaklığında bekletildi. Standartlara ve örneğe 100 µl Lowry F ilave edildi ve hemen vortekslendi. Tüpler 30 dak karanlıkta bekletildi. 650 nm'de absorbansları okundu. Kalibrasyon grafiği hazırlanarak örnek için elde edilen konsantrasyon değeri bu işlemdeki seyrelme faktörü ile çarpılarak orijinal özütteki protein içeriği mg/ml olarak belirlendi.

2.2.5. Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez (PAGE) ve Aktivite Boyaması

Doğal PAGE, Owl scientific marka P8DS model (Inc.Wobum, MA, USA) elektrofrez cihazı kullanılarak yapıldı. %5'lik yığma ve %10'luk ayırma jeli kullanıldı. Doğal elektrofrez yükleme boyası ile 1:1 oranında karıştırılan örnekler Hamilton şırıngası ile kuyucuklara yüklendi. Boya, yığma jelinden çıkana kadar 20 mA'lık ve ayırma jeli boyunca da 25 mA'lık akım uygulandı. Elektrik akımı kesildikten sonra jel sistemden dikkatlice çıkartılarak boyama işlemine geçildi. Elektrofrezde kullanılan çözeltiler ve hacimleri Tablo 3'te verilmiştir.

Doğal jel elektrofrez sonucu elde edilen jel, substrat boyama çözeltisi (0,1 M'lık 4-metilyum-belliferil- β -D-glukopiranozid) içinde 30 dak 37 °C'de inkübe edilerek β -glukozidaz aktivitesinden sorumlu enzimin varlığı oluşan bantlar gözlenerek tespit edildi.

Tablo 3. Doğal poliakrilamid jel elektrofrezinde kullanılan çözeltiler ve hacimleri

Bileşenler	Yığma Jeli (% 5, pH 6,8)	Ayırma Jeli(% 10, pH 8,8)
Yığma Jel Tamponu (1 M Tris-HCl, pH 6,8)	0,63 ml	---
Ayırma Jel Tamponu (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)	---	2,5 ml
% 30 Akrilamid/Bisakrilamid	0,83 ml	3,3 ml
dd H ₂ O	3,4 ml	4,0 ml
% 10 Amonyum persülfat (APS)	0,05 ml	0,1 ml
N,N,N',N'-tetrametiletilediamin (TEMED)	0,005 ml	0,004 ml

2.3. β -Glukozidaz Enziminin Saflaştırılması

2.3.1. Gradientli Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Çöktürme işlemleri %10–90 (w/v) oranındaki amonyum sülfat aralığında 10'ar birim artışla ayrı ayrı gerçekleştirildi. Yaklaşık 50 ml ham enzim özütü bir beher içerisine konuldu ve içi buz dolu bir kap ile beraber magnetik karıştırıcı üzerine yerleştirildi. Gradientli amonyum sülfat çöktürmesi işlemine %10'luktan başlanıldı. %10'luk çöktürme için gerekli amonyum sülfat miktarı, amonyum sülfat hesaplayıcısı programından (URL-2) yaklaşık 7,138g olarak hesaplandı. Bu miktar magnetik karıştırıcı üzerinde buz dolu kap içerisinde bir beherde bulunan enzim özütü üzerine çok küçük miktarlar şeklinde yavaş

yavaş eklendi ve bu sırada karıştırıcı ile çok yavaş bir şekilde karıştırılmaya devam edildi. Çözünme işlemi tamamlandıktan sonra karışımın 1 saat daha çok yavaş bir şekilde karışması sağlanarak çöktürme işlemi tamamlandı. Daha sonra karışım 20.000 rpm'de 30 dak santrifüjlendi. Süpernatant %20'lik çöktürmede kullanılmak üzere saklandı. Çökelek ise hacminin 1-2 katı tamponla çözülerek aktivite tayini için saklandı. Bu şekilde gradientli amonyum sülfat çöktürmesi işlemine %90'a kadar devam edildi. Böylece enzimin hangi aralıkta çöktüğü saptandı.

2.3.2. Diyaliz

Örnek, amonyum sülfat çöktürmesinin ardından ortamdaki tuz iyonlarını uzaklaştırmak için daha önceden kullanılan ekstraksiyon tamponuna karşı bir gece boyunca diyaliz edildi. Diyaliz işlemi için 20 mM 6 L Na-Ac (pH 5,5) tamponu hazırlandı ve soğuması için yaklaşık 4-5 saat buzdolabında bekletildi. Diyaliz edilecek numunenin yaklaşık 2 kat hacimdeki diyaliz membranı 10 dak kaynar suda kaynatıldı. Membranı kaynar sudan çıkarıp soğuttuktan sonra içine numune konuldu ve membran hem alttan hem de üstten magnetik kısırtıcılarla kapatıldı. Hazırlanan numune iyice soğumuş olan diyaliz tamponu içerisine alındı ve magnetik karıştırıcı üzerinde karışması sağlandı. İlk 1 saat içerisinde diyaliz tamponu bir kez değiştirildi ve aynı işlem ikinci saatin sonunda bir kez daha tekrarlandı. Değiştirme işlemi dördüncü saatin sonunda bir kez daha tekrarlanarak numunenin sabaha kadar karıştırıcıda karışması sağlandı. Gece sonunda diyaliz edilen örnek membrandan alınarak iyon değişim kromatografi kolonuna yüklenene kadar -20°C'de saklandı.

2.3.3. Aseton Çöktürmesi

Hazırlanan ham enzim özütü ayrıca asetonla da çöktürüldü. Bunun için 1 hacim özüt 1 hacim soğuk aseton:su karışımında (1:1) çöktürülerek 4 °C'de 5 dak 9.000 rpm'de santrifüjlendi. Elde edilen çökelek 4 °C'de 24 saat kalan asetonun uzaklaşması için bekletildi. Asetonu uçurulan çökelek hacminin 2-3 katı kadar 50 mM fosfat (pH 7,0) tamponunda çözüldü ve çözünmeyen kısmın uzaklaşması için 4 °C'de 5 dak 8.000 rpm'de santrifüjlendi. Elde edilen süpernatant iyon değişim kromatografi kolonuna yüklenene kadar -20 °C'de saklandı.

2.3.4. İyon Değişim Kromatografisi

İyon değişim kromatografisi için 30 cm uzunluğunda ve 1,5 cm çapında bir kolon ve kolon malzemesi olarak Q-Sepharose fast flow kullanıldı (Kongruang vd.,2002). Kolon dolgu malzemesi ve kullanılan tüm çözeltilerin gazları vakum pompası kullanılarak alındı. Gazı alınmış olan kolon dolgu malzemesi oda sıcaklığına getirildikten sonra bir pastör pipeti yardımıyla yavaş yavaş kolona dolduruldu. Kolon 20 mM Na-Ac tamponunun (pH 5,5) 350 ml'si ile bir gece boyunca dengeye getirildi. Enzim içeren örnek kolona akış hızı 1 ml/dak olacak şekilde emdirildi. Örneğin kolona yüklenmesinden sonra tutunmayan proteinlerin uzaklaştırılması için kolondan yaklaşık 80 ml tampon UV dedektörü kullanılarak kontrollü bir şekilde geçirildi. Kolondan çıkan örnekler bir tüp içerisinde biriktirilerek bu tüp içerisinde β -glukozidaz aktivitesi arandı. Yapılan aktivite testleri sonucunda kolondan çıkan çözeltide β -glukozidaz aktivitesi bulunamadı. Bu durum enzimin kolon matriksine bağlandığını göstermektedir. Daha sonra kolonun NaCl konsantrasyonu sıfırdan başlayarak 1 M'a kadar yükseltildi. Bunun için 0-1 M NaCl gradient köprüsü kullanıldı. Bu köprü iki beher içerisine ayrı ayrı 200 ml tampon konulması ve bu beherlerden birine konsantrasyonu 1 M olacak şekilde NaCl ilave edilmesi ile hazırlandı. Beherler arası tampon geçişi ise ince bir U cam boru ile sağlandı. Peristaltik pompa,cam boru yardımı ile 0 M tuz içeren tampondan sıvı çektikçe 1 M tuz içeren beher içerisindeki tamponun 0 M tuz içeren behere geçişi sağlandı. Böylelikle tuz konsantrasyonu dereceli olarak artırıldı. Kolondan çıkan fraksiyonlar yaklaşık 2,7 ml olacak şekilde cam tüpler içerisinde biriktirildi. Fraksiyonlardaki protein miktarı, 280 nm dalga boyunda yapılan ölçümler sonucu belirlendi. Ayrıca tüm fraksiyonlarda β -glukozidaz aktivitesine bakıldı. β -glukozidaz aktivitesi bulunan tüpler birleştirildi. Toplanan enzim özütü Amicon Ultracel Membrane 10.000 MWCO Milipore kullanılarak 4.000 g'de santrifüj süresi 2 dak olmak üzere yaklaşık 8 saat boyunca santrifüj işlemine devam edilerek yoğunlaştırıldı (Nakkaharat vd., 2005).

2.4. Saf Enzimin Biyokimyasal Karakterizasyonu

2.4.1. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi

β -glukozidaz aktivitesi üzerine pH'ın etkisini incelemek amacıyla, KCl-HCl (pH 1,0), Glisin-HCl (pH 2,0-3,0), sitrat-fosfat (pH 4,0-7,0), ve Tris-HCl (pH 8,0- 9,0) tampon sistemleri kullanılarak ayrı ayrı aktivite tayinleri yapıldı. β -glukozidaz için bulunan aktivite değerleri kullanılarak % Bağıl aktivite- pH grafiği çizildi. Aktivitenin en yüksek olduğu pH değeri optimum pH olarak tespit edildi ve bundan sonraki çalışmalarda aktivite tayinleri optimum pH değerlerinde gerçekleştirildi

2.4.2. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

β -glukozidaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini incelemek amacı ile 10–80°C sıcaklık aralığında, sıcaklık değeri 10 °C artırılarak aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Hazırlanan reaksiyon karışımları su banyosunda istenilen sıcaklıklarda 5'er dak bekletilerek ön ısıtmaları yapıldı. Ham enzim özütü ısıtılan reaksiyon karışımları üzerine ilave edilerek reaksiyonlar başlatıldı ve 20 dakika inkübasyon süresinden sonra aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda % Bağıl aktivite-sıcaklık grafiği çizilerek aktivitenin en yüksek olduğu sıcaklık değeri, optimum sıcaklık olarak belirlendi.

2.4.3. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

β -Glukozidaz aktivitesinin substrat konsantrasyonu ile değişimini incelemek amacı ile optimum şartlarda (pH ve sıcaklık) substratın değişen konsantrasyonlarına (0,1–25 mM PNPG) karşı ölçülen hız değerleri grafiğe geçirildi. Böylece hazırlanan substrat doygunluk eğrilerinden enzim aktivitesi için optimum substrat konsantrasyonu tayin edildi. Ayrıca, Lineweaver-Burk grafikleri de çizilerek enzimin V_{maks} ve K_m değerleri belirlendi.

2.4.4. Enzimin pH Kararlılığının İncelenmesi

β -Glukozidaz enziminine ait pH kararlılığının incelenmesi amacıyla 50 mM KCl-HCl (pH 1,0), 50 mM Glisin-HCl (pH 2,0- 3,0), 50 mM sitrat-fosfat (pH 4,0 - 7,0) ve 50 mM Tris-HCl (pH 8,0 - 9,0) tamponları kullanıldı. Uygun hacimlerdeki enzim özütleri yine uygun hacimlerdeki tampon çözeltilerle karıştırıldı. Hazırlanan bu reaksiyon karışımlarının her birinin 200 μ l'si enzim çözeltisi olarak kullanılarak enzimin aktivitesi tayin edildi. Böylece kontrol denemeleri gerçekleştirildi. Tamponlarla karıştırılan enzim çözeltilerinin geri kalan kısımları 4 °C'de, 24 saat inkübe edildikten sonra aktiviteleri tayin edildi. % Kalan aktiviteler 24 saat sonunda elde edilen aktivite değerlerinin kontrol denemelerindeki aktivite değerleri ile karşılaştırılmasıyla belirlendi ve % Kalan aktivite-pH grafiği çizildi.

2.4.5. Enzimin Isıl Kararlılığının İncelenmesi

β -Glukozidaz enziminin ısı kararlılık profilini belirlemek amacıyla enzim çözeltileri 30 dak, 1 saat, 2 saat, 4 saat, 6 saat, 12 saat ve 24 saat zaman aralıklarında 10–50 °C (10 °C'lik artışlarla) sıcaklıklarda su banyosunda ayrı ayrı inkübe edilerek aktivite tayinleri gerçekleştirildi. % Kalan aktiviteler, herhangi bir ön inkübasyon işlemi uygulanmamış enzim özütünün optimum şartlarda belirlenen aktivite değeri ile karşılaştırılarak hesaplanarak sıcaklığa karşı grafiğe geçilerek enzimin ısı kararlılık profili ortaya konuldu.

2.4.6. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi

β -Glukozidaz aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek amacıyla Na⁺, Li⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, Co²⁺ ve Zn²⁺ iyonlarının klorür tuzlarının 100 mM'lık stok çözeltileri hazırlandı. Metal iyonlarının nihai konsantrasyonları 1 mM olacak şekilde aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Sonuçlar metal iyonu içermeyen denemeden elde edilen sonuçla karşılaştırılarak metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendi.

2.4.7. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasalların Etkisi

β -Glukozidaz aktivitesi üzerine bazı kimyasalların etkisini incelenmek amacıyla Etilendiamin tetraasetikasit (EDTA), Fenilmetilsülfonilflorür (PMSF), Dithiothreitol (DTT), 2-Merkaptoetanol ve Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) kimyasallarının 100 mM'lık stok çözeltileri hazırlandı. Bu kimyasalların nihai konsantrasyonları 1 mM ve 10 mM olacak şekilde ayrı ayrı aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Sonuçlar herhangi bir kimyasal içermeyen denemeden elde edilen sonuçla karşılaştırılarak kimyasalların enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendi.

3. BULGULAR

3.1. Ham Enzim Özütünün Hazırlanması ve Aktivite Tayinleri

Climacocystis borealis makromantarından uygun deneysel yöntem kullanılarak ham özüt hazırlanmış ve daha sonra kullanılmak üzere – 20 °C’de saklanmıştır. Hazırlanan ham özütler tam berrak olmamakla birlikte yapılan ön aktivite testleri sonucu yüksek aktivite göstermişlerdir.

3.2. Doğal Jel Elektroforezi ile *C. borealis*’teki β -Glukozidaz Aktivitesinin Ortaya Konulması

Ham enzim özütündeki β -glukozidaz enzim aktivitesinin varlığı doğal poliakrilamid jel elektroforezi sonrası gerçekleştirilen substrat boyaması ile ortaya konulmuştur. Elektroferez sonunda jel 0,1 M MUG çözeltisi (substrat çözeltisi) ile boyanmıştır. Bu işlem sonunda jellerde iki bandın varlığı gözlenmiştir. Bu bantların varlığı, *p*-nitrofenil- β -D-glikozidin hidrolizinden sorumlu bir enzimin izomerleri halinde bulunduğunu veya benzer aktiviteye sahip enzimlerin varlığını göstermektedir.

3.3. Enzimin Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve İyon Değişim Kromatografisi ile Saflaştırılması

3.3.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz

Ham enzim özütü ile yapılan gradientli amonyum sülfat çöktürmesi sonrası β -glukozidaz enziminin spesifik aktivitesinin %10 ve %20’lik amonyum sülfat çöktürmeleri sonrasında oldukça yüksek , %30 ve %40’lık amonyum sülfat çöktürmeleri sonrasındaki ise oldukça azaldığı ve %50 ve üzerindeki amonyum sülfat çöktürmelerinde ise tamamen kaybolduğu görülmüştür (Tablo 4). Bunun yanında ham ekstraktın spesifik aktivitesi de çöktürme sonrası elde edilen spesifik aktivitelere göre oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca amonyum sülfat çöktürmesi sonrası elde edilen çökeleğin, hacminin 2–3 katı kadar tamponla çözülmesinden sonra bulanıklığın daha da arttığı tespit edilmiştir. Yüksek

devirde uzun zamanlı yapılan santrifüjleme işlemleri dahi bu bulanıklığı giderememiştir. Buna rağmen saflaştırma işlemlerine devam edilmiştir.

Bundan sonraki işlemlerde kullanılacak enzim çözeltisi doğrudan %40'lık amonyum sülfat çöktürmesi yapılarak elde edilmiştir. Hazırlanan enzim çözeltisi daha sonra bir gece boyunca diyalize tabi tutularak tuzların uzaklaşması sağlanmıştır. Diyaliz sonrasında da çözeltinin hala bulanık olduğu gözlenmiştir.

Tablo 4. Gradientli amonyum sülfat çöktürmesi ve spesifik aktivite değerleri

Çöktürme Yüzdesi (%)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)
Ham ekstrakt	6,10
% 10	1,40
% 20	0,43
% 30	0,04
% 40	0,06
%50	0,02
%60	0,00

3.3. 2. β -Glukozidaz Enziminin İyon Değişim Kromatografisi ile Saflaştırılması

Diyaliz sonrası elde edilen örnekler, optimum saflaştırma şartlarını (elüsyon tamponu pH'sı, akış zamanı, enzim aktivitesinin geldiği tüplerin sırası gibi) belirlemek için değişik şartlarda Q-Sefaroz içeren kolona yüklenmiş, tuz köprüsü çalıştırılmış ve fraksiyonların geldiği tüplerde enzim aktivitesi aranmıştır. Yapılan çalışmalar sonucu aynı şartlarda yapılan kolon kromatografileri sonucu elde edilen sonuçların birbirini tutmadığı, tüplerdeki aktivite düşük ve düzensiz olduğu tespit edilmiştir. Kısacası amonyum sülfat ve diyaliz sonrası elde edilen enzim özütünün Q-Sefarozun kullanıldığı kromatografik teknikle saflaştırılamayacağı kanısına varılmıştır.

3.4. Enzimin Aseton Çöktürmesi ve İyon Değişim Kromatografisi ile Saflaştırılması

3.4.1. Aseton Çöktürmesi

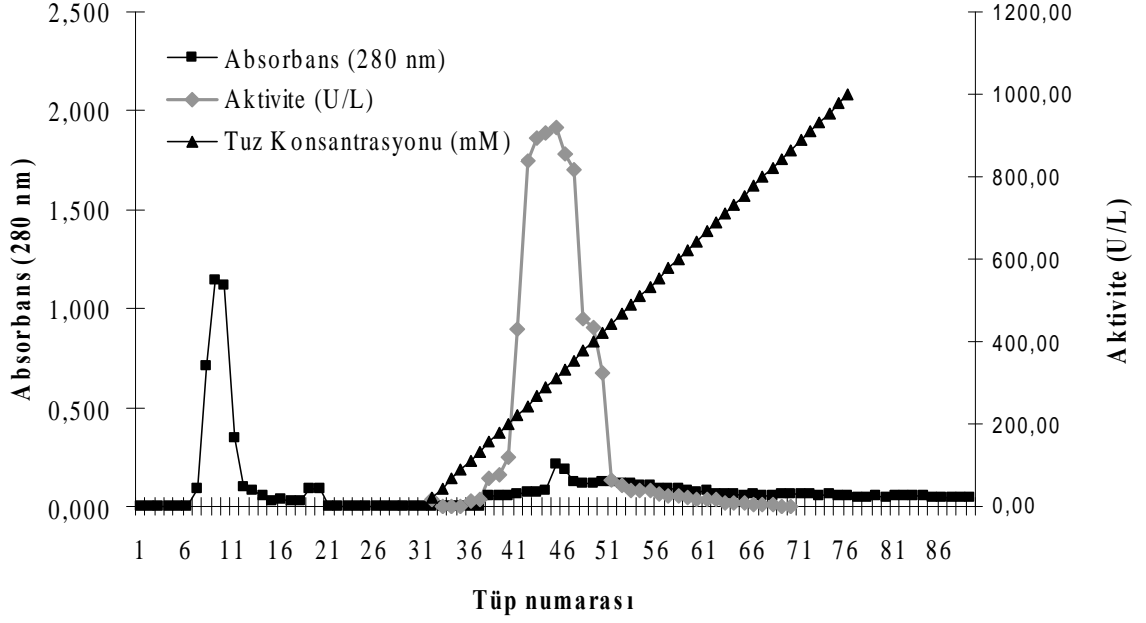
Hazırlanan ham enzim özütü soğuk aseton:su karışımı ile çöktürülmüş ve çökelek uygun tamponda çözülmüştür. Çözeltilinin, çözünmeyen maddelerin uzaklaştırılması için yapılan santrifüjlemeden sonra berrak olduğu gözlemlenmiştir. Daha sonra enzim çözeltisindeki enzim aktivitesi, spektrofotometrik olarak belirlenmiş ve enzim çözeltisi kolon kromatografisinde kullanılmak üzere 4 °C'de saklanmıştır.

3.4.2. β -Glukozidaz Enziminin İyon Değişim Kromatografisi ile Saflaştırılması

Aseton çöktürmesi sonrası elde edilen örnekler optimum saflaştırma şartlarını (elüsyon tamponu pH'sı, akış zamanı, enzim aktivitesinin geldiği tüplerin sırası gibi) belirlemek için değişik şartlarda Q-Sefaroz içeren kolona yüklenmiş, tuz köprüsü çalıştırılmış ve fraksiyonların geldiği tüplerde enzim aktivitesi aranmıştır. Yapılan çalışmalar sonucu optimum saflaştırma şartları belirlenmiş ve saflaştırma grafiği hazırlanmıştır (Tablo 5). Bu saflaştırma işlemi sonucunda enzimin yaklaşık 14 kat saflaştırıldığı görülmüştür. İyon değişim kromatografisine ait grafik Şekil 4'de gösterilmiştir.

Tablo .5 *C. borealis* 'den saflaştırılan β -glukozidaz enzimine ait saflaştırma tablosu

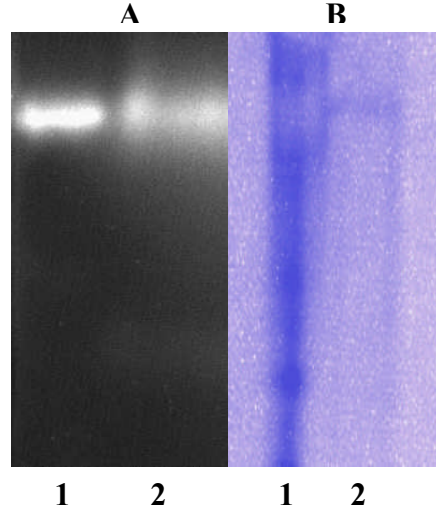
Saflaştırma Basamağı	Hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Aktivite (μ M/dak)	Toplam Aktivite	Spesifik Aktivite (U/mg)	Verim	Saflaştırma Katsayısı
Ham Enzim Özütü	43	3,54	152,2	20,1	864,3	5,68	100	1,0
Aseton Çöktürmesi	28	2,51	70,28	15,045	421,26	6,00	48,7	1,1
İyon Değişimi (Q-Seph.)	9	0,061	0,549	4,685	42,165	76,81	4,9	13,5



Şekil 4. β -Glukozidaz enziminin saflaştırılmasına ait iyon değişim kromatografisi grafiği

3.4.3. Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez

İyon değişim kromatografisi ile saflaştırılan β -glukozidaz enziminin doğal jel elektrofrez profili Şekil 5'de gösterilmiştir. Bu şekilden de görüldüğü üzere Q-Sefaroz kolonu sonrası elde edilen eluatın elektrofrez profilinde tek bandın varlığı hem aktivite hem de Comassie boyaması sonrası ortaya konulmuştur. Bu profil *C. borealis* makro mantarından β -glukozidaz enziminin tam olarak saflaştırıldığını ortaya koymaktadır.

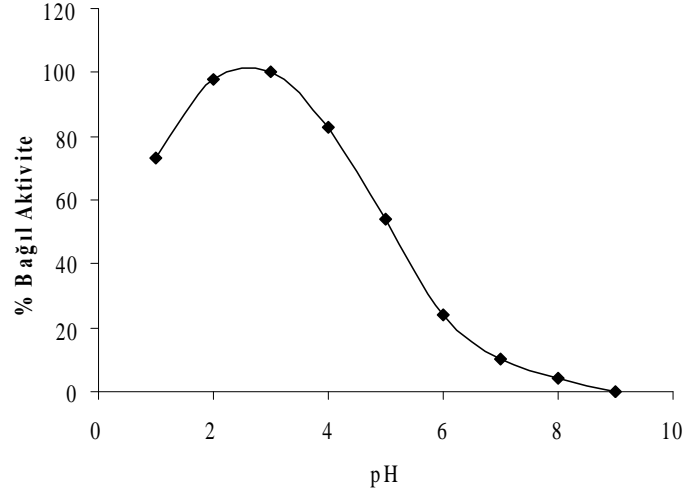


Şekil 5. *C. borealis* makromantarından saflaştırılan β -glukozidaz enziminin A) Substrat Boyama, B) Commasie Boyaması sonrası doğal jel elektroforez görüntüsü; 1) Ham ekstrakt, 2) Kolon sonrası elde edilen enzim çözeltisi.

3.5. *C. borealis*'den Saflaştırılan β -Glukozidaz Enziminin Biyokimyasal Karakterizasyonu

3.5.1. Optimum pH

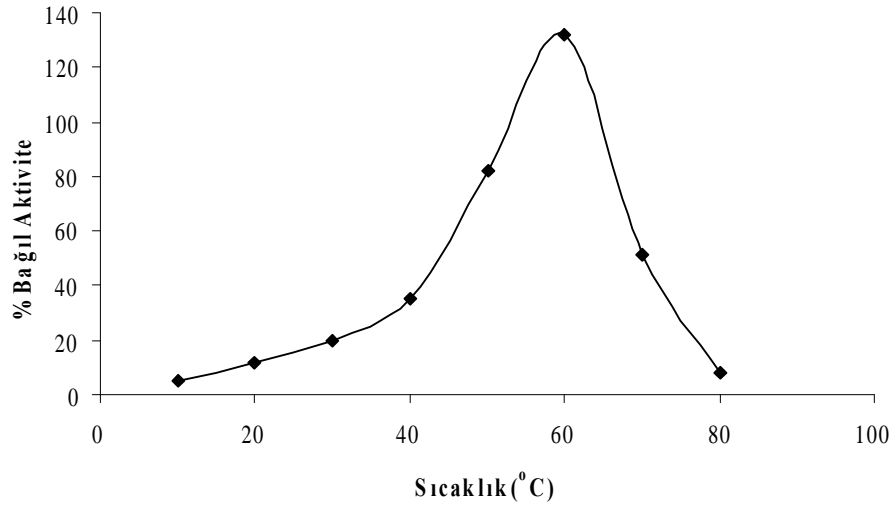
pH'nın β -glukozidaz aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacı ile farklı pH değerlerinde (1,0–9,0) tamponların kullanılmasıyla aktivite tayinleri yapıp ve % Bağıl aktivite- pH grafiği çizilmiştir (Şekil 6). β -glukozidaz aktivitesi için optimum pH değeri 3,0 olarak bulunmuştur.



Şekil 6. *C. borealis*'den saflaştırılan β -glukozidaz enzimine ait optimum pH grafiği

3.5.2. Optimum Sıcaklık

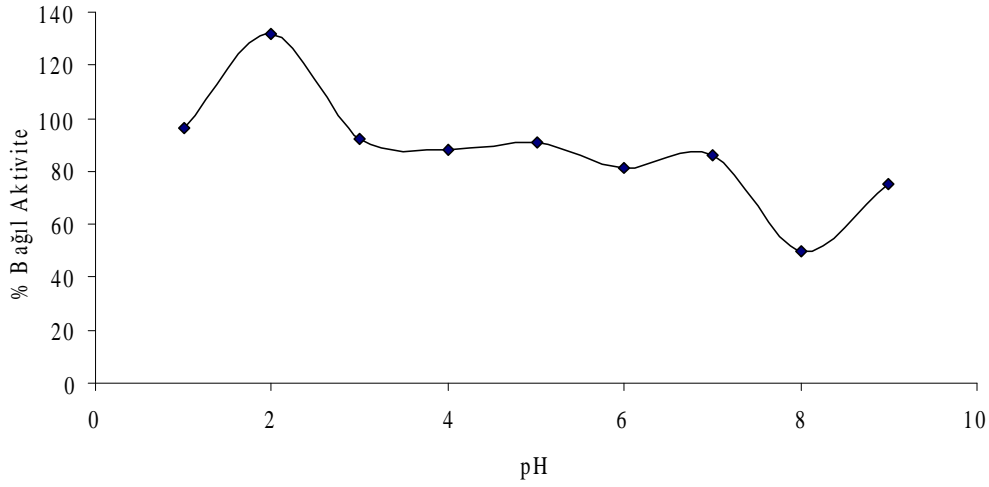
β -Glukozidaz aktivitesine ait optimum sıcaklık değerini belirlemek amacı ile 10–80°C sıcaklık aralığında 10'ar °C aralıkla aktivite tayinleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre % Bağlı aktiviteye karşı sıcaklık değerleri grafiğe geçirilmiştir (Şekil 7). Bu grafiğe göre, β -glukozidaz aktivitesine ait optimum sıcaklık değeri 60°C olarak belirlenmiştir.



Şekil 7. *C. borealis*'den saflaştırılan β -glukozidaz enzimine ait optimum sıcaklık grafiği

3.5.3. β -Glukozidaz Enziminin pH Kararlılığı

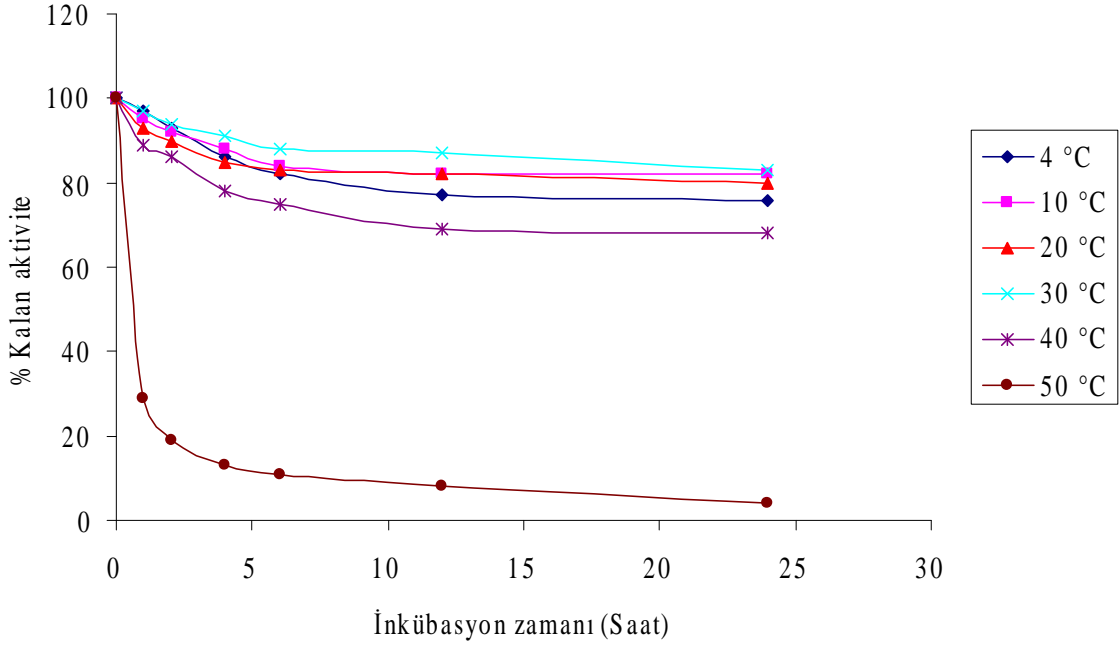
Saf enzimin farklı pH'larda ve 4 °C'de 24 saat bekletilmesi sonucu elde edilen aktivite grafiği Şekil 8'de gösterilmektedir. Bu grafikten de görüldüğü üzere enzimin kararlılığı özellikle pH 3–7 arasında oldukça yüksek oranda korunmakta, bunun dışındaki değerlerde ise yaklaşık %50 oranında azalmaktadır.



Şekil 8. *C. borealis*'den saflaştırılan β -glukozidaz enzimine ait pH kararlılık grafiği

3.5.4. β -Glukozidaz Enziminin Isıl Kararlılığı

Saf enzimin farklı zaman ve sıcaklık aralıklarında bekletilmesi sonrasında gerçekleştirilen aktivite testleri sonucu elde edilen % Bağlı aktivite-sıcaklık grafiği, Şekil 9'da gösterilmektedir. Bu şekilde, saf enzimin, 24 saatlik zaman dilimi içerisinde aktivitesini, 40 °C'ye kadar yüksek oranda koruduğu, 50 °C de ise ilk yarım saatlik zaman dilimi içerisinde yaklaşık %70 oranında kaybettiği görülmektedir. Ayrıca enzim aktivitesini, 60 °C ve yukarısında, yarım saatlik zaman dilimi içerisinde ve artan bekleme süreleri içinde büyük oranda kaybetmiştir (grafikte gösterilmemiştir).

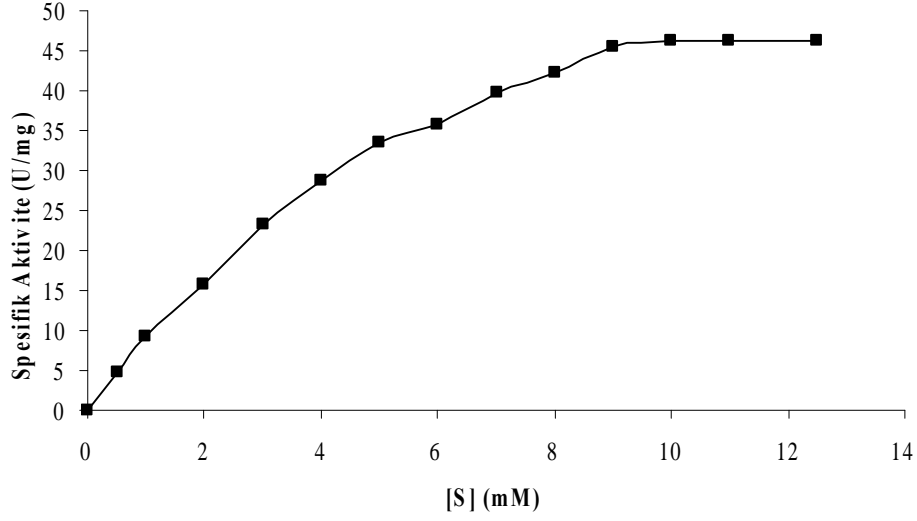


Şekil 9. *C. borealis*'den saflaştırılan β -glukozidaz enzimine ait ısıl kararlılık grafiği

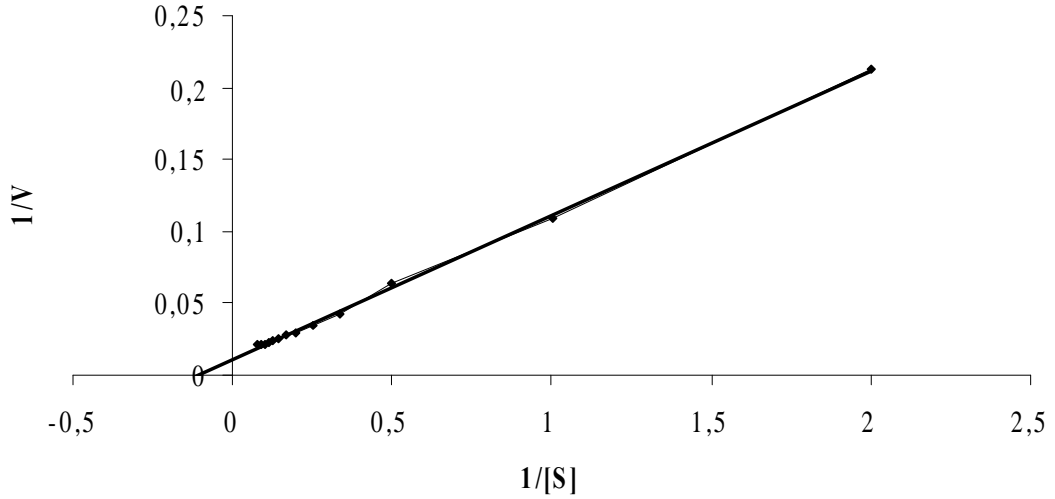
3.5.5. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

β -Glukozidaz enzim aktivitesinin substrat konsantrasyonu ile değişimini incelemek amacı ile daha önceden belirlenen optimum şartlarda, farklı substrat konsantrasyonları kullanılarak reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. β -Glukozidaz aktivitesi için 0,1–25 mM aralığında PNPG substratı kullanılmıştır. Elde edilen aktivite sonuçları kullanılarak substrat doygunluk eğrisi çizilmiştir (Şekil 10) ve β -glukozidaz aktivitesi için optimum substrat konsantrasyonu 9 mM olarak belirlenmiştir.

Kinetik verilerin belirlenmesi amacı ile ise Lineweaver-Burk grafiği çizilmiştir (Şekil 11). Bu grafikten, β -glukozidaz aktivitesi için PNPG substratı varlığında V_{maks} ve K_m değerleri sırası ile 72,46 U/mg protein ve 8,98 mM olarak bulunmuştur.



Şekil 10. PNPg varlığında β -glukozidazın substrat doygunluk eğrisi



Şekil 11. PNPg varlığında β -glukozidaz aktivitesi için Lineweaver-Burk eğrisi

3.5.6. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi

β -Glukozidaz aktivitesi üzerine metal iyonu etkisini incelemek amacıyla; Na^+ , Li^+ , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} ve Zn^{2+} iyonlarının klorür tuzlarının 100 mM'lık stok çözeltileri hazırlanmıştır. Metal iyonlarının nihai konsantrasyonları 1 mM olacak şekilde aktivite tayinleri gerçekleştirilmiştir. Kontrol olarak, optimum şartlarda metal iyonu içermeyen örneklerle aktivite tayini yapılmış ve elde edilen aktivite değeri %100 olarak kabul edilmiştir. % Kalan aktivite değeri, kontrol olarak yapılan deneme ve metal iyonu içeren denemeler

ile kıyaslanarak hesaplanmış ve sonuçlar Tablo 6’da verilmiştir. Bu sonuçlara göre, β -glukozidaz enziminin aktivitesinin Mn^{2+} iyonu mevcudiyetinde zayıf bir inhibisyona uğradığı, diğer metal iyonları durumunda ise aktivitenin önemli ölçüde değişmediği gözlenmiştir.

Tablo 6. β -Glukozidaz enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi

Metal İyonu(mM)	%Kalan Aktivite	Metal İyonu(mM)	%Kalan Aktivite
Na^+	95	Cu^{2+}	93
Li^+	90	Co^{2+}	94
Mn^{2+}	88	Zn^{2+}	93

3.5.7. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasalların Etkisi

β -Glukozidaz aktivitesi üzerine bazı kimyasalların etkisini incelenmek amacıyla; Etilendiamin tetraasetikasit (EDTA), Fenilmetilsülfonilflorür (PMSF), Dithiothreitol (DTT), 2-Merkaptoetanol ve Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) kimyasallarının 100 mM’lık stok çözeltileri hazırlanmıştır. Bu kimyasalların nihai konsantrasyonları 1 mM ve 10 mM olacak şekilde ayrı ayrı aktivite tayinleri gerçekleştirilmiştir. Kontrol olarak, herhangi bir kimyasal içermeyen aktivite denemesi yapılmış ve bu aktivite değeri %100 olarak kabul edilmiştir. % Kalan aktivite değeri, kontrol olarak yapılan deneme ve kimyasal içeren denemeler ile kıyaslanarak hesaplanmış ve sonuçlar Tablo 7’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre, β -glukozidaz enzim aktivitesinin farklı kimyasallar mevcudiyetinde farklı oranlarda inhibe olduğu gözlemlenmiştir.

Tablo 7. β -Glukozidaz enzimi aktivitesi üzerine kimyasalların etkisi

Kimyasallar(1mM)	%KalanAktivite	Kimyasallar(10mM)	%KalanAktivite
EDTA	85	EDTA	64
PMSF	78	PMSF	79
DTT	94	DTT	66
2-Merkaptoetanol	88	2-Merkaptoetanol	88
SDS	3	SDS	0

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, Trabzon ilinin Hıdırnebi yaylasından toplanan *Climacocystis borealis* mantarından hazırlanan ham özütte β -glukozidaz enziminin varlığı tespit edilmiş, iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılmış ve saf enzim biyokimyasal olarak karakterize edilmiştir. Elde edilen veriler diğer çalışmalardaki β -glukozidazlar ile mukayese edilmiştir.

C. borealis mantarından hazırlanan ham özütteki β -glukozidaz aktivitesini tespit etmek için yapılan doğal protein poliakrilamid jel elektroforezinde iki bandın varlığı gözlemlenmiştir. Ham özütün sahip olduğu β -glukozidaz aktivitesini ortaya koymak için substrat olarak PNPG kullanıldı. Daha önce yapılan çalışmalara bakıldığında; *Fusarium oxysporum*'dan izole edilen β -glukozidaz aktivitesini tespit etmek için de PNPG substratının kullanıldığı görüldü (Christakopoulos vd., 1994). Diğer yandan β -glukozidaz enziminin belirlenmesinde farklı substratlar varlığında yapılan çalışmalarında mevcut olduğu görülmüştür. Selulotik bir mantar olan *Stachybotrys sp.*'den izole edilen β -glukozidaz enziminin salisine karşı aktivitesi gözlemlenmiştir (Amouri ve Gargouri, 2006).

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda mantar, maya ve bakteri gibi birçok organizmadan β -glukozidaz enzimi saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Örneğin metilotrofik bir maya olan *Pichia pastoris*'den (Turan ve Zheng, 2004) ve *Aspergillus niger*'den Q-sefaroze kullanılarak iyon değişim kromatografisi ile β -glukozidaz enzimleri saflaştırılmıştır. *Aspergillus niger*'den saflaştırılan enzimin aktivitesinin 13 kat arttığı tespit edilmiştir (Rashid ve Siddiqui, 1997). Olgun tatlı kirazdan yapılan bir diğer çalışmada da β -glukozidaz enzimi Q-sefaroze kullanılarak saflaştırılmış ve saflaştırma katsayısı 7 olarak bulunmuştur (Gerardi vd., 2001). Bunların dışında ayrıca β -glukozidaz enzimi bir bal arısı türü olan *Apis mellifera*, bir maya türü olan *Metschnikowia pulcherrima*, küf mantarı türleri olan *Aspergillus niger* ve *Acremonium persicinum* gibi organizmalardan da benzer yöntemlerle saflaştırılmıştır.

C. borealis'den iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılan β -glukozidaz enziminin pH'ya bağımlılığı incelendiğinde, optimum pH değerinin 3,0 olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 6). *Aspergillus aculeatus* ile yapılan diğer bir çalışmada da yine aynı optimum pH değeri gözlemlenmiştir (Murao vd., 1988). Farklı çalışmalarda, β -glukozidaz enziminin sahip olduğu optimum pH değerleri, *Thermotoga maritima* için 3,0 (Kim vd., 2006), *Aspergillus wentii* için 3,5 (Srivastava vd., 1984), *Phytophthora infestans* için 4,0 (Brunner

vd., 2002), *Citrus sinensis* için 4,5 (Barbagallo vd., 2007), *Zea mays* için 5,0 (Feldwisch vd., 1994) olarak tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen çalışmalara dayanarak, karakterize edilen β -glukozidaz enzimlerinin optimum pH değerinin çoğunlukla 3,5–6,0 aralığında olduğu söylenebilir. β -glukozidaz enzimi için pH kararlılığı incelendiğinde, enzimin kararlılığını özellikle pH 3,0–7,0 arasında oldukça yüksek oranda korumakta olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 8). *C. sinensis*'den izole edilen β -glukozidaz enzimi için belirlenen pH kararlılığını bu yapılan çalışmayla paralellik göstererek, pH 3,0-7,0 arasında olduğu görülmüştür (Barbagallo vd., 2007). *C. borealis*'den saflaştırılan β -glukozidaz enzimine ait pH kararlılık grafiği incelendiğinde, pH 3,0–7,0 arasındaki değerler dışında aktivitenin yaklaşık %50 oranında azaldığı görülmüştür (Şekil 8). Bu sonuçlar değerlendirildiğinde *C. borealis*'den saflaştırılan β -glukozidaz enzimin aktivitesini geniş bir pH aralığında kaybetmediği anlaşılmıştır.

C. borealis'den saflaştırılan β -glukozidaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla yapılan denemelerde optimum sıcaklığın 60°C olduğu gözlenmiştir (Şekil 7). Tespit edilen bu sıcaklığın bir makro mantar için yüksek olduğu düşünülse de yapılan diğer benzer çalışmalarda benzer sonuçlar gözlemlenmiştir. Benzer bir çalışmada *C. sinensis* için optimum sıcaklık 65 °C (Barbagallo vd., 2007) olarak bulunmuştur. Farklı organizmalarla yapılan çalışmalarda; *Aspergillus wentii* için optimum sıcaklık 60°C (Srivastava vd., 1984), *Daldinia eschscholzii* için optimum sıcaklık 50°C (Karnchanatat vd., 2007), papaya meyvesinden saflaştırılan β -glukozidaz enzimi için optimum sıcaklık ise 50°C (Hartmann-Schreier ve Schreier, 1986) olarak bulunmuştur. *C. borealis*'den saflaştırılan β -glukozidaz enziminin ısı kararlılığı incelendiğinde, saf enzimin, 24 saatlik zaman dilimi içerisinde aktivitesini 40 °C'ye kadar yüksek oranda koruduğu, 50 °C de ise ilk yarım saatlik zaman dilimi içerisinde yaklaşık %70 oranında kaybettiği görülmektedir (Şekil 9). Benzer çalışmalar incelendiğinde *C. sinensis*'den izole edilen β -glukozidaz enziminin aktivitesini 30-40°C'ye kadar yüksek oranda koruduğu, 60°C'de ise enzimin aktivitesini %85 oranında kaybettiği gözlemlenmiştir (Barbagallo vd., 2007). *Daldinia eschscholzii*'den saflaştırılan β -glukozidaz enziminin ısı kararlılığına bakıldığında profilinin 30-60°C olduğu görülmüştür (Karnchanatat vd., 2007).

β -Glukozidaz enzim aktivitesinin substrat konsantrasyonu ile değişimini incelemek amacı ile daha önceden belirlenen optimum şartlarda, farklı substrat konsantrasyonları kullanılarak reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. β -Glukozidaz aktivitesi için 0,1–25 mM aralığında PNPG substratı kullanılmıştır. PNPG varlığında gerçekleştirilen aktivite

tainlerinden elde edilen değerler kullanılarak çizilen Lineweaver-Burk eğrisinden V_{maks} ve K_m değerleri sırasıyla 72,46 U/mg ve 8,98 mM olarak bulunmuştur (Şekil 10 ve 11). Yapılan diğer bazı çalışmalar incelendiğinde, papaya meyvesinden saflaştırılan β -Glukozidaz enzimi için PNPG varlığında belirlenen K_m değerinin 0,01 mM ve V_{maks} değerinin 3,37 U/mg olduğu gözlemlenmiştir (Hartmann-Schreier ve Schreier, 1986). *Citrus sinensis*'den izole edilen β -glukozidaz enziminin yine PNPG varlığında belirlenen K_m değerinin 0,267 mM olarak bulunduğu grlmştir (Barbagallo vd., 2007).

Birçok enzim, aktivitesi için kofaktör olarak metal iyonlarına ihtiyaç duyar. Metal iyonları farklı koordinasyon sayılarına, yaptıkları bileşiklerde farklı koordinasyon geometrisine ve Lewis asidi potansiyeline sahip olabilirler. Bu sebeple metal iyonları proteinler karşısında farklı ligand özellikleri gösterebilir ve proteinlerin farklı bölgelerine bağlanabilirler. Bunun sonucunda da enzim aktivitesini farklı şekilde etkileyebilirler (akmak, 2008). *C. borealis*'den saflaştırılan β -glukozidaz enziminin aktivitesinin Mn^{2+} iyonu mevcudiyetinde zayıf bir inhibisyonuna uğradığı, diğer metal iyonları durumunda ise aktivitenin önemli ölçüde değişmediği gözlenmiştir. β -glukozidaz enziminin en yüksek aktivitesi ise Na^+ iyonu varlığında gözlemlenmiştir (Tablo 6).

C. borealis'den saflaştırılan β -glukozidaz enziminin aktivitesinin farklı kimyasallar mevcudiyetinde, ne şekilde değiştiğini gözlemlemek amacıyla bir dizi reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyonlarda EDTA, PMSF, DTT, 2-Merkaptoetanol ve SDS kimyasalları kullanılmıştır. Bu sonuçlara göre, EDTA'nın artan konsantrasyonu ile birlikte aktivitenin de azaldığı tespit edilmiştir. Serin birimlerini slfolayan ve enzim aktivitesini inhibe eden PMSF (akmak, 2008) varlığında aktivitenin azaldığı gözlemlenmiştir. Bu inhibisyonun serinin katalitik grubun bir yesi olduğu sonucunu ortaya koyabilir (akmak, 2008). DTT'nin artan konsantrasyonu ile aktivitenin azaldığı grlmştir. Disülfür köprülerini indirgeyen DDT'nin (akmak, 2008) aktiviteyi azaltması, disülfür köprülerinin aktivite için gerekli olduğu sonucunu ortaya koyabilir. SDS varlığında ise aktivitenin tamamıyla azaldığı tespit edilmiştir (Tablo 7).

Bütün sonuçlar değerlendirildiğinde, *C. borealis*'den saflaştırılan β -glukozidaz enziminin aktivitesinin mevcudiyeti ortaya konulmuştur. Diğer alışmalar ile kıyaslamalar göz önünde bulundurulduğunda saflaştırılan diğer β -glukozidazlar ile *C. borealis*'den saflaştırılan β -glukozidaz enziminin pek çok benzer yönünü olduğu grlmştir.

5. ÖNERİLER

Enzimler doğanın katalizörleridirler ve dolayısıyla enzimsiz bir hayatın var olması düşünülemez. Endüstride enzim kullanımının gün geçtikçe yaygınlaşması, çok değişik kaynaklardan enzimlerin saflaştırılması ve karakterizasyonunu da beraberinde getirmektedir. Günümüzde enzim katalizli prosesler daha hızlı, daha ekonomik, çevre dostu, ürün verimi oldukça yüksek ve safsızlık oluşumu oldukça düşük olduğundan, endüstriyel ve klinik uygulamalarda kimyasal reaksiyonlara kıyasla daha fazla tercih edilmektedirler.

Fosil yakıtlarının hızla tükenmesi, sera gazı emisyonu ve fosil yakıtların tam olarak yanmaması sonucu oluşan hava kirliliği lignoselülozik materyalden biyoetanol üretimi üzerine ilginin artmasına neden olmuştur. Özellikle selülozları kullanarak lignoselülozik materyalin enzimatik hidrolizi mümkündür. Böylece selülozik biyokütle glukoza çevrilir ve glukoz da etanol üretimi için kullanılır. Biyoetanol üretim proseslerinin ekonomik olması için ise kullanılan hidroliz enzimlerinin üretim maliyetlerinin düşürülmesi ve enzim etkinliklerinin artırılması gerekmektedir. Tekstil endüstrisinde pamuğun yumuşatılması ve kotların taşlaması, selülozik giysilerin genel kalitesinin, parlaklığının ve pürüzsüzlüğünün artırılması, deterjan sektöründe renklerin korunması, temizleme ve çökmeyi önleyici olarak, yiyecek endüstrisinde lapa yapımı, meyve suyu ve bira filtrasyonunda ve yağ ekstraksiyonunda veriminin artırılması, kağıt ve küspe endüstrilerinde akışkanlığın artırılması ve liflerin modifiye edilmesi, fırın ürünlerinin ve hayvan yemlerinin besinsel değerinin artırılması, geri dönüşüm kağıtlarının özelliklerinin geliştirilmesi (mürekkeplerin çıkarılması gibi), kahvenin ticari olarak işlenmesi, ilaç endüstrisi (insan midesinde bulunan bir selüloz formu olan fitobezoarların tedavisi gibi) selulotik enzimlerin endüstride ne derecede önemli olduğunun birer göstergesidir.

Gerçekleştirilen bu çalışmada *Climacocystis borealis*'den hazırlanan ham özütten β -glukozidaz enzimi iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılmış ve enzimin biyokimyasal olarak karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Bundan sonra yapılabilecek olan çalışmalar, saflaştırılan β -glukozidaz enziminin endüstriyel koşullara uygunluğunun ayrıntılı olarak anlaşılması için ısıl kararlılığının ayrıntılı bir şekilde incelenmesi, çeşitli kimyasal maddeler mevcudiyetinde davranışının incelenmesi ve inhibisyon mekanizmalarının yine ayrıntılı bir şekilde ortaya konması

şeklinde sıralanabilir. Ayrıca saflaştırılan enzimin N- ve C- ucu sıra analizleri yapılarak enzimi kodlayan gen klonlanarak uygun bir konakçı hücrede ekspres edilebilir. Böyle bir çalışmanın devamında ise rekombinant β -glukozidaz enziminin katı bir destek üzerine immobilizasyonu da gerçekleştirilebilir.

6. KAYNAKLAR

- Amouri, B. ve Gargouri, A., 2006. Characterization of a Novel β -glucosidase from a *Stachybotry strain*, Biochemical Engineering Journal., 32, 191-197.
- Barbagallo, R.N., Palmeri, R., Fabiano, S., Rapisarda, P. ve Spagna, G., 2007. Characteristic of β -glucosidase from Sicilian Blood Oranges in Relation to Anthocyanin Degradation , DOFATA, 98.
- Beguín, P., Cornet, P. ve Aubert, J.P., 1985. Sequence of a Cellulase Gene of the Thermophilic Bacterium *Clostridium Thermocellum*, J. Bacteriol., 162, 102–105.
- Bhat, K.M., McCrae, S.I. ve Wood, T.M., 1989. The Endo-(1-4)-1,3-D-Glucanase System *Openicillium Pinophilum* Cellulase: İsolation, Purification and Characterization of Five Major Endoglucanase Components, Carbohydr. Res., 190, 279-297.
- Bhat, M.K., 2000. Cellulases and Related Enzymes in Biotechnology, Biotechnol. Adv., 18, 355–383.
- Bhat, M.K. ve Bhat, S., 1997. Cellulose Degrading Enzymes and Their Potential İndustrial Applications, Biotechnol. Adv., 15, 583–620.
- Boztok, K., 1990. Mantar Üretimi Tekniği, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, 489, 168, İzmir.
- Brunner, F., Wirtz, W., Rose, J.K.C., Darvill, A.G., Govers, F., Scheel, D. ve Nurnberger, T., 2002. A Beta-Glucosidase/Xylosidase from the Phytopathogenic Oomycete, *Phytophthora Infestans*, Phytochemistry, 59, 689-696.
- Chang, S.T. ve Miles, P.G., 1989. Edible Mushrooms and Their Cultivation, CRC Press, Florida, USA.
- Chapin III, F.S., Matson, P.A. ve Money, H.A., 2002. Principles of Terrestrial Ecosystem Ecology, Springer-Verlag, New York.
- Cherry, J.R. ve Fidantsef, A.L., 2003. Directed Evolution of İndustrial Enzymes: An Update, Curr. Opin. Biotechnol., 14, 438–443.
- Christakopoulos, P., Goodenough, M., Kekos, D., Macris, B.J., Cloeyssens, M. ve Bhat, M.K., 1994. Purification and Characterization of an Extracellular β -Glucosidase with Transglycosylation and Exoglucosidase Activities from *Fusarium Oxysporium* , Eur. J. Biochem., 224, 379-385.
- Crennell, S.J., Hreggvidsson, G.O. ve Karlsson, E.N., 2002. The Structure of *Rhodothermus marinus* Cell12A, a Highly Thermostable Family 12 Endoglucanase, at 1.8 Å Resolution, J. Mol. Biol., 320, 883-897.

- Çakmak, Ü., 2008. *Amanita Vaginata Var. Vaginata* Ve *Tricholoma Terreum* Mantarlarındaki Esterolitik Aktiviteden Sorumlu Enzimlerin Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 2008.
- Demain, A.L., Newcomb, M. ve Wu, J.H.D., 2005. Cellulase, Clostridia, and Ethanol, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 69, 124–154.
- Duan, X., Shuyan, L., Xuemei, L. ve Peiji, G., 2006. A Novel Thermophilic Endoglucanase from a Mesophilic Fungus *Fusarium Oxysporum*, Chinese Science Bulletin, 51, 191-197.
- Eriksson, K.E., 1978. Enzyme Mechanisms Involved in Cellulose Hydrolysis by the Rot Fungus *Sporotrichum Pulverulentum*, Biotechnol. Bioeng., 70, 317-332.
- Feldwisch, J., Vente, A., Zettl, R., Bako, L., Campos, N. ve Palme, K., 1994. Characterization of Two Membrane-Associated Beta-Glucosidases from Maize (*Zea Mays* L.) Coleoptiles, Biochem. Journ., 302, 15-21.
- Foong, F., Hamamoto, T., Shoseyov, O. ve Doi, R.H., 1991. Nucleotide Sequence and Characteristics of Endoglucanase Gene Engb from *Clostridium Cellulovorans*, J. Gen. Microbiol., 137, 1729–1736.
- Geimba, P.M., Riffel, A., Agostini, V. ve Brandelli, A., 1999. Characterisation of Cellulose-Hydrolysing Enzymes from the Fungus *Bipolaris Sorokiniana*. J. Sci. Food Agric., 79, 1849-1854.
- Gerardi, C., Blando, F., Santino, A. ve Zacheo, G., 2001. Purification and Characterisation of a β -Glucosidase Abundantly Expressed in Ripe Sweet Cherry (*Prunus Avium* L.) Fruit, Plant science, 160, 795-805.
- Guasch, A., Vallmitjana, M., Pérez, R., Querol, E., Pérez-Pons, J.A. ve Coll, M., 1999. Cloning, Overexpression, Crystallization and Preliminary X-Ray Analysis of a Family 1 B-Glucosidase from *Streptomyces*, Acta Cryst., 55, 679-682 .
- Hartmann-Schreier, J. ve Schreier, P., 1986. Purification and Partial Characterization of Beta-Glucosidase from Papaya Fruit, Phytochemistry, 25, 2271-2274.
- Hilden, L. ve Johansson, G., 2004. Recent Developments on Cellulases and Carbohydrate-Binding Molecules with Cellulose Affinity, Biotechnol. Lett., 26, 1683-1693.
- Hu, Y., Luan, H., Hao, D., Xiao, H., Yang, S. ve Yang, L., 2007. Purification and Characterization of a Novel Ginsenoide-Hydrolyzing β -D-Glucosidase from the China White Jade Snail (*Achatina Fulica*), Enzyme and Microbial Technology, 40, 1358-1366.
- Jorgensen, H., Eriksson, T., Börjesson, J., Tjerneld, F. ve Olsson, L., 2003. Purification and Characterization of Five Cellulases and One Xylanase from *Penicillium Brasilianum*, IBT 20888, Enzyme and Microbial Technology, 32, 851-861.

- Karnchanatat, A., Petsom, A., Sangvanich, P., Piaphukiew, J., Whalley, A.J., Reynolds, C.D. ve Sihanonth, P., 2007. Purification and Biochemical Characterization of an Extracellular Beta-Glucosidase from the Wood-Decaying Fungus *Daldinia Eschscholzii* (Ehrenb.:Fr.) Rehm, FEMS Microbiol. Lett., 270, 162-170.
- Kim, B., Singh, S.P. ve Hayashi, K., 2006. Characteristics of Chimeric Enzymes Constructed between *Thermotoga Maritima* and *Agrobacterium Tumefaciens* Beta-Glucosidases: Role Of C-Terminal Domain in Catalytic Activity, Enzyme Microb. Technol., 38, 952-959.
- Kirk, O., Borchert, T.V. ve Fuglsang, C.C., 2002. Industrial Enzyme Applications, Curr Opin., 45, 326-329.
- Kranzlin, F., 2005. Fungi of Switzerland, 2, 331, Verlag Mykologia Luzern.
- Krogh, K.B.R., Mørkeberg, A., Jørgensen, H., Frisvad, J.C. ve Olsson, L., 2004. Screening Genus *Penicillium* for Producers of Cellulolytic and Xylanolytic Enzymes, Appl. Biochem. Biotechnol., 113, 389-401.
- Kongruang, S., Bothwell, K. M., Mcguire, J., Zhou, M. ve Haugland, R.P., 2002. Assaying the Activities of *Thermomonospora Fusca* E₅ and *Trichoderma Reesei* CBHI Cellulase Bound to Polystyrene, Enzyme and Microbial Technology, 32, 539-545.
- Kubicek, C.P., Muhlbauer, G., Krotz, M., John, E. ve Kubicek-Pranz, E.M., 1988. Properties of a Conidial Bound Cellulase Enzyme System from *Trichoderma Reesei*, J.Gen. Microbiol., 134, 1215-1222.
- Latham, M.J., Brooker, B.E., Pettipher, G.L. ve Harris, P.J., 1978. *Ruminococcus Flavefaciens* Cell Coat and Adhesion to Cotton Cellulose and to Cell Walls in Leaves of Perennial Ryegrass (*Lolium Perenne*), Appl. Environ. Microbiol., 35, 156-165.
- Ledger, T.N., Jaubert, S., Bosseluta, N., Abada, P. ve Rosso, M.N., 2006. Characterization of a New B-1,4-Endoglucanase Gene from the Root-Knot Nematode *Meloidogyne Incognita* and Evolutionary Scheme for Phytonematode Family 5 Glycosyl Hydrolases, Gene, 382, 121-128.
- Lemaire, M. ve Beguin, P., 1993. Nucleotide Sequence of the CelG Gene of *Clostridium Thermocellum* and Characterization of Its Product, Endoglucanase CelG. J. Bacteriol., 175, 3353-3360.
- Li, X., Pei, J., Wu, G. ve Shao, W., 2005. Expression, Purification and Characterization of a Recombinant Beta-Glucosidase from *Volvariella Volvacea*, Biotechnol Lett., 27, 1369-1373.

- Mccarter, J.D., Grace, M.E., Grabowski, G.A., Aebersold, R. ve Withers, S.G., 1994. Identification of Glu340 as the Active-Site Nucleophile in Human Glucocerebrosidase by Use of Electrospray Tandem Mass Spectrometry, J. Biol. Chem., 15, 10975-10978.
- Mcltale, A. ve Coughlan, M.P., 1980. Synergistic Hydrolysis of Cellulose by Components of the Extracellular Cellulase System of *Talaromyces Emersonii*, FEBS Lett., 117, 319-322.
- Miles, P. ve Chang, S. T., 1997. Mushroom Biology, Concise Basics and Current Developments, World Scientific.
- Mirzaakhmedov, S.Y., Ziyavitdinov, Z.F., Akhmedova, Z.R., Saliev, A.B. ve Ruzmetova, D.T., 2007. Isolation, Purification, and Enzymatic Activity of Cellulase Components of the Fungus *Aspergillus Terreus*. Chemistry of Natural Compounds, 43, 594-597.
- Murao, S., Sakamoto, R. ve Arai, M., 1988. Cellulases of *Aspergillus Aculeatus*, Methods Enzymol., 160, 274-299.
- Nakkharat, P. ve Haltrich, D., 2006. Purification and Characterisation of an Intracellular Enzyme with β -Galactosidase Activity from the Thermophilic Fungus *Talaromyces Thermophilus* CBS 236.58, Journal Of Biotechnology, 123, 304-313.
- Nazir, A., Soni, R., Saini H, S., Manhas, R. K. ve Chadha , B. S., 2009. Purification and Characterization of an Endoglucanase from *Aspergillus Terreus* Highly Active Against Barley Glucan and Xyloglucan, World J. Microbiol. Biotechnol., 2, 191-197.
- Okamoto, K., Nakato, H., Yatake, T., Kiso, T. ve Kitahata, S., 2000. Purification and Some Properties of a Beta-Glucosidase from *Flavobacterium Johnsonae*, Biosci. Biotechnol. Biochem., 64, 2, 333-340.
- O'Neill, G.P., Goh, S.H., Warren, R.A.J., Kilburn, D.G. ve Miller, R.C., 1986. Structure of the Gene Encoding the Exoglucanase of *Cellulomonas Fimi*, Gene, 44, 325-340.
- Parry, N.J., Beeverb, D.E., Owenb, E., Nerinckxc, W., Claeysensc, M., Van Beeumenc, J. ve Bhat, M.K., 2002. Biochemical Characterization and Mode of Action of a Thermostable Endoglucanase Purified from *Thermoascus Aurantiacus*, Arch. Biochem. Biophys., 404, 243-253.
- Percival, Y.H., Michael, Z., Himmelb, E. ve Mielenzc, J.R., 2006. Outlook for Cellulase Improvement: Screening and Selection Strategies, Biotechnology Advances, 452-481.
- Pontoh, J. ve Low, N.H., 2002. Purification and Caharacterization of Beta-Glucosidase from Honey Bees (*Apis Mellifera*), Insect Biochem. and Mol., 32, 679-690.

- Priest, F.G., 1977. Extracellular Enzyme Synthesis in the Genus *Bacillus*, Bacteriol. Rev., 41, 711–753.
- Qin, Y., Wei, X., Liu, X., Wang, T. ve Qu, Y., 2007. Purification and Characterization of Recombinant Endoglucanase of *Trichoderma Reesei* Expressed in *Saccharomyces Cerevisiae* with Higher Glycosylation and Stability.
- Rashid, M. H. ve Siddiqui, K. S., 1997. Purification and Characterization of a β -Glucosidase from *Aspergillus Niger*, Folia Microbiol., 42, 544-550.
- Rosgaard, L., 2006. Efficiency of New Fungal Cellulase Systems in Boosting Enzymatic Degradation of Barley Straw Lignocellulose, Biotechnol. Prog., 22, 493–498.
- Saddler, J.N. ve Khan, A.W., 1981. Cellulolytic Enzym System of *Acetivibrio Cellulolyticus*, Can. J. Microbiol., 27, 288-294.
- Shaukat, F., 2002. Kinetics of B-Glucosidase Production by *Escherichia Coli* Recombinants Harboring Heterologous Bgl Genes, Biotechnol. Lett., 24, 1803–1806.
- Spano, L., 1978. In "Proceeding of 2nd Annual Symp. on Fuels From Biomass" Ed. Shuster, W.W., John Willey And Sons, New York, 671-684.
- Srivastava, S.K., Gopalkrishnan, K.S. ve Ramachandran, K.B., 1984. Kinetic Characterization of a Crude Beta-D-Glucosidase from *Aspergillus Wentii* Pt 2804, Enzyme Microb. Technol., 6, 508-512.
- Sun, Y. ve Cheng, J., 2002. Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production, Bioresource Technology, 83, 1–11.
- Suto, M. ve Tomita, F., 2001. Induction and Catabolite Repression Mechanisms of Cellulase in Fungi, J. Bios. Bioeng., 92, 305-311.
- Thongekkaew, J., Ikeda, H., Masaki, K. ve Iefuji, H., 2008. An Acidic and Thermostable Carboxymethyl Cellulase from the Yeast *Cryptococcus* Sp. S-2: Purification, Characterization and Improvement of Its Recombinant Enzyme Production by High Cell-Density Fermentation of *Pichia Pastoris*, Protein Expression and Purification, 60, 140-146.
- Toth, B., 1995. Mushroom Toxins and Cancer (Review), Int. J. Oncol., 6, 137.
- Turan, Y. ve Zheng, M., 2005. Purification and Characterization of an Intracellular beta-Glucosidase from the Methylophilic Yeast *Pichia Pastoris*, Biochemistry, 70, 1363-1368.
- URL-1. <http://www.fao.org/docrep/w7241e/w7241e08.htm>, FAO Corporate Dökümantasyon Havuzu, 8 Haziran 2009.

- URL-2. <http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>, Encor Biotechnology Inc., 8 Haziran 2009.
- Wang, T., Liu, X., Yu, Q., Zhang, X., Qu, Y., Gao, P. ve Wang, T., 2005. Directed Evolution for Engineering Ph Profile of Endoglucanase III from *Trichoderma Reesei*, Biomol. Eng., 22, 89-94.
- Wasser, S.P. ve Weis, A.L., 1999. Therapeutic Effects of Substances Occurring in Higher *Basidiomycetes* Mushrooms: a Modern Perspective. Crit. Rev. Immunol., 19, 65-96.
- Wolfenden, R. ve Snider, M.J., 2001. The Depth of Chemical Time and the Powder of Enzyme as Catalysts, Acc. Chem. Res., 34, 938-945.
- Wood, T.M. ve McCrae, S.L., 1977. Cellulase from *Fusarium Solani*: Purification and Properties of the C1 Component, Carbohydr. Res., 57, 117-133.
- Wood, T.M. ve McCrae, S.L., 1982. Purification and Some Properties of the Extracellular J3-Glucosidase of the Cellulolytic Fungus, *Trichoderma Koningii*, Gen. Microbiol., 128, 2973-2982.
- Yu, H.L., Xu, J.H., Lu, W.Y. ve Lin, G.Q., 2007. Identification, Purification and Characterization of Beta-Glucosidase from Apple Seed as a Novel Catalyst for Synthesis of O-Glucosides, Enzyme Microb. Technol., 40, 354-361.

ÖZGEÇMİŞ

12.07.1975 yılında Almanya'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini İzmir'de tamamladı. 1994 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya bölümünde lisans eğitimine başladı ve lisans öğrenimini 1998 yılında tamamladı. 2006 yılında K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. İyi derecede İngilizce bilmekte olup, evli ve bir erkek çocuğuna sahiptir.