

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

***Armillaria mellea*'dan  $\beta$ -GLUKOZİDAZ ENZİMİNİN KISMİ OLARAK  
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Ayşe TURAN**

**HAZİRAN 2011  
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

***Armillaria mellea*'dan  $\beta$ -GLUKOZİDAZ ENZİMİNİN KİSMİ OLARAK  
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**Kimyager Ayşe TURAN**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde  
"YÜKSEK LİSANS (KİMYA)"  
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 18.05.2011  
Tezin Savunma Tarihi : 09.06.2011**

**Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA**

**Trabzon 2011**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Kimya Anabilim Dalında**

**Ayşe TURAN tarafından hazırlanan**

***Armillaria mellea*'dan  $\beta$ -GLUKOZİDAZ ENZİMİNİN KISMİ OLARAK  
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 24 / 05 / 2011 gün ve 1406 sayılı  
kararıyla oluşturulan jüri tarafından 09 / 06 / 2011 tarihinde yapılan sınavda**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**olarak kabul edilmiştir.**

**Jüri Üyeleri**

**Başkan : Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK .....**

**Üye : Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI .....**

**Üye : Yrd. Doç. Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA .....**

**Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ**

**Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ

“*Armillaria mellea*’dan  $\beta$ -Glukozidaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu” adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında yapılmış olup, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Yüksek Lisans tez danışmanlığımı üstlenerek bu çalışmanın planlanıp değerlendirilmesinde desteğini ve bilgisini benden esirgemeyen değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA’ya ve tez çalışmalarım sırasında yardımlarını ve ilgisini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK’a teşekkürlerimi sunarım. Tezin hazırlanmasında ve geliştirmesinde büyük katkısı olan Öğr. Gör. Dr. Yakup KOLCUOĞLU’na, Dr. Melike YILDIRIM AKATIN’a ve Biyokimya Laboratuvarında çalışan tüm arkadaşlarıma teşekkür ve minneti borç bilirim. Biyoloji Bölümü Arş. Gör. Fulya AY’a yardımlarından dolayı teşekkürlerimi sunarım. Çalışma esnasında kullandığımız mantarın karakterizasyonunda yardımcı olan, Konya Selçuk Üniversitesi, Ahmet Keleşoğlu Eğitim Fakültesi, İlköğretim Bölümü, Fen Bilgisi Öğretmenliği Öğretim Üyesi sayın Doç. Dr. Dursun YAĞIZ’a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmama sağladıkları maddi destekten ötürü, Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi’ne (Proje No: 2009.111.02.7) teşekkürlerimi sunarım.

Maddi ve manevi desteğini, ilgisini, sevgisini ve sabrını hiçbir zaman eksik etmeyen, her zaman yanımda olan anneme ve babama en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayşe TURAN  
Trabzon 2011

## TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Armillaria mellea*’dan  $\beta$ -Glukozidaz Enziminin Kısmi Olarak Saflaştırılması ve Karakterizasyonu” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Yrd. Doç. Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA’nın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gosterdiğimi, çalışma surecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her trl yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 12/06/2011

Ayşe TURAN

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET .....	VIII
SUMMARY .....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XI
KISALTMALAR DİZİNİ .....	XII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Selülozun Yapısı ve Özellikleri.....	1
1.3. Selülazların Genel Özellikleri .....	3
1.3.1. Selülazların Sınıflandırılması .....	3
1.3.2. Selülazların Genel Reaksiyon Şekli .....	4
1.3.3. Selülaz Aktivite Testleri .....	5
1.3.3.1. Toplam Selülaz Aktivitesi .....	5
1.3.3.2. Endoglukanaz Aktivitesi .....	5
1.3.3.3. Ekzoglukanaz Aktivitesi.....	5
1.3.3.4. $\beta$ -Glukozidaz Aktivitesi .....	5
1.4. Selülazların Bulunduğu Organizmalar .....	6
1.5. Selülazların Kullanım Alanları.....	6
1.5.1. Gıda Endüstrisinde Selülazlar .....	6
1.5.2. İçecek ve Şarap Endüstrisinde Selülazlar .....	7
1.5.3. Hayvan Yemi Endüstrisinde Selülazlar .....	7
1.5.4. Tekstil Endüstrisinde .....	8
1.6. <i>Armillaria mellea</i> Makromantarının Özellikleri .....	8
1.7. Çalışmanın Amacı .....	9
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR .....	11

2.1.	Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar .....	11
2.1.1.	Cihazlar .....	11
2.1.2.	Kimyasal Madde ve Malzemeler .....	11
2.1.3.	Kullanılan Materyal .....	12
2.1.4.	Çözeltiler ve Tamponlar .....	12
2.1.4.1.	Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	12
2.1.4.2.	Protein Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler.....	12
2.1.4.3.	Tampon Çözeltiler .....	13
2.1.4.4.	Substrat Çözeltileri ve Enzim Aktivitesi Tayininde Kullanılan Diğer Çözeltiler .....	15
2.2.	Deneysel Çalışmalar .....	15
2.2.1.	Ham Enzim Özütünün Hazırlanması .....	15
2.2.2.	Enzim Aktivitesinin Tayini .....	16
2.2.3.	Protein Tayini .....	16
2.2.4.	SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi .....	17
2.2.5.	Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (PAGE) ile $\beta$ -Glukozidaz Aktivitesinin Ortaya Konulması.....	18
2.3.	$\beta$ -Glukozidaz Enzimin Kısmi Saflaştırılması.....	19
2.3.1.	Aseton Çöktürmesi .....	19
2.3.2.	İyon Değişim Kromatografisi.....	19
2.3.3.	Kısmi Olarak Saflaştırılan Enzimin Biyokimyasal Karakterizasyonu .....	20
2.3.3.1.	$\beta$ -Glukozidaz Aktivitesi Üzerine Çeşitli Substratların Etkisi .....	20
2.3.3.2.	$\beta$ -Glukozidaz Aktivitesi Üzerine pH' ın Etkisi .....	20
2.3.3.3.	$\beta$ -Glukozidaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi .....	21
2.3.3.4.	$\beta$ -Glukozidaz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi .....	21
2.3.3.5.	$\beta$ - Glukozidazın pH Kararlılığının İncelenmesi .....	21
2.3.3.6.	$\beta$ -Glukozidazın Isıl Kararlılığının İncelenmesi .....	21
2.3.3.7.	$\beta$ -Glukozidaz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi .....	22
2.3.3.8.	$\beta$ -Glukozidaz Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasalların Etkisinin İncelenmesi .....	22
3.	BULGULAR .....	23
3.1.	Ham Enzim Özütünün Hazırlanması .....	23
3.2.	Enzimin Kısmi Olarak Saflaştırılması .....	23
3.2.1.	Aseton Çöktürmesi .....	23

3.2.2.	$\beta$ -Glukozidaz Enziminin İyon Değişim Kromatografisi ile Kısmi Olarak Saflaştırılması .....	23
3.2.3.	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi .....	24
3.2.4.	Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi .....	25
3.3.	<i>A. mellea</i> 'dan Kısmen Saflaştırılan $\beta$ -glukozidaz Enziminin Biyokimyasal Karakterizasyonu .....	26
3.3.1.	<i>A. mellea</i> 'dan Kısmen Saflaştırılan $\beta$ -Glukozidaz Enziminin Substrat Özgünlüğü .....	26
3.3.2.	$\beta$ -Glukozidaz Aktivitesi Üzerine pH Etkisinin İncelenmesi .....	27
3.3.3.	$\beta$ -Glukozidaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi .....	28
3.3.4.	$\beta$ -Glukozidaz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisinin İncelenmesi .....	28
3.3.5.	$\beta$ -Glukozidazın pH Kararlılığının İncelenmesi .....	29
3.3.6.	$\beta$ -Glukozidazın Isıl Kararlılığın İncelenmesi .....	30
3.3.7.	$\beta$ -Glukozidaz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal iyonlarının Etkisi .....	31
3.3.8.	$\beta$ -Glukozidaz Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasalların Etkisi .....	32
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR .....	33
5.	ÖNERİLER .....	38
6.	KAYNAKLAR .....	40
	ÖZGEÇMİŞ	



Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

*Armillaria mellea*'dan  $\beta$ -GLUKOZİDAZ ENZİMİNİN KISMİ OLARAK  
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Ayşe TURAN

Karadeniz Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA

2011, 42 Sayfa

Bu çalışmada, Trabzon'un Hıdırnebi Yaylası'ndan toplanan *Armillaria mellea* makromantarından,  $\beta$ -glukozidaz enzimi, iyon değişim kromatografisi ile kısmi olarak saflaştırıldı ve karakterize edildi. Farklı pH değerlerine sahip tamponlar kullanılarak hazırlanan ham özütlerde  $\beta$ -glukozidaz aktivitesi araştırıldı ve ekstraksiyon için uygun tampon belirlendi. Hazırlanan ham özütte ve iyon değişim kromatografisi sonrası elde edilen eluatlardan,  $\beta$ -glukozidaz varlığı, doğal poliakrimalid jel elektroforezi ve substrat boyaması ile ortaya konuldu. Ham özütte üç bandın varlığı gözlenirken, iyon değişim kromatografisi sonrası elde edilen çözeltide iki bandın varlığı gözlemlendi. Kısmi olarak saflaştırılan enzim biyokimyasal olarak karakterize edildi. Enzimin optimum pH'sı 4,0, optimum sıcaklığı ise 50 °C olarak belirlendi. 4 °C'de 24 saat inkübasyondan sonra *A. mellea*  $\beta$ -glukozidazının pH 3,0-6,0 aralığında ve pH 8,0'de oldukça kararlı olduğu gözlemlendi. Enzimin ısıl kararlılık profili incelendiğinde, 1 saat inkübasyondan sonra, 20-50 °C aralığında oldukça kararlı olduğu gözlemlendi.  $\beta$ -glukozidaz enzimi için  $V_{maks}$  ve  $K_m$  değerleri, *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranozid (*p*NPG) substratı varlığında sırasıyla 3,646 U/mg ve 0,295 mM olarak bulundu. Ayrıca bazı metal iyonları ve kimyasal maddelerin enzim aktivitesini farklı şekillerde etkilediği tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** *Armillaria mellea*,  $\beta$ -Glukozidaz, İyon Değişim Kromatografisi, Karakterizasyon

Master Thesis

SUMMARY

PARTIAL PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF  $\beta$ -GLUCOSIDASE  
FROM *Armillaria mellea*

Ayşe TURAN

Karadeniz Technical University  
The Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Chemistry Graduate Program  
Supervisor: Ass. Prof. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA  
2011, 42 Pages

In this study,  $\beta$ -glucosidase from *Armillaria mellea* mushroom harvested at Hidirnebi Plateau in Trabzon were partially purified by using ion-exchange chromatography and characterized.  $\beta$ -Glucosidase activity was determined in the crude extracts prepared by using buffers having different pH values and the suitable buffer was chosen for the extraction. The presence of  $\beta$ -glucosidase in the crude enzyme extract and solution obtained after ion-exchange chromatography were put forward by native polyacrylamide gel electrophoresis and substrate staining. While three bands were observed in the crude extract, two bands were observed after ion-exchange chromatography. Partially purified enzyme was biochemically characterized. The optimum pH and optimum temperature of the enzyme were found to be 4.0 and 50 °C, respectively. After 24 h of incubation at 4 °C, the *A mellea*  $\beta$ -glucosidase extremely stable in the range of pH 3.0-6.0 and 8.0. When the thermal stability profile of the enzyme was analyzed, it was determined that the enzyme was extremely stable in the range of 20-50 °C after 1 h incubation.  $V_{max}$  and  $K_m$  values of  $\beta$ -glucosidase in presence of *p*NPG were found to be 3.646 U/mg and 0.295 mM, respectively. It was also determined that some metal ions and chemicals were effected the enzyme activity in different ratio.

**Key Words:** *Armillaria mellea*,  $\beta$ -Glucosidase, Ion-exchange Chromatography, Characterization

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Selülozun moleküler yapısı .....	2
Şekil 2. Selülozun enzimli hidrolizi .....	4
Şekil 3. <i>Armillaria mellea</i> mantarının fūriktifikasyon organları.....	9
Şekil 4. β-Glukozidaz enziminin saflaştırılmasına ait iyon değişim kromotagrafisi grafiği .....	24
Şekil 5. A. mellea makromantarından kısmi olarak saflaştırılan β-glukozidaz enziminin A) Ham enzim özütü, B) Aseton Çöktürmesi sonrası enzim çözeltisi, C) Kolon sonrası elde edilen enzim çözeltisi .....	25
Şekil 6. A. mellea makromantarından saflaştırılan β-glukozidaz enziminin A) Ham enzim Substrat Boyaması, B) Aseton Çöktürmesi Substrat Boyaması, C) Kolon sonrası Substrat Boyaması .....	26
Şekil 7. A. mellea'dan kısmen saflaştırılan β-glukozidaz enzimine ait %Bağıl aktivite-pH grafiği .....	27
Şekil 8. A. mellea'dan kısmen saflaştırılan β-glukozidaz enzimine ait % Bağıl aktivite-sıcaklık grafiği .....	28
Şekil 9. pNPG substratı varlığında β-glukozidazın substrat doygunluk eğrisi .....	29
Şekil 10. pNPG substratı varlığında β-glukozidaz aktivitesi için Lineweaver-Burk eğrisi .....	29
Şekil 11. A. mellea'dan kısmen saflaştırılan β-glukozidaz enzimine ait %kalan aktivite-pH grafiği .....	30
Şekil 12. A. mellea'dan kısmen saflaştırılan β-glukozidaz enzimine ait ısıl kararlılık grafiği .....	31

## TABLolar DİZİNİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Tablo 1. Kullanılan cihazlar .....	11
Tablo 2. SDS-PAGE bileşenleri .....	18
Tablo 3. Doğal Poliakrilamid Jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler ve hacimleri .....	18
Tablo 4. <i>A. mellea</i> 'dan kısmi olarak saflaştırılan $\beta$ -glukozidaz enzimine ait saflaştırma tablosu .....	24
Tablo 5. <i>A. mellea</i> 'dan kısmen saflaştırılan $\beta$ -glukozidaz enziminin aktivitesi üzerine çeşitli substratların %bağıl aktivite sonuçları .....	27
Tablo 6. <i>A. mellea</i> 'dan kısmen saflaştırılan $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi .....	32
Tablo 7. <i>A. mellea</i> 'dan kısmen saflaştırılan $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine bazı kimyasalların etkisi .....	32
Tablo 8. Bazı organizmalardan saflaştırılan $\beta$ -glukozidaz enzimlerinin biyokimyasal ve kinetik özellikleri .....	36

## KISALTMALAR DİZİNİ

APS	: Amonyum persülfat
BSA	: Bovin Serum albumin (Sığır Serum Albumini)
CMC	: Karboksimetil Selüloz
EC	: Enzim komisyonu
EDTA	: Etilendiamin tetraasetikasit
mM	: Milimolar
MUG	: 4-Metilbelliferil- $\beta$ -D-glukopiranozid
PAGE	: Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi
<i>p</i> NPG	: <i>p</i> -nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranozid
[S]	: Substrat konsantrasyonu
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
PMSF	: Fenilmetilsülfonilflorür
DTT	: Ditiyotreitol
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
Tris	: Tris (hidroksimetil) aminometan
$V_{maks}$	: Maksimum Hız
$K_m$	: Michaelis-Menten sabiti
Asp	: Aspartat
Glu	: Glutamat

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Gen ve protein mühendisliğini de içine alan biyoloji ve kimya alanlarında son yıllarda sağlanan önemli ilerlemeler, canlılığın temeli hakkında aydınlatılmayı bekleyen konulara ışık tutmakta, ayrıca elde edilen bilimsel veri ve sonuçların değerlendirilerek, sağlıktan gıdaya kadar birçok alanda pratikte kullanımını sağlamaktadır. Kaydedilen bu gelişme ve ilerlemelere paralel olarak canlı sistemlerde bulunan biyomoleküllerin (proteinler, enzimler, hormonlar vs.) insanlığın yararına farklı alanlarda kullanımı günden güne artmaktadır. Enzimler doğanın katalizörleridir ve dolayısıyla enzimsiz bir hayatın var olduğu düşünülemez. Bu yüzden enzimlerin özelliklerinin ve davranış biçimlerinin yaklaşık 200 yıldır inceleniyor olması sürpriz değildir. Endüstride enzim kullanımının gün geçtikçe yaygınlaşması, çok değişik kaynaklardan enzimlerin saflaştırılması ve karakterizasyonunu da beraberinde getirmektedir (Ertunga, 2006)

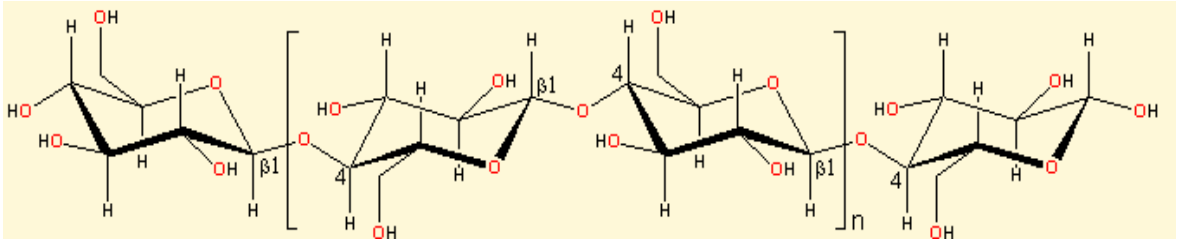
Selülozlar hidrolaz sınıfına ait enzimlerdir (Amouri, vd., 2006). Selülozdan glukoz dönüşüm için gerekli olan enzim sistemi; endoglukonazlar, ekzoglukanazlar ve  $\beta$ -glukozidazlar olmak üzere üç farklı enzimden meydana gelmektedir. Endoglukanazlar selülozun iç zincirlerini rastgele keserek yeni zincir uçlarının oluşmasını sağlar. Ekzoglukanaz da oluşan bu yeni selüloz zincirlerinin uçlardan keserek çözünür sellobiyoz birimleri oluştururlar. Son olarak da  $\beta$ -glukozidazlar sellobiyoz birimlerini glukoz birimlerine hidrolizler (Yoon, vd., 2008).

Bu çalışmanın amacı yenebilir bir makromantar türü olan *Armillaria mellea*'dan ticari ve endüstriyel öneme sahip  $\beta$ -glukozidaz enziminin kısmi saflaştırılması ve biyokimyasal karakterizasyonudur.

### 1.2. Selülozun Yapısı ve Özellikleri

Orman ve tarım ürünü olan selülozlu maddeler yeryüzünde en geniş yenebilir karbohidrat kaynaklarını oluştururlar. Selüloz, yosunlardan ağaçlara kadar bütün bitki hücrelerinin ana yapısal elemanını oluşturan ve yeryüzünde en çok bulunan organik

bileşiktir. Yaklaşık olarak her yıl 100 trilyon kg selüloz oluşmaktadır. Selüloz bitkilerde karbondioksit ve suyun fotosentez yoluyla oksijen ve karbohidratlara dönüşmesiyle oluşur. Bazı bakteri, mantar, yosunlar, tek hücreli bitkiler ve hayvanlar tarafından da sentezlenebilir. Pamuk ve orman ürünleri selüloz bakımından en zengin olan maddelere örnek olarak gösterilebilirler. Selüloz bunun yanında bitki ve ağaçlarda hücre duvarlarının ve baklagil tohumlarının, meyvelerin dış kabuklarının büyük kısmını oluşturur. En basit karbohidrat birimlerinden olan glukoz selülozun önemli ara ürünlerinden biridir. Selüloz glukozun  $\beta$ -1,4 glukozidik bağlarla birbirine bağlanması sonucu oluşan lineer bir polimerdir (Şekil 1). Selüloz polimeri 50 ile binlerce anhidroglukoz birimlerinden oluşabilir (Akmaz, 2001). Selüloz sellulobiyozun doğal bir polimeridir. Sellobiyoz, selülozdaki glukoz moleküllerini içeren tekrarlayan yapısal birimdir (Yılmaz, 2007). Selüloz molekülü genişletildiğinde dışarıda hidroksil grupları bulunan ve bu sayede molekül içi ve hücre içi hidrojen bağları yapabilen düz bir kurdele yapıda olduğu görülür. Bu kurdelenin yüzeyi karbon atomlarına direkt bağlı hidrojen atomları içermektedir ve bu nedenle hidrofobiktir (Yılmaz, 2007).



Şekil 1. Selülozun moleküler yapısı (Yılmaz, 2007).

Bu zincirler birbirlerine paralel demetler şeklinde dizilirler. Aralarında hidrojen bağlarının oluşması ile çok sağlam ve esnek olan selüloz lifleri meydana gelir. Yapıda  $\alpha$ -1,4 glikozid bağları yerine  $\beta$ -1,4 glikozid bağlarının bulunması; hem zincirlerin heliks oluşturmayıp lineer sıralar şeklinde dizilmesine hem de hayvansal organizmalardaki sindirim enzimlerinin bu bağları parçalayamamasına sebep olur. Dolayısıyla selülozun sindirimi için selülaz enzimine ihtiyaç duyulur. Selüloz bitki hücre duvarlarının temel iskeletidir. Spano ve arkadaşlarına göre (1975) selüloz; gıda, yakıt ve kimyasalların en fazla bulunan organik kaynağıdır. Bununla beraber selülozun kullanımı glukoza kadar hidroliz olabilmesine bağlıdır. Asit ve yüksek sıcaklıkta bozulma istenen bir durum

değildir. Çünkü bu koşullarda bozulma oluşu zaman oluşan şeker ve atık hale gelen selülozda safsızlıklar oluşur (Çakmar, 2005).

Selülozun yenilenebilen bir enerji kaynağı olarak önemli bir potansiyele sahip olması, selülaz parçalayıcı enzimler ya da selülazlar ortaya çıktıktan sonra olmuştur. Pahalı olmayan selüloz atıklarının etkili bir şekilde muamelesi ve işlenmesi ile ilgili yeni metodlar geliştirilmesi günümüzde ekonomik açıdan oldukça önemlidir. Selülazlar, selülozik biyokütlenin etkili bir şekilde işlenmesinde kilit role sahiptirler (Bhat, 2000).

### 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- $\beta$ -D glikozidik bağlarının hidrolizini katalizler. Bunun yanında, bitki ve hayvan gibi diğer tip organizmalar tarafından da üretilirler (Chapin vd., 2002). Selülozu enzimatik olarak hidrolizleyen selülazlar üç ana grupta sınıflandırılırlar. Endo-1,4- $\beta$ -glukanazlar (EC 3.2.1.4), ekzo-1,4- $\beta$ -glukanazlar ya da sellobiyohidrolazlar (EC 3.2.1.91) ve 1,4- $\beta$ -glukozidazlar (EC 3.2.1.21) (Souza vd., 2010). Bu enzimler kısaca aşağıda tanımlanmıştır.

1. Endo- $\beta$ -1,4 glukanazlar (endoglukanazlar): Selülazın %15-20'lik bir kısmını oluşturur. Selüloz moleküllerini, molekül boyunca rastgele hidrolizler. İndirgen olmayan zincir sonları oluşturmak için iç  $\beta$ -1,4 glukozid bağları üzerinde rol oynar (Akmaz, 2001).

2. Ekzo-  $\beta$ -1,4 glukanazlar (sellobiyohidrolazlar): Selülazın %35-85'lik bir kısmını oluşturur. Selülaz bileşenleri arasında en az kararlılığa sahip sellobiyohidrolaz, selüloz lifinin sonundaki indirgen olmayan şeker zincirinden sellobiyozun ayrılmasını katalizler. Sellobiyohidrolaz her ne kadar ilk hücum bileşeni olmasa da kristalin selülozun hidrolizi için gerekli olduğu genel olarak kabul edilir (Akmaz, 2001).

3.  $\beta$ -1,4 glukozidazlar (sellobiyazlar): Selülazın %1'den az kısmını oluşturur.  $\beta$ -Bağlı glukoz oligomerleri, sellobiyoz, sellotrioz ve sellotetraoza böler ve sellobiyozu glukoz hidrolizler (Akmaz, 2001).

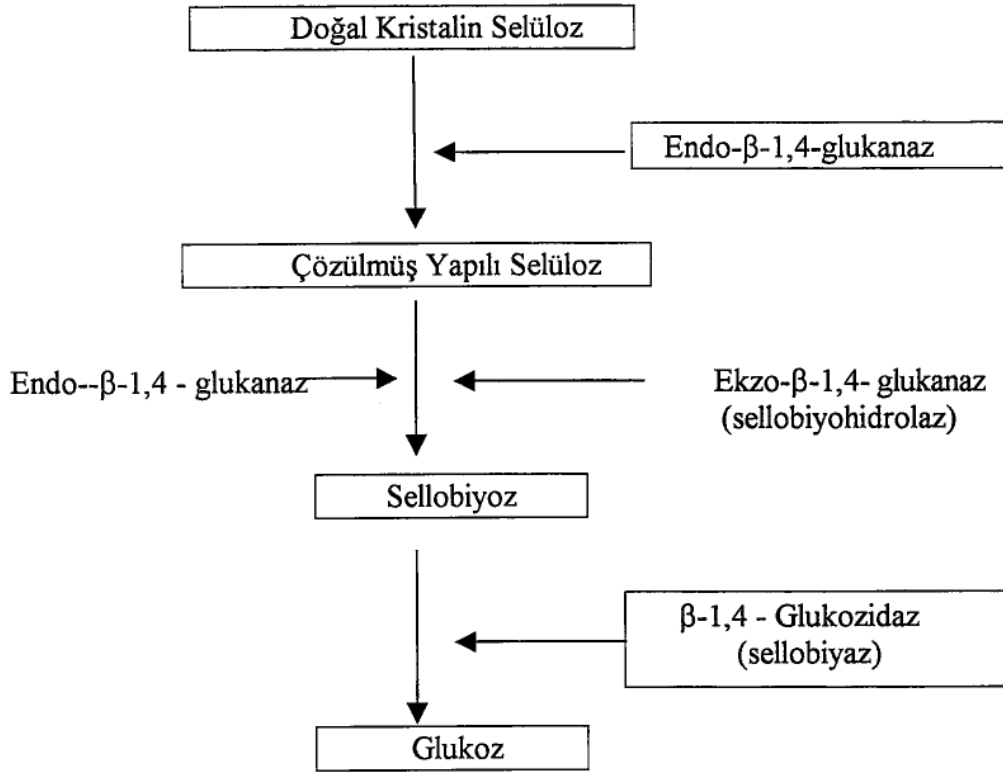
Bu enzimlerle reaksiyon başlamadan önce endoglukanazlar ve sellobiyohidrolazlar selüloz yüzeyinde tutunmalıdır.  $\beta$ -Glukozidaz çözeltide kalır ve sellobiyozu çözeltide hidrolizler (Akmaz, 2001).



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

### 1.3.2. Selülazların Genel Reaksiyon Şekli

Tam bir selülaz sisteminin üç sınıf enzimden oluştuğu bilinmektedir; endoglukanazlar uzun selüloz zincirlerini rastgele keserek selüloz parçaları oluştururlar, ekzoglukanazlar temel ürün olarak sellobiyozu üretirler ve  $\beta$ -glukozidazlar sellobiyozu glikoza çevirirler (Şekil 2) (Joo vd., 2009). Selülozik materyallerin hidrolizi bu enzimlerin kompleks reaksiyonuyla olur. Bu enzimlerin biyodönüşüm teknolojisinde iki önemli nokta, reaksiyon şartları ve bu enzim sistemiyle üretim maliyetidir. Bu yüzden birçok çalışma yüksek spesifik aktivitede ve yüksek etkinlikte selülotik enzimler üreten yeni organizmaların keşfini amaçlamaktadır (Lee vd., 2008).



Şekil 2. Selülozun enzimli hidrolizi (Akmaz, 2001).

### 1.3.3. Selülaz Aktivite Testleri

Selülaz aktivitesini ölçmek için iki temel yaklaşım mevcuttur; 1) ayrı ayrı selülaz aktiviteleri (endoglukanaz, ekzoglukanaz ve  $\beta$ -glukozidaz) ölçmek ve 2) toplam selülaz aktivitesi ölçmek (Zhang vd., 2006).

#### 1.3.3.1. Toplam Selülaz Aktivitesi

Toplam selülaz aktivitesi tayininde genel olarak filtre kağıdı gibi selüloz içeren materyaller kullanılır ve enzim aktivitesi indirgen şekerlerin açığa çıkması ile belirlenir (Jorgensen vd., 2003).

#### 1.3.3.2. Endoglukanaz Aktivitesi

Bu enzimin aktivitesi karboksi metil selüloz (CMS) ile ölçülür. Endoglukanaz aktivitesi substrat vizkozitesindeki azalmayla ya da indirgen şeker testiyle belirlenen indirgen uçların artışının ölçümüne dayanır (Kumaran vd., 1997).

#### 1.3.3.3. Ekzoglukanaz Aktivitesi

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

#### 1.3.3.4. $\beta$ -Glukozidaz Aktivitesi

4-metillumbelliferil- $\beta$ -D-glukopiranozid ve  $\beta$ -naftil- $\beta$ -D-glukopiranozid gibi substratların hidrolizlenmesiyle açığa çıkan floresan ya da *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-1,4-glukopiranozid substratının hidrolizi ile açığa çıkan renkli ürünün (*p*-nitrofenol) ölçümüne dayanır (Zhang vd., 2006).

#### 1.4. Selülazların Bulunduğu Organizmalar

Selülazlar biyokütleden faydalanmada önemli rol oynarlar. Birçok mantar ve bakteri tarafından üretilmektedirler. *Aspergillus* ve *Rhizopus* gibi mantar türlerindeki selülazlar birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır (Lee vd., 2008).

Birçok ipliksi mantar iyi birer selülaz ve hemiselülaz üreticisidir, özellikle hafif bir küf mantarı olan *Trichoderma reesei* çok miktarda enzim salgılama yeteneğinden dolayı detaylı çalışılmıştır. Ayrıca *Penicillium spp.*, selülaz ve hemiselülaz üreticisidir (Jorgensen vd., 2003). *Acremonium cellulolyticus*, *Irpex lacteus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Schizophyllum commune*, *Sclerotium rolfsii*, *Sporotrichum cellulophilum*, *Talaromyces emersonii*, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma koningii* ve *Trichoderma viride* mantarları selülaz çalışılan türlerden bazılarıdır (URL-3). Bunlara ek olarak, *Agaricus arvensis* etkili bir selülaz salgılayıcısıdır (Jeya vd., 2010).

Bazı bakterilerde selülaz sistemlerinin birçok bileşeni klonlanmıştır. Bunlardan bazıları *Bacillus*, *Clostridium*, *Cellomonas*, *Rumminooccus*, *Alteromonas* ve *Acetivibrio* gibi bakteri türleridir (Trivedi vd., 2011).

Selülaz aktivitesinin bulunduğu bazı maya türleri *Cryptococcus* (Thongekkaew vd., 2008) ve *Pichia pastoris* (Turan ve Zheng, 2005)'dir.

#### 1.5. Selülazların Kullanım Alanları

Selülazların ana uygulama alanları gıda, hayvan yemi üretimi, tekstil, biyoyakıt, kimya, kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi, atıkların giderimi, tıbbi ve farmasötik endüstrisi, protoplast üretimi, genetik mühendisliği ve kirlilik giderimidir (Bhat ve Bhat, 1997). Bazı uygulama alanları şunlardır;

##### 1.5.1. Gıda Endüstrisinde Selülazlar

- Tohumlardan yağ ve meyve suyu ekstraksiyonunda,
- Meyve sularının berraklaştırılmasında,
- Tahılların homojen olarak su çekmesini sağlamak ve yeterince ıslanmasının artırılmasında,

- Soya sosu gibi fermente soya gıdalarının üretiminde soyanın dış zarının uzaklaştırılmasında,
- Kokonat ve soya fasulyesinden protein izolasyonunda,
- Mısır ve tatlı patatesten nişasta üretiminde,
- Su yosunlarından agar ekstraksiyonunda,
- Gıda katkıları maddesi olarak kullanılan öğütülmüş lignoselülozik materyalin parçalanmasında,
- Selülozik atıkların çözünür şeker, glikoz ve selooligosakkarit üretiminde,
- Biyoetanol üretimi için substrat eldesinde,
- Kurutulmuş sebze ve çorba karışımlarının geri sulandırımının artırılmasında,
- Polisakkarit, protein enzim ve tat verici maddelerin açığa çıkışını kolaylaştırmak amacıyla bitki hücre duvarlarının uzaklaştırılmalarında kullanılmaktadır (Bhat ve Bhat, 1997).

### 1.5.2. İçecek ve Şarap Endüstrisinde Selülazlar

Rekombinant mayalardan elde edilen  $\beta$ -1,3 ve  $\beta$ -1,4 glukanaazlar şaraplarda aroma artışının sağlanması, biranın filtrasyonunun kolaylaştırılması ve düşük kalite arpada bulunan  $\beta$ -1, 3 ve  $\beta$ -1, 4 glukana hidrolizinde kullanılmaktadırlar (Aygan, 2008).

### 1.5.3. Hayvan Yemi Endüstrisinde Selülazlar

- Geviş getiren ve tek mideli hayvanların yiyeceklerinin zenginleştirilmesinde
- Hububat tanelerinin kabuklarının çıkarılmadan lignoselülozik materyalin ön muamelesinde kullanılır. Böylece geviş getiren ve tek mideli hayvanlar bu yiyecekleri kolaylıkla sindirebilirler (Mandels, 1985).
- Başka bir uygulama da hayvanların sindirim bölgelerine gerekli selülazı yayabilen transgenik hayvanların üretimi ve lifli gıdaların etkili bir biçimde sindirimine yardım etmek için selülaz genlerinin klonlanmasında kullanılır (Beguin ve Aubert, 1993).

#### 1.5.4. Tekstil Endüstrisinde

- Kumaşlarda boyanın fazlasını almada,
- Birçok yıkama sonunda pamuk kumaşlardan çıkan mikrofibrillerin giderilmesinde,
- Pamuk ya da pamuklu kumaşların yıkanması, renk parlaklığının artırılması ve yumuşaklığının geri kazandırılmasında kullanılır (Bhat ve Bhat, 1997).

#### 1.6. *Armillaria mellea* Makromantarının Özellikleri

*Armillaria mellea* mantarının şapkası 3-15 cm çapındadır. Mantarın şapkası, büyüme esnasında önce dışbükey, sonra yassı ve son olarak da merkezi basık ve kenarları dalgalı şekilde olmaktadır. Şapkanın rengi kirli sarı, saman rengi veya koyu kahverengi olmakla beraber, nihai olarak kırmızı renge dönüşmektedir. Şapka üzerinde geçici balık pullarına benzer pullar vardır. Sap, 6-15 x 1-1,5 cm olup dip kısma doğru daralmaktadır ya da dip kısmı şişkindir. Önce beyazımsı, sonra kırmızımsı kahverengi, sapın üst kısmına doğru halkası olup bu halka önceleri beyaz, sonra sarımsı ya da pembemsi kahverengi ve genellikle yaşlandıkça halka üzerinde koyu lekeli benekler oluşur. Sporları soluk krem rengine, eliptik 8-9 x 5-6 m. Yapraklı ve iğne yapraklı ağaçların üzerinde ve bunların devrik kütükleri üzerinde salkım gibi birçoğu bir arada bulunur yada orman toprağı üzerinde yoğun bir şekilde bulunmaktadır. Yaz mevsiminden erken kışa değin görülür. Çok yoğun kitle halinde popülasyonları vardır. Pişirildiğinde yenen değerli bir mantardır (Anşin vd., 2000).



Şekil 3. *Armillaria mellea* mantarının fűriktifikasyon organları

### 1.7. Çalışmanın Amacı

Gelişen teknoloji ile birlikte birçok alanda enzimlere duyulan ilgi de artmaktadır. Gıda, tekstil, temizlik ve sağlık gibi alanlarda artan talebi karşılamak için daha hızlı, az enerji maliyetli ve çevreye daha az zarar verebilecek yöntemler tercih edilmektedir. Klasik kimyasal yöntemlerin, spesifik olmaması, verimin düşük olması, yan ürünlerin fazla olması ve çevreye daha çok zararlı atık verilmesinden dolayı tercih sebebi olmaktan çıkmaktadır. Bu yüzden endüstriyel uygulamalar ve tıp alanında kimyasal katalizli yöntemlerin yerini artık enzim katalizli reaksiyonlar almaktadır. Canlı sistemler tarafından üretilen biyolojik katalizörler olan enzimler, oldukça spesifik reaksiyonları  $10^8$ - $10^{20}$  kat daha hızlı katalizleyerek spesifik ürünleri oluştururlar. Bu şekilde elde edilen ürünler hem oldukça saf olur, hem de klasik yöntemlere nazaran çok daha kısa sürede sentezlenir. Ayrıca enzim katalizli yöntemlerde reaksiyonlar ılımlı şartlarda (oda sıcaklığı ve basıncı, fizyolojik pH vb.) gerçekleştirilir, böylece büyük oranda enerji tasarrufu sağlanmış olur. Yani ekonomik açıdan da değerlendirildiğinde enzim kullanımının önemli avantajları olduğu açıktır. Bu

sebeple, bazı özel kimyasal maddelerin üretiminde enzimlere gittikçe daha fazla ihtiyaç duyulmaktadır.

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 gelecek 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 toplanan *Armillaria mellea* mantar türünden selüloz sistemi enzimi olan  $\beta$ -glukozidazın iyon değişimi kromatografisi ile kısmi saflaştırılması ve kısmi olarak saflaştırılan enzimin biyokimyasal olarak karakterizasyonudur. Enzim, aseton çöktürmesi ve iyon değişim kromatografisi ile Q-Sepharose fast flow kullanılarak kısmi olarak saflaştırılmıştır. Kısmi olarak saflaştırılan enzimin karakterizasyon çalışması kapsamında  $\beta$ -glukozidaz aktivitesi üzerine çeşitli substratların etkisi, optimum pH, optimum sıcaklık, substrat konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisi, pH ve ısı kararlılığı, metal iyonları ve çeşitli kimyasal maddelerin etkisi incelenerek bazı kinetik sonuçlara ulaşılmıştır. Böylece kısmen saflaştırılan enzimin biyokimyasal özellikleri ortaya konulmuştur.

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

#### 2.1.1. Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Firma	Model
UV-Vis Spektrofotometre	Perkin Elmer	Lambda 25
Protein Elektroforezi	Owl Separation Systems	P8DS
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Zentrifugen	Rotina 35 R
Mikrosantrifüj	Sigma	1-14
Saf Su Cihazı	Sartorius	Arium 611UV
Jel Görüntüleme Sistemi	Kodak	Gel Logic 200 Imaging System
Mikrotüpler İçin Termal Sallayıcı	Boeco	TS-100 Thermo Shaker
pH Metre	InoLab	WTW pH 720
Buz Makinesi	Hoshizaki	FM-80EE
Vorteks	Thermolyne	Type 37600 Mixer
Buzdolabı	Profilo	BD4303ANFE
Terazi	Ohaus	Pioneer
Derin Dondurucu	Regal	RDD-1280
Otoklav	Tomy	SX-700E
Güç Kaynağı	Heathkit	IP-17
Degaz pompası	Vacuubrand	2C

#### 2.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler

Bu çalışmada substrat olarak kullanılan *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranozid (*p*NPG) ve 4-metilyumbelliferi- $\beta$ -D-glukopiranozid (MUG) ile kolon dolgu maddesi olarak kullanılan Q-Sepharose fast flow, Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, USA)’dan, diğer kimyasal maddeler ve çözücüler Fluko, Sigma, Merck firmalarından temin edilmiştir.



### 2.1.3. Kullanılan Materyal

*Armillaria mellea* Eylül ayında Hıdırnebi Yayla'sından toplandı ve laboratuara getirilinceye kadar buz içinde saklandı. Laboratuara getirilen mantar örneği kullanılabildiği kadar -80 °C'de saklandı.

### 2.1.4. Çözeltiler ve Tamponlar

#### 2.1.4.1. Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler

- Lowry A Çözeltisi (0,1 N NaOH içinde % 2 (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>): 0,4 g NaOH ve 2,0 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> saf su ile çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4°C'de saklandı.
- Lowry B Çözeltisi (%1 CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O çözeltisi): 1,0 g CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O saf su ile çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4°C'de saklandı.
- Lowry C Çözeltisi (%2 Na-K tartarat çözeltisi): 2,0 g Na-K tartarat saf su ile çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4°C'de saklandı.
- Lowry D Çözeltisi: 1 kısım Lowry B ve 1 kısım Lowry C karıştırılarak hazırlandı.
- Lowry E Çözeltisi: 0,5 mL Lowry D ile 25 mL Lowry A karıştırılarak hazırlandı.
- Sığır Serum Albümin (BSA) Çözeltisi (1 mg/mL): 5,0 mg BSA saf su ile çözülüp hacmi 5 mL'ye tamamlandı ve 4°C'de saklandı.
- 0,1 N NaOH içinde %0,1 (w/v) SDS çözeltisi: 0,4 g NaOH ve 0,1 g SDS saf su ile çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4°C'de saklandı.

#### 2.1.4.2. Protein Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler

- Ayırma Jeli Tamponu (1,5 M Tris-HCl): 45,42 g Tris 200 mL saf suda çözüldü, pH'sı 8,8'e ayarlandı, hacmi 250 mL'ye tamamlandı ve 4°C'de saklandı.
- Yığılma Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl): 30,28 g Tris 200 mL saf suda çözüldü, pH'sı 6,8'e ayarlandı, hacmi 250 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- SDS Çözeltisi (%10): 10 g SDS saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

- Amonyum Persülfat (APS) Çözeltisi (%10): 1 g APS saf suda çözülüp hacmi 10 mL'ye tamamlandı ve hazırlanan çözelti -20 °C'de saklandı.
- N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin (TEMED): Orijinal şişesinden kullanıldı.
- Akrilamid/Bisakrilamid Çözeltisi (%30): 29,2 g akrilamid ve 0,8 g N,N'-metilen bisakrilamid saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- Gliserol Çözeltisi (%80): 80 mL gliserolün hacminin saf su ile 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Bromofenol Mavisi (%0,1): 10 mg bromofenol mavisi saf suda çözüldü ve hacmi 10 mL'ye tamamlandı.
- SDS-PAGE Yükleme Çözeltisi: 150 µL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 400 µL %10 SDS, 100 µL %0,1 bromofenol mavisi, 250 µL %80 gliserol ve 60 µL β-merkaptoetanol'ün karıştırılması ile hazırlandı ve küçük kısımlara ayrılarak -20 °C'de saklandı.
- SDS-PAGE Yürütme Tamponu: 7,2 g Glisin ve 1,5 g Tris yaklaşık 480 mL saf su ile çözüldükten sonra üzerine 5 mL SDS (%10) çözeltisi ilave edildi. pH 8,3'e ayarlandı ve çözeltinin hacmi 500 mL'ye tamamlandı.
- Doğal PAGE Yükleme Çözeltisi: 150 µL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 100 µL %0,1 bromofenol mavisi, 250 µL %80 gliserol ve 460 µL saf suyun karıştırılması ile hazırlandı ve küçük kısımlara ayrılarak -20 °C'de saklandı.
- Doğal PAGE Yürütme Tamponu: 7,2 g Glisin ve 1,5 g Tris yaklaşık 490 mL saf suda çözüldükten sonra pH 8,3 ayarlandı ve çözeltinin hacmi 500 mL'ye tamamlandı.
- Jel Boyama Çözeltisi: 1 g Coomassie Brilliant Blue-R250'nin 62,5 mL glasiyal asetik asit ve 93,5 mL metanol içinde çözülmesi ile hazırlandı.
- Boya Uzaklaştırma Çözeltisi: 100 mL glasiyal asetik asit, 400 mL metanol ve 600 mL saf suyun karıştırılmasıyla hazırlandı.

#### 2.1.4.3. Tampon Çözeltiler

- 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  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 'nun saf su ile çözülüp hacminin 250 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.
- Glisin-HCl Tamponu (50 mM, pH 2,0): 0,375 g glisin saf suda çözüldükten sonra pH'sı 2,0'a ayarlandıktan sonra hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- Glisin-HCl Tamponu (50 mM, pH 3,0): 0,375 g glisin saf suda çözüldükten sonra pH'sı 3,0'a ayarlandıktan sonra hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- Sodyum-Asetat Tamponu (Na-Ac) (50 mM, pH 4,0): 0,6804 g sodyum asetat saf suda çözüldükten sonra asetik asit çözeltisi ile pH'sı 4,0 ayarlandıktan sonra 100 mL'ye tamamlandı.
- Sodyum-Asetat Tamponu (Na-Ac) (50 mM, pH 5,0): 0,6804 g sodyum asetat saf suda çözüldükten sonra asetik asit çözeltisi ile pH'sı 5,0 ayarlandıktan sonra 100 mL'ye tamamlandı.
- Sodyum-Asetat Tamponu (Na-Ac) (50 mM, pH 5,5): 0,6804 g sodyum asetat saf suda çözüldükten sonra asetik asit çözeltisi ile pH'sı 5,5 ayarlandıktan sonra 100 mL'ye tamamlandı.
- Fosfat Tamponu (50 Mm, pH 6,0): 0,4164 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 0,3379 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  saf suda çözüldükten sonra sodyum hidroksit çözeltisi ile pH'sı 6,0 ayarlandıktan sonra 100 mL'ye tamamlandı.
- Fosfat Tamponu (50 Mm, pH 7,0): 0,4164 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 0,3379 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  saf suda çözüldükten sonra sodyum hidroksit çözeltisi ile pH'sı 7,0 ayarlandıktan sonra 100 mL'ye tamamlandı.
- Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 8,0): 0,3028 Tris yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N HCl ile 8,0'e ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 9,0): 0,3028 Tris yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N HCl ile 9,0'a ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

#### 2.1.4.4. Substrat Çözeltileri ve Enzim Aktivitesi Tayininde Kullanılan Diğer Çözeltiler

- *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranozit (4 mM stok): 0,060 g *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranozit 50 mM pH 5,5 sodyum asetat tamponunda çözülüp hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranozid (25 mM stok): 0,1883 g *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranozit saf suda çözülerek hacmi 25 mL'ye tamamlandı.
- *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranozid (4 mM): 0,060 g *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranozit saf suda çözülüp hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-galaktopiranozid (4 mM): 0,060 g *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranozit saf suda çözülüp hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-mannopiranozid (4 mM): 0,060 g *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranozit saf suda çözülüp hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-sellobiozid (4 mM): 0,11 g *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranozit saf suda çözülüp hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Çözeltisi: 1,06 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> saf suda çözülerek hacim 100 mL'ye tamamlandı.

## 2.2. Deneysel Çalışmalar

### 2.2.1. Ham Enzim Özütünün Hazırlanması

*Armillaria mellea* mantarından 3 farklı pH'da ekstraksiyon tamponu kullanılarak (5,0, 7,0 ve 9,0) ham enzim özütleri hazırlandı (Elvan, 2009). Bunun için aşağıdaki işlemler yapıldı.

- Mantar numunesinden 25'er g örnekler alınarak sıvı azot içinde 15 dakika bekletildi.
- Her bir örnek havanda dövüldü ve her birine 2 mM EDTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM PMSF içeren 50 mM asetat (pH 5,0), fosfat (pH 7,0) ve Tris-HCl (9,0) tamponlarından ayrı ayrı 50'şer mL ilave edildi.

- Her bir karışım 4 katlı tülbentten süzüldü ve elde edilen süzüntü 4 °C’de, 20.000 rpm’de 30 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant ham enzim özütü olarak kullanıldı.

### 2.2.2. Enzim Aktivitesinin Tayini

*A. mellea* özütündeki  $\beta$ -glukozidaz aktivitesi hem spektrofotometrik yöntemle hem de elektroforetik yöntemle tayin edildi. Spektrofotometrik aktivite tayini *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranozid substratı varlığında 410 nm’de gerçekleştirildi. Elektroforetik aktivite ise MUG substratı varlığında doğal elektroforez yapılarak gerçekleştirildi.

$\beta$ -glukozidaz aktivitesinin tayini için, 200  $\mu$ L substrat çözeltisi (4 mM stok) üzerine 200  $\mu$ L enzim çözeltisi ilave edildi ve elde edilen karışım 37 °C’de 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 1,2 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,1 M) çözeltisi eklenerek reaksiyon durduruldu ve 410 nm’de absorbans ölçüldü (Turan vd., 2005). 1 U enzim aktivitesi, 1 dakikada 1  $\mu$ mol *p*-nitrofenol oluşturan enzim miktarı, spesifik aktivite ise 1 mg proteindeki enzim ünitesi olarak tanımlandı.

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 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda  $\beta$ -glukozidaz enziminin aktivitesinden sorumlu bantların varlığı UV ışık altında tespit edildi (Turan vd., 2005).

### 2.2.3. Protein Tayini

Protein tayini Lowry metoduna göre gerçekleştirildi (Lowry vd., 1951). Protein standardı olarak sığır serum albümini (BSA) kullanıldı.

- Kalibrasyon grafiği çizmek için hazırlanan BSA çözeltisinden (1 mg/mL) deney tüplerine sırasıyla 10, 20, 30, 40 ve 50  $\mu$ L ilave edildi. Bu şekilde BSA’nın son konsantrasyonu 20, 40, 60, 80 ve 100  $\mu$ g/mL olmaktadır.
- Başka bir deney tüpüne enzim çözeltisinden 10  $\mu$ L ilave edildi.

- Standartlara ve örneğe, hacimlerini 500 µL'ye tamamlayacak şekilde 0,1 N NaOH içindeki %0,1 (w/v) SDS çözeltisinden ilave edilip vortekslendi.
- Her bir tüpe, 1 mL Lowry E çözeltisi ilave edilip vortekslendikten sonra oda sıcaklığında 5-10 dakika bekletildi.
- Standartlara ve numuneye saf su ile 1:1 oranında seyreltilmiş olan Folin Reaktifi'nden 100 µL ilave edildi ve karanlık bir ortamda 30 dakika bekletildi.
- 650 nm'de absorbanslar okundu ve kalibrasyon grafiği çizilerek enzim çözeltisinin protein konsantrasyonu hesaplandı.

#### **2.2.4. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi**

Sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), ayırma jeli %12'lik ve yükleme jeli %5'lik olacak şekilde Maniatis ve arkadaşlarına göre (1989) yapıldı.

Tablo 2'de belirtildiği şekilde hazırlanan jeller, cam plakalar arasına döküldü. Standart proteinler ve örnekler, içerisinde 30 µg protein olacak şekilde SDS yürütme boyasıyla karıştırıldı ve 95 °C'de 5 dakika bekletilip, Hamilton şırıngası yardımıyla kuyucuklara yüklendi. Jelde oluşan boya, yükleme jelinden çıkana kadar yaklaşık olarak 15 dakika 20 mA'de, daha sonra da ayırma jelinin alt kısmına gelene kadar 1-1.5 saat 25 mA'de yürütüldü. Elektroferez işlemi sona erdikten sonra, jel sisteminden dikkatlice alınarak, yaklaşık 15 dakika boyunca boyama çözeltisi içerisinde bekletildi. Protein bantlarının görünür hale getirilmesi için jel, boya uzaklaştırma çözeltisiyle (destaining) 1-1.5 saat çalkalandı. UV ışık kullanılarak bantlar görünür hale getirildi ve elektroforogramlar bilgisayara kaydedildi.

Tablo 2. SDS-PAGE bileşenleri

Bileşenler	Ayırma Jeli (%8)	Yükleme Jeli (%5)
Yükleme Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl)	...	1,25
Ayırma Jeli Tamponu (1.5 M Tris-HCl)	2,5	...
%10 SDS	0,1	0,1
%30 Akrilamid/Bisakrilamid	2,7	1,7
Saf Su	4,6	6,8
%10 APS	0,1	0,1
TEMED	0,006	0,01

### 2.2.5. Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez (PAGE) ile $\beta$ -Glukozidaz Aktivitesinin Ortaya Konulması

Doğal PAGE, SDS içermeyecek şekilde hazırlanan %5'lik yığıma jeli ve %10'luk ayırma jeli kullanılarak gerçekleştirildi. Ayırma jeli %0,1 MUG içerecek şekilde hazırlandı (Tablo 3).

Jel hazırlandıktan sonra tanka yerleştirildi ve tank, doğal PAGE yürütme tamponu ile dolduruldu. Yaklaşık 35  $\mu$ g protein, doğal PAGE yükleme çözeltisi ile karıştırılıp Hamilton şırıngası yardımı ile kuyucuklara yüklendi. Elektrofroz ünitesi buz dolu bir kabın içerisine yerleştirilerek, boya, yığıma jelinden çıkana kadar yaklaşık olarak 20 dakika 20 mA'de, daha sonra da ayırma jelinin alt kısmına gelene kadar 1-1,5 saat 25 mA'de yürütüldü.

Tablo 3. Doğal Poliakrilamid Jel elektrofrezinde kullanılan çözeltiler ve hacimleri

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

Elektroforez işlemi gerçekleştirildikten sonra jel, 15 mL, 100 mM pH 5,0 Mcilvaine tamponu ile üç kez yıkandı. Yıkanan jel, %0,1'lik MUG çözeltisi içinde 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi ve Kodak Gel Logic 200 Imaging System kullanılarak UV ışık altında incelendi (Turan, vd., 2005).

### **2.3. $\beta$ -Glukozidaz Enzimin Kısmi Saflaştırılması**

#### **2.3.1. Aseton Çöktürmesi**

Hazırlanan ham enzim özütü asetonla çöktürüldü. Bunun için, proteinler, 1 hacim özüt ve 1 hacim soğuk aseton karışımında (1:1) çöktürülerek, 4 °C'de 5 dakika 9.000 rpm'de santrifüjlendi. Elde edilen çökelek 4 °C'de 24 saat bekletilerek kalan asetonun uzaklaştırılması sağlandı. Asetonu uçurulan çökelek hacminin 2-3 katı kadar 50 mM sodyum asetat (pH 5,5) tamponunda çözüldü ve çözülmeyen kısmın uzaklaşması için 4 °C'de 5 dakika 8.000 rpm'de santrifüjlendi. Elde edilen süpernatant iyon değişim kromatografi kolonuna yüklenene kadar -20 °C'de saklandı (Demirkan, 2009).

#### **2.3.2. 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 (Turan vd.,2005). Kolon dolgu maddesi 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 50 mM Na-Ac tamponunun (pH 5,5) 350 ml'si ile bir gece boyunca dengeye getirildi. Enzimi 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 tüpler içerisinde biriktirilerek bu tüpler içerisinde  $\beta$ -glukozidaz aktivitesi arandı. Yapılan aktivite testleri sonucunda kolondan çıkan çözeltide  $\beta$ -glukozidaz aktivitesi bulunamadı. Bu durum enzimin kolon matriksine bağlandığını göstermektedir. Daha sonra kolonun NaCl konsantrasyonu sıfırdan başlayarak 0,6 M'a kadar yükseltildi. Bunun için 0-0,6 M NaCl



gradyent köprüsü kullanıldı. Bu köprü iki beher içerisine ayrı ayrı 100 mL tampon konulması ve beherlerden birine konsantrasyonu 0,6 M olacak şekilde NaCl ilave edilmesi ile hazırlandı. Beherler arası tampon geçişi ise ince bir U cam boru ile sağlandı. Peristaltik pompa 0 M tuz içeren tampondan sıvı çektiğçe 0,6 M tuz içeren beher içerisindeki tamponun 0 M tuz içeren behere geçişi sağlandı. Böylelikle tuz konsantrasyonu dereceli olarak artırıldı. Kolondan çıkan fraksiyonlar yaklaşık 2,0 mL olacak şekilde cam tüpler içerisinde biriktirildi. Fraksiyonlardaki protein miktarları 280 nm dalga boyunda yapılan ölçümler sonucu belirlendi. Ayrıca tüm fraksiyonlarda  $\beta$ -glukozidaz aktivitesi bakıldı.  $\beta$ -glukozidaz aktivitesi bulunan tüpler birleştirildi. Toplanan enzim özütü Amicon Ultracel Membrane 10.000 MWCO Milipore kullanılarak 4.000 rpm'de 4 dakika süre ile sürekli santifüj edilerek yoğunlaştırıldı (Turan vd., 2005).

### **2.3.3. Kısmi Olarak Saflaştırılan Enzimin Biyokimyasal Karakterizasyonu**

#### **2.3.3.1. $\beta$ -Glukozidaz Aktivitesi Üzerine Çeşitli Substratların Etkisi**

$\beta$ -Glukozidaz aktivitesi üzerine çeşitli substratların etkisini incelemek amacı ile *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-mannopiranozid, 4-nitrofenil- $\beta$ -D-galaktopiranozid, 4-nitrofenil- $\beta$ -D-sellobiozid, *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranozid substratları kullanılarak aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Böylece enzimin en etkin çalıştığı substrat belirlendi (Turan vd., 2005).

#### **2.3.3.2. $\beta$ -Glukozidaz Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi**

$\beta$ -Glukozidaz aktivitesi üzerine pH'ın etkisini incelemek amacıyla, glisin-HCl (pH 2,0-3,0), sodyum asetat tamponu (pH 4,0-5,0), fosfat tamponu (6,0-7,0) ve Tris-HCl (pH 8,0-9,0) tampon sistemleri kullanılarak ayrı ayrı aktivite tayinleri yapıldı.  $\beta$ -Glukozidaz için bulunan aktivite değerleri kullanılarak %bağlı 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 (Yoon vd., 2008).

### 2.3.3.3. $\beta$ -Glukozidaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

$\beta$ -Glukozidaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla 10-90 °C sıcaklık aralığında, sıcaklık 10 °C artırılarak aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Hazırlanan reaksiyon karışımları su banyosunda belirlenen sıcaklık değerlerinde 15 dakika, inkübe edilerek aktivite tayinleri yapıldı. Sıcaklığa karşı %bağıl aktiviteler grafiğe geçirilerek optimum sıcaklık değeri belirlendi (Yoon vd., 2008).

### 2.3.3.4. $\beta$ -Glukozidaz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

$\beta$ -Glukozidaz aktivitesinin substrat konsantrasyonu ile değişimini incelemek amacıyla optimum şartlarda (pH ve sıcaklık) substratın değişen konsantrasyonlarına (0,001- 0,1 mM *p*NPG) karşı ölçülen hız değerleri grafiğe geçirildi. Böylece hazırlanan substrat doygunluk eğrisinden enzim aktivitesi için optimum substrat konsantrasyonu tayin edildi. Ayrıca, Lineweaver-Burk grafiği de çizilerek enzimin  $V_{maks}$  ve  $K_m$  değerleri belirlendi (Yoon vd., 2008).

### 2.3.3.5. $\beta$ - Glukozidazın pH Kararlılığının İncelenmesi

$\beta$ -Glukozidaz enziminin pH kararlılığının incelenmesi amacıyla enzimi içeren eluat 50 mM glisin-HCl tamponu (pH 2,0-3,0), 50 mM sodyum asetat tamponu (pH 4,0-5,0), 50 mM fosfat tamponu (6,0-7,0) ve 50 mM Tris-HCl (pH 8,0-9,0) tamponları ile 1:1 oranında karıştırıldı. Enzim-tampon karışımları 4 °C 24 saat inkübe edildikten sonra optimum şartlar altında aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Aynı şekilde hazırlanmış fakat inkübe edilmemiş enzim-tampon karışımlarının optimum şartlar altında aktivitelerine bakılarak bu değerler %100 olarak kabul edildi ve bu değerlerden faydalanarak inkübe edilen enzimlerin %kalan aktiviteleri hesaplandı (Turan vd., 2005).

### 2.3.3.6. $\beta$ -Glukozidazın Isıl Kararlılığının İncelenmesi

Enzimin ısıl kararlılığının incelenmesi amacıyla enzim çözeltileri 10 °C artışlarla birlikte 20-90 °C aralığında su banyolarında ayrı ayrı 15, 30, 45, 60 dakika inkübe edildi.

Bu sürenin sonunda enzim çözeltisi buz içine alınarak 5 dakika bekletildi ve buzdan çıkartılıp oda sıcaklığına kadar ısınması beklendi. Daha sonra optimum şartlar altında aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Isı ile hiç muamele edilmemiş enzimin aktivitesi %100 olarak kabul edilerek, inkübe edilen enzimlerin %kalan aktiviteleri hesaplandı (Turan vd., 2005).

#### **2.3.3.7. $\beta$ -Glukozidaz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi**

*A. mellea*  $\beta$ -glukozidaz aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek amacıyla  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  iyonlarının klorür tuzlarının 100 mM'lık stok çözeltileri hazırlandı. Metal iyonlarının reaksiyon karışımındaki son konsantrasyonları 1 mM ve 5 mM olacak şekilde ve optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Metal iyonu içermeyen karışımın aktivitesi %100 olarak kabul edilip metal iyonu ilavesi durumunda %kalan aktiviteler hesaplandı (Yu vd., 2007).

#### **2.3.3.8. $\beta$ -Glukozidaz Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasalların Etkisinin İncelenmesi**

*A. mellea*  $\beta$ -glukozidaz aktivitesi üzerine bazı kimyasalların etkisini incelemek amacıyla, fenilmetansülfonil florür (PMSF), 100 mM'lık ditiyotreitol (DTT) ve %30'luk sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltileri hazırlandı. Kimyasalların reaksiyon karışımındaki son konsantrasyonları 10 mM ve 25 mM olacak şekilde optimum şartlar altında ayrı ayrı aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Kimyasal içermeyen karışımın aktivitesi %100 olarak kabul edilip kimyasalların ilavesi durumunda %kalan aktiviteler hesaplandı (Oyekole vd., 2007).

### **3. BULGULAR**

#### **3.1. Ham Enzim Özütünün Hazırlanması**

$\beta$ -Glukozidaz aktivitesinin belirlenmesi için, *A. mellea*'dan uygun miktarda alınarak 3 farklı pH'da (5,0, 7,0 ve 9,0) ham enzim özütü hazırlandı. Hazırlanan ham enzim özütlerinde aktivite tayini gerçekleştirildi. En yüksek enzim aktivitesi değerine 50 mM'lık sodyum asetat (pH 5,0) tamponunda hazırlanan ham özütte ulaşıldı. İleri çalışmalarda kullanılacak olan ham özütler 50 mM'lık sodyum asetat (pH 5,0) tamponunda hazırlanarak kullanılmaya kadar -20 °C'de saklandı.

#### **3.2. Enzimin Kısmi Olarak Saflaştırılması**

##### **3.2.1. Aseton Çöktürmesi**

Hazırlanan ham enzim özütü soğuk aseton ile çöktürülmüş ve çökelek uygun tamponda çözülmüştür. Çözeltinin, çözünmeyen maddelerin uzaklaştırılması için yapılan santrifüjlenmesinden sonra berrak olduğu gözlenmiştir. Daha sonra enzim çözeltisindeki protein miktarı ve aktivite tayini spektrofotometrik yöntemlerle gerçekleştirilmiş ve enzim çözeltisi iyon değişim kromatografisinde kullanılmak üzere 4 °C'de saklanmıştır.

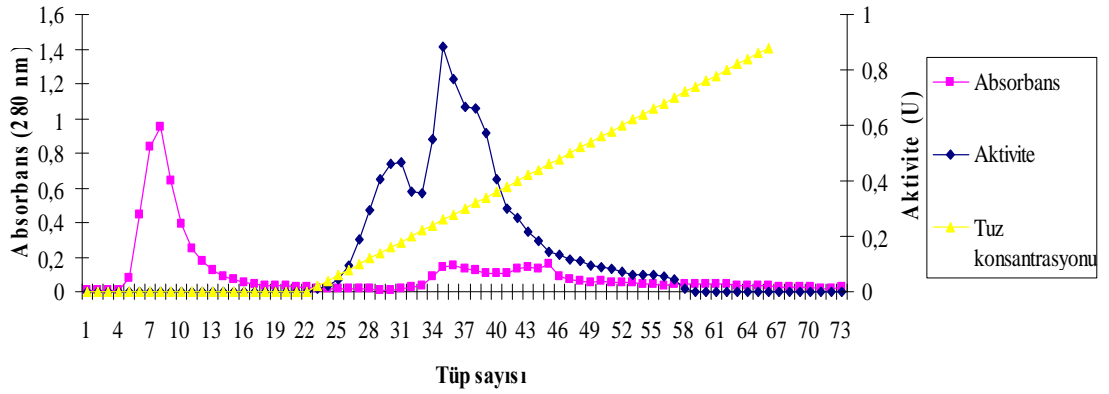
##### **3.2.2. $\beta$ -Glukozidaz Enziminin İyon Değişim Kromatografisi ile Kısmi Olarak Saflaştırılması**

Aseton çöktürmesi sonrası elde edilen örnekler optimum saflaştırma şartlarını (elüsyon tamponu pH'sı, akış zamanı, enzim aktivitesinin görüldüğü tüplerin sırası gibi) belirlemek için değişik şartlarda Q-sepharose fast flow içeren kolona yüklenmiş, tuz köprüsü çalıştırılmış ve fraksiyonların geldiği tüplerde enzim aktivitesi aranmıştır. Yapılan bu çalışmalar sonucu, optimum saflaştırma şartları belirlenmiştir ve saflaştırma işlemi belirlenen bu optimum şartlarda gerçekleştirilmiştir.  $\beta$ -glukozidaz aktivitesinin görüldüğü 37-40. tüplerdeki eluatlar toplanmış ve saflaştırma grafiği hazırlanmıştır (Tablo 4). Bu saflaştırma işleminin sonucunda enzim yaklaşık olarak 40 kat saflaştırıldığı görülmüştür.

İyon değişimine kromatografisi ile enzim saflaştırılmasına ait grafik Şekil 4'te gösterilmiştir.

Tablo 4. *A. mellea*'dan kısmi olarak saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enzimine ait saflaştırma tablosu

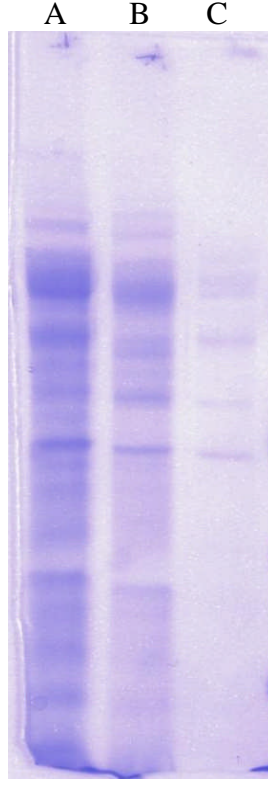
Saflaştırma Basamağı	Hacim (mL)	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Aktivite ( $\mu$ M/dak)	Toplam Aktivite	Spesifik Aktivite (U/mg)	Verim	Saflaştırma Katsayısı
Ham Enzim Özütü	400	3,4	1360	0,0960	38,4	0,0283	100	1,0
Aseton Çöktürmesi	60	1,5	90	0,0955	5,73	0,0636	14,92	2,2
İyon Değişimi (Q-seph.)	30	0,1	3	0,1159	3,48	1,15	9,05	40,6



Şekil 4.  $\beta$ -Glukozidaz enziminin saflaştırılmasına ait iyon değişim kromatografisi grafiği

### 3.2.3. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez

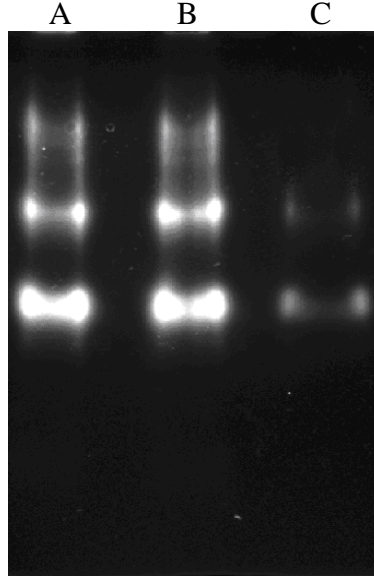
İyon değişim kromatografisi ile kısmi olarak saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enziminin sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektrofrez profili Şekil 5'te verilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi iyon değişim kromatografisi sonrası elde edilen elektrofrez profilinde yaklaşık 6 bandın varlığı ortaya konulmuştur.



Şekil 5. *A. mellea* makromantarından kısmi olarak saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enziminin A) Ham enzim özütü, B) Aseton Çöktürmesi sonrası enzim çözeltisi, C) Kolon sonrası elde edilen enzim çözeltisi

#### 3.2.4. Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez

İyon değişim kromatografisi ile kısmi olarak saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enziminin aktivite boyaması sonrası elde edilen doğal jel elektrofrez profili Şekil 6'da verilmiştir. Şekilde de görüldüğü üzere ham özüt ve aseton çöktürmesi sonucu elde edilen elektrofretik profilde iki baskın ve bir silik bandın, Q-sepharose fast flow kolonu sonrası elde edilen elektrofretik profilde ise bir baskın ve bir silik bandın varlığı ortaya konulmuştur. Bu profil *A. mellea* makro mantarında enzimin izomerleri halinde bulunduğu veya benzer aktiviteye sahip enzimlerin varlığını göstermektedir. İyon değişim kromatografisi sonrasında SDS PAGE'de altı, doğal PAGE'de ise iki farklı bandın varlığı enzim saflaştırmasının kısmi olduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 6. *A. mellea* makromantarından saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enziminin A) Ham enzim Substrat Boyaması, B) Aseton Çöktürmesi Substrat Boyaması, C) Kolon sonrası Substrat Boyaması

### 3.3. *A. mellea*'dan Kısmen Saflaştırılan $\beta$ -glukozidaz Enziminin Biyokimyasal Karakterizasyonu

#### 3.3.1. *A. mellea*'dan Kısmen Saflaştırılan $\beta$ -Glukozidaz Enziminin Substrat Özgünlüğü

*A. mellea*'dan kısmi olarak saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enziminin aktivitesi üzerine çeşitli substratların etkisini incelemek amacıyla *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-mannopiranozid, *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-galaktopiranozid, *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-sellobiozid, *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranozid substratları ile aktivite tayinleri gerçekleştirildi ve %bağlı aktiviteleri hesaplandı.

Tablo 5'te kısmi olarak saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enziminin aktivitesi üzerine çeşitli substratların etkisi incelendiğinde; aktivitenin *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranozid varlığında en yüksek olduğu, *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-sellobiozid varlığında ise *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranozide göre daha düşük bir aktivitenin olduğu tespit edilmiştir. Diğer substratlar varlığında ise  $\beta$ -glukozidaz aktivitesi tespit edilememiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmalarında *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranozid substrat olarak kullanılmıştır.

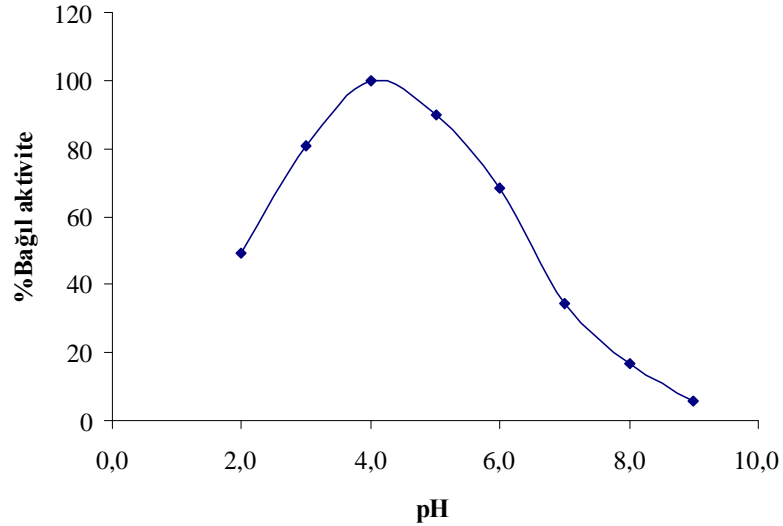
Tablo 5. *A. mellea*'dan kısmen saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enziminin aktivitesi üzerine çeşitli substratların %bağlı aktivite sonuçları

Substrat Adı	%Bağlı Aktivite
<i>p</i> -nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranozid	100
<i>p</i> -nitrofenil- $\beta$ -D-sellobiozid	31,4
<i>p</i> -nitrofenil- $\beta$ -D-galaktopiranozid	0
<i>p</i> -nitrofenil- $\beta$ -D-mannopiranozid	0

### 3.3.2. $\beta$ -Glukozidaz Aktivitesi Üzerine pH Etkisinin İncelenmesi

pH'nın  $\beta$ -glukozidaz aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacı ile farklı pH değerlerinde (2,0-9,0) tamponların kullanılmasıyla ayrı ayrı aktivite tayinleri yapıldı ve %bağlı aktivite-pH grafiği çizildi.

Şekil 7'de verilen grafikten yararlanarak kısmi olarak saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enziminin sodyum asetat tamponunun kullanıldığı pH 4,0 değerinde en yüksek aktivite gösterdiği tespit edildi ve gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmalarında pH'sı 4,0 olan sodyum asetat tamponu kullanıldı.

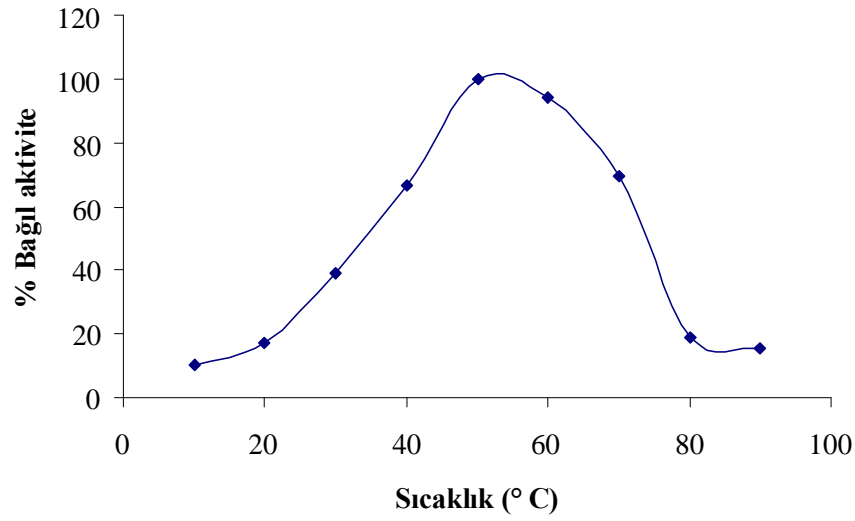


Şekil 7. *A. mellea*'dan kısmen saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enzimine ait %Bağlı aktivite-pH grafiği



### 3.3.3. $\beta$ -Glukozidaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi

Kısmi olarak saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesine ait optimum sıcaklık değerini belirlemek amacıyla 10-90 °C sıcaklık aralığında 10'ar °C aralıkla aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlara göre %bağıl aktiviteye-sıcaklık grafiği çizildi. Bu grafiğe göre  $\beta$ -glukozidaz aktivitesine ait optimum sıcaklık 50 °C olarak belirlendi (Şekil 8).

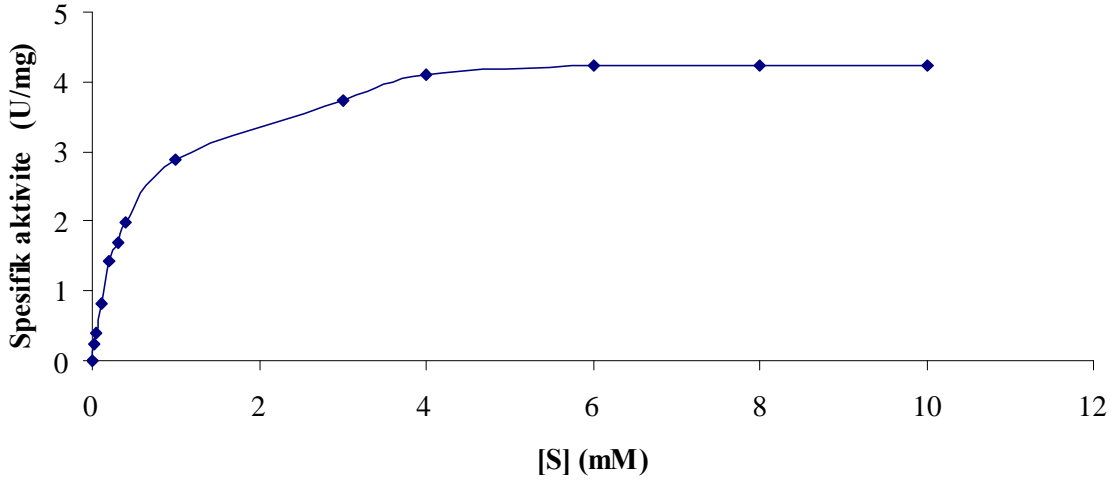


Şekil 8. *A. mellea*'dan kısmen saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enzimine ait % Bağıl aktivite-sıcaklık grafiği

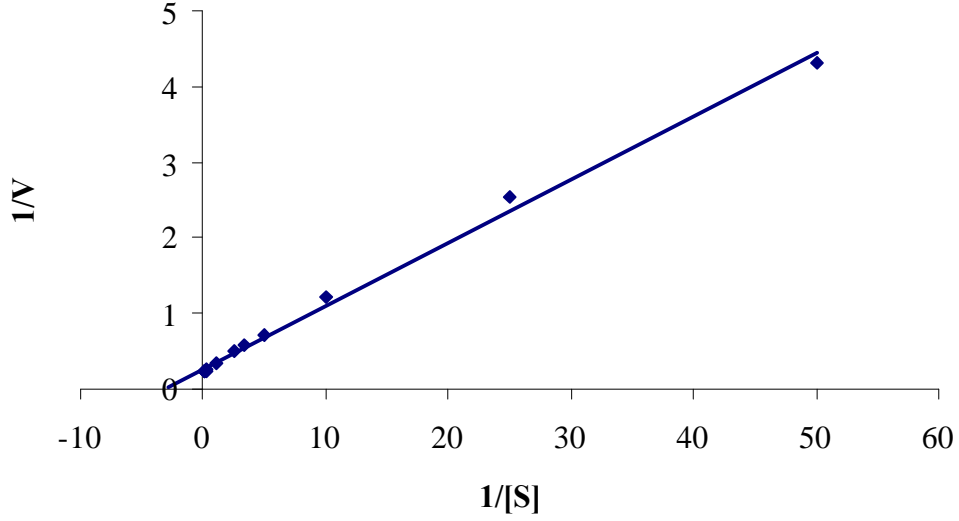
### 3.3.4. $\beta$ -Glukozidaz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisinin İncelenmesi

Kısmi olarak saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesinin substrat konsantrasyonu ile değişimini incelemek amacıyla daha önceden belirlenen optimum şartlarda, farklı substrat konsantrasyonları kullanılarak reaksiyon gerçekleştirildi.  $\beta$ -Glukozidaz aktivitesi için 0,01-10 mM aralığında *p*NPG substrat kullanıldı. Elde edilen aktivite sonuçları kullanılarak substrat doygunluk eğrisi grafiği çizildi (Şekil 9) ve  $\beta$ -glukozidaz aktivitesi için optimum substrat konsantrasyonu 4 mM olarak belirlendi.

Kinetik verilerin belirlenmesi amacıyla Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 10). Bu grafikten,  $\beta$ -glukozidaz aktivitesi için *p*NPG substratı varlığında  $V_{maks}$  ve  $K_m$  değerleri sırasıyla 3,646 U/mg protein ve 0,295 mM olarak bulundu.



Şekil 9. *p*NPG substratı varlığında  $\beta$ -glukozidazın substrat doygunluk eğrisi



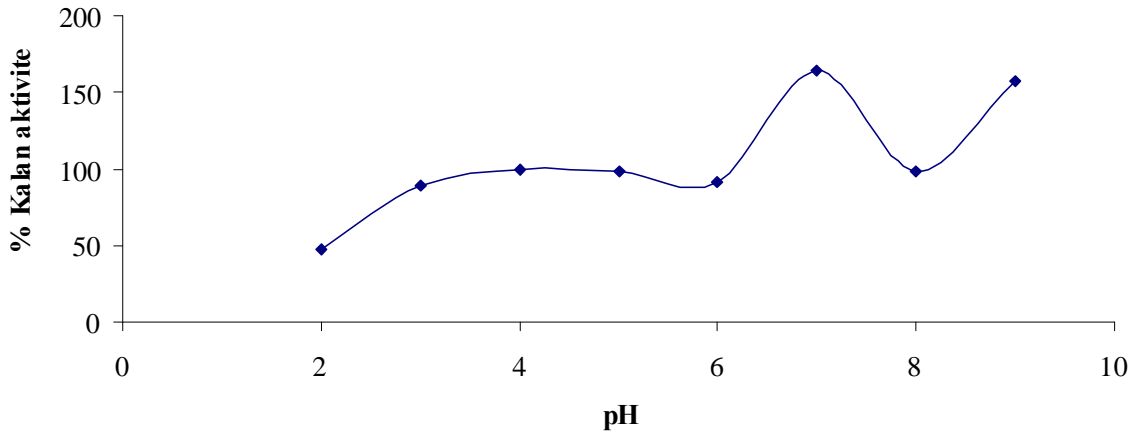
Şekil 10. *p*NPG substratı varlığında  $\beta$ -glukozidaz aktivitesi için Lineweaver-Burk eğrisi

### 3.3.5. $\beta$ -Glukozidazın pH Kararlılığının İncelenmesi

Kısmi olarak saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enzim çözeltisi ile 1:1 oranında farklı pH'lardaki tamponlar karıştırıldı. Elde edilen özüt-tampon karışımlarından uygun miktar alınarak reaksiyon karışımları hazırlandı ve aktivite tayinleri gerçekleştirildi. 4 °C'de 24 saat inkübe edilen özüt-tampon karışımlarından da uygun miktarlarda alınarak reaksiyon

karışımları hazırlandı ve aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Başlangıç ve 24 saat inkübasyon sonucu elde edilen aktiviteler karıştırılarak %kalan aktivite-pH grafikleri çizildi.

Şekil 11’de kısmen saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enziminin incelenen pH değerlerinde farklı aktivite profilleri sergilediği görülmektedir. pH 2,0’de aktivitenin yaklaşık yarı yarıya azaldığı, pH 3,0, 4,0, 5,0, 6,0 ve 8,0 değerlerinde aktivitenin büyük oranda korunduğu ve pH 5,0 ve 9,0 değerlerinde ise aktivitede bir artış olduğu gözlenmiştir.

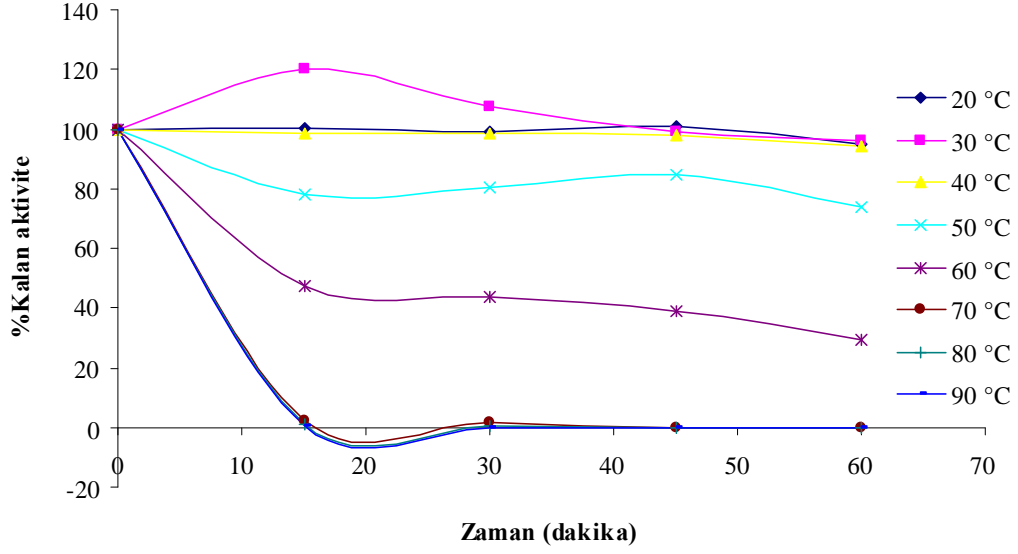


Şekil 11. *A. mellea*'dan kısmen saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enzimine ait %kalan aktivite-pH grafiği

### 3.3.6. $\beta$ -Glukozidazın Isıl Kararlılığın İncelenmesi

Kısmen saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enzimine ait ısıl kararlılık profilini belirlemek amacıyla özütler, 15, 30, 45, 60 dakika zaman dilimleri ve 20-90 °C’lik (10 °C’lik artışlar) sıcaklık aralıklarında su banyosunda ayrı ayrı inkübe edildi. Bu özütler oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra aktivite tayinleri gerçekleştirildi. %Kalan aktiviteler herhangi bir ön işlem uygulanmamış enzim özütünün optimum şartlarda belirlenen aktivite değerleriyle karşılaştırılarak hesaplandı ve grafikler çizildi.

Şekil 12’de  $\beta$ -glukozidaz enziminin 15, 30, 45, 60 dakika sonunda farklı sıcaklıklardaki kalan aktiviteleri gösterilmiştir. Belirtilen inkübasyon sürelerinde aktivite 40 °C’ye kadar yaklaşık olarak %95 oranında korunurken, enzimin optimum sıcaklığı olan 50 °C’de yaklaşık olarak %80 oranında korunmuş, 60 °C’de ise ilk otuz dakikalık zaman dilimi içerisinde %45 oranında korunmuştur. 70-90 °C’lik sıcaklık aralığında ise aktivite büyük oranda azalmıştır.



Şekil 12. *A. mellea*'dan kısmen saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enzimine ait ısıl kararlılık grafiği

### 3.3.7. $\beta$ -Glukozidaz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal iyonlarının Etkisi

Kısmi olarak saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisini incelemek amacıyla  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  ve  $\text{Cu}^{2+}$  iyonlarının klorür tuzlarının 100 mM'lık stok çözeltileri kullanıldı. Optimum şartlarda ve reaksiyon karışımındaki metal iyonlarının nihai konsantrasyonları 1 mM ve 5 mM olacak şekilde aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Kontrol olarak, optimum şartlarda metal iyonu içermeyen örneklerle aktivite tayini yapıldı ve elde edilen aktivite değeri %100 olarak kabul edildi. %Kalan aktivite değeri, kontrol olarak yapılan deneme ve metal iyonu içeren denemeler ile kıyaslanarak hesaplandı ve sonuçlar Tablo 6'da verildi. Bu sonuçlara göre,  $\beta$ -glukozidaz aktivitesinin 1 mM metal iyonu varlığında değişik oranlarda azaldığı gözlenmiştir. 5 mM'lık konsantrasyon değerlerinde ise sadece  $\text{Mn}^{2+}$  iyonu mevcudiyetinde aktivitenin arttığı, diğer metal iyonları mevcudiyetinde ise azaldığı tespit edilmiştir.

Tablo 6. *A. mellea*'dan kısmen saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi

Metal İyonu (1 mM)	%Kalan Aktivite	Metal İyonu (5 mM)	%Kalan Aktivite
NaCl	73	NaCl	75
LiCl	86	LiCl	70
MgCl <sub>2</sub>	93	MgCl <sub>2</sub>	79
MnCl <sub>2</sub>	94	MnCl <sub>2</sub>	128
ZnCl <sub>2</sub>	80	ZnCl <sub>2</sub>	88
CoCl <sub>2</sub>	88	CoCl <sub>2</sub>	93
CaCl <sub>2</sub>	80	CaCl <sub>2</sub>	83
CuCl <sub>2</sub>	76	CuCl <sub>2</sub>	43

### 3.3.8. $\beta$ -Glukozidaz Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasalların Etkisi

$\beta$ -Glukozidaz aktivitesi üzerine bazı kimyasalların etkisini incelemek amacıyla, Fenilmetilsülfonilflorür (PMSF), Ditiyotreitöl (DTT) ve Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) kimyasallarının 100 mM'lık stok çözeltileri hazırlandı.  $\beta$ -Glukozidaz enziminin optimum şartlarda son konsantrasyonunu 10 mM ve 25 mM olacak şekilde yukarıdaki kimyasalların etkisi incelendi (Tablo 7).

Kontrol olarak yukarıdaki kimyasalları içermeyen reaksiyon karışımları kullanıldı ve bu karışımlar için gözlenen aktivite değerleri %100 olarak kabul edildi.  $\beta$ -Glukozidaz aktivitesi 10 mM ve 25 mM'lık PMSF mevcudiyetinde konsantrasyon değerlerinde farklı oranlarda inhibisyon olduğu, DTT varlığında ise aktivite önemli derecede değişiminin olmadığı ve SDS mevcudiyetinde ise aktivite hemen hemen tamamen yok olduğu görüldü.

Tablo 7. *A. mellea*'dan kısmen saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine bazı kimyasalların etkisi

Kimyasallar	% Kalan Aktivite	
	10 mM	25 mM
DTT	102	103
PMSF	95	61
SDS	6	2

#### 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR

Bu çalışmada *Armillaria mellea* mantarından hazırlanan ham özütte  $\beta$ -glukozidaz enziminin varlığı tespit edilmiştir. Aseton çöktürmesi ve iyon değişim kromatografisi ile kısmi olarak saflaştırılmış ve kısmi olarak saflaştırılan enzim biyokimyasal olarak karakterize edilmiştir. Elde edilen veriler diğer çalışmalardaki  $\beta$ -glukozidazlar ile karşılaştırılmıştır.

*A. mellea*'dan hazırlanan ham enzim özütü ve iyon değişim kromatografisi sonrası kısmi olarak saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enziminin SDS jel elektroforezi yapılmıştır (Şekil 5). Ham enzim özütündeki yoğun bant profili iyon değişim kromatografisi sonrası yaklaşık 6 banda düşmüştür. Ham enzim özütünde ve iyon değişimi kromatografisi sonrasında elde edilen enzim çözeltisindeki  $\beta$ -glukozidaz aktivitesini ortaya koymak amacı ile doğal poliakrilamid jel elektroforezi yapılmıştır (Şekil 6). Elektroforez sonucunda ham enzim özütünde iki baskın ve bir silik bandın, iyon değişim kromatografisi sonrası elde edilen elektroforetik profilde ise bir baskın ve bir silik bandın varlığı ortaya konulmuştur. Bu profil, *A. mellea* makromantarında enzimin, izomerleri halinde bulunduğunu veya benzer aktiviteye sahip enzimlerin olduğunu göstermektedir. İyon değişim kromatografisi sonrası SDS elektroforez sonrası yaklaşık altı bandın, doğal jel elektroforezinde ise iki farklı bandın varlığı enzim saflaştırmasının kısmi olduğu sonucunu ortaya koymaktadır.

*A. mellea*'dan hazırlanan ham enzim özütün sahip olduğu  $\beta$ -glukozidaz aktivitesini ortaya koymak için farklı substratlar denenmiş ve en yüksek aktiviteye *pNPG* varlığında ulaşılmıştır. Bundan sonraki karakterizasyon çalışmasında substrat olarak *pNPG* kullanılmıştır. *Penicillium pinophilum*'dan saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz aktivitesini tespit etmek için *pNPG* substratı kullanılmıştır (Joo vd., 2010). Yine aynı şekilde *Lepista flaccida*'dan kısmi olarak saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz aktivitesi tespiti için (Elvan, 2009) ve *Climacocysis borealisten*'den saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz aktivitesi için (Demirkan, 2009) substrat olarak *pNPG* kullanıldığı görülmektedir.

*A. mellea*'dan iyon değişim kromatografisi ile kısmi olarak saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enziminin pH'ya bağımlılığı incelendiğinde, optimum pH değerinin 4,0 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 7). *L. flaccida*'dan kısmi olarak saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enziminde de aynı optimum pH değeri gözlenmiştir (Elvan, 2009). pH 3,0-6,5 arasındaki pH değerleri

birçok  $\beta$ -glukozidaz için benzerdir (Tablo 8). Farklı çalışmalarda  $\beta$ -glukozidaz enziminin sahip olduğu optimum pH değerleri, *C. borealis* için 3,0 (Demirkan, 2009), *Fomitopsis palustris* için 4,5 (Yoon vd., 2008), *Aspergillus oryzae* sp. 100 için 5,0 (Zhang vd., 2007), *Volvariella volvacea* için 6,4 (Li vd., 2005) olarak tespit edilmiştir. Enzimin pH kararlılığını incelemek amacıyla enzim özütleri farklı pH'larda 4 °C'de 24 saat inkübe edildi. Gerçekleştirilen aktivite denemeleri sonrasında enzim için %kalan aktivite-pH grafiği çizildi (Şekil 11). Kısmi olarak saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enziminin incelenen pH değerlerinde farklı aktivite profilleri sergilediği görülmektedir. pH 2,0'de aktivitenin yaklaşık yarı yarıya azaldığı, pH 3,0 - 6,0 ve 8,0 değerlerinde aktivitenin büyük oranda korunduğu ve pH 7,0 ve 9,0 değerlerinde ise aktivitede önemli bir artış olduğu gözlenmiştir. Genel olarak bakıldığında  $\beta$ -glukozidaz enziminin pH 3,0-9,0 aralığında aktivitesini büyük oranda koruduğu veya arttığı, dolayısıyla enzim özütünün içerdiği  $\beta$ -glukozidaz aktivitesi açısından yüksek sayılabilecek pH kararlılığına sahip olduğu gözlenmiştir. Benzer bir durum *L. flaccida* mantarından kısmi olarak saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enziminde de elde edilmiştir. Kısmi olarak saflaştırılan enzim 4 °C'de 24 saat inkübe edildikten sonra optimum şartlar altında aktivite tayinleri gerçekleştirilmiş ve enzim pH 2,0-9,0 aralığında kararlılık gösterdiği gözlenmiştir (Elvan, 2009). *Pichia pastoris*'den saflaştırılan enzim 5,5-9,5 aralığında aktivitesini %95 oranında koruduğu tespit edilmiştir (Turan ve Zheng, 2005). *C. borealis* mantarından saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enzimine ait pH kararlılığı incelendiğinde pH 3,0-7,0 aralığında kararlılık gösterdiği tespit edilmiştir. *Aspergillus niger* ve *Aspergillus oryzae* mantarlarından saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enzimlerinin pH kararlılıkları incelenmiş ve sırası ile 4,0-8,0 ve 4,0-5,0 aralığında enzimlerin kararlı olduğu tespit edilmiştir (Zhang vd., 2007).

*A. mellea*'dan kısmi olarak saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla yapılan denemelerde optimum sıcaklığın 50 °C olduğu tespit edilmiştir (Şekil 8). Aynı şekilde *Volvariella volvacea* mantarından saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enziminin optimum sıcaklığı 50 °C olarak gözlenmiştir (Li vd., 2005). Farklı organizmalarda yalpan çalışmalarda; *Penicillium pinophilum* için optimum sıcaklık 32 °C (Joo vd., 2010), *Pichia pastoris* için optimum sıcaklık 40 °C (Turan ve Zheng, 2005), *L. flaccida* için optimum sıcaklık 60 °C (Elvan,2009) olarak bulunmuştur. Ayrıca farklı organizma türlerinin optimum sıcaklıkları incelendiğinde 50-70 °C arasında farklı sıcaklık değerlerinde optimum sıcaklığa sahip oldukları görülmektedir (Tablo 8). *A. mellea*'dan

kısmi olarak saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enziminin optimum sıcaklığının bu verilerle karşılaştırıldığında uygun bir değere sahip olduğu söylenebilir.

*A. mellea*'dan kısmi olarak saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enzimini ısı kararlılığı incelendiğinde kısmi olarak saflaştırılan enzimin 1 saatlik zaman dilimi içerisinde aktivitesini 40 °C'ye kadar yaklaşık %95 oranında korurken, enzimin optimum sıcaklığı olan 50 °C'de yaklaşık %80 oranında korumuş, 60 °C'de ise ilk otuz dakikalık zaman dilimi içerisinde %45 oranında korunmuştur. 70-90 °C'lik sıcaklık aralığında ise aktivite büyük oranda azalmıştır (Şekil 12). *C.borealis*'den saflaştırılan  $\beta$ -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 (Demirkan, 2009). *Volvariella volvacea*'daki  $\beta$ -glukozidaz enzimi 2 saatlik ön inkübasyon sonucunda 42 °C'ye kadar kararlılığını %40-50 oranında korurken, 45 °C'de ise bu oran neredeyse sıfıra inmektedir (Li vd., 2005). *Penicillium pinophilum*'den saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enziminin ısı kararlılığının ise 50 °C'ye kadar yüksek oranda aktivitesini koruduğu, 70 °C'de aktivitesini yüksek oranda aktivitesini kaybettiği görülmektedir (Joo vd., 2010).

$\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesinin substrat konsantrasyonu ile değişimini incelemek amacı ile daha önceden belirlenen optimum şartlarda, farklı substrat konsantrasyonları kullanılarak reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir.  $\beta$ -glukozidaz aktivitesi için 0,01-10 mM aralığında *p*NPG substrat kullanılmıştır. *p*NPG varlığında gerçekleştirilen aktivite tayinlerinden elde edilen değerler kullanılarak çizilen Linewear-Burk eğrisinden  $V_{maks}$  ve  $K_m$  değerleri sırasıyla 3,646 U/mg protein ve 0,295 mM olarak bulunmuştur (Şekil 9 ve Şekil 10). *L. flaccida*'dan kısmi olarak saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enzimi için  $V_{maks}$  ve  $K_m$  değerleri sırasıyla 5,78 nmol.dak<sup>-1</sup>/mg protein ve 1,06 mM olarak bulunmuştur (Elvan, 2009). *C. borealis*'den saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enzimi için  $V_{maks}$  ve  $K_m$  değerleri sırasıyla 72,46 U/mg ve 8,98 mM olarak bulunmuştur (Demirkan, 2009). *A. mellea*'dan kısmi olarak saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enziminin  $V_{maks}$  değerinin yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında düşük olduğu tespit edilmiştir. Ancak  $K_m$  değerinin de birçok değerden daha düşük olması ise enzimin *p*NPG substratına ilgisinin birçok organizmadaki enzimlerden daha fazla olduğu sonucunu ortaya koymaktadır (Tablo 8).



Tablo 8. Bazı organizmalardan saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enzimlerinin biyokimyasal ve kinetik özellikleri (Joo vd., 2010).

	Mr (kDa)	Dördüncül Yapı	$K_m$ (mM)	Opt. pH	Opt. Sic. (°C)	$V_{max}$ (U/mg protein)
<i>Armillaria mellea</i>	-	-	0,295	4	50	3,646
<i>Aspergillus niger</i>	105	Dimer	21,7	5,0	55	199
<i>Aspergillus niger</i>	330	Tetramer	1,1	4,6-5,3	70	-
<i>Candida peltata</i>	43	Monomer	2,3	5,0	50	221
<i>Ceriporiopsis subvermispara</i>	110	-	3,3	3,5	60	0,13
<i>Daldinia eschscholzii</i>	64	Monomer	1,5	5,0	50	3,2
<i>Fomitopsis pinicola</i>	105	Monomer	1,8	4,5	50	1710
<i>Melamocarpus sp.</i>	92	Monomer	3,3	6,0	60	44
<i>Piptoporus betulinus</i>	36	Monomer	1,8	4,0	60	19
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	114	-	1,0	4,0-5,2	-	33
<i>Stachybotrys sp.</i>	85	Dimer	0,27	5,0	50	78
<i>Xylaria regalis</i>	85	-	1,7	5,0	50	326
<i>Penicillium verruculosum</i>	95	Dimer	0,2	5,0	70	0,29
<i>Penicillium funiculosum</i>	-	-	0,4	4,0	50	174
<i>Penicillium occitanis</i>	98	-	0,37	4,5	60	173
<i>Penicillium pinophilum</i>	120	Monomer	5,5	5,0	60	1120

Kısmi olarak saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi incelendi. 1 mM ve 5 mM final konsantrasyonlarında metal iyonlarının enzimle inkübe edilerek aktivitesindeki değişimler belirlendi (Tablo 6). Bu sonuçlara göre,  $\beta$ -glukozidaz aktivitesinin 1 mM metal iyonu varlığında değişik oranlarda azaldığı gözlemlendi. 5 mM'lık konsantrasyon değerlerinde ise sadece  $Mn^{2+}$  iyonu mevcudiyetinde aktivitenin arttığı, diğer metal iyonları mevcudiyetinde ise azaldığı tespit edildi. Daha önce yapılan çalışmalarda da  $Mn^{2+}$ 'nin aktiviteyi artırdığı tespit edilmiştir (Riou vd., 1998; Fan vd., 2011). Metal iyonları farklı koordinasyon sayılarına, oluşturdukları bileşiklerde farklı koordinasyon geometrisine ve Lewis asidi potansiyeline sahip olabilirler. Bu yüzden proteinler karşısında farklı ligand özellikleri gösterebilirler. Buna ilave olarak aktivasyona ve inhibisyona sebep olma gibi farklı durumlar, metal iyonlarının proteinlerin farklı bölgelerine bağlanmaları sonucu enzim yapısını farklı şekilde etkileyebilmelerinden de kaynaklanabilir (Keskin, 2009).

Kısmi olarak saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine bazı kimyasalların etkisi incelenmiştir. 10 mM ve 25 mM son konsantrasyonlarında bazı kimyasallar enzimle inkübe edilerek aktivitesindeki değişimler belirlenmiştir (Tablo 7). Bu sonuçlara göre,  $\beta$ -glukozidaz aktivitesi 10 mM ve 25 mM'lık PMSF varlığında bu konsantrasyon değerlerinde farklı oranlarda inhibe olmuştur, DTT varlığında ise aktivite önemli derecede değişmemiş ve SDS mevcudiyetinde hemen hemen tamamen inhibe olmuştur. Serin birimlerini sülfolayan ve enzim aktivitesini inhibe eden PMSF varlığında aktivitenin azaldığı gözlemlenmiştir. Bu inhibisyonun serinin katalitik grubun bir üyesi olduğu sonucunu ortaya koyabilir (Demirkan, 2009). Disülfür köprülerini indirgeyen DTT'nin aktiviteyi etkilememesi, disülfür köprülerinin aktivite için gerekli olmadığı sonucunu ortaya koyabilir (Çakmak, 2008). Anyonik bir deterjan olan SDS'in aktiviteyi tamamen inhibe etmesi ile enzimin kovalent olmayan etkileşimlerle bir arada tutulan alt birimlerden oluştuğu sonucuna ulaşılabilir (Elvan, 2009).

Sonuç olarak, *A. mellea*'dan kısmi olarak saflaştırılan  $\beta$ -glukozidaz enziminin pNPG substratı varlığında, optimum pH ve sıcaklık, pH ve ısıl kararlılığı, metal iyonları ve bazı kimyasalların etkisi ve kinetik bazı parametreler açısından çeşitli organizmalardaki  $\beta$ -glukozidazlarla oldukça benzer davranışlar gösterdiği belirlenmiştir.

## 5. ÖNERİLER

Enzimler doğanın katalizörleridir ve dolayısıyla enzimsiz bir hayatın var olması düşünülemez. Enzim terimi bin sekizyüzlü yılların sonlarında ortaya atılmış ve günümüze kadar birçok farklı organizmadan yüzlerce farklı enzim karakterize edilmiştir. Gelişen teknolojiyle birlikte enzimler, tıptan birçok sanayi dalına kadar farklı alanlarda kullanılmaya başlanmıştır. 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 edilmektedir.

Günümüzde hala değişik organizmalarda mevcut olan enzimleri inceleyen araştırmalar devam etmektedir. Bu tür yeni enzimlerin ortaya çıkarılmasına yönelik çalışmalar, farklı özelliklere sahip enzimlerin keşfi için önem arz etmektedir.

Selüloz bitki hücre duvarlarının temel iskeletidir. Spano ve arkadaşlarına (1975) göre selüloz; gıda, yakıt ve kimyasalların en fazla bulunan organik kaynağıdır. Bununla beraber selülozun kullanımı glukoza kadar hidroliz olabilmesine bağlıdır. Asit ve yüksek sıcaklıkta bozulma istenen bir durum değildir. Çünkü bu koşullarda bozulma oluşu zaman oluşan şeker ve atık hale gelen selülozda safsızlıklar oluşur.

Selülozun yenilebilen bir enerji kaynağı olarak önemli bir potansiyele sahip olması, selülaz parçalayıcı enzimler ya da selülazlar ortaya çıktıktan sonra oluşmuştur. Pahalı olmayan selüloz atıklarının etkili bir şekilde muamelesi ve işlenmesi ile ilgili yeni metotlar geliştirmesi günümüzde ekonomik açıdan oldukça önemlidir. Selülazlar selülozik biyokütlenin etkili bir şekilde işlenmesinde kilit role sahiptirler.

Bu çalışmada *Armillaria mellea* mantarından hazırlanan ham özütte  $\beta$ -glukozidaz enziminin varlığı tespit edilmiştir. Aseton çöktürmesi ve iyon değişim kromatografisi ile kısmi olarak saflaştırılmış ve kısmi olarak saflaştırılan enzim biyokimyasal olarak karakterize edilmiştir. Elde edilen veriler diğer çalışmalardaki  $\beta$ -glukozidazlar ile mukayese edilmiştir.

Bundan sonra yapılabilecek olan çalışmalar, iyon değişim kromatografisi ile kısmi olarak saflaştırılıp karakterize edilmiş olan  $\beta$ -glukozidaz enziminin tam saflaştırılması ve ileri derecede karakterize edilmesi, çeşitli kimyasal maddeler mevcudiyetinde davranışının ve inhibisyon mekanizmalarının incelenmesi şeklinde sıralanabilir. Ayrıca enzimi

kodlayan genlerin moleküler biyolojisi çalışılarak rekombinant enzim üretimi gerçekleştirilebilir ve mutasyon çalışmaları ile enzimin bazı özellikleri geliştirilebilir.

Enzimlerin sürekli kullanılabilirlik ve kararlılıklarını artırmanın diğer bir yolu da immobilizasyon yöntemidir. Bu yöntem sayesinde, immobilize enzimin özelliklerinin ve dolayısıyla kararlılıklarının nasıl değiştiği araştırılabilir. Böylece enzimler reaksiyonlarda defalarca kullanılacak hale getirileceğinden, endüstriyel açıdan da oldukça cazip hale geleceklerdir. Bu nedenle, daha ileri çalışmalarda *A. mellea* mantarındaki  $\beta$ -glukozidaz enziminin immobilizasyonu da incelenebilir.

## 6. KAYNAKLAR

- Akmaz, S., 2001. Selülozun Enzimli Hidroliz Yoluyla Glukoza Dönüştürülmesi ve Tepkime Kinetiğinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İTÜ., Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Amouri, B. ve Gargouri, A., 2006. Characterization of a novel  $\beta$ -glucosidase from a stachybotrys strain, Biochemical Engineering Journal, 32, 191-197.
- Anşın, R., Eminagaoğlu, Ö. ve Göktürk, T., 2000, Artvin İli Sınırlarında Yenebilen Bazı Mantarlar, Türkiye VI. Yemeklik Mantar Kongresi, Bengama, Bildiri:122-129.
- Aygan, A., 2008. Haloalkalofil *Bacillus Sp.* İzolasyonu, Amilaz, Selülaz ve Ksilanaz Enzimlerinin Üretimi, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulamalarda Kullanılabilirliği, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Beguin, P. ve Aubert, J.P., 1993. The biological degradation of cellulose, FEMS Microbiol. Rev., 13, 25-58.
- Bhat, M.K. ve Bhat, S., 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial application, Biotechnology advances, 18, 583-620.
- Bhat, M.K., 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology, Biotechnol. Adv., 18, 355-383.
- Chapin III, F.S., Matson, P.A. ve Money, H.A., 2002. Principles of Terrestrial Ecosystem Ecology, Springer-Verlag, New York
- Çakmar, E., 2005. Farklı Ortamlardan Ayrımı Yapılan Aşırı Halofilik Bakterilerin Protein Profilleri ve Bu Bakterilerin Selülaz Enzim Aktivitelerinin Ölçülmesi, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Demirkan, G., 2009. *Climacocystic borealis*'den  $\beta$ -Glukozidaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Ertunga, N.S., 2006. Termofilik *Anoxybacillus gonensis* G2 suşunun fruktoz-1,6-bifosfat Aldolaz Geninin Klonlanması, Ekspresyonu ve Karakterizasyonu, Doktora Tezi, KTÜ., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Fan, H.X., Miao, L.L., Liu, Y., Liu, H.C. ve Liu, Z.P., 2011. Gene cloning and characterization of a cold-adapted  $\beta$ -glucosidase belonging to glycosyl hydrolase family 1 from a psychrotolerant bacterium *Micrococcus antarcticus*, Enzyme and Microbial Technology, 49, 94-99.

- Jeya, M., Nguyen, N.P.T., Moon, H.J., Kim, S.H. ve Lee, J.K., 2010. Conversion of woody biomass into fermentable sugar by cellulase from *Agaricus arvensis*, Bioresource Technology, 101, 8742-8749.
- Joo, A.R., Jeya, M., Lee K.M., Lee, K.M., M, H.J., Kim, Y.S. ve Lee, J.K., 2010. Production and characterization of  $\beta$ -1,4-glucosidase from a strain of *Penicillium pinophilum*, Process Biochemistry, 45, 851-858.
- joo, A.R., Jeya, M., Lee, K.M., Sim, W.II., Kim, J.S., Kim, İ.W., Kim, Y.S., Oh, D.K., Gunasekaran, P. ve Lee, J.K., 2009. Purification and characterization of a  $\beta$ -1,4-glucosidase from a newly isolated strain of *Fomitopsis pinicola*, Appl Microbiol Biotechnol, 83, 285-294.
- 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.
- Jorgensen, H., Kutter, J.P. ve Olsson, L., 2003. Separation and quantification of cellulase and hemicellulases by capillary electrophoresis, Analytical Biochemistry, 317, 85-93.
- Keskin, Ş., 2009. *Russula delica* mantar numunesinden polifenol oksidaz enziminin karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Kumaran, S., Sastry, C.A and Vikineswary, S., 1997. Laccase, cellulase and xylanase activities during growth of *Pleurotus sajor-caju* on sago hampas, World Journal of Microbiology & Biotechnology, 13, 43-49.
- Lee, Y.J., Kim, B.K., Lee, B.H., Jo, K.I., Lee, N.K., Chung, C.H., Lee, Y.C. ve Lee, J.W., 2008. Purification and characterization of cellulase product by *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3utilizing rice hull, Bioresource Technolgy, 99, 378-386.
- Li, X., Pei, J., Wu, G. ve Shao, W., 2005. Expression, purification and characterization of a recombinant  $\beta$ -glucosidase from *Volvariella volvacea*, Biotechnol Lett., 25, 1369-1373.
- Mandels, M., 1985. Application of cellulases, Biochem. Soc. Trans., 13, 414-415.
- Oyekole, O.O., Ngesi, N. ve Whiteley, C.G., 2007. Isolation, purification and characterisation of an endoglucanase and  $\beta$ -glucosidase from an anaerobic sulphidogenic bioreactor, Enzyme and Microbial Technology, 40, 637-644.
- Riou, C., Salmon, J.M., Vallier, M.J., Günata, Z. ve Barre P., 1998. Purification, characterization and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant- $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus oryzae*, Applied and Environmental Microbiology, 10, 64, 3607-3614.

- Souza, F.H.M., Nascimento, C.V., Rosa, J.C., Masui, D.C., Leone, F.A., Jorge, J.A ve Furriel, R.P.M., 2010. Purification and biochemical characterization of a mycelial glucose- and xylose-stimulated  $\beta$ -glucosidase from the thermophilic fungus *Humicola insolens*, Process Biochemistry, 45, 272-278.
- Trivedi, N., Gupta, V., Kumar, M., Kumari, P., Reddy, C.R.K. ve Jha, B., 2011. An alkali-halotolerant cellulase from *Bacillus flexus* isolated from green seaweed *Ulva latuca*, Carbohydrate Polymers, 83, 891-897.
- Turan, Y. ve Zheng, M., 2005. Purification and Characterization of an Intracellular  $\beta$ -Glucosidase from the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*, Biochemistry (Moscow), 70, 12, 1363-1368
- 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>, 10.04.2011.
- Yılmaz, S., 2007. Alternatif Besin Yan Ürünlerinden Bakteriyel Selüloz Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, İTÜ., Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Yoon, J., Kim, K.Y. ve Cha, C.J., 2008. Purification and Characterization of Thermostable  $\beta$ -Glucosidase from the Brown-Rot Basidiomycete *Fomitopsis palustris* Grown on Microcrystalline Cellulose, The Journal of Microbiology, 46, 1, 51-55
- Yu, H.L., Xu, J.H., Lu, W.Y. ve Lin, G.Q., 2007. Identification, purification and characterization of b- glucosidase from apple seed as a novel catalyst for synthesis of o-glucosides, Enzyme and Microbial Technology, 40, 354-361.
- Zhang, C., Li, D., Yu, H., Zhang, B. ve Jin, F., 2007. Purification and characterization of piceid-  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus oryzae*, Process Biochemistry, 42, 83-88.
- Zhang, Y.H.P., Himmel, M.E. ve Mielenz, J.R., 2006. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies, Biotechnology Advances, 24, 452-481.

## ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Rize’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Rize’de tamamladı. 2003-2008 yılları arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü’nde Lisans öğrenimini tamamladı. 2009 yılında KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Programına girdi. İyi derecede İngilizce bilmektedir.