

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



MALATYA KAYISISI (*PRUNUS ARMENIACA* L.)
ÇEKİRDEĞİNDEN BETA-GLUKOZİDAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZEKİ EKMEKÇİ

BALIKESİR, HAZİRAN-2016

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



MALATYA KAYISISI (*PRUNUS ARMENIACA* L.)
ÇEKİRDEĞİNDEN BETA-GLUKOZİDAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZEKİ EKMEKÇİ

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Yusuf TURAN (Tez Danışman)**
Yrd. Doç. Dr. Hatibe KARA (Eş Danışman)
Prof. Dr. Gülendam TÜMEN
Prof. Dr. Raif KURTARAN
Doç. Dr. Fatih COŞKUN

BALIKESİR, HAZİRAN-2016

KABUL VE ONAY SAYFASI

Zeki EKMEKÇİ tarafından hazırlanan “MALATYA KAYISISI (*Prunus armeniaca* L.) ÇEKİRDEĞİNDEN BETA-GLUKOZİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 02.06.2016 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı** Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

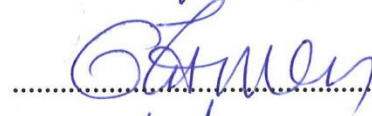
Danışman
Prof. Dr. Yusuf TURAN



Eş Danışman
Yrd. Doç. Dr. Hatibe KARA



Üye
Prof. Dr. Gülendamar TÜMEN



Üye
Prof. Dr. Raif KURTARAN



Üye
Doç. Dr. Fatih COŞKUN



Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Doç. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

**Bu tez çalışması Balıkesir Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma
Projeleri Birimi tarafından 2014/108 nolu proje ile desteklenmiştir.**

ÖZET

**MALATYA KAYISI (PRUNUS ARMENIACA L.) ÇEKİRDEĞİNDEN
BETA-GLUKOZİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI
VE KARAKTERİZASYONU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ZEKİ EKMEKÇİ
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. YUSUF TURAN)
(EŞ DANIŞMAN: YRD. DOÇ. DR. HATİBE KARA)
BALIKESİR, HAZİRAN-2016**

Bu çalışmanın amacı bitkilerde önemli rolü olan β -Glukozidaz enzimini, Malatya kayısı meyva ve çekirdeğinden saflaştırmaktır. Enzim aktivitesi meyva ve çekirdekte iki dönem olarak araştırılmıştır. Her iki dönemde de enzim aktivitesinin çekirdekte daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu yüzden sonraki çalışmalarda enzim, kayısı çekirdeğinden saflaştırılarak karakterize edilmiştir. Ekstraksiyon aşamasını takiben amonyum sülfat çöktürmesi yapılmış ardından hidrofobik etkileşim kromatografisi ile enzim saflaştırılmıştır. Enzim % 14 verimle 11.1 kat saflaştırılmış ve SDS-PAGE’de molekül ağırlığı yaklaşık 60 kDa olarak görüntülenmiştir.

Saflaştırılan enzimin optimum sıcaklık değeri 55°C ve optimum pH değeri 5.0 olarak tespit edilmiştir. *Para*-Nitrofenil β -D-glukopiranosid (*p*-NPGlu), *orto*-nitrofenil β -D-glukopiranosid (*o*-NPGlu), *para*-nitrofenil β -D-galaktopiranosid (*p*-NPGal) ve *orto*-nitrofenil β -D-galaktopiranosid (*o*-NPGal) bazı yapay substratların enzime olan ilgisi araştırılmıştır. *p*-NPGlu için K_M değeri 2.48 Mm, V_{max} değeri ise 58.14 EU bulunmuş, enzimin en yüksek afiniteyi bu substrata karşı gösterdiği tespit edilmiştir.

Saflaştırılan kayısı çekirdeği β -Glukozidazına, glukoz ve δ -Glukonolaktonun inhibitör etkileri araştırılmıştır. Glukozun enzimi güçlü inhibe etmediği görülmüş ve dolayısıyla IC_{50} değeri hesaplanmamıştır. δ -Glukonolaktonun IC_{50} değeri ise 0.83 mM olarak bulunmuştur.

ANAHTAR KELİMELER: Malatya kayısı, β -Glukozidaz, saflaştırma, karakterizasyon, *Prunus armeniaca*.

ABSTRACT

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF BETA-GLUCOSIDASE FROM SEED OF MALATYA APRICOT (*PRUNUS ARMENIACA* L.)

MSC THESIS

ZEKİ EKMEKÇİ

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. YUSUF TURAN)

(CO-SUPERVISOR: ASSIST PROF. DR. HATİBE KARA)

BALIKESİR, JUNE-2016

The aim of this study is to purify β -Glucosidase, which has important role in plants, from both fruit and seed parts of Malatya apricot separately. Enzyme activity was investigated in two periods as the seed and fruit. Enzyme activity in seed extract was determined quite higher than the activity from fruit extract in both periods. Therefore, the enzyme has been isolated from seeds of apricot and subsequently purified during the entire experiments. Following the extraction, the enzyme was precipitated with ammonium sulfate and purified by using hydrophobic interaction chromatography. The enzyme was purified 11.1- fold with 14 % yield and enzyme protein was visualized and determined molecular weight about 60 kDa on SDS-PAGE gel.

Optimum temperature and pH of the purified enzyme were determined as 55°C and 5.0 respectively. Some of the artificial substrates of the enzyme *para*-nitrophenyl β -D-glucopyranoside (*p*-NPGlu), *para*-nitrophenyl β -D-galactopyranoside (*p*-NPGal), *orto*-nitrophenyl β -D-glucopyranoside (*o*-NPGlu) and *orto*-nitrophenyl β -D-galactopyranoside (*o*-NPGal) have been investigated in the interest of. Kinetic values of the enzyme, which are expressed as K_M and V_{max} were determined against *p*-NPGlu as 2.48 mM and 58.14 EU, respectively.

The inhibitory effects of glucose and δ -Gluconolactone were investigated on purified apricot seed β -Glucosidase. Glucose was observed that due to the not strong inhibition and IC_{50} value was not calculated. IC_{50} value of δ -Gluconolactone was determined as 0.83 mM.

KEYWORDS: Malatya apricot, β -Glucosidase, purification, characterization.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRAC.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vi
SEMBOL LİSTESİ	vii
ÖNSÖZ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Malatya Kayısı.....	2
1.2 β -Glukozidazların Adlandırılması	3
1.3 β -Glukozidazların Özellikleri Ve Üç Boyutlu Yapısı.....	4
1.4 Enzimlerin İzoenzimleri	6
1.5 Enzimin Katalizleme Mekanizması	7
1.6 Katalizlediği Reaksiyonlar ve Substratları	8
1.7 β -Glukozidazların Önemi	9
1.7.1 Savunma	9
1.7.2 Besin Kalitesinin Artışı	11
1.7.3 Biyokütle Değişikliği	12
1.7.4 Büyüme ve Gelişme	12
1.7.5 Lignin Biyosentezi	13
1.7.6 Antikanserojen Etki	13
1.7.7 β -Glukozidazların Bitkilerden Saflaştırılması	13
2. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	15
2.1 Materyal.....	15
2.1.1 Malatya Kayısınının (<i>Prunus armeniaca</i> L.) Toplanması	15
2.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	15
2.1.3 Kullanılan Araç ve Gereçler	16
2.1.4 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları	17
2.1.5 Enzimleri Saflaştırmada Kullandığımız Çözeltiler.....	17
2.1.6 SDS-PAGE Tekniğinde Kullanılan Çözeltiler	18
2.2 Yöntemler.....	19
2.2.1 Kayısı Meyvasından Ham Ekstraktın Hazırlanması.....	19
2.2.2 Kayısı Çekirdeğinden Ham Ekstraktın Hazırlanması	20
2.2.3 Enzim Aktivite Tayini	20
2.2.4 Protein Tayini	20
2.2.4.1 Lowry Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini	20
2.2.5 Enzimin Saflaştırılması	21
2.2.5.1 Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi	21
2.2.5.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması.....	24
2.2.5.3 SDS-PAGE ile Enzim Saflığının Kontrolü	25
2.3 β -Glukozidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	26
2.3.1 Saf Enzimin Optimum pH Değerinin Belirlenmesi	26
2.3.2 Saf Enzimin Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi	26
2.3.3 Enzimin Farklı Substratlara Karşı K_M ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi	27

2.3.4 İnhibitörlerin IC ₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi	28
3. BULGULAR	29
3.1 Enzim Aktivite Tayininde Kullanılan Standart Eğri	29
3.2 Kayısı Meyvası ve Kayısı Çekirdeği aktivitelerinin Karşılaştırılması.....	30
3.3 Protein Miktar Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri	32
3.4 β-Glukozidaz Enziminin Saflaştırılması	33
3.4.1 β-Glukozidaz Enziminin Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi	33
3.5 β-Glukozidaz Enziminin Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi İle Saflaştırılması	35
3.5.1 Kayısı çekirdeği β-Glukozidaz Enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi	38
3.5.2 <i>p</i> -NPGlu Substratına Karşı K _M ve V _{max} Değerleri	38
3.5.3 <i>p</i> -NPGal Substratına Karşı K _M ve V _{max} Değerleri.....	41
3.5.4 <i>o</i> -NPGlu Substratına Karşı K _M ve V _{max} Değerleri	43
3.5.5 <i>o</i> -NPGal Substratına Karşı K _M ve V _{max} Değerleri.....	45
3.6 Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren Maddelerin IC ₅₀ Değerleri	47
3.6.1 β-Glukozidazların Genel İnhibitörlerinin IC ₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi	47
3.6.1.1 δ-Glukonolaktonun IC ₅₀ Değeri	47
3.6.1.2 Glukozun IC ₅₀ Değeri	49
3.7 Saf Enzimin Optimum pH Değeri	52
3.8 Saf Enzimin Optimum Sıcaklık Değeri.....	53
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	55
4.1 Sonuçlar	55
4.2 Öneriler	63
5. KAYNAKLAR.....	64

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Hasat olgunluğuna gelmiş kayısı meyvalarının görünüşü.....	3
Şekil 1.2: Kayısı kurusu ve çekirdeği.....	3
Şekil 1.3: Pirinç β -Glukozidazı	5
Şekil 1.4: Pirinç β -Glukozidazının üç boyutlu yapısı	5
Şekil 1.5: Mısır β -Glukozidaz izoenzim ZMGlu1' in katalitik glutamik asit rezidüleri Glu191 ve Glu406.....	7
Şekil 1.6: β -Glukozidaz enziminin subsratlarından bazıları	9
Şekil 2.1: Hidrofobik etkileşim kromatografisinde kullanılan hidrofobik jel.....	24
Şekil 2.2: Michealis- Menten grafiği	27
Şekil 2.3: Lineweaver-Burk grafiği	28
Şekil 3.1: Enzim aktivite tayininde kullanılan 210 μ L hacimli <i>p</i> -NP standart grafiği	29
Şekil 3.2: Enzim aktivite tayininde kullanılan 280 μ L hacimli <i>p</i> -NP standart grafiği	30
Şekil 3.3: Farklı dönemlerdeki kayısı meyvası ve çekirdek ekstraktlarının β -Glukozidaz aktivite grafiği	32
Şekil 3.4: Lowry yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik.....	33
Şekil 3.5: Amonyum sülfat çöktürme aralığı ve protein miktarı grafiği.....	35
Şekil 3.6: Hidrofobik etkileşim kromatografisi kolonu ile kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enziminin saflaştırma grafiği.....	36
Şekil 3.7: Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enziminin SDS-Poliakrilamid Jel elektroforezi.....	38
Şekil 3.8: <i>p</i> -NPGlu substratına karşı K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği.....	39
Şekil 3.9: <i>p</i> -NPGal substratına karşı K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği.....	41
Şekil 3.10: <i>o</i> -NPGlu substratına karşı K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği.....	43
Şekil 3.11: <i>o</i> -NPGal substratına karşı K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği.....	45
Şekil 3.12: Saflaştırılmış kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enziminin, <i>p</i> -NPGlu substratına karşı, δ -Glukonolaktonun % aktivite-[I] grafiği	49
Şekil 3.13: Saflaştırılmış kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enziminin, <i>p</i> -NPGlu substratına karşı, glukozun % aktivite-[I] grafiği	52
Şekil 3.14: Kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enziminin optimum pH grafiği.....	53
Şekil 3.15: Kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enziminin optimum sıcaklık grafiği	54

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1: SDS-PAGE’de kullanılan jel karışımlarının miktarları	19
Tablo 2.2: Amonyum sülfat çöktürme aralıklarının enzim aktiviteleri bulunurken kullanılan reaksiyon hacimleri	23
Tablo 3.1: Farklı dönemlerde kayısı meyva ve çekirdek ekstraktlarının aktivite değerleri.....	31
Tablo 3.2: Amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesinde kullanılan çözelti hacimleri, kullanılan tuz miktarı ve tesbit edilen değerler	34
Tablo 3.3: Saflaştırma tablosu	37
Tablo 3.4: Kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enziminin <i>p</i> -NPGlu substratı kullanılarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tesbitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri	40
Tablo 3.5: Kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enziminin <i>p</i> -NPGal substratı kullanılarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tesbitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri	42
Tablo 3.6: Kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enziminin <i>o</i> -NPGlu substratı kullanılarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tesbitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri	44
Tablo 3.7: Kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enziminin <i>o</i> -NPGal substratı kullanılarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tesbitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri	46
Tablo 3.8: Kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enziminin farklı substratlara karşı K_M , V_{max} ve V_{max}/K_M değerleri.....	47
Tablo 3.9: β -Glukozidaz enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren δ -Glukonolaktonun, IC_{50} değerinin bulunmasında çözelti miktarları, substrat ve inhibitör konsantrasyonları	48
Tablo 3.10: β -Glukozidaz enzimi üzerine inhibisyon etki gösteren Glukozun, IC_{50} değerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları, substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	50

SEMBOL LİSTESİ

<i>p</i>-NPGlu	:	4-Nitrofenil β -D-glukopiranosid
<i>o</i>-NPGlu	:	2-Nitrofenil β -D-glukopiranosid
<i>p</i>NP	:	4-Nitrofenol
<i>p</i>-NPGal	:	4-Nitrofenil β -D-galaktopiranosid
<i>o</i>-NPGal	:	2-Nitrofenil β -D-galaktopiranosid
Na-Ac	:	Sodyum Asetat
4-MUG	:	4-metilumbelliferil
EU	:	Enzim Ünitesi
SDS	:	Sodyum Dodesil Sülfat
PAGE	:	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TEMED	:	N,N,N', N', -tetrametiletildiamin
APS	:	Amonyum Persülfat
BSA	:	Bovin Serum Albumin (Sığır Serum Albumini)
[S]	:	Substrat Konsantrasyonu
K_M	:	Michaelis-Menten Sabiti
V_{max}	:	Maksimum Hız
mM	:	Milimolar
μL	:	Mikrolitre

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim sırasında beni yönlendiren değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Yusuf TURAN'a en derin duygularıyla teşekkürü bir borç bilirim.

Deneysel çalışmalarımızın her aşamasında bilgilerinden istifade ettiğim eş danışmanım sayın Yrd. Doç. Dr. Hatibe KARA hocama teşekkürlerimi sunuyorum.

Laboratuvar arkadaşım Nihal TÜRKMEN'e yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Son olarak sevgili eşim Kübra EKMEKCI'ye, kızlarım Mehlika Sultan ve Melike Hüma'ya sonsuz teşekkürler...

1. GİRİŞ

Enzimlerin, metabolik reaksiyonları hızlandırdığı ve çoğunun protein yapıda büyük moleküller olduğu bilinmektedir. Doğal ortamları dışında da uygun koşullar sağlandığında etkilerini gösterebilen enzimler, bundan dolayı pek çok kimyasal reaksiyonu hızlandırabilmektedir. Bu durumda enzimlerin yer aldıkları dokuların veya hücre kısımlarının belirlenmesi, biyokimyasal reaksiyonlardaki işlevlerinin ortaya çıkarılması, etki mekanizmalarının ve kinetik özelliklerinin tüm ayrıntılarıyla incelenmesi için enzimlerin saflaştırılarak elde edilmesi günümüzde büyük bir önem taşımaktadır.

Sistemik adı β -D-glukozid glukohidrolaz (EC 3.2.1.21) olan β -Glukozidazlar, oligosakkaritlerdeki veya diğer glukoz bileşiklerindeki $\beta(1.4)$ glukozid bağlarını hidroliz eden enzimlerdir [1]. β -Glukozidazların mikroorganizmalar, hayvanlar ve bitkilerde yaygın olarak buldukları ve biyolojik yollarda önemli görevlere sahip olduğu bildirilmektedir [2]. Örneğin bazı bitkilerde, hastalık esnasında konukçu glikozidaz enzimler, glikozitleri toksik aglikonlara dönüştürerek hastalık yapıcı koşulların ortadan kalkmasını sağlayabilir. Bu şekilde konukçu glikozidazlar organizmanın hastalığa dayanıklı olmasında önemli bir role sahip olmuş olurlar [3]. Ayrıca bitkilerde tat ve lezzet oluşumunda etkili birkaç yüz β -Glukozidik ürün tesbit edilmiştir. Fakat bu ürünlerin ortaya çıkmaları için β -Glukozidaz enzimlerinin hidrolizlenmesine ihtiyaç vardır. Bu enzimler, içecek ve meşrubat sanayisinde meyva suyu ve şarap üretiminde kullanılmaktadır. Üretim sırasında veya sonrasında eklendiğinde ürünlerin tat, lezzet, aroma ve diğer kalite faktörlerinde artış gözlemlenmektedir [4]. Bundan dolayı özellikle tarım ve ormancılık alanlarında ve biyoteknolojik çalışmalarda, β -Glukozidaz enzimleri bilimsel araştırmaların hedefi olmaktadır [1].

Bu çalışmada Malatya kayısı (*Prunus armeniaca* L.) meyvası ve çekirdeğinde β -Glukozidaz enziminin biyokimyasal yöntemlerle saflaştırılması ve kinetik özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için aşağıdaki çalışmalar planlanmıştır.

- Kayısı meyvasından ve çekirdeğinden ham ekstraktın hazırlanması.

- Kayısı meyvasının ve çekirdeğinin enzim aktivitesine bakılması.
- Kayısı çekirdeğinin, ham ekstraktını amonyum sülfat çöktürmesi yapılarak kısmi saflaştırmasının yapılması.
- Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enziminin saflaştırılmasının yapılması.
- SDS-PAGE ile saflığının kontrolü.
- Enzimin optimum pH ve optimum sıcaklık değerlerinin belirlenmesi
- Enzimin farklı substratlara (*p*-NPGlu, *o*-NPGlu, *p*-NPGal ve *o*-NPGal) karşı kinetik özelliklerinin (K_M ve V_{max}) araştırılması.
- Enzimin literatürde geçen (δ -Glukonolakton ve glukoz) inhibitör maddelere karşı aktivitesinin incelenmesi.

1.1 Malatya kayısı

Ülkemizde ekonomik olarak önemli bir değere sahip olan kayısı çok sevilerek tüketilen bir meyvedir. Kayısı çekirdeğinin tatlı olanları kuruyemiş olarak yenilir, acı olanları ise kozmetik ve ilaç sanayiinde hammadde olarak kullanılmaktadır. Ayrıca kayısı çekirdeğinin tohum ve kabuğundan badem yağı, yemeklik yağ, benzaldehit (aroma esansı), furfural, aktifkarbon, amigdalin ve hidrosiyamik asid elde edilmektedir. Kayısının gövde, dal ve çekirdek kabuklarının yakacak olarak kullanılmasının yanı sıra kayısı ağacının yaş yaprakları hayvanlara yem olarak da verilmektedir. Kayısı ülkemizde en yaygın olarak Malatya ve çevresinde yetiştirilmektedir. Malatya gerek ağaç sayısı gerekse yaş ve kuru kayısı üretimiyle sadece Türkiye'nin değil dünya'nın en önemli kayısı üretim merkezidir. Dünyada kuru kayısı üretiminin yaklaşık yüzde 85'i Türkiye'de gerçekleştirilmektedir. Türkiye'de ise yaş kayısı üretiminin bugün yaklaşık % 50'si Malatya'da üretilmektedir. Hasat olgunluğuna gelmiş kayısı meyvasının görünümü Şekil 1.1'de kuru kayısı ve çekirdeğinin görünümü Şekil 1.2'de gösterilmiştir. Bugün dünyada 1750'nin üzerinde kayısı çeşidi ve melezi bulunmaktadır. Ekonomik olarak yetiştiriciliği yapılan kayısı çeşidi 5-10 'u geçmemektedir [5].



Şekil 1.1: Hasat olgunluğuna gelmiş kayısı meyvalarının görünüşü [85].

Ülkemizde Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığının Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğüne bağlı olarak Malatya ilimizde kayısı araştırma istasyonu müdürlüğü bulunmaktadır. Bu istasyonda Malatya kayısı ile ilgili ıslah çalışmaları, çiftçilere modern kayısı yetiştiriciliği ile ilgili bilgiler verilmekte ve çeşitli projelerle kayısının önemi ve faydaları anlatılmaktadır.



Şekil 1.2: Kayısı kurusu ve çekirdeği [5].

1.2β-Glukozidazların Adlandırılması

β-Glukozidazlar, Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından oluşturulan altı sınıflandırma biriminden, Hidrolazların bulunduğu 3. sınıfta yer alırlar (EC.3). Glikozil bileşiklerini hidroliz edenler EC.3.2 alt sınıfında yer alan glikozid hidrolazlardandır [6]. Glikozid hidrolazlar Henrissat

tarafından, aminoasit dizisi benzerliklerine dayanarak, 82 enzim ailesi olarak sınıflandırılmıştır [6-8]. Bu enzim grubunda yer alanlardan O- ve S-glikozil bileşiklerini hidroliz edenler de EC.3.2.1. alt sınıfında bulunmaktadır [8,9].

EC.3. Hidrolazlar

EC.3.2. Glikozid Hidrolazlar (Glikozil bileşiklerini hidroliz edenler)

EC.3.2.1. O- ve S-glikozil bileşiklerini hidroliz edenler [7,10]

EC.3.2.1.21 β -Glukozidazlar (1.4- β -Glukozidaz) [11]

EC.3.2.2. N-glikozil bileşiklerini hidroliz edenler

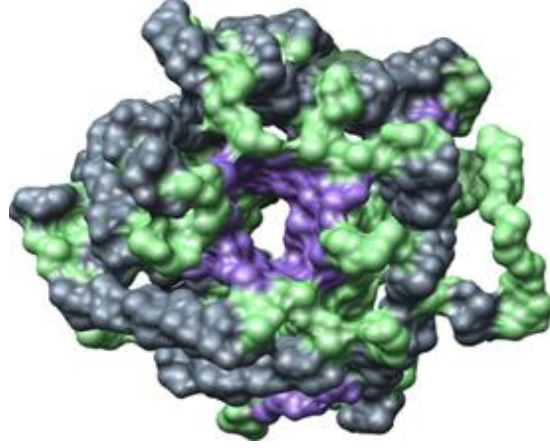
EC.3.2.3. S-glikozil bileşiklerini hidroliz edenler [7,10]

Sistematik adı β -D-glukozid glukohidrolaz (EC.3.2.1.21) olan β -Glukozidazlar, iki glikon rezidüsü arasındaki ya da glikon ve bir aril veya alkil olan aglikon rezidüleri arasındaki β -glikozidik bağı hidroliz eden enzimlerdir [9]. Ökaryot, arkea ve bakterilerde bulunan Glikozid Hidrolaz (GH) Ailel enzimleri G-O-X yada G-S-X tipindeki substratları hidroliz etmektedirler. Burada G β -bağlı glukozil, galaktozil, mannozil, fukozil, 6-fosfoglukozil yada 6-fosfagalaktozil rezidüsünü, X ise diğer glikozil rezidüsünü veya aglikonu simgelemektedir [12]. β -Glukozidazlar substrat spesifitesine göre üç alt sınıfa bölünür. Sınıf 1 enzimleri glikozil- β -Glukozidaz ve aril(alkil)- β -Glukozidaz aktivitesi ile selobiyoz, laktoz, β -p-nitrofenilglikozid, β -p-nitrofenilgalaktozid, β -p-nitrofenilfruktozid ve diğer benzer substratları hidroliz edebilirler. Sınıf 2 enzimlerinin sadece glikozil- β -Glukozidaz aktivitesi olduğu için selobiyoz ve laktoz gibi substratları hidroliz edebilirler. Sınıf 3 enzimleri sadece aril(alkil)- β -Glukozidaz aktivitesi olduğu için β -p-nitrofenilglikozid ve benzer substratları hidroliz edebilirler [13].

1.3 β - Glukozidazların Özellikleri Ve Üç Boyutlu Yapısı

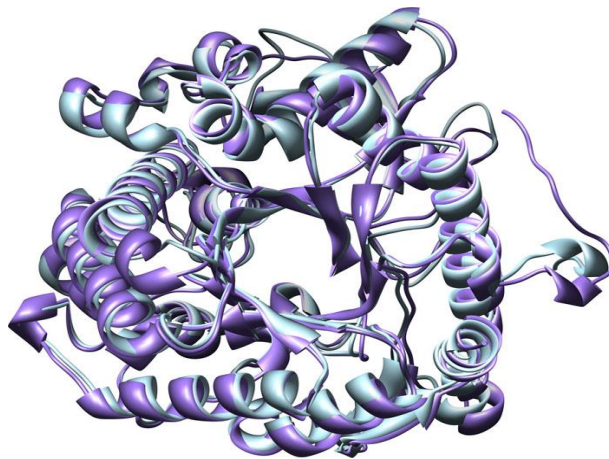
Çalışmalarda incelenen Ailel β -Glukozidaz enzimlerinin monomerleri SDS-PAGE'de 55-65 kDa aralığında tesbit edilmiştir. Tesbit edilen bu monomerlerin polipeptid uzunlukları 447 aminoasitten (*Bacillus polymyxa*'da olduğu gibi) 527 aminoasite (beyaz hardal mirosinazı) kadar değişiklik göstermektedir. Eubakteria ve arkebakterilerdeki enzimlerin polipeptid zincirlerinin daha kısa olması beklenirken ökaryotlardaki enzimlerin polipeptid zincirlerinin daha uzun olması beklenmektedir.

Dikotil bitkilerde ve hayvanlarda saflaştırılan tüm β -Glukozidazlarda hesaplanan monomerlerin molekül büyüklüklerinin, cDNA yada genomik DNA'dan hesaplanan molekül büyüklüklerine göre 3-5 kDa daha uzun olduğu tesbit edilmiştir [1]. Pirinç β -Glukozidazının yapısı Şekil 1.3'de gösterilmiştir



Şekil 1.3: Pirinç β -Glukozidazı [19].

Aile 1 β -Glukozidaz monomerlerinin her birinin temel yapısında yüksek korunumlu peptid motifleri bulunmaktadır. Bunlar SAYQI, YRFSI, TFNEP, LGLNYY, YITENG ve DNFEW'dir. Bunlardan TFNEP ve YITENG enzimin aktif bölgesinin bir parçasını oluştururlar ve iki katalitik glutamat içerirler [14-17].



Şekil 1.4: Pirinç β -Glukozidazının üç boyutlu yapısı [19].

Proteinlerin yapısında bulunan β dizilimleri bir fiçı oluşturacak biçimde düzenlenerek, bir seri β - α - β halkası (β - α - β loop), özellikle kararlı ve yaygın bir motif olan α/β fiçısı olarak adlandırılan bir yapı oluştururlar. Bu yapıda her paralel β kısım, komşusu olan β kısma α helikal bir parça ile tutunur. α/β fiçı motifi birçok enzimde bulunur ve çoğunlukla fiçı motifinin bir ucunda, cebe benzeyen, kofaktör yada substratın bağlandığı bölgede konumlanmaktadır [18]. Dört farklı bitkiden elde edilmiş 10 Glikozid Hidrolaz Aile 1 enziminin 3 boyutlu (3D) yapısı aydınlatıldığında bu 10 enzimin aktif bölgesinde aynı (β/α)₈-fiçısı olduğu gösterilmiştir (Şekil 1.4). Bu çalışmalarda söz konusu enzimlerin dizi benzerliğinin % 17-70 olduğu tesbit edilmiştir [15,16, 19, 20]. β -Glukozidazlarla yapılan çalışmalarda enzimin pH'sınının 4-10 ve sıcaklığını 0-4 °C aralığındaki değerlerde stabil olduğu tesbit edilmiştir. En yüksek stabilitenin ise ~pH 7 civarında olduğu gözlemlenmiştir [1].

Sıcaklıkla ilgili yapılan stabilite çalışmalarında da β -Glukozidazların 55-60 °C'nin üzerinde geri dönüşümsüz olarak inaktive oldukları bulunmuş ve bazı çalışmalar neticesinde de 50-55 °C'lerde en yüksek aktiviteye sahip oldukları tesbit edilmiştir [21].

1.4 Enzimlerin İzoenzimleri

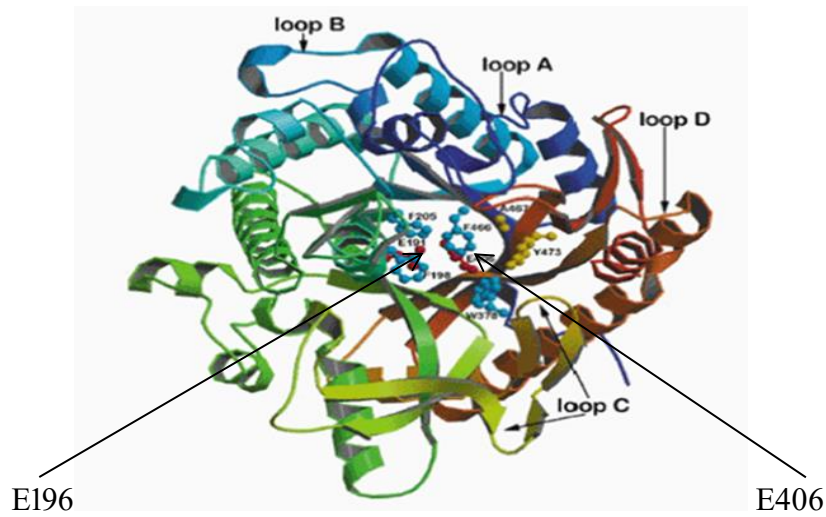
β - Glukozidazların, farklı canlılarda izoenzimlerinin olduğu belirtilmektedir. Mısırdaki Glu1 ve Glu2 olmak üzere iki izoenzimi bulunmaktadır. Mısır izoenzimleri klonlanılarak substrat spesifikliğı ve fizyolojik fonksiyonları belirtilmiştir. Glu1 izoenziminin karakteristik özellikleri de Esen tarafından ortaya çıkarılmıştır [21]. Söz konusu enzimin monomerinin 60 kDa büyüklüğünde, optimum pH değerinin 5.8 ve optimum sıcaklık değerinin de 50 °C olduğu belirtilmiştir. β - Glukozidaz enziminin substrat özgünlüğü Babcock ve Esen'in çalışmalarında verilmiştir [21,22].

Hosel ve diğerleri, süpürge darısı tohumlarından Dhurrinaz1 (Dhr1) ve Dhurrinaz2 (Dhr2) olmak üzere iki farklı Dhurrinaz elde etmişlerdir [23]. Yapılan çalışmalarda Dhr1 ile Dhr2'nin aminoasit benzerliğinin %75 olduğu tesbit edilmiş ve bu iki izoenzimin substrat spesifikliğinin de birbirinden farklı olduğu tesbit edilmiştir. Dhr1 yüksek katalitik etkinlikte sadece nötral substratları hidroliz ederken

Dhr2'nin *p*-NPG, *o*-NPG ve 4MUG gibi yapay substratları da dhurrin gibi hidroliz ettiği belirtilmiştir [24].

1.5 Enzimin Katalizleme Mekanizması

Tüm Aile1 β -Glukozidazlar glikozidik oksijen ve anomerik karbon arasındaki β -Glukozidik bağın hidrolizini içeren genel bir mekanizma görevine sahiptirler. Aynı zamanda bütün Aile1 β -Glukozidazlar etki ettikleri substratın glikozid bağını hidroliz ederken glikonun anomerik konfigürasyonunu değiştirmezler. Yani ürünlerdeki ve substrattaki β -D-glukoz aynıdır. Birçok organik tepkime, proton veren (genel asit) ve proton alan (genel baz) tarafından katalizlenir. Bazı enzimlerin aktif merkezlerinde proton alarak ve proton vererek katalitik süreçlere katılan aminoasit grupları mevcuttur. Bu gruplardan biri olan E (Glu) glutamik asit rezidüsüdür [25]. β -Glukozidazların aktif merkezinde E191 ve E406 konumunda işlevsel olarak iki glutamik asit kalıntısının olduğu bildirilmektedir [19]. Enzim tarafından substratın hidrolizi iki basamakta gerçekleşir: a) enzim glikolizasyonu olayı (glikozlanması) b) deglikozilasyon olayı (glikoz kopması). Ayrıca iki glutamik asit rezidüsünün aktif bölgeye katılımıyla hidroliz gerçekleşmektedir [26].



Şekil 1.5: Mısır β -Glukozidaz izoenzim ZMGlul' in katalitik glutamik asit rezidüleri Glu191 ve Glu406 [30].

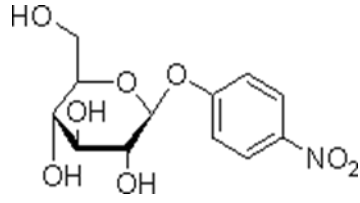
Glikozilasyon basamağında YI/VTENG motifindeki nükleofilik glutamat rezidüsü substratın anomerik karbonuna (C-1) atak yapar. Aglikon bir glutamik asit kalıntısı ile kararlı tutulurken, Şekil 1.5’de görüldüğü gibi aynı anda T(F/L/M)NEP motifindeki asit katalizleyici glutamik asit rezidüsü de glikozidik oksijenin protonlanmasını sağlar ve kovalent bağ yapımına katılarak geçiş formunu oluştururlar. Bu esnada glikozil-enzim araürünü oluşur ve aglikon serbest kalır [9]. Deglikozilasyon aşamasında, aktif merkezdeki anyon ve baz katalizleyici durumunda olan ikinci katalitik glutamat rezidüsü (Glu406) H₂O’dan bir proton koparır. Böylece H₂O’nun nükleofilik gücünü artırır. Bunun sonucunda oluşan OH⁻ glikon ve enzim arasındaki kovalent bağa nükleofilik atak yaparak glikonu uzaklaştırır ve nükleofilik glutamat eski haline geri döner [27].

İki katalitik glutamik asit rezidüsü (nükleofilik ve asit/baz katalizleyici olan glutamik asitler) Şekil 1.5’de görüldüğü gibi aktif bölgede yer aldıkları ve yaklaşık 5.5 Å (0.55nm) uzaklıkta oldukları belirlenmiştir [16].

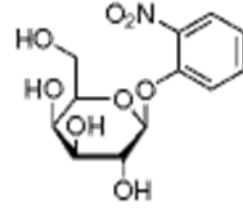
1.6 Katalizlediği Reaksiyonlar ve Substratları

β-Glukozidaz substratlarında bulunan sabit monosakkarite bağlı kimyasal grupların çeşitliliği β-Glukozidazların substrat çeşitliliğinin temelini oluşturur. Glukoza bağlanan grup ya disakkaritlerde ve oligosakkaritlerde olduğu gibi farklı bir glikon, ya da glikokonjugatlarda olduğu gibi bir aglikondur. Bu aglikon kısım linamarinde olduğu gibi bir alkil grup, prunasin, durrin ve DIMBOAGlc’da olduğu gibi bir aril grup olabilir [20,28-30].

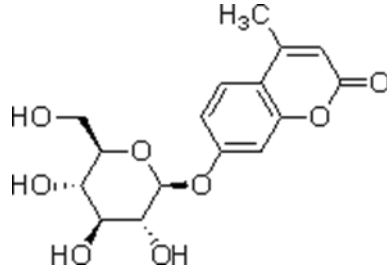
Enzimin doğal substratları olduğu gibi yapay substratları da mevcuttur (Şekil 1.6). Mısır β-Glukozidaz izoenzimi Glu1’in, aglikon parçası olarak *p*-NP, *o*-NP, 4-metilumbelliferil, 6-bromo-2-naftil, indoksil, 5-bromo-4-kloro-3-indolil ve sitokinin içeren bileşikleri hidroliz ettiği görülmüştür [31,32].



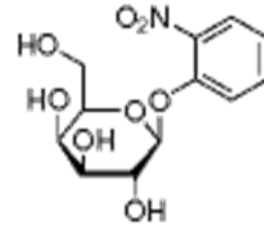
***p*-NPGlu**



***o*-NPGlu**



4-MUG



***o*-NPGal**

Şekil 1.6: β -Glukozidaz enziminin yapay substratlarından bazıları.

1.7 β -Glukozidazların Önemi

Canlı organizmalarda, β -Glukozidazlar birçok biyolojik olayda rol oynamaktadırlar. Bundan dolayı β -Glukozidaz enzimleri protein mühendisliğinde, tarım ve ormancılık alanlarında ve biyoteknolojik çalışmalarda oldukça sık kullanılmaktadır. β -Glukozidazlar (özellikle Familya 1 enzimleri) bitkilerde biyolojik bazı süreçlere katılırlar. Bunları şu şekilde söyleyebiliriz. Savunma, besin ve kâğıt kalitesini artırma, lignin biyosentezi, yenilenebilir yakıt üretimi elde etme, sekonder bitki metabolizması ve antikanserojen etkiye neden oldukları söylenebilir.

1.7.1 Savunma

Bitkiler metabolizmalarına zarar verenlere karşı savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bunun için hücrelerinde toksik maddeleri biriktirirler ve ihtiyaç halinde salıverirler. Bu kimyasal maddeler β -Glukozidler ve bazı dikotillerde de β -Glukosinolatlardır. β -Glukozidik substratlar ve β -Glukozidazlar hücrenin farklı alt yapılarında ya da doku bölümlerinde biriktirilerek depolanır [33,34]. Beyaz

yoncadaki siyanojenik β -Glukozidaz (linamaraz) enziminin hücre duvarında bulunmasına rağmen substratı olan linamarinin kofulda bulunduğu belirtilmiştir [35]. Patojen veya herbivorların bitki dokularına ulaşmasıyla hücrede oluşan zarar sonucu substrat ile enzim tepkimeye girer. Bu esnada substratların hidrolizi başlar ve hidroliz sonucu açığa çıkan aglikonlar ya da diğer parçalanma ürünleri toksik ve zehirli etki oluşturur. Açığa çıkan ürünler tiyosiyonatlar, izotiyosiyonatlar, nitriller, HCN, benzaldehyitler gibi maddelerdir [36]. Bu maddeler herbivorları caydırıcı, bitki zararlılarının bitkiye girişini, gelişmesini ve dağılmasını engelleyici etki gösterirler. Böylece β -Glukozidaz enzimleri bitkilerin savunma sisteminde görev almış olurlar [37]. Örneğin fosfat eksikliği [38], böceklerle [39] ve soğuğa [40] karşı dirençte etkili olduğu düşünülen bu enzimlerin etkisini araştırmak için yapılan bir çalışmada *Arabidopsis thaliana*'nın β -Glukozidaz genleri NaCl ile baskılanmış ve bitkide savunma yetersizliği sonucu bazı streslerin ortaya çıktığı gözlenmiştir [41].

Arabidopsis thaliana ile yapılan farklı bir çalışmada bitkinin oomycete *Peronospora parasitica* tarafından enfeksiyonun'dan sonra 48 saat içinde β -Glukozidaz geni olan psr3.1 geninin kopyalanmasının 8 kat arttığı gösterilmektedir [42]. Farklı bir çalışmada da yine *Arabidopsis thaliana* β -Glukozidazlarından birinin nematodlara karşı savunmada görev aldığı belirtilmiştir [43]. Buğday tohumlarından saflaştırılan β -Glukozidaz enzimi ile yapılan bir çalışmada enzimin birincil doğal substratının siyanojenik glukozid (DIMBOA) olduğu bildirilmiş ve söz konusu enzimin buğdayda herbivora ve patojenlere karşı savunmada görev aldığı kanısına varılmıştır [44]. Ayrıca bitkilerde yer alan izoflavonların kimyasal savunmada fonksiyonları olduğu bilinmektedir. Soyadan saflaştırılan ve β -Glukozidaz enzimi olan ICHG'nin izoflavon bileşiklerine karşı yüksek substrat özgüllüğünün olması bu enzimin savunmada yer aldığını düşündürmektedir [45].

β -Glukozidaz enzimlerinin farklı çevresel streslerde savunma görevi üstlendiği bilinmesine rağmen bu aşamaların nasıl gerçekleştiği henüz tam olarak aydınlığa kavuşmamıştır. Adı geçen enzimin araştırılması ve incelenmesiyle, bitki zararlılarına karşı daha çevreci ve ekonomik savunma mekanizmalarının geliştirilebileceği düşünülmektedir. Ayrıca böcek ilaçlarının toprağa verdiği zararı azaltmak ve minimuma indirmek için daha az pestisit kullanımı yine bu çalışmaların hedefleri arasında yer almaktadır.

1.7.2 Besin Kalitesinin Artışı

Bitkilerde tat ve lezzet oluşumunda etkili birçok β -glukozidik ürün tesbit edilmiştir. Bu moleküllerin aglikon parçalarının besin kalitesi ve üretimi üzerine etkili olduğu belirtilmiştir. Ancak aglikonların ortaya çıkmaları için β -Glukozidaz enzimleri tarafından β -Glukozidik substratların hidrolize uğraması gerekmektedir. Bu tür biyokimyasal bilgiler, meyva suyu ve meşrubat üretiminde kullanılmaktadır [46]. Üretim sırasında veya sonrasında β -Glukozidaz enzimi eklendiğinde ürünlerin tadında, lezzetinde, aromasında ve diğer kalite faktörlerinde artış olduğu gözlenmektedir [4]. Aynı şekilde bu bilgilerin, istenilen özellikte transgenik bitki oluşturulmasında genetik mühendisliği açısından da temel oluşturacağı düşünülmektedir [5]. Lahana, karnabahar, brokoli gibi turpgillerde bulunan mirosinaz-glukosinolat sistem, besin kalitesi ve tat oluşumu sürecinde oldukça önemlidir. Glikosinolatların enzimatik hidrolizinden oluşan aglikon parçaları ve bozulma sonrası ürünler, bu sebzelere acı ve kendine has kokularının verilmesinden dolayı oluştuğu belirtilmektedir. Bu maddeler aynı zamanda bu sebzelerle hazırlanmış yiyeceklere de lezzet katarlar. Glukosinolatlar ve bunların parçalanmasıyla oluşan ürünler, bu sebzelerle beslenen hayvanların etine, sütüne ve yumurtalarına da geçerler [47].

Vanilya [48], üzüm [49] ve papatya [50] meyvalarında yapılan çalışmalarda β -Glukozidazların meyva tatlanmasına etkileri araştırılmıştır. Vanilya tanelerinde bulunan bir β -Glukozidaz enziminin vanilin- β -Glukozid (glukovanilin) olarak bilinen aroma öncüllerinin hidrolizinden sorumlu olduğu ve vanilya aromasının bu substratın hidroliziyle açığa çıkan ürünlerle ilgili olduğu bildirilmiştir [48]. Muscat üzümünün tadından sorumlu öncül maddelerin araştırıldığı bir çalışmada monoterpenilglukozid miktarının meyvalardaki aromanın önemli kısmını oluşturduğu belirtilmiştir [51]. Üzümden saflaştırılan β -Glukozidaz enziminin'de üzüm monoterpenil glikozidlerinin aglikon kısımlarına karşı özgülüğü tesbit edilmiştir [49,52]. Çay yaprağı ile yapılan çalışmada da β -Glukozidaz enziminin aromatik tat ile ilişkisi olduğu belirtilmiştir [53].

1.7.3 Biyokütle Değişikliği

Polisakkaritlerden özellikle selüloz biyosferde bol bulunan bileşiklerdir. Bunlar geri dönüşümü olan kimyasal maddelerin ve yakıtların önemli kaynağıdır. Şehirlerde oluşan çöplüklerin yaklaşık % 40'ının kağıt ve diğer selüloz ürünlerinden oluştuğu bilinmektedir. Selulozun hidrolizi inorganik asit kullanımını ve yüksek ısıyı gerektirmektedir. Bu ekonomik ve ucuz bir yol değildir. Selulotik organizmalarca salgılanan bir selülaz enzim kompleksi selülozu glikoza hidroliz edebilir. Bu sistem endüstriyel çevreler açısından uygun bir model oluşturmaktadır. Bahsedilen enzim kompleksi üç enzimden oluşmaktadır. Bunlar endoglukonaz, ekzoglukonaz ve β -Glukozidaz enzimidir. Endoglukonazlar selülozun iç $\beta(1.4)$ glikozidik bağlarını hidrolizle keserek yeni zincir uçlarının oluşmasını sağlar. Ekzoglukonazlar da oluşan bu yeni selüloz zincirlerini uçlardan keserek çözünür sellobiyoz birimleri oluştururlar. Son olarak β -Glukozidazlar ise sellobiyoz birimlerini hidroliz ederek glukoz ürününü oluştururlar [54]. Günümüzde ticari olarak kullanılan selülozik enzimler daha çok *Trichoderma* ve *Aspergillus* mantarlarından elde edilmektedirler [55]. Böylece endüstride selülozik biyokütle yıkımı ve selülozun glukoz dönüşümü mikroorganizmalar ya da izole edilmiş selulaz kompleksi tarafından gerçekleştirilmektedir. Selulaz kompleksinin, selülozik biyokütlenin degradasyonunda kullanılması β -Glukozidazları mühendislik açısından önemli bir materyal haline getirmektedir. Günümüzde enzim katalizli süreçler, daha hızlı, daha ekonomik, çevreye duyarlı, ürün verimi oldukça yüksek ve safsızlık oluşumu oldukça düşük olduğundan, endüstriyel uygulamalarda kimyasal reaksiyonlara kıyasla daha fazla tercih edilmektedirler. Enzim katalizli süreçlere duyulan bu ilgi, zamanla dünya genelinde bir enzim pazarının ortaya çıkmasına ve bu alanda yapılan çalışmaların da çoğalmasına sebep olmuştur. İki bin yılında yapılan bir araştırmaya göre, dünya enzim ticaret kapasitesinin 1.6 milyar dolar olduğu rapor edilmiştir. Günümüzde endüstriyel enzimlerin % 60'ı Avrupa, geri kalan % 40'lık bölümü ise Amerika ve Japonya tarafından üretilmektedir [54].

1.7.4 Büyüme ve Gelişme

β -Glukozidazların bitkilerde, büyüme ve gelişme olaylarında bitki hormonlarının aktivasyonunu sağladığı düşünülmektedir [56-58]. Eğer bu

fonksiyonlara katıldıkları yapılan çalışmalarla kesin bir şekilde ispatlanacak olursa, söz konusu enzimlerle ilgili mühendislik ve biyoteknolojik alanlarında çok büyük gelişmelerin olacağı düşünülmektedir. Örneğin bitki büyüme ve gelişmelerinin düzenlenmesi sağlanarak verimliliğin artırılması, yılda birden fazla ürün elde edilmesi gibi çalışmaların hız kazanacağı öngörülmektedir.

1.7.5 Lignin Biyosentezi

Lignin, selülozdan sonra biyosferde bulunan en fazla polisakarittir. Lignin oluşumunda en önemli öncül madde olan koniferil alkol, β -Glukozidaz tarafından hidroliz edilen koniferinden türeyen bir bileşiktir [59]. Bu durumda bazı bitki β -Glukozidazlarının lignin biyosentezinde görev aldıkları ortaya çıkmaktadır [60]. Kaliteli kağıt üretimi ve ağaç yetiştirmede β -Glukozidaz enzimlerine ait bilgilerin kullanılması söz konusu enzimleri hedef materyal yapmaktadır.

1.7.6 Antikanserojen Etki

Glikosinolatların ve bunların parçalanmasıyla oluşan ürünlerin insanlarda antikanserojen etki yaptığı konusunda iddialar mevcuttur. Tüm mekanizmalarının tam olarak açığa kavuşmamasına rağmen kemirgenler üzerinde yapılan çalışmalarda, çiğ ya da pişmiş turpgillerin (lahana, karnabahar, brokoli gibi) aril hidrokarbon hidrokzilaz aktivitesini arttırdığı görülmüştür [61].

1.8 β -Glukozidazların Bitkilerden Saflaştırılması

Canlılar arasında geniş dağılım gösteren β -Glukozidaz enzimlerinin bir çok canlıdan elde edildiği görülmektedir. Bilim adamlarının birçoğu tarafından β -Glukozidaz enziminin mısır [21], vanilya [48], üzüm [49], pirinç [62], kiraz [63], çay [64], süpürgearası [65], portakal [66], zeytin [67], mandalina [68] bitkilerinden saflaştırıldığı ve biyokimyasal özelliklerinin incelendiği belirtirmiştir. Yapılan çalışmalarda saflaştırma işlemlerinde genelde amonyum sülfat tuz çöktürmesiyle başlandığı ve peşi sıra değişik kromatografi tekniklerinin kullanılarak çok basamaklı saflaştırma işlemi yapıldığı belirtilmektedir. Vanilyadan [48], kirazdan [63] ve çay yaprağından [64] yapılan enzim saflaştırması çalışmalarında amonyum sülfat

çöktürmesi sonunda iyon değişim kromatografisi ve sonra farklı jel filtrasyon kromatografilerinin uygulandığı görölmektedir. Soyadan [45] yapılan çalışmada ise tuz çöktürmesi ardından iki farklı iyon değişim kromatografisinin uygulanmış olduğu bildirilmektedir. Portakal meyvasından [66] yapılan saflaştırma çalışmasında da önce iki ayrı iyon değişim kromatografisi ardından üç farklı jel filtrasyon kromatografisinden oluşan beş aşamalı saflaştırma işlemi yapıldığı görölmektedir. Mısır ve zeytin meyvası üzerinde yapılan çalışmalarda β -Glukozidazların saflaştırılmasında amonyum sülfat tuz çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemlerinin uygulanarak saflaştırmanın yapıldığı görölmektedir [69,70].

Memelilerden izole edilen β -Glukozidaz enzimlerinin sitozolik ve lizozomal olarak iki farklı karakterde olduğu bulunmuştur [71]. Sitozolik β -Glukozidazların esas itibarıyla karaciğerde yer aldığı ve detoksifikasyonda görevli olduğu bildirilmektedir [72].

Mantarlardan β -Glukozidaz enzimi saflaştırılması çalışmalarında da benzer yöntemlerin kullanıldığı belirlenmiştir. *Melanocarpus* sp.'den yapılan enzim saflaştırmasında amonyum sülfat tuz çöktürmesi uygulanmış ve ardından iyon değişim kromatografisi yapılmıştır. Riou ve diğerlerinin [73] yapmış olduğu β -glukozidaz enziminin *Aspergillus oryzae* mantarından saflaştırılması çalışmasında ve *Thermoascus auranticus* [74] mantarından yapılan saflaştırma çalışmalarında iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografilerinin kullanıldığı bildirilmektedir.

2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

2.1 Materyal

2.1.1 Malatya Kayısının (*Prunus armeniaca* L.) Toplanması

Deneysel çalışmalarımızda kullanılan kayısılar Malatya'nın Doğanşehir ilçesinin Yenikoru köyünden farklı tarihlerde toplanmıştır. İlk toplama çiçeklenme tarihinden 8 hafta sonra, ikinci toplama ise çiçeklenme tarihinden 12 hafta sonra yapılmıştır. Yeterli miktarda toplanan kayısılar deneysel çalışmalarda kullanılmıştır.

2.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄), Sodyum hidroksit (NaOH), Sodyum karbonat (Na₂CO₃), Coomassie Brilliant Blue G250. elektroforez için standart proteinler (Fermentas, SM 1811), etil alkol, sığır serum albümin, fosforik asit (% 85, v/v), hidroklorik asit (% 37, v/v), glasiyel asetik asit, metanol, 2-merkaptoetanol, 4-nitrofenil-β-D-glukopiranozid, sitrikasit monohidrat, aseton, Tris asit, Tris baz, TEMED (N,N,N,N-Tetramethylethylenediamine), akrilamid, N'N'-bis-metilen-akrilamid, amonyum persülfat, SDS, gliserol, bromofenol mavisi, bütanol. Çalışmalarımızda kullandığımız kimyasal maddeler analitik saflıkta olup Merck firmasından temin edilmiştir.

2.1.3 Kullanılan Araç ve Gereçler

Bu çalışmada aşağıdaki alet ve cihazlar kullanılmıştır.

Sigma 3K15	Soğutmalı Santrifüj
Hettich EBA 12R	Soğutmalı Ultrasantrifüj
Thermo IEC	Multi Santrifüj (Falkon Santrifüjü)
Hanna HI 2210	pH metre
Thermo Type 1510	UV-Spektrofotometre (Plaka okuyuculu)
Sinbo SHB-3024	Doğrayıcı
Sartorius BL 210S	Terazi
Eppendorf	Otomatik Pipetler
Mini Protean Tetra Cell Bio-Rad	Elektroforez Sistemi
Sigma (1 cm çap ve 15 cm uzunluk)	Kromatografi Kolonu
CFC Free	Derin Dondurucu (-80 °C)
Arçelik	Buzdolabı (-20 °C)
Fisons Whirl Mixer	Vorteks
Hirayama HV 85	Well plate
Fiocchetti AF 10	Buz Makinesi
Thermo-Block	İnkübatör
Biosan TS-100	Jel Görüntüleme Sistemi
Gel Doc-H Imaging System (UVP)	Elektro- mag
	Su banyosu

2.1.4 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları

2.1.4.1 Enzimleri Saflaştırmada Kullandığımız Çözeltiler

- ✓ **Substrat çözeltisi:** 5 mM *p*-NPG çözeltisi; 0.0075 g pNPG 5 mL, 50 mM sodyum asetat tamponu içinde vortekste karıştırılarak çözüldü.
- ✓ **Reaksiyon durdurma tamponu:** 0.5 M Na₂CO₃ tamponu; 25.5 g Na₂CO₃ son hacim 500 mL olacak şekilde distile suda çözüldü.
- ✓ **Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda oluşan pelletin alındığı tampon:** 1 M (NH₄)₂SO₄ içeren, 50 mM Na₂HPO₄ tamponu (pH 6.8); 132.14 g (1 mol) (NH₄)₂SO₄ ve 7.09 g (0.05 mol) Na₂HPO₄ 950 mL distile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 6.8'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.
- ✓ **Hidrofobik jelin dengelenmesi için kullanılan tampon:** 1 M (NH₄)₂SO₄ içeren, 50 mM Na₂HPO₄ tamponu (pH 6.8); 132.14 g (1 mol) (NH₄)₂SO₄ ve 7.09 g (0.05 mol) Na₂HPO₄ 950 mL distile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 6.8'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.
- ✓ **Hidrofobik jele bağlanmış β-Glukozidaz enziminin elüsyonu için kullanılan tampon:** 1 M (NH₄)₂SO₄ içeren, 50 mM Na₂HPO₄ tamponu (pH 6.8) ve 50 mM Na₂HPO₄ tamponu (pH 6.8) ile gradient mikser kullanılarak tuz gradienti oluşturuldu; 132.14 g (1 mol) (NH₄)₂SO₄ ve 7.09 g (0.05 mol) Na₂HPO₄ 950 mL distile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 6.8'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı. 7.09 g (0.05 mol) Na₂HPO₄ 950 mL distile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 6.8'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.
- ✓ **Kayıp ekstraksiyon tamponu:** 1 M NaCl, % 0.02 (w/w) NaN₃ içeren 0.1 M tris tamponu (pH 8.0); 29.22 g (0.5 mol) NaCl, 0.1 g NaN₃ ve 6.057 g (0.05 mol) tris 450 mL distile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 8.0'e getirildi ve son hacim distile su ile 500 mL'ye tamamlandı.
- ✓ **Enzim aktivitesinin ölçüldüğü ve substrat çözeltisinin hazırlandığı tampon:** 50 mM sodyum asetat tamponu (pH 5.5); 6.804 g (0.05 mol)

Na-Ac 900 mL distile suda çözüldü. Glacial asetik asit ile pH'sı 5.5'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

✓ **Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözeltiler:**

Lowry yöntemi için aşağıdaki çözeltiler hazırlandı.

- **Çözelti A:** 0.1 M NaOH içeren % 2'lik Na₂CO₃ çözeltisi; 1 g (0.025 mol) NaOH ve 5 g Na₂CO₃ 200 mL distile suda çözüldü ve son hacim 250 mL'ye tamamlandı.
- **Çözelti B:** % 1'lik NaK tartarat; 1 g NaK 90 mL distile suda çözüldü ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.
- **Çözelti C:** % 0.5'lik CuSO₄; 0.5 g CuSO₄ 90 mL distile suda çözüldü ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.
- **Çözelti D:** 48 mL Çözelti A, 1 mL Çözelti B ve 1 mL Çözelti C alınarak hazırlanmıştır.
- **Çözelti E:** Folin fenol ve distile su (1:1 v/v); 2.5 mL folin fenol 2.5 mL distile su ile karıştırılarak hazırlanmıştır.
- **Sığır Serum Albumini (BSA):** 5 mg BSA 5 mL distile suda çözünerek taze olarak hazırlanmıştır.

2.1.4.2 SDS-PAGE Tekniğinde Kullanılan Çözeltiler

- ✓ **SDS-PAGE'de kullanılan alt ayırma ve üst yığma tamponları**
- **SDS'li üst yığma tamponu:** % 0.4'lük SDS içeren, 0.5 M Tris-HCl tamponu (pH 6.8); 6.6 g (0.05 mol) Tris ve 0.4 g SDS 75 mL distile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 6.8'e getirildi ve son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- **SDS'li alt ayırma tamponu:** % 0.4'lük SDS içeren, 1.5 M Tris-Base tamponu (pH 8.8); 19.8 g (0.15 mol) Tris ve 0.4 g SDS 75 mL distile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 8.8'e getirildi ve son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Tablo 2.1: SDS-PAGE’de kullanılan jel karışımlarının miktarları.

SDS-PAGE	SDS’li Ayırma Jeli (%10)	SDS’li Yığıma Jeli (%3)
SDS’li alt tampon	2.5 mL	---
SDS’li üst tampon	---	1.25 mL
Akril amid/Bis (37.5/1)	2.5 mL	625 µL
Distile su	4.89 mL	3.07 mL
%10’luk APS	100 µL	50 µL
TEMED	10 µL	5 µL
SDS’li Tank (Yürütme) Tamponu	3 g Tris-HCl, 14.4 g Glisin ve 1 g SDS eklenir ve pH’sı 8.3’e getirildikten sonra son hacim 1 L’ye tamamlanır.	
Yükleme Tamponu (SDS ve β-Merkaptoetanol) içerir.	2.5 mL 0.5 M Tris-HCl (pH’sı 6.8) tamponu, 4 mL % 10’luk SDS, 2 mL Gliserol, 1 mL β-Merkaptoetanol, 0.01 g Bromfenol mavisi ve 0.5 mL distile su karıştırılarak hazırlandı.	

2.2 Yöntemler

2.2.1 Kayısı Meyvasından Ham Ekstraktın Hazırlanması

Ham ekstraktını hazırlamak için kayısı meyvası, çekirdeğinden ayrıldı. Yüz gram kayısı meyvası maket bıçağı yardımıyla ince ince blender kabına doğrandı.

Önceden 4°C'ye kadar soğutulmuş olan 100 mL ekstraksiyon tamponu üzerine ilave edildi. Blander kabı buz içinde olacak şekilde 4 dakika boyunca blender'dan geçirildi. Sonra homejenatör yardımıyla 2-3 dakika daha homojenize edildi. Bir tülbent yardımıyla posalı kısım ve homojenat birbirinden ayırt edildi. Homojenat 10000 rpm, 2 dakika, 4 °C'de teflon tüplerde santrifüj edildi ve süpernatant ham ekstrakt olarak kullanıldı.

2.2.2 Kayısı Çekirdeğinden Ham Ekstraktın Hazırlanması

Kayısı çekirdeği ham ekstraktını hazırlamak için kayısı çekirdekleri, sert kabuklarından ayrıldı. Yirmi gram olan çekirdekler üzerine, önceden soğutulmuş 4 °C deki 40 ml ekstraksiyon tamponu ilave edildi. Daha sonra sırasıyla kayısı meyvasının ekstraktını hazırlamak için yapılan işlemler uygulandı.

2.2.3 Enzim Aktivite Tayini

Kayısı meyvasından ve çekirdeğinden izole edilen β -Glukozidaz enziminin aktivitesi spektrofotometrik olarak tesbit edildi. Kayısı meyvası ve çekirdeğinin ham ekstraktının aktivite ölçümü için 70 μ L, 5 mM pNPG substrat çözeltisi ve üzerine 70 μ L enzim çözeltisi 96'lık well-plate konuldu. Kör olarak ise 70 μ L 50 mM (pH 5.5) sodyum asetat (Na-Ac) tamponu ve üzerine 70 μ L enzim çözeltisi ilave edildi. Etüvde 37 °C'de, 30 dakika inkübe edildikten sonra reaksiyon 70 μ L 0.5 M Na₂CO₃ ile durduruldu. Sonra spektrofotometrede 405 nm'de köre karşılık, absorbans değerleri okunmuştur.

2.2.4 Protein Tayini

2.2.4.1 Lowry Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini

Protein miktarı ölçümleri Lowry Metoduna göre hesaplanmıştır. Bu yöntem için Bölüm 2.1.4.1'de anlatıldığı şekilde beş farklı çözelti hazırlanmıştır.

Protein tayini işlemlerinde sırasıyla şu işlemler yapılmıştır : 1 mg/mL protein içeren standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 μ L ilave edilmiştir. Sonra üzerlerine toplam hacim her tüpte 100 μ L

olacak şekilde saf su ilave edilmiştir. Kör olarak kullanılmak üzere de bir tüpe 100 µL saf su konuldu. Daha sonraki aşamada her tüpe 2 ml çözelti D eklendi ve 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. On dk sonunda tüplere 0.2 mL çözelti E eklenip vorteks ile zaman kaybetmeden karıştırıldı ve 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Örnekler 96'lık plakanın kuyucuklarına 200'er µL konularak 600 nm'de absorbansları köre karşı okundu. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri ile standart grafik hazırlandı. (Şekil 3.4)

Saflaştırma evrelerinde protein miktarı tesbit edilecek numunelerden 0.1'er mL tüplere alındı ve standart grafik için uygulanan yöntem benzer şekilde numune tüpleri için de uygulandı. Daha sonra numuneler içindeki protein miktarı standart grafikten elde edilen doğru denklemi kullanılarak hesaplanmıştır [75].

2.2.5 Enzimin Saflaştırılması

2.2.5.1 Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi

Belirli doygunluk derecelerine göre belirli proteinlerin çökmesini sağlayan (-2 değerlikli) çok kullanılan tuzun ismi amonyum sülfat tuzudur. Amonyum sülfat çöktürmesi yapılabilmesi için kullanılacak uygun amonyum sülfat konsantrasyonunun hesaplanması gerekir. Hesaplama işlemi aşağıdaki formüle göre yapılmıştır.

$$g(NH_4)_2SO_4 = \frac{1.77xVx(S_2 - S_1)}{3.54 - S_2}$$

V: Serum hacmi

S₁: Başlangıç konsantrasyonu

S₂: Son konsantrasyon

Amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesi için ham ekstrakta 0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100 aralıklarında çöktürme yapıldı. Her bir aralık için yukarıda verdiğimiz formüle göre hesaplanan

amonyum sülfat miktarları 0°C’de eklendi. Otuz dakika manyetik karıştırıcıda yavaşça karıştırılarak eklenen amonyum sülfat tuzunun çözünmesi sağlandı. Daha sonra 15000 rpm’de 4°C’de 30 dakika santrifüj edildi. Çökeleklerin her biri 1mL, 50 mM pH 6.8 sodyum fosfat tamponunda çözüldü.

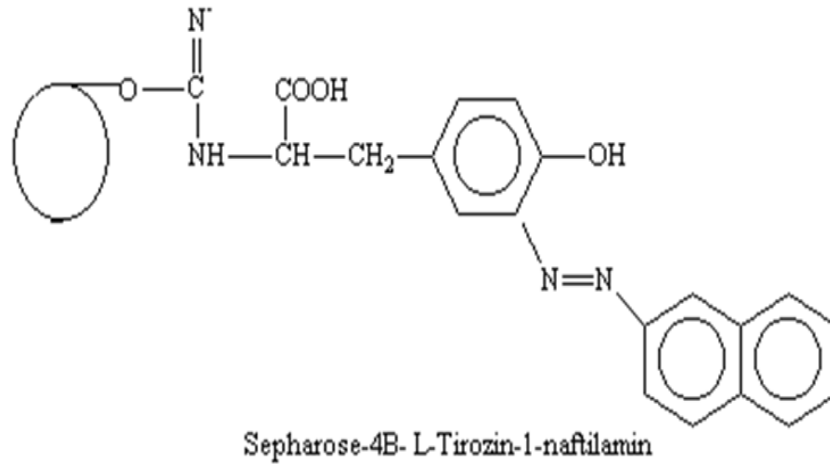
Ayrı ayrı her aralık için çözülen numunenin enzim aktivitesi ve Lowry yöntemiyle kantitatif protein miktarı tespit edildi. Enzim numuneleri renkli olduğundan 405 nm’de aktivite belirlenirken absorbans değerinin hatalı çıkmaması için her bir aralıktaki enzim çözeltisi kendi körüne karşı okundu. 0-10 aralığının enzim aktivitesi bulunurken, 70 µL bu aralıktaki enzim çözeltisi ve 70 µL substrat karışımının absorbans değeri, 70 µL bu aralıktaki enzim çözeltisi ve 70 µL aktivite tamponu körüne karşı okundu. Bu durumda 10 farklı tuz aralığı için 10 ayrı kör kullanılmış oldu. Tablo 2.2’de aktivite ölçümünde kullanılan hacim ve reaksiyon karışımlarının miktarları verilmiştir. 37 °C’de 30 dakika inkübe edildikten sonra reaksiyonlar 70 µL 0.5 M Na₂CO₃ ile durduruldu ve 405 nm’de absorbansları okundu. Her bir aralığın kantitatif protein miktarları Bölüm 2.2.4.1’de verilen Lowry metoduna göre hesaplandı.

Tablo 2.2: Amonyum sülfat çöktürme aralıklarının enzim aktiviteleri bulunurken kullanılan reaksiyon hacimleri.

Kör	Aktivitesi Bakılan Numune
70 µL Aktivite tamponu	70 µL Aktivite tamponunda çözülmüş substrat
70 µL 0-10 Aralığındaki numune	70 µL 0-10 Aralığındaki numune
70 µL Aktivite tamponu	70 µL Aktivite tamponunda çözülmüş substrat
70 µL 10-20 Aralığındaki numune	70 µL 10-20 Aralığındaki numune
70 µL Aktivite tamponu	70 µL Aktivite tamponunda çözülmüş substrat
70 µL 20-30 Aralığındaki numune	70 µL 20-30 Aralığındaki numune
70 µL Aktivite tamponu	70 µL Aktivite tamponunda çözülmüş substrat
70 µL 30-40 Aralığındaki numune	70 µL 30-40 Aralığındaki numune
70 µL Aktivite tamponu	70 µL Aktivite tamponunda çözülmüş substrat
70 µL 40-50 Aralığındaki numune	70 µL 40-50 Aralığındaki numune
70 µL Aktivite tamponu	70 µL Aktivite tamponunda çözülmüş substrat
70 µL 50-60 Aralığındaki numune	70 µL 50-60 Aralığındaki numune
70 µL Aktivite tamponu	70 µL Aktivite tamponunda çözülmüş substrat
70 µL 60-70 Aralığındaki numune	70 µL 60-70 Aralığındaki numune
70 µL Aktivite tamponu	70 µL Aktivite tamponunda çözülmüş substrat
70 µL 70-80 Aralığındaki numune	70 µL 70-80 Aralığındaki numune
70 µL Aktivite tamponu	70 µL Aktivite tamponunda çözülmüş substrat
70 µL 80-90 Aralığındaki numune	70 µL 80-90 Aralığındaki numune
70 µL Aktivite tamponu	70 µL Aktivite tamponunda çözülmüş substrat
70 µL 90-100 Aralığındaki numune	70 µL 90-100 Aralığındaki numune

2.2.5.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması

Kayısı çekirdeğinden izole edilen β -Glukozidaz enzimi saflaştırılmasında, amonyum sülfat çöktürmesinden sonra hidrofobik etkileşim kromatografisi tercih edilmiştir. Hidrofobik etkileşim kromatografisi için Laboratuvarımızda sentezi yapılan ve Şekil 2.1’de verilen hidrofobik jel, sepharose-4B-L- tirozin-1-naftilamin, kullanılmıştır [76].



Şekil 2.1: Hidrofobik etkileşim kromatografisinde kullanılan hidrofobik jel [68].

Oluşturulan etkileşim kolonu ilk olarak 1M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren 50mM, pH 6.8 sodyum fosfat tamponu ile dengelenmesi sağlandı. Bu işlemden sonra, jel üzerindeki tampon çözeltisi jelin üst düzeyine kadar indirildi. Amonyum sülfat çöktürmesi neticesinde elde edilen enzim çökeleği en az hacimde 1M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ihtiva eden 50mM, pH 6.8 sodyum fosfat tamponunda çözüldü. Sonra çözeltinin enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak tesbit edildikten sonra kolona tatbik edildi. Kolona 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren 50mM, pH 6.8 sodyum fosfat tamponu ve 50mM, pH 6.8 sodyum fosfat tamponu ile oluşturulan yüksek tuz konsantrasyonundan düşük tuz konsantrasyonuna doğru tuz gradienti uygulandı. Tuz gradienti ile kolondan elüe edilen elüatlar 2mL halinde tüplere alındı. Elüsyon işlemine 280 nm’deki absorbans değeri minimum oluncaya kadar devam edildi. 50 mM, pH 6.8 sodyum fosfat tamponu kör olarak kullanıldı. Her bir tüpte 280 nm’de kalitatif protein tayini ve

405 nm'de aktiviteler hesaplandı. Elde edilen değerlerin tüp nosuna karşı aktivite ve protein miktarı grafiği çizildi (Şekil 3.6).

2.2.5.3 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü

Enziminin hidrofobik etkileşim kromatoğrafisiyle saflaştırılmasından sonra iki farklı akrilamid konsantrasyonunda; yığıma jeli % 3, ayırma jeli % 10 olacak şekilde kesikli sodyum dodesil sülfat jel elektrofrez (SDS-PAGE) Laemmli [77] yöntemine göre yapılarak enzimin saflık derecesi belirlenmiştir. SDS-PAGE'de kullanılan jel karışımlarının miktarları Tablo 2.1'de verilmiştir.

Bunun için elektrofrez cam plakaları önce etil alkol ile sonra da distile su ile iyice temizlendi. Daha sonra plakalar arasına plastik aralık oluşturucusu konularak iki cam plaka birbiri üzerine yerleştirildi ve elektrofrezin dökme aparatına tutturuldu. Tablo 2.1'de belirtildiği şekilde yapılan ayırma jeli plakalar arasına üstten 3-4 cm kalana kadar enjektörle ilave edildi. Jel içerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Jelin üst kısmının düzgün olması için saf su ile ince bir katman oluşturuldu. Polimerizasyon gerçekleşikten sonra (1.5-2 saat) üst kısımdaki su boşaltıldı. Sonra cam plakaların arası doluncaya kadar polimerleşmiş ayırma jelinin üzerine yığıma jeli tatbik edildi. Jel kasetindeki yükleme jelinin üzerine tarak dikkatli bir şekilde yerleştirildi ve jelin polimerleşmesi için 25-30 dakika beklendi. Yükleme jeli polimerleşikten sonra tarak, kuyucuklar bozulmadan dikkatli bir şekilde çıkarıldı. Kuyucuklar ilk olarak distile suyla sonra tank tamponuyla yıkandı. Polimerize jellerin bulunduğu kaset elektrofrez tankına yerleştirildi. Elektrofrez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu tatbik edildi.

Hidrofobik etkileşim kromatoğrafisiyle elde edilen elüatlardan aktivitesi yüksek olanlar birleştirildi. Elde edilen çözelti toplam hacim 50 µl olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. Molekül ağırlık standartları; (β-Galaktosidaz (116.0 kDa), sığır serum albumin (66.2 kDa), yumurta albumini (45.0 kDa), laktat dehidrogenaz (35.0 kDa), REase Bsp98I (*E.coli*) (25.0 kDa), β-Laktoglobulin (18.4 kDa) ve Lizozim (14.4 kDa) içeren standart protein çözeltisi 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. Jele yüklenecek numuneler 5 dakika 95 °C'de termoblokta bekletildi. Numuneler soğutulularak kuyucuklara tatbik edildi.

Elektroforez güç kaynağına bağlanarak 80 volta ayarlandı. Proteinlerin jeldeki hareketini sağlayan numune tampon içindeki boyaya ait bant, ayırma jeline ulaştığında voltaj 150 volta getirildi. Yürütme işlemine proteinler, jelin altına 1cm kalana kadar tatbik edildi. Daha sonra elektrik kesilerek yürütme durduruldu. Cam plakalar arasındaki jel sarsılmadan çıkarıldı. Yığılma jeli kesilip ayrıldıktan sonra protein bantlarını içeren ayırma jeli renklendirme çözeltisi içine bırakıldı. Ardından 1.5-2 saat kadar çalkalayıcı üzerine konulduktan sonra jel renklendirme çözeltisinden çıkartılarak renksizleştirme çözeltisinin içine konuldu. Belirli aralıklarla değiştirmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp protein bantları görününceye kadar bu çözelti içinde çalkalandı. Jel renksizleştirme çözeltisinden alındıktan sonra jel görüntüleme sistemi (UVP) ile görüntü bilgisayara transfer edildi.

2.3 β -Glukozidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

2.3.1 Saf Enzimin Optimum pH Değerinin Belirlenmesi

Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enziminin optimum pH'sını bulmak için, bir seri farklı pH (2.80-10.75) değerlerinde 50 mM Na-Ac tamponu hazırlandı. Hazırlanan Na-Ac tamponlarının hepsinde sırasıyla son konsantrasyonu 5 mM olacak biçimde *p*-NPG substratı çözüldü. Enzimin farklı pH değerlerindeki substratlara karşı gösterdiği aktivite tesbit edilirken; 120 μ L, farklı pH'a sahip 5 mM *p*NPG substrat çözeltisi üzerine 20 μ L enzim çözeltisi ilave edilerek 96'lık plakaya konuldu. Kör olarak 120 μ L 50 mM (pH 5.5) Na-Ac tamponu ve üzerine 20 μ L enzim çözeltisi konuldu. Etüvde 37 °C'de, yarım saat inkübe edildi. Yarım saat sonunda reaksiyon 70 μ L 0.5 M Na₂CO₃ ile durduruldu. Spektrofotometrede 405 nm'de köre karşılık absorbans değeri okundu. Absorbans değerlerinden *p*-NP standart grafik kullanılarak enzim ünitesi (EU) hesaplandı.

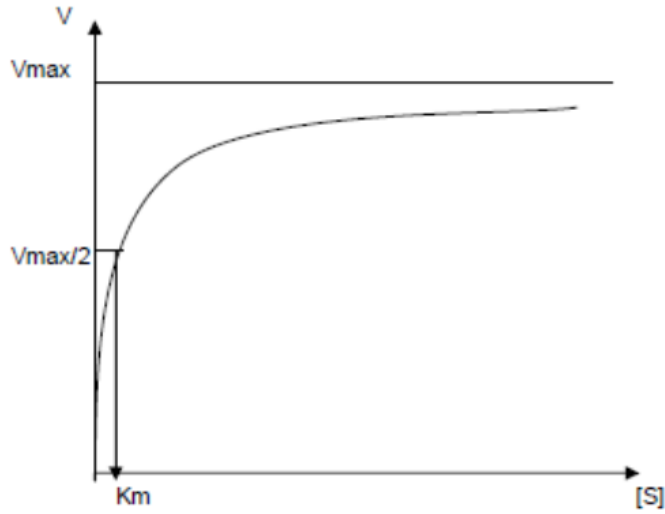
2.3.2 Saf Enzimin Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi

Saflaştırma sonucu elde edilen kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini araştırmak amacıyla, 20-60 °C aralığında, sıcaklık kademeli olarak 5 °C artırılarak aktivite tayini yapıldı. Söz konusu enzimin

farklı sıcaklıklarda aktivitesini belirlemek için Bölüm 2.2.3’de anlatılan yöntemin aynısı uygulandı. Sadece inkübasyon sıcaklıkları değiştirilerek farklı sıcaklıklardaki reaksiyonlar dururulduktan sonra 405 nm’de absorbanları okundu ve *p*-NP standart grafik kullanılarak enzim ünitesi (EU) hesaplandı.

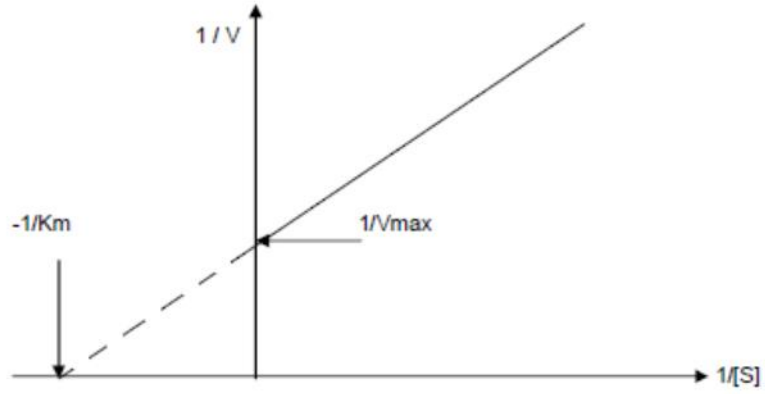
2.3.3 Enzimin Farklı Substratlara Karşı K_M ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi

Sabit konsantrasyondaki birçok enzimin reaksiyon hızı substrat konsantrasyonuna bağlı olarak artabilir [78]. Eğer enzimin reaksiyon hızı (V), substrat konsantrasyonuna $[S]$ karşı grafiğe yazılırsa Şekil 2.2.’de görüldüğü gibi hiperbolik bir eğri ortaya çıkar. 1913 yılında L. Michealis ve M. Menten bu hiperbolik eğrinin matematiksel olarak nasıl ifade edileceğini bir formüle bağlamışlardır.



Şekil 2.2: Michealis- Menten grafiği.

Michealis-Menten eşitliği hiperbolik eğrinin denklemdir. V_{max} 'ın değerini grafikten tam olarak tesbit etmek güçtür. Eğer Michealis-Menten eşitliği her iki tarafı 1'e bölünürse Lineweaver-Burk eşitliği olarak ifade edilen bir doğru denklemi oluşur. $1/[S]$ 'ye karşı $1/V$ grafiğe yazılırsa Şekil 2.3'de görüldüğü gibi K_M ve V_{max} miktarları kolaylıkla hesaplanabilir.



Şekil 2.3: Lineweaver-Burk grafiği.

İncelediğimiz söz konusu enzimin *p*-NPGlu, *p*-NPGal, *o*-NPGal ve *o*-NPGlu substratlarına olan ilgisi K_M ve V_{max} değerleri bulunarak tesbit edildi. Bunun için yukarıdaki substratların farklı konsantrasyonlarda enzim aktiviteleri ölçüldü. $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. K_M ve V_{max} değerleri grafiğin denkleminde bakılarak bulundu. Bunun için grafiğin $1/V$ eksenini kestiği nokta olan $1/V_{max}$ değerinden V_{max} değeri hesaplandı ve denklemin eğimi olan K_M/V_{max} değerinde V_{max} yerine K_M değeri yazılarak hesaplandı.

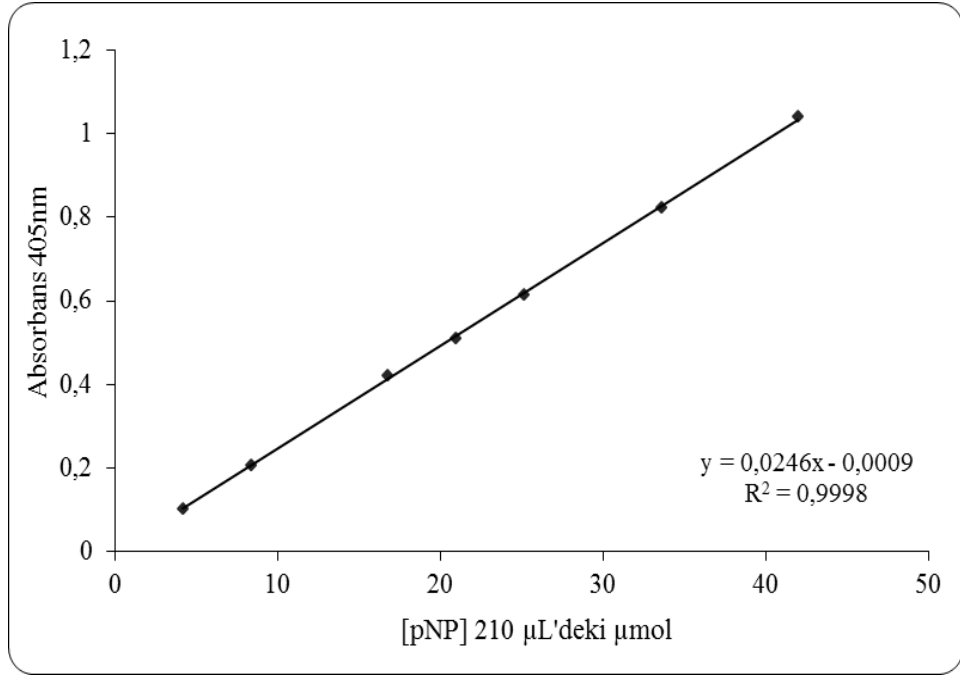
2.3.4 İnhibitörlerin IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi

Enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırılan inhibitör maddelerin IC_{50} değerlerini bulmak için, *p*-NPG substratının reaksiyon hacminde 0.01 mM ve 1.36 mM konsantrasyon aralıklarında çalışıldı. İnhibitör eklenmemiş ortamda enzim aktivitesi bulunarak bu değer % 100 aktivite olarak alındı. Farklı inhibitör konsantrasyonlarında enzim aktivite değerleri bulundu ve % aktivite değerleri hesaplandı ve % Aktivite-[I] grafikleri çizildi (Şekil 3.12). Bu grafiklerden yararlanarak enzim aktivitesini % 50 oranında azaltan inhibitör konsantrasyonu olan IC_{50} değerleri hesaplandı.

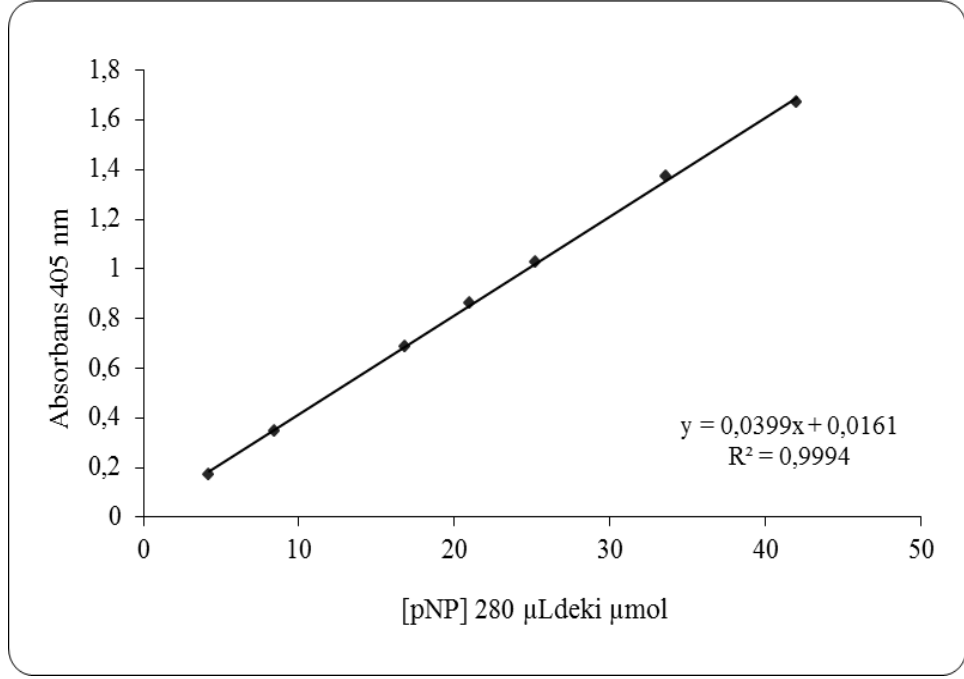
3. BULGULAR

3.1 Enzim Aktivite Tayininde Kullanılan Standart Eğri

Enzimin aktivitesinin hesaplanması, β -Glukozidaz enziminin hidroliz etmesi ve glikopiranozide bağlı olan *p*-Nitrofenolün açığa çıkması esasına dayanarak yapıldı. Bu amaçla 210 μ L ve 280 μ L'lik son reaksiyon hacimlerinde *p*-NP standart grafikleri oluşturuldu. Bu grafikleri oluşturmak için *p*-Nitrofenol standart olarak kullanıldı. Standart çözeltideki μ mol *p*-Nitrofenole karşılık gelen absorbans değerleri Bölüm 2.2.3'de anlatılan yöntemle bulunarak Şekil 3.1 ve 3.2 'deki standart grafikler çizildi.



Şekil 3.1: Enzim aktivite tayininde kullanılan 210 μ L hacimli *p*-NP standart grafiği.



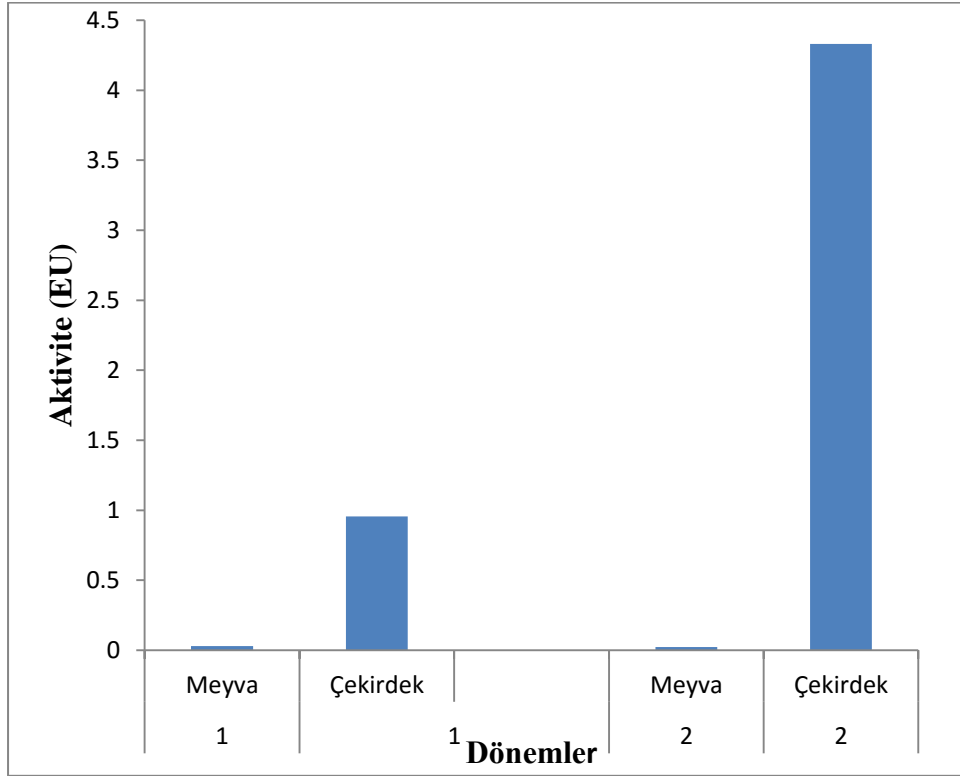
Şekil 3.2: Enzim aktivite tayininde kullanılan 280 μL hacimli *p*-NP standart grafiği.

3.2 Kayısı Meyvası ve Çekirdeğinin Aktivitelerinin Karşılaştırılması

Farklı tarihlerde toplanan kayısıların, meyva ve çekirdek ekstraktlarının spektrofometrede 405 nm'deki aktivite değerleri Tablo 3.1'de verilmiştir. Kayısı meyvası ve çekirdeği ekstraktlarının aktivite grafiği Şekil 3.3'de gösterilmiştir. Bu çalışmada kayısı meyvasının her iki dönemde aktivitesinin düşük, kayısı çekirdeğinin ise her iki dönemde aktivitesinin yüksek olduğu tesbit edilmiştir. Buradan yola çıkarak çalışmamızda kayısı çekirdeği β-Glukozidaz enziminin saflaştırılması ve karakterize işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.1: Farlı dönemlerde kayısı meyva ve çekirdek ekstraktlarının aktivite değerleri.

	EKSTRAKT	ABSORBANS (405 nm)	AKTİVİTE (EU)	ORTALAMA AKTİVİTE (EU)
İLK NUMUNE	Meyva Ekstrakt (1)	0.077	0.052	0.030
	Meyva Ekstrakt (2)	0.060	0.040	
	Meyva Ekstrakt (3)	-0.115	-	
	Çekirdek Ekstrakt (1)	0.346	0.399	0.955
	Çekirdek Ekstrakt (2)	1.032	1.396	
	Çekirdek Ekstrakt (3)	0.790	1.070	
İKİNCİ NUMUNE	Meyva Ekstrakt (1)	0.056	0.047	0.026
	Meyva Ekstrakt (2)	0.010	0.006	
	Meyva Ekstrakt (3)	-0.014	0	
	Çekirdek Ekstrakt (1)	2.694	3.774	4.539
	Çekirdek Ekstrakt (2)	3.560	4.889	
	Çekirdek Ekstrakt (3)	3.656	4.954	

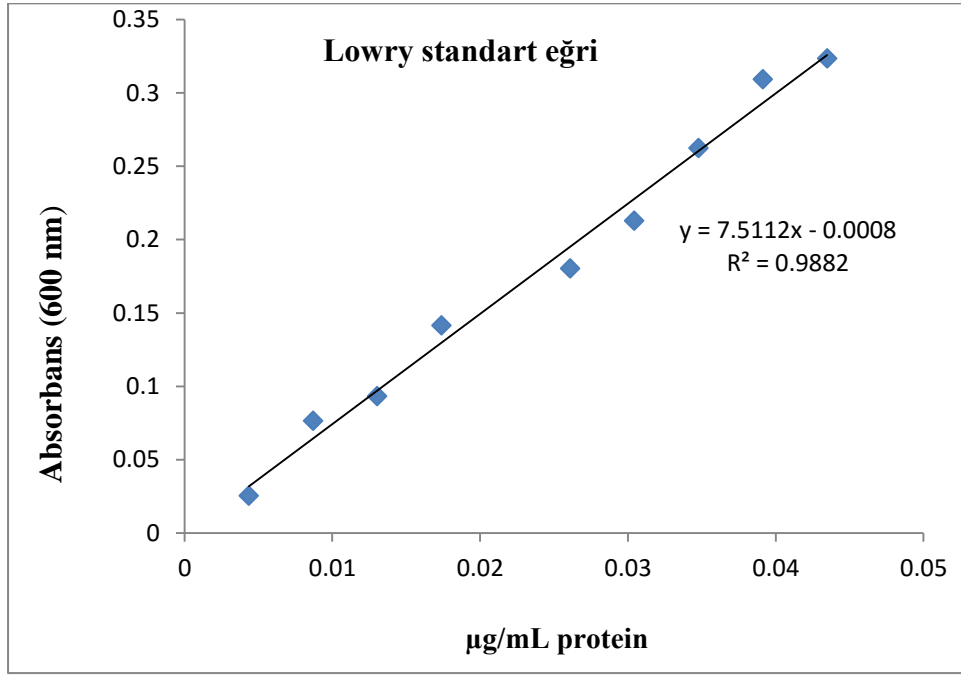


Şekil 3.3: Farlı dönemlerdeki kayısı meyva ve çekirdek ekstraktlarının β -Glukozidaz aktivite grafiği.

3.3 Protein Miktar Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri

β -Glukozidaz enziminin saflaştırma aşamalarında kantitatif protein tayini için Lowry metodu kullanılmıştır. Bu yöntemle protein miktar tayininde, sığır serum albumin proteini standart olarak kullanılmıştır. Standart çözeltideki mg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Bölüm 2.2.4'de anlatıldığı şekilde yapılmış Şekil 3.2'deki grafik çizilmiştir.

Elde edilen grafiğin doğru denkleminde ilgili absorbansa karşılık gelen mg/ml protein miktarı hesaplanmıştır.



Şekil 3.4: Lowry yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafiği.

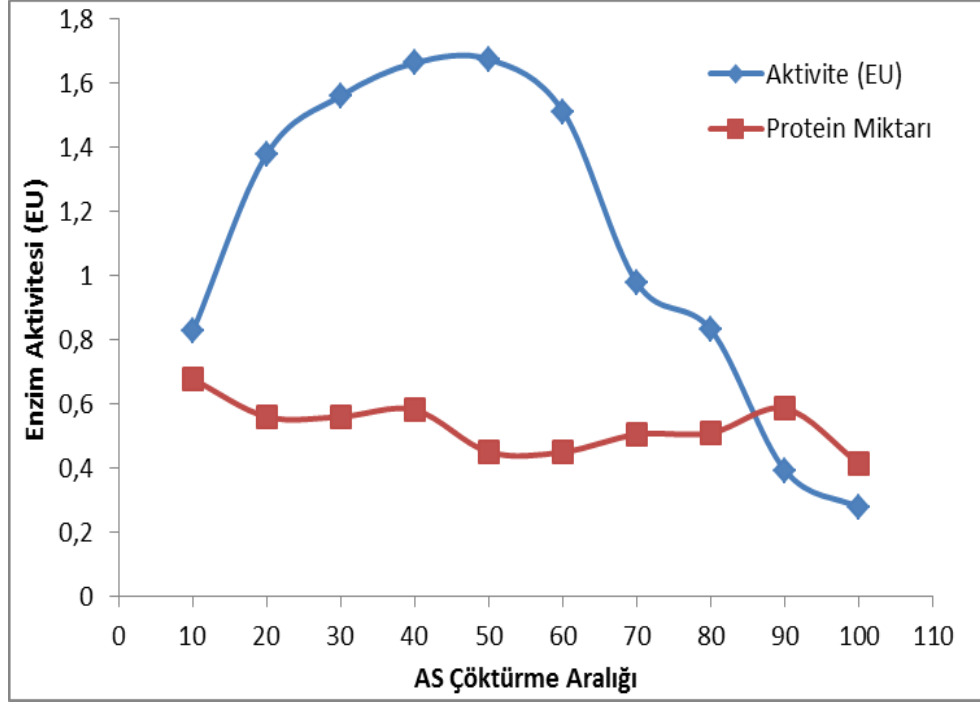
3.4 β -Glukozidaz Enziminin Saflaştırılması

3.4.1 β -Glukozidaz Enziminin Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi

Amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesi için ham ekstrakta Tablo 3.2’de verilen amonyum sülfat miktarları eklenerek Bölüm 2.2.5.1’de belirtilen işlemler yapıldı. Tablo 3.2’deki verilerden yola çıkarak Şekil 3.5’deki amonyum sülfat çöktürme aralığı-aktivite grafiği çizildi. Çöktürme aralığının belirlenmesinde protein miktarının düşük, enzim aktivitesinin yüksek olduğu aralık alınmıştır. Grafikten, enzimin çöktüğü tuz konsantrasyonu % 20-60 aralığı tesbit edilmiş ve saflaştırma işlemlerinde % 20-60 amonyum sülfat tuz çöktürmesi uygulanmıştır. Tablo 3.3’deki saflaştırma tablosunda gösterildiği gibi amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda çözülen çökeleğin toplam aktivitesi 309.27 U/ml ve toplam protein miktarı 32.89 mg/ml olarak belirlenmiş ve söz konusu enzim % 21.8 verimle 1.2 kat saflaştırılmıştır.

Tablo 3.2: Amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesinde kullanılan çözelti hacimleri, kullanılan tuz miktarı ve tesbit edilen değerler.

ARALIK DEĞERİ	ÇÖKTÜRME ARALIĞI (%)	HACİM (mL)	KULLANILAN AMONYUM SÜLFAT MİKTARI (g)	PROTEİN MİKTARI (µg/mL)	AKTİVİTE (EU)
1	0-10	5.00	0.257	0.678	0.826
2	10-20	5.00	0.264	0.561	1.379
3	20-30	4.75	0.259	0.561	1.560
4	30-40	4.75	0.267	0.582	1.663
5	40-50	4.75	0.276	0.451	1.674
6	50-60	4.80	0.288	0.451	1.512
7	60-70	4.80	0.299	0.506	0.976
8	70-80	4.75	0.306	0.510	0.830
9	80-90	4.75	0.318	0.586	0.392
10	90-100	4.75	0.331	0.414	0.277



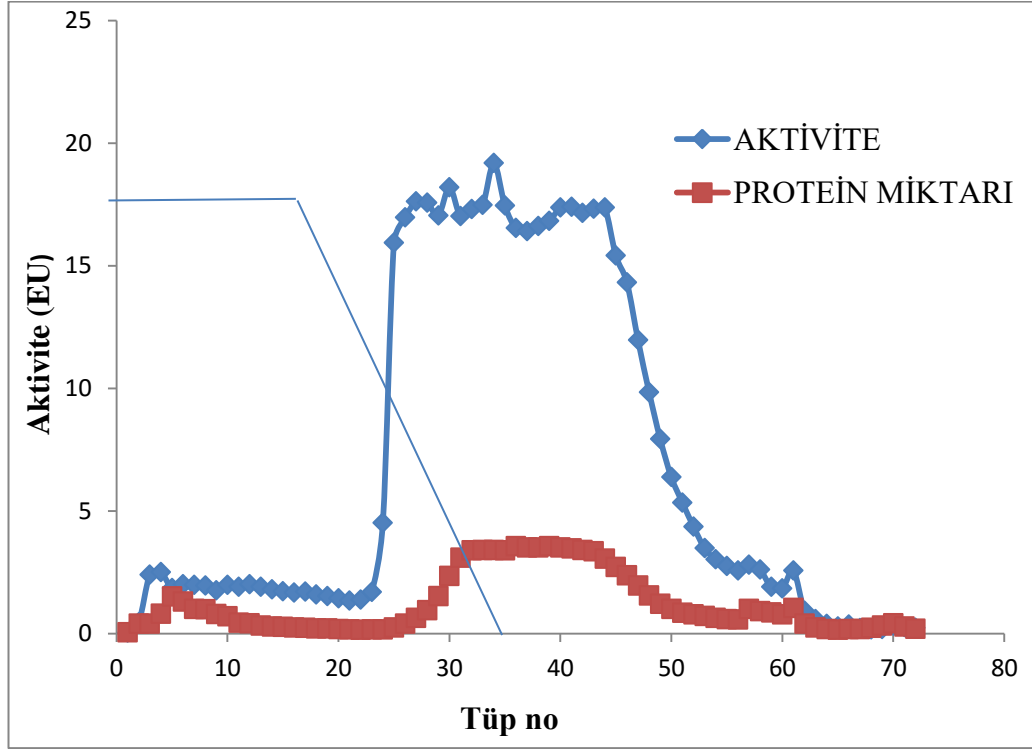
Şekil 3.5: Amonyum sülfat çöktürme aralığı ve protein miktarı grafiği.

3.5 β -Glukozidaz Enziminin Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi İle Saflaştırılması

Bölüm 2.2.5.2’de belirtildiği gibi % 20-60 amonyum sülfat çöktürmesi sonunda elde edilen numune, Laboratuvarımızda önceden sentezlenmiş olan hidrofobik yapıdaki sepharose 4B-L-tirozin-1-naftilamin jelini içeren kolona tatbik edilmiştir. Kolondaki jel yüksekliği 5 cm ve çap 1 cm olacak şekilde ayarlanmıştır. Kolondan alınan numuneler protein miktarı 50 mM sodyum fosfat, pH 6,8, tamponuna karşı 280 nm’de kalitatif olarak tayin edilmiştir. Elüe edilen her bir tüpteki enzim aktivite tayini, enzimsiz köre karşı okunmuştur. Şekil 3.6’da görüldüğü gibi elde edilen sonuçların tüp numarasına karşı aktivite ve protein miktarı grafiğinden faydalanarak yüksek aktivite gösteren 28. ve 29. numaralı tüpler birleştirilmiştir. Kolona tatbik edilen ve birleştirilen elüatlar için Lowry metoduyla kantitatif protein ve aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler ve saflaştırma oranları tesbit edilmiştir.

Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonucunda 28. ve 29. tüplerdeki proteinin % 14 verimle, 11,1 kat saflaştırıldığı görülmüştür. Yapılan hidrofobik

etkileşim kromatografisinde 1-0 M amonyum sülfat gradienti uygulanmış elüsyonun 15. tüpünde gradient başlamış, 35. tüpü ise gradient işlemi bitirilmiştir.



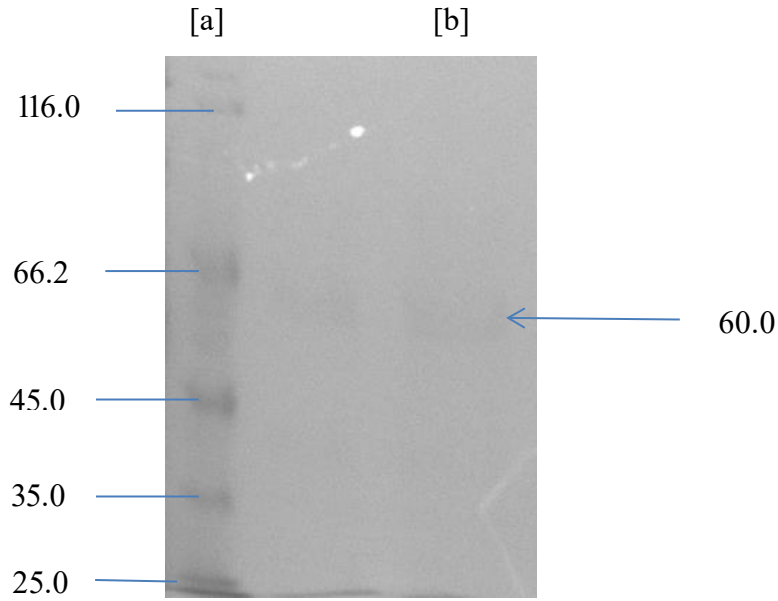
Şekil 3.6: Hidrofobik etkileşim kromatografisi kolonu ile kayısı çekirdeği β-Glukozidaz enziminin saflaştırma grafiği.

Tablo 3.3: Saflaştırma tablosu.

Basamak	Hacim (ml)	Aktivite (U/ml)	Toplam Aktivite (U/ml)	Protein Miktarı (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	% Verim	Saflaştırma Derecesi
Ham ekstrakt	20	70.846	1417.00	9.014	180.4	7.85	100	1
Amonyum Sülfat Çöktürmesi (%20-60)	4	77.307	309.27	8.224	32.897	9.40	21.82	1.2
Hidrofobik etkileşim kromatoğrafisi	4	49.748	198.992	0.573	2.292	86.82	14.0	11.1

3.5.1 Kayısı Çekirdeği β -Glukozidaz Enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Hidrofobik etkileşim kolonundan saflaştırılan kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla Bölüm 2.2.5.3'de anlatıldığı biçimde hazırlanan SDS Poliakrilamid Jel elektrofrezine, söz konusu enzim numunesi uygulandı. Protein bantları içeren jellerin görüntüleri jel görüntüleme sistemi ile bilgisayara transfer edilmiştir.



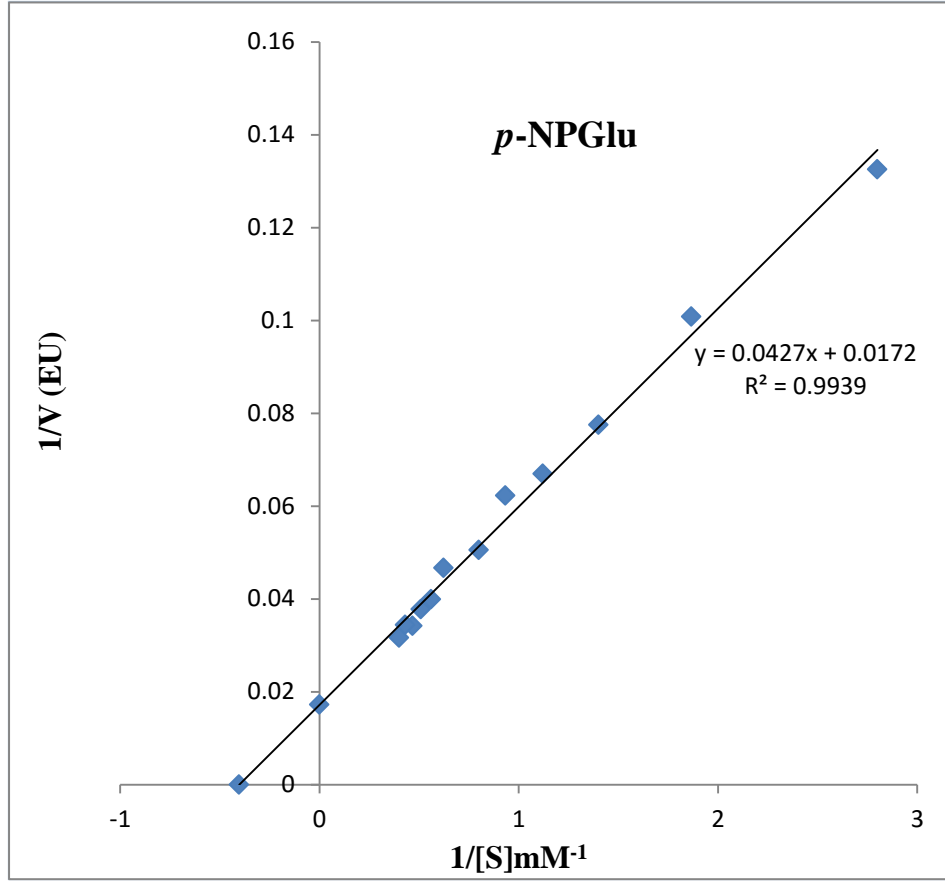
Şekil 3.7: Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enziminin SDS-Poliakrilamid Jel elektrofrezine. [a] Protein marker bantları [b] Numune bantı.

SDS Poliakrilamid Jel elektrofrezine sonucunda β -Glukozidaz enziminin molekül büyüklüğü yaklaşık 60 kDa olarak bulunmuştur.

3.5.2 *p*-NPGlu Substratına Karşı K_M ve V_{max} Değerleri

K_M ve V_{max} değerlerinin hesaplanması amacıyla *p*-NPGlu substratının farklı konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapılmış ve 405 nm'de ölçülen aktivite değerleri ile reaksiyon hızı, $V(U/mL)$ olarak belirlenmiştir. Tablo 3.3'de

verilen $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri kullanılarak Şekil 3.8’de gösterilen Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Grafik denkleminde faydalanarak kayısı ekirdeği β -Glukozidaz enzimine ilişkin p -NPGlu substratı için K_M değeri 2.48 mM ve V_{max} değeri 58.14 U/mg olarak hesaplanmıştır.



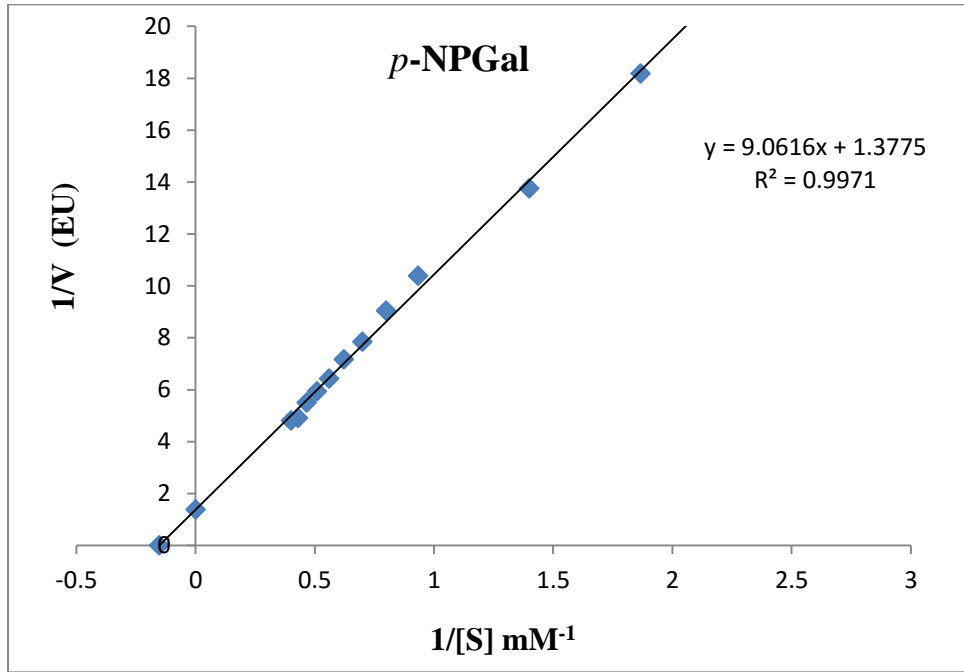
Şekil 3.8: p -NPGlu substratına karşı K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği.

Tablo 3.4: Kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enziminin *p*-NPGlu substratı kullanılarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tesbitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri.

50mM Na-Ac Tamponu (μ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Kuyucuktaki Toplam Hacim (μ l)	Kuyucuktaki Substrat Kons. [S](mM)	ΔA (405nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V$	$1/[S]$
130	70	10	210	0.3571	0.556	7.546	0.132	2.800
125		15		0.535	0.731	9.920	0.100	1.866
120		20		0.714	0.951	12.905	0.077	1.400
115		25		0.892	1.102	14.947	0.066	1,120
110		30		1.071	1.185	16.074	0.062	0.933
105		35		1.250	1.460	19.796	0.050	0.800
100		40		1.428	1.418	19.227	0.046	0.700
95		45		1.607	1.580	21.424	0.039	0.622
90		50		1.785	1.849	25.069	0.037	0.560
85		55		1.964	1.953	26.481	0.034	0.509
80		60		2.142	2.158	29.262	0.034	0.466
75		65		2.321	2.147	29.113	0.031	0.430
70		70		2.500	2.331	31.602	0.017	0.400

3.5.3 *p*-NPGal Substratına Karşı K_M ve V_{max} Değerleri

K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması amacıyla, *p*-NPGal substratının, farklı konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapılmış ve 405nm'de ölçülen aktivite değerleri ile reaksiyon hızı, $V(U/mL)$ cinsinden belirlenmiştir. Tablo 3.4'de verilen $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri kullanılarak Şekil 3.9'da gösterilen Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Grafik denkleminde faydalanarak kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enzimine ilişkin *p*-NPGal substratı için K_M değeri 6.578 mM ve V_{max} değeri 0.725 U/mg olarak hesaplanmıştır.



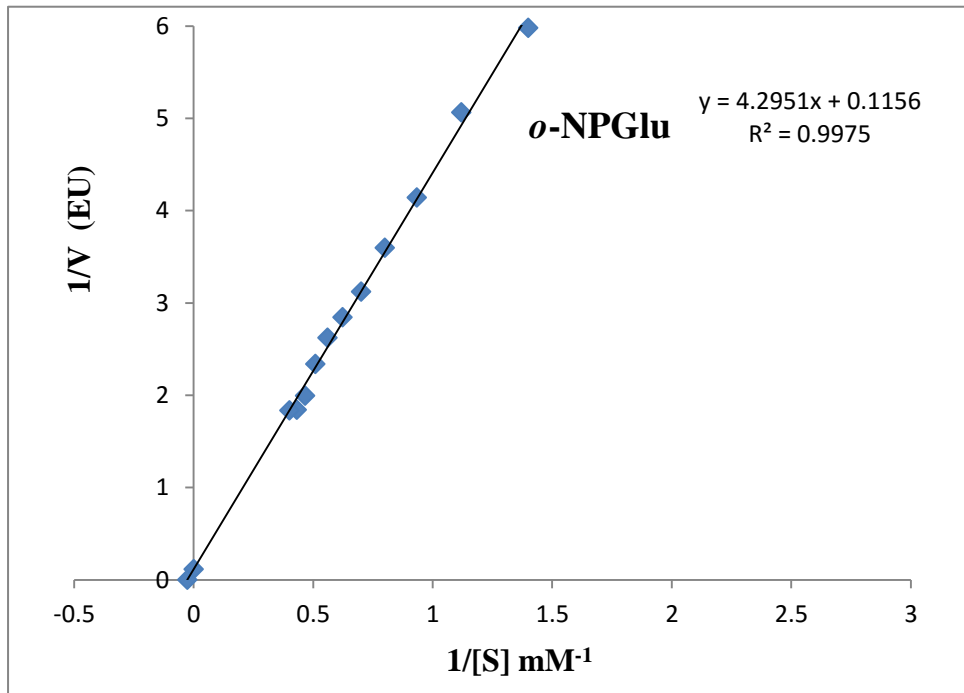
Şekil 3.9: *p*-NPGal Substratının K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği.

Tablo 3.5: Kayısı çekirdeği β -Glukozidazenziminin *p*-NPGal substratı kullanılarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tesbitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri.

50 mM Na-Ac Tamponu (μ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Kuyucuktaki Toplam Hacim (μ l)	Kuyucuktaki Substrat Kons. [S](mM)	ΔA (405 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V$	$1/[S]$
125	70	15	210	0.535	0.039	0.055	18.177	1.866
120		20		0.714	0.052	0.072	13.743	1.400
110		30		1.071	0.070	0.096	10.379	0.933
105		35		1.250	0.080	0.110	9.033	0.800
100		40		1.428	0.093	0.127	7.834	0.700
95		45		1.607	0.102	0.139	7.165	0.622
90		50		1.785	0.114	0.155	6.417	0.560
85		55		1.964	0.123	0.168	5.932	0.509
80		60		2.142	0.133	0.181	5.499	0.466
75		65		2.321	0.149	0.203	4.903	0.430
70		70		2.500	0.152	0.208	4.801	0.400

3.5.4 *o*-NPGlu Substratına Karşı K_M ve V_{max} Değerleri

o-NPGlu substratının farklı konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapılmış ve 405 nm'de ölçülen aktivite değerleri ile reaksiyon hızı, V (U/mL) olarak belirlenmiştir. Tablo 3.5' de verilen $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak Şekil 3.10'daki Lineweaver-Burk grafiği çizilmiştir. Grafik denklemi kullanılarak kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enziminin *o*-NPGlu substratına karşı K_M değeri 37.17 mM ve V_{max} değeri 8.65 U/mg olarak bulunmuştur.



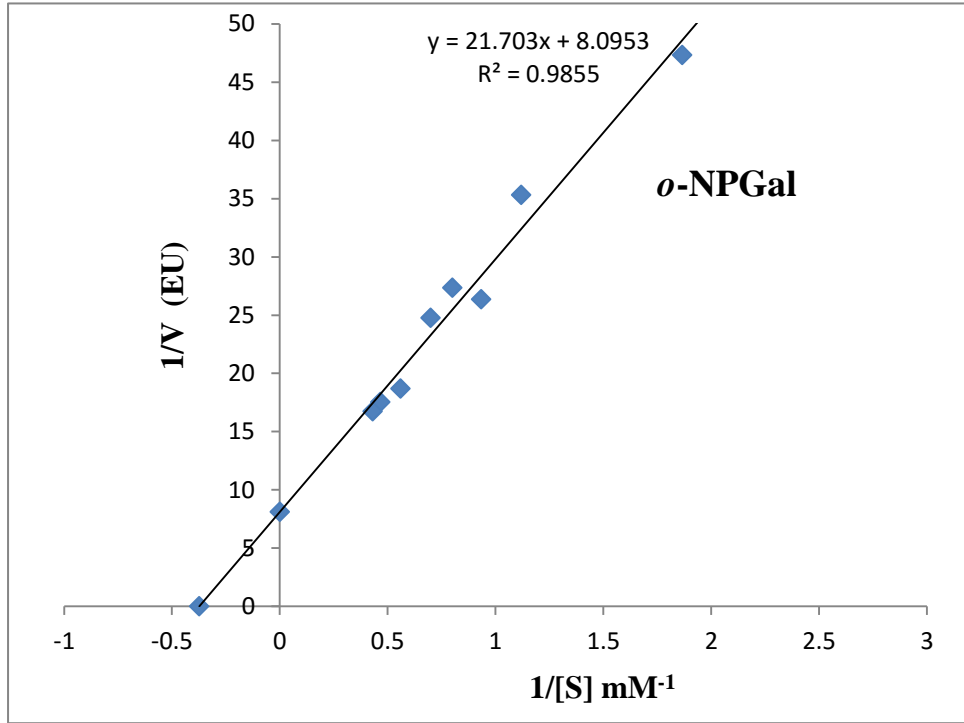
Şekil 3.10: *o*-NPGlu substratının K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği.

Tablo 3.6: Kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enziminin *o*-NPGlu substratı kullanılarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tesbitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri.

50Mm Na- Ac Tamponu (μ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Kuyucuktaki Toplam Hacim (μ l)	Kuyucuktaki Substrat Kons. [S](mM)	ΔA (405nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V$	$1/[S]$
120	70	20	210	0.714	0.122	0.167	5.980	1.400
115		25		0.892	0.144	0.197	5.065	1.120
110		30		1.071	0.177	0.241	4.141	0.933
105		35		1.250	0.204	0.277	3.598	0.800
100		40		1.428	0.235	0.320	3.121	0.700
95		45		1.607	0.258	0.351	2.845	0.622
90		50		1.785	0.280	0.381	2.621	0.560
85		55		1.964	0.314	0.427	2.336	0.509
80		60		2.142	0.369	0.501	1.993	0.466
75		65		2.321	0.399	0.542	1.842	0.430
70		70		2.500	0.400	0.544	1.836	0.400

3.5.5 *o*-NPGal Substratına Karşı K_M ve V_{max} Değerleri

K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması amacıyla, *o*-NPGal substratının farklı konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapılmıştır. Kullanılan değerler ve elde edilen sonuçlar Tablo 3.6'da verilmiş ve 405 nm'de ölçülen aktivite değerleri ile reaksiyon hızı, V (U/mL) olarak hesaplanmıştır. $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri kullanılarak Şekil 3.11'deki Lineweaver-Burk grafiği çizilmiştir. Grafikten yararlanarak kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enziminin *o*-NPGal substratına karşı K_M değeri 2.68 mM ve V_{max} değeri 0.12 U/mg olarak bulunmuştur.



Şekil 3.11: *o*-NPGal substratının K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği.

Tablo 3.7: Kayısı çekirdeği β -Glukozidazenziminin *o*-NPGal substratı kullanılarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tesbitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri.

50 mM Na-Ac Tamponu (μ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Kuyucuktaki Toplam Hacim (μ l)	Kuyucuktaki Substrat Kons. [S](mM)	ΔA (405 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V$	$1/[S]$
125	70	15	210	0.535	0.014	0.160	47.307	1.866
115		25		0.892	0.020	0.197	35.311	1.120
110		30		1.071	0.027	0.241	26.357	0.933
105		35		1.250	0.026	0.277	27.333	0.800
100		40		1.428	0.028	0.298	24.765	0.700
90		50		1.785	0.038	0.381	18.683	0.560
80		60		2.142	0.041	0.501	17.529	0.466
75		65		2.321	0.043	0.542	16.734	0.430

Tablo 3.8: Kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enziminin farklı substratlara karşı K_M , V_{max} ve V_{max}/K_M değerleri.

Substrat	V_{max}	K_M	V_{max}/K_M
<i>p</i> -NPGlu	58.14	2.48	23.44
<i>o</i> -NPGlu	8.65	37.17	0.23
<i>p</i> -NPGal	0.72	6.57	0.11
<i>o</i> -NPGal	0.12	2.68	0.05

3.6 Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren Maddelerin IC_{50} Değerleri

3.6.1 β -Glukozidazların Genel İnhibitörlerinin IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi

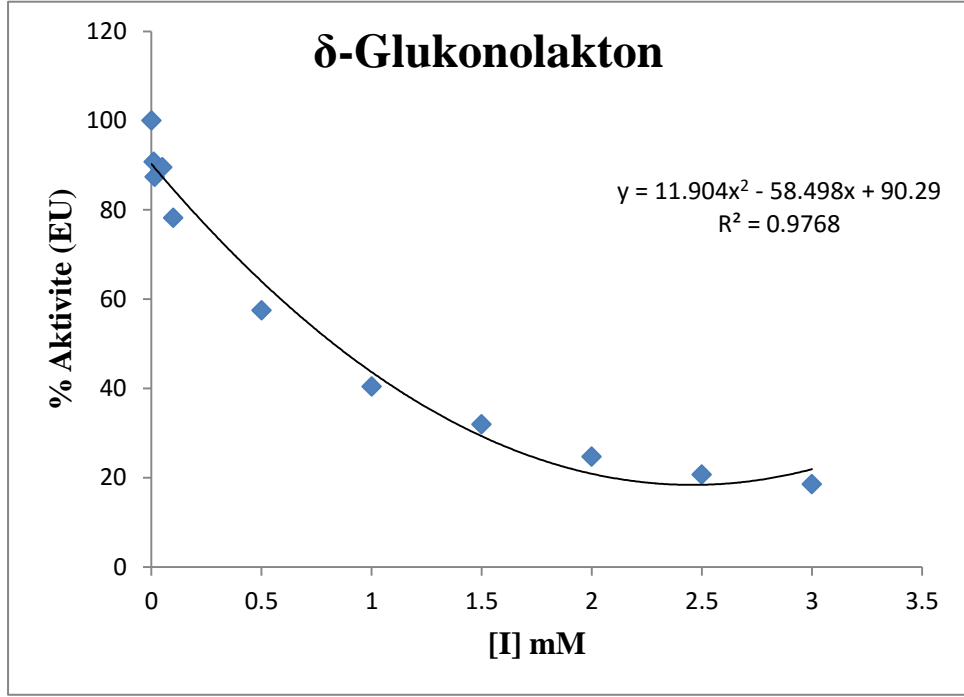
Literatürde β -Glukozidaz enzimlerinin en yaygın inhibitörlerinin glukoz ve δ -glukonolakton olduğu görülmektedir. Çalışmamızda bu iki maddenin kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırılmıştır.

3.6.1.1 δ -Glukonolaktonun IC_{50} Değeri

δ -Glukonolaktonun kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenirken, *p*-NPG substratının reaksiyon hacmindeki konsantrasyonu 1.36 mM kullanılmıştır. δ -glukonolakton bulunmayan ortamdaki enzim aktivitesi % 100 aktivite olarak alınmış ve δ -Glukonolaktonun 0.01-3.0 mM arasında değişen konsantrasyonlarındaki % Aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan veriler Tablo 3.9'da gösterilmiştir.

Tablo 3.9: β -Glukozidaz enzimi üzerine inhibisyon etki gösteren δ -Glukonolaktonun, IC_{50} değerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları, substrat ve inhibitör konsantrasyonları.

50 mM Na-Ac Tamponu (μ l)	İnhibitör	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (μ l)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Kuyudaki İnhibitör Kons. [I](Mm) (mM)	ΔA (405nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
70	δ -Glukonolakton	70	70	0	0	3.029	2.517	100.00
50				20	0.01	1.234	1.017	90.762
40				30	0.015	0.979	0.804	87.411
60				10	0.05	2.713	2.253	89.501
50				20	0.1	2.372	1.968	78.185
60				10	0.5	2.946	2.447	57.476
50				20	1.0	2.751	2.284	40.418
40				30	1.5	2.650	2.200	31.955
30				40	2.0	2.431	2.017	24.720
20				50	2.5	2.347	1.947	20.672
10				60	3.0	2.270	1.882	18.581



Şekil 3.12: Saflaştırılmış kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enziminin *p*-NPGlu substratına karşı δ -Glukonolaktonun % aktivite-[I] grafiği.

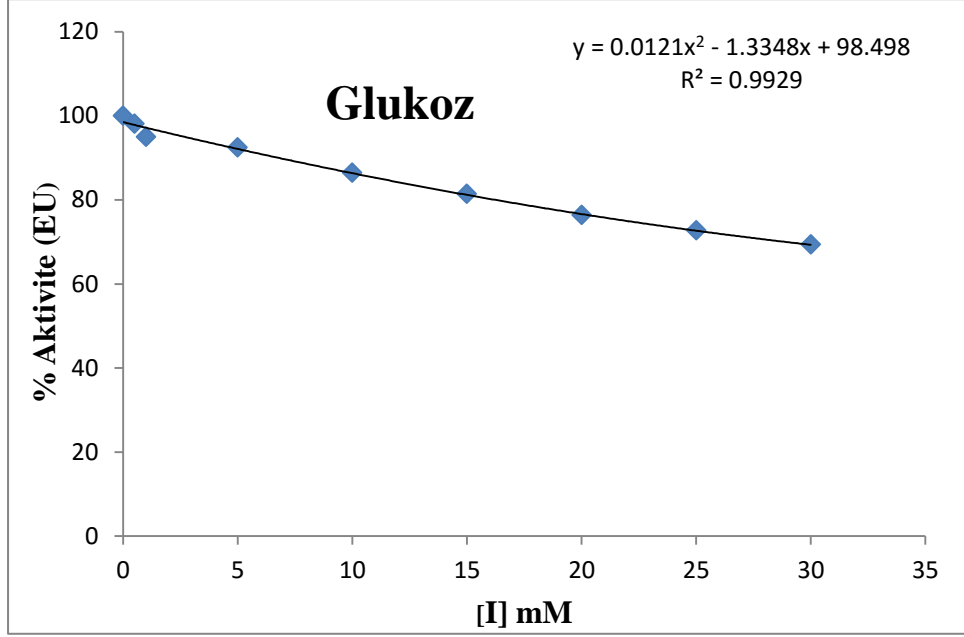
Tablo 3.9'daki veriler ışığında δ -Glukonolaktonun *p*-NPGlu substratı varlığındaki % Aktivite-[I] grafiği Şekil 3.12'deki gibi çizilmiştir. Grafikteki denklemden yararlanarak kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enzim aktivitesine δ -Glukonolakton ile IC_{50} değeri 0.83 mM olarak bulunmuştur.

3.6.1.2 Glukozun IC_{50} Değeri

Glukozun, kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenirken, *p*-NPGlu substratının reaksiyon hacmindeki konsantrasyonu 2.85 mM olacak şekilde kullanılmıştır. Glukoz bulunmayan ortamdaki enzim aktivitesi % 100 olarak alınmıştır. Glukozun 0.5 mM ile 30 mM arasında değişen konsantrasyonlarındaki % Aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan veriler Tablo 3.10'da gösterilmiştir.

Tablo 3.10: β -Glukozidaz enzimi üzerine inhibisyon etki gösteren Glukozun, IC_{50} değerinin bulunmasında kullanılan çözeltiler miktarları, substrat ve inhibitör konsantrasyonları.

50 mM Na-Ac Tamponu (μ l)	İnhibitör	Enzim Çözeltilinin Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	İnhibitör Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Kuyudaki İnhibitör Kons. [I] (mM)	ΔA (405 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
70	Glukoz	70	70	0	0	2.975	2.471	100
60				10	0.5	2.918	2.424	98.073
50				20	1	2.687	2.231	95.00
60				10	5	2.963	2.461	92.463
50				20	10	2.754	2.287	86.437
40				30	15	2.697	2.239	81.412
30				40	20	2.56	2.125	76.376
20				50	25	2.355	1.953	72.692
10				60	30	2.209	1.831	69.346

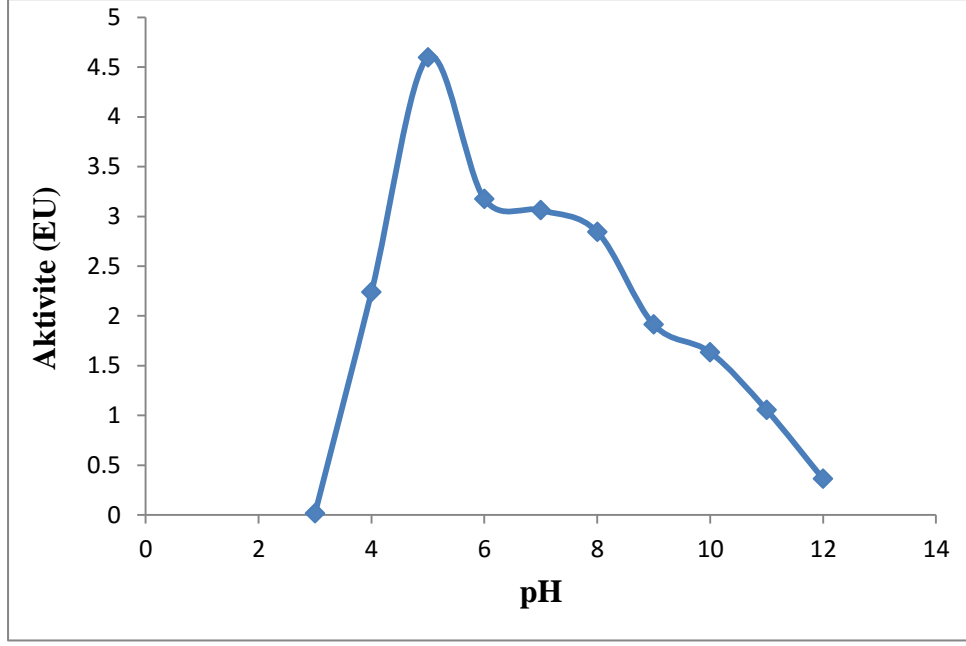


Şekil 3.13: Saflaştırılmış kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enziminin *p*-NPGlu substratına karşı glukozun % aktivite-[I] grafiği.

Tablo 3.10'daki verilere göre glukozun *p*-NPGlu substratı varlığındaki % Aktivite-[I] grafiği Şekil 3.13'de çizilmiştir. Glukozun kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enzimini yeterince inhibe etmediği görülmüş, bundan dolayı IC_{50} değeri hesaplanmamıştır.

3.7Saf Enzimin Optimum pH Değeri

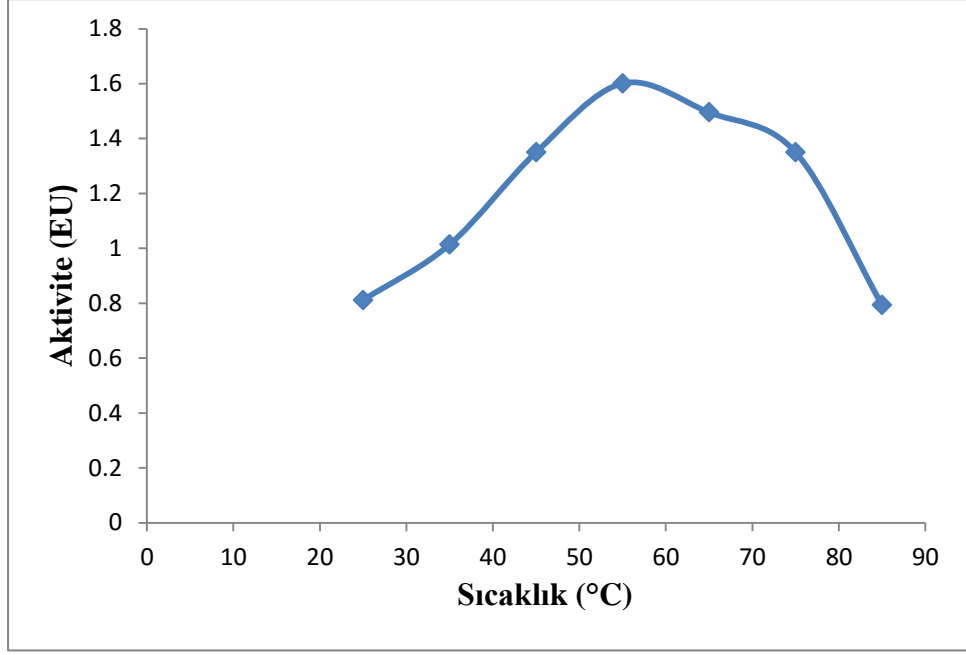
Bölüm 2.3.1'de belirtildiği şekilde, birbirinden farklı seri pH ortamlarında *p*-NPGlu substratı kullanılarak enzim aktivitesi ölçümleri yapılmıştır. Reaksiyonun gerçekleştiği ortamın pH değerine karşı enzim aktivite değeri Şekil 3.14 grafiğinde gösterilmiştir. Elde edilen grafikten kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği optimum pH değeri 5 olarak tesbit edilmiştir.



Şekil 3.14: Kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enziminin optimum pH grafiği.

3.8 Saf Enzimin Optimum Sıcaklık Değeri

Bölüm 2.3.2’de belirtildiği şekilde saf enzim, farklı sıcaklıklarda inkübe edilmiş ve aktivitesi hesaplanmıştır. Reaksiyonun gerçekleştiği ortamın sıcaklık değerine karşı enzim aktivitesi Şekil 3.15 grafiği ile gösterilmiştir. Elde edilen grafikten kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enziminin en yüksek aktiviteyi gösterdiği optimum sıcaklık değeri 55 °C olarak bulunmuştur.



Şekil 3.15: Kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enziminin optimum sıcaklık grafiği.

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

4.1 Sonuçlar

Bu çalışmada Malatya kayısı (*Prunus armeniaca* L.) meyva ve çekirdeğinden β -Glukozidaz enzim aktivitesi belirlenmiş olup, aktivitenin kayısı çekirdeğinde yüksek, kayısı meyvasında ise düşük çıkması üzerine saflaştırma işlemi çekirdek kısmından yapılmıştır. Saflaştırma işleminde sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemleri uygulanmıştır. Kayısı çekirdeğinden saflaştırılan β -Glukozidaz enzimi karakterize edilmiştir.

Kayısı çekirdeğinden toplam β -Glukozidaz enzimi saflaştırılması için ham ekstrakt hazırlama işlemi tek aşamada gerçekleştirilmiştir. Kayısı çekirdeğinin üzerine ekstraksiyon tamponu ilave edilerek ekstrakt hazırlama işlemi yapılmıştır. Literatürde farklı araştırmacılar farklı yollar izlemiştir. Örneğin portakal meyvasından [66] ve mandalina meyvasından [68] ekstrakt hazırlama işleminin tek aşamada gerçekleştirildiği bildirilmiştir. Farklı araştırmacılar tarafından yapılan kiraz meyvasından [63], çay yaprağından [64] ve zeytin meyvasından [67] hazırlanan ekstraktlardaki yağı veya fenolik bileşikler uzaklaştırmak amacıyla aseton tozu kullanılarak yapıldığı bildirilmektedir.

Yaptığımız çalışmada portakal meyvası ve mandalina meyvasında olduğu gibi ekstrakt hazırlama işlemi tek aşamada yapılmıştır. Kayısı çekirdeğinden toplam β -Glukozidaz enziminin saflaştırılması için amonyum sülfat çöktürme aralığı çalışmamızda % 20-60 olarak bulunmuş ve saflaştırma işlemlerinde ham ekstrakta % 20-60'lık amonyum sülfat tuz çöktürmesi tatbik edilmiştir. Literatürde β -Glukozidaz enziminin saflaştırılması için yapılan çalışmalarda, amonyum sülfat çöktürme aralıkları farklı tesbit edilmiştir. Örneğin β -Glukozidaz enziminin saflaştırılmasında portakal meyvası için % 75 [66], kiraz meyvası için % 30-70 [63], elma çekirdeği için % 40-65 [79], çay yaprağı için % 45-75 [64], zeytin meyvası için % 0-50 [67] ve mandalina meyvası için ise % 40-60 [68] amonyum sülfat çöktürme aralıklarının uygulandığı bildirilmektedir. Riou ve diğerlerinin yapmış oldukları araştırmada, *Aspergillus oryzae* fungusundan [73] β -Glukozidaz enzimi saflaştırılması için mantar kültür ortamına % 85, *Termonascus aurantiacus* mantarından [74] β -Glukozidaz

saflaştırılması çalışmasında yine besi yerine % 80 amonyum sülfat çöktürmesi uygulandığı belirtilmiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada kullanılan amonyum sülfat çöktürmesi aralığının zeytin meyvası hariç bitki ve mantar β -Glukozidaz enziminin saflaştırılması için kullanılan değerlere yaklaşık olduğu görülmektedir. Araştırmamızda amonyum sülfat çöktürmesi işlemi sonunda kayısı çekirdeğinden β -Glukozidaz enzimi % 21.8 verimle 1.2 kat saflaştırılmıştır. β -Glukozidaz enzimi saflaştırılması için yapılan farklı çalışmalarda amonyum sülfat çöktürmesi sonunda, soyadan % 120 verimle 3 kat [45], çay yaprağından % 50.6 verimle 7.6 kat [64], zeytin meyvasından % 72.25 verimle 7.82 kat [67], mandalina meyvasından [68] % 175.12 verimle 15.86 kat ve elma tohumundan % 51.3 verimle 2.6 kat [79] saflaştırıldığı belirtilmektedir. Çalışmamızda amonyum sülfat çöktürme basamağı sonunda elde edilen saflaştırma katsayısının, belirtilen diğer çalışmalara göre daha düşük olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda, amonyum sülfat çöktürmesi sonunda hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemi kullanılarak, tek aşamada saflaştırma işlemi yapılmıştır. Bu yöntemle enzimin aktivitesini kaybetmemesi amaçlanmıştır. Ayrıca tuz çöktürmesinden sonra hidrofobik etkileşim kromatografisi için ortamdaki tuzun uzaklaştırılmasına gerek olmamakta ve enzim aktivitesinin korunması açısından diyaliz gibi ayrı bir yöntem kullanılmamaktadır. Labaratuvarımızda sentezlenen sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin hidrofobik jeli [77] kullanılarak hidrofobik etkileşim kromatografisi gerçekleştirilmiştir. Yaptığımız çalışmada hidrofobik etkileşim kromatografisi sonucunda yüksek aktivite gösteren tüpler birleştirilmiş ve saf enzim olarak çalışmalarımızda kullanılmıştır. Araştırmamızda hidrofobik etkileşim kromatografisi sonucunda, söz konusu enzim % 14 verimle 11.1 kat saflaştırılmıştır. Literatürde farklı bitkiler üzerinde yapılan çalışmalarda söz konusu enzimin saflaştırma oranlarının farklı olduğu bildirilmiştir. Hsieh ve diğerleri [45] tarafından soya bitkisinden yapılan saflaştırmada amonyum sülfat çöktürmesinden sonra jel filtrasyon kromatografisi ile tuzlar uzaklaştırılmış, daha sonra anyon değiştirici ve katyon değiştirici matrikslerle arka arkaya iki defa iyon değişim kromatografisi yapılarak enzim % 20 verimle 20 kat saflaştırılmıştır. Odoux ve diğerlerinin [48], vanilya bitkisinden β -Glukozidaz enzimi saflaştırmak için amonyum sülfat çöktürmesi sonunda iyon değişim kromatografisi, ardından hidrofobik etkileşim kromatografisi ve sonrasında da jel filtrasyon kromatografisi

kullandıklarını ve enzimi % 8.4 verimle 7.2 kat saflaştırdıklarını belirtmişlerdir. Gerardi ve diğerlerinin [63] yaptığı bir çalışmada kiraz meyvasından β -Glukozidaz enziminin saflaştırılması için amonyum sülfat çöktürmesi sonunda iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi kullanarak enzim % 26 verimle 6.8 kat saflaştırdığı bildirilmiştir. Li ve diğerleri [64] tarafından çay yaprağında gerçekleştirilen saflaştırmada, amonyum sülfat tuz çöktürmesi sonunda iyon değişim kromatografisi ve ardından iki farklı jel filtrasyon kromatografisi uygulayarak enzimi % 1.26 verimle 117.0 kat saflaştırdıkları bildirilmektedir. Cameron ve diğerleri [66] tarafından portakaldan yapılan saflaştırmada da amonyum sülfat çöktürmesi sonunda önce katyon değiştirici sonra anyon değiştirici ile iki aşamalı iyon değişim kromatografisi ve arkasından üç farklı jel filtrasyon kromatografisi gerçekleştirilerek söz konusu enzimin 489.5 kat saflaştırıldığı bildirilmiştir. Kara ve diğerleri [67] tarafından yapılan aynı yapıya sahip hidrofobik jelle zeytin β -Glukozidaz enziminin iki aşamalı saflaştırmasında, % 53.92 verimle 154.93 kat saflaştırdıkları belirtilmiştir. Acar ve diğerleri [68] tarafından yapılan hidrofobik etkileşim kromatografisinde söz konusu enzim % 11.38 verimle 196.23 kat saflaştırıldığı belirtilmiştir. Romero ve diğerleri [70]'nin yapmış olduğu çalışmada zeytin meyvasından β -Glukozidaz saflaştırılması için amonyum sülfat çöktürmesinin ardından jel filtrasyon kromatografisi ile tuz uzaklaştırılmış, daha sonra anyon değiştirici matriksle iyon değişim kromatografisi yapılmış ve ardından hidrofobik etkileşim kromatografisi uygulanmıştır. Bu basamakların sonunda araştırmacıların zeytin β -Glukozidazını % 8.3 verimle 8.1 kat saflaştırdıkları görülmektedir. Farklı bir çalışmada ise Yu ve diğerlerinin [79] elma çekirdeğinden yaptığı saflaştırmada, amonyum sülfat tuz çöktürmesi sonunda iyon değişim kromatografisi, sonra hidrofobik etkileşim kromatografisi yapılmış ve enzim çözeltisi konsantre edilerek jel filtrasyon kromatografisinin uygulandığı bildirilmektedir. Bu şekilde enzimi % 12.8 verimle 46.1 kat saflaştırdıkları bildirilmiştir. Yukarıda belirtildiği üzere farklı araştırmacıların farklı bitkilerden gerçekleştirdiği β -Glukozidaz enzimi saflaştırmalarında amonyum sülfat tuz çöktürmesi ardından çoğunlukla çok aşamalı işlem kullandıkları görülmektedir.

Yapmış olduğumuz çalışmada kayısı çekirdeğinin β -Glukozidaz enzimini, vanilyadan [48], kirazdan [63] ve zeytinden [70] yapılan saflaştırma çalışmalarına göre daha yüksek verimde saflaştırdığımız görülmektedir. Saflaştırma katsayımızın

çay yaprağı [64], zeytin meyvası [67], mandali meyvası [68] ve elma çekirdeğinden [79] saflaştırılan enzim katsayısına göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. Daha önceki açıklamalarımızda hidrofobik etkileşim kromatografi yönteminde laboratuvarımızda sentezlenen sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin [76] hidrofobik jeli kullanıldığını belirtmiştik. Hidrofobik etkileşim kromatografisi tekniğinde ligand ve matriks yapısı son derece önemli bir yere sahiptir. Kullanılacak ligantın hidrofobik özelliği kritik bir paya sahiptir. Düşük hidrofobik özelliğe sahip ligandlar kullanıldığında ayrılacak moleküllerin kolonda etkileşimini gerçekleştirebilmek için yüksek tuz konsantrasyonu tatbik etmek gerekmektedir. Bu durumda proteinlerin kendi aralarında hidrofobik etkileşim yapma payı artmaktadır. Yüksek hidrofobik özellikli ligand tercih edildiğinde ise saflaştırılacak molekül ile ligand arasındaki etkileşim artacağı için elüsyon aşamasında bir takım sıkıntılar ortaya çıkabilmektedir [80]. Yaptığımız çalışmada kullanılan jelde hidrofobik uç olarak aril yapısında olan 1-naftilaminin olması, saflaştırma katsayımızın Odoux [48], Gerardi [63] ve Romero'nun [70] yaptığı hidrofobik etkileşim kromatografisi sonucuna göre daha yüksek sonuç vermesine neden olduğunu düşünmekteyiz. Bu olay aynı zamanda söz konusu enzimin hem hidrofobik hem de aromatik etkileşimlerde olduğunu düşündürmektedir. Buradan yola çıkarak kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enziminin yapısında hidrofobik ve aromatik rezidülerin olabileceğini düşünmekteyiz.

Hidrofobik etkileşim kromatografisinde kullanılan tuzun cinsi ve konsantrasyonu büyük önem taşımaktadır. Genellikle bu kromatografi yönteminde yaygın olarak Na_2SO_4 , K_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl , NH_4Cl , NaBr , NaSCN gibi tuzlar kullanılmaktadır. Buna rağmen en çok kullanılan amonyum sülfat tuzudur [81,82]. Çalışmamızda amonyum sülfat çöktürmesi uygulanması sonucunda 1M amonyum sülfat içeren tampon içindeki enzim, 1-0 M azalan tuz gradientinde hidrofobik etkileşim kromatografisinden elüe edilmiştir. Hidrofobik etkileşim kromatografisinde elüentler 2'şer mL'lik tüplere alınmış ve enzimin saflaştırma işlemi 72. tüpe kadar devam ettirilmiştir. Enzimin tuz yoğunluğunun azalmış bir değerde gelmesi, enzimin kolona sıkıca tutunduğunu gösterir. Buradan hareketle, enzimin üç boyutlu yapısında dış tarafta hidrofobik uçların yoğunlukta olduğu söylenebilir. Ayrıca hidrofobik jeldeki aromatik uç bölgesinde bulunması, enzimin aynı zamanda aromatik etkileşimlerde bulunmuş olabileceğini akla getirmektedir.

Tek aşamada saflaştırılan kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enziminin saflığını, alt birimlerinin varlığını ve sayısını kontrol etmek amacıyla SDS Poliakrilamid Jel elektroforezi uygulanmıştır. Protein Şekil 3.4’de görüldüğü üzere yaklaşık olarak 60 kDa hizasında tek bant şeklinde görüntülenmiştir. Araştırmacıların değişik bitkilerde yapmış olduğu çalışmalarda, saflaştırılan söz konusu enzimin mısırdaki 60 kDa [21], çimlenmiş pirinç tohumunda 56 kDa [62], kiraz meyvasında 68 kDa [63], portakal meyvasında 64 kDa [66], zeytin meyvasında 65 kDa [67] ve mandalina meyvasında ise 30 kDa [68] olduğu belirtilmiştir. Literatürdeki çalışmalarda ilgili enzimlerin molekül ağırlıklarının tesbiti genellikle SDS-PAGE yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bitki β -Glukozidazları için SDS-PAGE ile tespit edilen altbirimlerinin 55-65 kDa arasında olduğu bildirilmektedir [1]. Yapmış olduğumuz çalışmada kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enziminin SDS-PAGE ile görüntülenen molekül ağırlığı değeri yaklaşık 60 kDa’dur. Bu değer genellikle literatürde araştırmacıların yapmış olduğu çalışmalara uygunluk göstermektedir. Bununla birlikte bazı bitkilerden saflaştırılan β -Glukozidaz enziminin molekül ağırlığının farklı olduğuda görülmektedir. Örneğin çay yaprağı [64] ve mandalina meyvasından [68] saflaştırılan enzimlerin yapılan çalışmalarda sırasıyla 30 kDa ve 41 kDa olduğu belirtilmiştir.

Saflaştırılan kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enziminin optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri belirlenmiştir. Kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enzimi için optimum pH 5.0 ve optimum sıcaklık 55 °C olarak bulunmuştur. Farklı araştırmacıların yapmış olduğu çalışmalarda, β -Glukozidaz enziminin optimum pH ve sıcaklık değerlerinin çayda [64] 5.5 ve 40 °C, zeytinde [67] 5.5 ve 42 °C ve vanilya çekirdeğinde ise [83] 6.5 ve 39 °C olduğu bildirilmiştir. Aynı familyada bulunan portakal meyvasında [66] pH 5.0, optimum sıcaklık 40 °C ve mandalina meyvasında ise [68] pH 5.5, optimum sıcaklık 40 °C olduğu bildirilmektedir. Çalışmamızda bulunan optimum pH ve optimum sıcaklık değerlerinin, literatürde yapılan diğer bitki β -Glukozidaz enzimlerinin optimum pH ve sıcaklık değerlerine yakın olduğu görülmektedir.

β -Glukozidaz enziminin yapay substratlarından *p*-NPGlu, *o*-NPGlu, *p*-NPGal ve *o*-NPGal substratlarına karşı ilgisinin ifadesi olan K_M ve V_{max} değerleri bulunarak, substrat karakteristikiği tesbit edilmiştir. Kinetik parametrelerin tesbit edilmesi aşamasında saflaştırılmış enzimle *p*-NPGlu substratı için K_M değeri 2.48 mM ve V_{max}

değeri 58.14 EU olarak bulunmuş ve katalitik etkinliğin ölçüsü olan V_{\max}/K_M oranı 23.44 olarak hesaplanmıştır. Saflaştırılmış kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enziminin *o*-NPGlu substratı için K_M değeri 37.17 mM ve V_{\max} değeri 8.65 EU olarak bulunmuş ve V_{\max}/K_M değeri 0.23 olarak hesaplanmıştır. Yapmış olduğumuz çalışmada *p*-NPGal substratının K_M değeri 6.57 mM ve V_{\max} değeri 0.72 olarak belirlenmiş ve V_{\max}/K_M oranı 0.11 olarak hesaplanmıştır. Yine *o*-NPGal substratı ile yapılan çalışmada K_M değeri 2.68 mM ve V_{\max} değeri 0.12 EU olarak tesbit edilmiş ve V_{\max}/K_M oranının 0.05 olduğu tesbit edilmiştir. Yaptığımız çalışmada kayısı çekirdeğinden saflaştırılan β -Glukozidaz enziminin *p*-NPGlu substratına karşı ilgisinin diğer substratlara göre fazla olduğu tesbit edilmiştir.

Hsieh ve Graham tarafından yapılan bir çalışmada soyadan saflaştırılan β -Glukozidaz enziminin *p*-NPGlu substratına ilgisinin en yüksek olduğu belirtilmiştir [45, 46]. Vanilya bitkisi ile yapıla çalışmada ise ilgili enzimin *p*-NPGlu substratına ilgisinin yüksek olduğu açıklanmaktadır [48]. Farklı bir çalışmada ise zeytin β -Glukozidaz enziminin *p*-NPGlu substratlarına karşı K_M ve V_{\max} değerleri sırası ile 2.22 mM ve 370.37 EU olarak tesbit edilmiş, V_{\max}/K_M oranı 166,83 olarak hesaplanmıştır. Aynı çalışmada *o*-NPGlu substratının K_M ve V_{\max} değerleri sırası ile 14.11 mM ve 48,54 EU olarak belirlenmiş, V_{\max}/K_M oranı 3.44 olarak hesaplanmıştır [67]. Mandalina β -Glukozidaz enziminin *o*-NPGlu substratı için K_M değeri 3.04 mM ve V_{\max} değeri 116,27 EU olarak bulunmuş ve V_{\max}/K_M değeri 38.24 hesaplanmıştır. Aynı çalışmada *p*-NPG substratı için K_M değeri 0.246 mM ve V_{\max} değeri 294.11 EU olarak bulunmuş ve katalitik etkinliğin ölçüsü olan V_{\max}/K_M değeri 1114.07 olarak tesbit edilmiştir [68]. Erik çekirdeği β -Glukozidaz enziminin *p*-NPGlu substratına karşı K_M değeri 3.09 Mm, V_{\max} değeri 219.6 EU ve V_{\max}/K_M oranı 71.06 olarak bulunmuştur [84]. β -Glukozidaz enziminin substrat spesifikliğı çalışmalarında K_M ve V_{\max} değerlerinin hesaplanmasından ziyade karşılaştırmalı enzim aktivitelerinin önemli olduğu görülmektedir. Benzer şekilde çaydan [64] ve portakaldan [66] saflaştırılmış β -Glukozidaz enziminin *p*-NPGlu substratına ilgisinin yüksek olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Yaygın olarak bitkilerde β -Glukozidaz enziminin *p*-NPGlu substratına olan ilgisinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Ancak bu sonuçlardan farklı olarak kiraz meyvasından saflaştırılan β -Glukozidaz enziminin *o*-NPGlu substratına ilgisinin daha yüksek olduğu belirtilmiştir [63]. Farklı kaynaklardan elde edilen β -Glukozidaz enzimlerinin substratlara ilgilerinin farklı

olmasının nedeni, aktif merkeze yakın olan aminoasitlerin farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çalışmalarımızda β -Glukozidaz enzimlerinin genel inhibitörlerinden, δ -Glukonolaktonun kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enzim aktivitesini % 50 oranında azaltan konsantrasyonu olan, IC_{50} değeri 0.83 mM olarak tesbit edilmiştir. Odoux ve diğerlerinin [48] vanilya bitkisiyle yapmış olduğu çalışmada β -Glukozidaz enzimi, δ -Glukonolaktonun 40⁰C, pH 7'de, *p*-NPGlu substratı varlığında kompetitif (yarışmalı) tipte inhibe ettiği bildirilmiştir. Cameron ve diğerlerinin [66] portakaldan saflaştırılan β -Glukozidaz enzimi üzerine yaptığı çalışmada 10mM δ -Glukonolaktonun *p*-NPGlu substratı varlığındaki relatif aktivitesinin % 9.3 olduğu, 1mM δ -Glukonolaktonun aynı şartlarda relatif aktivitesinin % 29.4 olduğu belirtilmiştir. Kara ve diğerleri [67] tarafından zeytin β -Glukozidaz enzimi üzerine yapılan çalışmada, δ -Glukonolaktonun *p*-NPGlu substratı varlığındaki zeytin β -Glukozidaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösterdiğini ve IC_{50} değerinin 0.23 mM olduğu bildirilmiştir. Acar ve diğerlerinin [68] yapmış olduğu çalışmada β -Glukozidaz enzimlerinin genel inhibitörlerinden δ -Glukonolaktonun, *p*-NPGlu substratı varlığındaki söz konusu enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösterdiği IC_{50} değerinin 0.088 mM olduğu bildirilmiştir. Romero ve diğerlerinin [70] yapmış olduğu çalışmada δ -Glukonolaktonun söz konusu enzim üzerine etkisi farklı bir metotla incelenmiştir. Araştırmacılar, saflaştırılmış enzimi 15 mM δ -Glukonolakton ile 4 ⁰C'de 1 saat inkübe ettikten sonra *p*-NPGlu substratı varlığındaki relatif aktivitesinin % 100 olduğunu, 24 saatlik inkübe işleminin ardından yine relatif aktivitesinin % 100 olduğunu açıklamışlardır. Yapılan bu çalışmada, δ -Glukonolaktonun enzim aktivitesi üzerine etkisi, relatif aktivite olarak tesbit edilmiştir.

β -Glukozidaz enziminin genel inhibitörlerinden olan glukozun, kayısı çekirdeğinden saflaştırılan β -Glukozidaz enzim aktivitesi üzerine *p*-NPGlu substratı varlığında etkisi araştırıldığında, enzimi yeterince inhibe etmediği görülmüş ve IC_{50} değeri hesaplanmamıştır. Odoux ve diğerleri [48] tarafından vanilya β -Glukozidaz enzim aktivitesi üzerine yaptıkları çalışmada, β -Glukozidaz enziminin 2 M glukoz ile inhibe olmadığı bildirilmektedir. Kara ve diğerleri [67] tarafından zeytinden izole edilen enzim ile yapılan çalışmada, glukozun *p*-NPGlu substratı varlığındaki zeytin

β -Glukozidaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösterdiği ve IC_{50} değerinin 105.5 mM olduğu hesaplanmıştır. Acar ve diğerlerinin [68] mandalina meyvasından saflaştırılan β -Glukozidaz enzim aktivitesi üzerine *p*-NPGlu substratı varlığındaki etkisini araştırılmış, IC_{50} değerinin 8.61 mM olduğunu belirtmişlerdir. Chen ve diğerleri [84] tarafından yapılan çalışmada, erik çekirdeği β -Glukozidaz enzim aktivitesi üzerine glukozun, *p*-NPGlu substratı varlığında yarışmalı tipte inhibisyon etkisi gösterdiği bildirilmiştir.

β -Glukozidazların genel inhibitörleri olarak bilinen glukoz ve δ -Glukonolakton maddelerinin kayısı çekirdeğinden saflaştırılan, toplam β -Glukozidaz enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırıldığında, her iki inhibitörün de enzimi inhibe ettiği, fakat glukozun enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisinin δ -glukonolaktona göre düşük seviyede olduğu belirlenmiştir. Çalışma sonuçlarımızla uygunluk gösteren zeytin [67] ve erik çekirdeği [84] araştırmalarında δ -Glukonolaktonun glukozu göre daha güçlü inhibitör olduğu açıklanmıştır.

Sonuç olarak yapılan çalışmalarda aşağıdaki bulgular ve bilgiler elde edilmiştir:

Kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enzimi, Sepharose 4B-L-tirozin-1-naftilamin kimyasal özelliğe sahip hidrofobik etkileşim kromatografisi jeli ile saflaştırılmıştır.

Amonyum sülfat çöktürmesi ile β -Glukozidaz enzimi kısmi olarak saflaştırmış ve ardından hidrofobik etkileşim kromatografi yöntemi uygulanarak söz konusu enzim % 14.9 verimle 11.1 kat saflaştırılmıştır.

SDS-PAGE tekniği ile saflaştırılan enzimin saflığı kontrol edilmiştir. Söz konusu enzimin yaklaşık olarak 60 kDa molekül ağırlığında tek bant olduğu gözlenmiştir.

Saflaştırılan kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enzimi için optimum pH 5.0 ve optimum sıcaklık değeri 55 °C olarak bulunmuştur.

Kayısı çekirdeği β -Glukozidaz enziminin en yüksek spesifiteyi *p*-NPGlu substratına karşı gösterdiği belirlenmiştir.

Glukoz ve δ -Glukonolaktonun saflaştırılmış enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Gukozun inhibisyon etkisinin δ -glukonolaktona göre daha düşük seviyede olduğu tesbit edilmiştir.

4.2 neriler

Diğer *prunus* türleri β -Glukozidaz enzimini saflaştırmada ve incelemede uygun numune olabilir.

Amonyum sülfat oktrmesi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemi ile saflaştırılan kayısı ekirdeği β -Glukozidaz enzimini, NATIVE-PAGE tekniği ile molekül ağırlığı belirlenebilir.

Kayısı ekirdeğinden saflaştırılan β -Glukozidaz enziminin farklı yapay substratlara olan ilgisi araştırılabilir.

Ağır metallerin (Fe, Ag, Pb, Zn, Cu, Ni, Cd, Cr, Mn ve Mg), kayısı çekirdeğinden saflaştırılan β -Glukozidaz enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırılabilir.

Tarımında yaygın olarak kullanılan deltamethrin, diazinon ve glyphosat pestisitlerinin saflaştırılmış β -Glukozidaz enzim aktivitesi üzerine etkileri incelenebilir.

Saflaştırılan β -Glukozidaz enzimin % 100 verimle süperparamanyetik Fe₃O₄ nanopartiküllere immobilize edilmesi ve FT-IR analizi ile enzimin nanopartiküle nasıl bağlandığı araştırılabilir.

5. KAYNAKLAR

- [1] Esen, A., “Hydrolases; β -Glucosidase”, (eds. Whitaker, J.R., Voragen, A.G.J., Wong, D.W.S.) *In Handbook of Food Enzymology*, Dekker: New York, 791-803, (2003).
- [2] Esen, A., A “ β -Glucosidases, overview.” (ed. Esen, A., *β -Glucosidase: Biochemistry and Molecular Biology*. American Chemical Society: Washington, DC, 1-13, (1993).
- [3] Vidhyasekaran, P., *Physiology of disease resistance in plants*, Volume II, CRC Pres, 82-90. Florida: (1988).
- [4] Günata, Z., Dugelay, I., Sapis JC, Baumes, R., Bayonove, C. “Role of the enzymes in the use of the flavour potential from grape glycosides in vinemaking.” (ed. Schreier and P., Winterhalter, P.) *Progress in flavour precursor Studies*. Allured Publishing, Illinois:189-193, (1993).
- [5] “Kayısı Hakkında Detaylı Bilgiler” [online], (10 Ekim 2014), www.bodytr.com/2009/04/kayisi.html, (2009).
- [6] Henrissat, B., “A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities”, *Biochem. J.*, 280. 309-316, (1991).
- [7] Henrissat, B. and Davies, G. J., “Structural and sequencebased classification of glycoside hydrolases”, *Curr Opin Struct Biol.*, 7. 637-644. (1997).
- [8] Lee, Y. C. and Lang, D., “Automatic analysis of sugar components of glycoproteins”, *J. Biol Chem.*, 243, 677-700. (1968).
- [9] Henrissat, B. and Davies, G. J. “Glycoside hydrolases and glycosyltransferases. Families, modules, and implications for genomics”, *Plant Physiol*, 124. 1515-1519, (2000).

- [10] Henrissat, B. and Bairoch, A., "Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases", *Biochem J.*, 316, 695-696, (1996).
- [11] Henrissat, B., Driguez, H., Viet, C, and Schulein, M., "Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose.", *Bio technology*, 3, 722-726, (1985).
- [12] Xu, Z., Escamilla-Trevino, L. L., Zeng, L., Lalgondar, M., Bevan, D. R., Winkel, B. S. J. et al., "Functional genomic analysis of *Arabidopsis thaliana* glycoside hydrolase family 1", *Plant Molecular Biology*, 55, 343-367. (2004).
- [13] Terra, W. R. and Ferreira, C., "Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function", *Comp. Biochem. Physiol.*, 109, 1-62. (1994).
- [14] Wiesmann. C., Beste, G., Hengstenberg, W., Schulz,G. "The three-dimensional structure of 6-phospho- β -galaktosidazfrom *Lactococcus lactis*" *Structure* 3. 961–968, (1995).
- [15] Barrett, T., Suresh, C.G., Tolley, S.P., Dodson, E.J.,Hughes, M.A. "The crystal structure of a cyanogenic β -glucosidase from white sweet clover, a family 1 glycosyl hydrolase." *Structure* 3. 951–960. (1995).
- [16] Burmeister, W.P., Cottaz, S., Driguez, H., Iori, R., Palmieri, S., Henrissat, B. "The crystal structure of *Sinapis alba* myrosinase and a covalent glycosyl-enzyme intermediate provide insights into the substrate recognition and active site machinery of an S-glycosidase." *Structure* 5, 663–675, (1997).
- [17] Sanz-Aparicio, J., Hormoso, JA., martinez-Ripoll, M., Lequerica, J. "Crystal structure of β -glucosidase A from *Bacillus polymixia*: insights in to the catalytic activity in familyl glycosyl hydrolases." *J. Mol. Biol.* 275, 491-502. (1998).
- [18] Nelson, DL., Cox, MM., Çeviri Editörü Kılıç, N. *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*, Palme Yayıncılık, 3. Baskıdan çeviri, Ankara: 184. (2005)

- [19] Czjzek M, Cicek M, Zamboni V, Burmeister WP, Bevan DR, Henrissat B, Esen A. "Crystal structure of a monocotyledon (maize ZMGlul) β -glucosidase and a model of its complex with p-nitrophenyl β -D-thioglucoside." *Biochem J.* 354. 37-46, (2001).
- [20] Verdoucq, L., Morinier, J., Bevan, D.R., Esen, A., Vasella, A., Henrissat, B. and Czjzek, M. "Structural determinants of substrate specificity in family 1 beta-glucosidases: novel insights from the crystal structure of sorghum dhurrinase-1. a plant beta-glucosidase with strict specificity, in complex with its natural substrate." *J. Biol. Chem.* 279, 31796-31803, (2004).
- [21] Esen A, "Purification and partial characterization of maize." *Plant Physiol.* 98, 174-182. (1992).
- [22] Babcock, G.D. and Esen, A. "Substrate specificity of maize b-glucosidase." *Plant Sci.* 101. 31-39, (1994)
- [23] Hosel, W. and Todenhagen, R. Characterization of a bglucosidase from *Glycine max* which hydrolyses coniferin and syringin. *Phytochemistry* 19, 331-339, (1980).
- [24] Cicek, M., Esen, A., "Expression of soluble catalytically active plant (monocot) β -glucosidases in *E. coli*." *Biotechno. Bioeng.* 63, 392-40. (1999).
- [25] Nelson, D. L. and Cox, M. M., *Lehninger Principles of Biochemistry*, New York: W. H. Freeman and Company, 183-186, (2008).
- [26] Withers, SG., Warren, R.A.J., Street, I.P., "Unequivocal demonstration of the involvement of a glutamate residue of a retaining glucosidase" *J. Am. Chem. Soc.* 112. (1990).
- [27] Davies, G., Henrissat, B. "Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases." *Structure* 3, 853-859, (1995).
- [28] Hösel W, Conn EE. "The aglikon specificity of plant β -glucosidases." *Trends Biochem Sci.* 6, 219-221. (1982).

- [29] Conn, E.E. “ β -Glycosidases in plants. Substrate specificity” (ed. Esen, A.) *β -Glucosidases: Biochemistry and Molecular Biology, ACS Symposium Series* American Chemical Society, Washington DC: 15–26, (1993).
- [30] Czjzek M, Cicek M, Zamboni V, Burmeister WP, Bevan DR, Henrissat B, Esen A: The mechanism of substrate (aglycone) specificity in β -glucosidases is revealed by crystal structures of mutant maize β -glucosidase-DIMBOA, -DIMBOAGlc, and -dhurrin complexes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97. 13555-13560. (2000).
- [31] Campos N. “A protein from maize labelled with azido-IAA has novel beta-glucosidase activity.” *Plant J.* 2. 675-684. (1992).
- [32] Cicek, M., and Esen, A. “Structure and expression of dhurrinase from sorghum”. *Plant. Physiol.* 116, 1469-1478, (1998).
- [33] Thayer, S.S. and Conn, E.E. “Subcellular localization of dhurrin β -glucosidase and hydroxynitrile lyase in the mesophyll cells of Sorghum leaf blades.” *Plant Physiol.* 67. 617–622. (1981).
- [34] Esen, A. and Stetler, D.A. “Subcellular localization of maize β -glucosidase.” *Maize Genet. Coop. News Lett.* 67. 19–20. (1993).
- [35] Kakes, P. “Function and variation of the β -glucosidase linamarase in natural populations of *Trifolium repens*.” (ed Esen A.) *In β -glucosidases: Biochemistry and Molecular Biology*, Washington DC: American Chemical Society: 145-152. ACS Symposium Series 533 (1993).
- [36] Niemeyer, H.M. “Hydroxamic acids (4-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones), defense chemicals in the Gramineae”. *Phytochemistry* 27. 3349–3358, (1988).
- [37] Poulton, JE. “Cyanogenesis in plants.” *Plant Physiol*, 94 401-405, (1990).
- [38] Malboobi, M.A. and Lefebvre, D.D. “A phosphate starvation inducible beta-glucosidase gene (psr3.2) isolated from *Arabidopsis thaliana* is a member of a distinct subfamily of the BGA family.” *Plant Mol. Biol.* 34. 57–68, (1997).

- [39] Stotz, H.U., Pittendrigh, B.R., Kroymann, J., Weniger, K., Fritsche, J., Bauke, A. and Mitchell-Olds, T. "Induced plant defense responses against chewing insects. Ethylene signaling reduces resistance of Arabidopsis against Egyptian cotton worm but not diamondback moth." *Plant Physiol.* 124. 1007–1017. (2000).
- [40] Fujiki, Y., Yoshikawa, Y., Sato, T., Inada, N., Ito, M., Hishida, I. and Watanabe, A. "Dark-inducible genes from Arabidopsis thaliana are associated with leaf senescence and repressed by sugars." *Physiol. Plant.* 111. 345–352. (2001).
- [41] Piao, H.L. and Hwang, I. "A transgenic Arabidopsis plant overexpressing an ER localized b-glucosidase homolog that is transcriptionally suppressed by NaCl is hypersensitive to NaCl stress" (direct sequence submission to GenBank), (2000)
- [42] Maleck K, Levine A, Eulgem T, Morgan A, Schmid J, Lawton KA, Dangl JL, Dietrich RA. "The transcriptome of Arabidopsis thaliana during systemic acquired resistance." *Nat. Genet.* 26, 403-410. (2000).
- [43] Schmidt, K.P., Burrows, P.R., Davies, K.G., Kammerloher, W., Schaeffner, A.R., Buck, F., Cai, D. and Grundle, F.M.W. "A root specific myrosinase in Arabidopsis responding to cyst nematode infection (direct sequence submission to GenBank), (1995).
- [44] Sue M, Ishihara A, Iwamura H. "Purification and characterization of a hydroxamic acid glucoside β -glucosidase from wheat seedlings." *Planta* 210. 432-438, (2000).
- [45] Hsieh, M. C.; Graham, T. L. Partial purification and characterization of a soybean β -glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. *Phytochemistry*, 58, 995–1005, (2001).
- [46] Grohmann, K.; Manthey, J. A.; Cameron, R. G.; Buslig, B. S. Purification of citrus peel juice and molasses. *J. Agric. Food Chem.* 47. 4859-4867. (1999) .

- [47] Fenwick GR, Heaney RK, Mullin WJ. "Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants." *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* 18, 123-201. (1983).
- [48] Odoux, E.; Chauwin, A.; Brillouet, J. M. Purification and characterization of vanilla bean (*Vanilla planifolia* Andrews) β -glucosidase. *J. Agric. Food Chem.* 51. 3168–3173, (2003)
- [49] Lecas M, Günata YZ, Sapis JC, Bayonove C. "Purification and partial characterization of β -glucosidase from grape." *Phytochemistry*; 30. 451–454. (1991).
- [50] Hartman, S. J. and Schreier P., "Purification and partial characterization of β -glucosidase from papaya fruit" *Phytochemistry*. 451–54. 2271-2274. (1986).
- [51] Günata Z, Bitteur S, Brillouet JM, Bayonove C, Cordonnier R. "Sequential enzymatic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape." *Carbohydr Res*, 184 139–149, (1988).
- [52] Gunata, Y. Z.; Bayonove, C. L., Baumes, R. L., Cordonnier, R. E. "The aroma of grapes. I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components" *J. Chromatogr.* 331. 83-90. (1985).
- [53] Wang D, Yoshimura T, Kubota K, Kobayashi A. "Analysis of glycosidically bound aroma precursors in tea leaves. I. Qualitative and quantitative analyses of glycosides with aglycons as aroma compounds." *J Agric Food Chem* 48, 5411-5418 , (2000).
- [54] Beguin, P. "Molecular biology of cellulose degradation." *Annu. Rev. Microbiol* 44 219–248, (1990).
- [55] Persson I, Tjerneld F, Hagerdal HB, "Fungal cellulolytic enzyme production." *A review. Process Biochemistry* 26, 65-74. (1991).
- [56] Schliemann, W. "Hydolysis of conugated gibberellins by β -glucosidases from Dwarf rice". *J. Plant Physiol.* 116, 123-132. (1984).

- [57] Brzobohaty, B., I. Moore, P. Christofferson, L. Bako, N. Campos, J. Schell, and K. Palme *Science* 262. 1051-1054. (1993).
- [58] Opassiri R, Ketudat Cairns JR, Akiyama T, Wara-Aswapati O, Svasti J, Schliemann W: "Hydrolysis of conjugated gibberellins by β -glucosidases from dwarf rice (*Oryza sativa* L. cv. Tan-ginbozu)." *J Plant Physiol*, 116, 123-132. (1984).
- [59] Leah, R., Kigel J., Svendsen, I. and Mundy, J. "Biochemical and molecular characterization of a barley seed β -glucosidase." *J. Biol. Chem.* 270. 15789–15797. (1995).
- [60] Dharmawardhana, D.P., Ellis, B.E. and Carlson, J.E. A β -glucosidase from lodgepole pine specific for the lignin precursor coniferin. *Plant Physiol.* 107. 331–339, (1995).
- [61] Woodward J., Wiseman A, "Fungal and other β -D- glucosidases, their properties and applications." *Enzyme Microb. Technol.* 4. 73-93, (1982).
- [62] Opassiri R, Hua Y, Wara-Aswapati O, Akiyama T, Svasti J, Esen A, Ketudat Cairns JR " β -Glucosidase, α -glucanase and pyridoxine transglucosylase activities of rice BGlul". *Biochem J* 379, 125-131. (2004).
- [63] Gerardi C, Blando F, Santino A, Zacheo G. "Purification and characterisation of a β -glucosidase abundantly expressed in ripe sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit" *Plant Sci*, 160. 795–805, (2001)
- [64] Li, Y., Jiang CJ, Wan, XC, Zhang, X. , Li D.. "Purification and Partial Characterization of β -Glucosidase from Fresh Leaves of Tea Plants (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze)" *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 37(6), 363–370. (2005).
- [65] Hosel, W., Tober, I., Eklund, S.H. and Conn, E.E. "Characterization of β -glucosidases with high specificity for the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench seedlings." *Arch. Biochem. Biophys.* 252. 152-162. (1987).

- [66] Cameron, R. G.; Manthey, J. A.; Baker, R. A.; Grohmann, K. "Purification and characterization of a β -glucosidase from *Citrus sinensis* var. Valencia fruit tissue." *J. Agric. Food Chem.* 49, 4457-4462. (2001).
- [67] Kara, H., Sinan, S., Turan, Y., "Purification of beta-glucosidase from olive (*Olea europaea* L.) fruit tissue with specifically designed hydrophobic interaction chromatography and characterization of the purified enzyme", *Journal of Chromatography B*, 879, 1507-1512. (2011).
- [68] Acar, M., "Mandalina (*Citrus reticulata*) Meyvasından saflaştırılan β -Glukozidaz Enziminin Nanopartiküllere İmmobilizasyonu ve Meyva Suyu Aroma Arttırma etkisi", Yüksek Lisans. Balıkesir Üniversitesi Fenbilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilimdalı, Balıkesir, (2013).
- [69] Cicek, M., Blanchard, DR, Bevan Esen A. "The aglikon spesificity determining sites are in dhurrinese." *J. Biol Chem* 275, 20002-20011. (2000).
- [70] Romero-Segura, C., Sanz C, Perez AG "Purification and characterization of an olive fruit β -glucosidase involved in the biosynthesis of virgin olive oil fphenolics" *J. Agric. Chem* 57. 7983-7988, (2009).
- [71] Beutler B, Grabowski BA, "The metabolic bases of inherited diseases" (eds.II. Scriver, CR., et all P. McGraw-Hill), New York: 2641-2670. (1995).
- [72] Bautler E, "Gaucher disease: new molecular approaches to diagnosis and treatment." *Science* 256, 794-798, (1992).
- [73] Riou, C., Salmon, j. M., Vallier, M. J., Gunata, Z. and Barre, N., "Purification, Characterization and Substrate Specificity of a Novel Highly Glucose-Tolerant β -Glucosidase from *Aspergillus oryzae*", *Applied and Environmental Microbiology*, 3607-3614. (1998).
- [74] Parry, NJ., Beever, DE., Owen, E., Vandenberghe, I., Beeumen, JV. "Biochemical characterization and mechanism of a thermostable β -glucosidase purified from *Thermoascus auranticus*" *Biochem J.*, 353, 117-127. (2001).

- [75] Lowry O.H., Rosebrough, R.J., Farr, A.L., Randall, R.J. “Protein measurement with the folin phenol reagent” *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275. (1951).
- [76] Sinan, S., Kockar, F., Arslan, O. “Novel purification strategy for human PON1 and inhibition of the activity by cephalosporin and aminoglikozide derived antibiotics” *Biochimie* 88, 565–574. (2006).
- [77] Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature* 227. 680-685, (1970).
- [78] Lineweaver, H., Burk, D., “The determination of enzyme dissociation constants” *Journal American Chemical Society*. 56, 658-666, (1934).
- [79] Yu, H. L., Xu, J. H., Lu, W. Y. And Lin, G. L., “Identification, purification and characterization of β -glucosidase from apple seed as a novel catalyst for synthesis of O-glucosides”, *Enzyme and Microbial Technology*, 40. 354-361. (2007).
- [80] Robyt, JF., White, BJ., *Biochemical Techniques Theory and Practice*, Waveland Pres, Inc: 98, (1990).
- [81] Aguiar, J.A.K. and Michelacci, Y.M. “Preparation and purification of *Flavobacterium heparinum* chondroitinases AC and B by hydrophobic interaction chromatography”. *Braz J Med Biol Res*, 32(5) 545-550. (1999).
- [82] Pond, AL., Chambers, HW., Coyne, CP., Chambers, JE., “Purification of two rat hepatic proteins with A-esteraseactivity toward chlorpyrifos-oxon and paraoxon” *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 286(3), 1404-1411. (1998).
- [83] Marquez, O. and Waliszewski K. N., “The effect of thermal treatment on β -glucosidase inactivation in vanilla bean (*Vanilla planifolia* Andrews)”, *Int. J. of Food Sci. and Technol.*, 43, 1993-1999, (2008).

- [84] Chen, L., Li, N. and Zong M. H., “A glucose-tolerant β -glucosidase from *Prunus domestica* seeds: Purification and characterization”, *Process Biochemistry*, 47. 127-132. (2012).
- [85] “Malatya’yla özdeşleşen, altın meyvesi kayısı” [online], (16 Mayıs 2012), www.blog.milliyet.com.tr/malatya-yla-ozdeslesen--altin-meyvesi-kayisi-/Blog