

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

**β -GLUKOZİDAZ ENZİMİNİN HİDROFOBİK ETKİLEŞİM
KROMATOGRAFİSİ İLE *Olea europea* MEYVESİNDEN
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU İLE BAZI PESTİSİT ve
AĞIR METALLERE KARŞI AFİNİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Hatibe KARA

Balıkesir, Ağustos-2010

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

**β -GLUKOZİDAZ ENZİMİNİN HİDROFOBİK ETKİLEŞİM
KROMATOĞRAFİSİ İLE *Olea europea* MEYVESİNDEN
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU İLE BAZI
PESTİSİT ve AĞIR METALLERE KARŞI AFİNİTESİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Hatibe KARA

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Selma SİNAN

Sınav Tarihi: 02.08.2010

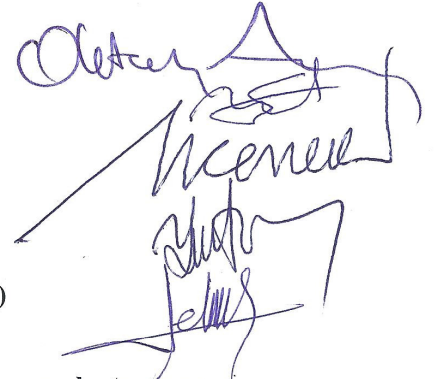
Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Oktay ARSLAN (BAÜ)

Doç. Dr. Kamil SEYREK (BAÜ)

Doç. Dr. Mustafa CEMEK (AKÜ)

Doç. Dr. Yusuf TURAN (BAÜ)

Doç. Dr. Selma SİNAN (Danışman-BAÜ)



Enstitü Yönetim Kurulunun tarih sayılı oturumunun
nolu kararı ile Mezun olmuştur.

Balıkesir, Ağustos-2010

ÖZET

β -GLUKOZİDAZ ENZİMİNİN HİDROFOBİK ETKİLEŞİM KROMATOĞRAFİSİ İLE *Olea europea* MEYVESİNDEN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU İLE BAZI PESTİSİT ve AĞIR METALLERE KARŞI AFİNİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

Hatibe KARA

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

**(Doktora Tezi /Tez Danışmanı: Doç. Dr. Selma SİNAN)
Balıkesir, 2010**

Bu çalışmada, önemli fonksiyonlarda görev alan β -glukosidaz enzimi, zeytin meyvesinden yeni bir yöntemle saflaştırılmıştır. Saflaştırma işleminde önce amonyum sülfat çöktürmesi ardından hidrofobik etkileşim kromatografisi metodları kullanılmıştır. Çalışmamızda zeytin β -glukosidaz enzimi %54.9 verimle 154.8 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan zeytin beta-glukosidaz enziminin SDS poliakrilamid jel elektroforezinde yaklaşık 65kDa molekül ağırlığında tek bant şeklinde görüntülenmiştir. Zeytin beta-glukosidaz enziminin substrat spesifikliği *p*NPG, *o*NPG, *p*NPGal ve *o*NPGal substratları kullanılarak belirlenmiştir. Söz konusu enzimin K_M değeri 2.22 mM, ve V_{max} değeri 370.37 EU olmak üzere *p*NPG substratına diğerlerine göre ilgisinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Beta-glukosidaz enzimlerinin genel inhibitörlerinden glukoz ve δ -glukonolaktunun, saflaştırılmış zeytin beta-glukosidaz enzimi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Her iki bileşiğin enzim aktivitesi üzerinde kompetitif inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca zeytin tarımında yaygın kullanılan diazinon, deltamethrin ve glyphosat pestisitlerinin saflaştırılmış zeytin beta-glukosidaz enzimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu pestisitlerden Glyphosatın enzim aktivitesini arttırdığı ve diazinon ile deltamethrinin de enzimi kompetitif olarak inhibe ettiği tespit edilmiştir. Doğada sık karşılaşılan ağır metallere Ag, Fe, Ni, Cd, Cu ve Pb'nun saflaştırılmış zeytin β -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine in vitro etkileri araştırılmıştır. Bu ağır metallere Fe'in enzim aktivitesi üzerinde aktivasyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. Ancak Cu, Ag, Ni, Cd ve Pb ağır metallerinin ise enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmamızda inhibisyon etkisi gösteren ağır metallerin inhibisyon etki mekanizmaları da belirlenmiştir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: β -glukosidaz, hidrofobik etkileşim kromatografisi, *para*-nitrofenil β -D-glikopiranosid (*p*NPG), pestisit.

ABSTRACT

THE PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF B-GLUCOSIDASE ENZYME FROM *Olea europea* WITH HYDROPHOBIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY AND THE INVESTIGATION ON AFFINITIES OF SOME PESTICIDES AND HEAVY METALS TO THE ENZYME

HATIBE KARA

Balikesir University, Institute of Science, Department of Biology

(PhD. Thesis / Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Selma SINAN)

Balikesir, Turkey, 2010

In this study, β -glucosidase enzyme which play important roles was purified from olive fruit by means a new method. In purification process firstly the ammonium sulfate precipitation, secondly hydrophobic interactions chromatography method were used. In our study, olive β -glucosidase enzyme was purified 154.8 fold with 54.9% yields. The purified olive beta-glucosidase enzyme, was observed as a single band as approximately 65kDa molecular weight with SDS polyacrylamide gel elektrophoresis. The specificity of olive beta-glucosidase enzyme was determined used *p*NPG, *o*NPG, *p*NPGal and *o*NPGal substrates. It was determined that the enzyme had more affinity to *p*NPG substrate with Km value of 2.22mM and Vmax value of 370 EU.

The effects of general inhibitors of β -glucosidase enzme which are glucose and δ -glukolakton, were investigated on olive β -glucosidase enzyme. It was determined that both compound have competitive inhibition effect on purified enzyme activity. In addition, the effects of diazinon, deltamethrin and glyphosate pesticides which are commonly used in olive agriculture were investigated on olive beta-glucosidase. It was determined that from this pesticides glyphosate increased enzyme activity and diazinon and deltametrin inhibited the activity by means of competitive inhibition. The effects of Ag, Fe, Ni, Cd, Cu and Pb which are commonly seen heavy metals in the nature on purified beta-glucosidase enzyme was investigated in vitro. It was determined that from this heavy metals Fe has affected as activation on ezyme activity. However, it was determined that the other heavy metals Ag, Ni, Cd, Cu and Pb have inhbition effects on enzyme activity.

KEY WORDS: β -glucosidase, hydrophobic interactions chromatography, *para*-nitrophenyl β -D-glucopyranoside (*p*NPG), pesticide.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER	ii
ABSTRACT, KEY WORDS	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SEMBOL LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	x
ÇİZELGE LİSTESİ	xiii
ÖNSÖZ	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1 Beta-glukosidaz Enziminin Biyokimyası	3
1.1.1 Adlandırılması	3
1.1.2 Beta-glukosidaz Enziminin Özellikleri ve İnce Yapısı	4
1.1.3 Enzimin İzoenzimleri	6
1.1.4 Enzimin Katalizleme Mekanizması	6
1.1.5 Katalizlediği Reaksiyonlar ve Substratları	10
1.2 Enzimin Saflaştırılması	11
1.3 Beta-glukosidaz Enziminin Önemi	12
1.3.1 Savunma	13
1.3.2 Besin Kalitesinin Artışı	14

1.3.3	Biyokütle Değişikliği	15
1.3.4	Lignin Biosentezi	16
1.3.5	Büyüme ve Gelişme	16
1.3.6	Antikanserojen Etki	16
1.4	Enzim Aktivitesi Üzerine İnvitro Etkisi Araş Pestisitler	17
1.4.1	Deltamethrin (S)- α -cyano-3-phenoxybenzyl (1R,3R)-3-(2,2-dibromovinyl) = 2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate (Deltamethrin)	17
1.4.2	Diazinon O,O-diethyl O-2-isoprpyl-6-methylpyrimidin-4-yl phosphorothioate (Diazinon)	18
1.4.3	N-(fosfometil)glisin	19
1.5	Ağır Metaller	20
2.	MATERYAL VE YÖNTEMLER	22
2.1	Materyaller	22
2.1.1	Kullanılan Kimyasal Maddeler	22
2.1.2	Kullanılan Alet ve Cihazlar	22
2.1.3	Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları	23
2.2.	Yöntemler	27
2.2.1	Aseton Tozu (Aceton Powder)nun Hazırlanması	27
2.2.2	Enzim Ekstraktının Hazırlanması	27
2.2.3	Enzim Aktivite Tayini	27
2.2.4	LowryYöntemiyle Kantitatif Protein Tayini	28
2.2.5	Enzimin Saflaştırılması	29
2.2.5.1	Amonyum sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi	29
2.2.5.2	Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması	31
2.2.5.3	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) İle Enzim Saflığının Kontrolü	32

2.2.6 Enzimin Farklı Substratlara Karşı K_M ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi	34
2.2.7 İnhibitörler İçin I_{50} Değerlerini Bulunması	34
2.2.8 İnhibitörler İçin K_i değerlerinin Bulunması	34
3. BULGULAR	36
3.1 Protein Miktar Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri	36
3.2 Enzimin Saflaştırılması	37
3.2.1 Amonyum sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi	37
3.2.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması	38
3.2.3 Zeytin Beta-glukosidaz Enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi	42
3.3 Farklı Substratların K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması	43
3.3.1 <i>p</i> -NPG Substratının K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması	43
3.3.2 <i>o</i> -NPG Substratının K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması	45
3.3.3 <i>p</i> -NPGal Substratının K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması	47
3.3.4 <i>o</i> -NPGal Substratının K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması	49
3.4 Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren Maddelerin IC_{50} Değerlerinin Bulunması	51
3.4.1 β -glukosidazların Genel İnhibitörlerinin IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi	51
3.4.1.1 β -glukosidazların Genel İnhibitörü Olan δ -glukonolaktonun IC_{50} Değerinin Belirlenmesi	51
3.4.1.2 β -glukosidazların Genel İnhibitörü Olan Glukozun IC_{50} Değerinin Belirlenmesi	53
3.4.2 Enzim Aktivitesi Üzerine Etkili Bazı Pestisitlerin IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi	55
3.4.2.1 Herbisit Olan Glyphosate Pestisitinin IC_{50} Değerinin Belirlenmesi	55

3.4.2.1 İnsektisit Olan Diazinon ve Deltamethrin Pestisitlerinin IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi	57
3.4.3 Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi Araştırılan Bazı Ağır Metallerin IC ₅₀ Değerlerinin Bulunması	62
3.5. Enzim İnhibisyonuna Sebep Olan Maddelerin İnhibisyon Tiplerinin ve K _i Değerlerinin Bulunması	72
3.5.1 β-glukosidazların Genel İnhibiörü Olan Maddelerin İnhibisyon Tipinin ve K _i Değerinin Belirlenmesi	72
3.5.1 β-glukosidazların Genel İnhibiörü Olan δ-glukonolaktonun İnhibisyon Tipinin ve K _i Değerinin Belirlenmesi	72
3.5.2 β-glukosidazların Genel İnhibiörü Olan Glukozun İnhibisyon Tipinin ve K _i Değerinin Belirlenmesi	75
3.5.2 Enzim Aktivitesi Üzerine Etkili Bazı Pestisitlerin İnhibisyon Tiplerinin ve K _i Değerlerinin Belirlenmesi	77
3.5.2.1 Deltamethrin Pestisitinin İnhibisyon Tipinin ve K _i Değerinin Bulunması	77
3.5.2.2 Diazinon Pestisitinin İnhibisyon Tipinin ve K _i Değerinin Bulunması	79
3.5.3 Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi Araştırılan Bazı Ağır Metallerin İnhibisyon Tiplerinin ve K _i Değerlerinin Bulunması	81
3.5.3.1 Cu Ağır Metalinin İnhibisyon Tipinin ve K _i Değerinin Bulunması	81
3.5.3.2 Ni Ağır Metalinin İnhibisyon Tipinin ve K _i Değerinin Bulunması	83
3.5.3.3 Ag Ağır Metalinin İnhibisyon Tipinin ve K _i Değerinin Bulunması	85
3.5.3.4 Pb Ağır Metalinin İnhibisyon Tipinin ve K _i Değerinin Bulunması	87
3.5.3.5 Cd Ağır Metalinin İnhibisyon Tipinin ve K _i Değerinin Bulunması	89
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	93
5. KAYNAKLAR	107

SEMBOL LİSTESİ

Simge	Adı
<i>p</i> NPG	para-nitrofenol β -D-glikopiranosid
<i>o</i> NPG	orto-nitrofenol β -D-glikopiranosid
<i>p</i> NPGal	para-nitrofenol β -D-glalaktopiranosid
<i>o</i> NPGal	orto-nitrofenol β -D-glalaktopiranosid
SDS	Sodyum dodesil sülfat
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
Tris	Tris (hidroksimetil) aminometan
TEMED	N,N,N', N', -tetrametiletildiamin
APS	Amonyum persülfat
BSA	Bovin serum albumin (Sığır Serum Albumini)
DTT	Ditiyotreitol
EDTA	Etilendiamin tetraasetikasit
PMSF	Fenilmetilsülfonilflorid
[S]	Substrat konsantrasyonu
K_m	Michaelis-Menten sabiti
V_{max}	Maksimum Hız
mM	Milimolar
μ M	Mikromolar

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil Numarası	Adı	Sayfa
Şekil 1.1	Zeytin meyvesi	2
Şekil 1.2	Pirinç beta-glukosidazı	4
Şekil 1.3	Mısır β -glukosidaz Glu1 izoenzimi monomerinin 3D	5
Şekil 1.4	Mısır beta-glukosidaz izoenzim ZMGlu1'in katlanma yapısı ve ligand molekülleri	7
Şekil 1.5	Enzimin katalizleme mekanizması	9
Şekil 1.6	β -glukosidazların doğal substratlarından bazıları	10
Şekil 1.7	Enzimin yapay substratlarından bazıları	11
Şekil 1.8	Deltamethrinin yapısı	18
Şekil 1.9	Diazinonun yapısı	19
Şekil 1.10	N-(fosfometil)glisinin yapısı	20
Şekil 2.1	Hidrofobik etkileşim kromatografisinde kullanılan hidrofobik jel	32
Şekil 3.1	Lowry yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik	36
Şekil 3.2	Amonyum sülfat çöktürme aralığının tespitinde kullanılan grafik	38
Şekil 3.3	Hidrofobik etkileşim kromatografisi kolonundan zeytin β -glukosidaz enziminin elüsyon grafiği	40
Şekil 3.4	Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan zeytin beta-glukosidaz enziminin SDS-polakrilamid jel elektroforezi.	42

Şekil 3.5	p-NPG Substratının K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasında kullanılan Lineweaver-Burk grafiği	43
Şekil 3.6	o-NPG Substratının K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasında kullanılan Lineweaver-Burk grafiği	45
Şekil 3.7	p-NPGal Substratının K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasında kullanılan Lineweaver-Burk grafiği	47
Şekil 3.8	o-NPGal Substratının K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasında kullanılan Lineweaver-Burk grafiği	49
Şekil 3.9	Saflaştırılmış zeytin beta-glukosidaz enzimi üzerine 1,36 mM p-NPG substratı konsantrasyonunda δ -glukonolaktonun % aktivite-[I] grafiği	53
Şekil 3.10	Saflaştırılmış zeytin beta-glukosidaz enzimi üzerine 2.85 mM p-NPG substratı konsantrasyonunda glukozun % aktivite-[I] grafiği	55
Şekil 3.11	Saflaştırılmış zeytin beta-glukosidaz enzimi üzerine 1,43 mM pNPGlu substratı konsantrasyonunda glyphosate pestisitinin % aktivite-[I] grafiği	57
Şekil 3.12	DMSO'in zeytin β -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi gösteren Aktivite- %DMSO grafiği	58
Şekil 3.13	Saflaştırılmış zeytin beta-glukosidaz enzimi üzerine 1,43 mM pNPGlu substratı konsantrasyonunda diazinon pestisitinin % aktivite-[I] grafiği	60
Şekil 3.14	Saflaştırılmış zeytin beta-glukosidaz enzimi üzerine 1,43 mM pNPGlu substratı konsantrasyonunda delthamethrin pestisitinin % aktivite-[I] grafiği	61
Şekil 3.15	Saflaştırılmış zeytin beta-glukosidaz enzimi üzerine 1,36 mM pNPGlu substratı konsantrasyonunda Cu ağır metalinin % aktivite-[I] grafiği	64
Şekil 3.16	Saflaştırılmış zeytin beta-glukosidaz enzimi üzerine 1,36 mM pNPGlu substratı konsantrasyonunda Ni ağır metalinin % aktivite-[I] grafiği	65
Şekil 3.17	Saflaştırılmış zeytin beta-glukosidaz enzimi üzerine 1,36 mM pNPGlu substratı konsantrasyonunda Ag ağır metalinin % aktivite-[I] grafiği	67
Şekil 3.18	Saflaştırılmış zeytin beta-glukosidaz enzimi üzerine 1,36 mM pNPGlu substratı konsantrasyonunda Pb ağır metalinin % aktivite-[I] grafiği	68

Şekil 3.19	Saflaştırılmış zeytin beta-glukosidaz enzimi üzerine 1,36 mM pNPGlu substratı konsantrasyonunda Cd ağır metalinin % aktivite-[I] grafiği	70
Şekil 3.20	Saflaştırılmış zeytin beta-glukosidaz enzimi üzerine 1,43 mM pNPGlu substratı konsantrasyonunda Fe ağır metalinin % aktivite-[I] grafiği	71
Şekil 3.21	Zeytin Beta-glukosidaz enziminin pNPGlu substratı varlığındaki δ -glukonolakton inhibitörünün inhibisyon etkisinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği	74
Şekil 3.22	Zeytin Beta-glukosidaz enziminin pNPGlu substratı varlığındaki glukozun inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği	75
Şekil 3.23	Deltamethrin pestisitinin zeytin beta-glukosidaz enziminin pNPGlu substratı varlığındaki inhibisyon etkisinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği	77
Şekil 3.24	Diazinon pestisitinin zeytin Beta-glukosidaz enziminin pNPG substrat aktivitesi üzerindeki inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği	79
Şekil 3.25	Cu ağır metalinin zeytin Beta-glukosidaz enziminin pNPGlu substrat aktivitesi üzerindeki inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği	83
Şekil 3.26	Ni ağır metalinin zeytin Beta-glukosidaz enziminin pNPGlu substrat aktivitesi üzerindeki inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği	85
Şekil 3.27	Ag ağır metalinin zeytin Beta-glukosidaz enziminin pNPGlu substrat aktivitesi üzerindeki inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği	87
Şekil 3.28	Pb ağır metalinin zeytin β -glukosidaz enziminin pNPG substrat aktivitesi üzerindeki inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği	89
Şekil 3.29	Cd ağır metalinin zeytin Beta-glukosidaz enziminin pNPGlu substrat aktivitesi üzerindeki inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği	91

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge Numarası	Adı	Sayfa
Çizelge 1.1	Endüstri gruplarından atılan metal türlerinin dağılımı	21
Çizelge 2.1	SDS-PAGE’de kullanılan jel karışımlarının miktarları.	26
Çizelge 2.2	Amonyum sülfat çöktürme aralıklarının enzim aktiviteleri bulunurken kullanılan reaksiyon hacimleri	31
Çizelge 3.1	Amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesinde kullanılan çözelti hacimleri, kullanılan tuz miktarı ve tespit edilen değerler	37
Çizelge 3.2	Saflaştırma tablosu	41
Çizelge 3.3	Zeytin Beta-glukosidaz enziminin pNPG substratı kullanılarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri	44
Çizelge 3.4	Zeytin Beta-glukosidaz enziminin <i>o</i> -NPG substratı kullanılarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri	46
Çizelge 3.5	Zeytin Beta-glukosidaz enziminin <i>p</i> -NPGal substratı kullanılarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri	48
Çizelge 3.6	Zeytin Beta-glukosidaz enziminin <i>o</i> -NPGal substratı kullanılarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri	50
Çizelge 3.7	Zeytin Beta-glukosidaz enziminin farklı substratlara karşı K_m , V_{max} ve V_{max}/K_m değerleri	51

Çizelge 3.8	Zeytin beta glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren δ -glukonolakton maddesinin IC ₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar	52
Çizelge 3.9	Zeytin beta glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren glukozun IC ₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar	54
Çizelge 3.10	Zeytin beta glukosidaz enzimi üzerinde aktivite artışı gösteren glyphosate pestisitinin enzim aktivitesinde meydana getirdiği değişikliklerin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar	56
Çizelge 3.11	DMSO'in zeytin β -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	58
Çizelge 3.12	Zeytin beta glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Diazinon ve Delthamethrin pestisitlerinin IC ₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar	59
Çizelge 3.13	Zeytin β -glukosidaz enzimi üzerine araştırılan pestisitlerin etkileri	62
Çizelge 3.14	Zeytin beta glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Cu ve Ni ağır metallerinin IC ₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçları	63
Çizelge 3.15	Zeytin beta glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Ag ve Pb ağır metallerinin IC ₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar	66
Çizelge 3.16	Zeytin beta glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Cd ve Fe ağır metallerinin IC ₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar	69

Çizelge 3.17	İnhibisyon etkisi gösteren ağır metallerin IC ₅₀ değerleri	71
Çizelge 3.18	Zeytin beta-glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren δ-glukonolaktonun K _i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	73
Çizelge 3.19	Zeytin β-glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren glukozun K _i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	76
Çizelge 3.20	Zeytin beta-glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren deltamethrin pestisitinin K _i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, pestisit konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	78
Çizelge 3.21	Zeytin beta-glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren diazinon pestisitinin K _i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, pestisit konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	80
Çizelge 3.22	Enzim aktivitesi üzerine etkili bazı pestisitlerin inhibisyon tipleri ve K _i değerleri	81
Çizelge 3.23	Zeytin beta-glukosidaz enzimi üzerine Cu ağır metalinin K _i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, ağır metal konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	82
Çizelge 3.24	Zeytin beta-glukosidaz enzimi üzerine Ni ağır metalinin K _i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, ağır metal konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	84
Çizelge 3.25	Zeytin beta-glukosidaz enzimi üzerine Ag ağır metalinin K _i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, ağır metal konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	86
Çizelge 3.26	Zeytin beta-glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Pb ağır metalinin K _i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, Pb konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	88

Çizelge 3.27	Zeytin beta-glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Cd ağır metalinin K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, Cd konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	90
Çizelge 3.28	Zeytin beta-glukosidaz enzimi için pNPG substrat varlığında %50 inhibisyona sebep olan ağır metallerin Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan inhibisyon tipleri ve K_i değerleri.	92

ÖNSÖZ

Çalışmam süresince bilgi ve tecrübelerini esirgmeden aktaran, üzerimde büyük emeği olan, maddi manevi destekçim, danışman hocam Doç. Dr. Selma SİNAN'a minnettarım.

Doktora çalışmalarına birlikte başladığımız, deneysel çalışmalarımı aktarmış olduğu bilgi ve tecrübeleriyle yönlendirdiğim sayın hocam Doç. Dr. Yusuf TURAN'a en içten dileklerle teşekkür ederim.

Tezimin deneysel aşamasında engin bilgilerinden faydalandığım ve çalışmalarım süresince beni hep destekleyen hocalarım Prof. Dr. Oktay ARSLAN ve Doç. Dr. Kamil SEYREK'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

En sıkıntılı dönemlerde bile bana benden daha çok güvenen annem, babam, ve kardeşlerime sonsuz teşekkürler.

Kendilerine ait olan zamanlarımı yine bana fedakarca veren, beni hep sabırla destekleyen sevgili eşim İbrahim KARA'ya ve biricik oğlum Furkan'ıma sonsuz teşekkürler...

Balıkesir, 2010

Hatibe KARA

1. GİRİŞ

Biyosferdeki önemli organik moleküllerden birisi karbohidratlardır. Karbohidratlar, basit şekerler (glukoz, riboz, galaktoz gibi), oligosakkaritler (sukroz, sellobioz, laktoz gibi), polisakkaritler (seluloz, nişasta, glikojen) ve bir aglikon ile bağlanmış O-, N-, S-glikozit türevlerinden oluşmaktadır. Bu moleküller tüm canlı organizmalarda yapı, metabolizma, savunma gibi pek çok önemli işlevde yer almaktadır. Bu fonksiyonların gerçekleşmesi sırasında karbohidratların sentezi ve yıkımı söz konusudur [1]. Karbohidratların sentez ve yıkım reaksiyonlarında ise pek çok enzim görev yapar. Bu enzimlerden birisi de β -glukosidazlardır. β -glukosidaz enzimlerinin, karbohidratlardaki $\beta 1 \rightarrow 4$ glikozit bağlarını hidroliz ederek birçok biyolojik işlevde anahtar rol oynadıkları tespit edilmiştir [2]. Örneğin bazı bitkilerde, enfeksiyon anında konakçı glikosidaz enzimler, glikozitleri toksik aglikonlara dönüştürerek patojenlerin yayılmasını önleyebilir. Bu şekilde konukçu glikosidazları hastalığa dayanıklılıkta önemli bir işleve sahip olmuş olur [3]. Ayrıca bitkilerde tat ve lezzet oluşumunda etkili birkaç yüz β -glukozidik ürün teşhis edilmiştir. Ancak bu ürünlerin ortaya çıkmaları için β -glukozidaz enzimlerinin hidrolizlemesine ihtiyaç vardır. Bu enzimlerin aydınlatılması, meyve suyu ve şarap üretiminde değerlendirilebilir. Üretim sırasında veya sonrasında eklendiğinde ürünlerin tad, lezzet, aroma ve diğer kalite faktörlerinde artış gözlenir [4]. Bu sebeple özellikle tarım ve ormancılık alanlarında ve biyoteknolojik çalışmalarda β -glukosidaz enzimleri bilimsel araştırmaların hedefi olmaktadır [2]. Literatürde bitki β -glukosidaz enzimleriyle ilgili pek çok çalışmaya rastlanmaktadır.

Bu çalışmada, besin ve ekonomik değeri yüksek bir bitki olan zeytinde β -glukosidaz enzimlerinin varlığı ve özellikleri çalışılmıştır. Zeytin (*Olea europaea*), [zeytingiller](#) (Oleaceae) familyasından olup [meyvesi](#) yenen ve yağı çıkarılan, [Akdeniz](#) ve Marmara iklimine özgü bir [ağaç türü](#)dür. Ülkemizde tarımı yapılan önemli ürünler arasında yer alır. Öyle ki Türkiye, dünya geneline bakıldığında da zeytin üretimi açısından dördüncü sırada yer almaktadır [5]. Zeytin, besleyici

değeri çok yüksek olmakla birlikte sağlıklı beslenme açısından da önemli bir yere sahiptir. Zeytinyağı özellikle kalp hastalığı riskini azaltıcı, iyi huylu kolestrolü (HDL) yükseltici, kötü huylu kolestrolü (LDL) düşürücü ve bazı kanser türlerine karşı koruyucu etkisinden dolayı, uluslararası tıp bilim otoritelerince işlevselliği yüksek bir gıda olarak kabul edilmektedir [6].



Şekil 1.1 Zeytin meyvesi

Bu çalışmada zeytin meyvesinden toplam β -Glukozidaz enzimlerinin biyokimyasal yöntemlerle saflaştırılması ve kinetik özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için aşağıdaki çalışmalar yapılmıştır.

- Zeytin meyvesinden aseton tozu hazırlanması ve bunun üzerinden ham ekstraktın hazırlanması.
- Ham ekstrakta amonyum sülfat çöktürmesi yapılarak kısmi saflaştırmanın yapılması.
- Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile zeytin meyvesi β -Glukozidaz enziminin saflaştırılması.
- SDS-PAGE elektroforezi ile saflığının kontrolü.
- Enzimin farklı substratlara (*p*NPG, *o*NPG, *p*NPGal, *o*NPGal) karşı kinetik özelliklerinin (K_M ve V_{max}) araştırılması.
- Enzimin literatürde geçen inhibitör maddelere karşı aktivitesinin incelenmesi.

- Zeytincilikte sık kullanılan pestisitlerin enzim aktivitesi üzerine etkisinin araştırılması ve inhibe eden maddelerin inhibisyon mekanizmasının belirlenmesi.
- Bazı ağır metallerin enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi.

1.1. Beta-Glukozidaz Enziminin Biyokimyası

1.1.1. Adlandırılması

Beta 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 [7]. Glikozid hidrolazlar Henrissat tarafından 95 enzim ailesi olarak sınıflandırılmıştır [8,9]. Bu enzim grubunda yer alanlardan O- ve S-glikozil bileşiklerini hidroliz edenler de EC.3.2.1. alt alt sınıfında bulunmaktadır [10-12].

EC.3. Hidrolazlar

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

EC.3.2.1. O- ve S-glikozil bileşiklerini hidroliz edenler [8,9]

EC.3.2.1.21 β -glukosidazlar (1,4- β -glukosidaz) [13]

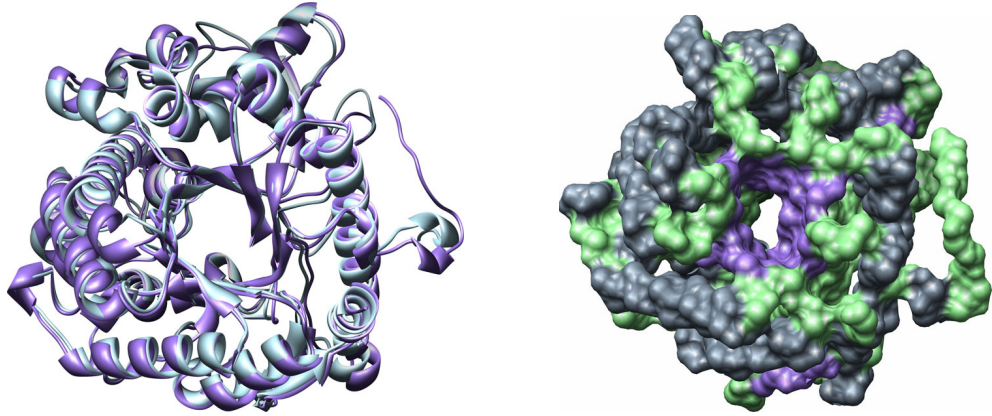
EC.3.2.2. N-glikozil bileşiklerini hidroliz edenler

EC.3.2.3. S-glikozil bileşiklerini hidroliz edenler[8,9]

Sistemik adı β -D-glukozid glukohidrolaz, EC.3.2.1.21 olan β -Glukozidazlar, iki glikon rezidüsü arasındaki ya da glikoz ve bir aril veya alkil olan aglikon rezidüleri arasındaki β -glikozidik bağı hidroliz eden enzimlerdir [14]. Ökaryot, Arkea ve bakterilerde bulunan Glikozid Hidrolaz (GH) Aile1 enzimleri G-O-X ya da G-S-X tipindeki substratları hidroliz etmektedirler. Burada G β -bağlı glukozil, galaktozil, mannozil, fukoil, 6-fosfoglukozil yada 6-fosfogalaktozil rezidüsünü, X ise diğer glikozil rezidüsünü yada aglikonu temsil eder [15].

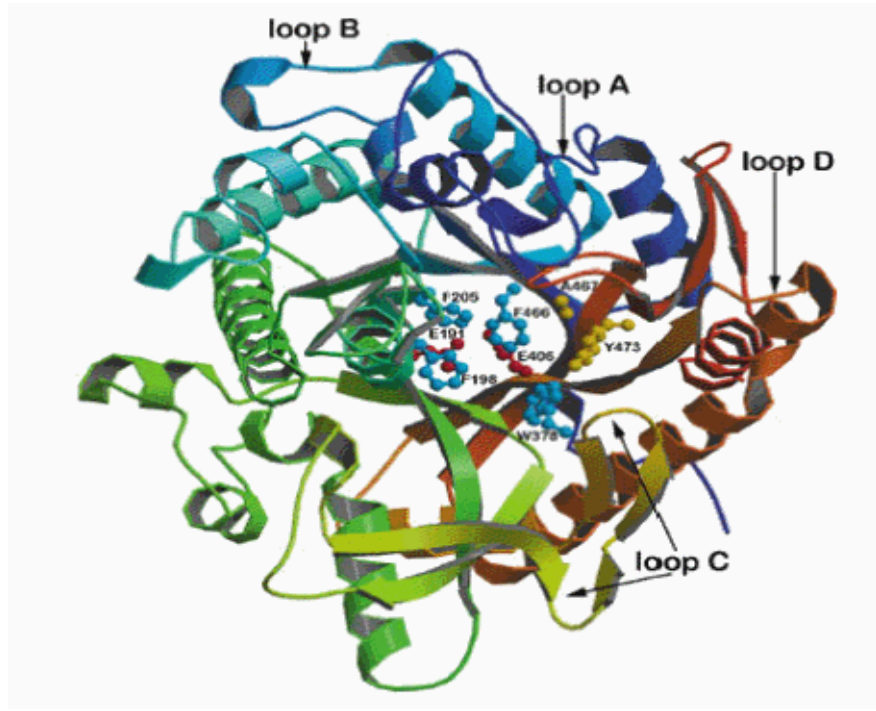
1.1.2. Beta-Glukozidaz Enziminin Özellikleri ve Yapısı

Literatürde incelenen Aile1 β -Glukozidaz enzimlerinin monomerleri SDS-PAGE'de 55-65 kDa aralığında tespit edilmiştir. Belirlenen bu monomerlerin polipeptid uzunlukları 447 aminoasitten (*Bacillus polymixia*'da olduğu gibi) 527 aminoasite (Beyaz hardal mirosinazı) kadar değişebilmektedir. Eubakteria ve arkebakterilerdeki enzimlerin polipeptid zincirlerinin daha kısa olması beklenirken ökaryotlardaki enzimlerin polipeptid zincirlerinin daha uzun olması beklenir. Dikotil bitkilerden ve hayvanlardan saflaştırılan tüm β -Glukozidazlarda hesaplanan monomerlerin molekül büyüklüklerinin, cDNA ya da genomik DNA'dan hesaplanan molekül büyüklüklerine göre 3-5 kDa daha uzun olduğu tespit edilmiştir[2].



Şekil 1.2 Pirinç beta-glukozidazı

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 [16-19]. Şekil 1.3'de aktif merkezdeki motifler görülmektedir.



Şekil 1.3 Mısır β -glukosidaz Glu1 izoenzimi monomerinin 3D yapısı

Proteinlerin yapısında bulunan β dizimleri bir fiçî oluşturacak şekilde düzenlenerek, bir seri β - α - β halkası (β - α - β loop), özellikle kararlı ve yaygın bir motif olan α/β fiçîsî olarak isimlendirilen bir yapı oluştururlar. Bu yapıda her paralel β kısım, komşusu olan β kısma α helikal bir parça ile bağlanır. α/β fiçî motifi birçok enzimde bulunur ve çoğunlukla fiçî motifinin bir ucunda, cebe benzeyen, kofaktör ya da substratın bağlandığı bölge yer alır [20]. 4 farklı bitkiden elde edilmiş 10 Glikozid Hidrolaz Aile 1 enziminin 3 boyutlu (3D) yapısı aydınlatıldığında bu 10 enzimin aktif bölgesinde aynı (β/α)₈-fiçîsî olduğu gösterilmiştir (Şekil 1.3). Bu çalışmalarda söz konusu enzimlerin dizi benzerliğinin %17-70 olduğu belirlenmiştir [21-24].

β -glukosidazlarla yapılan çalışmalarda enzimin pH 4-10 ve sıcaklık 0-4⁰C olduğu değerlerde stabil olduğu tespit edilmiştir. En yüksek stabilitenin ise ~pH 7 civarında olduğu bulunmuştur [2].

Sıcaklıkla ilgili yapılan stabilite çalışmalarında da β -glukosidazların 55-60⁰C'nin üzerinde geri dönüşsüz olarak inaktive oldukları bulunmuş ve bazı

çalışmalar neticesinde de 50-55⁰C'lerde en yüksek aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir [2].

1.1.3 Enzimin İzoenzimleri

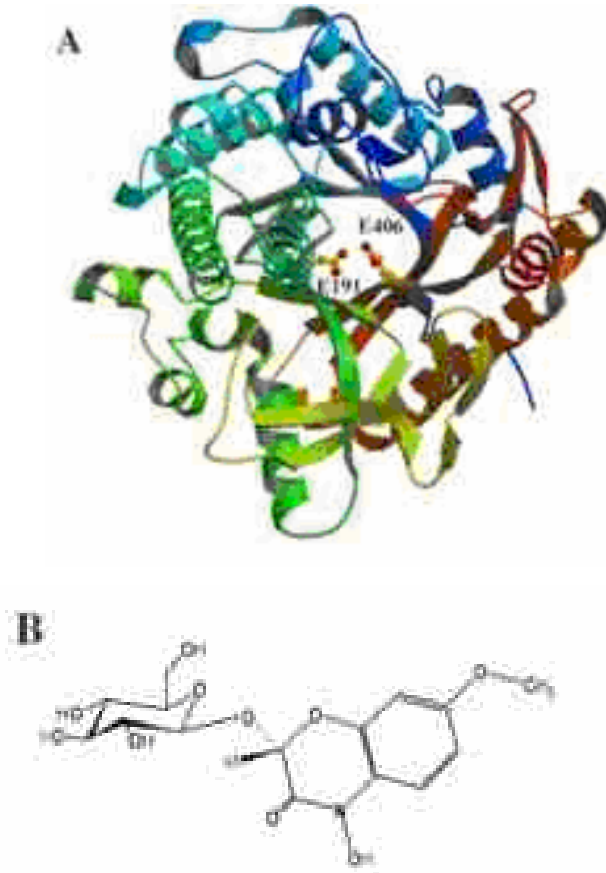
β - glukosidazların, farklı canlılarda izoenzimlerinin olduğu belirtilmektedir. Mısırdaki Glu1 ve Glu2 olmak üzere iki izoenzimi mevcuttur. Mısır izoenzimleri klonlanarak substrat spesifikliğı ve fizyolojik fonksiyonları belirlenmiştir [25]. Glu1 izoenziminin karakteristik özellikleri de Esen tarafından ortaya koyulmuştur [26]. Söz konusu enzimin monomerinin 60kDa büyüklüğünde, optimum pH değerinin 5.8 ve optimum sıcaklık değerinin de 50⁰C olduğu belirtilmiştir. Söz konusu enzimin substrat spesifikliğı Babcock ve Esen'in çalışmalarında verilmiştir [27].

Hosel ve ark. süpürge darısı tohumlarından Dhurrinaz1 (Dhr1) ve Dhurrinaz2 (Dhr2) olarak iki farklı dhurrinaz izole etmişlerdir [28]. Yapılan çalışmalarda Dhr1 ile Dhr2'nin aminoasit benzerliğinin %75 olduğu bulunmuştur. Bu iki izoenzimin substrat spesifikliğinin de birbirinden farklı olduğu belirtilmiştir. 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 bildirilmiştir [29].

1.1.4 Enzimin Katalizleme Mekanizması

Bir çok organik tepkime, proton verenler (genel asitler) ve proton alanlar (genel bazlar) tarafından oluşturulur. Bazı enzimlerin aktif merkezleri proton alan ve proton veren olarak katalitik süreçlere katılan aminoasit işlevsel grupları içerir. Bu gruplardan birisi E (Glu) glutamik asit kalıntısıdır [20]. β -glukosidazların aktif merkezinde de E191 ve E406 konumunda işlevsel iki glutamik asit kalıntısının olduğu bildirilmektedir [21].

Tüm Aile 1 β -glukosidazlar etki ettikleri maddenin glikozid bağımlı hidroliz ederken glikonun anomerik konfigürasyonunu korurlar. Yani ürün olarak açığa çıkan β -D-glukoz ile substrattaki β -D-glukozid aynıdır. Enzim tarafından substratın hidrolizi iki basamakta gerçekleşir:1) enzim glikolizasyonu (glikozlanması) 2) deglikozilasyon (glikoz kopması). Ayrıca iki glutamik asit rezidüsünün aktif bölgeye katılımıyla hidroliz gerçekleşir [30]. Katalitik glutamat rezidüleri E191 ve E406 Şekil 1.3.A'da görülmektedir



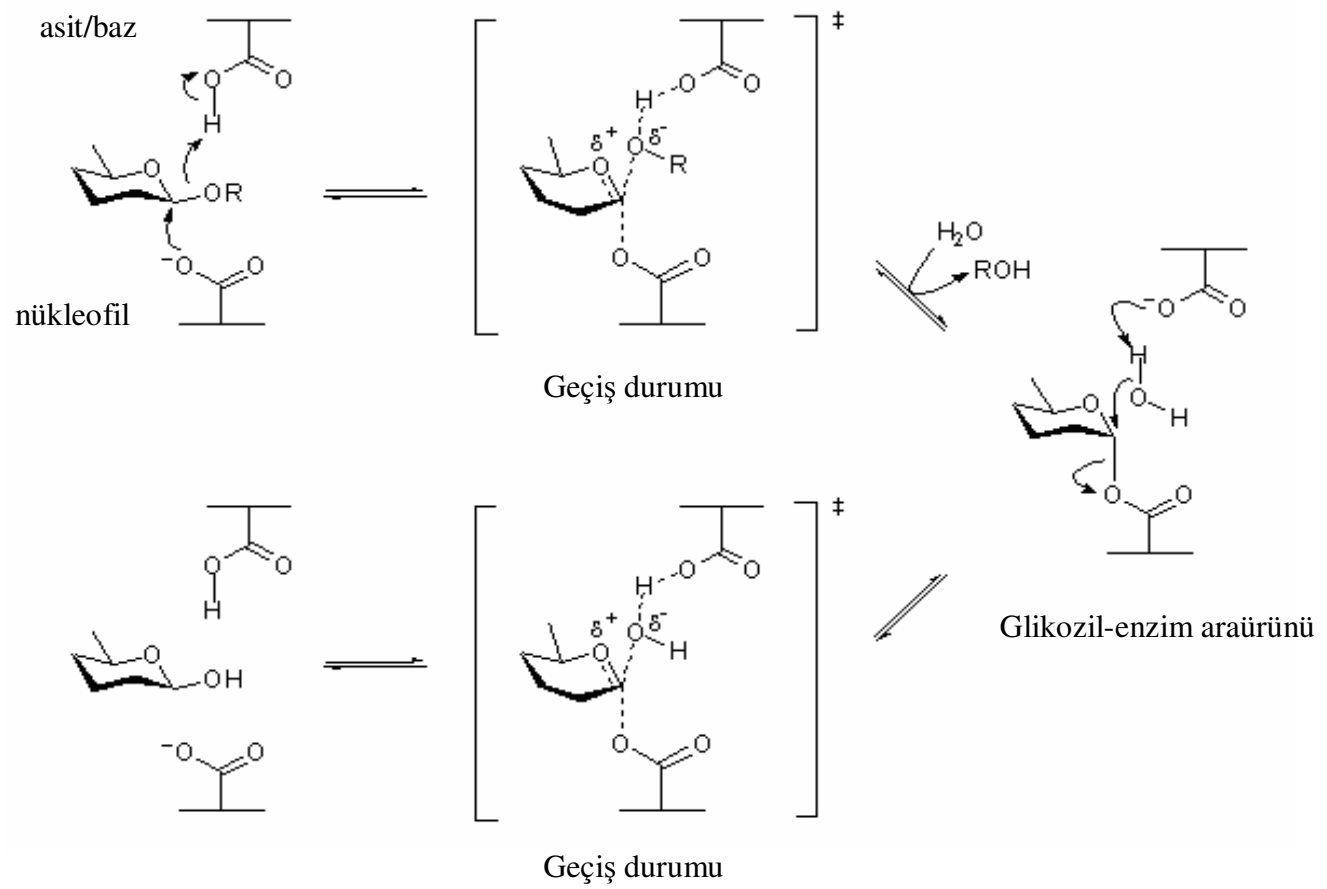
Şekil 1.4 Mısır beta-glukosidaz izoenzim ZMGlul'in katlanma yapısı ve ligand molekülleri[1] (A) Mısır beta-glukosidaz izoenzim ZMGlul'in katalitik glutamik asit rezidüleri Glu191 ve Glu406. (B) Nötral substrat olan DIMBOAGlc

Glikozilasyon basamağında YI/VTENG motifindeki nükleofilik glutamat rezidüsü substratın anomerik karbonuna (C-1) atak yapar. Aglikon bir glutamik asit kalıntısı ile kararlı tutulurken, Şekil 1.4'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 oluşturur ve aglikon serbest kalır [12,31].

Deglikozilasyon basamağında, aktif merkezdeki anyon ve baz katalizleyici durumunda olan ikinci katalitik glutamat rezidüsü 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 [32].

İki katalitik glutamik asit rezidüsü (ki bunlar nükleofilik ve asit/baz katalizleyici olan glutamik asitler) Şekil 1.3.A'da görüldüğü gibi aktif bölgede yer aldıkları ve yaklaşık 5.5 Å (0.55nm) uzaklıkta oldukları belirlenmiştir [2].

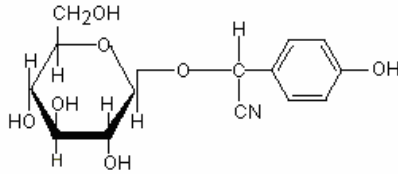


Şekil 1. 5 Enzimin katalizleme mekanizması [22]

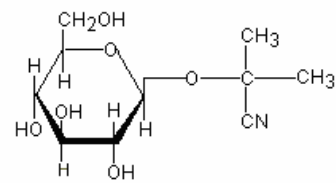
1.1.5 Katalizlediği Reaksiyonlar ve Substratları

β -glukosidaz substratlarında bulunan sabit monosakkarite bağlı kimyasal grupların çeşitliliği β -glukosidazların substrat çeşitliliğinin esasını oluşturur. Glikoza 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 veya prunasin, durrin ve DIMBOAGlc'da olduğu gibi bir aril grup olabilir [33-36].

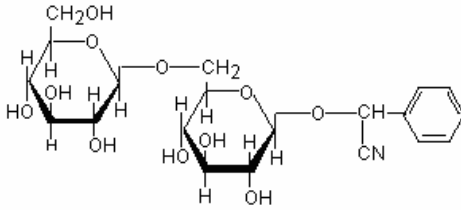
Dhurrin



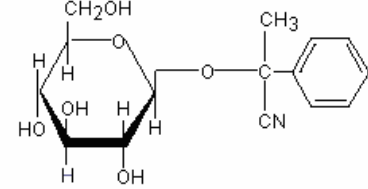
Linamarin



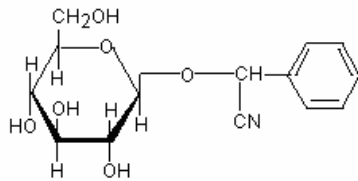
Amygdalin



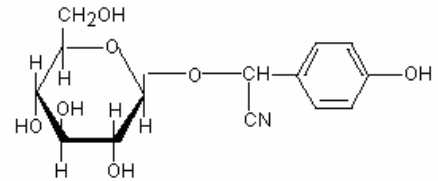
Lotaustralin



Prunasin



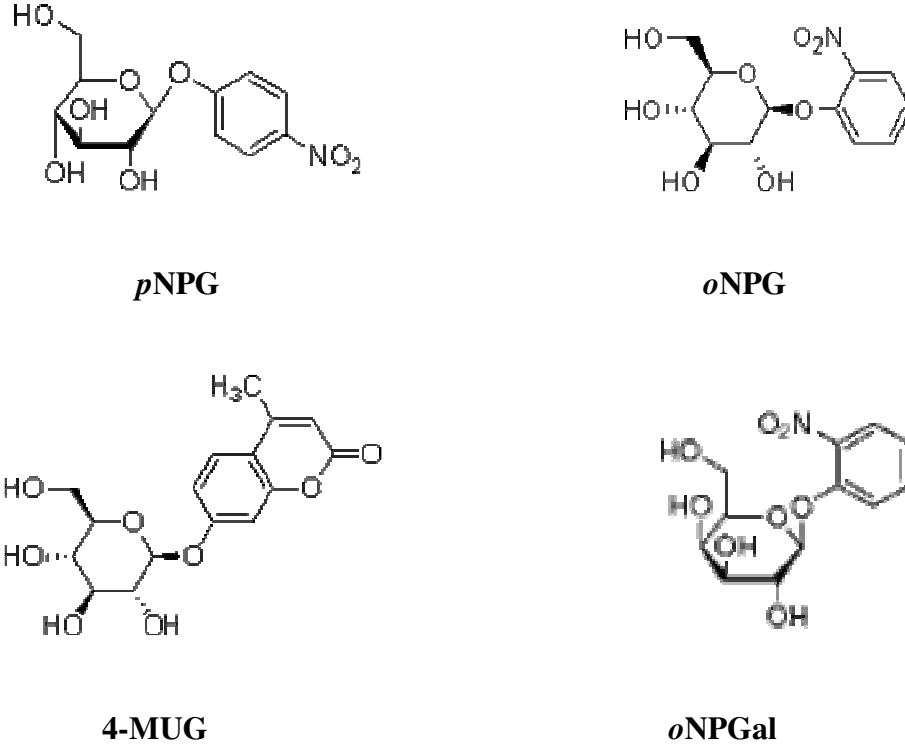
Taxiphyllin



Şekil 1.6 β -glukosidazların doğal substratlarından bazıları

Enzimin doğal substratları dışında yapay substratları da mevcuttur. Mısır β -glukosidaz izoenzimi Glu1'in, aglikon parçası olarak p- ve o-NP, 4-metilumbelliferil, 6-bromo-2-naftil, indoksil, 5-bromo-4-kloro-3-indolil ve sitokinin içeren bileşikler hidroliz ettiği görülmüştür [37,38]. Literatüre bakıldığında β -glukosidaz

enzimleriyle ilgili çalışmalarda en yaygın olarak *p*NPG substratının kullanıldığı görülmektedir.



Şekil 1.7 Enzimin yapay substratlarından bazıları

1.2 Enzimin Saflaştırılması

β -glukosidaz enzimlerinin bakteri, mantar, bitki ve hayvan dokularında buldukları belirtilmektedir [39]. Canlılar arasında oldukça geniş dağılım gösteren β -glukosidaz enzimlerinin pek çok canlıdan saflaştırılmış olduğu görülmektedir. Farklı araştırmacılar tarafından β -glukosidaz enziminin mısır [26], pirinç [40], üzüm [41], kiraz [42], çay [43], süpürge darısı [44], soya [45], portakal [46], vanilya [47] bitkilerinden saflaştırıldığı ve özelliklerinin incelendiği belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda saflaştırma işlemlerinde genelde amonyum sülfat tuz çöktürmesiyle başlandığı ve peşisıra değişik kromatografi yöntemlerinin kullanılarak çok basamaklı saflaştırma işlemi yapıldığı belirtilmektedir. Çay yaprağından [44], vanilyadan [48] ve kirazdan [42] yapılan enzim saflaştırması

çalışmalarında amonyum sülfat çöktürmesi sonunda iyon değişim kromatografisi ve sonra farklı jel filtrasyon kromatografilerinin uygulandığı görülmektedir. Soyadan yapılan çalışmada ise tuz çöktürmesi ardından iki farklı iyon değişim kromatografisinin uygulanmış olduğu bildirilmektedir. Portakal meyvesinden yapılan saflaştırma çalışmasında da önce iki ayrı iyon değişim kromatografisi ardından üç farklı jel filtrasyon kromatografisinden oluşan beş aşamalı saflaştırma işlemi yapıldığı görülmektedir. Mısır β -glukosidazlarının saflaştırılmasında ve zeytin meyvesinde yapılan çalışmada amonyum sülfat tuz çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemlerinin uygulanarak saflaştırma yapıldığı görülmektedir [48, 49].

Mantarlardan β -glukosidaz 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 [50]. Riou ve ark.'nın yapmış olduğu β -glukosidaz enziminin *Aspergillus oryzae* mantarından saflaştırılması çalışmasında [51] ve *Thermoascus auranticus* mantarından yapılan saflaştırma çalışmalarında [52] iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografilerinin kullanıldığı bildirilmektedir.

Memelilerden izole edilen β -glukosidaz enzimlerinin sitozolik ve lizozomal olarak iki farklı karakterde olduğu bulunmuştur [53]. Sitozolik β -glukosidazların esas itibarıyla karaciğerde yer aldığı ve detoksifikasyonda görevli olduğu bildirilmektedir [54].

1.3 β -glukosidaz Enziminin Önemi

β -glukosidazlar tüm canlı organizmalarda birçok biyolojik işlevde rol oynamaktadırlar. Bu sebeple β -glukosidaz enzimleri protein mühendisliğinde, tarım ve ormancılık alanlarında ve biyoteknolojik çalışmalarda oldukça sık çalışılmaktadır. β -glukosidazlar (özellikle Familya 1 enzimleri) bitkilerde biyolojik bazı süreçlere katılırlar. Bu süreçleri şöyle sıralayabiliriz:

- Herbivor, insektalar ve bitki zararlılarına karşı savunma,

- Besin kalitesinin artışı,
- Yenilenebilir yakıt üretimi,
- Lignin biyosentezi ve kağıt kalitesinin artışı,
- Sekonder bitki metabolizması,
- Antikanserojen etki [55].

1.3.1 Savunma

Bitkiler, zararlılara karşı savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bunun için bünyelerinde 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 stoklanır [56,57]. Beyaz yoncadaki siyaojenik β -glukozidaz (linamaraz) enziminin hücre duvarında yer almasına rağmen substratı olan linamarinin kofulda bulunduğu belirtilmiştir [58]. Patojen veya herbivorların bitki dokularına gelmesiyle hücrede oluşan zarar sonucu substrat ile enzim karşılaşır. Bu esnada substratların hidrolizi başlar ve hidroliz sonucu açığa çıkan aglikonlar ya da diğer parçalanma ürünleri toksik etki yaratır. Açığa çıkan ürünler tiyosiyonatlar, izotiyosiyonatlar, nitriller, HCN, benzaldehitler gibi maddelerdir [59]. Bu maddeler herbivorları caydırıcı, bitki zararlılarının bitkiye girişini, gelişmesini ve dağılmasını engelleyici etki gösterirler. Böylece β -glukosidaz enzimleri bitkilerin savunma sisteminde yer almış olurlar [60]. Örneğin fosfat eksikliği [61], insektalara [62] ve soğuğa [63] 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 [64].

Arabidopsis thaliana ile yapılan farklı bir çalışmada bitkinin oomycete *Peronospora parasitica* tarafından enfeksiyonundan sonra 48 saat içinde β -glukozidaz geni olan psr3.1 geninin transkripsiyonunun 8 kat arttığı gösterilmektedir [65]. Farklı bir çalışmada da yine *Arabidopsis thaliana* β -glukozidazlarından birinin nematodlara karşı savunmada rol aldığı belirtilmiştir [66]. Buğday tohumarından

saflaştırılan β -glukozidaz enzimi ile yapılan bir çalışmada enzimin birincil doğal substratının siyanojenik glukozid (DIMBOA) olduğu bildirilmiş ve söz konusu enzimin buğdayda herbivorlara ve patojenlere karşı savunmada yer aldığı sonucuna varılmıştır [67]. Ayrıca bitkilerde yer alan izoflavonların kimyasal savunmada fonksiyonları olduğu bilinmektedir. Soyadan saflaştırılan ve β -glukozidaz enzimi olan ICHG'nin izoflavon bileşiklerine karşı yüksek substrat özgülüğünün olması bu enzimin savunmada yer aldığını düşündürmektedir [45].

β -glukozidaz enzimlerinin farklı çevresel streslerde savunma görevi yaptığı bilinmesine rağmen bu olayların nasıl gerçekleştiği henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Söz konusu enzimin araştırılmasıyla, bitki zararlılarına karşı daha çevreci ve ekonomik savunma mekanizmalarının kullanılabileceği düşünülmektedir. Ayrıca böcek ilaçlarının toprağa verdiği zararı azaltmak için daha az pestisit kullanımı yine bu çalışmaların hedefleri arasındadır.

1.3.2 Besin Kalitesinin Artışı

Bitkilerde tat ve lezzet oluşumunda etkili birkaç yüz β -glukozidik ürün teşhis 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, meyve suyu ve meşrubat üretiminde kullanılmaktadır [68]. Üretim sırasında ve ya sonrasında β -glukozidaz enzimi eklendiğinde ürünlerin tad, lezzet, aroma ve diğer kalite faktörlerinde artış gözlenmektedir [4]. Aynı şekilde bu bilgilerin, istenilen özellikte transgenik bitki oluşturulmasında genetik mühendisliği açısından da temel oluşturacağı düşünülmektedir [2].

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 sorumludurlar. Bu maddeler aynı zamanda bu sebzelerle hazırlanmış yiyeceklere de lezzet katarlar.

Glukosinolatlar ve bunların parçalanmasıyla oluşan ürünler, bu sebzelerle beslenen hayvanların et, süt ve yumurtalarına da geçerler [69].

Vanilya bitkisinde [47], üzüm [41] ve papaya [71] meyvelerinde yapılan çalışmalarda β -glukozidazların meyve 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 [47]. Muscat üzümünün tadından sorumlu öncül maddelerin araştırıldığı bir çalışmada monoterpenilglikozid miktarının meyvelerdeki aroma kısmının önemli kısmını oluşturduğu belirtilmiştir [72]. Üzümden saflaştırılan β -glukozidaz enziminin de üzüm monoterpenil glikozidlerinin aglikan kısımlarına karşı özgülüğü tespit edilmiştir [41,73]. Çay yaprağı ile yapılan çalışmada da β -glukozidaz enziminin aromatik tat ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir [74].

1.3.3 Biyokütle Değişikliği

Polisakkaritler (özellikle selüloz) biyosferde bol bulunan bileşiklerdir ve bunlar geri dönüşümü olan kimyasal maddelerin ve yakıtların önemli kaynağıdır. Şehir çöplüklerinin yaklaşık %40'ı gazete ve diğer kağıt ürünlerinden oluşmaktadır. Selulozun hidrolizi inorganik asit kullanımını ve yüksek sıcaklık gerektirir. Bu yöntem ekonomik bir yol değildir. Selulitik organizmalarca salgılanan bir selulaz enzim kompleksi selulozu glikoza hidroliz edebilir. Bu sistem endüstriyel çevreler açısından uygun bir model oluşturmaktadır. Bahsedilen enzim kompleksi üç enzimden oluşmaktadır: bir endoglikonaz, bir ekzoglikonaz ve bir β -glukozidaz. Endoglikonazlar selülozun iç β -1,4-glikozidik bağlarını hidrolizle keserek yeni zincir uçlarının oluşmasını sağlar. Ekzoglikonazlar da oluşan bu yeni selüloz zincirlerini uçlardan keserek çözünür sellobiyoz birimleri oluştururlar. Son olarak β -glukozidazlar ise sellobiyoz birimlerini glukoz birimlerine hidroliz ederler [75]. Günümüzde ticari olarak kullanılan selülozik enzimler *Trichoderma* ve *Aspergillus* mantarlarından elde edilmektedirler [76]. Böylece endüstride selülozik biyokütle yıkımı ve selulozun glukoz dönüşümü mikroorganizmalar ya da izole edilmiş

selulaz kompleksi tarafından sağlanmaktadır. Selulaz kompleksinin, selulozik biyokütlenin degradesyonunda kullanılması β -glukozidazları mühendislik açısından önemli bir materyal haline getirmektedir. Günümüzde enzim katalizörlüğünde uygulanan yöntemler, daha hızlı, daha ekonomik, çevre dostu, ürün verimi oldukça yüksek ve safsızlık oluşumu oldukça düşük olduğundan, kimyasal reaksiyonlara oranla daha fazla tercih edilmektedir. Enzim katalizli proseslere duyulan bu ilgi, zamanla dünya genelinde bir enzim pazarını yaratmıştır [77]. 2000 yılında yapılan bir araştırmaya göre, dünya enzim pazarının ticari potansiyelinin 1,6 milyar dolar olduğu rapor edilmiştir. Günümüzde endüstriyel enzimlerin %60'ı Avrupa, geri kalan %40'lık bölümü ise Amerika ve Japonya tarafından üretilmektedir [78].

1.3.4 Lignin Biyosentezi

Lignin selülozdan sonra biyosferde bol bulunan ikinci bileşiktir. Lignin oluşumunda en önemli öncül madde olan koniferil alkol, β -glukozidaz tarafından hidroliz edilen koniferinden türeyen bir bileşiktir [79]. Bu durumda bazı bitki β -glukozidazlarının lignin biyosentezinde rol aldıkları ortaya çıkmaktadır [80]. Kaliteli kağıt üretimi ve ağaç yetiştirmede β -glukozidaz enzimlerine ait bilgilerin kullanılması söz konusu enzimleri hedef materyal yapmaktadır [56].

1.3.5 Büyüme ve Gelişme

β -glukozidazların bitkilerde büyüme ve gelişme olaylarında bitki hormonlarının aktivasyonunu sağladığı düşünülmektedir [81-83]. Eğer bu fonksiyonlara katıldıkları yapılan çalışmalarla kesin bir şekilde ispatlanacak olursa, söz konusu enzimlerle ilgili mühendislik alanında çok büyük gelişmelerin olacağı düşünülmektedir. Örneğin bitki büyüme ve gelişmelerinin düzenlenmesi ve verimliliğin artırılması gibi çalışmaların hız kazanacağı öngörülebilir [56].

1.3.6 Antikanserojen Etki

Glikosinolatların ve bunların parçalanmasıyla oluşan ürünlerin insanlarda antikanserojen etki yaptığı konusunda iddialar mevcuttur. Tüm mekanizmalarının tam olarak açıklanmamasına rağmen kemirgenler üzerinde yapılan çalışmalarda, çiğ ya da pişmiş turpgillerin (lahana, karnabahar, brokoli gibi) aril hidrokarbon hidrokzilas aktivitesini arttırdığı görülmüştür [39]

1.4 Beta- Glukozidaz Enzimi Üzerine İn Vitro Etkisi Araştırılan Pestisitler

Pestisitler, sorun yaratan böcekler, hayvanlar, mikroorganizmalar, yabancı otlar ve diğer zararlıların ölmesini ya da davranışlarının değiştirmesini sağlayan biyolojik olarak aktif kimyasallardır [84]. Tarım ilaçları olarak bilinen pestisitler, II. Dünya Savaşı'ndan sonra birim alandan daha fazla ürün alabilmek için bitki koruma alanında kullanılmaya başlanmıştır [85].

Pestisitler tarım ürünü zararlılarının kontrolünde kullanılan tüm kimyasalları kapsamaktadır. Genellikle aktif etkene göre sınıflandırılan pestisitler, en genel anlamda insektisitler-böcek öldürücüler, akarisitler-akar öldürücüler, fungusitler-mantar öldürücüler, herbisitler-ot öldürücüler gruplarından oluşmaktadırlar. Tarım ilaçlarının kullanımı açısından Türkiye'ye bakıldığında en fazla %47 oran ile insektisitlerin kullanıldığı, bunu %24 ile herbisitlerin izlediği ve %16'luk oranla da fungusitlerin yer aldığı gözlenmiştir [85].

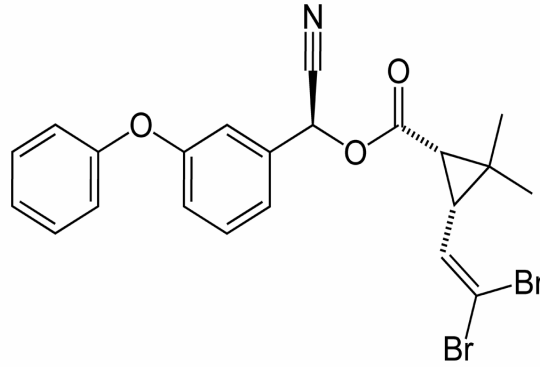
Bu çalışmada, zeytin tarımında kullanılan iki farklı insektisit ile bir herbisitinin zeytin β -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırılmıştır.

1.4.1 Deltamethrin (S)- α -cyano-3-phenoxybenzyl (1R,3R)-3-(2,2- dibromovinyl) = 2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate (Deltamethrin)

Maddenin fiziksel hali renksiz olup kristaldir. Kontak ve mide etkili insektisittir. Hızlı etki gösterir. Arılara ve balıklara zehirlidir. Türk Gıda Kodeksinde

yer alan maksimum rezidü limiti(MRL) Buğday, mercimek, mısır, meyveler, zeytin, soya, ayçiçeği, pamuk tohumu, biber, domates, havuç, hıyar için 0.5 ppm, marul, üzüm için 0.05, patates, şekerpancarı için 0.01 ppm Süt için 0.02 ppm olarak bildirilmiştir [86].

Zeytinde zeytin karakoşnili, zeytin sineği; buğdayda süne ve kımlı; pamukta çizgili yaprak kurdu için kullanılmaktadır. Ayrıca meyvede elma iç kurdu, elma ağ kurdu, testereli arılar, yaprak galeri güveleri, armut yaprak piresi; bağda dürmece, salkım güvesi; antep fıstığında yaprak psillidi; sebze beyaz sinek, yeşil kurt, bozkurt, pis kokulu yeşil böcek, tohum böceği, yaprak bitleri, yaprak pireleri, thripsler; patatesten patates böceği; mercimek, nohutta hortumlu böcek, apion, mantolu böcek, yeşil kurt; mısırdaki koçan kurdu, hububatta süne, hortumlu böcek, ekin kambur böceği; zeytinde zeytin sineği, zeytin güvesi, zeytin kara koşnili; ayçiçeğinde çayır tırtılı; fındıkta kır tırtılı; şekerpancarında pancar piresi, bozkurt, kalkan böceği için de kullanılmaktadır [87].



Şekil.1.8. Deltamethrinin yapısı

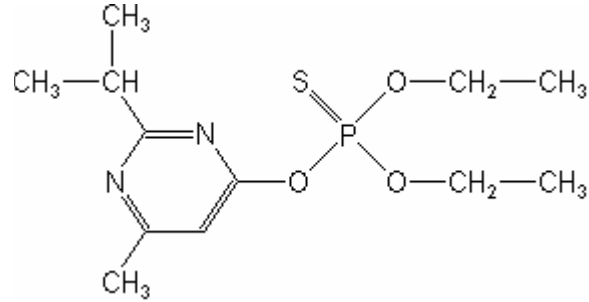
1.4.2 Diazinon O,O-diethyl O-2-isoprpyl-6-methylpyrimidin-4-yl phosphorothioate (Diazinon)

Maddenin fiziksel hali sarı renkli sıvıdır. Kontak, mide ve solunum sistemine etkili insektisit ve akarisitir.

Arılara oldukça zehirli olup, balıklara zehirlidir. Türk Gıda Kodeksinde yer alan maksimum Rezidü Limitleri (MRL) : Zeytin 0.5 ppm, erik, kavun, kiraz, şeftali

için 0.3 ppm armut, elma, domates, hıyar, lahana, marul, üzümde 0.2 ppm, mercimek, nohut, pamuk tohumu, soya, şekerpancarı için 0.1 ppm, biber, buğday, fındık, soğanda 0.5 ppm sütte 0.02 ppm olarak bildirilmiştir [87].

Meyvede altın kelebek, göz kurdu, yaprak biti, doğu meyve güvesi, armut kaplanı, elma ağ kurdu, elma pamuklu biti, kiraz sineği, sarı ağaç kurdu, kiraz sülüğü, tomurcuk tırtılları, yaprak bükenler; pamukta pamuk yaprak biti ve yaprak piresi; hububatta ekin güvesi; sebze de baklagil tohum böcekleri, tel kurdu, yaprak biti, yaprak piresi, thrips, karpuz telli böceği, pis kokulu yeşil böcek, lahana kokulu böceği, nohut yaprak sineği, biber gal sineği, kavun kızıl böceği, kavun sineği, lahana yaprak güvesi, lahana keleşği, lahana sineği, soğan sineği, tohum sineği; fındıkta fındık filiz güvesi; zeytinde zeytin güvesi ve zeytin pamuklu biti; haşhaşta kök kurdu; susamda susam güvesi; bağda unlu bit; süs bitkilerinde yaprak bitleri; gülde koşnil için kullanılmaktadır [88].

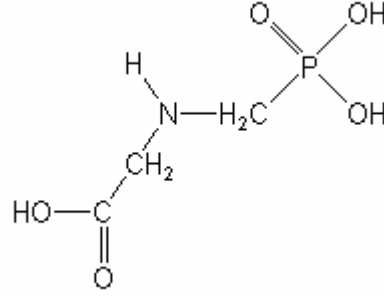


Şekil.1.9. Diazinonun yapısı

1.4.3 N-(fosfometil)glisin

Genel adı Glyphosate, kimyasal adı (IUPAC) ise N-(fosfometil)glisin'dir. Maddenin fiziksel hali kokusuz beyaz tozudur. Etki şekli yapraklar tarafından alınan sistemik etkili seçici olmayan herbisittir. Akut oral olarak etkir. Zehirlilik derecesi çok fazla olmayıp arılar ve balıklarda etkilidir. Türk Gıda Kodeksinde yer alan maksimum rezidü limiti (MRL), sert çekirdekli meyveler, fındık, yumuşak çekirdekli meyveler, turunçgillerde 0.1 ppm'dir. Üzümde ise 0.02 ppm'dir [86] Kullanım yerleri; turunçgiller, bağ, fındık, meyve bahçeleri ve ekili olmayan alanlarda; yabani

yulaf, yabani havuç, kısır brom, kus yemi, mürdümük, ballıbaba, kanarya otu, tilki kuyruğu, yer fesleğeni, düğün çiçeği, turna gagası, yabani fiğ, kus otu, yabani hardal, ebe gümece, yabani yonca, semiz otu, sütleğen, sirken, bambul otu, domuz pıtrağı, zincir pıtrağı, kırmızı köklü tilki kuyruğu, kirpi darı, darıcan, horoz ibiği, yeşil horoz ibiği, topalak, köpek dişi ayrığı, tarla sarmaşığı, ısırgan otu, pelin otu, kaynaştır [89].



Şekil.1.10. N-(fosfonometil)glisin (Glyphosate) in yapısı

1.5 Ağır Metaller

Ağır metal kavramı, fiziksel özelliği bakımından özkütlesi 5 g/cm^3 ten daha yüksek olan metaller için kullanılır. Bu grupta kurşun, kadmiyum, krom, demir, kobalt, bakır, nikel, civa ve çinko olmak üzere 60 tan fazla metal vardır. Bu elementler doğada genellikle karbonat, oksit, silikat ve sülfür halinde stabil bileşik olarak veya silikatlar içinde hapis olarak bulunurlar. Her ne kadar metallerin yoğunluk değeri üzerinden hareketle ekolojik sistem üzerindeki etkileri tanımlanmaya ve gruplandırılmaya çalışılıyorsa da gerçekte metallerin yoğunluk değerleri onların biyolojik etkilerini tanımlamaktan çok uzaktır. Element ve minerallerin insan sağlığı ile olan ilişkisini, insan vücudundaki her doku, sıvı, hücre ve organda dengelerini koruduğunu bilmenin insan sağlığını korumada temel olduğu açıktır [90-94].

Bazı metaller yaşamın sürdürülebilmesi için vazgeçilmez iken bazıları da ileri derecede toksiktirler. Ancak vazgeçilmez görünen metallerin de belirli miktarlardan sonra toksik etkili oldukları bilinmektedir. Örneğin bakır saç, deri, kemik gibi bazı

organların temel bileşimi arasında bulunmaktadır. Bakır eksikliği çocukluktan itibaren önemli sağlık sorunlarına yol açmaktadır. Bununla birlikte kurşunun düşük oranda alınması bile insanlar için toksik etki yaratma potansiyeline sahiptir [93].

Çizelge 1.1 Endüstri gruplarından atılan metal türlerinin dağılımı[95]

Endüstri	Cd	Cr	Cu	Hg	Pb	Ni	Sn	Zn
Kağıt Endüstrisi	-	+	+	+	+	+	-	-
Petrokimya	+	+	-	+	+	-	+	+
Klor-Alkali üretimi	+	+	-	+	+	-	+	+
Gübre Sanayi	+	+	+	+	+	+	-	+
Demir Çelik Sanayi	+	+	+	+	+	+	+	+
Termik Santraller	+	+	+	+	+	+	+	+

Bununla birlikte, tarımsal ürünlerin sulanması sırasında kullanılan suların içerdiği ağır metal ve toksik elementlerin çok düşük miktarları bile bitkiler için zararlı olmaktadır [96].

Yapmış olduğumuz çalışmada zeytin β -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine Fe, Cu, Ni, Ag, Pb ve Cd'un etkisi araştırılmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

2.1. MATERYALLER

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneyisel çalışmalarda kullanılan, *p*-NPG, *o*-NPG, Glukonolakton, Sepharose-4B, 1-Naftilamin, L-tirozin, standart serum albumin, N,N,N,N'tetrametiletildiamin (TEMED), trihidroksimetil aminometan (Tris-Base) Sigma Chemical'den; sodyum hidroksit, amonyum sülfat, glisin, fosforik asit, asetik asit, etil alkol, hidroklorik asit, sodyum dihidrojen fosfat, β -merkaptoetanol, sodyum dodesil sülfat, akrilamid, N,N-metilen bis-akrilamid, amonyum persülfat, bromofenol mavisi, gliserol, Coomassie brilliant blue G-250, sodyum bikarbonat, sodyum fosfat, potasyum fosfat, kalsiyum klorür, DMSO ve kullanılan ağır metaller, Fe(NO₃)₃, Cu(II)Cl, Ni NO₃, Pb (NO₃)₂, Ag NO₃, CdCl formunda olup Merk'den temin edildi.

Pestisitlerden, deltamethrin Aventis firmasının, diazinon koruma firmasının (imal form), glyphosate Bayer firmasının kimyasalları kullanılmıştır.

2.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Bu çalışmada aşağıdaki alet ve cihazlar kullanılmıştır.

Soğutmalı santrifüj	Sigma 3K15
Soğutmalı Ultrasantrifüj	Hettich EBA 12R
Multi Santrifüj (Falkon santrifüjü)	Thermo IEC
pH metre	Hana pH 211 Microprocessor
UV-Spektrofotometre (Plaka okuyuculu)	Biotek Power Wave XS

Manyetik karıştırıcı	Torrey Pines Scientific
Doğrayıcı	Felix Rapido
Terazi	Sartorius BL 210S
Otomatik pipetler	Hi-Tech ve Finipipette
Homojenizatör	Micra XRT
Elektroforez Sistemi	Hoefer, HSI
Kromatografi Kolonu	Sigma (1 cm çap ve 15 cm uzunluk)
Derin Dondurucu (-80 °C)	CFC Free
Buzdolabı (-20 °C)	Arçelik
Vorteks	Fisons Whirli Mixer
Otoklav	Hirayama HV 85
Buz makinesi	Fiocchetti AF 10
Su Banyosu	Elektro-mag
Thermo-block	Eliwell FALC
İnkübatör	Nuare CO ₂ -Water Jacket Incubator
Jel Görüntüleme Sistemi	Gel Doc-H Imaging System (UVP)

2.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları

- **Hidrofobik jelin dengelenmesi için kullanılan tampon:** 1 M (NH₄)₂SO₄ içeren, 50 mM Na₂HPO₄ tamponu (pH 6.8). Bunun için 7,095g (0.05 mol) Na₂HPO₄ ve 132,14 g (1 mol) (NH₄)₂SO₄ 950 mL distile suda çözülerek, 1N HCl ile pH'sı 6,8'e getirildi ve son hacim distile su ile 1L'ye tamamlandı.
- **Hidrofobik jele bağlanmış β-glukosidaz enziminin elüsyonu için kullanılan çözelti:** 1M NH₄(SO)₂ içeren, 50mM Na₂HPO₄ tamponu (pH 6.8) ve 50 mM Na₂HPO₄ tamponu (pH 6.8) ile gradient mikser kullanılarak tuz gradienti oluşturuldu. Bunun için 7,095g (0.05 mol) Na₂HPO₄ ve 132,14 g (1 mol) NH₄(SO)₂ 950 mL distile suda çözülerek, 1N HCl ile pH'sı 6.8'e getirildi ve son hacim distile

su ile 1 L'ye tamamlandı. 7.095 g (0.05 mol) Na_2HPO_4 950 mL distile suda çözülerek, 1 N HCl ile pH'sı 6.8'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

- **Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda oluşan çökeleğin alındığı tampon çözelti:** 1M $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ içeren, 50mM Na_2HPO_4 tamponu (pH 6.8) ve 50 mM Na_2HPO_4 tamponu (pH 6.8). 7.095g (0.05 mol) Na_2HPO_4 ve 132,14 g (1 mol) $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ 950 mL distile suda çözülerek, 1N HCl ile pH'sı 6.8'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

- **Enzim aktivitesinin ölçüldüğü ve substrat çözeltisinin hazırlandığı tampon:** 50mM pH 5.5 olan sodyum asetat tamponu; 6.804g Na-Ac 900mL distile suda çözüldü ve glacial asetik asit ile pH 5.5'e ayarlandıktan sonra son hacim distile su ile 1L'ye tamamlandı.

- **Substrat çözeltisi:** 5 mM p-NPG çözeltisi; 0,0075g pNPG 5mL, 50mM pH 5.5 sodyum asetat tamponu içinde vortekste karıştırılarak çözüldü.

- **Reaksiyon durdurma tamponu:** 0.5 M Na_2CO_3 ; 26.498g Na_2CO_3 son hacim 500mL olacak şekilde distile suda çözülerek hazırlandı.

- **PMSF Stok Çözeltisi:** 10mL isopropanol içerisinde 174.19g fenilmetilsülfonilflorid (PMSF) vorteks yardımıyla çözüldü.

- **Zeytin Ekstraksiyon Tamponu:** 100mM borat tamponu pH 9, 5 mM EDTA, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), 0.25 % (w/v) dithiothreitol (DTT). Bunun için 6.18g borik asit tartılarak 850mL distile suda çözüldü ve 1M NaOH ile pH 9' a ayarlandıktan sonra son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı. Bu borik asit tamponundan 90mL alınarak içinde 0.25g DTT, 0.1461g EDTA çözüldü ve 100mM'lık PMSF stok çözeltisinden 1mL ilave edildikten sonra hacim borat tamponu ile 100mL'ye tamamlandı.

- **SDS-PAGE’de kullanılan tank tamponu;**

Tris-HCl	3 g
Glisin	14,4 g
SDS	1,0 g

- **SDS-PAGE’de kullanılan numune tamponu;**

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	2,5 mL
% 10’luk SDS	4,0 mL
Gliserol	2,0 mL
β -merkaptoetanol	1,0 mL
Bromfenol mavisi	0,01 g
Distile su	0,5 mL

- **SDS-PAGE’de kullanılan ayırma ve yığma jellerinin hazırlanışı;** SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının hazırlanışı ve kullanılan miktarları Çizelge 2.1’de verilmektedir.

- **SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi;** 0,66 g Coomassie brilliant blue G-250, 120 mL metanolde çözüldü. Bu çözeltiliye 24 mL saf asetik asit ve 120 mL distile su ilave edildi.

- **SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renk açma çözeltisi;** Hacimce % 7,5 asetik asit, % 5 metanol ve % 87,5 mL distile su içermektedir. Bu amaçla 75 mL asetik asit ve 50 mL metanol, 875 mL saf su ile karıştırıldı.

Çizelge 2.1. SDS-PAGE’de kullanılan jel karışımlarının miktarları.

	Ayırma Jeli	Yığıma Jeli
	%10	%3
<p><u>Akril amid/Bis</u></p> <p>Akril amid 15 g Bis 0,4 g Alınarak son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanır.</p>	2.08 mL	330 µL
Distile su	2.5 mL	1.53 mL
<p><u>1.5 M tris-Base (pH 8.8)</u></p> <p>Tris-Base 11.82g Alınarak pH 8.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanır.</p>	1.56 mL	–
<p><u>0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)</u></p> <p>Tris-HCl 3.94 g Alınarak pH 6.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanır.</p>	–	630 µL
<p><u>% 10 'luk SDS</u></p> <p>SDS 1g Alınarak son hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlanır.</p>	62.5 µL	25 µL
TEMED	3.13 µL	2.5 µL
<p><u>%10'luk amonyum persülfat</u></p> <p>Amonyum persülfat 1g Alınarak son hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlanır.</p>	93.75 µL	50 µL

2.2. YÖNTEMLER

2.2.1. Aseton Tozu (Aceton Powder)'nun Hazırlanması

Enzim ekstraktının hazırlanmasında; önce “aseton tozu” (Aceton Powder) elde edilmesi ve daha sonra da bundan enzim ekstraksiyonunun yapılması olarak iki aşamalı bir yol izlendi. Aseton tozu hazırlamak için zeytin meyveleri iyice yıkandıktan sonra çekirdekleri çıkarıldı. 100 g çekirdeği çıkarılmış zeytin meyvesi, bir büyük kavanoza koyuldu. Daha önceden derin dondurucuda bekletilen (-20°C) soğuk asetondan 1500 mL ilave edilerek 2 dakika doğrayıcı ile parçalandı. Elde edilen bulamaç Whatman No 1 filtre kâğıdı yardımıyla filtre edildi. Filtre kağıdı üzerindeki kalıntı, 1 L'lik behere alınarak üzerine yeniden 500 mL, -20°C 'ye kadar soğutulmuş soğuk aseton ilave edildi ve işlem arka arkaya üç defa tekrar edildi. Filtre üzerindeki son kalıntı petri kaplarına yayılarak oda sıcaklığında, çeker ocakta 4-5 saat bekletildi ve iyice kuruması sağlandı. Kırmızımsı-morumsu renkte pudra görünümünde aseton tozu elde edilmiş oldu. Aseton tozu, kullanılabildiği kadar -20°C 'de saklandı. Deneylerde kullanılan enzim ekstraktı bu aseton tozundan elde edildi [51,97].

2.2.2 Enzim Ekstraktının Hazırlanması

Ham ekstrakt hazırlamak için bir behere 0,5 g aseton tozu koyulup üzerine, önceden yaklaşık $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğutulmuş olan 50 mL zeytin ekstraksiyon tamponu ilave edildi. Beher içeriği buz içinde, 2 dk homojenizatörde homojenize edildi. Homojenat 15300 rpm, 30 dk, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de teflon tüplerde santrifüj edildi ve süpernatant ham ekstrakt olarak kullanıldı.

2.2.3 Enzim Aktivite Tayini

Zeytin β -Glukozidaz enziminin aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edildi. Aktivite ölçümü için 70 μL , 5 mM *p*NPG substrat çözeltisi ve üzerine 70 μL enzim çözeltisi 96'lık plakaya (well-plate) koyuldu. Kör olarak 70 μL 50 mM pH 5.5 Na-Ac tamponu ve üzerine 70 μL enzim çözeltisi koyuldu. Etüvde 37°C 'de, 30 dk

inkübe edildi. 30 dk'nın sonunda reaksiyon 70 µL 0,5 M Na₂CO₃ ile durduruldu. Spektrofotometrede 405 nm'de köre karşılık absorbans değeri okundu. *o*-NPG ve *o*-NPGal substratlarının reaksiyon sonunda ortaya çıkan ürünleri orto-nitrofenol olduğu için bu substratlara karşı enzim aktiviteleri 420 nm'de okundu.

Enzim aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı ve bir Enzim Ünitesi dakikada oluşan *p*-nitrofenolün ve *o*-nitrofenolün µmol'ü olarak belirlendi.

Absorbansın (A), zamana bağlı değişimi (dA/dt), molar ekstinksiyon katsayısına (C) bölünürse absorbans değişimi izlenen maddenin derişimdeki değişim hızı saptanmış olur. Molar ekstinksiyon katsayısının değeri absorbansı veren maddenin değişimi ve absorbansı arasındaki sabit oranın ifadesidir [98].

$C=A/C \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ ile formülize edilir.

A= absorbans, C= maddenin derişimini ifade eder (cm² mol⁻¹)

Enzim ünitesi (EU)=(Vf(ml) x(seyreltme faktörü)/ (C) (cm²/mol⁻¹)x(Vs)x d)

Vf= Toplam hacim (ml)

Vs= Eklenen enzim hacmi (ml)

d= Işık yolu

dA/dt= Dakikada gözlenen absorbans farkı

para-nitrofenol için 405nm'deki C değeri 552.8 M⁻¹ cm⁻¹ olarak kullanılırken [51], *orto*-nitrofenolün 420nm'deki C değeri 4.55 mM⁻¹ cm⁻¹ olarak kullanılmıştır [46].

2.2.4 Lowry Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini

Protein miktarı ölçümleri Lowry Metoduna göre hesaplanmıştır. Bu yöntem için aşağıdaki solüsyonlar hazırlandı.

Solüsyon A : % 2'lik Na₂CO₃ 0.1 M NaOH' da çözüldü.

Solüsyon B : %1 NaK tartarat distile suda çözüldü.

Solüsyon C : % 0.5'lik CuSO₄ distile suda çözüldü.

Solüsyon D : 48 mL solüsyon A, 1mL solüsyon B, 1mL solüsyon C alınarak hazırlandı.

Solüsyon E : Folin-fenol ve distile sudan bire bir oranında alınarak hazırlandı .

Sığır Serum Albumini (BSA) : 5mg 5ml suda çözülerek taze olarak hazırlandı.

Protein tayini işleminde şu yol izlendi: 1 mL sinde 1mg protein içeren standart sığır albümin çözeltilisinden tüplere 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µL alındı ve miktar her tüpte 100 µL olacak şekilde üzerleri saf su ile tamamlandı. Kör olarak kullanılmak üzere de bir tüpe 100 µL saf su koyuldu. Daha sonra her tüpe 2 ml Solüsyon D eklendi ve 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. 10 dk sonunda tüplere 0,2 mL Solüsyon E eklenip vorteks ile zaman kaybetmeden karıştırıldı ve 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Örnekler 96'lık plakanın kuyucuklarına 200'er µL koyularak 600 nm de absorbansları köre karşı okundu. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri ile standart grafik hazırlandı (Şekil 3.1).

Saflaştırma basamaklarında protein miktarı belirlenecek numunelerden 0,1'er mL tüplere alındı ve standart grafik için uygulanan yöntem aynı şekilde numune tüpleri için de uygulandı. Daha sonra numuneler içindeki protein miktarı standart grafikten elde elden doğru denklemi kullanılarak hesaplandı [99].

2.2.5 Enzimin Saflaştırılması

2.2.5.1 Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi

Amonyum sülfat, belirli doygunluk derecelerine göre belirli proteinlerin çökmesini sağlayan 2 değerlikli, çok kullanılan bir tuzdur. Öncelikle, kullanılacak uygun amonyum sülfat konsantrasyonu aşağıda verilen formülle tespit edildi:

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

V : Serum hacmi

S₁ : 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S₂ : 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

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 yukarıdaki formüle göre hesaplanan amonyum sülfat miktarları 0°C'de eklendi. 30 dakika manyetik karıştırıcıda yavaşça karıştırılarak ilave edilen amonyum sülfatın çözünmesi sağlandı. Daha sonra 15000 rpm'de 4°C'de 30 dakika santrifüj edildi. Çökeleklerin her biri 1mL, 50mM pH 6.8 sodyum fosfat tamponunda çözüldü.

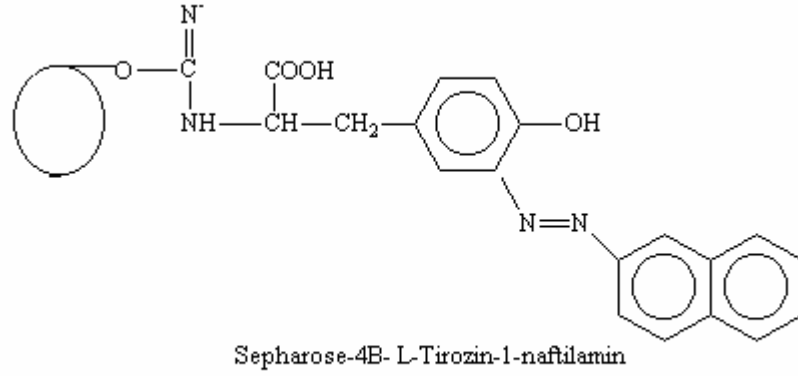
Her bir aralıkta çözülen numunenin enzim aktivitesi ve Lowry yöntemiyle kantitatif protein miktarı belirlendi. Enzim numuneleri renkli olduğundan 405nm'de aktivite belirlenirken absorbans değerinin yanlış çıkmaması için her bir aralıktaki enzim çözeltisi kendi körüne karşı okundu. 0-10 aralığının enzim 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. Çizelge 2.2'de aktivite ölçümünde kullanılan hacim ve reaksiyon karışımları özetlenmiştir. 37 °C'de 30 dakika inkübe sonunda reaksiyonlar 70 µL 0.5 M Na₂CO₃ ile durduruldu ve 405nm'de absorbans değerleri okundu. Her bir aralığın kantitatif protein miktarları Bölüm 2.2.4'de verilen Lowry metoduna göre hesaplandı.

Çizelge 2. 2 Amonyum sülfat çöktürme aralıklarının enzim aktiviteleri bulunurken kullanılan reaksiyon hacimleri

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

2.2.5.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması

Zeytin β -glukosidaz enziminin saflaştırılmasında amonyum sülfat çöktürmesinin ardından hidrofobik etkileşim kromatografisi tercih edilmiştir. Bunun için laboratuarda sentezlenen ve Şekil 2.2'de verilen hidrofobik jel sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin kullanılmıştır [100].



Şekil 2.1 Hidrofobik etkileşim kromatografisinde kullanılan hidrofobik jel

Hazırlanan hidrofobik etkileşim kolonu önce 1M (NH₄)₂SO₄ içeren 50mM, pH 6.8 sodyum fosfat tamponu ile dengelendi. Kolonun dengeleme işlemi bittikten sonra, jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine kadar indirildi. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen enzim çökeleği en küçük hacimde 1M (NH₄)₂SO₄ içeren 50 mM, pH 6.8 sodyum fosfat tamponu çözüldü. Ardından çözeltinin enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak belirlendikten sonra kolona tatbik edildi. Kolona 1 M (NH₄)₂SO₄ içeren 50 mM, 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 1 mL halinde tüplere alındı. Elüsyon işlemine 280 nm'deki absorbans sıfır oluncaya kadar devam edildi. 50 mM, pH 6.8 sodyum fosfat tamponu kör olarak kullanılarak her bir tüpte 280 nm'de kalitatif protein tayini ve 405 nm'de aktivite tayini yapıldı. Elde edilen değerlerin tüp numarasına karşı aktivite ve protein miktarı grafiği çizildi (Şekil 3.2).

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

Beta-glukosidaz enziminin hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılmasından sonra iki farklı akrilamid konsantrasyonunda; yığma jeli % 3, ayırma jeli % 10 olacak şekilde kesikli sodyum dodesil sülfat jel elektrofrez (SDS-

PAGE) Laemli [101] tarafından belirtilen yöntemle yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi.

Bu amaçla elektroforez cam plakaları önce su, sonra etil alkol ile iyice temizlendi. Daha sonra plakalar arasına plastik aralık oluşturucusu yerleştirilerek iki cam plaka birbiri üzerine konuldu ve elektroforezin dökme aparatına sabitlendi. Çizelge 2.1’de belirtildiği şekilde hazırlanan ayırma jeli plakalar arasına üstten 2-3 cm kalana kadar enjektörle döküldü. Jel içerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için saf su ile ince bir tabaka oluşturuldu. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra (1-2 saat) üst yüzeydeki su döküldü. Daha sonra cam plakaların arasına tamamen doluncaya kadar polimerleşmiş ayırma jelinin üzerine yığılma jeli ilave edildi. Jel kasetindeki yükleme jelinin üzerine tarak dikkatlice yerleştirilerek jelin polimerleşmesi beklendi (30 dakika). Yükleme jeli polimerleştikten sonra tarak kuyucukların arasının bozulmamasına dikkat edilerek çıkarıldı. Kuyucuklar önce saf suyla sonra tank tamponuyla yıkandı. Polimerize jellerin bulunduğu kaset elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu.

Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonucunda elde edilen fraksiyonlardan yüksek aktivite gösterenler birleştirildi. Elde edilen çözelti toplam hacim 50 µl olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. Molekül ağırlık standartları; (β-galaktosidaz (116.0kDa), 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 termoblok da bekletildi. Numuneler soğutularak kuyucuklara yüklendi. Elektroforez güç kaynağına bağlanarak 80 volt’a ayarlandı. Proteinlerin jeldeki hareketini incelemeye yarayan numune tamponu içindeki boyaya ait bant ayırma jeline ulaştığında voltaj 150 volt’a yükseltildi. Yürütme işlemine proteinler, jelin altına 1cm kalana kadar devam edildi. Daha sonra akım kesilerek yürütme durduruldu. Cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı yığılma jeli kesilip ayrıldıktan sonra protein bantlarını içeren ayırma jeli renklendirme çözeltisi içine konuldu ve 1,5-2 saat kadar çalkalayıcı üzerine bırakıldı. Daha sonra jel

renklendirme çözeltilerinden çıkartılarak renksizleştirme çözeltilerine kondu. Belirli aralıklarla değiştirmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp protein bantları belirginleşinceye kadar bu çözelti içinde çalkalandı. Jel renksizleştirme çözeltilerinden çıkarıldıktan sonra jel görüntüleme sistemi (UVP) ile görüntü bilgisayara aktarıldı.

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

Zeytin β -glukozidaz enziminin *p*-NPG ve *o*-NPG substratlarına olan ilgisi K_M ve V_{max} değerleri bulunarak tespit edildi. Bunun için *p*-NPG ve *o*-NPG substratlarının oniki farklı konsantrasyonunda enzim aktivitesi ölçüldü. $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. K_M ve V_{max} değerleri grafiğin denkleminde yararlanılarak bulundu. Bunun için grafiğin $1/V$ eksenini kestiği nokta olan $1/V_{max}$ değerinden V_{max} değeri bulundu ve denklemin eğimi olan K_M/V_{max} değerinde V_{max} yerine yazılarak K_M değeri hesaplandı.

2.2.7. İnhibitörlerin IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi

Enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırılan ağır metal, pestisit ve inhibitör maddelerin IC_{50} değerlerini bulmak için, *p*-NPG substratının reaksiyon hacminde 1,43mM ve 1,36mM konsantrasyonlarında çalışıldı. İnhibitör eklenmemiş ortamda enzim aktivitesi bulunarak bu değer %100 aktivite olarak alındı. Farklı inhibitör konsantrasyonlarında enzim aktivite değerleri bulundu ve % aktivite değerleri hesaplandı. % Aktivite-[I] grafikleri çizildi. (Şekil 3.8-3.15). Bu grafiklerden yararlanarak enzim aktivitesini % 50 oranında azaltan inhibitör konsantrasyonu olan IC_{50} değerleri hesaplandı.

2.2.8. İnhibitörlerin K_i Değerlerinin Bulunması

β -glukozidazların yaygın substratı olan *p*-NPG substratı kullanılarak zeytin meyvesinden saflaştırılan beta-glukozidaz enzim aktivitesi üzerine δ -glukonolakton, bazı pestisitler ve bazı ağır metallerin inhibisyon tipleri ile K_i değerleri belirlenmiştir. K_i değerlerinin tespiti için, inhibitörsüz ortamda oniki farklı *p*NPG substrat konsantrasyonu varlığında aktivite değerleri bulundu. Bulunan bu aktivitelere $1/V$

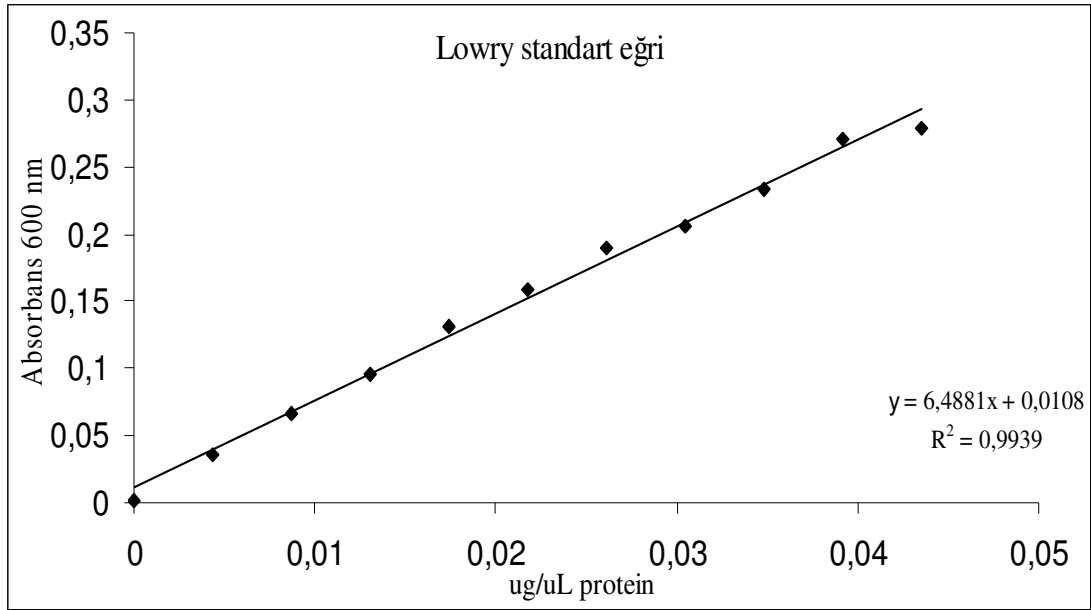
değerleri hesaplandı. $1/V - 1/[S]$ değerleri ile Lineweaver–Burk grafiği çizildiğinde I_0 doğrusu elde edildi. Her bir inhibitör maddenin iki farklı sabit konsantrasyonunda, p-NPG substratının oniki değişik konsantrasyonuna karşılık gelen enzim aktiviteleri belirlendi. İki farklı inhibitör konsantrasyonu varlığında, farklı substrat konsantrasyonuna karşılık gelen aktiviteler kullanılarak çizilen Lineweaver–Burk grafiğinde $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri ile I_1 ve I_2 doğruları oluşturuldu. Lineweaver–Burk grafiklerden yararlanarak K_i değerleri hesaplandı ve inhibisyon türleri tespit edildi. K_i değerleri yarışmalı (kompetitif) inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrisinde $1/[S]$ eksenini kestiği nokta olan $-1/K_M (1+[I]/K_i)$ ifadesinden, yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon için $1/V$ eksenini kestiği nokta olan $1/V_{max} (1+[I]/K_i)$ ifadesinden, yarıyarışmalı (unkompetitif) inhibisyon tipi için $1/V$ eksenini kestiği nokta olan $1/V_{max} (1+[I]/K_i)$ ifadesinden yararlanılarak hesaplandı. K_i değerlerinin hesaplanmasında kullanılan denklemlerdeki K_M ve V_{max} değerleri inhibitörsüz ortamda bulunan değerlerdir.

3. BULGULAR

3.1. Protein Miktar Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri

Saflaştırma basamaklarında kantitatif protein tayini için Lowry metodu kullanılmıştır. Bu yöntemle protein miktar tayininde sığır serum albümin proteini standart olarak kullanılmıştır. Standart çözeltideki mg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Bölüm 2.2.4’de anlatılan yöntemle bulunarak Şekil 3.1’deki grafik elde edilmiştir.

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



Şekil 3.1 Lowry yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik

3.2. Enzimin Saflaştırılması

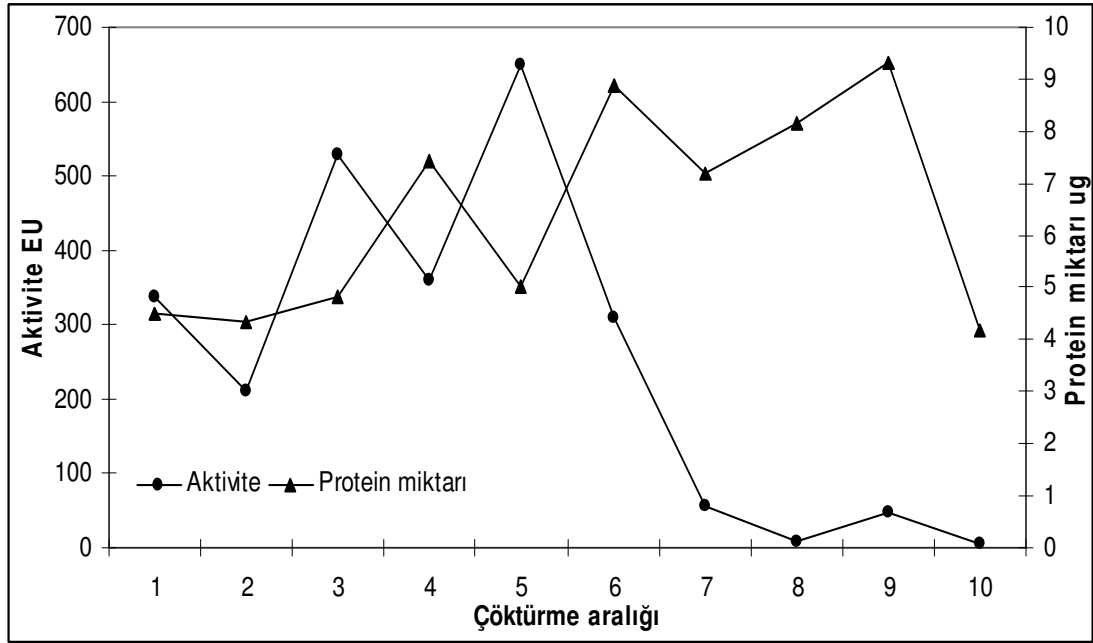
3.2.1. Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi

Amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesi için ham ekstrakta Çizelge 3.1’de verilen amonyum sülfat miktarları eklenerek Bölüm 2.2.5.1’de belirtilen yöntem uygulanmıştır. Bu yöntemle her aralığın enzim aktivitesi tespit edilirken enzim çözeltisi renkli olduğundan 405nm’de yanlış aktivite hesaplanmasına neden olmaması için Çizelge 2.2’deki reaksiyon karışımlarında verildiği gibi kör karışımı içinde de enzim çözeltisi olmasına dikkat edilmiştir. Elde edilen veriler Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesinde kullanılan çözelti hacimleri, kullanılan tuz miktarı ve tespit edilen değerler

Aralık Değeri	Çöktürme Aralığı	Hacim (mL)	Kullanılan Amonyum sülfat miktarı (g)	Protein Miktarı (mg/mL)	Aktivite (EU)	Absorbans 280 nm
1	0-10	21.5	1.11	4.50	337.916	10.26
2	10-20	21.5	1.14	4.33	211.0468	11.6
3	20-30	21.5	1.17	4.82	528.4611	17.66
4	30-40	21	1.18	7.43	359.6237	32.56
5	40-50	21	1.22	5.02	648.818	12.59
6	50-60	21.5	1.29	8.89	309.9372	36.12
7	60-70	21.5	1.34	7.19	55.47515	26.66
8	70-80	21.5	1.39	8.14	9.647852	35.31
9	80-90	21.5	1.44	9.30	47.99806	50.43
10	90-100	21.5	1.50	4.19	6.753496	10.76

Çizelge 3.1'deki değerler kullanılarak Şekil 3.2'deki amonyum sülfat çöktürme aralığı-Aktivite grafiği çizilmiştir. Özellikle çöktürme aralığının belirlenmesinde protein miktarının düşük ancak enzim aktivitesinin yüksek olduğu aralık tespit edilmeye çalışılmıştır. Grafikten, enzimin çöktüğü tuz konsantrasyonu %0-50 aralığı olarak tespit edilmiş ve saflaştırma işlemlerinde %50 amonyum sülfat tuz çöktürmesi uygulanmıştır.



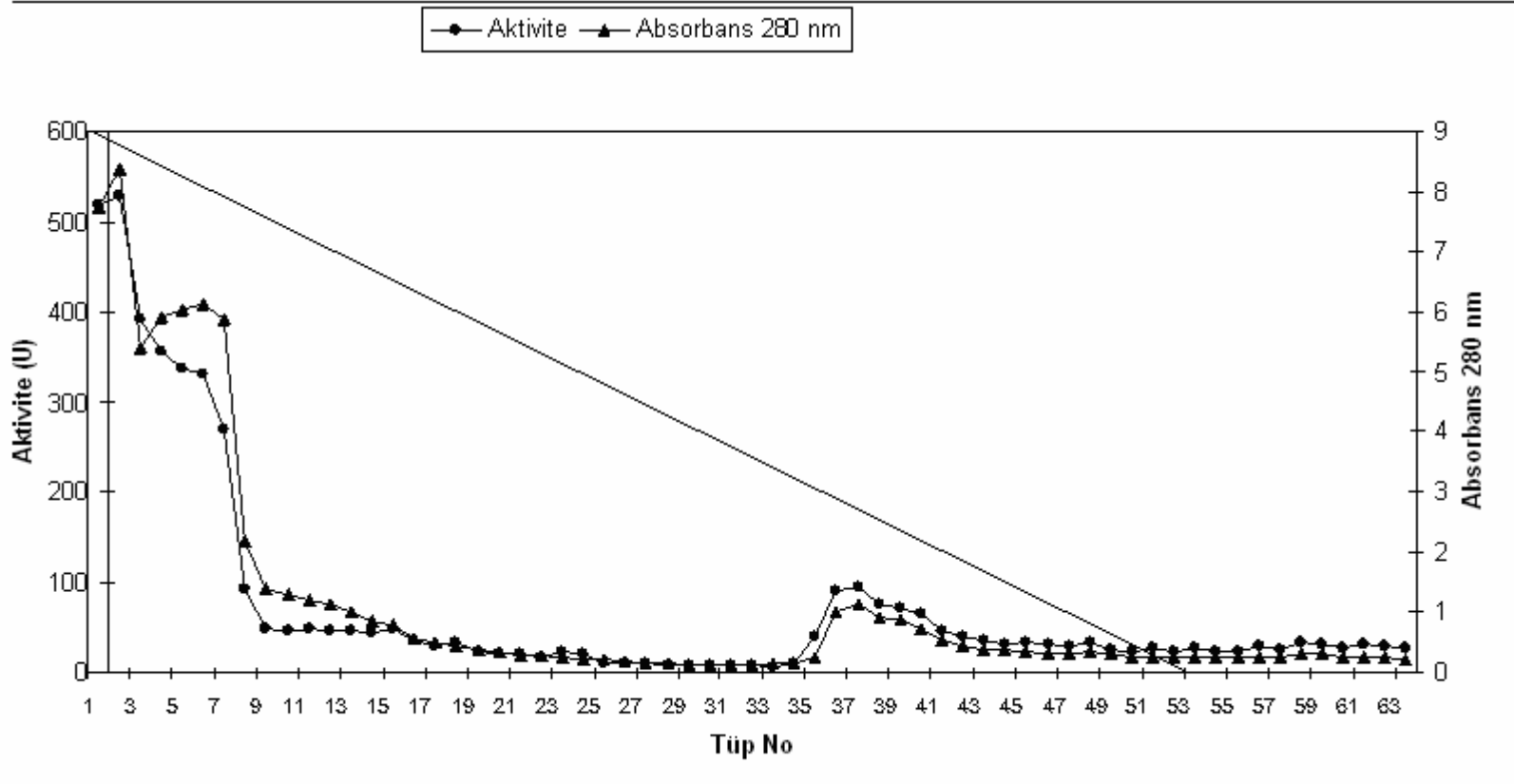
Şekil 3.2 Amonyum sülfat çöktürme aralığının tespitinde kullanılan grafik

3.2.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi İle Enzimin Saflaştırılması

Bölüm 2.2.5.2'de belirtildiği gibi %50 amonyum sülfat çöktürmesi sonunda elde edilen numune diyaliz edilmeden daha önceden laboratuvarında sentezlenmiş hidrofobik yapıdaki sepharose 4B-L-tirozin-1-naftilamin hidrofobik jelini içeren kolona uygulanmıştır. Kolondaki jel yüksekliği 5 cm ve çap 1 cm'dir. Kolondan alınan numunelerin 50 mM sodyum fosfat pH6.8 tamponu kör kullanılarak, 280 nm'de kalitatif protein tayini yapılmıştır. Elüsyondaki her bir tüpün aktivite tayini kendi numunesinden oluşan köre karşı yapılmıştır. Şekil 3.3'de görüldüğü gibi elde edilen değerlerin tüp numarasına karşı aktivite ve protein miktarı grafiğinden

yüksek aktivite gösteren 36, 37, 38, 39 ve 40 numaralı tüpler birleştirilmiştir. Kolona tatbik edilen ve birleştirilen elüatlar için Lowry metoduyla kantitatif protein ve aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler ve saflaştırma oranları tespit edilmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2'deki saflaştırma tablosunda gösterildiği gibi amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda çözülen çökeleğin toplam aktivitesi 239.173 U/ml ve toplam protein miktarı 18.57 mg/ml olarak belirlenmiş ve %72.25 verimle 7.82 kat saflaştırılmış olduğu hesaplanmıştır. Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonunda 36-40. tüplerin oluşturduğu saf enzimin %53.92 verimle 154.93 kat saflaştırılmış olduğu belirlenmiştir. Yapılan hidrofobik etkileşim kromatografisinde 1-0 M amonyum sülfat gradanti uygulanmış ve elüsyonun 53. tüpünde gradient işlemi bitirilmiştir. Bu açıdan incelendiğinde enzimin 36.-40. tüplede gelmesi tuz konsantrasyonunun oldukça azaldığı bir değerde kolona tutunamadığı görülmüştür.



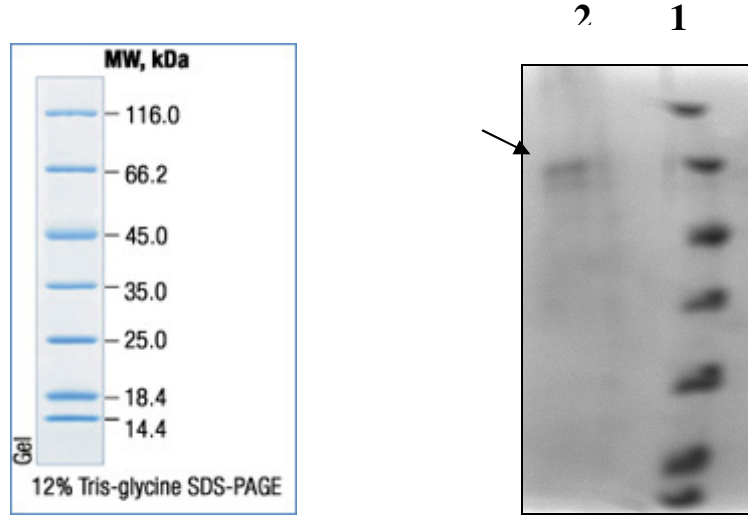
Şekil 3.3 Hidrofobik etkileşim kromatografisi kolonundan zeytin β -glukosidaz enziminin elüsyon grafiği

Çizelge 3.2. 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	22.5	14.7130	331.043	8.94	201.15	1.6458	100	-
Amonyum Sülfat Çöktürmesi	3.07	77.9064	239.173	6.05	18.57	12.8771	72.25	7.82
Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi	5	35.6971	178.486	0.14	0.7	254.9793	53.92	154.93

3.2.3 Zeytin Beta-Glukosidaz Enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Hidrofobik etkileşim kolonundan saflaştırılan zeytin beta-glukosidaz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla bölüm 2.2.5.3’de anlatıldığı şekilde hazırlanan SDS poliakrilamid jel elektroforezine saflaştırılan enzim numunesi uygulandı. Protein bantları içeren jellerin görüntüleri jel görüntüleme sistemi ile bilgisayara aktarıldı (Şekil 3.4).

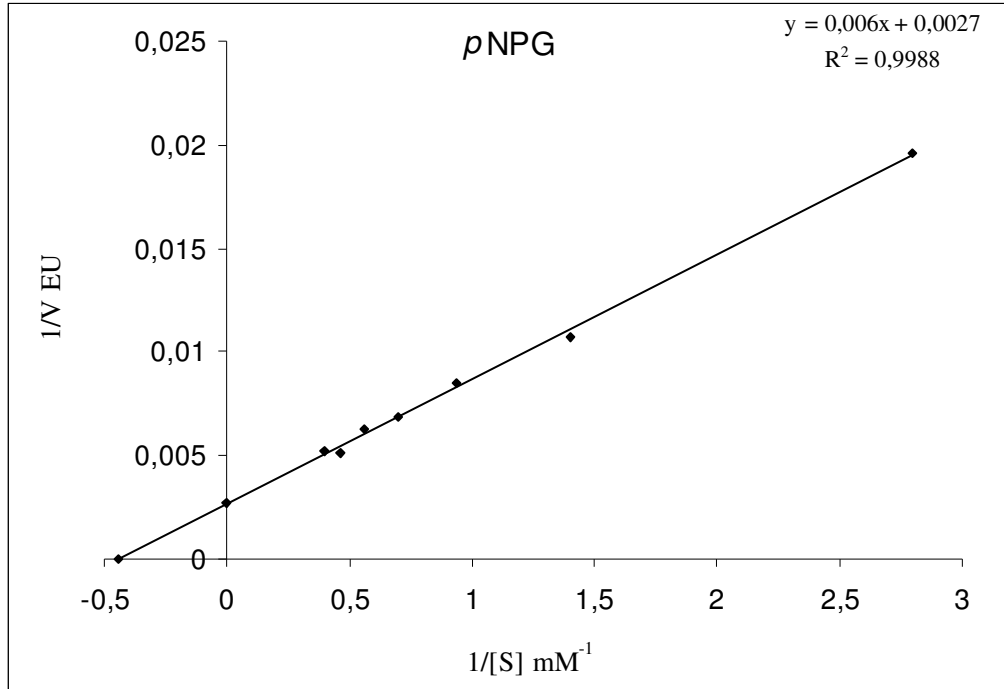


Şekil 3.4 Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan zeytin beta-glukosidaz enziminin SDS-polakrilamid jel elektroforezi. 1: Protein marker. Molekül ağırlık standartları; (β -galaktosidaz (116.0kDa), sığır serum albumin (66.2 kDa), yumurta albumini (45.0 kDa), laktat dehidrogenaz (35.0 kDa), REase Bsp98I (E.coli) (25.0 kDa), β -laktoglobulin (18.4 kDa) ve Lizozim (14.4 kDa) 2: Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonundaki saflaştırılmış zeytin beta-glukosidaz enzimi.

3.3 Farklı Substratların K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması

3.3.1 p-NPG Substratının K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması

K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması amacıyla pNPG substratının değişen konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. 405nm'de ölçülen aktivite değerleri ile reaksiyon hızı $V(U/mL)$ olarak hesaplandı. $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri kullanılarak Şekil 3.5'de gösterilen Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Grafik denkleminde yararlanılarak zeytin meyvesi beta-glukozidaz enzimine ilişkin pNPG substratı için K_m değeri 2,22 mM ve V_{max} değeri 370.37 U/mg olarak hesaplanmıştır.



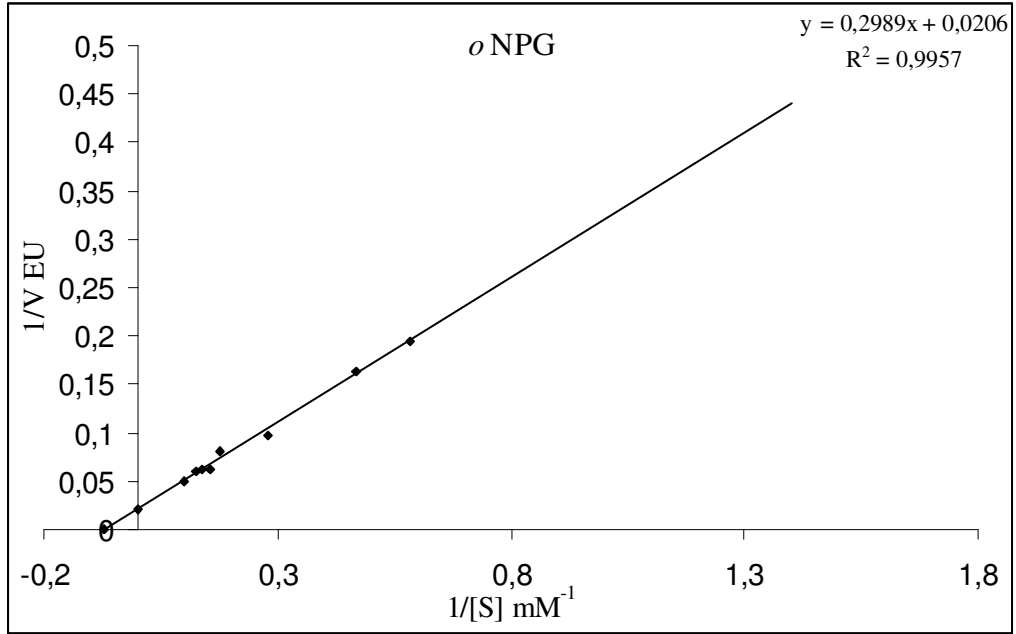
Şekil 3.5 p-NPG Substratının K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasında kullanılan Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 3.3 Zeytin Beta-glukosidaz enziminin pNPG substratı kullanılarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri

50mM Na- Ac Tamponu (μ l)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Substrat çözeltilisinin hacmi (μ l)	Kuyucukt aki toplam hacim (μ l)	Kuyucukt aki Substrat Kons [S] (mM)	ΔA (405 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
65	70	5	140	0.36	0.212	51.13	195.57	2.80
60		10		0.72	0.386	93.10	107.41	1.40
55		25		1.07	0.490	118.19	84.61	0.93
50		35		1.43	0.604	145.68	68.64	0.70
45		45		1.79	0.665	160.39	62.35	0.56
40		50		2.14	0.804	193.92	51.57	0.46

3.3.2 *o*-NPG Substratının K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması

Optimum şartlarda, *o*-NPG (orto nitrofenol β -D glukopiranozid) substratının değişen konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapılmıştır. 420nm'de ölçülen aktivite değerleri ile reaksiyon hızı V (U/mL) olarak alınmıştır. $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak Şekil 3.6'daki Lineweaver-Burk grafiği çizilmiştir. Grafik denklemleri kullanılarak zeytin meyvesi beta-glukozidaz enzimine ilişkin *o*-NPG substratı için K_m değeri 14.51 mM ve V_{max} değeri 48.54 U/mg olarak bulunmuştur. Buradan zeytin meyvesi beta-glukozidaz enziminin *p*-NPG substratına karşı ilgisinin *o*-NPG substratına göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir.



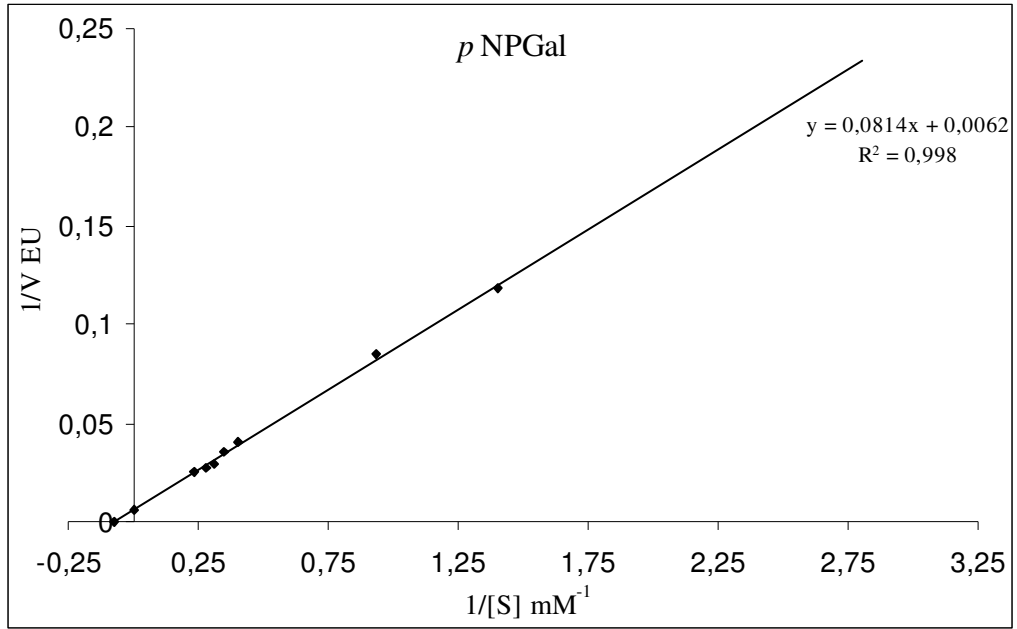
Şekil 3.6 *o*-NPG Substratının K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasında kullanılan Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 3.4. Zeytin Beta-glukosidaz enziminin *o*-NPG substratı kullanılarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri

50mM Na-Ac Tamponu (μ l)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Substrat çözeltilisinin hacmi (μ l)	Kuyucuktaki toplam hacim (μ l)	Kuyucuktaki Substrat Kons [S] (mM)	ΔA (405 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V$	$1/[S]$
68	60	12	140	1.71	0.01	5.13	0.195	0.58
65		15		2.14	0.012	6.15	0.163	0.47
55		25		3.57	0.020	10.26	0.098	0.28
40		40		5.71	0.024	12.31	0.081	0.18
35		45		6.43	0.031	15.89	0.063	0.16
30		50		7.14	0.031	15.89	0.063	0.14
25		55		7.86	0.033	16.92	0.059	0.13
10		70		10	0.039	20.00	0.050	0.10

3.3.3 *p*-NPGal Substratının K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması

K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması amacıyla, *p*-NPGal (para nitrofenol β -D galaktopiranozid) substratının değişen konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. 405nm'de ölçülen aktivite değerleri ile reaksiyon hızı (U/mL) olarak hesaplandı. $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri kullanılarak Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Grafikten yararlanarak zeytin meyvesi beta-glukozidaz enzimine ilişkin *p*-NPGal substratı için K_m değeri 13.13 mM ve V_{max} değeri 161.29 U/mg olarak bulunmuştur. (Şekil 3.7)



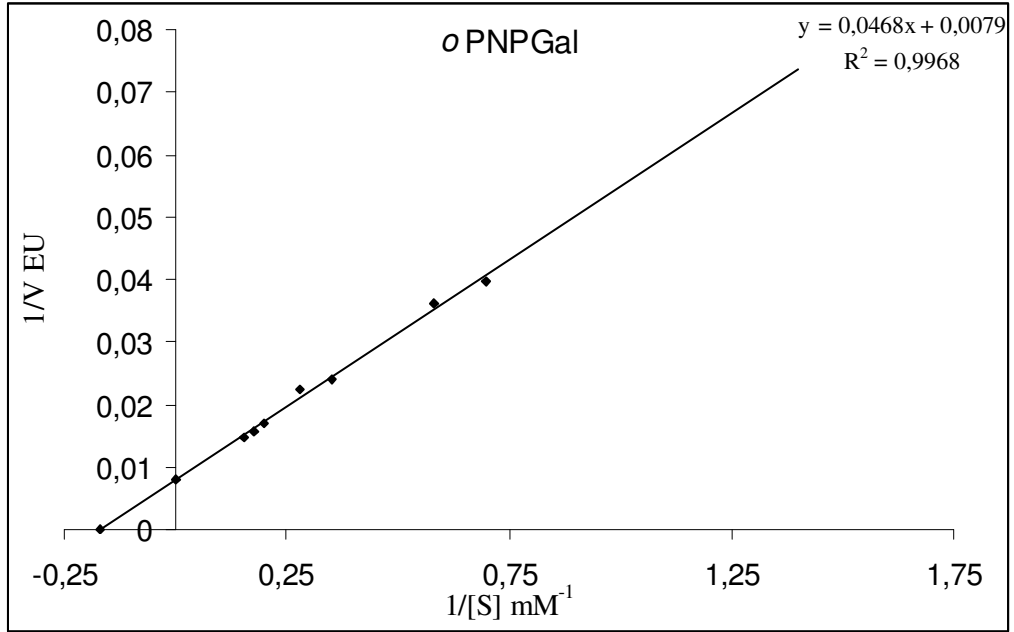
Şekil 3.7 *p*-NPGal Substratının K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasında kullanılan Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 3.5. Zeytin Beta-glukosidaz enziminin *p*-NPGal substratı kullanılarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri

50mM Na-Ac Tamponu (μ l)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Substrat çözeltilisinin hacmi (μ l)	Kuyucuktaki toplam hacim (μ l)	Kuyucuktaki Substrat Kons [S] (mM)	ΔA (405 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V$	$1/[S]$
110	20	10	140	0.71	0.01	8.44	0.1184	1.40
105		15		1.07	0.014	11.82	0.0846	0.93
85		35		2.5	0.029	24.48	0.0409	0.40
80		40		2.86	0.033	27.86	0.0359	0.35
75		45		3.21	0.04	33.77	0.0296	0.31
70		50		3.57	0.044	37.14	0.0269	0.28
60		60		4.29	0.047	39.68	0.0252	0.23

3.3.4 *o*-NPGal Substratının K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması

K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması amacıyla, *o*-NPGal (orto nitrofenol β -D-galaktopiranozid) substratının değişen konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. Kullanılan değerler ve elde edilen sonuçlar Çizelge 3.6'da verilmiştir. 420nm'de ölçülen aktivite değerleri ile reaksiyon hızı (U/mL) olarak hesaplandı. $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri kullanılarak Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 3.8). Grafikten yararlanarak zeytin meyvesi beta-glukozidaz enzimine ilişkin *p*-NPGal substratı için K_m değeri 5.92 mM ve V_{max} değeri 126.58 U/mg olarak bulunmuştur.



Şekil 3.8 *o*-NPGal Substratının K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasında kullanılan Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 3.6. Zeytin Beta-glukosidaz enziminin *o*-NPGal substratı kullanılarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde 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 (405 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V$	$1/[S]$
70	60	10	140	1.43	0.049	25.13	0.0398	0.70
68		12		1.72	0.054	27.69	0.0361	0.58
60		20		2.86	0.081	41.54	0.0241	0.35
55		25		3.57	0.087	44.62	0.0224	0.28
45		35		5.00	0.114	58.46	0.0171	0.20
40		40		5.70	0.124	63.59	0.0157	0.18
35		45		6.43	0.133	68.21	0.0147	0.16

Çizelge 3.7 Zeytin Beta-glukosidaz 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> NPG	370.37	2.22	166,83
<i>o</i> NPG	48.54	14.11	3.44
<i>p</i> NPGal	161.29	13.13	12.28
<i>o</i> NPGal	126.58	5.92	21.38

3.4 Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren Maddelerin IC_{50} Değerlerinin Bulunması

3.4.1 β -glukosidazların Genel İnhibitörlerinin IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi

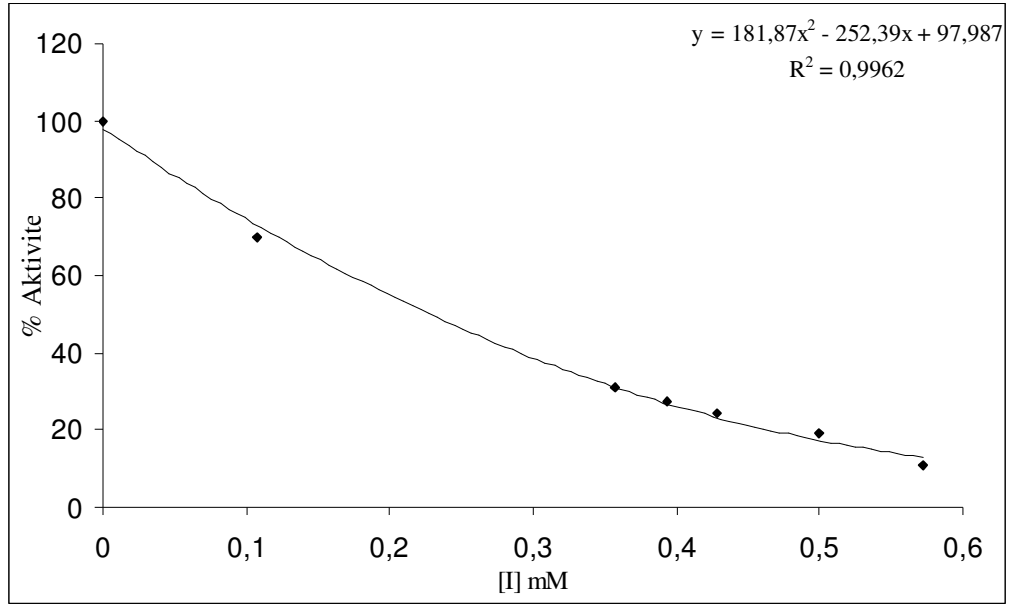
β -glukosidaz enzimlerinin literatürde en sık yer alan inhibitörlerinin glukoz ve δ -glukonolakton olduğu görülmektedir. Bu sebeple bu iki maddenin zeytin β -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırılmıştır.

3.4.1.1 β -glukosidazların Genel İnhibitörü Olan δ -glukonolaktonun IC_{50} Değerinin Belirlenmesi

δ -glukonolaktonun zeytin β -glukosidaz 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 0.11-0.57 mM arasında değişen konsantrasyonlarındaki % Aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan veriler Çizelge 3.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.8 Zeytin beta glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren δ -glukonolakton maddesinin IC₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar

50mM 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)	Δ A (405 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
80	δ -glukonolakton	20	40	-	-	0.46	49.20	100
65				15	0.11	0.321	28.36	69.78
30				50	0.36	0.142	10.42	30.87
25				55	0.40	0.126	35.60	27.39
20				60	0.43	0.113	21.71	24.57
10				70	0.50	0.087	16.50	18.91
0				80	0.57	0.051	13.89	11.09



Şekil 3.9 Saflaştırılmış zeytin beta-glukosidaz enzimi üzerine 1,36 mM p-NPG substratı konsantrasyonunda δ -glukonolaktonun % aktivite-[I] grafiği

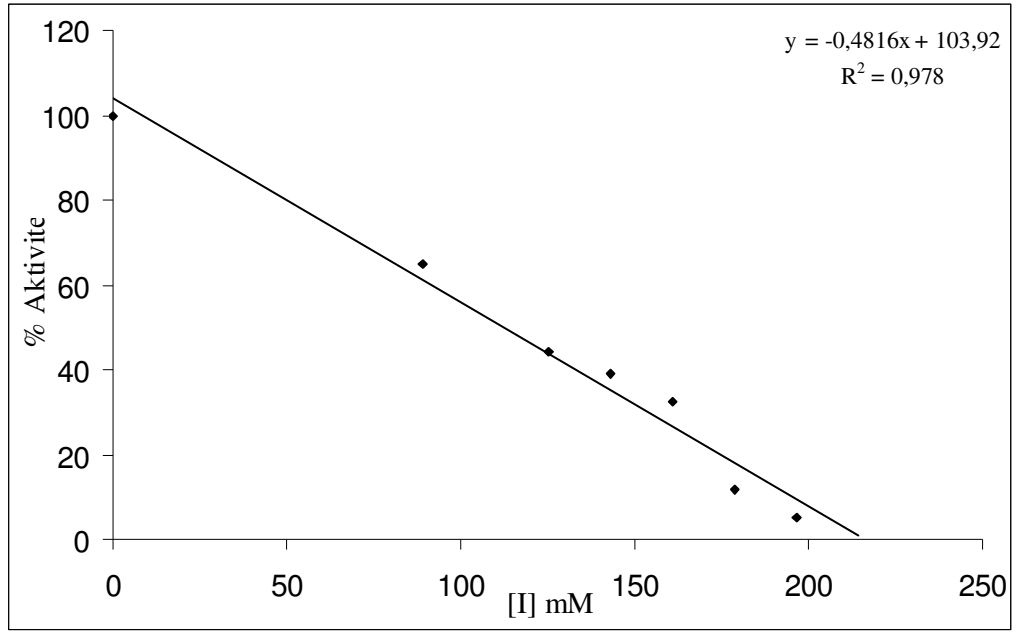
Çizelge 3.8'deki veriler ışığında δ -glukonolaktonun p-NPG substratı varlığındaki % Aktivite-[I] grafiği Şekil3.9'daki gibi çizilmiştir. Grafikteki denklemden yararlanarak zeytin beta-glukosidaz enzim aktivitesi üzerine δ -glukonolaktonun IC_{50} değeri 0.227 mM olarak hesaplanmıştır.

3.4.1.2 β -glukosidazların Genel İnhibitörü Olan Glukozun IC_{50} Değerinin Belirlenmesi

Glukozun zeytin β -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenirken, p-NPG substratının reaksiyon hacmindeki konsantrasyonu 2.85 mM olacak şekilde kullanılmıştır. Glukoz bulunmayan ortamdaki enzim aktivitesi %100 aktivite olarak alınmış ve glukozun 89.3 mM ile 196.4 mM arasında değişen konsantrasyonlarındaki % Aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan veriler Çizelge 3.9'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.9 Zeytin beta glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren glukozun IC₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar

50mM Na Ac Tamponu (µl)	İnhibitör	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µl)	Substrat çözeltisinin hacmi (µl)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (µl)	Kuyudaki İnhibitör Kons. [I] (mM)	ΔA (405 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
60	Glukoz	60	20	-	-	0.077	18.57	100
35				25	89.29	0.05	12.06	64.93
25				35	125.00	0.034	8.20	44.16
20				40	142.86	0.030	7.24	38.96
15				45	160.74	0.025	6.03	32.47
10				50	178.57	0.009	2.17	11.69
5				55	196.43	0.004	0.97	5.19



Şekil 3.10 Saflaştırılmış zeytin beta-glukosidaz enzimi üzerine 2.85 mM *p*-NPG substratı konsantrasyonunda glukozun % aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.9'daki verilere göre glukozun *p*-NPG substratı varlığındaki % Aktivite-[I] grafiği Şekil3.8'deki gibi çizilmiştir. Grafikteki denklemden yararlanarak zeytin beta-glukosidaz enzim aktivitesi üzerine glukozun IC₅₀ değeri 111,96 mM olarak hesaplanmıştır.

3.4.2 Enzim Aktivitesi Üzerine Etkili Bazı Pestisitlerin IC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi

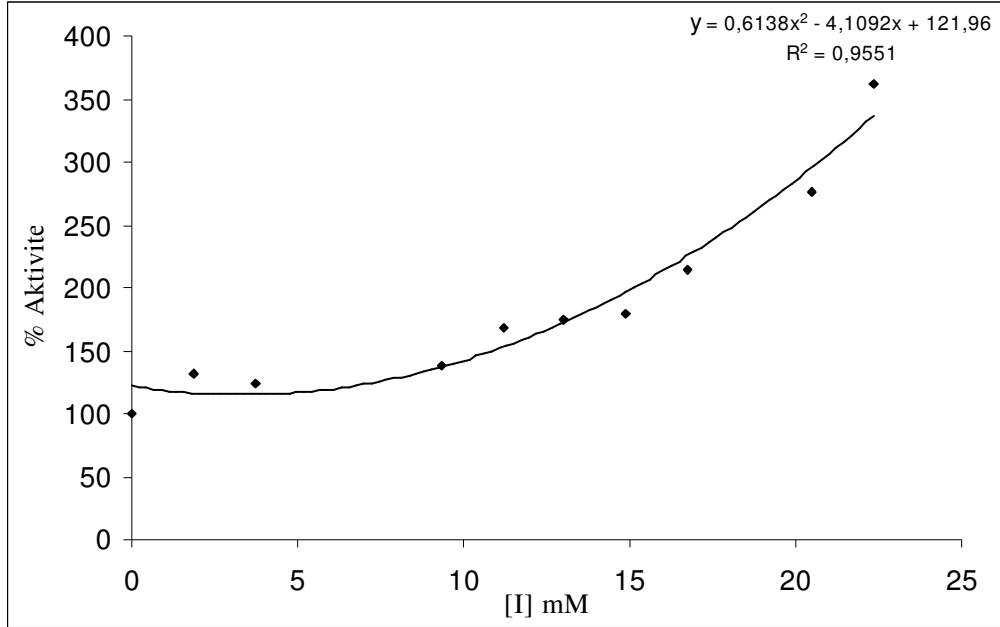
3.4.2.1 Herbisit Olan Glyphosate Pestisitinin IC₅₀ Değerinin Belirlenmesi

Glyphosat''ın zeytin β-glukosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırmak için *p*-NPG substratının reaksiyon hacmindeki konsantrasyonu 1.43mM alınmıştır. Glyphosat suda çözünebilir bir pestisit olduğundan reaksiyon hacmine katılmadan önce suda seyreltilmiştir. Glyphosat bulunmayan ortamdaki enzim aktivitesi %100 aktivite olarak alınmış ve glyphosatın 1.86 ile 22.36 mM arasındaki farklı konsantrasyonlarındaki % Aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan veriler Çizelge3.10'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.10 Zeytin beta glukosidaz enzimi üzerinde aktivite artışı gösteren glyphosate pestisitinin enzim aktivitesinde meydana getirdiği değişikliklerin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar

50mM Na Ac Tamponu (µl)	İnhibitör	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µl)	Substrat çözeltisinin hacmi (µl)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (µl)	Kuyudaki İnhibitör Kons. [I] (mM)	ΔA (405 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
70	Glyphosate	60	10	-	-	0.090	21.71	100
69				1	1.86	0.119	28.70	132.22
68				2	3.73	0.112	27.01	124.44
65				5	9.32	0.125	30.15	138.89
64				6	11.18	0.152	36.66	168.89
63				7	13.04	0.157	37.87	174.44
62				8	14.90	0.162	39.07	180.00
61				9	16.77	0.193	46.55	214.44
59				11	20.49	0.248	59.82	275.56
58				12	22.36	0.326	78.63	362.22

Çizelge 3.10'daki verilerle glyphosate pestisitinin p-NPG substratı varlığındaki % Aktivite-[I] grafiği Şekil3.11'deki gibi çizilmiştir. Grafikte de görüldüğü gibi diğer pestisitlerin aksine glyphosate pestisitinin, p-NPG varlığındaki zeytin β -glukosidaz enzim aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir.



Şekil 3.11 Saflaştırılmış zeytin beta-glukosidaz enzimi üzerine 1,43 mM pNPGlu substratı konsantrasyonunda Glyphosate pestisitinin % aktivite-[I] grafiği

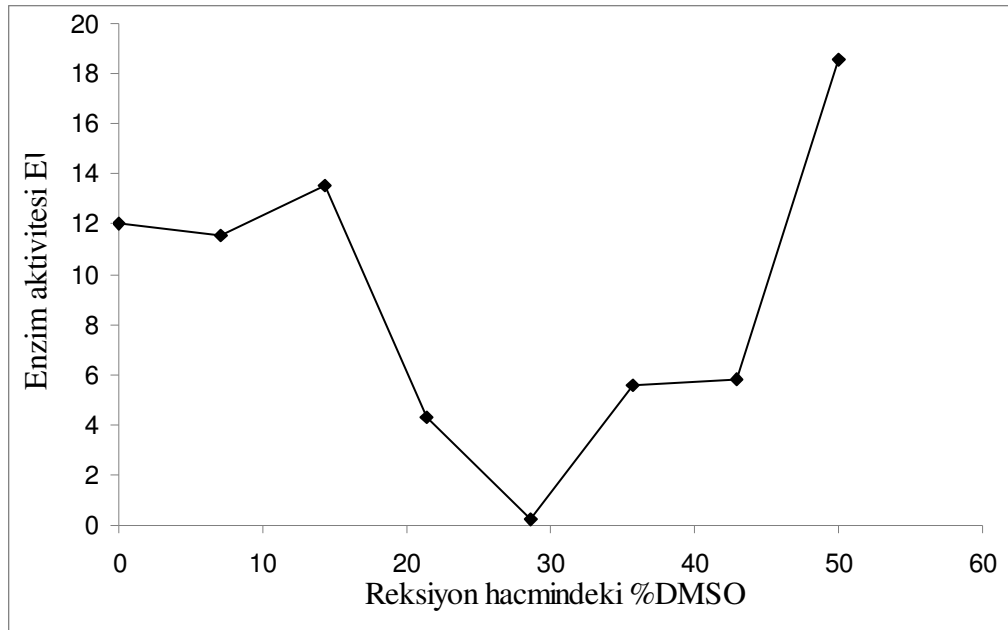
3.4.2.1 İnsektisit Olan Diazinon ve Deltamethrin Pestisitlerinin IC₅₀ Değerinin Belirlenmesi

Deltamethrin'in zeytin β -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisinin araştırılmasında p-NPG substratının reaksiyon hacmindeki konsantrasyonu 1.36mM olarak kullanılmıştır. Deltamethrin suda kısmen çözündüğü için reaksiyon hacmine katılmadan önce DMSO(Dimetilsülfoksit) içinde çözülmüştür. Bunun için öncelikle DMSO'in enzimi inhibe etmediği ve pestisitinin çözünebilir olduğu konsantrasyon aralığı tespit edilmiştir. Kullanılacak DMSO konsantrasyonunun tespitinde kullanılan deneysel veriler Çizelge 3.11'de verilmiştir. Çizelge 3.11'e göre çizilen Aktivite- % [DMSO] grafiği Şekil 3.12'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.11 DMSO'in zeytin β -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

50mM Na Ac Tampo nu (μ l)	Enzim Çözeltilis in Hacmi (μ l)	Substrat çözeltilis in hacmi (μ l)	DMSO Çözeltilis in Hacmi (μ l)	Kuyudaki % DMSO Kons.	ΔA (405 nm)	Aktivite (U/ml dak)
70	60	10	0	0	0.050	12.06
60			10	7.1	0.048	11.58
50			20	14.3	0.056	13.51
40			30	21.4	0.018	4.34
30			40	28.6	0.001	0.24
20			50	35.7	0.023	5.55
10			60	42.9	0.024	5.79
0			70	50.0	0.077	18.57

DMSO'in zeytin β -glukosidaz enzim aktivitesini reaksiyon hacminde % 14 konsantrasyona kadar etkilemediği tespit edilmiştir. Suda çözünmeyen pestisitler için reaksiyon hacminde maksimum %14 DMSO olacak şekilde pestisit miktarı koyularak IC_{50} ve inhibisyon tipi belirleme çalışmaları yapılmıştır.

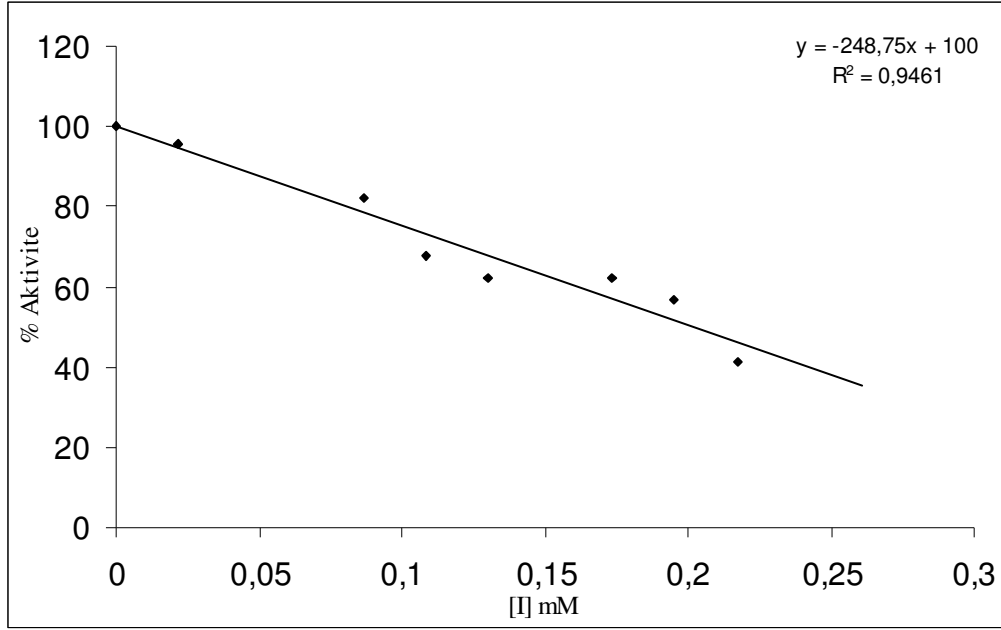


Şekil 3.12 DMSO'in zeytin β -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi gösteren Aktivite- %DMSO grafiği

Çizelge 3.12 Zeytin beta glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Diazinon ve Delthamethrin pestisitlerinin IC₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar

50mM Na Ac Tamponu (µl)	İnhibitör	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µl)	Substrat çözeltisinin hacmi (µl)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (µl)	Kuyudaki İnhibitör Kons. [I] (mM)	ΔA (405 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
70	Diazinon	60	10	-	-	0.09	21.71	100
69				1	0.022	0.086	20.74	95.56
66				4	0.087	0.074	17.85	82.22
65				5	0.109	0.061	14.72	67.78
64				6	0.130	0.056	13.51	62.22
62				8	0.174	0.056	13.51	62.22
61				9	0.195	0.051	12.30	56.67
60				10	0.217	0.037	8.92	41.11
70				Delthamethrin	60	10	-	-
69	1	0.004	0.053				12.78	58.89
67	3	0.011	0.036				8.68	40.00
66	4	0.014	0.022				5.31	24.44
64	6	0.021	0.017				4.10	18.89
63	7	0.025	0.017				4.10	18.89
61	9	0.032	0.016				3.859	17.78
59	11	0.039	0.015				3.618	16.67

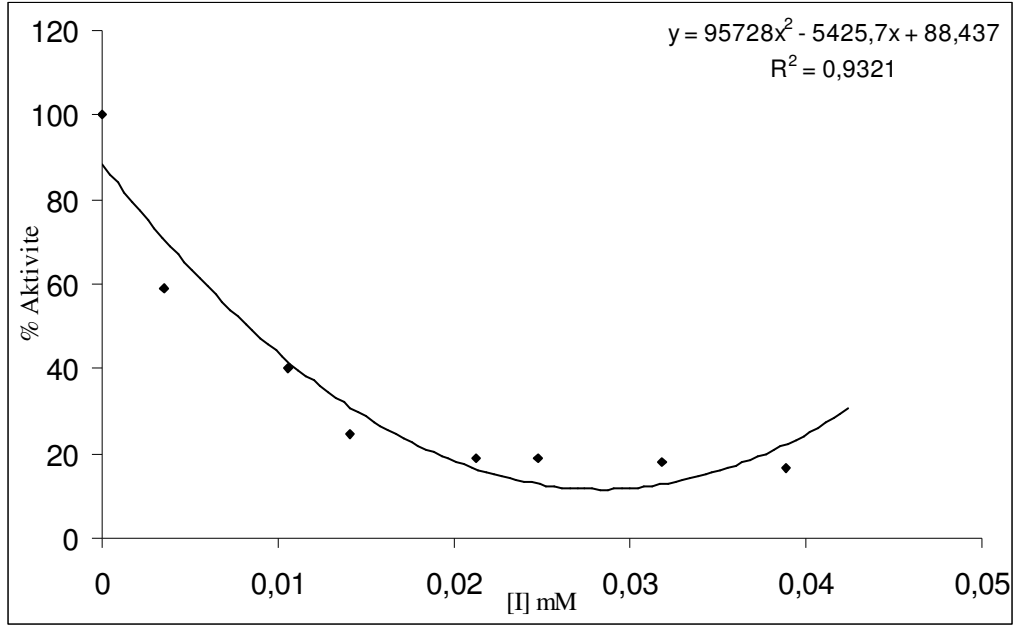
Diazinon pestisitinin zeytin β -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenirken p-NPG substratının reaksiyon hacmindeki konsantrasyonu 1.43mM olarak kullanılmıştır. Diazinon bulunmayan reaksiyon ortamındaki ortamdaki enzim aktivitesi %100 aktivite olarak kabul edilmiştir ve DMSO içinde çözünen diazinonun 0.02 ile 0.22 mM arasındaki farklı konsantrasyonlarında tespit edilen % Aktivite değerleri Çizelge3.12’de verilmiştir.



Şekil 3.13. Saflaştırılmış zeytin beta-glukosidaz enzimi üzerine 1,43 mM pNPGlu substratı konsantrasyonunda Diazinon pestisitinin % aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.12’deki verilerle çizilen diazinonun p-NPG substratı varlığındaki % Aktivite-[I] grafiği Şekil3.13’deki gibidir. Grafikteki doğru denkleminde yararlanılarak zeytin beta-glukosidaz enzim aktivitesi üzerine diazinonun IC_{50} değeri 0.2 mM olarak hesaplanmıştır.

Deltamethrin'in zeytin β -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenirken p-NPG substratının reaksiyon hacmindeki konsantrasyonu 1.43mM alınmıştır. Deltamethrin bulunmayan ortamdaki enzim aktivitesi %100 aktivite olarak alınmış ve deltamethrin'in DMSO içerisindeki 0.0035 ile 0.0389 mM arasındaki farklı konsantrasyonlarındaki % Aktivite değerleri Çizelge3.8'de verilmiştir.



Şekil 3.14 Saflaştırılmış zeytin beta-glukosidaz enzimi üzerine 1,43 mM pNPGlu substratı konsantrasyonunda Delthamethrin pestisitinin % aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.12'deki veriler ışığında deltamethrinin p-NPG substratı varlığındaki % Aktivite-[I] grafiği Şekil3.14'deki gibi çizilmiştir. Grafikteki doğru denklemden yararlanarak zeytin beta-glukosidaz enzim aktivitesi üzerine deltamethrinin IC₅₀ değeri 0.011 mM olarak hesaplanmıştır.

Zeytin tarımında sık kullanılan bu üç pestisitden glyphosatın enzimi inhibe etmeyip aktivitesini artırdığı gözlenirken insektisit türünde olan diazinon ve deltamethrin pestisitlerinin Çizelge 3.13'de verilen IC₅₀ değerlerinde enzimi inhibe ettiği tespit edilmiştir.

Çizelge 3.13 Zeytin β -glukosidaz enzimi üzerine araştırılan pestisitlerin etkileri

Pestisit	Türü	IC ₅₀
Glyphosate	Herbisit	İnhibisyon yok
Diazinon	İnsektisit	0.20 mM
Deltamethrin	İnsektisit	0.011 mM

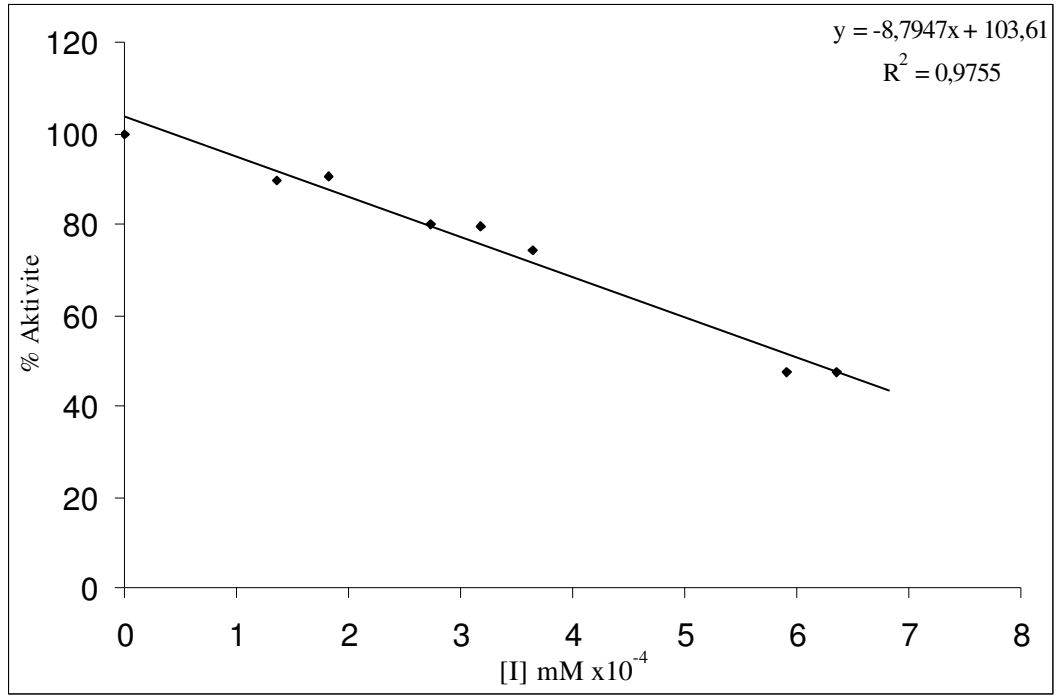
3.4.3 Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi Araştırılan Bazı Ağır Metallerin IC₅₀ Değerlerinin Bulunması

Ağır metaller, tarımda atık suların kullanılması, egzoz gazları çevre atıklarıyla bitkilere geçme riski yüksek olan maddelerdir. Ağır metallerin pek çok enzimi inhibe ettiği bilinmektedir.

Zeytin meyvesinden saflaştırılan toplam β -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine Fe, Cu, Ag, Ni, Pb, Cd ağır metallerin etkisi araştırılmıştır. Araştırma sırasında ilk önce, metallerin β -glukosidaz enzim aktivitesini %50 azaltan konsantrasyon değerleri bulundu. Bu amaçla yapılan çalışmalarda kullanılan hacim ve konsantrasyonlar Çizelge 3.14-3.16'da verilmiştir.

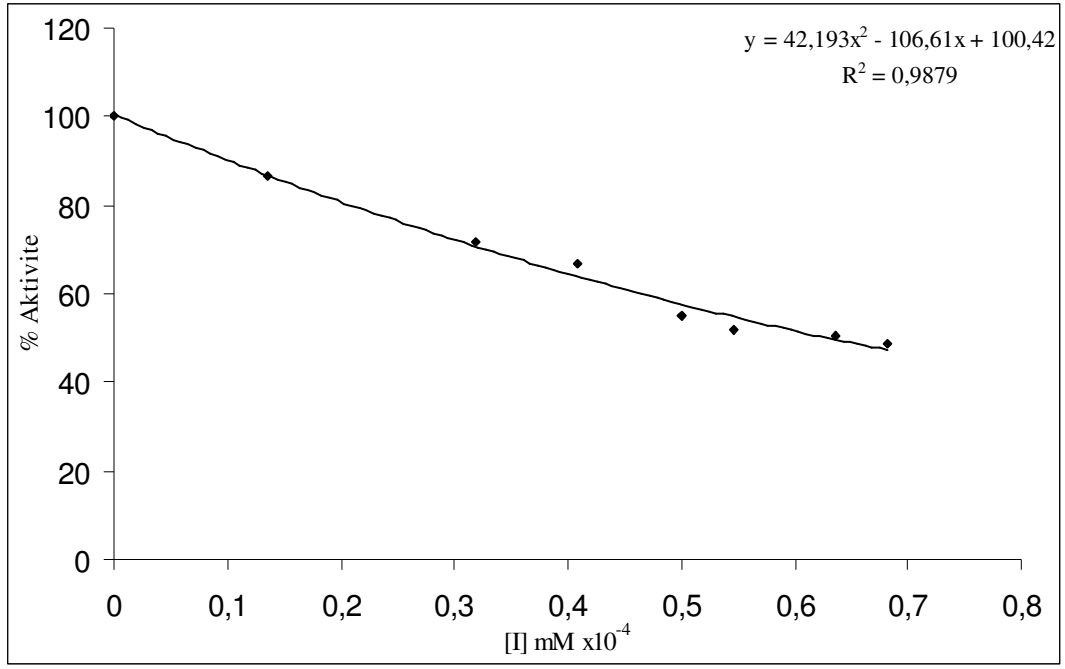
Çizelge 3.14 Zeytin beta glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Cu ve Ni ağır metallerinin IC₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçları

50mM Na Ac Tamponu (µl)	İnhibitör	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µl)	Substrat çözeltisinin hacmi (µl)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (µl)	Kuyudaki İnhibitör Kons. [I] (mMx10 ⁻⁴)	ΔA (405 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
150	Cu	60	10	-	-	0.156	32.85	100
120				30	1.36	0.140	29.48	89.74
110				40	1.82	0.141	29.69	90.39
90				60	2.73	0.125	26.32	80.13
80				70	3.18	0.124	26.11	79.49
70				80	3.64	0.116	24.43	74.36
20				130	5.91	0.074	15.58	47.44
10				140	6.36	0.074	15.58	47.44
150				Ni	60	10	-	-
120	30	0.14	0.233				49.06	86.62
80	70	0.32	0.193				40.64	71.75
60	90	0.41	0.180				37.90	66.91
40	110	0.50	0.148				31.16	55.02
30	120	0.55	0.139				29.27	51.67
10	140	0.64	0.136				28.64	50.56
0	150	0.68	0.131				27.58	48.70



Şekil 3.15. Saflaştırılmış zeytin beta-glukosidaz enzimi üzerine 1,36 mM pNPGlu substratı konsantrasyonunda Cu ağır metalinin % aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.14’de verilen deneysel sonuçlara dayanarak Cu ağır metalinin 1.36 mM p-NPG substratı varlığındaki % Aktivite-[I] grafiği Şekil3.15’deki gibi çizilmiştir. Grafikteki doğru denkleminde yararlanarak zeytin beta-glukosidaz enzim aktivitesi üzerine Cu ağır metalinin IC_{50} değeri 6.1×10^{-4} mM olarak hesaplanmıştır.

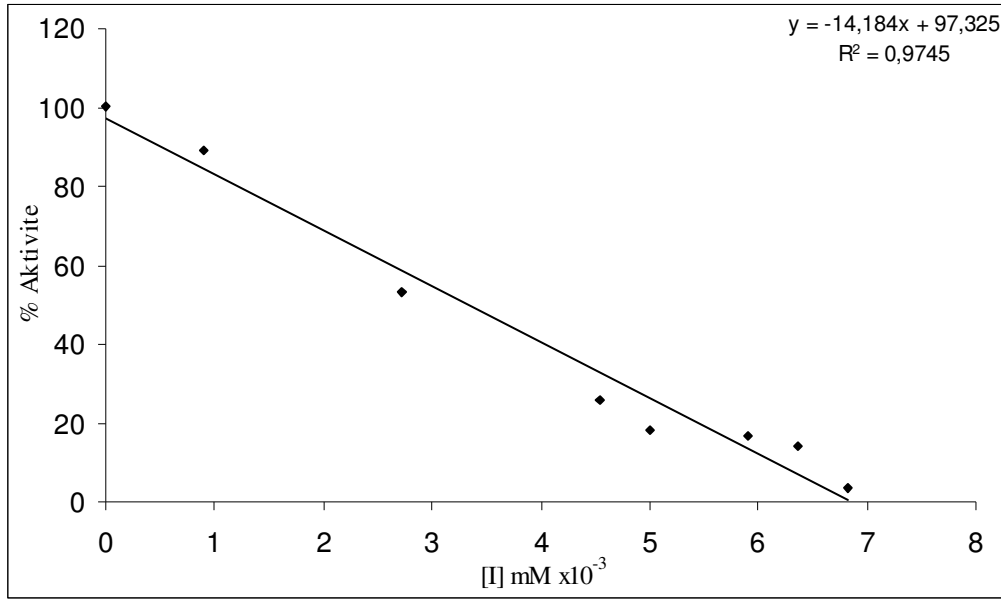


Şekil 3.16. Saflaştırılmış zeytin beta-glukosidaz enzimi üzerine 1,36 mM pNPGlu substratı konsantrasyonunda Ni ağır metalinin % aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.14’de verilen deneysel sonuçlara dayanarak Ni ağır metalinin 1.36 mM p-NPG substratı varlığındaki % Aktivite-[I] grafiği Şekil 3.16’daki gibi çizilmiştir. Grafikteki doğru denkleminde yararlanarak zeytin beta-glukosidaz enzim aktivitesi üzerine Ni ağır metalinin IC_{50} değerinin 0.63×10^{-4} mM olduğu hesaplanmıştır.

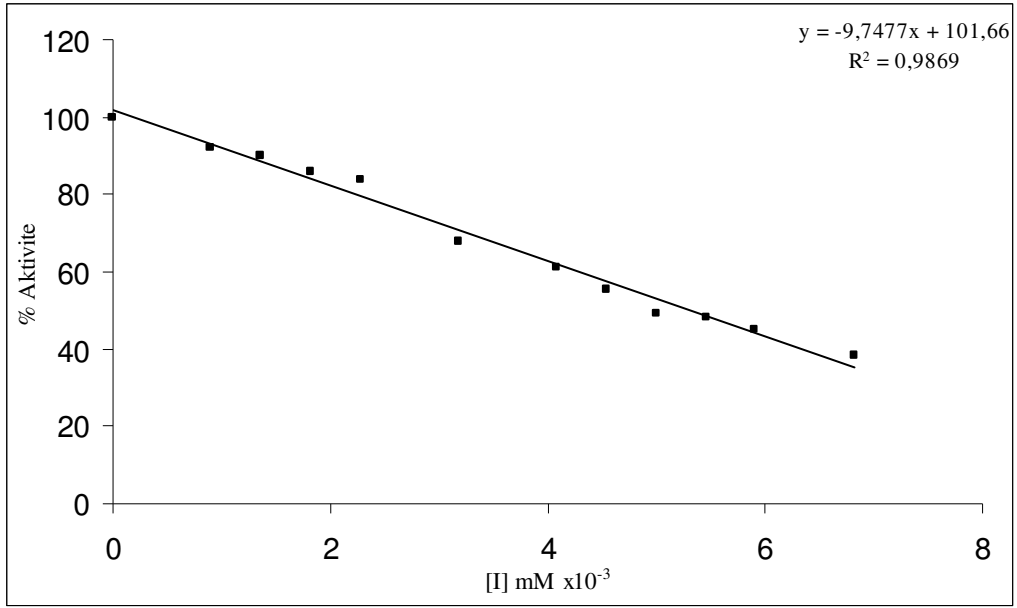
Çizelge 3.15 Zeytin beta glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Ag ve Pb ağır metallerinin IC₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar

50mM Na Ac Tamponu (µl)	İnhibitör	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µl)	Substrat çözeltisinin hacmi (µl)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (µl)	Kuyudaki İnhibitör Kons. [I] (mMx10 ⁻³)	ΔA (405 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
150	Ag	60	10	-	-	0.120	25.27	100
130				20	0.91	0.107	22.53	89.17
90				60	2.73	0.064	13.48	53.34
50				100	4.55	0.031	6.53	25.84
40				110	5	0.022	4.63	18.34
20				130	5.91	0.020	4.21	16.67
10				140	6.36	0.017	3.58	14.17
0				150	6.82	0.004	0.84	3.34
150				Pb	60	10	-	-
130	20	0.91	0.144				30.32	92.31
120	30	1.36	0.140				29.48	89.75
110	40	1.82	0.134				28.22	85.89
100	50	2.27	0.131				27.58	83.97
80	70	3.18	0.106				22.32	67.95
60	90	4.09	0.095				20.00	60.90
50	100	4.54	0.086				18.11	55.13
40	110	5	0.077				16.21	49.36
30	120	5.45	0.075				15.79	48.08
10	130	5.91	0.070				14.74	44.87
0	150	6.82	0.060				12.63	38.47



Şekil 3.17 Saflaştırılmış zeytin beta-glukosidaz enzimi üzerine 1,36 mM pNPGlu substratı konsantrasyonunda Ag ağır metalinin % aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.15’de verilen deneysel sonuçlara göre 0.91×10^{-3} ile 6.82×10^{-3} mM aralığındaki konsantrasyonlarda Ag ağır metalinin, 1.36 mM p-NPG substratı varlığındaki % Aktivite-[I] grafiği Şekil3.17’deki gibi çizilmiştir. Grafikteki doğru denkleminde yararlanarak zeytin beta-glukosidaz enzim aktivitesi üzerine Ag ağır metalinin IC_{50} değeri 3.34×10^{-3} mM olduğu bulunmuştur.

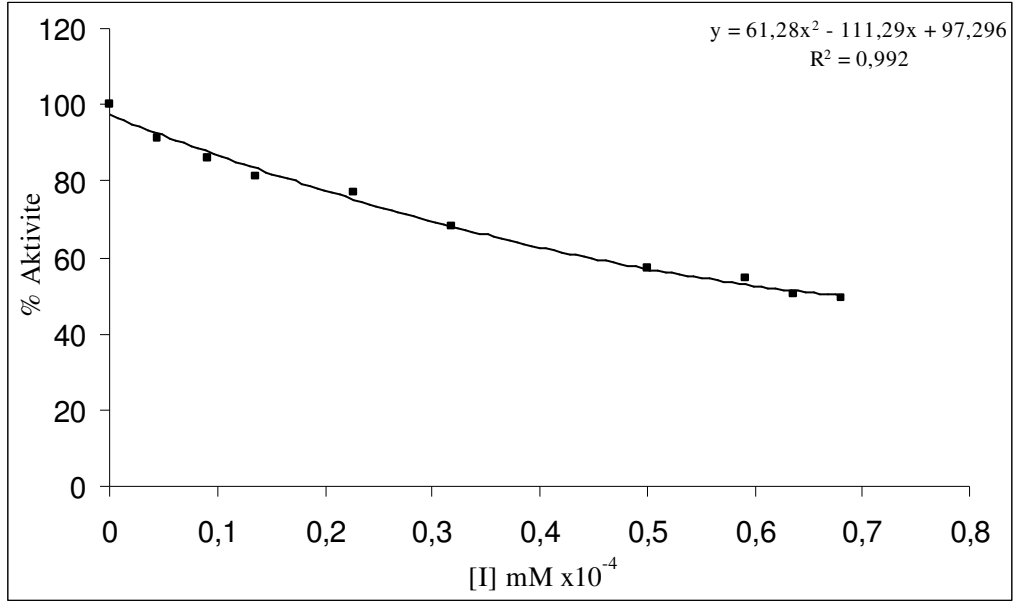


Şekil 3.18 Saflaştırılmış zeytin beta-glukosidaz enzimi üzerine 1,36 mM pNPGlu substratı konsantrasyonunda Pb ağır metalinin % aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.15’de verilen deneysel sonuçlara göre 0.91×10^{-3} ile 6.82×10^{-3} mM aralığındaki konsantrasyonlarda Pb ağır metalinin, 1.36 mM p-NPG substratı varlığındaki % Aktivite-[I] grafiği Şekil3.18’deki gibi çizilmiştir. Grafikteki doğru denkleminde yararlanarak zeytin beta-glukosidaz enzim aktivitesi üzerine Pb ağır metalinin IC_{50} değeri 5.3×10^{-3} mM olduğu bulunmuştur.

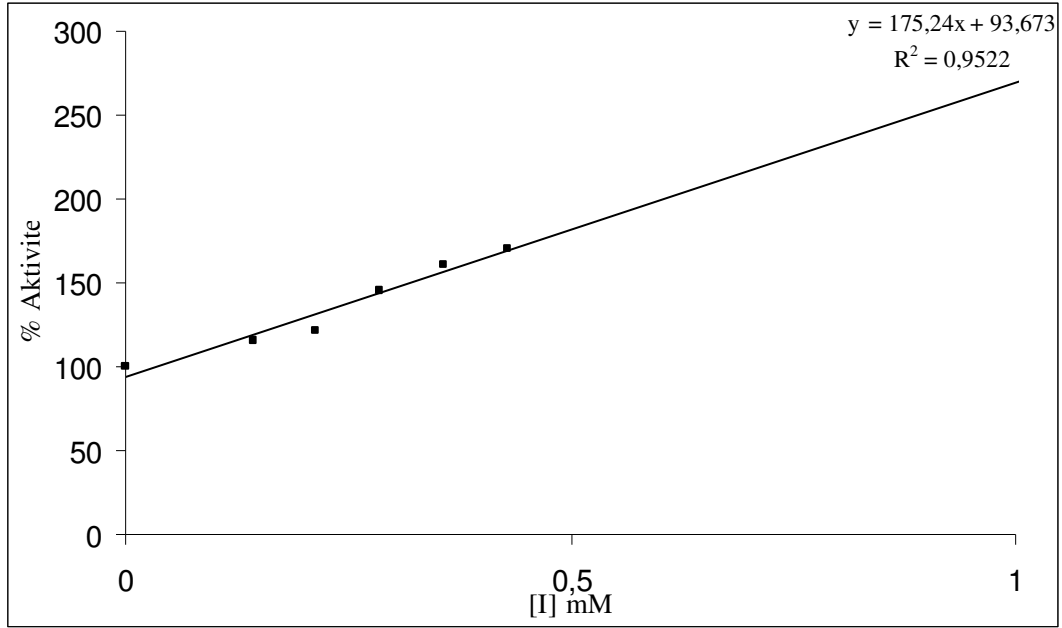
Çizelge 3.16 Zeytin beta glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Cd ve Fe ağır metallerinin IC₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar

50mM Na Ac Tamponu (µl)	İnhibitör	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µl)	Substrat çözeltisinin hacmi (µl)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (µl)	Kuyudaki İnhibitör Kons. [I] (mMx10 ⁻⁴)	ΔA (405 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite			
150	Cd			-	-	0.281	59.17	100			
140				10	0.05	0.256	53.91	91.10			
130				20	0.09	0.242	50.96	86.12			
120				30	0.14	0.228	48.01	81.14			
100				50	0.23	0.217	45.69	77.22			
80				70	0.32	0.191	40.22	67.97			
40				110	0.50	0.161	33.90	57.30			
20				130	0.59	0.153	32.22	54.45			
10				140	0.64	0.141	29.69	50.18			
0				150	0.68	0.139	29.27	49.47			
50mM Na Ac Tamponu (µl)				İnhibitör	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µl)	Substrat çözeltisinin hacmi (µl)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (µl)	Kuyudaki İnhibitör Kons. [I] (mM)	ΔA (405 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
72				Fe	60	8	-	-	0.105	25.31	100
52	20	0.14	0.121				29.16	115.24			
42	30	0.21	0.127				30.61	120.95			
32	40	0.29	0.152				36.63	144.77			
22	50	0.36	0.169				40.73	160.95			
12	60	0.43	0.179				43.14	170.48			



Şekil 3.19 Saflaştırılmış zeytin beta-glukosidaz enzimi üzerine 1,36 mM pNPGlu substratı konsantrasyonunda Cd ağır metalinin % aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.16’da verilen deney verilerine göre $0,05 \times 10^{-4}$ ile $0,68 \times 10^{-4}$ mM aralığındaki konsantrasyonlarda Cd ağır metalinin, 1,36 mM p-NPG substratı varlığındaki % Aktivite-[I] grafiği Şekil 3.19’daki gibi çizilmiştir. Grafikteki denklemden yararlanarak zeytin beta-glukosidaz enzim aktivitesi üzerine Cd ağır metalinin IC_{50} değeri $0,38 \times 10^{-4}$ mM olduğu bulunmuştur.



Şekil 3.20 Saflaştırılmış zeytin beta-glukosidaz enzimi üzerine 1,43 mM pNPGlu substratı konsantrasyonunda Fe ağır metalinin % aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.16'de verilen deney verilerine göre 0.14 ile 0.43 mM aralığındaki konsantrasyonlarda Fe ağır metalinin, 1.36 mM p-NPG substratı varlığındaki % Aktivite-[I] grafiği Şekil3.20'deki gibi çizilmiştir. Grafikte de görüldüğü gibi Fe'in p-NPG varlığındaki zeytin β -glukosidaz enzim aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir.

Çizelge 3.17 İnhibisyon etkisi gösteren ağır metallerin IC₅₀ değerleri

Ağır metal	IC ₅₀
Cu	6.1x10 ⁻⁴ mM
Ni	0.63x10 ⁻⁴ mM
Ag	3.34x10 ⁻³ mM
Pb	5.3x10 ⁻³ mM
Cd	0.38x10 ⁻⁴ mM
Fe	İnhibisyon yok

3.5. Enzim İnhibisyonuna Sebep Olan Maddelerin İnhibisyon Tiplerinin ve K_i Değerlerinin Bulunması

Beta-glukozidazların yaygın substratı olan *p*NPG substratı kullanılarak zeytin meyvesinden saflaştırılan beta-glukozidaz enzim aktivitesi üzerine genel inhibitörlerinden glukoz ve δ -glukonolaktonun, bazı pestisitlerin ve bazı ağır metallerin inhibisyon tipleri belirlenmiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada enzimin katalitik etkinliğinin en yüksek *p*NPG substratına karşı olduğu için tüm inhibisyon tipleri *p*NPG substratı varlığında bulunmuştur.

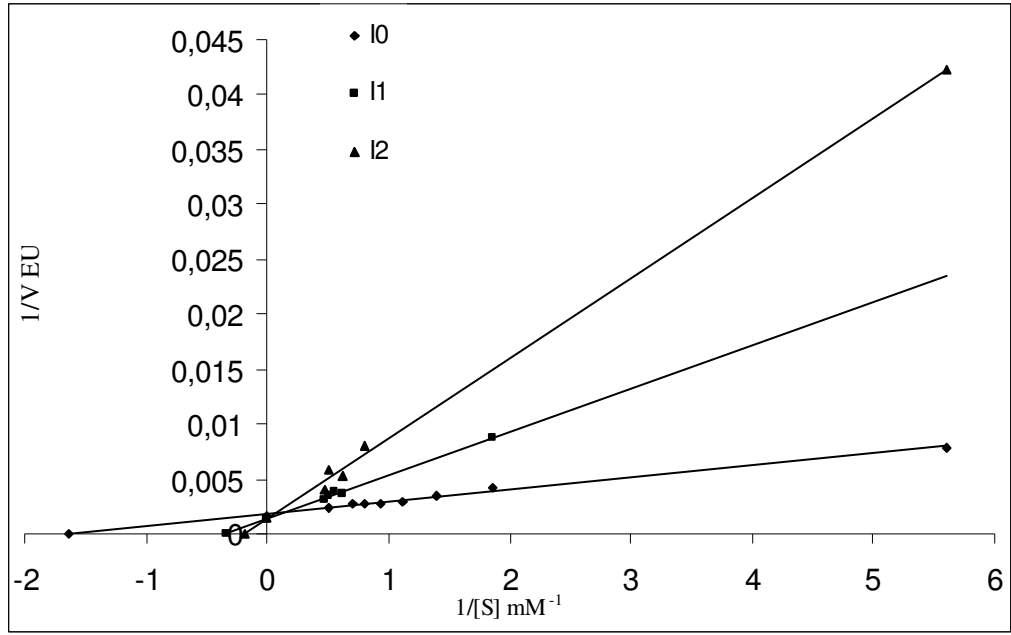
3.5.1 β -glukosidazların Genel İnhibiörü Olan Maddelerin İnhibisyon Tipinin ve K_i Değerinin Belirlenmesi

3.5.1.1 β -glukosidazların Genel İnhibiörü Olan δ -glukonolaktonun İnhibisyon Tipinin ve K_i Değerinin Belirlenmesi

δ -glukonolaktonun K_i sabitinin bulunması amacıyla, önce reaksiyon ortamında inhibitör yokken 12 farklı *p*NPG substrat konsantrasyonuna bağlı olarak aktiviteler bulundu. Daha sonra $3,57 \times 10^{-2}$ mM ve $10,71 \times 10^{-2}$ mM sabit δ -glukonolakton konsantrasyonlarında aktiviteler belirlendi (Çizelge 3.18). Belirlenen bu değerlerden $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri hesaplanarak, Lineweaver–Burk grafiğinde I1, I2 doğruları çizildi. Bu grafikten yararlanarak K_i değerleri ve inhibisyon türleri tespit edildi. K_i değerleri bölüm 2.2.8’de anlatıldığı gibi bulunmuştur.

Çizelge 3.18 Zeytin beta-glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren δ -glukonolaktonun K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

50mM Na- Ac tamponu (μ l)	Enzim Çözeltilisin in Hacmi (μ l)	Substrat çözeltilisini n hacmi (μ l)	İnhibitör Çözeltilisini n Hacmi (μ l)	Kuyudaki Toplam Hacim (μ l)	Kuyuda ki Substrat Kons. [S] (mM)	Kuyudaki İnhibitör Kons. [I] (mM)	ΔA (405 nm)	Aktivite (U/ml dak)	1/V	1/[S]
115	20	5	0	140	0.18	0	0.152	128.32	0.0077	5.6
105		15			0.54		0.286	241.44	0.0041	1.87
100		20			0.71		0.339	286.18	0.0034	1.40
95		25			0.89		0.399	336.83	0.0029	1.12
90		30			1.07		0.434	366.38	0.0027	0.93
85		35			1.25		0.434	366.38	0.0027	0.80
80		40			1.43		0.420	354.56	0.0028	0.70
65		55			1.96		0.512	432.22	0.0023	0.51
100		20			15		5	140	0.54	3.57×10^{-2}
70	45		1.61	0.331	279.43	0.0035			0.62	
65	50		1.79	0.303	255.79	0.0039			0.56	
60	55		1.96	0.349	294.62	0.0033			0.51	
55	60		2.14	0.392	330.92	0.0030			0.47	
100	20	5	15	140	0.18	10.71×10^{-2}	0.028	23.64	0.0423	5.60
70		35			1.25		0.148	124.94	0.0080	0.80
60		45			1.61		0.221	186.57	0.0053	0.62
50		55			1.96		0.202	170.53	0.0058	0.51
45		60			2.14		0.291	245.66	0.0040	0.47

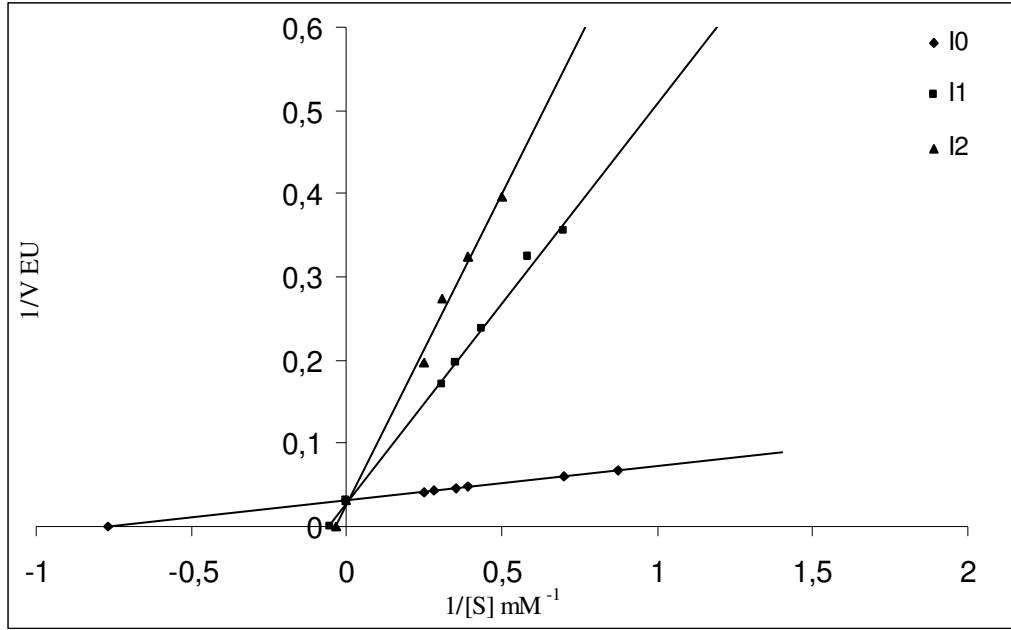


Şekil 3.21 Zeytin β -glukosidaz enziminin *p*NPG substratı varlığındaki δ -glukonolakton inhibitörünün inhibisyon etkisinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği

Şekil 3.21.'deki Lineweaver-Burk grafiğinden, δ -glukonolakton genel inhibitörünün zeytin Beta-glukosidaz enziminin *p*NPGlu substratı üzerine kompetitif (yarışmalı) tipte inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. δ -glukonolaktonun $[I_1]= 0,0357$ mM ve $[I_2]=0,1071$ mM olarak iki farklı konsantrasyondaki aktiviteler kullanılarak çizilen grafikten K_i değeri $0,016271 \pm 0,002731$ olarak hesaplanmıştır.

3.5.1.2 β -glukosidazların Genel İnhibiörü Olan Glukozun İnhibisyon Tipinin ve K_i Değerinin Belirlenmesi

Glukozun K_i sabitinin bulunması amacıyla, önce reaksiyon ortamında inhibitör yokken farklı p NPG substrat konsantrasyonuna bağlı olarak aktiviteler bulundu. Daha sonra 17.86mM ve 142.86 mM sabit glukoz konsantrasyonlarında aktiviteler Çizelge 3.19’da gösterildiği gibi elde edildi. Belirlenen bu değerlerden $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri hesaplanarak, Şekil 3.22’deki Lineweaver–Burk çizildi.



Şekil 3.22 Zeytin Beta-glukosidaz enziminin p NPGlu substratı varlığındaki glukozun inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği

Şekil 3.22.’deki Lineweaver-Burk grafiğinden, glukozun zeytin Beta-glukosidaz enzimini p NPGlu substratı varlığında kompetitif (yarışmalı) tipte inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. Glukozun $[I_1]= 17.86$ mM ve $[I_2]=142.86$ mM olarak iki farklı konsantrasyonundaki aktiviteler kullanılarak çizilen grafikten K_i değerinin 4.9333 ± 3.3036 olduğu hesaplanmıştır.

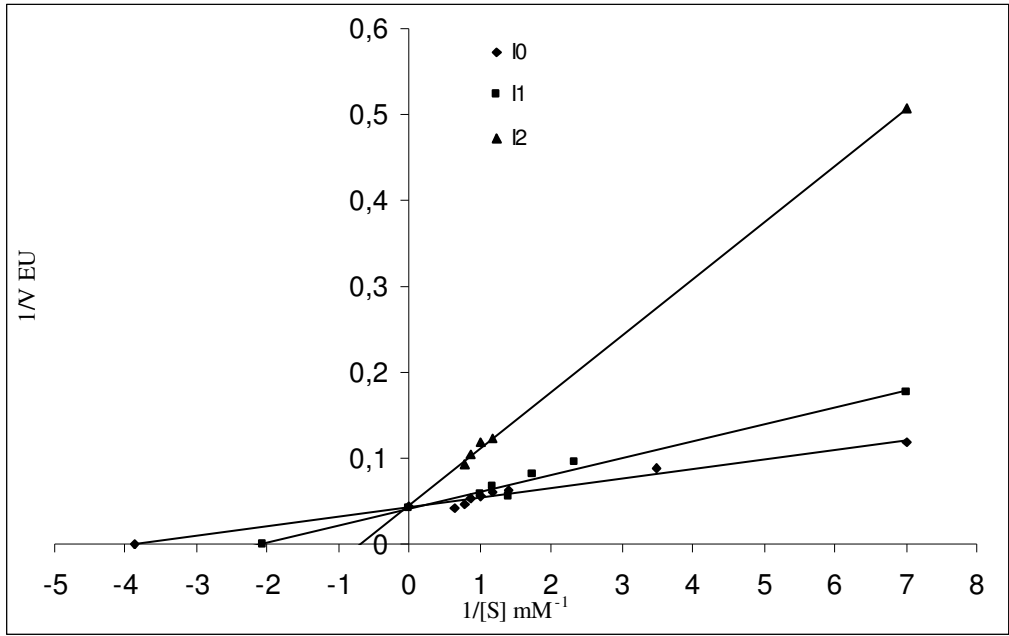
Çizelge 3.19 Zeytin β -glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren glukozun K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

50mM Na- Ac tamponu (μ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat çözeltisinin hacmi (μ l)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Kuyudaki Toplam Hacim (μ l)	Kuyudaki Substrat Kons. [S] (mM)	Kuyudaki İnhibitör Kons. [I] (mM)	ΔA (405 nm)	Aktivite (U/ml dak)	1/V	1/[S]
72	60	8	0	140	1.14	0	0.053	14.91	0.0670	0.88
70		10			1.42		0.059	16.60	0.0602	0.70
62		18			2.57		0.075	21.11	0.0473	0.39
60		20			2.86		0.078	21.95	0.0455	0.35
55		25			3.57		0.082	23.07	0.0433	0.28
52		28			4.00		0.086	24.20	0.0413	0.25
65	60	10	5	140	1.43	17.86	0.010	2.81	0.3553	0.70
63		12			1.71		0.011	3.10	0.3230	0.58
59		16			2.29		0.015	4.22	0.2369	0.44
55		20			2.86		0.018	5.07	0.1974	0.35
52		23			3.29		0.021	5.91	0.1692	0.30
26	60	14	40	140	2	142.86	0.009	2.53	0.3948	0.50
22		18			2.57		0.011	3.10	0.3230	0.39
17		23			3.29		0.013	3.66	0.2733	0.30
12		28			3.57		0.018	5.07	0.1974	0.25

3.5.2 Enzim Aktivitesi Üzerine Etkili Bazı Pestisitlerin İnhibisyon Tiplerinin ve K_i Değerlerinin Belirlenmesi

3.5.2.1 Deltamethrin Pestisitinin İnhibisyon Tipinin ve K_i Değerinin Bulunması

Deltamethrin pestisitinin zeytin β -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon tipinin belirlenmesi için Bölüm 2.2.8'de anlatıldığı şekilde değerler bulunmuş ve Çizelge 3.15'de verilmiştir. Çizelge 3.15'deki verilerle Şekil 3.23'deki Lineweaver-Burk grafiği çizilmiştir.



Şekil 3.23 Deltamethrin pestisitinin zeytin beta-glukosidaz enziminin pNPGlu substratı varlığındaki inhibisyon etkisinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği

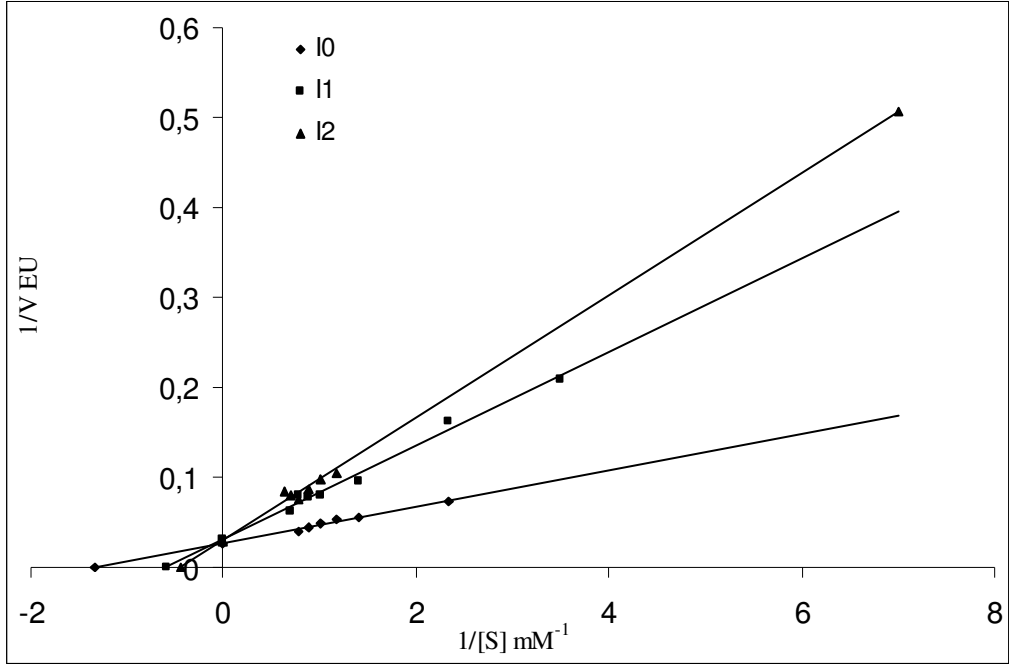
Şekil 3.23.'deki Lineweaver-Burk grafiğinden, deltamethrin pestisitinin zeytin β -glukosidaz enziminin pNPGlu substratı varlığında kompetitif (yarışmalı) tipte inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. Deltamethrin pestisitinin $[I_1]=0.003534$ mM ve $[I_2]=0.02474$ mM olarak iki farklı konsantrasyondaki aktiviteler kullanılarak çizilen grafikten K_i değeri 0.004834 ± 0.00023 mM olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.20. Zeytin beta-glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren deltamethrin pestisitinin K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, pestisit konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

50mM Na- Ac tamponu (μ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat çözeltisinin hacmi (μ l)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Kuyudaki Toplam Hacim (μ l)	Kuyudaki Substrat Kons. [S] (mM)	Kuyudaki İnhibitör Kons. [I] (mM)	ΔA (405 nm)	Aktivite (U/ml dak)	1/V	1/[S]
79	60	1	0	140	0.14	0	0.035	9.85	0.1185	7.00
78		2			0.29		0.047	13.23	0.0882	3.50
75		5			0.71		0.065	18.29	0.0638	1.40
74		6			0.86		0.068	19.14	0.0610	1.17
73		7			1.00		0.074	20.83	0.0560	1.00
72		8			1.14		0.079	22.23	0.0525	0.88
71		9			1.29		0.087	24.48	0.0477	0.78
69		11			1.57		0.097	27.29	0.0427	0.64
78	60	1	1	140	0.14	3.53×10^{-3}	0.020	5.63	0.1777	7.00
76		3			0.43		0.037	10.41	0.0961	2.33
75		4			0.57		0.044	12.38	0.0808	1.75
74		5			0.71		0.065	18.29	0.0547	1.40
73		6			0.86		0.052	14.63	0.0683	1.17
72		7			1.00		0.061	17.17	0.0583	1.00
72	60	1	7	140	0.14	24.74×10^{-3}	0.007	1.97	0.5077	7.00
69		4			0.57		0.030	8.16	0.1225	1.17
67		6			0.86		0.029	8.44	0.1185	1.00
66		7			1.00		0.030	9.57	0.1045	0.88
65		8			1.14		0.034	10.69	0.0935	0.78

3.5.2.2 Diazinon Pestisitinin İnhibisyon Tipinin ve K_i Değerinin Bulunması

Diazinon pestisitinin zeytin β -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon tipinin belirlenmesi için Bölüm 2.2.8’de anlatıldığı şekilde deneysel veriler bulunmuş ve Çizelge 3.21’de verilmiştir. Çizelge Çizelge 3.21’deki değerlerle Şekil 3.24’deki Lineweaver-Burk grafiği çizilmiştir.



Şekil 3.24 Diazinon pestisitinin zeytin Beta-glukosidaz enziminin pNPG substrat aktivitesi üzerindeki inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği

Şekil 3.24.’deki Lineweaver-Burk grafiğinden. diazinon pestisitinin zeytin Beta-glukosidaz enziminin pNPG substratı üzerine kompetitif (yarışmalı) tipte inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. Reaksiyon ortamındaki diazinon pestisiti 0.1086mM ve 0.2171mM olacak şekilde iki farklı konsantrasyon kullanılarak çizilen grafikten K_i değeri $0,080775 \pm 0,011249$ mM olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.21 Zeytin beta-glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren diazinon pestisitinin K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, pestisit konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

50mM Na- Ac tamponu (μ l)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Substrat çözeltilisinin hacmi (μ l)	İnhibitör Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Kuyudaki Toplam Hacim (μ l)	Kuyudaki Substrat Kons. [S] (mM)	Kuyudaki İnhibitör Kons. [I] (mM)	ΔA (405 nm)	Aktivite (U/ml dak)	1/V	1/[S]
77	60	3	0	140	0.43	0	0.048	13.51	0.0740	2.33
75		5			0.71		0.065	18.29	0.0547	1.40
74		6			0.86		0.068	19.14	0.0523	1.17
73		7			1.00		0.074	20.82	0.0480	1.00
72		8			1.14		0.079	22.23	0.0449	0.88
71		9			1.29		0.087	24.48	0.0409	0.78
73	60	2	5	140	0.29	108.57×10^{-3}	0.017	4.78	0.2090	3.50
72		3			0.43		0.022	6.19	0.1615	2.33
70		5			0.71		0.037	10.41	0.0960	1.40
68		7			1.00		0.044	12.38	0.0808	1.00
67		8			1.14		0.046	12.94	0.0773	0.88
66		9			1.29		0.045	12.66	0.0789	0.78
65	10	1.43	0.057	16.04	0.0623	0.70				
69	60	1	10	140	0.14	217.14×10^{-3}	0.007	1.97	0.5077	7.00
64		6			0.86		0.034	9.57	0.1045	1.17
63		7			1.00		0.036	10.13	0.0987	1.00
62		8			1.14		0.041	11.54	0.0866	0.88
61		9			1.29		0.047	13.23	0.0756	0.78
60		10			1.43		0.045	12.66	0.0789	0.70
59	11	1.57	0.042	11.82	0.0846	0.64				

Çizelge3.22 Enzim aktivitesi üzerine etkili bazı pestisitlerin inhibisyon tipleri ve K_i değerleri

İnhibe Eden Madde	K_i (mM)	İnhibisyon Tipi
Deltamethrin	0.004834±0.00023	Yarışmalı
Diazinon	0,080775±0,011249	Yarışmalı

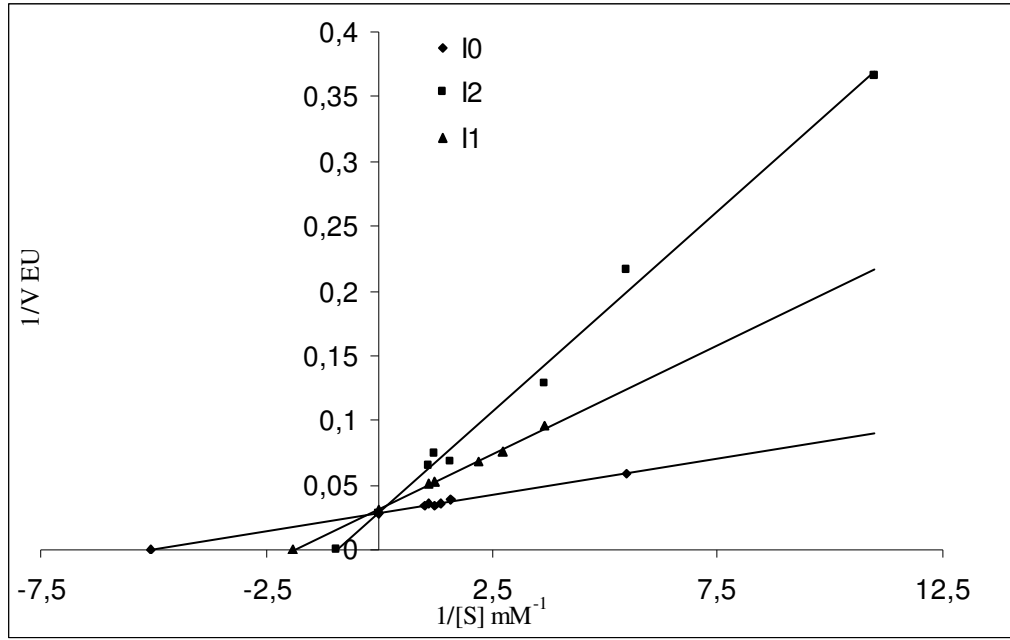
3.5.3 Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi Araştırılan Bazı Ağır Metallerin İnhibisyon Tiplerinin ve K_i Değerlerinin Bulunması

3.5.3.1 Cu Ağır Metalinin İnhibisyon Tipinin ve K_i Değerinin Bulunması

Cu ağır metalinin zeytin β -glukosidaz enzim aktivitesini inhibe ettiği belirlenmiştir. Cu'ın enzim üzerine inhibisyon tipinin belirlenmesi için Bölüm 2.2.8'de açıklandığı gibi çalışma yapılmış ve bulunan deneysel sonuçlar Çizelge 3.23'te verilmiştir. Çizelge 3.23'teki değerlerle Şekil 3.25'deki Lineweaver-Burk grafiği elde edilmiştir.

Çizelge 3.23 Zeytin beta-glukosidaz enzimi üzerine Cu ağır metalinin K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, ağır metal konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

50mM Na- Ac tamponu (μ l)	Enzim Çözeltilerin Hacmi (μ l)	Substrat çözeltilerinin hacmi (μ l)	İnhibitör Çözeltilerinin Hacmi (μ l)	Kuyudaki Toplam Hacim (μ l)	Kuyudaki Substrat Kons. [S] (mM)	Kuyudaki İnhibitör Kons. [I] (mM)	ΔA (405 nm)	Aktivite (U/ml dak)	1/V	1/[S]
158	60	2	-	220	0.18	-	0.080	16.85	0.0594	5.50
153		7			0.64		0.123	25.90	0.0386	1.58
152		8			0.73		0.134	28.22	0.0354	1.38
151		9			0.82		0.137	28.85	0.0347	1.22
150		10			0.91		0.134	28.22	0.0354	1.10
149		11			1.00		0.142	29.90	0.0334	1.00
57	60	3	50	220	0.28	3.57×10^{-4}	0.050	10.53	0.0949	3.67
56		4			0.36		0.063	13.27	0.0753	2.75
55		5			0.46		0.070	14.74	0.0678	2.20
51		9			0.82		0.090	18.95	0.0528	1.22
50		10			0.91		0.093	19.58	0.0511	1.10
109	60	1	100	220	0.09	7.14×10^{-4}	0.013	2.74	0.3653	11.00
108		2			0.18		0.022	4.63	0.2159	5.50
107		3			0.27		0.037	7.79	0.1284	3.67
103		7			0.64		0.068	14.74	0.0678	1.57
101		9			0.82		0.064	13.48	0.0742	1.22
100		10			0.91		0.074	15.58	0.0642	1.10



Şekil 3.25 Cu ağır metalinin zeytin Beta-glukosidaz enziminin *p*NPG substrat aktivitesi üzerindeki inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği

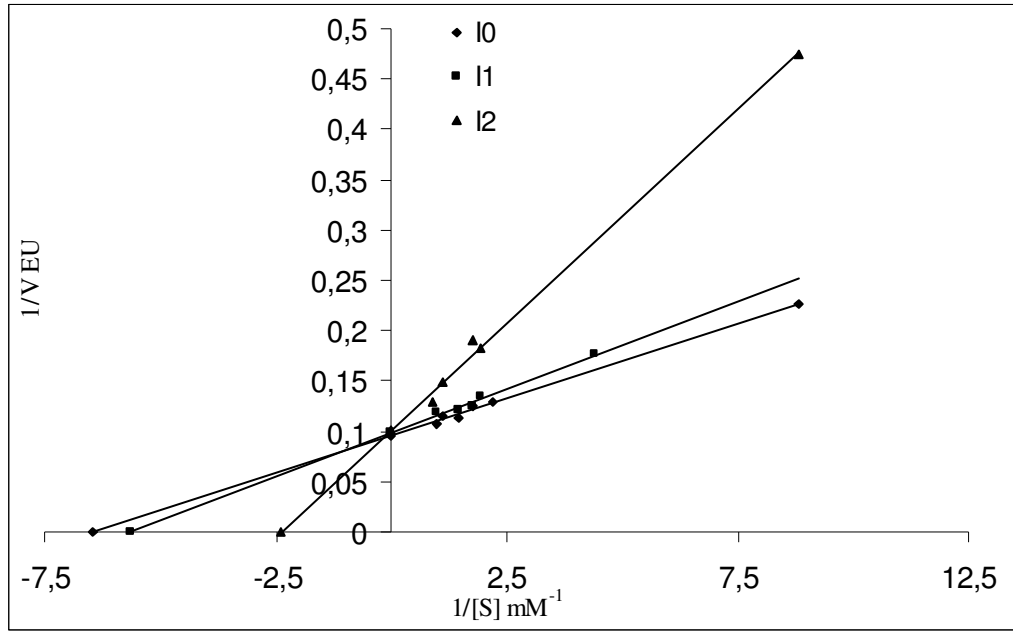
Şekil 3.25.'deki Lineweaver-Burk grafiğinden. Cu ağır metalinin zeytin Beta-glukosidaz enziminin *p*NPG substratı üzerine kompetitif (yarışmalı) tipte inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. Reaksiyon ortamındaki Cu ağır metalinin 3.57×10^{-4} mM ve 7.14×10^{-4} mM olacak şekilde iki farklı konsantrasyon kullanılarak çizilen grafikten K_i değeri $2.263 \times 10^{-4} \pm 1.48 \times 10^{-4}$ mM olarak hesaplanmıştır.

3.5.3.2 Ni Ağır Metalinin İnhibisyon Tipinin ve K_i Değerinin Bulunması

Ni'in zeytin β -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon tipinin araştırılması için Bölüm 2.2.8'de açıklanana yöntem izlenerek bulunan sonuçlar Çizelge 3.24'te verilmiştir. Çizelge 3.24'teki değerlerle Şekil 3.26'daki Lineweaver-Burk grafiği elde edilmiştir.

Çizelge 3.24 Zeytin beta-glukosidaz enzimi üzerine Ni ağır metalinin K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, ağır metal konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

50mM Na- Ac tamponu (μ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat çözeltisinin hacmi (μ l)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Kuyudaki Toplam Hacim (μ l)	Kuyudaki Substrat Kons. [S] (mM)	Kuyudaki İnhibitör Kons. [I] (mM)	ΔA (405 nm)	Aktivite (U/ml dak)	1/V	1/[S]
159	60	1	-	220	0.11	-	0.021	4.42	0.2261	8.8
156		4			0.46		0.037	7.79	0.1283	2.2
155		5			0.57		0.038	8.00	0.1249	1.76
154		6			0.68		0.042	8.84	0.1131	1.47
152		8			0.91		0.041	8.63	0.1158	1.1
151		9			1.02		0.044	9.27	0.1079	0.98
88	60	2	70	220	0.23	3.18×10^{-5}	0.027	5.69	0.1759	4.4
85.5		4.5			0.51		0.035	7.37	0.1357	1.96
85		5			0.57		0.038	8.00	0.1249	1.76
84		6			0.68		0.039	8.21	0.1218	1.47
81		9			1.02		0.040	8.42	0.1187	0.98
19	60	1	140	220	0.11	6.36×10^{-5}	0.010	2.11	0.4749	8.8
15.5		4.5			0.51		0.026	5.47	0.1827	1.95
15		5			0.57		0.025	5.26	0.1900	1.76
13		8			0.91		0.032	6.74	0.1484	1.1
10		10			1.14		0.037	7.79	0.1284	0.88



Şekil 3.26 Ni ağır metalinin zeytin Beta-glukosidaz enziminin *p*NPG substrat aktivitesi üzerindeki inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği

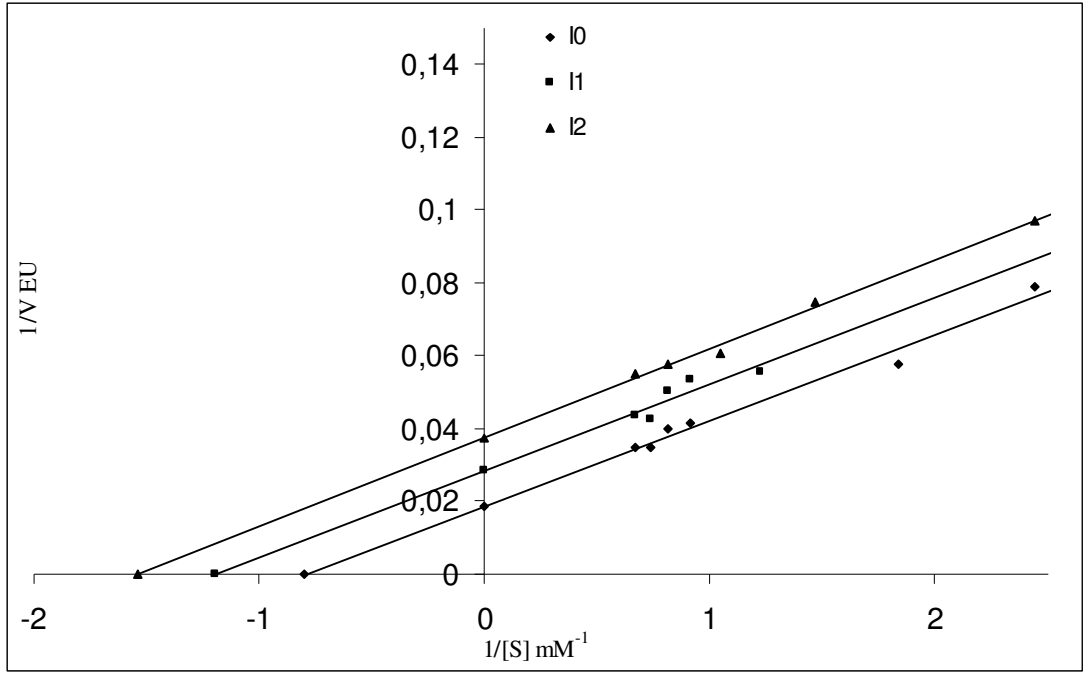
Şekil 3.26.'daki Lineweaver-Burk grafiğinden. Ni ağır metalinin zeytin Beta-glukosidaz enziminin *p*NPG substratı üzerine kompetitif (yarışmalı) tipte inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. Reaksiyon ortamındaki Ni ağır metalinin 3.18×10^{-5} mM ve 6.36×10^{-5} mM olacak şekilde iki farklı konsantrasyon kullanılarak çizilen grafikten K_i değeri $10.43 \times 10^{-5} \pm 6.98 \times 10^{-5}$ mM olarak hesaplanmıştır.

3.5.3.3 Ag Ağır Metalinin İnhibisyon Tipinin ve K_i Değerinin Bulunması

Ag metalinin zeytin meyvesinden saflaştırılan β -glukosidaz enzimini inhibe ettiği bulunmuştur. Ag'ün inhibisyon tipinin belirlenmesi için yapılan çalışmada Çizelge 3.25'te verilen değerler elde edilmiştir. Ag'ün zeytin β -glukosidaz enzimi üzerine inhibisyon tipi bu değerlerle çizilen Lineweaver-Burk grafiğinden tespit edilmiştir.

Çizelge 3.25 Zeytin beta-glukosidaz enzimi üzerine Ag ağır metalinin K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat. ağır metal konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

50mM Na- Ac tamponu (μ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat çözeltisinin hacmi (μ l)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Kuyudaki Toplam Hacim (μ l)	Kuyudaki Substrat Kons. [S] (mM)	Kuyudaki İnhibitör Kons. [I] (mM)	ΔA (405 nm)	Aktivite (U/ml dak)	1/V	1/[S]
157	60	3	-	220	0.41	-	0.067	14.11	0.0709	2.44
156		4			0.55		0.092	19.37	0.0516	1.83
155		5			0.68		0.115	24.22	0.0413	1.47
152		8			1.09		0.127	26.74	0.0374	0.92
151		9			1.23		0.132	27.80	0.0360	0.82
150		10			1.36		0.153	32.22	0.0310	0.73
149		11			1.50		0.153	32.22	0.0310	0.67
134	60	6	20	220	0.82	20	0.095	20.00	0.0499	1.22
132		8			1.09		0.099	20.85	0.0479	0.92
131		9			1.23		0.105	22.11	0.0453	0.82
130		10			1.36		0.124	26.11	0.0383	0.73
129		11			1.50		0.122	25.69	0.0389	0.67
87	60	3	70	220	0.41	70	0.054	11.37	0.0879	2.44
85		5			0.68		0.071	14.95	0.0669	1.47
83		7			0.95		0.085	17.89	0.0559	1.05
80		10			1.36		0.087	18.32	0.0495	0.82
79		11			1.50		0.087	18.32	0.0495	0.67



Şekil 3.27 Ag ağır metalinin zeytin Beta-glukosidaz enziminin pNPGlu substrat aktivitesi üzerindeki inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği

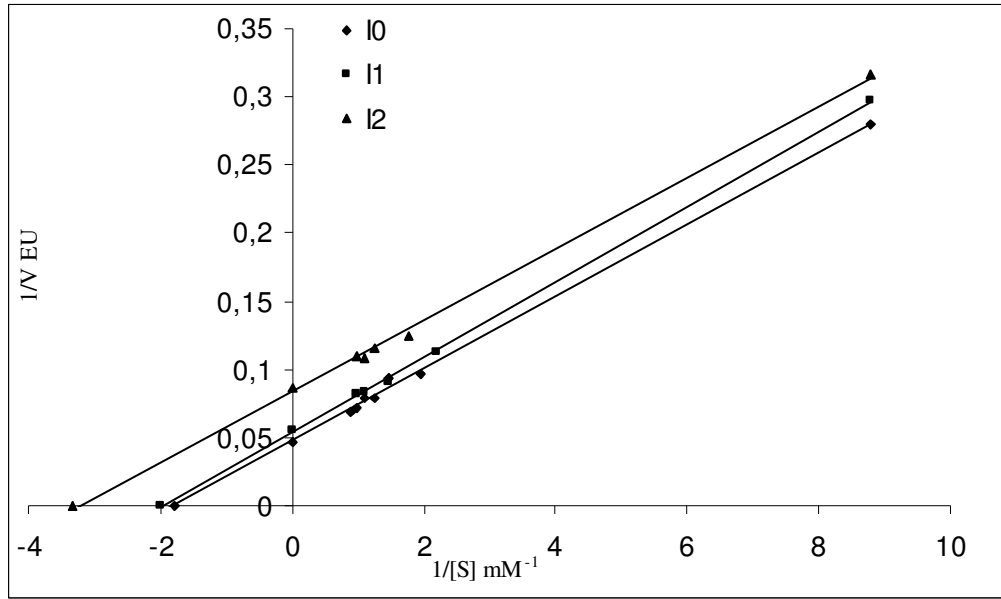
Şekil 3.27.'deki Lineweaver-Burk grafiğinden. Ag ağır metalinin zeytin Beta-glukosidaz enziminin *p*NPG substratı üzerine unkompetitif (yarı yarışmalı) tipte inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. Reaksiyon ortamındaki Ag ağır metalinin 18.18×10^{-4} mM ve 31.18×10^{-4} mM olacak şekilde iki farklı konsantrasyon kullanılarak çizilen grafikten K_i değeri $32.09 \times 10^{-4} \pm 1.89 \times 10^{-4}$ mM olarak hesaplanmıştır.

3.5.3.4 Pb Ağır Metalinin İnhibisyon Tipinin ve K_i Değerinin Bulunması

Pb ağır metalinin zeytin β -glukosidaz enzimi üzerine inhibisyon tipinin araştırılması için Çizelge 3.26'da verilen değerler kullanılarak yine aynı çizelgedeki sonuçlar elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlarla Şekil 3.28'deki Lineweaver-Burk grafiği çizilmiştir.

Çizelge 3.26 Zeytin beta-glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Pb ağır metalinin K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, Pb konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

50mM Na- Ac tamponu (μ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat çözeltisinin hacmi (μ l)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Kuyudaki Toplam Hacim (μ l)	Kuyudaki Substrat Kons. [S] (mM)	Kuyudaki İnhibitör Kons. [I] (mM)	ΔA (405 nm)	Aktivite (U/ml dak)	1/V	1/[S]
159	60	1	-	220	0.11		0.017	3.58	0.2793	8.80
155.5		4.5			0.51		0.049	10.32	0.0969	1.96
154		6			0.68		0.051	10.74	0.0931	1.47
153		7			0.80		0.060	12.63	0.0792	1.25
152		8			0.91		0.060	12.63	0.0792	1.10
151		9			1.02		0.066	13.89	0.0719	0.98
150		10			1.14		0.069	14.53	0.0688	0.88
69		60			1		90	220	0.11	4.09×10^{-3}
66	4		0.46	0.042	8.84	0.1131			2.20	
64	6		0.68	0.052	10.95	0.0913			1.47	
62	8		0.91	0.057	12.00	0.0833			1.10	
61	9		1.02	0.058	12.21	0.0818			0.98	
19	60	1	140	220	0.11	6.36×10^{-3}	0.015	3.16	0.3166	8.80
15		5			0.57		0.038	8.00	0.1250	1.76
13		7			0.80		0.041	8.63	0.1158	1.25
12		8			0.91		0.044	9.27	0.1079	1.10
11		9			1.02		0.043	9.05	0.1104	0.98



Şekil 3.28 Pb ağır metalinin zeytin β -glukosidaz enziminin pNPG substrat aktivitesi üzerindeki inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği

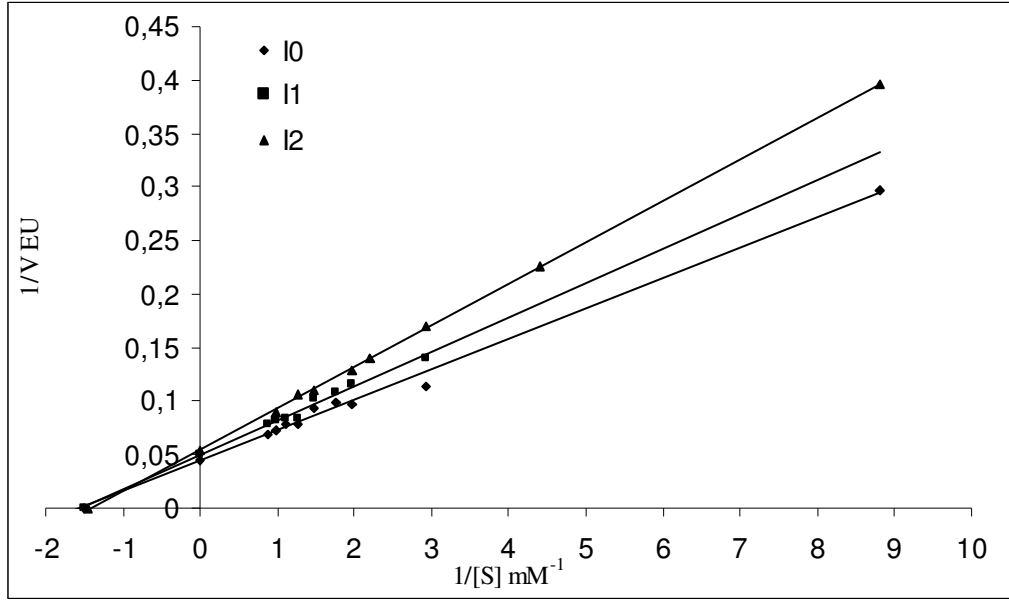
Çizelge 3.26'daki veriler kullanılarak çizilen Şekil 3.28.'deki Lineweaver-Burk grafiğinden, Pb ağır metalinin zeytin Beta-glukosidaz enziminin pNPGlu substratı üzerine nonkompetitif (yarışmasız) tipte inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. Reaksiyon ortamındaki Pb ağır metalinin 4.09×10^{-3} mM ve 6.36×10^{-3} mM olacak şekilde iki farklı konsantrasyon kullanılarak çizilen grafikten K_i değeri $12.576 \times 10^{-3} \pm 5.682 \times 10^{-3}$ olarak hesaplanmıştır.

3.5.3.5 Cd Ağır Metalinin İnhibisyon Tipinin ve K_i Değerinin Bulunması

Cd'un zeytin β -glukosidaz enzimi üzerine inhibisyon tipinin araştırılması için çizelge 3.27de belirtilen değerlerde çalışma yürütülmüş ve elde edilen sonuçlar aynı çizelgede verilmiştir. Çizelge 3.27'deki verilerle Şekil 3.29'daki Lineweaver-Burk grafiği elde edilmiştir.

Çizelge 3.27 Zeytin beta-glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Cd ağır metalinin K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, Cd konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

50mM Na- Ac tamponu (μ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat çözeltisinin hacmi (μ l)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Kuyudaki Toplam Hacim (μ l)	Kuyudaki Substrat Kons. [S] (mM)	Kuyudaki İnhibitör Kons. [I] (mM)	ΔA (405 nm)	Aktivite (U/ml dak)	1/V	1/[S]
159	60	1	-	220	0.11	-	0.016	3.37	0.2968	8.80
157		3			0.34		0.042	8.84	0.1131	2.93
155.5		4.5			0.51		0.049	10.32	0.0969	1.96
155		5			0.57		0.048	10.11	0.0989	1.76
154		6			0.68		0.051	10.74	0.0931	1.47
153		7			0.80		0.060	12.63	0.0792	1.26
152		8			0.91		0.060	12.63	0.0792	1.10
151		9			1.02		0.066	13.90	0.0719	0.98
150		10			1.14		0.069	14.53	0.0688	0.88
67		60			3		90	220	0.34	4.09×10^{-5}
65.5	4.5		0.51	0.041	8.63	0.1158			1.96	
65	5		0.57	0.044	9.27	0.1079			1.76	
64	6		0.68	0.046	9.69	0.1032			1.47	
63	7		0.80	0.057	12.00	0.0833			1.26	
62	8		0.91	0.057	12.00	0.0833			1.10	
61	9		1.02	0.058	12.21	0.0819			0.98	
60	10		1.14	0.060	12.63	0.0791			0.88	
19	60	1	140	220	0.11	6.36×10^{-5}	0.012	2.53	0.3958	8.80
18		2			0.23		0.021	4.42	0.2261	4.40
17		3			0.34		0.028	5.90	0.1696	2.93
16		4			0.45		0.034	7.16	0.1397	2.20
15.5		4.5			0.51		0.037	7.79	0.1283	1.96
14		6			0.68		0.043	9.05	0.1104	1.47
13		7			0.80		0.045	9.48	0.1055	1.26
11		9			1.02		0.053	11.16	0.0896	0.98



Şekil 3.29 Cd ağır metalinin zeytin Beta-glukosidaz enziminin pNPGlu substrat aktivitesi üzerindeki inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 3.27'deki verilere dayanılarak çizilen Şekil 3.29.'daki Lineweaver-Burk grafiğinden, Cd ağır metalinin zeytin Beta-glukosidaz enziminin pNPGlu substratı üzerine nonkompetitif (yarışmasız) tipte inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. Reaksiyon ortamındaki Cd ağır metalinin 4.09×10^{-5} mM ve 6.36×10^{-5} mM olacak şekilde iki farklı konsantrasyon kullanılarak çizilen grafikten K_i değeri $42.96 \times 10^{-5} \pm 0.94 \times 10^{-5}$ olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.28 Zeytin beta-glukosidaz enzimi için pNPG substrat varlığında %50 inhibisyona sebep olan ağır metallerin Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan inhibisyon tipleri ve K_i değerleri

İnhibe Eden Madde	K_i (mM)	İnhibisyon Tipi
Cu	$2.263 \times 10^{-4} \pm 1.48 \times 10^{-4}$	Yarışmalı
Ni	0.0001043 ± 0.0000698	Yarışmalı
Ag	0.003209 ± 0.0001885	Yarı yarışmalı
Pb	0.012576 ± 0.005682	Yarı yarışmalı
Cd	0.0004296 ± 0.0000094	Yarışmasız

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, bitkilerde önemli işlevleri olan β -glukosidaz enzimleri zeytin meyvesinden saflaştırılmış ve bazı karakteristik özellikleri incelenmiştir. Saflaştırma işleminde amonyum sülfat çöktürmesi ve ardından hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemleri uygulanmıştır. Saflaştırılan enzimin elektroforetik özellikleri, kinetik özellikleri incelenmiş ve bazı ağır metaller ile bazı pestisitlerin ve genel inhibitörlerinin enzim aktivitesi üzerine etkileri belirlenmiştir.

Zeytin meyvesinden toplam β -glukosidaz enzimi saflaştırılması için ham ekstrakt hazırlama işlemi iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk basamak olarak aseton tozu hazırlanmış ve ikinci aşamada aseton tozundan ekstraksiyon tamponu ile ekstrakt elde edilmiştir. Bir çok araştırmacının ekstrakt hazırlamada kullandığı aseton tozu elde edilmesinin amacı ortamdaki yağ ve fenolik bileşiklerin uzaklaştırılmasıdır. Özellikle zeytin meyvesinde de bol miktarda yağ bulunduğu için ekstraksiyon işlemi aseton tozu üzerinden yapılmıştır. Literatürde zeytin meyvesinden [49], çay yapraklarından [43] ve kiraz meyvesinden [42] β -glukosidaz enziminin saflaştırılması çalışmalarında ilgili materyallerin aseton tozu hazırlanarak ekstrakt yapıldığı görülmektedir. Aseton tozu hazırlanarak ekstrakt yapılması farklı enzimlerle yapılan çalışmalarda da kullanılmıştır. Şeftaliden PPO enzimi saflaştırılmasında ve çay bitkisi PPO enziminin incelenmesi çalışmalarında [97] aseton tozunun kullanıldığı görülmektedir.

Zeytin meyvesinden toplam β -glukosidaz enziminin saflaştırılması için amonyum sülfat çöktürme aralığı çalışmamızda % 0-50 olarak bulunmuş ve saflaştırma işlemlerinde ham ekstrakta % 50 amonyum sülfat tuz çöktürmesi uygulanmıştır. Yapılan çalışmalarda β -glukosidaz enziminin saflaştırılması için amonyum sülfat çöktürme aralıkları farklı kaynaklarda değişik aralıklar tespit edilmiştir. Örneğin β -glukosidaz enziminin saflaştırılması için çayda % 45-75 [43], portakal meyvesi için %75 [46], kiraz meyvesi için %30-70 [42] ve elma çekirdeği

için %40-65 [102] amonyum sülfat çöktürmesi aralıklarının uygulandığı görülmektedir. Riou ve ark.'nın yapmış olduğu bir çalışmada *Aspergillus oryzae* mantarından β -glukosidaz enzimi saflaştırılması için mantar kültür ortamına %85 [51], *Termonascus aurantiacus* mantarından β -glukosidaz saflaştırılması çalışmasında yine besiyeri %80 [52], *Daldinia eschscholzii* mantarından β -glukosidaz saflaştırılması çalışmasında mantar kültürü süpernatantına %80 [103] amonyum sülfat çöktürmesi uygulandığı belirtilmiştir. Ayrıca *Lepista flaccida* makro mantarından β -glukosidaz enzimi saflaştırılması çalışmasında %10-80 [104], *Climacocystis borealis* makromantarından β -glukosidaz enziminin saflaştırılması çalışmasında da %10-90 amonyum sülfat çöktürme aralığının kullanıldığı bildirilmiştir [77]. Yapmış olduğumuz çalışmada kullanılan amonyum sülfat çöktürme aralığının β -glukosidaz enziminin bitki materyallerinden saflaştırılması sırasında kullanılan aralıklara yakın olduğu ve mantarlardan yapılan saflaştırmalardaki değerlerden farklı olduğu görülmektedir. Araştırmamızda amonyum sülfat çöktürmesi işlemi sonunda zeytin meyvesinden β -glukosidaz enziminin % 72.25 verimle 7.82 kat saflaştırılmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesi sonundaki bu değerlerin, zeytin meyvesinden yapılan başka bir çalışmada β -glukosidaz enzimi saflaştırılmasında %100 verimle 4.3 kat, kirazdan saflaştırılan β -glukosidaz enzimi için %98 verimle 1.9 kat, çaydan yapılan saflaştırmada %50.6 verimle 7.6 kat, elma tohumundan yapılan saflaştırma çalışmasında %51.3 verimle 2.6 kat, soyadan β -glukosidaz enzimi saflaştırılması çalışmasında %120 verimle 3 kat olduğu görülmektedir. Çalışmamızda amonyum sülfat çöktürme basamağı sonunda elde edilen saflaştırma katsayısının belirtilen diğer çalışmalara göre daha yüksek olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda amonyum sülfat çöktürmesi sonunda hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemleri kullanılarak iki aşamalı saflaştırma işlemi yapılmıştır. Bu şekilde iki aşamalı saflaştırma yöntemi kullanılarak enzimin aktivitesini kaybetmemesi amaçlanmıştır. Ayrıca tuz çöktürmesinden sonra hidrofobik etkileşim kromatografisi için ortamdaki tuzun uzaklaştırılması gerekmekte ve enzim aktivitesinin korunması açısından diyaliz gibi ayrı bir basamak kullanılmamaktadır. Hidrofobik etkileşim kromatografisinde, laboratuvarımızda sentezlenmiş sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin hidrofobik jeli kullanılmıştır

[100]. Yapmış olduğumuz çalışmada hidrofobik etkileşim kromatografisi sonunda yüksek aktivite gösteren tüpler birleştirilmiş ve saf enzim olarak çalışmalarda kullanılmıştır. Araştırmamızda hidrofobik etkileşim kromatografisi sonunda söz konusu enzim %53.92 verimle 154.93 kat saflaştırılmıştır. Farklı araştırmacıların değişik bitkilerden yaptıkları β -glukosidaz enzimi saflaştırmalarında amonyum sülfat tuz çöktürmesi sonunda çoğunlukla çok aşamalı işlem kullandıkları görülmektedir. Çay yaprağından yapılan saflaştırmada amonyum sülfat tuz çöktürmesi sonunda iyon değişim kromatografisi ve ardından iki farklı jel filtrasyon kromatografisi yaparak enzimi %1.26 verimle 117.0 kat saflaştırdıkları [43] görülmektedir. Elma çekirdeğinden yapılan saflaştırmada amonyum sülfat tuz çöktürmesi sonunda iyon değişim kromatografisi, sonra hidrofobik etkileşim kromatografisi yapılmış ve enzim çözeltisi konsantre edilerek jel filtrasyon kromatografisinin uygulandığı bildirilmektedir [102]. Bu işlemin sonunda elma çekirdeği β -glukosidazının %12.8 verimle 46.1 kat saflaştırıldığı görülmektedir. Gerardi ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada kiraz meyvesinden β -glukosidaz saflaştırılması için amonyum sülfat çöktürmesi sonunda iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi kullanarak enzimin %26 verimle 6.8 kat saflaştırıldığı görülmektedir [42]. Bir başka çalışmada Odoux ve ark. vanilya bitkisinden β -glukosidaz 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 göstermişlerdir [47]. Soyadan yapılan saflaştırmada amonyum sülfat çöktürmesinden sonra jel filtrasyon kromatografisi ile tuz uzaklaştırılmış, daha sonra anyon değiştirici ve katyon değiştirici matrikslerle arka arkaya iki defa iyon değişim kromatografisi yapılarak enzim %20 verimle 20 kat saflaştırılmıştır [45]. Portakaldan yapılan saflaştırmada da amonyum sülfat çöktürmesi sonunda önce katyon değiştirici sonra anyon değiştirici ile iki defa iyon değişim kromatografisi ve ardından üç farklı jel filtrasyon kromatografisi yöntemleri uygulanarak enzimin 489.5 kat saflaştırıldığı görülmektedir [46]. Farklı bir çalışmada yapılan yine zeytin meyvesinden β -glukosidaz saflaştırılması için amonyum sülfat çöktürmesinden sonra jel filtrasyon kromatografisi ile tuz uzaklaştırılmış, daha sonra anyon değiştirici matriksle iyon değişim kromatografisi yapılmış ve ardından hidrofobik etkileşim kromatografisinin yapıldığı görülmüştür

[49]. Bu basamakların sonunda araştırmacıların zeytin β -glukosidazını % 8.3 verimle 8.1 kat saflaştırdıkları görölmektedir.

Yapmış olduğumuz çalışmada zeytinden β -glukosidaz enziminini çaydan, elma çekirdeğinden, kirazdan, vanilyadan, soyadan ve zeytinden yapılan saflaştırma çalışmalarına göre daha yüksek verimde saflaştırdığımız görölmektedir. Bu derece yüksek verim ile saf enzim elde etmemizin en önemli nedenlerinden biri saflaştırmanın iki basamakta yapılmış olmasıdır.

Ayrıca enzimi saflaştırma katsayımızın, literatürde yer alan çalışmalardan daha yüksek olduğu da görölmektedir. Yapmış olduğumuz çalışmada laboratuvarımızda sentezlenen sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin [100] hidrofobik jeli kullanılmıştır. Hidrofobik etkileşim kromatografisi tekniğinde ligand ve matriks yapısının son derece önemli olduğu bildirilmektedir. Kullanılacak liganın hidrofobik karakteri kritik bir öneme sahiptir. Düşük hidrofobik karaktere sahip liganlar kullanıldığında ayrılacak moleküllerin kolanda etkileşimini sağlayabilmek için yüksek tuz konsantrasyonu uygulamak gerekmektedir. Bu durumda proteinlerin kendi aralarında hidrofobik etkileşim yapma riski artmaktadır. Yüksek hidrofobik karaktere sahip ligan tercih edildiğinde ise saflaştırılacak molekül ile ligan arasındaki etkileşim artacağı için elüsyon sırasında problemler ortaya çıkabilmektedir [105]. Yapmış olduğumuz çalışmada kullanılan hidrofobik jelde ligan olarak L-tirozin bulunmaktadır. Kullandığımız jeldeki hidrofobik u ise 1-naftilamindir. Genellikle ticari olarak bulunan hidrofobik etkileşim kromatografi jellerinde hidrofobik u olarak düz zincirli alkil ve aril gibi moleküller kullanılmaktadır [106]. Bunlardan isopropil, butil, oktil ve fenil bileşikleri en çok tercih edilen liganlardır. Romero-Segura ve ark.'nın yapmış olduğu zeytin β -glukosidaz enzimi saflaştırmasında kullanılan hidrofobik jelin yapısı btil sepharosedur. Düz zincirli alkil liganları saf hidrofobik karakter gösterirlerken, aril liganlarında hem hidrofobik hem de aromatik etkileşimler gözlenir. Çalışmamızda kullanılan jelde hidrofobik u olarak aril yapısında olan 1-naftilaminin bulunması, saflaştırma katsayımızın Romero-Segura ve ark.'nın yaptığı hidrofobik etkileşim kromatografisi sonucuna göre daha yüksek olmasında etkili olduğunu düşünmekteyiz. Bu durum aynı zamanda enzimin hem hidrofobik hem de

aromatik etkileşimlerde bulunduğunu düşündürmektedir. Buradan hareketle zeytin β -glukosidaz enziminin yapısında hidrofobik ve aromatik rezidülerinin bulunabileceği kanaatindeyiz.

Hidrofobik etkileşim kromatografisinde kullanılan tuzun tipi ve konsantrasyonu da oldukça önemlidir. Bu kromatografi yönteminde yaygın olarak kullanılan tuzlar Na_2SO_4 , K_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl , NH_4Cl , NaBr , NaSCN olmasına rağmen en çok tercih edilen amonyum sülfat tuzudur [107,108]. Çalışmamızda amonyum sülfat çöktürmesi basamağı sonunda 1M amonyum sülfat içeren tampon içindeki enzim 1-0 M azalan tuz gradientinde hidrofobik etkileşim kromatografisinden elüe edilmiştir. Hidrofobik etkileşim kromatografisinde elüentler 1'er mL'lik tüplere biriktirilmiş ve enzimin 36.-40. tüplerde toplam 5 mL'de geldiği görülmüştür. Tuz konsantrasyonu 53. tüpte sona ermiştir. Enzimin 36.-40. tüplerde ve tuz yoğunluğunun azalmış olduğu bir değerde gelmesi enzimin kolona sıkı tutunduğunu gösterir. Bu durumda enzimin (proteinin) üç boyutlu yapısında dış tarafta hidrofobik uçların yoğunlukta olduğu düşünülebilir. Ayrıca hidrofobik jeldeki aromatik uç bölgesinin de bulunması enzimin aynı zamanda aromatik etkileşimler de yapmış olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda iki basamakta saflaştırılan zeytin β -glukosidaz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla, enzim SDS poliakrilamid jel elektroforezine uygulanmıştır. Şekil 3.4'de görüldüğü gibi yaklaşık 65 kDa hizasında bant tespit edilmiştir. Farklı canlılarda yapılan çalışmalarda, saflaştırılan β -glukosidaz enziminin mısırdaki 60 kDa [26], kirazda 68 kDa [42], portakalda 64 kDa [46], çimlenmiş pirinç tohumunda 56 kDa [40], süpürge darısında Dhurrinaz1 izoenziminin 57 kDa [44], Dhurrinaz2 izoenziminin 62 kDa [44], çayda 41 kDa [43], olduğu bildirilmiştir. Literatürde bulunan bu çalışmalarda ilgili enzimlerin molekül ağırlıklarının tespiti yaklaşık olarak SDS-PAGE yöntemi ile gösterilmiştir. Termofilik bir mantar olan *Melanocarpus sp.*'dan saflaştırılmış β -glukosidaz enziminin SDS poliakrilamid jel elektroforezinde ~92 kDa [50], *Aspergillus oryzae* mantarında 43 kDa [51] *Thermoascus aurantiacus* mantarında 120 kDa [52] olduğu gösterilmiştir. Bitki β -glukosidazları için SDS poliakrilamid jel elektroforezinde görüntülenen altbirimlerinin 55-65 kDa arasında olduğu belirtilmektedir [2].

Yapmış olduğumuz çalışmada zeytin β -glukosidaz enziminin SDS poliakrilamid jel elektroforezinde görüntülenen 65 kDa'lık molekül ağırlığı değeri literatürde yapılan bitki β -glukosidaz çalışmalarına uygunluk göstermektedir. Ancak mantarlardan saflaştırılan β -glukosidazların molekül ağırlığından farklı olduğu görülmektedir.

β -glukosidaz enziminin yapay substratlarından *p*-NPG, *o*-NPG ve *p*-NPGal ve *o*-NPGal substratlarına karşı ilgisinin ifadesi olan K_m ve V_{max} değerleri bulunarak substrat spesifikliğı belirlenmiştir. Kinetik parametrelerin belirlenmesi çalışmalarında saflaştırılmış enzimle *p*-NPG substratı için K_m değeri 2,22 mM ve V_{max} değeri 370.37 EU olarak bulunmuş, katalitik etkinliğıin ölçüsü olan V_{max}/K_m oranı 166.83 olarak hesaplanmıştır. Saflaştırılmış zeytin β -glukosidaz enziminin *o*-NPG substratı için K_m değeri 14.11mM ve V_{max} değeri 48.54 EU olarak bulunmuş ve V_{max}/K_m değeri 3.44 hesaplanmıştır. Yapmış olduğumuz çalışmada *p*-NPGal substratının K_m değeri 13.13 mM ve V_{max} değeri 161.29 olarak belirlenmiş ve V_{max}/K_m oranı 12.28 olarak hesaplanmıştır. Yine *o*-NPGal substratı ile yapılan çalışmada K_m değeri 5.92 mM ve V_{max} değeri 126.58 EU olarak tespit edilmiş ve V_{max}/K_m oranının 21.38 olduğu görülmüştür. Araştırmamızda zeytin meyvesinden saflaştırılan β -glukosidaz enziminin *p*-NPG substratına karşı ilgisinin çalışılan diğer substratlara oranla yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Literatürde yapılan β -glukosidaz enzimini substrat spesifikliğı çalışmalarında K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesinden ziyade karşılaştırmalı enzim aktivitelerinin belirlenmiş olduğu görülmektedir. Hsieh ve Graham tarafından yapılan bir çalışmada soyadan saflaştırılan β -glukosidaz enziminin *p*-NPG substratına ilgisinin en yüksek olduğu belirtilmiştir [45]. Vanilya bitkisi ile yapılan bir başka çalışmada da söz konusu enzimin *p*-NPG substratına ilgisinin yüksek olduğu gösterilmiştir [47]. Benzer şekilde portakaldan [46] ve çaydan [43] saflaştırılmış β -glukosidaz enziminin *p*-NPG substratına ilgisinin yüksek olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Ancak bu sonuçlardan farklı olarak kiraz meyvesinden saflaştırılan β -glukosidaz enziminin *o*-NPG substratına ilgisinin daha yüksek olduğu belirtilmiştir [42]. Farklı kaynaklardan elde edilen β -glukosidaz enzimlerinin substratlara ilgilerinin farklı olmasının nedeni aktif merkeze yakın olan aminoasitlerin gruplarının farklılığından kaynaklanabildiğı düşünülmektedir.

Araştırmamızda β -glukosidaz enzimlerinin genel inhibitörlerinden δ -glukonolaktonun *p*-NPG substratı varlığındaki zeytin β -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösterdiği IC_{50} değerinin 0.227 mM olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca δ -glukonolaktonun zeytin meyvesinden saflaştırılan β -glukosidaz enzimini *p*-NPG substratı varlığında yarışmalı tipte inhbe ettiği ve K_i değerinin $0,016271 \pm 0,002731$ olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlardan, δ -glukonolaktonun enzimin aktif bölgesine bağlanmada substratla yarıştığı sonucuna varılabilir. Romero-.Segura ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada δ -glukonolaktonun zeytin β -glukosidaz enzimi üzerine etkisi farklı bir yolla araştırılmıştır. Araştırmacılar, saflaştırılmış zeytin β -glukosidaz enzimini 15 mM δ -glukonolakton ile 4⁰C'de 1 saat inkübe edildikten sonra *p*-NPG substratı varlığındaki relatif aktivitesinin %100 olduğunu, 24 saatlik inkübe işleminin sonunda ise yine %100 olduğunu bulmuşlardır [49]. Portakaldan saflaştırılan β -glukosidaz enzimi üzerine yapılan bir çalışmada 10mM δ -glukonolaktonun *p*-NPG substratı varlığındaki relatif aktivitesinin %9.3 olduğu, 1mM δ -glukonolaktonun aynı şartlarda relatif aktivitesinin %29.4 olduğu belirtilmiştir [46]. Soya bitkisi ile yapılan çalışmada da δ -glukonolaktonun β -glukosidaz enzimi aktivitesi üzerine çok etkili olmadığı, 1mM δ -glukonolaktonun *p*-NPG substratı varlığındaki relatif aktivitesinin %99, 10mM δ -glukonolaktonun %93 olduğu gösterilmiştir [45]. Literatürde yapılan çalışmalarda genellikle δ -glukonolaktonun enzim aktivitesi üzerine etkisi relativ aktivite belirlenerek tespit edilmiştir ve ilgili kaynaklardan elde edilen β -glukosidaz enzimlerinin δ -glukonolakton tarafından inhbe edildiği gösterilmiştir. Araştırmamızda elde ettiğimiz sonuçlar literatüre uygunluk göstermektedir.

Aynı zamanda çalışmamız sonucunda elde edilen δ -glukonolaktonun yarışmalı inhibisyon etkisi gösterdiği Odoux ve ark.'nın yapmış olduğu vanilya β -glukosidazı çalışmasında da gösterilmiştir [49]. Vanilya bitkisiyle yapılmış olan bu çalışmada β -glukosidaz enzimini δ -glukonolaktonun 40⁰C, pH 7'de *p*-NPG substratı varlığında kompetitif (yarışmalı) tipte inhbe ettiği ve K_i değerinin 670 μ M olduğu belirtilmiştir [47].

Çalışmamızda δ -glukonolaktonun β -glukosidaz enzim aktivitesini % 50 oranında azaltan konsantrasyonu olan IC_{50} değeri 0,227mM olarak tespit edilmiştir. Yapılan farklı çalışmalarda söz konusu inhibitör için IC_{50} değerleri nohut bitkisinde 1mM [50], soyada 24mM [45], *Aspergillus oryzae*'de 12.5mM [51] olduğu belirtilmiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada δ -glukonolaktonun soya, nohut ve *Aspergillus oryzae* β -glukosidaz enzimlerine göre zeytin β -glukosidazını daha güçlü inhibe ettiği belirlenmiştir.

β -glukosidaz enziminin genel inhibitörlerinden olan glukozun zeytin meyvesinden saflaştırılan toplam β -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırıldığında IC_{50} değerinin 111,96 mM olduğu bulunmuştur. Glukozun *p*-NPG substratı varlığındaki K_i değeri ise 4.9333 ± 3.3036 olarak hesaplanmıştır Romero-Segura ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada glukozun zeytin β -glukosidaz enzimi üzerine etkisi farklı olarak araştırılmıştır. Araştırmacılar, saflaştırılmış zeytin β -glukosidaz enzimini 15 mM glukoz ile 4⁰C'de 1 saat inkübe ettikten sonra *p*-NPG substratı varlığındaki inhibitörsüz değere göre relativ aktivitesinin %100 olduğunu, 24 saatlik inkübe işleminin sonunda ise yine relativ aktivitenin %100 olduğunu bulmuşlardır [49]. Odoux ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada vanilya β -glukosidaz enziminin 2M glukoz ile inhibe olmadığı gösterilmiştir [47]. Yapılan farklı çalışmalarda glukozun *Melanocarpus sp.* termofilik fungustan saflaştırılan β -glukosidaz enzimini [50], *Aspergillus oryzae*'den saflaştırılmış β -glukosidaz enzimini [51] ve *Daldinia eschscholzii* mantarından izole edilen β -glukosidaz enzimini [103] inhibe ettiği gösterilmiştir. β -glukosidaz enziminin genel inhibitörleri olarak bilinen glukoz ve δ -glukonolakton maddelerinin zeytin meyvesinden saflaştırılan toplam β -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine etkileri karşılaştırıldığında her iki maddenin de enzimi yarışmalı olarak inhibe ettiği fakat glukozun enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisinin δ -glukonolaktona göre daha zayıf olduğu belirlenmiştir.

Zeytin tarımında insektisit ve fungusitlerin herbisitlere oranla daha yoğun kullanıldığı belirlenmiştir. Çalışmamızda zeytin tarımında en sık kullanılan deltamethrin ve diazinon insektisitleri ile glifosat herbisitinin zeytin meyvesinden saflaştırılan toplam β -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırılmıştır.

Glyphosat herbisiti sadece zeytinde değil pek çok alanda yabancı ot mücadelesinde sıklıkla kullanılan bir herbisittir [109]. Glyphosatın zeytin meyvesinden saflaştırılan β -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi için yapılan çalışmada *p*-NPG substratı varlığındaki enzim aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir.

Deltamethrin insektisiti de zeytin tarımında sık kullanılan insektisitlerdendir. Zeytine bir defada verilen dozu 0.31 mM'dır [87]. Yapılan bu çalışmada deltamethrinin *p*-NPG substratı varlığında zeytin β -glukosidaz enzimini inhibe ettiği ve IC_{50} değerinin 0,011mM olduğu bulunmuştur. İnhibisyon etkisi gösteren deltamethrin bileşiğinin enzim aktivitesini yarışmalı olarak inhibe ettiği ve K_i değerinin 0.004834 ± 0.00023 olduğu hesaplanmıştır. Literatürde β -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine deltamethrininin etkisinin araştırıldığı farklı bir yayına rastlanmamıştır. Yapmış olduğumuz çalışma sonunda zeytine tek seferde atılan ilaç dozu göz önüne alındığında deltamethrinin zeytin meyvesi β -glukosidaz enzimini inhibe edebilecek değerlerde olduğu düşünülmektedir

Diazinon zeytin tarımında sık kullanılan insektisitlerdendir. Zeytin tarımında tek dozda 1.22 mM kullanılmaktadır [88]. Diazinon pestisitinin zeytin β -glukosidaz enzimi üzerine etkisinin belirlenmesi için yapılan çalışmada *p*-NPG substratı varlığındaki enzim aktivitesini düşürdüğü ve IC_{50} değerinin 0,20 mM olduğu bulunmuştur. Diazinonun enzimi yarışmalı olarak inhibe ettiği ve K_i değerinin $0,080775 \pm 0,011249$ olduğu belirlenmiştir. Literatürde diazinonun β -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine yapılmış başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yapmış olduğumuz çalışmada, diazinonun bitki ilaçlamasında tek seferde kullanılan konsantrasyonunun, enzim aktivitesini %50 azaltan konsantrasyonundan çok daha fazla olduğu görülmektedir. Bu durumda kullanılan miktarın söz konusu enzim açısından olumsuz olduğu düşünülmektedir.

Zeytin meyvesinden saflaştırılan toplam β -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine Cu, Ni, Ag, Pb, Cd ve Fe'in etkisi araştırıldığında Fe haricindeki diğer ağır metallerin enzimi inhibe ettiği görülmüştür. *p*-NPG substratı varlığındaki enzim aktivitesi üzerine yapılan çalışmalarda Fe'in enzim aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir. Cameron ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada da Fe'in portakaldan

saflaştırılan β -glukosidaz enzimini inhibe etmediği, *p*-NPG substratı varlığında 1mM FeCl₃'ün inhibitörsüz ortama göre yüzde kalan aktivitesi (relativ aktivitesi)'nin %100 olduğu belirtilmektedir [46]. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar ışığında Fe içeren bileşiklerin zeytin tarımında β -glukosidaz enzim aktivitesi açısından zirai ilaç olarak uygun olabileceği kanaatindeyiz.

Zeytin β -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırılan Cu ağır metali bakır sülfat, bakırhidroksit, bakır oksiklorür, bakır kalsium sülfat formlarında, tarımda fungusit olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Hemen hemen tüm tarım ürünlerinde Cu'lu bileşiklerin göztaşı, bordo bulamacı gibi isimler altında fungusit olarak kullanıldığı görülmektedir. Ayrıca endüstriyel atık sularla özellikle gübre sanayi, demir-çelik, termik santral ve kağıt endüstrisinden de Cu'nun sulara karıştığı bilinmektedir [95]. Bu çalışmada da zeytin β -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine Cu'nun etkisi incelendiğinde enzimi inhibe ettiği ve IC₅₀ değerinin 6.1×10^{-4} mM olduğu bulunmuştur. Cu'nun zeytin β -glukosidaz enzimini yarışmalı olarak inhibe ettiği ve K_i değerinin de $2,263 \times 10^{-4} \pm 1,48 \times 10^{-4}$ olduğu hesaplanmıştır. Yapılan değişik çalışmalarda da Cu ağır metalinin β -glukosidaz enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösterdiği belirtilmiştir. Romero-Segura ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada, zeytin β -glukosidazının 1 mM Cu ile 4⁰C'de 1 saat inkübe edildikten sonra *p*-NPG substratı varlığındaki relativ aktivitesinin %100, 24 saatlik inkübe işleminin sonunda ise %21 olduğu belirtilmektedir [49]. Elma çekirdeğinden saflaştırılan β -glukosidaz enzimi üzerine CuSO₄'ün etkisinin incelendiği çalışmada *p*-NPG substratı varlığındaki relativ aktivitenin %3.0 olduğu gösterilmiştir [102]. Cu'nun vanilya bitkisi β -glukosidaz enzimi üzerine etkisini araştıran bilim adamları ise 1mM Cu ile 4⁰C'de 30 dakika inkübe edilmiş enzimin *p*-NPG substratına karşı relativ aktivitesinin %4 olduğunu açıklamışlardır [47]. Buna karşın soya bitkisi β -glukosidazı üzerine Cu'nun etkisini inceleyen araştırmacılar 1mM Cu'nun *p*-NPG substratı varlığında relativ aktivitesinin %99, 10 mM Cu ile *p*-NPG substratı varlığındaki relativ aktivitesinin %115 olduğunu bildirmişlerdir [45]. Yapmış olduğumuz çalışma sonucunda Cu'nun β -glukosidaz enzimini inhibe ettiği ve literatüre de genel itibarıyla uygunluk gösterdiği söylenebilir. Fungusit olarak yaygın kullanılan Cu'lu bileşiklerin zeytin β -glukosidaz enzim aktivitesini kuvvetli bir şekilde etkileyebileceği tarafımızdan düşünülmektedir.

Ni ağır metalinin gübre sanayi, demir-çelik sanayi, termik santral ve kağıt endüstrisi atıklarıyla sulara karıştığı bildirilmektedir [95]. Tarımda atık suların kullanımıyla toprağa ve bitkilere bulaşabileceği belirtilmiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada Ni'in zeytin β -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırılmış ve enzimi yarışmalı olarak inhibe ettiği, K_i değerinin $0,0001043 \pm 0,0000698$ olduğu bulunmuştur. Enzim aktivitesini %50 azaltan Ni konsantrasyonu olan IC_{50} değerinin de 0.63×10^{-4} mM olduğu hesaplanmıştır. Odoux ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada vanilyadan saflaştırılan β -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine Ni'in etkisi incelendiğinde enzim 1mM Ni ile 4^0C 'de 30 dakika inkübe edilmiş ve enzimin *p*-NPG substratına karşı relativ aktivitesinin %30 olduğu açıklanmıştır [47]. Yapmış olduğumuz çalışmada Ni'in zeytin β -glukosidazını vanilya β -glukosidazına göre çok daha düşük konsantrasyonda inhibe ettiği görülmüştür.

Ag ağır metalinin zeytin β -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırıldığında enzimi yarıyarışmalı tipte inhibe ettiği ve IC_{50} değerinin 3.34×10^{-3} mM olduğu tespit edilmiştir. İnhibisyon tipinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda K_i değerinin $0,003209 \pm 0,0001885$ olduğu hesaplanmıştır. Romero-Segura ve ark.'nın yaptıkları çalışmada zeytin β -glukosidazının 1 mM Ag^+ ile 1 saat ve 24 saat inkübasyonu sonunda enzimin *p*-NPG substratına karşı relativ aktivitesinin %0 olduğu bildirilmiştir. Yine elma çekirdeği β -glukosidazı ile yapılan başka bir çalışmada 5mM Ag^+ 'ün *p*-NPG substratına karşı relativ aktivitesini %0 yaptığı gösterilmiştir [102]. Vanilya bitkisinden saflaştırılan β -glukosidaz enzimi üzerine Ag^+ 'ün etkisi incelenirken 0.1mM ve 1mM Ag^+ ile enzim 4^0C 'de 30 dakika inkübe edilmiş, her birinin *p*-NPG substratına karşı relativ aktivitesinin sırasıyla %112 ve %29 olduğu bulunmuştur [47]. Soya bitkisi β -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine Ag^+ 'ün etkisinin incelendiği çalışmada 1mM $AgNO_4$ 'ün *p*-NPG substratına karşı relativ aktivitesinin %35, 10 mM $AgNO_4$ 'ün *p*-NPG substratına karşı relativ aktivitesinin %0 olduğu bildirilmiştir [45]. Yine aynı çalışmada reaksiyon ortamına β -merkaptolanol ilave edilmiş ve Ag^+ iyonlarının sülfhidril gruplarını inhibe etmesinin önlendiği bildirilmiştir. 250mM β -merkaptolanol varlığındaki Ag^+ 'ün IC_{50} değerinin β -merkaptolanolsüz IC_{50} değerinden 100 kat daha fazla olduğunu göstermişlerdir. β -glukosidazların enzim

aktivitesinde ve stabilitesinde sistein rezidüsünde bulunan SH grubunun rol aldığı bildirilmektedir [110,111]. Ag'ün bitki β -glukosidaz enzimleri için güçlü bir inhibitör olduğu belirtilmektedir [2]. Yapmış olduğumuz çalışmada da Ag'ün enzimi yarışmalı olarak inhibe ettiği bulunmuştur. Buradan hareketle Ag'ün, enzimin aktif bölgesine bağlandığı ve substrat ile yarış halinde olduğu gösterilmiştir. Zeytin β -glukosidaz enziminin aktif bölgesinde SH gruplarının olduğu ve Ag iyonlarının bu grupları inhibe ederek enzim aktivitesini azalttığı düşünülmektedir.

Zeytin meyvesinden saflaştırılan β -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine Pb'nin etkisini araştırdığımızda Pb'nin enzimi yarı yarışmalı tipte inhibe ettiği, K_i değerinin $0,012576 \pm 0,005682$ olduğu ve IC_{50} değerinin $5,3 \times 10^{-3}$ mM olduğu bulunmuştur. Pb'nin enzimi yarı yarışmalı tipte inhibe etmesi Pb'nin serbest enzime değil de ES kompleksine bağlanarak inhibisyona sebep olduğunu göstermektedir. Gueguen ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada da 10 mM Pb'un, *Zygosaccharomyces bailli* mayasından elde edilen β -glukosidaz enzim aktivitesini inhibe ederek relativ aktiviteyi %0 yaptığı belirtilmiştir [112]. Bu sonuç elde ettiğimiz sonuçla uyumludur. Şehirlerdeki atmosferik kurşunun %90'ının egzoz gazlarından geldiği bilinmektedir [113]. Alkil ihtiva eden benzinle çalışan araçların egzoz gazlarında Pb bulunmaktadır. Pb egzoz gazı bileşiminde yer aldığı için özellikle işlek yol kenarlarında tarımı yapılan bitkileri etkileme olasılığı oldukça yüksektir. Yapılan bir çalışmada Ankara'da trafik yoğunluğu yüksek kavşaklarda yetişen bitkilerin kök ve yapraklarındaki Pb miktarı incelenmiş ve Pb birikiminin %30-60 arttığı belirlenmiştir [114]. Ayrıca petrokimya sanayi, klor-alkali üretimi, gübre sanayi, demir-çelik sanayi ve termik santrallerden de sulara karıştığı bildirilmektedir. Bitkiler kurşunu esas olarak kökleri ile almakta ve diğer organlarına iletmektedirler [115]. Atık suların tarımda kullanılması ve zeytin tarımının yol kenarlarında yapılması durumunda, β -glukosidaz enzim aktivitesinin kurşundan etkilenme riskinin yüksek olduğu sonucuna varılmıştır.

Zeytin meyvesinden saflaştırılmış olan β -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine Cd'nin etkisi incelendiğinde, Cd'nin enzimi inhibe ettiği, IC_{50} değerinin $0,38 \times 10^{-4}$ mM olduğu bulunmuştur. İnhibisyon tipinin belirlenmesi için yapılan çalışmalarda

Cd'un enzimi yarışmasız tipte inhibe ettiği ve K_i değerinin $0,0004296 \pm 0,0000094$ olduğu hesaplanmıştır. Cd'nin enzimi yarışmasız tipte inhibe etmesi enzimin aktif merkezine bağlanma için substratla yarış içinde olmadığı, enzimle ESI kompleksi oluşturabilecek şekilde bağlandığı düşünülür. Cd'nin petrokimya, klor-alkali üretimi, gübre sanayi, demir-çelik sanayi, termik santrallerden atık sulara karıştığı bilinmektedir. Tarımda atık su kullanımı ile Cd'nin bitkilere geçtiği belirtilmiştir [116]. Ayrıca Cd'un egzoz gazlarından da bitkilere geçebileceği bildirilmektedir [114].

İncelenen ağır metallere Fe'in zeytin β -glukosidaz enziminin *p*-NPG substratı varlığındaki aktivitesini arttırdığı, Cu Ni, Ag, Pb ve Cd ağır metallerinin aktiviteyi düşürdüğü belirlenmiştir. Enzimi inhibe eden ağır metaller içinde en düşük K_i sabiti ile Ni'in enzimi en kuvvetli şekilde inhibe ettiği bulunmuştur. IC_{50} değerleri açısından değerlendirildiğinde Cd'un, etkisi araştırılan diğer ağır metallere göre enzim aktivitesini daha fazla inhibe ettiği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak yapılan çalışmalarda aşağıdaki bulgular elde edilmiştir:

- ✓ Zeytin β -glukosidaz enzimi Sepharose 4BL-tirozin 1-naftilamin kimyasal yapısına sahip farklı bir hidrofobik etkileşim kromatografisi jeli ile saflaştırılmıştır.
- ✓ Amonyum sülfat çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemi ile saflaştırılan zeytin meyvesi β -glukosidaz enzimi SDS-PAGE elektroforezinde yaklaşık 65 kDa molekül ağırlığında tek bant olarak görüntülenmiştir.
- ✓ Zeytin meyvesinden saflaştırılan β -glukosidaz enziminin *p*NPG, *o*NPG, *p*NPGal ve *o*NPGal substratlarına olan ilgisi araştırılmış ve en yüksek katalitik etkinliğinin *p*NPG substratı varlığında olduğu tespit edilmiştir.
- ✓ β -glukosidaz enzimlerinin genel inhibitörlerinden glukoz ve δ -glukonolaktonun saflaştırılmış enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırılmış, her iki maddenin de

enzimi yarışmalı olarak inhibe ettiği ve δ -glukonolaktonun inhibisyon etkisinin glukozaya göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

- ✓ Zeytin tarımında sık kullanılan deltamethrin, diazinon ve glyphosat pestisitlerinin saflaştırılmış β -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine etkileri incelenmiş ve glyphosatın enzim aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir. Deltamethrin ile diazinon pestisitlerinin her ikisinin de enzimi yarışmalı olarak inhibe ettikleri ve deltamethrinin diazinona göre inhibisyon etkisinin daha güçlü olduğu bulunmuştur.
- ✓ Söz konusu enzim aktivitesi üzerine Cu, Ni, Ag, Fe, Cd, Pb ağır metallerinin etkisi incelendiğinde Fe'in enzim aktivitesini arttırdığı diğer ağır metallerin ise enzimi inhibe ettiği görülmüştür.
- ✓ İnhibisyona sebep olan ağır metallerin IC₅₀ değerleri ve inhibisyon mekanizmaları belirlenmiştir. Cu ve Ni ağır metallerinin enzim aktivitesini yarışmalı, Ag ve Pb'nin yarıyarışmalı, Cd'un ise yarışmasız olarak inhibe ettikleri belirlenmiştir.

5. KAYNAKLAR

- [1] Laine, RA.”A calculation of all possible oligosaccharide isomers both branched and linear yields 1.05×10^{12} structures for reducing hexasaccharide: the isomer barrier to development of single method saccharide sequencing or synthesis systems.” *Glycobiology*, 4, (1994), 759-767
- [2] Esen, A. β -Glucosidase. In Handbook of Food Enzymology. Hydrolases; Whitaker, J., Vorage, A., Wong, D., Eds.; Dekker: New York, (2003) 791-803.
- [3] Vidhyasekaran, P., “Physiology of disease resistance in plants.” Volume IICRC Pres, inc Boca Raton, 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.” In: Schreier, P., Winterhalter, P. Progress in flavour precursor Studies. Allured Publ. (1993)
- [5] <http://www.internationaloliveoil.org> (UZK Uluslararası Zeytinyağı Konseyi) Olive products market report summary no 38 – april 2010
- [6] Harwood, J.L., Yaqoop, P. “Nutritional and health aspects of olive oil.” *Eur.J.Lipid Sci.Technol.*, 104, (2002) 685 – 697,
- [7] Henrissat, B. “A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities.” *Biochem. J.*, 280, (1991) 309–316.
- [8] Henrissat, B., “Glycosidase families.” *Biochem. Soc. Trans.* 26, (1998) 153–156,
- [9] Henrissat, B. and Davies, G.J. “Structural and sequence based classification of glycosyl hydrolases.” *Curr. Opin.Struct. Biol.* 7, (1997) 637–644.
- [10] Lee YC., Lang D. “Automatic analysis of sugar components of glycoproteins.” *J. Biol Chem.* 243, (1968) 677-700,
- [11] Wardi AH, Allen WS, Turner DL, Stary Z., “Hyaluronate-peptide linkage group.” *Biochim Biophys Acta*, 192, (1969) 151-155,

- [12] Henrissat B, Davies GJ: “Glycoside hydrolases and glycosyltransferases. Families, modules, and implications for genomics.” *Plant Physiol*, 124, (2000) 1515-1519.
- [13] Henrissat, B., Driguez, H., Viet, C, and SchUlein, M. “Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose.” *Bio/technology* 3, (1985) 722-726
- [14] Henrissat B., Bairoch A. “Updating the sequence-based classification of glycosyl hidrolases” *Biochem J.* 316, (1996) 695-696
- [15] Xu, Z., Escamilla-Trevino, L.L., Zeng, L., , Lalgondar M, Bevan DR, Winkel BSJ, Mohamed A, Cheng C, Shih M, Poulton JE, Esen A “Functional genomic analysis of Arabidopsis thaliana glycoside hydrolase family 1. *Plant Molecular Biology* 55 (2004) 343-367,
- [16] Wiesmann. C., Beste, G., Hengstenberg, W., Schulz,G. “The three-dimensional structure of 6-phospho- β -galaktosidazfrom *Lactococcus lactis*.” *Structure* 3. (1995) 961–968.
- [17] 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. (1995) 951–960.
- [18] 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 (1997) 663–675.
- [19] 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 family1 glycosyl hydrolases.” *J. Mol. Biol.* 275 (1998) 491-502
- [20] Nelson, DL., Cox, MM., Çeviri Editörü Kılıç, N. Lehninger Biyokimyanın İlkeleri . Palme Yayıncılık. 3.. Baskıdan çeviri, 2005,184
- [21] Czjzek M, Cicek M, Zamboni V, Burmeister WP, Bevan DR, Henrissat B, Esen A. “Crystal structure of a monocotyledon (maize ZMGlu1) β -glucosidase and a model of its complex with p-nitrophenyl β -D-thiogluconide” *Biochem J.* 354, (2001) 37-46

- [22] Çiçek, M. Mechanism of substrate specificity and Catalysis in Retaining β -glucosidases From maize and Sorghum. Ph.D. Thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, 1999
- [23] Esen, A., β -Glycosidases Overview. In: A. Esen (Ed.) β -Glucosidases: Biochemistry and Molecular Biology, ACS Symposium Series 533. American Chemical Society, Washington, DC, (1993) ,1-5
- [24] 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, (2004) 31796-31803
- [25] Esen A, Cokmuş C, "Maize genotypes classified as null at the glu locus have β -glucosidase activity and immunoreactive protein" *Biochemical Genetics* 28, (1990) 319-336,
- [26] Esen A, "Purification and partial characterization of maize." *Plant Physiol.* 98, (1992) 174-182
- [27] Babcock, G.D. and Esen, A. "Substrate specificity of maize b-glucosidase." *Plant Sci.* 101, (1994) 31-39
- [28] Hosel, W. and Todenhagen, R. Characterization of a bglucosidase from Glycine max which hydrolyses coniferin and syringin. *Phytochemistry* 19, (1980) 331-339.
- [29] Cicek, M., Esen, A., "Expression of soluble catalytically active plant (monocot) b-glucosidases in E. coli." *Biotechnol. Bioeng.* 63, 392-40, (1999)
- [30] 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)
- [31] Wang, Q.D., Trimbur, R., Graham, R., Warren RAJ, Withers SG. "Identification of the acid/base catalyst in *Agrobacterium facealis* beta-glucosidase by kinetic analysis of mutants." *Biochemistry* 34, (1995) 14554-14562.

- [32] Davies, G., Henrissat, B. “Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases.” *Structure* 3 , (1995) 853-859
- [33] Selmar, D., Lieberei, R., Biehl, B., Voigh, J. “Hevea linemarase, a nonspecific β -glukosidase” *Plant Physiol* 83, (1987) 557-567
- [34] Hösel W, Conn EE. “The aglikon spesify of plant β -glucosidases.” *Trends Biochem Sci.* 6, (1982) 219-221
- [35] Conn, E.E. β -Glycosidases in plants. Substrate specificity. In: A. Esen (Ed.) β -Glucosidases: Biochemistry and Molecular Biology, ACS Symposium Series 533. American Chemical Society, Washington, DC, (1993) 15–26.
- [36] 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, (2000) 13555-13560.
- [37] Campos N. “A protein from maize labelled with azido-IAA has novel beta-glucosidase activity.” *Plant J.* 2, (1992) 675-684
- [38] Cicek, M., and Esen, A. “Structure and expression of dhurrinase from sorghum. *Plant. Physiol.* 116, (1998) 1469-1478.
- [39] Woodward J., Wiseman A, “Fungal and other β -D- glucosidases, their properties and applications.” *Enzyme Microb. Technol.* 4, (1982) 73-93
- [40] Opassiri R, Hua Y, Wara-Aswapati O, Akiyama T, Svasti J, Esen A, Ketudat Cairns JR “ β -Glucosidase, exo- β -glucanase and pyridoxine transglucosylase activities of rice BGlu1”. *Biochem J* 379, (2004)125-131
- [41] Lecas M, Gunata ZY, Sapic JC, Bayonove CL. “Purification and partial characterization of β -glucosidase from grape.” *Phytochemistry*, 30, (1991) 451–454
- [42] 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, (2001) 795–805

- [43] Li, Y., Jiang CJ, Wan, XC, Zhang, X. , Li D.. “Purification and Partial Characterization of α -Glucosidase from Fresh Leaves of Tea Plants (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze)” *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 37(6), (2005), 363–370
- [44] 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, (1987) 152–162
- [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, (2001) 995–1005.
- [46] 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, (2001) 4457–4462.
- [47] Odoux, E.; Chauwin, A.; Brillouet, J. M. Purification and characterization of vanilla bean (*Vanilla planifolia* Andrews) β -glucosidase. *J. Agric. Food Chem.* 51, (2003) 3168–3173
- [48] Cicek, M., Blanchard, DR, Bevan Esen A. “The aglikon specificity determining sites are in dhurrinase.” *J. Biol Chem* 275, (2000) 20002-20011
- [49] Romero-Segura, C., Sanz C, Perez AG “Purification and characterization of an olive fruit β -glucosidase involved in the biosynthesis of virgin olive oil phenolics” *J. Agric. Chem* 57 (2009) 7983-7988
- [50] Melanocarpus mantari Kaur, J., Chadha, B.S., Kumar, B.A., Kaur, G.S., Saini, H.S. “Purification and characterization of β -glucosidase from *Melanocarpus sp.* MTCC 3922” *Electronic Journal of Biotechnology*, 10, (2007) p.260-270
- [51] Riou, C, Salmon jM., Vallier, MJ, Gunata, Z. Barre, N “Purification, Characterization, and Substrate Specificity of a Novel Highly Glucose-Tolerant β -Glucosidase from *Aspergillus oryzae*” *Applied and Environmental Microbiology*, oct. 1998, p. 3607–3614
- [52] 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 (2001) 117-127

- [53] Beutler B, Grabowski BA, “The metabolic bases of inherited diseases II. Scriver, CR., et all eds. McGraw-Hill. New York (1995) 2641-2670
- [54] Bautler E, “Gaucher disease: new molecular approaches to diagnosis and treatment.” *Science* 256, (1992) 794-798
- [55] <http://www.biol.vt.edu/faculty/esen/glycosidase/indext2.html>
- [56] Thayer, S.S. and Conn, E.E. “Subcellular localization of dhurrin b-glucosidase and hydroxynitrile lyase in the mesophyll cells of Sorghum leaf blades.” *Plant Physiol.* 67, (1981) 617–622.
- [57] Esen, A. and Stetler, D.A. “Subcellular localization of maize b-glucosidase.” *Maize Genet. Coop. News Lett.* 67, (1993) 19–20.
- [58] Kakes, P. “Function and variation of the β -glucosidase linamarase in natural populations of *Trifolium repens*.” Esen A β -glucosidases overview. In *β -glucosidases: Biochemistry and Molecular Biology* Edited by: Esen A. Washington DC: American Chemical Society; (1993),145-152., ACS Symposium Series 533
- [59] Niemeyer, H.M. “Hydroxamic acids (4-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones), defense chemicals in the Gramineae. *Phytochemistry* 27, (1988) 3349–3358.
- [60] Poulton, JE. “Cyanogenesis in plants.” *Plant Physiol*, 94 (1990) 401-405
- [61] Malboobi, M.A. and Lefebvre, D.D. “A phosphat 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, (1997) 57–68.
- [62] 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, (2000) 1007–1017
- [63] 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, (2001) 345–352

- [64] Piao, H.L. and Hwang, I. "A transgenic Arabidopsis plant overexpressing an ER localized β -glucosidase homolog that is transcriptionally suppressed by NaCl is hypersensitive to NaCl stress" (direct sequence submission to GenBank). (2000)
- [65] Maleck K, Levine A, Eulgem T, Morgan A, Schmid J, Lawton KA, Dangel JL, Dietrich RA. "The transcriptome of Arabidopsis thaliana during systemic acquired resistance." *Nat. Genet.* 26, (2000) 403-410
- [66] Schmidt, K.P., Burrows, P.R., Davies, K.G., Kammerloher, W., Schaeffner, A.R., Buck, F., Cai, D. and Grundler, F.M.W. "A root specific myrosinase in Arabidopsis responding to cyst nematode infection (direct sequence submission to GenBank)." (1995)
- [67] Sue M, Ishihara A, Iwamura H. "Purification and characterization of a hydroxamic acid glucoside β -glucosidase from wheat seedlings." *Planta* 210, (2000) 432-438
- [68] Grohmann, K.; Manthey, J. A.; Cameron, R. G.; Buslig, B. S. Purification of citrus peel juice and molasses. *J. Agric. Food Chem.* 47, (1999) 4859-4867,
- [69] Fenwick GR, Heaney RK, Mullin WJ. "Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants." *CRC Crit Rev Food Sci Nutr*18, (1983) 123-201
- [70] Lecas M, Günata YZ, Sapis JC, Bayonove C. "Purification and partial characterization of β -glucosidase from grape." *Phytochemistry*; 30, (1991) 451-54
- [71] Hartman Schreier J, Schreier P, "Purification and partial characterization of β -glucosidase from papaya fruit." *Phytochemistry*; 451-54, (1986) 2271-2274;
- [72] Günata Z, Bitteur S, Brillouet JM, Bayonove C, Cordonnier R. "Sequential enzymatic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape." *Carbohydr Res*, 184 (1988) 139-149
- [73] 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, (1985) 83-90

- [74] 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, (2000) 5411–5418
- [75] Beguin, P. "Molecular biology of cellulose degradation." *Annu. Rev. Microbiol* 44 (1990) 219–248.
- [76] Persson I, Tjerneld F, Hagerdal HB, "Fungal ccellulolytic enzyme production." A review. *Process Biochemistry* 26, (1991) 65-74
- [77] Demirkan, G. *Climacocystis borealis'den* β -glukozidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans tezi. 2009 KATÜ
- [78] Bhat, M.K. "Cellulases and Related Enzymes in Biotechnology" *Biotechnol. Adv.* (2000).18, 355–383.
- [79] Leah, R., Kigel J., Svendsen, I. and Mundy, J. "Biochemical and molecular characterization of a barley seed bglucosidase." *J. Biol. Chem.* 270, (1995) 15789–15797
- [80] Dharmawardhana, D.P., Ellis, B.E. and Carlson, J.E. A b-glucosidase from lodgepole pine specific for the lignin precursor coniferin. *Plant Physiol.* 107, (1995) 331–339.
- [81] Schliemann, W. "Hydolysis of conugated gibberellins by β -glucosidases from Dwarf rice". *J. Plant Physiol.* 116, (1984) 123-132
- [82] Brzobohaty, B., I. Moore, P. Christofferson, L. Bako, N. Campos, J. Schell, and K. Palme *Science* 262, (1993) 1051-1054
- [83] 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)
- [84] Kore H, Bisesi M. Handbook of Environmental Health And Safety, Lewis Publishers, Florida. (1996)
- [85] Delen N, Durmusoglu E, Güncan A, Güngör N, Turgut C, Burçak A.. Türkiye’de Pestisit Kullanımı, Kalıntı ve Organizmalarda Duyarlılık Azalışı Sorunları, Türkiye Ziraat Mühendisliği 6.Teknik Kongresi. (2005)

- [86] <http://www.gencziraat.com/Zaralilar-ve-Mucadele-Yontemleri/insektisitler-Bocek-ilaclari-2-.B.html>
- [87] Deltamethrin ilacının etiketi
- [88] Diazonon ilacının etiketi
- [89] Glyphosate ilacı etiketi
- [90] Güven A, Kahvecioğlu Ö, Kartal G, Timur S, 2009. Metallerin Çevresel Etkileri-III http://www.metalurji.org.tr/dergi/dergi138/d138_6471.pdf, (Erişim tarihi:12.09.2009)
- [91] Sarkar B. Heavy Metals in the Enviroment, Marcel Dekker, Inc. New York. 2002.
- [92] Selinus O, Alloway B, Centeno JA, Finkelman RB, Fuge R, Lindh U, Smedley P(Editors), Essentials of Medical Geology, Impacts of Natural Environment on Publice Health, Elsevier Academic Pres, 2005.
- [93] Dökmeci İ, Dökmeci AH, Toksikoloji Zehirlendirmede Tanı ve Tedavi, 4.Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, 2005.
- [94] Sienko, R.A. Temel Kimya (Chemistry:Principles and Properties), (Çevirenler: Gündüz N., Gündüz T., Tüzün C., Pulat E., Üneri S., Zeren A., Özgüner S.), Savaş Yayınları,Fen Bilimleri Dizisi. 1983
- [95] Kahvecioğlu Ö, Kartal G, Güven A, Timur S. Metallerin Çevresel Etkileri-I, Metalurji, 136.Sayı, (2009) http://www.metalurji.org.tr/dergi/dergi136/d136_4753.pdf.
- [96] Kukul, Y.S., Ünal Çalışkan, A.D., Anaç, S. “Arıtılmış atık suların tarımda kullanılması ve insan sağlığı yönünden riskler.” *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 44 (3), (2007) 101-116
- [97] Yemenicioğlu, A., Cemeroglu, B. “Hale haven şeftalilerinde polifenol oksidaz enzimlerinin bazı nitelikleri” *Tr. J. of Agriculture and Forestry* 22(1998) 261-265
- [98] Telefoncu A. Biyoteknoloji. Ege Üniversitesi Basımevi Bornova 1996

- [99] Lowry O., Rosebrough, R.J., Farr, A.L., Randall, R.J. "Protein measurement with the folin phenol reagent" (1951) 265
- [100] 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 (2006)565–574
- [101] Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature* 227:680-685,1970.
- [102] Yu, H.L., Xu, J.H., Lu, W.Y., 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 (2007) 354–361
- [103] Karnchanatat, A., Petsom, A., Sangvanick, P., Piaphukiew, J. Whalley A, Reynolds, C., Sihanont P. "Purification and chemical characterization of an extracellular beta- glukosidase from the food decaying fungus *Daldinia eschscholzi*" (2007)
- [104] Elvan, H. *Lepista flaccida* (sowerby : fr.) pat. mantarından β -glukozidaz ve endoglukanaz enzimlerinin kısmiolarak saflaştırılması ve karakterizasyonu Yüksek Lisans tezi 2009 KATÜ
- [105] Robyt, JF., White, BJ., "Biochemical Techniques Theory and Practice", (1990), Waveland Pres, Inc.p:98.
- [106] <http://www.chromatography.amershambiosciences.com>
- [107] 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*, May (1999), **32(5)** 545-550.
- [108] Pond, A.L., Chambers, H.W., Coyne, C.P., Chambers, J.E., Purification of two rat hepatic proteins with A-esteraseactivity toward chlorpyrifos-oxon and paraoxon, *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, (1998), **286(3)**, 1404-1411.

- [109] Öğüt, S., Küçüköner, E. “İsparta ve çevresinde tarımsal üretiminde kullanılan önemli tarım ilaçları” Türkiye 10. gıda kongresi Erzurum 2008
- [110] Rotrekl,V., Nejedla, E., Abdallah, I., Palme, F., Brzobohaty B. “The role of cistein reziduın structure and enzyme activity of maize beta-glucosidase.” *Eur J. Biochem.*266,(1999) 1056-1065
- [111] Hakulinen ,N., Paavilainen, S., Korpela, T., Rouvinen, J. “The crystal structure of beta-glucosidase from *Bacillus circulans.sp alcolophilus*:ağabeylity to form long polymeric assemblies.” *J. Struc. Biol.* 129, (2000) 69-79
- [112] Gueguen, Y., Chemardin, P., Arnaud, A., Gaizy, P. “Comparative study of extracrllular and intracellular β -glucosidases of a new strain of *Zygosaccharomyces bailli* isolated fromfermenting agave juice” *Journal of Applied Bacteriology*, 78, (1995) 270-280
- [113] <http://www.yildiz.edu.tr/~sandalci/dersnotu/TC/TC2.pdf>
- [114] Karademir, M., Toker, CM. “Ankara'nın bazı kavşaklarında yetişen çim bitkilerinde egzoz gazlarından gelen kurşun birikimi” *Ekoloji* 26 (1998) 9-12
- [115] Jones, L. P. H., Clement, C. R. and Hopper, M. J., Lead Upkate from Solution by Perennial Ryegrass and It's Transport from Rools to Shoots. *Plant and Soils*, 38, (1973) 403-414
- [116] Baş, L., Demet, Ö. “Çevresel toksikoloji yönünden bazı ağır metaller” *Ekoloji*, (1992) 5, 42