

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TERMOFİLİK *Anoxybacillus flavithermus* BAKTERİSİNİN ISIL
KARARLI β -GLUKOZİDAZ GENİNİN KLONLANMASI,
EKSPRESYONU ve BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU

Aytül UZUN

TEZ DANIŞMANI

YRD. DOÇ. DR. FATİH ŞABAN BERİŞ

TEZ JÜRİLERİ

YRD. DOÇ. DR. HAKAN KARAOĞLU

YRD. DOÇ. DR. DERYA YANMIŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

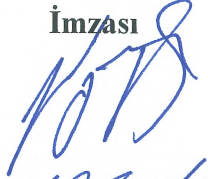

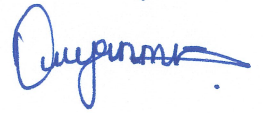
RİZE-2015

Her Hakkı Saklıdır

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TERMOFİLİK *Anoxybacillus flavithermus* BAKTERİSİNİN ISIL KARARLI
β-GLUKOZİDAZ GENİNİN KLONLANMASI, EKSPRESYONU ve
BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU

Yrd. Doç. Dr. Fatih Ş.BERİŞ danışmanlığında, Aytül UZUN tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 28.06.16 tarihinde Biyoloji Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Ünvanı Adı Soyadı	İmzası
Başkan :	YRD. DOÇ. DR. FATİH Ş. BERİŞ	
Üye :	YRD. DOÇ. DR. HAKAN KARAOĞLU	
Üye :	YRD. DOÇ. DR. DERYA YANMIŞ	


Prof. Dr. Selami ŞAŞMAZ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

ÖNSÖZ

“Termofilik *Anoxybacillus flavithermus* bakterisinin ısı kararlı β -glukozidaz geninin klonlanması, ekspresyonu ve biyokimyasal karakterizasyonu” adlı bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Çalışmam süresince Yüksek Lisans tez danışmanlığımı üstlenerek bu çalışmanın planlanıp değerlendirilmesinde desteğini ve bilgisini benden esirgemeyerek deneyimleri ile bana öncülük eden değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Fatih Ş.BERİŞ’ e;

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi birikimi, öneri ve içten yardımları ile desteğini esirgemeyen, sayın hocam Doç. Dr. Cemal SANDALLI’ ya ve enzim kinetiği çalışmalarım aşamasında engin bilgilerinden faydalandığım Yrd. Doç. Dr. Hakan KARAOĞLU’ na;

Eğitimimin süresince birlikte olduğum, öğrenciliğim boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, her konuda desteklerini ve sevgilerini esirgemeyen Meryem GEZİCİ, Dilek ÖZTÜRKOĞLU’na, çalışmamızın projeye dönüşmesinde emeği geçen Esma AKYILDIZ’a, tüm laboratuvar arkadaşlarıma ve yine her zaman desteğini yanımda hissettiğim çok değerli arkadaşım Taner YAZICI’ya;

Hayatımın her aşamasında bana destek olan, yardımlarını esirgemeyen ve her zaman sabır gösteren canım ailem Betül UZUN, Gürsel UZUN ve Volkan UZUN’a sonsuz teşekkür ediyorum.

Hazırlanan bu Yüksek Lisans tezi RTEÜ BAP Birimi tarafından 2012.102.03.7 nolu proje ile desteklenmiştir.

AYTÜL UZUN

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “Termofilik *Anoxybacillus flavithermus* bakterisinin ısıl kararlı β -glukozidaz geninin klonlanması, ekspresyonu ve biyokimyasal karakterizasyonu” başlıklı bu tezin, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim. .../.../...

Aytül UZUN

Uyarı: *Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.*

ÖZET

TERMOFİLİK *Anoxybacillus flavithermus* BAKTERİSİNİN ISIL KARARLI β -GLUKOZİDAZ GENİNİN KLONLANMASI, EKSPRESYONU ve BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU

Aytül UZUN

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Ana Bilim Dalı
Yükseklisans Tezi
Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Fatih Ş. BERİŞ

Dünyada bol bulunan ve yenilenebilir enerji kaynağı olan selülozun yıkımında da rol oynayan enzimlerden biri olan β -glukozidazlar (3.2.1.21), oligosakkaritlerin yapısında bulunan β -glukosidik bağların hidrolizinden sorumludur. Bu çalışmada, termofilik *Anoxybacillus flavithermus* bakterisine ait β -glukozidaz geni PZR ile saptanarak klonlanmış ve *E.coli*'de eksprese edilerek biyokimyasal karakterizasyonu amaçlanmıştır. *Afbgl* geni PZR ile yakalanarak Pet100 Directional TOPO Expression kit ile *E.coli* BL21Star (DE3) hücrelerinde eksprese edilmiştir. Sonrasında ısı çöktürmesi ve Ni^{+2} afinite kromatografisi yöntemleriyle saflaştırılmıştır. SDS-PAGE analizinde enzimin 53 kDa olduğu, optimum çalışma sıcaklığının 65°C, optimum pH'sı 6,8 olarak bulunmuştur. Beta-glukosidaz enziminin substrat spesifikliğı pNPG, pNPC, pNPX ve oNPG substratları kullanılarak belirlenmiştir. Enzimin substratı olan p-nitrofenil β -glukozid ile yapılan kinetik denemelerde V_{max} değerinin β -glukozidaz $5,13 \times 10^5$ $\mu\text{mol/dak/mg}$ protein, K_m değerinin ise 422,3 μM olduğu belirlenmiştir. Doğada sık karşılaşılan ağır metallere K, Fe, Mn, Al, Mg, Zn ve Cu'nun saflaştırılmış β -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine in vitro etkileri araştırılmıştır. Bu ağır metallere Mg'un enzim aktivitesi üzerinde aktivasyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. Ancak Cu, Zn, Al, Mn, Fe ve K ağır metallerinin ise enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir.

2016, 61 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Anoxybacillus flavithermus*, β -glukozidaz, termofilik enzim, pNPG, *E.coli*

ABSTRACT

CLONING AND EXPRESSION OF *Afbgl* GENE FROM, *Anoxybacillus flavithermus* AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF THERMOPHILIC β - GLUCOSIDASE

Aytül UZUN

Recep Tayyip Erdoğan University
Graduated School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Master Thesis

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Fatih Ş. BERİŞ

β -glucosidases (3.2.1.21) hydrolyse cellulose which is the most abundant and renewable source of energy on Earth. Also this enzyme completes the hydrolysis by converting cellobiose and cello-oligosaccharides into glucose monomers. In this study, we aimed to clone, expression, and biochemical characterization of thermophilic β - glucosidase gene from thermophilic bacterium, *Anoxybacillus flavithermus*. The gene was cloned, sequenced, and expressed in *E.coli Afbgl* was cloned and overexpressed in *E.coli* BL21 Star (DE3) host cells with Pet100 Directional TOPO Expression Kit. Then, we purified to homogeneity by heat precipitation and Ni⁺² affinity chromatography. The molecular mass of the recombinant enzyme was 53 kDa. The optimum temperature and pH of the purified enzyme were 65 °C and 6,8, respectively. The specificity of beta-glucosidase enzyme was determined used pNPG, pNPC, pNPX and oNPG substrates. At these points, the enzyme had $5,13 \times 10^5$ $\mu\text{mol/dak/mg protein } V_{max}$ and 422,3 μM of K_m towards p-nitrophenyl β -D-glucoside. The effects of K⁺, Fe⁺², Mn⁺², Mg⁺², Zn⁺², Cu⁺² and Al⁺³, and 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 Mg⁺² has affected as activation on enzyme activity. However, it was determined that the other heavy metals K⁺, Cu⁺², Zn⁺², Mn⁺², Fe⁺² and Al⁺³ have inhibition effects on enzyme activity.

2016, 61 page

Keyword: *Anoxybacillus flavithermus*, β -glucosidase, thermophilic enzyme, pNPG, *E.Coli*.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ	II
ÖZET	III
ABSTRACT	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
TABLolar DİZİNİ	VIII
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	IX
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Selüloz metabolizması	2
1.3. Selülazların Genel Özellikleri	3
1.3.1. Selülazların Uygulama Alanları	5
1.4. Beta-Glukozidaz'ın Biyokimyası	7
1.4.1. Beta-Glukozidaz'ın Genel Özellikleri	7
1.4.2. Beta-Glukozidaz'ın Sınıflandırılması	8
1.4.3. Beta-Glukozidaz Aktivitesi	9
1.4.4. Beta-Glukozidaz'ın Önemi	11
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	14
2.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller	14
2.2. <i>Anoxybacillus flavithermus</i> bakteri hücresinden genomik DNA izolasyonu	15
2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	16
2.4. Ligasyon ve Transformasyon İşlemleri	17
2.5. SDS-PAGE ve Enzimin Saflaştırılması	18
2.6. Enzimin Optimum Sıcaklık ve Optimum pH'sının Belirlenmesi	20
2.7. Enzim Kinetiği Çalışmaları	21
2.8. İnhibitörlerin ve Metal İyonlarının AFBGL Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	22
3. BULGULAR	24
4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	35
5. ÖNERİLER	39
KAYNAKLAR	40
ÖZGEÇMİŞ	49

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Selülozun moleküler yapısı.....	2
Şekil 2.	Selülaz aktivitesi	4
Şekil 3.	β -Glukozidazın genel üç boyutlu yapısı	8
Şekil 4.	p-nitrofenol- β -D-glikopiranozitin β -glukozidaz ile hidrolizi	9
Şekil 5.	Enzimin yapay substratlarından bazıları.....	10
Şekil 6.	PZR ürünlerinin aktarımında kullanılan klonlama vektörü	18
Şekil 7.	<i>Afbgl'</i> ın 1 kb lık dna lader ile UV görüntüsü.....	24
Şekil 8.	Plazmit izolasyonu sonrasında jel görüntüsü	24
Şekil 9.	Sırasıyla indüklenmemiş ve indüklenmiş protein bantları ile protein lader ...	23
Şekil 10.	Ni^+ -NTA sonrası saflaştırılmış protein ve protein lader	26
Şekil 11.	AFBGL'nin optimum sıcaklık grafiği	26
Şekil 12.	AFBGL'nin optimum pH grafiği	27
Şekil 13.	<i>p</i> -NPG substratının K_m ve V_{max} değerlerinin bulunmasında kullanılan Michaelis-Menten eğrisi	28
Şekil 14.	<i>p</i> NP- β -D-cellobioside substratının K_m ve V_{max} değerlerinin bulunmasında kullanılan Michaelis-Menten eğrisi.....	29
Şekil 15.	<i>p</i> NP- β -D-xylopyranoside substratının K_m ve V_{max} değerlerinin bulunmasında kullanılan Michaelis-Menten eğrisi.....	29
Şekil 16.	<i>o</i> NP- β -D-galactopyranoside substratının K_m ve V_{max} değerlerinin bulunmasında kullanılan Michaelis-Menten eğrisi	30
Şekil 17.	Çeşitli metallerin AFBGL aktivitesi üzerindeki inhibitör ve aktivatör etkilerini gösteren grafik.....	31
Şekil 18.	2-propanol'ün AFBGL aktivitesi üzerine etkisini gösteren bağıl aktivite grafiği.....	32
Şekil 19.	Etanol'ün AFBGL aktivitesi üzerine etkisini gösteren bağıl aktivite grafiği .	32
Şekil 20.	2-bütanol'ün AFBGL aktivitesi üzerine etkisini gösteren bağıl aktivite grafiği.....	32
Şekil 21.	β ME'ün AFBGLaktivitesi üzerine etkisini gösteren bağıl aktivite grafiği	33
Şekil 22.	TritonX-100'ün AFBGLaktivitesi üzerine etkisini gösteren bağıl aktivite grafiği.....	33
Şekil 23.	DTT'nin AFBGLaktivitesi üzerine etkisini gösteren bağıl aktivite grafiği....	33

Şekil 24. EDTA'nın AFBGL aktivitesi üzerine etkisini gösteren bağlı aktivite grafiği.....34



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. β -glukozidazgeni için kullanılan primerler.....	16
--	----



SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<i>Afbgl</i>	<i>Anoxybacillus flavithermus</i> β -glukozidaz geni
AFBGL	<i>Anoxybacillus flavithermus</i> β -glukozidazı
bp	Baz çifti
β ME	β -merkaptoetanol
cDNA	Komplementer DNA
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleozit trifosfat
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Enzim Komisyonu numarası
EDTA	Etilendiamin tetraasetikasit
F	Forward (ileri)
Glu	Glutamat
K_m	Michaelis-Menten sabiti
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
IUBMB	Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği
LB	Luria-Bertani
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
MUG	4-Metilbelliferil- β -D-glukopiranozid
μ M	Mikromolar
OD	Optimum yoğunluk
<i>o</i> NPG	<i>o</i> -nitrofenil- β -D-galaktopiranozid
PAGE	Poliakrilamit jel Elektroforezi
<i>p</i> NPG	<i>p</i> -nitrofenil- β -D-glukopiranozid
<i>p</i> NPC	<i>p</i> -nitrofenil- β -D-cellobioside
<i>p</i> NPX	<i>p</i> -nitrofenil- β -D-xylopiranozid
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
R	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rpm	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS	Sodyum dodesil sülfat
[S]	Substrat konsantrasyonu

TAE	Tris Asetat Tamponu
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
Tm	Erime sıcaklığı
UV	Ultraviole
V_{maks}	Maksimum Hız



1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Enzimler, doğanın katalizörleridirler ve dolayısıyla enzimsiz bir hayatın var olması düşünülemez. Bu yüzden enzimlerin özelliklerinin ve davranış biçimlerinin yaklaşık 200 yıldır inceleniyor olması sürpriz değildir. Endüstride enzim kullanımının gün geçtikçe yaygınlaşması, çok değişik kaynaklardan enzimlerin saflaştırılması ve karakterizasyonunu da beraberinde getirmektedir (Ertunga, 2006).

Hidrolaz sınıfına ait olan selülazlar, selülozun glukoza kadar parçalanmasını sinerjik olarak katalizleyen enzim sistemine verilen isimdir. Selülozdan glukozadönüşüm için gerekli olan enzim sistemi; endoglukonazlar, ekzoglukanazlar ve β -glukozidazlar olmak üzere üç farklı enzimden meydana gelmektedir. Endoglukanazlar selülozun iç zincirlerini rastgele keserek yeni zincir uçlarının oluşmasını sağlar. Ekzoglukanaz da oluşan bu yeni selüloz zincirlerinin uçlardan keserek çözünür sellobiyoz birimleri oluştururlar. Son olarak da β -glukozidazlar sellobiyoz birimlerini glukozbirimlerine hidrolizler (Yoon, vd., 2008).

Selülazların biyoteknolojisi 1980'li yılların başında başlamış, öncelikle hayvan yemi ve takiben de gıda sanayinde kullanılmaya başlanmıştır. Artık bu enzimler tekstil, deterjan, kâğıt, küspe gibi birçok endüstri dalında da kullanılmaktadır. Bugün selüloz parçalayıcı enzimler dünya pazarının % 20'sine sahiptir (Bhat, 2000).

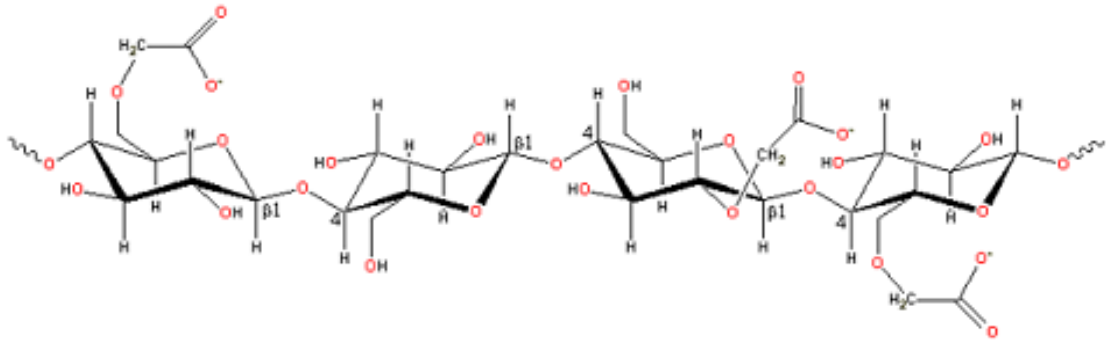
Bu çalışmanın amacı termofilik *Anoxybacillus flavithermus* bakterisinin ticari ve endüstriyel öneme sahip ısı kararlı β -glukosidaz geninin klonlanması, ekspresyonu ve β -glukozidazın saflaştırılmasıyla biyokimyasal karakterizasyonudur.

1.2. Selüloz Metabolizması

Selüloz, kara biyokütlesinin % 50'sini oluşturmasıyla doğada en bol bulunan yenilenebilir enerji, gıda, yakıt ve kimyasal maddelerin organik kaynağıdır. Bu biyomolekül insanlar tarafından yüzyıllardır farklı amaçlar için kullanılmaktadır. Günümüz biyoteknoloji uygulamalarında selülozun kullanımı, biyoişlem teknolojilerinden enzim teknolojilerine, yenilenebilir kaynaklar teknolojilerinden gıda teknolojilerine kadar pek çok alanda substrat olarak karşımıza çıkmaktadır (Beriş, 2014).

Bu polimerin kullanılabilirliği onun glikoza hidroliz olmasına bağlıdır. Selülozun yenilenebilir bir enerji kaynağı olarak önemli bir potansiyele sahip olması, selüloz parçalayıcı enzimler ya da selülazlar ortaya çıktıktan sonra olmuştur (Elvan, 2009). Pahalı olmayan selüloz atıklarının etkili bir şekilde muamelesi ve işlenmesi ile ilgili yeni metodlar geliştirmesi günümüzde ekonomik açıdan oldukça önemlidir. Selülazlar selülozik biyokütlenin etkili bir şekilde işlenmesinde kilit rol sahiptirler (Bhat, 2000).

Selüloz, β -1,4-glukozidik bağlarla bağlanmış yaklaşık 10.000 glukoz rezidüsünden oluşan bir glukoz polimeridir (Teeri, 1997). En basit karbohidrat birimlerinden olan glukoz, selülozun önemli ara ürünlerinden biridir. Selüloz, glukozun β -1,4 glukozidik bağlarla birbirine bağlanması sonucu oluşan lineer bir polimerdir (Şekil 1).



Şekil 1. Selülozün moleküler yapısı (URL-2, 2016)

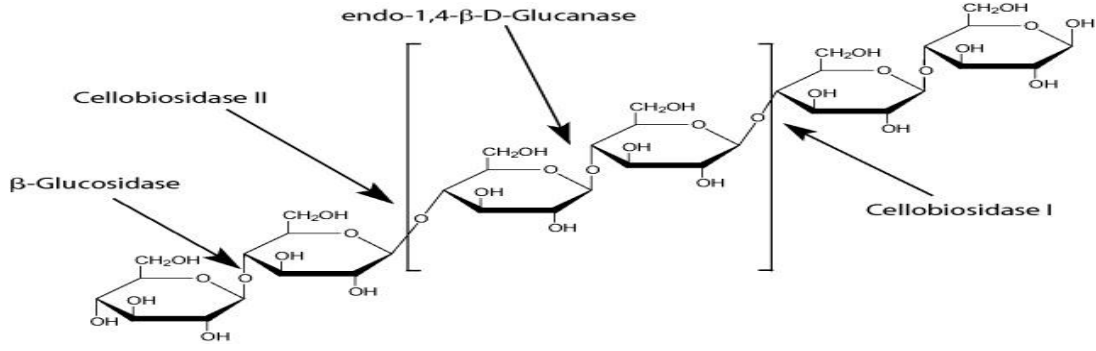
Selüloz, sellobiyozun doğal bir polimeridir. Selüloz molekülü genişletildiğinde dışarıda hidroksil grupları bulunan ve bu sayede molekül içi ve hücre içi hidrojen bağları yapabilen düz bir kurdele yapıda olduğu görülür. Bu kurdelenin yüzeyi karbon

atomlarına direkt bağlı hidrojen atomları içermektedir ve bu nedenle hidrofobiktir. Aralarında hidrojen bağlarının oluşması ile çok sağlam ve esnek olan selüloz lifleri meydana gelir. Selüloz yapısında α -1,4 glikozid bağları yerine β -1,4 glikozid bağlarının bulunması; hem zincirlerin heliks oluşturmayıp lineer sıralar şeklinde dizilmesine hem de hayvansal organizmalardaki sindirim enzimlerinin bu bağları parçalayamamasına sebep olur. Bu nedenle selülozun sindirimi için selülaz enzimine ihtiyaç duyulur (Yılmaz, 2007).

1.3. Selülazların Genel Özellikleri

Hidrolaz sınıfında bulunan selülazlar selülozun glukoza kadar parçalanmasını sinerjik olarak katalizleyen enzim sistemine verilen isimdir. Selülazlar 3 farklı enzim grubundan meydana gelmektedir.

Bu enzimlerden endo- β -1,4 glukanaazlar (endoglukanazlar): EC 3.2.1.4 uluslararası koda sahip olan bu grup, ayrıca selülaz, karboksimetil selülaz, endo-1,4- β -D-glukanohidrolaz olarak da adlandırılır ve total selülazların % 15-20'lik bir kısmını oluşturur (şekil 2). Selüloz moleküllerini, molekül boyunca rastgele hidrolizler. İndirgen olmayan zincir sonları oluşturmak için iç β -1,4-glukozid bağları üzerinde rol oynar. Ekzo- β -1,4 glukanaazlar (sellobiyohidrolazlar): EC 3.2.1.91 kodlu bu grup sellobiyozidaz, ekzosellobiyohidrolaz, selüloz 1,4- β -sellobiyozidaz veya avilaz olarak da adlandırılır ve total selülazların % 35-85'lik bir kısmını oluşturur. Selülaz bileşenleri arasında en az kararlılığa sahip sellobiyohidrolaz, selüloz lifinin sonundaki indirgen olmayan şeker zincirinden sellobiyozun ayrılmasını katalizler. β -1,4 glukozidazlar (sellobiyazlar) ise EC 3.2.1.21 kodlu son grup ise sellobiyaz veya gentobiyaz olarak da isimlendirilir ve selülazların % 1'den az kısmını oluşturur. β -bağlı glukoz oligomerleri, sellobiyoz, sellotrioz ve sellotetraoza böler ve sellobiyozu glukozahidrolizler (Akmaz, 2001; Kuhad vd., 2011).



Şekil 2. Selülaz aktivitelerinin şematik gösterimi (URL-1, 2016)

Geniş bir grup mikroorganizmanın selüloz parçalama yeteneğine sahip olduğu yapılan çalışmalar sonucu ortaya konulmuştur. Birçok selülitik bakteri ve mantar büyük miktarlarda selülaz üretmektedir (Mawadza vd., 2000).

Selülazların termofilik ve alkalofilik bakteriler tarafından da üretimi kanıtlanmıştır (Bischoff vd., 2006; Endo vd., 2001; Sánchez-Torres vd., 1996). Bunlardan bazıları *Clostridium*, *Cellomonas*, *Rumminococcus*, *Alteromonas* ve *Acetivibrio* gibi bakteri türleridir (Trivedi vd., 2011). Ayrıca *Bacillus licheniformis* (Bischoff vd., 2006), *Bacillus sp.* AC-1 (Li vd., 2006), *Flavobacterium johnsonae* (Okamoto vd., 2000), *Geobacillus sp.*, *Microbispora bispora*, *Paenibacillus curdolanolyticus*, *Pseudomonascellulosa*, *Rhodothermus marinus*, *Clostridium thermocellum*, *C. cellulolyticum*, *C. acetobutylium* (Kuhad vd., 2011) gibi bakterilerde de selülaz çalışmaları yapılmıştır.

Aspergillus ve *Rhizopus* gibi mantar türlerindeki selülazlar birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır (Lee vd., 2008). *Fusarium oxysporum* (Shuyan vd., 2006), *Volvariella volvacea* (Dingud vd., 2002), *Xylaria regalis* (Wei vd., 1996), *Coniophora puteana*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Sporotrichum thermophile*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Humicola insolens*, *Penicillium brasilianum*, *P. occitanis*, *Trichoderma reesei*, *Neurospora crassa*, *Thermoascus aurantiacus*, *Mucor circinelloides* (Pere vd., 2001; Kuhad vd., 1999; Kuhad vd., 2011) gibi mantarlarda selülaz aktivitesi çalışmaları yapılmıştır. Selülaz aktivitesinin bulunduğu bazı maya türleri ise *Cryptococcus* (Thongekkaew vd., 2008) ve *Pichia pastoris* (Turan ve Zheng, 2005)'dir.

1.3.1. Selülozların Uygulama Alanları

Selüloolitik enzimlerin üretim ve kullanım maliyetlerinin oldukça yüksek olmasına rağmen, bu enzimler önemli bir ticari ve endüstriyel kullanım potansiyellerine sahiptirler. Özellikle son yıllarda selüloz enzimlerine duyulan ilgi bu enzimlerin biyoenerji ve biyoyakıt üretimi, tekstil, kâğıt ve gıda endüstrisi gibi birçok alanda kullanımlarından dolayı oldukça artmıştır (Sun ve Cheng.,2002; Beriş, 2014; Sukumaran vd., 2005; Singh vd., 2007; Zhou vd., 2008; Kuhad vd., 2011).

Selülozların ana uygulama alanları gıda, hayvan yemi üretimi, tekstil, biyoyakıt, kimya, kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrisi, atıkların giderimi, tıbbi ve farmasötik endüstrisi, protoplast üretimi, genetik mühendisliği, tek hücre proteini eldesi ve kirlilik giderimidir (Bhat ve Bhat, 1997; Beriş, 2014; Kuhad vd., 2011). Selülozların bazı uygulama alanları ise şunlardır:

Gıda endüstrisinde selülozlar;

- Meyve sularının berraklaştırılmasında,
- Meyve pürelerinin vizkozitesinin ayarlanmasında,
- Hububatların homojen su absorpsiyonunun ve su emme etkinliğinin artırılmasında,
- Tohumlardan yağın ve meyve sularının ekstraksiyonunda,
- Hindistan cevizi ve soya fasülyesindeki proteinlerin izolasyonunda,
- Mısır ve tatlı patatesten nişasta üretiminde,
- Deniz yosunundan agar ekstraksiyonunda,
- Gıda katkı maddesi olarak kullanılan öğütülmüş lignoselülozik materyalin parçalanmasında,
- Kurutulmuş sebze ve çorba karışımlarının geri sulandırımının artırılmasında,
- Fermente gıdaların besin değerinin geliştirilmesinde,
- Selülozik atıkların çözünür şeker, glikoz ve selooligosakkarit üretiminde
- Tek hücre proteini üretiminde,
- Meyve ve sebzelerdeki antioksidan maddelerin salınmasında kullanılmaktadır (Beriş, 2014; Sukumaran vd., 2005; Singh vd., 2007; Kuhad vd., 2011).

İçecek ve şarap endüstrisindeki selülozlar;

- Biranın filtrasyonunda,
- Rekombinant mayalardan elde edilen β -1,3 ve β -1,4 glukozazlar şaraplarda aroma artışının sağlanması (Beguin ve Aubert, 1993) ,
- Şarapların aromalarının artırılmasında,
- Düşük kalite arpada bulunan β -1,3 ve β -1,4 glukoz hidrolizinde kullanılmaktadırlar (Sukumaran vd., 2005; Singh vd., 2007; Aygan, 2008; Kuhad vd., 2011).

Hayvan yemi endüstrisindeki selülozlar;

- Hububat tanelerinin kabuklarının çıkarılmadan lignoselülozik materyalin ön muamelesinde kullanılır. Böylece geviş getiren ve tek mideli hayvanlar bu yiyecekleri kolaylıkla sindirebilirler (Mandels, 1985).
- Hayvanların sindirim bölgelerine gerekli selülozı yayabilen transgenik hayvanların üretimi ve lifli gıdaların etkili bir biçimde sindirimine yardım etmek için selüloz genlerinin klonlanmasında (Beguin ve Aubert, 1993),
- Geviş getiren ve tek mideli hayvanların yiyeceklerinin zenginleştirilmesinde de kullanılmaktadır (Kuhad vd., 2011).

Tekstil endüstrisinde selülozlar;

- Pamuk ya da pamuklu kumaşların yıkanması, renk parlaklığının artırılması ve yumuşaklığının geri kazandırılmasında (Beguin ve Aubert, 1993),
- Kot fabrikalarında kotların renklerinin ön soldurma işlemlerinde kullanılan boyanın fazlasının uzaklaştırılmasında (biyotaylama) (Kuhad vd., 2011),
- Pamuklu ürünlerdeki birçok yıkama sonunda pamuk kumaşlardan çıkan mikrofibrillerin giderilmesinde de kullanılmaktadır (Hebeish ve Ibrahim, 2007; Kuhad vd., 2011).

Kâğıt endüstrisinde selülazlar;

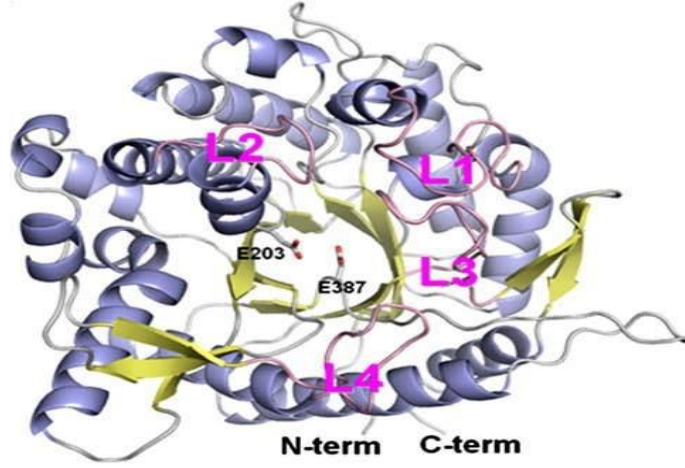
- Kâğıt hamuru ağartma işlemlerinde,
- Enzimatik renk giderme,
- Enzimatik işlemlerle enerji verimliliğinin sağlanması,
- Kimyasal ihtiyacının azaltılmasında kullanılmaktadır (Kuhad vd., 2011).

1.4. Beta-Glukozidaz Biyokimyası

1.4.1. Beta-Glukozidazların Genel Özellikleri

β -glukozidazlar (EC 3.2.1.21), D-glukoz ve bir aglikon (glukoz harici birimler) ya da farklı bir şeker arasındaki β -O-glukozidik bağlarını hidrolizleyerek glukoz ve bir aglikonun açığa çıkmasını sağlayan enzimlerdir (Chuenchor vd., 2008; Wallecha vd., 2003). Aminoasit dizilimlerine göre β -glukosidazlar, Sınıf 1 ve Sınıf 3 olarak iki sınıfa ayrılırlar. Sınıf 1 β -glukosidazlar glikozil β -glukozidaz ve aril β -glukozidaz aktiviteleri gösterir. Bu sınıf enzimler ayrıca sellobiyoz, laktoz ve β -p-nitrofenilglukozid, β -p-nitrofenilgalaktozid ve β -p-nitrofenilfruktozid ve diğer benzer substratları hidrolizler. 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 Şekil 3'te gösterildiği gibi iki adet katalitik glutamat içerirler (Sanz-Aparicio vd., 1998).

Literatürde Sınıf 1 β glukosidaz enzimlerinin monomerleri SDS-PAGE'de 55-65 kDa aralığında tespit edilmiştir. Belirlenen bu monomerlerin polipeptid uzunlukları 447 aminoasitten (*Bacillus polymyxa*'da olduğu gibi) 527 aminoasite (Beyaz hardal mirosinazı) kadar değişebilmektedir (Kara, 2010). Öbakteria ve arkebakterilerdeki enzimlerin polipeptid zincirlerinin daha kısa olması beklenirken ökaryotlardaki enzimlerin polipeptid zincirlerinin daha uzun olması beklenir. Dikotil bitkilerden ve hayvanlardan saflaştırılan tüm β -glukosidazlarda hesaplanan monomerlerin molekül büyüklüklerinin, cDNA ya da genomik DNA'dan hesaplanan molekül büyüklüklerine göre 3-5 kDa daha uzun olduğu tespit edilmiştir (Esen, 2003).



Şekil 3. β -glukozidazların genel üç boyutlu yapısı (Nam vd., 2010)

Sıcaklıkla ilgili yapılan stabilite çalışmalarında da β -glukosidazların 55-60°C'nin üzerinde geri dönüşümsüz olarak inaktive oldukları bulunmuş ve bazı çalışmalar neticesinde de 50-55°C'lerde en yüksek aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir (Esen, 2003). Ayrıca bazı çalışmalarda enzimin pH 4-10 (Haq vd., 2012) ve sıcaklık 0-40°C olduğu değerlerde stabil olduğu tespit edilmiş ve en yüksek stabilitenin pH 8 civarında olduğu bulunmuştur (Naz, 2010).

1.4.2. Beta-Glukozidazların Sınıflandırılması

Beta glukozidazlar, Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından oluşturulan altı sınıflandırma biriminden Hidrolazların bulunduğu 3. sınıfta yer almaktadır (EC.3). Glikozil bileşiklerini hidroliz edenler EC.3.2. alt sınıfında yer alan glikozid hidrolazlardandır (Henrissat, 1991). Glikozid hidrolazlar daha sonra yine Henrissat tarafından 95 enzim ailesi olarak sınıflandırılmıştır (Henrissat vd., 1997; Henrissat vd., 1998). Bu enzim grubunda yer alanlardan O- ve S-glikozil bileşiklerini hidroliz edenler de EC.3.2.1. alt sınıfında bulunmaktadır (Lee, 1968; Henrissat vd., 2000).

EC.3. Hidrolazlar, EC.3.2. Glikozid Hidrolazlar (Glikozil bileşiklerini hidroliz edenler), EC.3.2.1. O- ve S-glikozil bileşiklerini hidroliz edenler (Henrissat vd., 1997),

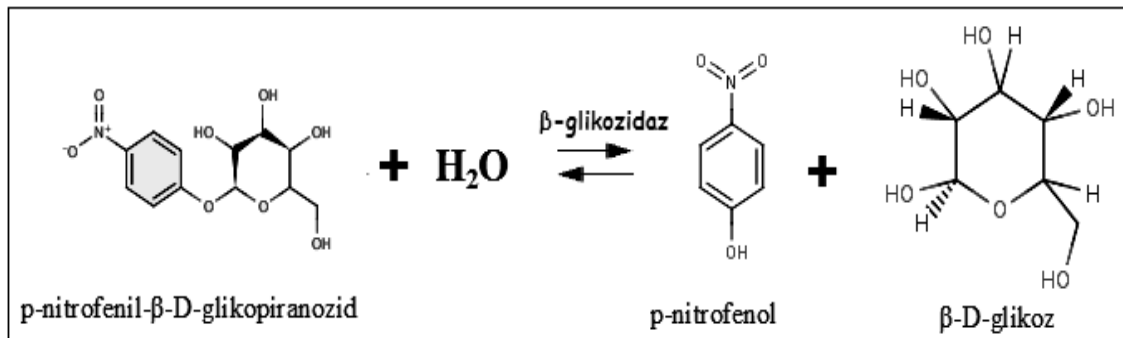
EC.3.2.1.21 β -glukosidazlar (1,4- β -glukosidaz) (Henrissat vd., 1985)şeklinde sınıflandırılırlar.

β -glukosidazlar (β -glukozid glukohidrolazlar, EC 3.2.1.21), aril-,amino-, alkil- β -d-glukozitlerin, siyanojenik glikozitlerin, disakkaritlerin ve oligosakkaritlerin yapısında bulunan β -glukozidik bağların hidrolizinden sorumlu enzimlerdir (Bhatia vd., 2002).

1.4.3. Beta-Glukozidaz Aktivitesi

Günümüzde bakteri, maya, bitki ve hayvan sistemlerinden elde edilen oldukça fazla sayıda β -glukosidaz geni hem *E. coli* hem de ökaryotik konaklara örneğin *S. cerevisiae* ve filamentsi mantarlara klonlanmış ve eksprese edilmişlerdir. Klonlama aşamaları 2 metoda dayanılarak yapılmaktadır; birincisi genomik DNA'dan genin spesifik primerlerle yakalanılarak klonlanmasını ikincisi ise cDNA kütüphanelerinin hazırlanarak problr kullanılarak klonlanmasıdır. Elde edilen rekombinant klonlar, X-glu (5-bromo-4-chloro-3-indolylglucopyranoside), MUG (4-methyl umbelliferyl β -D-glucopyranoside) veya pNPG (*p*-nitrophenyl β -D-glucopyranoside) substratlarının renk değiştirme özelliğinden yararlanılarak üç farklı yolla taranmaktadır (Bhatia vd., 2002).

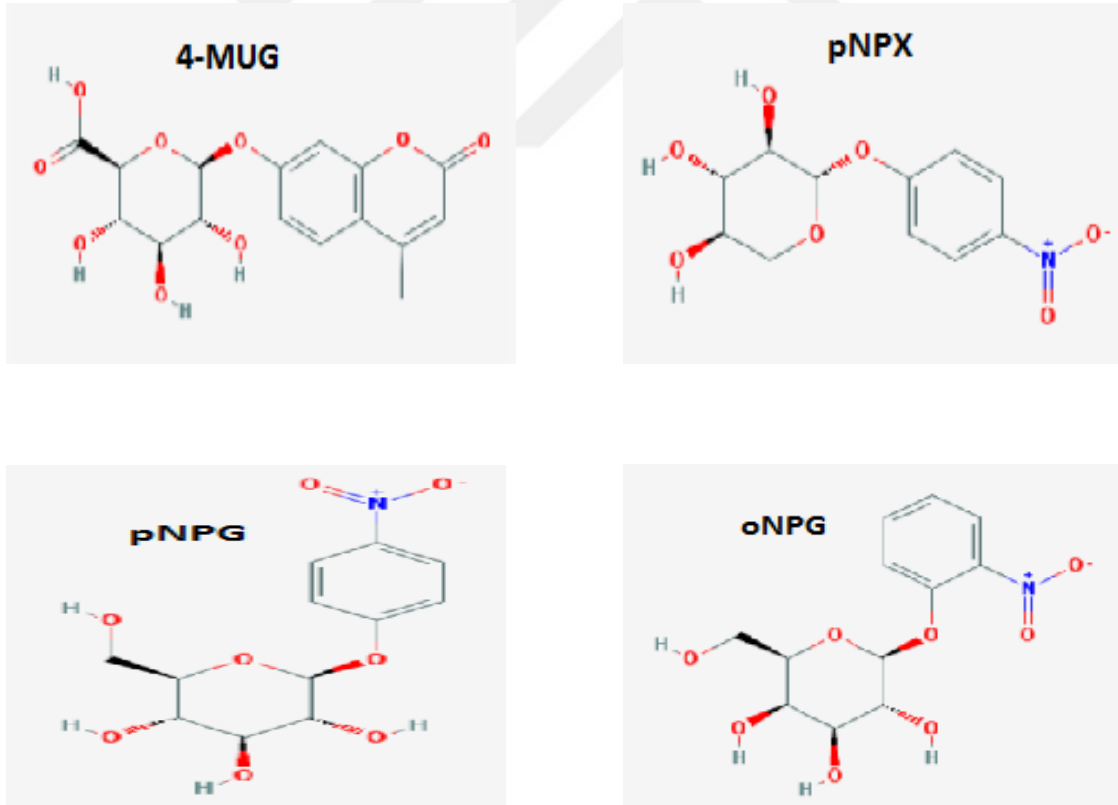
4-metilumbelliferil- β -D-glukopiranozid ve β -naftil- β -D-glukopiranozid gibi substratların hidrolizlenmesiyle açığa çıkan floresan ya da *p*-nitrofenil- β -D-1,4-glukopiranozid substratının hidrolizi ile açığa çıkan renkli ürünün (*p*-nitrofenol) ölçümüne dayanır (Percival vd., 2006). Ayrıca substrat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



Şekil 4. *p*-nitrofenol- β -D-glukopiranozitin β -glukozidaz ile hidrolizi (Lecasvd., 1991).

β -glukosidaz substratlarında bulunan sabit monosakkarite bağı kimyasal grupların çeşitliliği β -glukosidazların substrat çeşitliliğinin esasını oluşturur. Glukoza bağlanan grup ya disakkaritlerde ve oligosakkaritlerde olduğu gibi farklı bir glikon ya da glikokonjugatlarda olduğu gibi bir aglikondur. Bu aglikon kısım linamarinde olduğu gibi bir alkil grup veya prunasin, durrin ve DIMBOAGlc'da olduğu gibi bir aril grup olabilir (Selmar vd., 1987; Czjzek vd., 2000).

β -glukosidazların doğal substratlarının dışında yapay substratlarında kullanılmaktadır. 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 bileşikleri hidroliz ettiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Campos, 1992; Çiçek ve Esen, 1998). Yapılan çalışmalarda β -glukosidazların en yaygın olarak pNPG substratının kullanıldığı görülmektedir.



Şekil 5. Enzimin yapay substratlarından bazıları (URL- 4, 2016).

1.4.4. Beta-Glukozidazın Önemi

Ekstrem termofilik ve hipertermofilik mikroorganizmalardan elde edilen enzimler yüksek sıcaklıklarda stabil kalabilen ve endüstriyel proseslere uygun enzimlerdir. Mezofilik benzerlerine oranla organik çözücülere, deterjanlara, düşük ve yüksek pH değerlerine ve diğer denatüran ajanlara karşı daha stabildirler (Adams ve Kelly, 1995; Covan, 1997; Vieille ve Zeikus, 2001; Zeikus vd., 1998).

Termofilik organizmalardan elde edilen enzimlerin (kısaca termozimlerin) özellikle gıda endüstrisinde sıklıkla karşılaşılan kontaminasyon riskine karşı yüksek sıcaklıklarda iş görmesi sebebiyle avantajlıdır. Düşük sıcaklık değerlerinde aktivitelerinin düşmesi, endüstride istendiğinde sıcaklık düşürülerek kontrol altına alınmasına imkân verdiği için önemlidir. Bu sayılan avantajlar birçok endüstriyel uygulamada önemlilik arz etmektedir (Coolbear, 1992; Huber ve Stetter, 1998; Lasa ve Berenguer, 1993; Niehaus ve ark., 1999; Synowiecki, 1998).

Metabolizmada, hücrel karbohidratların yeniden düzenlenmesinde ve yıkımında, oligosakkarit içeren lipid ve proteinlerin işlenmesinde ve hücre duvarı ve patojen ataklara karşı hücre bariyerlerin yapımında sorumlu olduklarından dolayı β -glukozidazlar temel enzim grubu içerisinde yer alırlar (Bhatia vd., 2002). Tüm bunlara ilave olarak, kimyasal proseslerle sentezlenmesi zor olan farklı kimyasalların üretiminde endüstriyel kullanımları bulunmaktadır. Transglukosilasyon aktiviteleri nedeniyle β -glukosidazların rekombinant kullanımı oldukça yaygındır (Ciaramella vd., 2002; Ducret vd., 2002; Blancic vd., 2003, Na-Young vd., 2007).

β -glukosidazlar, biyolojik olarak oksijen nükleofilleri arasında glikosil transferi yapabildikleri için önemli enzimler olup oldukça iyi karakterize edilmişlerdir. β -glukosidaz, bakterilerden memelilere kadar bulunabilen ve bu organizmalarda yukarıda bahsi geçen metabolik yollarda rol aldığı için oldukça önemli enzimlerdir.

Bakterilerde ve mantarlarda bulunan β -glukosidazlar, selüloz sisteminin bir parçasıdır ve sellobiyoz ve oligosakkarit zincirlerinin glukoz hidrolizinden sorumludurlar (Bisaria ve Mishra, 1989). Böcek ve bitkilerde ise, siyanoglikozid

prekürsörlerinden siyanidlerin salınmasında sorumludurlar ki bu sistem savunma mekanizmaları içerisinde değerlendirilir. İlave olarak bitkilerde, pigment metabolizması, fitokrom biyosentezi, tohum gelişimi ve biyokütle dönüşümünde de görevlidir. İnsanda ise, membrana bağlı lizozomal asid β -glukosidaz, glikosilseramidleri hidroliz eden önemli bir enzimdir. Eksikliğinde ya da yetersizliğinde Gaucher Hastalığı olarak tanımlanan olgu ortaya çıkmaktadır (Bhatia vd., 2002).

Dünyada ilk olarak 1882'de Fransız dermatolog Dr. Phillipe Gaucher tarafından tanımlanan, toplumda az bilinen ancak her yaşta ortaya çıkabilen bir lipid depo hastalığıdır ve lizozomal enzimin kalıtsal eksikliğinden kaynaklanır. Bu enzimin temel görevi vücutta bulunan yağlı glukoserebrosid maddesinin metabolize edilmesine yardımcı olmaktır. Dolayısıyla bu enzimin eksikliği Gaucher Hastalığını tetikler. Ayrıca, enzim eksikliğinde yıkılmayan bu glikosilseramidler, dalak, karaciğer ve lenf nodları gibi organların retikuloendoteliyal hücrelerin lizozomlarında birikmekte ve hastalığa yol açmaktadır (URL-3, 2012).

Farklı kaynaklardan (bakteri, bitki, maya ve mantar) günümüze kadar yapılan bakteriyel kaynaklı pek çok rekombinant β -glukozidaz çalışmaları vardır. Bunlardan bakteriyel ve fungus kaynaklı olanlar *Thermoascus aurantiacus* (Parry vd., 2001), *Thermotoga neapolitana* (Park vd., 2005), *Thermotoga maritima* (Kim vd., 2006), *Bacillus subtilis 168* (Kuo ve Lee, 2008), *Thermotoga neapolitana* (Pozzo vd., 2010), *Thermus thermophilus* (Nam vd., 2010), *Sulfolobus shibatae* (Synowiecki vd., 2006) *Lactobacillus brevis* (Michlmayr vd., 2010), *Bacillus halodurans* (Naz vd., 2010), *Pyrococcus furiosus* (Li vd., 2013), *Aspergillus fumigatus* (Singhania vd., 2013), *Aspergillus niger* (Sorensen vd., 2013), *Sulfolobus acidocaldarius* (Shin vd., 2013), *Thermoascus aurantiacus* (Yan vd., 2013) örnek olarak verilebilir.

Yukarıdaki yer alan organizmalar dışında, bitki, hayvan, insan, maya ve filamentisi funguslar dâhil olmak üzere birçok β -glukozidaz çalışması yapılmıştır. Birçok rekombinant bakteriyel β -glukozidaz, düşük moleküler ağırlıklı ve doğal organizmalarında hücre içi protein olarak görülmektedir. Genellikle, klonlanan enzimler sitosolik karakterde olmasına rağmen, *Ruminococcus* sp. hücre dışı karaktere sahipken

(Takano vd., 1992), *E. chrysanthemi* (Vroemen vd., 1995), *Erwinia herbicola* (Marri vd., 1995) ve *A. Irakense*(Faure vd., 1999) ise periplazmik boşlukta yerleşiktir.

β -glukosidazların endüstride oldukça genişbir uygulama alanlarıvardır. Başlıca potansiyel uygulama alanları gıda, hayvan yemi, tekstil, yakıt ve kimyasal endüstrisidir. Diğer uygulama alanlarıise kağıt ve küspe endüstrisi, atık giderilmesi, medikal/ilaç endüstrisi, protoplast üretimi, genetik mühendisliği ve kirliliğin giderilmesini içermektedir (Bhat ve Bhat, 1997). Örneğin son yıllarda, alternatif enerji kaynağı olarak lignoselülozdan etanol üretiminde kullanılan enzimlerin yetersiz kalması nedeniyle uygulamalar, β -glukosidaz muamelesine yönelmiştir. Böylece selülozun sakkarifikasyonu sağlanmış olacağından bu durum β -glukosidazların endüstriyel talebini arttırmıştır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

Bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'ndaki kültür stoklarında bulunan *Anoxybacillus flavithermus* WK1 bakterisi üzerinde çalışılmıştır.

2.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller

Çalışmamızda kullanılan kimyasal maddeler, gerekli sarf malzemeler, gen aktarımında kullanılan plazmit vektörleri, enzimler ve çeşitli gen çoğaltım çalışması için gerekli primerler ile ilgili bilgiler aşağıda verilmiştir.

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve ilgili bilgileri şu şekildedir. β -merkaptoetanol (Merck, 805740), agaroz type II medium EEO (Sigma, A6877), agar (Merck, VM259713), akrilamid (Sigma, A8887), amonyum persülfat (Merck, A734116), ampisilin (Sigma, A1593), bromofenol mavisi (Sigma, B5525), bisakrilamid (Sigma, M2022), Coomassie Brilliant Blue R250 (Fluka, 27816), EDTA (Merck, K90262021), etanol (Sigma, A3678-1000), etidyum bromür (Sigma, E7637), gliserol (Riedel-deHaën, 15524), glisin (Sigma, G7126), glukoz (Roche, 1929526), HEPES (Sigma, H0891), IPTG (Sigma, I5502), KCl (Merck, K23759135), metanol (J. T. Baker, TBF0196396 1499), N,N,N',N'-tetrametiletilediamin (TEMED, Janssen Chimika, 13,84571), Na₂CO₃ (Merck, A339898), Na₂HPO₄ (Merck, A664174), NaH₂PO₄ (Merck, 567545), NaCl (Merck, 567441), SDS (Amresco, 0227), sodyum asetat (Merck, TA404965), tripton (Merck, V441613949), Tris-HCl (Sigma, T1503), X-gal (AppliChem, A1007.0005), 4-Nitrophenyl β -D-glucoopyranoside (Sigma, N7006), 4-Nitrophenyl β -D-cellobioside (Sigma, N5759), 2-Nitrophenyl β -D-galactopyranoside (AppliChem, A1272.0005), 4-Nitrophenyl- β -D-xylopyranoside (Chem-Impex, 21651). Diğer kimyasallar Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nden temin edildi.

Çalışmada kullanılan besi yerleri içeriklerine göre laboratuarda hazırlandı. Kullanılan besi yerleri, LB (Lauria-Bertani) besi yeri için litrede 10 g tripton, 5 g maya özütü ve 10 g NaCl saf suda karıştırıldı ve pH'sı 7,4'e ayarlanarak hazırlandı.

LBA besi yeri ise 1 litre LB besi yerine 12 g agar ilavesiyle hazırlandı. Tüm besiyerleri hazırlandıktan sonra otoklavda 121°C’de 1,1 atm basınç altında 20 dakika tutularak steril edildi.

Çalışmada kullanılan kitler ve ilgili bilgiler şu şekildedir. Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Katalog No: A1120, Promega Co., Medison, USA), Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Katalog No: A9282, Promega Co., Medison, USA), GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Katalog No: K0502, Thermo Fisher Scientific), iProof™ HF DNA Polymerase Kit (Bio RAD, Katalog No: 1725310), Champion™ pET100 Directional TOPO Expression Kit (Invitrogen, Katalog No: K100-01).

Yapılan PCR çalışmalarında ve DNA dizi analizi sırasında kullanılan primerlerin adları, 5’→3’ yönünde DNA sıraları ve sentez ettirildikleri firmalar ile ilgili bilgiler ise şu şekildedir. Forward (-23) primeri (5’-CACCATGGTAACGAAAAAATTCG-3’, Macrogen Inc, Hollanda), Reverse (-21) primeri (5’-CTCGAGTTGATCAATTAATCC-3’, Macrogen Inc, Hollanda).

Plazmit DNA izolasyonu ve PCR çalışmalarına ait agaroz jel elektroforezi uygulamalarında DNA markırı olarak Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder (Katalog No: SM1331, Thermo Scientific, ABD) kullanıldı. SDS-PAGE çalışmalarında protein markırı olarak Pierce™ Unstained Protein MW Marker (Katalog No: 26610, Thermo Scientific, ABD) kullanıldı.

2.2. *Anoxybacillus flavithermus* Bakterisinden Genomik DNA İzolasyonu

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Labrotuarı bakteri stoklarında yer alan *Anoxybacillus flavithermus* WK1 suşunun gDNA’sını temin etmek için öncelikle gliserol stoğundan 100 µl alınarak 3 mL LB besiyerine ekim yapıldı. Ardından 16 saat boyunca 55°C’de kuru havalı çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Tazelenen kültürden tekrar aynı şekilde kültür atıldı ve 14000 rpm’de 2 dakika çöktürülerek elde edilen pelletten Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega Co., Medison, USA) protokolü uygulanarak genomik DNA izolasyonu yapıldı.

2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Çalışılan *Anoxybacillus flavithermus* WK1 suşunda β -glukosidaz genini klonlayabilmek için uygun gen bölgesinin varlığının tespiti NCBI gen kaynakları kullanılarak istenilen bölgeyi çoğaltmak amacıyla PZR işlemi yapıldı.

β -glukosidaz geninin PZR ile yakalanabilmesi için aynı bakterinin farklı bir alt türü olan *Anoxybacillus flavithermus* WK1 suşu genom verileri kullanıldı. Bu verilere dayanılarak gene özgü ileri ve geri primerler tasarlandı (Tablo 1). Bu primerlerin kullanıldığı PZR şartları şu şekildedir: 10 μ l reaksiyon tamponu (iProof™ HF, Bio RAD), 3 μ l 25 mM MgCl₂, 5 μ l genomik DNA, 2 μ l her bir primerden, 2,5 μ l 10 mM dNTP ve 0,5 μ l iProof DNA polimeraz (iProof™ HF DNA Polymerase, Bio RAD) son hacim 50 μ l olacak şekilde dH₂O ilave edildi.

Tablo 1. β -Glukozidaz geni için kullanılan primerler

İlgili Gen	Primer sırası (5'→3')	Nükleotid Uzunluğu	Tm Derecesi (°C)
<i>Afbgl</i>	F:CACCATGGTAACGAAAAAATTCG	23	59,3
	R:CTCGAGTTGATCAATTAATCC	21	62

Afbgl geni için hazırlanan reaksiyon karışımı aşağıdaki koşullar altında yapıldı. İlk ön denatürasyon basamağında 95°C'de 3 dakika tutulduktan sonra 20 döngü boyunca 95°C'de 20 saniye denatürasyon, 45°C'de 1 dakika annealing ve 72°C de 1 dakika 10 saniye uzama basamağı ve yine 72°C'de 10 dakika son uzama ile reaksiyon tamamlandı. Polimeraz zincir reaksiyonunda oluşan ürünlerin görüntülenmesi agaroz jel elektroforez yardımıyla gerçekleştirildi.

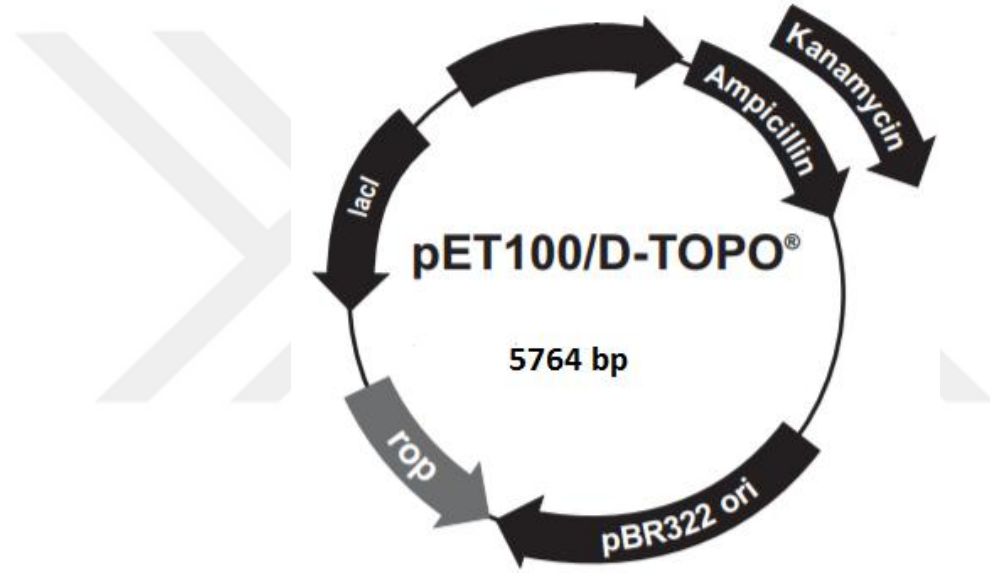
Görüntülenme işlemi gerçekleştirmek için hazırlık safhası şu şekilde gerçekleştirildi. % 1'lik jel hazırlamak için 100 mL 10X TAE tamponuna 1 g agaroz eklendi ve çözünmesi için ısıya tabi tutuldu. Çözelti oda sıcaklığına geldiğinde 10 mg/mL konsantrasyonda 4 μ l ethidium bromid eklenerek agaroz jel tepsisine döküldü. Jel donduktan sonra 5 μ l DNA örneği 2,5 μ L yükleme boyası ile karıştırıldı ve 1 kb büyüklüğündeki DNA marker (Thermo Scientific, Litvanya) ile beraber jelin

kuyucuklarına pipet yardımıyla aktarıldı. Yürütme tamponu yardımıyla 30 dakika 160 V da yürütme işlemi gerçekleştirildi. Yürütme işlemi bitikten sonra UV ışığında görüntüleme işlemi yapılarak tamamlandı. Yürütme işlemi sonucu 1395 baz çifti büyüklüğünde DNA fragmenti görüldü.

2.4. Ligasyon ve Transformasyon İşlemleri

Görüntüleme sonrasında elde edilen 1395 baz çifti büyüklüğündeki PZR parçası kullanılarak ligasyon aşamasına geçildi. Elde edilen PZR ürünleri pET100 Direction TOPO (Invitrogen, Champion™ pET100 Directional TOPO Expression) klonlama vektörüne klonlandı. Yapılan ligasyonun reaksiyon şartı pET100 Direction TOPO 0,5 µl, Bufferdan 0,5 µl, PZR ürününden 2 µl alınarak 25°C de 20 dakikalık bir ligasyon işlemine tabi tutulmuştur. Ligasyon işlemi sonunda 1,5 µl ligasyon ürünü ve 3,5 µl dH₂O ilave edilip transformasyon aşamasına geçildi. 110 µl'lik *E. coli* BL21 Star™(Invitrogen, Champion™ Pet100 Directional TOPO Expression Kit) hücrelerine son hacmi 5 µl olan dH₂O ve ligasyon ürünü olan karışım eklendi. Ardından buzda 20-30 dakika arasında bekletildi. Bekleme sonunda 42°C de 1,5 dakika Thermo-Shaker cihazında bekletildi. Sonratekrar buzda 1,5 dakika bekletildi. Daha sonra tüplerin içine 200 µl LB eklendi. 37°C de 2 saat boyunca çalkalayıcı etüvde inkübe edildi. İnkübasyonun sonrasında 1300 rpm de 1 dakika çöktürme işlemi gerçekleştirildi. Süpernatantın bir kısmı alınıp kalan süpernatant ile pellet çözüldü. Ampisilinli luria broth agar petrisine ligasyon ürünü baget yardımıyla yayıldı. 37°C lik etüvde 16 saat boyunca inkübasyon işlemine tabi tutuldu. İnkübasyon işleminden sonra petride oluşan beyaz koloniler seçilerek 3mL ampisilinli LB sıvı besiyerine ekim yapıldı. Ekimi yapılan kültürler 16 saat boyunca 37°C de çalkalayıcı etüvde büyümeye bırakıldı. Büyüyen plazmitlerin izolasyonu yapıldı ve izolasyon için plazmit kiti (Thermo Scientific, Litvanya) kullanıldı. Ependorf tüplere alınan kültürlerin pelletleri üzerine 250 µl resüpsansiyon solusyonundan eklenerek vorteksleme işlemiyle pellet çözüldü. Daha sonra 250 µl Lysis solusyonu eklendi ve alt üst edilerek 350 µl neutralization solusyonu eklendi. 14000 rpm de 5 dakika santrifüje tabi tutuldu. Süpernatant kitte bulunan filtrelili tüpe aktarıldı ve tekrardan 14000 rpm de 1 dakika santrifüjlenerek filtrelili tüpe aktarılan süpernatant filtreden geçmesi sağlanarak plazmitin fitrede kalmasıyla tüpte dibe çöken kısım atıldı. Filtreye 500 µl wash solusyonu eklenerek

14000 rpm de 1 dakikalık santrifüj yapıldı. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Ardından filtre yeni tüpe alınarak üzerine 50 µl elusyon buffer eklenerek 2 dakika bekletilip daha sonra 14000 rpm de 2 dakika santrifüj edilerek plazmit izolasyonunu gerçekleştirildi. İzolasyon sonrası izole edilmiş plazmit örnekleri agaroz jel elektroforeziyle görüntüledi. Klonlama sonrasında elde edilen plazmitler DNA dizi analizi için MacroGen firmasına (Amsterdam, Hollanda) gönderildi. Daha sonrasında dizi analizleri, GenBank veri tabanı taramaları ile NCBI BLAST programlarıyla sonuçlar analiz edilerek değerlendirildi.



Şekil 6. PZR ürünlerinin aktarımında kullanılan klonlama vektörü (Invitrogen, Champion™ Pet100 Directional TOPO Expression kit) (URL-4, 2016).

2.5. SDS – PAGE ve Enzimin Saflaştırılması

Analiz sonrası protein profilini incelemek amacıyla 100 ml'lik ampisinli sıvı besiyerine 1 ml kültürden ilave edildi ve 2 saat boyunca OD 0,5-0,6 aralığını yakalayana kadar inkübasyona tabi tutuldu. İnkübasyon süresi sonunda 50 ml'si 50 µl IPTG (1M stok) ile indüklendi. 50 ml'si ise indükleme işlemine tabi tutulmayıp kontrol olarak kullanıldı. İndüklenen kültür 4 saat boyunca büyütüldü ve 10 dakika buzda bekletildi. 7500 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek pellet üzerine liziz tamponu (10 ml pellet çözmek için; 500 µl Tris (50 mM pH 6,8), 0,2 mg lizozim, 10 µl DTT, 500 µl NaCl

(4M)) hazırlanarak 5 ml'lik liziz tamponunda çözüldü. Daha sonra sonikatörde patlatılıp 1 saat buzda saklandı. Tekrar sonikasyon işlemi uygulayıp 8000 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüj yapıldı ve süpernatant -20°C'de muhafaza edildi.

SDS PAGE yapmak için % 10'luk üst jel 5 ml için (1,90 ml saf su, 1,70 ml % 30'luk akrilamid çözeltisi, 1,5 M Tris (pH 8,8) 1,30 ml, 50ml % 10'luk SDS, 50 ml % 10'luk APS, 2 µl TEMED), % 12'lik alt jel için 2 ml (1,40 ml saf su, 330 ml % 30'luk acrylamide, 1 M Tris (pH 8,8) 250 ml, 20 ml % 10'luk SDS, 20 ml % 10'luk APS, 2 µl TEMED) hazırlandı ve SDS PAGE jelinde 15 µl yükleme boyası (8 ml % 10'luk SDS, 2,5 ml pH 6,8 Tris HCl, 4 ml gliserol, 2 ml 2-β-merkaptotanol, 0,04 g bromofenol blue ve 20 ml'ye dH₂O ile tamamlanıp stok hazırlandı) ve 25 µl liziz tamponunda çözülmüş pelletten yüklenip protein bant analizi yapıldı.

Protein bantlarının protein ladder ile karşılaştırılması ve Protein Molecular Weight Calculator programı kullanılarak çalışılan proteinimizin 53 kD olduğu analizi yapılmıştır. Yalnızca istediğimiz proteini çalışabilmek ve *in vitro* analizler yapabilmek için proteinin diğer hücre bileşenlerinden saflaştırılması gerekir. Saflaştırma sürecini kolaylaştırmak amacıyla proteinin yapısı ve etkinliğine etki etmeden bazı kimyasal özellikler eklenebilir. Belli bir amino asit dizisinden oluşan bir işaret (tag, kuyruk) çoğu zaman bir seri histidin uzantısı (His-tag) proteinin bir ucuna eklenebilir. Bizde çalışmamızda saflaştırma aşamasında bu yöntemi kullanarak nikel içeren bir kromatografi kolonundan lizati geçirerek histidin kalıntılarını nikel bağlayıp kolonda tutunmasını ve lizati işaretlenmemiş diğer proteinlerden ayırıp saf bir şekilde elde edildi.

Saflaştırma işlemi için indüklenmiş varlığı tespit edilmiş proteinde *E.coli*'den proteinleri ortamdaki uzaklaştırmak için 60 °C'de 30 dakika Thermo-Shaker cihazında ısı uygulaması yapıldı. 14000 rpm'de 15 dakikasıntrifüj edilip süpernatant yeni bir tüpe alındı. Ayrıca kontrol amaçlı 200 µl'lik örneğe ısı muamelesi yapılmadı. Isı uygulamasından sonra protein saflaştırma aşamasına geçildi. Saflaştırma için Ni NTA RESİNS (nickel-nitrilotriacetic acid) kullanıldı. Bunun için Binding buffer (10 ml 0,5 M HEPES pH 7,5 ve 0,25 ml 2M imidazol son hacim 50 ml olacak şekilde dH₂O ile tamamlandı.), Wash Buffer (2 M 500 µl imidazol, 10ml HEPES pH 7,5 konulup son

hacim 50 ml'ye tamamlandı), Elution Buffer (50 mM imidazol uygulaması için 2 M 1,25 ml imidazol ve 10ml HEPES pH 7,5 (0,5 M), 100 mM imidazol için 2 M 2,5ml imidazol, 10 ml HEPES pH 7,5, 200 mM imidazol uygulaması için 5 ml imidazol, 10ml HEPES pH 7,5 1000 mM imidazol için 25ml imidazol 10 ml HEPES pH 7,5 koyulup son hacimler 50 ml'ye dH₂O ile tamamlandı.

İlk olarak kolondan 14ml binding buffer eklenip kolon yıkandı. 20 ml'lik protein süpernatantı kolono eklendi. Kolondan geçen kısım yeni bir tüpe alındı. Daha sonra kolona 20 ml Washing Buffer konularak kolondan geçirildi. Bu geçen kısımda başka bir tüpe toplandı. Sırası ile en düşük imidazol konsantrasyonu içeren (50 mM, 100 mM, 200 mM, 1000 mM) elution bufferlar kolondan 5'er ml geçirildi ve her bir elution buffer farklı bir tüpe toplandı. Bu işlemler yapılırken kolondan akış sırasında Bradford boyası ile renk değişimi kontrol edilerek her aşamada 50 µl'lik numuneler alındı. Her aşamada alınan 50µl'lik proteinler SDS PAGE yapılarak yürütülüp saflaştırma işleminin kontrolü yapıldı.

Protein saflaştırma işleminden sonra proteini küçük moleküllerden ayırtmak için diyaliz işlemi uygulandı. Bunun için önce diyaliz tamponu hazırlandı (100ml 0,5 M HEPES pH 7,5 ve 400ml dH₂O). Daha sonra yarı geçirken bir diyaliz membranına saf protein karışımı konuldu ve hazırlanan tampon içerisine konularak 12 saat magnetik karıştırıcı üzerinde diyaliz edildi. Diyaliz sonrası 1µl saf diyalize olmuş protein örneği 280 nm de nanodrop cihazında ölçülerek 0,524 mg/ml olarak belirlendi.

2.6. Enzimin Optimum Sıcaklık ve Optimum pH'sının Belirlenmesi

Enzim için uygun pH aralığını ve uygun sıcaklığı bulmak amacıyla çeşitli tampon ve pH aralıklarıyla denemeler yapıldı. İlk olarak optimum sıcaklık denemeleri yapıldı. β-glukosidaz aktivitesini belirlemek için enzim tarafından hidrolize edilen p-nitrophenyl glycoside (pNPG) (Sigma) kullanıldı. Bunun için son konsantrasyonu 1mM pNPG den 25 µl, 100mM sodyum fosfat (Merck) pH 7,0'dan 470 µl alınıp 5 dakika 70°C inkübe edildi. Daha sonra 5 µl (20 ng) sulandırılmış enzim çözeltisi ilave edilerek 37°C'de de 30 dakika boyunca inkübe edildi. Süre sonunda reaksiyonu sonlandırmak için 500 µl

1M Na₂CO₃ (Merck) ilave edildi. Daha sonra pNPG hidroliziyle oluşan renk değişimi 405 nm de mikropate okuyucuda okundu.

Enzimin termofilik bir bakteriden izole edilmesinden dolayı bakterinin büyüme sıcaklığı olan 55°C’de veya daha yukarı sıcaklık değerlerinde beklenen aktiviteden çok aktivite göstermesi doğaldır. Bu nedenle çalışma çoklu tekrarlı seriler halinde hazırlanarak sıcaklığı 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 olarak belirlenip enzimlerin denatürasyon sıcaklığına kadar arttırıldı. Bu reaksiyonlar sonucunda, en uygun çalışma sıcaklığının optimum 65°C olduğu belirlendi.

Çalışılan enzimde optimum pH ve uygun tampon için Tris HCl pH 5,9-9,2 aralığı Glisin pH 8,4-10 aralığı McIlvaine tamponu (disodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄, Merck), sodyum dihidrojen fosfat (NaH₂PO₄, Merck) pH 3-8 aralığı çalışıldı. Bunun için 1 mM pNPG den 25 µl,450µl kullanılacak tampondan, 5µl (20 ng) sulandırılmış enzim çözeltisi ilave edilerek optimum sıcaklık olan 65°C de inkübe edildi. Bu işlem her bir tampon ve her bir pH değeri için çoklu tekrar serileri şeklinde uygulandı. Yapılan tampon çalışmasında en uygun tamponun Mcilvaine pH 6,8 olduğu belirlendi. 4-Nitrofenol (Sigma) standart grafiği oluşturuldu ve her dakika basına 1µmol pNP nin serbest kalması için gerekli olan enzim miktarı belirlendi.

2.7. Enzim Kinetiği Çalışmaları

Anoxybacillus flavithermus WK1 β-glukozidazı (AFBGL) tarafından pNPG substratını hidroliz edebilme yeteneği açısından spektrofotometrik olarak incelenmiştir. K_m ve V_{max} değerlerini belirlemek için 10 µM-6 mM aralığındaki konsantrasyonlarda 4-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside (Sigma, 015K5332) ticari substratı ile substrat değişimi deneyleri yapıldı. Bunun için değişen substrat miktarlarıyla beraber 5 µl (20 ng) enzim, 250 µl Mcilvaine tamponu pH 6,8 ve son hacim 500 µl olacak şekilde dH₂O ilavesiyle 65°C’de 30 dakika boyunca her bir substrat konsantrasyonu için çok tekrarlı seriler halinde yapılarak reaksiyonlar gerçekleştirildi. 405 nm de mikropate okuyucuda okundu ve Michaelis-Menten sabiti (K_m), enzimin maksimum hızı (V_{max}) ve substrat miktarı belirlendi.

β -glukozidazın substrat özgülüğü pNP- β -D-cellobioside, oNP- β -D-galactopyranoside, pNP- β -D-xylopyranoside, pNP- β -D-glucopyranosidesubstrat olarak kullanılarak belirlendi. Her reaksiyon karışımında (500 μ l), 250 μ l mcilvaine tamponu pH 6,8, 5 μ l (20 ng) enzim belirli mM aralıklarında substrat ve toplam dH₂O ile tamamlandı. Substratlardan pNP- β -D-cellobioside 10 mM stoktan 6 mM-10 μ M, oNP- β -D-galactopyranoside de 50 mM stoktan 20 mM-10 μ M, pNP- β -D-xylopyranoside de ise 50 mM stoktan 20 mM-10 μ M, pNP- β -D-glucopyranoside de 10 mM stoktan 6 mM-10 μ M arasındaki değerler çoklu tekrarlı seriler halinde 65°C'de 30 dakika boyunca inkübe edildi. Daha sonra 405 nm mikroplate okuyucuda değerler okundu ve Michaelis-Menten eğrileri çizilerek K_m değerleri karşılaştırıldı.

2.8. İnhibitörlerin ve Metal İyonlarının AFBGL Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

İnhibitör aktivatör deneylerinde metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini araştırmak için KCl, CuCl₂, FeCl₂, MnCl₂, MgCl₂, ZnCl₂ ve AlCl₃ olmak üzere 7 farklı metalle farklı konsantrasyonlarda inhibitör, aktivatör etkileri çalışıldı. Bunun için her bir metal için 10 mM'lık stoklar hazırlandı. Daha sonra pNPG substratını çalışarak belirlediğimiz substrat miktarı olan 400 μ M miktarını sabit tutarak 10 mM'lık ana stoktan 20 μ l pNPG hazırlandı. 5 μ l (20 ng) olan sabit enzim miktarı ile 50 mM pH 6,8 25 μ l MOBS tamponuyla son hacim 500 μ l olacak şekilde dH₂O ile tamamlanarak 65°C'de 30 dakika boyunca her bir metal 0,1 mM–10 mM aralığında çoklu tekrar serileri halinde reaksiyonlar gerçekleştirildi. 405 nm de mikroplate okuyucuda okunarak sonuçların aktivatör ve inhibitör etkileri karşılaştırılarak tüm sonuçlar bağıl aktivite (%) cinsinden hesaplandı.

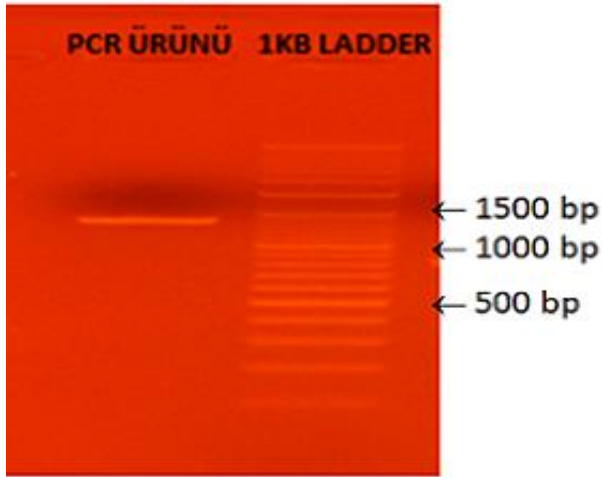
Çeşitli kimyasallarla yapılan inhibitör aktivatör deneylerinde ise TritonX-100, EDTA, 2-propanol, DTT, β ME, etanol, 2-bütanol gibi kimyasallar kullanıldı. İnhibitörlerden TritonX-100 % 1-% 20, EDTA 1 mM- 200 mM, 2-propanol % 1-% 30, DTT 400 μ M-1 mM, β ME % 1-% 20, etanol %1 -% 40, 2- bütanol % 1-% 30 aralığındaki değerler kullanıldı. Her bir inhibitör konsantrasyonu için 5 μ l(20 ng) enzim, 20 μ l pNPG substratı, 250 μ l mcilvaine tamponu pH 6,8 kullanıldı. Her bir

konsantrasyon için inhibitörsüz kontrol grupları da çalışılıp enzim aktiviteleri %100 olarak alınarak tüm sonuçlar bağıl aktivite (%) cinsinden hesaplanmıştır.



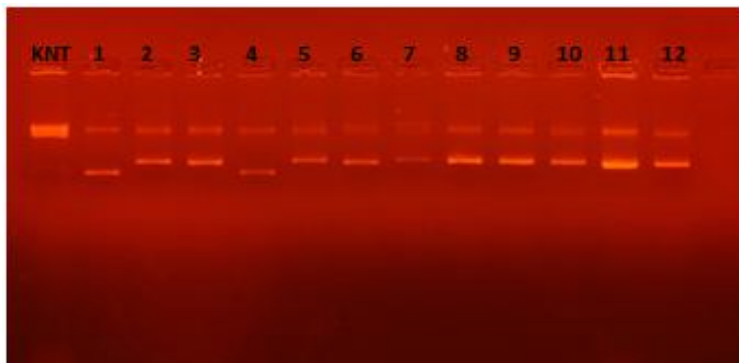
3. BULGULAR

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Labrotuarı'nda bulunan kültür stoklarından *Anoxybacillus flavithermus* WK1 bakterisinin gDNA izolasyonu ve PCR işlemi sonrasında 1395 baz çifti büyüklüğündeolan DNA fragmenti elde edildi.



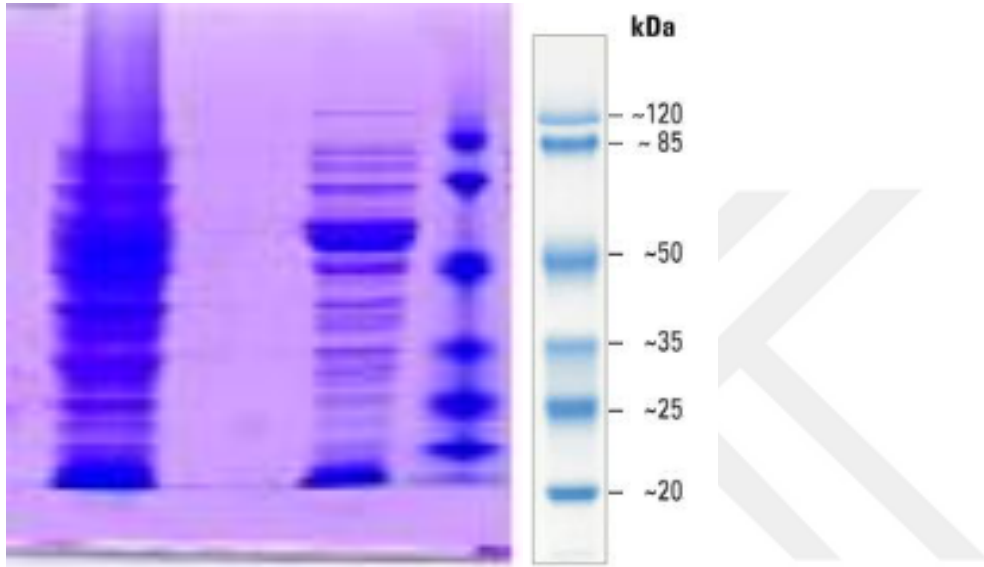
Şekil 7. *Afbgl*' in 1 kb lık DNA marker (1 kb plus DNA Ladder, Thermo Scientific) ile UV görüntüsü

PZR ürünün pET100 Direction TOPO (İnvitrogen, Champion™ pET100 Directional TOPO Expression) vektörüne transformasyonu ve *E. Coli*BL21 Star™ (invitrogen, Champion™ pET100 Directional TOPO Expression Kit) kompetent hücrelerine aktarımı sonrasında plazmit dna izolasyonu yapılarak transforme edilerek klonlama çalışmaları yapıldı.



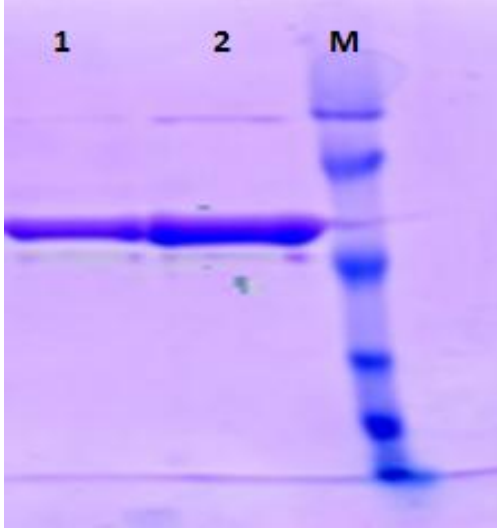
Şekil 8. Plazmit izolasyonu sonrasında jel görüntüsü (KNT: Gen içermeyen plazmit)

DNA dizi analizleri sonrası doğruluğu belirlenen plazmit ile SDS PAGE ve saflaştırma çalışmaları yapıldı. SDS PAGE sonrasında protein bantlarının protein lader ile karşılaştırılması ve Protein Molecular Weight Calculator (URL-5, 2015) programı kullanılarak proteinin moleküler ağırlığının 53 kD olduğu görülmüştür. Şekil 10'da İndüklenmiş ve indüklenmemiş kültür örneklerinin jelde ayrılması sonucu protein lader (Thermo Scientific) ile karşılaştırılması verilmiştir.



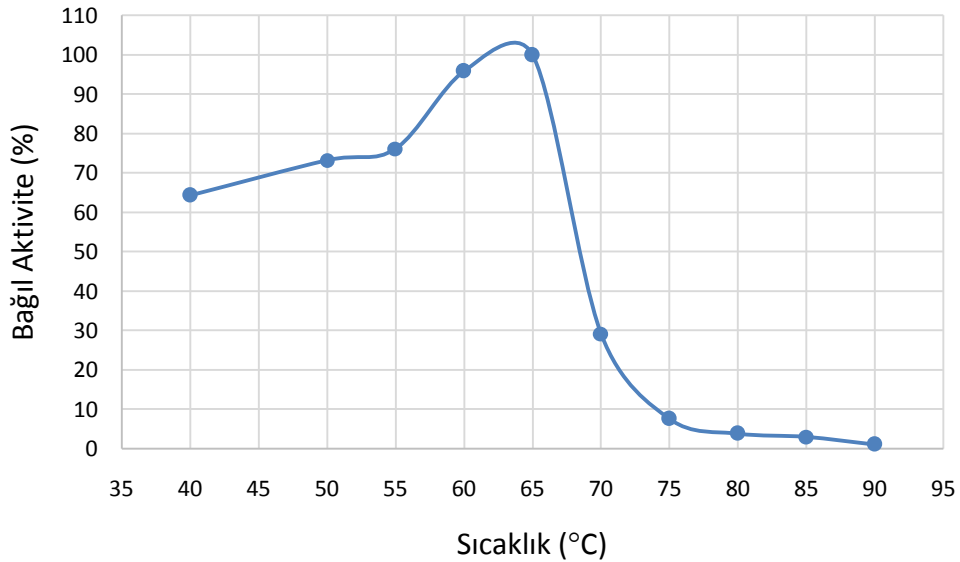
Şekil 9. Sırasıyla indüklenmemiş ve indüklenmiş protein bantları ile protein lader (Thermo Scientific, ABD)

İstediğimiz proteini çalışabilmek ve in vitro analizler yapabilmek ve proteinin diğer hücre bileşenlerinden ayrabilmek için saflaştırma işlemi uygulandı. Bu işlemde kullanılan nikel kromografi kolonundan geçen lizatın her bir safhasındaki işlemden örnekler alınarak SDS PAGE de yürütülerek çalışılan proteinin saflaştırılması kontrolü yapıldı. Şekil 10'da saflaştırılan protein bantlarının görüntüsü verilmiştir.



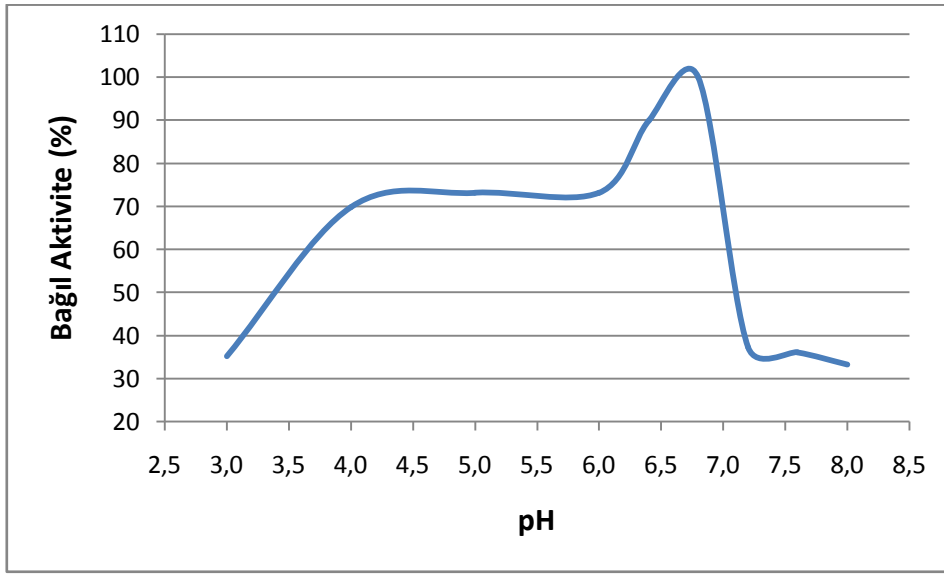
Şekil 10. Ni-NTA sonrası saflaştırılmış protein (1: 200 mM imidazol elution buffer, 2: 1000 mM imidazol elution buffer, M: protein marker (Thermo Scientific, ABD))

Enzimin optimum sıcaklık ve pH aralıkları belirlemek için yapılan çalışma sonucunda farklı sıcaklık aralıklarında ve çoklu tekrarlı seriler halinde yapılan deneyde β -glukozidazın *p*NPG substratını parçalayarak serbest *p*NP salmasıyla ortamdaki klorometrik değişim mikropate okuyucuda okunması sonucu enzimin optimum sıcaklık değeri bağlı aktivite (%) cinsinden hesaplandı ve 65°C olduğu gösterildi.



Şekil 11. AFBGL'nin optimum sıcaklık grafiği

Enzimin enzimatik reaksiyonlarında hangi tamponda en iyi aktivite sonuçlarını verdiği ve optimum pH aralığını belirlemek için Tris HCl pH 5,9-9,2, Glisin pH 8,4-10, Mcilvaine tamponu (disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4) pH 3-8 ile çalışıldı. Çalışmada en iyi aktivite sonuçlarını mcilvaine tamponuyla elde edildiği belirlendi. β -glukozidazın *p*NPG substratı hidrolize ederek *p*NP salıvermesi sonucu klorimertik değişimi spektrofotometri ölçümleriyle optimum pH'nın bağıl aktivite (%) cinsinden pH 6,8 olduğu belirlendi.

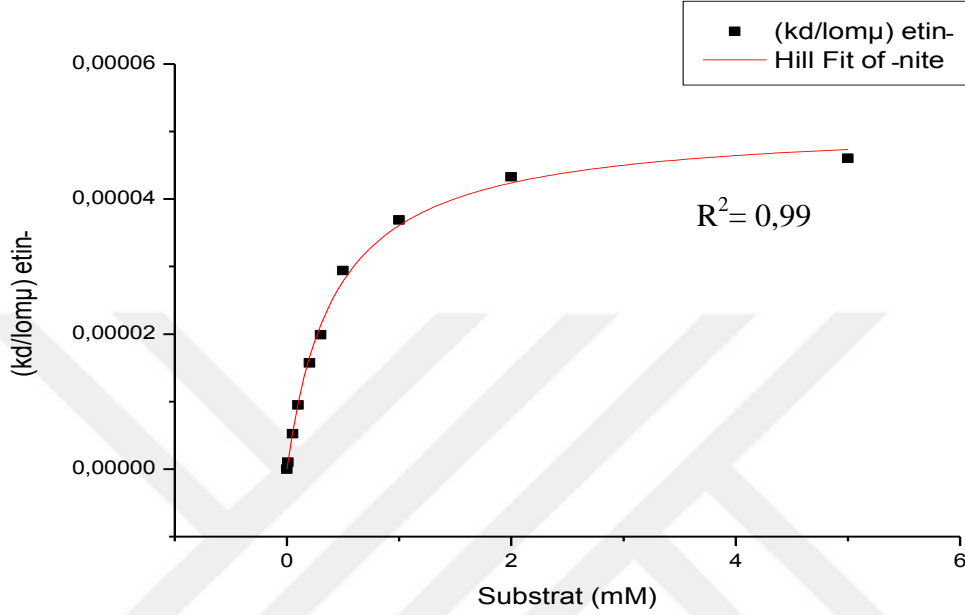


Şekil 12. AFBGL'nin optimum pH grafiği

Enzim kinetiği çalışmasında β -glukozidazın farklı substratlara olan ilgisini çalışmak amacıyla her bir substrat farklı konsantrasyon aralıklarında çalışıldı. *p*NP- β -D-cellobioside (*p*NPC), *o*NP- β -D-galactopyranoside (*o*NPG), *p*NP- β -D-xylopyranoside (*p*NPX), *p*NP- β -D-glucoyranoside (*p*NPG) gibi farklı ticari substratlarla olan ilgisi ORJİN (Orgin Pro version 8,1) programında Michaelis-Menten eğrileri çizilerek K_m ve V_{max} değerleri hesaplanıp literatür karşılaştırmaları yapıldı.

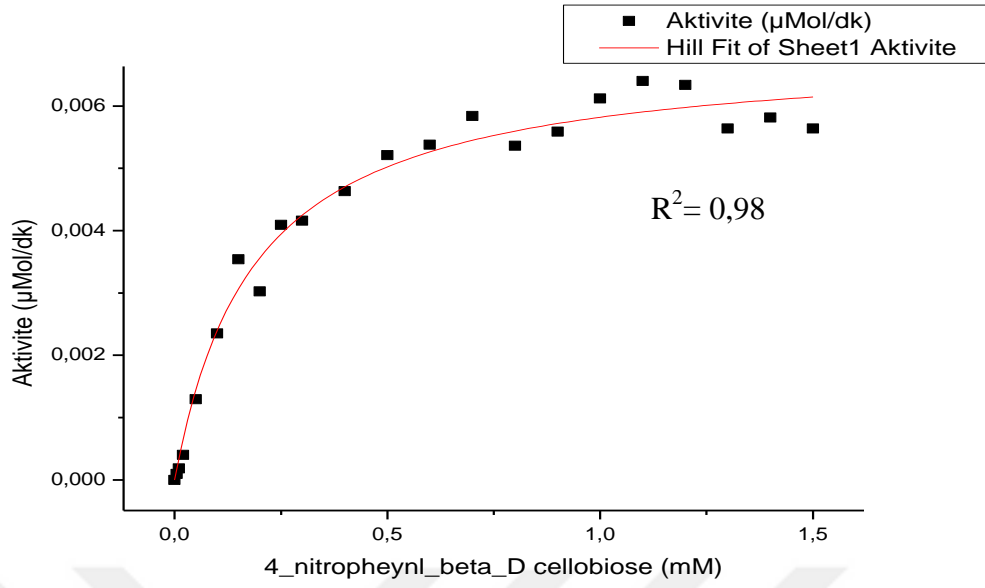
Bir enzimin aktivitesi, o enzim tarafından katalizlenen enzimatik reaksiyonun hızının, enzim etkisiyle optimal koşullarda belirli sürede ürüne dönüştürülen substrat miktarına göre ifadesidir. En çok kullanılan enzim aktivitesi birimi, IU'dir. 1 IU enzim aktivitesi, optimal koşullarda 1 dakikada 1 μ mol substratı değiştiren enzim etkinliğini ifade eder ki bu da 1 saniyede 16,67 nmol substratın ürüne dönüştürülmesine karşılıktır.

*p*NPG substratı ile yapılan çalışmada substrat miktarı 400 μ M olarak belirlendi. Enzimin V_{max} değeri $5,13 \times 10^5$ μ mol/dak/mg protein ve K_m değeri ise 0,42231 mM olarak belirlendi.



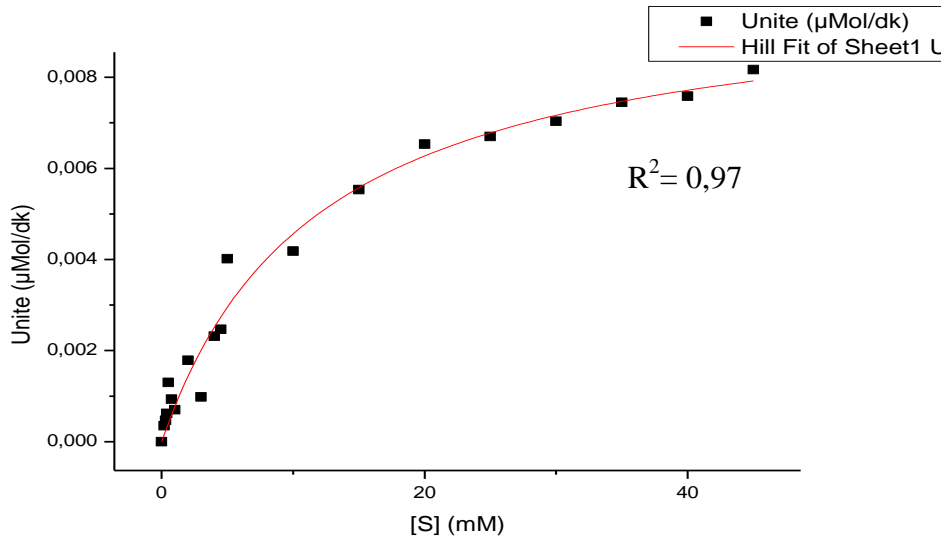
Şekil 13. *p*-NPG substratının K_m ve V_{max} değerlerinin bulunmasında kullanılan Michaelis-Menten eğrisi

*p*NP- β -D-cellobioside substratı kullanılarak yapılan aktivite çalışmasında da farklı konsantrasyonlardaki substrat miktarları reaksiyona sokulan substratın mikropate okuyucudaki değerleri kullanılarak Michaelis-Menten eğrisi çizildi ve K_m ve V_{max} değerleri hesaplanıp literatür karşılaştırmaları yapıldı. Çalışma sonucunda enzimin V_{max} değeri 0,0069 μ mol/dak/mg protein ve K_m değeri ise 0,1882mM olarak belirlendi.



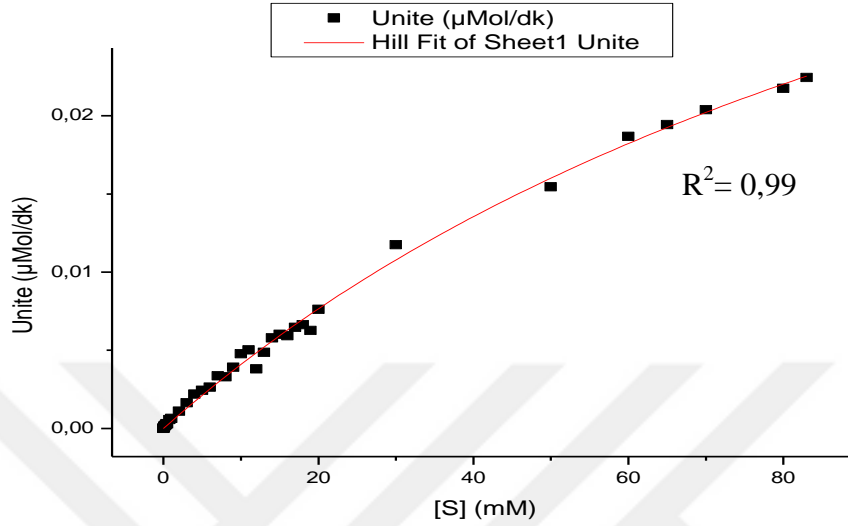
Şekil 14. *p*NP-β-D-cellobioside substratının K_m ve V_{max} değerlerinin bulunmasında kullanılan Michaelis-Menten eğrisi

Aynı koşullar altında farklı konsantrasyonlarda çalışan *p*NP-β-D-xylopyranoside substratında ise enzimin V_{max} değeri $0,01002 \mu\text{mol/dak/mg protein}$, K_m $11,96449 \text{ mM}$ olarak hesaplandı.



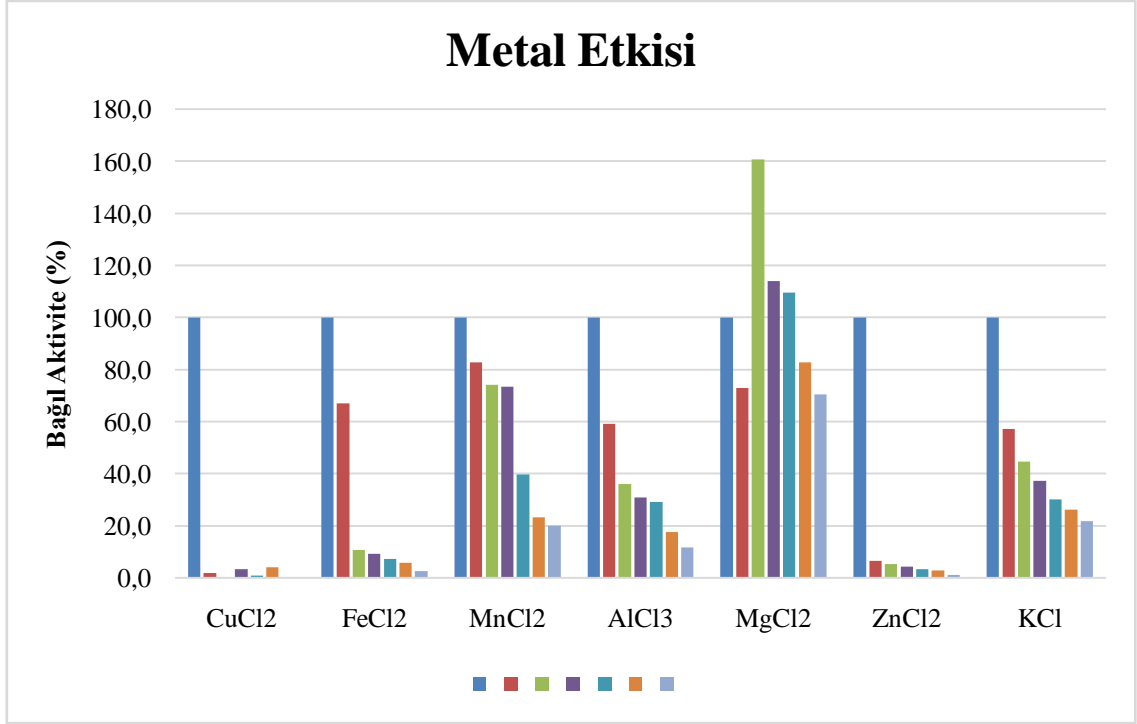
Şekil 15. *p*NP-β-D-xylopyranoside substratının K_m ve V_{max} değerlerinin bulunmasında kullanılan Michaelis-Menten eğrisi

*o*NP- β -D-galactopyranoside substratı ile yapılan enzim aktivitesi çalışmasında ise V_{max} 0,05887 $\mu\text{mol/dak/mg}$ proteindeğeri K_m 0,1338317 mM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 16. *o*NP- β -D-galactopyranoside substratının K_m ve V_{max} değerlerinin bulunmasında kullanılan Michaelis-Menten eğrisi

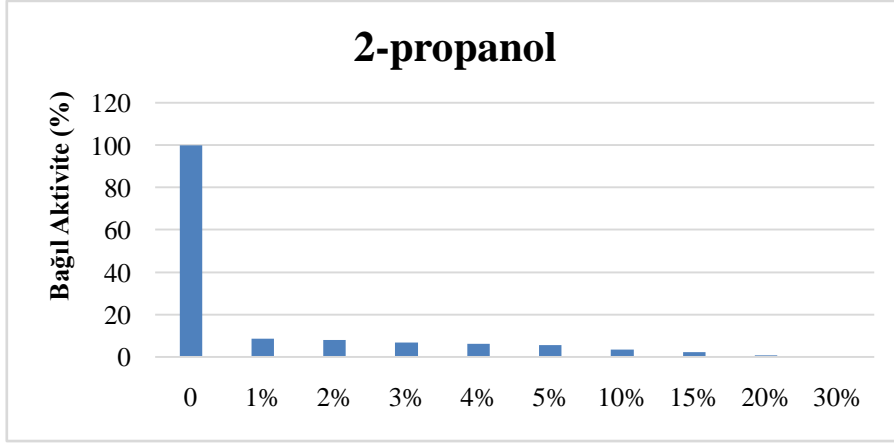
Metal iyonlarının β -glukosidaz aktivitesi üzerine olan çalışmada KCl, CuCl₂, FeCl₂, MnCl₂, MgCl₂, ZnCl₂ ve AlCl₃ gibi metaller kullanıldı. 0,1-10 mM konsantrasyonlarında ve enzimin optimum pH 6,8 ve optimum sıcaklık olan 65°C'deki deneylerde metallerin aktatör ve inhibitör ilgilerine bakıldı. Sonuçlar bağıl aktivite (%) cinsinden hesaplanarak 0,5 mM MgCl₂'ün aktiviteyi 1,6 kat arttırdığı tespit edildi. Çalışılan diğer metallerin ise β -glukosidaz üzerinde inhibitör etki gösterdiği belirlendi.



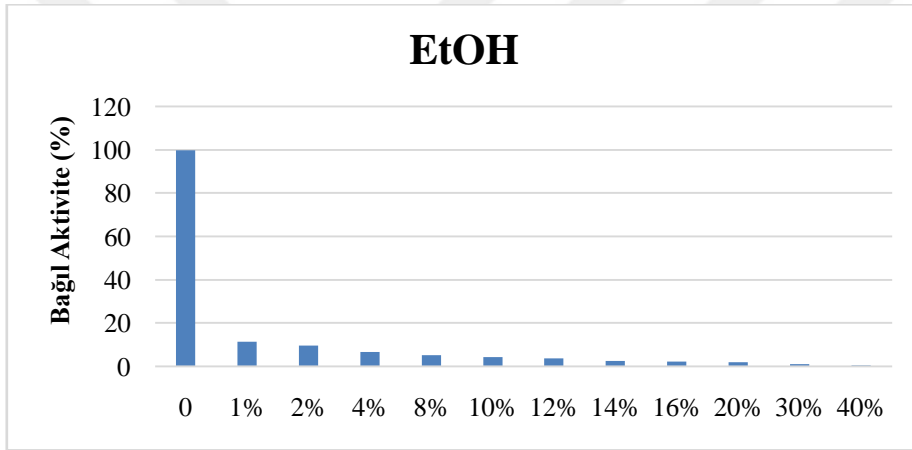
Şekil 17. Çeşitli metallerin AFBGL üzerindeki inhibitör ve aktivatör etkilerini gösteren grafik

Çeşitli kimyasallar kullanılarak enzimin aktivasyonu üzerine olan etkileri belirlemek için farklı konsantrasyon ve enzimin optimum şartlarında hazırlanan enzim reaksiyonu sonucunda inhibitör etkileri gözlemlendi.

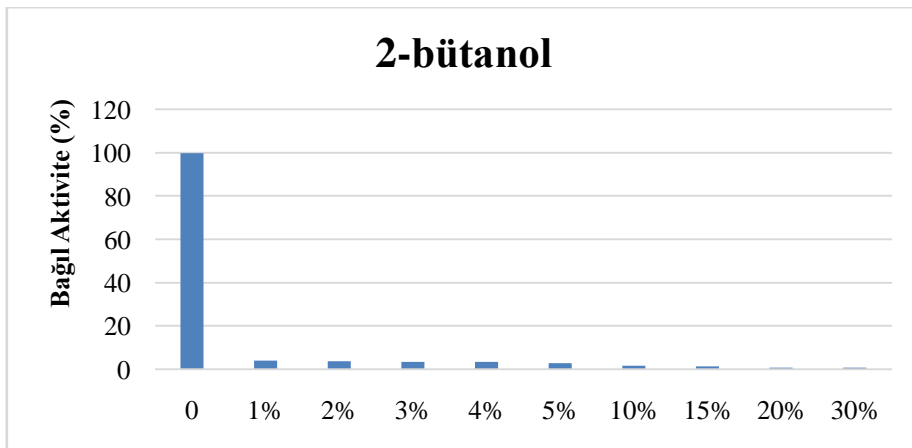
TritonX-100, EDTA, 2-propanol, DTT, β ME, etanol, 2-bütanol gibi kimyasalların kullanımı sonucunda 2-propanol'ün aktiviteyi % 15 oranında % 100 inhibe ederken etanol % 30 oranında % 100, 2-bütanol %10 oranında % 100, β ME % 20 oranında % 100, TritonX-100 % 20 oranında % 95, DTT 100 mM'da % 100 ve EDTA 150 mM'da % 100'lük bir inhibisyona sebep olduğu saptandı.



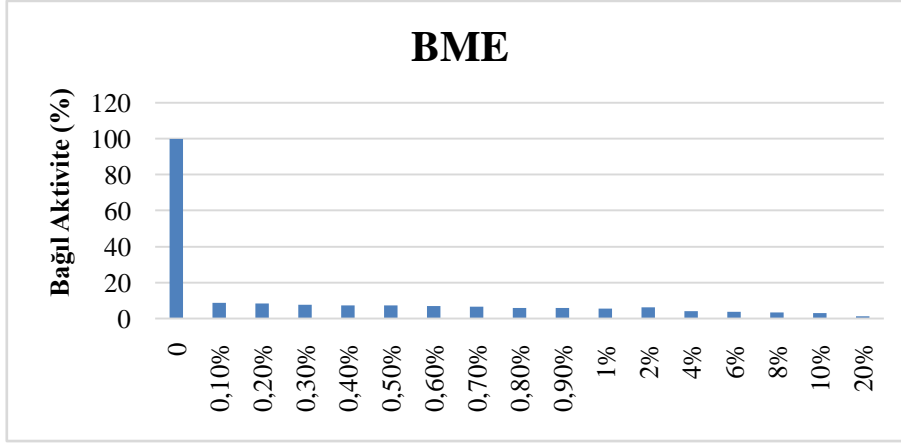
Şekil 18. 2-propanol'ün AFBGL aktivitesi üzerine etkisini gösteren bağıl aktivite grafiği



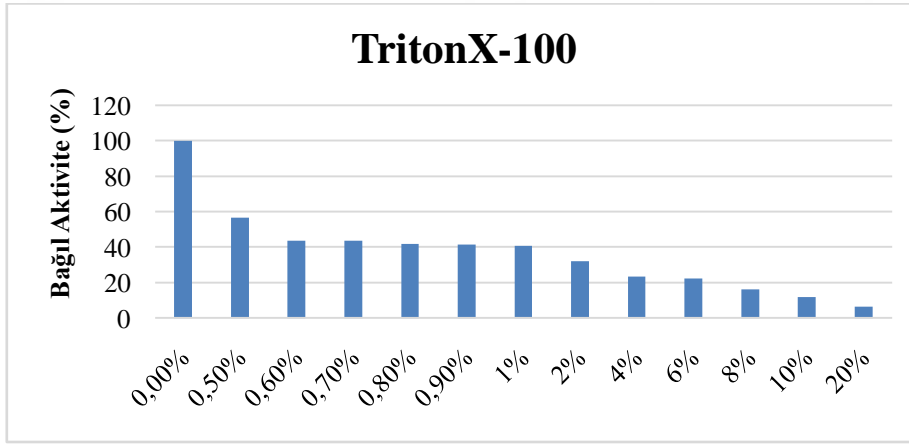
Şekil 19. Etanol'ün AFBGL aktivitesi üzerine etkisini gösteren bağıl aktivite grafiği



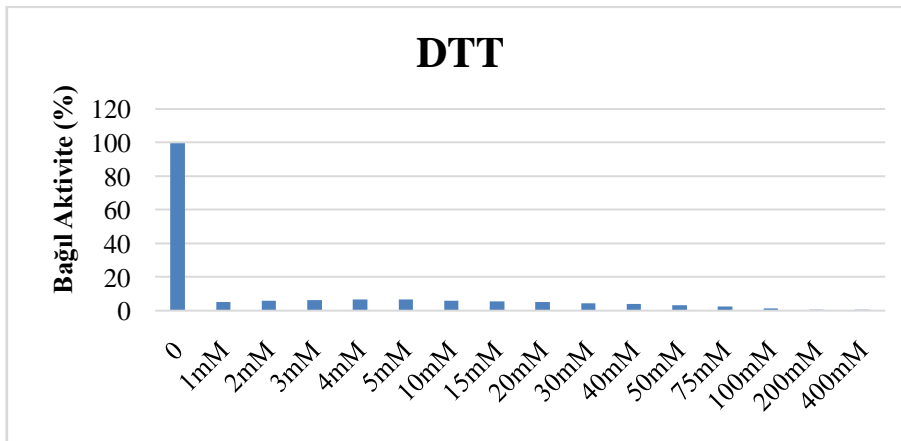
Şekil 20. 2-bütanol'ün AFBGL aktivitesi üzerine etkisini gösteren bağıl aktivite grafiği



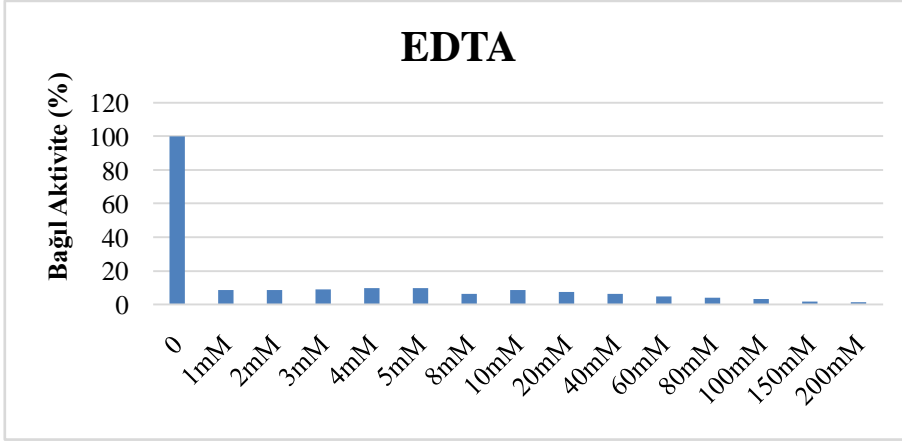
Şekil 21. β BME'nin AFBGL aktivitesi üzerine etkisini gösteren bağlı aktivite grafiği



Şekil 22. TritonX-100'nin AFBGL aktivitesi üzerine etkisini gösteren bağlı aktivite grafiği



Şekil 23. DTT'nin AFBGL aktivitesi üzerine etkisini gösteren bağlı aktivite grafiği



Şekil 24. EDTA'nın AFBGL aktivitesi üzerine etkisini gösteren bağıl aktivite grafiği



4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Bu çalışmada *Anoxybacillus flavithermus* WK1 bakterisinden β -glukozidaz varlığı tespit edildi ve PZR ile çoğaltılan gen bölgesi klonlama vektörüne aktarılıp rekombinant plazmit elde edildi. Ni^{+} -NTA kolon kromatografisi ile saflaştırıldı ve saflaştırılan enzim biyokimyasal olarak karakterize edildi. Elde edilen veriler diğer çalışmalardaki β -glukozidazlar ile karşılaştırıldı.

Saflaştırılan AFBGL'nin SDS jel elektroforezi yapıldı (Şekil 9). Yapılan elektroforez sonrası proteinin protein lader ile karşılaştırılmasında yapılarak 53 kDa ağırlığında ve 461 amino asit olduğu bulunmuştur. Literatürde Sınıf 1 β -Glukosidaz enzimlerinin monomerleri SDS PAGE'de 55-65 kDa aralığında olduğu tespit edildi. Belirlenen bu monomerlerin polipeptid uzunlukları 447 aminoasitten (*Bacillus polymixia*'da olduğu gibi) 527 aminoasite kadar değişebilmektedir (Kara, 2010).

Anoxybacillus flavithermus'da β -glukozidaz aktivitesini ortaya koyan en yüksek aktiviteye *pNPG* varlığında ulaşılmıştır. Bundan sonraki karakterizasyon çalışmasında substrat olarak *pNPG* kullanıldı. *Thermotoga neopolitana*'da saflaştırılan β -glukozidaz aktivitesini tespit etmek için *pNPG* substratı kullanılmıştır (Park vd.,2005). Yine aynı şekilde *Sulfolobus shibatae*'den saflaştırılan β -glukozidaz aktivitesi tespiti için (Na-Young., 2007) ve *Bacillus halodurans*'dan saflaştırılan β -glukozidaz aktivitesi için (Naz vd., 2010) substrat olarak *pNPG* kullanıldığı görülmektedir.

Saflaştırılan β -glukozidaz enziminin pH'ya bağımlılığı incelendiğinde, optimum pH değerinin 6,8 Mcilvaine tamponunda olduğu tespit edildi (Şekil 12). *Thermoascus aurantiacus*'dan saflaştırılan β -glukozidazının 70°C'de optimum pH 5,2 değeri gözlenmiştir (Parry, 2001). pH 3,0-7,0 arasındaki pH değerleri birçok β -glukozidaz için benzerdir. Farklı çalışmalarda β -glukozidazların sahip olduğu optimum pH değerleri, *B.subtilis* için 6,0 (Kuo vd., 2008), *Pectobacterium carotovorum* için maksimum pH 7,0 (An vd., 2004), *Thermus thermophilus* için maximum pH 6,5-7,0 ve pH 8,4'de ise enzimin inhibisyonu (Dion., 1999), *Pyrococcus furiosus* için pH 5,0 (Kengen vd., 1993) olarak tespit edilmiştir. Farklı organizmalardaki β -glukozidazların pH'sına bakıldığında

sahip olduğu optimum pH değerleri, *C. borealis* için 3,0 (Demirkan, 2009), *Fomitopsis palustris* için 4,5 (Yoon vd., 2008), *Aspergillus oryzae* sp. 100 için 5,0 (Zhang vd., 2007), *Volvariella volvacea* için 6,4 (Li vd., 2005) olarak tespit edilmiştir.

AFBGL'nin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla yapılan denemelerde optimum sıcaklığın 65°C olduğu tespit edildi. Aynı şekilde *Thermoanaerobacter brockii* bakterisinden saflaştırılan β -glukozidazının optimum sıcaklığı 60-75°C arasında (Breves vd., 1997), *Microbispora bispora*'da 60°C (Wright vd., 1992), *Bacillus circulans sub sp alkalophilus*'da 50-55°C (Paavilainen vd., 1993), *Thermotoga maritima*'da ise 90°C (Gabelsberger ve ark., 1993) olduğu gösterildi. Farklı organizmalarda yapılan çalışmalarda; *Penicillium pinophilum* için optimum sıcaklık 32°C (Joo vd., 2010), *Pichia pastoris* için optimum sıcaklık 40°C (Turan ve Zheng, 2005), *L. flaccida* için optimum sıcaklık 60°C (Elvan, 2009) olarak bulundu. Ayrıca termofilik organizma türlerinin optimum sıcaklıkları incelendiğinde 60-90°C arasında farklı sıcaklık kısmi olarak saflaştırılan β -glukozidazının optimum sıcaklığının bu verilerle karşılaştırıldığında uygun bir değere sahip olduğu söylenebilir.

β -glukozidaz aktivitesinin substrat konsantrasyonu ile değişimini incelemek amacıyla daha önceden belirlenen optimum şartlarda, farklı substrat konsantrasyonları kullanılarak reaksiyonlar gerçekleştirildi. β -glukozidaz aktivitesi için 6 mM-10 μ M aralığında pNPG substrat kullanıldı. pNPG varlığında gerçekleştirilen aktivite tayinlerinden elde edilen değerler kullanılarak çizilen Michaelis Menten eğrisinden V_{maks} ve K_m değerleri sırasıyla $5,13 \times 10^5$ μ mol/dak/mg protein ve 0,42231 mM olarak bulundu. *Pectobacterium carotovorum*'dan saflaştırılan β -glukozidaz için V_{maks} ve K_m değerleri sırasıyla 35 μ mol/dak-1/mg protein ve 0,25 mM olarak bulunmuştur (An, 2004). *C. borealis*'den saflaştırılan β -glukozidaz için V_{maks} ve K_m değerleri sırasıyla 72,46 U/mg ve 8,98 mM olarak bulunmuştur (Demirkan, 2009). BRENDA ve diğer literatürlere göre K_m , 0,006 (*Penicillium decumbens*)-68 mM (*Neosartorya fischeri*) arasındadır. Enzimin V_{max} değeri ise 3×10^{-6} (*Chilo suppressalis*) ve $1,9 \times 10^5$ (*Thermoascus aurantiacus*) oranla biraz daha yüksektir.

Enzimin farklı substratlara olan ilgisini çalışmak amacıyla pNPC, pNPX ve oNPG gibi yapay substratlarda çalışıldı. Çalışma sonucunda enzimin pNPC V_{max} değeri 0,0069 μ mol/dak/mg protein ve K_m değeri ise 0,1882 mM, pNPX V_{max} değeri 0,01002

$\mu\text{mol/dak/mg}$ protein, K_m 11,96449 mM ve enzimin *o*NPG substratındaki V_{max} değeri 0,05887 $\mu\text{mol/dak/mg}$ protein, K_m ise 0,1338317 mM olarak hesaplandı. Bir enzimin K_m değeri düşük ise substrat için yüksek afiniteye sahiptir. Çünkü düşük substrat konsantrasyonlarında maksimum hıza ulaşmıştır. Çalışmada da K_m değerlerine bakıldığında enzimin *o*NPG substratındaki K_m değeri daha düşük olduğundan enzimin *o*NPG substratına bağlanma ilgisizliği afinitesi *p*NPX ve *p*NPC'ye göre daha yüksek olduğunu söyleyebiliriz. Yapılan çalışmalarda *Bacillus subtilis*'de (Kuo vd.,2008) *o*NPG ile yapılan substrat deneyinde K_m 1,59 mM, *Thermus aurantiacus*'da (Parry vd.,2001) 0,25 mM, *Thermus thermophilus*'da (Nam vd., 2010) ise *o*NPG K_m değeri 6,05 olarak bulunmuştur. Bu çalışmalar arasında *Anoxybacillus flavithermus* bakterisinden saflaştırılan enzimin K_m değerinin birçok değerden daha düşük olması enzimin *o*NPG substratına ilgisinin birçok organizmadaki enzimlerden daha fazla olduğu sonucunu ortaya koymaktadır.

β -glukozidaz aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi incelendi. 0,1 mM ve 10 mM final konsantrasyonlarında metal iyonlarının enzimle inkübe edilerek aktivitesindeki değişimler belirlendi (Şekil 19). Bu sonuçlara göre, β -glukozidaz aktivitesinin 0,1 mM'dan başlayarak artan mM değerlerinde metal iyonu varlığında değişik oranlarda azaldığı gözlemlendi. 0,5 mM'lık konsantrasyon değerlerinde ise sadece MgCl₂'ün mevcudiyetinde aktiviteyi 1,6 kat arttığı, diğer metal iyonları mevcudiyetinde ise azaldığı tespit edildi. Daha önce yapılan çalışmalarda da Mg⁺²'nin aktiviteyi artırdığı tespit edildi (An vd.,2004, Kaur vd.,2007). Metal iyonları farklı koordinasyon sayılarına, oluşturdukları bileşiklerde farklı koordinasyon geometrisine ve Lewis asidi potansiyeline sahip olabilirler. Bu nedenle proteinler karşısında farklı ligand özellikleri gösterebilirler. Ayrıca aktivasyon ve inhibisyona sebep olma gibi farklı durumlar, metal iyonlarının proteinlerin farklı bölgelerine bağlanmaları sonucu enzim yapısını farklı şekilde etkileyebilmelerinden de kaynaklanabilir (Keskin, 2009).

β -glukozidaz aktivitesi üzerine bazı kimyasalların etkisi incelenmiştir. BRENDA verilerine göre belirlenen elimizde var olan çözücü, deterjan ve diğer katkıların aktiviteyi inhibe ettiği görüldü. Bu sonuçlara göre, β -glukozidaz aktivitesi 1 mM ve 200 mM EDTA varlığında bu konsantrasyon değerlerinde farklı oranlarda inhibe olduğu, DTT varlığında ise 1 mM-400 mM'da aktivitede 100 mM'dan sonra % 100 inhibisyon

gerçekleştirdiği görüldü. Etanol kullanımında ise %30 etanol varlığında tamamen inhibe olduğu gösterildi. *Thermoascus aurantiacus*'da % 50 oranındaki etanol konsantrasyonlarında inhibisyon varlığı tespit edilmiş (Parry vd., 2001). Genel olarak bakıldığında TritonX-100'de *Afbgl* % 10 daha dayanıklı, diğer kimyasallarda oldukça dayanıksız. Ayrıca enzimin pH çalışmalarında uygun tamponun belirlenmesi amacıyla çalışılan Tris'in enzimde inhibisyona neden olduğuda görüldü. *Thermus thermophilus* (Dion vd.,1999) ve *Fusobacterium sp* (Park vd.,2001) ile yapılan çalışmalarda da Tris'in inhibitör etki gösterdiği bulundu.

Sonuç olarak, AFBGL'nin NPG substratı varlığında, optimum pH, sıcaklık, metal iyonları ve bazı kimyasalların etkisi ve kinetik bazı parametreler açısından çeşitli organizmalardaki β -glukozidazlarla benzer davranışlar gösterdiği belirlendi.

5. ÖNERİLER

Günümüzde enzim katalizli prosesler daha hızlı, daha ekonomik, çevre dostu, ürün verimi oldukça yüksek ve safsızlık oluşumu oldukça düşük olduğundan, endüstriyel ve klinik uygulamalarda kimyasal reaksiyonlara kıyasla daha fazla tercih edilmektedir. Günümüzde hala değişik organizmalarda mevcut olan enzimleri inceleyen araştırmalar devam etmektedir.

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

Bu çalışmada *Anoxybacillus flavithermus* bakterisinde β -glukozidazın varlığı tespit edilmiştir. Saflaştırılan enzim biyokimyasal olarak karakterize edilmiştir. Elde edilen veriler diğer çalışmalardaki β -glukozidazlar ile mukayese edilmiştir. Ayrıca bazı yapay substratlarla da enzimin substrat afinitesi çalışılmıştır. Çeşitli metallerle enzimin inhibitör aktivatör etkilerine bakılmış, farklı kimyasal maddelerle de enzimin aktivitesi üzerine olan etkileri incelenmiştir.

Bundan sonra yapılabilecek olan çalışmalar, enzimin diğer doğal ve yapay substratlarının kullanılmasıyla diğer substratlara olan afinitesinin belirlenmesi veya transglukozilasyon aktivitesi çalışılabilir. Ayrıca enzimlerin sürekli kullanılabilirlik ve kararlılıklarının artırmanın diğer bir yolu da immobilizasyon yöntemidir. Bu yöntem sayesinde, immobilize enzimin özelliklerinin ve dolayısıyla kararlılıklarının nasıl değiştiği araştırılabilir. Böylece enzimler reaksiyonlarda defalarca kullanılabilir hale getirileceğinden, endüstriyel açıdan da oldukça cazip hale geleceklerdir. Bu nedenle, daha ileri çalışmalarda *Anoxybacillus flavithermus* bakterisindeki β -glukozidazın immobilizasyonu da incelenebilir.

KAYNAKLAR

- Adams, M.W.W., and Kelly, R.M. 1995.** Enzymes from microorganisms from extreme environments. *C&E News*, 73,32–42.
- Akmaz, S., 2001.** Selülozun Enzimli Hidroliz Yoluyla Glukoza Dönüştürülmesi ve Tepkime Kinetiğinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- An, C., Lim, W.J., Hong, S.Y., Kim., E.J., Shin, E.C., Kim, M.K., Lee J.R., Park, S.R., Woo, J.G., Lim Y and Yun, H.D., 2004.** Analysis of bgl operon structure and characterization of β -glucosidase from *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* LY34. *Bioscientific Biotechnology Biochemistry*.68(11), 2270-2278
- Aygan, A., 2008.** Haloalkalofil *Bacillus Sp.* İzolasyonu, Amilaz, Selülaz ve Ksilanaz Enzimlerinin Üretimi, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulamalarda Kullanılabilirliği, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Beguin, P. ve Aubert, J.P., 1993.** The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiology Reviews*, 13, 25–58.
- Belancic, A., Z. Gunata, M. J. Vallier, and E. Agosin. 2003.** β -Glucosidase from the grape native yeast *Debaryomycesvanriijiae*: Purification, characterization, and its effect on monoterpene content of a Muscat grape juice. *Journal of. Agricultural and Food Chemistry* 51, 1453-1459.
- Beriş, F.Ş.** Biyoteknoloji Ders Notları, 2014.
- Bhat, M.K. ve Bhat, S. 1997.** Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications, *Biotechnolojji Advances*, 15, 583–620.
- Bhat, M.K. 2000.** Cellulases and related enzymes in biotechnology, *Biotechnol. Adv.*, 18, 355–383.
- Bhatia, Y., Mishra, S., and Bisaria, V.S. 2002.** Microbial β -Glucosidases: Cloning, Properties, and Applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22(4):375–407.
- Bisaria, V.S. and Mishra, S. 1989.** Regulatory aspects of cellulase biosynthesis and secretion. *Critical Reviews in Biotechnolog.* 9, 61-103.
- Bischoff, K., Rooney, A., Li, X., Liu, S. ve Hughes, S., 2006.** Purification and characterization of a family 5 endoglucanase from a moderately thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology Letters*, 28,1761–1765.
- Breves, R., Bronnenmeier, K. Wild, N., Lottspeich, F., Staudenbauer, W.L., and Hofemeister, J. 1997.** Genes encoding two different β -glucosidases of

Thermoanaerobacter brockii are clustered in a common operon. Environ. Microbiology 63, 3902-3910.

- Campos N. 1992.** A protein from maize labelled with azido-IAA has novel beta glucosidase activity. Plant Journals, 2, 675-684
- Ciaramella, M., F. M. Pisani, and M. Rossi. 2002.** Molecular biology of extremophiles: Recent progress on the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus*. Antonie Van Leeuwenhoek 81: 85-97.
- Chuenchor, W., Pengthaisong, S., Robinson, R.C., Yuvaniyama, J., Oonanant, W., Bevan, D.R., Esen, A., Chen, C.-J., Opassiri, R., Svasti, J., and Cairns, J.R.K. 2008.** Structural Insights into Rice Bglu1 [Beta]-Glucosidase Oligosaccharide Hydrolysis and Transglycosylation, Journal of Molecular Biology, 377(4), 1200-1215.
- Coolbear, T., Daniel, R.M., and Morgan, H.W. 1992.** The enzymes from extreme thermophiles: bacterial sources, thermostabilities and industrial relevance. Biochemistry. Engineering. Biotechnology, 45,7-98.
- Covan, D.A. 1997.** Thermophilic proteins: stability and function in aqueous and organic solvents. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular Integrative Physiology, 118,429-438.
- Czjzek, M., Cicek, M., Zamboni, V., Burmeister, WP., Bevan, DR., Henrissat, B., Esen,,A. 2000.** The mechanism of substrate (aglycone) specificity in β -glucosidases is revealed by crystal structures of mutant maize β -glucosidase-DIMBOA, -DIMBOAGlc, and -dhurrin complexes. PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 97, 13555-13560
- Cicek, M., and Esen, A. 1998.** Structure and expression of dhurrinase from sorghum. Plant Physiology 116, 1469-1478.
- Demirkan, G., 2009.** *Climacocystic borealis*'den β -Glukozidaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon
- Ding, S., Ge, W. ve Buswell, J.A., 2002.** Secretion, purification and characterization of a recombinant *Volvariella volvacea* endoglucanase expressed in the yeast *Pichia pastoris*. Enzyme Microbial. Technology, 31, 621-626.
- Dion, M., Fourage, L., Hallet and Coal, B., 1999.** Cloning and expression of a β -glycosidase gene from *Thermus thermophilus*. Sequence and biochemical characterization of the encoded enzyme. Glycoconjugate Journal, 16, 27-37.
- Ducret, A., M. Trani, and R. Lortie. 2002.** Screening of various glycosidases for the synthesis of octyl glucoside. Biotechnology. Bioengineering. 77, 752-757.

- Elvan, H., 2009.** *Lepista flaccida* (Sowerby:Fr.) Pat. Mantarından β -glukozidaz ve Endoglukanaz Enzimlerinin Kısmi Olarak Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Karadeniz Teknik Üniversitesi. Yüksek Lisans Tezi. Trabzon
- Ertunga, N.S., 2006.** Termofilik *Anoxybacillus gonensis* G2 suşunun fruktoz-1,6 bisfosfat aldolaz geninin klonlanması, ekspresyonu ve karakterizasyonu, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Endo, K., Hakamada, Y., Takizawa, S., Kubota, H., Sumitomo, N. ve Kobayashi T., 2001.** A novel alkaline endoglucanase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate: enzymatic properties, and nucleotide and deduced amino acid sequences, *Microbiol. Biotechnology*, 57, 109–116.
- Esen, A., 2003.** β -Glucosidase. In *Handbook of Food Enzymology. Hydrolases*; Whitaker, J., Vorage, A., Wong, D., Eds.; Dekker: New York, 13(6) 791-803.
- Faure, D., Desair J., Keijers, V., Bekri, M.A., Proost, P., Henrissat, B., and Vanderleyden, J. 1999.** Growth of *Azospirillum irakense* KBC 1 on the aryl β -glucoside salicin requires either Sal A or Sal B. *Journal Bacteriology*. 181, 3003-3009.
- Gabelsberger, J., Liebl, W., and Schleifer, K.H. 1993.** Purification and properties of a recombinant β -glucosidase of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Microbiol. Biotechnology*. 40, 44–52.
- Graebnitz, F., Seiss, M., Ruecknagel, K. P., and Staudenbauer, W. L. 1991.** Structure of the β -glucosidase gene *bglA* of *Clostridium thermocellum*. Sequence analysis reveals a upefamily of cellulases and β -glycosidases including human lactase/phlorizin hydrolase. *European. Journal of. Biochemistry*. 200,3 01-309.
- Hayashi, S., Sako, S., Yokoi, H., Takasaki, Y. ve Imada, K., 1999.** Purification and characterization of the intracellular β -glucosidase from *Aureobasidium sp* ATCC 20524, *Journal of Industrial. Microbiology and. Biotechnology*, 22, 160-163.
- Haq, I.U., Khan, M.A., Muneer, B., Hussain, Z., Afzal, S., Majeed, S., Rashid, N ., Javed M.M., Ahmad, I. 2012.** Cloning, characterization and molecular docking of a highly thermostable beta 1-4-glucosidase from *Thermotoga petrophila*, *Biotechnology.Letters*. 34,1703-1709
- Hebeish, A. and Ibrahim, N. A. 2007.** The impact of frontier sciences on textile industry, *Colourage*, 54, 41-55.
- Henrissat, B., Driguez, H., Viet, C, and SchUlein, M., 1985.** Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. *Biotechnology* 3, 722-726
- Henrissat, B., 1991.** A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemistry. Journal*, 280, 309–316.

- Henrissat, B., and Davies, G.J., 1997.** Structural and sequence based classification of glycosyl hydrolases. *Current Opinion Structural Biology* 7, 637–644.
- Henrissat, B., 1998.** Glycosidase families. *Biochem. Soc. Trans.* 26,153–156.
- Henrissat, B., Davies, G.J., 2000.** Glycoside hydrolases and glycosyltransferases. Families, modules, and implications for genomics. *Plant Physiology*, 124, 1515-1519.
- Huber, H., and Stetter, K.O., 1998.** Hyperthermophiles and their possible potential in biotechnology. *Journal. Biotechnology*, 64,39–52.
- Kara, H., 2010.** Beta Glukozidaz Enziminin Hidrofobik Etkileşim Kromotografisi İle *Olea europea* Meyvesinden Saflaştırılması, Karakterizasyonu İle Bazı Pestisit Ve Ağır Metaller Karşı Afinitesinin Araştırılması. Balıkesir Üniversitesi. Doktora Tezi. Balıkesir.
- Kara, H.E., Turan, Y., Er, A., Acar, M., Tuemay, S., Sinan, S. 2014.** Purification and characterization of beta-glucosidase from greater wax moth *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *Archives of Insect Biochemistry Physiology* 86, 209-219.
- Kaur, J., Chadha, B.S., Kumar, B.A., Kaur, G.S and Saini, H.S. 2007.** Purification and characterization of beta-glucosidase from *Melanocarpus*. *MTCC3922. Biotechnol.* 10,260-270.
- Kengen, S.W.M., Luesink, E.J.S, Alfons, J.M., and Zehnder, A.J.B. 1993.** Purification and characterization of an extremely thermostable β -glucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *European Journal of Biochemistry* 213, 305-312.
- Keskin, Ş., 2009.** *Russula delica* mantar numunesinden polifenol oksidaz enziminin karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Kim, B., Singh, S.P. ve Hayashi, K., 2006.** Characteristics of chimeric enzymes constructed between *Thermotoga maritima* and *Agrobacterium tumefaciens* betaglucosidases: role of C-terminal domain in catalytic activity, *Enzyme Microbiol Technology*, 38, 952-959.
- Kubicek, C.P., Messner, R., Gruber, F., Mach, R.L., and Kubicek-Pranz, E.M. 1993.** The *Trichoderma* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. *Enzyme Microbiol Technology* 15: 90-99.
- Kuhad, R. C., Manchanda, M., and Singh, A., 1999.** Hydrolytic potential of extracellular enzymes from a mutant strain of *Fusarium oxysporum*. *Bioprocess Engineering*, 20 (2), 133–135.

- Kuhad, R. C., Gupta, R., and Singh, A., 2011.** Microbial Cellulase and Their Industrial Application. *Enzyme Research*, 1–10.
- Kuo, L., and Lee, K. 2008.** Cloning, Expression, and Characterization of Two β -Glucosidases from Isoflavone Glycoside-Hydrolyzing *Bacillus subtilis* Natto, *Journal of Agricultural. Food Chemistry*, 56, 119–125
- Lasa, I., and Berenguer, J. 1993.** Thermophilic enzymes and their biotechnological potential. *Microbiology Seminar*, 9, 77–89.
- Lee, Y.C., Lang, D. 1968** Automatic analysis of sugar components of glycoproteins. *Journal Biology Chemistry*. 243, 677-700.
- Lee, Y.J., Kim, B.K., Lee, B.H., Jo, K.I., Lee, N.K., Chung, C.H., Lee, Y.C. ve Lee, J.W. 2008.** Purification and characterization of cellulase product by *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3utilizing rice hull, *Bioresource Technology*, 99, 378-386.
- Lecas, M., Günata, Z.Y., Sapis, J.C., Bayonove, C.L., 1991.** Purification and Partial Characterization of β -glucosidase from Grape *Phytochemistry*, 30 (2), 451-454.
- Li, X., Pei, J., Wu, G. ve Shao, W., 2005.** Expression, purification and characterization of a recombinant β -glucosidase from *Volvariella volvacea*, *Biotechnology.Letters*, 27, 1369-1373.
- Li, Y.H., Ding, M., Wang, J., Xu, G. ve Zhao, F., 2006.** A novel thermoacidophilic endoglucanase, Ba-EGA, from a new cellulose-degrading bacterium, *Bacillus sp.AC-1*, *Microbial.Biotechnology*, 70, 430-436.
- Li, B., Wang, Z., Li, S., Donelan, W., Wang, X., Cui, T., Tang, D., 2013.** Preparation of lactose-free pasteurized milk with a recombinant thermostable beta-glucosidase from *Pyrococcus furiosus*. *BMC Biotechnology*. 13,0000.
- Lin, L. L., Rumbak, E., Zappe, H., Thompson, J. A., and Woods, D. R. 1990.** Cloning, sequencing and analysis of expression of a *Butyrivibrio fibrisolvens* gene encoding a β -glucosidase. *Microbiology Society Journals* 136, 1567-1576.
- Mandels, M., 1985.** Application of cellulases, *Biochemical Society. Transactions*, 13, 414-415.
- Marri, L., Valentini, S., and Venditti, D. 1995.** Cloning and nucleotide sequence of *bglA* from *Erwinia herbicola* and expression of β -glucosidase activity in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 128: 135-138.
- Mawadza, C., Hatti-Kaul, R., Zvauya, R. and Mattiasson, B. 2000.** Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains, *Journal of Biotechnology* ,83, 177-187.
- Michlmayr, H., Schümann, C., Barreira Braz Da Silva, N., Kulbe, K., Del Hierro, A., 2010.** Isolation and basic characterization of a beta-glucosidase from a strain

of *Lactobacillus brevis* isolation from a malolactic starter culture. *Journal of Applied Microbiology*. 108(2), 550-9.

- Nam, K.H., Sung, M.W., and Hwang, K.Y. 2010.** Structural Insights into the Substrate Recognition Properties of Beta-Glucosidase, *Biochemical Biophysical Research Communications*, 391(1), 1131-5
- Nam, K.M., Kim, M.S., Lee, H.B and Ahn, J.K. 2010.** Beta-glycosidase of *Thermus thermophilus* KNOUC202: gene and biochemical properties of the enzyme expressed in *E. coli*. *Biochemistry Microbial*. 46, 515-524.
- Na-Young, P., Cha, J., Kim, D., and Park, C. 2007.** Enzymatic Characterization and Substrate Specificity of Thermostable β -Glycosidase from Hyperthermophilic Archaea, *Sulfolobus shibatae*, Expressed in *E. coli*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(3), 454–460.
- Naz, S., Ikram, N., Rajoka, M.I., Sadaf, S. And Akhtar, M.W., 2010.** Enhanced production and characterization of a β -Glycosidase from *Bacillus halodurans* expressed in *E. coli*. *Biochemistry* 75(4), 513-518.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kahler, M., and Antranikian, G. 1999.** Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial applications. *Microbiol Biotechnology* 51, 711–729.
- Okamoto, K., Nakato, H., Yatake, T., Kiso, T. ve Kitahata, S., 2000.** Purification and some properties of a beta-glucosidase from *Flavobacterium johnsonae*, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64, 2, 333-340.
- Paavilainen, S., Hellman, J., and Korpela, T. 1993.** Purification, characterization, gene cloning and sequencing of a new β -glucosidase from *Bacillus circulans* sub sp. *alkalophilus*. *Environmental Microbiology*. 59: 927-932.
- Park, S.Y., Bae, E.A., Sung, J.H., Lee, S.K and Kim, D.H. 2001.** Purification and characterization of ginsenoside Rb1-metabolizing beta-glucosidase from *Fusobacterium* K-60, a human intestinal anaerobic bacterium. *Biotechnology Biochemistry* 65, 1163-1169
- Park, T., Choi, K., Park, C., Lee, S., Kang, H., Shon, K., Park, J., and Cha, J. 2005.** Substrate specificity and transglycosylation catalyzed by a thermostable β -glucosidase from marine hyperthermophile *Thermotoga neapolitana*. *Microbiol. Biotechnology* 69, 411–422
- Parry, N.J., Beever, D.E., Owen, E., Vandenberghe, I., Van Beeumen, J., and Bhat, M.K. 2001.** Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable β -glucosidase purified from *Thermoascus aurantiacus*. *Biochemistry Journals*, 353, 117-127.

- Percival, Y.H., Michael, Z., Himmelb, E. ve Mielenzc, J.R., 2006.** Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies, *Biotechnology Advances.*, 452-481.
- Pere, J., Puolakka, A., Nousiainen, P., and Buchert, J., 2001.** Action of purified *Trichoderma reesei* cellulases on cotton fibers and yarn. *Journal of Biotechnology*, 89 (2-3), 247–255.
- Pozzo, T., Pasten, J.L., Karlsson, E.N and Logan, D.T., 2010.** Structural and functional analyses of beta-glucosidase 3B from *Thermotoga neapolitana*: a thermostable three-domain representative of glycoside hydrolase 3. *Journal of Molecular Biology* 397, 724-739.
- Sánchez-Torres, J., Pérez, P. and Santamaría, I., 1996.** A cellulase gene from a new alkaliphilic *Bacillus* sp. (strain N186-1). Its cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli*, *Microbial Biotechnology*, 46, 149–155.
- Sanz-Aparicio, J., Hermoso, J.A., Martínez-Ripoll, M., Lequerica, J.L., and J., P. 1998.** Crystal Structure of B-Glucosidase a from *Bacillus polymyxa*: Insights into the Catalytic Activity in Family 1 Glycosyl Hydrolases, *Journal of Molecular Biology*, 275, 491-502.
- Selmar, D., Lieberei, R., Biehl, B., Voigh, J., 1987.** Hevea linamarase, a non-specific β -glucosidase *Plant Physiology* 83, 557-567.
- Shin, K.C., Oh, H.J., Kim, B.J., Oh, D.K., 2013.** Complete conversion of major protopanaxadiol ginsenosides to compound K by the combined use of alpha-L-arabinofuranosidase and beta-galactosidase from *Caldicellulosirupto rSaccharolyticus* and beta-glucosidase from *Sulfolobus acidocaldarius*. *Journals Biotechnology* 167, 33-40.
- Shuyan, L., Xinyuan, D., Xuemei, L ve Peiji, G., 2006.** A novel thermophilic endoglucanase from a mesophilic fungus *Fusarium oxysporum*, *Chinese Sci. Bull.*, 51, 191-197.
- Singh, A., Kuhad, R. C., and Ward, O. P., 2007.** Industrial application of microbial cellulases, in *Lignocellulose Biotechnology: Future Prospects*, R. C. Kuhad and A. Singh, Eds., pp. 345–358.
- Singhania, R.R., Patel, A.K., Sukumaran, R.K., Larroche, C., Pandey, A., 2013.** Role and significance of beta-glucosidase in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource Technology* 127, 500-507.
- Sukumaran, R. K., Singhania, R. R., and Pandey, A., 2005.** Microbial cellulases-production, applications and challenges, *Journal of Scientific and Industrial Research*, 64(11), 832–844.

- Sorensen, A., Luebeck, M., Luebeck, P., Ahring, B.K., 2013.** Fungal beta-glucosidase: a bottleneck in industrial use of lignocellulosic materials. *Biomolecules* 3, 612-631.
- Souza, F.H.M., Nascimento, C.V., Rosa, J.C., Masui, D.C., Leone, F.A., Jorge, J.A and Furriel, R.P.M., 2010.** Purification and biochemical characterization of a mycelialglucose- and xylose-stimulated β -glucosidase from the thermophilic fungus *Humicola insolens*, *Process Biochemistry*, 45, 272-278.
- Sun, Y. ve Cheng, J., 2002.** Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production, *Bioresource Technol.*, 83, 1–11.
- Synowiecki, J. 1998.** Preparation, properties and suitability of thermostable enzymes. *Biotechnologia*, 42,98–105.
- Synowiecki, J., Wolosowska, S., 2006.** Immobilization of thermostable beta-glucosidase from *Sulfolobus shibatae* by cross-linking with transglutaminase. *Enzyme Microbial Technology* 39, 1417-1422.
- Takano, M., Moriyama, R., and Ohmiya, K. 1992.** Structure of a β -glucosidase gene from *Ruminococcus albus* and properties of the translated product. *Journal of Fermentation Bioengineering* 73, 79-88.
- Teeri, T.T., 1997** Crystalline Cellulose Degradation: New Insight into the Function of Cellobiohydrolases, *Trends in Biotechnology*, 15(5), 160-167.
- Trivedi, N., Gupta, V., Kumar, M., Kumari, P., Reddy, C.R.K. ve Jha, B., 2011.** An alkalihalotolerantcellulase from *Bacillus flexus* isolated from green seaweed *Ulvalatuca*, *Carbohydrate Polymers*, 83, 891-897.
- Turan, Y. ve Zheng, M., 2005.** Purification and characterization of an intracellular beta glucosidase from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *Biochemistry*, 70, 1363-1368.
- Turner, P., Pramhed, A., Kanders, E., Hedstrom, M., Karlssona, E.N., and Logan, D.T. 2007.** Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of *Thermotoga neapolitana* *b*-glucosidase *Acta Crystallographica Section B* 63, 802–806.
- URL-1, 2016.** <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes-for-aer.html>
- URL-2, 2016.** <http://www.uskcmc.com/tr/>
- URL-3, 2015.** <http://www.gaucherhastaligi.com>, Gaucher Hastalığı, 13 Mart 2012.
- URL-4, 2016.** <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/91553>.
- URL-5, 2015.** http://web.expasy.org/compute_pi/

- Wallecha, A. and Mishra, S. 2003.** Purification and Characterization of Two [Beta]-Glucosidases from a Thermo-Tolerant Yeast *Pichiaetchellsii*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, 1649(1), 74-84.
- Wei, D.L., Kirimura, K., Usami, S. and Lin, T.H., 1996.** Purification and caharcterization ofextracellular β -glucosidase from the wood-grown fungus *Xylaria regalis*, *Current Microbiology*, 33, 297-301.
- Wright, R.M., Yablonsky, M.D., Shalita, Z.P., Goyal, A.K., and Eveleigh, D.E. 1992.** Cloning, Characterization, and Nucleotide Sequence of a Gene Encoding *Microbispora bispora* BglB, a Thermostable β -Glucosidase Expressed in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (11), 3455-3465.
- Vieille, C., and Zeikus, G.J. 2001.** Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular. Biology Reviews*, 65,1–43.
- Vroemen, S., Heldens, J., Boyd, C., Henrissat, B., and Keen, N.T. 1995.** Cloning and characterization of the *bgxa* gene from *Erwinia chrysanthemi* D1 that encodes a β -glucosidase/xylosidase enzyme. *Molecular Genetics and Genomics*, 246, 465-477.
- Yan, S., Wu, G., 2013.**Prediction of optimal pH in hydrolytic reaction of beta-glucosidase. *Biochemistry Biotechnology* 169, 1884-1894.
- Yoon, J., Kim, K.Y. ve Cha, C.J., 2008.** Purification and Characterization of Thermostable β -Glucosidase from the Brown-Rot Basidiomycete *Fomitopsis palustris* Grown onMicrocrystalline Cellulose, *The Journal of Microbiology*, 46, 1, 51-55
- Yılmaz, S., 2007.** Alternatif Besin Yan Ürünlerinden Bakteriyel Selüloz Üretimi, YüksekLisans Tezi, İTÜ., Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Zhang, C., Li, D., Yu, H., Zhang, B. ve Jin, F., 2007.** Purification and characterization of piceid- β -glucosidase from *Aspergillusoryzae*, *Process Biochemistry*, 42, 83-88.
- Zeikus, G.J., Vieille, C., and Savchenko, A. 1998.** Thermozyms: biotechnology and structure-function relationships. *Extremophiles*, 2, 179–183.
- Zhou J., Wang Y.H., Chu J., Zhuang P.Y., Zhang S.L. ve Yin P., 2008.** Identification andpurification of the main components of cellulases from a mutant strain of *Trichoderma viride* T 100-14, *Bioresource Technology*, 99, 6826-6833.

ÖZGEÇMİŞ

Aytül UZUN 28/01/1990 tarihinde Trabzon'da doğdu. İlköğretimini 2004 yılında Trabzon'un Cudibey İlköğretim Okulu'nda ve Ortaöğretimini 2007 yılında Trabzon'da Affan KİTAPÇIOĞLU Lisesi'nde tamamladı. 05/09/2008 tarihinde başladığı lisans eğitimini 15/06/2012 tarihinde Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölüm birincisi olarak 3.73 derece ile tamamladı. 2012 yılında Recep Tayyip ERDOĞAN Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü'nde başladığı yüksek lisans öğrenimini halen devam ettirmektedir.