Anoxybacillus ayderensis Ay9 ISIL KARARLI β-GLUKOZİDAZININ ÇİFT MUTASYONU (G226Q/Y227F), KARAKTERİZASYONU VE BAZI POLİFENOLİK SUBSTRATLARIN ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Mine KARAOĞLAN

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
2022

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Anoxybacillus ayderensis Ay9 ISIL KARARLI β-GLUKOZİDAZININ ÇİFT MUTASYONU (G226Q/Y227F), KARAKTERİZASYONU VE BAZI POLİFENOLİK SUBSTRATLARIN ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

(Double Mutation and Characterizations of *Anoxybacillus ayderensis* Ay9 Thermal Stable β-Glucosidase (G226Q/Y227F), and Investigation of the Effects on the Antioxidant Capacity of Some Polyphenolic Substrates)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mine KARAOĞLAN

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Erzurum

Ağustos, 2022

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Natural and Applied Sciences

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü
TEZ KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Anoxybacillus ayderensis Ay9 ISIL KARARLI β-GLUKOZİDAZININ ÇİFT MUTASYONU (G226Q/Y227F), KARAKTERİZASYONU VE BAZI POLİFENOLİK SUBSTRATLARIN ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL danışmanlığında, Mine KARAOĞLAN tarafından hazırlanan bu çalışma, 24/08/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler biyoloji ve genetik Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Bilim Dalı'nda Yüksek lisans tezi olarak **oybirliği / ~~oy çokluğu~~ ~~(.../...)~~** ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ *Karadeniz Teknik Üniversitesi*	Aslı Islak İmzalıdır
Danışman:	Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL *Atatürk Üniversitesi*	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Özkan BALTACI *Atatürk Üniversitesi*	Aslı Islak İmzalıdır

Enstitü Yönetim
Kurulunun …./…/…. tarih
ve …… sayılı kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof.Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN
Enstitü Müdürü

Aslı Islak İmzalıdır

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Natural and Applied Sciences

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL danışmanlığında sunulan "*Anoxybacillus ayderensis Ay9'un Isıl Kararlı ß-Glukozidazın Çift Mutasyonu (G226Q/Y227F), Karakterizasyonu Ve Bazı Polifenolik Substratların Antioksidan Kapasiteleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması*" başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	*1*	**30**
Kuramsal Temeller	*7*	**30**
Materyal ve Metot	*11*	**35**
Araştırma Bulguları ve Tartışma	*5*	**20**
Sonuçlar ve Öneriler	*1*	**20**
Tezin Geneli	*10*	**25**

***Not:** Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının **%5'den** büyük olmaması gerekir.*

Sunulan bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ettiğimizi beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	**Tez Danışmanı**
Mine KARAOĞLAN	Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL
24.8.2022	**24.8.2022**
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ'de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun …./…/…. tarih ve …… sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun …./…/…. tarih ve …… sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

Not: Bu form, Tezin son şekline uygun olarak bilgisayar ortamında doldurulmalı, çıktısı imzalanıp Tezin sonuna eklenmelidir.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması, Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Araştırma Laboratuvarı ve Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Tez çalışmamda, maddi ve manevi desteğini bir an olsun esirgemeyen, engin bilgilerinden faydalandığım danışmanım Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e derin şükran duygularımı sunarım.

Karadeniz Teknik Üniversitesinde bana laboratuvar imkânlarını sunan, bilimsel araştırmalarımda yol gösteren, çalışmaları ile bu araştırmanın başarısına katkıda bulunan Sayın Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ'e teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmamla ilgilenen, soru ve taleplerime hemen cevap veren ve tez çalışmamında bana yardımcı olan başta Doktora Öğretim Üyesi Dilşat Nigar ÇOLAK olmak üzere; doktora öğrencisi Miray ŞAHİNKAYA, Noman SALEH ZADA'ya ve manevi desteklerinden ötürü tüm laboratuvar arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Özellikle manevi olarak desteklerini her zaman hissettiğim, her zaman arkamda duran, gözümün nuru sevgili aileme şükranlarımı sunmaktan onur duyarım. Son olarak ne sevdiğimi, ne istediğimi her zaman bilen, varlığım için dua eden, varlıkları için şükrettiğim arkadaşlarıma da teşekkürlerimi sunarım.

Mine KARAOĞLAN

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Anoxybacillus ayderensis Ay9 ISIL KARARLI β-GLUKOZİDAZININ ÇİFT MUTASYONU (G226Q/Y227F), , KARAKTERİZASYONU VE BAZI POLİFENOLİK SUBSTRATLARIN ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Mine KARAOĞLAN

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Amaç: β-Glukozidazlar, birçok polifenolik bileşiği de-glikozile edebilen glikozil hidrolazlar ailesinin önemli üyeleridir. Bu tez çalışmasının amacı, hem aktif yapısındaki amino asitlerin mutasyonları ile enzimin termostabilitesini artırmak hem de bu mutasyonlarla doğal olarak oluşan ve ticari olarak satın alınan sentetik substratlar nedeniyle glukoz rezidülerini seçici olarak uzaklaştırılmasını artırmaktır. Ek olarak polifenolik glikozitlerin antioksidan etkilerini artırıp, enzimin endüstriyel alanlarda kullanımını kolaylaştırmaktır.

Yöntem: *bglAy9* G226Q/Y227F mutant geni PCR temelli mutagenez yöntemi ile spesifik primerler kullanılarak oluşturuldu. PCR ürünü pGEMT Easy klonlama vektörüne aktarıldı. DNA dizisi *Anoxybacillus ayderensis* Ay9'un β-glukozidaz gen dizisi ile hizalandı ve pET28(+) ekpresiyon vektörüne aktarıldı. Protein ekspresyonu için rekombinant pET28(+) vektörü taşıyan *E. coli* BL21 hücreleri LB içerisinde büyütüldü. Enzim ekspresyonunu indüklemek amacıyla IPTG eklendi. Rekombinant protein, Ni^{2+} NTA afinite kromatografisiyle saflaştırıldı ve SDS PAGE'de görüntülendi. Enzimin biyokimyasal karakterizasyon işlemleri ve doğal substratların kinetik parametleri farklı yöntemler kullanılarak oluşturuldu. Enzimin polifenolik bileşiklerin antioksidan özellikleri üzerindeki etkisi DPPH yöntemi kullanılarak test edildi.

Bulgular: PCR temelli mutagenez yöntemi ile *bglAy9 G226Q/Y227F geni* elde edildi. Enzimin ağırlığı SDS PAGE' de yaklaşık 54 kDa olarak tespit edildi. Enzimin optimum sıcaklığı 50 °C ve optimum pH 'sı 6,0 olarak belirlendi. Enzimin *p*NPG substratı ile oluşturulan K_m, V_{max}, değerleri sırasıyla 0,246 mM, 0,057 µmol/dk, olarak belirlendi. Enzimin Polidatin, Mirisetin 3-O-glikozit ve Kukurbitasin 2-E-O glikozit substratların antioksidan özelliklerinin üzerinde sırasıyla %54,5 , %32,95 ve %41,2 oranında artış sağladığı belirlendi.

Sonuç: Yaban tip (BglAy9 WT) ve mutant BglAy9 G226Q/Y227F enzimin karakterizasyon sonuçları karşılaştırıldı, mutantın optimum pH seviyesinde düşüş (pH 8'den pH 6'ya) görüldü. organik çözücüler, metallerle, iyonik/non iyonik deterjanlar, potansiyel inhibitörler ve glukoz etkileşimlerinde değişiklikler olduğu gözlendi. Optimum sıcaklığının, yaban tip ile uyumlu olduğu tespit edildi. Bunun yanında kinetik karakterler kıyaslandığında mutant enzimin bazı substratlara karşı ilgisinin azaldığı ve çalışma kapsamında belirlenen substratların antioksidan etkisini artırdığı tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: β-Glukozidazlar, polifenolik bileşikler, mutasyon, DPPH

Ağustos 2022, 110 sayfa

ABSTRACT

MASTER'S THESIS

DOUBLE MUTATION and CHARACTERIZATIONS OF *Anoxybacillus ayderensis* Ay9 THERMAL STABLE β-GLUCOSIDASE (G226Q/Y227F), AND INVESTIGATION OF THE EFFECTS ON THE ANTIOXIDANT CAPACITY OF SOME POLYPHENOLIC SUBSTRATES

Mine KARAOĞLAN

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Purpose: β-Glucosidases are important members of the family of glycosyl hydrolases, capable of de-glycosylating many polyphenolic compounds. The aim of this thesis is to increase the thermostability of the enzyme with mutations of amino acids in its active structure and to increase the selective removal of glucose residues due to naturally occurring and commercially purchased synthetic substrates with these mutations. In addition, it increases the antioxidant effects of polyphenolic glycosides and facilitates the use of the enzyme in industrial areas.

Method: The bglAy9 G226Q/Y227F mutant gene was generated by PCR-based mutagenesis using specific primers. The PCR product was transferred into the pGEMT Easy cloning vector. The DNA sequence was aligned with the β-glucosidase gene sequence of *Anoxybacillus ayderensis* Ay9 and transferred to the pET28(+) expression vector. E. coli BL21 cells carrying the recombinant pET28(+) vector for protein expression were grown in LB. IPTG was added to induce enzyme expression. The recombinant protein was purified by Ni^{+2}NTA affinity chromatography and visualized on SDS PAGE. The biochemical characterization processes of the enzyme and the kinetic parameters of the natural substrates were performed using different methods. The effect of the enzyme on the antioxidant properties of polyphenolic compounds was analyzed using the DPPH method.

Findings: *bglAy9 G226Q/Y227F* gene was obtained by PCR-based mutagenesis method. The weight of the enzymes was determined as approximately 54 kDa in SDS PAGE. The optimum temperature of the enzyme was determined as 50 °C and the optimum pH was determined as 6.0. The K_m, V_{max}, values of the enzyme formed with the pNPG substrate were determined as 0.246 mM and 0.057 µmol/min, respectively. It was determined that the enzyme increased the antioxidant properties of Polydatin, Myricetin 3-O glycoside and Cucurbitacin 2-E-O glycoside substrates by 54.5%, 32.95% and 41.2%, respectively.

Results: Characterization results of wild type (BglAy9 WT) and mutant BglAy9 G226Q/Y227F) enzyme were compared, and a decrease in the optimum pH level of the mutant (from pH 8 to pH 6) was observed. Changes were observed in interactions with organic solvents, metals, ionic/non-ionic detergents, potential inhibitors and glucose. Its optimum temperature was found to be compatible with wild type. In addition, when the kinetic characters were compared, it was determined that the mutant enzyme's affinity for some substrates decreased and it increased the antioxidant capacity of the substrates used within the scope of the study.

Keywords: β-Glucosidases, polyphenolic compounds, mutation, DPPH

August 2022, 110 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU ii
TEŞEKKÜR iii
ÖZET iv
ABSTRACT v
İÇİNDEKİLER vi
TABLOLAR DİZİNİ ix
ŞEKİLLER DİZİNİ x
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ xii
GİRİŞ 1
KURAMSAL TEMELLER 4
Termofilik Bakterilerin Genel Özellikleri 4
Anoxybacillus Cinsinin Genel Özellikleri 5
Enzimler 6
Hidrolazlar 6
Glikozil Hidrolazlar (GH) 7
β-glukozidazlar 8
β-Glukozidaz ile ilgili yapılan mutasyon çalışmaları 30
PCR tekniği kullanımı ile nokta mutasyonu oluşturma yöntemi 33
MATERYAL ve METOT 35
Materyal 35
Tez Çalışmasında Kullanılan Laboratuvar Materyalleri: 35
Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasallar: 36
Tez Çalışmasında Kullanılan Enzimler, Kitler ve Substratlar: 37
Tez Çalışmasında Kulanılan Besiyerleri, İçeriği ve Hazırlanışı: Tez kapsamında 38
Tez Çalışmasında Kullanılan Çözeltiler/Tamponlar İçeriği ve Hazırlanışı: 38
Tez çalışmasında Kullanılan Vektörler Genler ve Bakteriler: 42
Yöntem 43
Mutasyon çalışmaları 43
bglAy9 G226Q/Y227F mutant β-Glukozidaz geninin pGEM®-T Easy vektörüne klonlanması 44

Rekombinant pGEM®-T Easy vektörünün (pGEM®-T Easy vektörü+*bglAy9 G226Q/Y227F* geni) *E. coli* JM101 konak hücrelerine transformasyonu 45
Rekombinant plazmitlerin restriksiyon endonükleazlar ile kesilmesi 45
bglAy9 G226Q/Y227F geninin sekans analizi 46
bglAy9 G226Q/Y227F geninin pET28a (+) ifade vektörüne klonlanması 46
Rekombinant pET28a (+) klonun restriksiyon endonükleazlar ile teyit edilmesi 47
Rekombinant pET28a (+) vektörlerinin *E. coli* BL21 (D3) expresyon hücrelerine transformasyonu 47
bglAy9 G226Q/Y227F mutant genin aşırı ekpresyonu 48
BglAy9 G226Q/Y227F enziminin aktivite tayini 48
BglAy9 G226Q/Y227F enziminin saflaştırılması 48
BglAy9 G226Q/Y227F enziminin SDS poliakrilamid jel elektroforezinde görüntülenmesi 49
Enzim konsantrasyon tayini 49
BglAy9 G226Q/Y227F enzimin biyokimyasal karakterizasyonu 49
Glukoz toleransı 51
Enzim kinetiği 52
Deglikozile subsratların DPPH yöntemi ile antioksidan potansiyelinin değerlendirilmesi 53
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA 54
bglAy9 G226Q/Y227F geninin Oluşturulması 54
Rekombinant pGEM®-T Easy Vektörünün (pGEM®-T Easy Vektörüne +PCR ürünü) *E. coli* JM101 Konak Hücrelerine Transformasyon Sonucu 55
Rekombinant pGEM®-T Easy Plazmitlerin Endonükleaz Restriksiyon Enzimi ile Kesim Sonuçları 56
Sekans Analiz Sonuçları 56
Rekombinant pET28a(+) vektörünün *E. coli* JM101 Konak Hücrelerine Transformasyon Sonucu 57
Rekombinant pET28a (+) vektörlerinin doğrulanması 58
Protein Aktivitesinin Belirlenmesi ve SDS PAGE'de Görüntülenmesi 58
BglAy9 G226Q/Y227F Enzimin Biyokimyasal Karakterizasyonu 60
Optimum sıcaklık 60
Optimum pH 60
Isı stabilitesi 60
pH stabilitesi 61

Enzim Üzerine Metal İyonlarının Etkisi 62
BglAy9 G226Q/Y227F Enzim Aktivitesi Üzerine Organik Çözücülerin, İyonik/Non-İyonik Deterjanların ve Potansiyel İnhibitörlerin Etkisi 62
BglAy9 G226Q/Y227F Enziminin Kinetik Karakterizasyon Sonuçları 64
Glukoz Tolerans Analizi 69
DPPH Analiz Sonuçları 69
SONUÇLAR VE ÖNERİLER 78
KAYNAKLAR 81
ÖZGEÇMİŞ 94

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Bazı Hidrolaz Enzim Grupları ve İçerdiği Bazı Enzim Türleri 7
Tablo 2. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar 35
Tablo 3. Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasallar 36
Tablo 4. Tez Çalışmasında Kulanılan Enzimler, Kitler ve Substratlar 37
Tablo 5. Tez Kapsamında Kullanılan Besiyeri, İçeriği ve Hazırlanışı 38
Tablo 6. Tez Çalışmasında Kullanılan Çözeltiler/Tamponlar İçeriği ve Hazırlanışı 38
Tablo 7. Çalışmada Kullanılan Vektörler ve Genler 42
Tablo 8. Tez Kapsamında Kullanılan Primerler 43
Tablo 9. PCR Bileşenleri ve Miktarları 44
Tablo 10. Ligasyon Reaksiyonu İçin Kullanılan Bileşenler ve Miktarı 45
Tablo 11. Kesim Reaksiyonu İçin Kullanılan Bileşenler ve Miktarları 46
Tablo 12. Kesim Reaksiyon İçin Kullanılan Bileşenler ve Miktarları 46
Tablo 13. *bglAy9 G226Q/Y227F geni*nin pET28a (+) İfade Vektörüne Ligasyonu İçin Kullanılan Bileşenler ve Miktarları 47
Tablo 14. Tez Kapsamında Kullanılan Substratların Reaksiyon Sonrası Kinetik Verileri 69
Tablo 15. DPPH Analiz Sonuçları 70

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. *Anoxybacillus ayderensis* Ay9 bakterisine ait β-glukozidazın (BglA9 WT) 3D yapısı 9
Şekil 2. Farklı GH enzim ailelerine ait β-glukozidazların yapısı 10
Şekil 3. β-Glukozidaz enziminin sınıflandırılması 11
Şekil 4. (a) İnvört bir β-glukozidaz ve (b) retentant bir β-glukozidaz tarafından oluşan genel β-glukozidaz mekanizması 13
Şekil 5. β -glukozidaz enziminin bazı doğal substratları 14
Şekil 6. β-glukozidaz enziminin bazı yapay substratları. 15
Şekil 7. Selüloz'un hidroliz şeması 20
Şekil 8. Lignin'in yapı taşları 21
Şekil 9. Bazı Flavonoidlerin iskelet yapısı 25
Şekil 10. Bu çalışmada kullanılan pofenolik bileşikler 27
Şekil 11. Glukozun β-glukozidaz enzimi üzerinde bağlanma bölgesine göre enzim aktivitesinde oluşturduğu etkiyi gösteren çizim 30
Şekil 12. PCR temelli mutasyon oluşturma diyagramı. 34
Şekil 13. *bglAy9 G226Q/Y227F geni* için birinci basamakta oluşturulan 55
Şekil 15. Rekombinant pGEM®-T Easy vektörünün *E. coli* JM101 konak hücresine transformasyon sonucu. 55
Şekil 16. *bglAy9 G226Q/Y227F* β-glukozidaz geninin pGEM®-T Easy vektörüne klonlanmasının teyit edilmesi 56
Şekil 17. *Anoxybacillus ayderensis* Ay9'un β-glukozidaz amino asit dizisi ile BglAy9 G226Q/Y227F amino asit dizisinin BLAST sonucu 57
Şekil 18. Rekombinant pET28a (+) ifade vektörünün *E. coli* JM101 konak hücresine transformasyon sonucu 57
Şekil 19. *bglAy9 G226Q/Y227F geni*nin pET28a (+) ekspresyon vektörüne klonlanmasının teyit edilmesi. 58
Şekil 20. BglAy9 G226Q/Y227F enzim aktivitesinin belirlenmesi. 59
Şekil 21. Proteinin SDS PAGE görüntüsü. 59
Şekil 22. BglAy9 G226Q/Y227F enziminin optimum sıcaklık grafiği 60
Şekil 23. BglAy9 G226Q/Y227F enziminin optimum pH grafiği 60

Şekil 24. BglAy9 G226Q/Y227F enziminin sıcaklık kararlılığının zamana karşı değişim grafiği 61
Şekil 25. BglAy9 G226Q/Y227F enziminin pH kararlılığının zamana karşı değişim grafiği . 61
Şekil 26. BglAy9 G226Q/Y227F enzimi üzerine metal iyonların etkisi 62
Şekil 27. BglAy9 G226Q/Y227F enzimi üzerine potansiyel inhibitörlerin etkisi 63
Şekil 28. BglAy9 G226Q/Y227F enzimi üzerine iyonik/non-iyonik deterjanların etkisi..... 63
Şekil 29. BglAy9 G226Q/Y227F enzimi üzerine organik çözücülerin etkisi 64
Şekil 30. BglAy9 G226Q/Y227F enziminin *p*NPG varlığında Michaelis-Menten grafiği 65
Şekil 31. BglAy9 G226Q/Y227F enziminin ***p***NPG varlığında grafiği Lineweaver – Burk eğrisi 65
Şekil 32. BglAy9 G226Q/Y227F enziminin Polidatin varlığında Michaelis-Menten grafiği . 66
Şekil 33. BglAy9 G226Q/Y227F enziminin Polidatin varlığında Lineweaver – Burk eğrisi.. 66
Şekil 34. BglAy9 G226Q/Y227F enziminin Mirisetin 3-O-glikozit varlığında Michaelis-Menten grafiği 67
Şekil 35. BglAy9 G226Q/Y227F enziminin Mirisetin 3-O-glikozit varlığında Lineweaver – Burk eğrisi 67
Şekil 36. BglAy9 G226Q/Y227F enziminin Kukurbitasin E-2-O-glikozit varlığında Michaelis-Menten grafiği 68
Şekil 37. BglAy9 G226Q/Y227F enziminin Kukurbitasin E-2-O-glikozit varlığında Lineweaver – Burk eğrisi 68
Şekil 38. BglAy9 G226Q/Y227F enzimi üzerine glukozun etkisi 69

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C : Derece

µg : Mikrogram

µl : Mikrolitre

µM : Mikromolar

µmol : Mikromol

Amp : Amfisilin

Bp : Baz çifti

BSA : Sığır serum albumini

$CaCI_2$: Kalsiyum klorür

$CoCI_2$: Kobalt klorür

$CuSO_4$: Bakır (II) sülfat

ddH_2O : Deiyonize su

DEPC : Dietil dikarbonat

Dk : Dakika

DMSO : Dimetil sülfoksi

DNA : Deoksiribonükleik asit

DNS : Dinitro salisalik asit

dNTP : Deoksiribonükleotittrifosfat

DPPH : 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil

DTT : Dithiothreitol

EDTA : Etilendiamintetraasetik asit

EGTA : Etilen glikol-bis(β-aminoetil eter)tetraasetik asit

$FeSO_4$: Demir(II) sülfat

g : Gram

GH : Glikozil Hidrolaz

GOPOD : D-Glukoz test kiti

HCN : Hidrosiyanik asit

HgCl : Civa klorür

IPTG : Isopropil β-D-1-tiyogalaktopiranosid

IUBMB : Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji

K_2HPO_4 : Potasyum fosfat dibazik

Kan : Kanamisin

KCI : Potasyum klorür

kDa : Kilo Dalton

KH_2PO_4 : Potasyum fosfat monobazik

Km : Michaelis-Menten sabiti

lacZ : Beta- galaktosidaz geni

LB : Luria Bertani Sıvı Besiyeri

M : Molar

mg : Miligram

$MgCI_2$: Magnezyum klorür

ml : Mililitre

mM : Milimolar

mmol : Milimol

$MnSO_4$: Mangat sülfat

Na_2CO_3 : Sodyum karbonat

Na_2HPO_4 : Sodyum fosfat dibazik

NaCI : Sodyum klorür

NaH_2PO_4 : Sodyum Dihidrojen Fosfat

NaOH : Sodyum hidroksit

NCBI : National Centre for Biotechnology Information

$NiCI_2$: Nikel klorür

OD : Optik Yoğunluk

PAGE : Poli Akrilamid Jel Elektroforezi

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PMSF : Fenil metan sulfonil florid

***p*NPG** : P-nitrofenil beta-D-glukopiranosid

rpm : Dakikadaki devir sayısı

rpoB : DNA-directed RNA polymerase, beta alt ünitesi

SDS : Sodyum dodesil sülfat

sn : Saniye

TEMED : Tetrametiletilendiamin

Tm : Erime Sıcaklığı

U : Ünite

UV : Ultraviyole

v/v : hacim/hacim

X-Gal : 5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranosid

ZnSO4 : Çinko sülfat

***α*NPG** : 4-nitrogenil α-D-glukopiranozid

β : Beta

βME : Beta-merkaptoetanol

GİRİŞ

Biyosferde bulunan canlılar Carl Woese ve arkadaşları tarafından 1977 yılında Arkealar, Bakteriler ve Ökaryotlar olmak üzere üç farklı gruba ayrılmıştır (Baltacı and Kalkancı 2018). Bakteriler yeryüzünün her alanında yoğun bir şekilde yayılım gösterir ve ısıya karşı oluşturdukları yaşam habitatlarına göre (i) Sakrofilikler, (ii) Mezofilikler ve (iii) Termofilikler olarak sınıflandırılırlar. Termofilik bakteriler; lipaz, sellülaz, β-glukozidaz, protaez gibi ısıya dirençli ve ekstrem şartlarda aktivitesini koruyabilen enzimleri sentezleyebildikleri için literatürde sıklıkla karşımıza çıkarlar. Bu enzimlerden β -glukozidazlar glikozil hidrolaz enzim ailesinde bulunurlar. Bunlar iki veya daha fazla karbohidrat arasındaki veya bir karbohidrat, diğeri karbohidrat olmayan iki molekül arasındaki glikozidik bağı hidrolize eden enzimlerdir. β-glukozidazlar, aril-, amino- veya alkil-β-D-glikozitler, siyanojenik glikozitler ve oligo- veya disakkaritlerdeki β-glukozidik bağların kesilmesine aracılık eden glikozil hidrolazlar (GH)'dır. β-glukozidazlar, selülozun hidroliz edilerek etanol üretiminde (Shewale 1982), gıda işlemede lezzetin iyileştirilmesi (González *et al.* 2011) ve izoflavon glikozitlerin hidrolizi (Du *et al.* 2014) gibi birçok biyolojik işlemlerde uygulamaya sahiptir.

Glikozil hidrolazlar aglikon grubunu, bağlı olduğu bölgeye ve şeker tipine göre birçok polifenolik bileşiği deglikozile edebilir (Berrin *et al.* 2003). Polifenolik (doğal antioksidan) bileşikler, bitkiler tarafından doğal olarak üretilen bileşiklerin farklı bir grubudur (Handique 2002). Sağlığa faydalı olmalarından dolayı, bu doğal antioksidanlar büyük ilgi görmüştür. Antioksidanlar neoplazi, ateroskleroz ve nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisi ile ilişkili olan reaktif oksijen türlerinin neden olduğu oksidatif strese karşı bir bariyer oluşturarak oksidan etkisini ortadan kaldırırlar (Carter *et al.* 2014; He *et al.* 2016). Polifenolik bileşiklerin geniş antioksidan aktivite gösterdiği kanıtlanmış ve birçok hastalığa karşı (örneğin yukarıda belirtilen hastalıklar) koruyucu etkiye sahip oldukları düşünülmektedir. Bu bileşikler, genellikle çilek, üzüm ve soğan gibi daha yüksek bitkiler tarafından sentezlenirler. Tıbbi ve endüstriyel öneme sahip bu bileşikler, doğada çoğunlukla glikozile formda bulunurlar. Mirisetin 3-O- glikozit, polidatin ve kukurbitasin 2-E-O-glikozit polifenolik bileşikleri buna örnek olarak verilebilir. Birçok çalışma, aglikon'un (şeker molekülü bağlı olamayan molekülün formu), glikozile edilmiş fromlarına nazaran daha yüksek antioksidatif yeteneğe sahip olduğunu göstermektedir (He *et al.* 2016). Bundan dolayı çok sayıda ilaç ve gıda endüstrisi tarafından aglikon formunda satışa sunulmaktadır. Ayrıca doğal kaynaklarda bu moleküllerin aglikon formunun miktarı glikozile formuna göre düşüktür (Wang *et al.* 2007).

Yapılan bir çalışmada resveratrol miktarı (Polidatinin bileşiğinin deglikozile formu) bitki (*Polygonum cuspidatum*) içeriğinin yaklaşık %0,2'sini oluştururken, Polidatini ise 10-15 kat daha fazla oluşturduğu gözlemlenmiştir (Wang *et al.* 2007). Bu nedenle, aglikonları daha etkin ve ekonomik olarak elde etmek için, glikozitlerin hidrolizlenmesiyle/deglikozilasyon yoluyla aglikon formuna dönüştürülmesi uygun bir prosedür gibi görünmektedir.

Endüstriyel ortamlarda, bu glikozitlerin (Mirisetin 3-O- glikozit, Polidatin ve Kukurbitasin 2-E-O-glikozit) deglikozilasyonu/hidrolizi, kimyasal veya enzimatik yöntemlerle sağlanır. Kimyasal yöntemde, hidrolitik reaktif olarak genellikle asit veya alkali kullanılır ve bu teknik, yüksek sıcaklıklar ve/veya uzun inkübasyon süresi anlamına gelir. Bu yöntem genellikle hidrolizatın daha fazla bozulmasına yol açar ve maliyeti yüksek bir süreçtir. Enzimatik hidroliz ise çoğunlukla orta sıcaklıkta ve pH'ta gerçekleşir ve toksik veya bozulmuş ürünler oluşturmayan çevre dostu bir işlemdir (Kuo and Lee 2008). Doğada deglikozilasyon, glikozil hidrolazlar (GH'ler) ailesine ait β-glukozidaz enzimler tarafından gerçekleştirilir (Turner *et al.* 2006).

Fermentasyon yöntemi ile glikozitleri dönüştürmek için mikrobiyal kültürler kullanan birkaç çalışma rapor edilmiştir (Wang *et al.* 2007; Chong 2012; Tian *et al.* 2008; Park *et al.* 2007). Bu çalışmalarda deglikozilasyon verimi artırılmış olmasına rağmen, uzun fermentasyon süreleri ve düşük üretkenlik, endüstriyel ortamlarda kullanımı kısıtlamamıştır. Bu nedenle enzimatik dönüştürme, bu amaç için verimli bir teknik olarak önerilmiştir. Yaban tip β-glukozidaz ile ilgili diğer bir problem, enzimin hedef molekülün omurgasında belli bir pozisyona bağlı glukozun hidrolizi için düşük afinite göstermesidir. Çünkü hiçbir yaban tip enzim mükemmel veya ideal değildir ve her substrat spesifik özelliklere sahip bir enzim gerektirir (Khan *et al.* 2011).

Yapılan bu tez bu çalışmasının amacı hem enzimin termostabilitesini hem de doğal olarak oluşan polifenoliklerden (Kukurbitasin 2- E- O-glukozit, Mirisetin 3-O-glukozit ve Molidatin) ve ticari olarak satın alınan sentetik *p*NPG substratından glukoz rezidülerinin seçici olarak uzaklaştırılmasını (enziminin substrata olan ilgisini) ve sonrasında polifenolik glikozitlerin antioksidan etkilerini artırmaktır. Bu amaç doğrultusunda enzimin aktif bölgesinde (+2) bulunan 227 bölgesindeki Tirozin (Y) amino asiti yerine hidrofobik özellik gösteren Fenilalanin (F) amino asitinin dahil edilmesi sonucu ilgili substratlara karşı ilgilinin artacağı düşünüldü ve *Anoxybacillus ayderensis* Ay9'dan elde edilen β-glukozidaz enzimi üzerinde G226Q mutasyonuna ek olarak Y227F mutasyon bölgesi oluşturulması hedeflendi. Elde edilecek BglAy9 G226Q/Y227F mutant β-glukozidaz enziminin (BglAy9 G226Q/Y227F) tez kapsamında belirlenen substratlar ile kinetik karakterleri ve biyokimyasal karakterizasyon

basamakları oluşturulacak ve BglAy9 G226Q/Y227F ile deglikozilasyonu yapılan polifenolik bileşiklerin (Kukurbitasin 2-O-glukozit, Mirisetin 3-O glukozit ve Polidatin) antioksidan kapasiteleri DPPH yöntemi ile analiz edilecektir.

KURAMSAL TEMELLER

Termofilik Bakterilerin Genel Özellikleri

Biyosferde bulunan canlılar Carl Woese ve arkadaşları tarafından 1977 yılında Arkealar, Bakteriler ve Ökaryotlar olmak üzere üç farklı domaine ayrılmıştır (Baltacı and Kalkancı 2018). Bakteriler yeryüzünün her alanına yoğun bir şekilde yayılım gösterir. Isıya karşı oluşturdukları yaşam habitatlarına göre bakteriler; (i) Sakrofilikler (ii) Mezofilikler ve (iii) Termofilikler olarak sınıflandırılır. Psikrofiller, -10 °C sıcaklıklarda çoğalabilirler, ancak optimum büyüme sıcaklığı 15 °C veya daha düşük sıcaklık olan bakterileri de içerirler. Mezofilik bakteriler ise 15- 50 °C arasındaki sıcaklılarda büyüyebilirler ve bu bakteriler insan sağlığı bakımından patojen oluşturabilecek türler içerirler. Sınıflandırmanın üçüncü üyesi olan termofilikler, 45-80 °C arasındaki sıcaklıkları tolere edebilir, hatta bazı türleri 100 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda bile yaşamsal fonksiyonlarını devam ettirebilirler (Abdollahi *et al.* 2021; Oztas and Gormez 2020). Brock tarafından 1879 yılında ortaya atılan termofilik terimi, yüksek sıcaklıklara karşı direnç gösterebilen ve bu ortamlarda yaşayabilen canlıları tanımlamak için kullanılmıştır. Miquel bu çalışmasında farklı ortamlardan (çamur, nehir, toprak, kanalizasyon ve toz) izole ettiği bakterilerin 72 °C'de büyüdüğünü belirtmiştir (Brock 2001).

Canlılar, yüksek sıcaklıklarda ve ekstrem şartlarda yaşamlarını sürdürebilmeleri için hücresel ve metabolik fonksiyonlarını bu ortamlara adapte etmeleri gerekir. Termofilik bakterilerin hücre membranı doymuş yağ asitlerinden oluşur ve bu yağlar hücreye hidrofobik özellik kazandırır. Bu da organizmanın yüksek sıcakılık şartlarında yaşamını devam ettirebilmesi için hücrenin yeterince sıkı ve sert bir şekilde durmasını sağlar. Termofilik bakterilerin DNA'sında pozitif süper sarmallar oluşturarak DNA'nın geri dönüşünü (reversible) sağlayan DNA giraz enzimi, DNA'nın erime noktasını canlının maksimum büyüme gösterdiği sıcaklığa kadar artırır. Ayrıca bu bakteriler, ısıya karşı direnç gösteren canlıların kullandığı hidrofobik ve elektrostatik disülfit köprüsü gibi etkileşimler vasıtasıyla yüksek sıcaklıklara tolerans gösterirler (Fujiwara 2002; Haki 2003). Termofiliklerin protein ve enzim gibi hücresel elemanları da yüksek sıcaklıkları (65-85 °C) ve son derece asidik ya da alkali denatürantları tolere edebilirler (Fujiwara 2002; Haki 2003).

Termofilik bakteriler; lipaz, sellülaz, β-glukozidaz, proteaz gibi ısıya dirençli ve ekstrem şartlarda aktivitesini koruyabilen enzimleri sentezleyebildileri için literatürde sıklıkla karşımıza çıkarlar. Yüksek sıcaklıklarda polimerlerin (substratların) çözünürlük oranlarının

artması ve kontaminasyon oluşma riskinin azalması nedeniyle, biyoteknolojide ve endüstriyel uygulamalarda kullanılması termofilik bakterilere olan talebi artırmıştır (Güven 2011).

Anoxybacillus Cinsinin Genel Özellikleri

Anoxybacillus cinsi, 2000 yılında Pikuta ve arkadaşları tarafından tanımlandı ve önceleri *Bacillus* cinsi içerisinde sınıflandırılan *Anoxybacillus* üyeleri sonrasında ayrı bir cins olarak sistematiğe kazandırıldı (Pikuta *et al.* 2000). *Bacillus* cinsinden ayrılan *Anoxybacillus* cinsi genel olarak gram-pozitif, termofilik, alkolotolerant ya da alkolofilik ve endospor oluşturma yeteneğine sahip çubuk şekilli bakterilerden oluşur, hatta bu bakteriler bazı organik çözücüleri, metalleri ve etanolü tolere ederek yaşamsal fonksiyonlarını devam ettirebilirler (Lim *et al.* 2015; Bekler 2016). *Anoxybacillus* cinsinden ilk olarak tanımlanan *Anoxybacillus pushchionensis* $K1^T$ bakteri türü başlarda anerobik olduğu düşünülmüştür. Bundan dolayı ismin başına "anoksi" (oksijen gerektirmeyen) eki getirilmiştir. Fakat daha sonra bu bakteri türünün oksijenin olduğu alanlarda da yaşayabildiği gözlemlenmiş ve *Anoxybacillus* üyelerinin özelliği fakültatif anaerob ya da aetolerant olarak değiştirilmiştir (Pikuta *et al.* 2003). *Anoxybacillus* cinsi üyelerinin birçoğu genel olarak 50 ila 65 °C optimum büyüme sıcaklığına sahiptir ve genomlarında pullulanaz, α-amilaz, amilopullulanaz, ksiloz-izomeraz ve β-glukozidaz gibi birçok enzimin kodunu barındırırlar (Bolton *et al.* 1997; Beldüz *et al.* 2015; Chai *et al.* 2012; Zada *et al.* 2021; Kikani and Singh 2012). Yapılan araştırmalar göre *Anoxybacillus* türlerinden fruktoz-1,6-bifosfataldolaz, L-arabinoz izomeraz, alüminyum tolerans ATPaz, tip II restriksiyon endonükleazı (BflI RE), ksilanaz, α-L-arabinofuranosidaz ve karboksilesteraz enzimlerinin doğal ya da rekombinant olarak elde edildiği ve bu bakterilerin jeotermal topraklar, kaplıcalar, kanalizasyon gibi çeşitli mikrobiyal yaşam alanlarından elde edilebileceği görülmüştür (Beriş *et al.* 2011; Ay *et al.* 2011; Çanakçı *et al.* 2008; Ertunga *et al.* 2007; Li *et al.* 2011; Kacagan 2008;). Ayrıca *Anoxybacillus* türlerinin %G+C oranları %42-50 aralığında farklılık gösterdiği belirtilmiştir.

Son zamanlarda *Anoxybacillus'*un 24 türü tanımlanmış (LPSN) ve Ayder'in termal sularından elde edilen termofilik *Anoxybacillus ayderensis* $AB04^T$ suşunun, gram-pozitif, basil şekilli bakteri olduğu ayrıca çoğalması için gerekli sıcaklığın 30 ile 70 °C aralığında, optimum sıcaklığın ise 50 ile 55 °C aralığında olduğu belirtilmiştir (Dülger *et al.* 2004;). Buna ek olarak bu suşun D-ksiloz, D-mannoz, D-sükroz, D-mannitol, D-glukoz, D-rafinoz, maltoz, L-arabinoz gibi farklı karbon kaynaklarının olduğu ortamlarda fakültatif olarak yaşamsal fonksiyonlarını sürdürebildiği ve büyüme ortamında yeterli seviyede tetrasiklin, ampfisilin, streptomisin, gentamisin kanamisin ya da sülfat varlığında yaşamsal fonksiyonlarını devam ettiremeyen anaeroblar olduğu gözlemlenmiştir (Dülger *et al.* 2004).

Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji Laboratuvarının mikrobiyal kütüphanesi tarandığında *Anoxybaccilus ayderensis* Ay9 suşun da β-glukozidaz kodlayan gen dizisinin olduğu belirlenmiş ve ardından tespit edilen β-glukozidaz kodlama dizileri PCR yoluyla amplifiye edilip rekombinant tekniklerle uygun şartlarda overekspres edilmiştir. Bunun yanında elde edilen bu suşun optimum büyüme sıcaklığının 50 -55 °C olduğu gözlemlenmiştir (Zada *et al.* 2021).

Enzimler

Enzimler, biyolojik sistemlerdeki reaksiyonların canlılığa zarar vermeyecek şekilde gerçekleşmesini sağlayan ve ribozimler küçük bir grubu hariç hepsi protein yapısına sahip biyolojik katalizörlerdir.(Korkmaz *et al*. 2015) Bu katalizörler reaksiyon esnasında aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyonun daha kısa sürede oluşmasını sağlarlar ve işlem sonrasında kimyasal yapısını korurlar. Biyolojik reaksiyonlarda ve endüstriyel uygulamalarda sıklıkla karşımıza çıkan mikrobiyal kökenli enzimlerin çok fazla tercih edilmelerinin temel nedeni; maliyetinin düşük olması, toksik ya da alerjik problemler oluşturmaması ve hücre dışı ortamlarda da aktivitesinin devam etmesinden kaynaklıdır (Sevinç 2010).

Enzimlerin kendine özgü maksimum aktivite gösterdiği pH ve sıcaklık değerleri vardır. Reaksiyon esnasında bu değerlerin altına ya da üzerine çıkılması durumunda aktivite yavaş bir şekilde ya da direk olarak düşer (Bhat 2000). Ayrıca metal iyonlarının da birçok enzimin biyolojik işlevinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Bunun yanında birçok potansiyel inhibitörler, iyonik/ non-iyonik deterjanlar ve organik çözücü maddeler enzimlerin aktivitelerini olumlu ya da olumsuz yönde etkileyebilirler.

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji'ye (IUBMB) göre, enzimlerin sınıflandırılması ve adlandırılması, enzimin sahip olduğu belirli bir kataliz reaksiyon mekanizmasındaki göreviyle ilişkilidir (McDonald 2009). Yakın zamana kadar IUBMB tarafından altı gruba ayrılan bu enzimler, 2018 yılında yeni bir grup olan Translokazların eklenmesiyle yedi grup altında sınıflandırılmıştır (Altınok 2022; URL-1). Bunlar translokazlar, ligazlar, izomerazlar, liyazlar, hidrolazlar, transferazlar ve oksidoredüktazlardır. Bu enzim grupları arasında mikrobiyal kökenli hidrolazlar ticari öneme sahip enzimlerin çoğunu oluşturmaktadır.

Hidrolazlar

Karbohidratların aralarındaki bağların yapım ve yıkım metabolizmasında pek çok enzim grupları görev almaktadır. Bu enzim gruplarından olan hidrolaz ailesi, su varlığında makromoleküler substratları hidrolize edebilen organik katalizörler olarak bilinir (Singhania *et*

al. 2017). Hidrolaz grubu enzimler makromolekül substratları hidrolize etme gibi doğal görevlerinin yanında, polimerizasyon ve polimer modifikasyon reaksiyonlarının gerçekleştirilmesi için de yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Kaçıran 2020).

Yapılan araştırmalara göre, hidrolaz grubu enzimlerin polimer çalışmalarında diğer enzimlere göre daha sık kullanıldığı görülmektedir (Kaçıran 2020). Hidrolaz grubu enzimler, ester, glikozil, eter, peptit, asit, anhidrit C-C, C-Halojen ve P-N bağlarına etki ederek bu bileşiklerin hidroliz reaksiyonlarını gerçekleştirebilmektedir. Lipazlar, fosfatazlar, glukozidazlar, peptidazlar, nükleositazlar ve esterazlar yaygın olarak kullanılan hidrolaz enzimlerinden bazılarıdır (Gübitz and Paulo 2003). (Tablo 1).

Tablo 1. Bazı Hidrolaz Enzim Grupları ve İçerdiği Bazı Enzim Türleri

Hidrolaz Enzim Grupları	İçerdiği Bazı Enzim Türleri
Esterazlar	Karboksiesterazlar, Sülfatazlar ve Tiolesterhidrolazlar
Glikozilazlar	β-glukoronidaz, α-glukozidaz, α-amilaz, Oligodekstrin-6-glukanohidrolaz, heperinaz, β-glukozidaz, hiyoluronidaz, fruktohidrolaz, β-galaktozidaz, β-D-fruktofuranozid
Nükleositazlar	Nükleozidaz
Peptidazlar	Karboksipeptidaz A ve B, Pepsin, Rennin Tripsin, Kimotripsin, Katepsinler, Trombin 4- Diğer C–N bağ
Lipazlar	
Fosfatazlar	Alkalen Fosfataz

Glikozil Hidrolazlar (GH)

Karbohidratlar geniş stereokimyasal çeşitlilik gösterir ve çok farklı şekilde bir araya getirilebilirler (Laine 1994). Canlı organizmalar, bu çeşitlilikten depolama, yapıya katılma ve son derece spesifik sinyal rollerine kadar çok sayıda biyolojik işlev için karbohidrat çeşitlerinden oligosakkarit ve polisakkarit kullanarak yararlanırlar. Bu nedenle glikozidik bağların seçici hidrolizi; enerji alımı, hücre duvarı genişlemesi, bozulması ve sinyal moleküllerinin devri için çok önemlidir (Henrissat and Davies 1997). Glikozidik bağların hidrolizi, glikozil hidrolazlar tarafından gerçekleştirilir.

Glikozil hidrolazlar, iki veya daha fazla karbohidrat veya bir karbohidrat ve karbonhidrat olmayan bir kısım arasındaki glikozit bağını hidrolize edebilen enzimler grubudur. Bu enzim grubu, polisakkaritler ve oligosakkaritler içindeki glikozit bağlarını parçalayarak, onların metabolize edilebilecek kadar küçük hale gelmesini sağlar (Kaçıran 2021).

IUBMB'ye göre, glikozil hidrolazların tanımı, enzimin yapısal özelliklerinin yanısıra, substrat spesifikliğine ve moleküler mekanizmasına bakılarak yapılmıştır. Ancak GH16 ailesi gibi bazı glikozil hidrolazlar, karışık substrat özgüllüğüne sahiptirler. IUBMB'ye göre glikozil hidrolazlar etki ettiği moleküllere göre; (i) O- ve S-glikozil bileşiklerini parçalayabilen enzimler (Glukozidazlar) (EC 3.2.1), (ii) N-glikozil bileşiklerini parçalayabilen enzimler (EC 3.2.2) ve (iii) S-glikozil bileşiklerini parçalayabilen enzimler (EC 3.2.3) olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Glikozil hidrolazlardaki kalıtsal eksiklikler, laktoz intoleransı (Sebastio 1989) ve bir dizi lizozomal depo hastalığı gibi, insanda en sık görülen genetik temelli hastalıklara neden olurlar (Neufeld 1991).

β-glukozidazlar

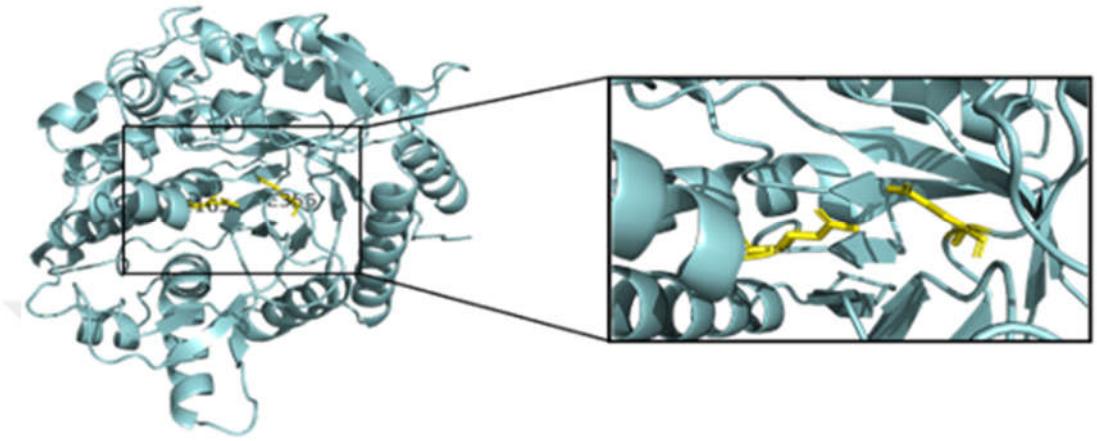
β-Glukozidazların genel özellikleri

β-Glukozidazlar, biyolojik sistemlerde glukoz moleküllerinin β-bağlarını hidrolize ettiği için büyük öneme sahip enzim grubudur. β-glukozidazların iki karbohidrat veya biri karbohidrat diğeri karbohidrat olmayan (aril veya alkil) iki grup arasındaki glikozidik bağı hidrolize ettiği ve karbohidratlar arasındaki β1→4 glikozit bağlarını koparark pek çok biyolojik işlevde temel rol oynadıkları belirtilmiştir (Laine 1994; Chuenchor *et al.* 2008; Ko *et al.* 2014). β-glukozidazların hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunduğu ve bu canlıların biyolojik süreçlerinde önemli rol oynadığı bilinmektedir (Krisch 2010).

Mantar ve bakteriyal β-glukozidazlar daha çok selülaz enzim sisteminin bir parçası olarak selobiyoz ve selülozun yıkımında önemli rol oynarken, bitkisel β-glukozidazlar, siyanojenez gibi bitki savunma sistemleri ve birçok mekanizmada rol oynamaktadır (Krisch 2010). Bu enzim grubu katalitik ve dizi özelliklerine göre birden çok glikozil hidrolaz ailelerinde yer alırlar ve esas olarak GH1 ve GH3 ailelerinde bulunurlar (Singh *et al.* 2016; Teugjas *et al.* 2013). GH1 ailesinde, çoğunlukla bitki ve memelilerden elde edilen yaklaşık 62 β-glukozidaz bulunurken, GH3 ailesinde esas olarak bakteri, küf ve maya kaynaklı yaklaşık 44 β-glukozidaz bulunur (Ketudat 2010).

Mikrobiyal β-glukozidazların birçoğunun ise 1. ve 3. glikozil hidrolaz ailelerine dahil olduğu bilinir. Bu enzimler, oksijene bağlı β-glikozitleri hidrolize eden β-O-glukozidazlar ve kükürt bağlı β-'yi hidrolize eden ve bitkilerde büyük ölçüde Brassicaceae ailesinde yer alan β-S-glukozidazlar (glukosinolatlar, β-tioglukozitler) olarak iki farklı gruba ayrılırlar (Clarke 1993; Gemici 2004).

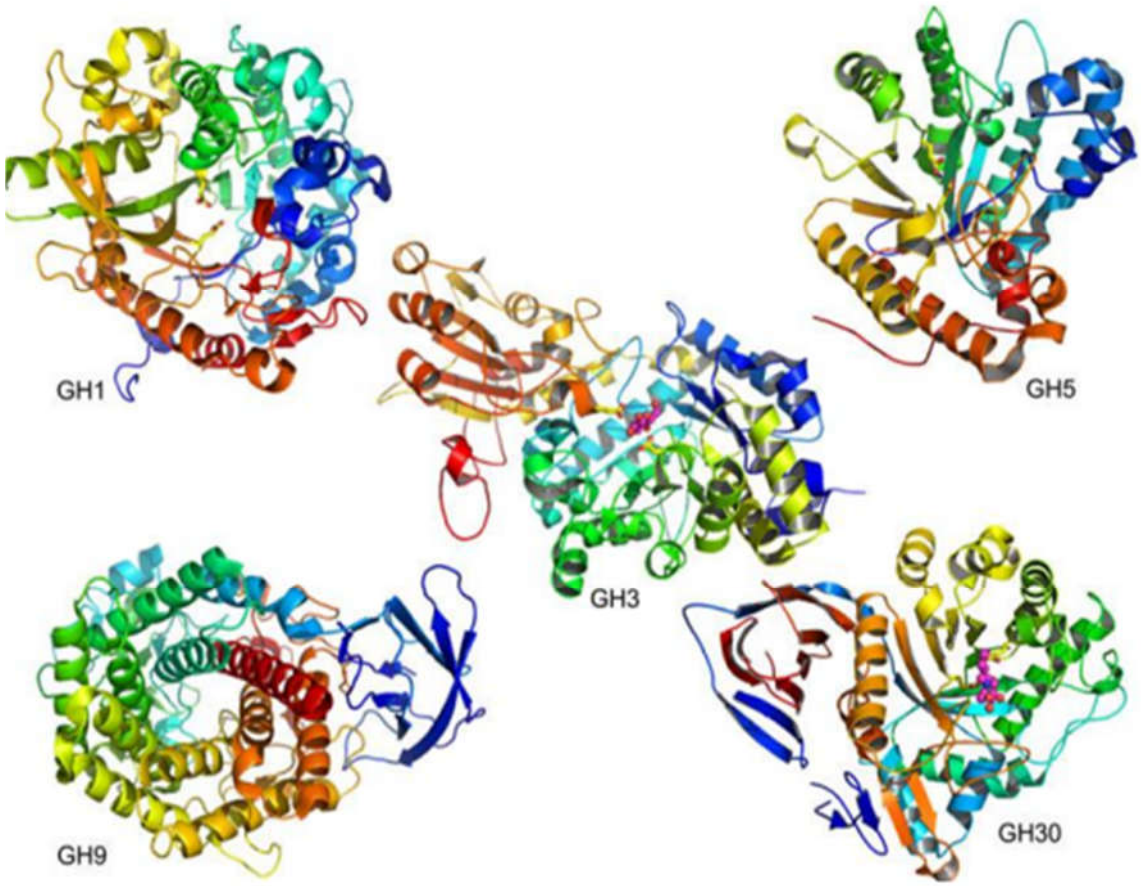
β-glukozidaz monomerlerinin, her birinin temel yapısında yüksek korunuma sahip peptit motiflerinin olduğu bilinmektedir. Bu motifler SAYQI, YRFSI, TFNEP, LGLNYY, YITENG ve DNFEW olarak belirtilmiştir. Bunlardan TFNEP ve YITENG motiflerinin, enzimin aktif bölgesinin bir parçasını oluşturduğu ve iki adet katalitik glutamat bölgesi (E165, E355) içerdiği tespit edilmiştir (Şekil 1) (Sanz-Aparicio *et al.* 1998; Zada *et al.* 2021;Xu *et al.* 2004).



Şekil 1. *Anoxybacillus ayderensis* Ay9 bakterisine ait β-glukozidazın (BglA9 WT) 3D yapısı. Enzimin aktif bölgesinde bulunan nükleofil ve asit/baz katalik bölge rezidüleri (165 ve 355) çubuklar halinde ve sarı renkte gösterilmektedir (Zade *et al.* 2021)

Enzimin yapısında bulunan β dizileri bir fıçı (barrel) oluşturacak şekilde düzenlenerek, özellikle kararlı bir motif olan α/β fıçısı olarak adlandırılan bir seri β-α-β halkasını (β-α-β lop) oluştururlar. Birçok enzimde bulunan α/β fıçı motiflerinin geneli, yapısında cebe benzeyen ve kofaktör ya da substratın bağlandığı bölgeler bulundurur. Bu yapıda bulunan birbirine paralel olan β kısım, α helikal bir parça ile komşusu olan β kısma bağlanır (Nelson 2008).

β-glukozidazların yapıları birbirinden farklı olmasına rağmen, her bir GH ailesindeki katalitik bölgeler benzerlik gösterir. GH1, GH5 ve GH30 aileleri aktif bölgelerinde benzer (β/α) 8-fıçı motifi içerirken, GH3 ailesi enzimleri aktif bölgesine iki motifle katkı sağlar. Bunun yanında GH9 enzimi yapısında $(\alpha\text{-}\alpha)_6$ motifini bulundururken, aynı motifi içeren GH2 ailesi ile zayıf homoloji gösterirler (Şekil 2) (Ketudat and Esen 2010).



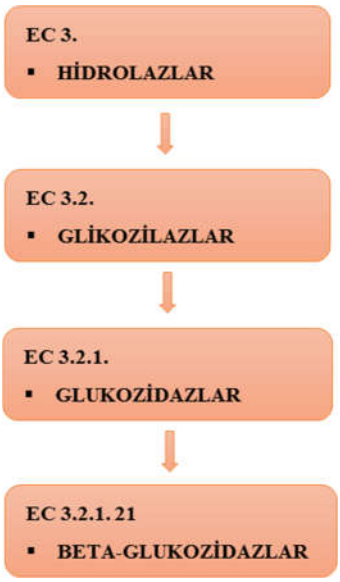
Şekil 2. Farklı GH enzim ailelerine ait β-glukozidazların yapısı (Uzun 2015)

Yapılan araştırmalara göre GH 1 ailesine ait β-glukozidaz enzimlerinin monomer ağırlıklarının 55 ile 65 kDa aralığında olduğu tespit edilmiştir (Uzun 2015). Belirlenen bu monomerlerin polipeptit uzunluklarının 445 amino asitten (*Anoxybacillus* sp.) 527 amino asite (Beyaz hardal bitkisi) kadar değişebildiği gözlemlenmiştir (Kara 2010; Zada *et al.* 2022).

Sıcaklıkla ilgili yapılan stabilite çalışmaları incelendiğinde β-glukozidaz enzimlerinin 55 ile 60 ºC üzerindeki sıcaklıklarda geri dönüşümsüz olarak aktivitesini kaybettiği gözlemlenirken, enzimin 50 ile 55 ºC sıcaklıklar da en yüksek aktiviteye sahip oldukları tespit edilmiştir (Esen 2003). Bunlara ek olarak yapılan bazı çalışmalarda enzimin pH 4- 10 aralığında stabil olduğu, ancak en yüksek stabilitenin pH 8,0 civarında olduğu ve enzimin 0-40 ºC sıcaklık aralığında stabil olduğu tespit edilmiştir (Naz 2010; Haq *et al.* 2012).

β-Glukozidazların sınıflandırılması

β-glukozidazlar (EC.3.2.1. 21), IUBMB tarafından yapılan sınıflandırmanın üçüncü basamağında yer alan hidrolaz (EC.3) grubu enzimleri üyelerinden glikozil hidrolaz ailesinin (EC.3.2) (Şekil 3) bir parçasıdır(Henrissat *et al.*1985; Henrissat 1991;Henrissat ve Davies, 2000; Henrissat and Davies 1997).



Şekil 3. β-Glukozidaz enziminin sınıflandırılması

Mantar, bitki ve bakterilerde yaygın olarak bulunan bir hidrolitik enzim grubu olan β-glukozidazlar, yapıları ve dizileri bakımından özdeş bir benzerlik gösterirler (Bhatti 2002). Genel olarak β-glukozidazlar iki farklı sisteme göre sınıflandırılmıştır (Esen 2003; Singh *et al.* 2016). Birinci sınıflandırma sistemi substrat özgüllüğüne dayanırken, ikinci sınıflandırma sistemi nükleotit dizi benzerliği dikkate alınarak yapılmıştır (Reeta 2003; José 2018). Substrat spesifikliğine dayalı sınıflandırmada, β-glukozidazlar üç ayrı gruba ayrılırlar: (i) tercihen aril-glukozitleri parçalayan aril β-glukozidaz; (ii) bir disakkarit olan selobiyozun glukoza dönüştürülmesinde rol oynayan sellobiyazlar ve son olarak (iii) geniş özgüllükteki glukozidazlardır (birçok substrat tipinde aktivite gösterirler ve en yaygın olarak bulunan β-glukozidazlardır) (Rajan *et al.* 2004; Souza 2018). Substrat özgüllüğüne dayalı sınıflandırma çok bilgilendirici değildir, çünkü tek bir enzim için belirlenemeyen birden fazla substrat vardır (Srivastava *et al.* 2019). Ancak bilinmeyen ve tanımlanmamış glukozidazların yapılarının belirlenebilmesi için, aglikon grubuna dayalı substrat özgüllüğü en önemli ve bazen tek belirleme yöntemidir (Esen 2003).

Bu bahsedilen sistemlerden ikinci sınıflandırma sistemi yaygın olarak kabul edilmektedir ve hem nükleotit dizisinin kimliğine hem de enzimin yapısal benzerliğine dayanmaktadır (Henrissat 1997). Bu sistemde, genel amino asit dizisi benzerliğine ve iyi korunmuş dizi motiflerine sahip olan enzimler tek bir aile içerisinde tutulur (Singh 2016; Li *et al.* 2012).

2016 yılında sıklıkla güncellenen, Karbohidrat Aktif enZYme (CAZY) web sitesinde (URL-1: http://www.cazy.org-) listelenen 133 glikozil hidrolaz (GH) ailesi tanımlanmıştır (Singh *et al.* 2015; Cantarel *et al.* 2009). Tanımlanan GH aileleri sahip oldukları ortak kataliz

mekanizmalarına göre klanlara ayrılmıştır. Bunun sonucunda aynı katalitik domaine ve korunmuş amino asit domaine sahip aileler aynı klana yerleştirilmiştir. GH1, GH5 ve GH30 gibi β-glukozidaz içeren ailelerle birlikte GH-A klanında gruplandırılmıştır (Singh 2016). Karakterize edilmiş olan β-glukozidazların çoğunluğu GH1 ailesine aittir.

β-Glukozidazların mekanizması

β-Glukozidaz enziminin katalitik mekanizmasının ve aktif bölge topolojisinin aydınlatılması için birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda: pH bağımlılığı, inhibisyon, izotopik etki, floro şekerler ile temel amino asit etiketlemesi, deoksi substrat analogları ile reaksiyonlar ve bölgeye yönelik mutajenez yöntemlerine yer verilmiştir (Gopal *et al.* 2015). Bu enzimler, reaksiyon esnasında glikozit bağını hidroliz ederken ürün olarak açığa çıkan glikonun (β-D-glukoz şekeri) anomerik konfigürasyonunda değişiklik oluşturmazlar.

$$\beta - D - \text{glukozit} + H_2O \longrightarrow D - \text{glukoz} + \text{Alkol}$$

Glikozidik bağın enzimatik hidrolizi, bir proton donörü ve bir nükleofil/baz olmak üzere iki önemli rezidü gerektiren genel asit katalizi yoluyla gerçekleşir (Koshland 1953; Sinnott 1990). Bu hidroliz, anomerik konfigürasyonun ters çevrilmesi (inverting mechanism) veya tutulması (retaining mechanism) olmak üzere iki farklı mekanizma ile meydana gelebilir (Gebler *et al.*). Her iki mekanizmada da aktif bölgede bir çift karboksilik asite yer verilir (Whitaker *et al.* 2003). Bazı GH ailesine ait β-glukozidazlar ters çevirme mekanizmasını kullanırken, bazıları da tutucu mekanizma ile reaksiyonu gerçeklerştiriler.

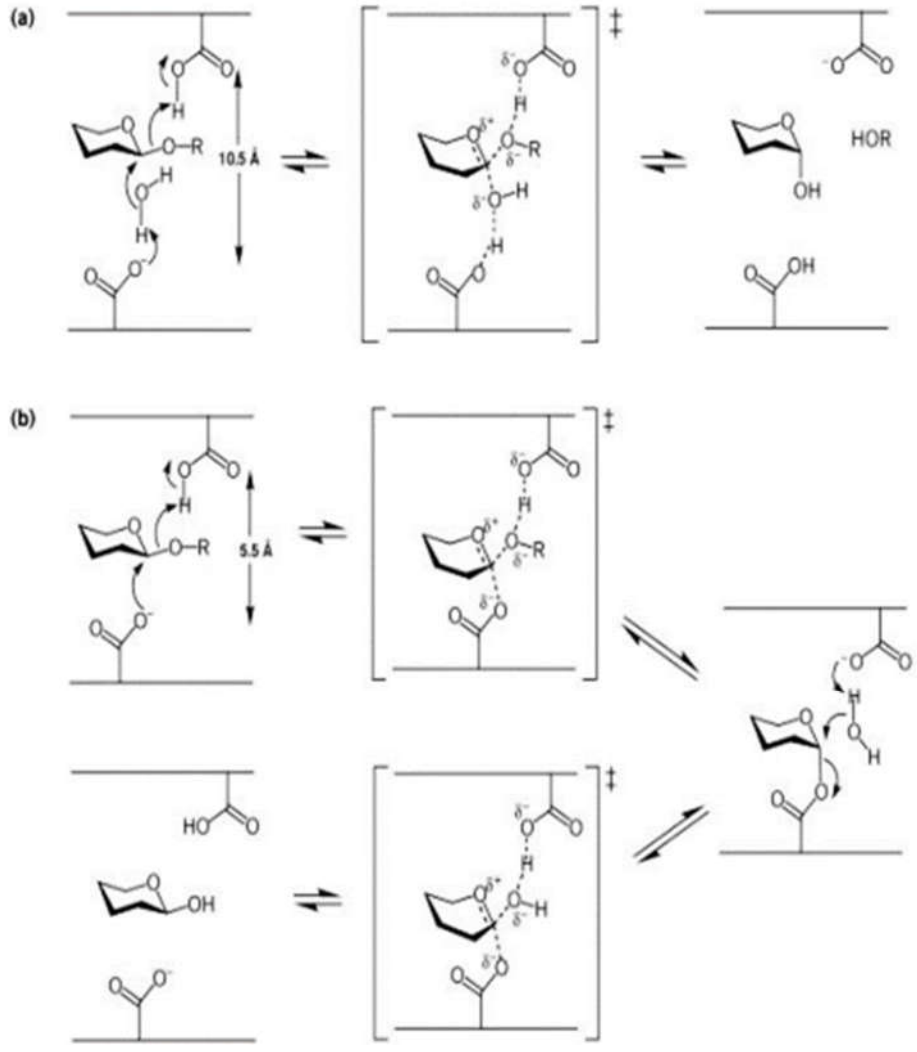
GH9 ailesine ait β-glukozidazlar, aktifleştirilmiş bir su molekülü ile aglikonu tek bir adımda yerinden çıkarmak için anomerik karbon üzerinde doğrudan bir nükleofilik atak yapan bir tersine çevirme mekanizmasını (inverting mechanism) kullanırlar (Şekil 4(a). Reaksiyonda ters çevrilen glukozidazdaki iki karboksil grup, substrat ve bir su molekülünün kendi aralarında bağlanmasına izin vermek için ortalama olarak yaklaşık 10,5 Å aralıkla uygun bir şekilde yerleşirler (Wang 1994).

Bunların yanında GH1, GH3, GH30 ve GH116 ailesine ait β-glukozidazlar, tutucu (retaining) β-glukozidazlardır ve anomerik merkezin tutulması ile substratlarını hidrolize ederler (Şekil 4(b)) (Koshland 1953). Bu enzimlerde, bir karboksil asit rezidüsü nükleofil görevi görürken diğeri asit/baz görevi görür ve her ikisi arasındaki mesafe de yalnızca 5 Å'dur (Davies *et al.* 1995; Cairns *et al.* 2010). Substratın enzim tarafından hidrolizi:

• Glikozilasyon basamağı (glukoz eklenmesi),
• Deglikozilasyon basamağı (glukoz kopması), olmak üzere iki adımda gerçekleşir.

Glikozilasyon basamağında nükleofilik karboksilik asit rezidüsü, substratın anomerik karbonuna atak yaparak aglikonu kararlı tutarken, asit katalizleyici karboksilik asit rezidüsü de glikozidik oksijenin protonlanmasını sağlar ve kovalent bağ oluşumuna katılarak glikozil-enzim ara ürünü oluşturur ve aglikon grubunu serbest bırakır (Henrissat *et al.* 2000; McCarter 1994).

Deglikozilasyon basamağında ise, anyon ve baz katalizleyici durumunda olan aktif merkezdeki ikinci katalitik karboksilik asit rezidüsü, H_2O'ya saldırır ve bir proton koparır. Bunun sonucunda oluşan OH, glikon ve enzim arasındaki kovalent bağa nükleofilik atak yaparak glikozidik bağı kırar ve glikonu (şekeri) serbest bırakır (Qi *et al.* 2008).



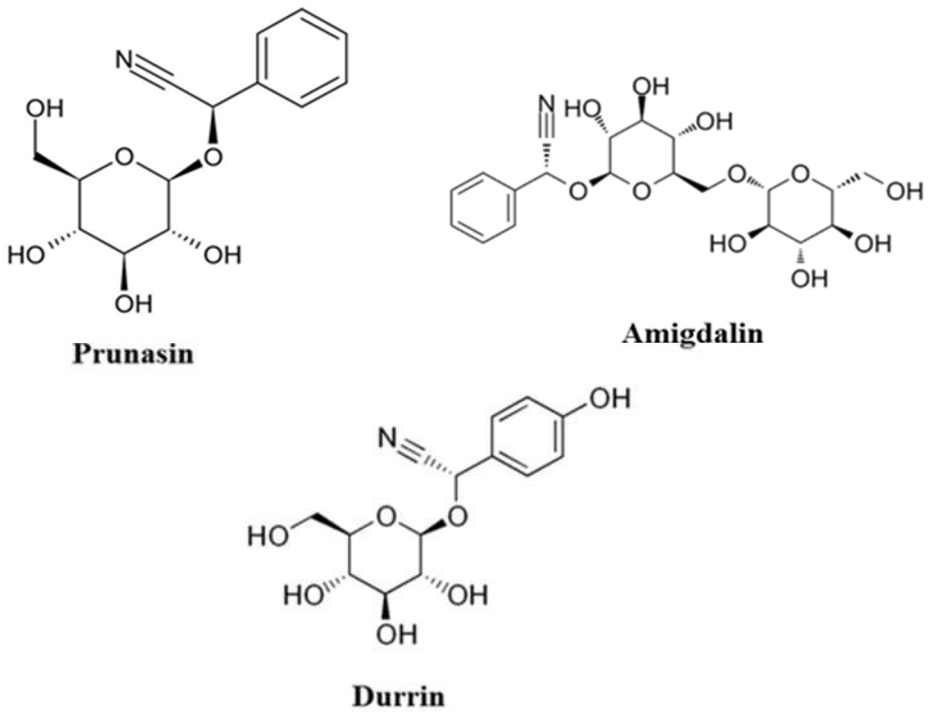
Şekil 4. (a) İnvört bir β-glukozidaz ve (b) retentant bir β-glukozidaz tarafından oluşan genel β-glukozidaz mekanizması (Zada *et al.* 2021)

β-Glukozidazın substrat özgüllüğü

Glikozil hidrolaz ailesinin önemli grubu olan β-glukozidazlar, çeşitli biyolojik ve biyoteknolojik işlemlerde önemli bir rol oynar. Doğada bol miktarda bulunan bu enzim

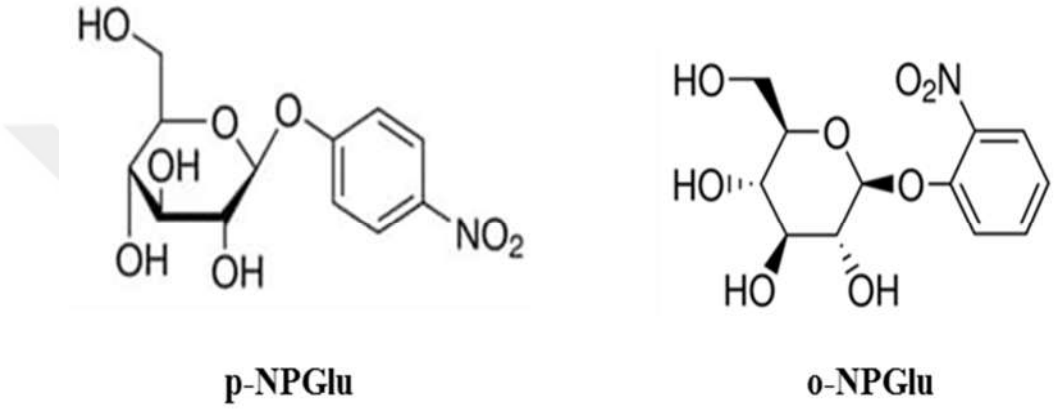
grupları, substratı tanıma ve bağlanma kabiliyeti açısından özgüllük gösterirler. Bitki hücre duvarındaki selülozun parçalanmasından sonra oluşan oligosakkaritler, bitki ikincil metabolizmasının glukozinolatları, siyanojenik mekanizmasının β-glukozitleri ve memeliler tarafından üretilen β-glukozit seramid ve steroid gibi ürünler β-glukozidazların doğal substratları olarak bilinir. β-glukozidazlar, oluşan bu doğal substratlara karşı oldukça spesifiktir. β-glikozidik substratın glikon (glukoz) kısmı, reaksiyon sonucunda herhangi bir değişime uğramadığı için genellikle substrat spesifikliğinin temeli aglikon olarak kabul edilir (Kim and Ma 2018).

β-glukozidazların etki ettiği substratlarda bulunan sabit monosakkarite (glikon) bağlı kimyasal grupların çeşitliliği, β-glukozidazların substrat çeşitliliğinin temelini oluşturur. Glukoz şekeri ile bağ yapan kısım oligosakkaritlerde ve disakkaritlerde olduğu gibi farklı bir glikon ya da glikokonjugatlarda olduğu gibi bir aglikon kısımdır. Bu aglikon kısım doğal substrat çeşitlerinden olan Linamarin'de olduğu gibi bir alkil grup veya DIMBOAGlc, Durrin ve Prunasin (Şekil 5) gibi doğal substratlardaki bir aril grup olabilir (Hösel 1982; Verdoucq 2004; Czjzek *et al.* 2000; Kakes 1993; Nahrstedt 1986). Doğal substratlar saf ve kolay elde edilebilir olmalarına rağmen enzim saflaştırması ve karakterizasyonu sırasında tercih edilmezler (Kaçıran 2020). Bunun aksine sentetik substratlar, *in vitro* koşullarda enzimlerin aktivitesini belirlemek ve karakterize etmek için yaygın olarak kullanılırlar (Czjzek *et al.* 2000).



Şekil 5. β -glukozidaz enziminin bazı doğal substratları

Yapay substratlar kullanılarak β-glukozidazların, enzimatik reaksiyon hızları ve enzimin substratla ilişkisi kolay bir şekilde analiz edilebileceği için biyokimyasal çalışmalarda sıklıkla kullanılır. Diğer yandan β-glukozidazların, bu substratları kantitatif ve kalitatif olarak hidrolize etme yeteneklerinin sınırlı olduğu belirtilmiştir (Kaçıran 2020). Bu yapay substratlar doğada, nitrofenil-glikozitler ve benzil gibi kromojenik yapıya veya metilumbelliferil-glukozlar gibi florojenik yapıya sahipler (Kim and Ma 2018; Cicek and Esen 1998). Bunun sonucu olarak enzim ile reaksiyona tabii tutulan substratın, reaksiyonu sonucunda oluşturduğu üründe ya renk değişikliği ya da ışıma gözlemlenmektedir. Şekil 6'da yapay substratların bazı örnekleri verilmiştir (URL-1).



Şekil 6. β-glukozidaz enziminin bazı yapay substratları. *p*-NPGlu (para-nitrofenil-beta-D-glukopiranozit), *α*-NPGlu (para-nitrofenil-alfa-D-glukopiranozit)(Kaçıran 2020).

β-Glukozidazların farklı organizmalardaki fonksiyonları

β-glukozidazlar bitkilerde, hayvanlarda ve mikroorganizmalarda bulunan ve canlılarda hem moleküllerin sentezi hem de parçalanma sürecini düzenleyen enzimlerdir. Bu enzimler canlıların yaşamları boyunca birçok temel biyolojik dönüşümlerde yer almaktadırlar. β-glukozidazlar bulundukları organizmaya ve organizmadaki işlevine göre farklılık gösterirler.

β- Glukozidazın memelilerdeki fonksiyonu

Memeliler, GH1 ailesine ait laktaz-floridzin hidrolaz ile sitoplazmik β-glukozidaz ve GH30 ailesine ait insan asiti (lizozomal) β-glukozidaz (GBA1 ve GBA2) ile safra asiti β-glukozidaz gibi birkaç β -glukozidaz grubu içerirler (Çavuşoğlu 2013; Arribas *et al.* 2000). Bu enzimler, diyet glikozitlerin ve glikolipidlerin metabolizmasında görev alırlar. Aynı zamanda, GH1 ailesine ait bir grup proteinin sinyalleşmede görev aldığı düşünülmektedir. Şu anda insanlarda varlığı bilinen beş GH1 protein tanımlanmıştır. Bunlar laktaz-floridzin hidrolaz (LPH), sitoplazmik β-glukozidaz, Klotho (α-Klotho, KL) β-Klotho (β-KL) ve Klotho-LPH (KLPH) proteinleridir. Bağırsak hidrolazı olan ve gıda sindiriminde rol oynayan LPH, hem

laktoza karşı β-galaktozidaz aktivitesi hem de floridzin gibi eksojen glikozitlere karşı β-glukozidaz aktivitesine sahiptir (Arribas *et al.* 2000). Yapılan incelemelere göre üzerinde en çok çalışması yapılan enzim, glukozil seramidaz fonksiyonundan sorumlu olan insan lizozomal (asit) β-glukozidazıdır (Çavuşoğlu 2013). İnsanda lizozomal (asidik) β-glukozidazların eksikliği ve lizozomlara taşınmaması, glikoseramidlerin doku lökositlerinin lizozomlarında birikerek şişmesiyle sonuçlanan ve otozomal resesif bir hastalık olan ‘’Gaucher” hastalığına yol açmaktadır (Grabowski *et al.* 1993). Bu hastalığın sonucunda bebeklerde zekâ geriliği, dalak ve karaciğerde büyümeler gözlemlenir. Tip 1 Gaucher Hastalığında uygulanan tedavinin asıl amacı makrofajlardaki oluşabilecek glikozil seramid birikimini önlemek ya da oluşan glikozil seramidleri hidroliz yoluyla dokudan temizlemektir (Çavuşoğlu 2013).

β- Glukozidazların böceklerdeki fonksiyonu

Böceklerin bir çoğunluğu bitkiler üzerinde hasar oluşturma potansiyeline sahiptir. Bu nedenle, böceklerin β-glukozidaz enzim sistemlerinin incelenmesinin hem bu enzimlerin genel yapı ve işlevleri hakkında önemli bulgular sağlayabileceğini hem de böceklerin bitkiler üzerinde oluşturduğu zararın kaynağının çözülebileceğini düşündürmüştür (Nam 2010). Yapılan araştırmalara göre böcek β-glukozidazlarının hem yararlarının hem de zararlarının olduğu gözlemlenmiştir (Zhang *et al.* 2012). Böceklerde bulunan bu enzimler, böceklerin daha çok sindirim sistemlerinde bulunan helisin, salisin, amigdalin ya da arbutin ve selobiyoz gibi β-glikozitleri hidrolizledikleri tespit edilmiştir (Nam 2010). Reilly ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, şeftali kurdundan elde edilen β -glukozidazın konağın siyanogenik β-glikozidini (prunasin) hidrolizleyebildiği ve bunun sonucu olarakta siyanür salınımını gerçekleştirebildikleri tespit edilmiştir (Reilly *et al.* 1987).

β-Glukozidazların bitkilerde fonksiyonu

Neredeyse tüm canlı organizmalarda bulunan β-glukozidazlar, canlılar için önemli birçok biyolojik süreçte görev almaktadır. Bundan dolayı bu enzimler, tarım ve ormancılık alanlarında, protein mühendisliğinde ve biyoteknolojik uygulamalarda sıklıkla çalışılmaktadır. β-glukozidazlar (özellikle GH1 aile enzimleri) bitki türlerinde biyolojik bazı mekanizmalarda rol almaktadır (Esen,1993). Bitkilerden elde edilen β-glukozidazların büyük bir kısmını β-O-glukozidazlar oluştururken, diğer bir kısmının β-S-glukozidazlar oluştuğu bilinmektedir. β-O-glukozidazlar incelendiğinde kendi içerisinde farklı gruplara ayrıldığı ve bu gruplardan birincisinin siyanogenik β-glukozitleri hidrolizleyebilen ve 3000’den fazla türde bulunan siyanogenik β-glukozidazlar olduğu, diğer grubun ise *Secale cereale* (çavdar), *Z. mays* ve *Triticum aestivum* (buğday) gibi bitki türlerinde bulunan ve hidroksamik asit β -glukozitlerini

(HxG) hidrolizleyebilen hidroksamik asit β-glukozidazlar olduğu bilinmektedir. Bitkilerde bulunan β-O-glukozidazların siyanogenik grupta olanları ilk defa 1837 yılında Wohler ve Liebig tarafından badem ağacından elde edilen amigdalini (siyanogenik β-D-gentiobiosid) hidrolizleyen enzimin açığa çıkarılmasıyla tanımlanmıştır (Esen 1993). Bu da enzimin siyanogenik özellikte olduğunu göstermiştir.

Yapılan çalışmalara göre bitkisel β-glukozidazların optimum pH 'sının 4.0 ile 6.0 aralığında olduğu saptanmıştır (Şener 2011). Bitki kaynaklı β-glukozidazlar, özellikle de GH1 ailesine ait enzimler, bitkilerde hücre duvarının parçalanması, savunma için oluşturulan siyanogenez mekanizması (toksik siyanür salımı) gibi bazı biyolojik süreçlere katılırlar(Gemici-Palabıyık 2004; Esen 1993; Jones 2000). Ayrıca bitkiler, giberellin, oksin ve sitokinin gibi birçok fitohormon glikozitleri sentezlerler (Han *et al.* 2012).

Bitki kaynaklı β-glukozidazların, bitki fitohormon glukokonjugantlarını ve aktif büyüme hormonlarını açığa çıkardığı gözlemlenmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda kısmen saflaştırılmış pirinç β-glukozidazlarının giberellin glukozitlerini hidrolize ettiği (Henrissat 1991), mısır β-glukozidazın, sitokinin β-glukozitlerini hidrolize ederek aktive ettiğini göstermiştir (Brzobohatý 1993).

Bitkiler, kendilerini çevresel stres koşullarından ve kendisinde herhangi bir hasar oluşturabilecek etkenlerden korumak için savunma sistemleri geliştirir. Bu sistemler için kimyasal toksik maddeleri hücrelerinde biriktirir ve herhangi bir saldırı anında aktive olan savunma glikozitleri içerirler (Han *et al.* 2012). Bu savunma glikozitleri, toksik bileşiklerin salınması için onları hidrolize eden β-glukozidaz enzimlerinden farklı bir hücre veya farklı bir hücresel bölmede bulunurlar. β-glukozidazlar genellikle bitkilerin apoplast veya plastid kısımlarında depolanma eğilimi gösterirken, savunma bileşikleri (β-glukozitler) vakuolde depolanır.

Beyaz yonca üzerinde yapılan bir çalışmada, bu bitkinin siyanür gibi toksik bileşikleri salan glikozitler içerdiği ve bu kimyasal bombaların (siyanür) serbest bırakılması için β-glukozidazların kullanıldığı görülmüştür. *Arabidopsis thaliana* üzerinde yapılan bir çalışmada β-glukozidaz genleri NaCl tuzu ile baskılanarak enzim ekpresyonu engellenmiş ve bunun sonucunda bitkide savunma yetersizliğine bağlı olarak bazı streslerin ortaya çıktığı gözlemlenmiştir (Piao 2000). Ayrıca bitkiler tarafından üretilen izoflavonların kimyasal savunmada görev aldığı da bilinmektedir.

β-Glukozidazların mikroorganizmalardaki fonksiyonu

Mikroorganizmalar, gezegenimizde evrimleşmiş en basit ve ilkel yaşam sistemlerine sahip canlılardır. Bakteri, arkea ve mantar gibi mikroorganizmaların tüm formlarında β-glukozidazın varlığı tespit edilmiştir. Bu canlılardan elde edilen β-glukozidazlar üzerinde birçok araştırma yapılmıştır. Yapılan bu araştırmaların çoğu, enzimin endojen işlevinden ziyade endüstriyel uygulamalarına odaklanmaktadır. Doğal işlevleri bakımından incelenen β-glikozidazların çoğu, bitki biyokütlesinden glukoz üretmek için biyodönüştürmede (besin alımı için selüloz ve diğer karbohidratların parçalanması) ya da patojenik veya simbiyotik ilişkiler kurmak için bitkilerin hücre duvarlarının parçalanmasında rol oynadığı saptanmıştır (Gilbert *et al.* 2008). Bu enzimler farklı mikroorganizmalarda incelendiğinde, bakteriyel β-glukozidazların, selülozom adı verilen büyük komplekslerin bileşenlerinden biri olduğu ve selüloz yüzeyi, hücre zarı ve kompleksi lokalize etmek için karbohidrat bağlayıcı proteinler ve polisakkarit parçalayıcı endoglukanazları içerdiği görülmüştür. Alternatif olarak, bazı mikroorganizmalar, eksoglukonazlar/ β-glukozidazlar dahil olmak üzere, bu işlev için çözünür endoglukozidazlar ve ekzoglukozidazlar salgılarlar (Ketudat and Esen 2010). Aslında bakteriler ve mantarlardan elde edilen β-glukozidazlar, esas olarak selülaz enzim sisteminin bir parçası olduğu ve kısa zincirli oligosakkaritlerin ve selobiyozun glukoza hidrolizinde hız sınırlayıcı bir basamaktan sorumlu olduğu bilinir (Doi 2004; Isorna *et al.* 2007). Ortamdaki glukoz zincir uzunluğu arttıkça selülozu parçalayan enzimlerin aktivitesi azalır (Bhatia *et al.* 2002).

Toprak mikroorganizmalarından elde edilen β-glukozidazlar, toprak organik madde döngüsündeki merkezi rolü nedeniyle toprak kalitesinin korunmasına katkıda bulunur. Ayrıca arkeler, yüksek sıcaklıkdaki endüstriyel uygulamalarda fonksiyonel kararlıklarını koruduğu için endüstriyel enzimler arasında en iyi kaynak olarak kabul edilir (Li *et al.* 2013).

β-Glukozidazların endüstriyel kullanım alanları

Biokitle dönüşümü

β-glukozidazlar, biyoteknolojik uygulamalar da yüksek hidrolizleme potansiyellerinden dolayı büyük ilgi görmektedirler. Özellikle selobiyoz mekanizmasında görev alan ve selülozun glukoz ve alkole kadar hidrolizinden sorumlu temel enzimlerdir (Kosugi 2004). Lignoselülozik biyokütleden biyoetanol üretiminde görev alırlar (Salgado *et al.* 2018; Salehi *et al*. 2015). Selülozlar doğada en çok bulunan ve bütün bitki hücrelerinin ana yapısal elemanını oluşturan organik moleküllerdir. Polisakkaritler arasında bulunan bu selülozlar yeryüzünde en geniş yenilenebilir karbohidrat kaynaklarını oluştururlar. Ancak canlıların çok az bir grubunun (selülotik mikroorganizmalar) selülozu kullanabilmesi ve son yıllarda artan sıvı yakıt

gereksinimi nedeniyle, bu bileşiğin glukoza indirgenmesi endüstriyel boyutta önem kazanmış ve selüloz içeren maddeler mikrobiyolojik süreçlerle çeşitli kimyasallara dönüştürülmüştür. Bunun yanında selülotik maddeler içeren endüstriyel, tarımsal ve kentsel atıkların bu şekilde kullanılması çevre kirliliğinin azalması yönünde araştırmacıları düşündürmüştür. 19. yy. başlarından itibaren günümüze kadar selüloz üzerinde birçok çalışma yapılmıştır (Akmaz 2001). Araştırmacılar ilk olarak selüloz hidrolizinin asit ile oluşabileceğini gösteren çalışmalar yapmıştır. Sonrasında bu yöntemin hem maliyetli olması hem de hidroliz süreçlerinde kullanılan donanımlarda karşılaşılan korozyon ve asitli ürünlerin çevreye zarar vermesi, araştırmacıların bu yönteme olan talebini azaltmıştır. Bundan dolayı araştırmacılar selülozu parçalayabilmek için yeni bir yöntem arayışına yönelmiştir. Son yıllarda meydana gelen hızlı gelişmeler, selülozun enzimatik yol ile glukoz ve alkole dönüştürülmesi, maliyeti büyük oranda düşürmüş ve bu yöntemin daha etkili ve daha hassas olduğunu göstermiştir. Selulotik organizmalar tarafından salgılanan selülaz enzimi, glukozil hidrolaz ailesinin bir üyesidir. Birçok selülaz sistemi kimyasal olarak basit yapıdaki bir substratın β-1,4 glukozidik bağlarının hidrolizlenmesinde sorumludur. Bu selülaz enzim sistemi;

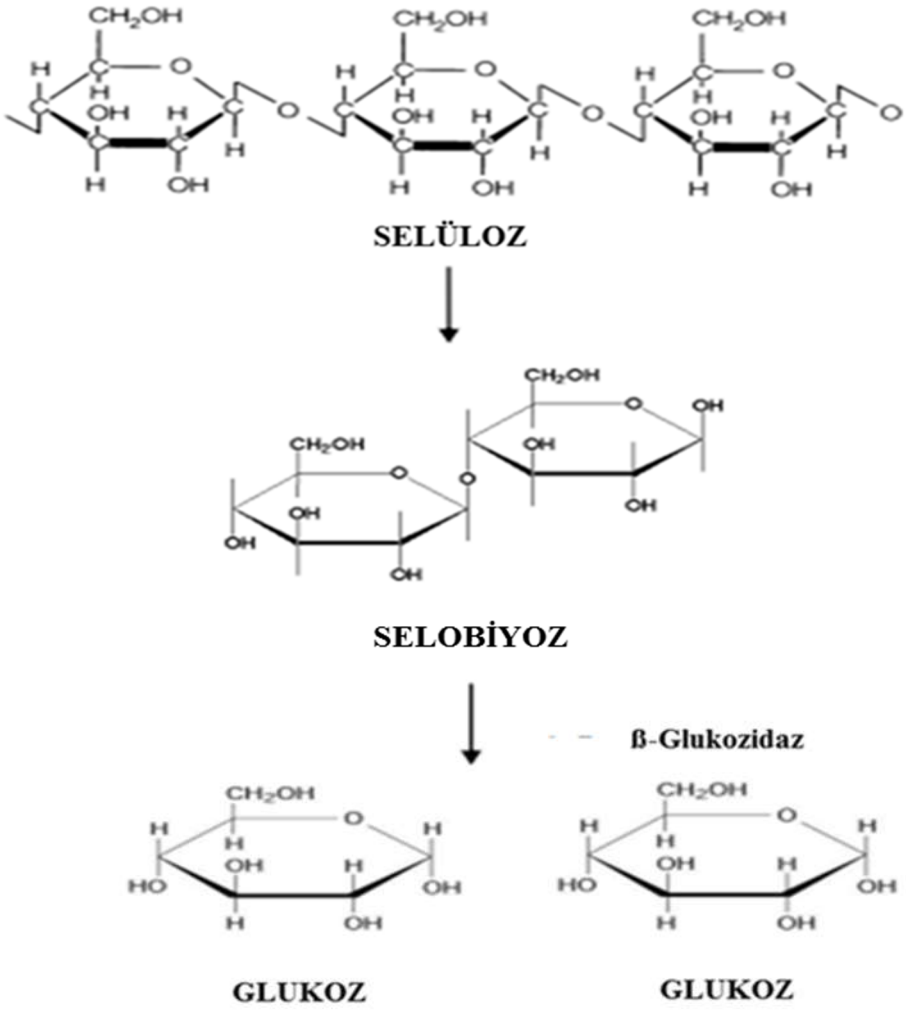
- Ekzo-β-1,4 glukanazlar (Selobiyohidrolazlar)
- Endo-β-1,4 glukanazlar (Endoglukanazlar)
- β-glukozidazlar olmak üzere üç gruptan oluşur (Bhat and Bhat 1997).

Endo-β-1,4 glukanazlar selülozun iç kısmında bulunan (genelde amorf bölgeden) β-1-4 glikozidik bağlarını keserek yeni zincir uçlarının oluşmasını sağlarlar. Tepkime sonrasında son ürün olarak olisakkaritler oluştururlar. Bazı Endo-β-1,4 glukanazlar sahip oldukları oyuklar (holes) vasıtasıyla polimeri kavrayarak hidrolizleme işlemini gerçekleştirirken, diğerleri ise selüloz bağlayıcı modüller (CBM, Cellulose Binding Modül) aracılığıyla, selüloz polimerlerine bağlanarak hidrolizleme işlemini gerçekleştirir. Bu grubun gösterdiği aktivite diğerine göre daha yüksektir (Lynd *et al.* 2002).

Ekzo-β-1,4 glukanazlar, Endo-β-1,4 glukanazlar tarafından oluşan bu yeni selüloz zincirlerini (ürün) uçlarından keserler ve son ürün olarak çözünür selobiyoz polimerlerini oluştururlar. Bu enzimlerin iç kısımlarında tünele benzeyen bir boşluk bulunur. Bu boşluk yeni zincirlerin uçlarını içine alarak aktivite gösterirler (Lynd *et al.* 2002). Son olarak β-glukozidazlar ise Ekzo-β-1,4 glukanazlar tarafından serbest bırakılan selobiyozu hidroliz ederek glukoz ürününü oluştururlar (Şekil 7) (Beguin 1990).

β-glukozidazlar, selülozun enzimatik hidrolizi sırasında genellikle hız sınırlayıcı bir faktör olarak rol oynar ve glukoz inhibisyonuna çok duyarlı enzimlerdir. Selülaz üreten çeşitli filamentli mantar türlerinde selülozun glukoza dönüştürülmesinde, selülazı oluşturan üç

enzimin bulunduğu ve optimum koşullarda gerçekleştiği saptanmıştır. Burada hız sınırlayıcı basamağın, bir β-glukozidaz olduğu ve bu enzimin aktivitesinin de glukoz tarafından engellenebildiği belirtilmiştir. *Thrichoderma reesei* mantarından elde edilen β-glukozidazlar ortamda ürün olarak oluşan glukoz ile inhibe olurken (glukoza duyarlı), *Aspergillus* türlerinden elde edilen β-glukozidazların ortamdaki glukozdan etkilenmediği (glukoza duyarsız) görülmüştür (Lynd 2002; Jäger *et al*.2001). Selülotik enzim sistemi incelendiğinde her bir grubun K_m noktasının farklı olduğu görülmüştür.



Şekil 7. Selüloz'un hidroliz şeması (Lynd 2002)

Günümüzde ticari olarak kullanılan selülotik enzimler *Aspergillus* ve *Trichoderma* mikroorganizmaları tarafından elde edilmektedir. *Trichoderma reesei* mantarından elde edilen selülazlar ticari olarak büyük öneme sahiptir ve üzerinde yoğun olarak çalışılmaktadır. Enzim tarafından hidrolizi gerçekleştirilen bu yöntemler, daha hızlı, ekonomik, ürün verimi oldukça yüksek ve çevre dostu olduğundan, kimyasal yöntemlere oranla daha fazla ilgi gördüğü bilinmektedir (Person 1991).

Lignin biyosentezi ve kâğıt kalitesi

Lignin, kimyasal yapısı bakımından diğer odunsu makromoleküllerden oldukça farklı olan ve selülozdan sonra biyosferde en fazla bulunan amorf bir polisakkarittir. Lignini oluşturan yapılar, diğer makromoleküllerin yanısıra birbirlerine sistematik olarak bağlanmazlar. Yapılan bazı çalışmalar ile bütün ligninlerin yapı taşlarının, koniferil alkol, p-kumaril alkol ve sinapil alkol olduğu kanıtlanmıştır (Şeki 8) (Hatfield 2001).



Şekil 8. Lignin'in yapı taşları (Hatfield 2001)

Lignin oluşumunda en önemli öncül madde olan koniferil alkol, koniferin molekülünün β-glukozidaz tarafından hidroliz edilmesiyle açığa çıkan üründür (Leah 1995). Bu olay da beta-glukozidazların lignin biyosentezinde görev aldıklarını ortaya çıkarmaktadır (Dharmawardhana 1995). Dharmawardhana ve arkadaşaları tarafından yapılan bir çalışmada, *Pinus contorta* bitki türünden elde edilen β-glukozidazların lignin biyosentezinde sorumlu olmalarından dolayı, bu enziminlerin ağaçların dayanıklılığını artırabileceği ve bu ağaçlardan elde edilecek olan kağıtların kalitesini etkileyebileceği ileri sürülmüştür.

Besin kalitesinin iyileştirilmesi

Bitkilerde tat ve lezzet oluşumunda sorumlu birçok β-glikozidik ürünler ve bu ürünlerin aromatik bileşiklerinin artırılmasında önemli rol oynayan β-glukozidazlar tesbit edilmiştir. β-glikozidik ürünlerin aglikon parçalarının besin oluşumu ve kalitesi üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Fakat bu aglikon parçalarının ortaya çıkabilmesi için β-glukozidik substratların, β-glukozidaz enzimleri tarafından parçalanması gerekmektedir.

β-glukozidaz enzimlerinin sahip olduğu bu özellik, enzimin meyve suyu ve meşrubat ürünlerinin kalitelerinin artırılmasında kullanılmasına olanak sağlamıştır. Meyve suyu ve meşrubat üretimi esnasında ortama β-glukozidazların eklenmesinden sonra, ürünlerin tadında, aromasında ve kalitesinde artış alduğu bilinmektedir (Acar 2013). Turunçgil ürünlerinden elde edilen limonoid aglikonlar ve limonoid glikozitler üzerinde yapılan bir çalışmada, limonoid aglikonlarının, meyvenin olgunlaşması esnasında glikozile olması sonucu limonoid glikozitleri

oluşturdukları ve Limonoid aglikonlarının sebep olduğu acılığın giderildiği bildirilmektedir (Fong *et al.* 1993; Ozaki *et al.* 1992).

Mikrobiyal β-glukozidazlar, meyve suyu ve fermente ürünlerde bulunan glikozidik substratlardan aromatik bileşenlerin (aglikon) açığa çıkmasında rol oynayan temel enzimlerdir. Bundan dolayı, bu enzimler iyi tanımlanmış ve bunların birçoğu biyoteknolojik süreçlerde kullanılmaktadır. Üzümdeki linalol, geraniol, nerol, sitronelo ve monoterpenoller gibi diglukozid moleküllerin, şaraba tadını verdiği bilinmektedir (Gunata *et al.* 1985). Şarap yapımı uygulamarında, üzümlerdeki glikozit ürünlerin hidrolizlenmesinde, mantar kökenli glukoz-toleranslı β-glukozidazların kullanımasının şaraba özgü tadı verdiğini ve kalitesini artırdığını göstermiştir. (Spagna *et al.* 2002; Gonzalez Pompa 2011; McDonald *et al*. 1998).

Bitkilerde varlığı kanıtlanmış birçok farklı β-glukozidik tat molekülleri bulunmaktadır. Bu moleküllerin aglikon kısımlarının şikimat ve mevalonat biyosentez süreçlerinin ürünleri olduğu ve β-glukozidazların da bitkilerde bulunan bu molekülleri hidrolizleyebildikleri kanıtlanmıştır (Winterhalter and Skouroumonis 1997).

Yapılan bir çalışmada β-glukozidaz (BG), silika ve amin grupları (SiO_2-NH_2) ile bifonksiyonelleştirilmiş nano-manyetik demir oksidin yüzeyinde immobilize edildi. Çay çorbasında BG'nin aroma ve flavonoid aglikon artırıcı etkisi araştırıldı. İmmobilize edilmiş BG sentezlenmiş nanokompozit morfolojisi ve yapısı, fourier dönüşüm kızılötesi (FTIR) spektroskopisi ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) dâhil olmak üzere farklı analitik teknikler kullanılarak karakterize edildi. Yeşil çay ve siyah çay çorbasında immobilize edilmiş-BG tedavisi, aroma içeriğini sırasıyla yaklaşık %16 ve %48 oranında artırdığı, ayrıca mirisetin ve kuersetin gibi flavonoid aglikonlar, yeşil çay ve siyah çay çorbasında sırasıyla yaklaşık 6 ve 5 kat arttığı gözlemlendi. Bu sonuçlar, immobilize edilmiş BG'nin aromanın artırılmasında mükemmel bir potansiyel gösterdiğini ve çay çorbasında flavonoid aglikonları serbest bırakmak için flavonoid glikozitleri etkili bir şekilde hidrolize ettiğini gösterdi (Yang 2019).

İnsan sağlığı ve ilaç üretimi

Nadir görülen bir hastalık olan Gaucher, β-glukozidaz enziminin eksikliğinden dolayı oluşan ve fenotopik olarak dokularda glikoseramid birikmesiyle ortay çıkan hastalıktır. Tedavi olarak uygulanan enzim replasman yönteminde, insanda lizozomal (asidik) β-glukozidazlar, memeli ve böcek hücrelerinde rekombinant olarak üretilir. Daha sonra insan hüclerine verilerek orada aktif hale gelmesi sağlanır ve enzimin yapısı kararlı hale geçer (Dvir 2003). Yapılan bu çalışmalar sonucunda insan lizozomal (asit) β-glukozidazın rekombinant olarak üretilmesi ve Gaucher hastalığında kullanılması nedeniyle farmakolojik ve biyoteknolojik açıdan büyük bir

öneme sahip olduğu görülmektedir (Barton 1990). Bunun yanında antikanser, antimikrobiyal ve antioksidan özelliğine sahip polifenolik bileşiklerin etki seviyelerini artırmak amacıyla β-glukozidaz enziminin kullanılması farmakolojik uygulamalarda popüler hale gelmiştir.

β-Glukozidazların antioksidan etkileri

β-glukozidazların antioksidanlar üzerindeki etkisi incelendiğinde karşımıza birçok çalışma çıkmaktadır. Bu çalışmalar enzimin antioksidan etkisinden daha çok flavonoid bileşiklerin ortamdaki etkisini arttırmaya veya flavonol birikimini çoğaltarak antioksidan seviyesini arttırmaya aracı olmaktır. Ortamda aşırı miktarda β-glukozidazın olması antioksidan flavonollerin ve abiyotik stresin birikmesine neden olmaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda flavonol birikiminin abiyotik stres koşulları sırasında reaktif oksijen türlerinin birikimini azalttığı görülmüş ve β-glukozidaz enzimlerinin daha çok bitki sekonder metabolitlerinin deglikozilasyon süreçlerine katılarak antioksidan etkilerini artırmaya yönelik çalışmaların olduğu ve deglikozilasyon sonrasında oluşan ürünün ortamdaki serbest radikaller ile bağ yaparak oksidan etkisini azaltacağı veya yok edeceği düşünülmüştür. Normal şartlarda antioksidan etkisine sahip bu metabolitlerin, enzim ile reaksiyon sonucunda antioksidan etkilerini artırdığı görülmüştür. Antioksidan kapasitesi üzerine β-glukozidaz enziminin etkisini araştırmak amacıyla dut yaprağı ekstraktında (MLE) bulunan kuersetin-3- β-D-glukoz (QT-G) bileşiği enzim ile hidrolize edilerek kuersetine (QT) dönüştürülmüştür. Antioksidan kapasitesi üzerindeki etkisi, oksijen radikal absorbans kapasitesi (ORAC) ve hücresel antioksidan kapasite (CAC) testi kullanılarak yapılmıştır. Sonuç olarak *in vitro* peroksil radikali ve hidroksil radikali süpürme kapasitesinin enzim tedavisinden sonra önemli ölçüde arttığı gözlemlenmiştir (Kim and Jang 2010). Yapılan başka bir çalışmada laktik asit bakterileri (LAB) tarafından üretilen β-glukozidazın, fermantasyon sırasında flavonoid aglikon konsantrasyonunu artırarak fermente gıdaların antioksidan kapasitesini artırdığı gözlemlenmiştir (Rizzello *et al.* 2013; Xiao *et al.*2015).

Lee ve diğerleri soğanda bulunan flavonoid glikozitlerin farklı NaCl konsantrasyonları ile *Leuconostoc mesenteroides* tarafından fermantasyonu sırasında flavonoid kompozisyonu ve antioksidan aktivitedeki değişimi araştırmış ve sonucunda fermantasyon esnasında *Leuconostoc mesenteroides* tarafından üretilen β-glukozidaz enziminin flavonoid glikozitleri hidrolizi sonucu antioksidan seviyelerinin arttığını, ancak NaCI eklenmesi durumunda enzimin inhibisyonuna dayalı antioksidan etkinin azaldığını tespit etmiştir (Lee 2016).

Greyfut kabuğu gibi gıda atıkları üzerinde antioksidan aktiviteye sahip biyoaktif bileşikler bulunur. Greyfut kabuğunda bulunan antioksidan maddeler üzerine *A. niger*'den elde edilen β-glukozidazın etkisini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada, enzimatik tedaviden

sonra DPPH ve FRAP test sonuçları, greyfurt kabuğu ekstresi antioksidan aktivitesinde önemli bir artış gösterdiği, sonuç olarak enzim hidrolizinden sonra daha güçlü antioksidan aktiviteye sahip üretilen ekstrakt, doğal ve düşük maliyetli bir antioksidan olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Karami *et al.* 2022).

β-glukozidaz hidrolizi ile desteklenen darbeli elektrik alanının (CPEF)) ginseng kök ekstraksiyonunun biyoaktif bileşenler üzerindeki antioksidan kapasitesi değerlendirildi. Ginseng kökünden elde edilen maksimum toplam ginsenosid içeriği, ısı geri akış ekstraksiyonundan (HRE) daha yüksek olan CPEF işlemiyle 38,15 mg/ml'ye ulaştı. HRE ve darbeli elektrik alanı (PEF) işleme ile karşılaştırıldığında, CPEF ekstraksiyonu daha fazla toplam polifenol (18,55 mg/ml), flavonoid (19,94 mg/ml) ve toplam şeker içeriği (47,35 mg/ml) içeriyordu. CPEF işleme, daha yüksek DPPH ve ABTS radikal süpürme aktiviteleri gösterdiği, ayrıca ginseng ekstraktlarından FRAP aktivitesini artırmıştır. CPEF ile muamele edilmiş ginseng kök yapısının morfolojisi, yapısal bütünlük bozulması için kanıt sağlayan taramalı elektron mikroskobu ile araştırılmış. Sonuçlar uygun yoğunlukta CPEF işleminin biyoaktif içerik ekstraksiyonu üzerinde büyük bir potansiyele sahip olduğunu göstermiştir (Lu 2020).

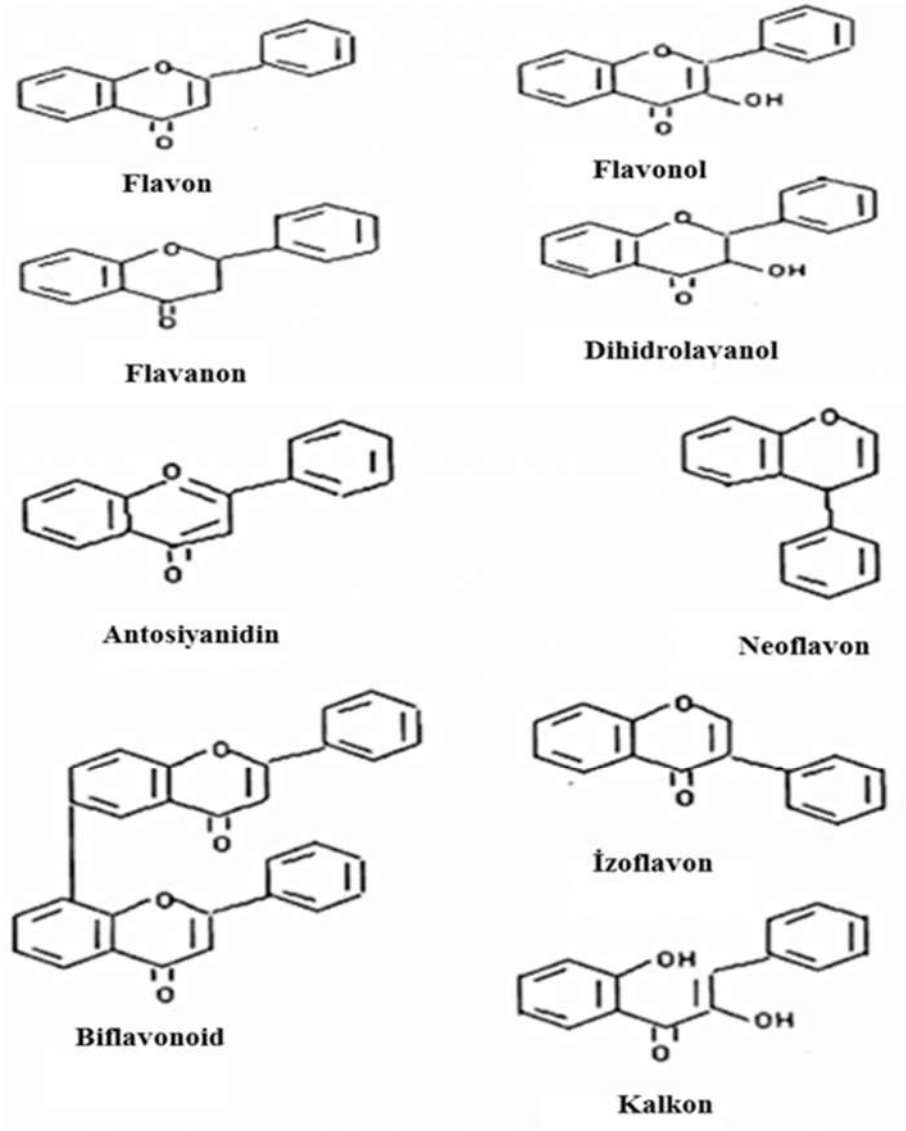
Ana ginseng yaprağı saponinleri üzerinde yapılan bir çalışmada Ginseng yapraklarından elde edilen üç farklı ginsenoid (Rg1, Re ve Rd) rekombinant β-glukozidaz enzimi (bgp1), ginsenosidlerin C-20 pozisyonuna bağlı tüm glukoz kısımlarını hidrolize ederek farmakolojik olarak daha aktif olan minör ginsenositlere dönüştürüldü. Dönüştürülen ürün, farmakolojik olarak aktif minör ginsenosidler (Rh1, Rg2, Rg3) 3T3-L1 adiposit hücre hattı üzerindeki etkileri araştırmak için kullanıldı. Sitotoksisite testi, 100 μg/ml'lik bir konsantrasyonda kullanıldığında bile herhangi bir toksisite göstermediği, adipogenezin, biyo-dönüştürülmüş yaprak saponinine yanıt olarak doza bağlı bir şekilde azaldığını göstermiştir (Huq *et al.* 2016).

Fenolik bileşikler (Doğal antioksidanlar)

Fenolik bileşikler (doğal antioksidanlar) bitkilerdeki önemli aromatik sekonder metabolitlerdir. Bu bileşikler sebze ve meyve gibi gıdalarda sıklıkla bulunur ve rutin olarak beslenme ile birlikte tüketilirler (Boudet 2007). Polifenolik bileşikler ise birden fazla fenolik bileşiğin bir araya gelmesiyle oluşan ve doğal antioksidanların en önemli grubunu oluşturan bileşiklerdir (Singleton and Rossi 1965).

Polifenoller, bir veya daha fazla hidroksil grubunun bağlı olduğu en az bir aromatik halkaya sahip bileşiklerdir ve flavonoidler ve flavonoid olmayanlar olarak iki gruba ayrılırlar (Crozier *et al*.2006; Rodriguez-Mateos *et al*. 2014; Boudet 2007). Flavonoidler, üç karbonlu bir köprü ile birbirine bağlanan iki aromatik halkaya sahip, 15 karbon içeren ortak bir karbon

iskeletine sahip polifenolik bileşiklerdir ve karbon iskeletine bağlı gruba göre flavonoller, flavonlar, izoflavonlar, flavanonlar, antosiyanidinler ve flavanollere olacak şekilde alt grublara ayrılırlar (Kahraman *et al.* 2007) (Şekil 9). Flavonoidlerin birçoğu doğal olarak aglikonlardan ziyade glikozitler halinde bulunurlar (Şekil 9).



Şekil 9. Bazı Flavonoidlerin iskelet yapısı (Kahraman *et al.* 2007)

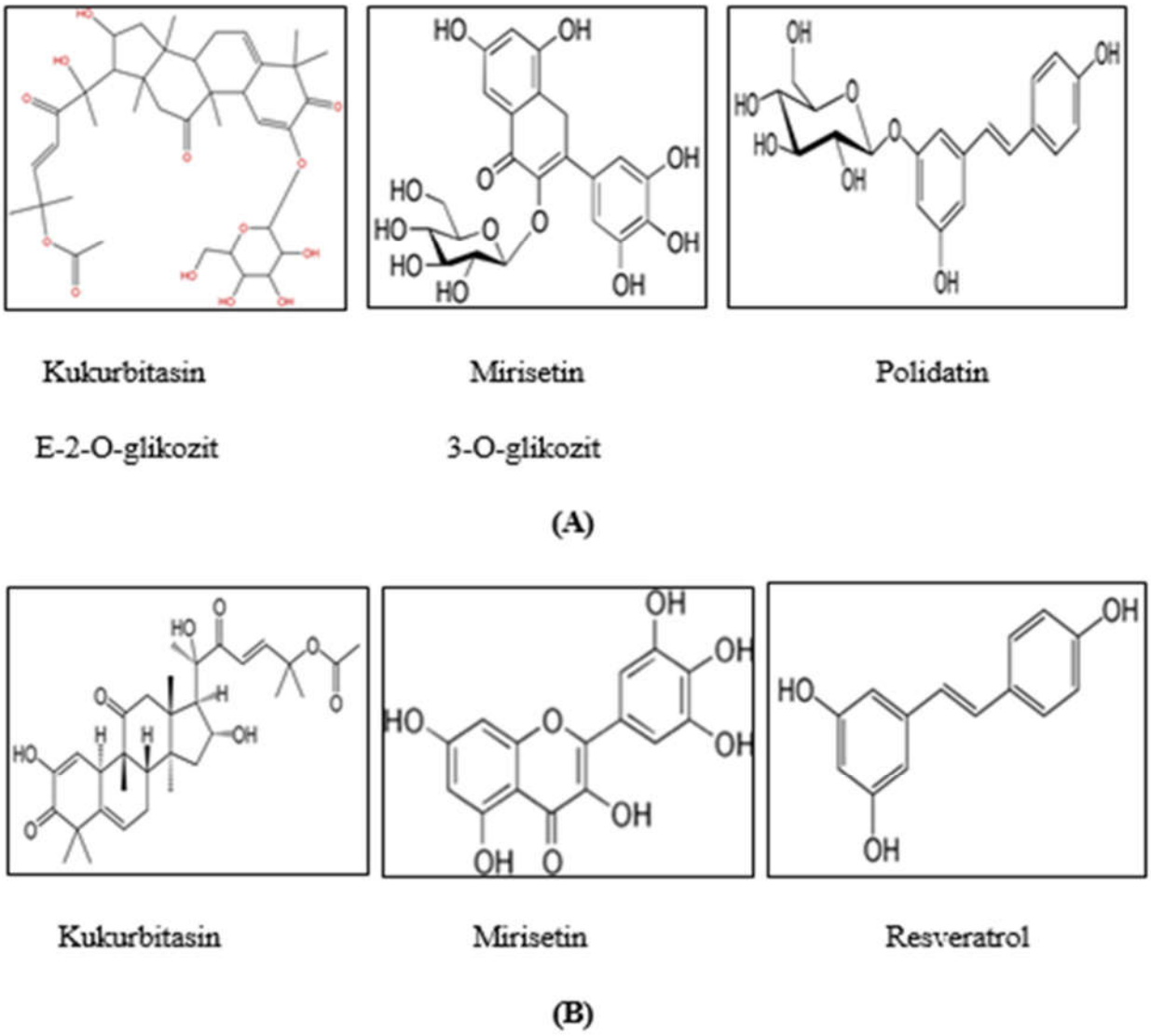
Polifenolik bileşikler, çeşitli hastalıklarla ilişkili olan serbest radikalleri temizleme yeteneğine sahiptir ve bu nedenle son zamanlarda antioksidan işlevi uygulamarın da çok ilgi görmektedirler (Souza 2008). Sağlık sorununa sebep olan bu serbest radikaller kimyasal ve radyasyon hasarının bir sonucu olarak ortaya çıkabileceği gibi, aynı zamanda normal olarak solunum, diğer hücresel aktiviteler ve mikrobiyal savunma (ROS) sırasında da oluşabilirler. Serbest radikaller, en dış katmanındaki elektron sayıları tamamlanmadığı için kararsızdırlar ve son derece reaktif kimyasal moleküllerdir. Bu radikaller proteinler, lipidler ve nükleik asitler

ile reaksiyona girerek insan vücudunda kanserojen ve kronik dejeneratif süreçlere neden olabilirler (DeGraft 2007; Del Rio 2013).

Polifenolik bileşikler, sahip oldukları çok sayıda çift bağ ve hidroksil grubu ile serbest radikallere elektron verip bağ yaparlar. Bunun sonucunda serbest radikalleri stabil hale getirip oksidan etkilerini ortadan kaldırırlar. Bunu yaparken de kalp hastalıkları riskini, kanser gelişimini ve dejeneratif hastalıklardan sorumlu hücrelerde yaşlanma sürecini yavaşlatır veya ortadan kaldırırlar (Flora 2009; Machlin 1987). Ayrıca birçok polifenolik bileşiğin antioksidan, antikanserojenik, antimikrobiyal, antialerjik, antimutajenik özelliklerinin varlığı da kanıtlanmıştır (Eberhardt *et al.* 2000; Kim *et al.* 2000: 1998; Kawaii *et al.* 1999; Cao and Cao 1999; Wataru *et al.* 1991; Lee and Lee 2006).

Son yıllar da 6500'den fazla polifenolik bileşik tanımlanmıştır. Mirisetin 3-O- glikozit, Polidatin ve Kukurbitasin 2-E-O-glikozit, polifenolik bileşiklerin örnekleridir ve sağlık üzerindeki olumlu etkilerinden dolayı çok sayıda gıda endüstrisi tarafından aglikon formlarında gıda takviyesi olarak satılırlar (Güven 2010). Bunlar içinden Polidatin bitkilerden ekstrakte edilir ve daha sonra resveratrol'e deglikozillenir. Ayrıca deglikozilasyon için de enzimatik yöntemler tercih edilir. Geleneksel Çin tıbbının bir bileşeni olan resveratrol insan sağlığı üzerinde faydalı etkilere ve modern tıpta uygulama için antikanser, kardiyo koruyucu ve antiinflamatuar aktiviteleri içeren birçok farmakolojik özelliğe sahiptirler (Sahu *et al*. 2013; Huige 2012; Zhou *et al.* 2022; Li *et al.* 2012). Bunun yanında yapılan araştırmalarda kukurbitasinlerin (Kukurbitasin 2-E-O-glikozit bileşiğinin hidrolizi sonucu oluşan ürün) hem sitotoksik hem de antikanserojen etkiye sahip olduğu, birçok kanser türünün gelişimini inhibe ettiği, kanser hücreleri için antiproliferatif olduğu belirtilmiştir (Rios *et al.* 2005). Kukurbitasinlerin özellikle *E. elaterium'da* cucurbitaceae (kabakgiller) familyası tarafından üretildiği ve bunlar arasında başlıca kukurbitasin D, E ve I'nın antitümör aktiviteleri ve sitotoksik etkileri test edilmiştir. Sonuç olarak kukurbitasin B, D, E ve I'nın insan karsinoması hücre hatlarına (HeLa) ve insan nasofarinks kanseri hücre hatlarına karşı kuvvetli sitotoksik aktivitesi bulunduğu belirtilmiştrir (Helena, 2017; Rios *et al.* 2005; Attard *et al.* 2005; Halaweish 2011; Greige-Gerges 2017). Meyve suyu ve üzüm şarabı gibi endüstriyel gıdalarda doğal olarak oluşan mirisetin fenolik bileşiğinin (Mirisetin 3-O-glikozit bileşiğinin hidrolizasyonu sonucu oluşan ürün) antioksidan, sitoprotektif etki, antikanserojen ve antimikrobiyal özellikler ve antiplatelet aktiviteleri dahil olmak üzere sağlık açısından birçok yararlı etkileri gösterilmiştir (Shimmyo 2008; Kang *et al.* 2011). Chang ve grubunun yapmış olduğu bir çalışma da, yüksek yağlı diyetle (HFD) beslenen sıçanlarda diyet mirisetinin vücut ağırlığını azalttığı ve kan lipid profilini iyileştirdiği gözlemlenmiştir (Chang *et al.* 2012; Ong

2000). Bunun yanında mirisetin, insüline dirençli yüksek fruktoz diyetiyle indüklenen diyabetik sıçanlarda hem glukoz kullanımını iyileştiren hem de bozulmuş insülin sinyal yolunu iyileştiren rosiglitazon etkisinin özelliklerini gösterdiği belirtilmiştir (Liu *et al.* 2007).



Şekil 10. Bu çalışmada kullanılan pofenolik bileşikler (A) Deglikozile edilmemiş pofenolik bileşiklerin kimyasal yapısı (B) β-glukozidaz tarafından glukoz şekeri uzaklaştırılmış (deglikozilasyon) pofenolik bileşiklerin kimyasal yapısı (Kaçıran 2020)

Polifenolik bileşikler siyah çay, olgun kırmızı şarap, kahve ve kakao gibi işlenmiş gıdalar ve içeceklerde bol miktarlarda bulunurlar (Crozier A. 2006). Bitkilerde polifenoliklerin çoğu β-glikozite bağlı glukoz, arabinoz, ksiloz, ramnoz ve galaktoz gibi şeker kısımları ile birlikte bulunurlar. Glukoz en çok bağlı bulunan şeker grubudur. β-glikozit ile glikonun (şeker) bir araya gelmek için (glikozilasyon) en çok tercih ettiği bölge 3. pozisyon iken, en az tercih edittiği bölge ise 7. pozisyondur (Rice-Evans 1996). Birçok çalışma, aglikonun (şeker molekülü bağlı olamayan formu), glikozile edilmiş fromlarına nazaran daha yüksek antioksidatif yeteneğe sahip olduğunu göstermektedir (He *et al.* 2016). Ayrıca doğal kaynaklarda bu

moleküllerin aglikon formunun miktarı glikozile formuna göre düşüktür. Yapılan bir çalışmada resveratrol miktarı (Polidatin bileşiğinin deglikozile formu) bitki içeriğinin (*Polygonum cuspidatum*) yaklaşık %0,2'sini oluştururken, Polidatinin ise bitkide 10-15 kat daha fazla oluşturulduğu gözlemlenmiştir (Wang *et al.* 2007). Bu nedenle, aglikonları daha etkin ve ekonomik olarak elde etmek için, glikozitlerin hidrolizlenmesiyle/deglikozilasyon yoluyla aglikon formuna dönüştürülmesi uygun bir prosedür gibi görünmektedir. Endüstriyel ortamlarda, bu glikozitlerin (Mirisetin 3-O- glikozit, Polidatin ve Kukurbitasin 2-E-O-glikozit vd.) deglikozilasyonu/hidrolizi, kimyasal veya enzimatik yöntemlerle sağlanabilir. Ancak kimyasal yöntemlerde, hidrolitik reaktif olarak genellikle asit veya alkali kullanılır ve yüksek sıcaklıklar ve/veya uzun inkübasyon süresi anlamına gelir. Bu yöntemler genellikle hidrolizatın daha fazla bozulmasına yol açar ve maliyeti yüksek bir süreçtir. Enzimatik hidroliz ise çoğunlukla orta sıcaklıkta ve pH'da gerçekleşir ve toksik veya bozulmuş ürünler oluşturmayan çevre dostu bir işlemdir (Kuo and Lee 2008).

Doğada deglikozilasyon, glikozil hidrolazlar (GH) ailesine ait β-glukozidazlar tarafından gerçekleştirilir (Turner *et al.* 2006). Son yıllarda bu konuda birçok bakteriyel ve fungal β-glukozidazlardan yararlanılmıştır (Wang 2007; Chong 2012; Tian 2008). Kukurbitasin B 2-O- β -D-glukozit fenolik bileşiğin (CuBg) kukurbitasin B'ye (CuB) yüksek miktarda biyotransformasyonu amacıyla yapılan bir çalışmada *Cucumis melo* pedicel ekstraktlarında kukurbitasin B 2-O- β-D-glikozitin (CuBg) kukurbitasin B'ye (CuB) verimli biyotransformasyonu için, *Streptomyces* sp'den (447 amino asit) oluşan β-glukozidaz geni *Escherichia coli* hücresine klonlandı ve BL21 (DE3) hücresi içinde ifade edildi. *C. melo* pedicel ekstraktlarının biyotransformasyonu için rekombinant β-glukozidaz kullanılarak bir reaksiyon karışımlarında CuBg konsantrasyonu 0,973 g/L iken CuBg, %87,6'lık bir dönüşüm oranıyla CuB'ye dönüştürüldü. *C. melo* pedicel özütlerindeki CuB konsantrasyonu, biyotransformasyondan sonra 13,6'dan 20,2 g/L'ye yükseltti ve bu sonuçlar doğrultusunda elde edilen enzimin CuBg biyotransformasyonu için daha uygun olduğunu göstermiştir (Mei *et al.* 2021). Yapılan başka bir çalışmada oksidatif strese bağlı hastalıkların önlenmesine yardımcı olduğu düşünülen bitki kaynaklı flavonoid kuersetin β-glikozit molekülünün ince bağırsakta laktaz tarafından hidrolizine ek olarak ayrıca hücre içerisinde β-glukozidazlar tarafındanda hidroliz edilebileceğini göstermiştir (Eğert 2011). Yapılan araştırmalara göre glikozitlerin, aglikon formundan daha yüksek çözünürlüğe sahip oldukları; bununla birlikte, glikozilasyonun antioksidatif gücü azaltabileceği gözlemlenmiştir (Corradini 2011).

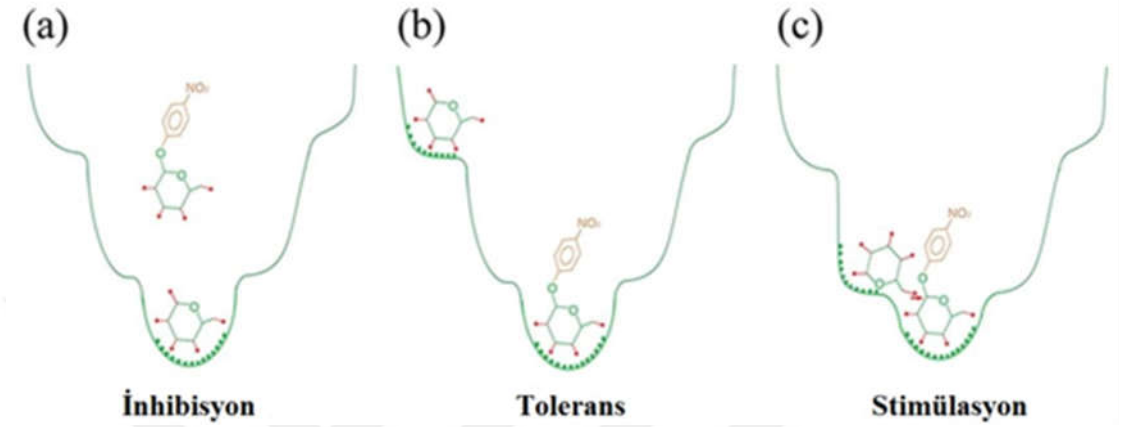
β-Glukozidazların glukoz toleransı

β-glukozidazların alkil-, amino- veya aril-β-D-glikozitlerin, siyanojenik glikozitlerin, disakkaritlerin ve kısa oligosakkaritlerin glikozidik bağlarını hidrolize ettiği bilinmektedir. Birçok substrat üzerinde hem hidroliz hem de glikozidik bağ sentezleme yeteneklerinden dolayı; bu enzimin önemi arttmaktadır. β-glukozidazlar birçok endüstriyel süreçte kullanılsa da, glukoza duyarlı olmaları bu enzimlerin kullanımını sınırlamıştır (Sun *et al*.2020). Bugüne kadar bilinen mikrobiyal β-glukozidazların çoğu, glukoza karşı oldukça hassastır ve aktiviteleri, yoğun glukoz varlığında azalır ya da tamamen yok olur. Selülolitik kompleksin hidrolizinden sorumlu selülaz enzimlerinden olan β-glukozidazlar da glukoza duyarlı enzimlerdendir. Bu sorunu üstesinden genellikle selülolitik kompleks içerisine eksojen enzimlerin eklenmesiyle gelinebilir. Eksojen enzim eklenmesi umut verici bir çözüm gibi görünebilir, ancak enzimin maliyeti nedeniyle uygulanması sınırlıdır. Bu nedenle glukoza toleranslı yeni β-glukozidazların araştırılması son günlerde araştırmacıların ilgi odağı olmuştur. Son yıllarda, birkaç glukoza toleranslı β-glukozidaz ve bunların glukoza toleranslı mekanizmaları rapor edilmiştir (Ketudat and Esen 2010; Pang *et al.* 2017; Matsuzawa *et al.* 2016). Bunlara ek olarak Zada ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada *Saccharomonospora sp*. NB11'den elde edilen β-glukozidazın glukoza toleranlı olduğu bildirilmiştir(Zade *et al*. 2021).

Yapılan başka bir çalışmada ise GH1 ailesi β-glukozidazların, GH3 ailesinden on kat ila 1000 kat daha fazla glukoz toleranslı olduğu ve GH1 β-glukozidazların aktif bölgesinin, GH3 ailesi β-glukozidazların sığ cebin (derinliği az olan) aksine, derin ve dar bir boşlukta bulunduğu tespit edilmiştir(de Giuseppe *et al* 2014). Bu bulgular, glukoz toleransı için moleküler araştırmalara ışık tutmuş ve GH1 ailesi β-glukozidazın bitki hücre duvarı skarifikasyonunu içeren biyoteknolojik uygulamalar için GH3 ailesiden daha uygun olduğunu göstermiştir (de Giuseppe 2014). Ayrıca ürün olarak açığa çıkan glukoz, maya veya diğer organizmalar tarafından kullanılabilir ve biyoyakıt üretimi için etanole dönüştürülebilir (Dogaris *et al.* 2013). Eşzamanlı bir skarifikasyon ve fermentasyon (SSF) işlemi, lignoselülozik biyokütlenin kombine hidrolizi ve etanolün dönüştürülmesi de etanol üreterek glukoz inhibisyonunu hafifletebilir (Singhania *et al.* 2013). Etanole toleranslı bir β-glukozidazın bu süreçte kullanılması fayda sağlayabilir.

Uygulama sonrası ortamda oluşan ya da var olan glukozun enzim üzerinde bağlanmak için tercih ettiği bölge enzimin glukoz toleransını etkileyebilir. Eğer glukoz substratın tercih ettiği kanalın aktif bölgesine bağlanmak isterse, substrat ile yarışa girerek rekabetçi inhibisyon yoluyla enzimin katalitik aktivitesini engelleyebilir. Bunun aksine glukoz, substrat kanalının dış bölgesine (aktif olmayan bölge) bağlanmayı tercih ederse katalitik aktivite üzerinde

herhangi bir etki oluşturmaz. Ayrıca glukoz stimülasyonunda kanalın ortasına bağlanmayı tercih eden glukoz, transglikozilasyon veya allosterik etkiler gibi diğer mekanizmalar aracılığıyla enzimin katalitik aktivitesini artırabilir (Şekil 11) (Yang *et al.* 2015). Bunlara ek olarak mantar GH1 β-glukozidazlarının +2 alt bölge dahil olmak üzere aktif bölgeye girişin yapısı glukoz toleransında anahtar bir rol oynar (Giuseppe *et al.* 2014).



Şekil 11. Glukozun β-glukozidaz enzimi üzerinde bağlanma bölgesine göre enzim aktivitesinde oluşturduğu etkiyi gösteren çizim (Yang *et al.* 2015). (a) Glukozun aktif bölgeye bağlanarak rekabetçi inhibisyon yoluyla enzimin katalitik aktivitesini inhibe etmesi. (b) Glukozun enzimin aktif bölgesinin dışına bağlanarak glukoz toleransına neden olması. (c) Glukozun katalitik etkinliği artırması (Yang *et al.* 2015)

β-Glukozidaz ile ilgili yapılan mutasyon çalışmaları

Enzimler doğada biyolojik süreçlerin oluşmasında görev alan katalizörlerdir. Yapılan çalışmalarda doğal olarak elde edilen enzimlerin (β-glukozidaz vd.) miktarının düşük olduğu gözlemlenmiş ve çözüm olarak enzim üzerinde yapılacak mutasyonlarla ekspresyon seviyesini artırmak hedeflenmiştir (Agrawal and Verma 2013).

Ruchi ve arkadaşları tarafında yapılan bir çalışmada etil metil sülfonat (EMS) ve ultraviyole (UV) radyasyonunun (hem tek hem de birlikte), *Bacillus subtilis* suşuna birden fazla uygulanmasıyla yüksek seviyede β-glukozidaz üreten mutant organizma geliştirilmiş ve yalnızca UV'ye maruz kaldıktan sonra geliştirilen mutant; yaban tip (675 U/l) ile karşılaştırıldığında β-glukozidaz üretiminde (718 U/l) küçük bir artış gösterirken, yalnızca EMS'ye maruz kaldıktan sonra geliştirilen mutantın, her iki suştan biraz daha iyi bir üretim (762 U/l) sergilediği görülmüştür. Ayrıca yaban tipin hem UV hem de EMS mutajenlerine birlikte maruz kalması sonucu enzim üretiminin yaklaşık 1,5 kat (806 U/l) daha artığı görülmüştür. Bununla birlikte yaban tip enzimlerin (β-glukozidaz vd.) hedef molekülün omurgasında belli bir pozisyona bağlı glukozun hidrolizi için düşük afinite gösterdiği saptanmış ve enzimlerin

aktif bölgelerinde yapılan mutasyonlar sonucunda elde edilen mutant enzimler ile doğal (yaban tip) enzimler karşılaştırıldığında katalitik aktivitelerinde farklılıklar gözlenmiştir (Ruchi 2012).

Hızlandırılmış moleküler dinamikler (accelerated molecular dynamics) olarak adlandırılan ve atomların farklı konformasyonel durumlarının ortaya çıkardığı sonuçları daha anlaşılır hale gelmesini sağlayan yöntem ile yapılan yaban tip ve nokta mutasyonluların kıyaslanması sonucunda, mutasyonların glukoz toleransına pozitif yönde etki edebileceği gösterilmiştir (Lima *et al.* 2021; Balogh *et al.* 2020). Yapılan bir çalışmada Hipertermofilik Arke *Pyrococcus furiosus*'dan elde edilen β- glukozidazın yapı-fonksiyon analizi için aktif bölgesinde bulunan E372 (Glutamat) pozisyonunda bölgeye yönelik mutajenez ile Aspartat (D) ve Glutamin (Q) mutantları oluşturuldu. E372D ve E372Q mutantlarının 90°C'deki hücre ekstraktındaki spesifik aktiviteleri yaban tip ile kıyaslandığında, sırasıyla 200 ve 1,000 kattan fazla azalttığı tespit edildi. Sonuç olarak bu bölgedeki Glutamat amino asitinin enzimin katalitik etkisi için önemli olduğu belirtildi (Voorhorst, 1995).

Paenibacillus polymyxa kaynaklı β-glukozidaz üzerinde *(BglB),* L171M, H178M, M221L, E406W, N160E ve F415M olmak üzere altı yeni mutasyon varyantı oluşturuldu ve sonrasında kinetik aktivite ve termal stabilite çalışmaları yapıldı. Altı mutantın tümü, katalitik verimlilikte bir azalma gösterdi. L171M, H178M ve M221L mutantları katalitik verimliliği, öncekine kıyasla ~2 kat azaltırken, N160E, E406W ve F415M mutantlarının katalitik aktivitede >100 daha azalmaya neden olduğu saptandı (Huang *et al.* 2020). Polar olmayan küçük amino asitleri daha büyük amino asitlere dönüştürerek amino asit boyutundaki genel yapısal kararlılık üzerindeki değişiklikleri araştırmak amacıyla *Paenibacillus polymyxa* türünden üretilmiş β-glukozidaz B üzerinde L171G, L171V ve L171W mutasyon bölgeleri oluşturuldu. L171G ve L171V, yaban tipe göre kinetik aktivitede bir azalmaya ve artan termostabiliteye neden olurken, L171W mutantının, yaban tipe göre artan bir kinetik aktiviteye ve düşük bir termostabiliteye neden olduğu görüldü (Siegel and Vater 2020).

Guo ve diğerleri tarafından *Trichoderma reesei* β-glukozidazı üzerinde yapılan başka bir çalışmada aktif bölge girişinde bulunan iki farklı amino asitte ayrı ayrı mutasyon oluşturulmuştur. Elde edilen mutantlar yaban tip ile karşılaştırıldığında hem glukoz toleransını hem de spesifik aktiviteyi 2,4 kat daha artırdığı gözlemlenmiştir (Guo *et al.* 2016).

Esansiyel amino asit rezidülerini incelemek amacıyla *Flavobacterium meningosepticum'*dan elde edilen GH3 ailesine ait β-glukozidaz (EC 3.2.1.21) enziminde bölgeye yönelik mutagenez yapılmış ve D247G, D247N ve D247E mutasyon varyantları oluşturulmuştur. D247G ve D247N mutantlarının aktiviteleri (k_{cat}/K_m) yaban tip enzimin aktivitesinden sırasıyla 30000 ve 200000 kat daha düşükken, D247E mutantının yaban tip

aktivitenin %20'sini koruduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar neticesinde Asp-247'nin esansiyel bir amino asit olduğuna karar verildi ve bu rezidünün reaksiyonda bir nükleofil olarak işlev gördüğü düşünüldü (LI *et al.* 2001). *Trichoderma reesei* β-glukozidazının (TrBgl2) yapısından yola çıkarak aktif bölgenin dış kanalında bulunan amino asitlerde tekli ve ikili olacak şekilde mutasyon oluşturulmuştur. Elde edilen mutant P172L ve P172L/F250A varyantları, yaban tipe göre 40 °C'de 4-nitrofenil-β-D glukopiranozit susbstratına karşı sırasıyla 5,3 ve 6,9 kat fazla k_{cat}/K_m ve k_{cat} değerlerini göstermiştir. Buna ek olarak L167W ve P172L/F250A mutasyonları, optimum sıcaklığın, yaban tipin neredeyse aktif olmadığı 50 °C'ye kaymasına neden olduğu gözlemlenmiştir (Lee *et al.* 2012).

Başka bir çalışma da *Thermotoga neapolitana* β-glukozidaz enziminin şeker bağlanma bölgesine (+2 bölgesi) yakın F219, N221 ve G222 rezidüleri ile diğer rezidüleri üzerinde tekli mutasyonlar oluşturulmuş, sonrasında bu mutasyonların tekli, ikili ve üçlü kombinasyonları olmak üzere toplamda sekiz mutant varyant (üçlü: F219L/P165L/M278I, N221S/P165L/M278I, G222Q/P165L/M278I, G222Q/V203M/K214R, ikili: F219L/K214R, N221S/P342L ve tekli: G222M, N221S) elde edilmiştir. Enzim kinetiği çalışmaları sonucunda enzim aktivitesi yaban tip ile kıyaslandığında; 222. pozisyonda mutasyona uğramış varyantlarda 2-3 kat azalma görülürken, 221. pozisyonda mutasyon taşıyan tek, çift ve üçlü mutasyona uğramış varyantların, aktiviteyi 3,5 kat kadar artırdığı gözlemlenmiştir (Khan *et al.* 2011).

Bir başka çalışmada bir deniz bakterisinden izole edilen glukoz toleranslı yeni bir GH1 β-glukozidaz enziminin 171. amino asiti (Fenilalanin-F) Triptofana (W) değiştirilecek şekilde mutasyon yapıldı. F171W mutant enzimin yaban tipten daha iyi glukoz toleransı ve termostabiliteye sahip olduğu ve *p*NPG substratı çin yaban tip enzimin ve F171W'nin aktivitesinin %100 değerleri sırasıyla 37,3 ± 0,4 U/mg ve 40,5 ± 0,7 U/mg olarak hesaplandı (Sun *et al.* 2020). Buna ek olarak *Thermotoga maritima* (*T. maritima) ve Thermoanaerobacter ethanolicus* JW200 kaynaklı β-glukozidazları aynı ailede olması ve bunların dizileri %53 oranında benzerlik göstermelerine rağmen aktif bölgede bulunan glikon bağlanma bölgelerindeki amino asitler birbirine göre farklılık gösterir. Bu farklılıklar göz önüne alınarak *T. maritima* β-glukozidaz enzimin de tekli ve ikili mutasyonları (F221L,N223L, G224T ve F221L/N223L) oluşturuldu. Mutantların *p*-nitrofenil β-D-glukopiranozit (*p*NPG) substratına karşı katalitik etkisi incelendiğinde aktivitede güçlü bir artışa neden olurken K_m değerinde herhangi birdeğişim gözlemlenmemiştir. Ayrıca mutantların izoflavonoid glikozitlerine karşı katalitik etkilerine bakıldığında tüm mutantların aktivitelerinde azalma görülmüş ve kuersetin substratına karşı farklı katalitik etkinlik sergilemiştir (Sun *et al.* 2014).

Clostridium thermocellum selülozomunun optimal sıcaklığı 70 °C iken, *C. thermocellum* β-glukozidaz A enzimi (BglA) bu kadar yüksek sıcaklıklarda neredeyse aktivitesini tamamen kaybetmektedir. Bu nedenle iyi bir etkinliğe sahip termostabil bir enzim üretmek için rastgele mutajenez yönelimi ile *C. thermocellum* BglA'da Mut1 (A17S/K268N) ve Mut2 (S39T) mutant varyantlar oluşturuldu. İki mutant ve yaban tip BglA enzimi ısı şoku işlemine (66-72 °C, 1 saat) tabi tutuldu ve sonucunda, her iki mutant varyantın yaban tip enzimden; Mut1 varyantın da, Mut 2'den daha termostabil olduğu saptandı. Mut1 varyantı 68,4 °C ısı şokundan (1 saat) sonra aktivitesinin sadece ~%40'ını (kalan aktivite ~%60) kaybederken, aynı koşullar altında Mut2, aktivitesinin ~%90'ını kaybetmektedir ve yaban tip BglA'nın aktivitesi tamamen kaybolmaktadır. 70 °C'de ısı şokundan (1 saat) sonra, hem yaban tip hem de Mut2 enzimleri aktivitelerini tamamen kaybederken Mut1 hala ~%9,5'lik aktivite sergilemektedir. Aynı çalışmada yaban tipin ve Mut1'in kinetik parametreleri ölçüldüğünde Mut1 varyantı yaban tip enzime kıyasla K_{cat} ve K_m değerleri arasında hiçbir istatistiksel fark olmaksızın, nispeten benzer ve sadece biraz daha yüksek katalitik verim (K_{cat}/K_m) ortaya çıkarmıştır. Mut1 varyantını oluşturan mutasyon bölgelerinin (A17S ve K268N) termostabilite üzerindeki etkisi ayrı ayrı incelenmiş; A17S, Mut1 varyantına benzer bir termostabilite göstermiş ve buna karşılık, K268N mutantı yaban tip ile karşılaştırıldığında termostabilitede gelişme göstermediği bu da iyileştirilmiş termostabilitenin sadece A17S mutasyonundan kaynaklandığını göstermiştir (Yoav *et al.* 2019).

PCR tekniği kullanımı ile nokta mutasyonu oluşturma yöntemi

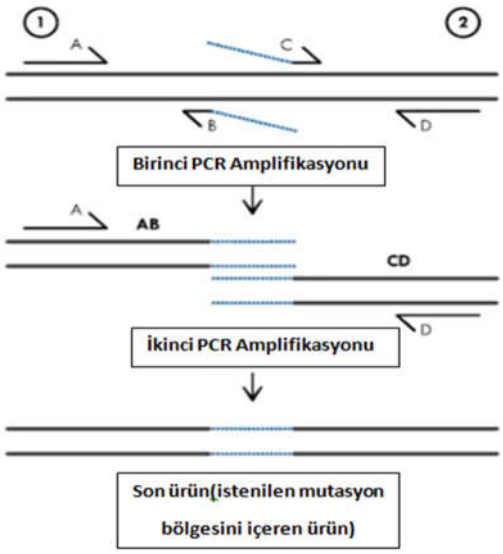
Bir canlının genetik şifresindeki ani ve kalıcı değişiklikler "Mutasyon" olarak adlandırılır. Gen dizisinde sadece tek bir nükleotit üzerinde meydana gelen mutasyonlar "Nokta mutasyonları" olarak bilinir. Eğer bu mutasyon bir bazın başka bir baza dönüşmesi şeklindeyse "sübstütisyon", tek bazın eklenmesi şeklindeyse "insersiyon" ya da tek bazın çıkarılması şeklindeyse "delesyon" olarak tanımlanabilir. Gen dizisi bilinen proteinlerin hücre içerisindeki fonksiyonlarının belirlenmesi veya proteinlerin katalitik aktivitelerinin artırılması gibi işlemler mutagenez ile gerçekleştirilebilir.

20. yüzyılın ilk zamanlarında mutagenez için iyonizan radyasyon ve ultraviyole radyasyon gibi fiziksel ajanlar kullanılıyordu. Ancak bu fiziksel ajanlar özellikle bitkilerde fenotipik değişimlere izin verirken, genom seviyesinde yapılan çalışmalarda kullanılamıyordu (Kocaefe 1999). 1940'lı yıllarda fiziksel mutagenezin yerini özellikle alkilleyici ajanların kullanıldığı kimyasal mutagenez aldı.

Fiziksel ve kimyasal mutagenezde kullanılan ajanlar canlı sağlığı açısından tehlike oluşturması ve yöntemin uygulamasında zor birkaç adım bu yöntemlerin dezavantajları olarak

karşımıza çıkar. Ayrıca çok uzun bir DNA parçasında istenilen tek bir noktada mutasyon oluşturma ihtimallerinin düşük olması ve çok sayıda mutasyon içeren bakteriler arasında istenilen organizmayı şeçmek zahmetli olduğu için araştırmacılar yeni yöntemler arayışında bulunmuştur.

Moleküler biyoloji tekniklerinin daha fazla yol alması ile biyolojik mutagenez yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemin alt dallarından olan PCR tekniği ile nokta mutasyonlarını oluşturmak mümkün hale gelmiştir. Ayrıca mutasyonun PCR tekniği ile oluşturulması hem ekonomik açıdan hem de zaman ve verimlilik bakımından avantaj sağlamıştır. PCR tekniği ile DNA fragmenti üzerinde nokta mutasyonu oluşturmak için DNA fragmentini çoğaltmaya uygun iki adet oligonükletid primer ve mutasyon bölgesini taşıyan, birbirinin komplementeri olan iki adet primer olmak üzere yöntem için toplamda dört adet oligonükleotit primer kullanılır. Bu amaç doğrultusunda ilk olarak aynı anda DNA fragmentine uygun 5' oligonükleotit primer ile mutasyon bölgesine uygun 3' oligonükleotit primer ve DNA fragmentine uygun 3' oligonükleotit primer ile mutasyon bölgesine uygun 5' oligonükleotit primer ayrı ayrı olacak şekilde tüplerde diğer PCR bileşenleri ile bir araya getirilir. Son olarak elde edilen her iki PCR ürünü eşit oranda karıştırılarak DNA fragmentine özgül oligonukleotit primerler ile tekrardan PCR yapılarak mutant bölgelerin amplifikasyonu gerçekleştirilir (Şekil 12) (Ito 1991; Wang *et al.* 1996; *Hö et al.* 1989;).



Şekil 12. PCR temelli mutasyon oluşturma diyagramı. Primer A ve D doğal genin amlifikasyonu için tasarlanmıştır. Primer B ve C eklenecek olan tamamlayıcı diziyi içerir (mutant-mavi bölge). Primer çiftleri A/B (1) ve C/D (2) kullanılarak PCR'nin ilk basamağında iki reaksiyon gerçekleştirilir. Elde edilen DNAfragmentleri, ikinci PCR reaksiyonu için primer A/D çifti ile karıştırılır. Birinci basamakdan elde edilen fragmentlerin tamamlayıcı uçları hibritleşir ve istenen ekleme ile nihai ürün (mutasyon bölgesini içeren ürün) oluşur (Ito 1991)

MATERYAL ve METOT

Materyal

Tez Çalışmasında Kullanılan Laboratuvar Materyalleri: Tez çalışması sırasında kullanılan ekipmanlar Tablo 2'de verilmiştir

Tablo 2. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar

Cihaz	**Marka / Model**
Buz Dolabı (+4)	Profilo
Çeker Ocak	WCS Space Series Fume Cupboard
Derin Dondurucu (-20)	Arçelik
Elektroforez Tankı (yatay)	Thermo EC 135-90
Etüv	Dedeoğlu
Elektroforez Tankı (dikey)	BioRad Mini Protean
Güç Kaynağı	Hoefer
Hassas Terazi	Ohaus Pıoneer
Isı Bloklar	Biosan
İnkübatör	Thermo Scientific
Kar Makinesi	Scotsman
Kabin (Hood)	Nordicsafe/Esko Biyogüvenlik
Mikrodalga Fırın	Beko
Mini Santrifüj	Sigma
Magnetik Karıştırıcı	Heidolph MR Hei-Standart
Nanodrop	Thermo Scientific/Multiskan GO
Otomatik Pipetler	Thermo Scientific
Otoklav	Hırayama Hiclave Autoclave
PCR Cihazı	SensQuest Labcycler
pH Metre	GMBH
Saf Su Cihazı	Mp MINI pure DestUp
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Mikro 220R
SDS-PAGE Elektroforez Seti	Bio-Rad
Spektrofotometre	Jenway
Santrifüj	Hermle
Sonikatör	Hielscher
UV Görüntüleme Cihazı	Biometra
Vorteks	Boeco
Yazıcı	Hp
Zaman Ayar Saati	Diehl

Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasallar: Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3. Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasallar

Kimyasallar	**Marka**
Amonyum Sülfat	Merck
Akrilamid	Sigma
Asetik asit	Riedel-dan Haen
Amfisilin	Applichem
Agar	Canda Lab
Bis-Akrilamit	Promega
β-merkaptoetanol	Merck
Bromfenol Mavisi	Gerbu
BSA	NEB
Butanol	Merck
Commassie Brillant Blue G-250	Merck
Commassie Brillant Blue R-250	Merck
$CoCI_2$	Sigma
$CaCl_2$	Aktar Kimya
$CuSO_4$	Merck
dNTP	Promega
Dioksan	Merck
DMSO	Carlo Erba
DTT	Applichem
DPPH	TCI D4313
DNA Ladder	N3232L
DEPC	Sigma
DNS	Sigma
Etil Alkol	Applichem
EDTA	Merck
EGTA	Biobasic Canada
Fosforik Asit	Merck
$FeSO_4$	MERC
Gliserol	Merck
HgCl	Merck
IPTG	Applichem
KCI	Merck
Kanamisin	Applichem
K_2HPO_4	Merck
KH_2PO_4	Merck
$MgCl_2$	Sigma Aldrich
Metanol	Riedel-dan Haen

Tablo 3. (devamı)

$MnSO_4$	**BDH Aralar**
NaCl	Merck
NaOH	İsolab
NaH_2PO_4	Merck
$NiCl_2$	Merck
Na_2HP0_4	Merck
Ni-Metal Affinity Resin	Qiagen
Propanol	Merck
PMSF	Sigma
Protein Ladder	V8491
Sodyum Asetat	Merck
Sitrik Asit	AFG Bioscience
SDS	Sigma
Tripton	Merck
Trisma Base	Sigma
TEMED	Janssen Chimica
Tween-20	Merck
Triton X-100	Merck
X-Gal	Applichem
Yeast ekstrat	Merck
$ZnSO_4$	Merck

Tez Çalışmasında Kullanılan Enzimler, Kitler ve Substratlar: Tez çalışmasında kullanılan enzimler, kitler ve substratlar Tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 4. Tez Çalışmasında Kulanılan Enzimler, Kitler ve Substratlar

Enzim/ Substrat/Kit	**MARKA**
*EcoR*I	Promega
HindIII	NEB
NcoI	Promega
Taq DNA Polimeraz	Promega
T4 DNA Ligaz	NEB
T4 DNA Ligaz tampon	Promega
Taq DNA Polimeraz Tampon	Promega
Kukurbitasin E-O-2 glukozit	Merck
Mirisetin 3-O-glukozit	Merck
*p*NPG	Sigma
Polidatin	Sigma Alrich
GOPOD Kiti	NEOGEN
Jel Ekstraksiyon Kiti	EcoSpin
PCR Temizleme Kiti	Nucleo Spin
Plazmit İzolasyon Kiti	Nucleo Spin

Tez Çalışmasında Kulanılan Besiyerleri, İçeriği ve Hazırlanışı: Tez kapsamında kullanılan besiyerleri ve hazırlanması Tablo 5'de verilmiştir.

Tablo 5. Tez Kapsamında Kullanılan Besiyeri, İçeriği ve Hazırlanışı

Besiyeri	İçeriği/Hazırlanışı
LB	10 g triptofan, 5g maya özütü. 5 g NaCI hassas terazide tartılır ve 950 ml distile suda çözülür. pH 7,0 olacak şekilde ayarlandıktan sonra son hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır ve otoklavlanır.
LB Agar	10 g triptofan/pepton, 5g maya özütü, 5 g NaCI hassas terazide tartılır ve 800 ml distile suda çözülür. pH 7,0 olacak şekilde ayarlandıktan sonra içerisine 16 g agar eklenir ve son hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır ve otoklavlanır.

Tez Çalışmasında Kullanılan Çözeltiler/Tamponlar İçeriği ve Hazırlanışı: Tez çalışmasında kullanılan çözeltiler Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Tez Çalışmasında Kullanılan Çözeltiler/Tamponlar İçeriği ve Hazırlanışı

Çözeltiler/Tamponlar	İçeriği/Hazırlanışı
100 mM Sodyum Sitrat Tampon (pH 3)	296 mg sodyum sitrat ve 1,741 g sitrik asit hassas terazide ölçülür ve 90 ml distile su içerisinde çözdürülür. Daha sonra tamponun pH'sı 3,0 olacak şekilde 1 M HCI ile ayarlanır ve son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.
100 mM Sodyum Sitrat Tampon (pH 4)	993 mg sodyum sitrat ve 1,272 g sitrik asit hassas terazide ölçülür ve 90 ml distile su içerisinde çözdürülür. Daha sonra tamponun pH'sı 4,0 olacak şekilde 1 M HCI ile ayarlanır ve son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.
100 mM Sodyum Sitrat Tampon (pH 5)	1,71g sodyum sitrat ve 804 mg sitrik asit hassas terazide ölçülür ve 90 ml distile su içerisinde çözdürülür. Daha sonra tamponun pH'sı 5,0 olacak şekilde 1 M HCI ile ayarlanır ve son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.
100 mM Potasyum Fosfat Tampon (pH 6):	367 mg $Na_2HPO_4.H_2O$ ve 1,191 g $NaH_2PO_4.H2O$ hassas terazide ölçülür 90 ml distile su içerisinde çözdürülür. Daha sonra tamponun pH'sı 6,0 olacak şekilde 1 M NaOH ile ayarlanır ve son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.
100 mM Potasyum Fosfat Tampon (pH 7):	1,549 g $Na_2HPO_4.H_2O$ ve 538 mg $NaH_2PO_4.H_2O$ hassas terazide ölçülür ve 90 ml distile su içerisinde çözdürülür. Daha sonra tamponun pH'sı 7,0 olacak şekilde 1 M NaOH ile ayarlanır ve son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

Tablo 6. (devamı)

100 mM Sodyum Fosfat Tampon (pH 8):	1,628 g K_2HPO_4 ve 90 mg KH_2PO_4 hassas terazide ölçülür ve 90 ml distile su içerisinde çözdürülür. Daha sonra tamponun pH'sı 8,0 olacak şekilde 1 M NaOH ile ayarlanır ve son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.
100 mM Glisin-NaOH Tamponu (pH 9) :	0,75 g Glisin ve 0,09 g NaOH hassas terazide ölçülür ve 90 ml distile su içerisinde çözdürülür. Daha sonra tamponun pH'sı 9,0 olacak şekilde 1 M NaOH ile ayarlanır ve son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.
100 mM Glisin-NaOH Tamponu (pH 10) :	0,75 g Glisin ve 0,26 g NaOH hassas terazide ölçülür ve 90 ml distile su içerisinde çözdürülür. Daha sonra tamponun pH'sı 10,0 olacak şekilde 1 M NaOH ile ayarlanır ve son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.
Plaztmit İzolasyon Solüsyonu (A):	Solusyonun içerisinde 50 mM Glukoz, 25 mM Tris-HCI ve 0,1 mM EDTA olacak şekilde ayarlanır ve son hacim distile su ile tamamlanır. Son olarak üzerine lizozim (1 ml solüsyon için 4 mg) eklenir ve çözünmesi için vortekslenir.
Plaztmit İzolasyon Solüsyonu (B):	Solusyonun içerisinde 200 mM NaOH ve 200 mM SDS olacak şekilde ayarlanır ve son hacim distile su ile tamamlanır.
Solusyon B	Solusyonun içerisinde 20 mM Tris-HCI (pH 7,5), 200 mM NaCI ve 5 mM betamerkaptoetanol olacak şekilde ayarlanır ve son hacim distile su ile tamamlanır. Beta merkaptoetanol çeker ocak içerisinde solüsyona eklenir.
Solusyon A	Solusyonun içerisinde 20 mM Tris-HCI (pH 7,5), 200 mM NaCI ve 500 mM imidazol olacak şekilde ayarlanır ve son hacim distile su ile tamamlanır.
IPTG	0,5 M stok solüsyon için 4,6 g IPTG (toz) hassas terazide ölçülür ve 40 ml distile suda çözdürülür. Daha sonra kabin içerisinde 0,22 µm'luk filreden geçirilir ve -20 derecede muhafaza edilir.
%10'luk SDS	%10'luk SDS; 9 ml saf su içerisinde hassas terazide ölçülen 1 g SDS çözülerek hazırlanır.
SDS-PAGE Tamponu	21,6 g Glisin, 4,5 g Tris base ve 15 ml SDS (%10) alınır 1 L distile su içerisinde çözdürülür. Son hacim distile su ile 1,5 L'ye tamamlanır **.**
%10'luk APS	1 ml için; 0,9 ml dH_2O içerisinde 0,1 g APS çözülür.
Solusyon I (SDS Yıkama Solunyonu)	50 ml metanol, 10 ml asetik asit bir arayara getirilir ve son hacim 100 ml olacak şekilde distile su ile tamamlanır.
Solusyon II (SDS Yıkama Solunyonu)	7,5 ml metanol, 10,5 ml asetik asit bir arayara getirilir ve son hacim 150 ml olacak şekilde distile su ile tamamlanır.

Tablo 6. (devamı)

SDS-PAGE İçin Ayırma Jeli	
X-Gal	100 mM stok solüsyon için: 400 mg X-Gal (katı) hassas terazide tartılır ve 10 ml N-N dimetil format içerisinde çözülür.-20 derecede muhafaza edilir. Bu işlemler kabin içerisinde gerçekleştirilir.
Etidyum Bromür	10 mg/ml için: 10 mg etidyum bromür hassas terazide ölçülür (çeker ocak içerisinde ve eldiven ile) 10 ml TAE tampon içerisinde çözdürülür.
SDS Loading Dye (Yükleme Boyası)	400 µL SDS (%10), 250 µL gliserol, 150 µl Tris (pH 6.8), %1 bromfenol blue (BPB), 50 µl betamerkaptoetanol bir araya getirilerek hafif bir şekilde alt üst edilir.
50X TAE	40 ml EDTA (0.5 M), 22,84 ml asetik asit ve 96, 8g Tris base alınır, son hacim 400 ml olacak şekilde distile su ilave dilir.
SDS-PAGE Ayırma Jeli (%12)	2 ml akrilamit (%30), 1,3 ml Tris (1,5 M-pH 8.8), 50 µl SDS (%10), 50 µl amonyumpersülfat (%10) ve 2 µl TEMED bir araya getirilir, son hacim 5 ml olacak şekilde distile su ilave edilir ve hazırlanmış olan jel, jel hazırlama aparatına aktarılır. Bu işlemler yapılırken TEMED işlemlerin son basamağında eklenir.
SDS-PAGE Yığma Jeli	0,33 ml akrilamit (%30), 0,25 ml Tris (1,5 M-pH 6,8), 20 µl SDS (%10), 20 µl amonyumpersülfat (%10) ve 2 µl TEMED bir araya getirilir son hacim 2 ml olacak şekilde distile su ilave edilir ve hazırlanmış olan jel, jel hazırlama aparatına aktarılır. Bu işlemler yapılırken TEMED işlemlerin son basamağında eklenir.
DNS Solusyonu	100 ml solüsyon için: 36 g sodyum potasyum tartarat, 1 g NaOH, 1 g DNS, 2 g fenol (katı), 0,05 g sodyum sülfit ve son hacim 100 ml olacak şekilde distile su ilave edilir. DNS solüsyonu hazılanırken ilk olarak sodyum potasyum tartarat bir miktar suda çözdürülür ve üzerine NaOH eklenir (Karışım 1). Bu esnada DNS ayrı bir yerde bir miktar suda yavaş bir şekilde çözünmesi sağlanır. Daha sonra karışım 1 üzerine suda çözünen DNS yavaş yavaş pipet ile aktarılır, manyetik karıştırıcı ile çözünmesi sağlanır. Son olarak elde edilen solusyon üzerine fenol ve sodyum sülfit eklenerek karışım hazırlanır ve karanlık ortamda. +4 derecede muhafaza edilir.
DPPH Solusyonu	0,079 g DPPH hassas terazide tartılır, 20 ml metanol (%95) içerisinde çözünür ve karanlık ortamda muhafaza edilir.
20 mM $MgCI_2$	50 ml 121 °C'de distile su içerisine 190,42 mg $MgCI_2$ eklenerek manyetik karıştırcı yardımıyla çözelti hazırlanır.
20 mM $CaCI_2$	50 ml distile su içerisine 226,96 mg $CaCI_2$ eklenerek manyetik karıştırcı yardımıyla çözelti hazırlanır.

Tablo 6. (devamı)

20 mM $MnCI_2$	50 ml distile su içerisine 251,65 mg $MnCI_2$ eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla çözelti hazırlanır.
20 mM $HgCI_2$	50 ml distile su içerisine 543 mg $HgCI_2$ eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla çözelti hazırlanır.
20 mM KCI	50 ml distile su içerisine 148 mg KCI eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla çözelti hazırlanır.
20 mM $CoCI_2$	50 ml distile su içerisine 222 mg $CoCI_2$ eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla çözelti hazırlanır.
20 mM $ZnSO_4$	50 ml distile su içerisine 322,8 mg $ZnSO_4$ eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla çözelti hazırlanır.
20 mM $CuSO_4$	50 ml distile su içerisine 319,24 mg $CuSO_4$ eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla çözelti hazırlanır. Karanlık ortamda muhafaza edilir.
20 mM $FeSO_4$	50 ml distile su içerisine 310 mg $FeSO_4$ eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla çözelti hazırlanır. Karanlık ortamda muhafa edilir.
20 mM $NiCI_2$	50 ml distile su içerisine 159,2 mg $NiCI_2$ eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla çözelti hazırlanır. Karanlık ortamda muhafaza edilir.
Amfisilin	50 mg/ml Amfisilin için: 50 mg amfisilin hassas terazide ölçülür, daha sonra 50 ml distile su içerisinde çözdürülür. Sonrasında uygun filtreden geçirilir ve -20 °C'de muhafaza edilir.
Kanamisin	50 mg/ml Kanamisin için:50 mg kanamisin hassas terazide ölçülür, daha sonra 50 ml distile su içerisinde çözdürülür. Sonrasında uygun filtreden geçirilir ve -20 °C'de muhafaza edilir.
1 M Glukoz	100 ml distile su içerisine 18,016 g glukoz eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla çözelti hazırlanır ve 121 °C'de 1 atm basınçta otoklav edilir.
0,5 M EDTA	100 ml su içerisine 14,612 g EDTA eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla çözelti hazırlanır.
50 mM EDTA	100 ml su içerisine 1,462 g EDTA eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla çözelti hazırlanır.
50 mM DTT	100 ml su içerisine 771,2 mg DTT eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla çözelti hazırlanır.
50 mM DEPC	100 ml su içerisine 981,7 mg DEPC eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla çözelti hazırlanır.
50 mM EGTA	100 ml su içerisine 1,562 g EGTA eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla çözelti hazırlanır.
50 mM PMSF	100 ml izopropil alkol içerisine 870,95 mg PMSF eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla çözelti hazırlanır
1 M Tris-HCI (pH 6,8)	Uygun bir beher içerisine 12,114 g Tris Base ekleyin. Daha sonra üzerine 85 ml distile su ekleyin ve manyetik karıştırıcı ile iyice çözünmesini bekleyın. Çözeltinin pH 'sı 6,8 oluncaya kadar 1 M HCI ekleyin ve son hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlayın.

Tablo 6. (devamı)

1 M Tris-HCI (pH 8,8)	Uygun bir beher içerisine 12,114 g Tris Base ekleyin. Daha sonra üzerine 85 ml distile su ekleyin ve manyetik karıştırıcı ile iyice çözünmesini bekleyın. Çözeltinin pH 'sı 8,8 oluncaya kadar 1 M HCI ekleyin ve son hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlayın.
200 mM NaOH	50 ml distile su içerisine 399,97 mg NaOH eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla çözelti hazırlanır.

Tez çalışmasında Kullanılan Vektörler Genler ve Bakteriler: Yapılan çalışmada kullanılan bakteriler, genler ve vektörlerle ilgili bilgiler Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. Çalışmada Kullanılan Genler, Bakteriler ve Vektörler

Bakteriler, Vektörler ve Genler	**Referanslar**	**Özellikleri**
Mutant *G226Q* Beta glukosidaz Geni	KTÜ Moleküler Biyoloji ve Araştırma Laboratuvarı	
E.*coli* K12 JM101	NEB-Laboratuvar Stok	F', traD36, proA^{+}, B $^{+}$, *LacIq*, Δ (*lacZ*), M15/Δ (*lacproAB*), glnV, thi^{+}
E. *coli* BL21 (D3)	Novagen	F', *ompT*, hsdS$_B$, (r$_B$ -m$_B$), gal, dcm (*D3*), *pLysS, Cam^R*
pET28a (+)	Novagen	Yüksek ekspresyon seviyesi, T7 promotorü, His*Tag®, *lacI geni*, Kan^R ve C terminalin de MCS (çoklu klonlama bölgesi) bölgesi
pGEM® -T Easy I	Promega	Yüksek kopya sayısı, T7 ve SP6 DNA polimeraz promotorleri, MCS (çoklu klonlama bölgesi) bölgesi, *LacZ geni*, 3'-T ucu ve Amp^R

Yöntem

Mutasyon çalışmaları

Enzimin katalitik aktivitesini ve diğer biyokimyasal özelliklerini endüstriyel uygulamalara daha uygun hale getirebilmek amacıyla aktif bölgede bulunan ve önceki çalışmamızda *Anoxybacillus ayderensiz* Ay9'dan elde edilen β-glukozidaz geni (*bglAy9* WT) üzerinde oluşturulan *G226Q* mutant varyanta ek olarak Y227F. mutasyon bölgesinin oluşması hedeflendi. Bu hedef doğrultusunda Tablo 8'de belirtilen primerler oluşturuldu.

Tablo 8. Tez Kapsamında Kullanılan Primerler (Primerlerde Mutasyon Bölgesi Sarı Renk İle Belirtilmiştir)

Primer adı	Dizi
Ayd-BGlu-F	5'- ggCCATggTgCTTCAgTTTCCgAAAgAT -3'
Ayd-BGlu-R	5'- AAgCTTTTTgTCATTgTCTACTTgCaaTC -3'
Y227F-F	5'-ggTATTACgTTTAATTTgACACCTg-3'
Y227F-R	5'-gTgTCAAATTAAACgTAATACCAATTTC-3'

G226Q/Y227F mutasyon bölgesini oluşturmak ve çoğaltmak amacıyla Snapgene yazılım programı kullanılarak *bgl*Ay9 WT genine göre ileri ve geri oligonükleotit primer ve mutasyon bölgelerini oluşturmak amacıyla mutasyon bölgesini içeren iki adet oligonükleitit primer olmak üzere toplamda 4 adet primer tasarlandı. *bgl*Ay9 WT geni için tasarlanan primerlerin 3' veya 5' uçlarına sonraki çalışmalarda uygun bir vektöre aktarabilmek için *NocI* ve *HindIII* restriksiyon enzim kesim bölgeleri olacak şekilde tasarlandı.

PCR tekniği ile β-glukozidaz geninde (bglAy9 WT) G226Q/Y277F mutasyon bölgelerinin oluşturulması

İstenilen bölgelerde nokta mutasyonu oluşturmak için mutagenez yöntemlerinden olan PCR temelli mutasyon yöntemi kullanıldı (Kocaefe 1999). Bu yöntem iki basamaklı PCR işleminden oluşur. Bu yöntemde her bir mutasyon için iki çift primer kullanılır.

Anoxybacillus ayderensis Ay9'dan elde edilen β-glukozidaz geni üzerinde G226Q/Y277F mutasyon bölgelerini oluşturmak için ilk basamakta, paralel olarak yaban tip β-glukozidaz (*bgl*Ay9 WT**)** için tasarlanmış ileri primer (Ayd-BGlu-F) ile mutasyon içeren geri primer (Y227F-R) ve yaban β- glukozidaz için tasarlanmış geri primer (Ayd-BGlu-R) ile mutasyon içeren ileri (Y227F-F) primerler, mutant *G226Q* β-glukozidaz genini içeren pET28a(+) klonu (KTÜ Moleküler Biyoloji ve Araştırma Laboratuvarından temin edildi) kalıp olarak kullanılmasıyla ayrı ayrı tüplerde amplifiye edildi. Amplifiye edilen iki fragmentin sırasıyla 5' veya 3' terminalinde mutasyonlu bölgeler oluşması hedeflendi. Oluşan bu iki farklı

fragment %1'ilk agaroz jelde 110 mA'de 15 dk yürütülerek kontrol edildi ve sonrasında jel pürifikasyon kiti (EcoSpin) ile jelden ekstrakte edildi.

İkinci basamakta kalıp olarak ilk basamakda elde edilen PCR fragmentleri ile yaban genin ileri (Ayd-BGlu-F) ve geri primerleri (Ayd-BGlu-R) kullanılarak mutant bölgeler tekrar amplifiye edildi. Sonuçlar, %1'lik agaroz jelde 110 mA'de 15 dk yürütülerek kontrol edildi.

Genin amplifikasyonu için kullanılan PCR koşulları:

- ilk denatürasyon; 94 °C'de 180 saniye
- ikinci denatürasyon; 94 °C'de 30 saniye
- Primerlerin bağlanması; 55 °C'de 40 saniye
- Uzama, 72 °C'de 90 saniye
- 72 °C'de 5 dakika olacak şekilde toplam 36 döngü oluşturuldu. PCR bileşenleri ve miktarları Tablo 9'da verilmiştir.

Tablo 9. PCR Bileşenleri ve Miktarları

PCR Bileşenleri	**PCR Amplifikasyonu için Kullanılan Miktar**
DdH2O	32,75 µl
Buffer (10X)(Promega)	10 µl
MgCI (50 mM)	3 µl
Primer-F (10 mM)	1 µl
Primer –R (10 mM)	1 µl
DNTP (10 mM)	1 µl
Taq DNA polimeraz (10u/ µl)	0,25 µl
Kalıp DNA (100 ng/ µl)	1 µl
Son Hacim	50 µl

***bglAy9 G226Q/Y227F* mutant β-Glukozidaz geninin pGEM®-T Easy vektörüne klonlanması**

Elde edilen PCR ürünü, firmanın öngördüğü şartlar altında pGEM®-T Easy klonlama vektörüne aktarmak için T4 DNA ligaz (Promega) varlığında, 16 °C'de 16 saat (gece boyu) inkübe edilerek ligasyon işlemi gerçekleştirildi. Ligasyon reaksiyonu için kullanılan bileşenler ve miktarları Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10. Ligasyon Reaksiyomu İçin Kullanılan Bileşenler ve Miktarı

Ligasyon için kullanılan bileşenler	Miktarları
T4 DNA ligaz Buffer (10X)	1 µl
pGEM®-T Easy vektörü	1 µl
ddH2O	4 µl
PCR Ürünü	3 µl
Toplam hacim	10 µl

Rekombinant pGEM®-T Easy vektörünün (pGEM®-T Easy vektörü+*bglAy9 G226Q/Y227F* geni) *E. coli* JM101 konak hücrelerine transformasyonu

İlk olarak $CaCl_2$ methoduyla (Brown 1990) hazırlanan *E. coli* JM101 konak hücresinden 200 µl alınarak, içerisinde 10 µl ligasyon ürünü bulunan steril mikrosantrifüj tüpe ve negatif kontrol olarak sadece 200 µl *E. coli* JM101 hücresi ($CaCl_2$ methoduyla hazırlanan) steril bir mikrosantrifüj tüpe aktarıldı. Ardından yaklaşık 30 dakika buz üzerinde bekletildi. Bekletilen transformant ve negatif kontrol hücrelerine 120 saniye 42 °C de ısı şoku uygulandı ve daha sonra tekrar buza alındı. Yaklaşık 5 dakika buz üzerinde bekletilen transformant ve negatif kontrol hücreleri üzerine 200 µl sıvı LB besiyeri ilave edilerek 37 °C'de yaklaşık 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında transformant ve negatif kontrol hücreleri daha önceden üzerine 40 µl IPTG (100 mM) ve 40 µl X-Gal (50 mM) yayılıp hazırlanmış olan amfisilinli (50 mg/ml) LB katı besiyeri üzerine yayıldı. Gece boyu 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası transformasyon petrileri +4 °C'de muhafaza edildi.

Rekombinant plazmitlerin restriksiyon endonükleazlar ile kesilmesi

Transformasyon sonucu oluşan mavi-beyaz koloniler içerisinden seçilen birkaç beyaz koloni, amfisilin (50 mg/ml) içeren LB içerisine aşılanarak, gece boyu 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında alkali liziz yöntemi (Birnboim and Doly 1979) ile hücrelerden plazmit izolasyonu yapıldı. Rekombinant plazmitlerden istenilen DNA parçasını içereni belirlemek amacıyla plazmit DNA'lar, *EcoRI* (promega) restriksiyon enzimi ve kesim için gerekli bileşenler ile reaksiyona tabii tutuldu. Reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra yaklaşık 2 saat 37 °C'de inkübe edildi. Daha sonra %1'lik agaroz jelde pozitif kontrol olarak PCR ürünü ve örnek grub olarakta kesim sonuçları eş zamanlı olarak 110 mA 'de 20 dk yürütülerek kontrol edildi. Kesim reaksiyonu için kullanılan bileşenler ve miktarları Tablo 11'da verilmiştir.

Tablo 11. Kesim Reaksiyon İçin Kullanılan Bileşenler ve Miktarlar

Bileşenler	**Miktarları**
Rekombinant Plazmit DNA	6 µl
Buffer (10X cutsmart)	1 µl
*EcoR*I (10 U/µl)	0,3 µl
ddH_2O	2,7 µl
Toplam hacim	10 µl

bglAy9 G226Q/Y227F geninin sekans analizi

Gen üzerinde G226Q/Y227F mutasyon bölgelerinin oluştuğundan emin olmak için kesim sonucunda içerisinde istenilen uzunlukta gen bulunduran plazmit DNA'lar (rekombinant pGEM®-T Easy Vektörü), *E.coli* hücrelerinden Plazmit İzolasyon Kiti (NucleoSpin) ile izole edildi. Sekans analizi için Macrogen (Hollanda) şirketine gönderildi.

bglAy9 G226Q/Y227F geninin pET28a (+) ifade vektörüne klonlanması

PCR ile amplifiye edilen *bgl*Ay9 *G226Q/Y227F* β-glukozidaz geninin uçlarında *NcoI* ve *HindIII* restriksiyon endonükleaz tanıma bölgeleri bulunur. Bu nedenle, rekombinant pGEM-T Easy vektörü (İçerisinde *bgl*Ay9 *G226Q/Y227Q* genini içeren vektör) ve pET28a (+) ifade vektörü (içerisinde herhangi bir gen bulundurmayan vektör), eş zamanlı olarak *HindIII ve NcoI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile 2 saat 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında örnekler %1'lik agaroz jelde 90 mA'de 25 dk yürütüldü. Jel ekstraksiyon kiti ile firmanın (EcoSpin) önerdiği koşullar dikkate alınarak jelden saflaştırıldı. Gerçekleştirilen kesim reaksiyon şartları Tablo 12'de verilmiştir.

Tablo 12. Kesim Reaksiyon İçin Kullanılan Bileşenler ve Miktarları

Bileşenler	**Miktarları**
Rekombinant Plazmit DNA/Boş pET28a(+)	6 ,25 µl
Buffer (10X cutsmart)	4 µl
NcoI (10 U/ µl)	1 µl
HindIII (10 U/µl)	1 µl
ddH_2O	9 µl
Toplam hacim	40 µl

*bglAy9 G226Q/Y227F geni*nin pET28a (+) vektörüne ligasyonu için, jelden çıkarılan pET28a(+) ifade vektörü ve *bglAy9 G226Q/Y227F geni* doğrudan ligaz enzimi ile reaksiyona tabii tutuldu. Reaksiyon karışımı, gece boyunca 16 °C'de inkübe edildi. Reaksiyon için kullanılan bileşenler ve miktarları Tablo 13'de verilmiştir.

Tablo 13. *bglAy9 G226Q/Y227F geni*nin pET28a (+) İfade Vektörüne Ligasyonu İçin Kullanılan Bileşenler ve Miktarları

Bileşenler	**Miktarları**
T4 DNA ligaz tamponu (10X)	1 µl
pET28a (+) vektör	2 µl
T4 DNA Ligaz	1 µl
insört DNA (*G226Q/Y227F*)	4 µl
Toplam hacim	10 µl

Ligasyon ürünü, daha önce $CaCl_2$ methodu (Brown 1990) ile hazırlanmış *E. Coli* JM101 konak hücrelerine önceki transformasyon reaksiyonu ile aynı şartlar altında aktarıldı. Elde edilen transformant ve negatif kontrol kanamisinli (50mg/ml) LB katı besiyeri üzerine yayılarak gece boyu 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası transformantlar +4 °C'de muhafaza edildi.

Rekombinant pET28a (+) klonun restriksiyon endonükleazlar ile teyit edilmesi

Transformasyon sonrası petride oluşan beyaz kolonilerden birkaç koloni seçildi ve kanamisin (50mg/ml) içeren sıvı LB besiyerine inokülasyon yapıldı. Örnekler 37 °C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı. Gece kültürlerinden alkali liziz yöntemi ile plazmit izolasyonları yapıldı. Elde edilen plazmitler, *HindIII* ve *NcoI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile reaksiyon oluşturuldu. Reaksiyon karışımı 37 °C'de 2 saat inkübasyona bırakıldı. Sonuçların doğruluğu, PCR ürünü, DNA marker (Promega) ve kesim yapılan plazmitlerin aynı anda %1'lik agaroz jelde 115 mA'de yürütülmesiyle teyit edildi.

Rekombinant pET28a (+) vektörlerinin *E. coli* BL21 (D3) expresyon hücrelerine transformasyonu

Elde edilen rekombinant pET28a (+) ifade vektörleri, $CaCl_2$ metoduyla (Brown 1990) hazırlanan *E. coli* BL21 konak hücresinden 200 µl alınarak, içinde 2 µl rekombinant pET28a(+) klonu bulunan steril bir mikrosantrifüj tüpe ve negatif kontrol olarak sadece 200 µL *E. coli* BL21 hücresi ($CaCl_2$ methoduyla hazırlanan hücre) steril bir mikrosantrifüj tüpe aktarıldı. Yaklaşık 30 dakika buz üzerinde bekletildi. Bekletilen transformat ve negatif kontrol hücrelerine 42 °C de 120 saniye ısı şoku uygulandı ve daha sonra tekrar buza alındı. Yaklaşık 5 dakika buz üzerinde bekletilen örneklere 200 µl sıvı LB besiyeri ilave edilerek 37 °C'de yaklaşık 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında transformat ve negatif kontrol hücreleri daha önce hazırlanmış kanamisinli (50 mg/ml) LB katı besiyeri üzerine yayıldı ve gece boyu 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası transformasyon petrileri +4 °C'de muhafaza edildi.

bglAy9 G226Q/Y227F mutant genin aşırı ekpresyonu

Rekombinant pET28a **(+)** vektörünü içeren kolonilerden (*E. coli* BL21 (DE)) kanamisin (50mg/ml) antibiyotiği ile desteklenmiş LB sıvı besiyerine ekim yapıldı ve 37 °C'de 16 saat (gece boyu) inkübe edildi. Hazırlanan gece kültürünün konsantrasyonu 1/10 oranında su ile seyreltilerek spektrofotometrede 600 nm'de ölçüldü. 0,1 OD değeri baz alınarak 100 ml LB sıvı besiyeri için spektrofotometrede çıkan sonuca göre işlem yapıldı. Hesaplama sonucunda elde edilen miktarda gece kültüründen alınıp, içerisinde 100 µl kanamisin (50mg/ml) antibiyotiği bulunan 100 ml LB sıvı besiyerine aktarılarak alt kültür oluşturuldu. Yaklaşık 90 dakika 37 ° C'de inkübe eildikten sonra tekrardan spektrofotometrede OD_{600} nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Alt kültürün konsantrasyonu 0,7-0,8 OD'ye ulaştığında, protein ekspresyonu için 100 µl IPTG (0,5 mM) ilave edilerek 37 °C'de 4 ve 6 saat ile 16 °C'de 16 saat olacak şekilde farklı şartlarda indübasyona bırakıldı (Zada *et al.* 2021).

İnkübasyon sonrası hücreler 1,5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüplere alındı ve 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek üst faz uzaklaştırıldı ve hücreler toplandı. Hücre içi proteinlerin açığa çıkarılması için ilk olarak hücreler fosfat tamponu (50 mM fosfat, pH 7,0) ile muamele edildi ve daha sonra % 60'lık bir ses yoğunluğu kullanılarak 3 mm titanyum prob ile 3x60 saniye süreyle sonikasyon işlemi gerçekleştirildi. Uygulanan tüm adımlar buz üzerinde gerçekleştirildi. Sonikasyon işleminden sonra proteinlerin diğer hücresel moleküllerden ayrılması için 15.000 rpm'de 15 dakika boyunca +4 °C'de santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası kullanılmak üzere süpernatant (ham ekstrat) +4 °C'de muhafaza edildi.

BglAy9 G226Q/Y227F enziminin aktivite tayini

Ham ekstrat içerisinde istenilen BglAy9 G226/Y227F enziminin varlığını teyit etmek amacıyla 5 µl ham ekstrat, 5 µl substrat (*p*NPG -10 mM), 250 µl sodyum fosfat tamponu (100 mM pH-7) ve son hacim 500 µl olacak şekide ddH_2O eklenerek reaksiyon oluşturuldu. .Oluşturulan reaksiyon 50 °C'de 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası ortamda renk değişiminin varlığı kontrol edildi.

BglAy9 G226Q/Y227F enziminin saflaştırılması

Ham ekstrat saflaştırılmadan önce, 50 °C de 30 dakika ön denatürasyona tabii tutuldu. Ardından 5-10 saniye santrifüj edilerek üst faz saflaştırılmak üzere başka bir steril mikrosantrifüj tüpüne alındı.

BglAy9 G226Q/Y227F enziminin (protein) C terminalinde His-Tag proteini olduğu için, enzimin saflaştırılması Metal İyon Afinite Kromatografisi (Ni–NTA) (GE Healthcare, Fairfield, ABD) ile gerçekleştirildi. Saflaştırma işleminde A ve B olmak üzere iki farklı tampon

kullanıldı. İlk olarak kolon, 10 ml A tamponu ile dengelendi. Ardından, ham ekstrat 1/3 oranında A tampon ile seyreltildi ve dengelenmiş kolona aktarıldı. İstenilen protein dışındaki diğer proteinlerin uzaklaştırılması için kolon 10 ml A tamponu ile yıkandı. Son olarak istenilen proteinin kolondan ayrıştırılması için 3 ml B tamponu kolona aktarıldı ve her biri 1 ml olacak şekilde saf protein fraksiyonları steril 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplere toplandı. Saf protein fraksiyonları karakterizasyon için +4 ºC'de muhafaza edildi.

BglAy9 G226Q/Y227F enziminin SDS poliakrilamid jel elektroforezinde görüntülenmesi

BglAy9 G226Q/Y227F proteininin saflığı ve moleküler ağırlığını belirlemek için SDS PAGE yöntemi kullanıldı. Yürütme %12 jel kullanılarak 15 mA'lık bir akım altında gerçekleştirildi. Örnekler 15 µl saf protein fraksiyonu (kolondan saflaştırılan protein) ile 5 µl yükleme boyası, 5 µl ham ekstrat (saflaştırılmamış protein karışımı) ile 15 µl yükleme boyası ve 5 µl Protein marker (Promega) ile 15 µl yükleme boyası bir araya getirilerek oluşturuldu. Proteinlerin denature etmek için, örnekler 5 dakika 95 °C'de inkübe edildi ve daha sonar, hazırlanan %12'lik SDS jeline yüklendi. Örnekler yaklaşık 40 dk 15 mA'de yürütüldü. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel, bir saat boyunca Commansie Brillant Blue R-250 (%0.125 Commassie Brillant Blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit) ile boyandı. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra jel, solüsyon I içerisine alındı bir saat inkübe edilerek proteinler jele sabitlendi. Son olarak jel, solüsyon II ile yıkandı.

Enzim konsantrasyon tayini

Saflaştırılan protein (enzim) konsantrasyonu Bovine Serum Albümin (BSA) ile hazırlanan standart eğim grafiği kullanılarak, Bradford yöntemi ile belirlendi (Bradford 1976) . Kör için 3 ml Comassiea-Brilant Blue G-250 boyası ve 100 µl NaCI (0.15 M) ,örnek için 3 ml Comassie Brilant Blue G-250 boyası, 80 µl NaCI (0.15 M) ile 20 µL saf protein eklenerek reaksiyon oluşturuldu. 15 dakika oda sıcaklığında bekletilen reaksiyon, spektrofotometre ile 595 nm dalga boyun da ölçülerek protein miktarı belirlendi.

BglAy9 G226Q/Y227F enzimin biyokimyasal karakterizasyonu

Optimum sıcaklık

Enzimin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla 30,40,50,60,70,80,90,100 °C'lik ısıtıcı bloklar ayarlandı. 15 µl subsrat (*p*NPG-10 mM) 10 µl protein (1/1000 seyreltilmiş) ,250 µl fosfat tampon (100 mM-pH 7) ve son hacim 500 µl olacak şekilde ddH_2O tamamlanan reaksiyon karışımları ısıtıcı bloklarda 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi bittikten sonra

reaksiyonu durdurmak için her bir örnek üzerine 500 µl Na_2CO_3 (1 M) eklendi ve spektrofotometre ile 405 nm'de ölçüm yapıldı (Jäger 2001).

Optimum pH

Enzimin optimum pH'sını belirlemek amacıyla, 50 mM sodyum sitrat tampon (pH 3-5), 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 6-7), 50 mM potasyum fosfat tampon (pH 8) ve 50 mM Glisin-NaOH tamponu (pH 9-10) ile 15 µl substrat (*p*NPG-10 mM) 10 µl protein (1/1000 seyreltilmiş) ve son hacim 500 µl olacak ddH_2O eklenerek reaksiyon oluşturuldu. Reaksiyon 50 °C de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi bittikten sonra reaksiyonu durdurmak için her bir reaksiyon içerisine 500 µl Na_2CO_3 (1 M) eklendi ve spektrofotometre de 405 nm de ölçüm yapıldı.

Isı stabilitesi

Enzim stabilitesi üzerine ısının etkisini incelemek için enzim, 50 mM sodyum fosfat tamponu ile karıştırılarak 40,50 ve 60 °C sıcaklıklarda ayrı ayrı inkübe edildi. Düzenli aralıklarla enzim aktivitesi, *p*NPG substratı (10mM), 50 mM sodyum fosfat (pH-6.0) tamponu ve 40,50 ve 60 °C bekletilen enzimler ile ayrı ayrı reaksiyon oluşturuldu ve 50 °C'de 30 dakika inkübe edilerek kontrol edildi. Bu işlem enzim aktivitesinin %50'sini kaybedene kadar tekrar edildi. Sonuç olarak enzimin kalan aktivite yüzdesi, sıfırıncı saatte elde edilen enzim aktivitesi ile karşılaştırılarak hesaplandı.

pH stabilitesi

Enzim stabilitesi üzerine pH'nın etkisini incelemek için, 50 mM sodyum sitrat tamponu (pH 3-5), 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7-6), 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 8) ve 50 mM Gly-NaOH (pH9-10) tamponu ile bir miktar enzim karıştırılarak 50 °C'de inkübe edildi. Aktivite %50'nin altına düşene kadar düzenli aralıklarla enzim aktiviteleri *p*NPG substratı (10mM), 50 mM sodyum fosfat (pH-6.0) tamponu ile reaksiyon oluşturuldu ve 50 °C'de 30 dakika bekletilerek kontrol edildi. Sonuç olarak enzimin kalan aktivite yüzdesi, sıfırıncı saatte elde edilen enzim aktivitesi ile karşılaştırılarak hesaplandı.

Enzim üzerine metal iyonlarının etkisi

Metal iyonlarının bir kısmı geçiş metali, bir kısmı toprak alkali, bir kısmı da alkali metal olarak ayrılmıştır. Alkali metaller +1 değerlikli, toprak alkali metalleri +2 değerlikli, geçiş metalleri ise değişken değerliklidir. Hücre içerisinde +1, +2 ve değişken değerlikli metaller bulunmakta ve bunlar çeşitli fonksiyonları yerine getirmektedir. Metal iyonlarının enzim üzerindeki etkisini belirlemek için 0,5 mM, 1 mM ve 5 mM konsantrasyonlarda $NiCl_2$, $MgCl_2$,

$FeSO_4$, $CaCl_2$, $MnSO_4$, $CoCl_2$, $ZnSO_4$, KCl, $HgCl_2$ ve $CuSO_4$ metal tuzları kullanıldı. Reaksiyon iki adımda gerçekleştirildi. İlk adımda enzim ile karıştırılan 0,5 mM, 1 mM, ve 5 mM konsantrasyonda metal tuzlar ve kontrol grubu olarak metal eklenmeyen enzim, optimum sıcaklıkta (50°C') 30 dakika inkübe edildi. İkinci adımda inkübasyon süresü bittikten sonra her bir reaksiyon üzerine 15 µl *p*NPG substratı (10 mM) ,250 µl fosfat tampon (100 mM -pH 6) ve son hacim 500 µl olucak şekilde ddH_2O eklenen reaksiyon 50 C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra 500 µl Na_2CO_3 (1 M) eklenerek reaksiyon sonlandırıldı. Sonuçlar spektrofotometrede 405 nm dalga boyunda analiz edildi.

Elde edilen sonuçlar kontrol grubuyla karşılaştırıldı. Kontrol grupları tüm parametler için %100 kabul edildi. Örneklerin kalan aktiviteleri % de inhibisyon olarak adlandırıldı.

Enzim aktivitesi üzerine organik çözücülerin, iyonik/non-iyonik deterjanların ve potansiyel inhibitörlerin etkisi

Organik çözücülerin (Dioksan, DMSO, Propanol, Etanol, Metanol, Butanol ve Gliserol [%5, % 10 ve % 20 v/v]). İyonik (SDS) ve non-iyonik deterjanların (Triton X-100, Tween-20 [% 1, % 5 ve % 10 v/v]) ve potansiyel inhibitörlerin (DTT, DEPC, EDTA, EGTA, Beta-merkaptoetanol PMSF [1 mM, 5 mM, 10 mM]) enzim üzerine etkisi, metal etkisinde kullanılan reaksiyon şartları uygulanarak incelendi.

Elde edilen sonuçlar kontrol grubuyla karşılaştırıldı. Kontrol grupları tüm parametler için %100 kabul edildi. Örneklerin kalan aktiviteleri % de inhibisyon olarak adlandırıldı.

Glukoz toleransı

Glukozun enzim aktivitesi üzerindeki etkisi farklı glukoz konsantrasyonu ile incelendi. İlk olarak 10 µl enzim (1/1000 seyreltilmiş) ile farklı konsantrasyonlarda (1-12 M) glukoz ve kontrol grubu olarak glukoz muamele edilmemiş enzim, 50 °C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra her bir reaksiyon üzerine 15 µl *p*NPG substratı (10 mM), 250 µl fosfat tampon (100 Mm- pH 6) ve son hacim 500 µl olucask şekilde ddH_2O eklenen reaksiyon 50 °C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra 500 µl Na_2CO_3 (1 M) solüsyonu eklendi. Sonuçlar spektrofotometre de 405 nm dalga boyunda incelendi.

Elde edilen sonuçlar kontrol grubuyla karşılaştırıldı. Kontrol grubları tüm konsantrasyonlar için %100 kabul edildi. Örneklerin kalan aktiviteleri %'de inhibisyon olarak adlandırıldı

Enzim kinetiği

BglAy9 G226Q/Y227F enziminin pNPG varlığında kinetik karakterizasyonu

BglAy9 G226/Y227F enziminin (*p*NPG) substrat ile kinetik karakterleri, 0.01 ile 0,8 mM arasındaki substrat (*p*NPG) konsantrasyonlarında belirlendi. Her bir reaksiyon, 0,2 mg enzim, *p*NPG substratı (10 mM), 250 µl sodyum fosfat tamponu ((100 mM-pH 6,0) ve son hacim 500 µl olacak şekilde ddH_2O eklenerek hazırlandı ve 50 ºC'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası her bir reaksiyon üzerine 500 µl (1M) Na_2CO_3 tamponu eklendi ve spektrofotometrede 405 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Spektrofotometrede elde edilen veriler ile Michaelis-Menten ve Lineweaver – Burk eğrileri oluşturuldu ve enzimin K_m ile V_{max} noktaları hesaplandı. Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerleri Lineweaver – Burk eğrisinde x ve y eksenlerinin kesiştiği noktalara karşılık gelen değerlerin tersi olarak belirlendi. (Lineweaver ve Burk 1934).

BglAy9 G226Q/Y227F enziminin Kukurbitasin E-2-0-glikozit varlığında kinetik karakterizasyonu

BglAy9 G226/227 enziminin, Kukurbitasin E-2-0-glikozit polifenolik substratı ile enzim kinetik karakterleri, 0,015-0,1 konsantrasyonlarda subtsrat ve 47 mg enzim kullanılarak belirlendi. Her bir substrat konsantrasyonu için; 47 mg enzim, Kukurbitasin E-2-0-glukozit substratı (1 mM), 250 µl sodyum fosfat tampon (100 mM- pH 6) ve son hacim 500 µl olacak şekilde ddH_2O eklenerek reaksiyonlar hazırlandı ve 50 ºC'de 120 dakika inkübe edildi. Reaksiyon tüpleri her 15 dk bir alt üst edilerek substratın aşağı çökmesi engellendi. İnkübasyon sonrası ortamda serbest bırakılan glukoz konsantrasyonu GOPOD (Neogen) kiti kullanılarak firmanın uygun gördüğü koşullar altında test edildi. Test sonrasında elde edilen veriler ile Michaelis-Menten ve Lineweaver – Burk grafikleri oluşturuldu ve enzimin K_m ile V_{max} değerleri hesaplandı.

BglAy9 G226Q/Y227F enziminin Mirisetin O-3-glikozit varlığında kinetik karakterizasyonu

BglAy9 G226Q/Y227F enziminin Mirisetin O-3-glikozit polifenolik substratı ile enzim kinetik karakterleri 0,01-0,09 mM konsantrasyonlarda subtsrat ve 47 mg enzim kullanılarak belirlendi. Her bir substrat konsantrasyonu için; 47 mg enzim, Mirisetin O-3-glikozit substratı, 250 µl sodyum fosfat tampon (100 mM-pH 6**)** ve son hacim 500 µl olacak şekilde ddH_2O eklenerek reaksiyonlar hazırlandı ve 50 ºC'de 120 dakika inkübe edildi. Reaksiyon tüpleri her 15 dk bir alt üst edilerek substratın aşağı çökmesi engellendi. İnkübasyon sonrası ortamda serbest bırakılan glukoz konsantrasyonu GOPOD(Neogen) kiti kullanılarak firmanın uygun

gördüğü koşullar altında test edildi. Test sonrasında elde edilen veriler ile Michaelis-Menten ve Lineweaver – Burk grafikleri oluşturuldu ve enzimin K_m ile V_{max} değerleri hesaplandı.

BglAy9 G226Q/Y227F enziminin Polidatin varlığında kinetik karakterizasyonu

BglAy9 G226Q/Y227F enziminin, polidatin polifenolik substratı ile enzim kinetik karakterleri 0,5 ila 8 mM konsantrasyonlarda subsrat, 10 mg enzim ve 50 mM sodyum fosfat tamponu ile oluşturuldu. Oluşturulan reaksiyon ve 50 ºC'de 30 dakika inkübe edildi. Ardından reaksiyon sonucunda oluşan glukoz konsantrasyonunu belirlemek için DNS yöntemi kullanıldı (Deshavath 2020). İnkübasyon sonrası her bir reaksiyon üzerine 1:1 oranda DNS solüsyonu eklendi ve kaynar suda 10 dakika indübe edildi. Sonuçlar daha önce glukoz ile hazırlanan standart eğim grafiği kullanılarak, spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda ölçüldü. Elde edilen veriler ile Michaelis-Menten ve Lineweaver – Burk grafikleri oluşturularak enzimin K_m ile V_{max} değerleri hesaplandı.

Deglikozile subsratların DPPH yöntemi ile antioksidan potansiyelinin değerlendirilmesi

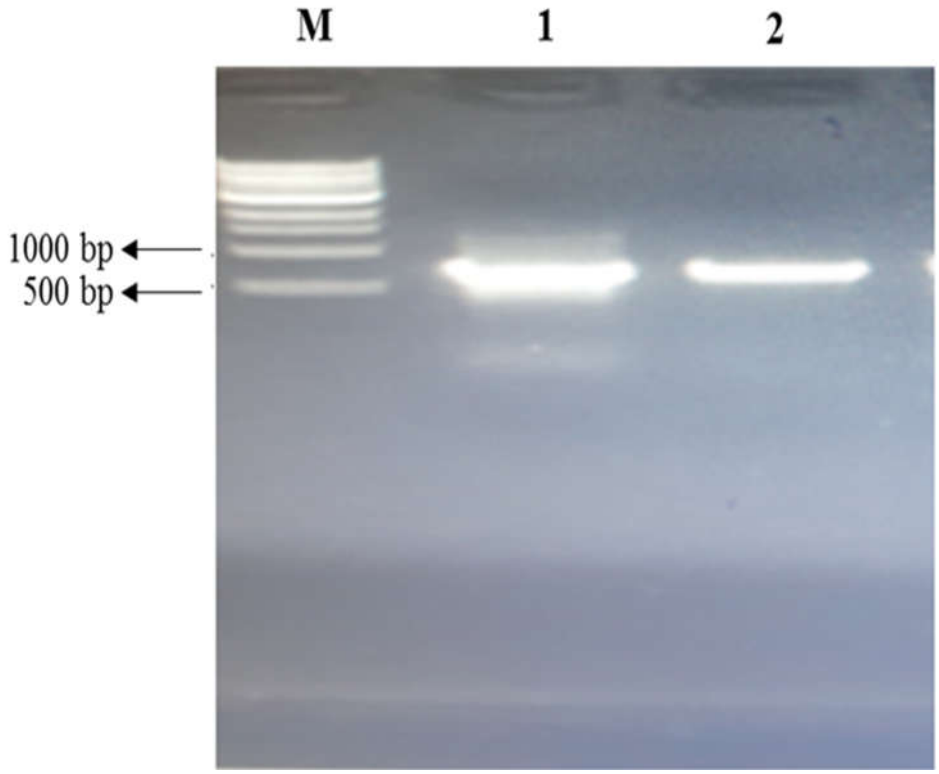
BglAy9 G226Q/Y227F enzimi ile deglikolize olan polifenolik susbstratların (mirisetin O-3-glikozit, polidatin ve kukurbitasin 2-E-O-glikozit) radikal süpürme potansiyeli DPPH testi aracılığıyla belirlendi (Sagar *et al.* 2011). Test grubu için 150 µl numune (BglAy9 G226Q/Y227F ile muamele edilmiş polifenolik substrat), 20 µl DPPH (1 mM -%95 metanolde çözülmüş) son hacim 200 µl olucak şekilde 30 µl metanol (%95) eklendi ve kontrol grubu olarakda 180 µl metanol (%95) ve 20 µl DPPH (1 mM) ile reaksiyonlar oluşturuldu. Ayrıca enzim ile muamele edilmemiş substrat, test grubu ile aynı şartlar altında reaksiyona tabii tutuldu. Oda sıcaklığında 20 dakika karanlıkta inkübe edilen reaksiyonların, inkübasyondan sonra spektrofotometrede 517 nm dalga boyunda ölçümü yapıldı. Ölçüm sonucunda elde edilen veriler ile yüzde radikal süpürme aktivitesi aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\%\ \text{Radikal Süpürme Aktivitesi} = \frac{\text{Kontrolün Absorbansı} - \text{Numunenin Absorbansı}}{\text{Kontolün Absorbansı}} * 100$$

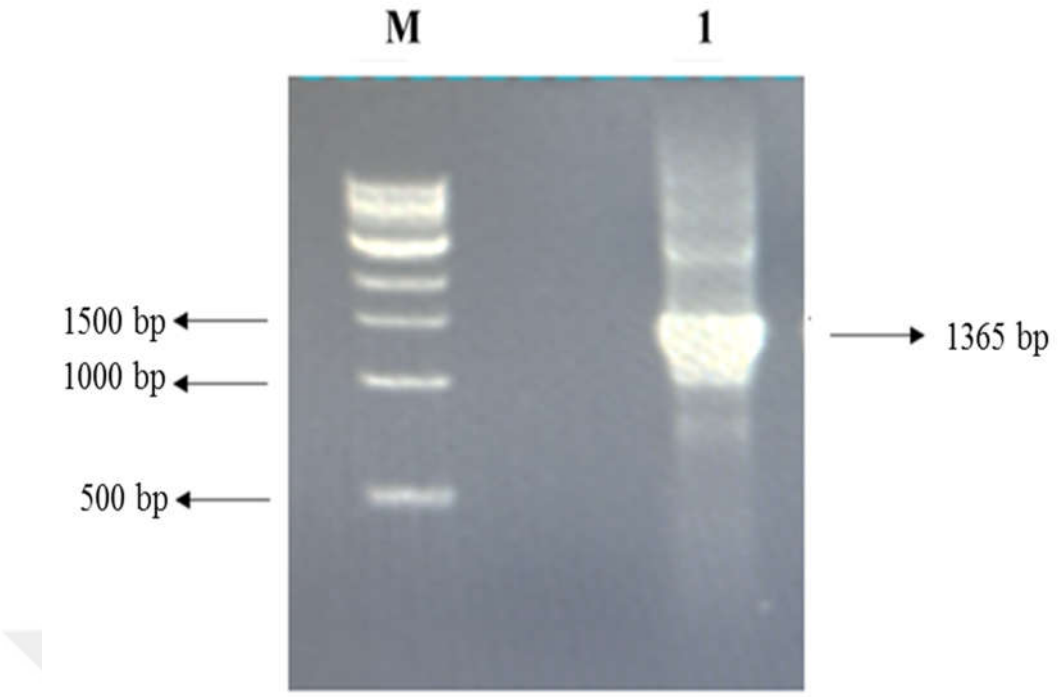
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

bglAy9 G226Q/Y227F geninin Oluşturulması

*bglAy9 G226Q/Y227F geni*ni PCR temelli mutagenez yöntemi ile oluşturmak için, kalıp olarak *G226Q* β-glukozidaz genini içeren pET28a(+) klonu (KTÜ Moleküler Biyoloji ve Araştırma Laboratuvarı temin edildi) kullanıldı. Birinci amplifikasyon sonucunda yaklaşık 700 bp (Şekil 13) DNA fragmentleri elde edilirken, ikinci amplifikasyon sonucunda yaban tip ile aynı uzunlukta (1365 bp) (Şekil 14) DNA fragmenti elde edildi.



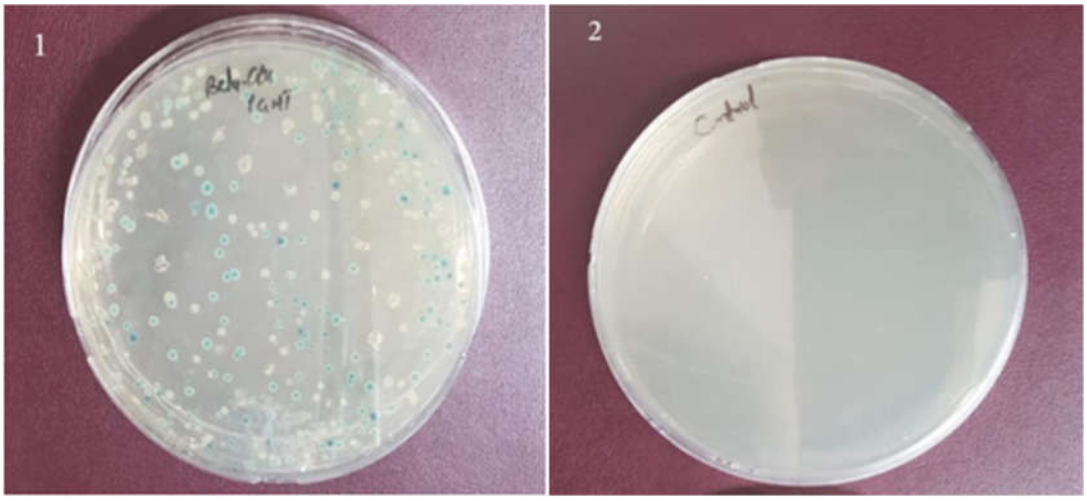
Şekil 13. *bglAy9 G226Q/Y227F geni* için birinci basamakta oluşturulan PCR ürünlerinin doğrulanması. (M) DNA marker, (1) ilk basamakda istenilen birinci ~700 bp'lik PCR ürünü, (2) ilk basamakda istenilen ikinci ~ 700 bp'lik PCR ürünü.



Şekil 14. *bglAy9 G226Q/Y227F geni* için ikinci basamakta oluşturulan PCR ürünlerinin doğrulanması, (M) DNA marker, (1) İkinci basamakda elde edilen 1365 bp'lık PCR ürünü

Rekombinant pGEM®-T Easy Vektörünün (pGEM®-T Easy Vektörüne +PCR ürünü) *E. coli* JM101 Konak Hücrelerine Transformasyon Sonucu

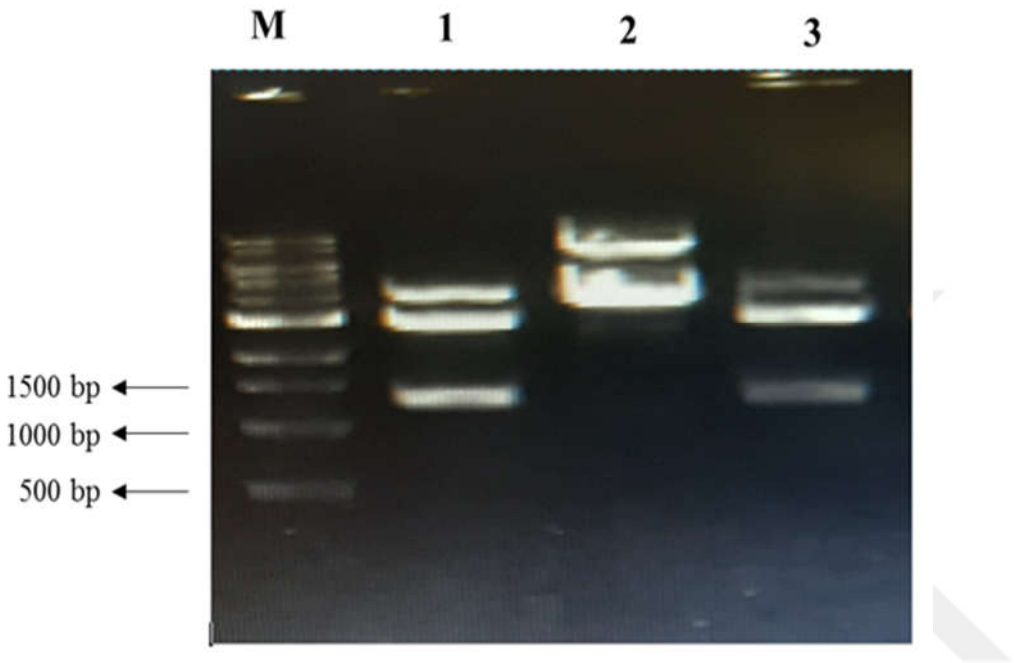
Ligasyon ürünü konak hücre olarak seçilen $CaCI_2$ metodu ile kompetant hale getirilmiş *E.coli* JM101 hücresine transformasyonu gerçekleştirildi. Sonuç olarak ligasyon ürünü içeren petrilerde (pozitif kontrol) mavi beyaz koloniler gözlemlenirken, ligasyon ürünü içermeyen (negatif kontrol) petrilerde herhangi mikroorganizma büyümesi gözlemlenmedi (Şekil 15).



Şekil 15. Rekombinant pGEM®-T Easy vektörünün *E. coli* JM101 konak hücresine transformasyon sonucu. 1) Pozitif kontrol 2) Negatif kontrol sonucu

Rekombinant pGEM®-T Easy Plazmitlerin Endonükleaz Restriksiyon Enzimi ile Kesim Sonuçları

PCR ürününün pGEM®-T Easy vektörüne klonlanmasının teyidi için izole edilmiş plazmitlerin *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesimi yapıldı. Sonuç olarak PCR ürünü ile aynı boyutta (1365 bp) olan DNA fragmenti gözlendi ve içerisinde istenilen büyüklükte gen dizisi bulunduran rekombinant plazmitler belirlendi (Şekil 16).



Şekil 16. *bglAy9 G226Q/Y227F* β-glukozidaz geninin pGEM®-T Easy vektörüne klonlanmasının teyit edilmesi, (M) DNA marker, *EcoRI* enzimi ile muamele edilmiş rekombinant plazmit (1-3), *EcoRI* enzimi ile muamele edilmemiş plazmit(2).

Sekans Analiz Sonuçları

İçerisinde istenilen büyüklükte gen dizisi bulunduran recombinant pGEM®-T Easy plazmitleri *E. coli* JM101 hücrelerinden izole edildi ve tez kapsamında istenilen mutasyon bölgelerinin oluştuğunu kanıtlamak amacıyla sekansa gönderildi. Sekans sonrası gönderilen sonuçların okumaları BioEdit programı kullanılarak kontrol edildi ve elde edilen DNA dizisinden primer ve vektör bölgeleri çıkarıldı. DNA dizisi, NCBI veri tabanında bulunan BLAST kısmında *Anoxybacillus ayderensis* Ay9'un β-glukozidaz gen dizisi ile hizalandı ve ExPASy programı ile amino asit dizisine çevrildi. Belirlenen amino asit dizisi, NCBI veri tabanında Protein Blast kısmında *Anoxybacillus ayderensis* Ay9'un β-glukozidaz amino asit dizisi ile hizalandı ve tez kapsamında istenildiği gibi 227. bölgedeki trozin (Y) amino asiti yerine istenilen fenilalainin (F) ve 226. bölgede glisin (G) amino asiti yerine glutamat (Q) amino asitinin oluştuğu gözlendi (Şekil 17).

```
WildTypeMVLQFPKDFIWGAATSSYQIEGTATGEDKIYSIWDHFSRIPGKVANGDNGDIAIDHYNRY 60
Mutant  MVLQFPKDFIWGAATSSYQIEGTATGEDKIYSIWDHFSRIPGKVANGDNGDIAIDHYNRY 60
        ************************************************************

WildTypeVEDIALMKALHLKAYRFSTSWARLYCETPGKFNEKGLDFYKRLVHELLENGIEPMLTIYH 120
Mutant  VEDIALMKALHLKAYRFSTSWARLYCETPGKFNEKGLDFYKRLVHELLENGIEPMLTIYH 120
        ************************************************************

WildTypeWDMPQALQEKGGWENRDIVHYFQEYAAFLYENLGDVVKKWITHNEPWVVTYLGYGNGEHA 180
Mutant  WDMPQALQEKGGWENRDIVHYFQEYAAFLYENLGDVVKKWITHNEPWVVTYLGYGNGEHA 180
        ************************************************************

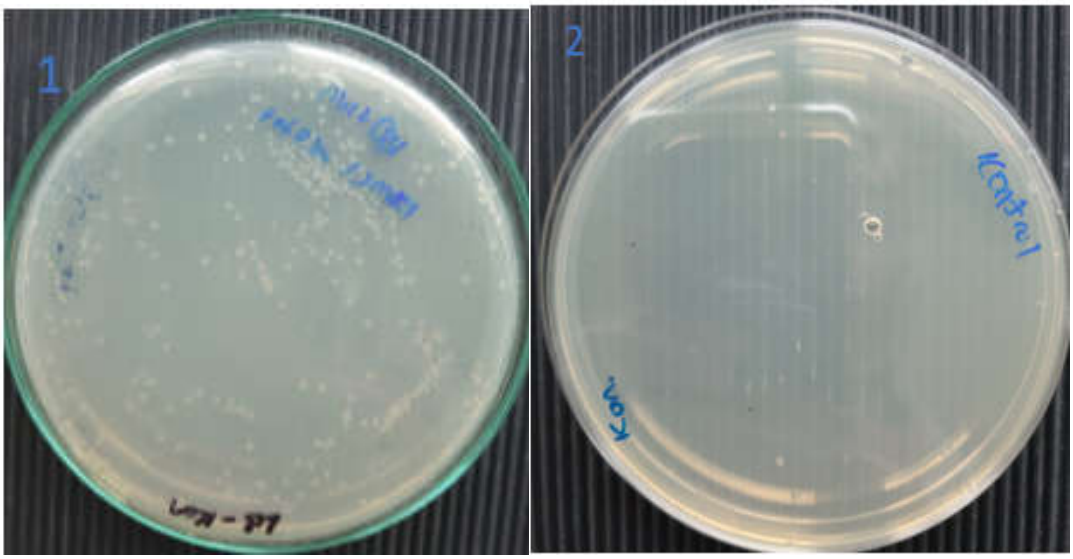
WildTypePGIQNFTSFLKAAHHVLLSHGEAVKAFRAIGSKDGEIGITLNLTPGYAVDPKDEKAVDAA 240
Mutant  PGIQNFTSFLKAAHHVLLSHGEAVKAFRAIGSKDGEIGITLNLTPQFAVDPKDEKAVDAA 240
        ******************************************** :**************

WildTypeRKWDGFMNRWFLDPVFKGQYPADMLEVYKDYLPDVYKEGDLQTIQQPIDFFGFNYYSTAT 300
MutantRKWDGFMNRWFLDPVFKGQYPADMLEVYKDYLPDVYKEGDLQTIQQPIDFFGFNYYSTAT  300
```

Şekil 17. *Anoxybacillus ayderensis* Ay9'un β-glukozidaz amino asit dizisi ile BglAy9 G226Q/Y227F amino asit dizisinin BLAST sonucu (sarı renk ile belirtilen kısım mutasyon bölgesini göstermektedir)

Rekombinant pET28a(+) vektörünün *E. coli* JM101 Konak Hücrelerine Transformasyon Sonucu

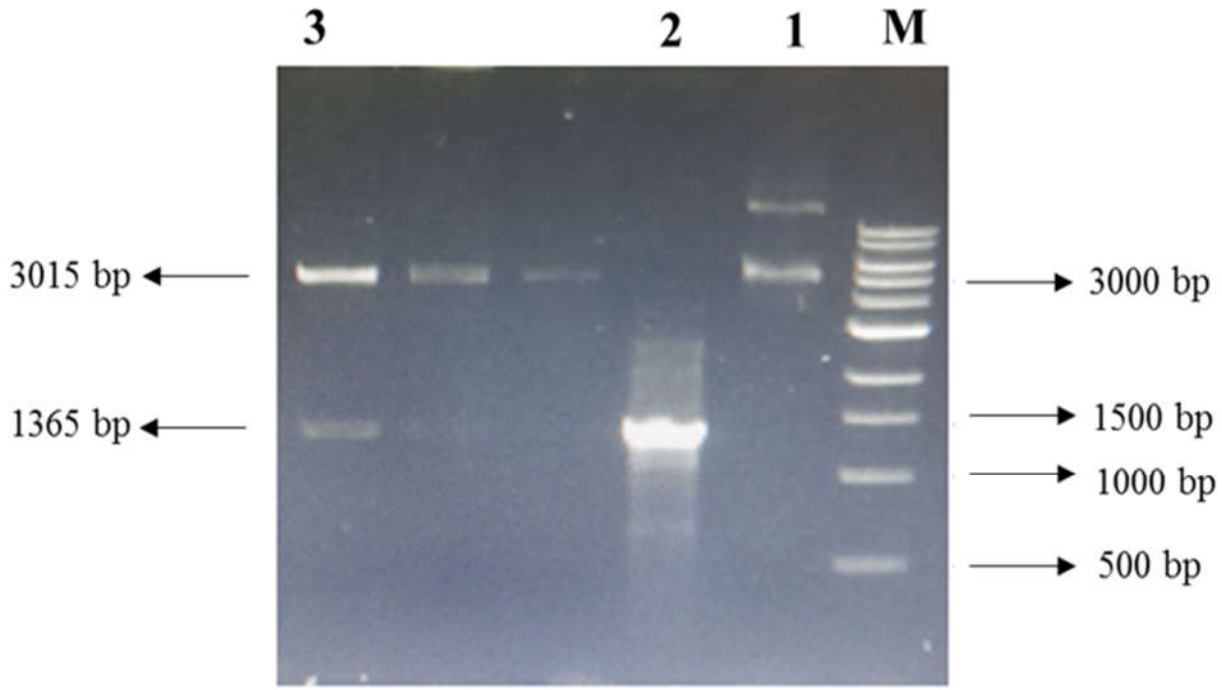
$CaCI_2$ metodu ile kompetant hale getirilmiş *E.coli* JM101 konak hücrelerine, ligasyon ürünün transformasyonu gerçekleştirildi. Sonuç olarak ligasyon ürünü içeren petrilerde beyaz koloniler (Transformant) (Şekil 18-1), ligasyon ürünü içermeyen (negatif kontrol) petrilerde herhangi mikroorganizma büyümesi gözlemlenmedi (Şekil 18-2).



Şekil 18. Rekombinant pET28a (+) ifade vektörünün *E. coli* JM101 konak hücresine transformasyon sonucu, 1) Transformant, 2) Negatif kontrol sonucu.

Rekombinant pET28a (+) vektörlerinin doğrulanması

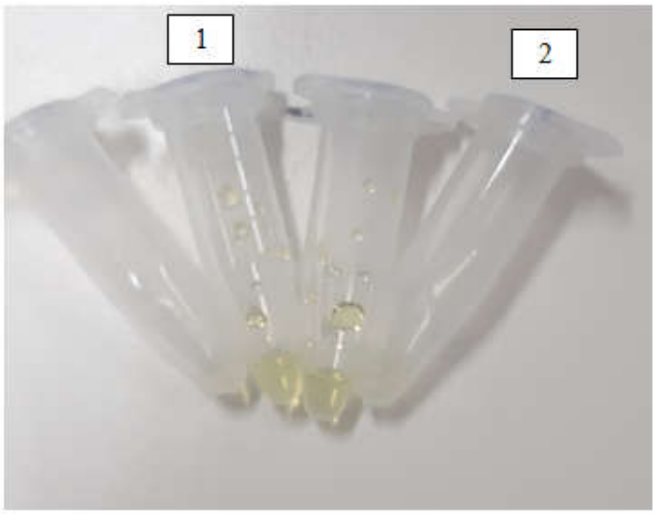
*b*glAy9 *G226/Y227F* geninin pET28a (+) ekspresyon vektörüne klonlandığını kontrol etmek amacıyla *NcoI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri ile kesim yapıldı. Kesim sonuçları, PCR ürünü ve DNA marker ile karşılaştırıldı. Sonuç olarak istenilen uzunlukda DNA fragmenti gözlendi ve istenilen gen dizisini içeren rekombinant pET28a(+) ifade vektörleri belirlendi (Şekil 19).



Şekil 19. *bglAy9 G226Q/Y227F geni*nin pET28a (+) ekspresyon vektörüne klonlanmasının teyit edilmesi. (M) DNA marker, (1) *NcoI* ve *HindIII* enzimi ile muamele edilmemiş klon, (2) PCR ürünü, (4) *NcoI* ve *HindIII I* enzimleri ile muamele edilmiş klon

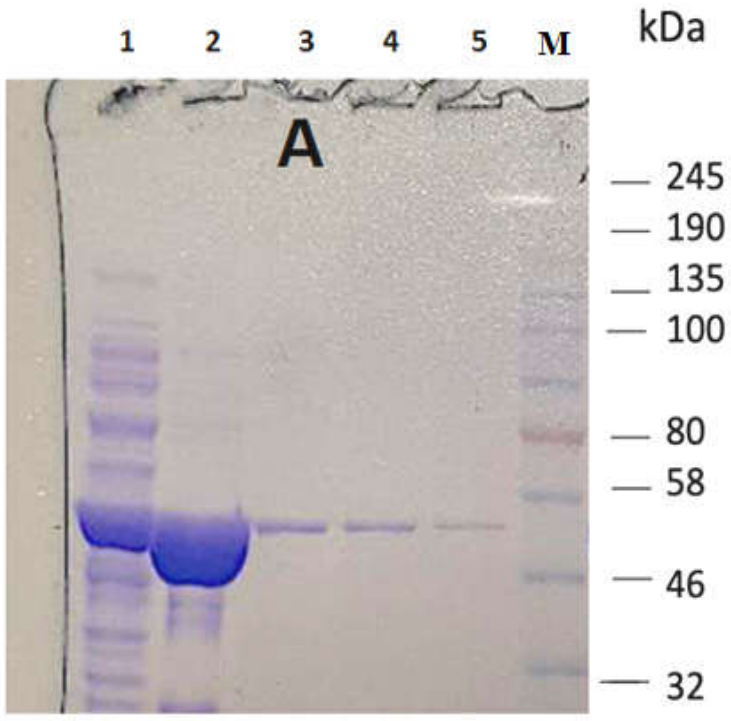
Protein Aktivitesinin Belirlenmesi ve SDS PAGE'de Görüntülenmesi

Saflaştırmadan önce, BglAy9 G226Q/Y227F enziminin aktivitesi, *p*NPG (para-nitrofenil-β-D-glukopiranozit)'i hidrolize ettiği bir reaksiyon ile belirlendi. Reaksiyon sonucunda kolorimetrik (sarı) ürün oluşumu gözlendi (Şekil 20).



Şekil 20. BglAy9 G226Q/Y227F enzim aktivitesinin belirlenmesi. (1) Enzim ile muamele edilmiş substrat, (2) Enzim ile muamele edilmemiş substrat

Ni-afinite kromatografisiyle saflaştırılan protein, ham ekstrat ve Protein marker (NEB) SDS-jel elektroforezi üzerinde yürütüldü. Ham ekstrat ve saflaştırılmış proteinde 54 kDa'luk bölgede bant gözlendi (Şekil 21).

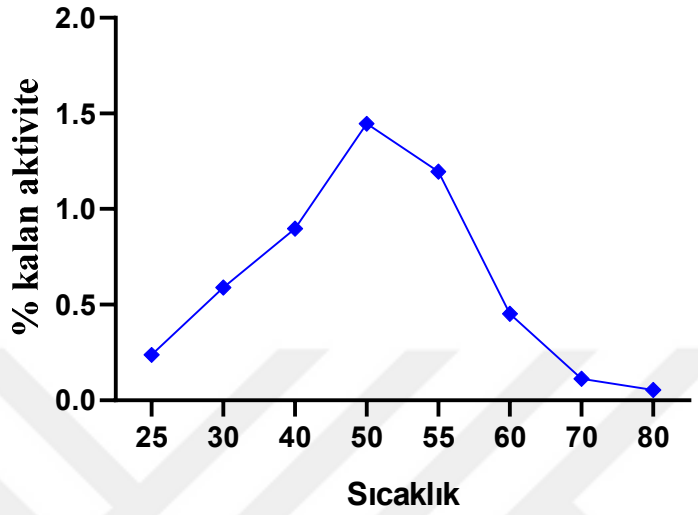


Şekil 21. Proteinin SDS PAGE görüntüsü. (1) Ham ekstrat, (2) Tamamen saflaşmamış protein (3-5) Saf protein, (M) Protein marker (NEB).

BglAy9 G226Q/Y227F Enzimin Biyokimyasal Karakterizasyonu

Optimum sıcaklık

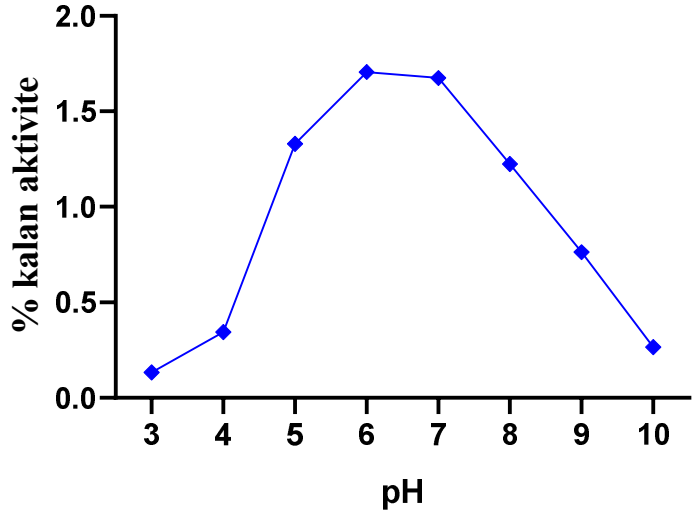
Yapılan deney sonuçlarında elde edilen veriler ile sıcaklık-aktivite grafiği oluşturuldu ve enzimin optimum sıcaklığı 50 ºC olarak belirlendi (Şekil 22).



Şekil 22. BglAy9 G226Q/Y227F enziminin optimum sıcaklık grafiği

Optimum pH

Yapılan deney sonuçlarında elde edilen veriler ile pH -aktivite grafiği oluşturuldu ve enzimin optimum pH'sı 6,0 olarak belirlendi (Şekil 23).

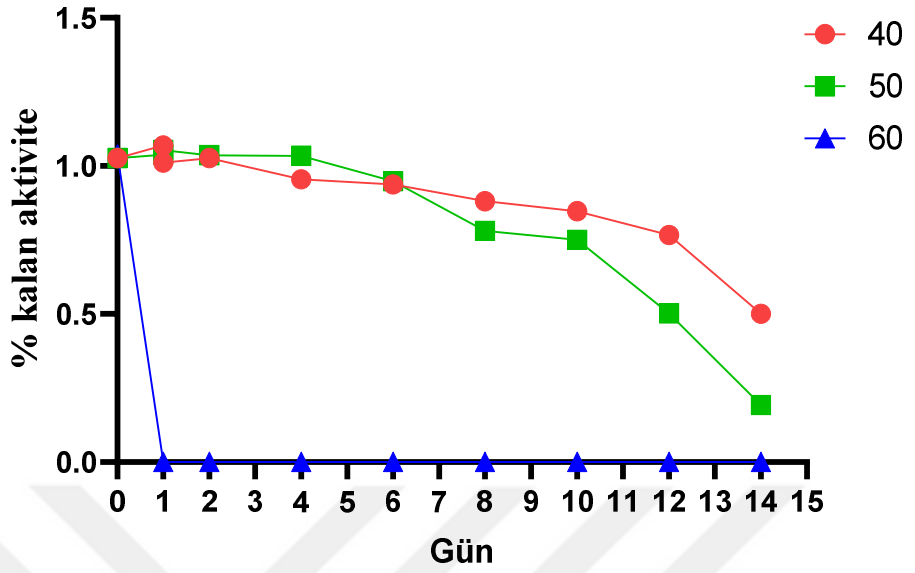


Şekil 23. BglAy9 G226Q/Y227F enziminin optimum pH grafiği

Isı stabilitesi

BglAy9 G226Q/Y227F enziminin termal stabilitesi, aktivite-zaman grafiği oluşturularak belirlendi. Sonuçlara göre enzim 40 °C'de 11 gün, 50 °C'de 12 gün aktivitesinin

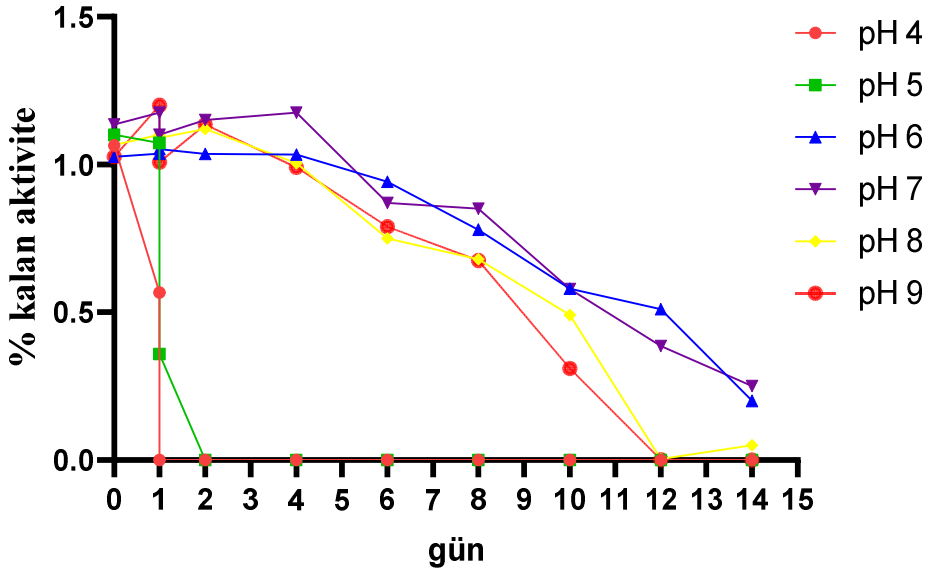
%50'sini korurken, 60 °C'de 30 dakika içinde aktivitesini tamamen kaybettiği gözlemlendi (Şekil 24).



Şekil 24. BglAy9 G226Q/Y227F enziminin sıcaklık kararlılığının zamana karşı değişim grafiği

pH stabilitesi

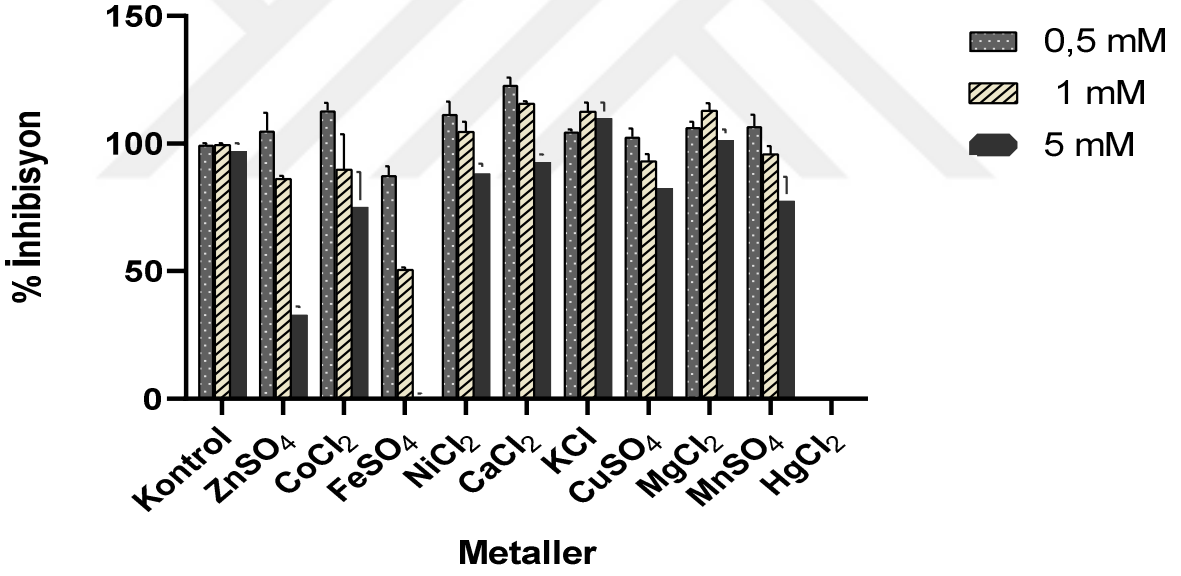
BglAy9 G226Q/Y227F enziminin pH stabilitesi, farklı pH koşullarında 50 °C'de analiz edildi. Yapılan analiz sonucunda elde edilen veriler ile grafik oluşturuldu. Sonuçlara göre ilk 24 saatte enzimin pH 4'teki aktivitesi yaklaşık %50 azaldı. Enzim, pH 5'te 2 gün içerisinde aktivitesinin %50'sini kaybetti. 10. günün sonunda enzim pH 8-9'da aktivitesinin % 50'sini kaybederken, 12. günde pH 6-7'de aktivitesinin %50'sini kaybettiği gözlemlendi (Şekil 25).



Şekil 25. BglAy9 G226Q/Y227F enziminin pH kararlılığının zamana karşı değişim grafiği

Enzim Üzerine Metal İyonlarının Etkisi

BglAy9 G226Q/Y227F enzimi üzerine farklı konsantrasyonlarda (0,5 mM, 2 mM ve 5 mM) metallerin etkisini gözlemlemek için, reaksiyon sonucunda elde edilen veriler ile grafik oluşturuldu. Sonuçlara göre, 0,5 mM toprak alkali grubunda olan Fe^{+2} metal iyonunun enzimin aktivitesini %5-10 azaltırken, Hg^{+2} metal iyonunun enzimin aktivitesini tamamen bitirdiği ve diğer metallerin %5-20 oranında artırdığı gözlemlendi. Diğer yandan toprak alkali grubunda olan Fe^{+2}, Cu^{+2} ve Co^{+2} (1 mM) metal iyonlarının, enzimin aktivitesini %10-50 oranında azalttığı gözlemlenirken, Hg^{+2} metal iyonunun enzimin aktivitesini tamamen inhibe ettiği ve belirtilen diğer metallerin enzimin aktivitesini %1-25 oranında artırdığı gözlemlendi. Son olarak 5 mM Fe^{+2} ve Cu^{+2} metal iyonlarının enzim aktivitesini %60-95 oranında azalttığı gözlemlenirken, Ni^{+2}, Ca^{+2}, Cu^{+2} ve Mn^{+2} metal iyonlarının enzim aktivitesini %4-10 oranında azalttığı gözlemlendi ve 5 mM Mg^{+2} ve K^{+} (alkali) metal iyonlarının enzimin aktivitesini etkilemediği, Co^{+2} (toprak alkali) metal iyonunun % 60-70 oranında aktiviteyi azalttığı görüldü (Şekil 26).

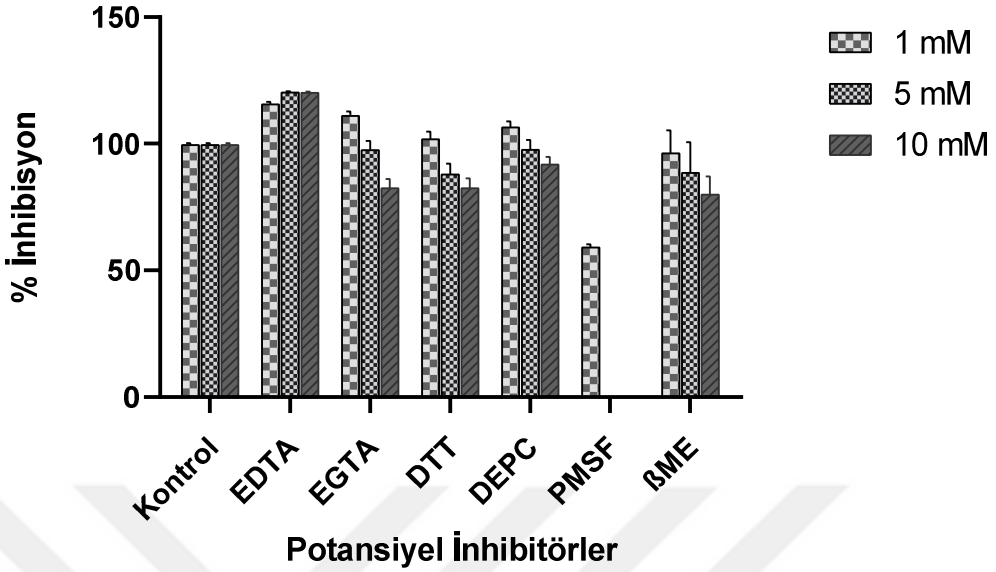


Şekil 26. BglAy9 G226Q/Y227F enzimi üzerine metal iyonların etkisi

BglAy9 G226Q/Y227F Enzim Aktivitesi Üzerine Organik Çözücülerin, İyonik/Non-İyonik Deterjanların ve Potansiyel İnhibitörlerin Etkisi

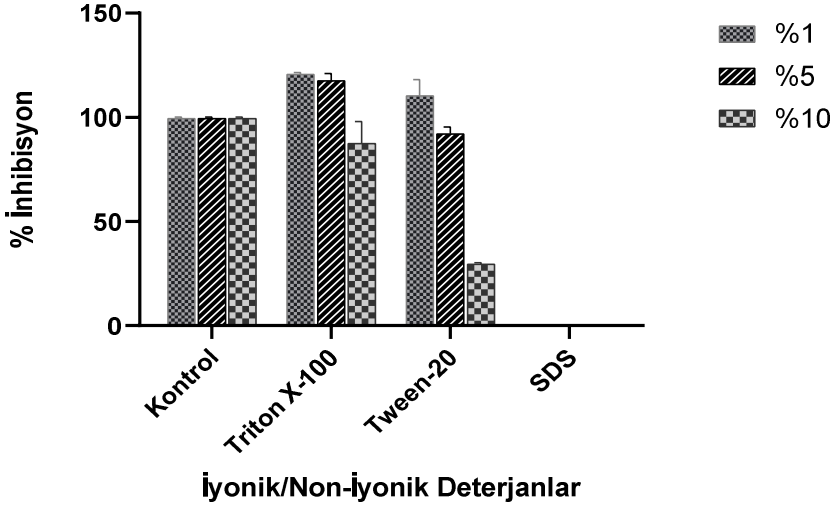
BglAy9 G226Q/Y227F enziminin aktivitesi üzerine farklı konsantrasyonlarda (1 mM, 5 mM ve 10 mM) potansiyel inhibitörlerin etkisi incelendi ve sonucunda elde edilen veriler ile grafik oluşturuldu. Sonuçlara göre 1 mM EDTA, EGTA, DTT ve DEPC'nin enzimin aktivitesini %2-15 oranında artırdığı, β-merkaptoetanolün %2 ve PMSF'nin enzimin aktivitesini %50-60 oranında azalttığı gözlemlendi. Son konsantrasyonla yapılan çalışma sonucunda, PMSF'nin enzimin aktivitesini tamamen inhibe ettiği, EGTA, DEPC, DTT ve β-

merkaptoetanol'ün aktiviteyi %5-20 oranında azalttığı ve EDTA'nın aktiviteyi %20 artırdığı gözlemlendi (Şekil 27).



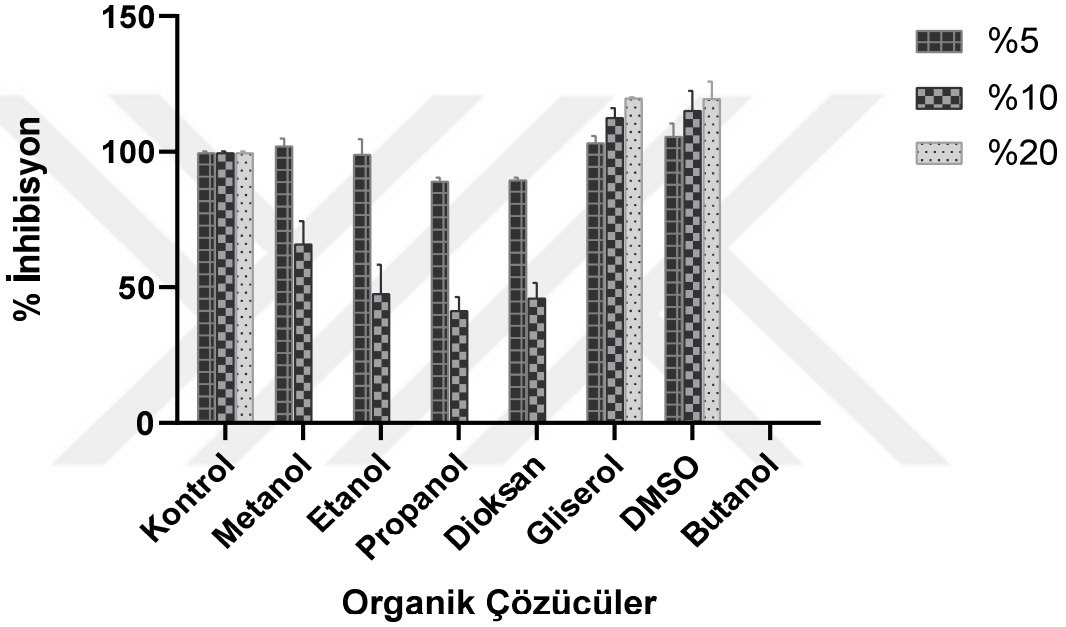
Şekil 27. BglAy9 G226Q/Y227F enzimi üzerine potansiyel inhibitörlerin etkisi

BglAy9 G226Q/Y227F enzimi üzerine farklı konsantrasyonlarda (%1, %5 ve %10) iyonik (SDS) ve non-iyonik (Triton X-100 ile Tween-20) deterjanların etkisi incelendi ve sonucunda elde edilen veriler ile grafik oluşturuldu. Sonuçlara göre %1'lik Triton X-100 ile Tween-20 deterjanlarının enzimin aktivitesini %10-20 oranında artırdığı ve SDS'in aktiviteyi tamamen inhibe ettiği gözlemlenirken, %5'lik Triton X-100'in aktiviteyi %10-20 oranında artırdığı, Tween-20'nin %5-10 oranında azalttığı bulundu. Son konsantrasyonda Triton X-100'ün aktiviteyi %10-20 oranında ve Tween-20'nin aktiviteyi %60-70 oranında düşürdüğü gözlemlendi (Şekil 28).



Şekil 28. BglAy9 G226Q/Y227F enzimi üzerine iyonik/non-iyonik deterjanların etkisi

BglAy9 G226Q/Y227F enzimi üzerine farklı konsantrasyonlarda (%5, %10 ve %20) organik çözücülerin etkisi incelendi ve sonucunda elde edilen veriler ile grafik oluşturuldu. Oluşturulan grafiğe göre %5 konsantrasyonda metanol, etanol, gliserol ve DMSO'un enzim aktivitesi üzerine herhangi bir etki göstermediği, propanol ile dioksanın aktiviteyi %5-10 oranında düşürdüğü ve butanolun aktiviteyi tamamen inhibe ettiği gözlemlendi. %10 konsantrasyondaki DMSO ve gliserolün aktiviteyi %10-20 oranında artırdığı, metanol, propanol, etanol ve dioksanın aktiviteyi %40-65 oranında azalttığı tespit edildi. Son konsantrasyondaki DMSO ve gliserolün aktiviteyi %10-20 oranında artırırken; metanol, propanol, etanol, dioksan ve butanolün aktiviteyi tamamen inhibe ettiği gözlemlendi (Şekil 29).

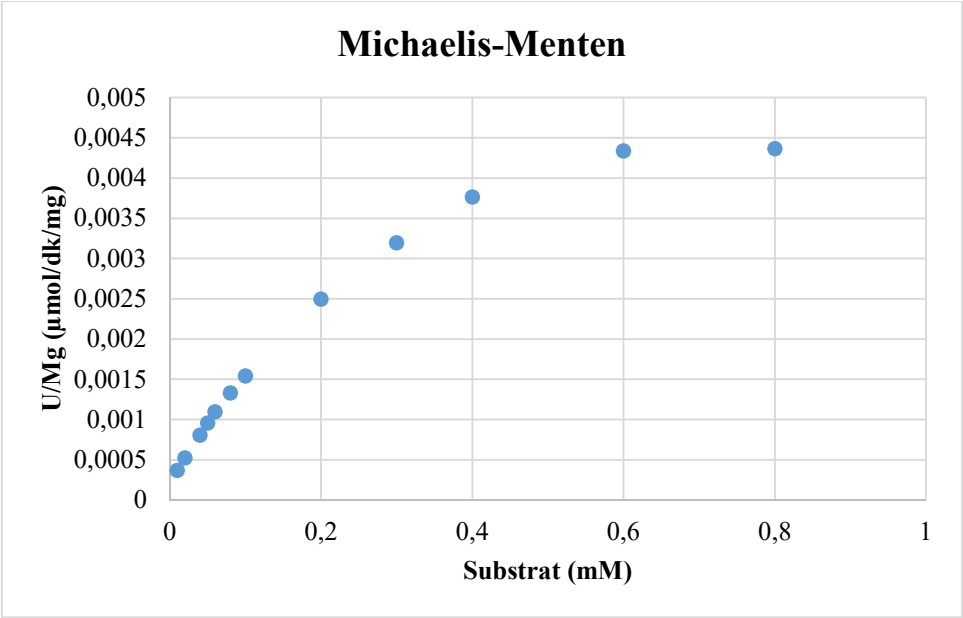


Şekil 29. BglAy9 G226Q/Y227F enzimi üzerine organik çözücülerin etkisi

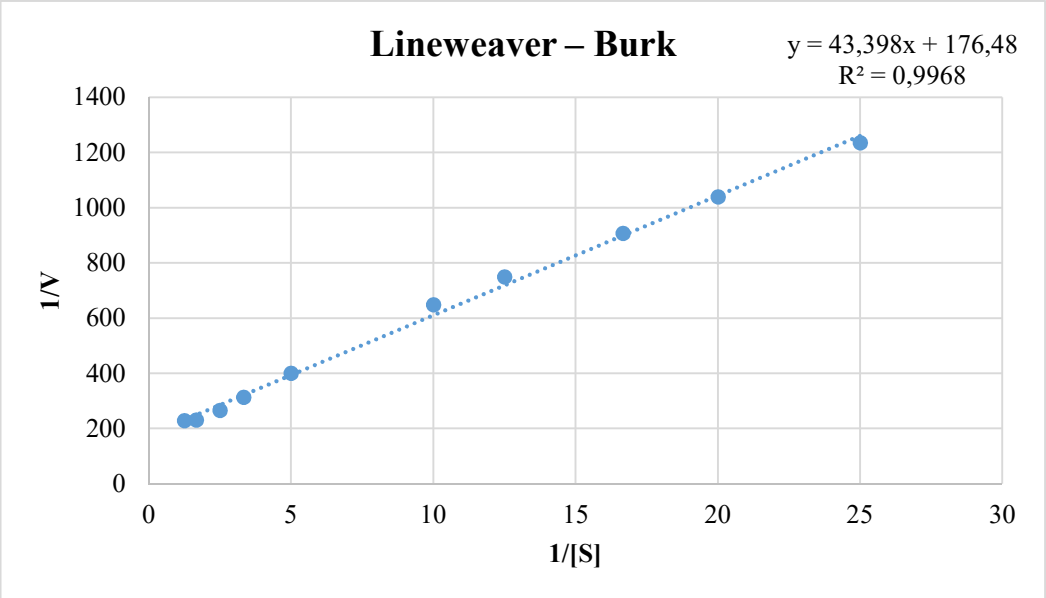
BglAy9 G226Q/Y227F Enziminin Kinetik Karakterizasyon Sonuçları

BglAy9 G226Q/Y227F enziminin pNPG varlığında kinetik karakterleri

*p*NPG substratı ve 0,0198 µg enzim ile oluşturulan reaksiyon sonucunda elde edilen veriler ile Michaelis-Menten grafiği oluşturuldu (Şekil 30). Michaelis-Menten grafiğinden x ve y eksenlerinin geldiği noktalara karşılık gelen değerlerin tersi kullanılarak Lineweaver – Burk eğrisi oluşturuldu (Şekil 31). Kinetik parametreler, Lineweaver – Burk denklemi kullanılarak K_m = 0,245909 mM, V_{max} = 286,18 U/mg (µmol/dk/mg) olarak hesaplandı. Son olarak devir sayısı (k_{cat}) 250,9334s^{-1} ve katalitik etki (k_{cat}/K_m) 1020,432 $s^{-1}mm^{-1}$ olarak hesaplandı (Tablo 14).



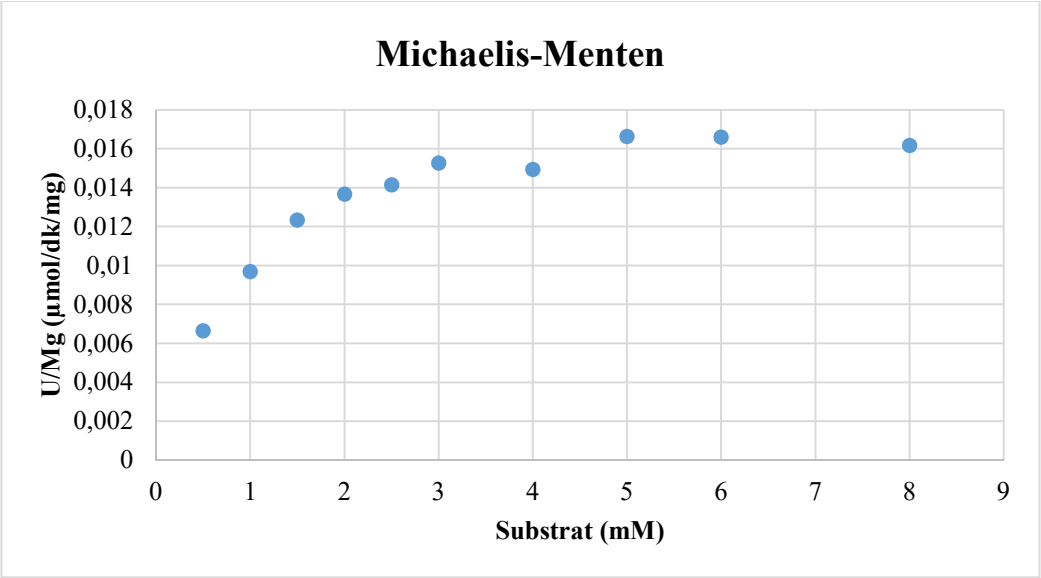
Şekil 30. BglAy9 G226Q/Y227F enziminin *p*NPG varlığında Michaelis-Menten grafiği



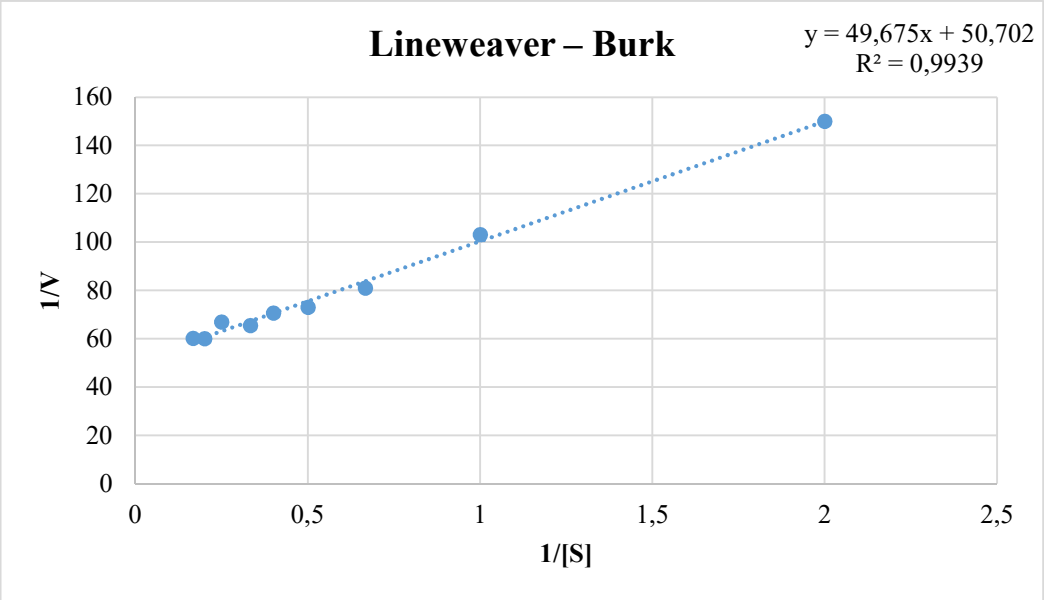
Şekil 31. BglAy9 G226Q/Y227F enziminin *p*NPG varlığında grafiği Lineweaver – Burk eğrisi

BglAy9 G226Q/Y227F enziminin Polidatin varlığında kinetik karakterleri

Polidatin substratı ve 4,44µg enzim ile oluşturulan reaksiyon sonucunda elde edilen veriler ile Michaelis-Menten grafiği oluşturuldu (Şekil 32). Michaelis-Menten grafiğinden x ve y eksenlerinin geldiği noktalara karşılık gelen değerlerin tersi kullanılarak Lineweaver – Burk eğrisi oluşturuldu (Şekil 33). Kinetik parametreler, Lineweaver – Burk denklemi kullanılarak K_m = 0,979744389 mM, V_{max} = 4,442137 U/mg olarak hesaplandı. Son olarak devir sayısı (k_{cat}) =3,895032 s^{-1}ve katalitik etki (k_{cat}/K_m)= 3,97556 $s^{-1}mm^{-1}$ olarak hesaplandı(Tablo 14).



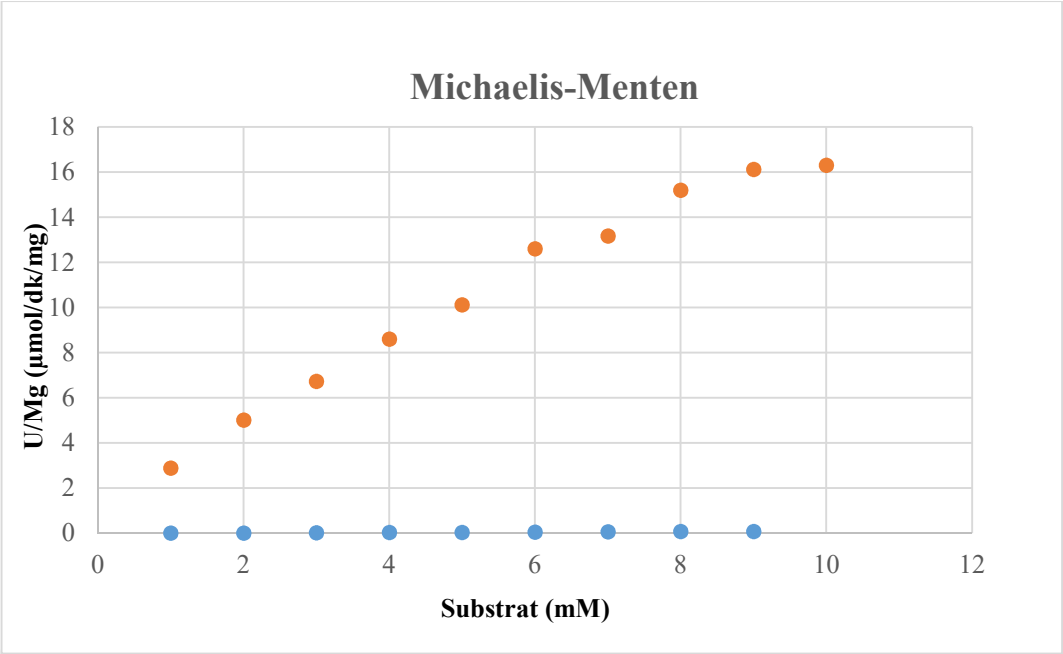
Şekil 32. BglAy9 G226Q/Y227F enziminin Polidatin varlığında Michaelis-Menten grafiği



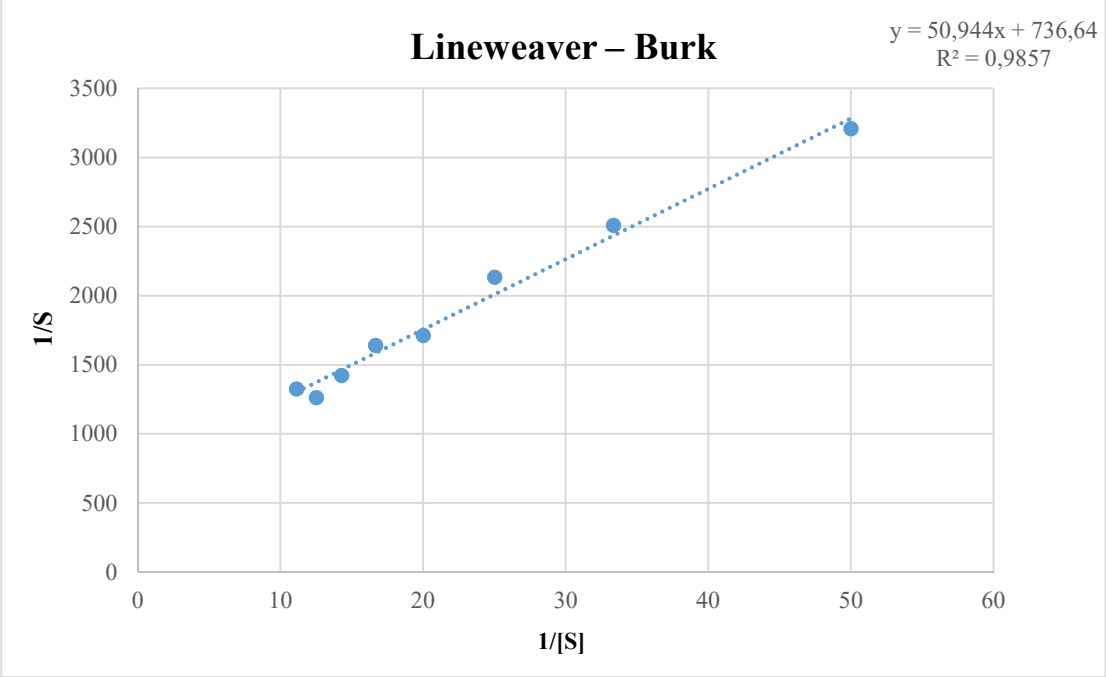
Şekil 33. BglAy9 G226Q/Y227F enziminin Polidatin varlığında Lineweaver – Burk eğrisi

BglAy9 G226Q/Y227F enziminin Mirisetin 3-O-glikozit varlığında kinetik karakterleri

Polifenolik Mirisetin 3-O-glikozit substratı ve 50,25 µg enzim ile oluşturulan reaksiyon sonucunda elde edilen veriler ile Michaelis-Menten grafiği oluşturuldu (Şekil 34). Michaelis-Menten grafiğinden x ve y eksenlerinin geldiği noktalara karşılık gelen değerlerin tersi kullanılarak Lineweaver – Burk eğrisi oluşturuldu (Şekil 35). Kinetik parametreler, Lineweaver – Burk denklemi kullanılarak K_m= 0,069157mM, V_{max} = 0,027015228 U/mg olarak hesaplandı. Son olarak devir sayısı (k_{cat})= 0,023688 s^{-1}ve katalitik etki (k_{cat}/Km) = 0,342523 $s^{-1}mm^{-1}$ olarak hesaplandı (Tablo 14).



Şekil 34. BglAy9 G226Q/Y227F enziminin Mirisetin 3-O-glikozit varlığında Michaelis-Menten grafiği

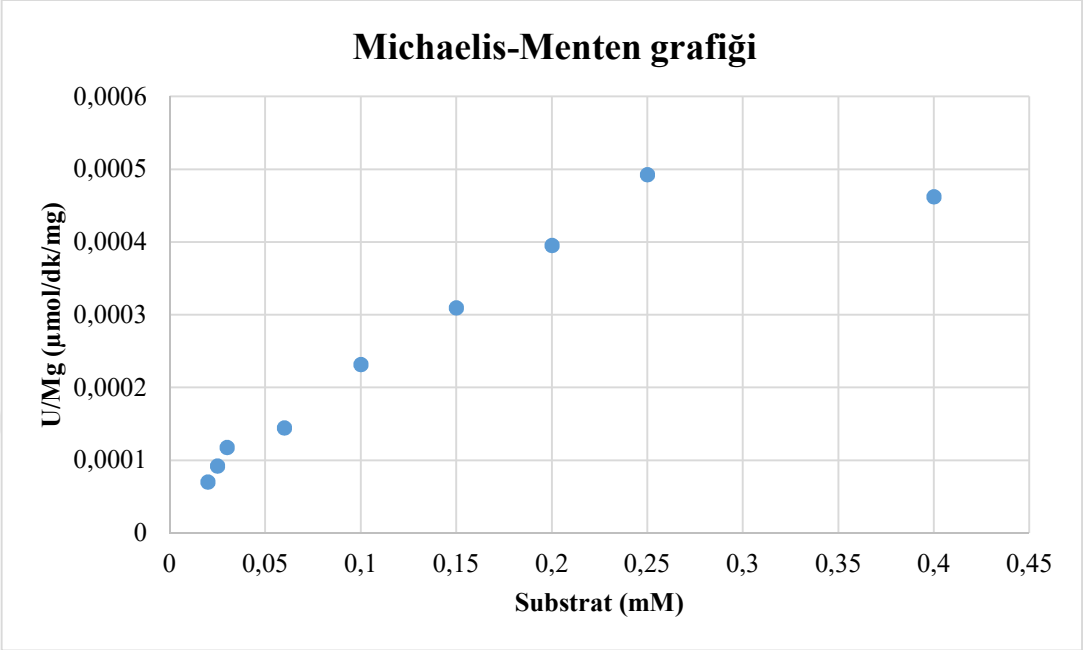


Şekil 35. BglAy9 G226Q/Y227F enziminin Mirisetin 3-O-glikozit varlığında Lineweaver – Burk eğrisi

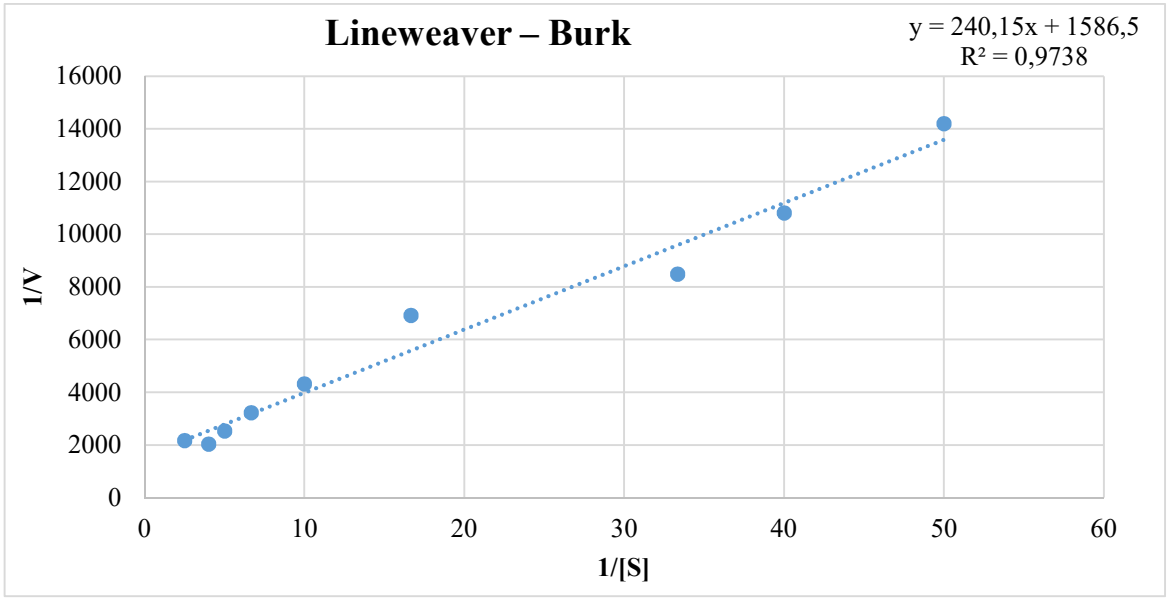
BglAy9 G226Q/Y227F enziminin Kukurbitasin E-2-O-glikozit varlığında kinetik karakterleri

Polifenolik Kukurbitasin E-2-O-glikozit substratı ve 27,75 µg enzim ile oluşturulan reaksiyon sonucunda elde edilen verilerle Michaelis-Menten grafiği oluşturuldu (Şekil 36). Michaelis-Menten grafiğinden x ve y eksenlerinin geldiği noktalara karşılık gelen değerlerin

tersi kullanılarak Lineweaver – Burk eğrisi oluşturuldu (Şekil 37). Kinetik parametreler, Lineweaver – Burk denklemi kullanılarak K_m = 0,151371 mM, V_{max} = 0,022714173 U/mg olarak hesaplandı. Son olarak devir sayısı (k_{cat}) 0,19917 s^{-1} ve katalitik etki (k_{cat}/K_m) 131575 $s^{-1}mm^{-1}$ olarak hesaplandı (Tablo 14).



Şekil 36. BglAy9 G226Q/Y227F enziminin Kukurbitasin E-2-O-glikozit varlığında Michaelis-Menten grafiği



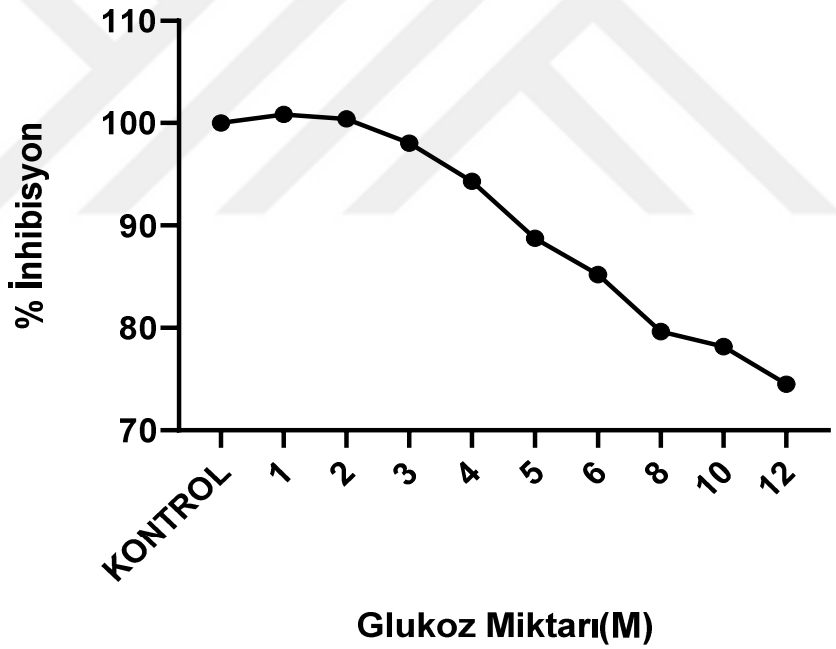
Şekil 37. BglAy9 G226Q/Y227F enziminin Kukurbitasin E-2-O-glikozit varlığında Lineweaver – Burk eğrisi

Tablo 14. Tez Kapsamında Kullanılan Substratların Reaksiyon Sonrası Kinetik Karakterleri

Substratlar	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (s^{-1} mm^{-1})	V_{max} (µmol/dk)
pNPG	0,245909	250,9334	1020,432	0,05666
Polidatin	0,979744389	3,895032	3,97556	0,019723
Mirisetin 3-O glikozit	0,06915725456	0,02368796493	0,3425232115	0,02701522794
Kukurbitasin 2-E-O glikozit	0,151371	0,019917	0,131575	0,022714173

Glukoz Tolerans Analizi

Glukozun enzim aktivitesi üzerindeki etkisi farklı substrat (*p*NPG) konsantrasyonu ile incelendi. Elde edilen veriler ile grafik oluşturuldu. Grafige göre 1 M, 2 M ve 3 M glukozun enzim aktivitesinde herhangi bir etki göstermediği, bunun yanısıra 3 M glukoz konsantrasyonundan sonraki glukoz miktarının enzimin aktivitesini kademeli bir şekilde inhibe ettiği gözlemlendi (Şekil 38).



Şekil 38. BglAy9 G226Q/Y227F enzimi üzerine glukozun etkisi

DPPH Analiz Sonuçları

BglAy9 G226Q/Y227F enzimi ile Polidatin, Kukurbitasin E-2-O –glikozit ve Mirisetin 3-O-glikozit polifenolik substratlarının glukoz grupları uzaklaştırılarak (deglikozilasyon), sırasıyla resveratrol, kukurbitasin ve merisitin ürünlerine dönüştürüldü. Oluşan ürünlerin antioksidan etkileri, doğal formlarının (enzim ile muamele edilmemiş polifenolik susbtrat) antioksidan potansiyelleri ile karşılaştırıldı (Tablo 15). Elde edilen sonuçlara bakılarak, resverarolün, polidatin substratına göre antioksidant etkiyi % 54,75 artırdığı ve kukurbitasinin,

kukurbitasin E-2-O-glikozite göre antioksidan etkiyi % 41,20 artırdığı görüldü. Son olarak merisitinin, Mirisetin 3-O-glikozite göre antioksidan etkiyi % 32 oranında artırdığı gözlemlendi (Tablo 15).

Tablo 15. DPPH Analiz Sonuçları

Substratlar	**Enzim ile muamele edilmiş substrat (%)**	**Enzim ile muamele edilmemiş substrat (%)**	**Antioksidan kapasitesindeki değişim (%)**
Polidatin	33,6507937	21,7460317	54,7445255
Merisitin 3-O glikozit	35,2222222	26,4920635	32,9538646
Kukurbitasin 2-E-O glikozit	28,8596491	20,4385965	41,2017167

Termofilik bakteriler; selülaz, lipaz, proteaz ve β-glukozidaz gibi biyoteknolojik açıdan önemli enzimleri sentezleyebildikleri için literatürde sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. β-glukozidaz böceklerde, bitkilerde, memelilerde fonksiyonu araştırılmış; bulunduğu organizmaya ve işlevine göre farklılık gösteren, ilaç üretimi, besin kalitesinin iyileştirilmesi, lignin biyosentezi ve antioksidan etkisi gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılan önemli bir enzimdir. β-glukozidazların iki karbohidrat veya biri karbohidrat diğeri karbohidrat olmayan iki grup arasındaki β-1,4 glikozidik bağları hidrolize ettiği bilinmektedir (Laine 1994; Chuenchor *et al.* 2008; Ko *et al.* 2014). Bu enzimlerin ilgili substratlara ilgisinin artırılması amacıyla birçok mutasyon çalışmaları mevcuttur. *Anoxybacillus ayderensis* Ay9 β-glukozidaz enzimi kullanılarak yapılan bu çalışma, enzimin termostabilitesini yükseltmek, doğal olarak oluşan polifenolik glikozitlerden (Kukurbitasin 2-O-glikozit, Mirisetin 3-O-glikozit ve Polidatin) ve ticari olarak satın alınan sentetik *p*NPG substratından glukoz rezidülerinin seçici olarak uzaklaşmasını (enziminin substrata olan ilgisini) ve bazı doğal polifenolik susbtratların antioksidan etkilerini artırmak amacıyla yapıldı.

Anoxybacillus ayderensis Ay9'dan elde edilen β-glukozidaz (Zada *et al.* 2021) enzimi üzerinde G226Q mutasyonuna ek olarak Y227F mutasyon bölgesi oluşturuldu. Elde edilen G226Q/Y227F mutant β-glukozidaz enziminin (BglAy9 G226Q/ Y227F) tez kapsamında belirlenen substratlar ile kinetik karakterleri ve biyokimyasal karakterizasyon basamakları incelendi. BglAy9 G226Q/Y227F enzimi ile deglikozilasyonu yapılan polifenolik bileşiklerin (Kukurbitasin 2-E-O-glikozit, Polidatin ve Mirisetin 3-O-glikozit) antioksidan kapasiteleri DPPH yöntemi ile analiz edilip, farklı konsantrasyonlarda glukozun enzim üzerindeki etkisi araştırıldı.

Zada ve arkadaşları (2021) 'nın yapmış olduğu çalışmada; *Anoxybacillus ayderensis* Ay9 suşuna ait yaban tip β-glukozidaz enziminin (BglA9 WT) biyokimyasal karakterizasyon çalışmaları sonucunda enzimin optimum sıcaklığını 50 °C olarak belirleyip yaban tip ve mutant

enzimlerin termal olarak kararlı olduğunu göstermiştir. *Paenibacillus polymyxa* kaynaklı β-glukozidaz üzerinde yapılan bir çalışmada elde edilen L171W mutantının düşük bir termostabiliteye neden olduğu görülmüştür (Siegel and Vater 2020). *Trichoderma reesei* β-glukozidazın (TrBgl2) yapısından yola çıkarak aktif bölgenin dış kanalında bulunan amino asitlerde tekli ve ikili olacak şekilde mutasyon oluşturulmuş ve L167W ile P172L/F250A mutasyonlarının, optimum sıcaklığının, yaban tipin neredeyse aktif olmadığı 50 °C'ye kaymasına neden olduğu gözlenmiştir (Lee *et al.* 2012).

Sıcaklığın enzim üzerindeki etkisi incelendiğinde yaban tip BglA9 WT'nin 60 °C de aktivitesinin yarısını 10 saat koruduğu gözlemlenirken (Zada *et al*. 2021), bu çalışmada elde edilen mutant enzimin 30 dk içerisinde aktivitesinin tamamen inhibe olduğu gözlemlendi. Bunlara ek olarak yaban tip BglA9 WT enziminin 50 °C'de 24 saat sonunda aktivitesinin yarısını koruduğu, G226Q, L221S ve N222S mutantlarının termostabilitesinde çok önemli bir farklılık olmadığı belirtilmiştir (yayınlanmamıştır).

Tez kapsamında elde edilen BglAy9 G226Q/Y227F enziminin 50 °C'de aktivitesinin yarısını 12 gün koruduğu saptanmış, bu enzimin G226Q, L221S, N222S mutant ve yaban tip BglA9 WT β-glukozidazlara kıyasla termostabilitesinin daha yüksek olduğunu saptandı. *Clostridium thermocellum* selülazının optimal sıcaklığı 70 °C iken, *C. thermocellum* β-glukozidaz A enzimi (BglA) bu kadar yüksek sıcaklıklarda aktivitesininin neredeyse tamamını kaybetmektedir. Bu nedenle iyi bir etkinliğe sahip termostabil bir enzim üretmek için rastgele mutajenez yönelimi ile *C. thermocellum* BglA'da Mut1 (A17S/K268N) ve Mut2 (S39T) mutant varyantlar oluşturulmuştur. Mut1 varyantı, 68,4 °C ısı uygulamasından sonra aktivitesinin sadece ~%40'ını kaybederken aynı koşullar altında Mut2'nin aktivitesinin ~% 90'ını kaybettiği ve yaban tip BglA'nın aktivitesinin tamamen inhibe olduğu gözlenmiştir. 70 °C'lik ısı uygulamasından sonra, hem yaban tip hem de Mut2 enzimleri aktivitelerini tamamen kaybederken, Mut1'in hala ~%9,5'lik aktivite sergilediği tespit edilmiştir (Yoav *et al.*2019).

Her enzimin maksimum aktivite gösterdiği belirli pH aralıkları vardır. BglA9 WT enzimi maksimum aktivitesini pH 8'de göstermiştir (Zada *et al.* 2021). Bunun yanında L221S mutant enzimin doğal (BglA9 WT) ile aynı pH özelliği gösterdiği, N222S ve G226Q mutant enziminin de maksimum aktiviteyi pH 7'gösterdiği gözlenmiştir (yayınlanmamıştır). Çalışmamızda elde ettiğimiz BglAy9 G226Q/Y227F enziminin de pH 6,0'da maksimum aktiviteyi gösterdiği belirlendi. Ayrıca BglA9 WT pH 7- 10 arasında aktivitesinin % 80'den fazlasını koruduğu belirtilmiştir (Zada *et al.* 2021). N222S, L221S ve G226Q mutant enzimler BglA9 WT ile karşılaştırıldığında benzer pH stabilite profiline sahip olduğu anlaşılmıştır.

BglAy9 G226Q/Y227F enziminin BglA9 WT ve diğer mutant enzimlerden farklı olarak pH 6 ile pH 9 arasında aktivitesinin % 85'den fazlasını koruduğu gözlenmiştir.

Proteinlere karşı yüksek ilgi duyan metal iyonları spesifik noktalarda negatif yüklü amino asitleri bağlamaktadır Metal iyonlarının bir kısmı geçiş metali, bir kısmı toprak alkali, bir kısmı da alkali metal olarak ayrılmıştır. Alkali metaller +1 değerlikli, toprak alkali metalleri +2 değerlikli, geçiş metalleri ise değişken değerliklidir. Hücre içerisinde +1, +2 ve değişken değerlikli metaller bulunmakta ve bunlar çeşitli fonksiyonları yerine getirmektedir. Aynı zamanda Ca^{+2}, Mg^{+2} katyonlar ve CI^{-}, PO_4^{-3} gibi anyonlar proteinlere bağlanarak, proteinin aktivitesini azaltıcı ya da artırıcı yönde etki edebilmektedir (Keha and Küfrevioğlu 2015). Bunlara ek olarak düşük konsantrasyonlardaki nötral tuzlar, proteinin çözünürlüğünü artırarak aktivitenin artmasını destekleyebilir (Keha and Küfrevioğlu 2015) Genel olarak ağır metaller; karbonil, sülfidril ve karboksil gruplarının birbirine bağlanmasını sağlayarak enzim aktivitesinin artmasında ya da azalmasında etkili oldukları bilinmektedir (Kaçıran 2020). Hg^{+2}, Cu^{+2} gibi ağır metal iyonları (ya da bunların türevleri) katalitik bölgesinde sistein kökleri bulunduran enzimlerin -SH gruplarıyla bağ kurarak merkaptür oluşturup enzim aktivitesini engelleyebilmektedir (Zubay 1988). 0,5 mM Hg^{+2} iyonunun BglAy9 G226Q/Y227F enziminin aktivitesini tamamen inhibe ettiği gözlemlenirken, yaban BglA9 WT'nin üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı hatta 2,5 mM konsantrasyonda bile yaban tip enzimin %80 aktivitesinin devam ettiği belirtilmiştir (Zada *et al.* 2021). Ayrıca BglA9 WT ile ilgili mutantların hepsi Hg^{+2} varlığında aktivitelerini tamamını kaybettiği gözlemlenmiştir. Benzer şekilde Fe^{+2} ve Co^{+2} (5 mM) metal iyonları BglAy9 G226Q/Y227F enziminin aktivitesini sırasıyla %95 ve %60 inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Bunun yanında aynı oranda Fe^{+2} ve Co^{2+} iyonları, yaban BglA9 WT enziminin aktivitesinde herhangi bir değişiklik oluşturmamıştır (Zada *et al*. 2021). *Jiangella ureilytica* KC603 β-glukozidazı, K^{+} (5 mM) ve Hg^{+} (5 mM) metal iyonların varlığında %80 aktivitesini kaybetmiştir (Kaçıran 2020). K^{+} (10 mM) iyonunun *Bacillus licheniformis* kaynaklı β-glukozidazın aktivitesini etkilemediği belirlenmiştir (Chen *et al.* 2017). L221S/G226Q ikili mutantının aktivitesinin, 1 mM K^{+} varlığında %50 oranında arttığı, 2,5 mM varlığında herhangi bir değişim olmadığı gözlenmiştir (yayınlanmamıştır). Aynı zamanda BglA9 WT üzerine 2,5 mM ve 5 mM konsantrasyonlardaki K^{+} (alkali) iyonunun olumsuz bir etkisi olmadığı gözlemlenmiştir (Zada *et al.* 2021). 2,5 mM ve 5 mM konsantrasyonlardaki K^{+} iyonu BglAy9 G226Q/Y227F 9 aktivitesini %15 oranında artırdığı görülmüştür. Zn^{+2} (5 mM) BglA9 WT aktivitesinde bir değişikliğe neden olmazken, Mn^{+2}(5 mM) enzimin aktivitesini %10-15 oranında inhibe ettiği görülmüştür (Zada *et al.* 2021). Yaban tip ile kıyaslandığında Zn^{+2} (5 mM) ve Mn^{+2} (5 mM) varlığında BglAy9 G226Q/Y227F enzimin aktivitesinin sırasıyla %60 ve %20 oranında inhibe olduğu gözlemlendi. Zn^{+2} (5 mM) varlığına L221S/G226Q mutantının

aktivitesinde kademeli bir şekilde azalma gözlemlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda Mg^{+2}ve Ca^{+2} (1, 2,5 ve 5 mM) iyonları yaban BglA9 WT enziminin aktivitesinde inhibisyon etkisi oluşturmazken, aynı konsantrasyonlarda Mg^{+2} ve Ca^{+2} iyonlarının BglAy9 G226Q/Y227F enzimin aktivitesini yaban tip ile aynı oranda etkilediği görüldü. Ayrıca 10 mM Mg^{+2} iyonunun *Bacillus licheniformis* kaynaklı enzimin aktivitesinde %25 oranında aktiviteyi artırdığı gözlemlenmiştir (Chen *et al.* 2017). *Talaromyces thermophilus* suşundan elde edilen β-glukozidazın Mn^{+2}, Mg^{+2}, Co^{+2} ve Ca^{+2} metal iyonlarından etkilenmediği görülmüştür (Mallek-Fakhfakh and Belghith 2016). Kültüre edilmemiş toprak kaynaklı mikroorganizmaların β-glukozidaz enziminin yapısında metal bağlanma bölgelerinin olmadığı belirtilmiştir (Jiang *et al.* 2011). Ayrıca metal iyonlarının *Bacillus licheniformis*'in β-glukozidaz enzim aktivitesinde değişimler oluşturmasından dolayı, bu enzimin aktif katalitik merkezinde divalent metal iyonlarının bağlanabileceği bölgelere sahip olduğu düşüncesini oluşturmuştur (Chen *et al.* 2017). Bu düşünce benzer şekilde BglAy9 G226Q/Y227F enzimi üzerinde divalent metal bölgelerinin olabileceğini göstermiştir.

İyonik ve non-iyonik deterjanların uzun zincir grupları enzim ile hidrofobik, baş grupları ise iyonik ve hidrojen bağı kurarlar. Yüklü deterjanlar proteinlerin hidrofobik olmayan diğer kısımlarıylada etkileşime girebilir ve aktiviteyi engelleyebilirler. İyonik ve non-iyonik deterjanları enzimin hidrofobik kısımlarıyla etkileşime girerek enzimin 3D yapısının değişmesine ve bundan dolayı enzimin aktivitesini hem artırıcı yönde hem de inaktif edici yönde etkili olan modülatör moleküller olduğu belirtilmiştir (Keha and Küfrevioğlu 2015). Bu çalışmalar doğrultusunda peptit bağların hidrolizine neden olan iyonik SDS'in enzim üzerindeki etkisi incelendiğinde hem yaban tip BglA9 WT hem de tüm mutantlar için ciddi bir inhibitör olduğu görülmüştür. Enzim üzerine uygulanan farklı konsantrasyonlarda (%1, %5 ve %10) non- iyonik olan Triton X-100'ün, yaban tipte herhangi bir değişime neden olmazken, %1 ve %5 konsantrasyondaki Triton X-100'ün BglAy9 G226Q/Y227F enzim aktivitesini %19 oranında artırdığı, bunun aksine son konsantrasyondaki Triton X-100'ün aktiviteyi %12 oranında azalttığı gözlemlendi. Non-iyonik Tween-20 deterjanının farklı konsantrasyonlardaki etkisi yaban tip ve mutant varyantlar arasında kıyaslandığında yaban tip, N222S ve G226Q mutant enzimin aktivitesinde değişiklik oluşturmadığı ancak % 5 ve %10 konsantrasyonda Tween-20 'nin BglAy9 G226Q/Y227F enzim aktivitesini sırasıyla %5-10 ve %80 oranında inhibe ettiği belirlendi.

Birçok organik çözücü muhtemelen enzimleri dengesizleştirmesinden ve esnekliğini kaybettirmesinden ya da düşürmesinden dolayı birçoğu, β-glukozidaz enzimlerinin aktivitesinin düşmesine sebebiyet vermiştir (Zada *et al*. 2021). Bunun yanında nötral organik

çözücü (etanol, metanol vb.) olan etanol, protein üzerinde zıt yüklerin çekimini artırarak, proteinlerin kümeleşip çökmesine neden olabilir ve sonuç olarak substratın aktif bölgeye ulaşmasını engelleyerek enzimin aktivitesini ya azaltır ya da inhibe edebilir((Keha and Küfrevioğlu 2015). Organik çözücülerin etkileri üzerine yapılan çalışmalar sonucunda, son konsantrasyonda (%20) butanol, etanol, dioksan, propanol ve metanolün BglAy9 G226Q/Y227F enzimini tamamen inhibe ettiği gözlemlendi. Bunun aksine aynı şartlarda BglA9 WT enziminin aktivitesini, test edilen organik çözücülerin son konsantrasyonlarında %95'ten fazla koruduğu belirtilmiştir (Zada *et al.* 2021). G226Q mutantının butanol varlığında aktivitesini büyük ölçüde kaybettiği, N222S mutantının butanolden etkilense de tamamen inhibe olmadığı ve diğer organik çözücülere karşı da aktivitesini koruduğu gösterilmiştir (yayınlanmamıştır).

EDTA divalent özelliği gösteren iyonların şelatörüdür ve aktivasyonları için divalent katyonlara bağımlı olan enzimlerin için inhibitördür (Zubay 1988). EDTA metal bağımlı proteinlerin aktif merkezlerinde bulunan çinko iyonlarına şelatör olarak etki eder. Ayrıca kalsiyuma ihtiyaç duyan sistein proteazları gibi metalloenzimlerin aktivitesini inhibe eder (Zubay 1988). BglA9 WT üzerine 5 ve 10 mM konsantrasyonlarda EDTA uygulanmasından sonra enzimin aktivitesinde herhangi bir farklılık oluşturmadığı görülmüştür (Zada *et al.* 2021). BglAy9 G226Q/Y227F enziminin 10 mM ve 5 mM EDTA varlığında aktivitesinin %15-20 oranında arttığı görüldü. Bu durum BglAy9 G226Q/Y227F mutant enziminin, aynı yaban tip gibi aktivasyonu için kofaktörlere ihtiyacı olmadığının göstergesidir. 10 mM konsantrasyondaki EGTA, BglA9 WT'nin aktivitesini tamamen inhibe ederken, BglAy9 G226Q/Y227F mutantının aktivitesini %75-80 oranında koruduğu gözlemlendi. Serin rezidüleri ile reaksiyona giren bir proteaz inhibitörü olan PMSF (10 mM) varlığında BglA9 WT aktivitesinin, %80'ini korumuştur (Zada *et al.* 2021). Bunun aksine aynı konsatrasyondaki PMSF BglAy9 G226Q/Y227F mutant enzimin aktivitesini tamamen inhibe ettiği gözlemlendi.

Endüstriyel süreçlerde reaksiyon sonrası oluşan glukozun, enzim inhibisyonuna neden olduğu bilinmektedir. Bu nedenle kullanılan enzimlerin glukoza toleransının yüksek olması endüstriyel süreçlerde elde edilecek ürün verimliliği açısından son derece önemlidir. BglA9 WT glukoz toleransı yüksek bir enzimdir. Bu enzimin 5 M glukoz varlığında bile aktivitesinde herhangi bir değişiklik görülmemiştir (Zada *et al.* 2021). Bunun aksine BglAy9 G226Q/Y227F mutant enzimin glukoz toleransı, BglA9 WT ile kıyaslandığında daha düşük aktivite gösterdiği ve 5 M glukoz varlığında aktivitesinin %90-80 koruduğu, ancak aktivite düşmüş olsa da birçok β-glukozidaz enzimine göre glukoz toleransı yüksek olduğu belirlendi. L221S ve G226Q

mutantların glukoz varlığında aktivitelerinin değişmediği yaban tip (BglA9 WT) ile aynı glukoz toleransı sergilediği belirtildi (yayınlanmamıştır).

Biyoteknolojik uygulamalarda önemli olduğu düşünülen substratları etkileyen birçok endüstriyel enzimin K_m değerinin 0,01 mM ile 100 mM aralığında olduğu bildirilmiş (Öz 2016). BglAy9 G226Q/Y227F ile enzim kinetiği çalışmaları sonrası elde edilen K_m değerlerinin bu aralıkta olması bu enzimin endüstriyel kullanıma uygun olabileceğinin göstergesidir (Tablo 14). *p*NPG substratı ile yapılan kinetik çalışmalarda BglA9 WT enziminin kinetik parametreleri sırasıyla $K_{m=}$ 0,28(K_m), V_{max} =0,077 U/mg, k_{cat}= 384 s^{-1}ve k_{cat}/k_m =1354$s^{-1}mM^{-1}$ olarak hesaplandı (Zada *et al.* 2021). *p*NPG substratı ile BglAy9 G226Q/Y227F enziminin kinetik parametleri hesaplandı ve sırasıyla $K_{m=}$ 0,245909 K_m, V_{max} =0,005666 U/mg, k_{cat}= 250,9334 s^{-1} ve k_{cat}/k_m=1020,432 $s^{-1}mM^{-1}$ olarak belirlendi. Yaban tip ile mutant BglAy9 G226Q/Y227F enzimi kıyaslandığında, mutant varyantın katalitik etkisinin azaldığı saptandı. Ayrıca L221S, N222S ve G226Q mutant varyantlar BglA9 WT enzimi ile kıyaslandığında sırasıyla katalitik etkiyi 0,32, 2,65 ve 0,40 kat daha artırdığı belirltilmiştir (yayınlanmamıştır). *Paenibacillus polymyxa* türünden üretilmiş β-glukozidaz B üzerinde L171G, L171V ve L171W mutasyon bölgeleri oluşturuldu. L171G ve L171V, yaban tipe göre kinetik aktivitede bir azalmaya ve artan termostabiliteye neden olurken, L171W mutantının, yaban tipe göre artan bir kinetik aktiviteye ve düşük bir termostabiliteye neden olduğu görülmüştür (Siegel and Vater 2020). Guo ve diğerleri tarafından *Trichoderma reesei* β-glukozidazı üzerinde yapılan bir çalışmada aktif bölge girişinde bulunan iki farklı amino asitte ayrı ayrı mutasyon oluşturulmuştur. Elde edilen mutantlar yaban tip ile karşılaştırıldığında hem glukoz toleransını hem de spesifik aktiviteyi 2,4 kat daha artırdığı gözlemlenmiştir (Guo *et al.* 2016). *Trichoderma reesei* β-glukozidazı üzerinde yapılan başka bir çalışmada *Trichoderma reesei* β-glukozidazının (TrBgl2) yapısından yola çıkarak aktif bölgenin dış kanalında bulunan amino asitlerde tekli ve ikili mutasyonlar oluşturuldu. Elde edilen mutant P172L ve P172L/F250A varyantları, yaban tipe göre 40 °C'de 4-nitrofenil-β-D glukopiranozit susbstratına karşı k_{cat}/K_m ve k_{cat} değerleri sırasıyla 5,3 ve 6,9 olarak tespit edilmiştir. Buna ek olarak L167W ve P172L/F250A mutasyonları, optimum sıcaklığın, yaban tipin neredeyse aktif olmadığı 50 °C'ye kaymasına neden olduğu gözlemlenmiştir (Lee *et al.* 2012). Başka bir çalışma da *Thermotoga neapolitana* β-glukozidaz enziminin şeker bağlanma bölgesine (+2 bölgesi) yakın F219, N221, ve G222 rezidüleri ile diğer rezidüler üzerinde tekli mutasyonlar oluşturuldu. Sonrasında bu mutasyonların tekli, ikili ve üçlü kombinasyonları olmak üzere toplamda sekiz mutant varyant (üçlü: F219L/P165L/M278I, N221S/P165L/M278I, G222Q/P165L/M278I, G222Q/V203M/K214R, ikili: F219L/K214R, N221S/P342L ve tekli: G222M, N221S) elde edildi. Enzim kinetiği çalışmaları sonucunda enzim aktivitesi yaban tip ile kıyaslandığında;

222. pozisyonda mutasyona uğramış varyantlarda 2-3 kat azalma görülürken, 221. pozisyonda mutasyon taşıyan tek, çift ve üçlü mutasyona uğramış varyantların, aktiviteyi 3,5 kat kadar artırdığı gözlemlenmiştir (Khan *et al.* 2011). Esansiyel amino asit rezidüleri incelemek amacıyla *Flavobacterium meningosepticum'*dan GH3 ailesine ait β-glukozidaz (EC 3.2.1.21) enziminde bölgeye yönelik mutagenez yapılmış ve D247G, D247N ve D247E mutasyon varyantları elde edilmiştir. D247G ve D247N mutantlarının aktiviteleri (k_{cat}/K_m) yaban tip enzimin aktivitesinden sırasıyla 30000 ve 200000 kat daha düşükken, D247E mutantının yaban tip aktivitenin %20'sini koruduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar neticesinde Asp-247'nin esansiyel bir amino asit olduğuna karar verilmiş ve bu rezidünün reaksiyonda bir nükleofil olarak işlev gördüğü düşünülmüştür (Li *et al.* 2001).

Doğal bir substrat olan Polidatin ile reaksiyonu tabi tutulan yaban tip (BglA9 WT) enzimin kinetik karakterleri Zada ve arkadaşları tarafından oluşturulmuştur (Zada *et al.* 2021). Bu hesaplamalar sonucunda elde edilen veriler ile BglAy9 G226Q/Y227F enziminin verileri kıyaslandığında katalitik etkinliği 1,2 kat daha artırdığı görüldü. Ayrıca aynı substrat (Polidatin) bakımından L221S, N222S ve G226Q mutantları, yaban tip (BglA9 WT) ile karşılaştırıldığında L221S mutant enzimin katalitik etkiyi 0,55 kat azalttığı ancak N222S ve G226Q mutant enzimlerin sırasıyla katalitik etkinliği 2,2 ve 1,68 kat daha artırdığı saptanmıştır (yayınlanmamıştır).

Yaban tip (BglA9 WT) enzimin Mirisetin 3-O-glikozit ve Kukurbitasin 2-E-O glikozit doğal substratlar üzerindeki katalitik etkinliği incelenmiş ve sonuç olarak sırasıyla K_m =5,12 mM, $V_{max=}$ 7.6 U/mg, $k_{ca}t$ = 823 s^{-1}, k_{cat}/k_m =160 $s^{-1}mM^{-1}$ ve K_m =2,99 mM, $V_{max=}$ 1,74 U/mg, $k_{ca}t$ = 123 s^{-1}, $k_{ca}t$ =40,92 $s^{-1}mM^{-1}$ olarak belirlenmiştir (yayınlanmamıştır). BglAy9 G226Q/Y227F mutant enzim ile yaban tip (BglA9 WT) , Mirisetin 3-O-glikozit ve Kukurbitasin 2-E-O glikozit doğal substratları bakımından kıyaslandığında, mutant enzimin katalitik verimi sırasıyla 104,8(Mirisetin 3-O-glikozit) ve 124 (Kukurbitasin 2-E-O glikozit) kat düşürdüğü anlaşıldı. L221S, N222S veG226Q mutantları, yaban tip (BglA9 WT) ile karşılaştırıldığında L221S mutant enzimin katalitik etkiyi Mirisetin 3-O-glikozit bakımından 0,43 kat azalttığı ancak N222S veG226Q mutant enzimlerin sırasıyla katalitik etkinliği 0,1 ve 0,31 kat daha artırdığı görülmüştür (yayınlanmamıştır). Bunlara ek olarak Kukurbitasin 2-E-O glikozit doğal substrat bakımından L221S, N222S ve G226Q mutantları, yaban tip (BglA9 WT) ile karşılaştırıldığında, L221S mutant enzimin katalitik aktiviteyi 16,8 kat azalttığı ve N222S ile G226Q mutant enzimlerin sırasıyla katalitik etkiyi 15,75 ve 21 kat daha yükselttiği anlaşılmıştır (yayınlanmamıştır). *Thermotoga maritima* β-glukozidazında tekli ve ikili mutasyonları (F221L, N223L, G224T ve F221L/N223L) oluşturulmuş ve mutantların p-

nitrofenil β-D-glukopiranozit (*p*NPG) substratına karşı katalitik etkisi incelendiğinde aktivitede güçlü bir artışa neden olurken K_m değerinde herhangi bir değişim gözlemlenmemiştir. Ayrıca mutantların izoflavonoid glikozitlerine karşı katalitik etkilerine bakıldığında tüm mutantların aktivitelerinde azalma görülmüş ve kuersetin substratına karşı farklı katalitik etkinlik sergilemiştir (Sun *et al.* 2014). Yapılan bir çalışma da, etil metil sülfonat (EMS) ve ultraviyole (UV) radyasyonunun (hem tek, hem de birlikte) *Bacillus subtilis* suşuna (PS) birden fazla uygulanmasıyla yüksek seviyede β-glukozidaz üreten mutant organizma geliştirilmiş ve yalnızca UV'ye maruz kaldıktan sonra geliştirilen mutant, yaban tip (675 U/l) ile karşılaştırıldığında β-glukozidaz üretiminde (718 U/l) küçük bir artış gösterirken, yalnızca EMS'ye maruz kaldıktan sonra geliştirilen mutantın, her iki suştan biraz daha iyi bir üretim (762 U/l) sergilediği görülmüştür. Ayrıca, yaban tipin hem UV hem de EMS mutajenlerine birlikte maruz kalması sonucu enzim üretiminin yaklaşık 1,5 kat (806 U/l) daha arttığı gösterilmiştir. Bununla birlikte yaban tip enzimlerin (β-glukozidaz vd.) hedef molekülün omurgasında belli bir pozisyona bağlı glukozun hidrolizi için düşük afinite gösterdiği saptanmış ve enzimlerin aktif bölgelerinde yapılan mutasyonlar sonucunda elde edilen mutant enzimler ile doğal (yaban tip) enzimler karşılaştırıldığında katalitik aktivitelerinde farklılıklar gözlemlenmiştir (Kaiser and Lawrence 1984).

Polifenolik bileşikler, çeşitli hastalıklarla ilişkili olan serbest radikalleri temizleme yeteneğine sahiptir ve bu nedenle son zamanlarda antioksidan işlevi uygulamarın da çok ilgi görmektedirler (Souza 2008). Birçok çalışma, polifenolik bileşiklerin aglikon formlarının (şeker molekülü bağlı olmayan formu), glikozile edilmiş fromlarına nazaran daha yüksek antioksidatif yeteneğe sahip olduğunu göstermektedir (He *et al.* 2016). Yaban tip (BglA9 WT) ile glukoz grubu uzaklaştırılan(deglikozilasyon) Polidatin, Kukurbitasin 2-E-O glikozit ve Mirisetin 3-O-glikozit polifenolik bileşiklerin antioksidan etkisi incelendi ve sonuç olarak antioksidan etkinin sırasıyla %10, %39,92 ve%10,92 oranında arttığı görüldü. Diğer yandan mutant BglAy9 G226Q/Y227F enzimin Polidatin, Kukurbitasin 2-E-O glikozit ve Mirisetin 3-O-glikozit polifenolik bileşikler üzerindeki etkisi incelendiğinde, antioksidan etkinin sırasıyla %54,7445255, %41,2017167 ve %32,9538646 oranında arttıdığı gözlemlendi.

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Anoxybacillus ayderensis Ay9 suşunun β-glukozidaz enzimi klonlanmış ve biyokimysal karakterizasyon tanımlamaları yapılmıştır (Zada *et al.*). Devamında gen üzerinde tekli mutasyonlar oluşturulmuş ve karakterize edilmiştir (yayınlanmamıştır). Yapılan bu tez çalışmasında hem enzimin termostabilitesini hem de doğal olarak oluşan polifenolik glikozitlerden (Kukurbitasin 2-O- E glukozit, Mirisetin 3-O-glukozit ve Polidatin) ve ticari olarak satın alınan sentetik *p*NPG substratınadan glukoz rezidülerinin seçici olarak uzaklaştırılmasını (enziminin substrata olan ilgisini) ve bazı polifenolik glikozitlerin antioksidan etkilerini artırmak amacıyla, biyoinformatik yöntemlere dayalı protein mühendisliğine (bölgeye özgün mutasyon) başvuruldu. Daha önceki çalışmalarda yaban tip enzimin G226 rezidüsüne polar özellikte olan Glutamin (Q) hidrofilik amino asiti dâhil edilmişti. Bu tez kapsamında Y227 bölgesindeki Tirozin (Y) amino asiti yerine hidrofobik özellik gösteren Fenilalanin (F) amino asitinin dâhil edilmesi sonucu ilgili substratlara karşı ilgilinin artacağı düşünüldü ve *Anoxybacillus ayderensis* Ay9'dan elde edilen β-glukozidaz enzimi üzerinde G226Q mutasyonuna ek olarak Y227F mutasyon bölgesi oluşturuldu. Elde edilen G226Q/ Y227F mutant β-glukozidaz enziminin (BglAy9 G226Q/ Y227F) tez kapsamında biyokimyasal özellikleri belirlendi ve belirtilen substratlar ile kinetik karakterizasyonları gerçekleştirildi. BglAy9 G226Q/ Y227F ile deglikozilasyonu yapılan polifenolik bileşiklerin (Kukurbitasin 2-O- E glikozit, Polidatin ve Mirisetin 3-O-glikozit) antioksidan kapasiteleri DPPH yöntemi ile analiz edildi ve farklı konsantrasyonlarda glukozun enzim üzerindeki etkisi incelendi.

Çalışmamızda BglAy9 G226Q/Y227F mutant geni PCR temelli mutagenez yöntemi ile elde edildi. PCR ürünü pGEM-T Easy vektörüne klonlandı ve mutasyon bölgelerinden emin olmak amacıyla sekansa göderildi. Sekans sonrasında istenildiği gibi *G226Q/Y227F* mutant *Anoxybacillus ayderensis* Ay9'un β-glukozidaz geni (*bglAy9 G226Q/Y227F*) elde edildi. Ardından *bglAy9 G226Q/Y227F geni* ekpres edildi. Protein Ni- Afinite kromatografisi ile saflaştırıldı. Elde edilen saf protein SDS-PAGE'de yürütüldü. Yaban tip proteinle aynı büyüklükte yaklaşık 54 kDa saf protein bantları elde edildi. Enzimin optimum sıcaklığı 50 °C ve optimum pH 'sı 6,0 olarak belirlendi. Termal ve pH kararlı bir enzim olduğu anlaşıldı. Enzimin Hg^{+2} metal iyonunu varlığında aktivitesini tamamen inhibe ettiği, Fe^{+2} ve Zn^{+4} metal iyonlarının yüksek konsantrasyonlarda aktiviteyi engellediği ancak diğer metal iyonlarına karşı kararlığını koruduğu tespit edildi. Enzimin SDS (iyonik) harici deterjanlarda aktivitesine devam ettiği, fakat yüksek Tween-20 (non-iyonik) varlığında aktivitesini kaybettiği ve SDS'in enzim için çok güçlü inhibitör olduğu anlaşıldı. Organik bir çözücü olan butanolün aktiviteyi tamamen

inhibe ettiği ve %20 konsantrasyonda metanol, etanol, propanol ve dioksan gibi organik çözücülerin enzim için güçlü inhibitörler olduğu gözlemlendi. Enzimin PMSF harici diğer potansiyel potansiyel inhibitörlere karşı kararlılığını koruduğu ve glukoza karşı toleranslı bir enzim olduğu anlaşıldı. Enzimin *p*NPG substratı ile oluşturulan K_m, V_{max}, k_{cat} ve K_m/k_{cat} değerleri sırasıyla 0,245909 mM, 0,05666 µmol/dk, 250,9334 s^{-1}, 1020,432 $s^{-1}mM^{-1}$ olarak belirlendi. Bununla beraber Polidatin substratı ile oluşturulan K_m, V_{max}, k_{cat} ve K_m/k_{cat} değerleri sırasıyla 0,979744389 mM, 0,019723 µmol/dk, 3,895032s^{-1}, 3,97556 $s^{-1}mM^{-1}$ ve Kukurbitasin 2-E-O glikozit substratı ile oluşturulan K_m, V_{max}, k_{cat} ve K_m/k_{cat} değerleri sırasıyla 0,151371 mM, 0,022714173 µmol/dk, 0,019917^{-1}, 0,131575 $s^{-1}mM^{-1}$ olarak hesaplandı. Ayrıca Mirisetin 3-O-glikozit substratı ile yapılan kinetik çalışmalar sonucunda K_m, V_{max}, k_{cat} ve K_m/k_{cat} değerleri sırasıyla 0,06915725456 mM, 0,02701522794 µmol/dk, 0,02368796493 s^{-1}, 0,3425232115$s^{-1}mM^{-1}$ olarak belirlendi. Enzimin polifenolik susbstratlar üzerindeki antioksidan etkisini incelendi ve sonu olarak Polidatin, Mirisetin 3-O-glikozit ve Kukurbitasin 2-E-O glikozit substratları üzrindeki antioksidan etkiyi sırasıyla %54,7445255, %32,9538646 ve %41,2017167 oranında yükselttiği gözlemlendi.

Yaban tip (BglA9 WT) ve mutant BglAy9 G226Q/Y227F enzimin karakterizasyon sonuçları karşılaştırıldı, mutantın optimum pH seviyesinin düştüğü (pH 8'den pH 6'ya) ve organik çözücüler, metaller, iyonik/non- iyonik deterjanlar, potansiyel inhibitörler ve glukoz etkileşimlerinde değişiklikler olduğu ve optimum sıcaklığının, yaban tip ile uyumlu olduğu tespit edildi. Bunun yanında kinetik parametreler kıyaslandığında mutant enzimin bazı substratlara karşı ilgisinin azaldığı ancak enzimin substratlar ile deglikozilasyon sonrası elde edilen K_m değerlerinin endüstriyel uygulamar açısından uygun değerlere sahip olduğu saptandı. Son olarak elde edilen mutant enzim yaban tip ile karşılaştırıldığında çalışma kapsamında belirlenen substratlar üzerindeki antioksidan etkiyi artırdığı tespit edildi.

Öneriler;

- BglAy9 G226Q/Y227F mutantının farklı doğal ve yapay substratlara karşı verimliliği incelenebilir.
- BglAy9 G226Q/Y227F mutantının farklı doğal substratlar üzerinde antioksidan etkisi incelenebilir.
- BglAy9 G226Q/Y227F mutant geninde 227. bölgedeki Fenilalanin (F), hidrofilik özelliğe sahip amino asit rezidüsü ile değiştirilerek, oluşan yeni mutant enzimin doğal substratlar üzerinde antioksidan etkisi incelenebilir

- BglAy9 G226Q/Y227F mutant geninde 227. bölgedeki Fenilalanin (F), hidrofilik özelliğe sahip amino asit rezidüleri ile dğiştirilerek, oluşan yeni mutant enzimin doğal ve yapay substratlara karşı verimliliği incelenebilir.
- Enzimin +2 aktif bölgelerinde bulunan farklı amino asit rezidüleri üzerinde mutasyon yapılarak subtrata olan ilgisi incenebilir.
- Çalışmada kullanılan doğal susbstratlar %10'luk DMSO'da çözülerek enzimin kinetik karakterleri incelenebilir

KAYNAKLAR

Abdollahi, P. Ghane, M., & Babaeekhou, L., 2021. Isolation and characterization of Thermophilic bacteria from Gavmesh Goli hot spring in Sabalan geothermal field, Iran: *Thermomonas hydrothermalis* and *Bacillus altitudinis* isolates as a potential source of Thermostable Protease. *Geomicrobiology Journal*, *38*(1), 87-95.

Acar, M. 2013. Mandalina (Citrus Reticulata) Meyvesinden Saflaştırılan Beta-Glukosidaz Enziminin Nanopartiküllere İmmobilizasyonu ve Meyve Suyu Aroma Arttırma Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.

Agrawal, R. Satlewal, A., & Verma, A. K., 2013. Development of a β-glucosidase hyperproducing mutant by combined chemical and UV mutagenesis. *3 Biotech*, *3*(5), 381-388.

Akmaz S, 2001. Selülozun Enzimli Hidroliz Yoluyla Glukoza Dönüştürülmesi ve Tepkime Kinetiğinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi.

Altınok F,. 2022. Lokal olarak izole edilen *Anoxybacillus gonensis* UF7 ile lipaz enzim üretimi. yüksek lisans tezi, fen bilimleri enstitüsü, Atatürk Üniversitesi.

Arribas, J. C. D. Herrero, A. G. Martín-Lomas, M., Cañada, F. J., He, S., & Withers, S. G., 2000. Differential mechanism-based labeling and unequivocal activity assignment of the two active sites of intestinal lactase/phlorizin hydrolase. *European Journal of Biochemistry*, *267*(24), 6996-7005.

Ay F., Karaoglu H., İnan K., Çanakçi S., Beldüz A. O., Cloning, Purification and Characterization of a Thermostable Carboxylesterase from Anoxybacillus sp. PDF1., Protein Expression and Purification, 80 (2011) , 74–79.

Balogh, G. Komáromi, I., & Bereczky, Z., 2020. The mechanism of high affinity pentasaccharide binding to antithrombin, insights from Gaussian accelerated molecular dynamics simulations. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *38*(16), 4718-4732.

Baltacı, N.& Kalkancı, A., 2018. The pathogenes potential of Archaea.

Barton, N. W. Furbish, F. S., Murray, G. J., Garfield, M., & Brady, R. O., 1990. Therapeutic response to intravenous infusions of glucocerebrosidase in a patient with Gaucher disease.*Proceedings of the National Academy of Sciences*,*87*(5), 1913-1916.

Beguin, P. 1990. Molecular biology of cellulose degradation. *Annual review of microbiology*, *44*(1), 219-248.

Bekler Matpan F., 2016. Isolation and identification of a novel thermo-alkalophilic *Anoxybacillus* sp. strain KB4 from Kuşburnu hot spring in Turkey. Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

Beldüz A. O., Çanakçı S., Chan K.G., Kahar U. M., Chan C. S., Yaakop A. S., Goh K. M., Genome Sequence of Anoxybacillus ayderensis AB04T Isolated from Ayder Hot Spring in Turkey, Standarts in Genomic Sciences, 10 (2015).

Beriş F. Ş., De Smet L., Karaoglu H., Çanakçi S., Van Beeumen J., Beldüz A. O., The ATPase Activity of the G2alt Gene Encoding an Aluminium Tolerance Protein from Anoxybacillus gonensis G2, The Journal of Microbiology, 49 (2011), 641-650.

Berrin, J. G., Czjzek, M., Kroon, P. A., McLauchlan, W. R., Puigserver, A., Williamson, G., & Juge, N., 2003. Substrate (aglycone) specificity of human cytosolic beta-glucosidase. *Biochemical Journal*, *373*(1), 41-48.

Bhat, M. K., & Bhat, S., 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology advances*, *15*(3-4), 583-620.

Bhat, M. K., 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology advances*, *18*(5), 355-383.

Bhatia, Y., Mishra, S., & Bisaria, V. S., 2002. Microbial β-glucosidases: cloning, properties, and applications. *Critical reviews in biotechnology*, *22*(4), 375-407.

Bhatti, J. S., Apps, M. J., & Jiang, H., 2002. Influence of nutrients, disturbances and site conditions on carbon stocks along a boreal forest transect in central Canada. *Plant and Soil*, *242*(1), 1-14.

Bolton D.J., Kelly C.T., Fogarty W.M. Purification and Characterization of the α-amylase of Bacillus flavothermus, Enzyme and Microbial Technology, 20(1997), 340-343.

Boudet, A. M., 2007. Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*, *68*(22-24), 2722-2735.

Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, *72*(1-2), 248-254.

Brock, T. D., 2001. Chapter I: The Origins of Research on Thermophiles.(Ed: Reysenbach AL, Voytek M. Mancinelli, R. Kluwer Acedemic/Plenum Publishers, New York.(218).

Brzobohatý, B., Moore, I., Kristoffersen, P., Bako, L., Campos, N., Schell, J., & Palme, K., 1993. Release of active cytokinin by a β-glucosidase localized to the maize root meristem. *Science*, *262*(5136), 1051-1054.

Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., & Henrissat, B., 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic acids research*, *37*(suppl_1), D233-D238.

Cao, Y., & Cao, R., 1999. Angiogenesis inhibited by drinking tea. *Nature*, *398*(6726), 381-381.

Carter, L. G., D'Orazio, J. A., & Pearson, K. J., 2014. Resveratrol and cancer: focus on in vivo evidence. *Endocrine-related cancer*, *21*(3), R209-R225.

Chai Y.Y., Rahman R. N. Z. R. A., Illias R.M., Goh K.M. Cloning and Characterisation of Two New Thermostable and Alkali-tolerant α-amylases From the Anoxybacillus species that Produce High Levels of Maltose, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 39 (2012), 731–741

Chang, C. J., Tzeng, T. F., Liou, S. S., Chang, Y. S., & Liu, I. M., 2012. Myricetin increases hepatic peroxisome proliferator-activated receptor α protein expression and decreases plasma lipids and adiposity in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 787152–63.

Chen, Z., Meng, T., Li, Z., Liu, P., Wang, Y., He, N., & Liang, D., 2017. Characterization of a beta-glucosidase from *Bacillus licheniformis* and its effect on bioflocculant degradation. *AMB Express*, *7*(1), 1-7.

Chong, Y., Yan, A., Yang, X., Cai, Y., & Chen, J., 2012. An optimum fermentation model established by genetic algorithm for biotransformation from crude polydatin to resveratrol. *Applied biochemistry and biotechnology*, *166*(2), 446-457.

Chuenchor, W., Pengthaisong, S., Robinson, R. C., Yuvaniyama, J., Oonanant, W., Bevan, D. R., ... & Cairns, J. R. K., 2008. Structural insights into rice BGlu1 β-glucosidase oligosaccharide hydrolysis and transglycosylation. *Journal of molecular biology*, *377*(4), 1200-1215.

Cicek, M., & Esen, A., 1998. Structure and expression of a dhurrinase (β-glucosidase) from *sorghum*. *Plant Physiology*, *116*(4), 1469-1478.

Clarke, A. J., Bray, M. R., & Strating, H., 1993. β-Glucosidases, β-glucanases, and xylanases: their mechanism of catalysis. *Biochemistry and Molecular Biology*, ACS Symposium Series 533. American Chemical Society, Washington DC: 27- 41.

Corradini, E., Foglia, P., Giansanti, P., Gubbiotti, R., Samperi, R., & Lagana, A., 2011. Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of identification and quantitation in foods and plants. *Natural product research*, *25*(5), 469-495.

Crozier, A., Yokota, T., Jaganath, I. B., Marks, S., Saltmarsh, M., & Clifford, M. N., 2006. Secondary metabolites as dietary components in plant-based foods and beverages. *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet.* Oxford: Blackwell Publishing; 2006. pp. 208–302.

Czjzek, M., Cicek, M., Zamboni, V., Bevan, D. R., 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(25), 13555-13560.

Çanakçi S., Kacagan M., İnan K., Beldüz A. O., Saha B. C., Cloning, Purification, and Characterization of a Thermostable α-Larabinofuranosidase from *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26Sari., Applied Microbiology and Biotechnology, (2008),61–68.

Çavuşoğlu G,. 2013. Dolma zeytin (*Olea europaea l.)* Yaprağindan β-glukozidaz enzimini kodlayan genin klonlanmasi. Yüksek lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

Davies G. ve Henrissat B., Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases, Structure, 3 (1995), 858–859.

de Giuseppe, P. O., Souza, T. D. A., Souza, F. H. M., Zanphorlin, L. M., Machado, C. B., Ward, R. J., ... & Murakami, M. T., 2014. Structural basis for glucose tolerance in GH1 β-glucosidases. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, *70*(6), 1631-1639.

DeGraft Johnson, J., Kolodziejczyk, K., Krol, M., Nowak, P., Krol, B., & Nowak, D., 2007. Ferric-reducing ability power of selected plant polyphenols and their metabolites: implications for clinical studies on the antioxidant effects of fruits and vegetable consumption. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, *100*(5), 345-352.

Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A., 2013. Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & redox signaling*, *18*(14), 1818-1892.

Deshavath, N. N., Mukherjee, G., Goud, V. V., Veeranki, V. D., & Sastri, C. V., 2020. Pitfalls in the 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) assay for the reducing sugars: Interference of furfural and 5-hydroxymethylfurfural. *International journal of biological macromolecules*, *156*, 180-185.

Dharmawardhana, D. P., Ellis, B. E., & Carlson, J. E., 1995. A [beta]-Glucosidase from lodgepole pine xylem specific for the lignin precursor coniferin. *Plant physiology*, *107*(2), 331-339.

Dogaris, I., Mamma, D., & Kekos, D. (2013). Biotechnological production of ethanol from renewable resources by *Neurospora crassa*: an alternative to conventional yeast fermentations. Applied Microbiology and Biotechnology, 97(4), 1457–1473

Du, L., Wang, Z., Zhao, Y., Huang, J., Pang, H., Wei, Y., & Huang, R., 2014. A β-glucosidase from *Novosphingobium* sp. GX9 with high catalytic efficiency toward isoflavonoid glycoside hydrolysis and (+)-catechin transglycosylation. *Applied microbiology and biotechnology*, *98*(16), 7069-7079.

Dülger S., Demirbağ Z., Beldüz A.O., Anoxybacillus ayderensis sp. nov. and Anoxybacillus kestanbolensis sp. nov., International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54 (2004), 1499-1503.

Dvir, H., Harel, M., McCarthy, A. A., Toker, L., Silman, I., Futerman, A. H., & Sussman, J. L., 2003. X-ray structure of human acid-β-glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease. *EMBO reports*, *4*(7), 704-709.

Eberhardt, M. V., Lee, C. Y., & Liu, R. H., 2000. Antioxidant activity of fresh apples. *Nature*, *405*(6789), 903-904.

Ertunga N. S., Çolak A., Beldüz A. O., Çanakçi S., Karaoglu H., Sandalli C., Cloning, Expression, Purification and Characterization of Fructose-1,6-bisphosphate Aldolase From Anoxybacillus gonensis G2., The Journal of Biochemistry, 141 (2007), 817-825

Esen, A. (Ed.)., 1993. *ß-Glucosidases: biochemistry and molecular biology*. American Chemical Society. Washington, 0-8412-2697-0.

Esen, A., Whitaker, J., Vorage, A. ve Wong, D., 2003. β-Glucosidases. *In Handbook of Food Enzymology*, New York, 791- 803.

Flora, S. J., 2009. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *2*(4), 191-206.

Fong, C. H., Hasegawa, S., Miyake, M., Ozaki, Y., Coggins, C. W., & Atkin, D. R. , 1993. Limonoids and their glucosides in *Valencia orange* seeds during fruit growth and development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *41*(1), 112-115.

Fujiwara, S., 2002. Extremophiles: Developments of their special functions and potential resources. *Journal of bioscience and bioengineering*, *94*(6), 518-525.

Gebler, J., Gilkes, N. R., Claeyssens, M., Wilson, D. B., Beguin, P., Wakarchuk, W. W., ... & Withers, S. G., 1992. Stereoselective hydrolysis catalyzed by related beta-1, 4-glucanases and beta-1, 4-xylanases. *Journal of Biological Chemistry*, *267*(18), 12559-12561.

Gemici-Palabıyık, B., 2004. Bitki Genlerinin *Schizosaccharomyces* Pombe'de Anlatımı, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Gilbert, H. J., Stålbrand, H., & Brumer, H., 2008. How the walls come crumbling down: recent structural biochemistry of plant polysaccharide degradation. *Current opinion in plant biology*, *11*(3), 338-348.

González-Pombo, P., Fariña, L., Carrau, F., Batista-Viera, F., & Brena, B. M., 2011. A novel extracellular β-glucosidase from *Issatchenkia terricola*: Isolation, immobilization and

application for aroma enhancement of white Muscat wine. *Process Biochemistry*, *46*(1), 385-389.

Grabowski, G. A., Berg-Fussman, A., & Grace, M., 1993. Molecular biology and enzymology of human acid β-glucosidase. *biochemistry and molecular biology*, American Chemical Society, Washington D. C., 0-8412-2697-0.

Grabowski, G. A., Dinur, T., Osiecki, K. M., Kruse, J. R., Legler, G., & Gatt, S., 1985. Gaucher disease types 1, 2, and 3: differential mutations of the acid beta-glucosidase active site identified with conduritol B epoxide derivatives and sphingosine. *American journal of human genetics*, *37*(3), 499.

Greige-Gerges, H., Abou Khalil, R., Abou Mansour, E., Magdalou, J., Chahine, R., & Ouaini, N., 2007. Cucurbitacins from *Ecballium elaterium* juice increase the binding of bilirubin and ibuprofen to albumin in human plasma. *Chemico-Biological Interactions*, *169*(1), 53-62.

Guo, B., Amano, Y., & Nozaki, K., 2016. Improvements in glucose sensitivity and stability of *Trichoderma reesei* β-glucosidase using site-directed mutagenesis. *PloS one*, *11*(1), e0147301.

Gübitz, G. and Paulo, A., 2003. New substrates for reliable enzymes: enzymatic modification of polymers, Elsevier, 14, 577–582.

Güven, E. Ç., Otkun, G. T., & Boyacıoğlu, D. (2010). Flavonoidlerin biyoyararlılığını etkileyen faktörler. *Gıda*, *35*(5), 387-394.

Güven, R. G., 2011. Termofilik bakteriler ve biyoteknolojik açıdan önemli bazı enzimleri. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, *9*(1), 1-10.

Haki, G. D., & Rakshit, S. K., 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource technology*, *89*(1), 17-34.

Halaweish, F. T., Bartalis, J., 2007. Cucurbitacin Compounds, US Patent Appl. Pub. US 2007/0099852 A1, May 2007.

Han Y. J., Cho K. C., Hwang O.J., Choi Y. S., Shin A. S., Hwang I., Kim J. I., Overexpression of an Arabidopsis β-glucosidase gene enhances drought resistance with dwarf phenotype in creeping bentgrass, Plant Cell Reports, 31 (2012), 1677– 1686.

Handique, J. G., & Baruah, J. B., 2002. Polyphenolic compounds: an overview. *Reactive and Functional Polymers*, *52*(3), 163-188.

Haq, I. U., Khan, M. A., Muneer, B., Hussain, Z., Afzal, S., Majeed, S., ... & Ahmad, I., 2012. Cloning, characterization and molecular docking of a highly thermostable β-1, 4-glucosidase from *Thermotoga petrophila*. *Biotechnology letters*, *34*(9), 1703-1709.

Hatfield, R., & Vermerris, W., 2001. Lignin formation in plants. The dilemma of linkage specificity. *Plant physiology*, *126*(4), 1351-1357.

He, Z., Huang, Z., Zhou, W., Tang, Z., Ma, R., & Liang, J., 2016. Anti-biofilm activities from resveratrol against *Fusobacterium nucleatum*. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 1065.

Henrissat B., Driguez H., Viet C., Schülein M., Synergism of Cellulases from Trichoderma reesei in the Degradation of Cellulose, Bio technology, 3 (1985), 722-726.

Henrissat B., ve Bairoch A., Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases , Bichemical Journal, 316 (1996), 695-696.

Henrissat, B., & Davies, G. J., 2000. Glycoside hydrolases and glycosyltransferases. Families, modules, and implications for genomics. *Plant physiology*, *124*(4), 1515-1519.

Henrissat, B., & Davies, G., 1997. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Current opinion in structural biology*, *7*(5), 637-644.

Henrissat, B., 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical journal*, *280*(2), 309-316.

Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., & Pease, L. R., 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, *77*(1), 51-59.

Hösel, W., & Conn, E. E., 1982. The aglycone specificity of plant ß-glycosidases. *Trends in biochemical sciences*, *7*(6), 219-221.

Huang, X., Kim, D., Huang, P., Vater, A., & Siegel, J. B., 2020. Design to Data for mutants of β-glucosidase B from *Paenibacillus polymyxa*: L171M, H178M, M221L, E406W, N160E, F415M. *bioRxiv*.

Isorna, P., Polaina, J., Latorre-García, L., Cañada, F. J., González, B., & Sanz-Aparicio, J., 2007. Crystal structures of *Paenibacillus polymyxa* β-glucosidase B complexes reveal the molecular basis of substrate specificity and give new insights into the catalytic machinery of family I glycosidases. *Journal of molecular biology*, *371*(5), 1204-1218.

Jäger, S., Brumbauer, A., Fehér, E., Réczey, K., & Kiss, L., 2001. Production and characterization of β-glucosidases from different *Aspergillus strains*. *World J Microbiol Biotechnol*. 2001;17:455–461.

Jones, P. R., Andersen, M. D., Nielsen, J. S., Høj, P. B., & Møller, B. L., 2000. The biosynthesis, degradation, transport and possible function of cyanogenic.*Evol Metab Pathways*, *34*(191), 80008-8.

Kacagan M., Çanakci S., Sandallı C., İnan K., Çolak D. N., Beldüz A. O., Characterization of a Xylanase from a Thermophilic Strain of Anoxybacillus pushchinoensis A8, Biologia, 63, 5 2008), 599-606

Kaçıran A., 2020. Cloning, Expression and Characterization of the β-Glucosidases from *Jiangella ureilytica* KC603, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü.

Kahraman, A., Serteser, M., & Koken, T., 2002. Flavonoidler. *Kocatepe Tıp Dergisi*, *3*(1).

Kakes, P., 1993. Function and variation of the β-glucosidase linamarase in natural populations of *Trifolium repens. Biochemistry and Molecular Biology*, Washington DC: American Chemical Society: 145-152. ACS Symposium Series 533.

Kang, N. J., Jung, S. K., Lee, K. W., & Lee, H. J., 2011. Myricetin is a potent chemopreventive phytochemical in skin carcinogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1229*(1), 124-132.

Kara, H., 2010. Beta Glukozidaz Enziminin Hidrofobik Etkileşim Kromotografisi ile *Olea europea* Meyvesinden Saflaştırılması, Karakterizasyonu ile Bazı Pestisit Ve Ağır Metallere Karşı Afinitesinin Araştırılması. Balıkesir Üniversitesi. Doktora Tezi.

Kawaii, S., Tomono, Y., Katase, E., Ogawa, K., & Yano, M., 1999. Antiproliferative effects of the readily extractable fractions prepared from various citrus juices on several cancer cell lines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*(7), 2509-2512.

Kedare, S. B., & Singh, R. P., 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of food science and technology*, *48*(4), 412-422.

Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö. İ., 2015. Proteinler. Biyokimya, Bölüm 3. Erzurum, 33-84.

Ketudat Cairns, J. R., & Esen, A., 2010. β-Glucosidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *67*(20), 3389-3405.

Khan, S., Pozzo, T., Megyeri, M., Lindahl, S., Sundin, A., Turner, C., & Karlsson, E. N., 2011. Aglycone specificity of *Thermotoga neapolitana* β-glucosidase 1A modified by mutagenesis, leading to increased catalytic efficiency in quercetin-3-glucoside hydrolysis. *BMC biochemistry*, *12*(1), 1-15.

Kikani B. A. ve Singh S.P., The Stability and Thermodynamic Parameters of a Very Thermostable and Calcium-independent α-amylase From a Newly Isolated Bacterium, Anoxybacillus beppuensis TSSC-1, Process Biochemistry, 47, 12 (2012), 1791-1798

Kim, M. Y., Choi, S. W., & Chung, S. K., 2000. Antioxidative flavonoids from the garlic (*Allium sativum* L.) shoot. *Food Science and Biotechnology*, *9*(4), 199-203.

Kim, Y. S., & Ma, J. Y., 2018. Insight into the hydrolytic selectivity of β-glucosidase to enhance the contents of desired active phytochemicals in medicinal plants. *BioMed Research International*, *2018*.

Ko, J. A. Park, J. Y., Kwon, H. J., Ryu, Y. B., Jeong, H. J., Park, S. J., ... & Kim, Y. M., 2014. Purification and functional characterization of the first stilbene glucoside-specific β-glucosidase isolated from *Lactobacillus kimchi*. *Enzyme and microbial technology*, *67*, 59-66.

Kocaefe Ç.Y,. 1999. PCR tekniği kullanimi ile DNA dizilerinde mutasyon oluşturulmasi (in-vitro mutagenez). Yüksek Lisans Tezi.

Korkmaz, H. Tankılıç, N. Özen, T. Güden A., 2015. Biyokimya I Ders Notları, Yayınları no :18, On Dokuz Mayıs Üviversitesi. Samsun

Koshland Jr, D. E., 1953. Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. *Biological reviews*, *28*(4), 416-436.

Kosugi, A., 2004. Cellulosomes: plant-cell-wall-degrading enzyme complexes. *Nature reviews microbiology*, *2*(7), 541-551.

Krisch, J. Takó, M., Papp, T., & Vágvölgyi, C., 2010. Characteristics and potential use of β-glucosidases from *Zygomycetes*. *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*, *2*, 891-896.

Kuo, C. H., & Lee, C. K., 2009. Enhanced enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse by N-methylmorpholine-N-oxide pretreatment. *Bioresource Technology*, *100*(2), 866-871.

Laine, R. A., 1994. A calculation of all possible oligosaccharide isomers both branched and linear yields 1.05 x 10 (12) structures for a reducing hexasaccharide: the Isomer Barrier to development of single-method saccharide sequencing or synthesis systems. *Glycobiology*, *4*(6), 759-767.

Leah, R., Kigel, J., Svendsen, I. B., & Mundy, J., 1995. Biochemical and Molecular Characterization of a Barley Seed β-Glucosidase (∗). *Journal of Biological Chemistry*, *270*(26), 15789-15797.

Lee, H. L., Chang, C. K., Jeng, W. Y., Wang, A. H. J., & Liang, P. H., 2012. Mutations in the substrate entrance region of β-glucosidase from *Trichoderma reesei* improve

enzyme activity and thermostability. *Protein Engineering, Design & Selection*, *25*(11), 733-740.

Lee, K. H., Piao, H. L., Kim, H. Y., Choi, S. M., Jiang, F., Hartung, W.,. & Hwang, I., 2006. Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid. *Cell*, *126*(6), 1109-1120.

Lee, K. W., & Lee, H. J., 2006. The roles of polyphenols in cancer chemoprevention. *Biofactors*, *26*(2), 105-121.

Lee, Y. G., Cho, J. Y., Kim, Y. M., & Moon, J. H., 2016. Change in flavonoid composition and antioxidative activity during fermentation of onion (Allium cepa L.) by *Leuconostoc mesenteroides* with different salt concentrations. *Journal of food science*, *81*(6), C1385-C1393.

Li Y., Zhu Y., Liu A., Sun Y., Identification and Characterization of a novel L-arabinose Isomerase from *Anoxybacillus flavithermus* useful in D-tagatose production, Extremophiles, 15 (2011), 441–450

Li, D., Li, X., Dang, W., Tran, P. L., Park, S. H., Oh, B. C., ... & Park, K. H., 2013. Characterization and application of an acidophilic and thermostable β-glucosidase from *Thermofilum pendens*. *Journal of bioscience and bioengineering*, *115*(5), 490-496.

Li, H., Xia, N., & Förstermann, U., 2012. Cardiovascular effects and molecular targets of resveratrol. *Nitric oxide*, *26*(2), 102-110.

Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M., & Wang, X., 2012. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Computational and structural biotechnology journal*, *2*(3), e201209017.

Li, Y. K., Chir, J., & CHEN, F. Y., 2001. Catalytic mechanism of a family 3 β-glucosidase and mutagenesis study on residue Asp-247. *Biochemical Journal*, *355*(3), 835-840.

Lima, L. H. F. D., Fernandez-Quintéro, M. L., Rocha, R. E. O., Mariano, D. C. B., de Melo-Minardi, R. C., & Liedl, K. R., 2021. Conformational flexibility correlates with glucose tolerance for point mutations in β-glucosidases–a computational study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *39*(5), 1621-1634.

Liu, I. M., Tzeng, T. F., Liou, S. S., & Lan, T. W., 2007. Myricetin, a naturally occurring flavonol, ameliorates insulin resistance induced by a high-fructose diet in rats. *Life sciences*, *81*(21-22), 1479-1488.

Lynd, L. R., Weimer, P. J., Van Zyl, W. H., & Pretorius, I. S., 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*, *66*(3), 506-577.

Machlin, L. J., & Bendich, A., 1987. Free radical tissue damage: Protective role of antioxidant nutrients 1. *The FASEB journal*, *1*(6), 441-445.

Matsuzawa, T., Jo, T., Uchiyama, T., Manninen, J. A., Arakawa, T., Miyazaki, K., ... & Yaoi, K., 2016. Crystal structure and identification of a key amino acid for glucose tolerance, substrate specificity, and transglycosylation activity of metagenomic β-glucosidase Td2F2. *The FEBS journal*, *283*(12), 2340-2353.

McCarter, J. D., & Withers, G. S., 1994. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Current opinion in structural biology*, *4*(6), 885-892.

McDonald, A. G., Boyce, S., & Tipton, K. F., 2009. ExplorEnz: the primary source of the IUBMB enzyme list. *Nucleic acids research*, *37*(suppl_1), D593-D597.

McDonald, M. S., Hughes, M., Burns, J., Lean, M. E., Matthews, D., & Crozier, A., 1998. Survey of the free and conjugated myricetin and quercetin content of red wines of different geographical origins. *Journal of agricultural and food chemistry*, *46*(2), 368-375.

Nahrstedt, A., & Davis, R. H., 1986. Uptake of linamarin and lotaustralin from their foodplant by larvae of *Zygaena trifolii*. *Phytochemistry*, *25*(10), 2299-2302.

Nam, K. H., Sung, M. W., & Hwang, K. Y., 2010. Structural insights into the substrate recognition properties of β-glucosidase. *Biochemical and biophysical research communications*, *391*(1), 1131-1135.

Naz, S., Ikram, N., Rajoka, M. I., Sadaf, S., & Akhtar, M. W., 2010. Enhanced production and characterization of a β-glucosidase from *Bacillus halodurans* expressed in Escherichia coli. *Biochemistry (Moscow)*, *75*(4), 513-518.

Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M., 2008. *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan.

Neufeld, E. F. 1991. Lysosomal storage diseases. *Annual review of biochemistry*, *60*(1), 257-280.

Ong, K. C., & Khoo, H. E., 2000. Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. *Life sciences*, *67*(14), 1695-1705.

Ozaki, Y., Ayano, S., Miyake, M., Maeda, H., Ifuku, Y., & Hasegawa, S., 1992. Limonoid glucosides in juices of *Satsuma Mandarin* (Citrus unshiu Marc.). *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, *56*(5), 836-837.

Oztas Gulmus, E., & Gormez, A., 2020. Identification and characterization of novel thermophilic bacteria from hot springs, Erzurum, Turkey. *Current Microbiology*, *77*(6), 979-987.

Pang, P., Cao, L. C., Liu, Y. H., Xie, W., & Wang, Z, 2017. Structures of a glucose-tolerant β-glucosidase provide insights into its mechanism. *Journal of Structural Biology*, *198*(3), 154-162.

Park, N. Y. Cha, J. H., Kim, D. O., & Park, C. S., 2007. Enzymatic characterization and substrate specificity of thermostable beta-glycosidase from hyperthermophilic archaea, *Sulfolobus shibatae*, expressed in E. coli. *Journal of microbiology and biotechnology*, *17*(3), 454-460.

Piao, H. L., & Hwang, I., 2000. A transgenic *Arabidopsis* plant overexpressing an ER localized b-glucosidase homolog that is transcriptionally suppressed by NaCl is hypersensitive to NaCl stress (direct sequence submission to GenBank). *direct sequence submission to GenBank*.

Pikuta, E. Lysenko, A. Chuvilskaya, N. Mendrock, U. Hippe, H., Suzina, N., & Laurinavichius, K. 2000. *Anoxybacillus pushchinensis* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of *Anoxybacillus flavitherms* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *50*(6), 2109-2117.

Pikuta, E., Cleland, D., & Tang, J., 2003. Aerobic growth of *Anoxybacillus pushchinoensis* K1T: emended descriptions of *A. pushchinoensis* and the genus *Anoxybacillus*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *53*(5), 1561-1562.

Qi, M., Jun, H. S., & Forsberg, C. W., 2008. Cel9D, an atypical 1, 4-β-d-glucan glucohydrolase from *Fibrobacter succinogenes*: characteristics, catalytic residues,

and synergistic interactions with other cellulases. *Journal of bacteriology*, *190*(6), 1976-1984.

Rajan, S. S., Yang, X., Collart, F., Yip, V. L., Withers, S. G., Varrot, A., ... & Anderson, W. F., 2004. Novel catalytic mechanism of glycoside hydrolysis based on the structure of an NAD+/Mn2+-dependent phospho-α-glucosidase from *Bacillus subtilis*. *Structure*, *12*(9), 1619-1629.

Reilly, C. C., Gentry, C. R., & McVay, J. R., 1987. Biochemical evidence for resistance of rootstocks to the peachtree borer and species separation of peachtree borer and lesser peachtree borer (Lepidoptera: Sesiidae) on peach trees. *Journal of economic entomology*, *80*(2), 338-343.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*, *20*(7), 933-956.

Rios, J. L., Escandell, J.M., Recio, M.C., 2005. New Insıghts into the bioactivıty of Cucurbitacins. *Studies in Natural Products Chemistry*. 32, 429-469.

Rizzello, C. G., Coda, R., Macías, D. S., Pinto, D., Marzani, B., Filannino, P., & Gobbetti, M., 2013. Lactic acid fermentation as a tool to enhance the functional features of Echinacea spp. *Microbial Cell Factories*, *12*(1), 1-15.

Rodriguez-Mateos, A., Vauzour, D., Krueger, C. G., Shanmuganayagam, D., Reed, J., Calani, L., ... & Crozier, A., 2014. Bioavailability, bioactivity and impact on health of dietary flavonoids and related compounds: an update. *Archives of toxicology*, *88*(10), 1803-1853.

Sahu, S. S. Madhyastha, S., & Rao, G. M., 2013. Neuroprotective effect of resveratrol against prenatal stress induced cognitive impairment and possible involvement of Na+, K+-ATPase activity. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *103*(3), 520-525.

Salehi Jouzani, G. & Taherzadeh, M. J. 2015. Advances in consolidated bioprocessing systems for bioethanol and butanol production from biomass: a comprehensive review. *Biofuel Research Journal*, *2*(1), 152-195.

Salgado, J. C. S. Meleiro, L. P., Carli, S., & Ward, R. J., 2018. Glucose tolerant and glucose stimulated β-glucosidases–a review. *Bioresource technology*, *267*, 704-713.

Sanz-Aparicio, J., Hermoso, J. A., Martınez-Ripoll, M., Lequerica, J. L., & Polaina, J., 1998. Crystal structure of β-glucosidase A from *Bacillus polymyxa*: insights into the catalytic activity in family 1 glycosyl hydrolases. *Journal of molecular biology*, *275*(3), 491-502.

Sebastio, G., Villa, M., Sartorio, R., Guzzetta, V., Poggi, V., Auricchio & Semenza, G., 1989. Control of lactase in human adult-type hypolactasia and in weaning rabbits and rats. *American journal of human genetics*, *45*(4), 489.

Sevinç, N.2010. Türkiye Topraklarından İzole Edilen *Bacillus Sp.* Suşlarından Proteaz Üretimi, Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu (Doctoral dissertation, Bursa Uludag University (Turkey).

Shewale, J. G.1982. β-Glucosidase: its role in cellulase synthesis and hydrolysis of cellulose. *International Journal of Biochemistry*, *14*(6), 435-443.

Shimmyo, Y. Kihara, T., Akaike, A., Niidome, T., & Sugimoto, H., 2008. Three distinct neuroprotective functions of myricetin against glutamate-induced neuronal cell death: involvement of direct inhibition of caspase-3. *Journal of neuroscience research*, *86*(8), 1836-1845.

Singh G., Verma A.K., Kumar V,Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of β-glucosidases, 3 Biotech, 6:3 (2015)

Singh, G., Verma, A. K., & Kumar, V., 2016. Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of β-glucosidases. *3 Biotech*, *6*(1), 1-14.

Singhania, R. R., Patel, A. K., Sukumaran, R. K., Larroche, C., & Pandey, A., 2013. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource technology*, *127*, 500-507.

Singhania, R., R., Patel, A., K., Pandey, A. and Ganansounou, E., Genetic modification: A tool for enhancing beta-glucosidase production for biofuel application, Biosource Technology, 245 (2017) 1352-1361.

Singleton, V. L., & Rossi, J. A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, *16*(3), 144-158.

Sinnott, M. L., 1990. Catalytic mechanism of enzymic glycosyl transfer. *Chemical Reviews*, *90*(7), 1171-1202.

Souza, J. N., Silva, E. M., Loir, A., Rees, J. F., Rogez, H., & Larondelle, Y., 2008. Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: A correlation study using chemical and biological in vitro assays. *Food Chemistry*, *106*(1), 331-339.

Spagna, G., Barbagallo, R. N., Palmeri, R., Restuccia, C., & Giudici, P., 2002a-b. Properties of endogenous β-glucosidase of a *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from Sicilian musts and wines. *Enzyme and Microbial Technology*, *31*(7), 1030-1035.

Srivastava, N., Rathour, R., Jha, S., Pandey, K., Srivastava, M., Thakur, V. K., ... & Mishra, P. K., 2019. Microbial beta glucosidase enzymes: Recent advances in biomass conversation for biofuels application. *Biomolecules*, *9*(6), 220.

Sun, H., Xue, Y., & Lin, Y., 2014. Enhanced catalytic efficiency in quercetin-4′-glucoside hydrolysis of Thermotoga maritima β-glucosidase A by site-directed mutagenesis. *Journal of agricultural and food chemistry*, *62*(28), 6763-6770.

Sun, J., Wang, W., Ying, Y., & Hao, J., 2020. A novel glucose-tolerant GH1 β-glucosidase and improvement of its glucose tolerance using site-directed mutation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *192*(3), 999-1015.

Şener, H., 2011. Glikozidaz Enzim Preparatlarının Beyaz Şarap Aromasına Etkisi. *Academic Food Journal/Akademik GIDA*.

Teugjas, H., & Väljamäe, P., 2013. Selecting β-glucosidases to support cellulases in cellulose saccharification. *Biotechnology for biofuels*, *6*(1), 1-13.

Tian, T., Sun, Q., Shen, J., Zhang, T., Gao, P., & Sun, Q., 2008. Microbial transformation of polydatin and emodin-8-β-d-glucoside of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc into resveratrol and emodin respectively by Rhizopus microsporus. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *24*(6), 861-866.

Turner, C. Turner, P., Jacobson, G., Almgren, K., Waldebäck, M., Sjöberg, P., ... & Markides, K. E., 2006. Subcritical water extraction and β-glucosidase-catalyzed hydrolysis of quercetin glycosides in onion waste. *Green Chemistry*, *8*(11), 949-959.

URL-1 https://www.sigmaaldrich.com/ prodMerch10-3, 2020

Uzun A,. 2015. Termofilik *Anoxybacillus flavithermus* bakterisinin isil kararli βglukozġdaz genġnġn klonlanmasi, ekspresyonu ve biyokimyasal karakterġzasyonu. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi.

Verdoucq, L., Morinière, J., Bevan, D. R., Esen, A., Vasella, A., Henrissat, B., & Czjze, M., 2004. Structural determinants of substrate specificity in family 1 β-glucosidases: novel insights from the crystal structure of sorghum dhurrinase-1, a plant β-glucosidase with strict specificity, in complex with its natural substrate. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(30), 31796-31803.

Voorhorst, W. G., Eggen, R. I., Luesink, E. J., & De Vos, W. M., 1995. Characterization of the celB gene coding for beta-glucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* and its expression and site-directed mutation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *177*(24), 7105-7111.

Wang, C. C., Fernando, L. P., & Low, P. S., 1996. Rapid site-directed mutagenesis by a method that selects for full length mutated DNA. *Nucleic acids research*, *24*(7), 1378-1379.

Wang, H., Liu, L., Guo, Y. X., Dong, Y. S., Zhang, D. J., & Xiu, Z. L., 2007. Biotransformation of piceid in *Polygonum cuspidatum* to resveratrol by Aspergillus oryzae. *Applied microbiology and biotechnology*, *75*(4), 763-768.

Wang, Q., Graham, R. W., Trimbur, D., Warren, R. A. J., & Withers, S. G., 1994. Changing enzymic reaction mechanisms by mutagenesis: conversion of a retaining glucosidase to an inverting enzyme. *Journal of the American Chemical Society*, *116*(25), 11594-11595.

Wataru, I. Hiroshi, I. & Yoshikazu, K., 1991. A general method for introducing a series of mutations into cloned DNA using the polymerase chain reaction. *Gene*, *102*(1), 67-70.

Winterhalter, P., & Skouroumounis, G. K., 1997. Glycoconjugated aroma compounds: occurrence, role and biotechnological transformation. *Biotechnology of aroma compounds*, 73-105.

Xiao, Y., Wang, L., Rui, X., Li, W., Chen, X., Jiang, M., & Dong, M., 2015. Enhancement of the antioxidant capacity of soy whey by fermentation with *Lactobacillus plantarum* B1–6. *Journal of Functional Foods*, *12*, 33-44.

Xu Z., Escamilla-Treviño L., Zeng L., Lalgondar M., Bevan D., Winkel B., Mohamed A., Cheng C., Shih M., Poulton J., Asim Esen A., Functional Genomic Analysis of Arabidopsis thaliana Glycoside Hydrolase Family 1", Plant Molecular Biology, 55 (2004), 343-367.

Yoav, S., Stern, J., Salama-Alber, O., Frolow, F., Anbar, M., Karpol, A., ... & Bayer, E. A., 2019. Directed evolution of *Clostridium thermocellum* β-Glucosidase a towards enhanced thermostability. *International journal of molecular sciences*, *20*(19), 4701.

Zada N. S., Beldüz A. O., Güler H. İ. Şahinkaya M., Khan S. I., Saba M., İnan-Bektas K., Kara Y., Kolaylı S., Badshah M., Shah A. A., Khan S., Cloning, biochemical characterization and molecular docking of novel thermostable β-glucosidase BglA9 from *Anoxybacillus ayderensis* A9 and its application in de-glycosylation of Polydatin, International Journal of Biological Macromolecules, 193, (2021), 1898-1909.

Zada, N. S., Belduz, A. O., Güler, H. I., Khan, A., Sahinkaya, M., Kaçıran, A., ... & Khan, S., 2021. Cloning, expression, biochemical characterization, and molecular docking

studies of a novel glucose tolerant β-glucosidase from *Saccharomonospora* sp. NB11. *Enzyme and Microbial Technology*, *148*, 109799.

Zhang, D., Allen, A. B., & Lax, A. R., 2012. Functional analyses of the digestive β-glucosidase of *Formosan subterranean* termites (Coptotermes formosanus). *Journal of insect physiology*, *58*(1), 205-210.

Zhou, J., Liang, M., Lin, Y., Pang, H., Wei, Y., Huang, R., & Du, L., 2022. Application of β-Glucosidase in a Biphasic System for the Efficient Conversion of Polydatin to Resveratrol. *Molecules*, *27*(5), 1514.

Zubay, G., 1988. Biochemistry. *Machmillan Publishing Company*, 866 Third Avenue, New York 10022, 2nd. edition; 131-414, ISBN-0-22-432080-3.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Mine KARAOĞLAN
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	Tarsus Teknik ve Anadolu Endüstri Meslek Lisesi
Lisans:	Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Yüksek lisans:	Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji Ve Genetik Anabilim Dalı
Doktora:	
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	Orta
Almanca:	
Rusça:	
Diğer	
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
Tezden Üretilmiş Yayınlar	