

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANOXYBACILLUS AYDERENSIS AY9 β -GLUKOZİDAZ G226E MUTANTININ
KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZGÜ YILMAZ

TEMMUZ 2022
TRABZON



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***ANOXYBACILLUS AYDERENSIS* AY9 β -GLUKOZİDAZ G226E MUTANTININ
KARAKTERİZASYONU**

Özgü Yılmaz

ORCID : - - -

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

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 13 / 06 / 22

Tezin Savunma Tarihi : 07 / 07 / 22

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Kadriye İnan Bektaş
ORCID : - - -

Trabzon 2022

ÖNSÖZ

“*Anoxybacillus ayderensis* Ay9 β -Glukozidaz G226E Mutantının Karakterizasyonu” konu alan bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans tez danışmanlığımı üstlenerek, gerek konu seçimi gerekse çalışmaların yürütülmesi ve değerlendirilmesi sırasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Kadriye İnan Bektaş’a, benzer şekilde Yüksek lisans tez danışmanlığımı üstlenmiş olan eski danışmanım sayın Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’ e, laboratuvar çalışmalarım sırasında deneyimlerinden yararlandığım sayın hocam Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI’ya teşekkür etmeyi bir borç bilirim. Aynı zamanda çalışmalarımda bana yardımcı olan Arş. Gör. Aleyna NALÇAOĞLU’na, doktora öğrencisi Miray ŞAHİNKAYA’ya, doktora öğrencisi Arife KAÇIRAN’a, yüksek lisans öğrencisi Mine KARAOĞLAN’a, tüm laboratuvar çalışanlarına ve beni yalnız bırakmayan ailem ve tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum “*Anoxybacillus ayderensis* Ay9 β -Glukozidaz G226E Mutantının Karakterizasyonu” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Doç. Dr. Kadriye İNAN BEKTAŞ’ın sorumluluğunda tamamladığımı, örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 07/07/2022

Özgü YILMAZ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET.....	VII
SUMMARY.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER DİZİNİ.....	XII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. β -Glukozidaz Enziminin Adlandırılması.....	2
1.3. Hidrolazlar (EC 3).....	3
1.4. Glukozit Hidrolazlar (EC.3.2).....	3
1.5. β -Glukozidaz (EC3.2.1.21).....	4
1.6. β -Glukozidazların Kataliz Mekanizmaları.....	6
1.7. Enzimin Endüstriyel Kullanım Alanları.....	9
1.7.1. Besin Kalitesinin İyileştirilmesi.....	9
1.7.2. Biyokitle dönüşümü.....	10
1.7.3. İnsan Sağlığı ve Tıp.....	10
1.7.4. β -glukozidazların Diğer Uygulamaları Alanları.....	11
1.8. β -glukozidazların Substratları ve Substrat Özgüllüğü.....	12
1.9. β -glukozidazın Glukoz Toleransı.....	15
1.10. β -Glukozidaz Enziminde Yapılan Nokta Mutasyonu Çalışmaları.....	17
1.11. <i>Anoxybacillus</i> Cinsinin Özellikleri.....	24
1.11.1. <i>Anoxybacillus ayderensis</i> Ay9.....	26
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	28
2.1. Kullanılan Kimyasallar, Enzimler ve Kitler.....	28
2.2. Kullanılan Besiyerleri.....	28
2.3. Kullanılan Bakteriler ve Vektörler.....	29
2.4. β -glukozidaz Geninde (<i>bglAy9</i> N222S) G226E Nokta Mutasyonunun Oluşturulması.....	29

2.5.	<i>bgl</i> Ay9 N222S /G226E Mutant β -Glukozidaz Geninin pGEM®-T Easy Klonlama Vektörüne Klonlanması.....	31
2.6.	<i>bgl</i> Ay9 N222S/G226E Geninin pET28a (+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması	32
2.7.	<i>bgl</i> Ay9 N222S/G226E mutant β -glukozidaz Geninin Aşırı Ekspresyonu.....	33
2.8.	BglAy9 N222S/G226E Enziminin Ni- Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması	33
2.9.	SDS-PAGE Analizi.....	34
2.10.	Bradford Yöntemiyle Protein Konsantrasyon Tayini	35
2.11.	BglAy9 N222S/G226E Enziminin Karakterizasyonu	35
2.11.1.	Optimum Sıcaklık	36
2.11.2.	Optimum pH	36
2.11.3.	Enzim Kinetiği	36
2.11.4.	Termal Kararlılık.....	36
2.11.5.	pH Kararlılığı	37
2.11.6.	Metal İyon Etkisi.....	37
2.11.7.	Deterjanların, İnhibitörlerin ve Organik Çözücülerin Etkileri.....	37
2.11.8.	Glukoz Toleransı.....	38
3.	BULGULAR.....	39
3.1.	<i>bgl</i> Ay9 N222S/G226E Geninin Elde Edilmesi.....	39
3.2.	<i>bgl</i> Ay9 N222S/G226E Geninin pGEM®-T Easy Vektörüne Klonlanması	39
3.3.	G226E β -glukozidaz Mutasyon Analizi.....	40
3.4.	<i>bgl</i> Ay9 N222S/G226E Geninin pET28a (+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması	42
3.5.	BglAy9 N222S/G226E Enziminin SDS-PAGE Analizi.....	42
3.6.	BglAy9 N222S/G226E Enziminin Karakterizasyonu	43
3.6.1.	Optimum Sıcaklık	43
3.6.2.	Optimum pH	44
3.6.3.	Enzim Kinetiği	45
3.6.4.	Termal Kararlılık.....	46
3.6.5.	pH Kararlılığı	47
3.6.6.	Metal İyon Etkisi.....	47
3.6.7.	Deterjanların, İnhibitörlerin ve Organik Çözücülerin Etkileri.....	48
3.6.8.	Glukoz Toleransı.....	51
4.	TARTIŞMA	52

5.	SONUÇLAR	56
6.	ÖNERİLER.....	57
7.	KAYNAKLAR	58
8.	EKLER.....	67
ÖZGEÇMİŞ		



ÖZET

ANOXYBACILLUS AYDERENSİS AY9 β -GLUKOZİDAZ G226E MUTANTININ KARAKTERİZASYONU

Özgü YILMAZ

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Kadriye İNAN BEKTAŞ
2022, 81 Sayfa, 2 Sayfa Ek

Enzimler, metabolik yolların biyolojik anahtarlarıdır. Bu metabolik yollarla görev alan enzimlerden biri olan β -glukozidaz doğada yaygın olarak bulunur ve tüm yaşayan organizmalarla ilişkilidir. Glukoz hidrolaz ailesinin önemli bir grubunu temsil eden β -glukozidaz çok sayıda doğal ve yapay substratları bulunur ve bu substratlara karşı özgünlüğü farklıdır. Bu nedenle, endüstriyel açıdan önemlidir. Bu çalışmada, *Anoxybacillus ayderensis* Ay9 suşundan önceden kolonlamış ve N222S mutasyonuna sahip β -glukozidaz enzimine ikinci bir mutasyon yapmak amacıyla 226. Rezidüsündeki glisin glutamik aside dönüştürüldü. Daha sonra mutasyonun enzim üzerindeki etkisinin anlaşılması için enzim karakterizasyonu substrat olarak p-nitrofenil β -d-glukopiranozid (pNPG) kullanılarak yapıldı. Enzimin optimum sıcaklığı 50°C ve optimum pH değeri 7 olarak belirlendi. Enzimin K_m , V_{max} , k_{cat} ve K_m/k_{cat} değerleri sırasıyla 0,35 mM, 16,61 U/mg, 14,98 s⁻¹, 42,26 s⁻¹mM⁻¹ olarak belirlendi.

Anahtar Kelimeler: *Anoxybacillus ayderensis* Ay9, β -glukozidaz, p-nitrofenil β -d-glukopiranozid (pNPG).

SUMMARY

CHARACTERIZATION OF MUTANT β -GLUCOSIDASE G226E FROM *ANOXYBACILLUS* AYDERENSIS

Özgü YILMAZ

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Assoc. Prof. Kadriye İNAN BEKTAŞ
2022, 81 Pages, 2 Pages Appendix

Enzymes are biological keys of metabolic pathways. β -glucosidase taking part in methabolic pathways is widespread and associated with all living things. β -glucosidase representing an significant group of glycoside hydrolase family has plenty of natural and artificial substrates. Also, it shows different substarate specificity against these substarates. Therefore, it is important for industrial application. In this study, the enzyme which has already been cloned from *Anoxybacillus ayderensis* Ay9 was used. Also, this enzyme has already been mutation with N222S. For the purpose of making the second mutation at position 226, glycine was converted to glutamic acid. After that enzyme characterization was performed to investigate the mutation effect on the enzyme by using p-nitrophenyl β -d-glucopyranoside (pNPG) as a substrate. The optimum temperature of enzyme was 50°C and the optimum pH was 7. Kinetic parameters were determined as 0,35 mM, 16,61 U/mg, 14,98 s⁻¹, 42,26 s⁻¹mM⁻¹ for K_m , V_{max} , k_{cat} ve K_m/k_{cat} values, respectively.

Key Words: *Anoxybacillus ayderensis* Ay9, β -glucosidase, p-nitrophenyl β -d-glucopyranoside (pNPG).

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1	IUBMB'e göre β -glukozidazların sınıflandırılması.....	3
Şekil 2.	β -Glukozidaz enziminin glikolizasyon ve deglikolizasyon şeması.....	6
Şekil 3.	Transglikosilasyon gerçekleşmesi.....	7
Şekil 4.	Mısır β -glukozidaz Glu1 monomerinin üçüncül yapısının ve aktif bölgesi şerit diyagramı ile gösterimi.....	8
Şekil 5.	Bazı β -glukozidaz substratlarının yapısının açık gösterimi IUPAC sistemine göre adlandırılması.....	14
Şekil 6.	İki farklı aileye ait β -glukozidaz enziminin aktif bölgesinin şematik görünümü.....	16
Şekil 7.	Glukozun, β -glukozidaz enzimine bağlanma bölgesi tercihine bağlı olarak enzim aktivitesini gösteren temsili şema	17
Şekil 8.	Mutasyon oluşturmak için takip edilen PZR basamakları.....	31
Şekil 9.	Mutasyon oluşturulmak için yapılan PZR ardından oluşan fragmentlerin agaroz jel görüntüleri.....	39
Şekil 10.	G226E β -glukozidaz geninin pGEM-T easy vektörü ile klonlanması.....	40
Şekil 11.	N222S, N222S/G226E mutantları ve yabantip β -glukozidazların Clustal Omega ile hizalanması.....	41
Şekil 12.	G226E β -glukozidazın pET28a (+) vektörü ile klonlanması.....	42
Şekil 13.	Saf G226 β -Glukozidazın SDS-PAGE görüntüsü.....	43
Şekil 14.	Enzimin optimum sıcaklık grafiği.....	44
Şekil 15.	Enzimin optimum pH grafiği.....	45
Şekil 16.	Enzimin Lineweaver-Burk grafiği.....	46
Şekil 17.	Enzimin termal kararlılık grafiği.....	46
Şekil 18.	Enzimin pH kararlılık grafiği.....	47
Şekil 19.	Enzime metal iyonlarının etkisi grafiği.....	48
Şekil 20.	Enzime deterjanların etkisi grafiği.....	49
Şekil 21.	Enzime organik çözücülerin etkisi grafiği.....	50
Şekil 22.	Enzime inhibitörlerin etkisi grafiği.....	50
Şekil 23.	Enzimin glukoz toleransı grafiği.....	51

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1.	Farklı organizmalardan elde edilen doğal substratlar (Gemici-Palabıyık, 2004).	13
Tablo 2.	β -Glukozidazla yapılan mutasyon çalışmaları.....	20
Tablo 3.	Anoxybacillus türlerinden saflaştırılmış bazı enzimler (Goh vd., 2013).	25
Tablo 4.	Kullanılan Primerler	29
Tablo 5.	pGEM®-T Easy vektörü ligasyonu için tepkime bileşenleri.....	32
Tablo 6.	Ni-Afinite kromatografisinde kullanılan solüsyonlar.....	34



SEMBOLLER DİZİNİ

BglAy9 N222S	: <i>Anoxybacillus ayderensis</i> Ay9 N222S proteini
BglAy9 N222S/G226E	: <i>Anoxybacillus ayderensis</i> Ay9 N222S geni
BglAy9 N222S/G226E	: <i>Anoxybacillus ayderensis</i> Ay9 N222S/G226E proteini
BglAy9 N222S/G226E	: <i>Anoxybacillus ayderensis</i> Ay9 N222S/G226E geni
BglAy9 WT	: <i>Anoxybacillus ayderensis</i> Ay9 yabani tip proteini
BglAy9 WT	: <i>Anoxybacillus ayderensis</i> Ay9 yabani tip geni
BSA	: Bovin Serum Albumin
dk	: Dakika
dNTP	: Deoksiribonükleotittrifosfat
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
GH	: Glukozil Hidrolaz
HCN	: Hidrosiyamik asit
IUBMB	: Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği
ERT	: Enzim yerine koyma terapisi (Enzyme replacement therapy)
kDa	: Kilo Dalton
K_m	: Michaelis-Menten sabiti
LB	: Luria Bertani Broth
mA	: Milliamp
Mirosinaz	: β -S-glukozidaz
mM	: Millimolar
mg	: Milligram
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
SDS	: Sodyum dodesilsülfat
U	: Ünite
v/v	: Hacimde yüzde
V_{max}	: Maksimum hız
μ g	: Mikrogram
μ l	: Mikrolitre
β	: Beta
$^{\circ}$ C	: Derece

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Enzimler, çok sayıda metabolik yollarda yer alan biyolojik anahtarlardır. Bu anahtarlar canlı yaşamının sürüp gitmesini sağlamak için pek çok hayati noktada görev alır. Yaşamın kökeni olan nükleik asitlerden protein sentezine, canlı yaşamı için vazgeçilemez olan oksijen üretimine, alınan besinlerin sindirilip enerji döngüsüne katılmasına ve daha birçok olağanüstü süreçlere dâhil olurlar. Bu olağanüstü ve kritik süreçlerde yer alan kilit taşı enzimlerden biri de Beta-glukozidazdır (β -glukozidaz). Çoğunlukla mantar, küf ve bakteriler tarafından üretiliyor olsalarda doğada yaygın olarak bulunurlar ve tüm yaşayan organizmalarla ilişkililerdir (Czjzek vd., 2000; Koffi vd., 2012). Enzim, glukozit hidrolazlar arasında önemli bir grubu temsil eder. Basitçe β -glukozidaz, oligosakkarit veya polisakkaritlerin indirgenmemiş uçlarından β -1,4-glukozidik bağın hidroliziyle beta-D-glukoz salınımını gerçekleştirir (Opassiri vd., 2004).

Mikroorganizmalarda selülozun parçalanması, simbiyotik ilişkilerde, dücre dışından besin alımında, konak patojen etkileşimlerinde önemlidirler (Singh vd., 2015). Bitki β -glukozidazları endosperm hücre duvarının yıkılması, bitki zararlılarına karşı stres cevabının oluşturulması, hücre duvarı için gerekli maddelerin oluşması benzeri süreçlerde görev alır. İlgili enzimin eksikliği insanda otozomal resesif bir hastalık olan Gaucher hastalığına neden olur (Beutler, 1991).

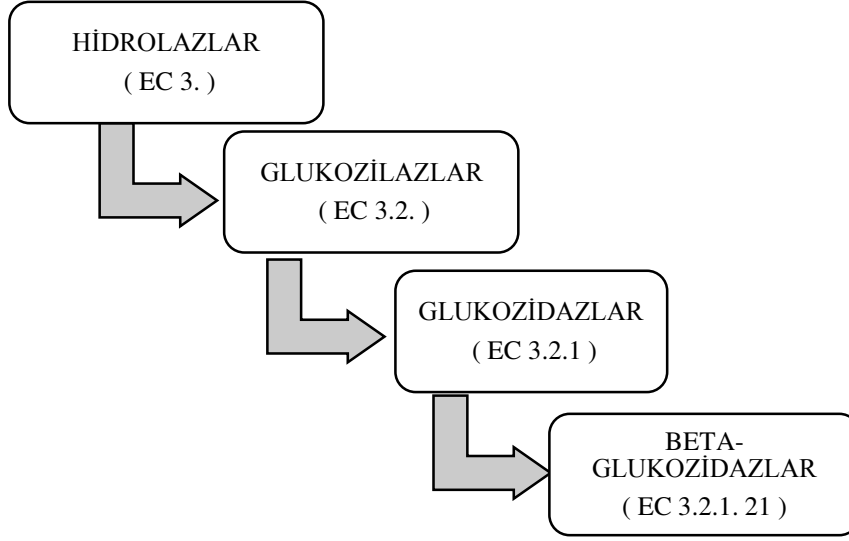
β -glukozidazların çok sayıda doğal ve yapay substratları bulunur. Enzimin substratlarına karşı tanıma, bağlanma, hidroliz kabiliyeti açısından farklılıklar göstermektedir. β -glukozidazların doğada çeşitli proseslerde yer almaları, substrat özgüllükleri ve bu özgüllük sayesinde farklı substratlara etki kabiliyetleri nedeniyle endüstriyel uygulamalarda geniş bir kullanım yelpazesine sahiptirler. İçecek endüstride, meyve suyu ve şarap üretimi esnasında acı tadın giderilmesinde, uçucu yağ miktarı artırılarak çeşitli çayların aromasının artırılmasında kullanılırlar (Gueguen vd., 1998; Harhangi vd., 2002; Su vd., 2010). Sofralık zeytin tadının iyileştirilmesinde ve hayvan yemlerinde katkı maddesi olarak kullanılırlar (Sargın, 2015; Krisch vd., 2010).

Biyoteknolojik süreçlerde selülozik atıklardan biyoyakıt ve etanol üretimine ek olarak önemli β -glukozitlerin sentezinde de kullanılırlar (Li vd., 2013).

Bu çalışmada, Karadeniz Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı'nda *Anoxybacillus ayderensis* Ay9 suşunun daha önceden kolonlanmış ve N222S bölgede mutasyona uğratılmış β -glukozidaz enzimine ikinci bir mutasyon yapmak amacıyla 226. rezüdüdeki glisin. glutamik aside dönüştürüldü. Ardından mutasyonlu bölgenin, elde edilen proteine olan etkisinin anlaşılması için enzim karakterizasyonu gerçekleştirildi.

1.2. β -Glukozidaz Enziminin Adlandırılması

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) enzimleri, enzimin belirli kataliz reaksiyon mekanizmasındaki işlevine göre adlandırılmasını ve sınıflandırılmasını yapmaktadır. Mevcut durumda yedi sınıf bulunmaktadır. Bunlar sırasıyla oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ligazlar ve translokaslardır (McDonald vd.,2009; URL-1). Enzimleri katalizledikleri kimyasal reaksiyonlara bağlı olarak bir Enzim Komisyonu numarası (EC numarası) alırlar. EC noktalarla bölünmüş dört sayıdan oluşur. Bir enzimi sınıfa, alt sınıfa, alt alt sınıfa göre numaralandırır ve son dördüncü bileşen o alt sınıf içindeki tanımlayıcı bir seri numarasıdır (McDonald vd.,2009). β -glukozidazlar (EC.3.2.21), sırasıyla hidrolazların bulunduğu 3. sınıfın (EC.3), glukozil bileşiklerini hidroliz eden glukozid hidrolazların (EC.3.2) ve O- ve S- glukozil bileşenlerini hidroliz eden (EC.3.2.1) glukozidazların alt sınıfında yer alırlar (Henrissat vd, 1985 ; Henrissat, 1991 ; Henrissat ve Bairoch, 1996 ; Henrissat ve Davies, 1997 ; Henrissat ve Davies, 2000) (Şekil 1).



Şekil 1. IUBMB'e göre β -glukozidazların sınıflandırılması.

1.3. Hidrolazlar (EC 3)

Hidrolazlar, ortamda su varlığında substratları hidrolize edebilen organik makromoleküler katalizörlerdir (Singhanian vd., 2017). Substratların eter, peptit, ester, glukozil, anhidrit C-C, C-Halojen, P-N gibi bağlarını kırarak başlangıca göre daha küçük moleküllerin ortaya çıkmasını sağlarlar. Bu işlevlerine ek olarak polimer modifikasyonu ve polimerizasyon reaksiyonları içinde kullanılabilirler. Literatürlerde hidrolaz enzimlerinin polimer çalışmalarında diğer enzimlerle kıyaslandığında daha fazla kullanıldığı görülmektedir (Kaçıran, 2020). Fosfatazlar, glukozidazlar, lipazlar, peptidazlar, esterazlar ve nükleosidazlar yaygın kullanımı olan hidrolazlardan birkaçıdır (Gübitz ve Paulo, 2003).

1.4. Glukozit Hidrolazlar (EC.3.2)

Glukozit hidrolazlar (GH), iki ya da ikiden fazla karbonhidrat arasındaki glukozidik bağları hidroliz edilebildiği gibi bir karbonhidrat olan kısım ve karbonhidrat olmayan kısım arasındaki glukozidik bağları da hidrolize edebilen bir enzim grubudur. Bu sayede polisakaritler ve oligosakkaritler içindeki glukozidik bağları parçalanmış olur ve daha küçük metabolize edilebilir ürünler ortaya çıkar (Cantarel vd., 2009). β -glukozidik bağın hidrolizi glikosilasyon ve deglikosilasyon olmak üzere iki aşamada gerçekleşir. Reaksiyon

genellikle, yüksek oranda korunmuş TFNEP (asit/baz katalizörü) ve YI/VTENG (nükleofil) peptit motifleri içeren katalitik olarak aktif iki glutamat rezidüsü katılımıyla gerçekleşir (Xu vd., 2004).

GH Aile 1 hidrolazlar, canlı organizmalarda çeşitli ve önemli roller oynarlar. Örneğin, bitkilerde çimlenme sırasında hücre duvarı kaynaklı oligosakkaritlerin hidrolizi edilmesi, bitki zararlılarına karşı kimyasal savunma, aktif fitohormon seviyelerinin kontrolü ve lignifikasyon gibi çeşitli bir çok süreçte önemli görevleri vardır (Xu, vd., 2004). Ayrıca, GH Aile 1 hidrolazlar selülitik bakteri ve mantarlarda selülozu glukoza indirgemek için salgılanan selüla komplekslerinin temel bileşenleridir (Be'guin, 1990; Fowler, 1993). Bununla birlikte, tüm GH Aile 1 üyelerinin karbonhidrat substratlarını hidrolize etmediğini belirtmek gerekir (Raychaudhuri ve Tipton, 2002).

Ökaryot, bakteri ve arkea GH Aile 1 enzimleri G-O-X ya da G-S-X tipi substratları hidrolize edebilmektedirler. Burada G β -bağlı glukozil, mannozil, fukozil, galaktozil, 6-fosfoglukozil veya 6-fosfogalaktozil bakiyesini, X ise diğer bir glukozil bakiyesini veya aglukonu temsil eder (Xu vd., 2004).

1.5. β -Glukozidaz (EC3.2.1.21)

β -glukozidaz ayrıca emülsin, elateraz, β -1,6-glukozidaz, aril- β -glukozidaz, β -D-glukozidaz, β -glukozit glukohidrolaz, geniobiaz, sellobiaz, arbutinaz, amigdalinaz, p-nitrofenil β -glukozidaz, primeverozidaz, isimleriyle de adlandırılır (URL-2).

Glukozidazlar glukozidik bağların hidrolizinde görevlidirler bu nedenle bakterilerde, hayvanlarda, mantarlarda, bitkilerde dahil olmak üzere hemen her canlıda bulunurlar. β -glukozidazların canlılar dünyasında pek çok biyokimyasal yolda görev almasından dolayı tüm β -glukozidazların ortak katalitik ve yapısal özelliklerinin olması beklenir. β -glukozidazların Aile 1 enzimlerinin altbirimlerinin 55 ile 65 kDa arasında olduğu tespit edilmiştir (Esen, 1993). Aile 1 β -glukozidazların her birinin monomerlerinin yapısında TFNEP, LGLNYY, SAYQI, DNFEW, YRFSI ve YITENG diye adlandırılan korunmuş peptid motifleri vardır. Bunlardan iki katalitik glutamat içerip enzimin aktif bölgesinin bileşeni olanlar YITENG ve TFNEP'dir (Wiesmann vd., 1995; Sanz-Aparicio vd., 1998).

Aile 1-glukozidaz monomerleri, enzimin kaynağı olan organizmaya bağlı olarak amino asit sayısı 447 (örn., *Bacillus polymyxa*) ile 527 (örn., beyaz hardal mirosinaz)

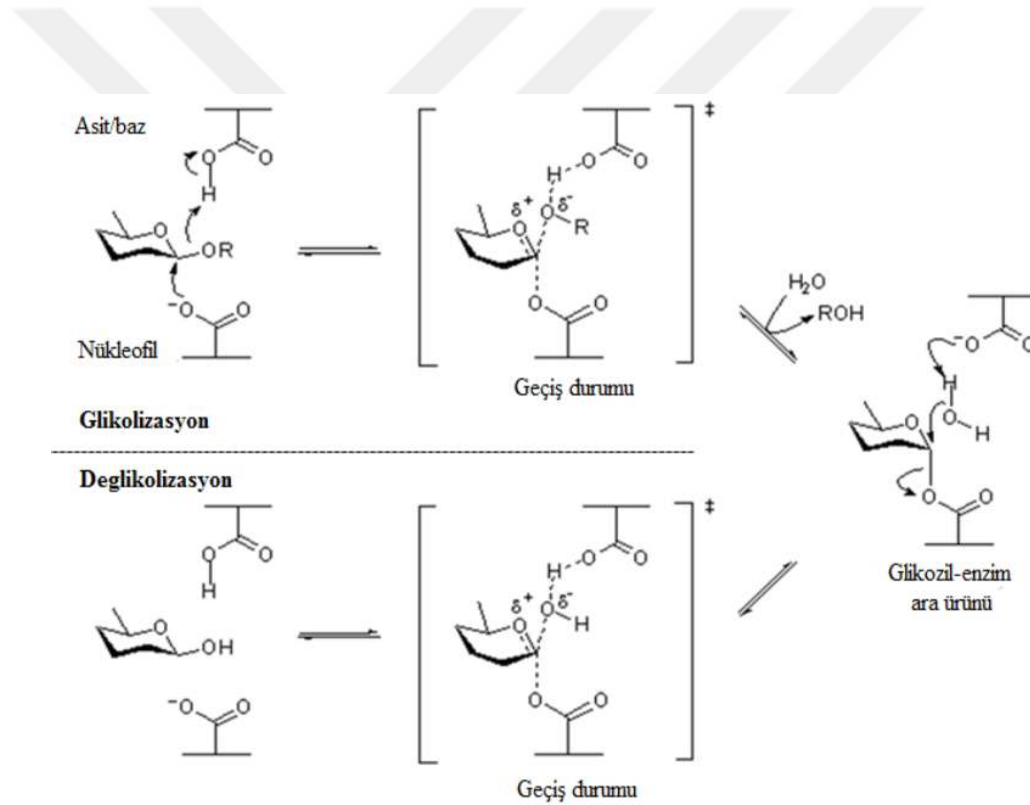
arasında değişen polipeptit uzunluklarına sahiptirler. En uzun polipeptit zincir ökaryotik enzimlerde bulunurken, en kısa olanlar ise arkebakteri ve öbakterilerde bulunur. Glukozidazların katalitik olan aktif formu, 120 kDa'lık homodimerden veya bu homodimerin multimerlerinden oluşur (Esen, 2002).

β -glukozidazlar substrat seçimine göre üçe ayrılırlar. Sınıf 1 β -glukozidaz enzimleri aril(alkil)- β -glukozidaz ve glukozil- β -glukozidaz aktiviteleriyle β -p-nitrofenilglukozit, β -p-nitrofenilfruktozid, β -p-nitrofenilglukozit, laktoz, sellobiyoz ve benzeri substratları; Sınıf 2 β -glukozidaz enzimleri yalnızca glukozil- β -glukozidaz aktivitesine sahip olmasından dolayı sellobiyoz ve laktoz benzeri substratları; Sınıf 3 enzimleri sadece aril(alkil)- β -glukozidaz aktivitesi olmasından dolayı β -p-nitrofenilglukozit ve benzeri substratların hidrolizini yapabilirler (Terra ve Ferreira,1994).

β -glukozidazlar ilgili glukozitin indirgen olmayan β -1,4 bağlı monosakkarit rezidülerinin hidrolizini katalize eder. Hangi monosakkariti uzaklaştırabilmesine bağlı olarak isimlendirilirler. Örneğin, β -glukozidaz glukozu, β -galaktozidaz galaktozu ve β -ksilosidaz ksiloz bakiyelerini hidrolize edebilir. Çoğunlukla, aynı β -glukozidaz glukozitlerin farklı monosakarit kalıntılarını hidrolize edebilir. Bu bağlamda, β -glukozidaz glukozu etkili bir şekilde uzaklaştıran tüm enzimleri isimlendirmek amacıyla kullanılır. β -ksilosidaz, β -galaktozidaz ve diğerleri sadece sırayla ksiloz ve galaktozu uzaklaştırabilen, etkinlikleri kısıtlı olan enzimleri belirtmek amacıyla kullanılır (Terra ve Ferreira,1994).

1.6. β -Glukozidazların Kataliz Mekanizmaları

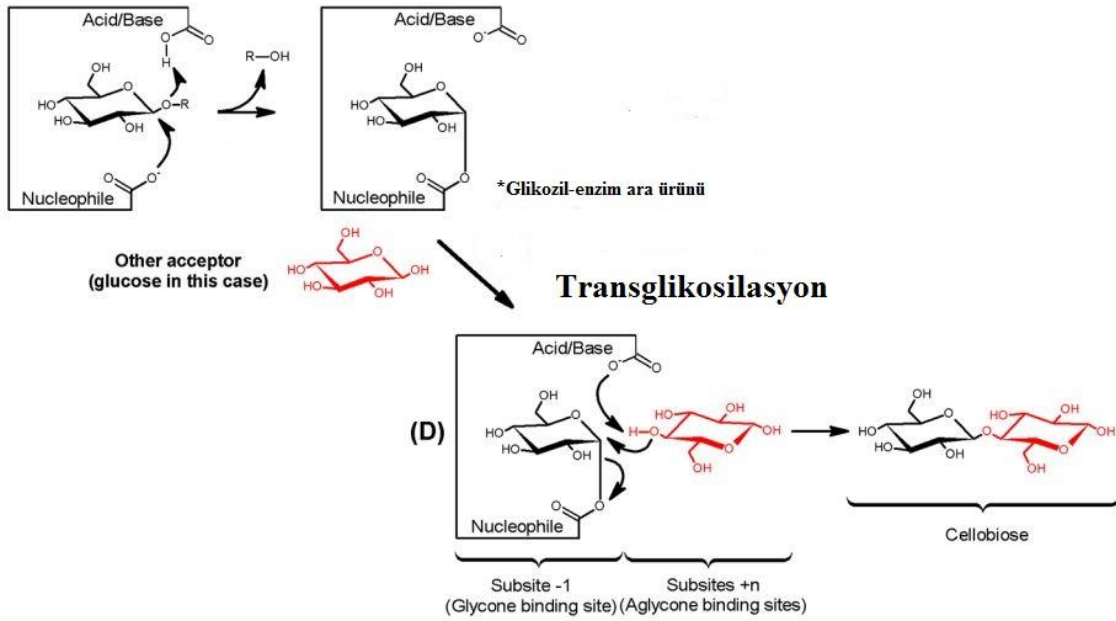
β -glukozidazların substrat hidrolizi, iki spesifik glutamik asitin katılmasıyla glikosilasyon ve deglikosilasyon olmak üzere iki adımdan oluşur (Esen, 2002). Glikolizasyonda (T(F/L/M) NEP motifindeki asit katalizörü glutamik asit rezidüsünün, glukozidik oksijeni protonlamasından sonra aglukon salınımı ile birlikte kovalent bir glikozil-enzim ara ürünü oluşur (Withers vd., 1990; Wang vd., 1995). Deglikosilasyon basamağında ise, ikinci katalitik glutamat rezidüsü artık bir anyon ve baz katalizörüdür. Glutamat sudan bir proton uzaklaştırır ve ortaya bir OH⁻ grubunun çıkmasını sağlar. OH⁻ enzim ve glukon arasındaki bağa nükleofilik bir saldırı gerçekleştirir. Bu durum glukon salınımı ve nükleofilik glutamat kalıntısının yenilenmesini sağlar (Esen, 2002) (Şekil 2).



Belirli koşullar altında glikozil-enzim ara ürününe su yerine aril-, alkil- alkol,

Şekil 2. β -Glukozidaz enziminin glikolizasyon ve deglikolizasyon şeması (Acar,2013).

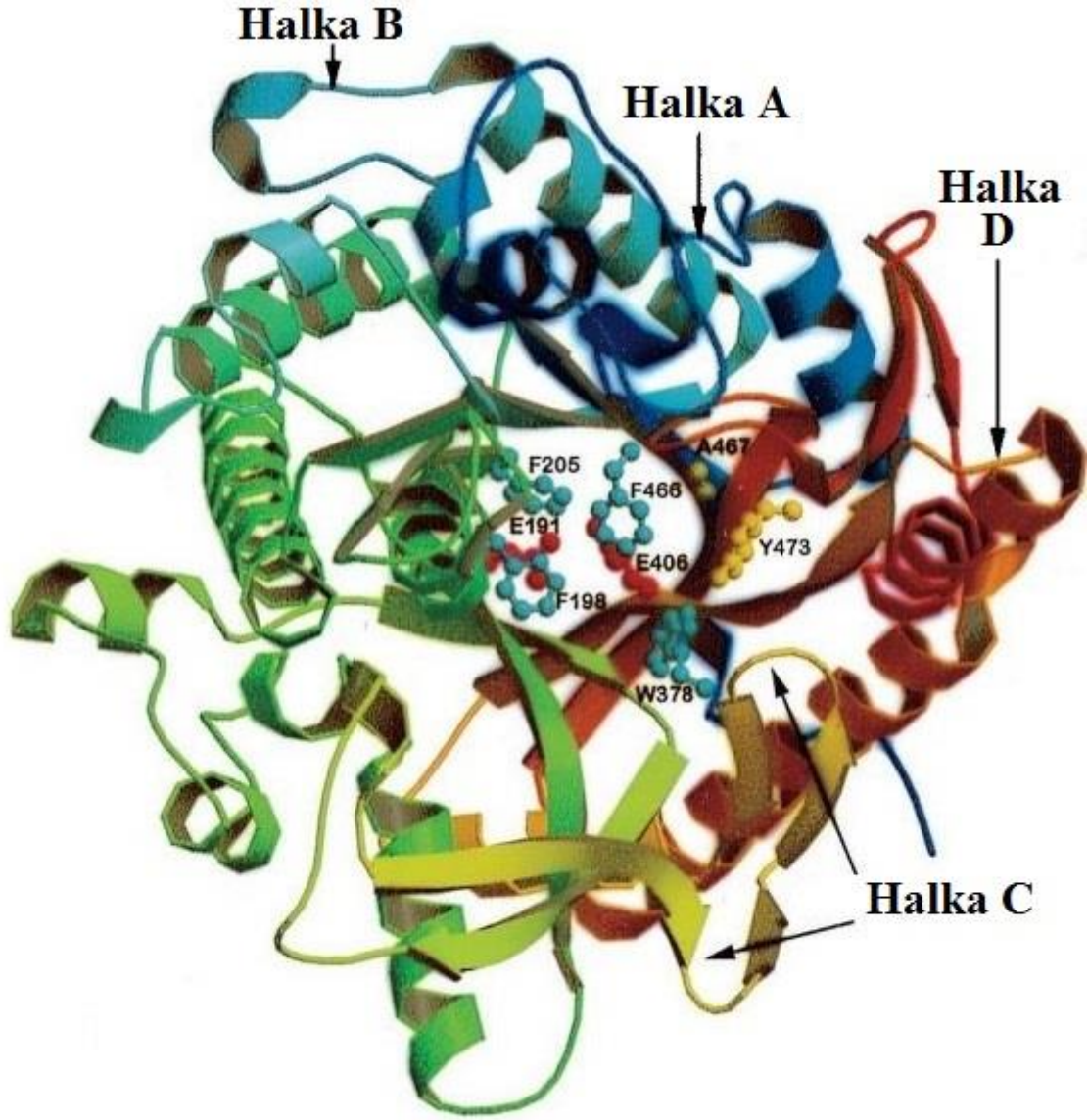
monosakarit, disakarit, veya monoterpen alkol gibi farklı bir alıcı nükleofil tarafından saldırı gerçekleştirilebilir. Reaksiyona şekerin girişi transglikosilasyona neden olur (Meleiro vd., 2017) (Şekil 3).



Şekil 3. Transglikosilasyon gerçekleşmesi (Meleiro vd., 2017).

β -S-glukozidaz (mirosinaz) harici yapılarda TFNEP ve I/VTENG motifleri, krater şekline sahip aktif bölge içinde glikon bağlanması ve katilizinde görev alırlar (Davies ve Henrissat, 1995). Mirosinazlarda, β -O-glukozidaz TFNEP'inin homoloğu olan motif TINQL bulunur. TINQL'de asit/baz katalizörü glutamik asit rezidüsü, bir glutamin rezidüsü ile değiştirilir. B-Glukosinolatların aglukonu kimyasal yapısı nedeniyle kolaylıkla ayrılabilen bir grup olmasından dolayı, mirosinazda aglukon ayrılması için protonik desteğe gereksinimin duyulmaz (Esen, 2002).

GH Ailesi 1 üyeleri, tümü aynı genel $(\beta/\alpha)_8$ katlanmasına sahiptirler ancak farklı substrat özgüllüklerine sahip enzimleri içerirler (Bhatia ve Mishra, 2002; Esen ve Cairns, 2010) (Şekil 4).



Şekil 4. Mısır β -glukozidaz Glu1 monomerinin üçüncül yapısının ve aktif bölgesi şerit diyagramı ile gösterimi (Czjzek vd., 2000). Diyagramdaki α -sarmallar ve β -ipliklerdeki farklı renkler ve renk geçişleri fiçli şeklindeki üç boyutlu yapıdaki polipeptit omurga gözükmemektedir.

1.7. Enzimin Endüstriyel Kullanım Alanları

1.7.1. Besin Kalitesinin İyileştirilmesi

Ülkemiz bulunduğu konum nedeniyle zeytin yetiştiriciliğinde müsaittir ve dünya zeytin üretiminde geniş bir paya sahiptir. Sekoiridoid glukozit bir bileşik olan Oleuropein acı bir tada sahiptir. Bu fenolik bileşik zeytin ağacı meyvesinde ve yapraklarında bulunmaktadır. Zeytinin yenilebilir hale gelmesi için bu acılık unsurunun ortadan kaldırılması gerekmektedir. β -glukozidaz enzimi Oleuropein'in hidrolizini yapabilmektedir. Sargın (2005) ve çalışma arkadaşları β -glukozidaz enziminin sofralık yeşil zeytin üretiminde ürün kalitesinin artırılmasında kullanılabileceğini göstermişlerdir.

β -glukozidazlar içecek endüstrisinde şarap, şıra ve meyve sularında bulunan glukozidik öncüllerden aromatik bileşiklerin enzimatik salınımında rol oynarlar. Ortama ekstra enzim eklenmesi aromatik bileşiklerin salınımını artırabilir. Ayrıca yukarıda bahsedilmiş olan sofralık yeşil zeytin üretiminde acılığın giderilmesi için β -glukozidaz enziminin kullanılması çalışmasında olduğu gibi narenciyelerden üretilen meyve sularında Naringenin hidrolizi acı tadın azalmasını sağlamıştır (Krisch vd., 2010; Gueguen vd., 1998). β -glukozidaz şarap, şıra ve meyve sularına ek olarak çay aromasının artırılmasında da önemli role sahiptir. Çay aroması, içeceğin kalitesini belirleyen en önemli etkenlerden biridir. Bu aroma yenilebilir uçucu yağlar ekleyerek iyileştirebilir. Bu aromalar çay bitkisinin yapraklarında monosakkarit veya disakkarit glukozit öncülleri (β -D-glukopiranozitler) şeklinde tatsız halde bulunurlar. β -D-glukozidaz gibi enzimlerle glukozit öncüllerinin hidrolizi sayesinde bu aromalar serbest bırakılabilir. İmmobilize β -glukozidaz ile muamele edilen yeşil çayda %20,69, siyah çayda %6,79 ve oolong (bir çeşit Çin çayı) çayda %10,30 oranında toplam uçucu yağ miktarı artmıştır (Su vd., 2010).

Gıda endüstrisinde pek çok gıda ve içeceğin üretiminin bir parçası olan soya fasülyesi glukozidik izoflavonlarca zengindir. Bu izoflavonların fitoöstrojenik özellikleri vardır ve osteoporoz, kardiyovasküler hastalıklar, meme kanseri gibi çeşitli hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde kullanılırlar. Ne yazık ki bu izoflavonlar esas olarak glukozitlerin aktif olmayan formundadırlar. β -glukozidaz enzimi uygulanarak glukozitlerin hidrolizi ile izoflavonlar aglukon formlarına dönüştürülür (Singh vd., 2015). Birkaç çalışma, soya sütü fermentasyonu esnasında β -glukozidaz aktivitesi olan laktik asit bakterilerinin aglukon içeriğini artırabildiğini göstermiştir (Marazza vd., 2009). İzoflavonların aglukon

formları, glukozidik formlarına göre daha fazla biyolojik aktiviteye sahiptirler. Sindirim esnasında daha fazla ve daha hızlı bir şekilde emilimleri gerçekleşir (Izumi vd., 2000).

β -glukozidazlar insan besini kalitesinin artırılması veya iyileştirilmesinde kullanılabilmesine ek olarak hayvan yemlerinde de kullanılabilmektedir. Enzimin selüloz bazlı yemlerde katkı maddesi olarak kullanılması yemin sindirilebilirliğini artırır. Bu durum tavuk ve domuz gibi tek mideli hayvanlar için yararlıdır (Krisch vd., 2010).

1.7.2. Biyokitle dönüşümü

β -glukozidazlar, biyoteknolojik çalışmalarda yüksek potansiyellerinden dolayı büyük ilgi görmektedirler. Özellikle selülozun tam hidrolizi için gerekli anahtar enzimdirler. Lignoselülozik biyokütleden biyoetanol üretiminde görev alırlar (Meleiro vd., 2017).

Bir polisakkarit olarak selüloz canlılar dünyasında en fazla bulunan karbonhidratların başında gelmesine rağmen canlıların pek çoğu tarafından parçalanamamaktadır. Selülozun hidrolizinde β -glukozidaz ile birlikte 2 farklı enzim daha görev alır. Bu enzimler; endoglukanaz (endo-1, 4- β -glukanaz [EC3.2.1.4]) ve ekzoglukanaz (sellobiyohidrolaz) (ekso-1, 4- β -glukanaz [EC3.2.1.91])'dır (Teeri, 1997). Endoglukanaz, selüloz molekülündeki β -1-4 bağlarını rastgele hidrolize eder ve eksoglukanaz, sellobiyozu ve diğer oligosakkaritleri serbest bırakır. Son olarak, β -glukozidaz ise bu serbest kalan oligosakkaritleri glukozu dönüştürür (Bhat ve Bhat, 1997). β -glukozidazın, sellobiyozu glukozu hidrolize etmesiyle sellobiyoz inhibisyonu azalır, bu durum selülitik enzimlerin daha verimli çalışmasını sağlar (Saha ve Bodhast, 1996). Lignoselülozik biyokütlenin dönüşümündeki önemli sınırlama glukozun bilinen pek çok β -glukozidazı güçlü bir şekilde inhibe etmesidir (Meleiro vd., 2017).

1.7.3. İnsan Sağlığı ve Tıp

Nadir görülen bir hastalık olan Gaucher hastalığı, β -glukozidaz enziminin eksikliğinden dolayı lizozomal dokularda glukoseramid birikmesi nedeniyle ortaya çıkar. Enzim ilgili hastalığın tedavisinde önemli bir role sahiptir (Butters, 2007). Gaucher hastalığının tedavi yaklaşımlarından biri enzim yerine koyma terapisi [Enzyme replacement

therapy (ERT)]’dir. Tip 1 Gaucher hastalığında β -glukozidaz enziminin ERT yönteminde kullanılmasıyla başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Brady, 2006). Ayrıca besin kalitesinin iyileştirilmesi kapsamında soya fasülyesinde bulunan glukozidik izoflavonların osteoporoz, kardiyovasküler hastalıklar, meme kanseri gibi çeşitli hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde kullanılmasından dolayı enzimin dolaylı yoldan insan sağlığı üzerindeki önemli görevinden bahsedilmiştir.

1.7.4. β -glukozidazların Diğer Uygulamaları Alanları

Pinus contorta bitkisi β -glukozidazları, bitkide bulunan koniferininin (4-O-koniferilglukozid) hidrolizini sağlayarak koniferil alkolün ortaya çıkmasını sağlar. Koniferil alkol ligninin en önemli öncülüdür. Biosferde lignin selülozdan sonra en fazla bulunan maddedir ve bu tip β -glukozidazlar lignin biyosentezinde görev almaktadırlar. Lignin biyosentezinde işlev gören bu β -glukozidazların ağaç dayanıklılığını ve bu ağaçlardan üretilen kağıtların kalitesini etkileyebileceği düşünülmektedir (Dharmawardhana vd., 1995; Gemici-Palabıyık, 2004) .

Bitkilerde ayrıca β -glukozidaz savunmada, büyüme ve gelişmede görev alır. Bitkiler çeşitli çevresel koşullara ve bitki zararlılarına karşı stres cevabı oluştururlar. Bu cevap genellikle kimyasal senteziyle olmaktadır. *Arabidopsis* β -glukozidazı olan AtBG1 inaktif absisik asitten hidroliz yoluyla aktif absisik asit oluşturarak bitkide absisik asit artışına neden olur. Bitkilerde aktif absisik asit artışı, kuraklık gibi abiyotik strese karşı tolerans sağlar (Han vd., 2012). Savunma, bitkinin zarar görmesi durumunda toksik ve acı aglukonların ortaya çıkarılması şeklinde de gerçekleşebilir. Bitkinin farklı kısımlarında yer alan substratların ve enzimlerin bir araya gelmesiyle bu cevap oluşturulur (Gemici-Palabıyık, 2004). Enzim, bitkiyi bazı patojenlerden ve otçullardan korumak amacıyla giberellinler, oksinler, sitokininler gibi konjuge fitohormonların hidrolizi için tiyosiyanatların, terpenlerin, kumarinlerin ve siyanürün salınmasında görev alır (Esen,1993).Bitki zararlısı böcekler tarafından yenilen *Arabidopsis thaliana*’da β -glukozidaz enziminin şifrenlenmesinden sorumlu genlerde gen anlatımının arttığı gözlemlenmiştir (Stotz vd., 2000). Mısır β -glukozidazları, bitkinin genç ve büyüyen kısımlarında çözünür bir protein olarak fazla miktarda bulunmasından dolayı enzimin bu bitkideki işlevi ve fizyolojik substratları tam olarak bilinmemesine rağmen büyüme ve

gelişmede önemli bir protein olabileceği düşünülmektedir (Esen,1993). Enzim germinasyon esnasında, endospermin hücre duvarının parçalanmasında görev alır (Leah vd 1995).

1.8. β -glukozidazların Substratları ve Substrat Özgüllüğü

Doğada farklı β -glukozidazlar, farklı substratlara tanıma, bağlanma ve aktivite yönünden özgüllük göstermektedirler. Örneğin, iki farklı mısır β -glukozidazı olan Glu1 ve Glu2 cDNA'larının her biri, sırasıyla 566 ve 563 amino asit uzunluğunda öncü protein kodlar. Her iki protein olgunlaştığında 512 aminoasit uzunluğundadır. Glu1'in tüm bitkide gen anlatımı yapılırken Glu2 çimlenmeden sonraki 6. günden itibaren yapraklarda gen anlatımı yapılır. Bu iki proteinin %90 nükleotid dizi benzerliği olmasına rağmen substrat özgüllüğü yönünden birbirlerinden farklıdırlar. Glu1 yapay aril-glukozitleri yüksek bir verimle hidrolize edebilirken Glu2 zayıf bir şekilde hidrolize etmekte veya hiç hidrolize etmemektedir (Çiçek ve Esen, 1998). Glu1 nitrofenil glukozitler gibi yapay substratları Glu2'den yaklaşık olarak beş ile altı kat daha verimli hidrolize etmektedir. Ayrıca Glu1 tarafından kolaylıkla hidrolize edilebilen 6-bromo-2-naftil-b-D-glukoziti, Glu2 hiç hidroliz etmez (Czjzek vd., 2000).

β -glukozidazların ikincil fenolik glukozitlere karşı yüksek substrat özgüllüğüne örnek olarak elma çekirdeklerinde bulunan β -glukozidaz enzimi verilebilir. Elma çekirdeklerinde bulunan bu enzim floridzin (4,2',4',6'-tetrahidroksidihidrokalon 2' β -glukozit) substratına spesifiktir. Aynı aktivite elma yapraklarında da görülür. Bu glukozidaz standart koşullar altında floridzini, 4-nitrofenil β -glukozidle kıyaslandığında 370 kat daha hızlı hidroliz eder. Elma çekirdeklerinde diğer bir β -glukozidaz, siyanojenik glukozit olan amigdalın hidroliz eder. Çekirdeklerin tabakalaşması esnasında 90 gün boyunca floridzin spesifik β -glukozidaz artarken amigdalın hidroliz eden β -glukozidaz aktifitesi 60 günden sonra azalır (Hösel, 1993).

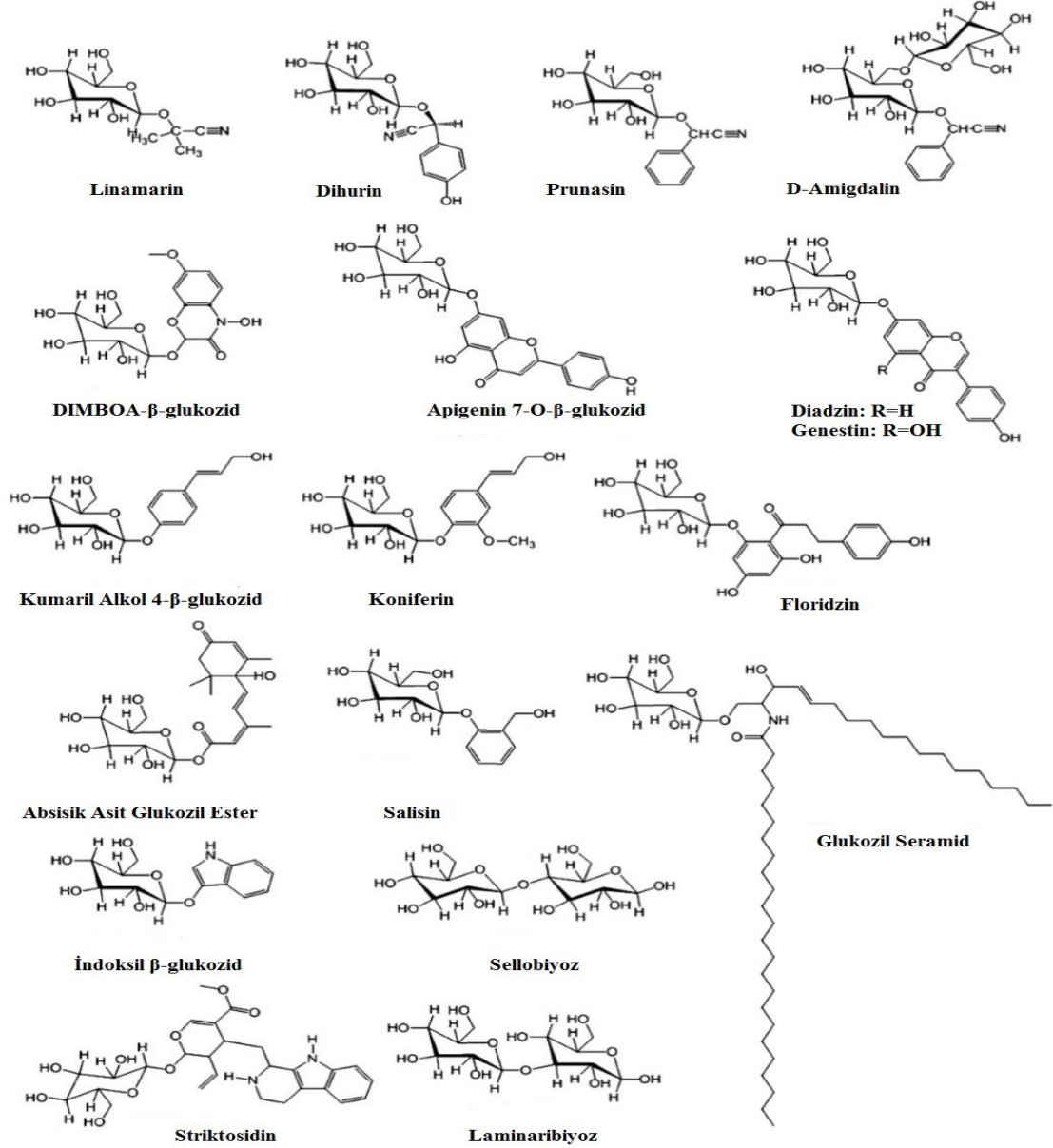
Lactobacillus antri β -glukozidazıyla yapılan çalışmada enzimin substrat özgüllüğünün glukozit şeker bakiyelerinin düzenlemeleri ve bağlantı şekilleriyle alakalı olabileceği gösterilmiştir. Enzim 1 $\rightarrow$ 6 bağlarına, 1 $\rightarrow$ 2 bağlarından daha yüksek özgüllük göstermiştir. Glukozidinin şeker parçasının C6 bakiyesiyle enziminde yer alan oksijen etkileşiminin substrat özgüllüğünü etkilediği düşünülmektedir (Kim ve Ma, 2018).

Tablo 1. Farklı organizmalardan elde edilen doğal substratlar (Gemici-Palabıyık, 2004).

SUBSTRAT	MONO-/DİGLUKOZİT	KAYNAK ORGANİZMA
Amigdalın	di-	<i>Prunus serotina</i>
Neolinustatin	di-	<i>Linum usitatissimum</i>
Linustatin	di-	<i>Linum usitatissimum</i>
Prunasın	mono-	<i>Manihot esculenta</i> Crantz
Linamarin	mono-	<i>Linum usitatissimum</i>
Dihurin	mono-	<i>Sorghum bicolor</i> Moench
Gentiobioz	mono-	<i>Prunus serotina</i>
Sellobioz	di-	<i>Trichoderma reesei</i>
Koniferin	di-	<i>Hevea brasiliensis</i>
Sello-Oligosakkarid	di-	<i>Prunus serotina</i> <i>Trichoderma reesei</i>
Diboaglc	mono-	<i>Secale cereale</i>
Dımboaglc	mono-	<i>Zea mays</i>
Zeatin-O-Glukozid	mono-	<i>Hordeum vulgare</i> <i>Brassica napus</i>
Piridoksin-5'-O-B-Glukozid	mono-	<i>Oryza sativa</i>
Benzilglukosinolat	mono-	<i>Sinapis alba</i>
Sinigrin	mono-	<i>Lepidium sativum</i>
Glukobrassicin	mono-	<i>Sinapis alba</i>
2-Hidroksi-3-Butenil-Glukosinolat	mono-	<i>Sinapis alba</i>
Glukosifingolipid	mono-	<i>Homo sapiens</i>

β -glukozidazların farklı organizmalardan elde edilen çok sayıda doğal substratları bulunmaktadır (Tablo 1). β -glukozidazların doğal substratları genellikle saf ve kolay bir şekilde elde edilebilmelerine rağmen *in vitro* koşullarda enzimlerin aktivitesini belirleme,

doğal substratları karakterize etme, enzimlerin substrata olan ilgisini anlaşılmasında daha etkili şekilde kullanılabilmesi ve kullanımlarının kolay olması sayesinde yapay substratlar β -glukozidazların analizlerinde tercih edilmektedirler (Conn, 1993; Czjzek vd., 2000). β -glukozidazların yapay substratlarına örnek olarak indolglukosinolat, 6-bromo-naftil- β -D-glukozid, 4-nitrojenil α -D-glukopiranozid ve p-nitrofenil- β -D-glukozit verilebilir.

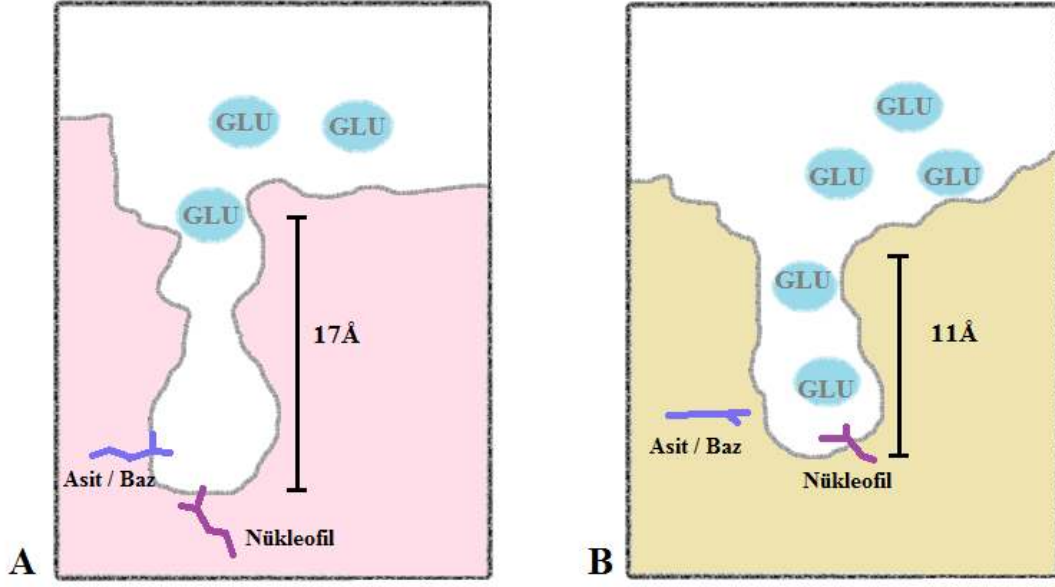


Şekil 5. Bazı β -glukozidaz substratlarının yapısının açık gösterimi IUPAC sistemine göre adlandırılması (Esen ve Cairns, 2010).

İlk olarak siyanojenik glukozidler olan linamarin, dihurin, prunasin ve öncüsü amigdalin gösterilmiştir. Siyanojenik glukozitler bileşimlerinde bulunan siyanidi HCN şeklinde açığa çıkararak toksik etki gösterirler (Ayaz vd., 2008). 2-O- β -D- glukopiranozil-4-hidroksi-7-metoksi-1,4- benzoksazin-3-bir (DIMBOAGlc), flavonoid apigenin 7-O- β -D- glukozid, izoflavonoid diadzin ve geneistin ve floridzin bitki zararlılarına karşı savunmayla ilişkililerdir. Koniferin ve kumaril alkol monolignol β -glukozitlerdir. Absisik asit glukozil ester, salisin ve indoksil β -glukozit bitki glukozitleridir. Striktosidin, çeşitli monoterpen alkaloidlerinin metabolik öncüsüdür. Sellobiyoz ve laminaribiyoz, bitki hücre duvarından bulunan oligosakkaritlerdir. Glukozil seramid, insan asit β -glukozidazın (GBA1) ve diğer memeli β -glukozidazlarının substratlardan biridir (Esen ve Cairns, 2010) (Şekil 5).

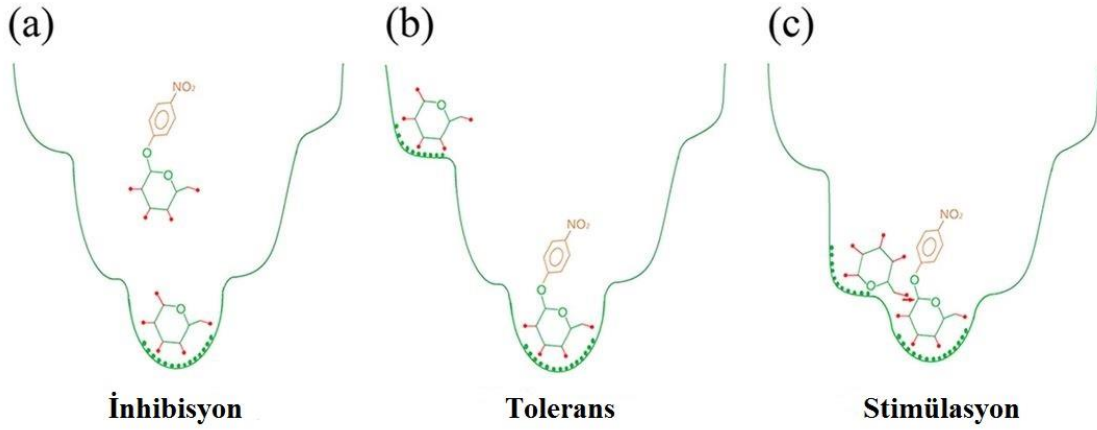
1.9. β -glukozidazın Glukoz Toleransı

Bazı β -glukozidazlar glukozu toleranslı olmasına rağmen çoğu β -glukozidaz glukozu karşı hassastır (Yang vd., 2015). Özellikle yüksek şeker verimi istenen endüstriyel biyokütle hidrolizlerinde β -glukozidazın son ürünü olan glukoz tarafından geri beslenme inhibisyonuna uğraması sınırlayıcı bir etkidir (Singhania vd.,2017). Birçok β -glukozidaz, lignoselülozik biyokütle hidrolizinde glukoz tarafından inhibe edilir (Meleiro vd., 2017). Selülozun enzimatik hidrolizi sırasında β -glukozidazın glukoz inhibisyonuna çok duyarlı olmasının önüne geçmek amacıyla selüloz kokteyline toplu olarak eklenir. Bu durum enzimlerin maliyetinin artmasıyla sonuçlanır. Mevcut sorunu ortadan kaldırmak ve daha ekonomik fiyatlarda ürün elde etmek için glukoz toleransı yüksek β -glukozidazların üretimi zorunludur (Singhania vd.,2013).GH1 ailesi β -glukozidazları, GH3 ailesi β -glukozidazlarıyla kıyaslandığında genellikle 10 ile 1000 kat daha fazla glukozu toleranslıdır. Bu durum glukozun katalitik bölgeye erişimiyle alakalı olduğu düşünülüyor. Termofilik bir mantar olan *Humicola insolens* β -glukozidazının aktif bölgesini derin ve dar bir boşlukta barındırırken *Abdopus aculeatus* β -glukozidazının aktif bölgesini sık bir oyukta barındırır. GH1 *H. insolens* nükleofil rezidüsünün derinliği 17 Å iken GH1 *A. aculeatus* 11 Å'dur (Giuseppe vd., 2014) (Şekil 6). Glukoz toleransı yüksek olan β -glukozidazların substrat kanallarında, glukoz girişi ve eliminasyonu için ciddi dinamik farklılıklar bulunmaktadır (Lima vd., 2021).



Şekil 6. İki farklı aileye ait β-glukozidaz enziminin aktif bölgesinin şematik görünümü (Giuseppe vd., 2014). A, GH1 ailesi β-glukozidazının aktif bölgesini; B, GH3 ailesi β-glukozidazının aktif bölgesini; GLU glukozu temsil ediyor.

Halothermothrix orenii ve *Paenibacillus polymyxa* β-glukozidazlarının modellerinin benzer derinlik ve genişliğe sahip olmalarına rağmen glukoz toleransları farklıdır. Bu durum glukoz toleransında ayrıca başka mekanizmalarında etkili olabildiğini gösterir. Glukozun enzim üzerinde bağlanma bölgesi seçimi enzimin toleransını etkiler. Eğer glukoz substrat kanalının aktif bölgesine bağlanma eğiliminde ise substratla yarışa girerek rekabetçi inhibisyon yoluyla enzim aktivitesini inhibe edebilir (Şekil 7.a). Glukoz tercihen kanalın dış bölgesine bağlanırsa substratın aktif bölgeye bağlanması engellenmiş olmaz. (Şekil 7.b). Glukoz stimülasyonunda ise kanalın ortasına bağlanan glukoz, transglukosilasyon veya allosterik etkiler gibi diğer mekanizmalar sayesinde substratın parçalanma etkinliğini artırabilir. (Şekil 7.c) (Yang vd., 2015).



Şekil 7. Glukozun, β -glukozidaz enzimine bağlanma bölgesi tercihine bağlı olarak enzim aktivitesini gösteren temsili şema (Yang vd., 2015). (a) Glukozun, aktif bölgeye bağlanarak rekabetçi inhibisyon yoluyla enzim aktivitesini inhibe etmesi. (b) Glukozun, enzim aktif bölgesinin dışına bağlanarak glukoz toleransına neden olması. (c) Glukozun substrat parçalanmasını uyarması.

1.10. β -Glukozidaz Enziminde Yapılan Nokta Mutasyonu Çalışmaları

Enzimlerin aktif bölgelerinde yapılan mutasyonlar sonucu elde edilen mutant enzimler ile doğal enzimlerle kıyaslandığında katalitik aktivitelerinde ciddi farklılıklar gözlenebilmektedir (Kaiser ve Lawrence, 1984). Atomların farklı konformasyonel durumlarının ortaya çıkardığı sonuçları daha anlaşılır hale getiren bir örnekleme yöntemi olan Hızlandırılmış moleküler dinamikler ile yapılan yabani tip ve nokta mutasyonlu mutantların karşılaştırmasında mutasyonların glukoz toleransına pozitif yönde etki edebileceği gösterilmiştir (Balogh vd., 2019; Lima vd., 2021). *Trichoderma reesei* β -glukozidazının aktif bölge girişinde bulunan iki aminoasit rezidüsünde ayrı ayrı yapılan mutasyonlar ile enzimin glukoz toleransında artış olmuştur. Enzimin glukoz toleransında gerçekleşen artışa ek olarak yabani tiple kıyaslandığında spesifik aktivitesi 2.4 katına çıkmıştır ve glukoz stimülasyonunda da artış gözlemlenmiştir (Guo vd., 2016). *Thermotoga neapolitana* şeker bağlanma bölgesi +2'ye yakın rezidülerde yapılan tekli, ikili ve üçlü mutasyonlar sonucunda direkt veya dolaylı yollarla enzim kinetiğini ve enzim dönüşüm sayısını etkilemiştir (Khan vd., 2011) (Tablo 2).

Güney Çin Denizi'nin mikrobiyal metagonomundan elde edilen iki farklı mikroorganizmaya ait β -glukozidazlar yüksek sekans benzerliği göstermelerine rağmen glukoz toleransları farklıdır. *Halothermothrix orenii* β -glukozidazı düşük glukoz seviyelerinde yüksek glukoz toleransına sahip iken ve *Paenibacillus polymyxa* ait β -glukozidazın aktivitesi glukoz tarafından kalıcı olarak inhibe edilmektedir. Bu iki proteinin sekiz bölgesinde dizi farklılığı bulunmaktadır. Bu farklılıkların enzimin aktif bölgesine yakın substrat kanalında olmasından dolayı glukoz potansiyelini etkilediği düşünülmektedir. Bu farklılıklar baz alınarak 228, 301 ve 302. rezidülerde yapılan bölgeye yönelik tekli ve çiftli nokta mutasyonlarıyla glukoz toleransı olmayan enzimin glukoz toleransının arttığı gözlemlenmiştir (Yang vd., 2015). *Paenibacillus polymyxa* ile yapılan başka bir çalışmada 184. rezidünün histidinden fenilalanine dönüştürülmesi mutantın glukoz toleransını artırmıştır (Liu vd., 2011) (Tablo 2).

Thermoanaerobacter ethanolicus JW200 ve *Thermotoga maritima* (*T. maritima*) β -glukozidazları aynı ailede bulunmaları ve %53 dizi benzerliği göstermelerine rağmen muhtemel glukon bağlanma bölgelerindeki rezidü farklılıklarından dolayı izoflavon glukozitleri daha küçük aglukonlara hidroliz etme yetenekleri farklıdır. Bu farklılıklar göz önüne alınarak *T. maritima* β -glukozidazı dizisinde yapılan tekli, çiftli ve üçlü mutasyonlar sonucu elde edilen yedi mutantta p-nitrofenil β -D-glukopiranozide (pNPG) substratına karşı katalitik verimde güçlü bir artış gözlemlenmesine rağmen Michaelis-Menten sabiti'nde (K_m) bir değişiklik gözlenmemiştir. Tüm mutantlar, izoflavonoid glukozitlerine karşı katalitik verimliliklerinde düşüş göstermiştir ve kuersetin substratına karşı farklı katalitik verim sergilemişlerdir (Sun vd., 2014). *T. Maritima* β -glukozidazı ile yapılan başka bir çalışmada, enzimin bir alkil glukozit olan heksil- β -glukozidin sentezlenmemesinin artırılması amacıyla farklı altı rezidüde tekli mutasyonlar yapılmıştır. Elde edilen mutantlardan üçünde transglükolizasyon aktivitesinin ve heksil- β -glukozidin sentezinin artabileceği gözlemlenmiştir (Xue vd., 2021) (Tablo 2).

Aşırı termofilik bir arke olan *Pyrococcus furiosus* ait β -glukozidazın 372. sırada bulunan korunmuş glutamik asit rezidüsünün aspartik asit veya glutamine değiştirilmesi spesifik aktivitede büyük bir düşüşe neden olmasına rağmen enzim kinetiğinde ve stabilitesinde önemli bir değişikliğe neden olmamıştır (Voorhorst vd., 1995). Benzer şekilde *Agrobacterium*'dan klonlanmış β -glukozidazın 358. aminoasiti olup nükleofil olarak işlev gören glutamik asit rezidüsünün aspartik asit, asparajin veya glutamine dönüştürülmesi ciddi aktivite azalmasına neden olmuştur. Ayrıca bu mutasyon glikozil-enzim ara ürününü çok

önemli ölçüde kararsızlaştırmıştır (Withers vd., 1992). *Arabidopsis thaliana*'dan izole edilen intron içermeyen At2g25630 geninin 385. kodonu bir stop kodonudur. Bu nedenle, YITENG motifinde yer alan 413. pozisyonadaki nükleofil glutamik asit sentezlenemez. 1155. aminoasit olan adeninin yönlendirilmiş nokta mutasyonu ile guanine dönüşmesiyle (TGA → TGG) stop kodonu bir triptofan rezidüsüne dönüştürülmüştür. Bu sayede tahmin edilen bir erken durdurma kodonundan katalitik olarak aktif bir enzim elde edilmiştir. Glutamik asit rezidüsünün substrat hidrolizi için gerekliliği doğrulanmıştır (Turan, 2008) (Tablo 2). Endüstriyel uygulamalarda enzimin verimliliği son derece kritik bir öneme sahiptir. Mariana Çukuru'ndaki derin deniz suyundan izole edilen *Alteromonas sp.* L82 β -glukozidazı halihazırda etanole toleranslıdır. Bu nedenle endüstriyel uygulamalarda sellobiyoz dönüşümü ve biyoyakıt üretiminde potansiyele sahiptir. Enzimin 171. aminoasit rezidüsünde yapılan mutasyonla elde edilen mutant enzim yabani tipe göre termal olarak daha stabildir ve glukoz toleransı daha iyidir. Üstelik rapor edilmiş pek çok β -glukozidazdan daha yüksek glukoz toleransına sahiptir (Sun vd., 2020) (Tablo 2).

Süt endüstrisi işlem atığı olan laktozun, tekrardan endüstriyel işlemlere dahil edilmesi son derece önemlidir. Laktozun tekrardan endüstriye katılmasını sağlama yöntemlerinden biri laktozdan galaktooligosakkarit üretmektir. β -glukozidaz transglükolizasyon aktivitesiyle bu işlemi gerçekleştirebilmektedir. *Thermotoga naphthophila*'nın 414. aminoasit rezidüsünün fenilalanininden serine değiştirilmesi galaktooligosakkarit üretimini artırmıştır (Yang vd., 2017) (Tablo 2).

Tablo 2. β -Glukozidazla yapılan mutasyon çalışmaları

Kaynak Organizma	Konak Organizma	Oluşturulan Mutasyon	Mutasyona Uğratılmış Alan/Alanlar	Yapılan Mutasyonun Enzim Üzerindeki Etkisi	Kaynakça
<i>Pyrococcus furiosus</i>	<i>Escherichia coli</i>	Tekli	E372D	Spesifik aktivitede 200 kat kadar büyük bir düşüşe neden olmuştur.	Voorhorst vd., 1995
			E372Q	Spesifik aktivitede 1000kat kadar büyük bir düşüşe neden olmuştur.	
<i>Agrobacterium</i>	<i>Escherichia coli</i>	Tekli	E358Q	Ciddi aktivite azalmasına neden olmuştur. Ayrıca bu mutasyon glikozil-enzim ara ürününü çok önemli ölçüde kararsızlaştırmıştır.	Withers vd., 1992
			E358D		
			E358N		
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	<i>Escherichia coli</i>	Tekli	H228T	Önemli glukoz toleransı artışı gözlemlenmiştir.	Yang vd., 2015
		Çiftli	N301Q/V302F		
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	<i>Escherichia coli</i>	Tekli	H184F	Önemli glukoz toleransı artışı gözlemlenmiştir.	Liu vd., 2011
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Pichia pastoris</i>	Tekli	.385W	YITENG motifinde yer alan nükleofil asit kalıntısının beta-glukozidaz substrat hidrolizi için mutlak gerekliliği doğrulanmıştır.	Turan, 2008

Tablo 2'nin devamı

<i>Thermotoga maritima</i>	<i>Escherichia coli</i>	Tekli	F221L	pNPG substratına karşı katalitik verimde güçlü bir artış gözlemlenmesine rağmen Michelaelis-Menten sabiti'nde (K_m) bir değişiklik gözlenmemiştir. Tüm mutantlar, izoflavonoid glukozitlerine karşı katalitik verimliliklerinde düşüş göstermiştir ve kuersetin substratına karşı farklı katalitik verim sergilemişlerdir.	Sun vd.,2014.
			N223L		
			G224T		
		Çiftli	F221L/N223L		
		Çiftli	F221L/G224T		
		Çiftli	N223L/G224T		
		Üçlü	F221L/N223L/G224T		
<i>Thermotoga maritima</i>	<i>Escherichia coli</i>	Tekli	N222F	Trasnglikolizasyon aktivitesinin ve alkil glukozidin sentezinin artabileceği gözlemlenmiştir.	Xue vd., 2021
			Y295F		
			F414S		
<i>Trichoderma reesei</i>	<i>Escherichia coli</i>	Tekli	L167W	Enzimin glukoz toleransında gerçekleşen artışa ek olarak spesifik aktivitesinde ve glukoz stimülasyonunda da artış gözlemlenmiştir.	Guo vd., 2016
			P172L		

Tablo 2'nin devamı

<i>Alteromonas sp. L82</i>	<i>Escherichia coli</i>	Tekli	F171W	Enzimin 171. aminoasit rezidüsünde yapılan mutasyonla elde edilen mutant enzim yabani tipe göre termal olarak daha stabildir ve glukoz toleransı daha iyidir. Üstelik rapor edilmiş pek çok β -glukozidazdan daha yüksek glukoz toleransına sahiptir.	Sun vd., 2020
<i>Thermotoga naphthophila</i>	<i>Escherichia coli</i>	Tekli	F144S	Enzimin trasnglikolizasyon aktivitesinin artırılarak endsürtriyel bir yan ürün olan laktozun galoktooligosakkaritlere dönüştürülme verimi artırılmıştır.	Yang vd., 2017
<i>Thermotoga neapolitana</i>	<i>Escherichia coli</i>	Tekli	G222M	<i>Thermotoga neapolitana</i> şeker bağlanma bölgesi +2'ye yakın rezidülerde yapılan tekli, ikili ve üçlü mutasyonlar sonucunda direkt veya dolaylı yollarla enzim kinetiğini ve enzim dönüşüm sayısını etkilemiştir.	Khan vd., 2011
			N221S		
		Çiftli	N221S/P342L		
			F219L/K214R		
		Üçlü	N221S/P165L/M278I		

Tablo 2'nin devamı

			F219L/P165L/M278I		
			G222Q/V203M/K214R		
			G222Q/P165L/M278I		

1.11. *Anoxybacillus* Cinsinin Özellikleri

Anoxybacillus cinsi, bakteri aleminin en büyük ailelerinden biri olan *Bacillaceae* ailesine dahildir (Mandic-Mulec vd., 2015). Şube olarak *Firmicutes*'te, sınıf olarak *Bacilli*'de yer alır ve takımı ise *Bacillales*'tir (Gibsons ve Murray, 1978; Skerman vd., 1989; Pikuta vd., 2009). Bu cinsin, *Bacillus* cinsinden ayrımı *Anoxybacillus pushchinoensis* tanımlanmasıyla yapılmıştır (Pikuta vd., 2000).

Bacillaceae familyasının, doğal yaşam alanı oldukça geniştir. Deniz ekosistemlerinde, tatlı sularda, tuz göllerinde, kaplıcalarda, toprakta, havada, bitki köklerinde yaşayabilirler. Hatta, Kennedy Uzay Merkezi'nin temiz odaları gibi hiç alışılmadık ortamlarda da bulunabilmektedirler (Mandic-Mulec vd., 2015). Ayrıca, insan kanında da *Bacillaceae* ailesi üyesi bakteriye rastlanmıştır (Schmidt vd., 2011). Özellikle sıcak sularda ve hidrotermal habitatlarda yaşayabilen termofilik türlerinin bulunması ticari değeri yüksek ısı stabil hücre dışı enzim üretimindeki potansiyellerinden dolayı ilgi çekmektedirler. Bu ailenin çoğu üyesinin radyasyon, ısı, kuraklık ve çeşitli kimyasalar gibi olumsuz çevre koşullarına karşı endospor oluşturma yetenekleri vardır (Goh vd., 2013). *Bacillaceae*'ler oval (cocci) veya çubuk (basil) şekildedirler (Beldüz vd., 2015). Çoğunlukla aerobik veya fakültatif anaerobik solunum yaparlar ve tipik Gram-pozitif hücre duvarına sahiptirler (Mandic-Mulec vd., 2015).

Anoxybacillus sp. TSB-6 harici çoğu *Anoxybacillus* türlerinin optimal büyüme sıcaklığı 50 ile 65 °C arasındadır (Paul vd., 2012). *Anoxybacillus*'lar alkalifilik veya alkali toleranttırlar ve 5.6-10.5 arası pH değerlerinde yaşayabilirler (Goh vd., 2013; Beldüz vd., 2015). Genomlarında birçok enzimin kodunu barındırırlar. Pullulanaz, amilopullulanaz, α -amilaz, ksiloz-izomeraz ve CDase gibi nişasta hidrolizi yapabilen enzimleri kodlayan genler taşıyabilirler (Beldüz vd., 2015; Bolton vd., 1997; Chai vd., 2012; Kikani ve Singh, 2012; Turner vd., 2005). *Anoxybacillus* türlerinden, L-arabinoz izomeraz, fruktoz-1,6-bifosfaldolaz, alüminyum tolerans ATPaz, ksilanaz, tip II restriksiyon endonükleazı (BfII RE), α -L-arabinofuranosidaz, karboksilesteraz enzimleri doğal veya rekombinant olarak saflaştırılmıştır (Ay vd., 2011; Beriş vd., 2011; Çanakçı vd., 2008; D'Souza vd., 2004; Ertunga vd., 2007; Kacagan vd., 2008; Li vd., 2011; Wang vd., 2009) (Tablo 3).

Tablo 3. Anoxybacillus türlerinden saflaştırılmış bazı enzimler (Goh vd., 2013).

Enzim	Kaynak Organizma	Protein Tipi	Optimal Sıcaklık (°C)	Optimal PH
CDase	<i>A. flavithermus</i>	Rekombinant	57.5	6.5
L-arabinoz izomeraz	<i>A. flavithermus</i>	Rekombinant	95	10.5
Fruktoz-1,6-bifosfaldolaz	<i>A. gonensis</i> G2	Rekombinant	60	8.5
Alüminyum tolerans ATPaz	<i>A. gonensis</i> G2	Rekombinant	73	6.0
Ksilanaz	<i>A. puchchinoensis</i> A8	Doğal	55	6.5
	<i>Anoxybacillus</i> sp. E2	Rekombinant	65	7.8
Tip II restriksiyon endonükleazı (<i>BflI</i> RE)	<i>A. flavithermus</i>	Doğal	60	8.0
α -L-Arabinofuranosidaz	<i>A. kestanbolensis</i> AC26Sari	Rekombinant	65	5.5
Karboksilesteraz	<i>Anoxybacillus</i> sp. PDF1	Rekombinant	60-65	8.0

Tablo 3'un devamıdır.

α -amilaz	<i>A. flavithermus</i> DSM2641	Doğal	60	5.5-6.0
	<i>Anoxybacillus</i> sp. TSSC-1	Doğal	80	7.0
	<i>Anoxybacillus</i> sp. SK3-4	Rekombinant	60	8.0
	<i>Anoxybacillus</i> sp. DT3-1	Rekombinant	60	8.0

Rize Ayder'in sıcak sularından izole edilen termofilik *Anoxybacillus ayderensis* AB04^T suşu, basil şekilli Gram-pozitif bakteri olup büyüme için gerekli sıcaklık 30 ile 70 °C aralığındadır. Optimal büyüme sıcaklığı ise 50 ile 55 °C aralığındadır. D-ksiloz, D-sükroz, D-mannoz, D-mannitol, D-glukoz, D-fruktoz, D-rafinoz, L-arabinoz, maltoz gibi çeşitli karbon kaynaklarının varlığında üreyebilen fakültatif anaeroblardır. Kolenileri 1-2 mm çapında ve yuvarlak şekillidir. Elverişsiz koşullar altında terminal, küresel endospor oluştururlar. Kompleks bir karbonhidrat olan nişasta ve jelatinin hidrolizini yapar. Büyüme ortamında yeterli miktarda ampisilin, tetrasiklin, streptomisin, kanamisin, gentamisin veya sülfat varlığında büyüme inhibe edilir (Dülger vd., 2004).

1.11.1. *Anoxybacillus ayderensis* Ay9

Tez kapsamında, Karadeniz Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı tarafından izole edilip, tanımlanan *Anoxybacillus ayderensis* Ay9 bakterisi çalışılmıştır. *Anoxybacillus ayderensis* Ay9 bakterisi, genomunda β -glukozidaz geni taşıyan termostabil bir bakteridir. Rize Ayder'in sıcak sularından izole edilip genom dizilemesi yapılmıştır. β -glukozidaz proteini kolonlanmış ve biyokimyasal analizleri sentetik pNPG substratıyla yapılmıştır. Bunun sonucunda GH1 ailesine ait olduğu anlaşılan enzim, maksimum aktivitesini 50 °C'de ve pH8'de göstermiştir. HgCl₂ enzimin aktivitesini tamamen indirgemesine rağmen metallerin çoğundan az miktarda etkilenmiştir. Deterjan

testlerinde SDS'in β -glukozidaz enzimi için güçlü bir inhibitör olduğu anlaşılmıştır. Geri beslenme inhibisyonuna neden olan glukozu karşı toleransı yüksek olan bir enzimdir. Enzimi kimyasallara, birçok metale ve glukozu toleransının yüksek olması biyoteknolojik çalışmalar için ilgi çekici yapmaktadır (Zada vd., 2021).



2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Kimyasallar, Enzimler ve Kitler

Tripton (Merck V441613949), Yeast ekstrakt (Merck VM175053), NaCl (Merck K34243404), Etil alkol, Kanamisin (Applichem A1493), IPTG (Applichem A1008), Amfisilin (Applichem A0839), EDTA (Merck 84211000), dNTP seti (Promega), Agar (Himedia), CaCl₂ (Aktar Kimya), X-Gal (Applichem A10070005), Commassie Brilliant Blue G-250, Commassie Brilliant Blue R-250 (Merck 2C2133453), Etanol, Fosforik Asit (Merck 563.2500), Sodyum Asetat (Merck TA867065), K₂HPO₄ (Merck A678671), KH₂PO₄ (Merck 567300), Trizma Baz (Sigma T1503), SDS, Akrilamid (Sigma A8887), Bis-akrilamid (Promega), Bromofenol mavisi (Gerbu 080702), β-merkaptotanol (Merck 805740), Metanol, Asetik asit (Riedel-dan Haen 27225), Gliserol (Merck K40789992008), 4-Nitrophenyl-β-D-glucopyranosid (Sigma N7006), TEMED (Janssen Chimica), DNA Ladder (N3232L), Protein Ladder (V8491), NcoI (Promega), EcoRI (Promega), HindIII (Promega), T4 DNA Ligaz (NEB), Taq DNA polimeraz (Promega), pGEMT Easy Vector System I (Promega), Plazmit DNA izolasyon kiti (Fermentas), GeneJET Jel Ekstraksiyon Kiti (Qiagen), Ni-Metal Affinity Resin (Qiagen) belirtilen firmalardan temin edilmiştir.

2.2. Kullanılan Besiyerleri

Çalışmalarda kullanılan LB (Luria-Bertani) sıvı besiyeri, 1 L ddH₂O içerisinde, %1 (w/v) tripton, %0,5 (w/v) NaCl, %0,5 (w/v) yeast ekstrakt, olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan besiyeri, otoklavda, 121°C’de 20 dk boyunca steril edildi (Luria, 1984).

LB (Luria-Bertani) katı besiyerinin hazırlanışı şöyledir: 1 L ddH₂O içerisinde, %1 (w/v) tripton, %0,5 (w/v) yeast ekstrakt, %0,5 (w/v) NaCl ve %1,2 (w/v) agar olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan besiyeri, otoklavda 121°C’de 20 dk boyunca steril edildi (Luria, 1984).

2.3. Kullanılan Bakteriler ve Vektörler

Çalışmalarda *Escherichia coli* BL21, *Escherichia coli* JM101 ve pET-28a(+) ekspresyon vektörü (İnvitrogen), pGEM-T Easy klonlama vektörü kullanıldı.

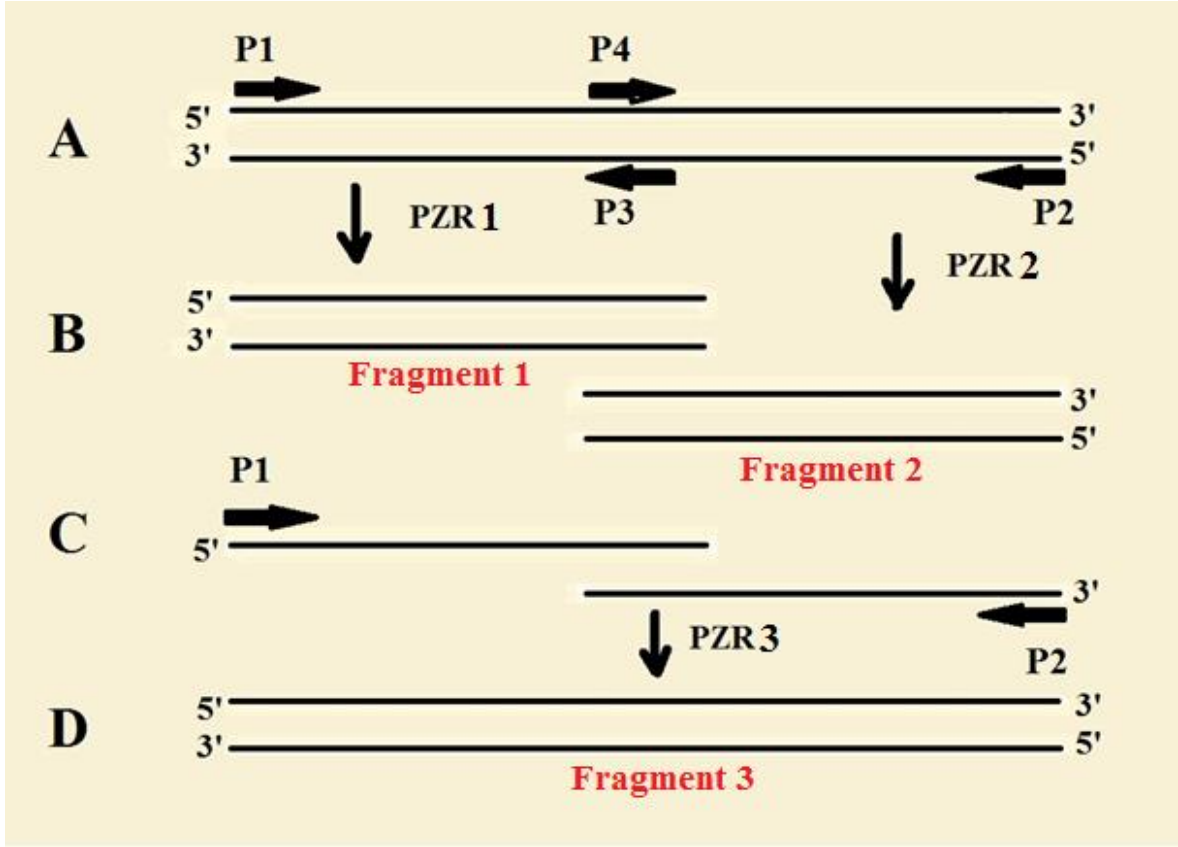
2.4. β -glukozidaz Geninde (*bglAy9* N222S) G226E Nokta Mutasyonunun Oluşturulması

Karadeniz Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı'nda 1001 TÜBİTAK proje kapsamında daha önceden elde edilip mutasyona uğratılarak klonlanmış olan *Anoxybacillus ayderensis* Ay9 kaynaklı N222S mutasyonlu β -glukozidaz genini (*bglAy9* N222S) içeren pET28a(+)-*bglAy9* N222S plazmiti kalıp olarak kullanıldı. *bglAy9* N222S β -glukozidaz geninin 226. bölgesinde bulunan glisini glutamik asit ile değiştirmek için 226. bölgede glutamik asit oluşturacak şekilde dizayn edilen P3 ve P4 primerleri, bir sonraki aşamada β -glukozidaz geninin bir bütün olarak elde edilmesi için birbirine komplementer bölgeler içerecek şekilde dizayn edildi. Ayrıca, elde edilen geni pET28a(+) vektörüne klonlamak için restriksiyon enzim bölgelerini içeren P1 ve P2 primerleri dizayn edildi (Tablo 4).

Tablo 4. Kullanılan Primerler

Kodu	Primer Adı	Primer Dizisi	Restriksiyon Enzimi Kesim Bölgesi
P1	AydA9-F	5'- ggCCATggTgCTTCAgTTTCCgAAAgAT -3'	<i>NcoI</i>
P2	AydA9-R	5'- AAgCTTTTTgTCATTgTCTACTTgCaaTC -3'	<i>HindIII</i>
P3	G226E-R	5'-ACCgCATACTGAggTgTCAAATTC-3'	—
P4	G226E-F	5'- ATTTgACACCTCAgTATGCggTCg -3'	—

Nokta mutasyonu, iki aşamalı olmak üzere üç PZR reaksiyonu (PZR1, PZR2, PZR3) ile gerçekleştirildi. İlk aşamada, gende hedeflenen mutasyonun oluşması için iki ayrı PZR reaksiyonu (PZR1 ve PZR2) gerçekleştirildi. PZR1 reaksiyonunda, P1 ve P3 primerleri kullanılarak fragment 1; PZR2 reaksiyonunda, P2 ve P4 primerleri ile fragment 2 elde edildi. Bu aşamada birbirine komplementer bölgesi bulunan eksik iki parça olarak elde edildi. PZR1 ve PZR2 reaksiyonları belirli koşullar altında gerçekleştirildi. PZR 1 için Go taq polimeraz 1X buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.2 µM P1 ve P3 primerleri, 1.25 U Go taq DNA Polimeraz ve 1 µl pET28a(+)-*bgl*Ay9 N222S kullanılarak reaksiyon karışımı hazırlandı. İlk denatürasyon 95 °C’de 180 sn tek döngü olarak gerçekleşti. Denatürasyon 95°C’de 30 saniye, bağlanma 50 °C’de 30 sn, uzama 72 °C’de 30 sn olmak üzere birbiri ardına gerçekleşen reaksiyonlar 36 döngü olarak gerçekleşti. Son uzama 72 °C’de 300 sn olarak gerçekleştirildi. PZR 2 için Go taq polimeraz 1X buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.2 µM P2 ve P4 primerleri, 1.25 U Go taq DNA Polimeraz ve 1 µl pET28a(+)-*bgl*Ay9 N222S kullanılarak reaksiyon karışımı hazırlandı. İlk denatürasyon 95 °C’de 180 sn tek döngü olarak gerçekleşti. Denatürasyon 95°C’de 30 saniye, bağlanma 51 °C’de 30 sn, uzama 72 °C’de 30 sn olmak üzere birbiri ardına gerçekleşen reaksiyonlar 36 döngü olarak gerçekleşti. Son uzama 72 °C’de 300 sn olarak gerçekleştirildi. Elde edilen PZR1 ve PZR2 ürünleri %1 agaroz jelde yürütüldü. Biorad jel görüntüleme cihazıyla görüntülendi. Beklenen ağırlıktaki PZR ürünleri jel pürifikasyon kitiyle ekstrakte edildi. İkinci aşamada, PZR1 ve PZR2 sonucunda agaroz jelden ekstrakte edilen fragment 1 ve fragment 2 kalıp olarak kullanılarak, P1 ve P2 primerleri ile PZR3 reaksiyonu gerçekleştirildi. PZR3 için, Go taq polimeraz 1X buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.2 µM P1 ve P2 primerleri, 1.25 U Go taq DNA Polimeraz 1 µl fragment 1 ve 1 µl fragment 2 kullanılarak reaksiyon karışımı hazırlandı. İlk denatürasyon 95 °C’de 180 sn tek döngü olarak gerçekleşti. Denatürasyon 95°C’de 30 saniye, bağlanma 50 °C’de 30 sn, uzama 72 °C’de 30 sn olmak üzere birbiri ardına gerçekleşen reaksiyonlar 36 döngü olarak gerçekleşti. Son uzama 72 °C’de 300 sn olarak gerçekleştirildi. PZR3 reaksiyonu sonucunda fragment 3 elde edildi (Şekil 8).



Şekil 8. Mutasyon oluşturmak için takip edilen PZR basamakları. A, *bglAy9* N222S mutantına ait diziye primerlerin bağlanma yerlerini gösteriyor. B, PZR1 ve PZR2 gerçekleştirildikten sonraki oluşan fragment 1 ve fragment 2. C, PZR3 için fragment 1, fragment 2 üzerinde P1 ve P2 primerlerinin bağlanma bölgelerini temsil ediyor. D, PZR3 sonucu mutasyonlu fragment 3. P1 *AydA9-F* primerini, P2 *AydA9-R* primerini, P3 *G226-R* primerini ve P4 *G226E-F* primerini temsil ediyor.

2.5. *bglAy9* N222S /G226E Mutant β -Glukozidaz Geninin pGEM®-T Easy Klonlama Vektörüne Klonlanması

Elde edilen DNA fragmenti, baz dizilimi belirlemek amacıyla pGEM®-T Easy Klonlama vektörü ile ligasyon yapıldı. 16°C’de gece boyu inkübasyona bırakıldı. Reaksiyon belirli şartlar altında gerçekleşti (Tablo 5). Ardından CaCl₂ methodu ile hazırlanan *Echerichia coli* JM101 kompetent hücrelerine transforme edildi. Transformasyon amacıyla, içerisinde 200 µl konak hücresi bulunan santrifüj tüpüne, 10 µl ligasyon ürünü eklendi ve ardından 30 dk buz üzerinde bekletildi. Inkübasyon ardından örnek, 42°C’lik ısıtıcı blokta iki dk bekletildi ve sürenin sonunda her bir tüpe 200 µl LB sıvı besiyeri eklendi. 37°C’de iki saat inkübasyondan sonra, 50 µg/mL kanamisin içeren LB agar petrilere yayılarak,

37°C’de bir gece inkübasyona bırakıldı (Sambrook vd., 1989). LacZ geni içerisine yerleştirilen DNA fragmentini içeren hücrelerin oluşturduğu beyaz koloniler seçildi. Plazmit izolasyonu yapıldı ve *EcoRI* kesimi ile genin varlığı tesbit edildi. Elde edilen fragment sekans analizi yapılmak üzere Macrogen firmasına gönderildi. Sekans sonucu, BLAST aracılığı ile, Genbank’taki (NCBI, NIH, Washington, DC) verilerle karşılaştırıldı ve elde edilen sekansın *bglAy9* N222S/G226E β -glukozidaz genine ait olduğu tespit edildi.

Tablo 5. pGEM®-T Easy vektörü ligasyonu için tepkime bileşenleri.

pGEM®-T Easy klonlama vektörü ligasyon bileşenleri
1 μ L 10X T4 DNA ligaz tamponu
3 μ L Kalıp DNA
1 μ L (1:1 sulandırılmış vektör)pGEM-T Easy klonlama vektörü
1 μ L T4 DNA ligaz (1 U)
4 μ L ddH ₂ O

2.6. *bglAy9* N222S/G226E Geninin pET28a (+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

Rekombinant pGEM-T Easy vektörü (içerisinde *bglAy9* N222S/G226E genini içeren vektör), *NcoI* ve *HindIII* enzimleri ile kesildi. Daha sonra, aynı enzimlerle kesilmiş olan pET28a(+) ekspresyon vektörüne T4 DNA ligaz kullanılarak firmanın öngördüğü şartlar altında ligasyon yapıldı. Ligasyon ürünü, *E. coli* BL21(DE3) LysS suşuna, yukarıda anlatılan CaCl₂ transformasyonu yöntemi ile aktarıldı ve transformasyon ürünü, 50 μ g/mL kanamisin içeren LB agar petrilere yayılarak, 37°C’de bir gece inkübe edildi. Inkübasyon sonucunda elde edilen kolonilerden, plazmit izolasyonu yapıldı. Boş pET28a(+) vektöründen ağır olan plazmitler önce *NcoI* enzimi ile kesildi. 65°C’de 15 dakika enzim inaktif hale getirildi. Ardından *HindIII* enzimi ile kesim yapıldı. Kesim reaksiyonlarının her biri 37°C’de 2 saat boyu inkübasyonla gerçekleştirildi. Kesimin ardından örnekler, DNA ladder ile birlikte % 0,8’lik agaroz jelde yürütüldü. İstenen büyüklükte elde edilen fragmentin sekans analizi

yapılmak üzere MacroGen firmasına gönderildi. Sekans sonucuna göre mutasyonun varlığı, Clustal omega, Gentle ve Snapgene programları kullanılarak tespit edildi.

2.7. *bglAy9* N222S/G226E mutant β -glukosidaz Geninin Aşırı Ekspresyonu

bglAy9 N222S/G226E β -glukosidaz genini içeren Rekombinant pET28a (+) vektörüne sahip kolonilerden (*E. coli* BL21(DE3) LysS) hücre, 50 μ g/ml kanamisin içeren 50 ml LB sıvı besiyerine ekilerek gece boyu inkübe edildi. Ardından gece kültüründen optik yoğunluğu 0.1 olacak şekilde 50 μ g/ml kanamisin içeren 2L LB sıvı besiyerine ekim yapıldı. Kültür, optik yoğunluk 0,6-0,9 ulaşmaya kadar 37°C’de inkübe edildi ve genin overekspresyonu için son hacim 1 mM olacak şekilde IPTG (Isopropil eklenecek T7 promotörü indüklendi. İndüklemenin ardından kültür 37°C’de 4 saat boyunca inkübe edildi. Büyütülen hücreler 11.000 rpm’de 5 dk santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatant atıldı ve pellet 50 mM Sodyum Fosfat tamponu (pH 8) ile çözüldü. Ardından %70 şiddetinde, 0,6 devirde 5 dk Sartorius Labsonic sonikatör ile sonike edildi. Elde edilen hücre solüsyonu 14800 rpm’de 15 dk boyunca santrifüj edildi. Pellet kısmı atılarak süpernatant alındı. Elde edilen ürün, 5 mM pNP-G substratı ile 40°C’de 30 dk inkübe edilerek β -glukozidaz aktivitesi tespit edildi.

2.8. *BglAy9* N222S/G226E Enziminin Ni- Afinité Kromatografisi ile Saflaştırılması

BglAy9 N222S/G226E proteinini saflaştırmak için Ni Afinité kolonu kullanıldı. Kromatografi manuel olarak yapıldı. 1 ml kolon maddesi içeren kolon 3 ml buffer A ile dengeye getirildi. Daha önce β -glukozidaz aktivitesi teyit edilmiş olan ham protein, 1:1 oranında buffer A ile karıştırıldı ve kolona yüklendi. Histidin etiketi içermeyen proteinlerin uzaklaştırılması için kolondan 10 ml Buffer A geçirildi. Son olarak, kolondan 1’er ml’lik ependorflara ayrılarak, 10 ml buffer B geçirildi. Elusyon ürünlerinden β -glukozidaz aktivitesi olan ependorflardan alınan örneklerin saflığı SDS-PAGE analizi ile tespit edildi (Tablo 6).

Tablo 6. Ni-Afinite kromotografisinde kullanılan solüsyonlar.

Buffer A	Buffer B
20 mM Tris.HCl buffer (pH 7,5)	20 mM Tris.HCl buffer (pH 7,5)
5 mM β -merkaptoetanol	5 mM β -merkaptoetanol
0,2 M NaCl	0,2 M NaCl
	0,5 M İmidazol

Elde edilen enzimi kimyasallardan arındırmak için diyaliz yapıldı. Bunun için enzim diyaliz membranı içinde 20 mM Sodyum Fosfat (ph 8) tamponu içerisine 1 gece boyunca manyetik karıştırıcıda döndürülerek inkübe edildi.

2.9. SDS-PAGE Analizi

Protein jel elektroforezi Hoeffler SE 600 marka cihazla gerçekleştirildi. Elde edilen proteinin moleküler ağırlığının tayini için molekül ağırlığı bilinen bir markerla SDS (Sodyum dodesilsülfat) poliakrilamid jel elektroforezinde yürütüldü. Her örnek (50 μ g protein) yüklenirken eşit miktarda muamele tamponu (%20 Gliserol; 0,15 M Tris-HCl pH 6,8; % 6 β -merkaptoetanol; % 4 SDS) eklendi. Ardından 99°C’de dört dakika bekletilip %12’lik sodyum dodesil sülfatpoliakrilamid jeline (SDS-PAGE) yüklendi (Maniatis vd.,1982). 15 mA akım verilerek yürütme boyasının jelden çıktığı emin olunana kadar yürütüldü. Yürütme tamamlandıktan sonra Commasie Brilliant Blue (%50 metanol, % 0,125 Brilliant Blue R-250, %10 asetik asit) boyasıyla 1 saat boyunca boyandı. Boyamanın hemen ardından jel 1. yıkama solüsyonuna (%10 Asetik asit, %50 Metanol, %40 ddH₂O) alındı ve

1 saat bekletildi. Bir saatin sonunda jel 2. yıkama solusyonuna (%7 asetik asit, %5 metanol) alındı ve protein bantları belirginleşmesi beklendikten sonra bilgisayar tarayıcısıyla fotoğraflandı.

2.10. Bradford Yöntemiyle Protein Konsantrasyon Tayini

Protein konsantrasyon tayini Bradford (1976) metodu ile tespit edildi. İlk olarak, Commassie Brilliant Blue G-250 boya solüsyonu hazırlandı. %5 etanol içerisine % 0,01 (w/v) boya solusyonu çözündürüldü ve karanlık ortamda filtre kağıdı yardımıyla filtre edildi. Protein standart grafiği oluşturmak için BSA (Bovin Serum Albumin) kullanıldı. 5,10, 15, 20, 40, 60, 80 µg konsantrasyonlarındaki BSA proteini 0,15 M NaCl ile 100 µl'ye tamamlandı. Her bir çözeltiye önceden hazırlanan 3 ml CBB-G250 boya solüsyonundan eklendi, örnekler vortekslendi ve oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi. Ardından spektrofotometrede 595 nm'de ölçüm alınarak standart grafiği oluşturuldu.

Çalışma boyunca protein konsantrasyon tayinleri hazırlanan standart kullanılarak ölçüldü. Ölçüm için; 10 ul protein, 90 ul 0.15 M NaCl ve 3 ml CBB-G250 karıştırıldı, vorteksiendi ve 15 dakika inkübasyonun ardından spektrofotometrede okutuldu.

2.11. BglAy9 N222S/G226E Enziminin Karakterizasyonu

BglAy9 N222S/G226E enziminin biyokimyasal aktivitesi, standart aktivite testine göre p-NPG substratı kullanılarak yapıldı. Reaksiyon toplamda 500 µl olacak şekilde 1mM p-NPG, 50 mM sodyum fosfat (pH 8) ve 0.2 µg enzim kullanılarak kuruldu. 50°C'de 10 dakika inkübe edildikten sonra 1mM 500 µl Na₂CO₃ durdurma tamponuyla muamele edildi. Enzim içermeyen reaksiyon kör olarak kullanılarak renk değişimi spektrofotometre cihazında 450 nm'de ölçüldü. Mevcut deney koşullarında, bir µmol pNP/dakika oluşumunu için gerekli olan enzim miktarı bir birim enzim aktivitesi olarak belirtilmiştir.

2.11.1. Optimum Sıcaklık

BglAy9 N222S/G226E'nin en iyi çalıştığı optimum sıcaklık değeri 30, 40, 50, 60, 70 ve 80°C'ye ayarlanmış ısıtıcı blokta gerçekleştirilen seri reaksiyonlar ile p-NPG varlığında belirlendi. Bu aralıkta aktive ölçümü yapılarak bir optimum sıcaklık grafiği oluşturuldu. Devamında yapılan çalışmalar tespit edilen optimum sıcaklık baz alınarak gerçekleştirildi.

2.11.2. Optimum pH

BglAy9 N222S/G226E enzimi için en uygun pH değerinin anlaşılması için farklı pH değerlerinde tamponlarla reaksiyon gerçekleştirildi. 50 mM sodyum sitrat tamponu (pH 3-6), 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7-8) ve 50 mM Glisin-NaOH (pH 9-10) tamponları kullanıldı. Devamında yapılan çalışmalar tespit edilen optimum pH baz alınarak gerçekleştirildi.

2.11.3. Enzim Kinetiği

50°C'de 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7) içerisinde farklı konsantrasyondaki (0,2-1,6 mM) p-NPG substratının hidroliz edilme oranı ölçüldü. Elde edilen verilerden yararlanılarak enzimin maksimum hızı (V_{max}) ve Michaelis-Menten sabiti (K_m) saptandı. Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri oluşturuldu (Lineweaver ve Burk, 1934).

2.11.4. Termal Kararlılık

Isının BglAy9 N222S/G226E enzimin termal kararlılığına olan etkisinin anlaşılması için, enzim oda sıcaklığında ve 55°C'de 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7) içerisinde 1, 3, 5, 24, 48, 76, 96 ve 168 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kalan aktivite (%); optimum pH ve sıcaklıkta p-NPG substratı ile 30 dk.'lık bir reaksiyon sonucunda ölçüldü.

2.11.5. pH Kararlılığı

pH'nin BglAy9 N222S/G226E termal kararlılığına olan etkisinin anlaşılması için 50 mM sodyum fosfat tamponu pH 6, 50 mM Tris-HCl tamponu pH 7 ve 50 mM Tris-HCl tamponlarında 50°C'de 168. saate kadar inkübe edildi. İnkübasyonun 1., 3., 5., 24., 48., 76., 96. ve 168. saatlerinde kalan aktivite (%); optimum pH ve sıcaklıkta *p*NPG substratı (10 mM) ile 30 dk.'lık bir reaksiyon sonucunda ölçülerek enzimin en kararlı olduğu pH değeri belirlendi.

2.11.6. Metal İyon Etkisi

NiCl₂, KCl, MnSO₄, CaCl₂, MgCl₂, CoCl₂, ZnSO₄, CuSO₄, FeSO₄, HgCl₂ tuzları metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisinin anlaşılması amacıyla kullanıldı. Enzim, 0.5mM ve 5 mM metal tuzları ile 50°C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, metal içeren enzimlerin aktivitesi *p*-NP butirat substratı kullanılarak belirlendi. Metal tuzları olmadan enzimin aktivitesi, metal içeren enzimlerin kalan aktivitesinin belirlenmesi amacıyla %100 olarak kabul edildi.

2.11.7. Deterjanların, İnhibitörlerin ve Organik Çözücülerin Etkileri

İyonik veya non-iyonik deterjanlar olan Tween 20, Triton X-100, SDS (%1 v/v, %5 v/v, %10 v/v), organik çözücü olarak propanol, etanol, bütanol, DMSO, metanol, dioksan (%5 v/v, %10 v/v, %20 v/v), potansiyel inhibitör olarak EGTA, DTT, EDTA ve DEPC (1 mM, 10 mM) kullanılarak 50°C'de 30 dakika boyunca inkübe edilmesiyle enzimin aktivitesi üzerindeki etkileri belirlendi. Deterjan, organik çözücü ve potansiyel inhibitörler olmadan enzimin aktivitesi, kalan aktivitenin belirlenmesi amacıyla %100 olarak kabul edildi.

2.11.8. Glukoz Toleransı

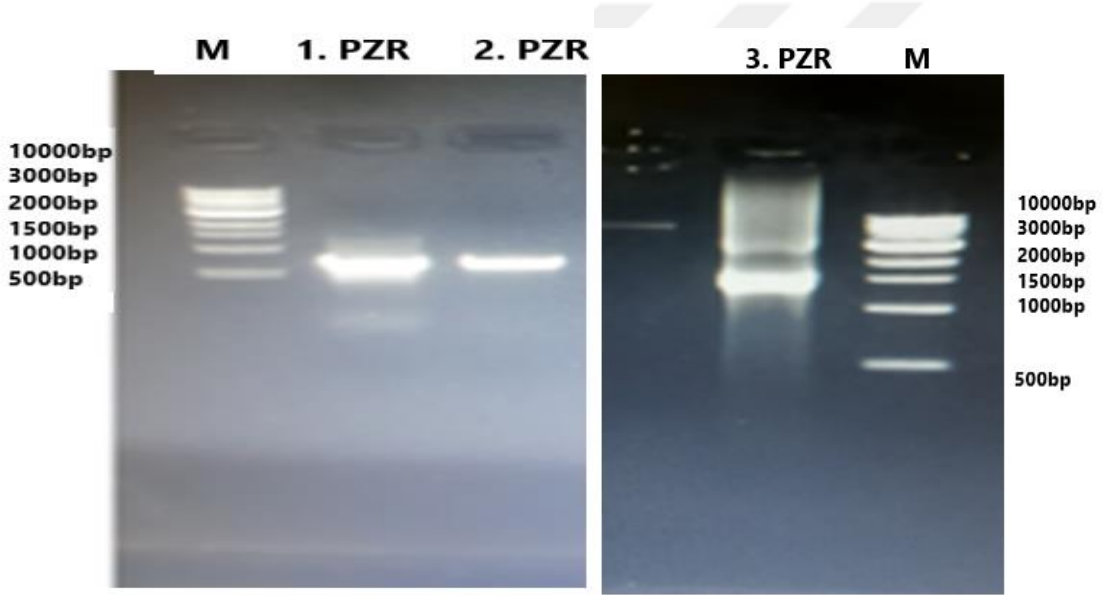
Glukozun enzim aktivitesine olan etkisi belirlenmesi 1, 2, 4, 6, 8, ve 10 mM glukoz konsantrasyonları kullanılarak 50°C’de 30 dakika boyunca inkübe edilmesiyle belirlendi



3. BULGULAR

3.1. *bglAy9* N222S/G226E Geninin Elde Edilmesi

bglAy9 N222S/G226E mutasyonlu β -glukozidaz geninin elde edilmesinde uygulanan iki aşamalı PZR reaksiyonunun birinci basamagında 1. PZR sonucunda 688 bp ve 2. PZR sonucunda 699 bp'lik DNA fragmentleri elde edildi. 3. PZR sonucunda ise 1365 bp'lik fragment elde edildi (Şekil 9).



Şekil 9. Mutasyon oluşturulmak için yapılan PZR ardından oluşan fragmentlerin agaroz jel görüntüleri.

3.2. *bglAy9* N222S/G226E Geninin pGEM®-T Easy Vektörüne Klonlanması

bglAy9 N222S/G226E-pGEM-T klonunun *EcoRI* ile kesimi sonucunda yaklaşık 1365 bp uzunluğunda fragment elde edildi (Şekil 10).



Şekil 10. G226E β -glukozidaz geninin pGEM-T easy vektörü ile klonlanması. M: Marker (N3232L), 1: *EcoRI* ile kesilmiş *bglAy9* N222S/G226E, 2: kesilmemiş *bglAy9* N222S/G226E -pGEM-T klonu.

3.3. G226E β -glukozidaz Mutasyon Analizi

bglAy9 N222S/G226E geninin elde edilmesinde kalıp olarak kullanılan *bglAy9* N222S mutasyonlu ve yaban tip (*bglAy9* WT) β -glukosidaz amino asit hizalamaları sonucunda 226. bölgede Glisinin (G) Glutamik asite (E) dönüştüğü tespit edildi (Şekil 11).

CLUSTAL Q(1.2.4) multiple sequence alignment

WT	MVLQFPKDFIWGAATSSYQIEGTATGEDKIYSIWDHFSRIPGKVANGDNGDIAIDHYNRY	60
N222S	MVLQFPKDFIWGAATSSYQIEGTATGEDKIYSIWDHFSRIPGKVANGDNGDIAIDHYNRY	60
N222S/G226E	MVLQFPKDFIWGAATSSYQIEGTATGEDKIYSIWDHFSRIPGKVANGDNGDIAIDHYNRY	60

WT	VEDIALMKALHLKAYRFSTSWARLYCETPGKFNEKGLDFYKRLVHELLENGIEPMLTIYH	120
N222S	VEDIALMKALHLKAYRFSTSWARLYCETPGKFNEKGLDFYKRLVHELLENGIEPMLTIYH	120
N222S/G226E	VEDIALMKALHLKAYRFSTSWARLYCETPGKFNEKGLDFYKRLVHELLENGIEPMLTIYH	120

WT	WDMPOALQEKGGWENRDIVHYFQEYAAFLYENLGDVVKKWITHNEPWVVTYLGYGNGEHA	180
N222S	WDMPOALQEKGGWENRDIVHYFQEYAAFLYENLGDVVKKWITHNEPWVVTYLGYGNGEHA	180
N222S/G226E	WDMPOALQEKGGWENRDIVHYFQEYAAFLYENLGDVVKKWITHNEPWVVTYLGYGNGEHA	180

WT	PGIQNFTSFLKAAHHVLLSHGEAVKAFAIGSKDGEIGITLNLTPGYAVDPKDEKAVDAA	240
N222S	PGIQNFTSFLKAAHHVLLSHGEAVKAFAIGSKDGEIGITLSLTPGYAVDPKDEKAVDAA	240
N222S/G226E	PGIQNFTSFLKAAHHVLLSHGEAVKAFAIGSKDGEIGITLSLTPEYAVDPKDEKAVDAA	240
	***** , ** *****	
WT	RKWDGFMNRWFLDPVFKGQYPADMLEVYKDYLDPVYKEGDLQTIQQPIDFFGFNYSTAT	300
N222S	RKWDGFMNRWFLDPVFKGQYPADMLEVYKDYLDPVYKEGDLQTIQQPIDFFGFNYSTAT	300
N222S/G226E	RKWDGFMNRWFLDPVFKGQYPADMLEVYKDYLDPVYKEGDLQTIQQPIDFFGFNYSTAT	300

WT	LKDWKTDGREPIVFEHVSTGRPVTDMNWEVNPNGLFDLMVRLKKDYGDIPLYITENGAAY	360
N222S	LKDWKTDGREPIVFEHVSTGRPVTDMNWEVNPNGLFDLMVRLKKDYGDIPLYITENGAAY	360
N222S/G226E	LKDWKTDGREPIVFEHVSTGRPVTDMNWEVNPNGLFDLMVRLKKDYGDIPLYITENGAAY	360

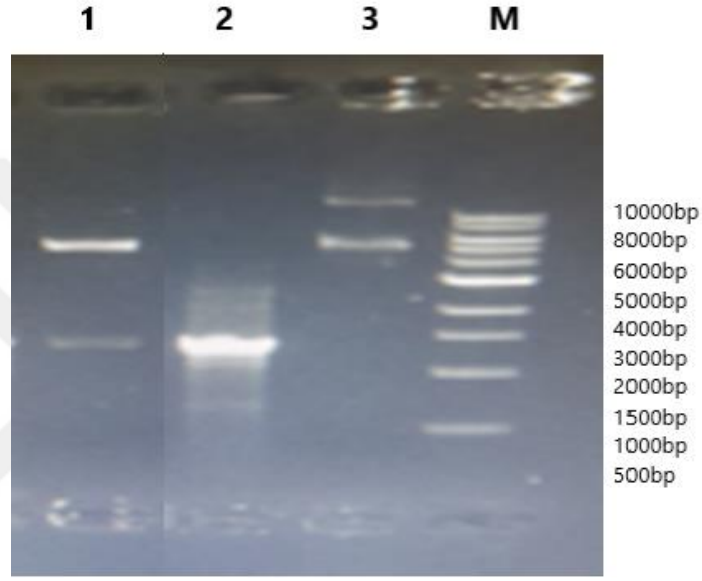
WT	KDRVNEQGEVEDDERVAYIREHLIACHRAIEQGVNLKGYVWSLFDNFEWAFGYDKRFGI	420
N222S	KDRVNEQGEVEDDERVAYIREHLIACHRAIEQGVNLKGYVWSLFDNFEWAFGYDKRFGI	420
N222S/G226E	KDRVNEQGEVEDDERVAYIREHLIACHRAIEQGVNLKGYVWSLFDNFEWAFGYDKRFGI	420

WT	VYVDYETLERIPKKSALWYKETIINNGLQVDNDKKLAAALE*----- 461	
N222S	VYVDYETLERIPKKSALWYKETIINNGLQVDNDKKLAAALEHHHHHH* 467	
N222S/G226E	VYVDYETLERIPKKSALWYKETIINNGLQVDNDKKLAAALEHHHHHH* 467	

Şekil 111. N222S, N222S/G226E mutantları ve yabantip β -glukozidazların Clustal Omega ile Hizalanması

3.4. *bglAy9* N222S/G226E Geninin pET28a (+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

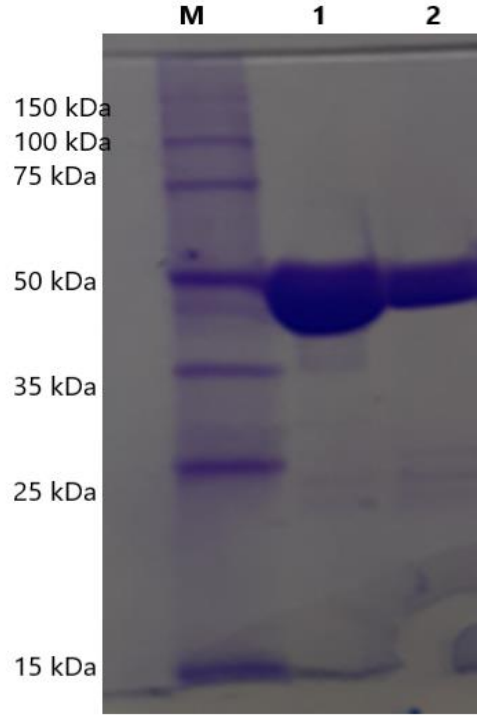
bglAy9 N222S/G226E-pET28a(+) klonunun *NcoI* ve *HindIII* enzimleri ile kesimi sonucunda yaklaşık 1365 bp'lık fragment elde edildi (Şekil 12).



Şekil 122. G226E β -glukozidazın pET28a (+) vektörü ile klonlanması. 2: β -glukozidaz PZR sonucu DNA fragmenti, 3: kesilmemiş *bglAy9* N222S/G226E-pET28a (+) klonu, M: Marker (N3232L).

3.5. *BglAy9* N222S/G226E Enziminin SDS-PAGE Analizi

Ni-afinite kromatografi sonrası yaklaşık 54 kDa büyüklüğünde saf protein bandı tespit edildi (Şekil 13).

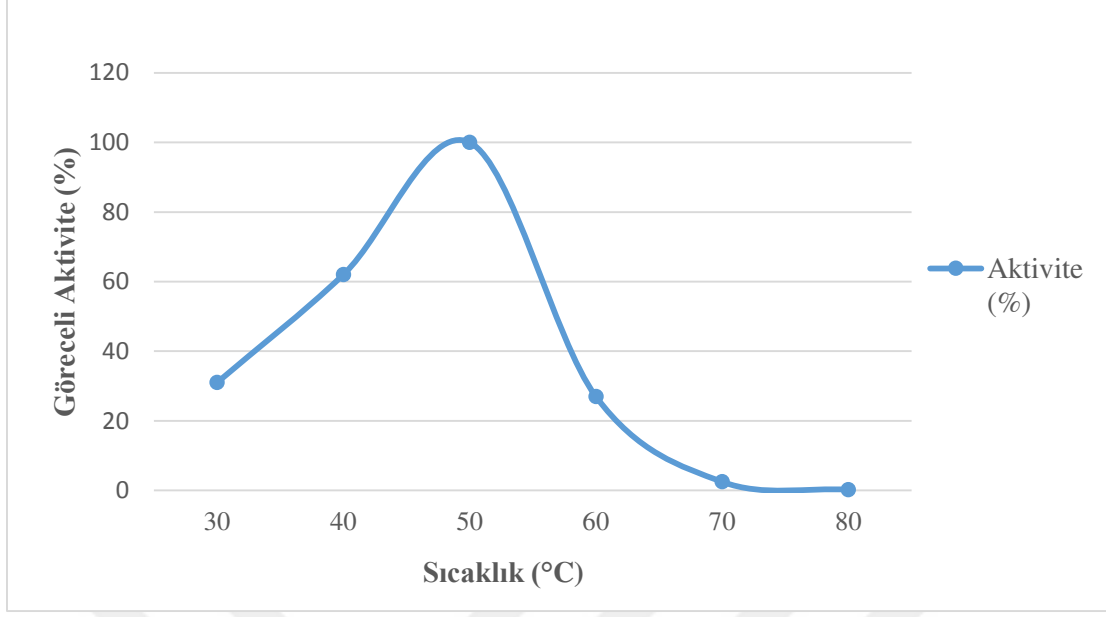


Şekil 13. Saf G226 β -Glukozidazın SDS-PAGE görüntüsü. M: Marker (V8491), 1. Fraksiyon, 2. Fraksiyon.

3.6. BglAy9 N222S/G226E Enziminin Karakterizasyonu

3.6.1. Optimum Sıcaklık

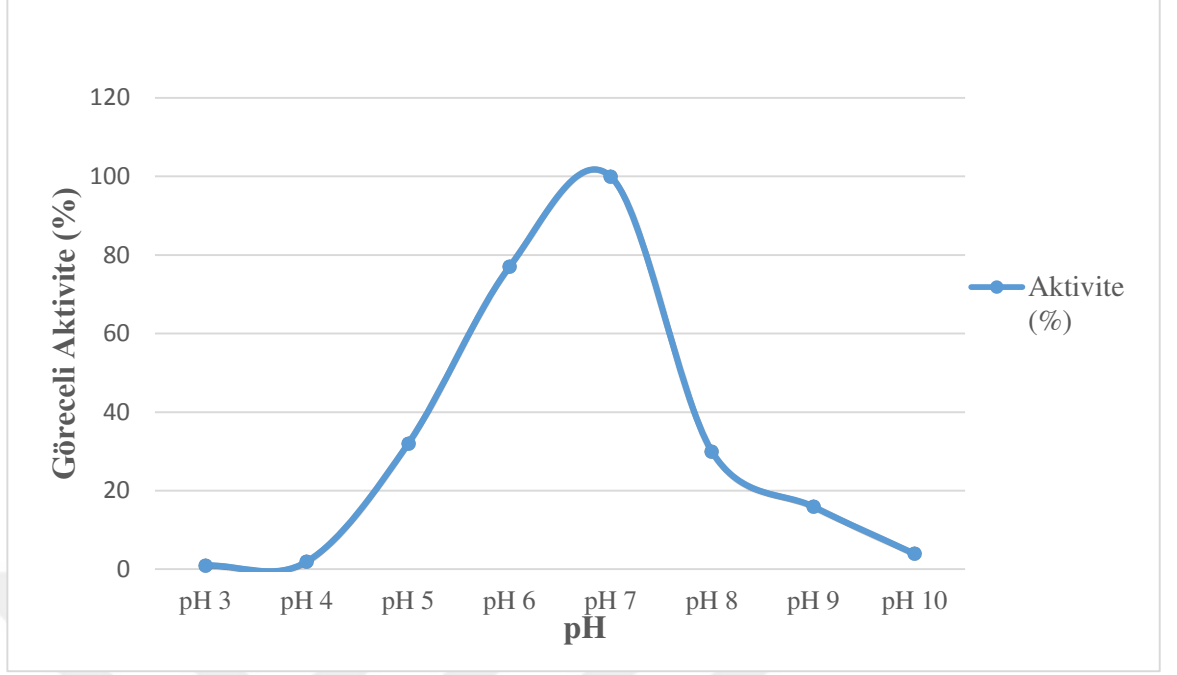
30, 40, 50, 60, 70 ve 80°C’de yapılan aktivite ölçümleri sonucu optimum sıcaklık grafiği oluşturuldu ve enzimin optimum sıcaklığı 50°C olarak belirlendi (Şekil 14).



Şekil 14. Enzimin optimum sıcaklık grafiği.

3.6.2. Optimum pH

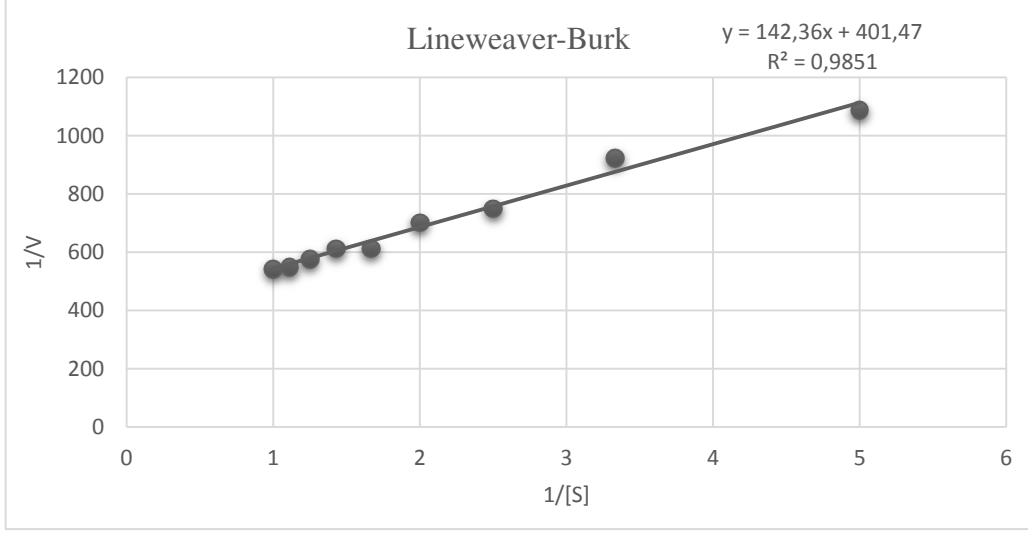
Enzim, pH 3.0 ve 10.0 aralığında sekiz farklı tamponla muamele edilip bir optimum pH grafiği oluşturuldu. İlgili enzimin en iyi aktiviteyi pH 7.0 tamponunda gösterdiği saptandı (Şekil 15).



Şekil 15. Enzimin optimum pH grafiği.

3.6.3. Enzim Kinetiği

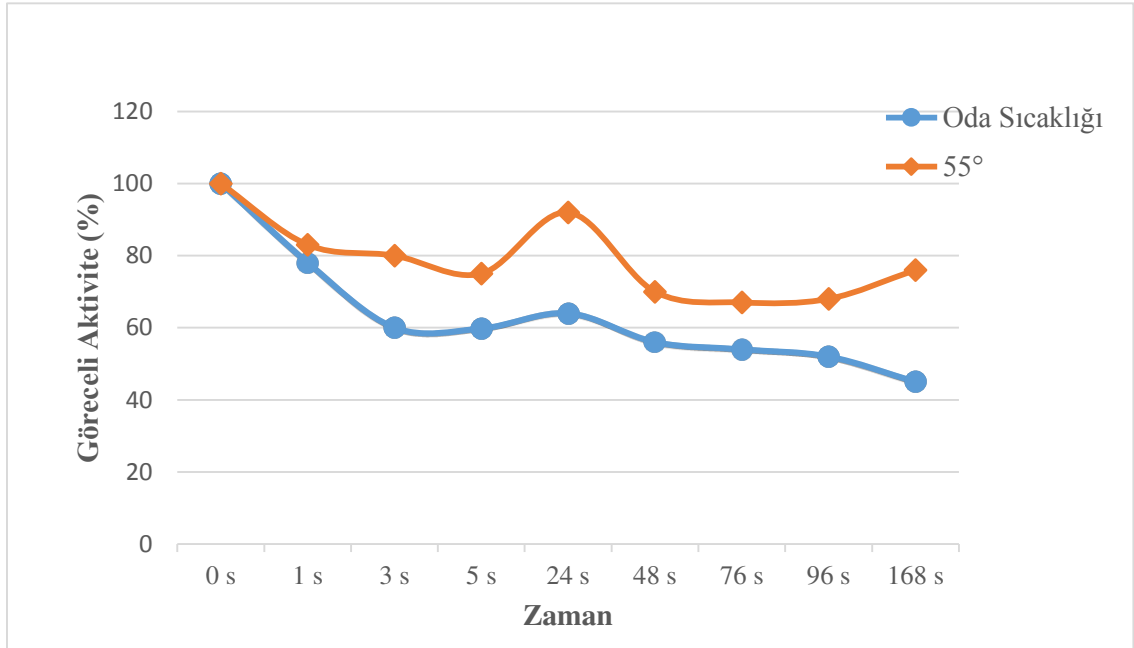
Enzimin K_m , V_{max} , k_{cat} ve K_m/k_{cat} değerleri sırasıyla 0,35 mM, 16,61 U/mg, 14,98 s⁻¹, 42,26 s⁻¹mM⁻¹ olarak belirlendi (Şekil 16).



Şekil 16. Enzimin Lineweaver-Burk grafiği.

3.6.4. Termal Kararlılık

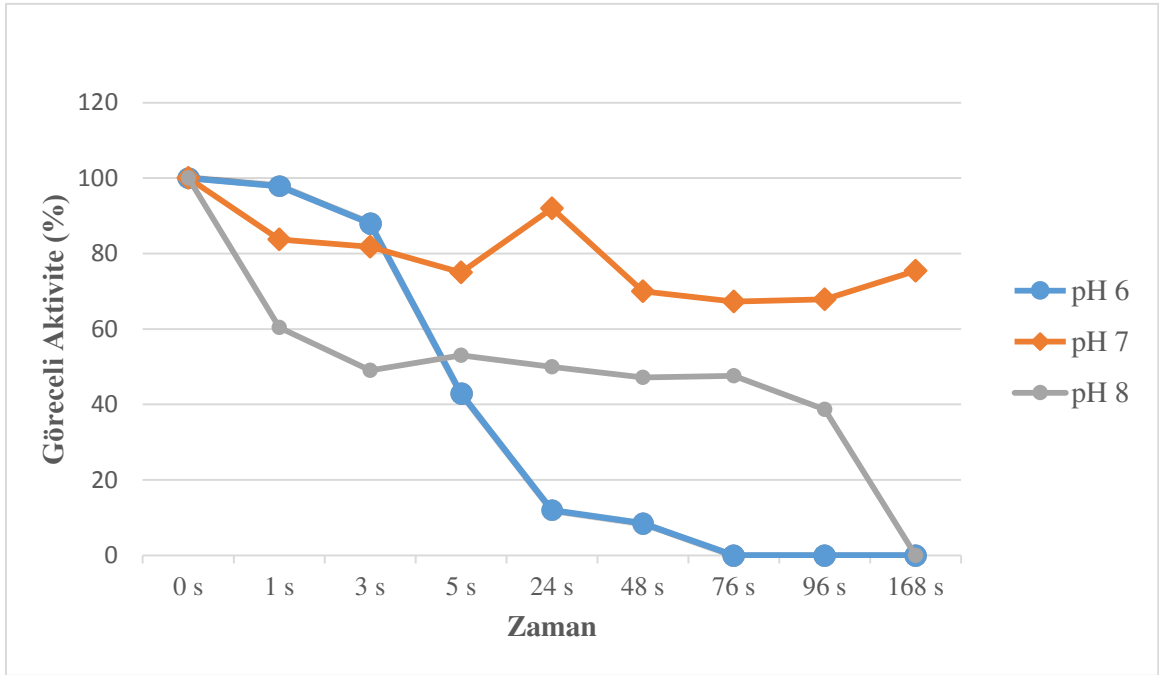
Enzimin 55°C ve oda sıcaklığında yapılan ölçümleri sonucunda termal kararlılık grafiği oluşturuldu. Grafiğe göre, enzimin aktivitesi oda sıcaklığında 168 saatte yarılandı ve 55°C’de 168 saat sonunda %30 azaldı (Şekil 17).



Şekil 17. Enzimin termal kararlılık grafiği.

3.6.5. pH Kararlılığı

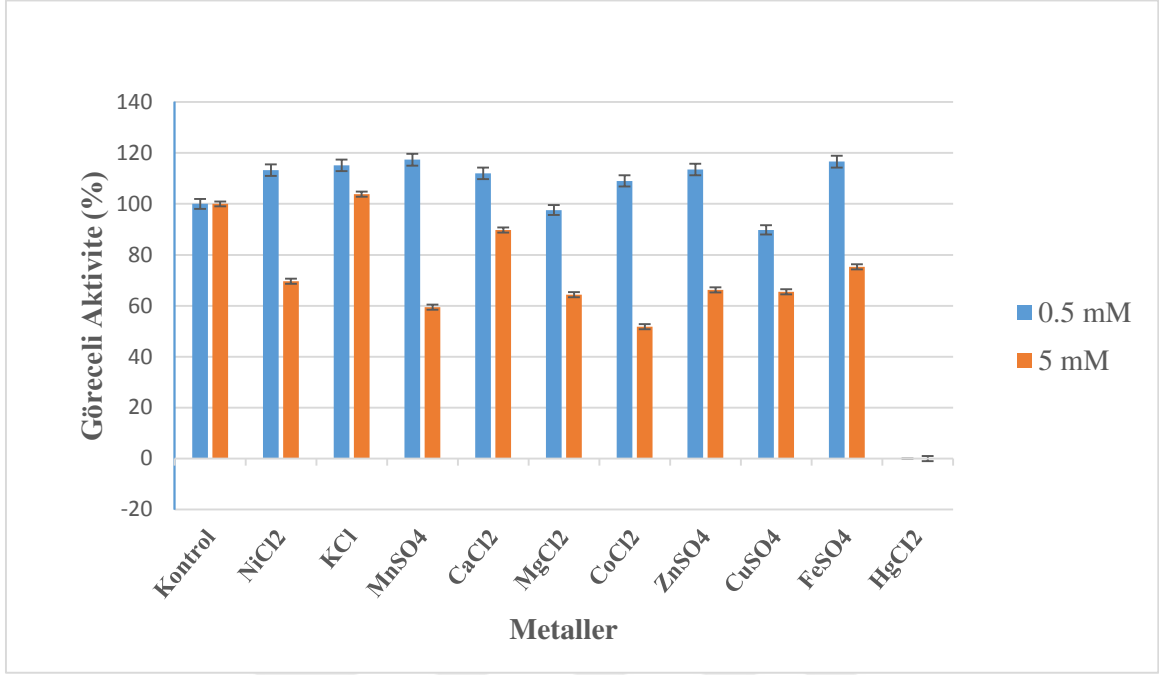
Oda sıcaklığında farklı pH aralığında yapılan ölçümler sonucunda enzimin pH 8’de 3 saatin sonunda aktivitesi yarılamış, 168 saatin sonunda ise enzim aktivitesini tamamını kaybetmiştir. pH 6’da ise enzim 5 saatin sonunda enzim aktivitesinin %50’sini, 76 saatin sonunda enzim aktivitesini tamamını kaybetmiştir. pH 7’de 168 saatin sonunda %60 oranının üzerinde aktivite göstermeye devam etmiştir (Şekil 18).



Şekil 18. Enzimin pH kararlılık grafiği.

3.6.6. Metal İyon Etkisi

0.5 ve 5 mM konsantrasyonda farklı metallerle yapılan deneyler sonucunda 0.5 mM metal konsantrasyonunun enzimin aktivitesini etkilemediği veya çok az etkilediği gözlenmiştir. 5 mM konsantrasyondaki K^+ iyonu enzim aktivitesinde önemli bir değişikliğe neden olmamıştır. Diğer iyonlar (5 M) ise %11 ile %49 arasında enzimde aktivite düşüşüne neden olmuştur. Hg^{+2} iyonu enzim aktivitesini tamamen inhibe etti (Şekil 19).



Şekil 19. Enzime metal iyonlarının etkisi grafiği.

3.6.7. Deterjanların, İnhibitörlerin ve Organik Çözücülerin Etkileri

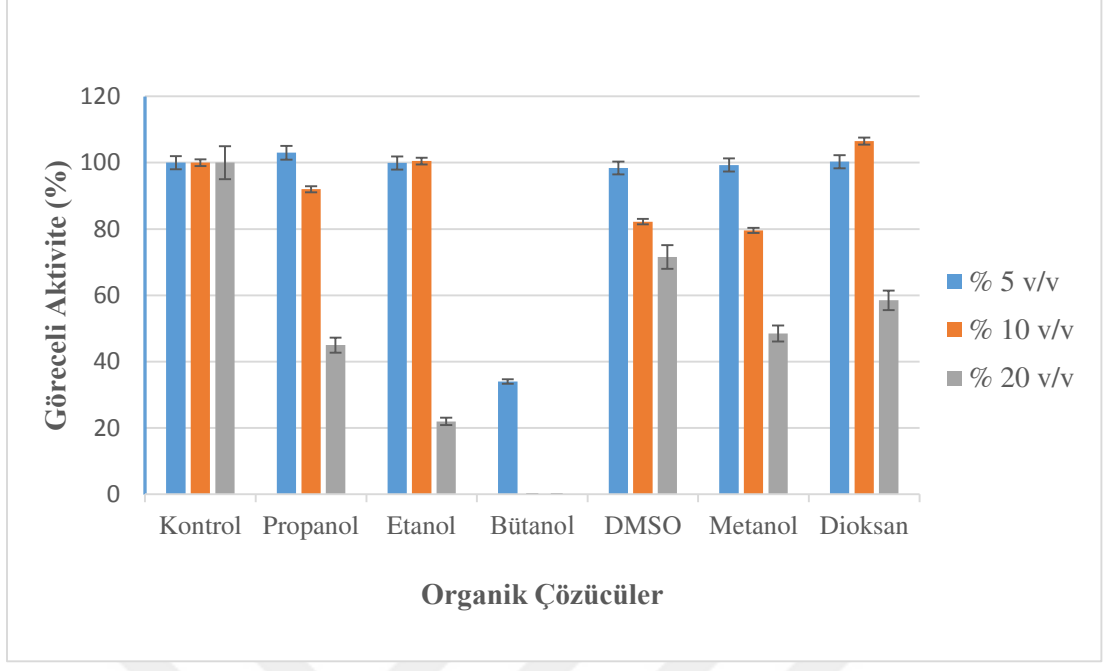
Enzim aktivitesini %1, %5 ve %10 deterjan konsantrasyonlarında ölçülerek grafik oluşturuldu. %1 Tween 20 enzim aktivitesinde %7'lik bir azalmaya neden olurken %5 ve %10 Tween 20 konsantrasyonu enzimin aktivitesinin tamamen kaybolmasına neden olmuştur. %1 Triton X-100 enzimin aktivitesinde %12'lik düşüşe neden olurken deterjan konsantrasyonunun artmasıyla sırasıyla %3 ve %9'luk enzim aktivitesi artışı gözlemlenmiştir. Enzim hiç bir SDS deterjanı konsantrasyonunda aktivite göstermemiştir (Şekil 20).



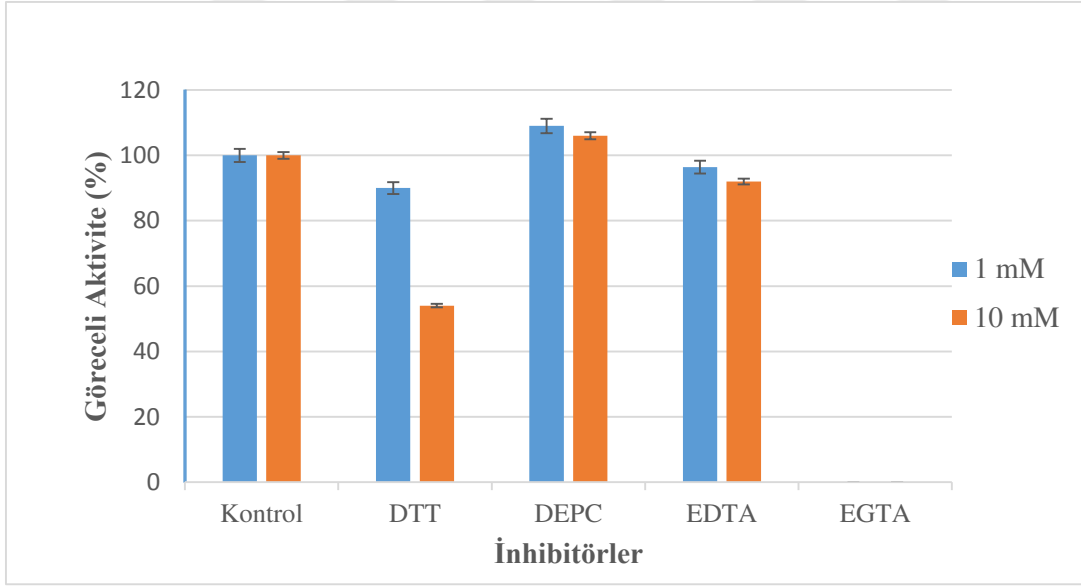
Şekil 20. Enzime deterjanların etkisi grafiği.

Organik çözücülerle %5, %10 ve %20 konsantrasyonda yapılan ölçümler sonucunda en fazla aktivite kaybı ortamda bütanol varlığında gerçekleşmiştir. Bütanolün ortamdaki %1'lik yoğunluğu enzimin aktivitesinde %66'lık bir aktivite kaybına neden olmuştur. Enzim bütanolün diğer konsantrasyonlarında aktivitesini tamamen kaybetmiştir. Ortamda %10 etanol veya diakson bulunması enzim aktivesinde değişikliğe neden olmamıştır. Kullanılmış olan tüm organik çözücülerin %20'lik konsantrasyonu enzimde aktivite kayıplarına neden olmuştur (Şekil 21).

1 mM ve 10 mM konsantrasyonda inhibitörlerle yapılan ölçümler sonucunda DEPC enzimde aktivite kaybına neden olmamıştır. EGTA ise enzim için güçlü bir inhibitör olup enzim ortamda EGTA varlığında hiç aktivite göstermemiştir. EDTA enzimde az miktarda da olsa aktivite kaybına neden olmuştur. 1 mM DTT %10, 10 mM %56 enzimde aktivite düşüşüne neden olmuştur (Şekil 22).



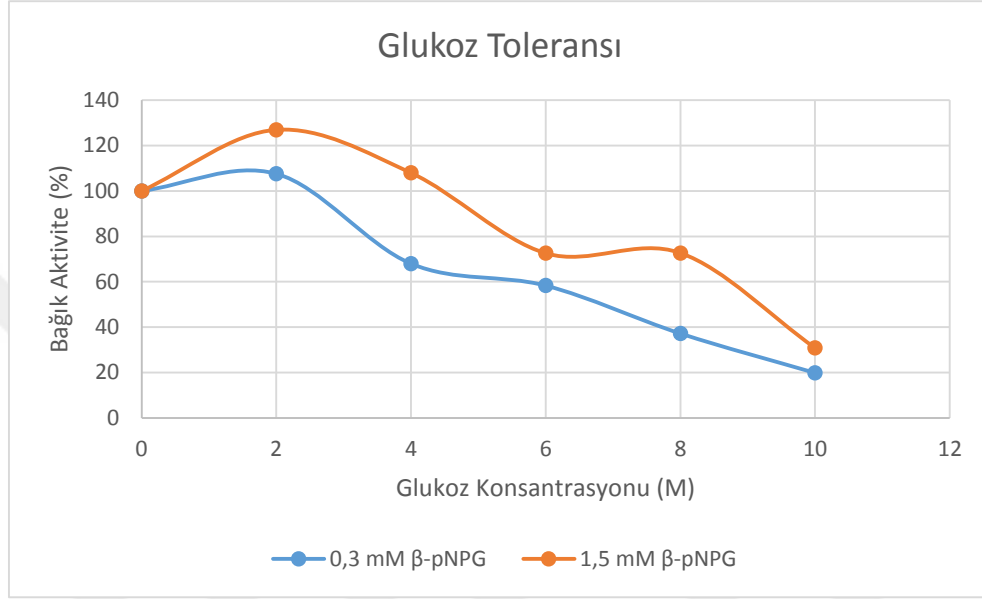
Şekil 22. Enzime organik çözücülerin etkisi grafiği.



Şekil 21. Enzime inhibitörlerin etkisi grafiği.

3.6.8. Glukoz Toleransı

Enzimin glukoz tolerans grafiği 1, 2, 4, 6, 8 ve 10 M glukoz varlığında 0,3 ve 1,5 mM p-NPG substrat kullanılarak oluşturuldu. Enzimin 10 M glukoz varlığında %80 aktivite gösterdiği belirlendi (şekil 23).



şekil 23. Enzimin glukoz toleransı grafiği.

4. TARTIŞMA

β -glukozidaz enzimi kullanım alanı çeşitliliğinden dolayı ensüstriyel ölçekte önemli bir enzimdir. Termofilik bakterilerin enzimleri, yüksek pH ve sıcaklıktaki kararlılıklarından dolayı biyoteknolojik çalışmalarda önemli yere sahiptir. Ek olarak, bu enzimlerin yapısal özelliklerini, pH ve sıcaklık kararlılığını, çeşitli inhibitörler ve organik çözücülere karşı kararlılığını, metal iyonlarına verdikleri tepkileri iyileştirmek amacıyla çeşitli mutasyon çalışmaları yapılmaktadır (Öz, 2016). Örneğin, *Paenibacillus polymyxa* β -glukozidazında yapılan farklı mutasyonlarda enzimin glukoza olan toleransı arttığı gözlemlenmiştir (Yang vd., 2015; Liu vd., 2011). Mutasyon çalışmalarından her zaman olumlu sonuçlar alınmasa bile mutasyon yapılan bölgenin enzimin işlevindeki etkisini anlamak açısından son derece önemlidir.

GH1 ailesi β -glukozidazları aktif bölgesi -1, +1 ve +2 alt bölgelerinden oluşur. Farklı inhibitörlerle yapılan çalışmalarda -1 alt bölgesinin şeker seçimi için önemli olduğu anlaşılmıştır. -1 alt bölgesinin korunmuş rezidüleri Q19, H120, N164, E409, W402, W410'dur. Substratın aglikon kısmı +1 ve +2 alt bölgeleri büyük ölçüde yerleşir. +1 alt bölgesinin korunmuş dizileri W34, F37, W121, N164, A411, F418'dir. 1 ve +1 alt bölgeler yüksek oranda korunmuş rezidülere sahip olmasından dolayı bu bölgede yapılan mutasyonlar β -glukozidaz aktivitesini kolaylıkla değiştirebilir. +2 alt bölgesi ise aktif bölge kanalının önünde veya alt yüzünde bulunur ve *Anoxybacillus ayderensis* Ay9 bu bölgede korunmamış L221, N222, L223, T224, P225, G226, Y227 rezidüleri içerir. GH1 β -glukozidazlarında bu amino asitlerin değişkenliği, aktif bölgede ilgili rezidülerin daha fazla substratı barındırmak için varsayılan mutasyon bölgeleri olabileceğini gösterir (Zada vd., 2021).

BglAy9 WT pNPG substratıyla yapılan çalışmada enzim maksimum aktivitesini 50°C'de göstermiştir (Zada vd., 2021). Karadeniz Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarında *Anoxybacillus ayderensis* Ay9 β -glukozidazının N222S (BglAy9 N222S) mutasyonlu yayınlanmamış çalışmada BglAy9 N222S maksimum aktiviteyi 60°C'de göstermişken diğer mutantların optimum sıcaklığı yaban tiple aynıdır. BglAy9 N222S/G226E optimum sıcaklığı 50°C olarak belirlenmiştir. Yabani tip ve mutantların termal olarak kararlı oldukları belirlendi. BglAy9 WT enzim 50°C'de 24 saat sonunda aktivitesinin yarısını korumuştur BglAy9 N222S 50°C'de termostabilitesinde

önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. BglAy9 N222S/G226E 168 saatin sonunda dahi aktivitesinin %50'den fazlasını korumuştur. Bu durum, BglAy9 N222S/G226E'nin diğer β -glukozidazlara kıyasla termostabilitesinin daha yüksek olduğunu göstermektedir. Örneğin *Scytalidium thermophilum* β -glukozidazı yarı aktivitesine 20. dakikada ulaşmıştır (Zada vd., 2021).

BglAy9 WT maksimum aktivitesini pH 8'de göstermiştir (Zada vd., 2021). Mutantların optimum pH değeri 7'dir. BglAy9 WT pH 7 ile pH 10 arasında aktivitesinin %80'den fazlasını korumuştur (Zada vd., 2021). BglAy9 N222S BglAy9 WT ile benzer pH stabilite profiline sahiptir. BglAy9 N222S/G226E pH 7'de aktivitesinin %60'dan fazlasını korumuştur.

Proteinlere yüksek afiniteyle bağlanma eğiliminde olan metal iyonları, spesifik bölgelerde negatif yüklü aminoasitleri bağlarlar. Genellikle ağır metaller sülfhidril, karbonil ve karboksil grupları birbirine bağlayarak enzim aktivitesinin artmasında veya azalmasında önemli rol oynarlar (Kaçıran, 2020). K^+ (5 M) iyonu BglAy9 N222S/G226E enziminin aktivitesinde önemli bir değişikliğe olmamıştır. Benzer şekilde K^+ (10 M) iyonu *Bacillus licheniformis*'in enzim aktivitesinde değişikliğe neden olmamıştır (Chen v., 2017). Zn^{2+} (10 M) *Bacillus licheniformis*'in aktivitesinde %25 aktivite artışına neden olurken Zn^{2+} (0.5 M) BglAy9 N222S/G226E enziminin aktivitesinde %13 artışa neden olmuştur. Zn^{2+} (5 M) olması durumunda ise %33 aktivite kaybına neden olmuştur. Mg^{2+} (10 M) *Bacillus licheniformis*'in aktivitesinde %25 aktivite artışına neden olurken 0.5 M Mg^{2+} BglAy9N222S/G226E enziminin aktivitesinde değişikliğe neden olmamıştır. 5 M Mg^{2+} %35 aktivite kaybına neden olmuştur. Mn^{2+} (10 M) *Bacillus licheniformis*'in aktivitesinde %40 ciddi bir aktivite artışına neden olurken BglAy9 N222S/G226E 0.5 M'da %20 artışa, 5 M'da %40 aktivite kaybına neden olmuştur. BglAy9 N222S/G226E enzimi Cu^{2+} 0.5 M'da %10 aktivite, 5 M'da %35 aktivite kaybına neden olmuştur. BglAy9 N222S/G226E enzimi Ca^{2+} 0.5 M'da %10 aktivite artışına neden olurken 5 M'da %10 aktivite kaybına neden olmuştur. *Bacillus licheniformis* Cu^{2+} (10 M) ve Ca^{2+} (10 M) iyonları varlığında aktivitesi büyük oranda azalmıştır (sırasıyla %40, %20) (Chen v., 2017). BglAy9 WT ve ilgili mutantların hepsi ortamda Hg^{+2} varlığında aktivitelerini tamamını kaybetti. $HgCl_2$ enzimi inhibe etmesi sülfhidril grubun ve sisteinin etkileşiminden kaynaklı olabilir (Zada vd, 2021).

Költre edilmemiş toprak mikroorganizmalarından elde edilen β -glukozidazların metal iyonu bağlanma bölgesi içermediği anlaşılmıştır (Jiang vd., 2011). *Talaromyces thermophilus* β -glukozidazını Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} metal iyonlarından etkilenmemiştir (Mallek-Fakhfakh ve Belghith, 2016). *Bacillus licheniformis*'in metal iyonları varlığında aktivitesindeki değişimler neticesinde enzimin aktif katalitik bölgesinin divalent metal iyonu bağlanma bölgesine sahip olduğu düşünülmektedir (Chen vd., 2017). Benzer şekilde BglAy9 N222S/G226E enziminin aktif katalitik bölgesinin divalent metal iyonu bağlanma bölgesine sahip olduğu düşünülmektedir.

Deterjanların enzimin üzerindeki etkisi kıyaslandığında SDS mutantlar ve yabancı tip için güçlü bir inhibitördür. BglAy9 WT, BglAy9 N222S Tween 20 deterjanından etkilenmemiş olmamalarına rağmen BglAy9 N222S/G226E enziminin aktivitesi %5 v/v ve %10 v/v Tween 20'de tamamen inaktive olmuştur. Deterjanlar, enzimin hidrofobik bölgeleriyle reaksiyona girerek enzimin 3 boyutlu yapısında değiştirerek enzimi inaktif edebilen amfifil moleküllerdir (Shoja ve Minai-Tehrani, 2021). Benzer şekilde sert bir anyonik deterjan olan SDS, enzimin hidrofobik kısımlarını etkilemesi ve üçüncü yapısında değişikliğe neden olması nedeniyle enzimi inaktive ettiği düşünülmektedir (Zada vd, 2021).

Organik çözücüler, muhtemelen enzimlerin esnekliğini azaltması ve dengesizleştirilmesi nedeniyle çoğu β -glukozidazın aktivitesinin düşmesine neden olurken BglAy9 WT test edilen organik çözücülerin %20 v/v konsantrasyonda %95'ten fazla enzim aktivitesini korudu (Zada vd, 2021). BglAy9 N222S/G226E bütanol varlığında büyük ölçüde inhibe olmuştur. BglAy9 N222S bütanolden etkilense de tamamen inhibe olmamış ve diğer organik çözücülere karşı aktivitesini korumuştur. BglAy9 WT ve BglAy9 N222S EGTA %20 v/v konsantrasyonda tamamen inhibe olurken BglAy9 N222S/G226E mutantı ortamda EGTA varlığında hiç aktivite göstermemiştir. BglAy9 WT ve ilgili mutantlar ortamda EDTA olmasından etkilenmemişlerdir. Bu durum BglAy9 WT ve ilgili mutantların bazı rapor edilen β -glukozidazlar gibi aktivasyon için kofaktörlere ihtiyacı olmadığını gösterir (Zada vd, 2021).

BglAy9 WT ve BglAy9 N222S/G226E enzimlerinin sentetik p-NPG substratı kullanılarak kinetik parametreleri hesaplandı. Sırasıyla K_m değerleri 0,28 ve 0,35 mM bulundu. Biyoteknolojide önemli yere sahip substratları etkileyen pek çok endüstriyel enzimlerin K_m değerinin 0,01 mM ile 100 mM arasında olduğu saptanmıştır (Öz, 2016).

BglAy9 N222S/G226E enzminin bu aralıkta K_m değerine sahip olması endüstriyel kullanıma uygun olabileceğinin göstergesidir.

Endüstriyel üretimde son ürün olan glukoz inhibisyona neden olabilmektedir. Bu nedenle kullanılan enzimlerin glukoz toleransının yüksek olması ürün verimliliği için son derece önemlidir. BglAy9 WT enzimi dikkat çekici şekilde glukoz toleransı yüksektir (Zada vd, 2021). BglAy9 N222S/G226E glukoz toleransı BglAy9 WT enzimi ile kıyaslandığında daha zayıf olduğu saptanmış olsada pek çok β -glukozidaza göre glukoz toleransı yüksektir.



5. SONUÇLAR

Karadeniz Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı'nda daha önceden izole edilmiş olan *Anoxybacillus ayderensis* Ay9 suşunun β -glukozidaz enzimi kolonlanmıştır. Yaban tip enzim ve mutasyona uğratılmış enzimler karakterize edilmiştir. Bu çalışmada, N222S mutasyonlu β -glukozidaza (*BglAy9* N222S) ikinci bir mutasyon yapmak amacıyla 226. rezüdüdeki glisin glutamik aside dönüştürüldü. *bglAy9* N222S-pEt28a(+) plazmiti kalıp olarak kullanıldı. Mutasyon oluşturmak için iki aşamalı üç farklı PZR gerçekleştirildi. 3.PZR sonu 1365 bp'lik fragment elde edildi. *bglAy9* N222S/G226E geni pGEM-T easy vektörüne klonlandı. Dizi sekanslandıktan sonra NCBI BLAST aracılığıyla genin β -glukozidaz kodlayan gen olduğu doğrulandı. Clustal aracı kullanılarak *bglAy9* WTve *bglAy9* N222S kıyaslanarak mutasyonun gerçekleştiği teyit edildi. Daha sonra enzimin bol miktarda elde edilebilmesi amacıyla, *bglAy9* N222S/G226E geni pET28a(+) vektörüne klonlandı. Genin sonuna eklemiş olduğumuz 6X histidin etiketi sayesinde proteinin Ni- Afinite kromatografisi ile saflaştırıldı. Elde edilen protein SDS-PAGE'de yürütüldü. Yaklaşık 54 kDa büyüklüğünde saf protein bandı tespit edildi. Ardından enzimin karakterizasyonu p-NPG substratıyla yapıldı.

Enzimin optimum sıcaklığı 50°C olarak belirlendi. En iyi aktiviteyi pH 7 tamponunda gösterdiği saptandı. Termal ve pH kararlı bir enzim olduğu anlaşıldı. Enzim SDS harici deterjanlarda aktivite göstermiş fakat yabani tipe benzer şekilde ortamda SDS deterjanı olması halinde aktivite göstermemiştir. Hg^{+2} iyonu enzim aktivitesini tamamen inhibe etsede diğer metal iyonlarına karşı kararlılığını korumuştur. Organik çözücülerle yapılan deneylerde enzim en fazla aktivite kaybını ortamda butanol varlığında olduğu gözlemlenmiştir. EGTA harici potansiyel inhibitörlere karşı kararlılığını korumuştur. Glukoza karşı toleransı bir enzimdir. Enzimin K_m , V_{max} , k_{cat} ve K_m/k_{cat} değerleri sırasıyla 0,35 mM, 16,61 U/mg, 14,98 s⁻¹, 42,26 s⁻¹mM⁻¹ olarak belirlendi. K_m 'si düşüktür bu nedenle enzimin kullanılan p-NPG substratına ilgisi olduğu anlaşılmıştır.

6. ÖNERİLER

- BglAy9 N222S/G226E başka yapay substratlara ve doğal substratlara karşı verimliliği incelenebilir.
- BglAy9 N222S/G226E mutantının substratlarına karşı antioksidan etkisi incelenebilir.
- Enzime üçüncü bir mutasyon yapılarak enzime olan etkisi inlenebilir.

7. KAYNAKLAR

- Acar M., 2013. Mandalina (*Citrus Reticulata*) Meyvesinden Maflaştırılan Beta-glukozidaz Enziminin Nanopartiküllere Immobilizasyonu ve Meyve Suyu Aroma Arttırma Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.
- Ay F., Karaoglu H., İnan K., Çanakçı S., Beldüz A. O., 2011. Cloning, Purification and Characterization of a Thermostable Carboxylesterase from *Anoxybacillus sp.* PDF1., Protein Expression and Purification, 80, 74–79.
- Ayaz A., Yurttagül M., 2008. Besinlerdeki Toksik Öğeler-1, Klasmat Matbaacılık, Ankara, 32s.
- 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.
- Beldüz A. O., Çanakçı S., Chan K.G., Kahar U. M., Chan C. S., Yaakop A. S., Goh K. M., 2015. Genome Sequence of *Anoxybacillus ayderensis* AB04^T Isolated from Ayder Hot Spring in Turkey, Standarts in Genomic Sciences, 10.
- Bhat M. K. ve Bhat S., 1997. Cellulose Degrading Enzymes and Their Potential Industrial Applications, Biotechnology Advances, 15, 583-620.
- Bhatia Y., Mishra S., Bisaria V.S. 2002. Microbial β -Glucosidases: Cloning, Properties, and Applications, Critical Reviews in Biotechnology 22, 4, 375-407.
- Be'guin P., Molecular Biology of Cellulose Degradation, 1990. Annual Review of Medicine, 44, 219–248.
- Beriş F. Ş., De Smet L., Karaoglu H., Çanakçı S., Van Beeumen J., Beldüz A. O., 2011. The ATPase Activity of the G2alt Gene Encoding an Aluminium Tolerance Protein from *Anoxybacillus gonensis* G2, The Journal of Microbiology, 49, 641-650.
- Beutler E., Gaucher's Disease, 1991. The New England Journal of Medicine, 325, 1354-1360.
- Bolton D.J., Kelly C.T., Fogarty W.M. 1997. Purification and Characterization of the α -amylase of *Bacillus flavothermus*, Enzyme and Microbial Technology, 20, 340-343.
- Brady R. O., 2006. Enzyme Replacement for Lysosomal Diseases , Annual Review of Medicine, 57, 283-296.
- Butters T. D., 2007. Gaucher Disease, Current Opinion in Chemical Biology, 11, 4 , 412-418.

- 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, D233–D238.
- Chai Y.Y., Rahman R. N. Z. R. A., Illias R.M., Goh K.M., 2021. 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, 731–741.
- 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 biofloculant degradation, Amb Ekpress, 197, 1-7.
- Conn E.E., 1993. β -glucosidase in Plants, Substrate Specificity, American Chemical Society, Washington D. C.
- Czjzek M, Çicek M., Zamboni V., Bevan D.R. , Henrissat B., and 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 – Dhuririn Complexes, PNAS, 13555-13560.
- Çanakçı S., Kacagan M., İnan K., Beldüz A. O., Saha B. C., 2008. Cloning, Purification, and Characterization of a Thermostable α -L-arabinofuranosidase from *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26Sari., Applied Microbiology and Biotechnology, 61–68.
- D’Souza D. R., Morgan R. D., Parashar V., Capalash N., Sharma P., 2004. Characterization of BfII—a Thermostable, Co⁺⁺-requiring Isoschizomer of BsiYI from *Anoxybacillus flavithermus*., World Journal of Microbiology and Biotechnology, 20, 593-598.
- Davies G. ve Henrissat B., 1995. Structures and Mechanisms of Glycosyl Hydrolases, Structure, 3, 858–859.
- Dharmawardhana D. P., Ellis B. E., Carlson J. E., 1995. A [beta]-glucosidase from Lodgpole Pine Xylem Specific for the Lignin Precursor Coniferin, Plant Physiol, 107, 2, 331-339.
- Dülger S., Demirbağ Z., Beldüz A.O., 2004. *Anoxybacillus ayderensis* sp. nov. and *Anoxybacillus kestanbolensis* sp. nov., International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54, 1499-1503.
- Ertunga N. S., Çolak A., Beldüz A. O., Çanakçı S., Karaoglu H., Sandalli C., 2007. Cloning, Expression, Purification and Characterization of Fructose-1,6-bisphosphate Aldolase From *Anoxybacillus gonensis* G2., The Journal of Biochemistry, 141, 817-825.
- Esen A., 1993. β -Glucosidases Biochemistry and Molecular Biology, Acs Symposium Series, American Chemical Society, Washington. D.C.
- Esen A., 2002. β -Glucosidase, Handbook of Food Enzymology, edt: J. R. Whitaker, A. G. J. Voragen ve D. W. S. Wong, 774-786, Marcer Dekkel, New York.

- Esen A., Cairns J. K., 2010. β -Glucosidases, Cellular and Molecular Life Sciences, 67, 20, 3389–3405.
- Fowler T., 1993. Deletion of the *Trichoderma reesei* b-glucosidase gene, bgl1, Biochemistry and Molecular Biology, Acs Symposium Series, American Chemical Society, Washington. D.C., 56-65.
- Gemici-Palabıyık B., 2004. Bitki Genlerinin *Schizosaccharomyces pombe*'de anlatımı, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Gibsons N.E. ve Murray R.G. E., 1978. Proposals Concerning the Higher Taxa of Bacteria, Internatioanal Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 28, 1, 1-6.
- Goh K. M., Kahar M. U., Chai Y. Y., Chong C. S., Chai K. P., Ranjani V., Illias R. , Chan K.G., 2013. Recent Discoveries and applications of *Anoxybacillus*, Applied Microbiology and Biotechnology, 97, 1475-1488.
- Gueguen Y., Chemardin S. P., Arnaud A., Galzy P., 1998. Investigation of β -glucosidases Potentialities of Yeast Strains and Application to Bound Aromatic Terpenols Liberation, Studies in Organic Chemistry, 53, 149-157.
- Guo B., Amano Y., Nozaki K. 2016. Improvements in Glucose Sensitivity and Stability of *Trichoderma reesei* β -Glucosidase Using Site-Directed Mutagenesis, Plos One, 20, 1-12.
- Giuseppe, P. O., Souza, T. D. A., Souza, F. H. M., Zanthorlin, L. M., Machado, C. B., Ward, R. J. and Murakami, M. T. 2014. Structural Basis for Glucose Tolerance in GH1 β -glucosidases, Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 70, 6, 1631-1639.
- Gübitz, G. and Paulo, A., 2003. New Substrates for Reliable Enzymes: Enzymatic Modification of Polymers, Current opinion in biotechnology, 14, 6, 577–582.
- Han Y. J., Cho K. C., Hwang O.J., Choi Y. S., Shin A. S., Hwang I., Kim J. I., 2012. Overexpression of an *Arabidopsis* β -glucosidase Gene Enhances Drought Resistance with Dwarf Phenotype in Creeping Bentgrass, Plant Cell Reports, 31, 1677–1686.
- Harhangi H.R., Steenbakkens P. J. M., Akhmanova A., Jetten M. S. M., van der Drift C., Op den Camp H. J. M., 2002. A Highly Expressed Family 1 β -glucosidase with Transglycosylation Capacity from The Anaerobic fungus *Piromyces* sp. E2., Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression, 1574, 293–303.
- Henrissat B., Driguez H., Viet C., Schülein M., 1985. Synergism of Cellulases from *Trichoderma reesei* in the Degradation of Cellulose, Bio technology, 3, 722-726.

- Henrissat B., 1991. A classification of Glycosyl Hydrolases Based on Amino Acid Sequence Similarities, Biochemical Journal, 28, 309-316.
- Henrissat B., ve Bairoch A., 1996. Updating the Sequence-based Classification of Glycosyl Hydrolases , Biochemical Journal, 316, 695-696.
- Henrissat B. ve Davies G., 1997. Structural and Sequencebased Classification of Glycoside Hydrolases, Current Opinion in Structural Biology, 7, 637-644.
- Henrissat B. ve Davies G. J., 2000. Glycoside Hydrolases and Glycosyltransferases. Families, Modules, and Implications for Genomics, Plant Physiology, 124, 1515-1519.
- Hösel W., 1993. Glycosylation and Glycosidases, American Chemical Society, Washington D. C.
- Izumi T., Piskula, M. K., Osawa S., Obata A., Tobe K., Saito M., Kataoka S., Kubota Y., Kikuchi M., 2000. Soy Isoflavone Aglycones are Absorbed Faster and in Higher Amounts than Their Glucosides in Humans, The Journal of Nutrition, 130, 7, 1695-1699.
- Jiang C., Li S. X., Luo F. F., Jin K., Wang Q., Hao Z. Y., Wu L. L., Zhao G. C., Ma G. F., 2011. Shen P.H., Biochemical Characterization of Two Novel β -glucosidase Genes by Metagenome expression cloning, Bioresource Technology, 102, 3, 3272-3278.
- Kacagan M., Çanakci S., Sandallı C., İnan K., Çolak D. N., Beldüz A. O., 2008. Characterization of a Xylanase from a Thermophilic Strain of *Anoxybacillus pushchinoensis* A8, Biologia, 63, 5, 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, Trabzon.
- Kaiser E. T. ve Lawrence D. S., 1984. Chemical Mutation of Enzyme Active Sites, Science, 126, 505-511.
- 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, 1-15.
- Kikani B. A. ve Singh S.P., 2012. 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, 1791-1798.

- 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.
- Koffi Y. G., Konan H. K., 2012. Eugène N'guessan Kouadio J. P., Dabonné S., Dué E. A., Kouamé L. P. Purification and biochemical characterization of beta-glucosidase from cockroach, *Periplaneta americana*, Journal of Animal & Plant Sciences, 13, 2, 1747-1757.
- Krisch J., Tako M., Papp T., Vagvolgyi C., 2010. Characteristics and Potential Use of β -Glucosidases from Zygomycetes, Current Research Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, Antonio Mende-Vilas, 2, 891-896.
- Leah R., Kigel J., Svendsen I., Mundy J., 1995. Biochemical and Molecular Characterization of a Barley Seed Beta-glucosidase, Journal of Biological Chemistry, 270, 15789–15797.
- Li D., Li X., Dang W., Tran P. L., Park S. H., Oh B., Hong W., Lee J., Park K., 2013. Characterization and Application of an Acidophilic and Thermostable β -glucosidase from *Thermophilum pendens*, Journal of Bioscience and Bioengineering, 115, 5, 490-496.
- Li Y., Zhu Y., Liu A., Sun Y., 2011. Identification and Characterization of a novel L-arabinose Isomerase from *Anoxybacillus flavithermus* useful in D-tagatose production, Extremophiles, 15, 441–450.
- Lima L. H. F., Fernandez-Quintéro M. L., Rocha R. E. O, Mariano D. C. B., Melo-Minardi R. D., Lied K. R. L., 2011. 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.
- Mallek-Fakhfakh H. ve Belghith H., 2016. Physicochemical Properties of Thermotolerant Extracellular β -glucosidase from *Talaromyces thermophilus* and Enzymatic Synthesis of Cello-oligosaccharides, Carbohydrate Research, 419 , 41-50.
- Mandic-Mulec I., Stefanic P., Elsas J. D. V, 2015. Ecology of Bacillaceae, Microbiology Spectrum
- Marazza J. A., Garro M. S., Savoy de Giori G., 2009. Aglycone Production by *Lactobacillus rhamnosus* CRL981 During Soymilk Fermentation, Food Microbiology, 26, 3, 333-339.
- Mcdonald, A. G., Boyce, S. And Tipon, K. F., 2009, Explorenz: The Primary Source Of The IUBMB Enzyme List, Nucleic Acids Research, 37, 593-597.
- Meleiro L. P., Salgado J. C. S., Maldonado R. F. , Carli S. , Luiz Alberto Beraldo Moraes L. A. B., Ward R. J. , Jorge J. A. , Furriel R. P. M., 2017. Engineering the GH1 β -

glucosidase from *Humicola insolens*: Insights on the stimulation of activity by glucose and xylose, Plos One.

- Opassiri R., Hua Y., Wara-Aswapati O., Akiyama T., Svasti J. Esen A. Cairns J. R. K., 2004. Beta-Glucosidase, Exo-beta-glucanase and Pyridoxine Transglucosylase Activities of Rice Bglu1, Biochemical Journal Molecular Mechanisms in Biology, 379, 1, 125–131.
- Öz F., 2016. Termofilik *Geobacillus caldxylosilyticus* TK4 Rekombinant Fosfotriesteraz Homolog Proteininin Mutasyonla Bazı Özelliklerinin Geliştirilmesi, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Paul S. C., Jain P., Mitra J., Dutta S., Bhattacharya P., Bal B., Bhattacharyya D., Gupta S. D., Pal P., 2012. Induction of Cr(VI) Reduction Activity in an *Anoxybacillus* Strain Under Heat Stress: a Biochemical and Proteomic Study, FEMS Microbiology Letters, 331, 1, 70–80.
- Pikuta E., Lysenko A., Chuvilskaya N., Mendrock U., Hippe H., Suzina N., Nikitin D., Osipov G., Laurinavichius K., 2000. *Anoxybacillus pushchinensis* gen. nov., sp. nov., a Novel Anaerobic, Alkaliphilic, Moderately Thermophilic Bacterium from Manure, and Description of *Anoxybacillus flavithermus* comb. nov., International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50, 2109–2117.
- Pikuta E., Lysenko A., Chuvilskaya N., Mendrock U., Hippe H., Suzina N., Nikitin D., Osipov G., Laurinavichius K., Cleland, Tang, 2009. The *Firmicutes*, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Paul Vos, George Garrity, Dorothy Jones, Noel R. Krieg, Wolfgang Ludwig, Fred A. Rainey, Karl-Heinz Schleifer, William B. Whitman, İkinci Baskı, New York.
- Raychaudhuri A. ve Tipton P. A., 2003. A Familiar Motif in a New Context: The Catalytic Mechanism of Hydroxyisourate Hydrolase, Biochemistry 42, 6848–6852.
- Saha B. C. ve Bothast R. J., Production, 1996. Purification, and Characterization of a Highly Glucose Tolerant Novel β -Glucosidase from *Candida peltata*, Applied and Environmental Microbiology, 3165- 3170.
- Sanz-Aparicio J., Hormoso J.A., Martinez-Ripoll M., Lequerica J., 1998. Crystal Structure of β -glucosidase A from *Bacillus polymyxa*: Insights in to the Catalytic Activity in Family1 Glycosyl Hydrolases, Journal of Molecular Biology, 275, 491-502.
- Sargın S., Öngen G., Tetik D., Köse T., 2005. Sofralık Yeşil Zeytin İşlemede β -Glukozidaz Enziminin Kullanımı The Use Of β -Glucosidase Enzyme In Green Table Olive Processing, Mandıra Kongresi, İzmir.
- Schmidt T. R., J Scott E. J., Dyer D., 2011. Whole-genome Phylogenies of the Family Bacillaceae and Expansion of the Sigma Factor Gene Family in The *Bacillus cereus* Species-group, Bmc Genomics, 12,1, 1-17.

- Shoja M. ve Minai-Tehrani D., 2021. Effect of Tween Type Non-Ionic Detergent on the Activity of Lipase of *Pseudomonas aeruginosa*, Cell Biochemistry and Biophysics, 79, 87–92.
- Singh G., Verma A.K., Kumar V., 2015. 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., 2017. Genetic Modification: A Tool for Enhancing Beta-glucosidase Production for Biofuel Application, Biosource Technology, 245, 1352-1361.
- Skerman V.B.D., McGowan V., Sneath P. H. A., 1989. Approved Lists of Bacterial Names, ASM Press, Washington DC.
- Stotz H. U., Pittendrigh B. R., Kroymann J., Weniger, K., Fritsche J., Bauke A., Mitchell-Olds T., 2000. Induced Plant Defense Responses against Chewing Insects. Ethylene Signaling Reduces Resistance of Arabidopsis against Egyptian Cotton Worm But Not Diamondback Moth, Plant Physiology, 124, 3, 1007–1018.
- Su E., Xia T., Gao L., Dai Q., Zhang., 2010. Characteristics and Potential Use of β -glucosidases from Zygomycetes, Food and Bioproducts Processing, 88, 83-89.
- 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, 999–1015.
- Teeri T. T., 1997. Crystalline Cellulose Degradation: New Insight into the Function of Cellobiohydrolases, Trends in Biotechnology, 15, 160-167.
- Terra W. R. Ve Ferreira C., 1994. Insect Digestive Enzymes: Properties, Compartmentalization and Function Comparative, Biochemistry and Physiology, 109, 1-62.
- Turan Y., 2008. A Pseudo- β -glucosidase in *Arabidopsis thaliana*: Correction by Site-Directed Mutagenesis, Heterologous Expression, Purification, and Characterization, Biochemistry, 78, 912-919.
- Turner P., Labes A., Fridjónsson Ó. H., Hreggvidson G. O., Schönheit P., Kristjánsson J. K., Holst O., Karlsson E. N., 2005. Two Novel Cyclodextrin-degrading Enzymes Isolated From Thermophilic Bacteria have Similar Domain Structures but Differ in

Oligomeric State and Activity Profile, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100, 380-390.

URL-1 <https://iubmb.qmul.ac.uk/>, 2022

URL-2 <https://www.enzyme-database.org/query.php?ec=3.2.1.21>, 2022

- Voorhorst W. G. B., Eggen R. I. L., Luesink E. J., Devos W. M., 1995. Characterization of the celB Gene Coding for β -Glucosidase from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* and Its Expression and Site-Directed Mutation in *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, 177, 7105-7111.
- Wang J., Bai Y., Yang P., Shi P., Luo H., Meng K., Huang H., Yin J., Yao B., 2009. A New Xylanase From Thermoalkaline *Anoxybacillus* sp. E2 with High Activity and Stability Over a Broad PH Range, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 917-924.
- Wang Q.D., Trimbur R., Graham R., Warren R. A. J., Withers S. G., 1995. Identification of the Acid/base Catalyst in *Agrobacterium Faecalis* -glucosidase by Kinetic Analysis of Mutants, *Biochemistry* 34, 14554-14562.
- Wiesmann. C., Beste G., Hengstenberg W., Schulz G., 1995. The Three-dimensional Structure of 6-phospho- β -galaktosidaz from *Lactococcus lactis*, *Structure* 3, 9, 961-968.
- Withers S.G., Warren R. A. J., Street I.P., Rupitz K., Kempton J.B., Aebersold R., 1990. Unequivocal Demonstration of the Involvement of a Glutamate Residue as a Nucleophile in the Mechanism of a “Retaining” Glycosidase, *Journal of the American Chemical Society*, 112, 5887-5889.
- Withers S. G., Rupitz K., Trimbur D., Warren R. A. J., 1992. Mechanistic Consequences of Mutation of the Active Site Nucleophile Glu 358 in *Agrobacterium* β -Glucosidase, *Biochemistry* 31, 9979-9985.
- Xu Z., Escamilla-Treviño L., Zeng L., Lalgondar M., Bevan D., Winkel B., Mohamed A., Cheng C., Shih M., Poulton J., Asim Esen A., 2004. Functional Genomic Analysis of *Arabidopsis thaliana* Glycoside Hydrolase Family 1”, *Plant Molecular Biology*, 55, 343-367.
- Xue Y., Xue M., Xie F., Zhang M., Zhao H., Zhou T., 2021. Engineering *Thermotoga maritima* β -glucosidase for Improved Alkyl Glycosides Synthesis by Site-directed Mutagenesis, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 48, 1-11.
- Yang Y., Zhang X., Yin Q., Fang W., Fang Z., Wang X., Zhang X., Xiao Y., 2015. A Mechanism of Glucose Tolerance and Stimulation of GH1 β -glucosidases, *Scientific Reports*, 5, 1, 1-12 .

- Yang J., Wanga Q., Zhou Y., Li J., Gao R., Guo Z., 2017. Engineering *T. naphthophila* β -glucosidase for Enhanced Synthesis of Galactooligosaccharides by Site-directed Mutagenesis, Biochemical Engineering Journal, 127, 15, 1-8.
- 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., 2021. 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, 1898-1909.
- Zhang X., Fang Z., Fang W., Peng H., Xiao Y., 2011. The 184th Residue of β -glucosidase Bgl1B Plays an Important Role in Glucose Tolerance, Liu J., Journal of Bioscience and Bioengineering, 112, 5, 447-450.



8. EKLER

EK-1

N226S/G226E mutantının dizisi. Sarı altı çizili 6X His tagı, sarı G226E'yi, yeşil N222S'yi temsil ediyor.

GGTTTAGATTTTTATAAGCGTCTTGTACATGAATTGCTAGAGAACGGTATCGAGCCAAT
 GTTGACCATTTATCATTGGGATATGCCACAAGCTCTTCAAGAGAAAGGTGGCTGGGAA
 AATCGTGATATCGTTCACTACTTCCAAGAATACGCTGCTTTCCTTTACGAGAATCTTGG
 GGATGTCGTGAAAAAATGGATTACGCATAATGAGCCGTGGGTTGTCACCTATTTAGGA
 TATGGGAATGGCGAACATGCCCCAGGGATTCAAACTTTACATCATTTTTAAAAGCAG
 CACATCATGTTCTTCTCTCACACGGGGAAGCGGTAAAAGCGTTTCGAGCAATCGGTTC
 GAAAGATGGGGAAATTGGTATTACGTTGTCCTTTGACACCTGAAATATGCGGTCGATCCG
 AAAGATGAAAAAGCAGTTGATGCCGCTCGAAAAATGGGACGGCTTTATGAATCGTTGGT
 TTTTAGATCCTGTATTTAAGGGACAATATCCAGCAGATATGTTAGAAGTGTATAAAGA
 TTATTTACCAGACGTTTACAAAGAGGGAGATTTACAAACGATTCAGCAACCGATCGAC
 TTTTTCGGATTTAACTATTATTCAACAGCAACATTTAAAAGATTGGAAAACAGGTGACC
 GTGAACCGATCGTATTTGAACATGTGAGCACAGGAAGACCTGTGACGGATATGAATTG
 GGAAGTGAATCCAAACGGTTTGTGTTGATTTAATGGTGCGATTGAAAAAAGATTATGGC
 GATATTCATTATACATTACCGAAAACGGTGCTGCATACAAAGATCGCGTCAACGAAC
 AAGGTGAAGTAGAAGATGATGAGCGAGTTGCTTATATACGGGAGCATTTAATCGCTTG
 CCACCGCGCGATTGAACAAGGCGTCAATTTAAAAGGATATTATGTATGGTCGCTGTTC
 GATAATTTTGAGTGGGCATTTGGATATGATAAGCGCTTTGGGATTGTATACGTGGATTA
 TGAAACGCTAGAGCGCATCCCGAAAAAGAGTGCATTATGGTACAAGGAAACGATTAT
 AAACAACGGATTGCAAGTAGACAATGACAAAAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCA
 CCACCACCACCACTGA

Ek-2

N222S ve G226E mutasyonlarına sahip *Anoxybacillus ayderensis* kaynaklı β -glukozidazın gen ürünü 466 amino asittir ve C-terminalde 6X histidine etiketi içermektedir.

VLQFPKDFIWGAATSSYQIEGTATGEDKIYSIWDHFSRIPGKVANGDNGDIAIDHYNRYVE
DIALMKALHLKAYRFSTSWARLYCETPGKFNEKGLDFYKRLVHELLENGIEPMLTIYHWD
MPQALQEKGGWENRDIVHYFQEYAAFLYENLGDVVKKWITHNEPWVVTYLYGYNGEHA
PGIQNFTSFLKAAHHVLLSHGEAVKAFRAIGSKDGEIGITLSLTPLEYAVDPKDEKAVDAAR
KWDGFMNRWFLDPVFKGQYPADMLEVYKDYLDPVYKEGDLQTIQQPIDFFGFNYSTAT
LKDWKTGDREPIVFEHVSTGRPVTDMNWEVNPNGLFDLMVRLKKDYGDIPLYITENGAA
YKDRVNEQGEVEDDERVAYIREHLIACHRAIEQGVNLKGYVWSLFDNFEWAFGYDKRF
GIVYVDYETLERIPKKSALWYKETIINNGLQVDNDKKLAAALEHHHHHH

ÖZGEÇMİŞ

İlk ve orta eğitimini Borçka'da tamamladı. Liseyi Araklı Anadolu Öğretmen Lisesi'nde tamamladı. 2013 yılında İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümüne başladı. 2017 yılında lisans eğitimini tamamladı. 2018 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji'de yüksek lisans eğitimine başladı. 2019 yılının bahar döneminde Erasmus+ programına katıldı. Yüksek lisans derslerinin bir kısmını Çekya South Bohemia Üniversitesi'nde aldı. Yabancı dili İngilizce'dir.

