

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİOKİMYA ANABİLİM DALI

MİDYE MANTO DOKUSU β - GLUKOZİDAZİ

Yüksek Lisans Tezi

Eczacı Nurten ÖZSOY

Danışman: Prof. Dr. Hakan BERKKAN

44838

İSTANBUL - 1995

TEŞEKKÜR

Bu tezin konusunu veren ve tez çalıŐmalarımı özenle yöneten Sayın Prof. Dr. Hakan BERKKAN'a, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Nevzat ÖNER'e karşılaŐtıđım güçlüklerin giderilme-sinde değerli yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. İnci KUŐŐU'ya, deneylerin yapılması sırasında desteklerini gördüğüm Biokimya Anabilim Dalının diğer öğretim üyelerine içtenlikle teşekkür ederim.

Nurten ÖZSOY

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ	1
GEREÇ VE YÖNTEM	6
Midye Manto Dokusu β -glukozidazının Elde Edilmesi	7
Midye manto dokusu ham ekstresinden	
β -glukozidazı çöktüren uygun amonyum sülfat	
konsantrasyonunun belirlenmesi	7
Midye manto dokusu β -glukozidazının	
ekstraksiyonu ve % 40- % 60 amonyum sülfat	
kesitinin elde edilmesi	9
Hidroksilapatit kolon kromatografisi	10
β -glukozidaz Aktivitesinin Ölçülmesi	10
Aktivite deneyinin yapılışı	11
4-nitrofenol standart eğri denkleminin elde edilmesi	12
Protein Miktar Tayini	12
Belirteçler	12
Deneyin yapılışı	13
Sığır serum albumini standart eğri denkleminin	
elde edilmesi	13
Midye Manto dokusu β -glukozidazının Kinetik	
Özelliklerinin İncelenmesi	13
Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisinin incelenmesi	14
Enzim aktivitesi üzerine temperaturün etkisinin	
incelenmesi	14
Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun	
etkisinin incelenmesi	14
BULGULAR	16
TARTIŞMA	22
ÖZET	24
SUMMARY	25
KAYNAKLAR	26

GİRİŞ

Glikoproteinler yapılarında polipeptid zincirlerine kovalan bağlarla birleşmiş oligosakkarid zincirlerini içerirler. Biyolojik işlevleri bakımından büyük önem taşıyan glikoproteinler doğada yaygın olarak bulunurlar. İnsan organizmasında da çok farklı görevleri olan glikoproteinler vardır. Albumin dışında hemen hemen tümü glikoprotein olan plazma proteinlerinin bir kısmının kanda çözünmeyen maddelerin taşınmasında, bir kısmının kanın pıhtılaşmasında, bir kısmının ise bağışıklıkta rolleri vardır. Mukoza salgılarındaki glikoproteinlerin hem kayganlaştırıcı hem koruyucu etkileri bulunur. Birçok enzim, hormon, kan grubu maddeleri ile çeşitli dokuların yapısını oluşturan kollajen glikoprotein yapısındadır. Bundan başka glikoproteinler hücre zarlarının önemli bileşenleridir, burada hem taşıyıcı, hem reseptör olarak işlev görürler.

Glikoprotein molekülleri tüm bu önemli işlevlerine karşılık ancak 1969 yılından sonra araştırmacıların yoğun ilgi odağı haline gelmiştir. Burger ile Goldberg (1) ve Inbar ile Sachs (2) ilk defa hücre zarlarındaki glikoproteinlerin kanser hücrelerinde tamamen değişikliğe uğradığını saptamışlardır. Adı geçen araştırmacılar daha önce de, kanser hücrelerinin lektinler veya fitoaglutininler tarafından aglutinasyonlarında, normal hücrelere kıyasla, önemli farklılaşmalar meydana geldiği gözlenmiştir (3).

Glikoproteinlerin gerek yapıları gerek işlevleri çeşitli çalışmalar sonucunda büyük ölçüde aydınlatılmıştır. Glikoproteinlerin protein konformasyonlarının oluşmasında, monosakkarid-monosakkarid ve monosakkarid-protein etkileşmelerinin diğer bir deyişle hidrojen bağları

ve/veya hidrofobik bağların rol oynadığı, bu maddelerin proteinleri proteolitik enzimlerin etkilerine karşı korudukları, hücre zarlarının geçirgenliğinin glikoproteinler tarafından kontrol edildiği, glikoproteinlerdeki polisakkarid zincirlerinin molekülün kimyasal olarak tanınarak hücre dışına taşınmasında rolü olduğu, hücre zarlarında yer alan glikoproteinlerin hücrelerin işlev bakımından farklılaşmasında görev aldıkları ve enzimler, hormonlar, virüsler için reseptör oluşturdukları saptanmıştır (4-19).

Glikoproteinlerdeki oligosakkarid ve polipeptid zincirleri arasındaki kovalan bağlar, bazı amino asitlerin fonksiyonel grupları ile monosakkaridin 1 numaralı karbon atomunun katılması sonucunda oluşan N-glikozid veya O-glikozid bağlarıdır. N-asetil glukozaminin 1 numaralı karbon atomundaki hidroksil grubu ile polipeptid zincirindeki asparaginamid grubu arasında bulunan N-glikozid bağı saptanan ilk glikopeptid bağıdır (20,21). Tavuk ovalbuminindeki glikoproteinde varlığı saptanan bu bağın (22,23), sığır ribonukleazında (24), α_1 - asid glikoproteinde (25,26), kornea keratan sülfat glikoproteininde (27,28) ve dana ile insan tiroglobulininde (29) de bulunduğu saptanmıştır.

O-glikozid bağlarına ise polipeptid zincirindeki serin, treonin veya hidroksilizin iştirak eder. Serin ve treoninin yer aldığı bağlar ilk kez mukoza salgılarındaki glikoproteinlerde belirlenmiştir (30,31,32,33).

Hidroksilizin katıldığı O-glikozid bağları ilk kez kobay derisi tropokollajeninde (34) ve sığır böbrek glomerul hücre zarlarında (35) saptanmıştır. Galaktozilhidroksilizin bağlarına ise gerek omurgalı gerek

omurgasızlardan elde edilen çok sayıdaki farklı kollajende rastlanmıştır (36,39).

Bitki glikoproteinlerindeki O-glikozid bağının sıklıkla hidroksiprolin ile arabinoz arasında olduğu görülmüştür (38). Aynı amino asidin galaktoz ile meydana getirdiği bağın yeşil alglerde bulunduğu saptanmıştır (39). Serin veya treonin ile mannoz arasındaki O-glikozid bağının varlığı maya ve mantarlarda gösterilmiştir (40).

Glikoproteinlerin gerek yapısal gerek işlevsel özelliklerinin incelenmesinde eksoglikozidazlar ve endoglikozidazlar olarak sınıflandırılan bazı glikozidazlardan yararlanır. Eksoglikozidazlar oligosakkarid zincirinin ucunda yer alan monosakkaridin katıldığı glikozid bağını spesifik olarak hidroliz ederek serbest kalan monosakkaridin tanınmasına olanak sağlar. Endoglikozidazlar ise oligosakkarid zincirlerini polipeptid iskeletine yakın kısımlarında bulunan N-asetilglukozaminin veya N-asetilgalaktozaminin katıldığı glikozid bağlarını parçalayarak daha sonra yapısal analiz uygulanabilecek uzunluktaki oligosakkarid zincirlerinin polipeptid kısmından ayrılmasında rol oynar.

Glikozidazlar çok sayıda bitki ve mikroorganizmadan elde edilmiş ve özellikleri incelenmiştir, bunlardan β -asetilglukozaminidaz (41,42), β -galaktozidaz (43,44), α -galaktozidaz (45), α -mannozidaz (46) pratikte kullanılan eksoglikozidazlardır. Yumuşacıkların glikozidazları ile ilgili bazı araştırmalar yapılmış, deniz yumuşacıklarından istiridyede α - ve β -galaktozidazlar ve α - ve β -mannozidazlardan başka α -ve β -glukozidazların da varlıkları saptanmış ve adı geçen enzimlerin çeşitli karbohidratların

yapılarının aydınlatılmasında kullanılabilecekleri belirtilmiştir (47). *Mytilus galloprovincialis* midye türünün tüm doku ekstresinden üç β -galaktozidaz izoenzimi izole edilmiş ve kinetik özellikleri incelenmiştir (48). Aynı midye türünün manto dokusunda da β -galaktozidaz aktivitesi saptanmış, enzimin aynı zamanda galaktozil transferaz aktivitesi de gösterdiği belirlenmiştir (49).

Sistemik adı β -D-glukozid glukohidrolaz olan β -glukozidaz (EC 3.2.1.21) (52) glikozil bileşiklerine etki eden hidrolazlar alt sınıfında yer alır. Doğal substratları sellobioz, sellotrioz vb. olan bu enzim β -glukozid bağıny hidroliz ederek, molekülden D-glukozun ayrılmasını sağlar.

Hayvan, bitki ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunan glukozidazlar çok sayıda araştırmaya konu olmakla beraber (41,42,50,51), midye glukozidazları ile ilgili çalışmaların sayısı oldukça azdır. *Mytilus edulis* midye türünün tüm doku ekstresinde β -glukozidaz aktivitesi gösteren en az iki izoenziminin bulunabileceği ileri sürülmüş (53), aynı midye türünün hepatopankreasının α -D-galaktozidaz, β -D-galaktozidaz, α -D-mannozidaz, β -D-glukozidaz, α -L-fukozidaz ve N-asetil - β -D- glukozaminidaz gibi çok sayıda glikozidazın içerdiği saptanmıştır (54). *Mytilus edulis* manto dokusundan yüksek aktivite gösteren iki α -glukozidaz izoenzimi izole edilmiştir (55).

Türkiye kıyılarında bulunan ve Akdenize özgü midye türü olan *Mytilus galloprovincialis* glukozidazlarına ilişkin araştırmaların sayısı oldukça azdır. Adı geçen türün tüm doku ekstresi ve manto dokusu α -glukozidazları (56,57) ile hepatopankreas β -glukozidazları (58) incelenmiştir.

Midye manto dokusu β -glukozidazına ilişkin bir bilginin literatürde yer almaması göz önünde bulundurularak, bu çalışmada *Mytilus galloprovincialis* manto dokusu β -glukozidazının elde edilmesi ve bazı kinetik özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır.



GEREÇ VE YÖNTEM

Mytilus galloprovincialis L. midye türünün manto dokusu β -glukozidazının elde edilmesi ve bazı özelliklerinin incelenmesi amacıyla gerçekleştirilen bu çalışmada doku homojenatı, ham ekstre ve amonyum sülfat kesitinin elde edilmesinde Bosch homojenizatör, Kermanlar manyetik karıştırıcı, Heraeus-Cryofuge 20-3 soğutuculu santrifüj, β -glukozidaz aktivitesi gösteren fraksiyonun ayrılmasında yararlanılan hidroksilapatit kromatografisinde LKB-8300 UVICORD II. ultraviyole absorpsiyometre, LKB 6520 kaydedici ve LKB -2112 REDIRAC fraksiyon toplayıcı kullanıldı.

Enzim aktivitesi ölçülmesi ve protein miktar tayininde THERMOMIX Bu su banyosu ve SHIMADZU UV-1208 spektrofotometreden yararlanıldı.

Hidroksilapatit hazırlanmasında $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Merck 6573), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck 2380) ve NaOH (Ferak 21148), enzim aktivitesi ölçülmesinde substrat olarak 4-Nitrofenil- β -D-glukopiranozid (Fluka 73626), standart olarak 4-Nitrofenol (Fluka 73560) ve reaksiyonu durdurmak için susuz Na_2CO_3 (Merck 6398) kullanıldı. Protein miktar tayininde ise $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Riedel 12849), standart olarak sığır serum albumini (Serva 11920) kullanıldı.

Deneyler sırasında kullanılan

Potasyum fosfat tamponu	KH_2PO_4	(Merck 4871)
	K_2HPO_4	(Merck 5100)
Mc Ilvaine sitrat-fosfat tamponu	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	(Merck 242)
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	(Merck 6573)
Sorensen glisin tamponu	glisin	(Merck 500190)
	NaCl	(Merck 6400)
	ve HCl	(Merck 317)
Sorensen fosfat tamponu ise	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	(Merck 6576)
	ve KH_2PO_4	(Merck 4871)

ile hazırlandı.

MİDYE MANTO DOKUSU β -GLUKOZİDAZİNIN ELDE EDİLMESİ

Midye manto dokusu β -glukozidazı, midyenin manto dokusundan hazırlanan homojenattan, β -glukozidaz aktivitesi gösteren fraksiyonun en uygun amonyum sülfat konsantrasyonunda çöktürülerek, distile suya karşı dializ edilmesi ve hidroksilapatit kolonuna uygulanması suretiyle elde edildi.

Midye manto dokusu ham ekstresinden β -glukozidazı çöktüren uygun amonyum sülfat konsantrasyonunun belirlenmesi

Deneyin yapılacağı gün toplanan midyeler kabuklarından ayrıldı, manto kısımları makasla dikkatle kesilerek alındı ve distile su ile iyice yıkandıktan sonra, 67 g kadarı, 300 ml % 0.9 NaCl çözeltisi ve 2 ml toluen içeren, buz içine yerleştirilmiş olan, 500 ml'lik balona aktarıldı, dakikada 10.000 devir yapan homojenizatör yardımıyla homojenize edildi. Bu suretle

elde edilen homojenat 1000 ml'lik bir behere aktarıldı, üzerine 300 ml % 0.9 NaCl çözeltisi katıldı, manyetik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldıktan sonra bir gece buz dolabında bekletildi. Ertesi gün, 20.000 devir/dakikada 30 dakika süreyle soğutuculu santrifüjde santrifüje edildi, üstteki berrak kısım, süzgeç kağıdından süzülerek alındı ve bu şekilde ham ekstre elde edildi.

Ham ekstreya, konsantrasyonu % 20 oluncaya kadar, havanda dövülerek toz haline getirilmiş amonyum sülfat küçük porsiyonlar halinde katıldı. Karışım manyetik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldıktan ve bir gece buz dolabında bekletildikten sonra 20.000 devir/dakikada soğukta 30 dakika santrifüje edildi. Üstteki sıvıda ve çökeltide β -glukozidaz aktivitesi tayini ve protein miktar tayini yapıldı. Bu işlemlere, amonyum sülfatın sıvı kısımdaki konsantrasyonu, kademeli olarak her defasında % 5 arttırılmak suretiyle, % 45'e kadar çıkarılarak devam edildi. % 40 amonyum sülfat içeren ham ekstrenin santrifüjü ile elde edilen çökeltide β -glukozidaz aktivitesi bulunmaması, aktivitenin % 45 amonyum sülfat içeren ham ekstrenin santrifüjü ile elde edilen çökeltide ilk kez ortaya çıkması % 40'lık amonyum sülfat konsantrasyonu taban olarak kabul edilmesine neden oldu. Karışımın amonyum sülfat konsantrasyonunun yine her seferinde % 5 arttırılması ve yukarıda sözü edilen işlemlerin aynen tekrarlanması suretiyle gerçekleştirilen deneylerde % 60 amonyum sülfat içeren ham ekstrenin santrifüjü ile elde edilen çökeltide aktivite görüldü ancak sıvı kısımda aktivite saptanmadı. Bu suretle *Mytilus galloprovincialis* midye mantosu ham ekstresinden β -glukozidazı çöktüren uygun amonyum sülfat kesitinin % 40- % 60 konsantrasyonları olduğu belirlendi.

Midye manto dokusu β -glukozidazının ekstraksiyonu ve % 40-%60 amonyum sülfat kesitinin elde edilmesi

Mytilus galloprovincialis L. mantosu β -glukozidazını çöktürmek için uygun amonyum sülfat konsantrasyonunun % 40-% 60 olduğu saptandıktan sonra sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı:

Kabuklarından ayrılıp, makasla dikkatle kesilerek alınan ve distile su ile yıkanmış 105 g civarında manto dokusu 300 ml % 0.9 NaCl çözeltisi ve 2 ml toluen içeren, buz içine yerleştirilmiş olan 500 ml'lik balonda dakikada 10.000 devir yapan homojenizatör kullanılarak homojenize edildi, 1000 ml'lik bir behere aktarıldı ve üzerine 300 ml soğuk % 0.9 NaCl çözeltisi ilave edildi. Karışım 30 dakika manyetik karıştırıcı ile karıştırıldıktan sonra bir gece bekletildi. Ertesi gün, 20.000 devir/dakikada soğutuculu santrifüjde santrifüje edildi, üstteki berrak kısım alındı ve bu şekilde ham ekstre elde edildi.

Ham ekstreya ortamdaki konsantrasyonu % 40 olacak şekilde havanda toz haline getirilmiş amonyum sülfat yavaş yavaş ilave edildi. Karışım manyetik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldıktan sonra bir gece buzdolabında bekletildi, ertesi gün 20.000 devir/dakikada 30 dakika süreyle soğukta santrifüje edildi. Santrifüjle ayrılan sıvı kısma, ortamdaki konsantrasyonu % 60 olacak şekilde katı amonyum sülfat katıldı. Karışım 30 dakika süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve ertesi gün aynı koşullarda santrifüje edildi. Çökelti, çözünebileceği en az miktardaki distile suda çözüldü. % 40-%60 amonyum sülfat kesiti olarak adlandırılan bu çözeltiye, bir gün süreyle distile suya karşı dializ edildikten ve β -glukozidaz aktivitesi ile protein

miktarı tayin edildikten sonra hidroksilapatit kolon kromatografisi uygulandı.

Hidroksilapatit kolon kromatografisi

Hidroksilapatit kolon kromatografisinde, kolon dolgu maddesi olarak kullanılan hidroksilapatit Tiselius, Hjerten ve Levin'in (59) değiştirilmiş yöntemine göre hazırlandı (60).

Hidroksilapatit, alt ucu küçük bir parça cam pamuğu ile kapatılmış, iç çapı 1.8 cm olan cam kolona 15 cm yükseklikte olacak şekilde dolduruldu. Kolon, hacminin üç katı kadar pH'sı 6,8 olan 5 mM fosfat tamponu geçirilmesiyle dengelendi. Daha sonra, midye manto dokusu β -glukozidazını içeren % 40 - % 60 amonyum sülfat kesitinden 7 ml kolona uygulandı. Kolondan sırasıyla 50 mM, 100 mM, 200 mM, 1 M pH'sı 6.8 olan potasyum fosfat tampon çözeltileri geçirilerek 36 ml/saat akış hızı ile elüsyon gerçekleştirildi ve fraksiyonlar fraksiyon toplayıcı cihazdaki deney tüplerinde 3'er ml'lik hacimler halinde toplandı. Her tüpte β -glukozidaz aktivitesi araştırıldı. Enzimatik aktivite gösteren tüplerin içerikleri biraraya getirildi ve enzimin kinetik özelliklerini incelemek için yapılacak deneylerde kullanılmak üzere + 4°C'de saklandı.

β -GLUKOZİDAZ AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜLMESİ

Enzim aktivitesi 37°C'de, dakikada açığa çıkan μ mol 4-nitrofenol (μ mol 4-nitrofenol/dakika) olarak, spesifik aktivite ise 37°C'de, dakikada 1 mg enzim proteininin açığa çıkardığı μ mol 4-nitrofenol (μ mol 4-nitrofenol/dak./mg protein) olarak belirtildi.

Aktivite ölçümlerinde, substrat olarak 4-nitrofenil- β -D-glukopiranozidin 1/50 M çözeltisi ve tampon olarak pH'sı 5.8 olan Mc Ilvaine sitrat-fosfat tamponu kullanıldı.

Spesifik aktivitenin hesaplanmasında gerekli olan protein miktarları, standart olarak sığır serum albumini kullanılarak hazırlanan regresyon denkleminde bulundu.

Aktivite deneyinin yapılışı

β -glukozidazın hidrolitik aktivitesinin ölçülmesinde aşağıdaki yöntem uygulandı.

Bir deney tübünde Mc Ilvaine sitrat-fosfat tamponu (pH 5.8) ve substrat çözeltisinden 100 μ l karıştırıldı ve tüp 37°C'lik su banyosunda 5 dakika bekletildi. Daha sonra, 100 μ l enzim çözeltisi ilave edildi ve karışım 30 dakika süreyle 37°C'lik su banyosunda bırakıldı. Bu sürenin sonunda tübe 3 ml 0.2 M Na₂CO₃ ilavesiyle enzim reaksiyonu durduruldu.

Diğer taraftan enzim ve substrat kontrol deneyleri, enzim ve substrat çözeltileri yerine aynı miktarda distile su kullanılması suretiyle gerçekleştirildi.

β -glukozidazın substrat üzerine etkisiyle açığa çıkan 4-nitrofenole ait sarı rengin absorbansı ile enzim ve substrat kontrol deneylerinin absorbansları spektrofotometrede, ayrı ayrı, 0.2 M Na₂CO₃'a karşı, 420 nm dalga boyunda ölçüldü. Elde edilen değerler, 4-nitrofenolün regresyon

denklemine uygulanmasıyla enzim tarafından 1 dakikada açığa çıkartılan 4-nitrofenol miktarı μmol olarak belirlendi.

4-nitrofenol standart eğri denkleminin elde edilmesi

4-nitrofenol standart eğri denklemin elde edilmesi için önce 4-nitrofenolün sudaki 2000 $\mu\text{mol/ml}$ 'lik çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltinin distile su ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları 1750 $\mu\text{mol/ml}$, 1500 $\mu\text{mol/ml}$, 1250 $\mu\text{mol/ml}$ ve 1000 $\mu\text{mol/ml}$ olan çözeltiler elde edildi ve absorbansları distile suya karşı 420 nm'de ölçüldü. Deney 5 kez tekrarlandı ve bulunan değerlerden, en küçük kareler yönteminin uygulanmasıyla, 4-nitrofenolün regresyon denklemi elde edildi.

PROTEİN MİKTAR TAYİNİ

Ham ekstre, % 40-60 amonyum sülfat kesiti ve 50 mM tampon eluatında protein miktar tayini aşağıda belirtilen mikrobiüre yöntemine göre yapıldı (61).

Belirteçler

Mavi belirteç: 40 ml % 1'lik CuSO_4 çözeltisinin sürekli olarak karıştırmak suretiyle, 150 ml % 40'luk NaOH çözeltisine katılmasıyla hazırlandı

Beyaz belirteç: 150 ml % 40'luk NaOH çözeltisine 40 ml distile su katılması suretiyle hazırlandı.

Deneyin yapılışı

İki deney túbüne 1'er ml örnek alındı ve her birine 1'er ml distile su ilave edildi. Bunlardan birine 1 ml mavi belirteç, diğetine 1 ml beyaz belirteç eklendi ve 20 dakika süreyle oda temperaturünde bekletildikten sonra, örnek yerine distile su ile hazırlanan kontrollerine karşı, 310 ve 390 nm'lerde absorpsanları ölçüldü. Mavi belirteç ile hazırlanan örneğin 310 nm'deki absorpsansı 390 nm'de ölçülen absorpsansından çıkarıldı ve Δ_1 değeri elde edildi. Beyaz belirteç ile hazırlanan örneğe de aynı işlemin uygulanmasıyla Δ_2 değeri elde edildi. $\Delta_1-\Delta_2$ değerinin sığır serum albumini regresyon denkleminde uygulanmasıyla $\mu\text{g/ml}$ cinsinden protein miktarı belirlendi.

Sığır serum albumini standart eğri denkleminin elde edilmesi

Sığır serum albumininin distile sudaki $1000\mu\text{g/ml}$ 'lik çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu çözeltinin distile su ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları $200\mu\text{g/ml}$, $400\mu\text{g/ml}$, $600\mu\text{g/ml}$ ve $800\mu\text{g/ml}$ olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere, ayrı ayrı, Zamenhof'un mikrobiyore yöntemi (61) uygulandı ve adı geçen yöntemle göre ölçülen $\Delta_1-\Delta_2$ absorpsan değerlerine en küçük kareler yönteminin uygulanmasıyla sığır serum albumini regresyon denkleminin elde edildi.

MİDYE MANTO DOKUSU β -GLUKOZİDAZİNİN KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Midye manto dokusu β -glukozidazının optimum pH ve optimum temperaturünü belirlemek ve 4-nitrofenil- β -D-glukopiranozide karşı K_m

değerini saptamak için yapılan deneylerde, hidroksilapatit kolonundan 50 mM fosfat tamponu ile elüe edilen fraksiyon kullanıldı.

Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisinin incelenmesi

β -glukozidazın optimum pH'sını saptamak üzere 1.2-9 arasında gösterdiği aktivite, pH 1.2-3.6 arası Sorensen glisin tamponu (62,63), pH 2.2-7.2 arası Mc Ilvaine sitrat-fosfat tamponu (64), pH 7.0-9.2 arası ise Sorensen fosfat tamponu (63,65) kullanılan ortamlarda ölçüldü.

Değişik pH değerlerinde elde edilen enzim aktiviteleri ordinatta, pH'lar absiste gösterilerek β -glukozidaza ait optimum pH eğrisi çizildi.

Enzim aktivitesi üzerine temperaturün etkisinin incelenmesi

β -glukozidazın optimum temperaturünü belirlemek amacıyla enzim aktivitesi, 5°-65°C'ler arasında değişen sıcaklıklarda, her defasında 5°C'er, optimum sıcaklık dolaylarında ise 1'er santigrat derece arttırmak suretiyle, "enzim aktivitesi ölçülmesi" başlığı altında belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Enzim aktivitesi ordinatta, sıcaklık ise absiste gösterilmek suretiyle adı geçen enzime ait optimum sıcaklık eğrisi çizildi.

Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisinin incelenmesi

Substrat konsantrasyonun değiştirilmesiyle β -glukozidazın reaksiyon hızında meydana gelecek değişimleri saptamak üzere, 4-nitrofenil- β -D-glukopiranozid'in sudaki 0.02M, 0.01 M, 0.05 M, 0.0025 M, 0.00125 M'lik

çözeltileri kullanıldı. Enzimin farklı substrat konsantrasyonlarındaki aktivitesi “enzim aktivitesinin ölçülmesi” kısmında belirtildiği şekilde tayin edildi. Farklı her substrat konsantrasyonu için aynı koşullarda 5'er deney yapılarak ve en küçük kareler yöntemi uygulanarak enzime ait Lineweaver-Burk doğrusu çizilip (66), doğrunun denklemi bulundu.

$$y = 0.0999 x + 9.55$$

Adı geçen denklemden yararlanılarak enzime ait Km ve Vmax değerleri hesaplandı.

BULGULAR

Midye manto homojenatı ham ekstresinden % 40-%60 amonyum sülfat konsantrasyonunda çöktürmek suretiyle elde edilen ve β -glukozidaz aktivitesi gösteren 118.95 mg protein içeren 7 ml hacimdeki fraksiyonun hidroksilapatit kromatografi sütununa uygulanması ve artan molaritedeki fosfat tamponlarıyla elüe edilmesi sonucunda elde edilen fraksiyonlarda enzimatik aktivite ölçüldü ve 50 mM tampon çözeltisiyle elüe olan fraksiyonda β -glukozidaz aktivitesi bulundu (Şekil 1).

Midye manto β -glukozidazının elde edilme sürecindeki işlem basamakları Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1- Midye mantosu β -glukozidazının elde edilme aşamaları

Fraksiyon	Hacim (ml)	Protein (mg)	Total * aktivite (U)	Spesifik aktivite** (U/mg)
Ham ekstre	720	2057	2786.5	1.35
% 40-%60 (NH ₄) ₂ SO ₄ kesiti	7	118.95	378.9	3.18
50 mM tampon eluatu	45	10.5	186.72	17.78

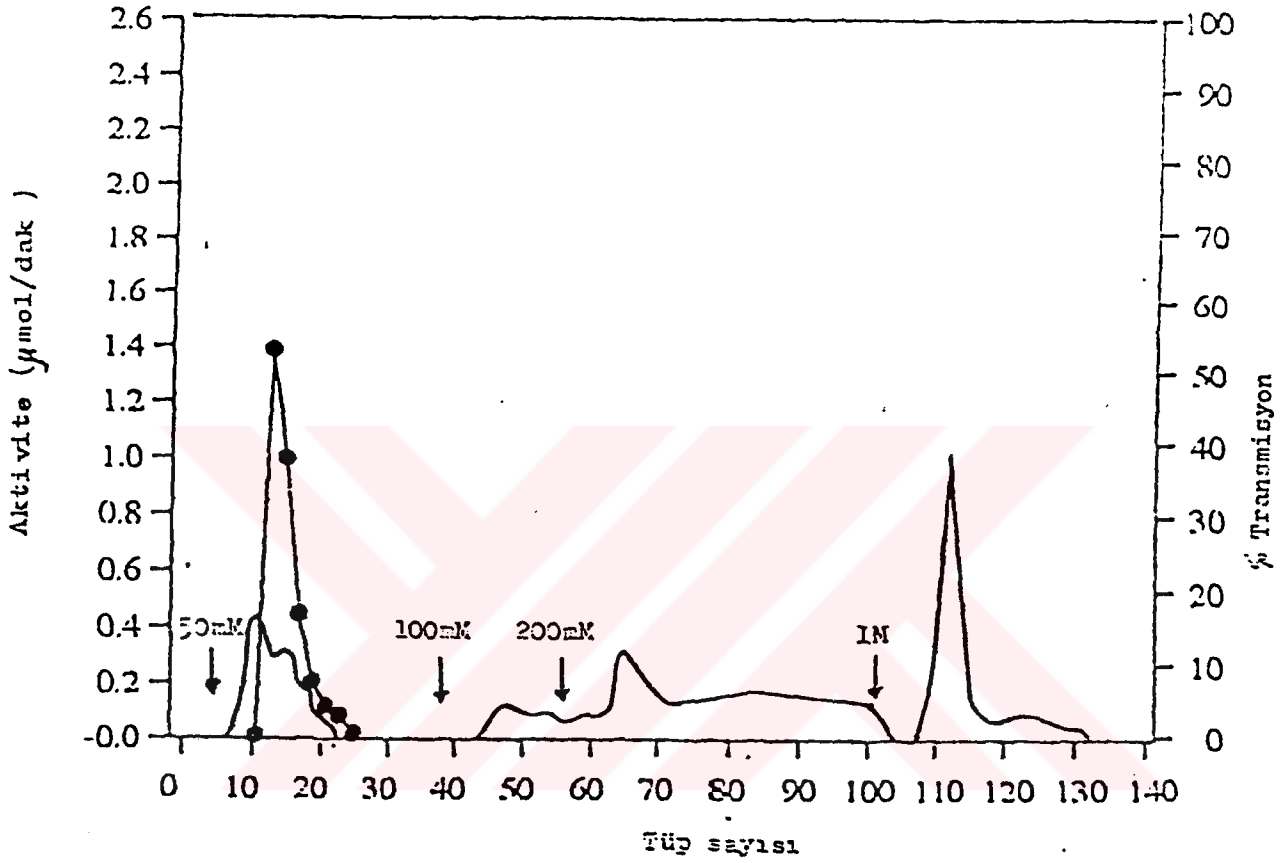
*- μ mol 4- nitrofenol/dak.

** - μ mol 4- nitrofenol/dak./mg protein

Regresyon denklemleri,

4- nitrofenol için (μ mol):

$$y = 0,0003721 x + 0.0096814 \quad (1)$$



Şekil 1. Midye mantosu ham ekstresi % 40-%60 amonyum sülfat kesitinin hidrosilapatit kolonundaki elüsyon grafiği.

Kolon boyutları: 15 x 1.8 cm, örnek hacmi: 7 ml (118.95 mg protein), akış hızı: 36 ml/saat, tamponlar: 50 mM, 100 mM, 200 mM, 1 M pH'sı 6.8 olan potasyum fosfat tamponları Protein (—) enzim aktivitesi (•••••).

Sığır serum albumini için ($\mu\text{g/ml}$):

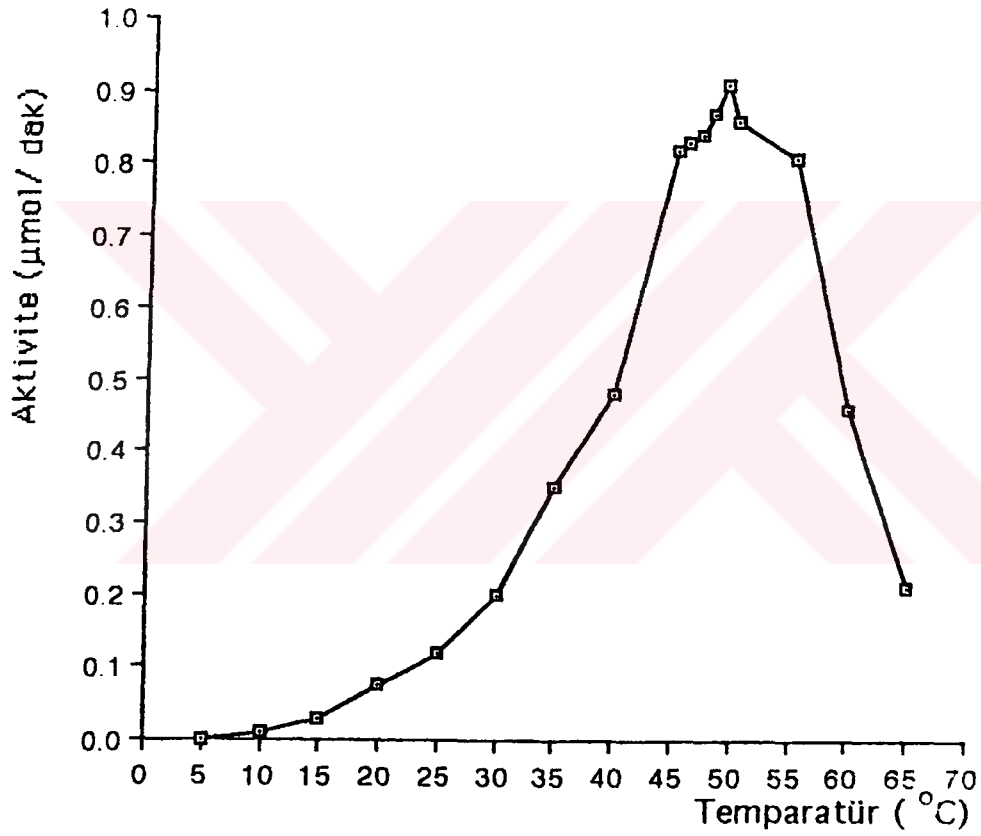
$$y = 0.0005665 x + 0.0169 \quad (2)$$

bulundu.

Enzim aktivitesi ölçümleri sırasında açığa çıkan 4-nitrofenole ait optik dansiteler 1 numaralı denkleme yerleştirilerek enzim aktiviteleri saptandı. Protein miktarları, mikrobiüre reaksiyonu ile saptanan optik dansitelerin 2 numaralı denkleme yerleştirilmesiyle bulundu.

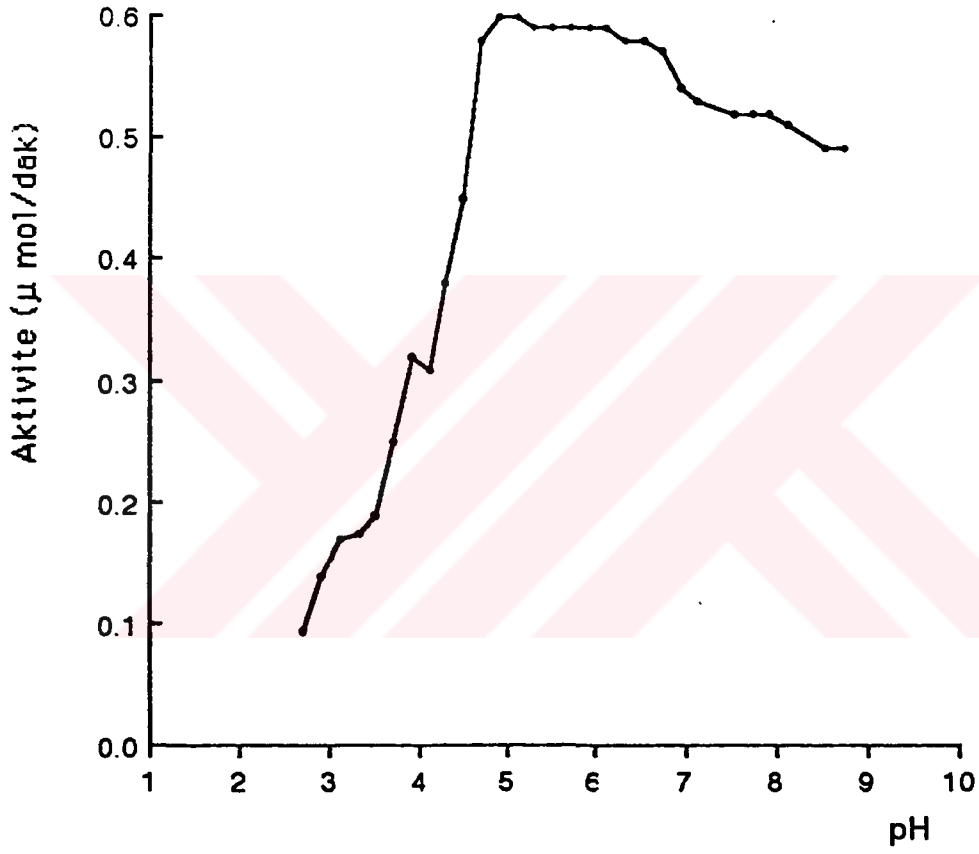


β -glukozidaz aktivitesi gösteren fraksiyonun 0-70°C arasındaki sıcaklıklarda aktivitesinin incelenmesinde, enzimin 49°C'de en yüksek aktiviteyi gösterdiği saptandı (Şekil 2).



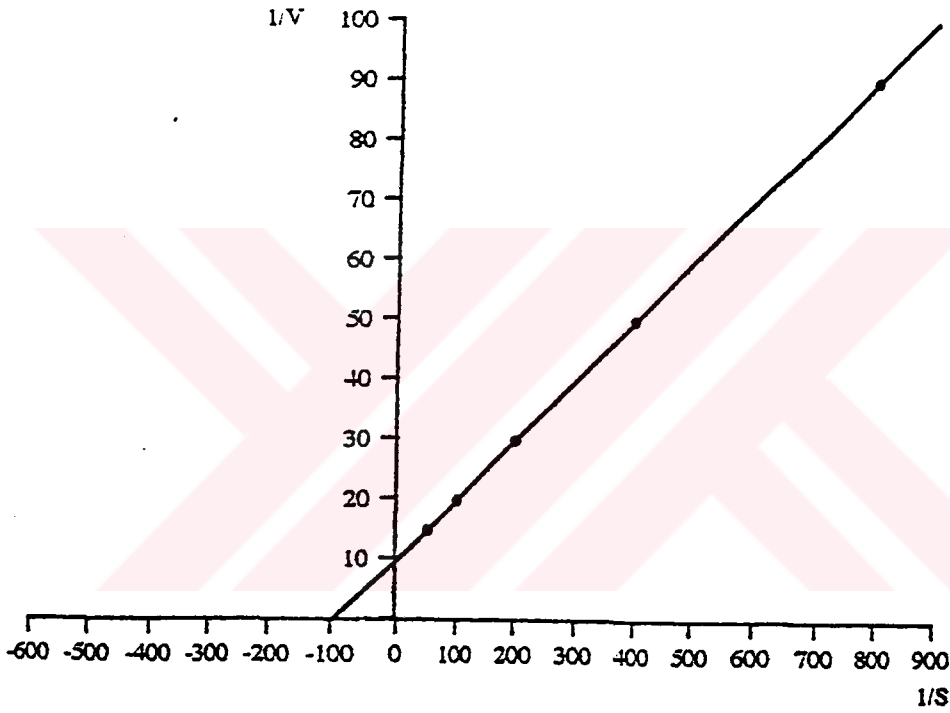
Şekil 2. β -glukozidaz aktivitesine sıcaklığın etkisi

β -glukozidaz aktivitesi gösteren fraksiyonun değişik pH'larda aktivitesinin incelenmesinde, pH 4.8-5.0 arasında en yüksek aktiviteyi gösterdiği, aktivitenin pH 6.6 dan sonra azaldığı görüldü (Şekil 3).



Şekil 3. β -glukozidaz aktivitesine pH'nın etkisi

Substrat konsantrasyonunun β -glukozidaz aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi sonucunda, enzimin 4-nitrofenil- β -D- glukopiranozide karşı K_m değerinin $1.046 \times 10^{-2}M$, V_{max} değerinin ise 3.49 mM olduğu saptandı (Şekil 4). Regresyon denklemi: $y = 0.0999 x 9.55$



Şekil 4. 4-nitrofenil- β -D- glukopiranozid konsantrasyonunun β -glukozidaz aktivitesi üzerine etkisi ($-\frac{1}{K_m} = -95$)

TARTIŞMA

Bugüne kadar sınırlı sayıda araştırmanın konusu olan midye glikozidalarının, midyenin sindirim sisteminde besinlerle organizmaya giren karbohidratların hidrolizindeki görevleri yanısıra, diğer bazı dokularda da önemli işlevleri olduğu bilinmektedir. *Mytilus edulis* manto dokusunda glukoz moleküllerinin glikojenden ayrılmasını sağlayan yüksek aktiviteli iki α -glukozidaz izoenzimi bulunmuş (55), *Mytilus galloprovincialis*'e ait aynı dokuda da adı geçen enzim gene iki izoenzimi halinde izole edilmiştir (57). Bir başka araştırmada *Mytilus galloprovincialis* manto dokusunda β -galaktozid bağı içeren bileşiklerin hidrolizi yanında, adı geçen bağların meydana gelmesini de sağlayan bir β -galaktozidazın varlığı saptanmıştır (49).

Midye manto dokusu β -glukozidazının kısmen saflaştırılması ve bazı özelliklerinin incelenmesi amacıyla yapılan bu ęalıřmada, midye manto dokusu ham ekstresinden sırayla amonyum sülfatla ęöktürme ve hidroksilapatit kromatografisi uygulanması sonucu adı geçen dokuda bir tek β -glukozidaz aktivitesi bulunduğu belirlenmiş ve β -glukozidaz 13 kez saflaştırılarak elde edilmiştir. Midyenin sindirim sisteminde β -galaktozidaz ve β -glukozidaz aktiviteleri gösteren enzimlerin birden fazla izoenzimleri halinde bulunmalarına karşın (67,58), manto dokusunda bu araştırmada görüldüğu gibi β -glukozidaz, diğer bir ęalıřmada ise β -galaktozidaz (49) aktiviteleri gösteren enzimlerin izoenzimleri saptanmamıştır.

Bu ęalıřmada izole edilen β -glukozidazının optimum temperaturü 49°C olarak belirlenmiştir. Diğer bir araştırmada aynı midye türünün manto dokusundan elde edilen β -galaktozidazın da en yüksek aktiviteyi 49°C'de

gösterdiği saptanmıştır (49). Her iki glikozidazın, farklı substratlar üzerine etki göstermelerine karşın, aynı optimum temperatüre sahip olmaları ilginç bir bulgu olarak değerlendirilebilir.

Midye manto dokusu β -glukozidazı, pH 4.8-5.0 arasında en yüksek aktiviteyi göstermekte, pH 6.6 ya kadar ise aktivitesinde önemli bir azalma görülmemektedir. Bu değerler *Phaseolus vulgaris* tohumlarından izole edilen β -glukozidazın 4.8-5.0 olan optimum pH'sı ve aktivitesinde pH 6.8'e kadar azalma olmaması bulguları (42) ile benzerlik göstermektedir. *Mytilus edulis* midye türünden elde edilen β -glukozidazın en yüksek aktiviteyi pH 4.2'de, *Mytilus galloprovincialis*'in hepatopankreasından izole edilen izoenzimlerinden daha aktif olanın ise pH 4.3'de gösterdiği bildirilmiştir (53, 58). Bu çalışmada elde edilen β -glukozidazın 4.8-5.0 olarak belirlenen optimum pH'ları yukarıda belirlenen β -glukozidazlara ait optimum pH değerleriyle de uygunluk göstermektedir.

Manto dokusu β -glukozidazının, 4-nitrofenil- β -D-glukopiranozide karşı gösterdiği en yüksek reaksiyon hızı ve K_m değeri sırasıyla 3.49 mM ve 1.046×10^{-2} M olarak bulunmuştur. Aynı midye türünün manto dokusu β -galaktozidazın K_m değeri 1.53×10^{-3} M, α -glukozidaz izoenzimlerin K_m değerleri ise 6.25×10^{-3} ve 1.87×10^{-3} M olarak saptanmıştır (49, 57). Bu bulgulardan, bu çalışmada incelenen β -glukozidazın, aynı dokuda olan diğer glikozidazlardan daha yüksek K_m değerine sahip olduğu anlaşılmaktadır.

ÖZET

Bu çalışmada Türkiye sahillerinde bulunan midye türü olan *Mytilus galloprovincialis*'in manto dokusu β -glukozidazı elde edildi ve bazı kinetik özellikleri incelendi.

Rumelikavağı deniz kıyısından toplanan midyelerin kabukları çıkartıldıktan sonra manto kısımları ayrılarak homojenize edildi. β -glukozidaz aktivitesi gösteren fraksiyon, midye manto homojenizatının santrifüje edilmesiyle elde edilen ham ekstreden % 40 - 60 amonyum sülfat konsantrasyonunda çöktürülmesi suretiyle ayrıldı, dializ edildi ve hidroksilapatit kolona uygulandı. Adı geçen fraksiyonun pH'sı 6.8 olan artan molaritede fosfat tamponu ile yapılan kolon kromatografisi sonucunda enzimin 50 mM fosfat tamponu ile elüe edilebileceği saptandı. Bu suretle midye manto dokusu β -glukozidazı 13 kez saflaştırılarak elde edildi.

β -glukozidazın en yüksek aktivitesini pH 4.8-5.0 değerleri arasında gösterdiği, optimum temperaturünün ise 49°C olduğu belirlendi. Midye manto β -glukozidazının 4-nitrofenil- β -D-glukopiranozide karşı gösterdiği en yüksek reaksiyon hızının ve K_m değerinin sırasıyla 3.49 mM ve 1.046×10^{-2} M olduğu bulundu.

SUMMARY

In the present study β -glucosidase was isolated from the mantle tissue of *Mytilus galloprovincialis*, a mollusc species existing in the coasts of Turkey, and some of its kinetic properties were examined.

After removing the shells of the mollusc collected from Rumeli Kavağı seabord, the mantle tissue was separated and homojenized. The crude extract of the mantle tissue was obtained by centrifugation and β -glucosidase active fraction was precipitated from the crude extract at 40 % - 60 % ammonium sulphate concentration. This fraction was dialysed and applied to hydroxylapatite column. During the elution, molarity gradient was performed with phosphate buffers of pH 6.8 and it was observed that the enzyme existed in 50 mM eluate. Thereupon, mollusc mantle tissue β -glucosidase was purified 13 fold.

It was determined that optimum pH of the mantle tissue β -glucosidase of the mollusc existed between pH 4.8-5.0 and optimum temperature at 49°C. V_{max} and K_m of β -glucosidase was found 3.49 mM and $1.046 \times 10^{-2}M$ for 4-nitrophenyl- β -D-glucopiranoside.

KAYNAKLAR

1. Burger, M.M., Goldberg, A.R., Proc., Natl. Acad. Sci., U.S.A., 57, 359 (1967).
2. Inbar, M., Sachs, L., Nature, 223, 710 (1969).
3. Aub, J.C., Tieslau, C., Lankester, A., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 50, 613 (1963).
4. Spiro, R.G., Adv. Protein Chem., 27, 349 (1973).
5. Ashwell, G., Morell, A.G., Glycoproteins of Blood Cells and Plasma, Lippincott, Philadelphia, 173 (1971). - Ref., Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, 37, 160 (1980).
6. Gottschalk, A., Glycoproteins. Their Structure and Function, Elsevier, Amsterdam, (1972). - Ref., Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, 37, 160 (1980).
7. Marshal, R.D., Annu. Rev. Biochem., 41, 673 (1972).
8. Schauer, R., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 12, 127 (1973).-Ref., Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, 37, 160 (1980).
9. Montreuil, J., Methodologie de la Structure et du Metabolisme des Glycoconjugues, Colloque International du Centre National de la Recherche Scientifique No. 221, Villeneuve d'Ascq, CNRS ed., Paris,

- (1974). - Ref., *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 37, 160 (1980).
10. Montreuil, J., Recent Data on the Structure of the Carbohydrate Moiety of Glycoproteins: Metabolic and Biological Implications, *Proc. Int. Symp. Carbohydr. Chem. VII th, Bratislava, 1974*; *Pure Appl. Chem.*, 42, 431 (1975). -Ref., *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 37, 160 (1980).
 11. Ashwell, G., Morell, A.G., *Adv. Enzymol.*, 41, 99 (1974).
 12. Sharon, N., *Complex Carbohydrates, Their Chemistry, Biosynthesis and Functions*, Addison Wesley, Reading, Pa., 1975. - Ref., *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 37, 160 (1980).
 13. Kornfeld, R., Kornfeld, S., *Annu. Rev. Biochem.*, 45, 217 (1976).
 14. Rosenberg, A., Schengrund, C.L., *Biological Roles of Sialic Acids*, Plenum Press, New York, (1976). - Ref., *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 37, 160 (1980).
 15. Ashwell, G., Morell, A.G., *Trends Biochem. Sci.*, 2, 76 (1977).
 16. Meager, A., Hughes, R.C., *Virus Receptors, Receptors and Recognition, Ser. A, Vol. 4*, Chapman and Hall, 141 (1977). - Ref., *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 37, 160 (1980).

17. Vandenheede, J.R., Ahmed, A.I., Feeney, R.E., *J. Biol. Chem.*, 247, 7885 (1972).
18. Eylar, H., *J. Theoret. Biol.*, 10, 89 (1965).
19. Winterburn, P.J., Phelps, C.F., *Nature*, 236, 147 (1972).
20. Johansen, P.G., Marshall, R.D., Neuberger, A., *Biochem. J.*, 247, 1610 (1972).
21. Nuenke, R.H., Cunningham, L.W., *J. Biol. Chem.*, 236, 2452 (1961).
22. Marks, G.S., Marshall, R.D., Neuberger, A., *Biochem. J.*, 87, 274 (1963).
23. Marshall, R.D., Neuberger, A., *Biochemistry*, 3, 1596 (1964).
24. Plummer, T.H., *J. Biol. Chem.*, 243, 5961 (1968).
25. Yamashina, I., Makino, M., Ban-i, K., Kojima, T., *J. Biochem.*, 58, 168 (1965).
26. Wagh, P.V., Bornstein, I., Winzler, R.J., *J. Biol. Chem.*, 244, 658 (1969).
27. Baker, J.R., Cifonelli, J.A., Mathews, M.B., Roden, L., *Fed. Proc., Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.*, 28, 605 (1969). -Ref., *Advances in Protein Chemistry*, 27, 362 (1973).

28. Stuhlsatz, H.W., Kisters, R., Wollmer, A., Greiling, H., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 352, 289 (1971).
29. Arima, T., Spiro, R.G., J. Biol. Chem. 247, 1836 (1972).
30. Anderson, B., Seno, N., Sampson, P., Riley, J.G., Hoffman, P., Meyer, K., J. Biol. Chem., 239, 2716 (1964).
31. Bhavanandan, V.P., Buddecke, E., Carubelli, R., Gottschalk, A., Biochem. Biophys. Res. Commun., 16, 353 (1964).
32. Tanaka, K., Pigman, W., J. Biol. Chem. 240, 1487 (1965).
33. Harbon, S., Herman, G., Clauser, H., Eur. J. Biochem., 4, 265 (1968).
34. Butler, W.T., Cunningham, L.W., J. Biol. Chem., 241, 3882 (1966).
35. Spiro, R.G., J. Biol. Chem., 242, 1923 (1967).
36. Spiro, R.G., J. Biol. Chem., 244, 602 (1969).
37. Spiro, R.G., Glycoproteins, Elsevier, Amsterdam, 2 nd Ed., Part B, 964 (1972)- Ref., Advances in Protein Chemistry, 27, 365 (1973).
38. Brown, R.G., Kimmins, W.C., International Review of Biochemistry II, Volume 13: Plant Biochemistry, University Park Press, Baltimore, 183 (1977).-Ref., Glycoproteins, Chapman and Hall, New York, 11 (1983).
39. Miller, D. H., Lamport, D.T.A., Miller, M., Science, 176, 918 (1972).

40. Finne, J., Krusius, T., Margolis, R.K., Margolis, R.U., *J. Biol. Chem.*, 254, 10295 (1979).
41. Meyer, D., Bourrillon, R., *Biochimie*, 55, 5 (1973).
42. Agrawal, K.M.L., Bahl, O.P., *J. Biol. Chem.*, 243, 103 (1968).
43. Caygill, J.C., Roston, C.P.J., Jevons, F.R., *Biochem. J.*, 96, 405 (1966).
44. Kojima, K., Iwamori, M., Takasaki, S., Kubushiro, K., *Anal. Biochem.*, 165, 465 (1987).
45. Li, Y.T., Li, S.C., Shetlar, M.R., *Arch. Biochem. Biophys.*, 103, 436 (1963).
46. Li, Y.T., *J. Biol. Chem.*, 241, 1010 (1966).
47. Courtois, J.E., Petek, F., Dong, T., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 44, 11 (1962).
48. Yalvaç, S., Kuşçu, I., *Acta Pharma. Turc.*, 35 (2), 45 (1993).
49. Somar, N., Yüksek Lisans Tezi, İst. Üniv., Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biokimya Anabilim Dalı (1992).
50. Yeoh, H.H., Wee, Y.Ch., *Phytochemistry*, 35 (3), 1391 (1994). Ref., *Chem. Abstr.*, 121, 77037 (1994).

51. Tsvetanov, O., Angelova, Zh., *Khranit. Prom-St.* 43 (4), 21 (1994).
Ref., *Chem. Abstr.*, 121, 77972 (1994).
52. Barman, T.E., *Enzyme Handbook*, Springer, Verlag, Berlin, 2, 578 (1969).
53. Veibel, S., Jensen, K.A., *Biochem. Z.*, 337, 146 (1963).
54. Sanches Mozo, P., Vazques Pernas, R., *Acta Scientifica Compostelana*, 10, 175 (1973).
55. Peek, K., Gabbott, P.A., *Mar. Biol. (Berlin)*, 104 (3), 403 (1990).
56. Kuşçu, I., Berkkan, H., *Acta Pharm. Turc.*, 34 (4), 111 (1992).
57. Arisan-Ataç, I., Kuşçu, I., Berkkan, H., *Acta Pharm. Turc.*, 36 (2), 53 (1994).
58. Ashkhası, A., Yüksek Lisans Tezi, İst. Üniv., Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biokimya Anabilim Dalı (1992).
59. Tiselius, A., Hjertén, S., Levin, Ö., *Arch. Biochem. Biophys.*, 65, 132 (1956).
60. Levin, Ö., *Methods in Enzymology*, 5, 27 (1962).
61. Zamenhof, S., *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, 3, 702, (1957).

62. Sorensen, N., *Biochem. Z.*, 21, 131 (1909).
 63. Sorensen, N., *Ergebn. Physiol.*, 12, 393 (1912).
 64. Mc Ilvaine, T.C., *J. Biol. Chem.*, 49, 183 (1921).
 65. Sorensen, N., *Biochem. Z.*, 22, 352 (1909).
 66. Lineweaver, H., Burk, D., *J. Am. Chem. Soc.*, 56, 658 (1934).
 67. Ramos, J. I., Freire, M., Vazques Pernas, R., 11 th FEBS Meeting, C-5, 353 (1977).
- 