

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



KATI SUBSTRAT FERMENTASYONU KOŞULLARINDA *ASPERGİLLUS*
***ACULEATUS* NRRL 358'DA EKSTRASELÜLER β -GLUKOZİDAZ**
ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

MERT ÇOKER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Ayşe Dilek AZAZ (Tez Danışmanı)**
 Dr. Öğr. Üyesi Selma ÇELEN YÜCETÜRK (Eş Danışman)
 Prof. Dr. Olga SAK
 Doç. Dr. Meltem ALPER

BALIKESİR, HAZİRAN - 2026

ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “**Katı Substrat Fermentasyonu Koşullarında *Aspergillus aculeatus* NRRL 358’da Ekstraselüler β -glukozidaz Üretimi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu**” başlıklı tezde;

- Tüm bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Kullanılan veriler ve sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tüm bilgi ve sonuçları bilimsel araştırma ve etik ilkelere uygun şekilde sunduğumu,
- Yararlandığım eserlere atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,

beyan eder, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Mert ÇOKER

**Bu tez çalışması Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
(2025/214) nolu proje ile desteklenmiştir.**

ÖZET

KATI SUBSTRAT FERMENTASYONU KOŞULLARINDA *ASPERGILLUS ACULEATUS* NRRL 358'DA EKSTRASELÜLER β -GLUKOZİDAZ ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MERT ÇOKER
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. AYŞE DİLEK AZAZ)
(EŞ DANIŞMAN: DR. ÖĞR. ÜYESİ SELMA ÇELEN YÜCETÜRK)
BALIKESİR, HAZİRAN - 2026

Bu çalışmada, arpa samanı kullanılarak hazırlanmış KSF ortamında geliştirilen *Aspergillus aculeatus* NRRL 358'dan ASÇ ve HEK yöntemleri kullanılarak β -glukozidaz enzimi saflaştırılmıştır. *A. aculeatus*'un KSF ortamında en yüksek β -glukozidaz aktivitesine sahip olduğu optimum koşullar belirlenmiştir. Nemlendirme sıvısı Sodyum Dihidrojen Fosfat (NaH_2PO_4); pH'ın 7,0; sıcaklığın 25°C ve inkübasyon süresinin ise 10 gün olduğu saptanmıştır.

Elde edilen β -glukozidaz enzimi HEK uygulaması sonucunda %43,08 verim ile 23,85 kat saflaştırılmıştır. β -glukozidazın saflığının ve alt birim sayısının kontrolü SDS-PAGE ve NATİVE-PAGE yöntemleri kullanılarak yapılmıştır. NATİVE-PAGE elektroforezi sonucunda 170 kDa molekül ağırlığına sahip olduğu, SDS-PAGE işlemi sonucunda ise enzimin 70 kDa ve 100 kDa olmak üzere iki alt birimden oluştuğu tespit edilmiştir. Enzimin aktivitesinin tespit edilmesinde *p*NPG substratı kullanılmış, pH 4,0'de ve 55°C 'de en yüksek aktiviteye ulaştığı belirlenmiştir. Saflaştırılmış β -glukozidaz enziminin 45, 55, 65 ve 75°C sıcaklıklarda 120 dk inkübasyona bırakılmasıyla yapılan aktivite ölçümleri sonucunda sırasıyla %99,6; %99,8; %98,6 ve %31,87 oranında aktivite gösterdiği, 85°C sıcaklıkta ise 36 dk boyunca aktivitesini kaybetmediği tespit edilmiştir.

Saflaştırılan β -glukozidaz enzimi kinetik parametreleri yönünden de incelenmiş, K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 2,8571 mM ve 14285,71 mM olarak hesaplanmıştır. Bunlara ek olarak, D(+)-glukoz ve δ -glukonolakton inhibitörlerinin saflaştırılan β -glukozidaz enzimine karşı inhibisyon mekanizmalarının yarışmalı tipte olduğu belirlenmiştir. D(+)-glukozun IC_{50} değeri 11,49 mM ve K_i değeri $1,7857 \times 10^{-3}$ olarak, δ -glukonolakton inhibitörünün IC_{50} değeri 13,64 mM ve K_i değerleri ise $7,143 \times 10^{-5}$ ve $1,07145 \times 10^{-4}$ mM olarak belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELELER: Amonyum Sülfat Çöktürmesi, *Aspergillus aculeatus*, Enzim kinetiği, Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi, Katı Substrat Fermentasyonu (KSF), β -Glukozidaz

ABSTRACT

PRODUCTION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF EXTRASELLULAR β -GLUCOSIDASE FROM *ASPERGILLUS ACULEATUS* NRRL358 UNDER SOLID-STATE FERMENTATION CONDITIONS

MSC THESIS

MERT ÇOKER

BALIKESIR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. AYSE DILEK AZAZ)

(CO-SUPERVISOR: ASSIST. PROF. DR. SELMA CELEN YUCETURK)

BALIKESİR, June - 2026

In this study, the β -glucosidase enzyme was purified from *Aspergillus aculeatus* NRRL 358, which was grown on a KSF medium prepared using barley straw, using ASÇ and HEK methods. The optimal conditions under which *A. aculeatus* exhibited the highest β -glucosidase activity in the KSF medium were determined. The buffer solution was Sodium Dihydrogen Phosphate (NaH_2PO_4); the pH was 7.0; the temperature was 25°C; and the incubation period was 10 days.

The β -glucosidase enzyme obtained was purified 23.85-fold with a yield of 43.08% using the HEK method. The purity and subunit number of the β -glucosidase were verified using the SDS-PAGE and NATIVE-PAGE methods. NATIVE-PAGE electrophoresis revealed a molecular weight of 170 kDa, while SDS-PAGE analysis indicated that the enzyme consists of two subunits of 70 kDa and 100 kDa. The enzyme's activity was determined using the pNPG substrate, and it was found to reach its highest activity at pH 4.0 and 55°C. Activity measurements conducted by incubating the purified β -glucosidase enzyme at 45, 55, 65, and 75°C for 120 minutes revealed activity levels of 99.6%, 99.8%, 98.6%, and 31.87%, respectively, and it was found that the enzyme retained its activity for 36 minutes at 85°C.

The kinetic parameters of the purified β -glucosidase enzyme were examined, and the K_m and V_{max} values were calculated to be 2.8571 and 14,285.71 mM respectively. In addition, it was determined that the inhibition mechanisms of D(+)-glucose and δ -gluconolactone inhibitors against the purified β -glucosidase enzyme were of the competitive type. The IC_{50} value of D(+)-glucose was 11.49 mM and the K_i value was 1.7857×10^{-3} , while the IC_{50} value of the δ -gluconolactone inhibitor was 13.64 mM and the K_i values were 7.143×10^{-5} and 1.07145×10^{-4} mM.

KEYWORDS: Ammonium Sulfate Precipitation, *Aspergillus aculeatus*, Enzyme kinetics, Hydrophobic Interaction Chromatography, Solid-State Fermentation (SSF), β -glucosidase

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ.....	vii
SEMBOLLER ve KISALTMALAR LİSTESİ.....	viii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR	ix
1.GİRİŞ.....	1
1.1 Enzimlerin Yapısı	2
1.2 Enzimlerin Adlandırılması.....	3
1.2.1 Oksidoredüktazlar.....	4
1.2.2 Transferazlar	4
1.2.3 Hidrolazlar	4
1.2.4 Liyazlar.....	4
1.2.5 İzomerazlar	4
1.2.6 Ligazlar.....	4
1.2.7 Translokazlar	4
1.3 Enzimlerin Kullanım Alanları	5
1.3.1 Gıda Sektörü	5
1.3.2 Kozmetik Endüstrisi	5
1.3.3 İlaç Sanayi	5
1.3.4 Hayvancılık.....	6
1.3.5 Tekstil Endüstrisi	6
1.3.6 Kağıt Sanayi	6
1.4 Selülozun Yapısı	6
1.5 Selülazlar	7
1.5.1 β -Glukozidazlar	8
1.5.1.1 β -Glukozidazların Uygulamaları Alanları	8
1.6 Selülaz Üreticisi Mikroorganizmalar.....	11
1.6.1 <i>Aspergillus</i> Genel Özellikleri	11
1.6.1.1 <i>Aspergillus aculeatus</i> Iizuka (1953)'un Genel Özellikleri	11
1.7 β -Glukozidaz Eldesi	12
1.7.1 Katı Substrat Fermentasyonu (KSF)	12
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	13
2.1 Materyal.....	13
2.1.1 Czapek Dox Agar (%5 CMC) besiyerinde geliştirilen mikrofungusların β -glukozidaz aktivitesinin belirlenmesi	13
2.1.1.1 <i>A. aculeatus</i> NRRL 358'un β -glukozidaz aktivitesinin belirlenmesi	13
2.1.2 <i>A. aculeatus</i> Lizuka (1953).....	13
2.1.3.10 Hidrofobik etkileşim kromatografisinde (HEK) kullanılacak jelin sentezlenmesi.....	13
2.2 Yöntem	15
2.2.1 <i>A. aculeatus</i> 'un β -glukozidaz aktivitesinin belirlenmesi.....	15
2.2.2 Mikrofungus üretimi ve spor süspansiyonu hazırlanması	15
2.2.3 KSF ortamının hazırlanması.....	15
2.2.4 KSF ortamına inokülasyon ve kısmi saflaştırılmış β -glukozidaz eldesi	16
2.2.5 KSF Üretim Koşullarının <i>A. aculeatus</i> 'un β -Glukozidaz Sentezine Etkisi.....	16

İÇİNDEKİLER (Devam)

2.2.5.1 Optimum nemlendirme sıvısı ve pH'nın saptanması	16
2.2.5.2 Optimum inkübasyon sıcaklığının saptanması	17
2.2.5.3 Optimum inkübasyon süresinin belirlenmesi	17
2.2.6 Kısmi saflaştırılmış β -glukozidaz enzim aktivitesinin belirlenmesi	17
2.2.7 Protein miktarının belirlenmesi	18
2.2.7.1 Warburg metodu ile kalitatif protein tayini.....	18
2.2.7.2 Lowry metodu ile kantitatif protein tayini.....	18
2.2.7.3 BSA grafiğinin hazırlanması	18
2.2.8 β - Glukozidaz enziminin saflaştırılması.....	19
2.2.8.1 Amonyum sülfat çöktürmesi.....	19
2.2.8.2 Hidrofobik etkileşim kromatografisi	20
2.2.9 NATIVE-PAGE/SDS-PAGE yöntemleri kullanılarak β -glukozidaz enziminin saflığı ve alt birimlerinin belirlenmesi.....	21
2.2.9.1 Saflaştırılan β -glukozidazın SDS-PAGE yöntemi ile saflığının ve alt birimlerinin kontrolü	22
2.2.9.2 Saflaştırılan β -glukozidazın NATIVE-PAGE yöntemi ile saflığının ve alt birimlerinin kontrolü	22
2.2.10 Saflaştırılan β -glukozidaz'ın biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi.....	23
2.2.10.1 Saflaştırılan β -glukozidaz aktivitesine farklı pH'ların etkisi.....	23
2.2.10.2 Saflaştırılan β -glukozidaz aktivitesine farklı sıcaklıkların etkisi	23
2.2.10.3 Saflaştırılan β -glukozidazın termal kararlılığının belirlenmesi.....	24
2.2.10.4 Saflaştırılan β -glukozidazın pNPG substratına karşı K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi	24
2.2.10.5 Saflaştırılan β -glukozidazın inhibitörleri olan D(+)glukoz ve δ -glukonolakton'un IC_{50} değerlerinin belirlenmesi	25
2.2.10.6 Saflaştırılan β -glukozidazın inhibitörleri olan D(+)glukoz ve δ -glukonolakton'un inhibisyon tiplerinin ve K_i değerlerinin belirlenmesi	25
3. BULGULAR	26
3.1 <i>A. aculeatus</i> 'un β -Glukozidaz Aktivitesinin Belirlenmesi	26
3.2 KSF Üretim Koşullarının <i>A. aculeatus</i> 'un β -Glukozidaz Sentezine Etkisi.....	26
3.2.1 KSF ortamında geliştirilen <i>A. aculeatus</i> 'un β -glukozidaz üretimine pH ve nemlendirme sıvısının etkisi.....	26
3.2.2 KSF ortamında geliştirilen <i>A. aculeatus</i> 'un β -glukozidaz üretimine sıcaklığın etkisi	28
3.2.3 KSF ortamında geliştirilen <i>A. aculeatus</i> 'un β -glukozidaz üretimine inkübasyon süresinin etkisi	29
3.3 KSF Ortamında Geliştirilen <i>A. aculeatus</i> 'tan Kısmi Saflaştırılmış Enzim Eldesi	30
3.4 β -Glukozidaz Enziminin Saflaştırılması.....	30
3.4.1 Amonyum sülfat çöktürmesi.....	30
3.4.2 Hidrofobik etkileşim kromatografisi	31
3.5 Saflaştırılan β -Glukozidazın SDS PAGE ve NATIVE PAGE Elektroforez Yöntemleriyle Alt Birim Sayısının Kontrolü.....	34
3.6 Saflaştırılan β -Glukozidazın Biyokimyasal Özelliklerinin ve Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi	34
3.6.1 Farklı pH değerlerinin saflaştırılan β -glukozidaz enzim aktivitesine etkisi	35
3.6.2 Farklı sıcaklıkların saflaştırılan β -glukozidaz enzim aktivitesine etkisi	35
3.6.3 Saflaştırılan β -glukozidaz enziminin termal kararlılığının belirlenmesi	36
3.6.4 Saflaştırılan β -glukozidaz enziminin K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi.....	36

İÇİNDEKİLER (Devam)

3.6.5 Saflaştırılan β -glukozidaz enzim inhibitörlerinin IC_{50} değerlerinin hesaplanması	38
3.6.5.1 D(+)glukoz inhibitörünün IC_{50} değerinin belirlenmesi	38
3.6.5.2 δ -Glukonolakton inhibitörünün IC_{50} değerinin belirlenmesi.....	40
3.6.6 İnhibitörlerin inhibisyon tiplerinin belirlenmesi ve K_i değerlerinin hesaplanması	42
3.6.6.1 D(+)glukoz inhibitörünün inhibisyon tipinin ve K_i değerinin belirlenmesi	42
3.6.6.2 δ -Glukonolakton inhibitörünün inhibisyon tipinin ve K_i değerinin belirlenmesi	46
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	51
KAYNAKLAR	60
EKLER	77
ÖZGEÇMİŞ	87

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1: (a) <i>Aspergillus aculeatus</i> NRRL 358 40x mikroskop görüntüsü, (b) <i>Aspergillus aculeatus</i> Malt Extract Agar petri görüntüsü.	13
Şekil 2.2: Standart BSA grafiği.....	19
Şekil 3.1: <i>A. aculeatus</i> 'un oluşturduğu hidroliz zonu.....	26
Şekil 3.2: Farklı pH'ların <i>A. aculeatus</i> 'un β -glukozidaz üretimine etkisi	27
Şekil 3.3: <i>A. aculeatus</i> 'un β -glukozidaz üretimine sıcaklığın etkisi.....	28
Şekil 3.4: İnkübasyon sürelerinin <i>A. aculeatus</i> 'un β -glukozidaz üretimine etkisi.....	29
Şekil 3.5: Farklı çöktürme aralıklarında yapılan aktivite ve protein miktarı ölçümleri.....	31
Şekil 3.6: HEK sonucu elde edilen elüatların aktivite ve protein miktarı ölçüm sonuçları	32
Şekil 3.7: β -glukozidaz enziminin (A) NATIVE-PAGE ve (B) SDS-PAGE jel görüntüleri	34
Şekil 3.8: Farklı pH değerlerinin β -glukozidaz aktivitesine etkisi.....	35
Şekil 3.9: Farklı sıcaklıkların β -glukozidaz aktivitesine etkisi	35
Şekil 3.10: Saflaştırılan β -glukozidaz enziminin termal kararlılık grafiği.....	36
Şekil 3.11: Saflaştırılan β -glukozidaz enziminin K_m ve V_{max} değerlerinin hesaplanmasına yönelik Lineweaver–Burk doğrusu	38
Şekil 3.12: D(+)glukoz inhibitörünün IC_{50} grafiği.....	40
Şekil 3.13: δ -Glukonolakton inhibitörünün IC_{50} grafiği	42
Şekil 3.14: D(+)glukoz inhibitörünün farklı konsantrasyonlarının saflaştırılan β -glukozidaz enzimi üzerine etkisinin Lineweaver-Burk grafiği üzerinde gösterimi	46
Şekil 3.15: δ -glukonolakton inhibitörünün farklı konsantrasyonlarının saflaştırılan β -glukozidaz enzimi üzerine etkisinin Lineweaver-Burk grafiği üzerinde gösterimi	50

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.1: Farklı pH'ların <i>A. aculeatus</i> 'un β -glukozidaz üretimine etkisi	27
Tablo 3.2: <i>A. aculeatus</i> 'un β -glukozidaz üretimine sıcaklığın etkisi.....	28
Tablo 3.3: Farklı inkübasyon sürelerinin <i>A. aculeatus</i> 'un β -glukozidaz üretimine etkisi ..	29
Tablo 3.4: Farklı aralıklarda yapılan çöktürme işlemlerinde kullanılan amonyum sülfat tuzu miktarları ile çöktürme sonucu elde edilen enzim aktivitesi ve protein miktarı verileri.	30
Tablo 3.5: <i>A. aculeatus</i> 'tan saflaştırılan β -glukozidaz enziminin saflaştırma tablosu.....	33
Tablo 3.6: Saflaştırılan β -glukozidaz enziminin K_m ve V_{max} değerlerinin hesaplanmasında ve Lineweaver-Burk grafiğinin çizilmesinde kullanılan veriler.	37
Tablo 3.7: Saflaştırılan β -glukozidaz enziminin K_m , V_{max} ve V_{max} / K_m değerleri.	38
Tablo 3.8: 0,1 M D(+)-glukoz inhibitörünün IC_{50} değerinin hesaplanmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve sonuçlar	39
Tablo 3.9: 0,002 M δ -Glukonolakton inhibitörünün IC_{50} değerinin hesaplanmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve sonuçlar	41
Tablo 3.10: D(+)-Glukoz inhibitörünün K_i değerinin belirlenmesinde kullanılan veriler. .	43
Tablo 3.10: (Devam)	44
Tablo 3.10: (Devam)	45
Tablo 3.11: δ -glukonolakton inhibitörünün K_i değerinin belirlenmesinde kullanılan veriler.	47
Tablo 3.11: (Devam)	48
Tablo 3.11: (Devam)	49

SEMBOLLER ve KISALTMALAR LİSTESİ

APS: AmonyumPersülfat
BSA: Bovin Serum Albumin (Sığır SerumAlbumini)
CMC: Karboksimetil Selüloz
EC: Enzyme Commission (Enzim Komisyonu)
EU: Enzim Ünitesi
g: Gram
HEK: Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi
HIC: Hydrophobic Interaction Chromatography
IC₅₀: İnhibe Edici KonsantrasyonunYüzdesi
K_i: İnhibitör sabiti
K_M: Michaelis-Menten Sabiti
KSF: Katı Substrat Fermentasyonu
M: Molar
MEA: Malt Extract Agar
mg: Miligram
ml: Mililitre
mM: Milimolar
pNPG: *p*-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside
rpm: Rotary Per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)
SDS: Sodyum Dodesil Sülfat
SSF: Solid State Fermentation
TEMED: *N,N,N',N'*, -tetrametiletildiamin
V_{max}: Maksimum Hız
 μ l: Mikrolitre
°C: Santigrat Derece
 β : Beta
 δ : Delta
[S]: Substrat Konsantrasyonu
[I]: İnhibitör Konsantrasyonu

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimleriyle bana rehberlik eden, çalışmamın her aşamasında desteklerini esirgemeyen ve her türlü fedakârlığı gösteren değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Ayşe Dilek AZAZ ve Dr. Öğr. Üyesi Selma ÇELEN YÜCETÜRK'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca desteklerini hiç esirgemeyen ve bugünlere gelmemde büyük emeği bulunan, her zaman yanımda olan sevgili annem Nejla ÇOKER'e, babam Yahya ÇOKER'e ve ablam İlknur KILIÇ'a; yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca desteği, sabrı ve anlayışıyla bana güç veren, desteğini her koşulda hissettiğim değerli eşim Münevver ÇOKER'e ve hayatıma anlam katan, bana hayatımın en güzel duygularını yaşatan sevgili oğlum Atilla ÇOKER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Balıkesir, 2026

Mert ÇOKER

1.GİRİŞ

Biyokimyasal reaksiyonlarda temel kinetik düzenleyiciler olan enzimler, spesifik substratlarıyla moleküler düzeyde etkileşime girerek aktivasyon enerjisini düşüren ve böylece ürün oluşumunu mümkün kılan protein yapılı biyokatalizörlerdir (Bhat, 2000; Egwim, 2025). Kullanım süreçleri boyunca moleküler düzeyde çeşitlenerek üstün katalitik nitelikler kazanan bu biyomoleküller, reaksiyon hızlarını katalizörün bulunmadığı ortamlara kıyasla üst seviyelere taşıyarak geniş spektrumlu biyolojik ve endüstriyel uygulamaların zeminini hazırlamışlardır (Ndochinwa et al., 2024).

Tarihsel süreç boyunca çeşitli alanlarda deneysel veya bilinçli bir şekilde insanların yararlandıkları biyolojik araçlar olan enzimlerin günümüzde biyoteknolojik gelişmelerin ışığında, kullanım alanları genişlemiş ve buna paralel olarak endüstriyel önemleri kritik bir seviyeye ulaşmıştır. Günümüzde temel birer biyokatalizör olan enzimler; gıda işleme, ilaç, tarım, enerji, kimya, tekstil, kağıt, biyoyakıt, deterjan ve kozmetik gibi çok geniş bir endüstriyel yelpazede sürdürülebilir üretimin temel taşlarını oluşturmaktadır. Geleneksel kimyasal katalizörlerle kıyaslandığında enzimler, yüksek seçicilik ve katalitik verimlilik sunmaları bakımından üstünlüğe sahiptirler. Özellikle düşük sıcaklık ve basınç gibi koşullar altında etkinlik gösterebilmeleri, enerji tüketimini minimize etmekte ve üretim maliyetlerinin düşürülmesine doğrudan katkı sağlamaktadır. Bu özellikleri sayesinde enzimler, ürün kalitesini artırmanın yanı sıra çevre dostu ve ekonomik açıdan uygulanabilir endüstriyel yöntemlerin geliştirilmesinde temel biyolojik materyaller olarak kabul edilmektedir. Endüstriyel reaksiyon ortamları sıklıkla yüksek sıcaklık, ekstrem pH değerleri, organik çözücülerin varlığı ve çeşitli reaksiyon inhibitörleri gibi enzim yapısını dejenere edebilecek zorlu koşulları içermektedir (Luetz et al., 2008). Söz konusu bu çevresel stres faktörleri ve operasyonel gereklilikler karşısında, doğal enzimlerin mevcut katalitik performansları yetersiz kalabilmektedir. Bu sebeple; enzimlerin endüstriyel süreçlerin ihtiyaç duyduğu yüksek stabilite, aktivite ve seçicilik kriterlerini karşılayabilmesi için yapısal modifikasyonlara tabi tutulmaları gereklilik haline gelmiştir (Albayati et al., 2024). Sonuçta enzim teknolojisindeki ilerlemeler; bir yandan mevcut enzimlerin mühendislik yöntemleriyle iyileştirilmesine, diğer yandan ekstrem koşullara dayanıklı yeni enzim kaynaklarının keşfine odaklanarak, modern endüstrinin sürdürülebilirlik hedeflerine katkı sağlamaktadır.

Mikrobiyal kaynakların kullanımı; hızlı çoğalma kapasiteleri, düşük maliyetli üretim imkanları ve genetik manipülasyona olan yatkınlıkları nedeniyle bu süreçte birincil derecede tercih edilmektedir. 20. yüzyılın başlarından itibaren sistematik bir gelişim gösteren mikrobiyal enzim üretimi, 1960'larda *Bacillus licheniformis* kullanımı ve ardından 1980'lerde rekombinant DNA teknolojisinin sürece entegrasyonu ile paradigmatic bir değişim yaşamıştır. Bu tarihsel birikim, 2020'li yıllarda COVID-19 pandemisi esnasındaki tanı teknolojilerinde görüldüğü üzere, klinik uygulamalardan endüstriyel biyoproseslere kadar uzanan stratejik bir etki alanına ulaşmıştır (Hassan et al., 2024).

1.1 Enzimlerin Yapısı

Enzimler, doğada çoğunlukla protein yapısında bulunan ve başlangıçta peptit bağları ile birbirine bağlanmış uzun amino asit zincirlerinden oluşan biyomoleküllerdir. Birincil amino asit zincirinin sentezinden sonra bu doğrusal yapının üç boyutlu ve fonksiyonel bir yapı kazanmasını sağlayan, translasyon sonrası modifikasyon olarak adlandırılan aşamalı biyokimyasal süreçler devreye girer. Farklı enzimlerdeki amino asit dizilimi ve kompozisyonu oldukça çeşitlilik göstermekte olup, bu yapısal farklılıklar enzim aktivitesi ve stabilitesi ile doğrudan ilişkilidir.

Enzim molekülünün tamamı katalitik reaksiyona katılmaz; yalnızca 2-4 amino asitten oluşan ve "aktif bölge" olarak tanımlanan sınırlı bir kısım katalitik işlevi yerine getirir. Geri kalan kısım ise apoenzim olarak adlandırılır ve doğrudan katalitik reaksiyona dahil olmaz. Enzimlerin büyük çoğunluğu inaktif formda sentezlenmekte ve çeşitli organik ve/veya inorganik faktörlerin etkisiyle holoenzim (enzimin fonksiyonel formu) haline dönüştürülmektedir. Organik enzim aktivatörleri genellikle vitaminler gibi proteinsiz moleküllerden oluşan koenzimler olarak bilinirken, çinko, demir, kalsiyum ve bakır gibi inorganik moleküller kofaktör olarak tanımlanmaktadır (Gurung et al., 2013).

Enzimler genel olarak yüksek derecede spesifik olan katalizörlerdir; ancak bazı enzimler geniş substrat özgüllüğü göstererek birden fazla substrat üzerinde de etki gösterebilirler. Enzim-substrat etkileşimini ve tanıma mekanizmasını açıklamak üzere çeşitli teoriler öne sürülmüş olup, bunlar arasında en yaygın kabul gören Emil Fischer tarafından geliştirilen "Anahtar-Kilit teorisi"dir (Lemieux and Spohr, 1994). Bu teori, enzim-substrat ilişkisini anahtar-kilit uyumuna dayalı spesifik bir bütünlük üzerinden kurgulasa da kataliz sırasında gerçekleşen dinamik yapısal değişimleri ve enzimin geçiş durumunu nasıl stabilize ettiğini

açıklamakta yetersiz kalmıştır (Gurung et al., 2013; El-Gendi et al., 2021). Enzimin aktif bölgesindeki bu yapısal değişiklikleri açıklamak amacıyla Koshland tarafından "İndüklenmiş Uyum Modeli" önerilmiştir. Bu model, aktif bölgenin esnek bir yapıya sahip olduğunu ve substratın bağlanmasıyla optimal uyumu sağlamak üzere yapısını değiştirebildiğini ileri sürmektedir. Michaelis-Menten kinetik teorisinde ise katalitik reaksiyonun iki aşamalı bir mekanizma izlediği önerilmiştir: İlk aşamada enzim-substrat kompleksi oluşmakta, ikinci aşamada ise enzim ve ürünler serbest bırakılmaktadır (El-Gendi et al., 2021).

1.2 Enzimlerin Adlandırılması

Enzimler uzun bir süre boyunca standart bir kurala bağlı kalınmaksızın isimlendirilmiştir. Bu düzensiz isimlendirme sistemi, enzimin spesifik özelliklerinin yalnızca o enzim üzerinde çalışan araştırmacılar tarafından bilinmesi ve aynı enzime birden fazla isim verilmesi gibi sorunlara yol açmıştır. Bu durum bilimsel iletişimde çeşitli karmaşalara neden olması gerekçesiyle yeni bir düzenleme ihtiyacını doğurmuştur. Her ne kadar bu yeni düzenleme enzimlere geleneksel isimler vermiş bazı bilim insanlarının tepkisini çekmiş olsa da, Uluslararası Enzim Komisyonları (IUPAC ve Uluslararası Enzim Komisyonu) tarafından hayata geçirilmiştir. Bu kurallara göre enzimler, Enzim Kodu (EC) ön ekinin ardından gelen benzersiz dört parçalı sayısal kodlama sistemi ile adlandırılmaktadır (McDonald and Tipton, 2023).

Enzimler 2018 yılına kadar 1-Oksidoredüktazlar, 2-Transferazlar, 3-Hidrolazlar, 4-Liyazlar, 5-İzomerazlar, 6-Ligazlar olarak sınıflandırılmıştır. Buna 2018 yılında Translokazlar da dahil edilerek yedinci ana sınıf olarak değerlendirilmeye başlanmıştır (McDonald and Tipton, 2023).

EC kodundan sonra gelen ilk rakam, enzimin bu yedi sınıftan hangisine ait olduğunu belirtmektedir. Her bir sınıf daha spesifik alt bölümlere ayrılmaktadır. EC numarasının ikinci rakamı, genellikle ilgili bileşik veya grup türü hakkında bilgi içeren alt sınıfı; üçüncü rakam alt-alt sınıfı; son rakam ise ilgili alt-alt sınıf içerisindeki seri numarasını ifade etmektedir (McDonald and Tipton, 2023).

1.2.1 Oksidoredüktazlar

Yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarını gerçekleştiren enzimlerin tamamı bu sınıfa dahildir. Oksitlenen substrat, hidrojen veya elektron vericisi olarak kabul edilmektedir. Sınıflandırma, verici-alıcı prensibi esasına dayanmaktadır (IUBMB, 2026).

1.2.2 Transferazlar

Bunlar, metil grubu gibi fonksiyonel bir grubu bir bileşikten başka bir bileşiğe aktaran enzimlerdir. Sınıflandırma, verici-alıcı grup prensibine dayanmaktadır (IUBMB, 2026).

1.2.3 Hidrolazlar

Bu enzimler çeşitli kimyasal bağların hidrolitik parçalanmasını katalize ederler. Bu enzimlerin bazıları geniş substrat özgüllüğüne sahip olduklarından, farklı araştırmacılar tarafından tanımlanan iki preparatın aynı enzim olup olmadığına veya farklı kategoriler altında listelenmesi gerekip gerekmediğine karar vermek güçlük oluşturur. Sistematik isim her zaman 'hidrolaz' terimini içerirken, kabul edilen yaygın isim çoğu durumda substratın adına '-az' son eki eklenerek oluşturulmaktadır. Bu son ek ile substratın adının hidrolitik bir enzimi ifade ettiği anlaşılır (IUBMB, 2026).

1.2.4 Liyazlar

Liyazlar, hidrolizden daha farklı bir yol ile grupların substratlardan uzaklaştırılarak, çift bağların oluşumuna neden olan reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir. (IUBMB, 2026).

1.2.5 İzomerazlar

Bir molekül içindeki atom ya da grupların yeniden düzenlenmelerini sağlayıp aynı moleküler formüle sahip izomerlerin birbirine dönüşümünü sağlayan enzimlerdir. (IUBMB, 2026).

1.2.6 Ligazlar

Ligazlar, iki büyük molekülü yeni bağlarla birleştiren enzim grubudur. 'Ligaz' terimi genellikle yaygın ad olarak kullanılmakta, ancak bazı durumlarda 'sentetaz' veya 'karboksilaz' terimleri de tercih edilmektedir (IUBMB, 2026).

1.2.7 Translokazlar

Bu enzimler, iyonların veya moleküllerin biyolojik membranlar boyunca hareketini veya membranlar içindeki ayrılmasını katalize ederler (IUBMB, 2026).

1.3 Enzimlerin Kullanım Alanları

Enzimler, doğal kökenli, toksik olmayan, biyolojik olarak parçalanabilir, yüksek substrat özgüllüğüne sahip ve düşük reaksiyon koşullarında katalitik aktivite gösteren biyokatalizör olmaları ve geleneksel kimyasal sentez yöntemlerine kıyasla çevre dostu ve sürdürülebilir alternatifler sunmalarından dolayı günümüzde birçok alanda kullanılmaktadırlar (Porter et al., 2016).

1.3.1 Gıda Sektörü

Meyve suyu üretim proseslerinde β -Glukozidaz enzimi, acı bileşenlerin hidrolizi ve üzüm şaraplarında aroma prekürsorlerinin serbest bırakılması amacıyla endüstriyel ölçekte uygulanmaktadır (Harhangi et al., 2002). Laktozsuz süt üretim teknolojisinde ise β -glukozidaz ve β -galaktozidaz enzimleri, laktozun glukoz ve galaktoza hidrolizi için kullanılmaktadır (Li et al., 2013). Ayrıca, bu enzimler çay ve meyve suyu endüstrisinde aroma profili geliştirici ajan olarak da değerlendirilmektedir (Liang et al., 2023). Zeytinyağı ekstraksiyonunda verim artışı sağlamak üzere çalışmamızda da enzim kaynağı olarak kullanılan *Aspergillus aculeatus*'tan elde edilen ksilanaz, selülaz ve pektinaz enzimlerinin sinerjistik kombinasyonunun başarıyla kullanıldığı rapor edilmiştir (Ejaz et al., 2021).

1.3.2 Kozmetik Endüstrisi

Çalışmamızın konusunu oluşturan ve biyoteknolojinin çeşitli dallarında geniş uygulama alanına sahip olan β -glukozidaz, kozmetik sektöründe de özellikle cilt beyazlatıcı özelliğe sahip glukozidik bir bileşik olan Arbutin'i hidrokinon ve glukozu hidrolize ederek ciltte aydınlanma ve parlaklık artışına neden olmaktadır (Kannan et al., 2023).

1.3.3 İlaç Sanayi

Farmasötik endüstride *Candida antarctica* CalB'den elde edilen immobilize lipaz enzimi, BASF ve Merck gibi önde gelen firmalar tarafından stereoselektivite sağlamak amacıyla, farmasötik ara ürün sentezinde kullanılmaktadır (Basso and Serban, 2019).

Doğu Asya geleneksel tıbbında geniş kullanıma sahip olan *Panax ginseng* C.A. Meyer (Araliaceae) kökü, biyoaktif ginsenosid bileşikleri içermekte olup bunların saf formda izolasyonu, geleneksel yöntemlerle yüksek maliyet gerektirdiğinden; β -Glukozidaz enziminin kullanımı; majör ve minör ginsenosidlerin saf olarak elde edilmesinde etkili ve ekonomik bir biyokatalitik yaklaşım sağlamaktadır (Kannan et al., 2023).

1.3.4 Hayvancılık

Hayvancılıkta selülozlar özellikle yemlerin sindirilebilirliği üzerinde etkili olup bunu yemde bulunan selülozun glikoz açığa çıkacak şekilde parçalanmasını sağlayarak gerçekleştirirler. Bu amaçla hayvan yemlerine eklenen enzim preparatları sayesinde özellikle geviş getiren hayvanların rumenlerinde bulunan mikroorganizmaları destekleyerek yemlerden maksimum şekilde yararlanmalarına olanak sağlanır. Bu sayede özellikle sığırlarda yemden yararlanma oranının artması sebebiyle hayvan canlı ağırlığında artış ve süt veriminin iyileşmesi sağlanabilmektedir (Kung et al., 2000; Beauchemin et al., 2003).

1.3.5 Tekstil Endüstrisi

Tekstil üretim proseslerinde β -glukozidaz enziminin kullanılması, üretim sonucu oluşan kirlilik ile birlikte su tüketiminin ve enerji kullanımının azaltılması sayesinde çevresel sürdürülebilirlik açısından önemli avantajlar sağlar. Özellikle kot kumaşların yapısına zarar vermeden renginin açılmasının sağlandığı biyotaşlama işleminde selüloz enzimlerinin kullanımı, klasik taşlama yöntemi ile ağartmaya göre çevre dostu bir alternatif oluşturur (Rodrigues and Odaneth, 2021).

1.3.6 Kağıt Sanayi

Başta endoglukonazlar olmak üzere selülozlar kağıt hamurunun yapısındaki selüloz zincirlerinde değişiklikler yaparak lif yapısında gevşemeye neden olduğundan lifler arasında bulunan lignin ağartıcılar tarafından daha kolay uzaklaştırılabilmektedir (Viikari ve et al., 1994; Bajpai, 2012). Ayrıca ağartma aşamasında kullanılan klor dioksit ile birlikte diğer oksidan maddelerin kullanımlarının da %10-20 oranında azaltılması sağlanmaktadır. Bu sayede de endüstriyel atık suların toksisite seviyelerinde klorlu bileşiklerin kullanımlarının azaltılması nedeniyle düşüş olacağından sürdürülebilir üretim hedeflerine de katkı sağlanmış olur (Nagar et al., 2010).

1.4 Selülozun Yapısı

Selüloz, yaklaşık 200 yıl önce Anselme Payen tarafından ilk kez izole edilmiş ve adlandırılmıştır (Cosgrove, 2014). Bitkiler başta olmak üzere çeşitli derecelerde algler, bakteriler, sosyal amipler ve tunikatlar gibi organizmalar tarafından üretilen selüloz, doğada en bol bulunan polisakkaritlerden biridir (Saxena et al., 2001). Kağıt, tekstil, ahşap ürünleri, polimerler, hayvan yemi ve biyokütle enerjisi gibi alanlarda muazzam ekonomik değere sahip olduğundan, selüloz mikrofibrilinin yapısal özellikleri ve sentez mekanizması

günümüzde devam eden araştırma ve tartışmaların konusu olmaya devam etmektedir (Cosgrove, 2014).

Selüloz fibrilleri plazma zarında yer alan protein kompleksleri tarafından sentezlenen çok sayıda doğrusal β -1,4 glikozidik bağı içeren glukoz zincirinden oluşur. Bu zincirler, değişken uzunlukta, belirsiz kesit alanı ve şekle sahip düzenli bir mikrofibril halinde paketlenmiştir (Cosgrove, 2014).

Selüloz, yenilenebilir bir biyolojik kaynak olup düşük maliyet, yüksek biyo-uyumluluk, hızlı bozunma, nispeten düşük çevre kirliliği ve geri dönüştürülebilirlik gibi önemli avantajlar sergiler. Selüloz mikroküreleri, iyi biyo-uyumluluk, biyolojik bozunabilirlik, güvenlik ve toksik olmama gibi özellikleri nedeniyle tıp ve biyoloji alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Ruan et al., 2022). Mikrobiyal selüloz ise üstün mukavemeti, biyoyuymuluğu ve yüksek şişme kapasitesi nedeniyle önemli bir biyomedikal malzeme olarak ilgi görmektedir (Khopade et al., 2024).

1.5 Selülazlar

Selülaz enzimleri, dirençli selüloz yapısını hidroliz yoluyla çözünür şekerlere dönüştüren biyokatalizörlerdir. Mikroorganizmalar tarafından çözünmeyen selülozun hidrolizi, serbest veya hücreye bağlı ekstraselüler selülazların üretimini gerektirir. Son yirmi yılda aerobik ve anaerobik bakteriler ile mantarlardan elde edilen selülaz sistemlerinin biyokimyasal analizleri, selülozun mikroorganizmalar tarafından metabolize edilebilir çözünür şeker monomerlerine hidrolizi için birden fazla enzimatik aktivitenin sinerjik olarak çalışması gerektiğini ortaya koymuştur (Hasunuma et al., 2013).

Selülitik enzimler temel olarak üç ana gruba ayrılmaktadır: endoglukanazlar (EC 3.2.1.4) (1,4- β -D-glukan-4-glukanohidrolaz veya karboksimetil selülaz), ekzoglukanazlar [sellobiohidrolaz (EC 3.2.1.91) ve selodekstrinaz (EC 3.2.1.74)] ve β -glukozidazlar (EC 3.2.1.21) (Bhardwaj et al., 2021).

Endoglukanazlar selüloz molekülünün iç kısımlarındaki β -1,4-glikozidik bağlarını rastgele keserek selüloz zincirini daha küçük parçalara (oligomerlere) ayırıp diğer enzimlerin daha etkili çalışması için daha fazla uç nokta oluşturur.

Ekzoglukanazlar, selülozun indirgen ve indirgen olmayan uçlarıyla reaksiyona girerek glikoz veya sellobiyoz birimlerini açığa çıkarmaktadır. β -Glukozidazlar ise birbirine β -1,4 glikozidik bağı ile bağlı iki glikoz monomerinden oluşan sellobiyoz molekülündeki β -1,4 glikozidik bağı parçalayarak son ürün olarak glikoz monomerinin açığa çıkmasını sağlarlar (Jayasekara and Ratnayake, 2019).

1.5.1 β -Glukozidazlar

β -Glukozidaz (EC 3.2.1.21), doğada yaygın olarak bulunan ve selülaz enzim ailesine dahil olan önemli bir glikosil hidrolaz türüdür. Bu enzim, indirgen olmayan β -D-glikozidik bağların hidrolizini katalize ederek glikozitlerden ve oligosakkaritlerden glikoz kalıntılarının salınımını sağlarlar. Substrat özgülüğüne göre β -glukozidazlar; alkilglukozidazlar, selobiyazlar veya alkil- β -glikozitleri ve oligosakkaritleri hidrolize eden enzimler olarak sınıflandırılmaktadır. Önemli bir hidrolaz olarak, geniş bir ilgi alanına sahip olup derinlemesine araştırmalara konu olmaktadır (Lu et al., 2024; Li et al., 2025).

Liebig ve Wohler'in 1837 yılında acı badem suyunda β -glukozidazı ilk kez keşfetmelerinden bu yana, enzimin çeşitli organizmalarda bulunduğu tespit edilmiştir. β -Glukozidaz bitkilerde, mikroorganizmalarda ve hayvanlarda yaygın olarak bulunmakta olup zengin bir kaynak çeşitliliğine sahiptir (Lu et al., 2024; Li et al., 2025).

Bitkisel kaynaklardan ginseng ve soya fasulyesi, hayvansal kaynaklarda ise arılar, domuz karaciğerleri ve domuz ince bağırsakları bu enzimi içermekte ve hayvanlarda glikoz metabolizması gibi fizyolojik süreçlere katılmaktadır. Günümüzde ise β -glukozidaz kaynağı olarak daha çok mikroorganizmalar tercih edilmektedir. Farklı mikroorganizmalardan elde edilen β -glukozidazların özellikleri ve işlevlerinde önemli farklılıklar bulunmakta olup, bu durum farklı uygulama alanlarında β -glukozidazın kullanımı için çeşitli seçenekler sunmaktadır (Li et al., 2025).

1.5.1.1 β -Glukozidazların Uygulamaları Alanları

β -Glukozidazlar endüstride çeşitli alanlarda kullanılabilmesi sebebiyle büyük öneme sahip hidrolazlardır. Farklı substratlar üzerinde etki gösterebilmeleri, farklı alanlarda kullanılabilmeleri avantajını sağlar. Biyoyakıt üretiminde selülozu fermente edilebilir şekerlere dönüştürebilmesinden, ilaç sektöründe farmasötik bileşenlerin oluşumuna katkı

sağlamasından, gıda ve kozmetik gibi alanlarda da ürün kalitesi ve kullanılabilirliğini artırmasından dolayı β -glukozidazlardan yararlanılmaktadır (Li et al., 2025).

Fosil yakıtların kullanımına bağlı olarak artan çevre kirliliği ve mevcut kaynakların tükenme eğiliminde olması nedeniyle sürdürülebilir alternatif olarak biyoyakıt kullanımına yönelim artmaktadır. β -glukozidazlar, özellikle lignoselülozik biyokütlenin biyoetanol gibi yenilenebilir enerjiye dönüştürülmesi sürecinde, enerji verimliliğini artırmaya ve karbon emisyonlarını azaltmaya katkı sağlamaktadır. Selülaı oluşturan üçlü enzim grubundan olan ve selülozun tam parçalanmasını sağlayan β -glukozidaz, selülozdaki β -1,4-glikozidik bağları hidrolize ederek çözünmeyen selülozu çözünür şekerlere ayrıştırmakta ve bu şekerler daha sonra biyoyakıt üretmek için fermente edilebilmektedir. β -glukozidazın bu önemli rolü sebebiyle mevcut taleplerin karşılanması için enzim üretimi ihtiyacı doğmuştur. Selülaı üretimi için en yaygın kullanılan fungus *Trichoderma reesei* olmasına rağmen fungusun ürettiği β -glukozidazların çoğunun gelişim sırasında hücre duvarına bağlanması sebebiyle fungusun geliştiği ortama direkt olarak salgıladığı β -glukozidaz aktivitesi düşüktür. Bunun üzerine yapılan araştırmalarda hem bakteriyel hem de fungal suşların incelenmesi sonucunda en yüksek aktivitede β -glukozidaz enziminin *Aspergillus* cinsi mantarlardan elde edildiği belirlenmiştir (Srivastava et al., 2019).

Şarap yapım sürecinde β -glukozidaz, üzümlerdeki glikozitleri hidrolize ederek aroma bileşiklerini serbest kalmalarını sağlamakta ve şarabın aromasını ve tadını zenginleştirmektedir (Zhang et al., 2019). β -glukozidazların aglikon salınımını sağlamaları meyve sularında aroma ve lezzetin iyileşmesine, renk bozunmalarının önüne geçilmesine ve turunçgil meyve sularının organoleptik özelliklerinin iyileştirilmesine fayda sağlamaktadır (Keerti et al., 2014). Li ve arkadaşları (2013) laktoz varlığındaki β -glukozidazın yüksek kararlılığı ve yüksek katalitik aktivitesi sebebiyle laktoz disakkaritinin hidrolizinde ve böylelikle de laktozsuz süt üretiminde kullanılabileceğini rapor etmişlerdir. Birçok gıda ve içecek ürününün bir parçası olan soya fasulyesi inaktif glikozit formda izoflavonlar (daidzin, geniştin, glisitin) içermektedir. β -glukozidaz enzimi ile bu izoflavonlar aglikon formlara (daidzein, genistein, glisitein) dönüştürülebilmekte, bu sayede de daha yüksek biyolojik aktivite ve sindirimde daha hızlı emilim görülmektedir (Singh et al., 2016).

İlaç endüstrisinde β -glukozidazlar aktif aglikonları serbest bırakarak biyoaktif bileşiklerin, antibiyotiklerin, flavonoidlerin ve diğer terapötik moleküllerin sentezinde kritik bir rol

oyunlar. β -glukozidazlar ile serbest form kazanan bu aktif aglikonlar; antioksidan, antiinflamatuvar ve antimikrobiyal moleküllerin farmakolojik özelliklerini güçlendirirler (Nimker et al., 2025). Doğal ilaçların aktif bir bileşeni olan polidatin, β -glukozidazlar tarafından daha güçlü koruyucu etkileri olan resveratrole dönüştürülebilmektedir. Polidatinin resveratrole doğrudan enzimatik dönüşümü zamandan tasarruf sağlarken, aynı zamanda verim artışına da neden olur (Zhou et al., 2022). Benzer şekilde temel yapıdaki ginsenosidlerin (Re ve Rf), glikozdan arındırılmış obeziteyi hafifletmeye ve hafıza güçlendirmeye yarayan ginsenosidlere (Rg2 ve Rg1) dönüştürülmesinde β -glukozidaz enziminin kullanılabileceği ve bu yöntem ile daha düşük maliyetle daha hızlı sonuç alınabileceği raporlanmıştır (Bi et al., 2019).

β -glukozidaz enzimi aynı zamanda mürekkep gidermek amacıyla kağıt üretiminde ve artık kağıtların ayrıştırılmasında kullanılmaktadır. Meleiro ve arkadaşları (2014) *Humicola insolens*'ten saflaştırdıkları β -glukozidaz enziminin işlenmemiş ofis kağıdını, peçeteyi, dergi kağıdını ve kartonu %100 glikoz verimi ile hidrolize ettiğini ve bu eldenin aynı zamanda selülozik etanol üretiminde hammadde olarak da kullanılabileceğini raporlamışlardır. Mallek-Fakhfakh ve arkadaşları (2016) *Talaromyces thermophilus*'tan elde ettikleri β -glukozidaz içeriği yüksek olan enzim suyunun *Trichoderma reesei*'den elde edilen selülozlara eklendiğinde atık kağıdın sakkarifikasyonunun %423 oranında arttığını gözlemlemişlerdir.

Hayvan yemlerine uygulanmasıyla yem liflerinin β -glukozidaz tarafından hidrolize edilmesi sonucu geviş getiren hayvanların yemi daha kolay sindirdikleri rapor edilmiştir (Kaenyng et al., 2023). Ayrıca Qian ve arkadaşları (2011) çalışmalarında kırmızı ete β -glukozidaz uygulanmasının etteki L (koyu-siyah renk), a (kırmızı renk) ve b (sarı renk) değerlerini etkilediği ve bu sebeple etin kalitesini değiştirdiğini savunmuşlardır. Çalışmalarının sonucunda β -glukozidazın L değerini önemli ölçüde azalttığını ve a değerini ise önemli ölçüde artırdığını, buna bağlı olarak et kalitesini iyileştirdiğini raporlamışlardır.

Biyoteknolojide sıklıkla kullanılan β -glukozidaz enziminin kozmetik sektöründe de kullanılması yaygınlaşmaktadır. β -glukozidaz glikozidik bir bileşik olan arbutini, hidrolize ederek cilde daha beyaz ve parlak bir görünüm veren hidrokinon ve glikoz birimlerini açığa çıkarmaktadır (Kannan et al., 2023).

1.6 Selülaz Üreticisi Mikroorganizmalar

Selülaz enzimi, çok sayıda bakteri, protozoa, mantar, hayvan ve bitki tarafından üretilmektedir. Bunlar arasından bakteriler ve mantarlar selüloolitik enzimlerin en verimli üreticileri olarak öne çıkmakta, ancak mantarlar ekstraselüler enzim üretim özellikleri nedeniyle selülaz üretimi için daha uygun mikroorganizmalar olarak ilgi görmektedirler. Selülaz üretim süreci oldukça maliyetli olup hidroliz toplam maliyetin en az %50'sini oluşturmaktadır. Bu nedenle artan talebin de yarattığı baskı ile farklı ekolojik habitatları keşfederek yeni mikrobiyal kaynaklar bulma gerekliliği büyük önem taşımaktadır (Bhardwaj et al., 2021).

1.6.1 *Aspergillus* Genel Özellikleri

Pier Antonio Micheli 1729 yılında ilk olarak "*Aspergillus*" adını kullanmış, 1768 yılında Albrecht von Haller cinsi doğrulamış ve 1832 yılında Elias Magnus Fries cins adını onaylamıştır (Samson et al., 2014).

Aspergillus türleri, topraktan, havadan ve bitki materyallerinden izole edilen yaygın saprofitik küflerin geniş bir grubunu oluşturmaktadır (Merad et al., 2021).

Morfoloji, *Aspergillus* türlerinin tanımlanmasında kritik bir rol oynamaktadır. Türleri karakterize etmek için kullanılan koloni özellikleri arasında koloni büyüme hızları, doku yapısı, sporlanma derecesi, sklerosyum veya kleistotesyum üretimi, miselyum renkleri, sporlanma özelliği, çözünür pigmentlerin renkleri, eksüdat oluşturup oluşturmadığı ve rengi, koloni altı rengi ve hücre hücreleri varlığı bulunmaktadır. *Aspergillus*'ta seksüel ve aseksüel üreme yapılarının mikroskopik özellikleri tanı açısından önem taşımaktadır. Tanımlamada; konidial başların şekli, vezikül ve fialidler arasında metula varlığı veya yokluğu (tek sıralı veya çift sıralı), sapların rengi ayrıca tüm bu yapıların şekil ve büyüklükleri önem taşımaktadır (Samson et al., 2014).

1.6.1.1 *Aspergillus aculeatus* Iizuka (1953)'un Genel Özellikleri

Selülaz üreten mantarlar arasında *Aspergillus aculeatus*, çok çeşitli substratlarda değişken koşullar altında gelişebilme kapasitesi nedeniyle selüloolitik enzimlerin optimizasyonu için en önemli model organizmalardan birini temsil etmektedir (Mhuantong et al., 2021).

A. aculeatus koyu kahverengi-siyah konidiler üretmekte ve yaklaşık olarak 10-40°C sıcaklıklarda gelişim göstermektedir (Leong et al., 2004).

1.7 β -Glukozidaz Eldesi

1.7.1 Katı Substrat Fermentasyonu (KSF)

Suyun sınırlı miktarda bulunduğu, mikroorganizmanın gelişimini sağlayacak besin değerine ve nem oranına sahip olan katı substratlar içeren ortamlar olarak tanımlanır. Tarımsal ve endüstriyel atıkların giderilmesinde kolay uygulanabilirliği, düşük enerji gerektirmesi ve düşük su tüketimi sebepleriyle çevre dostu bir seçenek oluşturmaktadır (Pandey, 2003).

Viniegra-González ve arkadaşları (2003) KSF ve SmF (submerged fermentation) ile geliştirilen *Aspergillus niger* tarafından üretilen invertaz, pektinaz ve tannaz enzimlerinin genel bir karşılaştırmasını yapmış ve KSF yönteminde daha yüksek verim elde ettiklerini açıklamışlardır. Ayrıca bu deneylerinde mekanik bir enerji harcaması gerektirmeyen bir süreç olması gibi KSF yönteminin önemli bir avantajını da vurgulamışlardır.

KSF ortamı için substrat seçimi oldukça önem teşkil etmektedir. Maliyet göz önünde bulundurularak çeşitli tarımsal ve endüstriyel atıklar tercih edilebilir ancak KSF işleminde substrat sadece mikrobiyal kaynağa besin sağlamakla kalmayıp aynı zamanda hücreler için bir tutunma görevi de göreceğinden bazı lignoselülozik kaynaklar tercih edilirken bir ön işlem (fiziksel veya kimyasal parçalama) geçirilmesi gerekebilmektedir (Pandey et al., 2000).

KSF yöntemi funguslar ve mayalar için oldukça uygun gelişim ortamı sunmaktadır (Singhania et al., 2009). Özellikle katı substratın içi hava dolu boşluklar içermesi aerobik funguslar için oksijen kaynağı oluşturmaktadır (Richard et al., 2004; Brijwani and Vadlani, 2011).

Günümüzde KSF uygulaması atıkların biyolojik ayrıştırılması, mahsul kalıntıların biyolojik dönüşümü ve enzim üretimi gibi çeşitli ihtiyaçlarda giderek yaygınlaşmaktadır (Couto and Sanroman, 2005; Singhania et al., 2009).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Materyal

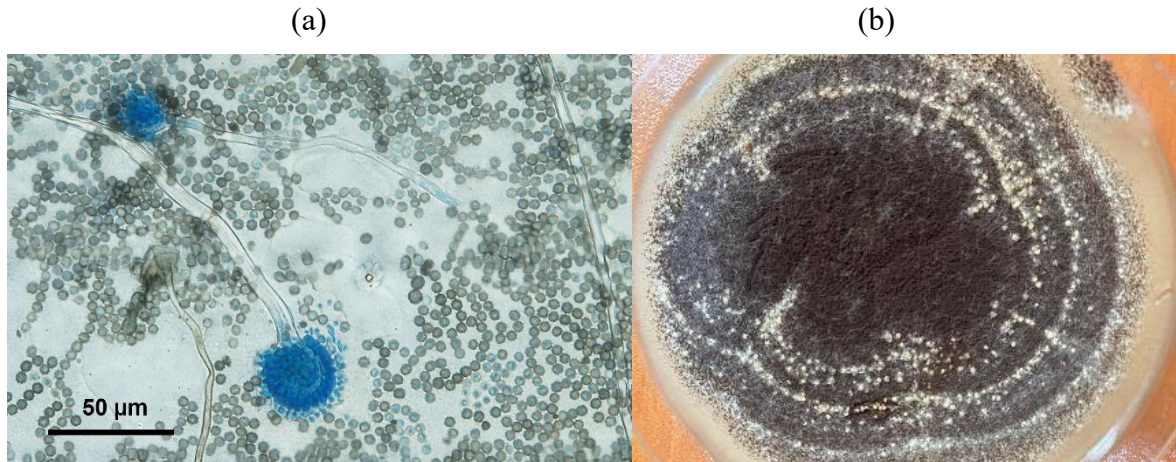
2.1.1 Czapek Dox Agar (%5 CMC) besiyerinde geliştirilen mikrofungusların β -glukozidaz aktivitesinin belirlenmesi

2.1.1.1 *A. aculeatus* NRRL 358'un β -glukozidaz aktivitesinin belirlenmesi

Aspergillus aculeatus β -glukozidaz aktivitesini belirlemek amacıyla, karbon kaynağı olarak Karboksimetil Selüloz'u (CMC) %5 oranında ihtiva eden Czapek Dox Agar'a inoküle edilip hidroliz zonu oluşumu yönünden incelenmiştir. Besiyeri üzerinde net hidroliz zonları oluşturduğu saptanan *A. aculeatus*'un enzimatik aktiviteye sahip olduğu saptanarak çalışmada β -glukozidaz kaynağı olarak kullanılmasına karar verilmiştir.

2.1.2 *A. aculeatus* Lizuka (1953)

A. aculeatus, Czapek Dox Agar besiyerinde oda sıcaklığında hızlı gelişmekte, 12 günde 8-9 cm çapında koloni yapmakta, koloni düz, yoğun ve eşit dağılmış konidi yapıları ve beyaz-krem renkli sklerosyumlar oluşturmakta, koloni mor-siyah tonlarında, koloni altı ise renksizdir (Şekil 2.1) (Hasenekoğlu, 1991).



Şekil 2.1: (a) *Aspergillus aculeatus* NRRL 358 40x mikroskop görüntüsü, (b) *Aspergillus aculeatus* Malt Extract Agar petri görüntüsü

2.1.3.10 Hidrofobik etkileşim kromatografisinde (HEK) kullanılacak jelin sentezlenmesi

Saflaştırmanın son aşaması olan HEK metodunda kullanılacak olan hidrofobik jel sentezi, Sepharose 4B matriksinin aktifleştirilmesi, bu aktif matrikse 1-naftilamin bileşiğinin

bağlanabilmesi için bir ara kol görevi görecektir olan L-tirozin ligandının ve son olarak da 1-naftilamin bileşiğinin bağlanması aşamaları ile gerçekleştirilmiştir.

Sepharose 4B matriksinin aktifleştirilmesi

Sentez sürecinin ilk aşamasında, Sepharose 4B matriksi (10 ml) distile su ile yıkanıp dekante edilmiş ardından eşit hacimde distile su ilavesi yapılmıştır. Sürekli karıştırılan jelle siyanojen bromür (CNBr) (4g) ilave edilmiş ve reaksiyon ortamının pH'ı NaOH eklenerek 11'e yükseltilmiştir. pH stabil hale gelene kadar NaOH ilavesine devam edilmiştir. Alkali eklenmesiyle ortaya çıkan ekzotermik reaksiyon sonucu artan sıcaklığı kontrol altında tutmak amacıyla ortama bol miktarda buz ilave edilmiş; ardından karışım Buhner hunisine aktararak süzme işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında soğutulmuş sodyum bikarbonat tamponu (0,1 M, pH 10.0, 250 ml) ile yıkanarak bir sonraki basamağa hazır hale getirilmiştir (Sinan, 2005).

L-tirozin bağlama

CNBr ile aktive edilmiş matrikse, bir ara kol görevi görecektir olan L-tirozin molekülünün bağlanması amacıyla; 15 mg L-tirozin içeren soğuk sodyum bikarbonat tamponu (0,1 M, pH 10, 20 ml) ilave edilmiştir. Süspansiyon 90 dakika boyunca karıştırıldıktan sonra, etkin bir kovalent bağlanmanın gerçekleşmesi için 4°C'de 16 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından matriks, oda sıcaklığındaki saf su ile yaklaşık 2 saat boyunca yıkanmıştır. Yıkama sularının 280 nm'deki absorbans değerleri takip edilerek, serbest haldeki tüm L-tirozin uzaklaştırılana kadar yıkama işlemine devam edilmiştir. Son aşamada yıkama işlemi sodyum bikarbonatla (0,2 M; pH 8,8; 100 ml) tekrarlanmış, L-tirozin ile modifiye edilerek jel aynı tamponun (40 ml) içine alınmıştır (Sinan, 2005).

1-Naftilamin bileşiğinin bağlanması

Diazolama işlemi için 0°C'de 25 mg 1-naftilamin, 10 ml 1 M HCl içerisinde çözündürülmüştür (çözünürlüğü artırmak amacıyla hazırlama aşamasında bir miktar etanol ilave edilerek ısı artışı sağlanmıştır). Bu çözeltiye damlalar halinde, 5 ml'de 75 mg NaNO₂ içeren soğuk çözelti (0°C) eklenmiştir. 10 dakikalık reaksiyonun sonunda diazolan 1-naftilamin bileşiği, Sepharose 4B-L-tirozin'e (40 ml) hızlıca eklenmiştir. Karışım neticesinde yaklaşık 6,0-7,0 seviyelerine düşen pH, 4 M NaOH yardımıyla 9,5 değerine yükseltilerek sabit tutulmuştur. Buz banyosu üzerinde 3 saat boyunca karıştırıldıktan sonra, sentezlenen matris önce 1 L distile su ardından 200 ml sodyum fosfat (0.01 M, pH 6.0) ile yıkanmıştır.

Sentezlenen hidrofobik jel, aynı sodyum fosfat tamponu içerisinde +4°C'de muhafaza edilmiştir (Sinan, 2005).

2.2 Yöntem

2.2.1 *A. aculeatus*'un β -glukozidaz aktivitesinin belirlenmesi

Mikrofungusun β -glukozidaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla, substrat olarak %5 Karboksimetil Selüloz (CMC) ilave edilmiş Czapek Dox Agar besiyeri kullanılmıştır. Hazırlanan besiyerine fungusun tek nokta ekimi yapılarak 7 gün süreyle 25°C'de gelişmeye bırakılmıştır. Sonrasında selülitik aktiviteye bağlı zonların saptanması amacı ile koloni yüzeyine Kongo kırmızısı (%1) uygulanarak 15 dk. 25°C'de beklenilmiştir. Boyama işleminin ardından fazla boya 1M NaCl çözeltisi ile uzaklaştırılmıştır. Renk açılmasını belirginleştirmek amacıyla koloni yeniden NaCl ile 15 dakika daha muamele edilmiştir. Ardından NaCl çözeltisi uzaklaştırılarak koloni incelenmiş ve çevresinde şeffaf zon oluşumu gözlemlendiğinden test mikroorganizmasının β -glukozidaz aktivitesi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Teather and Wood, 1982).

2.2.2 Mikrofungus üretimi ve spor süspansiyonu hazırlanması

Malt Ekstrakt Agar (MEA) besiyerine ekimi yapılan *Aspergillus aculeatus* 7 gün 25°C'de geliştirilerek spor eldesi amacıyla, koloni yüzeyi Tween 80 çözeltisi ile kaplanarak sporların çözeltiliye geçişi sağlanmıştır. Elde edilen spor süspansiyonunun konsantrasyonu Thoma lamı kullanılarak sayıldı ve nihai spor yoğunluğu 10^7 CFU/ml olarak hazırlandı. Hazırlanan bu süspansiyondan 5 ml alınıp, içerisinde 150 ml Czapek Dox Broth bulunan 250 ml'lik erlenmayere aktarıldı ve 30°C sıcaklık ve 150 rpm'de 72 saatlik inkübasyona bırakıldı. Süreç sonunda elde edilen kültür, arpa samanı kullanılarak hazırlanan KSF ortamına inoküle edilmiştir (Ijaz et al., 2011).

2.2.3 KSF ortamının hazırlanması

Katı substrat olarak kullanılacak arpa samanları, öncelikle bir öğütücü yardımıyla parçalanıp elekten geçirildi. Ardından elek altında kalan kısım, 80°C'ye ayarlanmış olan Pasteur fırınında 24 saat boyunca kurutulduktan sonra her erlenmayelere 5'er gram paylaştırıldı. Substratın nem içeriği, farklı pH değerlerini sağlamak amacıyla hazırlanan spesifik tampon çözeltileriyle %55 oranında ayarlandı. Bu doğrultuda; pH 4,0; 4,5; 5,0 ve 5,5 değerleri için sitrik asit monohidrat tamponu; pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 ve 8,0 için sodyum dihidrojen fosfat tamponu; pH 8,5 ve 9,0 için ise disodyum monohidrojen fosfat tamponu kullanılmıştır.

Tampon çözeltiler ile nemlendirilerek hazırlanan katı substrat ortamlarının, otoklavda sterilizasyonları sağlanmıştır (Ijaz et al., 2011).

2.2.4 KSF ortamına inokülasyon ve kısmi saflaştırılmış β -glukozidaz eldesi

Substrat olarak arpa samanının kullanıldığı steril KSF ortamına inokülasyon *A. aculeatus*'un sıvı kültüründen 3 ml yapılarak 7 gün süreyle 30°C'de gelişmeye bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda, enzimlerin ekstraksiyonunu sağlamak amacıyla ortama 75 ml distile su ilave edildi. Karışım, oda sıcaklığında 2 saat süre ile 150 rpm'de inkübe edildi. Ardından partiküllerden arındırılması için ham ekstrakt, gazlı bezden süzülerek 10 dakika 10.000 rpm ve 4°C'de santrifüjlendi. Daha sonra pelletten ayrılan süpernatant, deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere 'kısmi saflaştırılmış enzim (kaba enzim) kaynağı' olarak -20 °C muhafaza edildi (Ijaz et al., 2011).

2.2.5 KSF Üretim Koşullarının *A. aculeatus*'un β -Glukozidaz Sentezine Etkisi

A. aculeatus'un KSF ortamındaki üretim koşullarının en iyi β -glukozidaz enzim sentezi üzerine etkisinin belirlenmesi için farklı nemlendirme sıvıları, pH'lar ve farklı inkübasyon sıcaklıkları ve sürelerinde optimizasyonlar yapıldı. En iyi enzim aktivitesi gösterdiği optimum koşullar belirlendikten sonra mikrofungusun bu optimum koşullar altında gelişim göstermesi sağlandı.

2.2.5.1 Optimum nemlendirme sıvısı ve pH'nın saptanması

KSF üretim koşullarının optimizasyon sürecinde ilk aşama, uygun pH'daki nemlendirme sıvısının belirlenmesidir. Bunun için, farklı pH aralıklarını sağlamak üzere farklı tamponlar kullanıldı. pH 4,0; 4,5; 5,0 ve 5,5 için sitrik asit monohidrat, pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 ve 8,0 için sodyum dihidrojen fosfat, pH 8,5 ve 9,0 için ise disodyum monohidrojen fosfat tamponları kullanıldı. KSF ortamının nem içeriği ilgili tamponlar kullanılarak %55 oranına ayarlandı ve 121°C'de 20 dakika otoklavlandı. Sterilizasyon işleminin ardından oda sıcaklığına soğutulan KSF ortamlarına *A. aculeatus* sıvı kültür örneğinden 3 ml kullanılarak inokülasyon yapıldı ve kültürler 7 gün süre ile 30°C'de gelişmeye bırakıldı. Geliştirme sürecinin ardından, KSF ortamına 75 ml saf su ilave edilerek oda sıcaklığında 2 saat süre ile 150 rpm'deki geliştirmenin ardından alınan ham ekstrakt gazlı bezle süzülüp; ardından süzüntü 10 dakika +4°C'de 10.000 rpm hızında santrifüjlenerek süpernatant (kısmi saflaştırılmış enzim kaynağı) ayrıldı ve enzim aktivitesi ölçülerek β -glukozidaz aktivitesinin maksimum düzeyde gözlemlendiği pH ve nemlendirme koşulları tespit edildi (Ijaz et al., 2011).

2.2.5.2 Optimum inkübasyon sıcaklığının saptanması

KSF koşullarının optimizasyonunda ikinci aşama, β -glukozidaz üretimi için optimum inkübasyon sıcaklığının belirlenmesidir. Bu amaçla, ilk aşamada belirlenen pH değerinde nemlendirilmiş KSF ortamları hazırlandı. Hazırlanan ortamlara sıvı kültürden alınan 3 ml'lik kısım transfer edilerek, 7 gün süre ile farklı sıcaklık derecelerinde (25, 30, 35, 40 ve 45°C) gelişmeye bırakılmıştır. Bu süresinin ardından her bir sıcaklık derecesi için daha önce belirtilen yöntemle kısmi saflaştırılmış enzim kaynakları elde edilerek β -glukozidaz aktivite ölçümleri gerçekleştirilerek en yüksek enzim aktivitesi için gerekli sıcaklık saptandı (Nkala et al., 2020; Sugiwati et al., 2020).

2.2.5.3 Optimum inkübasyon süresinin belirlenmesi

KSF üretim koşullarının optimizasyonundaki son aşaması, optimum inkübasyon süresinin belirlenmesidir. Bu amaçla, önceki deneysel basamaklarda belirlenen optimum pH değeri ve inkübasyon sıcaklığı parametreleri temel alınarak KSF ortamları hazırlandı. Hazırlanan ortamlara sıvı kültürden alınan 3 ml'lik kısım transfer edilerek kültürler belirlenen en uygun sıcaklıkta gelişmeye bırakıldı. Geliştirmenin dördüncü gününden itibaren başlanarak, enzim aktivitesinde düşüş gözlemlenene kadar her gün periyodik olarak filtrasyonu yapıp alınan örneklerden elde edilen kısmi saflaştırılmış enzimin aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Maksimum enzim aktivitesinin görüldüğü gün 'optimum inkübasyon süresi' olarak belirlendi (Sugiwati et al., 2020).

2.2.6 Kısmi saflaştırılmış β -glukozidaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

β -glukozidaz aktivitesinin belirlenmesi, 96 kuyucuklu well-plate (mikroplaka) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ölçüm, örnek ve kontrol kuyucuklarının kıyası ile yapılmış olup, örnek kuyucuklarına 70 μ l substrat çözeltisi (pNPG) ve 70 μ l enzim ilave edildi. Kontrol kuyucuklarına substrat yerine 70 μ l sodyum asetat tamponu kullanılarak reaksiyon karışımı tamamlandı. Hazırlanan well-plate, reaksiyonun gerçekleşmesi için 30 dakika 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon süresinin ardından, tüm kuyucuklara 70 μ l reaksiyon durdurucu çözelti (0,5 M sodyum karbonat) eklenerek enzim aktivitesi sonlandırıldı. Well-plate spektrofotometrede 410 nm dalga boyunda okutularak absorbans ölçümleri gerçekleştirildi (Yun et al., 2001).

2.2.7 Protein miktarının belirlenmesi

Protein miktarlarının belirlenmesinde, Warburg ve Lowry metodları kullanılmıştır. Warburg yöntemi ile 280 nm dalga boyunda direkt olarak spektrofotometrede ölçüm yapıp kalitatif protein miktarı belirlendi. Protein miktarının kantitatif tayini için ise Lowry yöntemi tercih edildi ve 600 nm dalga boyunda spektrofotometrede gerçekleştirilen ölçümlerle protein miktarları belirlendi.

2.2.7.1 Warburg metodu ile kalitatif protein tayini

HEK yöntemi sonucunda ependorflara alınan elüatların her birinden 210µl alınıp 96'lık kuartz plakanın kuyucuklarına aktarıldı. Kör için ise farklı kuyucuklara 210µl distile su konularak 280 nm'de ölçümleri yapıldı (Warburg und Christian, 1941).

2.2.7.2 Lowry metodu ile kantitatif protein tayini

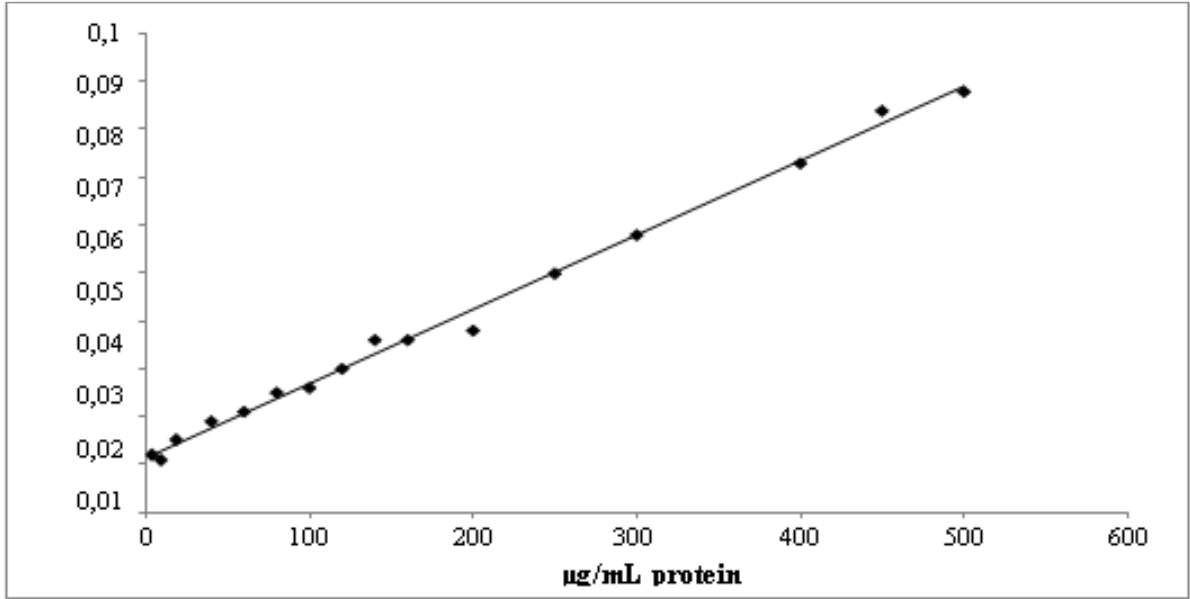
Amonyum sülfat çöktürmesi (ASÇ) ve HEK yöntemleri sonucunda alınan elüatların protein miktarlarının kantitatif olarak belirlenmesinde Lowry Metodu kullanılmıştır. Bu metotta kullanılmak üzere A, B, C, D ve E çözeltileri (Bkz. Ek A.6) hazırlandı;

Ölçümü yapılacak olan örnekten (%10 seyreltme işleminden sonra) 100 µl bir tüpe alındı. Kontrol tüpüne de 100 µl distile su konularak örnek ve kontrol tüplerinin her birine taze hazırlanan 2 ml D çözeltisi ilave edilmiş ve vortex ile karıştırılan tüpler karanlıkta 10 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Ardından tüplere taze hazırlanmış E çözeltisinden 200 µl ilave edilerek yine aynı şartlarda 30 dk inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon süresinin 30. dakikasında tüplerinden 210 µl alınıp 96 kuyucuklu plate'e aktarılarak spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda ölçüldü. Ölçülen sonuçlar BSA grafiğinden yararlanılarak protein miktarı belirlendi ve grafiği oluşturuldu (Lowry et al., 1951).

2.2.7.3 BSA grafiğinin hazırlanması

Protein miktarının tayininde kullanılacak standart eğrinin oluşturulması amacıyla, 1:1 oranında hazırlanan Bovin Serum Albümin (BSA) çözeltisinden sırasıyla 0-100 µl alınarak deney tüplerine aktarıldı. Tüm tüplerin hacimleri distile su ilavesi ile 100 µl'ye tamamlandı. Hazırlanan standartlara 2'şer ml D çözeltisi ilave edildi ve tüpler oda sıcaklığında 10 dakika süreyle inkübe edildi. Inkübasyon sürecinin ardından, tüplere E çözeltisinden 200 µl eklendi; örnekler vortexlenerek 30 dakika daha 25°C'de karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, her bir standarttan 210 µl alınarak 96'lı well-plate kuyucuklarına aktarıldı. BSA

içermeyen tüp kör olarak kullanıldı ardından 600 nm dalga boyunda spektrofotometrede yapılan ölçümler sonucunda standart grafik oluşturuldu (Şekil 2.2) (Lowry et al., 1951).



Şekil 2.2: Standart BSA grafiği

Grafikten alınan verilerle;

$$\text{Protein miktarı (}\mu\text{g/ml)} = \frac{(\text{Örnek Tüp Absorbansı} - \text{Kontrol Tüp Absorbansı}) - 0,0113}{0,0002}$$

formülü kullanılarak Lowry Metodu ile protein miktarı hesaplamaları yapıldı.

2.2.8 β- Glukozidaz enziminin saflaştırılması

Arpa samanının katı substrat olarak kullanıldığı KSF ortamında geliştirilen *A. aculeatus*'tan saflaştırılan kaba enzim, ilk olarak ASÇ, sonrasında ise HEK yöntemleri kullanılarak saflaştırılmıştır.

2.2.8.1 Amonyum sülfat çöktürmesi

Kaba enzimin ilk saflaştırma basamağını oluşturan ASÇ, farklı doygunluk derecelerine sahip olan farklı proteinlerin çöktürülmesi için amonyum sülfat tuzu ((NH₄)₂SO₄) kullanımı esasına dayanmaktadır. Kullanılacak olan tuz miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplanmaktadır;

$$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 (\text{g}) = \frac{1,77 \times V \times (S_2 - S_1)}{3,54 - S_2}$$

Formülde;

V: Ölçülen süpernatantın hacmini

S1: Amonyum sülfatın ilk doyunluğunu

S2: Amonyum sülfatın istenilen doyunluğunu ifade etmektedir (Wingfield, 2001).

ASÇ'nin ilk aşaması olan çöktürme aralığının belirlenmesi işlemi için %0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100 oranlarında çöktürme işlemi yapıldı. Her çöktürme aralığı için gerekli olan tuz miktarı belirtilen formüle göre hesaplanarak buz üzerinde manyetik karıştırıcıda 15 dk çözdürüldü. Teflon tüplere alınan örnek 4°C'de 15000 rpm'de 30 dk santrifüj yapıldı. Teflon tüpte kalan pellet 4 ml tuzlu tamponda (pH 6,8) çözdürülüp muhafaza edilmek üzere 4°C'ye kaldırıldı. Bütün çöktürme aralıkları için bu işlem tekrar edildi ve sonrasında elde edilen örneklerin β -glukozidaz enzim aktiviteleri (410 nm'de) ve kantitatif protein miktarları (600 nm'de) ölçümleri yapıldı (Macris, 1984).

Çöktürme aralığının belirlenmesinin ardından, buz dolu kap içerisine yerleştirilen bir behere 10 ml hacminde kısmi saflaştırılan β -glukozidaz enzim çözeltisi aktarıldı. Aktivite ve toplam protein (Lowry) analizlerinde kullanılmak üzere kısmi saflaştırılan enzim çözeltisinden 500 μ l ayrıldı. Belirlenen ilk doyunluk aralığı için gerekli amonyum sülfat tuzu, enzim çözeltisine yavaşça eklenerek 15 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda tamamen çözünmesi sağlandı. Ardından 2 saat süreyle 15000 rpm ve 4°C'de santrifüjleme ile çöktürme yapılarak süpernatant kısmı mezüre alınıp yeni hacim kontrolü yapıldıktan sonra temiz bir behere aktarıldı. İkinci doyunluk aşaması için hesaplanan tuz miktarı süpernatanta eklendi ve 30 dakika daha karıştırılarak tam bir çözünme sağlandığından emin olundu. Sonrasında yeniden temiz bir teflon tüpe aktarıldı ve aynı koşullarda (2 saat, 15.000 rpm, 4°C) tekrar santrifüjlendi. İşlem sonunda β -glukozidaz enzimi içeren pellet 4 ml tuzlu tampon içerisinde çözdürüldü. Elde edilen enzim çözeltisinin 3,5 ml'lik kısmı Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HEK) kolonuna yüklenirken, kalan 500 μ l'lik kısım aktivite ve protein tayini analizleri için muhafaza edildi (Macris, 1984).

2.2.8.2 Hidrofobik etkileşim kromatografisi

HEK aşamasında hidrofobik jel olarak laboratuvarımızda kendi sentezlediğimiz Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin kullanıldı. ASÇ sonrası elde edilen örnek kolona yüklenmeden önce pH'sı 6,8 olan tuzlu tampon ile kolon dengelemesi yapıldı. Bu işlemin ardından, amonyum sülfat çöktürmesinden elde edilen 3,5 ml'lik enzim örneği kolona yüklendi.

Proteinlerin kolondan elüsyonu için, yüksek yoğunluklu pH'sı 6,8 olan 0,05 M tuzlu tampondan başlayarak, düşük yoğunluklu pH'sı 6,8 olan 50 mM Na₂HPO₄ tamponuna doğru azalan bir tuz gradiyenti (linear gradient) oluşturuldu. Gradiyent boyunca elüat, 2 ml'lik ependorf tüplere alındı. Dolumu yapılan her bir ependorfta β -glukozidaz enzim aktivitesi spektrofotometrede 410 nm dalga boyunda ölçüldü. Enzim aktivitesi tespit edilen ependorfların kalitatif protein içerikleri 280 nm'de (Warburg yöntemi), kantitatif protein ölçümleri ise 600 nm'de (Lowry yöntemi) saptandı. Elde edilen veriler doğrultusunda, aktivite ve protein miktarı grafiği oluşturuldu. Saflaştırma sürecinin verimliliğini değerlendirmek amacıyla; başlangıçtaki kaba enzimi, ASC ve HEK basamaklarından elde edilen Lowry protein tayini ve aktivite sonuçları kullanılarak kapsamlı bir 'Saflaştırma Tablosu' oluşturuldu (Kara et al., 2011; Asic et al., 2015).

2.2.9 NATIVE-PAGE/SDS-PAGE yöntemleri kullanılarak β -glukozidaz enziminin saflığı ve alt birimlerinin belirlenmesi

A. aculeatus'tan saflaştırılarak elde edilen enziminin saflık düzeyi ve alt birim varlığının belirlenmesi için Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel (SDS-PAGE) ve Doğal Poliakrilamid Jel (NATIVE-PAGE) elektroforez teknikleri kullanıldı. Elektroforez, protein karışımlarının fraksiyonlara ayrılması, alt birim varlıklarının araştırılması, protein homojenliğinin doğrulanması ve immobilizasyon gibi ileri uygulamalar için saflaştırma süreçlerinde yaygın olarak tercih edilen bir yöntemdir.

Bu elektroforez yönteminde protein molekülleri, poliakrilamid jel içersindeki gözeneklerden elektriksel kuvvet etkisiyle migrasyon gösterirler. Akrilamid konsantrasyonunun artması gözenek boyutunun azalmasına neden olur; böylece proteinin göç hızı, yük, boyut ve konformasyonun bir bileşkesi olarak belirlenir. SDS-PAGE uygulaması için Laemmli (1970) tarafından tanımlanan protokolde proteinler, üçüncül yapılarının bozulması sonucu yalnızca moleküler ağırlıklarına göre ayrılabilir. Bu çalışmada SDS-PAGE, saflaştırılan β -glukozidazın alt birim varlığı ve moleküler ağırlığının belirlenmesi amacıyla kullanıldı. NATIVE-PAGE ise proteinlerin doğal konformasyonlarının korunarak analiz edildiği ve saflık düzeyinin belirlenmesine olanak tanıyan bir tekniktir. Bu yöntemde, enzimin toplam moleküler ağırlığı ve saflığının değerlendirilmesinde kullanıldı (Laemmli, 1970; Jian et al., 2016; Roychowdhury et al., 2023).

2.2.9.1 Saflaştırılan β -glukozidazın SDS-PAGE yöntemi ile saflığının ve alt birimlerinin kontrolü

Elektroforez sisteminde kullanılacak cam plakalar saf suyla yıkanıp alkol ile silinmiştir. Temizlenen cam plakalar, jel yürütme aparatına yerleştirildi. Hazırlanan ayırma jeli (%10 SDS) cam plakaların arasına, üstte boşluk (2-3 cm) kalacak şekilde dikkatle (hava kabarcıkları oluşturmamak amacı ile) döküldü ve polimerizasyonun tamamlanması için 60 dakika bekletildi. Ayırma jelinin polimerizasyonunu tamamlandıktan sonra üst kısmına hazırlanan yükleme jeli eklendi ve kuyucuk tarağı yerleştirildi. Yükleme jelinin polimerizasyonunun tamamlanması için de 60 dakika daha beklendi sonrasında tarak kuyucuklar zarar görmeden dikkatlice çıkarıldı. Jel yürütme aparatı elektroforez tankına yerleştirilerek SDS-PAGE tank tamponu ile dolduruldu ve kuyucuklar tampon ile yıkandı. HEK ile saflaştırılmış ve en yüksek aktivite gösteren β -glukozidaz enzim örneklerinden oluşturulmuş havuzdan 10 μ l alınarak 40 μ l SDS-PAGE yükleme tamponu ile karıştırıldı ve örnekler 100°C'de 5 dakika boyunca kaynar suda bekletilerek denatürasyonları sağlandı. Denatürasyon sonrasında örnekler oda sıcaklığına soğutuldu. Yükleme jelindeki ilk ve son kuyucuklara 5'er μ l protein moleküler ağırlık standardı (marker) ve aradaki diğer kuyucuklara 15'er μ l hazırlanan enzim örnekleri yüklendi. Elektroforez tankının elektrotları güç kaynağına bağlanmış ve ilk aşamada 80 V sabit gerilim uygulanarak proteinlerin yükleme jelinden geçişi sağlandı. Proteinler ayırma jeline ulaştıklarında gerilim 100 V seviyesine yükseltildi ve yürütme işlemine, örneklerin jelin alt kenarından yaklaşık 1 cm yukarısına gelene kadar devam edildi. Belirtilen seviyeye kadar yürütme gerçekleştirildikten sonra güç kaynağı kapatıldı ve jel, cam plakalar arasından özenle çıkarıldı. Protein bantlarının boyanması amacıyla jel, Ek A.8'de belirtilen boyama çözeltisi içinde 2 saat süresince çalkalamalı inkübatörde düşük seviyede çalkalanarak boyanın nüfuzu sağlandı. Boyama işlemi sonunda jel, Bölüm 2.1.3.8'de tanımlanan yıkama çözeltisi ile yıkanarak fazla boya uzaklaştırıldı ve protein bantları görünür hale getirildi (Alu'dat et al., 2019; Wang et al., 2021).

2.2.9.2 Saflaştırılan β -glukozidazın NATIVE-PAGE yöntemi ile saflığının ve alt birimlerinin kontrolü

NATIVE-PAGE yöntemiyle saflaştırılan enzimin saflığı ve alt birim kontrolü yapıldı. Ayırma ve yığma jelleri Ek A.9'da belirtilen oranlarda hazırlanmış ve sırasıyla cam plakalar arasına aktarılmıştır. Cam plakaların bulunduğu aparat elektroforez tankına konulup NATIVE-PAGE tank tampon çözeltisi ile dolumu yapıldı. Yüksek aktivitelere sahip β -

glukozidaz enzim örneklerinden oluşturulan enzim havuzundan 10 µl alındı ve üzerine 40 µl yükleme tamponundan (NATIVE-PAGE) ilave edilerek elektroforez kuyucuklarına yüklenecek numuneler hazırlandı ve markerla birlikte kuyucuklara yüklemesi yapıldı. Elektroforez aşaması SDS-PAGE yöntemindeki aşamalar ile aynı prosedürde gerçekleştirildi. Elektroforez sonrası dikkatlice cam plakalardan çıkarılan jel, SDS-PAGE yönteminde olduğu gibi boyandı. Boyama işlemi sonunda jel, Ek A.9’da tanımlanan yıkama çözeltisi ile yıkanarak fazla boya uzaklaştırıldı ve protein bandı görünür hale getirildi (Chevallet et al., 2006; Niepmann and Zheng, 2006; Roychowdhury et al., 2023).

2.2.10 Saflaştırılan β-glukozidaz’ın biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi

2.2.10.1 Saflaştırılan β-glukozidaz aktivitesine farklı pH’ların etkisi

Saflaştırılan enzim aktivitesi üzerine pH etkisini gözlemlemek için hazırlanan substrat (pNPG) çözeltileri ile aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Bu amaçla, farklı pH değerlerine uygunluğu sebebiyle 25 mM sodyum asetat (pH 2,0; 3,0; 4,0; 5,0), 25 mM sodyum dihidrojen fosfat (pH 6,0; 7,0) ve 25mM disodyum hidrojen fosfat (8,0; 9,0) tamponları hazırlandı. Hazırlanan çözeltiler kullanılarak, her bir pH değeri için 5 mM pNPG substratları hazırlandıktan sonra farklı pH değerlerindeki enzim aktiviteleri analizi için bölüm 2.2.6 da anlatıldığı şekilde hazırlandı. Ardından well-plate, statik inkübatörde 30 dakika süreyle 37°C’de inkübe edildi. Sonrasında her bir kuyucuğa 70 µl 0,5 M sodyum karbonat (Na₂CO₃) çözeltisi eklenerek reaksiyon durduruldu ve 410 nm dalga boyunda ölçümleri yapıldı. Elde edilen absorbans değerleri ve daha önce hazırlanmış standart eğrisi kullanılarak enzim ünitesi (EU) cinsinden β-glukozidaz aktivitesi hesaplandı. Her bir pH değeri için enzim aktivitesi, üç tekrarlı deneyin ortalaması alınarak yapıldı ve en yüksek aktivitenin görüldüğü pH optimum pH değeri olarak saptandı (Sulyman et al., 2020; Singh et al., 2023).

2.2.10.2 Saflaştırılan β-glukozidaz aktivitesine farklı sıcaklıkların etkisi

Saflaştırılan enzimin optimum çalışma sıcaklığının saptanması amacıyla farklı sıcaklıklarda inkübe edildikten sonra aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Bunun için 96 well-platelerde kontrol grupları için kuyucuklara 70 µl saflaştırılmış β-glukozidaz ve 70 µl 50 mM sodyum asetat trihidrat tamponu (pH 7,0) konuldu. Örnek grupları için kuyucuklarına ise 70 µl saflaştırılmış β-glukozidaz ile 70 µl pNPG substrat çözeltisi eklendi. Hazırlanan well-plateler, farklı sıcaklık derecelerinde (25, 35, 45, 55, 65, 75 ve 85°C) 30 dakika süreyle inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda, reaksiyonu sonlandırmak amacıyla tüm kuyucukların her birine 70 µl 0,5 M sodyum karbonat (Na₂CO₃) çözeltisi eklendi. Reaksiyon

durdurulduktan sonra örneklerin 410 nm dalga boyunda absorbands değerleri ölçüldü. Elde edilen verilere dayanarak, her bir sıcaklık derecesi için β -glukozidaz aktiviteleri enzim ünitesi (EU) cinsinden hesaplanarak optimum sıcaklık değeri belirlendi (Sulyman et al., 2020; Singh et al., 2023).

2.2.10.3 Saflaştırılan β -glukozidazın termal kararlılığının belirlenmesi

β -glukozidazın termal kararlılığı için enzim 45, 55, 65, 75 ve 85°C sıcaklıklarda inkübasyona bırakıldı. Herhangi bir ısıtma işlemi tabi tutulmadan önce enzimin aktivitesi ölçülerek, bu değer başlangıç aktivitesi olarak kabul edildi. Enzimin 45, 55, 65 ve 75°C sıcaklıklardaki termal kararlılık profilini çıkarmak için 120 dakika süren inkübasyon boyunca her 10 dakikada bir örnek alınarak aktivite ölçümü yapıldı. 85°C sıcaklıkta ise enzimin sergilediği kararlılığı incelemek amacıyla 2 dakikalık aralıklarla aktivite ölçümleri yapıldı ve aktivite düşüşü tespit edilene kadar işleme devam edildi. Ölçümler sonucunda elde edilen absorbands değerleri üzerinden enzim üniteleri (EU) hesaplandı; zaman ve sıcaklığa bağlı olarak değişen aktivite değerleri üzerinden enzimin termal kararlılık özellikleri analiz edildi (Liu et al., 2012).

2.2.10.4 Saflaştırılan β -glukozidazın pNPG substratına karşı K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi

Saflaştırılan β -glukozidazın K_m ve V_{max} değerlerini belirlemek için, sabit enzim konsantrasyonu karşısında farklı derişimlerden (5-70 μ l hacim aralıklarından oluşan çözeltiler hazırlanarak) oluşan pNPG substratları 96 kuyucuklu well-plate kullanılarak hazırlanmış enzim aktiviteleri ölçüldü. Ölçüm sonuçlarından reaksiyon hızları (V) EU/ml olarak hesaplandı. Enzim kinetiği verilerinin analizi için Michaelis-Menten denkleminin lineer formu olan Lineweaver-Burk grafiği oluşturuldu. Bu amaçla, substrat konsantrasyonlarının (S) ve reaksiyon hızlarının 1/S değerlerine karşı 1/V değerleri grafiğe geçirildi. Grafikten elde edilen denklemden yararlanılarak kinetik sabitler saptandı. Regresyon doğrusunun y-eksenini kestiği noktadan ($1/V_{max}$) maksimum reaksiyon hızı (V_{max}) değeri bulundu, doğrunun eğimi (K_m/V_{max}) ve saptanan V_{max} değeri kullanılarak da Michaelis-Menten sabiti (K_m) hesaplandı (Pontoh and Low, 2002; Dikshit and Tallapragada, 2014; Sulyman et al., 2020 Singh et al., 2023).

2.2.10.5 Saflaştırılan β -glukozidazın inhibitörleri olan D(+)-glukoz ve δ -glukonolakton'un IC₅₀ değerlerinin belirlenmesi

β -glukozidaz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkilerini değerlendirmek amacıyla D(+)-glukoz ve δ -glukonolakton inhibitörleri için 'yüzde elli inhibisyon konsantrasyonu' anlamına gelen IC₅₀ değerleri saptanmıştır. Deneylerde, 1,25 mM sabit *p*NPG substrat konsantrasyonu kullanıldı. İnhibitör içermeyen reaksiyon ortamındaki enzim aktivitesi başlangıç değeri (%100) olarak kabul edildi ve tüm hesaplamalar bu değer referans alınarak gerçekleştirildi. 0,1 M D(+)-glukoz ve 0,0001 M δ -glukonolakton stok çözeltilerinden reaksiyon ortamına 1-60 μ l aralığında değişen hacimlerde ilave edilerek farklı inhibitör konsantrasyonları oluşturuldu ve enzim aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen absorbans verilerinden hesaplanan yüzde (%) aktivite değerlerinin inhibitör konsantrasyonlarına karşı grafikleri oluşturuldu. Oluşturulan grafiklerinden yararlanılarak, enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu (IC₅₀) değerleri her bir inhibitör için ayrı ayrı hesaplandı (Asic et al., 2015).

2.2.10.6 Saflaştırılan β -glukozidazın inhibitörleri olan D(+)-glukoz ve δ -glukonolakton'un inhibisyon tiplerinin ve K_i değerlerinin belirlenmesi

K_i değerlerinin hesaplanması amacıyla ilk olarak, inhibitör içermeyen ortamda farklı *p*NPG substrat konsantrasyonlarında (5-70 μ l) β -glukozidaz aktivite ölçümleri yapıldı. Ölçümler sonucunda elde edilen hız (V) değerlerinden 1/V, substrat konsantrasyonlarından (S) ise 1/S değerleri hesaplandı. Bu veriler doğrultusunda Lineweaver-Burk grafiği oluşturuldu ve inhibitörsüz sisteme ait I₀ doğrusu elde edildi. Sonrasında ise; 0,1 M D(+)-glukoz ve 0,0005 M δ -glukonolaktonun sabit konsantrasyonlarının varlığında, yine farklı substrat derişimlerinde (5-70 μ l *p*NPG) enzim aktiviteleri ölçüldü. Elde edilen verilerden yararlanılarak 1/V ve 1/S değerleri bulundu ve Lineweaver-Burk grafiği üzerinde her bir inhibitör için I₁ ve I₂ doğruları çizildi. K_i değerleri ve inhibisyon tiplerinin tespiti, hazırlanan Lineweaver-Burk grafiklerindeki doğruların konumları üzerinden gerçekleştirildi. İnhibisyon tiplerinin belirlenmesinde; 1/S eksenini kestiği nokta baz alınarak $-1/K_m(1+[I]/K_i)$ denklemi ile 'yarışmalı inhibisyon', 1/V eksenini kestiği nokta baz alınarak $1/V_{max}(1+[I]/K_i)$ denklemi ile 'yarışmasız inhibisyon' ve yine 1/V eksenindeki değişimler üzerinden 'yarı-yarışmalı' (uncompetitive) inhibisyon tipleri değerlendirildi. K_i değerlerinin hesaplanmasında kullanılan K_m ve V_{max} verileri, inhibitör içermeyen ortamdan elde edilen değerlerdir (Parry et al., 2001; Asic et al., 2015).

3. BULGULAR

3.1 *A. aculeatus*'un β -Glukozidaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılacak ve β -glukozidaz enzimi aktivitesine sahip olduğu düşünülen *Aspergillus aculeatus* NRRL 358 suşu, % CMC (karboksimetil selüloz) içeren czapek dox agar besiyerine inoküle edilip 7 gün 25°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süreci sonunda ilgili suşun hidroliz zonu oluşturduğu gözlenmiştir. *Aspergillus aculeatus* mikrofungusunun β -glukozidaz aktivitesine sahip olduğu kesinleştirilerek ve çalışmada kullanılmasına karar verilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: *A. aculeatus*'un oluşturduğu hidroliz zonu

3.2 KSF Üretim Koşullarının *A. aculeatus*'un β -Glukozidaz Sentezine Etkisi

KSF koşullarında sıcaklık, pH-nemlendirme sıvısı ve inkübasyon süresi gibi mikrofungusun enzim üretimini etkileyebilecek parametrelerin test edilip en yüksek aktivitenin görüldüğü optimum değerleri belirlenmiştir.

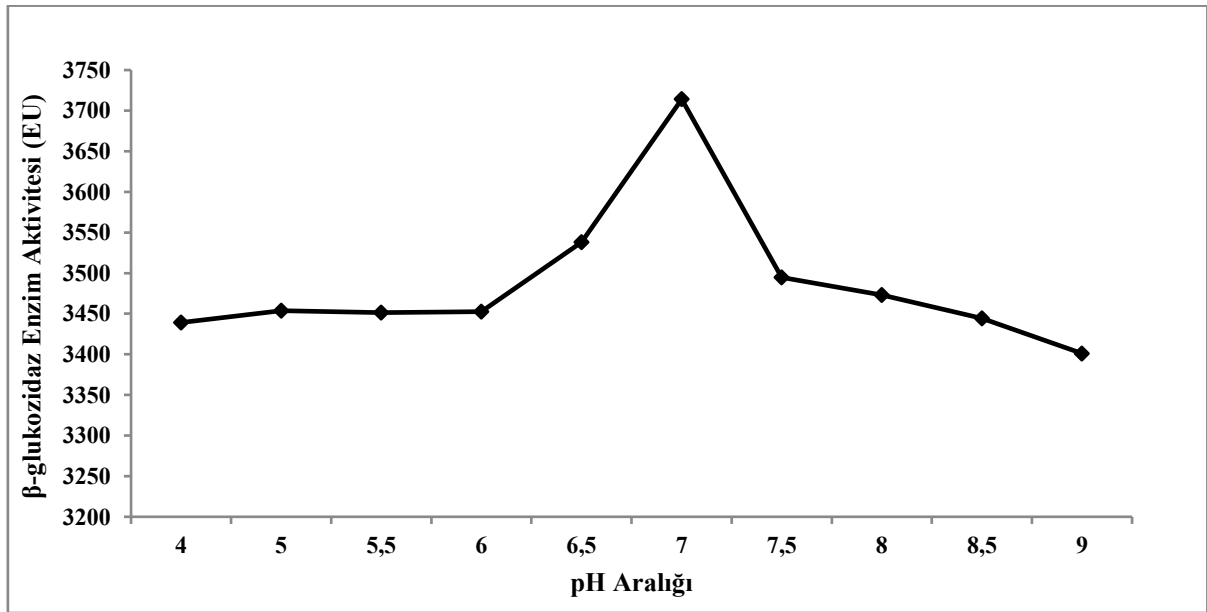
3.2.1 KSF ortamında geliştirilen *A. aculeatus*'un β -glukozidaz üretimine pH ve nemlendirme sıvısının etkisi

Mikrofungusun β -glukozidaz enzimini en yüksek verimle üretebilmesi için gerekli koşulların belirlenmesine nemlendirme sıvısı ve pH'ın belirlenmesi ile başlanmıştır. Bu amaçla KSF ortamları bölüm 2.2.5.1 de anlatıldığı gibi pH 4 ile pH 9 arasındaki tamponların kullanımıyla %55 oranında nemlendirilip otoklavlanmıştır. Ardından KSF ortamlarına czapek dox broth besiyerinde üretilen *A. aculeatus*'un 3 ml kültürünün transferi yapılarak 7

gün 25°C’de gelişmeye bırakılmıştır. Gelişme süresinin sonrasında en yüksek β -glukozidaz aktivitesi pH’sı 7,0 olan 0,2 M sodyum dihidrojen fosfat tamponu ile nemlendirilmiş KSF ortamında saptanmıştır (Tablo 3.1, Şekil 3.2).

Tablo 3.1: Farklı pH’ların *A. aculeatus*’un β -glukozidaz üretimine etkisi

pH Değerleri	β -Glukozidaz Enzim Aktivitesi (EU)
4	3439,024
4,5	3453,93
5	3451,22
5,5	3451,22
6	3452,575
6,5	3537,94
7	3714,092
7,5	3494,58
8	3472,9
8,5	3444,444
9	3401,084



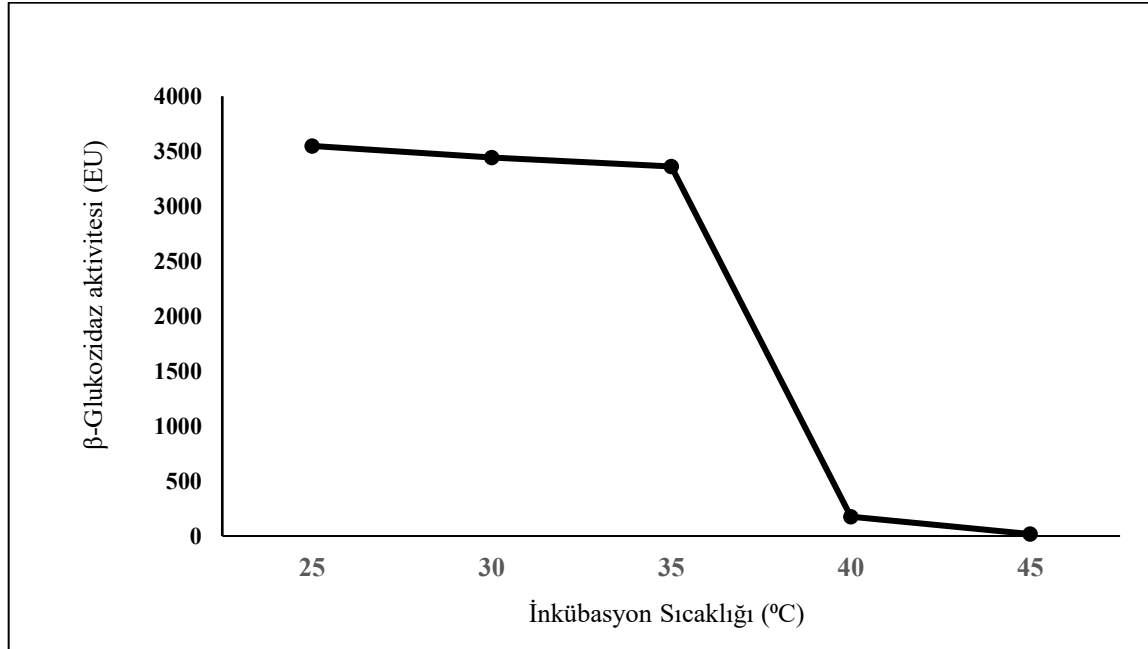
Şekil 3.2: Farklı pH’ların *A. aculeatus*’un β -glukozidaz üretimine etkisi

3.2.2 KSF ortamında geliştirilen *A. aculeatus*'un β -glukozidaz üretimine sıcaklığın etkisi

Optimizasyon çalışmalarına inkübasyon sıcaklığının belirlenmesi ile devam edilmiş ve bu amaçla KSF ortamları pH'sı 7 olan sodyum dihidrojen fosfat tamponu (0,2 M) ile %55 oranında nemlendirilip sterilize edildikten sonra 3 ml *A. aculeatus* kültüründen alınan kısım ile aşılanmıştır. Ardından farklı sıcaklıklara ayarlanan inkübatörlerde (25°C, 30°C, 35°C, 40°C ve 45°C) 7 gün inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda elde edilen kısmi saflaştırılmış enzim kaynaklarında yapılan aktivite ölçümlerine göre en yüksek aktivitenin görüldüğü inkübasyon sıcaklığı 25°C olarak saptanmıştır (Tablo 3.2, Şekil 3.3).

Tablo 3.2: *A. aculeatus*'un β -glukozidaz üretimine sıcaklığın etkisi

İnkübasyon Sıcaklığı (°C)	β -Glukozidaz Enzim Aktivitesi (EU)
25	3547,425
30	3441,734
35	3361,788
40	174,796
45	17,615



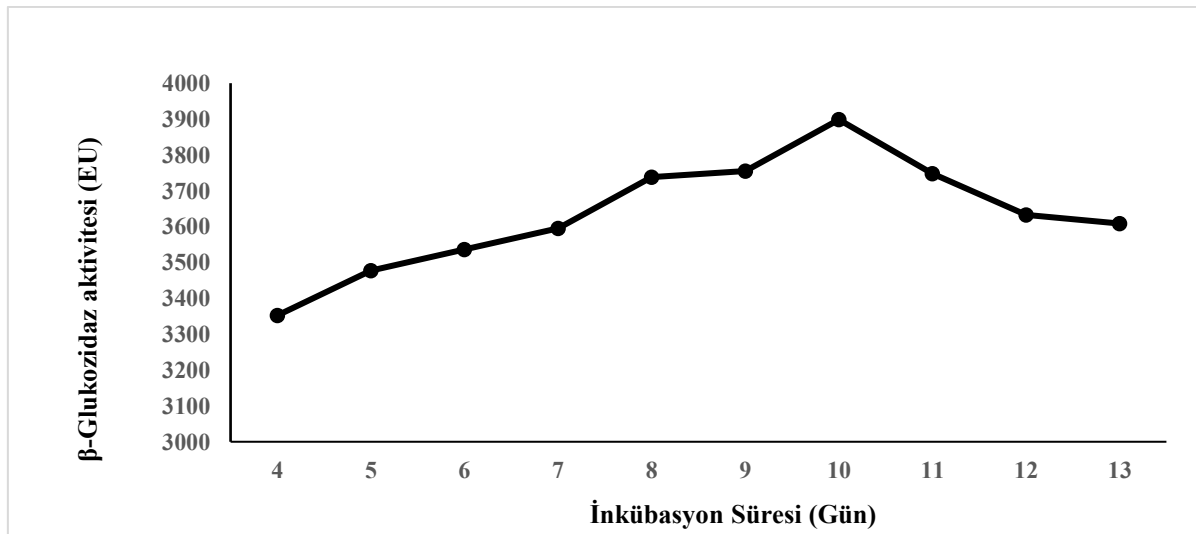
Şekil 3.3: *A. aculeatus*'un β -glukozidaz üretimine sıcaklığın etkisi

3.2.3 KSF ortamında geliştirilen *A. aculeatus*'un β -glukozidaz üretimine inkübasyon süresinin etkisi

Optimizasyon çalışmalarının son aşamasında *A. aculeatus*'un en yüksek β -glukozidaz aktivitesi gösterdiği inkübasyon süresi belirlenmiştir. Bu aşamada optimum pH 7 olan sodyum dihidrojen fosfat tamponu ile %55 oranında nemlendirilerek sterilize edilmiş KSF ortamına sıvı kültürden 3 ml inoküle edilerek 25°C sıcaklığa ayarlanmış inkübatörde farklı sürelerde (4-10 gün) inkübe edilmiştir. Aktivite ölçümleri 4. günden başlayarak her gün yapılmıştır. Elde edilen veriler incelendiğinde en yüksek aktivitenin 10. günde olduğu tespit edildiğinden çalışmanın diğer basamaklarında optimum inkübasyon süresi olarak 10. güne karar verilmiştir (Tablo 3.3, Şekil 3.4).

Tablo 3.3: Farklı inkübasyon sürelerinin *A. aculeatus*'un β -glukozidaz üretimine etkisi

İnkübasyon Süresi (gün)	β -Glukozidaz Enzim Aktivitesi (EU)
4	3352,303
5	3476,964
6	3536,585
7	3594,851
8	3738,482
9	3754,742
10	3898,374
11	3747,967
12	3632,791
13	3608,401



Şekil 3.4: İnkübasyon sürelerinin *A. aculeatus*'un β -glukozidaz üretimine etkisi

3.3 KSF Ortamında Geliştirilen *A. aculeatus*'tan Kısmi Saflaştırılmış Enzim Eldesi

Bölüm 2.2.3'te belirtildiği şekilde hazırlanan KSF ortamına 3 ml *A. aculeatus* spor süspansiyonu inoküle edilerek daha önce belirlenen optimum koşullar altında (pH 7, 25°C, 10 gün) inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra KSF ortam içeriğine 75 ml distile su ilave edilerek oda sıcaklığında 120 dk boyunca 150 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra gazlı bez yardımıyla süzülen ortam içeriğinden alınan süzüntü 10000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek alınan süpernatant amonyum sülfat çöktürmesi işleminde kullanılmak üzere kısmi saflaştırılmış (kaba) enzim kaynağı olarak -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.4 β -Glukozidaz Enziminin Saflaştırılması

3.4.1 Amonyum sülfat çöktürmesi

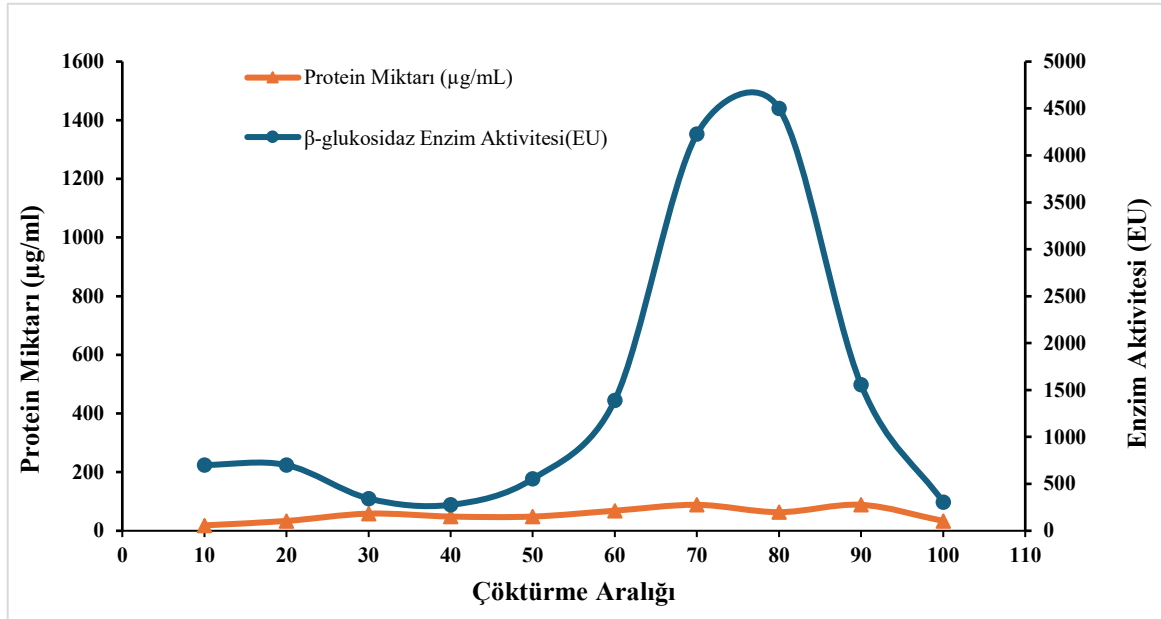
Kısmi saflaştırılmış enzim kaynağından β -glukozidaz enzimini ASÇ işlemine tabii tutmadan önce çöktürme aralığının belirlenmesi çalışması yapılmıştır. Farklı çöktürme aralıklarında tuz miktarları hesaplanıp eklenerek aktivite ölçümleri yapılmış ve alınan sonuçlar ile 'Tablo 3.4' oluşturulmuştur.

Tablo 3.4: Farklı aralıklarda yapılan çöktürme işlemlerinde kullanılan amonyum sülfat tuzu miktarları ile çöktürme sonucu elde edilen enzim aktivitesi ve protein miktarı verileri

Çöktürme Aralığı (%)	Hacim (ml)	β -Glukozidaz Aktivitesi (EU)	Protein Miktarı (μ g/ml)
0-10	10	701,897	18,5
10-20	10	700,542	33,5
20-30	10	344,1734	58,5
30-40	10	276,4228	48,5
40-50	10	552,8455	48,5
50-60	10,5	1390,244	68,5
60-70	10,5	4227,642	88,5
70-80	10,5	4502,71	63,5
80-90	10,5	1556,911	88,5
90-100	10,5	304,878	33,5

Elde edilen veriler kullanılarak Şekil 3.5'teki grafik oluşturulmuştur. Oluşturulan grafiğe göre β -glukozidaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği çöktürme aralığının %50-90 olduğu

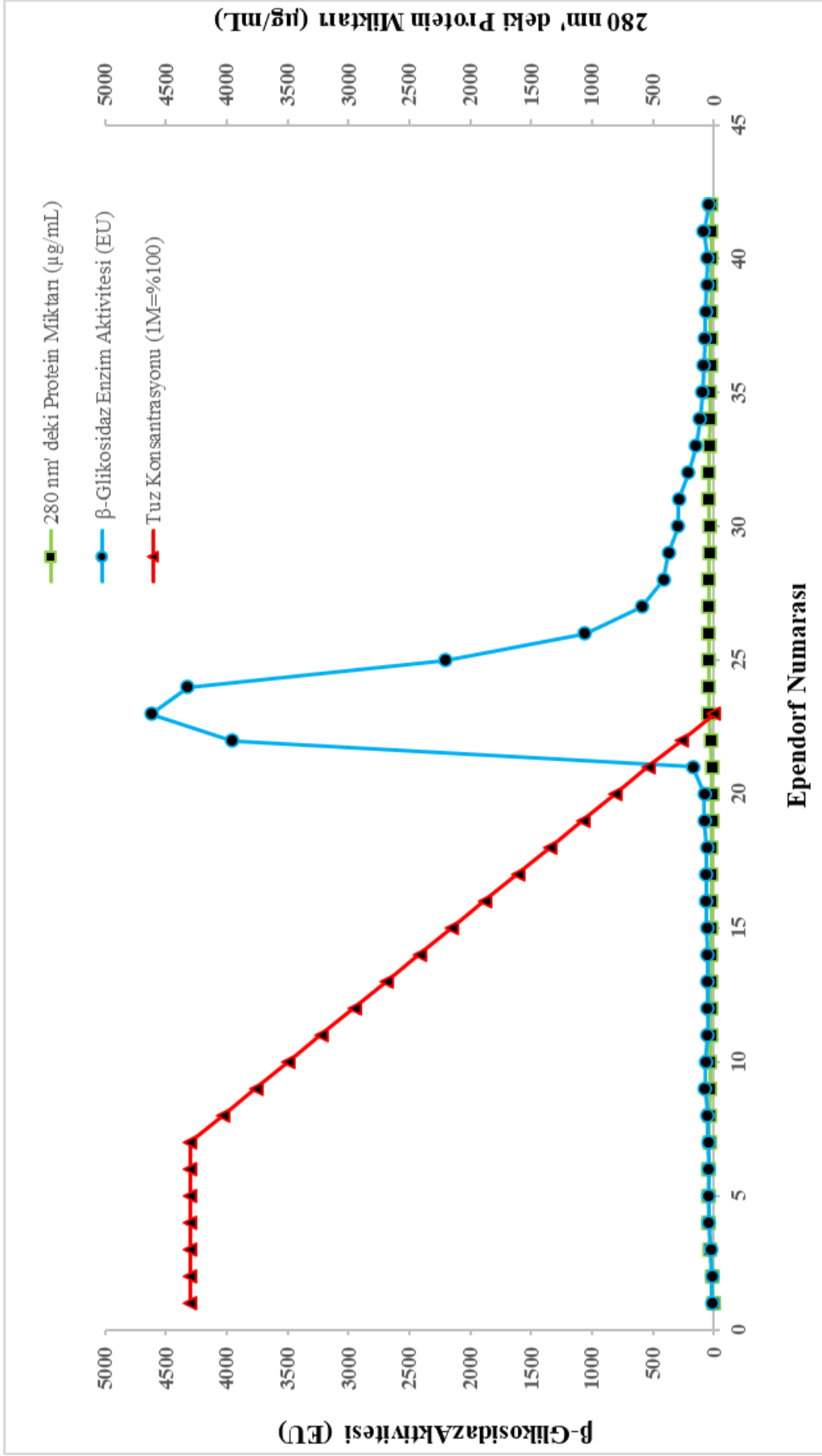
belirlenmiştir. Bu aralıkta elde edilen enzim hidrofobik etkileşim kromatografisinde kullanılmak üzere -20°C’de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.5: Farklı çöktürme aralıklarında yapılan aktivite ve protein miktarı ölçümleri

3.4.2 Hidrofobik etkileşim kromatografisi

KSF ortamında geliştirilen *A. aculeatus*'tan elde edilen ve amonyum sülfat çöktürmesinde %50-90 aralığındaki enzim örneği Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin jelinin bulunduğu kolona yüklenmiştir. Kolondan ependorf tüplere alınan eluatların enzim aktivitesi ile kalitatif (Warburg metodu) ve kantitatif (Lowry metodu) protein analizleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar kullanılarak Şekil 3.6'teki grafik çizilerek Tablo 3.5'teki saflaştırma tablosu oluşturulmuştur.



Şekil 3.6: HEK sonucu elde edilen elüatların aktivite ve protein miktarı ölçüm sonuçları

Tablo 3.5: *A. aculeatus*'tan saflaştırılan β -glukozidaz enziminin saflaştırma tablosu

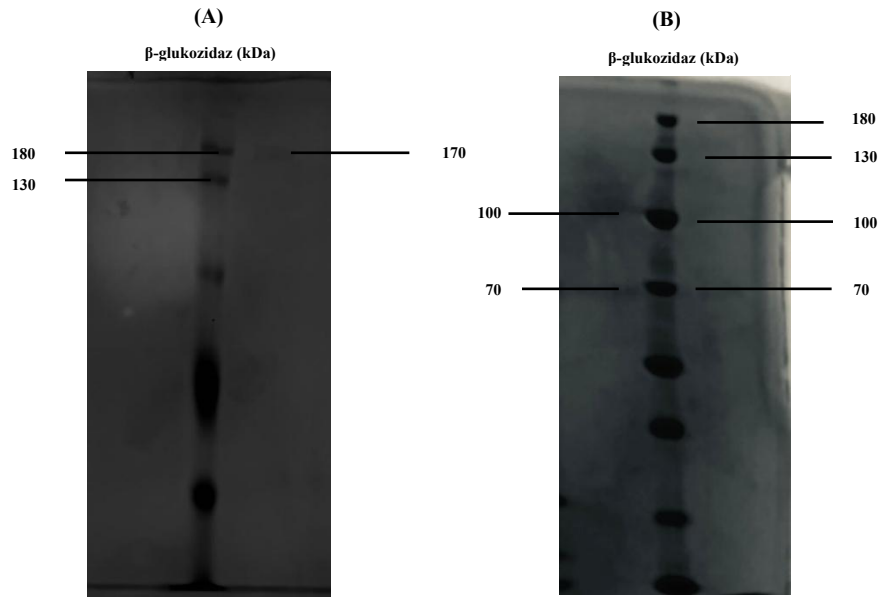
Saflaştırma Basamakları	Hacim (ml)	Aktivite (EU/ml)	Protein Miktarı (mg/ml)	Toplam Aktivite (EU/ml)	Toplam Protein (mg/ml)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	%Verim	Saflaştırma Derecesi
Kısmi Saflaştırma	10	3756,098	0,3585	37560,980	3,58500	10476,9874	100	1
Amonyum Sülfat Çöktürmesi (%50-90)	4	4180,217	0,2135	16720,868	0,85400	19579,4707	44,52	1,87
Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi	3,5	4623,31	0,0185	16181,585	0,06475	249908,649	43,08	23,85

Saflaştırma tablosunda belirtildiği üzere β -glukozidaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda %44,52 verim ile 1,87 kat, hidroforik etkileşim kromatografisi sonucunda ise %44,52 verim ile 23,85 kat saflaştırılarak elde edilmiştir.

3.5 Saflaştırılan β -Glukozidazın SDS PAGE ve NATİVE PAGE Elektroferez

Yöntemleriyle Alt Birim Sayısının Kontrolü

Saflaştırdığımız β -glukozidaz enziminin SDS PAGE ve Native PAGE yöntemleriyle alt birim varlığı/sayısı kontrolü yapılmıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7: β -glukozidaz enziminin (A) NATİVE-PAGE ve (B) SDS-PAGE jel görüntüleri

β -glukozidazın NATİVE-PAGE jel görüntüsünde yaklaşık 170 kDa'da tek, SDS-PAGE jel görüntüsünde ise yaklaşık 100 kDa ve 70 kDa seviyelerinde iki bant verdiği belirlenmiştir.

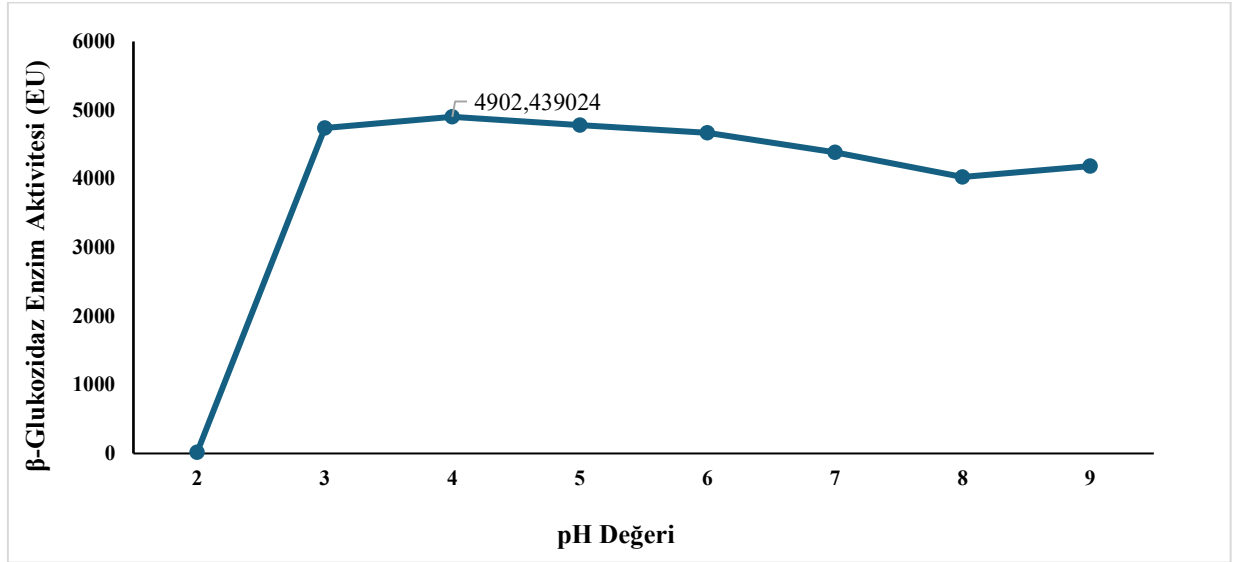
3.6 Saflaştırılan β -Glukozidazın Biyokimyasal Özelliklerinin ve Kinetik

Parametrelerinin Belirlenmesi

A. aculeatus'tan saflaştırılan β -glukozidazın biyokimyasal özelliklerinin ve kinetik parametrelerinin belirlenmesi amacıyla farklı pH ve sıcaklıklardaki aktiviteleri ölçüldü ve ayrıca termal kararlılığı incelendi. Daha sonra K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı ve son olarak IC_{50} ve K_i değerleri hesaplanarak inhibisyon tipleri belirlendi.

3.6.1 Farklı pH değerlerinin saflaştırılan β -glukozidaz enzim aktivitesine etkisi

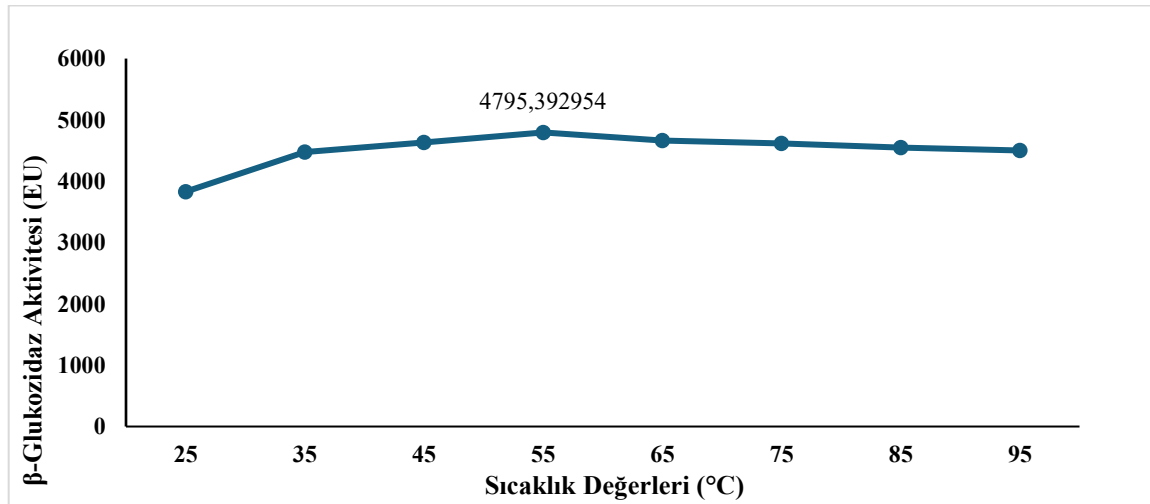
Farklı pH değerlerine sahip çözeltiler (pH 2-9) ile hazırlanmış *p*NPG substratları kullanılarak aktivite ölçümleri yapılmış ve sonuçlar doğrultusunda Şekil 3.8'deki grafik oluşturulmuştur. Elde edilen ölçüm sonuçları ve grafik incelendiğinde en yüksek aktivitenin görüldüğü pH değeri 4 olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.8: Farklı pH değerlerinin β -glukozidaz aktivitesine etkisi

3.6.2 Farklı sıcaklıkların saflaştırılan β -glukozidaz enzim aktivitesine etkisi

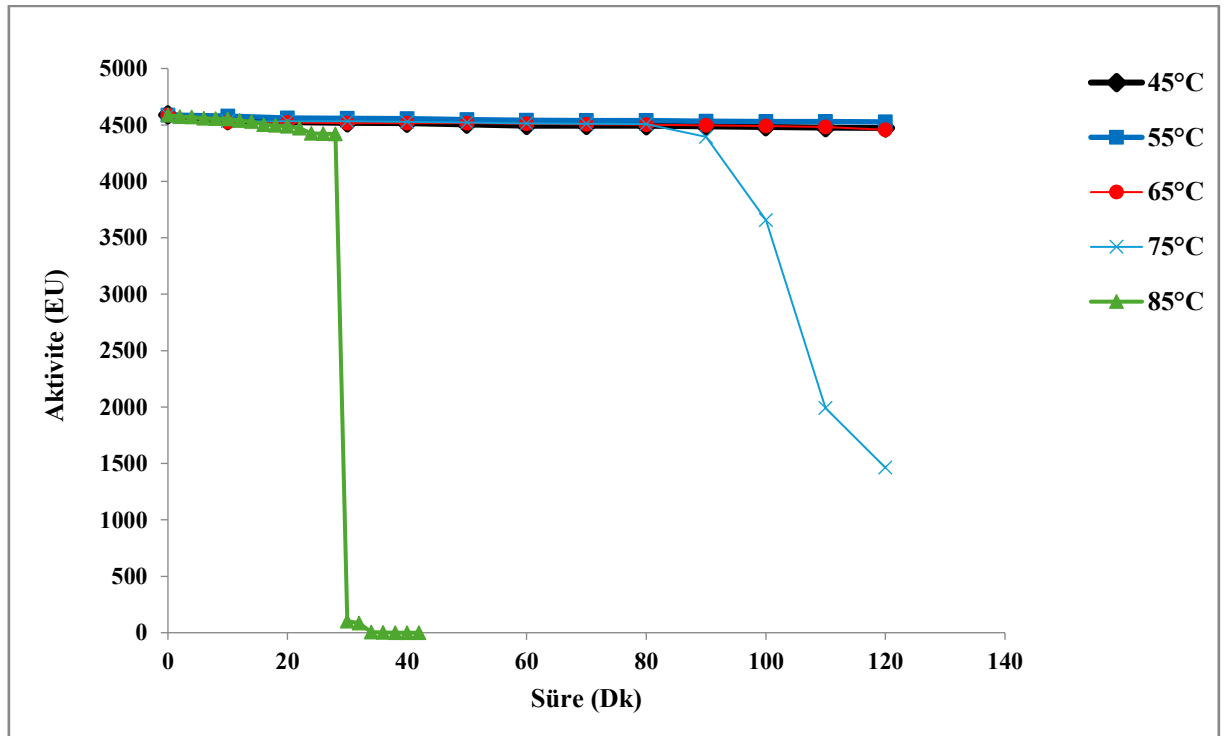
Farklı sıcaklıklarda (25°C-85°C) inkübasyona bırakılan β -glukozidaz enziminin aktivite ölçümleri yapılarak sonuçlar doğrultusunda Şekil 3.9'daki grafik oluşturulmuştur. Ölçüm sonuçları ve oluşturulan grafik incelendiğinde en yüksek aktivitenin görüldüğü sıcaklık 55°C olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.9: Farklı sıcaklıkların β -glukozidaz aktivitesine etkisi

3.6.3 Saflaştırılan β -glukozidaz enziminin termal kararlılığının belirlenmesi

Farklı sıcaklıklarda (45°C, 55°C, 65°C, 75°C) ve 120 dk süreyle inkübasyona bırakılan β -glukozidaz enziminin her 10 dakikada bir, 85°C’de ise 2 dakikada bir aktivite ölçümleri yapılmış ve Şekil 3.10’daki termal kararlılık grafiği oluşturulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre saflaştırılan β -glukozidaz enziminin 45°C’de %99,6; 55°C’de %99,8; 65°C’de %98,6 ve 75°C’de %31,87 oranında aktivite gösterdiği, 85°C’de ise 36 dk boyunca aktivitesini koruduğu saptanmıştır.



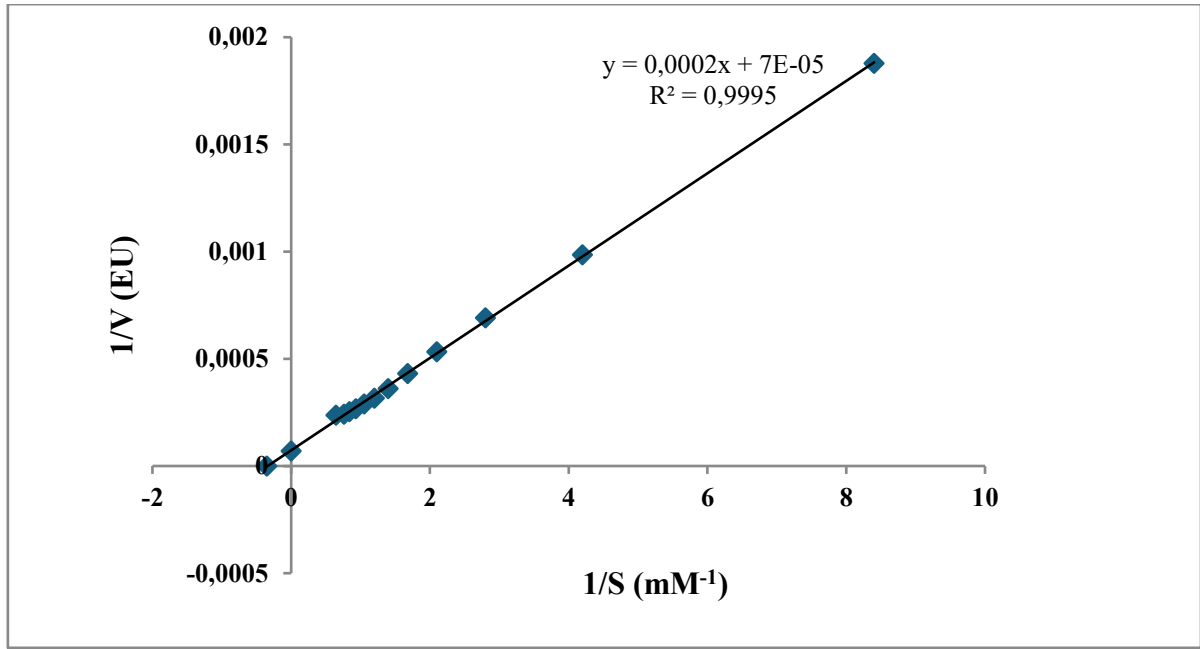
Şekil 3.10: Saflaştırılan β -glukozidaz enziminin termal kararlılık grafiği

3.6.4 Saflaştırılan β -glukozidaz enziminin K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi

Enzim miktarı sabit tutularak değişken konsantrasyonlardaki (5-70 μ l) *p*NPG substratı ile aktivite ölçümleri yapılmış ve saflaştırılan β -glukozidaz enziminin *p*NPG substratına karşı ilgisini gösteren K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır (Tablo 3.7). Elde edilen sonuçlardan reaksiyon hızı (V) kullanılarak $1/V$, substrat konsantrasyonu (S) kullanılarak da $1/S$ değeri hesaplanmış ve veriler kullanılarak Lineweaver-Burk grafiği oluşturulmuştur (Tablo 3.6, Şekil 3.11).

Tablo 3.6: Safılaştırılan β -glukozidaz enziminin K_m ve V_{max} değerlerinin hesaplanmasında ve Lineweaver-Burk grafiğinin çizilmesinde kullanılan veriler

50mM Sodyum Asetat (μ L)	Enzim	pNPG (μ L)	Toplam Hacim (μ L)	Örnek	Kör	Abs. Farkı	Aktivite (V)	1/V	1/S
65	70	5	210	0,508	0,115	0,393	532,5203252	0,00188	8,403
60		10		0,864	0,115	0,749	1014,905149	0,00099	4,201
55		15		1,184	0,115	1,069	1448,509485	0,00069	2,801
50		20		1,5	0,115	1,385	1876,693767	0,00053	2,1
45		25		1,826	0,115	1,711	2318,428184	0,00043	1,68
40		30		2,16	0,115	2,045	2771,00271	0,00036	1,4
35		35		2,448	0,115	2,333	3161,246612	0,00032	1,2
30		40		2,664	0,115	2,549	3453,929539	0,00029	1,05
25		45		2,877	0,115	2,762	3742,547425	0,00027	0,933
20		50		3,026	0,115	2,911	3944,444444	0,00025	0,84
15		55		3,181	0,115	3,066	4154,471545	0,00024	0,763
10		60		3,194	0,115	3,079	4172,086721	0,00024	0,7
5		65		3,231	0,115	3,116	4222,222222	0,00024	0,646
0		70		3,297	0,115	3,182	4311,653117	0,00023	0,6



Şekil 3.11: Saflaştırılan β -glukozidaz enziminin K_m ve V_{max} değerlerinin hesaplanmasına yönelik Lineweaver–Burk doğrusu

Tablo 3.7: Saflaştırılan β -glukozidaz enziminin K_m , V_{max} ve V_{max} / K_m değerleri

Substrat	K_m (mM)	V_{max} (EU)	V_{max} / K_m
<i>p</i> NPG	2,8571	14285,71	5000,0735

3.6.5 Saflaştırılan β -glukozidaz enzim inhibitörlerinin IC_{50} değerlerinin hesaplanması

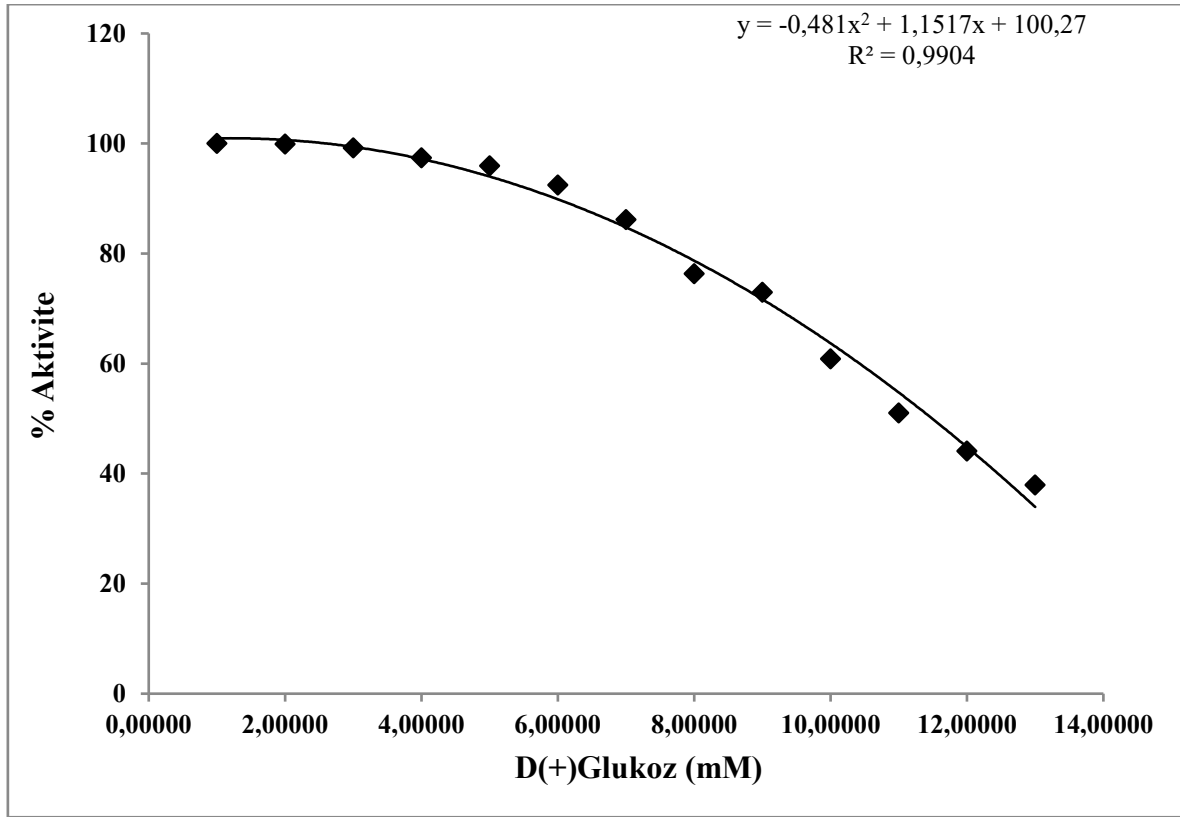
Yapılan genel literatür araştırmaları sonucu D(+)-glukoz ve δ -glukonolakton'un β -glukozidaz enziminin inhibitörleri olduğu tespit edildiğinden bu iki inhibitörün β -glukozidaz enzimine etkileri araştırılmış ve sonuçlar rapor edilmiştir.

3.6.5.1 D(+)-glukoz inhibitörünün IC_{50} değerinin belirlenmesi

İnhibitörün IC_{50} değeri belirlenirken; 1,25 mM *p*NPG varlığında, 1-60 μ l arasında değişen inhibitör konsantrasyonlarında aktivite değerleri ölçülmüştür. İnhibitör içermeyen enzim aktivitesi %100 kabul edilmiş ve buna oranla farklı konsantrasyonlardaki aktivite yüzdeleri hesaplanmıştır (Tablo 3.8). Elde edilen sonuçlar doğrultusunda Şekil 3.12'deki [I] - % Aktivite Grafiği oluşturularak IC_{50} değeri hesaplanmıştır.

Tablo 3.8: 0,1 M D(+)-glukoz inhibitörünün IC₅₀ değerinin hesaplanmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve sonuçlar

Sodyum Asetat Tamponu (50 mM) (µl)	Inhibitör (µl)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Reaksiyon Durdurucu (µl)	Inhibitör konsantrasyonu (280 µl) (mM) (*10000)	Absorbans Farkı (ΔA) (410nm)	Aktivite (U/ml)	% Aktivite
60	-	70	70		-	3,240	4.390,244	100
59	1				0,4464	3,2370	4.386,1789	99,907407
59	1				0,8929	3,2140	4.355,0136	99,197531
59	1				1,7857	3,1560	4.276,4228	97,407407
59	1				3,5714	3,1090	4.212,7371	95,95679
57	3				8,9286	2,9960	4.059,6206	92,469136
55	5				17,8571	2,7920	3.783,1978	86,17284
52	8				26,7857	2,4740	3.352,3035	76,358025
50	10				35,7143	2,3640	3.203,2520	72,962963
45	15				53,5714	1,9720	2.672,0867	60,864198
40	20				71,4286	1,6150	2.188,3469	49,845679
35	25				89,2857	1,4280	1.934,9593	44,074074
30	30				107,1429	1,2290	1.665,3117	37,932099
25	35				125,0000	1,0600	1.436,3144	32,716049
20	40				142,8571	0,9320	1.262,8726	28,765432
15	45				160,7143	0,8860	1.200,5420	27,345679
10	50				178,5714	0,7540	1.021,6802	23,271605
5	55				196,4286	0,7090	960,7046	21,882716
-	60				214,2857	0,6550	887,5339	20,216049



Şekil 3.12: D(+)-glukoz inhibitörünün IC₅₀ grafiği

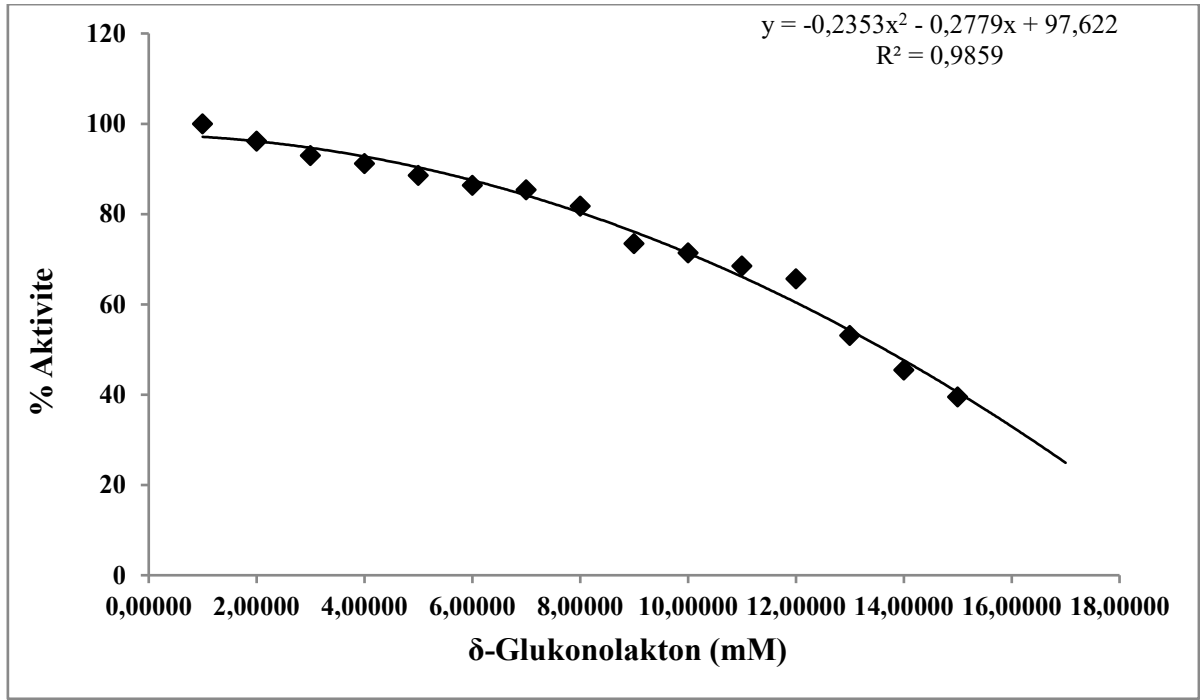
Oluşturulan grafik sonucunda saflaştırılan β -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine D(+)-glukoz inhibitörünün IC₅₀ değeri 11,49 mM olarak hesaplanmıştır.

3.6.5.2 δ -Glukonolakton inhibitörünün IC₅₀ değerinin belirlenmesi

İnhibitörün IC₅₀ değeri belirlenirken; 1,25 mM *p*NPG varlığında, 1-60 μ l arasında değişen inhibitör konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapılmıştır. İnhibitör içermeyen enzim aktivitesi %100 kabul edilmiş ve buna oranla farklı konsantrasyonlardaki aktivite yüzdeleri hesaplanmıştır (Tablo 3.9). Elde edilen sonuçlar doğrultusunda Şekil 3.13'teki [I] - % Aktivite Grafiği oluşturularak IC₅₀ değeri hesaplanmıştır.

Tablo 3.9: 0,002 M δ -Glukonolakton inhibitörünün IC_{50} değerinin hesaplanmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve sonuçlar

Absorbans Farkı (ΔA) (410nm)	Aktivite (U/ml)	Sodyum Asetat Tamponu (50 mM) (μ l)	Inhibitör (μ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Inhibitör konsantrasyonu (280 μ l) (mM) (*10000)	Absorbans Farkı (ΔA) (410nm)	Aktivite (U/ml)	% Aktivite
3,390	4.593,496	60	-	70	70	-	3,390	4.593,496	100
3,260	4.417,344	59	1			1,7857	3,2600	4.417,3442	96,165192
3,151	4.269,648	59	1			3,5714	3,1510	4.269,6477	92,949853
3,092	4.189,702	57	3			10,7143	3,0920	4.189,7019	91,20944
3,003	4.069,106	55	5			17,8571	3,0030	4.069,1057	88,584071
2,927	3.966,125	52	8			28,5714	2,9270	3.966,1247	86,342183
2,893	3.920,054	50	10			35,7143	2,8930	3.920,0542	85,339233
2,771	3.754,743	45	15			53,5714	2,7710	3.754,7425	81,740413
2,489	3.372,629	40	20			71,4286	2,4890	3.372,6287	73,421829
2,420	3.279,133	35	25			89,2857	2,4200	3.279,1328	71,386431
2,322	3.146,341	30	30			107,1429	2,3220	3.146,3415	68,495575
2,225	3.014,905	25	35			125,0000	2,2250	3.014,9051	65,634218
1,799	2.437,669	20	40			142,8571	1,7990	2.437,6694	53,067847
1,541	2.088,076	15	45			160,7143	1,5410	2.088,0759	45,457227
1,338	1.813,008	10	50			178,5714	1,3380	1.813,0081	39,469027
1,283	1.738,482	5	55			196,4286	1,2830	1.738,4824	37,846608
1,197	1.621,951	-	60			214,2857	1,1970	1.621,9512	35,309735



Şekil 3.13: δ-Glukonolakton inhibitörünün IC₅₀ grafiği

Oluşturulan grafik sonucunda saflaştırılan β-glukozidaz enzim aktivitesi üzerine δ-Glukonolakton inhibitörünün IC₅₀ değeri 13,64 mM olarak hesaplanmıştır.

3.6.6 İnhibitörlerin inhibisyon tiplerinin belirlenmesi ve K_i değerlerinin hesaplanması

3.6.6.1 D(+)-glukoz inhibitörünün inhibisyon tipinin ve K_i değerinin belirlenmesi

İnhibitörün inhibisyon sabiti (K_i) belirlenirken farklı *p*NPG konsantrasyonlarında D(+)-glukoz içermeyen enzim aktivite ölçümleri yapılmıştır. Sonrasında ise sabit 3,57 mM ve 10,7 mM inhibitör konsantrasyonları ve değişen *p*NPG konsantrasyonlarında β-glukozidaz enziminin aktivitesi ölçülmüştür. Sonuçlar kullanılarak 1/V ve 1/S değerleri hesaplanmış (Tablo 3.10) ve Lineweaver-Burk grafiğinde I₁ ve I₂ doğruları çizilerek D(+)-glukoz inhibitörünün inhibisyon tipi belirlenmiş ve K_i değeri hesaplanmıştır (Şekil 3.14).

Tablo 3.10: D(+)-Glukoz inhibitörünün K_i değerinin belirlenmesinde kullanılan veriler

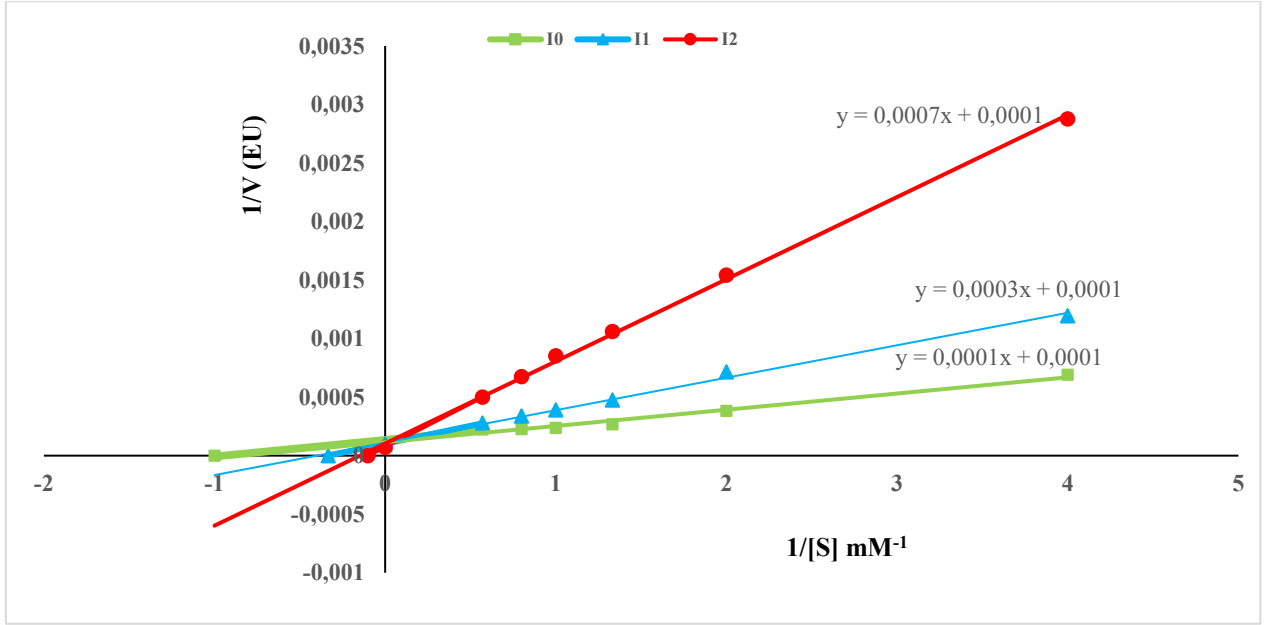
50 mM Sodyum Asetat Tamponu (µl)	Saflaştırılmış Enzim Hacmi (µL)	p NPG Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Reaksiyon Durdurucu (µl)	Toplam Hacim (µl)	Inhibitör (µl)	Substrat Konsantrasyonu (S) (mM)	Inhibitör Konsantrasyonu (I) (mM)	Absorbans Farkı ΔA	β-Glukozidaz Enzim Aktivitesi (U/ml dk.)	1/V	1/S
120	70	10	80	280	0	0,25	0	1,068	1447,154472	0,000691	4
110		20				0,5		1,953	2646,341463	0,000378	2
100		30				0,75		2,775	3760,162602	0,000266	1,3333333
90		40				1		3,115	4220,867209	0,000237	1
80		50				1,25		3,261	4418,699187	0,000226	0,8
60		70				1,75		3,312	4487,804878	0,000223	0,5714

Tablo 3.10: (Devam)

50 mM Sodyum Asetat Tamponu (μ L)	Saflaştırılmış Enzim Hacmi (μ L)	p NPG Çözeltisinin Hacmi (μ L)	Reaksiyon Durdurucu (μ L)	Toplam Hacim (μ L)	İnhibitör (μ L)	Substrat Konsantrasyonu (S) (mM)	İnhibitör Konsantrasyonu (I) (mM)	Absorbans Farkı ΔA	β -Glukozidaz Enzim Aktivitesi (U/ml dk.)	1/V	1/S
110	70	10	80	280	10	0,25	3,57	0,618	837,398374	0,001194	4
100		20				0,5		1,044	1414,634146	0,000707	2
90		30				0,75		1,557	2109,756098	0,000474	1,333333
80		40				1		1,894	2566,395664	0,00039	1
70		50				1,25		2,19	2967,479675	0,000337	0,8
50		70				1,75		2,668	3615,176152	0,000277	0,5714

Tablo 3.10: (Devam)

50 mM Sodyum Asetat Tamponu (μl)	Safıştırılmış Enzim Hacmi (μL)	p NPG Çözeltisinin Hacmi (μl)	Reaksiyon Durdurucu (μl)	Toplam Hacim (μl)	İnhibitör (μl)	Substrat Konsantrasyonu (S) (mM)	İnhibitör Konsantrasyonu (I) (mM)	Absorbans Farkı ΔA	β-Glukořidaz Enzim Aktivitesi (U/ml dk.)	1/V	1/S
90	70	10	80	280	30	0,25	10,7	0,618	837,398374	0,001194	4
80		20				0,5		1,044	1414,634146	0,000707	2
70		30				0,75		1,557	2109,756098	0,000474	1,333333
60		40				1		1,894	2566,395664	0,00039	1
50		50				1,25		2,19	2967,479675	0,000337	0,8
30		70				1,75		2,668	3615,176152	0,000277	0,5714



Şekil 3.14: D(+)-glukoz inhibitörünün farklı konsantrasyonlarının saflaştırılan β -glukozidaz enzimi üzerine etkisinin Lineweaver-Burk grafiği üzerinde gösterimi

Çizilen Lineweaver-Burk grafiğinden, *p*NPG varlığında D(+)-glukoz inhibitörünün β -glukozidaz enzimine karşı inhibisyon mekanizmasının yarışmalı tipte olduğu belirlenmiştir. D(+)-glukozun $I_1 = 3,57$ mM ve $I_2 = 10,7$ mM olmak üzere iki farklı konsantrasyondaki aktiviteleri ölçülmüş ve oluşturulan grafikten K_i değerlerinin her ikisi de $1,7857 \times 10^{-3}$ olarak hesaplanmıştır.

3.6.6.2 δ -Glukonolakton inhibitörünün inhibisyon tipinin ve K_i değerinin belirlenmesi

İnhibitörün inhibisyon sabiti (K_i) belirlenirken farklı *p*NPG konsantrasyonlarında δ -glukonolakton içermeyen enzimin aktivite ölçümleri yapılmıştır. Sonrasında ise sabit 0,143 mM ve 0,214 mM inhibitör konsantrasyonları ve değişen *p*NPG konsantrasyonlarında β -glukozidaz enziminin aktivite değerleri ölçülmüştür. Bu sonuçlar yardımıyla 1/V ve 1/S değerleri hesaplanmış (Tablo 3.11) ve Lineweaver-Burk grafiğinde I_1 ve I_2 doğruları çizilerek δ -glukonolakton inhibitörünün inhibisyon tipi belirlenmiş ve K_i değeri hesaplanmıştır (Şekil 3.15).

Tablo 3.11: δ -glukonolakton inhibitörünün K_i değerinin belirlenmesinde kullanılan veriler

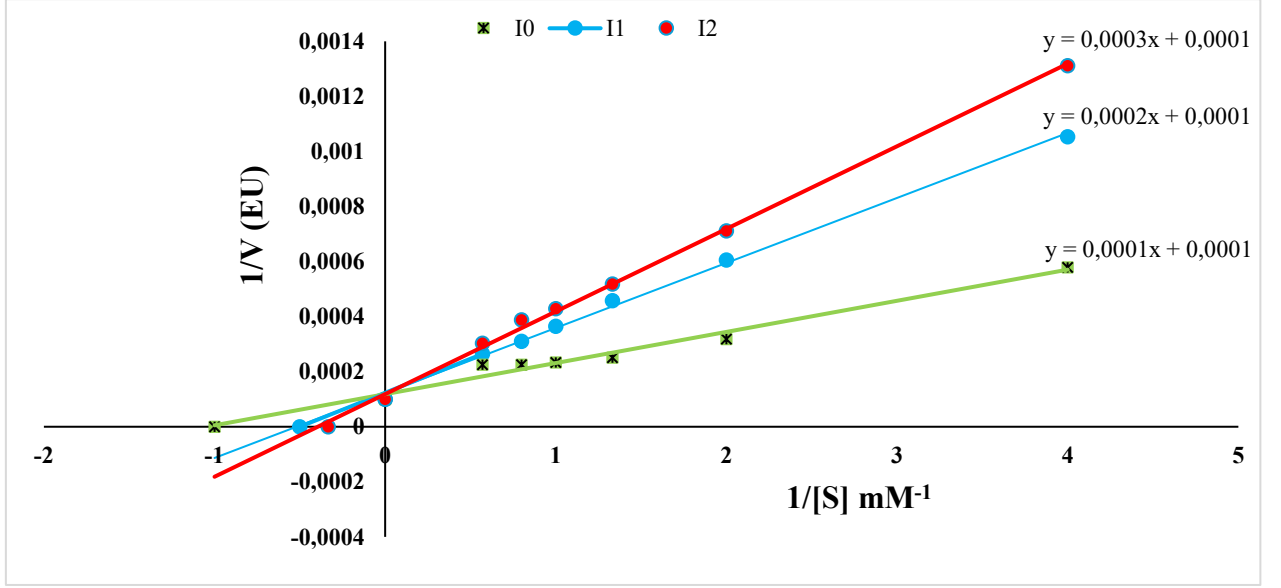
50 mM Sodyum Asetat Tamponu (μ l)	Saflaştırılmış Enzim Hacmi (μ L)	<i>p</i> NPG Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Reaksiyon Durdurucu (μ l)	Toplam Hacim (μ l)	Inhibitör (μ l)	Substrat Konsantrasyonu (S) (mM)	Inhibitör Konsantrasyonu (I) (mM)	Absorbans Farkı ΔA	β -Glukozidaz Enzim Aktivitesi (U/ml dk.)	1/V	1/S
120	70	10	80	280	0	0,25	0	1,609	2180,216802	0,000459	4
110		20				0,5		2,74	3712,737127	0,000269	2
100		30				0,75		3,132	4243,902439	0,000236	1,333333
90		40				1		3,251	4405,149051	0,000227	1
80		50				1,25		3,291	4459,349593	0,000224	0,8
60		70				1,75		3,35	4539,295393	0,00022	0,5714

Tablo 3.11: (Devam)

50 mM Sodyum Asetat Tamponu (μl)	Saflaştırılmış Enzim Hacmi (μL)	p NPG Çözeltisinin Hacmi (μl)	Reaksiyon Durdurucu (μl)	Toplam Hacim (μl)	İnhibitör (μl)	Substrat Konsantrasyonu (S) (mM)	İnhibitör Konsantrasyonu (I) (mM)	Absorbans Farkı ΔA	β-Glukozidaz Enzim Aktivitesi (U/ml dk.)	1/V	1/S
100	70	10	80	280	20	0,25	0,143	0,701	949,8644986	0,001053	4
90		20				0,5		1,219	1651,761518	0,000605	2
80		30				0,75		1,612	2184,281843	0,000458	1,333333
70		40				1		2,023	2741,192412	0,000365	1
60		50				1,25		2,378	3222,222222	0,00031	0,8
40		70				1,75		2,789	3779,132791	0,000265	0,5714

Tablo 3.11: (Devam)

50 mM Sodyum Asetat Tamponu (µl)	Saflaştırılmış Enzim Hacmi (µL)	p NPG Çözeltisinin Hacmi (µl)	Reaksiyon Durdurucu (µl)	Toplam Hacim (µl)	İnhibitör (µl)	Substrat Konsantrasyonu (S) (mM)	İnhibitör Konsantrasyonu (I) (mM)	Absorbans Farkı ΔA	β-Glukozidaz Enzim Aktivitesi (U/ml dk.)	1/V	1/S
90	70	10	80	280	30	0,25	0,214	0,563	762,8726287	0,001311	4
80		20				0,5		1,037	1405,149051	0,000712	2
70		30				0,75		1,423	1928,184282	0,000519	1,333333
60		40				1		1,72	2330,623306	0,000429	1
50		50				1,25		1,903	2578,590786	0,000388	0,8
30		70				1,75		2,438	3303,523035	0,000303	0,5714



Şekil 3.15: δ -glukonolakton inhibitörünün farklı konsantrasyonlarının saflaştırılan β -glukozidaz enzimi üzerine etkisinin Lineweaver-Burk grafiği üzerinde gösterimi

Çizilen Lineweaver-Burk grafiğinden, *p*NPG varlığında δ -glukonolaktonun saflaştırılan β -glukozidaz enzimine karşı inhibisyon mekanizmasının yarışmalı tipte olduğu belirlenmiştir. δ -glukonolaktonun $I_1 = 0,143$ mM ve $I_2 = 0,214$ mM olmak üzere iki farklı konsantrasyondaki aktiviteleri ölçülmüş ve oluşturulan grafikten $7,143 \times 10^{-5}$ ve $1,07145 \times 10^{-4}$ olmak üzere iki farklı K_i değeri hesaplanmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Enzimlerin kullanım alanlarının giderek artması enzim eldesine yönelik çalışmaları da ilgi odağı haline getirmiştir. Bu çalışmada da oldukça geniş bir uygulama alanına sahip olan *Aspergillus* cinsinin *Aspergillus aculeatus* NRRL 358 suşu, arpa samanı kullanılarak hazırlanan KSF ortamında geliştirildi. Saflaştırma basamaklarının ardından β -glukozidaz enzimi elde edilerek kinetik parametreleri ile biyokimyasal özellikleri belirlendi.

Saflaştırmanın ilk aşamasını oluşturan Amonyum Sülfat Çökeltilmesinden alınan pellet, daha sonra β -glukozidazı saflaştırmak için Hidrofobik Etkileşim Kromatografisine tabi tutuldu.

Saflaştırılan β -glukozidaz enziminin alt birim bileşiminin gösterilmesi, SDS-PAGE ve NATIVE-PAGE elektroforez tekniklerinin uygulanmasıyla gerçekleştirildi; ayrıca, termal stabilitesinin değerlendirilmesinin yanı sıra maksimum enzimatik aktiviteyi ortaya çıkaran optimal sıcaklık ve pH koşulları tespit edildi, K_m ve V_{max} parametrelerinin belirlenmesi gerçekleştirildi. Ayrıca, her ikisi de β -glukozidaz enziminin genel inhibitörleri olarak kabul edilen D-(+)-glukoz ve δ -glukonolaktonun, *p*NPG substratının varlığında enzimatik aktivite üzerindeki etkisi değerlendirildi ve spesifik inhibisyon türleri tanımlandı.

Araştırmaya *A. aculeatus*'un β -glukozidaz sentezleme yeteneğinin değerlendirilmesi ile başlandı. Bu değerlendirmede, %5 CMC ile takviye edilmiş Czapek Dox Agar ortamına aşıl原因an *A. aculeatus*'un inkübasyondan sonra bir hidroliz bölgesi oluşumu sergilediği gözlemlendiği için *A. aculeatus*'un deneylerde enzim kaynağı olarak kullanılmasına karar verildi.

Islam ve Roy (2018) çalışmalarında mikroorganizmalarının CMC agar ortamında hidroliz zonu oluşturduğunu belirtmiş ve selüloz aktivitesinin varlığını doğrulamışlardır. Shruthi ve arkadaşları (2019) deneylerinde kullanmak istedikleri fungusu belirlemek için 9 farklı izolatu %0,5 CMC içeren Czapek Dox Agar besiyerinde 7 gün inkübasyona bırakmışlar ve içlerinden birinin 5 cm çapında hidroliz zonu oluşturduğunu rapor etmişlerdir. Zhang ve Dong (2022) çalışmalarında 43 farklı izolattan 15 tanesinin CMC içeren besiyerinde 3 günlük gelişimlerinin ardından hidroliz zonu oluşturduğunu gözlemlemişlerdir. Taha ve

arkadaşları (2015) deneylerinde topraktan (19), kompostlardan (35) ve saman örneklerinden (6) izole ettikleri bakteri suşlarını, dört farklı saman türünü (buğday, pirinç, şeker kamışı ve bezelye samanı) eşit oranda karıştırarak hazırladıkları besiyerlerinde geliştirerek CMC deneyi gerçekleştirmişler ve 60 izolatin tamamında hidroliz zonu oluşumunu gözlemlediklerini raporlamışlardır.

A. aculeatus'un çalışmada kullanılmasına karar verilmesinin ardından katı substrat olarak kullanılacak arpa samanı öğütülerek 24 saat süreyle 80°C'de kurutuldu. Ardından fungusun KSF ortamında geliştirilmesiyle β -glukozidaz üretimine etki eden nemlendirme sıvısı ve optimum pH, optimum inkübasyon sıcaklığı ve optimum inkübasyon süresi belirlendi.

Geçmişten bugüne farklı katı substratlar kullanılarak çeşitli KSF ortamlarında enzim eldesi çalışmaları yapılmıştır. Ali ve arkadaşları (2024) 10 g buğday kepeğini substrat olarak kullandıkları KSF ortamında *Aspergillus niger* ISL-9 suşunu geliştirmişlerdir. Steril saf su kullanarak (10 ml) nemlendirdikleri KSF ortamını otoklavda steril ettikten sonra (121°C'de 15 dk) üzerlerine 100 ml steril saf su ilave ederek Whatman 1 nolu filtre kağıdından süzmüşlerdir. Yaptıkları optimizasyon çalışmalarında nemlendirme sıvısının pH değerini 6,2 optimum inkübasyon süresinin 72 saat (3 gün) ve sıcaklığın 30°C olduğu sonucuna varmışlardır. Pensupa ve arkadaşları (2013) buğday samanı kullanarak farklı nem içeriğine sahip KSF ortamları (%85, %87, %88, %89, %90, %91) hazırlamışlardır. Her bir KSF ortamına aynı mikrofungusu (*A. niger*) inoküle ederek ortam içeriklerinden elde ettikleri kaba enzim kaynaklarına aktivite ölçümleri yapmışlar ve nem oranı yükseldikçe mikrofungusun büyüme hızının da arttığı sonucuna varmışlardır.

Ng ve ark. (2010) *Penicillium citrinum*'dan β -glukozidazın eldesi için pirinç kepeğinin kullanıldığı bir KSF ortamı hazırlayarak optimizasyon çalışmaları yapmışlar, maksimum enzimatik aktivitenin (156.5 U/g) kaydedildiği sıcaklık parametresini 30°C, optimal pH değerini 6 olarak bildirmişlerdir. Shruthi ve ark. (2019) araştırmalarında, *Aspergillus unguis*'in maksimum β -glukozidaz aktivitesini (7.6 FPU/g) 4. günde sergilediğini ve KSF ortamının çay kalıntısından türetildiğini rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda *A. aculeatus*'tan türetilen β -glukozidazın maksimum enzimatik aktivitesi için gereken optimal pH değeri 7, nemlendirme sıvısı sodyum dihidrojen fosfat, nem içeriği %55, ideal inkübasyon sıcaklığı 25°C, inkübasyon süresi 10 gün olarak belirlenmiştir. (Bkz. Şekil 3.2, 3.3 ve 3.4). Daha önce yapılmış incelediğimiz literatürlerle kıyaslandığında, *A.*

aculeatus'un, incelenen diğer mikroorganizmalara göre düşük nem seviyesinde daha üstün enzimatik aktivite sergilediği, uzun bir inkübasyon periyoduyla birlikte daha yüksek bir pH değerine gereksinim duyduğu ve ortalamaya yakın veya altında olan inkübasyon sıcaklıklarında en yüksek enzim aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir.

A. aculeatus'tan KSF yöntemi ile elde edilen kısmi saflaştırılmış enzim önce ön saflaştırma yöntemi olan Amonyum Sülfat Çöktürmesine tabii tutulmuş ardından ise Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi'nden geçirilmiştir. ASÇ %50-90 aralığında yapılmış olup %44,52 verim ile 1,87 kat saflaştırma sağlanmıştır (Bkz. Tablo 3.5). Da Costa ve arkadaşları (2018) *Penicillium citrinum* UVF1'den saflaştırmak istedikleri β -glukozidazlara %50 oranında ASÇ uygulamışlardır. Bai ve arkadaşları (2013) *Penicillium simplicissimum* H-11E'den β -glukozidaz eldesi için %80 aralığında ASÇ işlemi uygulamışlar ve %49,8 verim ile 1,12 kat saflaştırma sağlamışlardır. Wei ve arkadaşları (1996) *Xylaria regalis*'ten saflaştırdıkları β -glukozidaz enziminin çöktürme aralığını %70 olarak belirtmişler ve 1,9 kat saflaştırma ile %35,1 verim elde etmişlerdir. He ve arkadaşları (2022) *Cladosporium cladosporioides* Lcx9'dan elde ettikleri iki β -glukozidaz enzimine (BG CC1 ve BG CC2) %70 doygunluğunda ASÇ uygulayarak 6 kat saflaştırmış ve %31,3 verim elde etmişlerdir. Asic ve arkadaşları (2015) *Agaricus bisporus*'tan saflaştırdıkları β -glukozidaz enzimine %40-80 aralığında ASÇ uyguladıktan sonra %41,22 verim ve 1,42 kat saflaştırma derecesi elde ettiklerini raporlamışlardır. Chang ve arkadaşları (2012) β -glukozidaz enzimini *Aspergillus niger* KCCM 11239'dan Amonyum Sülfat Çöktürmesi ile saflaştırmışlar, %30-90 aralığında yaptıkları çöktürmenin sonucunda 9,2 kat saflaştırma gerçekleştirerek %21,5 verim elde etmişlerdir.

İncelenen literatür verileri ile çalışmamızda yapmış olduğumuz ASÇ sonuçları karşılaştırıldığında, çöktürme aralığının bazı çalışmalar ile benzerlik gösterdiğini, çoğundan ise daha geniş aralıkta olduğunu söyleyebiliriz. Saflaştırma katsayısı ve veriminin ise benzerlik göstermediği, çoğundan daha yüksek saflaştırma veriminin elde edildiği görülmektedir.

A. aculeatus'tan elde edilen β -glukozidaz enzimi ön saflaştırma yöntemi olan ASÇ'nin ardından HEK metodu uygulanarak ikinci saflaştırma aşamasından geçirilmiştir. Sepharose-4B-L-tirozin-1-Naftilamin jeli kullanılarak gerçekleştirilen HEK metoduyla *A. aculeatus*'tan β -glukozidaz enzimi %43,08 verim ile 23,85 kat saflaştırılmıştır (Bkz. Tablo 3.5). Asic ve

arkadaşları (2015) *Agaricus bisporus*'tan saflaştırmak istedikleri β -glukozidaz enzimini HEK (Sephacrose-4B-L-tirozin-1-Naftilamine jel) metodunu kullanarak %4,05 verim ile 10,12 kat saflaştırma sağlamışlardır. Da Costa ve arkadaşları (2018) *Penicillium citrinum* UVF1'den saflaştırmak istedikleri Pc β Glu1 ve Pc β Glu2 enzimlerini HEK yöntemini kullanarak (Phenyl Sepharose Jel ile) sırasıyla %9,9 verimle 3,9 kat ve %15,8 verimle 3,3 kat saflaştırmışlardır. Pc β Glu2 enzimini ayrıca jel filtrasyon yöntemiyle (Superdex 200 jeli) %3,2 verim ile 3,4 kat saflaştırmışlardır. He ve arkadaşları (2022) *Cladosporium cladosporioides* Lcx9'dan saflaştırmak istedikleri BG CC1 ve BG CC2 enzimlerini Anyon Değişim Kromatografisi (MonoQ10/100GI) kullanarak sırasıyla %11,4 verimle 10,8 kat ve %17,7 verimle 15,3 kat saflaştırmışlardır. Chang ve arkadaşları (2012) β -glukozidaz enzimini *Aspergillus niger* KCCM 11239'dan Jel Filtrasyon yöntemini (Sephadex G-100) kullanarak %11 verim ile 22,9 kat; İyon Değişim Kromatografisi (DEAE sephadex) yöntemini kullanarak ise %1,5 verim ile 46,5 kat saflaştırma sağlamışlardır.

İncelenen literatür sonuçları ile çalışmamızda yapmış olduğumuz HEK sonuçları karşılaştırıldığında enzim verimi ve saflaştırma katsayıları arasında benzerlik bulunmadığı görülmektedir. Bu farklılığın KSF ortam içeriği, mikroorganizma seçimi veya farklı çöktürme aralıklarında gerçekleştirilen ASÇ işleminden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamıza KSF ortamında optimum koşullarda geliştirilen *A. aculeatus*'tan elde edilen β -glukozidaz enziminin ASÇ ve HEK yöntemleri ile saflaştırıldıktan sonra alt birim varlığı ve/veya sayısının kontrolü amacıyla NATİVE ve SDS PAGE elektroforezi uygulamaları ile devam edilmiştir. Uyguladığımız elektroforez yöntemleri sonucunda SDS PAGE elektroforezi sonucu yaklaşık 70 ve 100 kDa olmak üzere iki bant, NATİVE PAGE elektroforezi sonucunda ise yaklaşık olarak 170 kDa seviyesinde tek bant oluşumu gözlemlenmiştir (Bkz. Şekil 3.7). Lin ve arkadaşları (2010) *Trichoderma koningii* AS3.2774'ten saflaştırdıkları β -glukozidazın SDS PAGE'te 69,1 kDa molekül ağırlığında olduğunu ve tek bant oluşturduğunu, Qin ve arkadaşları (2020) *Fusarium chlamydosporum* HML278'den saflaştırdıkları iki β -glukozidaz enziminin SDS PAGE'te yaklaşık 93kDa (BG FH1) ve 52kDa (BG FH2) molekül ağırlıklarında olduğunu ve tek bant oluşturduklarını, Asic ve arkadaşları (2015) *Agaricus bisporus*'tan saflaştırdıkları β -glukozidaz enziminin SDS-PAGE'te 46 ve 62 kDa molekül ağırlığında olduğunu ve iki bant, NATİVE PAGE'te yaklaşık 110 kDa molekül ağırlığında olduğunu ve tek bant oluşturduğunu, Chang ve arkadaşları

(2012) *Aspergillus niger* KCCM 11239'dan saflaştırdıkları β -glukozidaz enziminin 123 kDa molekül ağırlığında olduğunu ve tek bant oluşturduğunu, Çelen Yüçetürk ve Azaz (2025) *Trichoderma koningii*'den saflaştırdıkları β -glukozidaz enziminin SDS ve NATIVE PAGE teknikleri ile yaptıkları elektroforezde yaklaşık 110 kDa molekül ağırlığında olduğunu ve tek bant oluşturduğunu, He ve arkadaşları (2022) SDS PAGE yöntemini uyguladıkları çalışmalarında *Cladosporium cladosporioides* Lcxs9'dan saflaştırdıkları iki β -glukozidaz enziminden BGCC1'in 41 kDa molekül ağırlığına sahip olduğunu ve tek bant oluşturduğunu, BGCC2'nin de 53 kDa molekül ağırlığına sahip olduğu ve tek bant oluşturduğunu, Ng ve arkadaşları (2010) *Penicillium citrinum*'den saflaştırdıkları β -glukozidaz enzimini ve ellerinde hazır bulunan Novo-188 (β -glukozidaz) enzimini SDS PAGE yöntemi ile karşılaştırmışlar ve saflaştırdıkları β -glukozidazın yaklaşık 72 kDa molekül ağırlığında olduğunu ve tek bant oluşturduğunu, Novo-188'in ise 130 kDa molekül ağırlığında olduğunu ve tek bant oluşturduğunu rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda saflaştırdığımız β -glukozidaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği pH değeri 4,0 ve sıcaklık değeri 55°C olarak tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 3.8, Şekil 3.9). Elyas ve arkadaşları (2010) *Aspergillus*-SA 58'den saflaştırdıkları iki farklı β -glukozidaz enziminin de en yüksek aktivite gösterdikleri optimum sıcaklığın 60°C olduğunu, BGLA'nın optimum pH değerinin 4,0; BGL B'nin optimum pH değerinin ise 3,0 olduğunu raporlamışlardır. Baraldo Junior ve arkadaşları (2014) *Aspergillus niger* 12'den saflaştırdıkları β -glukozidaz enziminin en yüksek aktivite için optimum sıcaklığın 40-65°C arasında, optimum pH değerinin ise 4-5,5 arasında olduğunu tespit etmişlerdir. Qin ve arkadaşları (2020) *Fusarium chlamydosporum* HML278'den saflaştırdıkları iki β -glukozidaz enziminin (BG FH1 ve BG FH2) en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık ve pH değerlerinin de aynı olup optimum pH değerlerinin 6,0; optimum sıcaklık değerlerinin ise 60°C olduğunu belirtmişlerdir. So ve arkadaşları (2010) *Aspergillus usamii* D5'ten saflaştırdıkları β -glukozidaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği optimum sıcaklığın 55°C ve optimum pH değerinin 4,5 olduğunu rapor etmişlerdir. Bai ve arkadaşları (2013) *Penicillium simplicissimum* H-11E'den saflaştırdıkları β -glukozidaz enziminin en yüksek aktivite için optimum pH değerinin 4,4-5,0 aralığında, optimum sıcaklık değerinin ise 60°C olduğunu tespit etmişlerdir. Yan ve arkadaşları (2016) topraktan izole ettikleri *Aspergillus terreus*'tan saflaştırdıkları β -glukozidaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği optimum sıcaklığın 65°C, optimum pH değerinin ise 5,0 olduğunu raporlamışlardır.

İncelenen literatürler sonucunda çeşitli organizmalardan saflaştırılan β -glukozidaz enzimlerinin en yüksek aktivite gösterdiği optimum pH değerleri 3,0-6,0; optimum sıcaklık değerlerinin ise 40°C-65°C aralığında olduğu görülmüştür. Bu literatür verilerine dayanarak β -glukozidaz enziminin kaynağı, saflaştırma yöntemleri ve çalışma şartlarındaki farklılıkların; enzimin biyokimyasal özelliklerinin üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızda *A. aculeatus*'tan saflaştırılan β -glukozidaz enziminin termal kararlılığı da ölçülmüş olup 120 dakikalık inkübasyon süresi sonunda 45°C'de %99,6; 55°C'de %99,8; 65°C'de %98,6 ve 75°C'de %31,87 oranında aktivite gösterdiği, 85°C'de ise 36 dk boyunca aktivitesini kaybetmediği belirlenmiştir (Bkz Şekil: 3.10). Xu ve arkadaşları (2015) *Hypocrea orientalis*'ten elde ettikleri β -glukozidaz enziminin aktivitesinin 50°C'nin altında 30 dk boyunca sabit kaldığını, 67°C'nin üzerinde 30. dakikadan sonra hidroliz hızının düştüğünü ve ürün artışının olmadığını, 80°C'de ise tamamen aktivitesini kaybettiğini raporlamışlardır. Souza ve arkadaşları (2010) *Humicola insolens*'ten saflaştırdıkları β -glukozidaz enziminin 50°C 60 dk; 55°C'de 43,8 $\pm$ 3,7 dk; 60°C'de 20 dk aktivite gösterdiğini, sonrasında aktivitesini kaybettiğini tespit etmişlerdir. Qin ve arkadaşları (2020) *Fusarium chlamydosporum* HML278'den saflaştırdıkları iki β -glukozidaz enziminin de (BG FH1 ve BG FH2) 70°C'de 1 saat inkübe edildiğinde aktivitesinin %75'ini koruduğunu rapor etmişlerdir. Bai ve arkadaşları (2013) *Penicillium simplicissimum* H-11E'den saflaştırdıkları β -glukozidazın 50°C'de 4 saat boyunca aktivitesini koruduğunu, sıcaklığın 60°C'den 80°C'ye yükseltilmesi ile birlikte aktivitede çok keskin bir düşüş (1523 EU'dan 106,1 EU'ya) gözlemlediklerini raporlamışlardır. Asic ve arkadaşları (2015) *Agaricus bisporus*'tan saflaştırdıkları β -glukozidaz enziminin 65°C'nin altındaki sıcaklıklarda 2 saat boyunca gerçekleştirdikleri inkübasyonlarda kayda değer bir aktivite düşüşü gözlemlediklerini, 65°C'de yaklaşık 20 dakika aktivitesini koruduğunu, 75°C'de ise anında inaktif hale geldiğini rapor etmişlerdir. Çelen Yücetürk ve Azaz (2025) *Trichoderma koningii*'den saflaştırdıkları β -glukozidaz enziminin 45°C'de 120 dk inkübasyon sonucunda aktivitesinin %84,73'ünü koruduğunu tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda saflaştırılan β -glukozidaz enziminin kinetik parametreleri incelenmiştir. Enzimin *p*NPG substratına karşı ilgisini gösteren K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır. K_m değeri 2,8571 mM; V_{max} değeri 14285,71 EU ve enzimin katalitik etkinliğinin ölçüsü olan V_{max}/K_m oranı 5000,0735 olarak hesaplanmıştır (Bkz. Tablo 3.7). Belirlenen K_m ve V_{max} değerleri, farklı konsantrasyonlardaki *p*NPG varlığında yapılan aktivite ölçümlerinin sonucunda elde edilmiştir. Ölçüm sonuçları ile çizilen Lineweaver-Burk grafiğinden elde

edilen denklem kullanılarak K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır. V_{max} değeri, sabit konsantrasyondaki bir enzimin değişken substrat konsantrasyonlarına bağlı olarak ulaştığı en yüksek reaksiyon hızını ifade ederken K_m değeri ise en yüksek reaksiyon hızının gözlemlendiği noktadaki substrat konsantrasyonunu ifade etmektedir. Yan ve arkadaşları (2016) topraktan izole ettikleri *Aspergillus terreus*'tan saflaştırdıkları β -glukozidaz enziminin K_m değerinin 1,73 mmol/L; V_{max} değerinin 42,37 U/mg olduğunu belirtmişlerdir. Qin ve arkadaşları (2020) *Fusarium chlamydosporum* HML278'den saflaştırdıkları β -glukozidaz enziminin K_m değerinin 2,76 mg/ml; V_{max} değerinin 20,6 U/mg olduğunu bildirmişlerdir. Liu ve arkadaşları (2012) *Aspergillus fumigatus* Z5'ten saflaştırdıkları nBgl3 enziminin K_m değerini 1,73 mM; V_{max} değerini 141,60 U/mg ve rBgl3 enziminin K_m değerini 1,76 mM olarak hesaplamışlardır. Joo ve arkadaşları (2009) *Fomitopsis pinicola*'dan saflaştırdıkları β -glukozidaz enziminin K_m değerini 1,8 mM olarak raporlamışlardır. Kimura ve arkadaşları (1999) *Aspergillus sojae*'den saflaştırdıkları β -glukozidaz enziminin K_m değerinin 0,14 mM ve V_{max} değerinin 16,7 $\mu\text{molmin}^{-1}\text{mg protein}^{-1}$ olduğunu belirtmişlerdir. Kaur ve arkadaşları (2007) *Melanocarpus sp.* MTCC 3922'den saflaştırdıkları β -glukozidaz enziminin K_m değerini 3,3 mM ve V_{max} değerini 43,68 $\mu\text{molmin}^{-1}\text{mg protein}^{-1}$ olarak hesaplamışlardır. İncelenen literatürler ile çalışmamızda elde ettiğimiz K_m ve V_{max} değerleri karşılaştırıldığında; saflaştırdığımız β -glukozidaz enziminin K_m değerinin literatür verilerine benzer veya yüksek olduğu, V_{max} değerinin ise oldukça yüksek olduğu görülmektedir. K_m değerinin yüksek olması substrata olan ilginin düşük olması anlamına gelmesine karşın V_{max} değerinin yüksek olması substratı daha hızlı hidrolize ettiğini göstermektedir. Bunun sonuçlara dayanarak çalışmamızda saflaştırdığımız β -glukozidaz enziminin endüstride kullanımının avantajlı olduğunu söyleyebiliriz.

Çalışmamızda β -glukozidaz enziminin genel inhibitörü olan D(+)glukozun ve pNPG'nin bulunduğu ortamda enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonunu ifade eden IC_{50} değeri ile enzim aktivitesine etki eden inhibisyon tipi belirlenerek K_i değerleri hesaplanmıştır. *A. aculeatus*'tan saflaştırdığımız β -glukozidaz enziminin D(+)glukoz inhibitörü için IC_{50} değeri 11,49 mM (Bkz. Tablo 3.8, Şekil 3.12), K_i değeri $1,7857 \times 10^{-3}$ (Bkz. Tablo 3.10, Şekil 3.14) olarak hesaplanarak yarışmalı tipte inhibisyon etkisine sahip olduğu belirlenmiştir. Singh ve arkadaşları (2023) *Neofusicoccum parvum* F7 suşundan üç β -glukozidaz izoformu saflaştırmış ve IC_{50} değerlerini Bgl1 için 2,6; Bgl2 için 22,6; Bgl3 için 319,5 mM olarak hesapladıklarını raporlamışlardır. Asic ve arkadaşları (2015) *Agaricus bisporus*'tan saflaştırdıkları β -glukozidaz enziminin D(+)glukoz inhibitörü için IC_{50}

değerini 19,185 mM; K_i değerini ise 9,402 mM olarak hesaplamışlar ve yarışmalı tipte inhibisyon etkisi gösterdiğini belirtmişlerdir. Liu ve arkadaşları (2019) saflaştırdıkları β -glukozidazın D(+)glukoz inhibitörü için IC_{50} değerinin 0,8 M olduğunu belirtmişlerdir. Job ve arkadaşları (2023) *Paecilomyces variotii* MG3'ten saflaştırdıkları β -glukozidaz izoenzim I'in K_i değerinin 901,6 M olduğunu raporlamışlardır. Krogh ve arkadaşları (2010) *Penicilium brasilianum*'dan saflaştırdıkları β -glukozidaz enziminin (rBGL) D(+)glukoz inhibitörü için K_i değerinin 2,3 mM; *Aspergillus niger*'den saflaştırdıkları β -glukozidaz enziminin ise aynı inhibitör için K_i değerinin 1,1 mM olduğunu rapor etmişlerdir. Elshafei ve ark. (2011), *Aspergillus terreus* NRRL 265'ten saflaştırdıkları β -glukozidaz enziminin D(+)glukoz inhibitörü için K_i değerini 13,6 mM olarak hesaplamış ve D(+)glukoz inhibitörünün β -glukozidaz enzimine karşı kompetitif tipte inhibisyon etkisi gösterdiğini tespit etmişlerdir. Decker ve arkadaşları (2001) *Aspergillus turbingensis* CBS 643.92'den saflaştırdıkları dört ayrı β -glukozidaz enziminin K_i değerlerinin 5,8; 1,3; 470 ve 600 mM olduklarını belirtmişlerdir.

Çalışmamızda β -glukozidaz enziminin genel inhibitörü olan δ -glukonolaktonun ve pNPG'nin bulunduğu ortamda enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonunu ifade eden IC_{50} değeri ile enzim aktivitesine etki eden inhibisyon tipi belirlenerek K_i değerleri hesaplanmıştır. *A. aculeatus*'tan saflaştırdığımız β -glukozidaz enziminin δ -glukonolakton inhibitörü için IC_{50} değeri 13,64 mM (Bkz. Tablo 3.9, Şekil 3.13), K_i değerleri $7,143 \times 10^{-5}$ ve $1,07145 \times 10^{-4}$ (Bkz. Tablo 3.11, Şekil 3.15) olarak hesaplanarak yarışmalı tipte inhibisyon etkisine sahip olduğu belirlenmiştir. Asic ve arkadaşları (2015) *Agaricus bisporus*'tan saflaştırdıkları β -glukozidaz enziminin δ -glukonolakton inhibitörü için IC_{50} değerini 0,39 mM; K_i değerini ise 7,2 mM olarak hesaplamışlar ve yarışmalı tipte inhibisyon olduğunu belirtmişlerdir. Elshafei ve ark. (2011), *Aspergillus terreus* NRRL 265'ten saflaştırdıkları β -glukozidaz enziminin δ -glukonolakton inhibitörü için K_i değerini 1,9 mM olarak hesaplamış ve δ -glukonolakton inhibitörünün β -glukozidaz enzimine karşı kompetitif tipte inhibisyon etkisi gösterdiğini tespit etmişlerdir. Krogh ve arkadaşları (2010) *Penicilium brasilianum*'dan saflaştırdıkları β -glukozidaz enziminin (rBGL) δ -glukonolakton inhibitörü için K_i değerinin 0,1 mM; *Aspergillus niger*'den saflaştırdıkları β -glukozidaz enziminin ise aynı inhibitör için K_i değerinin 0,12 mM olduğunu rapor etmişlerdir.

Yarışmalı tip inhibisyonda inhibitör, substrat ile yapısal olarak benzerlik göstermektedir. Bu benzerlik sayesinde substrat ile bir yarış içerisinde enzimin aktif bölgesine bağlanmaya

alışır. İnhibitör ve substrat aynı anda enzime bağlanamaz ve bu sebeple ortamdaki substrat konsantrasyonunun yeterince yükseltilmesiyle inhibisyonun üstesinden gelinebilmektedir. Selülozların endüstride kullanımının yaygınlaşması ve özellikle çalışma konumuzu oluşturan β -glukozidaz enziminin gıda sanayi, ilaç sanayi, kozmetik endüstrisi, tekstil endüstrisi, hayvancılık ve kağıt endüstrisinde uygulamalarının giderek yaygınlaşması, enzime olan ilgiyi de büyük oranda artırmaktadır. Ayrıca sürdürülebilirlik ve yenilenebilirlik açısından tarım atıklarının değerlendirilmesiyle çevreye karşı oluşturduğumuz pozitif etki de çalışmamızın önemli bir amacıdır. Bunların yanında endüstride ticari öneme sahip β -glukozidaz enziminin elde edilmesinde mikroorganizma kökenli enzim kaynaklarına bir yenisinin daha eklenmesi, düşük maliyetle saflaştırma teknikleri ile enzimin biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi de bilime önemli katkı sağlamaktadır.

KAYNAKLAR

Albayati, S. H., Nezhad, N. G., Taki, A. G., and Abd Rahman, R. N. Z. R. (2024). Efficient and easible biocatalysts: Strategies for enzyme improvement. A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 276, 133978. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.133978>

Ali, S., Noor, P., Ahmad, M. U., Khan, Q. F., William, K., Liaqat, I., and Bourhia, M. (2024). Kinetics of cellulase-free endo xylanase hyper-synthesis by *Aspergillus Niger* using wheat bran as a potential solid substrate. *BMC biotechnology*, 24(1), 69. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12896-024-00895-w>

Alu'datt, M. H., Rababah, T., Kubow, S., and Alli, I. (2019). Molecular changes of phenolic–protein interactions in isolated proteins from flaxseed and soybean using Native-PAGE, SDS-PAGE, RP-HPLC, and ESI-MS analysis. *Journal of food biochemistry*, 43(5), e12849. Doi: <https://doi.org/10.1111/jfbc.12849>

Ašić, A., Bešić, L., Muhović, I., Dogan, S., and Turan, Y. (2015). Purification and characterization of β -glucosidase from *Agaricus bisporus* (white button mushroom). *The protein journal*, 34(6), 453-461. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10930-015-9640-z>

Bhat, M. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology advances*, 18(5), 355-383. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(00\)00041-0](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00041-0)

Bai, H., Wang, H., Sun, J., Irfan, M., Han, M., Huang, Y., and Yang, Q. (2013). Production, purification and characterization of novel beta glucosidase from newly isolated *Penicillium simplicissimum* H-11 in submerged fermentation. *EXCLI journal*, 12, 528. Doi: [10.17877/DE290R-7346](https://doi.org/10.17877/DE290R-7346)

Baibarac, M., Smaranda, I., Nila, A., and Serbschi, C. (2019). Optical properties of folic acid in phosphate buffer solutions: the influence of pH and UV irradiation on the UV-VIS absorption spectra and photoluminescence. *Scientific Reports*, 9(1), 14278. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50721-z>

Bajpai, P. (2012). *Biotechnology for pulp and paper processing*. Springer Science & Business Media. Doi: <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1409-4>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Basso, A., and Serban, S.** (2019). Industrial applications of immobilized enzymes—A review. *Molecular Catalysis*, 479, 110607. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2019.110607>
- Beauchemin, K. A., Colombatto, D., Morgavi, D. P., and Yang, W. Z.** (2003). Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *Journal of Animal Science*, 81(E. Suppl. 2), E37–E47. Doi: https://doi.org/10.2527/2003.8114_suppl_2E37x
- Baraldo Junior, A., Borges, D. G., Tardioli, P. W., and Farinas, C. S.** (2014). Characterization of β -glucosidase produced by *Aspergillus niger* under solid-state fermentation and partially purified using MANAE-Agarose. *Biotechnology research international*, 2014(1), 317092. Doi: <https://doi.org/10.1155/2014/317092>
- Bhardwaj, N., Kumar, B., Agrawal, K., and Verma, P.** (2021). Current perspective on production and applications of microbial cellulases: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, 8(1), 95. Doi: <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00447-6>
- Bi, Y. F., Wang, X. Z., Jiang, S., Liu, J. S., Zheng, M. Z., and Chen, P.** (2019). Enzymatic transformation of ginsenosides Re, Rg1, and Rf to ginsenosides Rg2 and aglycon PPT by using β -glucosidase from *Thermotoga neapolitana*. *Biotechnology letters*, 41(4), 613-623. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10529-019-02665-7>
- Brijwani, K., and Vadlani, P. V.** (2011). Cellulolytic enzymes production via solid-state fermentation: effect of pretreatment methods on physicochemical characteristics of substrate. *Enzyme research*, 2011(1), 860134. Doi: <https://doi.org/10.4061/2011/860134>
- Chang, K. H., Jo, M. N., Kim, K. T., and Paik, H. D.** (2012). Purification and characterization of a ginsenoside Rb1-hydrolyzing β -glucosidase from *Aspergillus niger* KCCM 11239. *International journal of molecular sciences*, 13(9), 12140-12152. Doi: <https://doi.org/10.3390/ijms130912140>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Chaudhari, M. (2022). Preparation of buffer solution. *Pharmacy Infoline*. Kokan Gyanpeeth Rahul Dharkar College of Pharmacy and Research Institute, Karjat. Doi: [10.5281/zenodo.10826597](https://doi.org/10.5281/zenodo.10826597)

Chevallet, M., Luche, S., and Rabilloud, T. (2006). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature protocols*, 1(4), 1852-1858. Doi: <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.288>

Cosgrove, D. J. (2014). Re-constructing our models of cellulose and primary cell wall assembly. *Current opinion in plant biology*, 22, 122-131. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.11.001>

Couto, S. R., and Sanromán, M. A. (2005). Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal*, 22(3), 211-219. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2004.09.013>

Çelen Yüçetürk, S., ve Azaz, A. D. (2025). Production, purification, and determination of the biochemical properties of β -glucosidase in *Trichoderma koningii* via solid substrate fermentation. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 80(1-2), 9-19. Doi: <https://doi.org/10.1515/znc-2024-0026>

Da Costa, S. G., Pereira, O. L., Teixeira-Ferreira, A., Valente, R. H., de Rezende, S. T., Guimarães, V. M., and Genta, F. A. (2018). *Penicillium citrinum* UFV1 β -glucosidases: purification, characterization, and application for biomass saccharification. *Biotechnology for biofuels*, 11(1), 226. Doi: [10.1186/s13068-018-1226-5](https://doi.org/10.1186/s13068-018-1226-5)

Decker, C., Visser, J., and Schreier, P. J. A. M. (2001). β -Glucosidase multiplicity from *Aspergillus tubingensis* CBS 643.92: purification and characterization of four β -glucosidases and their differentiation with respect to substrate specificity, glucose inhibition and acid tolerance. *Applied microbiology and biotechnology*, 55(2), 157-163. Doi: <https://doi.org/10.1007/s002530000462>

Dikshit, R., and Tallapragada, P. (2014). Partial purification and characterization of β -glucosidase from *Monascus sanguineus*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58(2), 185-191. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-8913201400040>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Egwim, C. E. F. (2025). Enzymes: redefining the axiom 'jack of all trade'. https://inaugural.futminna.edu.ng/wp-content/uploads/2025/03/Final-inugural-22-finalssEEE_0610111.pdf (Erişim tarihi: 10 Mayıs 2026)
- Ejaz, U., Sohail, M., and Ghanemi, A. (2021). Cellulases: from bioactivity to a variety of industrial applications. *Biomimetics*, 6(3), 44. Doi: <https://doi.org/10.3390/biomimetics6030044>
- El-Gendi, H., Saleh, A. K., Badierah, R., Redwan, E. M., El-Maradny, Y. A., and El-Fakharany, E. M. (2021). A comprehensive insight into fungal enzymes: structure, classification, and their role in mankind's challenges. *Journal of Fungi*, 8(1), 23. Doi: <https://doi.org/10.3390/jof8010023>
- Elshafei, A. M., Hassan, M. M., Morsi, N. M., and Elghonamy, D. H. (2011). Purification and some kinetic properties of β -glucosidase from *Aspergillus terreus* NRRL 265. *Afr J Biotechnol*, 10(84), 19556-19569. Doi: <https://doi.org/10.5897/AJB10.2617>
- Elyas, K. K., Mathew, A., Sukumaran, R. K., Ali, P. M., Sapna, K., Kumar, S. R., and Mol, K. R. (2010). Production optimization and properties of beta glucosidases from a marine fungus *Aspergillus*-SA 58. *New Biotechnology*, 27(4), 347-351. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.02.007>
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S., and Rai, V. (2013). A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed research international*, 2013(1), 329121. Doi: <https://doi.org/10.1155/2013/329121>
- Han, Y., Du, J., and Song, Z. (2021). Effects of the yeast endogenous β -glucosidase on hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bunge) wine ethyl carbamate and volatile compounds. *Journal of Food Composition and Analysis*, 103, 104084. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104084>
- Harhangi, H. R., Steenbakkers, P. J., Akhmanova, A., Jetten, M. S., van der Drift, C., and den Camp, H. J. O. (2001). 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(3), 293-303. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(01\)00380-3](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(01)00380-3)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Hasenekoğlu, İ. (1991). *Toprak Mikrofungusları*. Erzurum: Atatürk Üniversitesi Yayınları No. 689., Kazım Karabekir Eğitim Kurumları Yayınları No. 11

Hassan, F. S., El-Fakharany, E. M., El-Maradny, Y. A., Saleh, A. K., El-Sayed, M. H., Mazi, W., and El-Gendi, H. (2024). Comprehensive insight into exploring the potential of microbial enzymes in cancer therapy: Progress, challenges, and opportunities: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 277, 134535. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.134535>

Hasunuma, T., Okazaki, F., Okai, N., Hara, K. Y., Ishii, J., and Kondo, A. (2013). A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology. *Bioresource technology*, 135, 513-522. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.047>

He, H., Huang, Q., Huang, Z., Luo, Y., and Qin, Y. (2022). Rapid purification and enzymatic properties of two thermostable β -glucosidase from *Cladosporium cladosporioides* Lcx9. *China Brewing*, 41(7), 76-81. Doi: [10.11882/j.issn.0254-5071.2022.07.014](https://doi.org/10.11882/j.issn.0254-5071.2022.07.014)

Ijaz, A., Anwar, Z., Zafar, Y., Hussain, I., Muhammad, A., Irshad, M., and Mehmood, S. (2011). Optimization of cellulase enzyme production from corn cobs using *Alternaria alternata* by solid state fermentation. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 9(2), 51-56. Doi: [10.13140/RG.2.2.16093.56808](https://doi.org/10.13140/RG.2.2.16093.56808)

International Union of Biochemistry and Molecular Biology, ExplorEnz- the Enzyme Database. (Erişim tarihi: 10 Mayıs 2026) <https://www.enzyme-database.org/class.php>

Islam, F., and Roy, N. (2018). Screening, purification and characterization of cellulase from cellulase producing bacteria in molasses. *BMC research notes*, 11(1), 445. Doi: <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3558-4>

Jayasekara, S., and Ratnayake, R. (2019). Microbial cellulases: an overview and applications. *Cellulose*. Doi: <https://dx.doi.org/10.5772/intechopen.84531>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jeilu, O., Alexandersson, E., Johansson, E., Simachew, A., and Gessesse, A.** (2024). A novel GH3- β -glucosidase from soda lake metagenomic libraries with desirable properties for biomass degradation. *Scientific Reports*, 14(1), 10012. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-60645-y>
- Job, J., Abraham, A., and Jayachandran, K.** (2023). Purification and characterization of a highly glucose tolerant β -glucosidase isozyme from *Paecilomyces variotii* MG3. *Sustainability, Agri, Food and Environmental Research-DISCONTINUED*, 11. Doi: <https://doi.org/10.7770/safer.v11i1.2421>
- Johnsen, H. R., and Krause, K.** (2014). Cellulase activity screening using pure carboxymethylcellulose: application to soluble cellulolytic samples and to plant tissue prints. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(1), 830-838. Doi: <https://doi.org/10.3390/ijms15010830>
- Joo, A. R., Jeya, M., Lee, K. M., Sim, W. I., Kim, J. S., Kim, I. W., and Lee, J. K.** (2009). Purification and characterization of a β -1, 4-glucosidase from a newly isolated strain of *Fomitopsis pinicola*. *Applied microbiology and biotechnology*, 83(2), 285-294. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1861-7>
- Kaenying, W., Tagami, T., Suwan, E., Pitsanu Wong, C., Chomngam, S., Okuyama, M., and Kongsaree, P. T.** (2023). Structural and mutational analysis of glycoside hydrolase family 1 Br2 β -glucosidase derived from bovine rumen metagenome. *Heliyon*, 9(11). Doi: [10.1016/j.heliyon.2023.e21923](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e21923)
- Kannan, P., Achudhan, A. B., Gupta, A., and Saleena, L. M.** (2023). A review on applications of β -glucosidase in food, brewery, pharmaceutical and cosmetic industries. *Carbohydrate Research*, 530, 108855. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2023.108855>
- Kara, H. E., Sinan, S., ve Turan, Y.** (2011). Purification of beta-glucosidase from olive (*Olea europaea* L.) fruit tissue with specifically designed hydrophobic interaction chromatography and characterization of the purified enzyme. *Journal of Chromatography B*, 879(19), 1507-1512. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.03.036>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kaur, J., Chadha, B. S., Kumar, B. A., Kaur, G., and Saini, H. S.** (2007). Purification and characterization of β -glucosidase from *Melanocarpus* sp. MTCC 3922. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10(2), 260-270. Doi: <https://doi.org/10.2225/vol10-issue2-fulltext-4>
- Keerti, Gupta, A., Kumar, V., Dubey, A., and Verma, A. K.** (2014). Kinetic characterization and effect of immobilized thermostable β -glucosidase in alginate gel beads on sugarcane juice. *International Scholarly Research Notices*, 2014(1), 178498. Doi: <https://doi.org/10.1155/2014/178498>
- Khopade, S., Gomte, S. S., Janrao, C., Bavaskar, A., Agnihotri, T. G., Jain, A., and Khatik, R.** (2024). Peptide and protein delivery through cellulose, hyaluronic acid, and heparin. In *Peptide and protein drug delivery using polysaccharides* (pp. 75-113). Academic Press. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-18925-8.00003-9>
- Kung, L., Treacher, R. J., Nauman, G. A., Smagala, A. M., Endres, K. M., and Cohen, M. A.** (2000). The effect of treating forage with fibrolytic enzymes on its nutritive value and lactation performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 83(5), 115–122. Doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74862-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74862-4)
- Kristianto, H., Rahman, H., Prasetyo, S., and Sugih, A. K.** (2019). Removal of Congo red aqueous solution using *Leucaena leucocephala* seed's extract as natural coagulant. *Applied water science*, 9(4), 88. Doi: <https://doi.org/10.1007/s13201-019-0972-2>
- Krogh, K. B., Harris, P. V., Olsen, C. L., Johansen, K. S., Hojer-Pedersen, J., Borjesson, J., and Olsson, L.** (2010). Characterization and kinetic analysis of a thermostable GH3 β -glucosidase from *Penicillium brasilianum*. *Applied microbiology and biotechnology*, 86(1), 143-154. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2181-7>
- Kügler, M., Jänsch, L., Kruff, V., Schmitz, U. K., and Braun, H. P.** (1997). Analysis of the chloroplast protein complexes by blue-native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE). *Photosynthesis Research*, 53(1), 35-44. Doi: <https://doi.org/10.1023/A:1005882406718>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680-685. Doi: <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lemieux, R. U., and Spohr, U.** (1994). How emil fischer was led to the lock and key concept for enzyme specificity¹. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, 50, 1. https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=o2KFo2DqIJoC&oi=fnd&pg=PA1&ots=yFhtBKVk5k&sig=4MhDIdUXMr2S_qOhIaO6hsLVu6w&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false (Erişim tarihi: 10 Mayıs 2026)
- Leong, S. L., Hocking, A. D., and Pitt, J. I.** (2004). Occurrence of fruit rot fungi (*Aspergillus section Nigri*) on some drying varieties of irrigated grapes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10(1), 83-88. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2004.tb00010.x>
- Li, B., Wang, Z., Li, S., Donelan, W., Wang, X., Cui, T., and Tang, D.** (2013). Preparation of lactose-free pasteurized milk with a recombinant thermostable β -glucosidase from *Pyrococcus furiosus*. *BMC biotechnology*, 13(1), 73. Doi: <https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-73>
- Li, L., Liu, H., Liu, T., Mi, J., Cai, R., and Xu, H.** (2025). β -Glucosidase: progress from basic mechanism to frontier application. *Fermentation*, 11(10), 588. Doi: <https://doi.org/10.3390/fermentation11100588>
- Limaye, L., and Patil, R. C.** (2016). Identifying the strains having ability to produce ligninolytic enzyme laccase from the plethora of *Actinomyces* isolated from soil and mangrove samples. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(5), 878-884. Doi: <http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2016.505.091>
- Lin, Y., Chen, G., Ling, M., and Liang, Z.** (2010). A method of purification, identification and characterization of β -glucosidase from *Trichoderma koningii* AS3. 2774. *Journal of microbiological methods*, 83(1), 74-81. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.07.019>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Liu, D., Zhang, R., Yang, X., Zhang, Z., Song, S., Miao, Y., and Shen, Q.** (2012). Characterization of a thermostable β -glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, and its functional expression in *Pichia pastoris* X33. *Microbial cell factories*, 11(1), 25. Doi: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-25>
- Liu, X., Cao, L., Zeng, J., Liu, Y., and Xie, W.** (2019). Improving the cellobiose-hydrolysis activity and glucose-tolerance of a thermostable β -glucosidase through rational design. *International journal of biological macromolecules*, 136, 1052-1059. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.029>
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. L., and Randall, R. J.** (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J biol Chem*, 193(1), 265-275. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Lu, X., Li, X., and Zhao, J.** (2024). Improving enzymatic efficiency of β -glucosidases in cellulase system by altering its binding behavior to the insoluble substrate during bioconversion of lignocellulose. *Bioresource Technology*, 391, 129974. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129974>
- Luetz, S., Giver, L., and Lalonde, J.** (2008). Engineered enzymes for chemical production. *Biotechnology and bioengineering*, 101(4), 647-653. Doi: <https://doi.org/10.1002/bit.22077>
- Macris, B. J.** (1984). Production and characterization of cellulase and β -glucosidase from a mutant of *Alternaria alternata*. *Applied and environmental microbiology*, 47(3), 560-565. Doi: <https://doi.org/10.1128/aem.47.3.560-565.1984>
- Mallek-Fakhfakh, H., Fakhfakh, J., Masmoudi, N., Rezgui, F., Gargouri, A., and Belghith, H.** (2016). Agricultural wastes as substrates for β -glucosidase production by *Talaromyces thermophilus*: role of these enzymes in enhancing waste paper saccharification. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 47(4), 414-423. Doi: <https://doi.org/10.1080/10826068.2016.1252928>
- Manns, J. M.** (2011). SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of proteins. *Current protocols in microbiology*, 22(1), A-3M. Doi: <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca03ms22>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

McDonald, A. G., and Tipton, K. F. (2023). Enzyme nomenclature and classification: the state of the art. *The FEBS journal*, 290(9), 2214-2231. Doi: <https://doi.org/10.1111/febs.16274>

Meleiro, L. P., Zimbardi, A. L. R. L., Souza, F. H. M., Masui, D. C., Silva, T. M., Jorge, J. A., and Furriel, R. P. M. (2014). A novel β -glucosidase from *Humicola insolens* with high potential for untreated waste paper conversion to sugars. *Applied biochemistry and biotechnology*, 173(2), 391-408. Doi: <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0847-9>

Merad, Y., Derrar, H., Belmokhtar, Z., and Belkacemi, M. (2021). *Aspergillus* genus and its various human superficial and cutaneous features. *Pathogens*, 10(6), 643. Doi: <https://doi.org/10.3390/pathogens10060643>

Mhuantong, W., Charoensri, S., Poonsrisawat, A., Pootakham, W., Tangphatsornruang, S., Siamphan, C., and Chantasingh, D. (2021). High quality *Aspergillus aculeatus* genomes and transcriptomes: a platform for cellulase activity optimization toward industrial applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 607176. Doi: [10.3389/fbioe.2020.607176](https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.607176)

MYCO Bank Database. “Fungal databases, nomenclature and species banks”. (Erişim tarihi: 03 Şubat 2026) <https://www.mycobank.org/Basic%20names%20search> (Erişim tarihi: 10 Mayıs 2026)

Nagar, S., Gupta, V. K., Kumar, D., Kumar, L., and Kuhad, R. C. (2010). Production and optimization of cellulase-free, alkali-stable xylanase by *Bacillus pumilus* SV-85S and its application in biobleaching of kraft pulp. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37(1), 71–83. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0691-z>

National Center for Biotechnology Information (NCBI). “*Aspergillus aculeatus*”. (Erişim tarihi: 02 Şubat 2026) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/tree/?taxon=5053&expanded=2759> (Erişim tarihi: 10 Mayıs 2026)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nazir, A., Soni, R., Saini, H. S., Manhas, R. K., and Chadha, B. S.** (2009). Regulation Of Expression Of Multiple β -Glucosidases Of *Aspergillus Terreus* And Their Purification And Characterization. *Bioresources*, 4(1). Doi: [10.15376/biores.4.1.155-171](https://doi.org/10.15376/biores.4.1.155-171)
- Ndochinwa, O. G., Wang, Q. Y., Amadi, O. C., Nwagu, T. N., Nnamchi, C. I., Okeke, E. S., and Moneke, A. N.** (2024). Current status and emerging frontiers in enzyme engineering: An industrial perspective. *Heliyon*, 10(11). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e32673>
- Ng, I. S., Li, C. W., Chan, S. P., Chir, J. L., Chen, P. T., Tong, C. G., and Ho, T. H. D.** (2010). High-level production of a thermoacidophilic β -glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-5 by solid-state fermentation with rice bran. *Bioresource technology*, 101(4), 1310-1317. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.049>
- Niepmann, M., and Zheng, J.** (2006). Discontinuous native protein gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 27(20), 3949-3951. Doi: <https://doi.org/10.1002/elps.200600172>
- Nimker, V., Patel, A. K., Chen, C. W., Giri, B. S., Dong, C. D., and Singhania, R. R.** (2025). Molecular engineering and biotechnological advancements in β -glucosidase for industrial impact: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 318, 145133. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.145133>
- Nkala, S., Rabi, S. L., and Ncube, T.** (2020). Optimization of solid state fermentation conditions for improved production of cellulases by *Didymella phacea*. *Zimbabwe Journal of Science and Technology*, 15(1), 34-47. Doi: <https://journals.nust.ac.zw/index.php/zjst/article/view/160>
- Pandey, A.** (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical engineering journal*, 13(2-3), 81-84. Doi: [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00121-3](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00121-3)
- Pandey, A., Soccol, C. R., and Mitchell, D.** (2000). New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process biochemistry*, 35(10), 1153-1169. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00152-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00152-7)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Parry, N. J., Beever, D. E., Owen, E., Vandenberghe, I., Beeumen, J. V., and Bhat, M. K. (2001). Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable β -glucosidase purified from *Thermoascus aurantiacus*. *Biochemical Journal*, 353(1), 117-127. Doi:

<https://doi.org/10.1042/bj3530117>

Payne, S. M. (2019). Laboratory cultivation and storage of *Shigella*. *Current protocols in microbiology*, 55(1), e93. Doi:

<https://doi.org/10.1002/cpmc.93>

Pereira, V. J., Fernandes, D., Carvalho, G., Benoliel, M. J., San Romão, M. V., and Crespo, M. B. (2010). Assessment of the presence and dynamics of fungi in drinking water sources using cultural and molecular methods. *Water Research*, 44(17), 4850-4859. Doi:

<https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.07.018>

Pontoh, J., and Low, N. H. (2002). Purification and characterization of β -glucosidase from honey bees (*Apis mellifera*). *Insect biochemistry and molecular biology*, 32(6), 679-690. Doi:

[https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(01\)00147-3](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(01)00147-3)

Qian, L. C., Sun, J. Y., and Fu, S. J. (2012). Effect of β -glucosidase on the meat quality and digestibility in broilers. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 96(2), 270-274. Doi:

<https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2011.01148.x>

Qin, Y., Li, Q., Luo, F., Fu, Y., and He, H. (2020). One-step purification of two novel thermotolerant β -1, 4-glucosidases from a newly isolated strain of *Fusarium chlamydosporum* HML278 and their characterization. *AMB Express*, 10(1), 182. Doi: [10.1186/s13568-020-01116-1](https://doi.org/10.1186/s13568-020-01116-1)

Queiroz, J. A., Tomaz, C. T., and Cabral, J. M. S. (2001). Hydrophobic interaction chromatography of proteins. *Journal of biotechnology*, 87(2), 143-159. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00237-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00237-1)

Pensupa, N., Jin, M., Kokolski, M., Archer, D. B., and Du, C. (2013). A solid state fungal fermentation-based strategy for the hydrolysis of wheat straw. *Bioresource technology*, 149, 261-267. Doi:

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.09.061>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Porter, J. L., Rusli, R. A., and Ollis, D. L.** (2016). Directed evolution of enzymes for industrial biocatalysis. *ChemBioChem*, 17(3), 197-203. Doi: <https://doi.org/10.1002/cbic.201500280>
- Richard, T. L., Veecken, A. H., De Wilde, V., and Hamelers, H. V. M.** (2004). Air-filled porosity and permeability relationships during solid-state fermentation. *Biotechnology progress*, 20(5), 1372-1381. Doi: <https://doi.org/10.1021/bp0499505>
- Rodrigues, V. J., and Odaneth, A. A.** (2021). Industrial application of cellulases. In *Current Status and Future Scope of Microbial Cellulases* (pp. 189-209). Elsevier. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821882-2.00007-7>
- Roychowdhury, T., Santhaseela, A. R., Sharma, S., Panchal, P., Rodina, A., and Chiosis, G.** (2023). Use of native-PAGE for the identification of epichaperomes in cell lines. In *Chaperones: Methods and protocols* (pp. 175-191). New York, NY: Springer US. Doi: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3342-7_14
- Ruan, L., Su, M., Qin, X., Ruan, Q., Lang, W., Wu, M., and Lv, Q.** (2022). Progress in the application of sustained-release drug microspheres in tissue engineering. *Materials Today Bio*, 16, 100394. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2022.100394>
- Sambrook, J., and Russell, D. W.** (2006). SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. *CSH Protoc*, 2006(4), pdb-prot4540. Doi: <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4540>
- Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraeken, J., Hong, S. B., Hubka, V., Klaassen, C. H., and Frisvad, J.** (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in mycology*, 78(1), 141-173. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>
- Saxena, I. M., Brown Jr, R. M., and Dandekar, T.** (2001). Structure–function characterization of cellulose synthase: relationship to other glycosyltransferases. *Phytochemistry*, 57(7), 1135-1148. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00048-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00048-6)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shruthi, K., Yadav, P. S., Prasad, B. S., and Chandra, M. S.** (2019). Cellulase production by *Aspergillus unguis* in solid state fermentation. *Journal of Forestry Research*, 30(1), 205-212. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11676-018-0619-4>
- Shukolyukov, S. A.** (2011). Native electrophoresis in cell proteomic: BN-PAGE and CN-PAGE. *Cell and Tissue Biology*, 5(3), 311-318. Doi: <https://doi.org/10.1134/S1990519X11030126>
- Sinan, S., Kockar, F., ve Arslan, O.** (2006). Novel purification strategy for human PON1 and inhibition of the activity by cephalosporin and aminoglikozide derived antibiotics. *Biochimie*, 88(5), 565-574. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2005.12.004>
- Singh, G., Verma, A. K., and Kumar, V.** (2016). Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of β -glucosidases. 3 *Biotech*, 6(1), 3. Doi: <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0328-z>
- Singh, N., Sithole, B., Kumar, A., and Govinden, R.** (2023). A glucose tolerant β -glucosidase from a newly isolated *Neofusicoccum parvum* strain F7: production, purification, and characterization. *Scientific Reports*, 13(1), 5134. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-32353-6>
- Singhania, R. R., Patel, A. K., Soccol, C. R., and Pandey, A.** (2009). Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 44(1), 13-18. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.10.019>
- So, J. H., Do, H. J., and Rhee, I. K.** (2010). Purification and characterization of β -Glucosidase from *Aspergillus usamii* D5 capable of hydrolyzing isoflavone glycosides in soybean and astragali radix. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 53(5), 626-633. Doi: <https://doi.org/10.3839/jksabc.2010.095>
- Souza, F. H. M., Nascimento, C. V., Rosa, J. C., Masui, D. C., Leone, F. A., Jorge, J. A., and Furriel, R. P. M.** (2010). Purification and biochemical characterization of a mycelial glucose-and xylose-stimulated β -glucosidase from the thermophilic fungus *Humicola insolens*. *Process Biochemistry*, 45(2), 272-278. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.09.018>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Srivastava, N., Rathour, R., Jha, S., Pandey, K., Srivastava, M., Thakur, V. K., and Mishra, P. K.** (2019). Microbial beta glucosidase enzymes: recent advances in biomass conversation for biofuels application. *Biomolecules*, 9(6), 220. Doi: <https://doi.org/10.3390/biom9060220>
- Su, E., Xia, T., Gao, L., Dai, Q., and Zhang, Z.** (2010). Immobilization of β -glucosidase and its aroma-increasing effect on tea beverage. *Food and Bioproducts Processing*, 88(2-3), 83-89. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2009.04.001>
- Sugiwati, S., Hanafi, M., Lioe, H. N., and Suhartono, M. T.** (2020). Effect of growth conditions on β -glucosidase production by local isolate of *Aspergillus niger* using rice bran substrate. *Biodiversitas*, 21(9), 4058-4066. Doi: <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210917>
- Sulyman, A. O., Igunnu, A., and Malomo, S. O.** (2020). Isolation, purification and characterization of cellulase produced by *Aspergillus niger* cultured on Arachis hypogaea shells. *Heliyon*, 6(12). Doi: [10.1016/j.heliyon.2020.e05668](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05668)
- Taha, M., Kadali, K. K., AL-Hothaly, K., Smith, A. T., Ball, A. S., and Adetutu, E. M.** (2015). An effective microplate method (Biolog MT2) for screening native lignocellulosic-straw-degrading bacteria. *Annals of microbiology*, 65(4), 2053-2064. Doi: <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1044-y>
- Teather, R. M., and Wood, P. J.** (1982). Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and environmental microbiology*, 43(4), 777-780. Doi: <https://doi.org/10.1128/aem.43.4.777-780.1982>
- VanderMolen, K. M., Raja, H. A., El-Elimat, T., and Oberlies, N. H.** (2013). Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program. *Ambio Express*, 3(1), 71. Doi: [10.1186/2191-0855-3-71](https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-71)
- Viikari, L., Kantelinen, A., Sundquist, J., and Linko, M.** (1994). Xylanases in bleaching: From an idea to the industry. *FEMS Microbiology Reviews*, 13(2-3), 335–350. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00053.x>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C. N., de Jesus Romero-Gomez, S., Diaz-Godínez, G., and Augur, C. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), 157-167. Doi:

[https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00128-6](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00128-6)

Wang, S., Wang, T., Sun, Y., Cui, Y., Yu, G., and Jiang, L. (2021). Effects of high hydrostatic pressure pretreatment on the functional and structural properties of rice bran protein hydrolysates. *Foods*, 11(1), 29. Doi:

<https://doi.org/10.3390/foods11010029>

Warburg, O., and Christian, W. (1941). Isolierung und kristallisation des gärungsferments enolase. *Naturwissenschaften*, 29(39), 589-590. Doi:

<https://doi.org/10.1007/BF01482279>

Wei, D. L., Kirimura, K., Usami, S., and Lin, T. H. (1996). Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase from the wood-grown fungus *Xylaria regalis*. *Current Microbiology*, 33(5), 297-301. Doi:

<https://doi.org/10.1007/s002849900117>

Xu, X. Q., Shi, Y., Wu, X. B., Zhan, X. L., Zhou, H. T., and Chen, Q. X. (2015). Heat inactivation kinetics of *Hypocrea orientalis* β -glucosidase with enhanced thermal stability by glucose. *International journal of biological macromolecules*, 81, 1012-1018. Doi:

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.09.022>

Yan, F. Y., Xia, W., Zhang, X. X., Chen, S., Nie, X. Z., and Qian, L. C. (2016). Characterization of β -glucosidase from *Aspergillus terreus* and its application in the hydrolysis of soybean isoflavones. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 17(6), 455-464. Doi:

[10.1631/jzus.B1500317](https://doi.org/10.1631/jzus.B1500317)

Yun, S. I., Jeong, C. S., Chung, D. K., and Choi, H. S. (2001). Purification and some properties of a β -glucosidase from *Trichoderma harzianum* type C-4. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 65(9), 2028-2032. Doi:

<https://doi.org/10.1271/bbb.65.2028>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Zhang, G., and Dong, Y.** (2022). Design and application of an efficient cellulose-degrading microbial consortium and carboxymethyl cellulase production optimization. *Frontiers in Microbiology*, 13, 957444. Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.957444>
- Zhang, Y., Min, Z., Qin, Y., Ye, D. Q., Song, Y. Y., and Liu, Y. L.** (2019). Efficient Display of *Aspergillus niger* β -glucosidase on *Saccharomyces cerevisiae* cell wall for aroma enhancement in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(18), 5169-5176. Doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00863>
- Zhou, J., Liang, M., Lin, Y., Pang, H., Wei, Y., Huang, R., and Du, L.** (2022). Application of β -glucosidase in a biphasic system for the efficient conversion of polydatin to resveratrol. *Molecules*, 27(5), 1514. Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules27051514>

EKLER

EKLER

EK A: Kullanılan Besiyerleri, Tamponlar ve Çözeltiler

A.1: *A. aculeatus*'un geliştirilmesinde kullanılan besiyerleri

Czapek Dox Agar Besiyeri (Merck)

Czapek dox agar.....	7,2 g
Saf su.....	150 ml

%5 CMC içeren Czapek Dox Agar Besiyeri

CMC (C ₂₈ H ₃₀ Na ₈ O ₂₇) (Sigma).....	5 g
Czapek dox agar (Merck).....	4,8 g
Saf su.....	100 ml

Malt Extract Agar Besiyeri (Merck)

Malt ekstrakt agar.....	9,6 g
Saf su.....	200 ml

Belirtilen miktarlarda hazırlanan besiyerleri 121°C 20dk otoklavlandıktan sonra petri kaplarına paylaştırılmıştır (Pereira et al., 2010; VanderMolen et al., 2013; Johnsen and Krause, 2014).

Czapek Dox Broth Besiyeri (Difco)

Czapek dox broth.....	7 g
Saf su.....	200 ml

Hazırlanan dehidre besiyeri 121°C'de 20dk erlen içerisinde otoklavlandıktan sonra soğumaya bırakılmıştır

A.2: Hidroliz zonu varlığının saptanmasında kullanılan çözeltiler

Kongo Kırmızısı çözeltisi (%1)

Kongo kırmızısı.....	0,25 g
Saf su.....	25 ml

1M Sodyum klorür çözeltisi (NaCl)

Sodyum klorür (NaCl).....8,77 g

Saf su.....150 ml

Çözeltiler belirtilen miktarlardaki bileşenlerin saf su içerisinde çözündürülmesiyle hazırlanmıştır (Kristianto et al., 2019; Payne, 2019).

A.3: Spor süspansiyonu eldesinde kullanılan Tween 80 çözeltisi

Tween 80.....1 ml

Saf su.....1000 ml

Hazırlanan çözelti 121 °C’de 20 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. (Limaye and Patil, 2016).

A.4: KSF ortamı için hazırlanan çözeltiler

0,2 M Sitrik asit monohidrat (1,2,3-Propantrikarboksilikasit asit) tamponu

1,2,3-propantrikarboksilikasit asit ($C_6H_8O_7$) (Sigma-Aldrich)3,1521 g

Saf su75 ml

3,1521 g 1,2,3-propantrikarboksilikasit saf su içerisinde tamamen çözülerek balon jöjeye alınıp saf su ile son hacim 75 ml’ye tamamlanmıştır. Elde edilen çözeltinin pH değeri uygun asit/baz çözeltileri kullanılarak ayrı ayrı pH 4,0; pH 5,0 ve pH 5,5 olacak şekilde ayarlanmıştır (Chaudhari, 2022).

0,2 M Sodyum dihidrojen fosfat tamponu

Sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4) (Carlo-Erba).....11,0384 g

Saf su400 ml

11,0384 g sodyum dihidrojen fosfat saf su içerisinde çözülerek 500 ml’lik balon jöjeye aktarılmış ve saf su ilavesiyle son hacim 400 ml’ye tamamlanmıştır. Elde edilen çözeltinin pH değeri uygun asit/baz çözeltileri kullanılarak ayrı ayrı pH 6,0; pH 6,5; pH 7,0; pH 7,5 ve pH 8,0 olacak şekilde ayarlanmıştır (Baibarac et al., 2019; Chaudhari, 2022).

0,2 M Disodyum hidrojen fosfat tamponu

Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4)2,6694 g

Saf su75 ml

2,6694 g disodyum hidrojen fosfatın saf su içerisinde çözülmesi sağlandıktan sonra 100 ml’lik balon jöjeye transfer edilerek saf su ile son hacim 75 ml’ye tamamlanmıştır. Elde

edilen çözeltinin pH değeri uygun asit/baz çözeltileri kullanılarak ayrı ayrı pH 8,5 ve pH 9,0 olacak şekilde ayarlanmıştır (Baibarac et al., 2019; Chaudhari, 2022).

A.5: Enzim aktivitesi ölçümlerinde kullanılan çözeltiler

50 mM Sodyum asetat trihidrat tamponu

Sodyum asetat trihidrat ($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$)1,0206 g
Saf su150 ml
1,0206 g sodyum asetat trihidrat (Sigma-Aldrich) bir miktar saf su içerisinde çözülerek çözeltinin pH değeri 7,0 olacak şekilde ayarlanmıştır. Daha sonra saf su ilavesiyle son hacim 150 ml'ye tamamlanmıştır (Nazir et al., 2009; Chaudhari, 2022; Jeilu et al., 2024).

5 mM *p*-nitrofenil- β -D-glukopirenosit (*p*NPG) solüsyonu

*p*NPG0,0045 g
50 mM (pH 7) sodyum asetat trihidrat tamponu.....3 ml
Taze olarak hazırlanacak olan *p*-nitrofenil- β -D-glukopiranozit (*p*NPG) substratı için 0,0045 g *p*NPG sodyum asetat tamponu içerisinde çözülerek çözelti hacmi tampon ilavesiyle 3 ml'ye tamamlanmıştır (Nazir et al., 2009; Jeilu et al., 2024).

Reaksiyon durdurucu tampon (sodyum karbonat)

Sodyum karbonat (Na_2CO_3) (Sigma-Aldrich).....3,9704 g
Saf su75 ml
3,9704 g sodyum karbonat (Na_2CO_3) saf su içerisinde çözülerek saf su ilavesiyle son hacim 75 ml'ye tamamlanmıştır (Nazir et al., 2009; Jeilu et al., 2024).

A.6: Kantitatif protein miktarı ölçümünde kullanılan çözeltiler (Lowry metodu)

A çözeltisi

Sodyum hidroksit (NaOH) (Sigma-Aldrich).....0,80020 g
Sodyum Karbonat (Na_2CO_3) (Sigma-Aldrich).....4 g
Saf su.....200 ml
0,80020 g Sodyum hidroksit (NaOH) 200 ml saf su içerisinde çözüldükten sonra çözeltiye 4 g sodyum karbonat (Na_2CO_3) ilavesi ile A çözeltisi hazırlanmıştır (Lowry et al., 1951).

B çözeltisi

Potasyum sodyum tartarat ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$) (Merck).....0,25 g
Saf su.....25 ml
0,25 g potasyum sodyum tartarat saf su içerisinde çözülüp balon joje içine alınarak saf su ile son hacimin 25 ml'ye tamamlanması ile B çözeltisi hazırlanmıştır (Lowry et al., 1951).

C çözeltisi

Bakır Sülfat ($CuSO_4$) (Sigma-Aldrich).....0,5 g
Saf su.....25 ml
0,5 g bakır sülfat saf su içerisinde çözüldükten sonra son hacim saf su ile 25 ml'ye tamamlanarak C çözeltisi hazırlanmıştır (Lowry et al., 1951).

D çözeltisi

A çözeltisi.....9,6 ml
B çözeltisi.....0,2 ml
C çözeltisi.....0,2 ml
D çözeltisi, taze olarak 9,6 ml A çözeltisi, 0,2 ml B çözeltisi ve 0,2 ml C çözeltisinin karıştırılmasıyla hazırlanmıştır (Lowry et al., 1951).

E çözeltisi (Folin ayracı)

Folin–Ciocalteu fenol reaktifi (Merck) saf su ile 1:1 (v/v) oranında seyreltilerek taze E çözeltisi hazırlanmıştır (Lowry et al., 1951).

Sığır serum albümin (BSA)

Bovin serum albümini (BSA) saf su ile 1:1 (v/v) oranında seyreltilerek standart çözelti hazırlanmıştır (Lowry et al., 1951).

A.7: HEK (Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi) metodunda kullanılan tampon çözeltiler

Tuzlu tampon çözeltisi (pH 6,8)

1,5 M Amonyum sülfat tuzu ($NH_4(SO_2)$) (Merck).....99,105 g
0,05 M Disodyum monohidrojen fosfat ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) (Carlo-Erba).....4,449 g
Saf su.....500 ml

Yukarıda adı ve miktarları belirtilen bileşenler saf su içinde çözülerek çözeltinin pH değeri 6,8'e ayarlanmıştır. Daha sonra çözelti balon jojeye aktarılmış ve saf su ile son hacim 500 ml'ye tamamlanmıştır (Queiroz et al., 2001).

Tuzsuz tampon çözeltisi (pH 6,8)

0,05 M Disodyum monohidrojen fosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Carlo-Erba)..... 4,449 g
Saf su.....500 ml
Yukarıda belirtilen molarite ve miktardaki Disodyum monohidrojen fosfat saf su içerisinde çözülerek, pH 6,8'e ayarlanmış ve saf su ilavesiyle son hacim 250 ml'ye tamamlanmıştır (Queiroz et al., 2001).

A.8: SDS-PAGE tekniğinde kullanılan çözelti ve tamponlar

Ayrırma jeli

Saf su.....3 ml
Tris-Base ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$) (pH 8,8)1,875 ml
SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$)75 μl
%30'luk Akrilamid/Bis.....2,5 ml
TEMED (N,N,N,N Tetrametil etilen diamine)3,75 μl
%10'luk APS (Amonyum persülfat)((NH_4) $_2\text{S}_2\text{O}_8$)112,5 μl
Jel çözeltisi; yukarıda belirtilen miktardaki bileşenlerin karıştırılması ile hazırlanarak donmanın gerçekleşmesi için yaklaşık 45 dakika bekletilmiştir (Laemmli, 1970; Sambrook and Russell, 2006).

Ayrırma jeli hazırlanırken kullanılan alt tampon

Tris-Base (1,5M).....17,73 g
Saf su.....75 ml
Belirtilen miktardaki Tris-Base (1,5M) saf suda çözündürüldükten sonra pH'ı 8,8 olarak ayarlanıp saf su ile son hacim 75 ml'ye tamamlanmıştır (Laemmli, 1970; Sambrook and Russell, 2006).

Yığma jeli

Saf su4,575 ml
Tris-Base ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$) (pH 6,8)1,875 ml
SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$).....75 μl

%30'luk Akrilamid/Bis.....937,5 ml
TEMED (N,N,N,N Tetrametil etilen diamine)7,5 µl
%10'luk Amonyum persülfat (APS)150µl
Jel çözeltisi; yukarıda belirtilen miktardaki bileşenlerin karıştırılması ile hazırlanarak donmanın gerçekleşmesi için yaklaşık 45 dakika bekletilmiştir (Laemmli, 1970; Sambrook and Russell, 2006).

Yığma jeli hazırlanırken kullanılan üst tampon

Tris-Base (0,5M).....5,91 g
Saf su.....75 ml
Üst tampon çözeltisi için Tris-Base saf suda çözüldükten sonra pH değeri 6,8'e ayarlanarak son hacim saf su ilavesiyle 75 ml'ye tamamlanmıştır (Laemmli, 1970; Sambrook and Russell, 2006).

%10'luk Amonyum persülfat ((NH₄)₂S₂O₈)

APS (Amonyum persülfat)((NH₄)₂S₂O₈).....0,4 g
Saf su.....4 ml
Bu amaçla 0,4 g APS saf suda çözülerek son hacim 4 ml'ye tamamlanmıştır (Laemmli, 1970; Sambrook and Russell, 2006).

Tank tamponu

Tris-Base (C₄H₁₁NO₃)1,5 g
Glisin (C₂H₅NO₂)12,2 g
SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) (C₁₂H₂₅NaO₄S)0,5 g
Saf su.....500 ml
SDS-PAGE tank tamponu hazırlamak amacıyla yukarıda belirtilen bileşenler saf suda çözüldükten sonra son hacim saf su ile 500 ml'ye tamamlanmıştır (Laemmli, 1970; Sambrook and Russell, 2006).

Örnek Yükleme tamponu

Tris-Base (6,8) (C₄H₁₁NO₃).....5 ml
%10'luk SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) (C₁₂H₂₅NaO₄S)8 ml
Gliserol(C₃H₈O₃).....4 ml
β-merkaptotanol (C₂H₆OS)2 ml

Bromfenol mavisi0,02 g
Saf su1 ml
Örnek yükleme tamponu; yukarıda listelenen bileşenlerin karıştırılması ile hazırlanmıştır (Laemmli, 1970; Sambrook and Russell, 2006).

%10'luk SDS (sodyum dodesil sülfat)

%10'luk SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) ($C_{12}H_{25}NaO_4S$).....0,3 g
Saf su3 ml
SDS stok çözeltisi hazırlamak amacıyla 0,3 g SDS saf suda çözülüş ve son hacim 3 ml'ye tamamlanmıştır (Laemmli, 1970; Sambrook and Russell, 2006).

Jel boyama çözeltisi

Coomassie brilliant blue.....0,33 g
%96 Asetik asit (CH_3COOH).....12 ml
%99 Metanol (CH_3OH).....60 ml
Saf su60 ml
Coomassie brilliant blue 0,33 g tartılıp 60 ml saf suda çözülerek üzerine 60 ml metanol ve 12 ml asetik asit eklenmiştir (Manns, 2011).

Jel yıkama çözeltisi

Asetik asit (CH_3COOH).....60 ml
Metanol (CH_3OH).....40 ml
Saf su700 ml
40 ml metanol ve 60 ml asetik asit karıştırıldıktan sonra 700 ml saf su ile seyreltilmiştir (Manns 2011).

A.9: NATIVE-PAGE tekniğinde kullanılan tampon ve çözeltiler

Ayrırma jeli

Tris-Base ($C_4H_{11}NO_3$) (pH 8,8).....5 ml
%30'luk Akrilamid/Bis.....5 ml
Temed (N,N,N,N Tetrametil etilen diamine).....20 μ l
%10'luk Amonyum persülfat (APS) ($(NH_4)_2S_2O_8$)200 μ l
Saf su9,78 ml

Jel çözeltisi; yukarıda belirtilen miktardaki bileşenlerin karıştırılması ile hazırlanarak donmanın gerçekleşmesi için yaklaşık 45 dakika bekletilmiştir (Kügler et al., 1997; Niepmann and Zheng, 2006; Shukolyukov, 2011).

Ayırma jeli hazırlanırken kullanılan alt tampon

Tris-Base (1,5M).....23,64 g
Saf su100 ml
Belirtilen miktar ve molaritedeki Tris-Base saf suda çözüldükten sonra pH'ı 8,8'e ayarlanarak son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır (Kügler et al., 1997; Niepmann and Zheng, 2006; Shukolyukov, 2011).

Yığma jeli

Tris-Base ($C_4H_{11}NO_3$) (pH 6,8)2,5 ml
%30'luk Akrilamid/Bis.....1,25 ml
Temed (N,N,N,N Tetrametil etilen diamine).....10µl
%10'luk Amonyum persülfat (APS).....100µl
Saf su6,14 ml
Yukarıdaki bileşime göre hazırlanan jel cam plaklara dökülerek donması sağlanmıştır (Kügler et al., 1997; Niepmann and Zheng, 2006; Shukolyukov, 2011).

Yığma jeli hazırlanırken kullanılan üst tampon

Tris-Base (0,5M).....3,152 g
Saf su40 ml
3,152 g Tris-Base (0,5M) bir miktar saf suda çözüldükten sonra pH 6,8'e ayarlanarak son hacim saf su ile 40 ml'ye tamamlanmıştır (Kügler et al., 1997; Niepmann and Zheng, 2006; Shukolyukov, 2011).

%10'luk Amonyum persülfat ((NH₄)₂S₂O₈)

APS (Amonyum persülfat) ((NH₄)₂S₂O₈).....0,2 g
Saf su2 ml
0,2 g APS 2 ml saf suda çözülerek hazırlanmıştır (Kügler et al., 1997; Niepmann and Zheng, 2006; Shukolyukov, 2011).

Tank tamponu

Tris-Base ($C_4H_{11}NO_3$)6 g
Glisin ($C_2H_5NO_2$)28,8 g
Saf su2000 ml
6,0 g Tris-Base ve 28,8 g glisin bir miktar saf suda çözülüp son hacim 2000 ml'ye tamamlanmıştır (Kügler et al., 1997; Niepmann and Zheng, 2006; Shukolyukov, 2011).

Yükleme tamponu

Tris-Base (6,8) ($C_4H_{11}NO_3$)5 ml
Gliserol ($C_3H_8O_3$)4 ml
Bromfenol mavisi 0,02 g
Saf su1 ml
0,02 g Bromfenol mavisi, 5 ml Tris Base (0,5M, pH: 6,8) içerisinde çözülerek üzerine 4 ml Gliserol ve 1 ml saf su eklenerek hazırlanmıştır (Kügler et al., 1997; Niepmann and Zheng, 2006; Shukolyukov, 2011).

Yıkama çözeltisi

Asetik Asit (%96).....75,0 ml
Metanol (%99)50,0 ml
Saf su875 ml
50 ml metanol ve 75 ml asetik asit karıştırıldıktan sonra 875 ml saf su ile seyreltilmiştir (Manns 2011).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Mert ÇOKER

Doğum tarihi ve yeri :

e-posta :

Öğrenim Bilgileri

Derece	Okul/Program	Yıl
Y. Lisans	Balıkesir Üniversitesi / Biyoloji	2023-2026
Lisans	Gazi Üniversitesi / Biyoloji	2013-2017
Lise	Bahçelievler Lisesi	2009-2013