

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



*Trichoderma atroviride*'den  $\beta$ -GLUKOSİDAZ ELDESİ,  
SAFLAŞTIRILMASI VE BİYOKİMYASAL  
KARAKTERİZASYONUNUN BELİRLENMESİ

HATİCE AYDIN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jüri Üyeleri : Dr. Öğr. Üyesi Selma ÇELEN YÜCETÜRK (Tez Danışmanı)  
Prof. Dr. Ayşe Dilek AZAZ (Eş Danışman)  
Doç. Dr. Hatice YILDIRIM  
Doç. Dr. Sema ÇARIKÇI

BALIKESİR, HAZİRAN - 2024

## ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “*Trichoderma atroviride*’den  $\beta$ -glukosidaz eldesi, saflaştırılması ve biyokimyasal karakterizasyonunun belirlenmesi” 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.

**Hatice AYDIN**  
(imza)

## ÖZET

### ***Trichoderma atroviride*'den $\beta$ -GLUKOSİDAZ ELDESİ, SAFLAŞTIRILMASI VE BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONUNUN BELİRLENMESİ**

#### **YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HATICE AYDIN**

**BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**(TEZ DANIŞMANI: DR. ÖĞR. ÜYESİ SELMA ÇELEN YÜCETÜRK)**

**(EŞ DANIŞMAN: PROF. DR. AYŞE DİLEK AZAZ)**

**BALIKESİR, HAZİRAN - 2024**

Bu çalışmada, *Trichoderma atroviride* NRRL 25150'den elde edilen  $\beta$ -glukosidaz enzimi, öğütülmüş fasulye kabuğu kullanılarak Katı Substrat Fermentasyonu (KSF) yöntemiyle üretilmiştir. Ardından elde edilen enzim, iki farklı yöntem kullanılarak saflaştırılmıştır.

İlk aşamada *Trichoderma atroviride*'den KSF ortamında  $\beta$ -glukosidaz enzimi elde edilmesi için gereken optimum şartlar belirlenmiştir. Optimum ortam şartları; nemlendirme sıvısı olarak Sitrik asit monohidrat tamponu ( $C_6H_8O_7$ ), pH 5, sıcaklık  $25^\circ C$  ve inkübasyon süresi 4 gündür.

Saflaştırdığımız  $\beta$ -glukosidaz'ın saflaştırma verimi ve kat sayısı sırasıyla %17,1434 ve 6,7117 kat olarak belirlenmiştir.  $\beta$ -glukosidazın saflığı ve alt birim varlığı/sayısının belirlenmesi için Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel elektroforez metodu uygulanmış ve enzimin yaklaşık olarak 70 kDa ve 60 kDa moleküler ağırlığında iki alt birime sahip olduğu saptanmıştır. Saflaştırılan enzimin aktivitesinin tespit edilmesinde *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranosit (*p*NPG) kullanılarak enzimin yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık değeri ve pH değerleri sırasıyla  $65^\circ C$  ve pH 3 olarak belirlenmiştir.  $\beta$ -glukosidaz enziminin kinetik parametreleri de çalışılmıştır.  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri 0,0869 mM ve 434,782 EU olarak hesaplanmıştır. Buna ek olarak,  $\beta$ -glukosidaz enzimine  $\delta$ -glukonolakton ve D(+)-glukoz inhibitörlerinin *p*NPG substratı bulunan ortamda karışık tipte inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir.  $\delta$ -glukonolakton inhibitörünün  $K_i$  ve  $IC_{50}$  değerleri ise sırasıyla  $K_i(1)$ :  $0,0712 \times 10^{-3}$ ,  $K_i(2)$ :  $0,068 \times 10^{-3}$  ve 8,4214 mM; D(+)-glukoz inhibitörünün  $K_i$  ve  $IC_{50}$  değerleri sırasıyla  $K_i(1)$ :  $4,31 \times 10^{-3}$ ,  $K_i(2)$ :  $29,45 \times 10^{-3}$  ve 9,7395 mM olarak hesaplanmıştır.

**ANAHTAR KELİMELER:** *Trichoderma atroviride*,  $\beta$ -glukosidaz, katı substrat fermentasyonu, saflaştırma, biyokimyasal karakterizasyon

## ABSTRACT

**PURIFICATION, DETERMINATION OF BIOCHEMICAL  
CHARACTERIZATION OF  $\beta$ -GLUCOSIDASE FROM *Trichoderma atroviride*  
MSC THESIS  
HATICE AYDIN  
BALIKESIR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE  
MOLECULAR BIOLOGY AND GENETIC  
(SUPERVISOR: ASSIST. PROF. DR. SELMA CELEN YUCETURK )  
(CO-SUPERVISOR: PROF. DR. AYSE DILEK AZAZ )  
BALIKESİR, JUNE - 2024**

In this research, the Beta-glucosidase enzyme from *Trichoderma atroviride* NRRL 25150 was produced by the Solid State Fermentation (SSF) method utilizing ground bean pods. Subsequently, the enzyme obtained in this way was then purified using two different methods.

The first step was the determination of the optimal conditions for the production of  $\beta$ -glucosidase from *Trichoderma atroviride* in SSF medium. Citric acid monohydrate buffer ( $C_6H_8O_7$ ) as humidifying liquid, pH 5, temperature 25°C and incubation time 4 days were considered as optimal conditions.

The purification yield and the fold number of the purified  $\beta$ -glucosidase were determined to be 17.1434 % and 6.7117 fold, respectively. Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel electrophoresis was used to determine the purity and the presence/number of subunits of  $\beta$ -glucosidase and it was found that the enzyme has two subunits with molecular weights of approximately 70 kDa and 60 kDa. The activity of the purified enzyme was evaluated with the use of *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (*p*NPG). The temperature and pH at which the enzyme exhibited high activity were determined to be 65°C and pH 3 respectively. The kinetic properties of  $\beta$ -glucosidase were also investigated.  $K_m$  and  $V_{max}$  were calculated as 0.0869 mM and 434.782 EU, respectively. Furthermore,  $\delta$ -gluconolactone and D(+)-glucose inhibitors were found to exert mixed inhibition on  $\beta$ -glucosidase enzyme in the absence of *p*NPG substrate.  $K_i$  and  $IC_{50}$  of  $\delta$ -gluconolactone inhibitor were calculated as  $K_i(1)$ :  $0.0712 \times 10^{-3}$ ,  $K_i(2)$ :  $0.068 \times 10^{-3}$  and 8.4214 mM;  $K_i$  and  $IC_{50}$  values of D(+)-glucose inhibitor were calculated as  $K_i(1)$ :  $4.31 \times 10^{-3}$ ,  $K_i(2)$ :  $29.45 \times 10^{-3}$  and 9.7395 mM, respectively.

**KEYWORDS:** *Trichoderma atroviride*,  $\beta$ -glucosidase, solid state fermentation, purification, biochemical characterization

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ .....	vi
TABLO LİSTESİ.....	vii
SEMBOL LİSTESİ .....	viii
ÖNSÖZ .....	ix
<b>1. Giriş .....</b>	<b>1</b>
1.1 Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması .....	2
1.2 Enzimlerin Özellikleri.....	7
1.3 Selülozun Yapısı ve Özellikleri .....	8
1.4 Selülazların Yapısı ve Özellikleri .....	9
1.4.1 Endoglukanaz.....	10
1.4.2 Ekzoglukanaz .....	10
1.4.3 Beta-glukosidaz.....	11
1.5 Selülazların Kullanım Alanları .....	11
1.5.1 Şarap Endüstrisi .....	12
1.5.2 Gıda Endüstrisi.....	12
1.5.3 Zeytinyağı Ekstraksiyonu.....	12
1.5.4 Karotenoid Ekstraksiyonu.....	13
1.5.5 Flavonoid Ekstraksiyonu.....	13
1.5.6 Tekstil Endüstrisi .....	13
1.5.7 Deterjan Endüstrisi.....	14
1.5.8 Hayvan Yemi .....	15
1.5.9 Kağıt Hamuru ve Kağıt Endüstrisi .....	15
1.5.10 Tarım Endüstrisi .....	16
1.5.11 Biyoyakıt Endüstrisi .....	16
1.5.12 Hastalıkların Tedavisi.....	16
1.5.13 $\beta$ -glukosidaz Enziminin Kullanıldığı Alanlar.....	17
1.5.14 Selülaz Üreten Organizmalar.....	19
1.6 <i>Trichoderma</i> Genel Özellikleri .....	20
1.6.1 <i>Trichoderma atroviride</i> 'nin Sınıflandırılması .....	20
1.6.2 <i>Trichoderma</i> 'nın Karakteristik Özellikleri .....	21
1.7 Katı Substrat Fermentasyonu.....	21
1.8 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi .....	22
<b>2. MATERYAL ve YÖNTEM .....</b>	<b>26</b>
2.1 Materyal .....	26
2.2 Patates Dekstroz Agar (%5 CMC) Besiyerinde Yetiştirilen Mikrofungusların $\beta$ -glukosidaz Aktivitesi Yönünden İncelenmesi .....	26

2.2.1.1	<i>Trichoderma atroviride</i> Bissett (1984) .....	26
2.2.2	Kullanılan Tampon ve Solüsyonlar.....	27
2.2.2.1	<i>Trichoderma atroviride</i> 'nin Geliştirilmesinde Kullanılan Besiyerleri.....	27
2.2.2.2	PDA (%5 CMC ) Geliştirilen Mikrofungusların $\beta$ - glukosidaz Aktivitesi Yönünden İncelenmesinde Kullanılan Solüsyonlar .....	28
2.2.2.3	Spor Süspansiyonu Hazırlamada Kullanılan Çözelti .....	29
2.2.2.4	KSF Ortamı Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler.....	29
2.2.2.5	Enzim Aktivitesini Belirlemede Kullanılan Tampon ve Solüsyonlar .....	30
2.2.2.6	Lowry Yöntemiyle Protein Miktarının Belirlenmesinde Hazırlanan Solüsyonlar	30
2.2.2.7	HEK Metodundaki Hazırlanan Solüsyonlar.....	32
2.2.2.8	SDS-PAGE Yöntemindeki Tampon ve Solüsyonların Hazırlanması .....	32
2.2.2.9	SDS-PAGE'deki Boya Solüsyonları .....	34
2.3	Yöntem.....	35
2.3.1	Patates Dekstroz Agar (%5 CMC) Besiyerinde Yetiştirilen <i>Trichoderma</i> <i>atroviride</i> 'nin $\beta$ -glukosidaz Aktivitesi Yönünden İncelenmesi.....	35
2.3.2	Mikrofungusun Geliştirilmesi ve Sporlarının Elde Edilmesi.....	35
2.3.3	Katı Substrat Fermentasyonu Ortamının Hazırlanması .....	35
2.3.4	<i>Trichoderma atroviride</i> Sıvı Kültürünün KSF Ortamına Ekilmesi .....	36
2.3.4.1	Kısmi Saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz Enziminin Elde Edilmesi .....	36
2.3.5	KSF koşullarında <i>Trichoderma atroviride</i> 'nin $\beta$ -glukosidaz Enzim Üretimine Ortam Koşullarının Etkisi .....	36
2.3.5.1	KSF Ortamının Optimum pH ve Nemlendirme Sıvısının Saptanması.....	36
2.3.5.2	KSF Ortamının Optimum İnkübasyon Sıcaklığının Saptanması .....	37
2.3.5.3	KSF Ortamının Optimum İnkübasyon Süresinin Saptanması.....	37
2.3.6	Kısmi Saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz Enzimi Aktivitesinin Saptanması .....	38
2.3.7	Protein Miktarının Tespit Edilmesi.....	38
2.3.7.1	Warburg Yöntemi.....	38
2.3.7.2	Lowry Yöntemi .....	38
2.3.7.3	Standart BSA Grafiğinin Oluşturulması.....	39
2.3.8	$\beta$ -glukosidaz Enziminin Saflaştırma Aşamaları.....	40
2.3.8.1	Amonyum Sülfat Çöktürme (ASÇ) Aralığının Tespit Edilmesi .....	40
2.3.8.2	Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığı Belirlendikten Sonraki HEK Öncesi $\beta$ - glukosidaz Enzim Saflaştırılması .....	41
2.3.8.3	$\beta$ -glukosidaz Enziminin Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Saflaştırılması	41
2.3.9	<i>Trichoderma atroviride</i> 'den Saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz'ın Alt Birim Sayısı/Varlığı ve Homojenliğinin SDS -PAGE Yöntemiyle Saptanması .....	42
2.3.9.1	<i>Trichoderma atroviride</i> 'den Saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz'ın Alt Birim Sayısı/Varlığı ve Homojenliğinin SDS -PAGE Yöntemiyle Saptanması.....	42
2.3.10	<i>T. atroviride</i> 'den Elde Edilip Saflaştırılan $\beta$ -glukosidazın Kinetik ve Biyokimyasal Karakterizasyonunun Saptanması.....	43
2.3.10.1	<i>T. atroviride</i> 'den Elde Edilip Saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz'ın Optimum pH Değerinin Saptanması.....	43
2.3.10.2	<i>T. atroviride</i> 'den Saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz'ın Optimum Sıcaklık Değerinin Saptanması.....	43
2.3.10.3	<i>T. atroviride</i> 'den Elde Edilip Saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz'ın Termal Kararlılığının Saptanması.....	44
2.3.10.4	<i>T. atroviride</i> 'den Elde Edilip Saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz'ın $K_m$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Saptanması.....	44

2.3.10.5 <i>T. atroviride</i> 'den Elde Edilip Saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz'ın İnhibitörlerinin $IC_{50}$ Değerlerinin Saptanması.....	45
2.3.10.6 <i>T. atroviride</i> 'den Elde Edilip Saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz'ın İnhibitörleri $\delta$ -glukonolakton ve D(+)-glukozun $K_i$ Değerlerinin Saptanması.....	45
<b>3. BULGULAR.....</b>	<b>46</b>
3.1 Patates Dekstroz Agar (%5 CMC) Besiyerinde Yetiştirilen Mikrofungusların $\beta$ -glukosidaz Aktivitesi Yönünden İncelenmesi .....	46
3.2 Katı Substrat Fermentasyon Koşullarının <i>Trichoderma atroviride</i> 'nin $\beta$ -glukosidaz Enzim Üretimine Etkisi.....	46
3.2.1 KSF Ortamının Optimum pH ve Nemlendirme Sıvısının Saptanması .....	46
3.2.2 KSF Ortamının Optimum İnkübasyon Sıcaklığının Saptanması .....	48
3.2.3 KSF Ortamının Optimum İnkübasyon Süresinin Saptanması .....	49
3.3 KSF Yöntemiyle Mikrofungusun Optimum Şartlarda Geliştirilmesi ve Kısmen Saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz Enzim Eldesi .....	50
3.4 <i>Trichoderma atroviride</i> 'den Elde Edilen $\beta$ -glukosidaz'ın Saflaştırma Basamakları ...	50
3.4.1 Amonyum Sülfat Çöktürmesi .....	50
3.5 <i>T. atroviride</i> 'den Elde Edilip Saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz'ın SDS-PAGE Elektroforez Yöntemi ile Homojenliğinin ve Alt Birimlerinin Sayısı/ Varlığının İncelenmesi.....	55
3.6 <i>T. atroviride</i> 'den Elde Edilip Saflaştırılan $\beta$ -glukosidazın Kinetik ve Biyokimyasal Karakterizasyonunun Saptanması.....	56
3.6.1 <i>T. atroviride</i> 'den $\beta$ -glukosidaz'ın Optimum pH Değerinin Saptanması.....	56
3.6.2 <i>T. atroviride</i> 'den Elde Edilip Saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz'ın Optimum Sıcaklık Değerinin Saptanması .....	56
3.6.3 <i>T. atroviride</i> 'den Elde Edilip Saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz'ın Termal Kararlılığının Saptanması .....	57
3.6.4 <i>Trichoderma atroviride</i> 'den Saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz'ın $K_m$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Saptanması .....	58
3.6.5 <i>T. atroviride</i> 'den Saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz Enziminin Genel İnhibitörlerinin $IC_{50}$ Değerlerinin Saptanması .....	60
3.6.5.1 <i>T. atroviride</i> 'den Saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz Enziminin İnhibitörü D(+)-glukozun $IC_{50}$ Değerinin Saptanması .....	60
3.6.5.2 <i>T. atroviride</i> 'den Saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz'ın İnhibitörü $\delta$ -glukonolaktonunu $IC_{50}$ Değerlerinin Saptanması.....	62
3.6.6 <i>T. atroviride</i> 'den Saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz'ın Genel İnhibitörlerinin $K_i$ Değerlerinin ve İnhibisyon Tiplerinin Saptanması .....	64
3.6.6.1 <i>T. atroviride</i> 'den Saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz Enziminin İnhibitörü D(+)-glukozun İnhibisyon Tipinin ve $K_i$ Değerinin Saptanması.....	64
3.6.6.2 <i>T. atroviride</i> 'den Saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz'ın İnhibitörü $\delta$ -glukonolaktonun $K_i$ Değerinin ve İnhibisyon Tipinin Saptanması .....	68
<b>4. TARTIşMA VE SONUÇLAR.....</b>	<b>73</b>
<b>5. KAYNAKÇA.....</b>	<b>87</b>
<b>ÖZGEÇMİş.....</b>	<b>110</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 1.1: Laktat dehidrogenaz enziminin piruvatın L-laktat'a dönüşümünü katalizlediği reaksiyon .....	4
Şekil 1.2: Hekzokinaz enziminin glukozun glukoz-6-fosfat'a dönüşümünü katalizlediği reaksiyon .....	4
Şekil 1.3: Maltaz enziminin maltozun glikoza dönüşümünü katalizlediği reaksiyon .....	5
Şekil 1.4: Fumaraz'ın Fumaratın L-malat'a dönüşümünü katalizlediği reaksiyon .....	6
Şekil 1.5: Fosfogliseratmutaz enziminin 3-fosfogliseratın 2-fosfogliserata dönüşümünü katalizlediği reaksiyon .....	6
Şekil 1.6: Piruvat karboksilaz enziminin piruvatın oksaloasetata dönüşümünü katalizlediği reaksiyon .....	7
Şekil 1.7: Enzimlerin yapısı .....	7
Şekil 1.8: Enzim-substrat kompleksi .....	8
Şekil 1.9: Selülozun yapısı .....	9
Şekil 1.10: Seloluzun enzimatik hidrolizi .....	10
Şekil 2.1: (a) <i>Trichoderma atroviride</i> NRRL 25150 petri (10x10); (b) <i>Trichoderma atroviride</i> NRRL 25150 preparat (10x40).....	27
Şekil 2.2: Lowry yöntemiyle protein miktarının tespit edilmesinde yararlanılan BS standart grafiği.....	39
Şekil 3.1: Çeşitli pH'larda hazırlanan nemlendirme sıvılarının KSF kültür koşullarında <i>Trichoderma atroviride</i> 'den $\beta$ -glukosidaz eldesine etkisi.....	47
Şekil 3.2: Çeşitli inkübasyon sıcaklıklarının KSF kültür ortamında <i>Trichoderma atroviride</i> 'den $\beta$ -glukosidaz eldesine etkisi.....	48
Şekil 3.3: Çeşitli inkübasyon sürelerinin KSF ortam şartlarında <i>Trichoderma atroviride</i> 'den $\beta$ -glukosidaz enzim eldesine etkisi.....	49
Şekil 3.4: Amonyum sülfat çöktürme aralıklarında <i>Trichoderma atroviride</i> 'den kısmen saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz enziminin protein miktarları ve aktiviteleri.....	52
Şekil 3.5: HEK ile saflaştırılan <i>T. atroviride</i> 'den saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz'ın elüsyon grafiği.....	53
Şekil 3.6: <i>T. atroviride</i> 'den saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz enziminin SDS-PAGE görüntüsü..	55
Şekil 3.7: <i>Trichoderma atroviride</i> 'den saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz'ın optimum aktivite gösterdiği pH grafiği.....	56
Şekil 3.8: <i>Trichoderma atroviride</i> 'den saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz'ın optimum aktivite gösterdiği sıcaklık grafiği .....	57
Şekil 3.9: <i>Trichoderma atroviride</i> 'den saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz'ın termal kararlılık grafiği.....	57
Şekil 3.10: <i>T. atroviride</i> 'den saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz'ın $K_m$ ve $V_{max}$ Grafiği .....	60
Şekil 3.11: <i>T. atroviride</i> 'den saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz'ın inhibitörü D(+)-glukozun $IC_{50}$ değerinin grafiği.....	62
Şekil 3.12: <i>T. atroviride</i> 'den saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz'ın inhibitörü $\delta$ -glukonalaktonunu $IC_{50}$ değerinin grafiği.....	64
Şekil 3.13: <i>T. atroviride</i> 'den saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz'a farklı konsantrasyonlardaki D(+)-glukoz inhibisyon etkisi.....	68
Şekil 3.14: <i>T. atroviride</i> 'den saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz'ın farklı konsantrasyonlardaki $\delta$ -glukonalaktonun inhibisyon etkisi.....	72



## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 1. 1:</b> Hidrolaz enzimlerinin etki ettikleri bağlar.....	5
<b>Tablo 3. 1:</b> Çeşitli pH'larda hazırlanan nemlendirme sıvılarının KSF ortam koşullarında <i>Trichoderma atroviride</i> 'den $\beta$ -glukosidaz eldesine etkisi.....	47
<b>Tablo 3. 2:</b> Çeşitli inkübasyon sıcaklıklarının KSF kültür ortamında <i>Trichoderma atroviride</i> 'den $\beta$ -glukosidaz enzim eldesine etkisi.....	48
<b>Tablo 3. 3:</b> Çeşitli inkübasyon sürelerinin KSF ortam şartlarında <i>Trichoderma atroviride</i> 'den $\beta$ -glukosidaz eldesine etkisi.....	49
<b>Tablo 3. 4:</b> Amonyum sülfat çöktürme aralıklarında <i>Trichoderma atroviride</i> 'den kısmen saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz enziminin protein miktarları ve aktiviteleri.....	51
<b>Tablo 3. 5:</b> <i>T. atroviride</i> 'den saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz'ın saflaştırma tablosu.....	54
<b>Tablo 3. 6:</b> <i>T. atroviride</i> 'den saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz'ın $K_m$ ve $V_{max}$ değerlerinin saptanmasın kullanılan veriler. ....	59
<b>Tablo 3. 7:</b> <i>T. atroviride</i> 'den saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz'ın $K_m$ , $V_{max}$ ve $V_{max}/K_m$ değerleri.....	60
<b>Tablo 3. 8:</b> <i>T. atroviride</i> 'den saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz inhibitörü 0,1 M D(+)-glukozun $IC_{50}$ değerinin tespit edilmesinde kullanılan solüsyon miktarları ve ulaşılan değerler.....	61
<b>Tablo 3. 9:</b> <i>T. atroviride</i> 'den saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz enziminin inhibitörü 0,001 M $\delta$ -glukonalaktonun $IC_{50}$ değerinin belirlenmesinde kullanılan solüsyon miktarları ve ulaşılan değerler.....	63
<b>Tablo 3. 10:</b> <i>T. atroviride</i> 'den saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz'ın inhibitörü D(+)-glukozun $K_i$ değerinin ve inhibisyon tipinin saptanması için kullanılan solüsyon miktarları ve ulaşılan değerler.....	65
<b>Tablo 3. 11:</b> <i>T. atroviride</i> 'den saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz'ın inhibitörü $\delta$ -glukonalaktonun $K_i$ değerinin ve inhibisyon tipinin saptanması için kullanılan solüsyon miktarları ve ulaşılan değerler.....	69

## SEMBOL LİSTESİ

<b>mg</b>	: Miligram
<b>g</b>	: Gram
<b><math>\mu</math>L</b>	: Mikrolitre
<b>mL</b>	: Mililitre
<b>M</b>	: Molar
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>rpm</b>	: Dakikadaki Devir Sayısı
<b><math>^{\circ}</math>C</b>	: Santigrat Derece
<b>PDA</b>	: Patates Dektroz Agar Besiyeri
<b>PDB</b>	: Patates Dektsroz Broth Besiyeri
<b>CMC</b>	: Karboksimetil Selüloz
<b>KSF</b>	: Katı Substrat Fermentasyonu
<b>SSF</b>	: Solid State Fermentation
<b><i>p</i>NPG</b>	: <i>p</i> -Nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside
<b>ASÇ</b>	: Amonyum Sülfat Çöktürmesi
<b>HIC</b>	: Hydrophobic Interaction Chromatography
<b>HEK</b>	: Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi
<b><math>\delta</math></b>	: Delta
<b><math>\beta</math></b>	: Beta
<b>E.C</b>	: Enzim Komisyonu
<b>BSA</b>	: Bovin Serum Albumin
<b>EU</b>	: Enzim Ünitesi
<b>TEMED</b>	: N,N,N',N', -tetrametiletildiamin
<b>SDS</b>	: Sodyum Dodesil Sülfat
<b>APS</b>	: Amonyum Persülfat
<b>[I]</b>	: İnhibitör Konsantrasyonu
<b>[S]</b>	: Substrat Konsantrasyonu
<b><math>V_{max}</math></b>	: Maksimum Hız
<b><math>K_m</math></b>	: Michaelis-Menten Sabiti
<b>IC<sub>50</sub></b>	: %50 İnhibe Edici İnhibitör Konsantrasyonu
<b><math>K_i</math></b>	: İnhibitör sabiti
<b><math>\Delta A</math></b>	: Absorbans Farkı

## ÖNSÖZ

Tez çalışmam boyunca destek olan BİDEB 2210/A Genel Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programına teşekkür ederim ve saygılarımı sunarım.

Yüksek Lisansım boyunca her zaman desteğini esirgemeyen, her türlü fedakarlığı yapan, bilgi birikimini sabırla aktaran ve yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ayşe Dilek AZAZ teşekkür ederim ve saygılarımı sunarım.

Bilgi ve birikimini sabırla aktaran, her an desteğini hissettiğim ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum güler yüzlü danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi SELMA ÇELEN YÜCETÜRK teşekkür ederim ve saygılarımı sunarım.

Eğitim hayatımda oldukları her türlü destekten ve bunun için elinden gelen her türlü fedakârlığı yapan canım aileme çok teşekkür ederim.

**Balıkesir, 2024**

**Hatice AYDIN**

## 1. Giriş

Enzimler kimyasal reaksiyonları katalizleyen ve aktivasyon enerjilerinde değişikliğe neden olabilen, etki ettikleri reaksiyondan tüketilmeden çıkabilen, yaşamsal faaliyetlerin gerçekleştirilmesinde rol oynayan moleküllerdir [1, 2, 3, 4].

Enzim, Yunanca bir kelime olan “in yeast” (maya içinde) kelimesinden köken alarak 1878 yılında ilk olarak Wilhelm Kühne tarafından kullanılmıştır [2, 5, 6]. Çeşit kaynaklarda MÖ 7000’lerde insanların farkında olmadan enzimleri şekerleri alkole fermente etmek için kullandıkları [6], ayrıca MÖ 2100’de eski Babil Hammurabi Kodeksinde şarap yapımında enzimlerin kullanıldığı da rapor edilmiştir [7]. Amilaz karışımı olan diastaz 1833’te Anselme Payen tarafından ilk bulunan enzim olup, daha sonra pepsin ve invertaz gibi hidrolitik enzimler keşfedilmiştir [6, 8]. İnsanlar; yiyeceklerin bozulması, alkol fermentasyonu, peynir yapımı, yoğurt yapımı, sütün ekşimesi ve organik maddelerde meydana gelen değişiklikleri bilselerde bu değişimlerin kaynağını bilmiyorlardı [5, 7]. Pasteur gerçekleştirdiği araştırmalar sayesinde fermentasyon ve ürünlerin bozulmasında canlıların rol oynadığını yaptığı araştırmaları ile saptamış ve bunlara “ferment” ismini vererek, bakteriler ve mayalara ‘organize ferment’, tükürük ve mide sıvısına ise ‘organize olmayan ferment’ demiştir. 1894 yılında Fischer enzim ve substrat ilişkisini anahtar-kilit modeline benzeterek enzimlerin sadece bir madde ile etkileşime girecek özgülüğe sahip olduklarını belirtmiştir. Christian Hanse tarafından 1870’de buzağı midesinden elde edilen saf peynir mayası ile peynir üretiminin gerçekleştirilmesi [9], 1897 yılında Eduard Buchner’in fermentasyon işleminin hücre dışında da özelleşmiş bazı moleküller tarafından gerçekleştirilebildiğini rapor etmesinin ardından enzimler ile ilgili araştırmalar hız kazanmış ve yeni enzimler keşfedilmiştir [5, 6, 10].

19. yy son yıllarında ve 20. yy başlarında, enzimlerin ekstraksiyonu, karakterizasyonu ve ticari kullanımında önemli ilerlemeler kaydedilmiş olsa da enzimlerin kristalleştirilmesi ve katalitik aktivitenin protein molekülleri ile ilişkili olduğu ancak 1920’lerde ortaya konmuştur [2]. James B. Sumner 1926’da üreazı kristalleştirmiş ve protein yapıda olduğunu rapor etmiştir [6, 11].

Enzimler, hücrelerdeki biyokimyasal olayları katalize edebilen protein yapıda moleküller olmakla birlikte hücre dışında da kullanılabilirler. Enzimlerden bu şekilde yararlanılması onların endüstride ticari olarak kullanılabilmesine olanak sağlamıştır. Günümüzde enzimlerden deterjan ve temizlik malzemeleri, antibiyotik üretimi, yiyecek ve içecek endüstrisi, biyoyakıt üretimi, ilaç sanayi, ekmek ve hamur üretimi, kağıt ve kağıt hamuru üretimi, tarımsal ilaçların üretilmesi ve atık maddelerin dönüştürülme işlemleri başta olmak üzere 700'ü aşkın farklı ürünün elde edilmesinde yararlanılmaktadır [2, 12, 13, 14].

2013 yılında yapılan araştırmalara göre dünya genelinde % 46 karbohidrazlar (selülazlar), % 28 proteazlar, %7 lipazlar ve %5 ile polimerazlar ve nükleazlar, %14 diğer enzimlerin endüstriyel enzim pazarında yer aldığı rapor edilmiştir [5].

Enzimlerin endüstriyel olarak kullanılması ve maddi getirisindeki artışa bağlı olarak ülkeler arasındaki rekabet de artmaktadır. Küresel endüstriyel enzim pazarı 2017 yılında yaklaşık olarak 6,1 milyar dolar, 2021'de ise 6,4 milyar dolar seviyelerindeyken, 2026'da 8,7 milyar dolar seviyelerine kadar ulaşacağı tahmin edilmektedir [15, 16].

2022 yılındaki araştırma sonuçlarına göre enzim pazarında en fazla gelir elde eden ülkeler sırasıyla ABD, Avrupa, Asya, Güney Amerika, Orta Doğu ve Afrika olarak rapor edilmiştir. [17].

Enzimler hayvansal, bitkisel ve mikrobiyal kaynaklı olarak üretilebilsede günümüzde %86 oran ile mikrobiyal kaynaklı olarak elde edilmektedirler [17]. Yapılan çalışmalar ile günümüze kadar yaklaşık 200 tanesi mikrobiyal kaynaklı olmak üzere 4000 civarında enzim keşfedilmiş olup bu konudaki çalışmalar devam etmektedir [12].

## **1.1 Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması**

20. yüzyılda çok sayıda enzimin keşfedilmesiyle, insanlar aynı enzimleri farklı isimlerle adlandırmaya başlamış ve bu böylece enzimlerin adlandırılmasında karışıklıklar meydana

gelmiştir. Ayrıca keşfedilen enzimlerin katalize ettikleri reaksiyonların tam olarak anlaşılması da karışıklığı artırmıştır. Enzimlerin adlandırılmasındaki karışıklığı önlemek için Uluslararası Enzim Komisyonu (EC) 1956 yılında araştırmalara başlamıştır. Buna göre enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılmasında üç kural geçerlidir. Birinci kural; tek enzimin olduğu reaksiyonlarda enzimin ismine “ase” eki getirilir. İkinci kural; enzimler spesifik olarak katalizledikleri kimyasal reaksiyona göre adlandırılıp sınıflandırılır. Üçüncü kural; enzimler katalizledikleri reaksiyonun çeşidine göre adlandırılır ve sınıflandırılır. Bu yöntemle göre Enzim Komisyonunun oluşturduğu kodlar kullanılarak enzimler belirlenir. Enzimlerin genellikle iki ismi bulunmaktadır. Birinci isim sistematik veya tavsiye edilen, ikincisi ise genel isimdir. Enzimlerin sistematik ve E.C. kodlarına göre adlandırılmasıyla birlikte önerilen isimler de karışıklığa neden olmadan kullanılmaktadır [18].

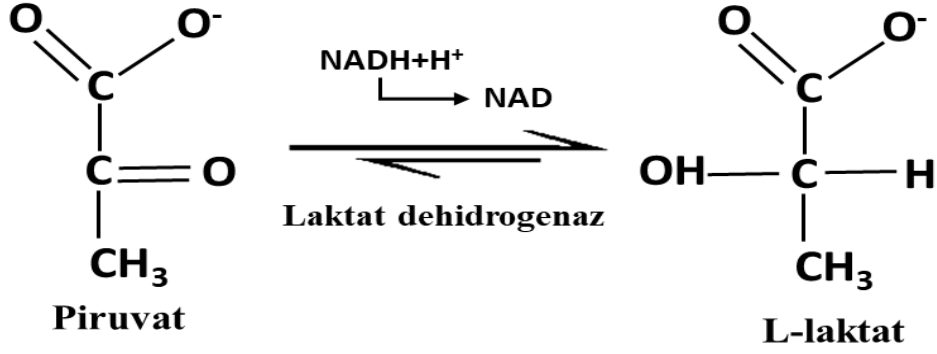
Katalizledikleri reaksiyonlara göre enzimler 1961 yılında Uluslararası Enzim Komisyonu tarafından altı sınıfa ayrılarak “EC” ön eki ve dört sayı ile kodlanmıştır.

- Birinci sayı enzimin altı ana gruptan hangisinin içinde yer aldığı,
- İkinci sayı enzimin alt sınıfını,
- Üçüncü sayı enzimin alt alt sınıfını,
- Dördüncü sayı enzimin alt alt sınıfındaki seri numarasını belirtmektedir [19].

$\beta$ -glükosidaz enziminin E.C. kodu 3.2.1.21'dir.

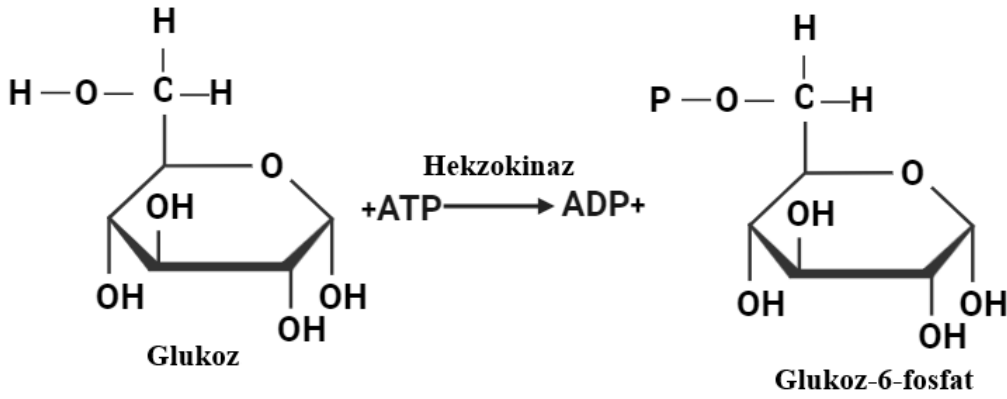
Bu sistemde enzimler katalize ettikleri reaksiyonun mekanizmasına göre altı ana gruba ayrılmaktadır. Bu altı ana grubu; oksidoredüktaz, transferaz, hidrolaz, liyaz, izomeraz ve ligazlar oluşturmaktadır [18, 20].

Oksidoredüktazlar: Elektronların, bir vericiden elektron alıcısına transfer edilmesiyle birlikte oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarının gerçekleştirilmesinde görev alan enzimlerdir [21].



**Şekil 1. 1:** Laktat dehidrogenaz enziminin piruvatın L-laktat'a dönüşümünü katalizlediği reaksiyon [22]

Transferazlar: Fosfat ve amino gibi spesifik grubun bir molekülden diğerine transfer edilmesinde rol oynayan enzimlerdir [20].

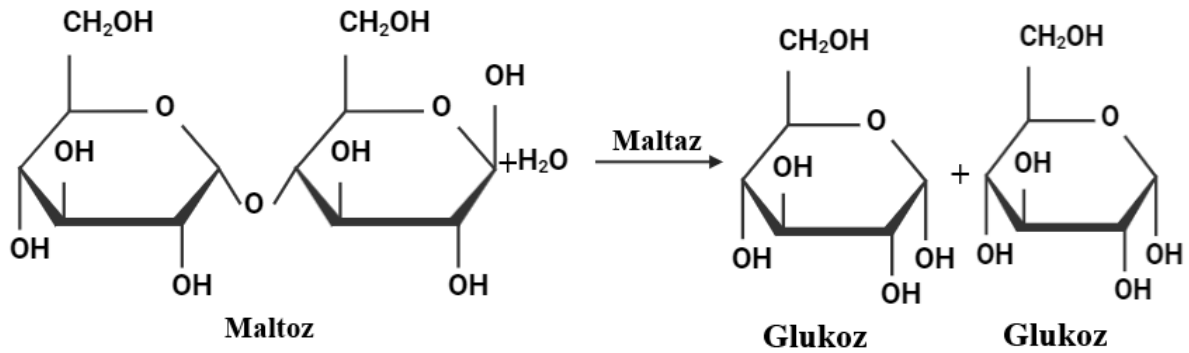


**Şekil 1. 2:** Hekzokinaz enziminin glukozun glukoz-6-fosfat'a dönüşümünü katalizlediği reaksiyon [22]

Hidrolazlar: Su molekülünün kullanılması ile ester, eter, peptid ve glikozit bağlarının hidrolizini gerçekleştiren enzimlerdir [20].

**Tablo 1. 1:** Hidrolaz enzimlerinin etki ettikleri bağlar [23]

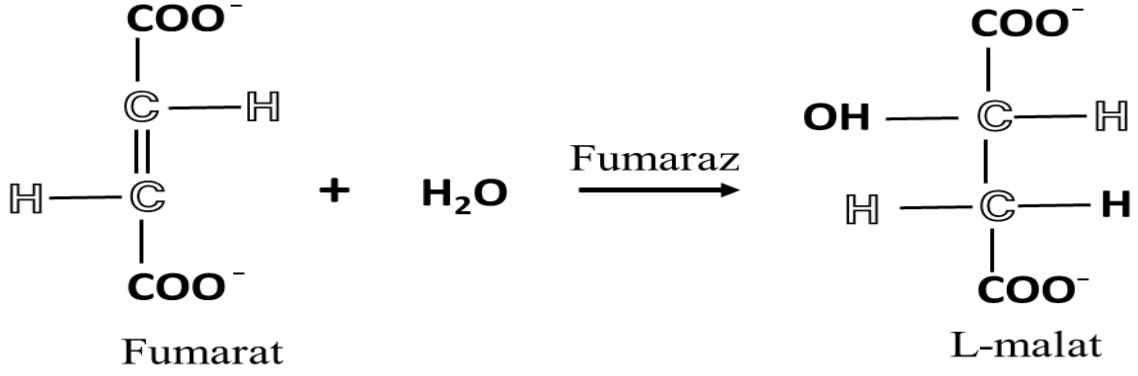
E.C.	Hidrolazlar
3.1	Ester bağlarına etki eder.
3.2	Glikozidik bağları etki ederler. <b>E.C.3.2.1.4</b> selülazlar bu grup içerisinde yer almaktadır.
3.3	Eter bağını etkiler.
3.4	Peptid bağlarını etkileyen enzimlerdir.
3.5	Diğer karbon ve nitrojen bağlarını hidroliz eder.
3.6	Asit anhidrit bağlarına etki eder.
3.7	Karbon-karbon bağlarına etki eder.
3.8	Halojenür bağlarına etki eder.
3.9	Fosfor azot bağlarını etki eder.
3.10	Kükürt azot bağlarına etki eder.
3.11	Fosfor karbon bağlarına etki eder.
3.12	Kükürt kükürt bağlarına etki eder.
3.13	Karbon kükürt bağlarına etki eder



**Şekil 1. 3:** Maltaz enziminin maltozun glikoza dönüşümünü katalizlediği reaksiyon [22]

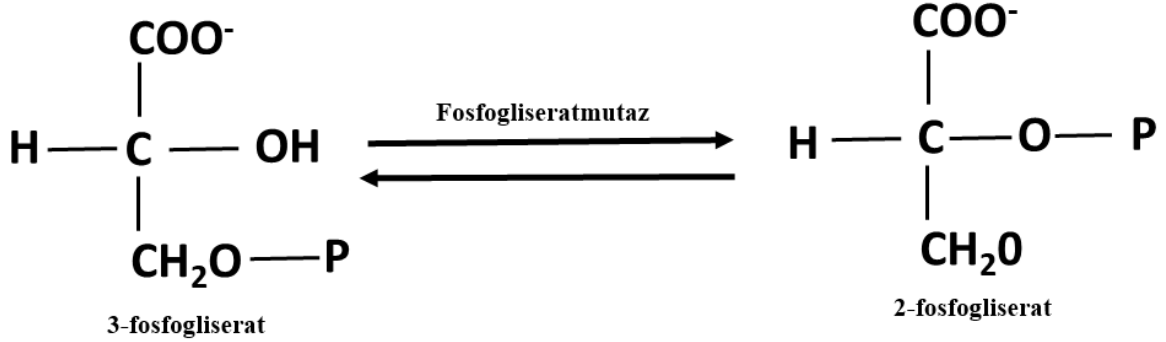
Liyazlar: Hidroliz veya oksidasyon reaksiyonlarından başka yollarla çift bağın parçalanmasında görev alan enzimlerdir [24].





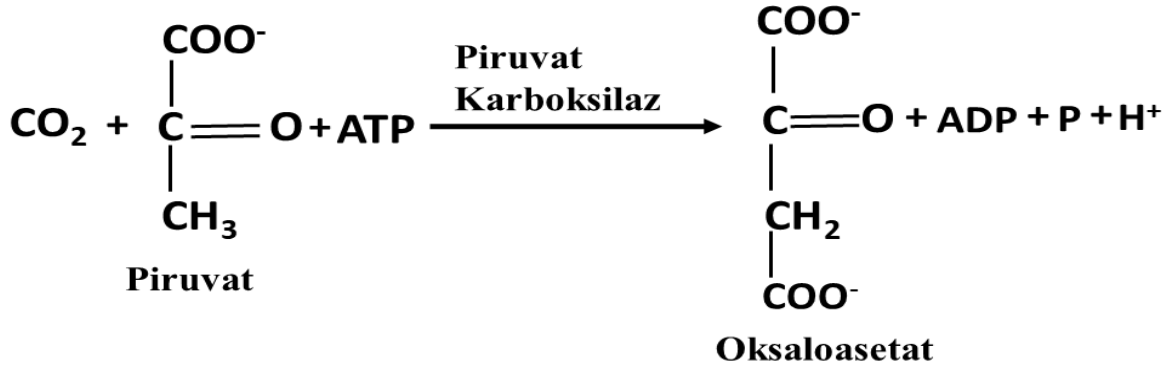
Şekil 1. 4: Fumaraz'ın Fumaratın L-malat'a dönüşümünü katalizlediği reaksiyon [22]

İzomerazlar: Moleküldeki yapısal veya geometrik yeniden düzenlemeyi katalizler. İzomereazlar; rasemaz, epimeraz, izomeraz, tautomeraz, mutaz veya sikloizomeraz gibi farklı isimler alabilmektedir [18, 21, 24].



Şekil 1. 5: Fosfogliseratmutaz enziminin 3-fosfogliseratın 2-fosfogliserata dönüşümünü katalizlediği reaksiyon [22]

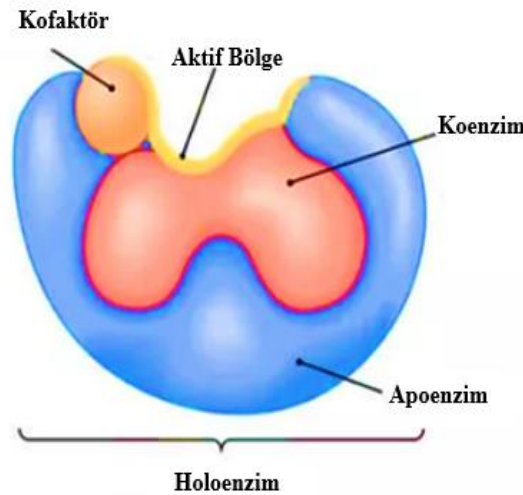
Ligazlar: Adenozin trifosfat (ATP) molekülünün kullanılması ile iki molekülün birbirine bağlanmasında görevli enzimlerdir [18, 24].



Şekil 1. 6: Piruvat karboksilaz enziminin piruvatın oksaloasetata dönüşümünü katalizlediği reaksiyon [22]

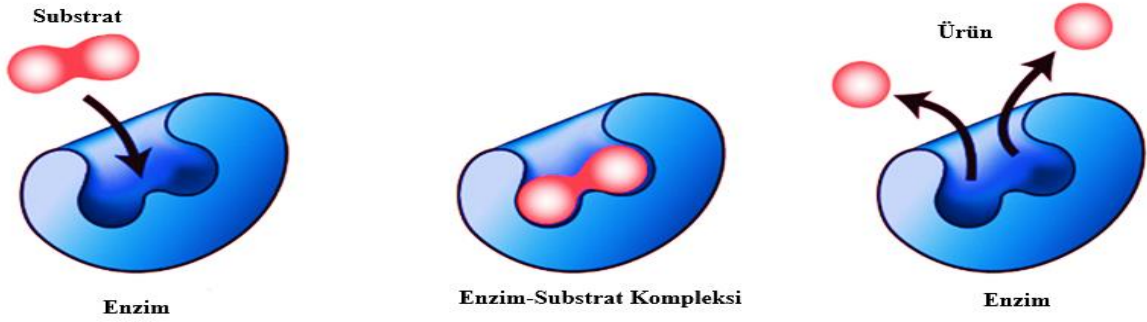
## 1.2 Enzimlerin Özellikleri

Enzimler; molekül ağırlıkları 10000 ile 1000000 dalton aralığında değişen, tek ya da daha fazla polipeptitin bir araya gelmesiyle oluşan ve çoğunluğu protein yapılı olan moleküllerdir. Enzimlerin proteinden oluşmayıp metal iyonu “kofaktör” ya da organik bileşik olan kısmı “koenzim”, enzimin proteinden oluşan kısmı ise “apoenzim” olarak adlandırılır. Apoenzim reaksiyonun gerçekleşmesi için enzime özgülük kazandırırken, kofaktör apoenzimle etkileşime girerek enzimin katalitik aktivite kazanmasını sağlamaktadır. Böylece apoenzim ve koenzim birleşerek holoenzim yapısını meydana oluşturmaktadır [25].



Şekil 1. 7: Enzimlerin yapısı [26]

Enzimler, substratları ile spesifik olarak sahip oldukları aktif bölgeler sayesinde etkileşime girer ve bu etkileşim için enzimde konformasyonel bir değişim meydana gelir. Etkileşim sonucunda enzim-substrat kompleksi oluşur. Reaksiyon gerçekleştikten sonra enzim reaksiyondan tüketilmeden, reaksiyonun dengesini değiştirmeden çıkar ve sonuçta substrat enzim aracılığıyla ürüne dönüştürülür [25].

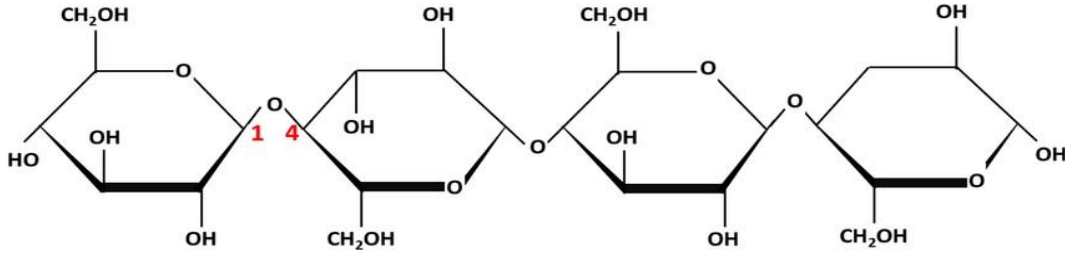


Şekil 1. 8: Enzim-substrat kompleksi [27]

### 1.3 Selülozun Yapısı ve Özellikleri

Selüloz, doğada bol miktarda bulunan bir polisakkarittir [28, 29]. Selüloza tahta, keten, kenevir, bambu, odun, pamuk, çimen ve bitkilerde sıklıkla rastlamaktayız. Bundan dolayı geçmişte insanlar selülozu ısınmak, giyinmek ve enerji elde etmek için kullanmışlardır [30, 31].

1838'de Anselme Payen bitki biyokütlesinden elde ettiği materyali selüloz olarak tanımlamış, aynı zamanda moleküler formülünü  $(C_6O_5H_{10})_n$  olarak belirlemiştir [29, 30, 31]. Selüloz; en fazla 15000 glikoz molekülünden oluşan,  $\beta$ -1,4-glikozidik bağlarla bağlanan, dallanmamış ve doğrusal yapıda bir homopolisakkarittir [28, 30, 32]. Selüloz, bitki hücre duvarında mikrofibriller yapıda bulunur [31, 32]. Selülozun yapısındaki kristal ve amorf bölgelerin birbirine hidrojen bağları ile bağlanmasından dolayı selüloz suda çözünmemektedir. Selülozun yapısında indirgeyici ve indirgeyici olmayan uçlar bulunmaktadır [28, 32].



**Şekil 1. 9:** Selülozun yapısı [33]

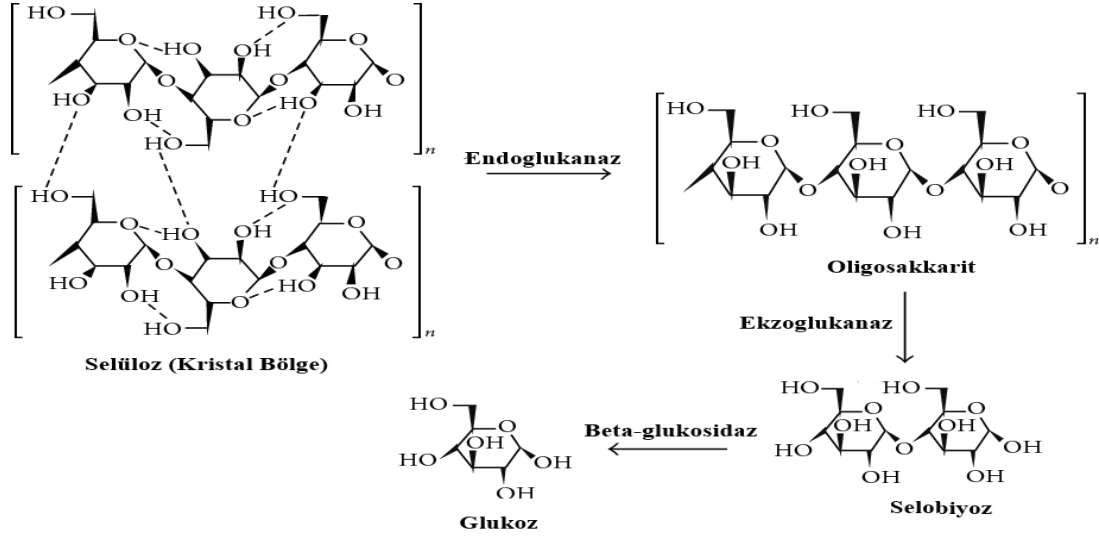
Selüloz, tek başına bulunabildiği gibi başka polisakkaritler ile birleşik halde karşımıza çıkmaktadır. Lignin ile selüloz birlikte “hemiselülozu” oluşturmaktadır. Sık görülen selüloz tipleri ağaç, pamuk ve ketende karşımıza çıkan selüloz I ve selüloz I'nin alkali işleme ‘swollen’ şişmiş şekli olan selüloz II'dir [30].

1910 yılında Ost ve Wilkening tarafından selülozun glikoza kadar hidrolizinin mümkün olduğu rapor edilmiştir. Fazla miktarda lignoselüloz içeren evsel atıklar çevre sorunlarına yol açmaktadır. Çevremizde bol miktarda bulunan lignoselülozik biyokütlenin selüloz içeriği %35 ile %50 arasında farklılık göstermekte olup bu materyallerin geri dönüşümlerinin uygun maliyet ve az enerji gerektiren yöntemlerle gerçekleştirilmesi son yıllarda fazla ilgi çekmektedir [34, 35, 36, 37].

#### 1.4 Selülazların Yapısı ve Özellikleri

Selülazlar selüloz içeren hammaddeye bir su molekülünün eklenmesiyle  $\beta$ -1,4-glikozidik bağımlı parçalayarak selülozun oligosakkaritlere (selobiyoz) ve glikoza kadar dönüşümünü sağlayan hidrolaz enzim grubudur [34, 37, 38, 39]. Selülazlar biyolojik katalizördür ve mikroorganizmalar (bakteri ve matarlar) tarafından sentezlenebilmektedir. Reaksiyonda kullanılan substratın çeşidine ve reaksiyonun şartlarına göre selülazın katalitik aktivitesi değişkenlik gösterir [36, 40].

Selülaz enziminin selülozun hidrolizini tam anlamıyla gerçekleştirilebilmesi için üç farklı enzimin sinerjik çalışması gerekmektedir. Bu selülaz enzim sistemindeki enzimler; endoglukanaz (endo-1,4- $\beta$ -glukanaz, EC 3.2.1.4), ekzoglukanaz (ekzo-1,4- $\beta$ -glukanaz, EC 3.2.1.91) ve  $\beta$ -glukosidazlar (1,4- $\beta$ -glukosidaz, EC 3.2.1.21) olarak adlandırılmaktadır [34, 39, 40, 41].



**Şekil 1. 10:** Selülüzün enzimatik hidrolizi [42]

#### 1.4.1 Endoglukanaz

Endoglukanaz, selülaz enzim sistemin bir parçasıdır. Enzim Komisyonu tarafından kodu EC 3.2.1.4 olarak bildirilmiştir. 1,4- $\beta$ -D-glukan-4-glukanohidrolaz, endo- $\beta$ -1,4-glukanaz veya karboksimetil selülaz gibi isimler almaktadır [34, 37]. Glikozit hidrolaz familyasına ait olup [36], selülozik hammaddenin amorf bölgelerinde bulunan  $\beta$ -1,4 glikosidik bağlarından gelişigüzel kesimler yaparak farklı uzunlukla oligosakkaritler oluşturmaktadır. Buna ek olarak endoglukanazlar, hem indirgeyici hem de indirgeyici olmayan zincir uçları meydana getirirler [32, 34, 36]. Endoglukanazlar hem kristalli hem de amorf selüloza karşı aktivite gösterirler [34, 35].

#### 1.4.2 Ekzoglukanaz

Ekzoglukanazlar selülaz enzim sistemin diğer bir parçasıdır. Enzim komisyonu tarafından kodu E.C 3.2.1.91 olarak bildirilmiştir [4]. Sellobiohidrolaz veya Ekzo- $\beta$ -1,4-D-glukan-4-sellobiyohidrolaz olarak da adlandırılır [34, 36]. Ekzoglukanazlar da [5-7, 48] Glikozit hidrolaz familyasına aittir [36]. Ekzoglukanazlar, selülozik biyokütlenin (oligosakkaritler) indirgeyici ve indirgeyici olmayan zincir uçlarındaki  $\beta$ -1,4 glikosidik bağlarından kesimler yaparak çözülebilir selobiyoz birimlerini meydana getirirler [4, 32, 34, 36, 37]. Aynı zamanda ekzoglukanazlar selülüzün indirgeyici olmayan uçlarından glikoz monomerini meydana getirirler [4]. Ekzoglukanazlar amorf ve kristalin selüloza karşı aktivite gösterirken, karboksimetil selüloza karşı aktivite göstermezler [35].

### 1.4.3 Beta-glukosidaz

$\beta$ -glukosidaz seloluzun hidrolizinin son aşamasında görev almaktadır. Enzim komisyonu tarafından kodu ( E.C.3.2.1.21) olarak belirlenmiştir [32, 34].  $\beta$ -1,4-glukosidaz veya selobiaz olarak da isimlendirilirler [34, 36]. Glikozit hidrolaz [5-7, 48] familyasına ait olup endoglukanazlar tarafından meydana getirilen disakkaritler, oligosakkaritler, alkil, aril  $\beta$ -D-glukozitler ve selobiyozun indirgeyici olmayan zincir uçlarından  $\beta$ -1,4 glikosidik bağın hidrolizi ile  $\beta$ -D-glikozu açığa çıkarırlar [32, 34, 36, 37].  $\beta$ -glukosidaz, selobiyozun inhibe olmasını engelleyerek diğer selülaz enzimlerinin işlevini artırır [43].

### 1.5 Selülazların Kullanım Alanları

Çeşitli endüstrilerde enzimlerin kullanılması; maliyeti azaltır, daha elverişlidir, enerji tasarrufu sağlar, oluşan ürün miktarı fazladır ve daha çevrecidir [34, 37]. Selülaz enzimi, tarımsal atık olan lignoselülozik biyokütlenin dönüşümünü sağlayabilir ve basit şeker, biyoyakıt, etil alkol, tek hücreli proteinler, organik asitler, biyoaktif bileşikler ve başka kimyasallar gibi ticari değeri fazla olan son ürünlerin elde edilmesinde kullanılırlar [32, 35, 36, 37, 44].

Selülaz enziminin endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamaları yirminci yüzyılda başlamıştır [32, 34, 37]. 2019'da dünyadaki selülaz enzim pazarı 1500 milyon dolar civarındayken, 2024'te 2320 milyon dolara ve daha sonraki yıllarda %7-10 arasında büyüme göstermesi beklenmektedir. Selülazların çeşitli endüstrilerdeki küresel pazarı incelendiğinde %30'unu hayvan yemi endüstrisi, %26'sını gıda endüstrisi ve %14'ünü tekstil endüstrisi oluşturmaktadır. Selülazların ilaç ve biyoteknolojik alanlarda kullanımının 2024 yılından sonra daha da artması beklenmektedir [37].

Endüstride kullanılan enzimlerin %85'ini selülazların içinde yer aldığı grup olan hidrolazların oluşturduğu bilinmektedir [4]. Selülaz enzimi deterjan endüstrisi, gıda endüstrisi, hayvan yemi, kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi, atık kağıttan mürekkebin uzaklaştırılması, ilaç sanayi, pamuk işleme, tarım endüstrisi ve biyoyakıt üretimi gibi çeşitli endüstrilerde son yıllarda en çok tercih edilen enzimler arasında üçüncü sırada yer almaktadır [32, 34, 35, 37, 39, 40, 43].

### **1.5.1 Şarap Endüstrisi**

Selüloz  $\beta$ -glukanaz, hemiselüloz ve pektinazların birlikte şarap üretiminde kullanılması ekstrakte edilen şarabın renginin, berraklığının, kalitesinin, kıvamının dayanıklılığının ve filtrasyonunun iyileştirilmesini sağlamaktadır [44, 45]. Galante ve ark. selüloz, ksilanaz ve pektinaz enzimlerinin birlikte kullanılmasıyla şarap üretimi aşamalarının kolaylaştırıldığını ve bu yöntem ile enerji tasarrufu sağlanabileceğini bildirmişlerdir [46].  $\beta$ -glukosidaz enzimi de şarabın aroma özelliklerini iyileştirmekte kullanılmaktadır [37].

### **1.5.2 Gıda Endüstrisi**

Gıda endüstrisinde meyvelerin püre haline getirilmesi ve meyve suyunun bozulmadan uzun süre depolanması önemli bir problemdir [47]. Bu endüstride maserasyon enzimleri olarak pektinaz, ksilanaz, hemiselüloz ve selüloz birlikte kullanılmaktadır [37, 42, 44]. Bu enzimlerin kullanılması meyve suyunun berraklaştırılması, ekstraksiyonun daha iyi olması ve meyve suyu üretim sürecinin geliştirilmesi, viskozitesinin düşürülmesi, aromasının iyileştirilmesi, daha verimli elde edilmesi, meyve suyunun rengindeki değişimin azalması, tadının bozulmadan kalması, filtre edilme süresinin kolaylaşması ve uçuculuğunun iyileştirilmesini sağlamaktadır [34, 37, 44]. Buna ek olarak bazı meyve ve sebzelerin kokusunun ve uçuculuğunun iyileştirilmesi,  $\beta$ -glukosidaz ve pektinaz enzimlerinin kombinasyonu ile sağlanabilmektedir [47].

Chandrasekharan (2012), hamur yapımında kullanılan undaki selülozik hammaddelerin ayrıştırılması için *A. niger*, *T. reesi* ve *H. insolens* funguslarının selülozlarının kullanıldığını rapor etmiştir [48]. Sajith ve ark. (2016), yaptıkları çalışmada turunçgillerdeki aromanın iyileştirilmesi ve acılığın azaltılmasında selüloz enziminin diğer enzimlerle kombinasyonu kullanmışlar [49], Hai ve ark. (2016), ise çay yapraklarında bulunan polifenollerin ekstrakte edilmesinde selüloz enzimi kullanılmasını önermişlerdir [50].

### **1.5.3 Zeytinyağı Ekstraksiyonu**

Zeytinyağının bileşiminde yağ asitleri, E vitamini, antioksidanlar ve çeşitli bileşikler bulunduğundan zeytinyağı faydalı bir gıda maddesi olarak kabul görmektedir. Zeytinyağının ekstraksiyonu selülozlar ile yapılabilmektedir [44]. Sharma ve Yazdani (2016) zeytinyağı

ekstraksiyonunda pektinaz ve selülaz enziminin birlikte kullanılması ile daha nitelikli ve verimli bir zeytinyağı ekstraksiyonu elde edildiğini belirtmişlerdir [51]. Ayrıca selülazların da içinde yer aldığı maserasyon enzimlerinin zeytinyağında acı tat oluşumunu azalttığı, nitelikli zeytinyağı elde edilmesini sağladığı, zeytinyağının bozulma riskini azalttığı, zeytin ezmesinin akışkanlığını düşürdüğü ve antioksidan seviyelerini yükselttiği de belirtilmektedir [42, 52].

#### **1.5.4 Karotenoid Ekstraksiyonu**

Karotenoidler, bitkilerin renginin kırmızı-sarı renkli olmasını sağlayan renk maddesidir [52, 53]. Portakal kabuğu, tatlı patates ve havucun hücre duvarının parçalanması ile hem kloroplastlarda hem de hücre sıvılarında yer alan karotenoidlerin ekstraksiyonu, pektinaz ve selülaz enzimleri ile yapılabilmektedir [52]. Neagu ve arkadaşlarının 2014 yılındaki araştırmasında selülazın domatesten karotenoidlerin elde edilmesine katkı sağladığı rapor edilmiştir [54]. Buna ek olarak selülaz enzimi bitkilerden biyoaktif maddelerin elde edilmesinde de kullanılabilir [44].

#### **1.5.5 Flavonoid Ekstraksiyonu**

İkincil metabolit olan flavonoidler, hem bitkilerde hemde bazı içeceklerde karşımıza çıkmaktadır. Flavonoidler; antikanser, antioksidan, antimutajenik, yaşlanma karşıtı ve anti-inflamatuar özellikleri bulunması sebebiyle ilaç sektöründe ve kozmetik alanında tercih edilmektedir. Flavonoidlerin elde edilmesinde selülaz enziminden yararlanılabilmektedir [53].

#### **1.5.6 Tekstil Endüstrisi**

Tekstil endüstrisi kirliliğe, aşırı su ve enerji tüketimine neden olmaktadır. Tekstil endüstrisinin neden olduğu bu zararların azaltılması için enzimlerden yararlanılabilmektedir [37, 44]. Tekstil endüstrisinde geleneksel yöntemlerde kotun soluk renginin ve dokusunun oluşturulması için ponza taşı kullanılmaktayken son yıllarda bu işlem için selülazların da kullanıldığı “biyotaşlama” adı verilen yöntem tercih edilmektedir [39, 44]. Ayrıca tekstil endüstrisinde pamukların yumuşatılması, kumaşların özelliklerinin iyileştirilmesi, biyoparlatma gibi süreçlerde de selülazlardan yararlanılmaktadır [44, 47]. Belghith ve ark. (2001), tarafından yapılan araştırmada *Penicillium occitanis* Pol6'den elde edilen selülazlar kot giysilerin biyotaşlama işlemi için kullanılırken [55], Galante ve ark. (1998), tarafından



*Humicola insolens*'ten nötr selülaazlar ve asidik *Trichoderma reesei*'den asidik selülaazlar elde edilerek kot giysilerinin yıpranma ve tekrar lekelenme özellikleri incelenmiştir [46]. *Humicola insolens*'den elde edilen selülaazlar; kumaşın fibrillerinin giderilmesi, daha pürüzsüz kumaş yüzeyi elde edilmesi, liflerin renginin ayarlanması ve kumaşın dokusunun düzeltilmesi için kullanılmaktadır [39]. Selülaaz ve endoglukanazlar kumaşın görünümünü, yapısını, pürüzsüzlüğünü, rengini ve ışıltısını daha iyi bir forma getirmek için “biyo-parlatma” işlemlerinde de kullanılmaktadır [37].

Liyosel, saf selülozik bir elyafır. Liyosel kumaşların fibrillerinin giderilmesinde asit selülaazların kullanılması tercih edilirken, farklı liyosel giysiler için nötr selülaazlar tercih edilmektedir [47].

### **1.5.7 Deterjan Endüstrisi**

Deterjanların ucuz olması, giysileri iyi yıkaması ve enerji tasarrufu sağlaması deterjan endüstrisinde önemlidir. Bu sebeple son zamanlarda yıkama tozları ve sıvı deterjanlardaki zararlı fosfat ve silikatların yerini enzimler almaktadır. Deterjan endüstrisinde selülaaz, lipaz, proteaz ve amilaz enzimlerinin kombinasyonları kirli çamaşırların yıkama verimi artırmak için kullanılmaktadır [37].

Selülaazlar, mikrofibrillerin yapısını bozarak çamaşırların sertliğinin giderilmesi ve fibriller arasında kalan kir-lekelerin rahatlıkla yok edilmesini sağlamaktadır [37, 47]. Selülaaz çeşitlerinden EG III ve CBH I, çamaşırların yıkanmasında kullanılabilir. Deterjan endüstrisinde, *Trichoderma reesei* fungusunun EG III enziminin kullanılabildiği rapor edilmiştir [39]. Deterjan ve yıkama tozlarına ilave edilen *Humicola insolens* ve *Humicola griseothermoidea*'nın selülaazları hafif alkali (pH 8,5-9,0) ve 50°C'nin üstündeki sıcaklık şartlarında aktive olmaktadır [39, 47]. Soğukta aktive olan selülaazların yıkama tozlarında kullanılması giysilerin daha iyi temizlenmesini, su ve enerji tüketiminin azalmasını sağlamaktadır. Selülaaz enzimi ihtiva eden yıkama tozları kumaşların görünümünü korur ve buna ek olarak yünlülük kumaşların tüylenmesini engeller [37].

### 1.5.8 Hayvan Yemi

Hayvan yemi endüstrisinde kullanılan enzimler selüloz, hemiselüloz ve pektinazlardır [37]. Bu enzimler hayvan yemlerinin besin içeriğinin zenginleştirilmesi, yemin özelliğinin iyileştirilmesi, süt üretiminin artırılması, hayvanların ağırlığının artırılması ve bu yemlerle beslenen hayvanların yemden daha iyi yararlanabilmesini sağlamaktadır [37, 39, 47].

### 1.5.9 Kağıt Hamuru ve Kağıt Endüstrisi

Selülozlar, bu endüstrisinde kağıttan mürekkep ve tonerlerin uzaklaştırılması ve kağıt hamurunun biyokimyasal özelliklerinin düzenlenmesi için kullanılmaktadır. Mukavvaların oluşturulmasında ve kağıt peçete yapımında selüloz enzimlerinden yararlanılmaktadır [39]. Bunlara ek olarak kağıt hamurunun arıtılması, meydana getirilmesi, susuzlaştırılması, daha parlak bir görünüm elde edilmesi, ağartma ve süzülme işlemlerinde selüloz enzimlerinden faydalanılmaktadır [44].

Selülozların hemiselülozlar ile kombinasyonları elyaftan atık mürekkebin çıkarılması işlemlerinde, biyomekanik olarak pulp elde edilmesinde, kâğıdın sağlamlığının ayarlanmasında, kağıt imalathanelerinin drenaj ve üretim verimini artırmak için kullanılmaktadır [39, 47]. Yine hemiselüloz ve selüloz birlikte elyafların yapısının uygun şekile getirilmesinde kullanılmaktadır. *Trichoderma*'dan elde edilen Pergalase A40 hemiselüloz ve selüloz enzimleri ahşap içerikli baskı kâğıtlarının elde edilmesinde kullanılmaktadır [47].

Selüloz enzimi kağıt hamurunun görünümünün iyileştirilmesi, ksilanaz enzimi ise kağıt hamurunu daha dayanıklı forma getirilmesinde kullanılmaktadır [47]. Pathak ve ark. (2014), yaptıkları araştırmada *Trichoderma harzianum*'dan, Chutani ve Sharma (2016), tarafından gerçekleştirilen araştırmada ise *Trichoderma longibrachiatum* MDU'dan elde edilen selüloz ve ksilanazlar kullanılarak kâğıttan mürekkebin uzaklaştırılması sağlanmıştır [56, 57].

### **1.5.10 Tarım Endüstrisi**

Selülozlar, hemiselüloz ve pektinaz tarım endüstrisinde çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır [47, 53]. Selüloz, pektinaz ve selülozların karışımları bitki patojenlerinin hücre çeperinin yapısını bozarak bitkilerde oluşan hastalıkları önleyebilmesinin bu enzimler aracılığıyla bitkinin yetişmesi, gelişmesi ve büyümesine bağlı olarak elde edilen ürün verimi de artırılmaktadır [37, 47, 53].

Bitki ve fungusların protoplastlarının elde edilmesinde selüloz ve hemiselülozların birleşimlerinden yararlanılmaktadır. *Trichoderma* ve *Penicillium* funguslarından elde edilen selülozlar, bitki ve mantar protoplastlarının oluşturulmasında kullanılmaktadır [47]. Brown ve ark. (1986), tarafından yapılan çalışmada *Penicillium*'un yabani ve mutant suşlarından protoplastların elde edilmesi için ticari selülozlar kullanılmıştır [58].

Tarım endüstrisinde selüloz enziminin toprağın zenginleştirilmesi için gübre olarak kullanılması ile aşırı gübre kullanımı da azaltılmıştır [37, 53].

### **1.5.11 Biyoyakıt Endüstrisi**

Son zamanlarda insanlar, fosil yakıtların tükenmesi ve zararlı etkilerinden dolayı yenilenebilir ve çevreci olan biyoyakıt kaynaklarının kullanılmasına yönelmişlerdir [37, 39]. Lignoselülozik hammaddenin biyoyakıt gibi değerli son ürünlere biyodönüştürülmesi için kademeli bir işlem gerekmektedir [37]. Biyodönüştürme işlemi ön-arıtma, hidroliz reaksiyonları ve fermentasyondan oluşmaktadır [44]. Lignoselülozik biyokütlenin biyoetanole dönüştürülmesinde hemiselüloz ve selüloz enzimleri kullanılmaktadır [39].

### **1.5.12 Hastalıkların Tedavisi**

Sindirim sistemi bozukluğu kaynaklı bağırsakların tıkanması ile oluşan Fitobezoar hastalığı, gözlerde meydana gelen Keratit hastalığı ve *Acanthamoeba* amibinin neden olduğu beyinde görülen Granülomatöz Amipli Ensefalit hastalığının iyileştirilmesinde selüloz enzimlerinden yararlanılmaktadır. Ayrıca selülozlar, patojenlerin hücre membranının bozulmasını sağlayarak hastalıklar ile mücadele edilmesinde kullanılmaktadır [53].

### 1.5.13 $\beta$ -glukosidaz Enziminin Kullanıldığı Alanlar

$\beta$ -glukosidaz enzimi tekstil, kağıt ve kağıt hamuru, petrol üretimi, geri dönüşüm, gıda endüstrisi, biyoyakıt üretimi, sağlık, tarım ve hayvan yemi gibi çeşitli endüstrilerde kullanılmaktadır [43, 59]. Tekstil endüstrisinde giysilerin üretim süreçlerinde, petrolün üretim aşamasında ve kağıt endüstrisinde kağıdın üretimi için rafine edilmesinde  $\beta$ -glukosidaz'dan yararlanılmaktadır [43].

$\beta$ -glukosidaz enzimi şıralarda, şarap endüstrisinde ve meyve sularında aromatik bileşiklerin açığa çıkarılmasında kullanılmaktadır [43, 60]. Şarap endüstrisinde, üzümün içerisindeki aroma veren monoterenler (geraniol, nerol, terpineol ve linalol oksit ve linalool) açığa çıkarılarak şarap tadının iyileştirilmesi için  $\beta$ -glukosidaz enzimi kullanılmaktadır [60, 61, 62]. Gonzalez-Pombo ve ark. (2011), yaptıkları araştırmada beyaz Muskat şarabının tadının iyileştirilmesi için *Issatchenkia terricola*  $\beta$ -glukosidaz'ını immobilize edilerek kullanılmışlardır [63]. *Oenococcus oeni* ATCC BAA-1163'nin  $\beta$ -glukosidazı ise Muskat şarabındaki aromatik bileşiklerin ortaya çıkarılmasında kullanılmıştır [63]. Gonz'alez-Pombo ve arkadaşları 2014 yılında gerçekleştirdikleri bir çalışmada ise *Aspergillus niger*'den elde ettikleri a-arabinosidaz, a-ramnosidaz ve  $\beta$ -glukosidaz gibi enzimlerini immobilize ettikten sonra Muscat şarabının lezzetini artırmak için bu enzimleri kullanılarak monoterenleri elde etmişlerdir [61].

Meyve sularının acılığının azaltılması için  $\beta$ -glukosidaz enzimi ilave edilerek naringin (4,5,7-trihidroksi flavanon-7- ramnoglukozid) bileşiği açığa çıkarılmaktadır [60, 61]. Krisch ve ark. (2010), tarafından yapılan çalışmada çay üretiminde  $\beta$ -glukosidaz enziminin kullanılması ile çaydaki uçucu yağ oranının arttığı rapor edilmiştir [64]. Schroder ve ark. (2014),  $\beta$ -glukosidazların kullanılması ile meyve sularının ve fermentasyon ürünlerinin aromasının artırılması ve ayrıca meyve sularının viskozitesinin azaltılmasının sağladığını bildirmişlerdir. [65].

Antiinflatuar, antikanser, antialerjik ve antioksidan özelliklere sahip olması nedeniyle izoflavon, flavonlar, flavonoid ve flavonon gibi fenolik bileşiklerin hem ilaç hem de gıda sektöründe kullanılmalarına yönelik araştırmalar ilgi görmektedir [61, 62]. Ancak bu fenolik bileşikler çoğunlukla bağırsaklardan emilimi kısıtlayan glikozit formda bulunmaktadır. Bu

sebeple soya içeren gıdalardaki glikozit formdaki (daidzein, genistin ve glisitin) inaktif izoflavonları, aktif izoflavon olan aglikon formuna dönüştürmek için  $\beta$ -glukosidaz enzimi kullanılmaktadır [60, 61, 62]. Opassiri ve ark. (2004),  $\beta$ -glukosidaz ile pirinçte bulunan piridoksininin (B6 vitamini) elde edilmesine yönelik çalışma yapmışlardır [66]. Marazza ve ark. (2009), tarafından yapılan araştırmada soya sütünün *Lactobacillus* suşunun ürettiği  $\beta$ -glukosidaz enzimi ile muamelesi sonucunda aglikon miktarının arttığı rapor edilmiştir [67]. Liu ve ark. (2012), lignoselülozik biyokütleyle *Aspergillus fumigatus* Z5'tan üretilen  $\beta$ -glukosidazın ilavesinin fenolik bileşiklerin elde edilmesini artırdığını bildirmişlerdir [68]. Hati ve ark. (2014), yaptıkları çalışmada, *Lactobacillus rhamnosus*'tan elde edilen  $\beta$ -glukosidaz enziminin kullanılması ile yüksek miktarda izoflavon içeren soyalı ürünler elde edilmişlerdir [69].

Manyok, siyanojenik glikozitlerden lotaustralin ve linamarini içeren ve insan sağlığını etkileyen bitki türüdür [61]. Bu bitkinin insan sağlığına etkisine azaltmak için siyanojenik glikozitlerin hidrolizinde rol oynayan ekzojen linamaraz ve  $\beta$ -glukosidaz enzimleri kullanılmaktadır [61, 62].

Laktoz şekerinin parçalanmasında rol oynayan  $\beta$ -D-galaktosidaz enzimini kodlayan gendeki hasar nedeniyle pek çok insan laktoz intoleransı ile mücadele etmek zorunda kalmaktadır. Bu durumu önlemek amacıyla laktoz içermeyen süt üretiminde  $\beta$ -glukosidaz ya da  $\beta$ -galaktosidaz enzimlerinin kullanılmasına yönelik çalışmalar devam etmektedir [61].

$\beta$ -glukosidaz enzimi kozmetikte cilt tonunun beyazlaştırılmasında kullanılmaktadır. Arbutin, hidrokinon ve  $\beta$ -glukosidaz enzimi kullanılmasıyla ciltteki pigmentlerin ortadan kaldırılarak cilt renginin beyazlaştırılması sağlanmaktadır. Park ve ark. (2001), tarafından yapılan çalışmada arbutin ve glikozidaz kullanılarak cilt tonunun beyazlaştırılması sağlanmış ve KR100923141B1 patentli ürün elde edilmiştir [61].

İnsanlarda Gaucher hastalığı  $\beta$ -glukosidaz enziminin glukozil seramidlerin hidrolizini gerçekleştirememesi ya da eksikliği nedeniyle ortaya çıkmaktadır [62]. Birçok endüstride

kullanılan ve antimikrobiyal ajan olan alkil glikozitlerin biyosentezlemesinde  $\beta$ -glukosidaz enziminden faydalanılmaktadır [60, 62].

Biyoetanol üretilmesinde  $\beta$ -glukosidaz enziminden yararlanılmaktadır [62]. Liu ve ark. (2012), *Clavispora sp.* elde ettikleri  $\beta$ -glukosidazın ksilozla ekstrakte edilmiş mısır koçanı kalıntısını kullanarak etanol ürettiğini rapor etmişlerdir [70]. Vervoort ve ark. (2016), yaptıkları araştırmada *Brettanomyces anomalus*'tan elde edilen  $\beta$ -glukosidaz'ın orman meyveli süt ve kiraz biralalarında kullanılmasıyla metil salisilat, linalool, benzil alkol ve öjenol üretiminin arttığını rapor etmişlerdir [71].

Atık kâğıttan mürekkebin ayrıştırılmasında kullanılan kimyasallar nedeniyle kâğıt özelliklerini kaybetmekte ve aynı zamanda bu kimyasallar çevre sorunlarına da yol açmaktadır. Bu endüstrideki sorunların giderilmesi için selülaz,  $\beta$ -glukosidaz ve hemiselülaz enzim preparatları kullanılmaktadır [62].

Hayvanların besinleri sindirimini kolaylaştırmak için hayvan yemlerine  $\beta$ -glukosidaz enziminin ilave edilmesiyle  $\beta$ -glukosidaz enziminden hayvan yemi endüstrisinde de faydalanılmaktadır [60].

#### **1.5.14 Selülaz Üreten Organizmalar**

Selülotik enzimleri üretebilen mikroorganizmalar; bakteriler, aktinomisetler, protozoalar ve funguslardır [4, 32, 34, 39, 41, 42]. Bakterilerin selülazları yapısal olarak karmaşıktır. Funguslar ise hifleri sayesinde besinlere daha iyi ulaşabilmekte ve böylece fazla miktarda ekstraselüler selülaz üretimini gerçekleştirmektedir. Bu sebeple selülazların elde edilmesinde genellikle funguslar tercih edilmektedir [41, 42].

*Humicola*, *Trichoderma*, *Penicillium* ve *Aspergillus* cinlerine ait türleri selülaz enzimini üretmektedirler [39, 42]. Selülaz enzimi elde edilmesinde genellikle *Trichoderma reesei* tercih edilmektedir [42]. Endüstride ise selülaz enziminin üretiminde yaygın olarak *Trichoderma reesei* ve *Trichoderma viride* fungusları tercih edilmektedir [35]. Selülotik

enzimleri en iyi üreten mikroorganizmaların keşfedilmesine yönelik çalışmalar artarak devam etmektedir [34, 39].

## 1.6 *Trichoderma* Genel Özellikleri

*Trichoderma* ilk kez Persoon tarafından 1794’de saptanmış ve daha sonra 20.yy başında Thakur ve Norris *Trichoderma*’nın izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir [42, 72]. Waghunde ve ark. (2016), *Trichoderma* cinsine ait yaklaşık 10000 türün olduğu rapor etmişlerdir [42, 73].

### 1.6.1 *Trichoderma atroviride*’nin Sınıflandırılması

Index Fungorum veritabanına göre *Hypocrea* için 471 adet *Trichoderma* türü bildirilmiştir [72]. Index Fungorum ve Uluslararası Biyoteknoloji Bilgi Merkezine (NCBI) göre *Trichoderma atroviride*’nin sınıflandırması:

**Alem:** Fungi

**Şube:** Ascomycota

**Alt Şube:** Pezizomycotina

**Sınıf:** Sordariomycetes

**Alt Sınıf:** Hypocreomycetidae

**Takım:** Hypocreales

**Aile:** Hypocreaceae

**Cins:** *Trichoderma*

**Tür:** *Trichoderma atroviride* [74, 75].

### 1.6.2 *Trichoderma*'nın Karakteristik Özellikleri

*Trichoderma*, 3-5 günde hızla gelişen fungus cinsidir [41, 42, 72]. *Trichoderma* spp. toprak, çayır, orman, su ve nemli ortamlarda bulunur [41, 42, 73]. *Trichoderma*; anomorfik ve filamentlidir [73]. Sahip oldukları uçucu 6-pentil-a-piron'dan dolayı hindistancevizi kokusu açığa çıkmaktadır [42]. *Trichoderma*'nın kolonileri şişmiş durumda şeffaf renkli, daha sonra yeşil, kırmızı ve sarı renkli olabilmektedir [41, 42, 72]. Koloninin tersi beyazımsı sarı, açık ten rengi sarı ya da soluk turuncu renklidir [42]. Besiyerindeki aynı merkeze sahip koyu yeşil halkaları ayırt edici özelliğidir [42, 73]. Konidioforları; düz ya da dalgalı, tekrar dallanıp kıvrılarak düzensiz yapılar oluşturabilir ve çoğunlukla simetrik olmayan silindir ya da şişe şeklinde yarı küresel fiyalidleri kümeler oluşturur [42, 72, 73]. Konidyumları genellikle yeşil renkli olup fiyalidlerin terminalinde yarı saydam (hiyalin) kümeler oluştururlar [42, 73].

*Trichoderma* cinsi türleri selülaz, ksilanaz ve glukanzlar gibi selüloolitik ve hemiselüloolitik enzimler ürettiklerinden selüloz gibi farklı substratları kullanabilme özelliğine sahiptirler. Ayrıca antibiyotik üretebilmesi, tarımda biyolojik kontrol ajanı olarak rol oynaması ve genetik çalışmalarda kullanılabilmesi sebebiyle ilgi çekici funguslar arasında yer almaktadır. [41, 42, 72, 73].

### 1.7 Katı Substrat Fermentasyonu

Selülazların elde edilmesinde, Sıvı Substrat Fermentasyonu ve Katı Substrat Fermentasyonu olmak üzere iki yöntem kullanılmaktadır. Sıvı Substrat Fermentasyonu (SMF), mikroorganizmaların sıvı besiyerinde geliştirildiği fermentasyondur. Katı Substrat Fermentasyonunda (KSF) ise ortamda serbest halde su molekülü bulunmaz, mikroorganizmalar nemlendirilmiş katı substratlar üzerinde geliştirilir [32, 42, 53, 76]. Katı Substrat Fermentasyonunda substrat olarak buğday samanı, pirinç samanı, şeker kamışı küspesi, atık karton ve kağıt hamuru tercih edilebilmektedir [76].

Katı substratlar; bakteriler, filamentli funguslar ve mayaların gelişmesi için uygun bir sağlasada bu gibi ortamlarda fungusların gelişimi daha iyi olduğundan KSF'de genellikle funguslar tercih edilmektedir [42, 77].



2018 yılında AB’de tarım, ormancılık ve balık endüstrisinden yaklaşık olarak 21 milyon ton atık meydana gelmiş ve gıda ihtiyacının artmasına paralel olarak bu atıkların daha da artması beklenmektedir. KSF yönteminden bu tarımsal atıklardaki lignoselülozik biyokütleyi hidroliz edebilen selülozların elde edilmesinde yararlanılmaktadır [78]. Ayrıca Katı Substrat Fermentasyonu; organik asit, alkol, antibiyotik, biyoyakıt, hayvan yemi, metabolit ve farklı ürünlerin elde edilmesinde de sıklıkla kullanılmaktadır [42, 79].

Üretim maliyetinin düşüklüğü, enzim üretim veriminin fazla olması, reaksiyondaki substratın inhibe olma riskinin azlığı, elde edilen enzimin çeşitli koşullara (pH, sıcaklık gibi) daha dayanıklı oluşu, mikroorganizmanın yaşam alanına benzer bir ortam sunması, ortamda su az bulunduğu için kontaminasyon riskinin düşüklüğü KSF yönteminin başlıca avantajları arasındadır [32, 42, 53, 78, 79]. Bunlara ek olarak uygun fiyatlı bir teknoloji gerektirir, daha kolay bir yöntemdir, enerji tasarrufu sağlar ve oluşan atık miktarı daha azdır [32, 42, 53, 79].

KSF’de substratın seçilmesinde; substratın ucuz olması, işlevselliği, parçacık boyutu ve nem miktarı oldukça önemlidir. Substratın ufak tanecikli olarak kullanılması mikroorganizmaların daha iyi gelişmesi için yüzey alanı sağlar ancak mikroorganizmaların solunumuna engel olduğu için mikroorganizmaların büyümesi azalır ve bunun sonucunda enzim eldesi de azalabilmektedir. Büyük parçacıklı substratların tercih edilmesi sonucunda mikroorganizmaların gelişmesi için yüzey alanı azalırken solunum verimi artacağından enzim eldesinde artış beklenebilmektedir. KSF’de enzim eldesinde KSF ortamının nemlendirme oranının, nemlendirme sıvısının pH’ının, inkübasyon süresinin ve inkübasyon sıcaklığının optimizasyonunun yapılması gerekmektedir [80].

## **1.8 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi**

Kromatografi çözünürlüğe, bileşiklerin polar ya da nonpolar oluşlarına ve sabit fazdaki adsorpsiyonu temel alan bir saflaştırma metodudur [81]. Kromatografi yöntemi hareketli bir faz ile sabit bir fazın bulunduğu sistemde, inorganik ve organik bileşikler ayırt edilirken kullanılabilir. Sabit faz katı, hareketli faz ise sıvı ya da gaz halde olabilir. İncelenecek numune, hareketli faz sayesinde sabit fazda ilerler. Numunedeki bileşenler sabit fazdan geçerken adsorbe edilerek ayrıştırılma gerçekleştirilir. Ayrılma işlemi, numunenin sabit faza

tutunmasına ve çözücüdeki çözünürlüğüne bağlıdır. Numunenin çözünme hızı az ve sabit faza daha fazla tutunursa, numune sabit fazda yavaş olarak ilerler [82].

Hidrofobik etkileşim kromatografisi (HEK), iyon değişim, jel filtrasyon ve afinite kromatografileri proteinlerin saflaştırılmasında kullanılan başlıca yöntemlerdir [83]. HEK, proteinlerde mevcut olan hidrofobik bölgeler ile sabit bir faza bağlı hidrofobik ligandlar (bütil, oktil ve fenil) arasındaki zayıf hidrofobik etkileşimlerden yararlanarak proteinlerin saflaştırılmasını sağlar [83, 84]. Van Oss ve ark. (1986), hidrofilik etkileşimlerin oluşmasında Van der Waals etkileşimlerinin önemli rol oynadığını bildirmişlerdir [85]. Polar olmayan molekül ile polar bir çözücünün karşılıklı olarak meydana getirdiği itme kuvvetine “hidrofobiklik” denir [83, 84]. Proteinler sahip oldukları hidrofobik amino asitleri, çeşitli konumlarda yer almaları ve hidrofobik özellikleri ile tanımlanırlar. Bu özelliklerinden yararlanarak proteinlerin spesifik hidrofobik matris ya da yüzeyler ile saflaştırılmaları gerçekleştirilebilmektedir [83]. Hidrofobik etkileşimler; proteinlerin kararlılığını, proteinlerin katlanmasını, antikor-antijen reaksiyonlarını, hücre lipid çift katmanlı yapısının korunması ve enzim-substrat etkileşmesini sağlayan kovalent olmayan bağlardır [84]. Proteinlerin katlanmasında hidrofobik etkileşimlerin rolü olduğunu ilk olarak Kauzmann (1959) açıklamıştır [86].

Proteinlerin adsorpsiyonu tuz konsantrasyonunun artırılması ile sağlanırken, elüetin tuz konsantrasyonunun düşürülmesi ile elüsyon gerçekleştirilmektedir [83]. Proteinlerin hidrofobik olarak tutunması termodinamik kanunlarını esas alarak gerçekleşen entropi değişimlerinden meydana gelen bir süreçtir [87]. Sulu çözeltilerde hidrofobik grupların etrafını çevreleyen su molekülleri daha düzenli yapılar meydana getirmektedir ve bunun sonucunda sistemin entropisinde  $\Delta S < 0$  düşüş meydana gelmektedir [83, 87]. Hidrofobik gruplar su molekülleri ile olan bağlantılarını minimum düzeyde tutmak için bir araya gelirler. Su molekülleri de etkisini gerçekleştiremediği için daha düzensiz yapılar oluştururlar. Bunun sonucunda sistemin entropisinde artış gözlenirken ( $\Delta S > 0$ ), sistemdeki serbest enerjide ( $\Delta G < 0$ ) düşüş gözlenir [87]. Serbest enerjide meydana gelen azalma pozitif olarak değerlendirilir ve reaksiyon kendiliğinden gerçekleşir [83].

$$(\Delta G = \Delta H - T\Delta S)$$

$\Delta G$ : Serbest Enerjideki Değişim

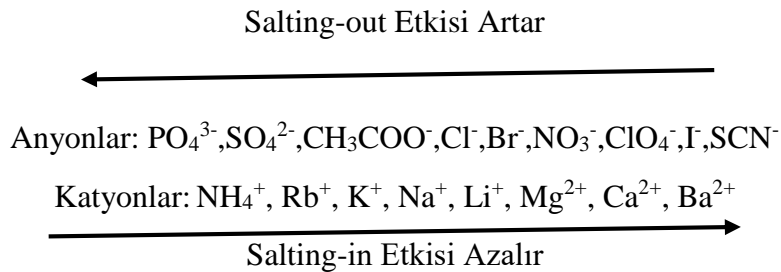
$\Delta H$ : Entalpideki Değişim

$\Delta S$ : Entropideki Değişim

T: Mutlak Sıcaklık

HEK çalışma prensibinin anlaşılması için Tiselius (1948) ve Shepard tarafından ‘‘Tuzlama kromatografisi’’ terimi ilk kez kullanmıştır [83, 88]. Hjerte'n (1973) zayıf hidrofobik karbonhidrat jel matrisler aracılığıyla proteinlerin tuz varlığında ayırma işleminde kullanılabileceğini ifade etmiş ve bu metodu ‘‘hidrofobik etkileşim kromatografisi’’ olarak isimlendirmiştir [83, 84]. Hidrofobik etkileşim kromatografisi, proteinlerdeki hidrofobik kısımlar ile hidrokarbon kuyruğu ihtiva eden noniyonik grup ile çapraz bağlanan sefaroz ya da agaroz gibi sabit mikro gözenekli matrikse tutturulmuş aromatik halkanın arasındaki hidrofobik etkileşime dayanmaktadır. Destek matrisinin iyonik yük bulundurmaması gerekmektedir. İndirgenmiş koşullarda alkalın hidrolizi ile çapraz bağlı agaroz / sefaroz matrisinin sülfatları koparılmaktadır. Sabit faza yük bulandırmayan ‘‘ara kol’’ bağlanır ve daha sonra hidrofobik gruplar, glisidil eter ile etkileşime girer. Bu sayede hidrofobik gruplar yük içermezler ve kimyasal olarak sabit eter bağlarıyla sabit faza tutturulurlar [89]. Proteinlerin solüsyonlarda çöktürülebilmesi için Hofmeister serisi-Liyotropik (su çekme gücü) dikkate alınarak çeşitli tuzlar kullanılmaktadır [83].

Tuz ile çöktürme etkisini artıran anyonlar ok işaretine göre artmaktadır. ( Hidrofobik etkileşim artar.)



Tuz ile çöktürme etkisini azaltan kasyonlar ok işaretine göre artmaktadır. ( Hidrofobik etkileşim azalır.)

Kozmotropik tuzlar daha fazla polariteye sahip olduklarından su ile kuvvetli bir bağ oluştururlar [88]. Bu tuzlar protein ve ligand arasına suyun girmesini engellerler. Hidrofobik etkileşim kuvvetinde gözlenen artış ise proteinlerin çöktürülmesine neden olur ve "Salting-out" olarak adlandırılır [84]. Kozmotropik tuzlar immobilize ligandların hidrofobik gruplarının ortaya çıkarılmasını sağlayarak hidrofobik etkileşim kromatografisinin gerçekleştirilmesinde rol oynarlar ve proteinlerin yapısının korunmasında görev alırlar. Kaotropik tuzların polaritesinin daha düşük olmasından dolayı su ile zayıf bir etkileşim gerçekleştirirler, protein ve ligand yüzeyine suyun girmesine neden olduklarından hidrofobik etkileşim kuvvetinde azalma meydana gelir. Bu da "salting-in" olarak ifade edilir [84, 88]. Kaotropik tuzlar hidrojen bağlarını ortadan kaldırırlar. Ayrıca bu tuzlar proteinlerin yapısının dengesizleştirilmesine sebep olmaktadır [88]. Hidrofobik etkileşim kromatografisi, biyolojik moleküllerin denatüre olmasını engelleyerek aktivitesinin korunmasını sağlar. Bundan dolayı serum proteinleri, nükleer proteinler, hormonlar, rekombinant proteinler biyolojik makromolekül, terapötik proteinlerin DNA aşularının ve enzimlerin saflaştırılmasında tercih edilmektedir [83, 84].

Günümüzde HEK, hem laboratuvar ortamında hem de endüstriyel alanda proteinlerin saflaştırılması için kullanılmaktadır. Proteinlerin saf olarak elde edilmesi yapısal ve işlevsel araştırmaların gerçekleştirilmesi için temel oluşturur. Proteinin kullanılacağı endüstriye göre fazla ya da az olacak şekilde saflık derecesi belirlenmelidir. Gıda ve deterjan endüstrisinde kullanılacak proteinin saflık derecesi düşük olarak tercih edilirken, ilaç endüstrisinde saflık derecesi fazla olacak şekilde tercih edilir. Proteinin saf olarak elde edilmesi, proteinin stabil olması, proteinin konsantrasyonun istenen seviyede olması ve uygun bir ortama transfer edilmesi proteinlerin saflaştırma sürecinde etkili olan parametrelerdir. Proteinlerin saflaştırılması için biyolojik ve fizikokimyasal yapılarının iyi bilinmesi gerekmektedir [83].

Bu çalışmamızda KSF ortamı olarak tarımsal yan ürün olan fasulye kabuğunun substrat olarak değerlendirilmesi sonucunda endüstriyel kullanıma uygun olan  $\beta$ -glukosidaz için yeni bir mikrobiyal enzim kaynağı belirleyerek, enzimin saflaştırılmasının ardından endüstriyel alanlarda kullanılmasına yönelik biyokimyasal ve kinetik parametrelerinin belirlenmesi hedeflenmektedir.

## 2. MATERYAL ve YÖNTEM

### 2.1 Materyal

#### 2.2 Patates Dekstroz Agar (%5 CMC) Besiyerinde Yetiştirilen Mikrofungusların $\beta$ -glukosidaz Aktivitesi Yönünden İncelenmesi

Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde muhafaza edilen *Trichoderma atroviride* NRRL 25150, *Trichoderma viride* NRRL 6418 ve *Cladosporium oxysporum* fungus suşlarından en yüksek  $\beta$ -glukosidaz aktivitesine sahip olanın tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bunun için mikrofunguslar, %5 Karboksimetil Selüloz (CMC) bulunduran Patates Dekstroz Agar besiyerine ekildikten sonra hidroliz zon büyüklüklerine göre karşılaştırılmıştır. En fazla  $\beta$ -glukosidaz aktivitesinin *Trichoderma atroviride* NRRL 25150'ye ait olduğu saptandıktan sonra yapılacak olan araştırmalarda bu fungus suşu tercih edilmiştir.

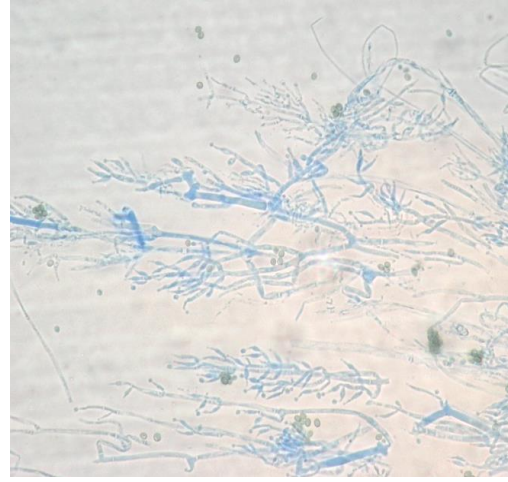
##### 2.2.1.1 *Trichoderma atroviride* Bissett (1984)

*Trichoderma atroviride* spor üretimi 12–13 saat aralığında değişmektedir. Patates Dekstroz Agar besiyerinde *Trichoderma atroviride* 'nin miselyumları beyaz ya da yarı saydam flokoz (tüylü yumak) yapıdadır. Kolonileri 5-8 cm'lik petriyi kaplayacak şekilde hızla büyümektedir. Kolonilerin rengi ikinci günden sonra sarı-yeşilden artemisia yeşili olurken, koloni altı sarı-yeşil renkli olmaktadır. Yaşlı kültürlerde granürlü ya da kabuksu konidasyon oluşumu gözlenmektedir. Kolonileri hindistan cevizi kokusuna benzer bir koku salmaktadır. Konidioforları dallanmış ve karmaşık yapıdadır. Fiyalidleri tek veya 2-4-vertisilat, az ya da çok lageniform, kavisli yapıda ve 6-12X2,4-3,0  $\mu$ m boyutundadır. Terminal fiyalidleri tekli, orta kısımları şişmiş ve uç kısımları daralmıştır şekildedir. Konidileri koyu yeşil renkli, düz yapıda, sub-globoz 2,6-3,8(-4,2)X2,2-3,4(-3,8)  $\mu$ m boyutundadır [42, 90]. Ayrıca *Trichoderma atroviride* 349 gen bulundurmaktadır [73].

Tip Tür: *Trichoderma atroviride*



(a)



(b)

**Şekil 2.1:** (a) *Trichoderma atroviride* NRRL 25150 petri (10x10); (b) *Trichoderma atroviride* NRRL 25150 preparat (10x40)

## 2.2.2 Kullanılan Tampon ve Solüsyonlar

### 2.2.2.1 *Trichoderma atroviride*'nin Geliştirilmesinde Kullanılan Besiyerleri

#### Patates Dekstroz Agar (PDA) Besiyeri (Oxoid CM0139)

Patates ektrat.....	2,0 g
Glukoz.....	10,0 g
Agar.....	7,5 g
Saf su.....	500 mL

Belirtilen formüle göre besiyeri hazırlandıktan sonra sterilizasyon işlemi için otoklavlanmış (121°C - 20 dk) ve petri kaplarına dökülmüştür [91, 92].

#### Patates Dekstroz Broth (PDB) Besiyeri (Difco™)

Patates nişastası.....	2,0 g
Dekstroz.....	10,0 g
Saf su.....	500 mL

İfade edilen formüle göre besiyeri hazırlandıktan sonra besiyerinin sterilizasyonu için 121°C’de 20 dakika otoklav yapılmıştır [93].

### **İçeriğinde %5 CMC bulunduran PDA Besiyeri**

CMC (C <sub>28</sub> H <sub>30</sub> Na <sub>8</sub> O <sub>27</sub> ) (Sigma Life Science).....	5 g
Patates Dekstroz Agar (PDA).....	3,9 g
Distile su.....	100 mL

Gösterilen formüle göre besiyeri hazırlandıktan sonra sterilizasyon işlemi için otoklavlanmış (121°C - 20 dk) ve petri kaplarına dökülmüştür [94].

### **2.2.2.2 PDA (%5 CMC ) Geliştirilen Mikrofungusların β- glukosidaz Aktivitesi Yönünden İncelenmesinde Kullanılan Solüsyonlar**

#### **0,1’lik Kongo Kırmızısı Solüsyonu**

Kongo kırmızısı.....	0,2 g
Saf su.....	200 mL

0,2 g kongo kırmızısı 200 mL saf suda çözündürülerek kullanılmıştır [95, 96, 97].

#### **1 M Sodyum Klorür (NaCl) Solüsyonu**

Sodyum klorür (NaCl).....	5,844 g
Saf su.....	100 mL

5,844 g sodyum klorür (NaCl) 100 mL saf suda çözündürülerek 1M sodyum klorür çözeltisi hazırlanmıştır [97].

### 2.2.2.3 Spor Süspansiyonu Hazırlamada Kullanılan Çözelti

#### % 0,1'lik Polisorbat 80 Çözeltilsinin Hazırlanması

Polisorbat 80 (Merck).....	0,25 mL
Saf su.....	250 mL

250 mL saf suda 0,25 mL polisorbat 80 çözüldükten sonra sterilizasyon işlemi için 121°C'de 20 dakika otoklav yapılarak 0,1'lik Tween 80 çözeltisi hazırlanmıştır [97].

### 2.2.2.4 KSF Ortamı Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler

#### 0,2 M Sitrik Asit Hidrat (1,2,3-Propantrikarboksilikasit asit) Tamponu

1,2,3-propantrikarboksilikasit asit (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> ) (Sigma-Aldrich) .....	2,1014 g
Saf Su .....	50 mL

2,1014 g 1,2,3-propantrikarboksilikasit asit tartılıp saf suda çözdürülmüş ve sonra pH 4, pH 5 ve pH 5,5'e olacak şekilde pH'ı ayarlanmış ve balon jöjeye aktarılıp son hacmi 50 mL'ye tamamlanmıştır [98].

#### 0,2 M Sodyum Dihidrojen Fosfat Tamponu

Sodyum Dihidrojen Fosfat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) (Carlo-Erba Reagentı).....	6,899 g
Saf Su .....	250 mL

6,899 g sodyum dihidrojen fosfat saf suda çözdürülmüş ve ardından pH 6, pH 6,5, pH 7, pH 7,5 ve pH 8 olarak pH'ı ayarlanıp sonrasında 250 mL'lik balon jöjeyede son hacmi 250 mL olacak şekilde saf su eklenmiştir [99].

#### 0,2 M Disodyum Fosfat Tamponu

Disodyum Fosfat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) .....	0,8898 g
Saf Su .....	25 mL



1,7796 g disodyum fosfat tartılıp saf suda çözdürülmüş ve sonra pH 8,5 ve pH 9 olacak şekilde pH'ları ayarlanıp sonrasında 25 mL'lik balon jöjeyede son hacmi 25 mL'ye tamamlanmıştır [99].

### 2.2.2.5 Enzim Aktivitesini Belirlemede Kullanılan Tampon ve Solüsyonlar

#### 50 mM Sodyum Asetat Trihidrat Tamponu

Sodyum Asetat Trihidrat ( $C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$ ) ..... 0,3402 g  
Saf Su ..... 50 mL

Sodyum asetat trihidrat (Sigma-Aldrich) 0,3402 g tartılıp saf suda çözdürüldükten sonra pH metrede pH 7 ayarlanıp ardından saf su ile 50 mL'ye tamamlanmıştır [100].

#### 5 mM *p*NPG Solüsyonu

*p*NPG ..... 0,0015 g  
50 mM (pH 7) Sodyum Asetat Trihidrat Tamponu..... 1,0 mL

Taze olarak hazırlanacak olan *p*NPG 0,0015 g tartılıp sodyum asetat trihidrat tamponu ile çözdürüldükten sonra hacim 1,0 mL olacak şekilde tampon ilave edilmiştir [101].

#### Reaksiyon Durdurucu Tampon

$Na_2CO_3$  (Sigma-Aldrich).....5,2938 g  
Saf Su ..... 100 mL

Sodyum karbonat ( $Na_2CO_3$ ) 5,2938 g tartıldıktan sonra saf suda çözdürülüp hacmi 100 mL olacak şekilde ayarlanmıştır [101].

### 2.2.2.6 Lowry Yöntemiyle Protein Miktarının Belirlenmesinde Hazırlanan Solüsyonlar

#### A Solüsyonu

Sodyum Hidroksit (Sigma-Aldrich)..... 0,40010 g  
Sodyum Karbonat ( $Na_2CO_3$ ) (Sigma-Aldrich)..... 2,0 g  
Saf Su.....100 mL

Tartılan 0,40010 g sodyum hidroksit (NaOH) üzerine 100 mL saf su ilave edilip çözdürüldükten sonra 2 g sodyum karbonat'ın da çözetliye ilave edilmesiyle A solüsyonu hazırlanmıştır [102].

### **B Solüsyonu**

Potasyum Sodyum Tartarat ( $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$ ) (Merck)..... 0,5 g  
Saf Su..... 50 mL

Tartılan 0,5 g potasyum sodyum tartarat bir miktar saf suda çözdürülmüş daha sonra balon joljede son hacim 50 mL'ye tamamlanarak B solüsyonu hazırlanmıştır [102].

### **C Solüsyonu**

Bakır Sülfat ( $CuSO_4$ ) (Sigma-Aldrich)..... 1 g  
Saf Su..... 50 mL

Tartılan 1 g bakır sülfat saf suda çözdürülüp ardından son hacim 50 mL olacak şekilde C solüsyonu hazırlanmıştır [102].

### **D Solüsyonu**

A Solüsyonu..... 96 mL  
B Solüsyonu..... 2 mL  
C Solüsyonu..... 2 mL

Taze olarak hazırlanan 100 mL D solüsyonu; 96 mL A Solüsyonunun, 2mL B Solüsyonunun ve 2 mL C Solüsyonunun karıştırılması ile hazırlanmıştır [102].

### **E Solüsyonu**

Folin fenol reaktifi (Merck) ve saf su 1:1 oranında olacak şekilde taze E solüsyonu hazırlanmıştır [102].

### **Sığır Serum Albümin (BSA)**

BSA ve saf su 1:1 oranında olacak şekilde taze BSA hazırlanmıştır [102].

### 2.2.2.7 HEK Metodundaki Hazırlanan Solüsyonlar

#### Tuzlu Tampon Solüsyonu (pH 6,8)

1,5 M Amonyum sülfat tuzu ( $\text{NH}_4(\text{SO}_2)$ ) (Merck).....	198,21 g
0,05 M Disodyum monohidrojen fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Carlo-Erba).....	8,898 g
Saf Su.....	1 L

198,21 g  $\text{NH}_4(\text{SO}_2)$ ; 8,898 g disodyum monohidrojen fosfat ve saf suda çözdürüldükten sonra pH 6,8 olarak ayarlanıp ardından balon jodede son hacim 1 L olarak hazırlanmıştır [103].

#### 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).....	2,2245 g
Saf Su.....	250 mL

0,05 M disodyum monohidrojen fosfat bir miktar saf suda çözdürüldükten sonra pH 6,8 olarak ayarlanıp ardından son hacim 250 mL olarak hazırlanmıştır [103].

### 2.2.2.8 SDS-PAGE Yöntemindeki Tampon ve Solüsyonların Hazırlanması

#### Yürütme Jeli

Saf Su.....	2 mL
1.5 M Trizma-Base ( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ ) (pH 8,8) .....	1,25 mL
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ( $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$ ) .....	50 $\mu\text{L}$
TEMED (N,N,N,N Tetrametil etilen diamin) .....	2,5 $\mu\text{L}$
%30'luk N,N'-metilen-bis(Akrilamid).....	1,665 mL
%10'luk Amonyum persülfat (APS) ( $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) .....	75 $\mu\text{L}$

Yukarıda belirtilen formüle göre yürütme jeli hazırlandıktan sonra 60 dk. boyunca jel donması için beklenilmiştir [104].

#### Yürütme Jelinde Kullanılan Alt Tampon

1,5 M Trizma-Base (pH 8.8).....	59,1 g
Saf Su .....	250 mL

1,5 M Trizma-Base 59,1 g tartılıp saf su ile karıştırılıp pH 8,8 ayarlanmıştır. Tampon 250 mL olacak şekilde saf su eklenmiştir [104].

### **Yükleme Jeli**

Saf Su .....	3,05 mL
0,5 M Trizma-Base (pH 6,8) .....	1,25 mL
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS).....	50 µL
TEMED (N,N,N,N Tetrametil etilen diamin) .....	5 µL
%30'luk N,N'-metilen-bis(Akrilamid) .....	625 µL
%10'luk Amonyum persülfat (APS) .....	100µL

Yukarıda belirtilen formülden yükleme jeli hazırlandıktan sonra 60 dk. boyunca jel donması için beklenilmiştir [104].

### **Yükleme Jelinde Kullanılan Üst Tampon**

0,5 M Trizma-Base (pH 6,8).....	7,88 g
Saf Su .....	100 mL

0,5 M Trizma-Base 7,88 g tartılıp saf su ile çözdürülüp sonra pH 6,8 ayarlanıp ardından tampon 100 mL olarak hazırlanmıştır [104].

### **% 10'luk Amonyum Persülfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>)**

Amonyum persülfat (APS) .....	0,2 g
Saf Su .....	2 mL

0,2 g APS saf suda çözdürülüp ardından son hacim 2 mL olacak şekilde taze hazırlanmıştır [104].

### **Tank Tamponu**

Trizma-Base (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> ) .....	0,30 g
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS).....	0,1 g
Glisin (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> ) .....	1,44 g
Saf Su .....	100 mL

0,1 g sodyum dodesil sülfat; 0,30 g C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>; 1,44 g C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub> ve 100 mL saf su karıştırılarak hazırlanmıştır [104,105].

### **Yükleme Tamponu**

0,5 M Trizma-Base (pH 6,8)(C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> ) .....	10 mL
%10'luk SDS (C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> NaO <sub>4</sub> S) .....	16 mL
Gliserol(C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> ) .....	8 mL
β-merkaptoetanol (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS) .....	4 mL
Bromfenol mavisi .....	0,04 g
Saf Su .....	2 mL

10 mL 0,5 M Trizma-Base (pH 6,8), 16 mL %10 SDS'den, 8 mL gliserol, % 99,5 4 mL β-merkaptoetanol'den, bromfenol mavisi 0,04 g ve 2 mL saf su karıştırılmıştır [104, 105].

### **%10'luk SDS (C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaO<sub>4</sub>S)**

%10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) .....	0,1 g
Saf Su .....	1 mL

0,1 g C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaO<sub>4</sub>S saf suda çözdürülüp son hacmi 1 mL olarak hazırlanmıştır [104, 105].

### **2.2.2.9 SDS-PAGE'deki Boya Solüsyonları**

#### **Jel Boyama Çözeltisi**

Cosmassie Brilliant Blue.....	0,66 g
%96 Asetik Asit.....	24 mL
%99 Metanol.....	50 mL
Saf su .....	120 mL

0,66g Cosmassie Brilliant Blue, %99 metanol 50 mL, %96 asetik asit 24 mL ve 120 mL saf su karıştırılarak hazırlanmıştır [106, 107, 108]

#### **Jel Yıkama Çözeltisi**

Asetik Asit.....	75 mL
Metanol.....	50 mL
Saf su .....	875 mL

Metanol 50 mL, asetik asit 75 mL ve saf su 875 mL olacak şekilde hazırlanmıştır [106, 107, 109].

## 2.3 Yöntem

### 2.3.1 Patates Dekstroz Agar (%5 CMC) Besiyerinde Yetiştirilen *Trichoderma atroviride*'nin $\beta$ -glukosidaz Aktivitesi Yönünden İncelenmesi

%5 CMC (C<sub>28</sub>H<sub>30</sub>Na<sub>8</sub>O<sub>27</sub>) bulunduran Patates Dekstroz Agar (PDA) besiyerine, *T. atroviride* NRRL 25150'nin  $\beta$ -glukosidaz aktivitesinin varlığının belirlenmesi için tek nokta yöntemiyle inokülasyonu gerçekleştirildikten sonra 7 gün 25°C'de inkübe edilmiştir [110]. Ardından hidroliz zonunun varlığının incelenmesi için *Trichoderma atroviride* NRRL 25150 kültürlerinin üst kısmı (%0,1) kongo kırmızısı çözeltisi ile kaplanarak 15 dakika 25°C'de inkübe edilmiştir. 15 dakika sonunda kongo kırmızısının fazlası 1M'lık NaCl ile yıkanmıştır. Yıkama uygulamasından sonra kültürlerin üst kısmı yeniden 1M'lık NaCl ile kaplanmış ve 15 dakika 25°C'de inkübe edilmiştir. 15 dakika sonunda 1M'lık NaCl petriden uzaklaştırılmıştır. *Trichoderma atroviride* NRRL 25150'nin %5 CMC içeren PDA besiyerinde hidroliz zonu meydana getirip getirmediği incelenmiştir [110, 111, 112].

### 2.3.2 Mikrofungusun Geliştirilmesi ve Sporlarının Elde Edilmesi

*Trichoderma atroviride*'nin Patates Dekstroz Agar (PDA) besiyerine tek nokta yöntemiyle inokülasyonu gerçekleştirildikten sonra 168 saat (25°C) inkübasyonu yapılmıştır [113, 114]. Ardından petri kabına %0,1'lik Tween 80 eklenmiş ve Thoma lamında sayım işlemi gerçekleştirilerek 10<sup>7</sup> CFU/mL olacak şekilde spor süspansiyonu hazırlanmıştır [115, 116, 117, 118, 119]. Hazırlanan spor süspansiyonundan 5 mL alınarak 250 mL'lik erlende hazırlanmış 150 mL PDB medyumuna inokülasyon gerçekleştirilerek kültürün çalkalayıcı inkübatörde (30°C'de 150 rpm) 3 gün inkübasyonu sağlanmıştır [119, 120, 121, 122].

### 2.3.3 Katı Substrat Fermentasyonu Ortamının Hazırlanması

Balıkesir'deki tarladan elde edilen fasulye kabukları güneş altında kurutulmuştur [123, 124]. Daha sonra kurutulan fasulye kabuğu küçük parçalar haline getirilerek elek yardımıyla elenmiştir [122, 124]. Eleme işleminden sonra 80°C'de 24 saat Pastör fırınında kurutma işlemi yapılmıştır [125]. 250 mL'lik erlene kurutulmuş fasulye kabuğundan 5 gram tartılmıştır [119, 122, 126]. Öğütülmüş fasulye kabuğu ile hazırlanan KSF ortamına (pH 4; pH 5; pH 5,5) 0,2 M 1,2,3-propantrikarboksilikasit tamponundan, (pH 6; pH 6,5; pH 7; pH 7,5; pH 8) 0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (pH 8,5; pH 9,0) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponlarından 2,75 mL ilave edilerek nemliliği

%55'e ayarlanıp 121°C'de 20 dakika otoklavda sterilizasyonu yapılmıştır ve ardından soğumaya bırakılmıştır [122, 123, 126].

### **2.3.4 *Trichoderma atroviride* Sıvı Kültürünün KSF Ortamına Ekilmesi**

Üç gün süresince Patates Dekstroz Broth besiyerinde yetiştirilen *Trichoderma atroviride* NRRL 25150'nin sıvı kültüründen steril cam pipet ve pipetör vasıtasıyla 3 mL soğutulan fasulye kabuğuna ekim yapılmıştır. Ekimden sonra 30°C'de 7 gün için inkübasyonu sağlanmıştır [127].

#### **2.3.4.1 Kısmi Saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz Enziminin Elde Edilmesi**

Fasulye kabuğunda 168 saat boyunca geliştirilen *Trichoderma atroviride*'nin  $\beta$ -glukosidaz enziminin aktivitesinin tespit edilmesi için 75 mL steril distile su eklenmiştir. 25°C'de 150 rpm'de 2 saat için çalkalamalı inkübasyon yapılmıştır [125]. 2 saat sonunda hazırlanan temiz erlen, huni ve steril gazlı bez ile süzme işlemi yapılmıştır. Elde edilen süzöntü teflon tüplere konulmuştur. (4°C-10000 rpm) 10 dk. santrifüj yapılmıştır. Santrifüjlemeden sonra elde edilen kısmi saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidazı içeren süpernatanttan aktivite ölçümü gerçekleştirilmiştir [128].

### **2.3.5 KSF koşullarında *Trichoderma atroviride*'nin $\beta$ -glukosidaz Enzim Üretimine**

#### **Ortam Koşullarının Etkisi**

*Trichoderma atroviride*'den  $\beta$ -glukosidaz enziminin elde edilmesine Katı Substrat Fermentasyonunda geliştirme şartlarının etkisinin belirlenmesi amacıyla optimum geliştirme sıcaklığı, nemlilik sıvısı, optimum pH ve optimum geliştirme süresi belirlendikten sonra katı substrat fermentasyonun koşullarında mikrofungusun geliştirilmesi sağlanmıştır.

#### **2.3.5.1 KSF Ortamının Optimum pH ve Nemlendirme Sıvısının Saptanması**

KSF koşullarında ilk belirlenen parametreler optimum pH ve nemlendirme sıvısıdır. Bu amaçla 5 gram tartılan fasulye kabukları 250 mL'lik erlene alınıp, farklı pH ve nemlendirme sıvıları kullanılarak katı substrat fermentasyon ortamı hazırlanmıştır. Öğütülmüş fasulye kabuğu ile hazırlanan KSF ortamına 0,2 M 1,2,3-propantrikarboksilikasit tamponundan (pH 4; pH 5; pH 5,5); 0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 6; pH 6,5; pH 7; pH 7,5; pH 8) ve 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH

8,5; pH 9,0) tamponlarından 2,75 mL ilave edilerek nemliliği %55'e ayarlanıp 121°C'de 20 dakika otoklavda sterilizasyonu yapılmıştır [129, 130, 131]. Soğuduktan sonra 150 mL'lik Patates Dekstroz Broth'da geliştirilen *Trichoderma atroviride* kolonilerinden 3 mL fasulye kabuğuna aşılansın 30°C'de 7 gün inkübasyonu sağlanmıştır [127].

Yedi günün sonunda 75 mL distile su eklendikten sonra 25°C'de 150 rpm'de 2 saat için çalkalamalı inkübasyonu yapılmıştır [125, 132]. Sürenin sonunda, katı substrat fermentasyonu içeriği steril gazlı bez ve huni yardımıyla temiz bir erlene filtre edilmiştir [133]. Elde edilen süzüntü teflon tüplere koyulduktan (10000 rpm-4°C) 10 dakika soğuk santrifüj uygulaması yapılmıştır. Daha sonra farklı pH'ların katı substrat fermentasyonu vasatlarından kısmen saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz enzimi üretimine etkisini saptamak için enzim aktivitesi spektrofotometre kullanılarak incelenmiştir [128, 134].

### **2.3.5.2 KSF Ortamının Optimum İnkübasyon Sıcaklığının Saptanması**

Optimum geliştirme sıcaklığının tespit edilmesi amacıyla katı substrat fermentasyonu vasatı tespit edilen optimum pH ve nemlendirme sıvısı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Fasulye kabuğuna 3 mL Patates Dekstroz Broth besiyerinde büyütülen *Trichoderma atroviride* NRRL 25150 sıvı kültüründen 3 mL ilave edildikten sonra kolonilerin gelişmesi için hazırlanan erlenler farklı sıcaklıklara 25°C, 30°C, 35°C, 40°C ve 45°C ayarlanmış inkübatörlere 7 gün boyunca inkübe edilmiştir. 7 günün sonunda farklı sıcaklıklardaki katı substrat fermentasyonu vasatlarından kısmen saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz enzimi üretimine sıcaklığın etkisini saptamak için spektrofotometrede enzim aktivitesi ölçülmüştür [131, 135, 136, 137].

### **2.3.5.3 KSF Ortamının Optimum İnkübasyon Süresinin Saptanması**

Tespit edilen nemlendirme sıvısı, optimum pH ve optimum inkübasyon sıcaklığına göre katı substrat fermentasyonu vasatında yetiştirilmek için *Trichoderma atroviride* kültürü optimum inkübasyon süresinin tespit edilmesi için 3, 4, 5, 6, 7, 8 ve 9 gün süre ile inkübasyona bırakılmış ve kısmi saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz enzimi üretimine inkübasyon süresinin etkisini saptamak için enzim aktivitesi ölçümleri yapılmıştır [130, 131, 135, 136, 138].



### 2.3.6 Kısmi Saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz Enzimi Aktivitesinin Saptanması

Kısmi saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz enzimi aktivitesini saptamak için 96 kuyulu plaka kullanılmıştır. Örnek kuyularına 70  $\mu$ L kısmen saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz, 70  $\mu$ L 0,005 M *p*NPG solüsyonu ve 70  $\mu$ L 0,05M sodyum asetat tamponundan (pH 7,0) ve 70  $\mu$ L kısmen saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminden kontrol kuyularına koyulmuştur. Daha sonra 96 kuyulu plakada 30 dakika 37°C'de inkübe edilmiştir. 30 dakika sonunda hazırlanan örnek ve kontrol kuyularına gerçekleşen reaksiyonu bitirmek için 70  $\mu$ L 0,5 M sodyum karbonat tamponundan eklenmiştir. *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranosit (*p*NPG) substratının konsantrasyonunun 410 nm'de spektrofotometrede ölçülmesiyle enzimin aktivitesi (EU) tespit edilmiştir [129, 138, 139].

### 2.3.7 Protein Miktarının Tespit Edilmesi

Çalışmamızda Warburg ve Lowry Yöntemleri tercih edilerek protein miktarı tespit edilmiştir. Protein miktarının saptanması için 280 nm'de kalitatif (nitel) ölçüm için Warburg Yöntemi uygulanırken, 600 nm'de kantitatif (nicel) ölçüm için Lowry yöntemi tercih edilmiştir.

#### 2.3.7.1 Warburg Yöntemi

Proteinlerin kalitatif olarak belirlenmesinde Warburg yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem de  $\beta$ -glukosidaz enzimi son saflaştırma aşaması HEK sırasında alınan her elüatın örnek ve kontrol hazırlanarak 280 nm'de absorbans ölçümleri yapılmıştır. Bu ölçümde kuartz 96 kuyulu plakada örnek kuyucukları için elüatlardan 210  $\mu$ L alınarak, kontrol kuyucukları ise distile sudan 210  $\mu$ L alınarak hazırlanmıştır [140].

#### 2.3.7.2 Lowry Yöntemi

ASÇ ve HEK yöntemlerinden elde edilen protein miktarının saptanması için Lowry yöntemi tercih edilmiştir. Aşağıdaki formüllere göre beş farklı çözelti hazırlanmıştır.

A Solüsyonu %2'lik (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; 0,1 M NaOH ile karıştırılarak,

B Solüsyonu; %1'lik (w/v)  $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ile saf su karıştırılarak,

C Solüsyonu; % 0,5'lik (w/v)  $\text{CuSO}_4$  saf su ile karıştırılarak,

D Solüsyonu; 2 mL C solüsyonu, 2 mL B solüsyonu ve 96 mL A solüsyonu karıştırılarak,

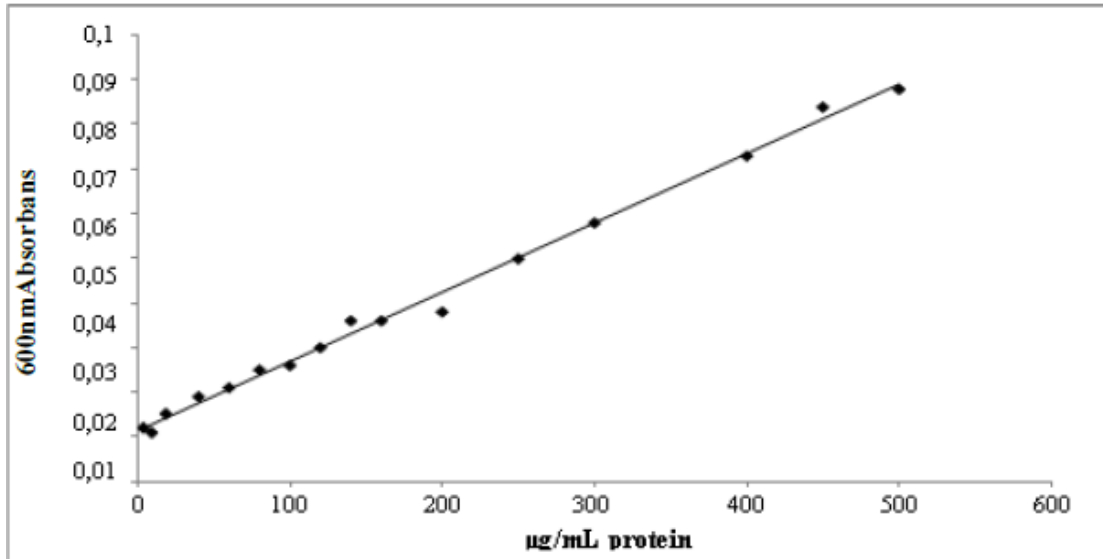
E Solüsyon; Saf su ve Folin fenol (1/1) ile hazırlanmıştır.

Hazırlanan örnek 1/10 oranında distile su ile dilüe edildikten sonra bu örnek tüplerinden 100  $\mu$ L olacak şekilde yeni tüplere ilave edilmiştir. 100  $\mu$ L saf su eklenerek kontrol tüpleri

hazırlanmıştır. Hem kontrol tüplerine hem de örnek tüplerine 2 mL yeni hazırlanmış D solüsyonundan ilave edildikten sonra kontrol ve örnek tüpleri vortekslenip karanlıkta 10 dk. boyunca 25°C’de inkübe edilmiştir. Ardından kontrol ve örnek tüplerine yeni hazırlanmış E solüsyonundan 200 µL ilave edilip vortekslenmiştir ve daha sonra karanlıkta 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. 30 dakika tamamlandığında örnek ve kontrol tüplerinden 210 µL alınıp 96 kuyulu plakaya eklendikten sonra spektrofotometrede 600 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerleri göz önünde bulundurularak BSA grafiğinden çıkarılan formül kullanılarak protein miktarı grafiği çizilmiştir [141, 142].

### 2.3.7.3 Standart BSA Grafiğinin Oluşturulması

Distile su ve BSA (1/1) ile hazırlanan solüsyondan sırasıyla 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µL tüplere alındıktan sonra son hacimleri 100 µL olacak şekilde distile su ilave edilmiştir. Hazırlanan tüplere 2000 µL D solüsyonundan ilave edildikten sonra bütün tüpler vortekslenip 10 dakika boyunca 25°C’de karanlık ortamda inkübe edilmiştir. 10 dakika ardından kontrol ve örnek tüplerine yeni hazırlanmış E solüsyonundan 200 µL ilave edilip vortekslenmiştir ve daha sonra karanlıkta 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Ardından 210 µL kontrol ve örnek tüplerinden alınarak 96 kuyulu-plakaya eklenmiştir. Daha sonra 600 nm’de spektrofotometrede absorbans değer ölçümleri yapılmıştır. Absorbans değerlerinden yararlanılarak Standart Bovin Serum Albumin (BSA) grafiği oluşturulmuştur [142].



**Şekil 2.2:** Lowry yöntemiyle protein miktarının tespit edilmesinde yararlanılan BSA standart grafiği

Oluşturulan standart BSA grafiğinden çıkarılan formül aşağıda belirtilmiştir ve bu formülden yararlanılarak öteki örneklerin protein miktarları belirlenmiştir.

$$\text{Protein Miktarı}(\mu\text{g/mL}) = \frac{(\text{Örnek Tüpün Absorbansı} - \text{Kontrol Tüpün Absorbansı}) \cdot 0,0113}{0,002}$$

### 2.3.8 $\beta$ -glukosidaz Enziminin Saflaştırma Aşamaları

*Trichoderma atroviride*'den fasulye kabuğunun substrat olarak kullanılmasıyla katı substrat fermentasyonu sonucunda oluşan kısmi saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz'ın ASÇ ve Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi yöntemleriyle saflaştırması yapılmıştır.

#### 2.3.8.1 Amonyum Sülfat Çöktürme (ASÇ) Aralığının Tespit Edilmesi

ASÇ ile kısmen saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz'ın ilk saflaştırma aşaması gerçekleştirilmiştir. Çöktürme gerçekleştirilirken amonyum sülfat tuzunun tercih edilmesinin pek çok nedeni vardır. Amonyum sülfat tuzu  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  kolay bulunabilir, proteinin yapısını bozmadan proteini stabil eder, çözünme hızı yüksektir, diğer tuzlara göre daha uygun fiyatlıdır, iyonik şiddeti yüksek olan solüsyonlarda etkilidir ve iyi bir çöktürücüdür [143, 144].

Amonyum sülfat çöktürme aralığının saptanması için çöktürmede kullanılacak olan amonyum sülfat tuzu miktarı aşağıdaki grafikten yararlanılarak belirlenmiştir:

$$g (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = \frac{1,77 \cdot V \cdot (S2 - S1)}{3,54 - S2}$$

V: Ölçülen süpernatantın hacmi

S1:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ilk doygunluğu

S2:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  istenilen doygunluğu

Amonyum sülfat çöktürmesi % 0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100 (w/v) oranlarda kısmen saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz kaynağına uygulanarak çöktürme aralığı belirlenmiştir. Kısmi saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz enzim kaynağı buz dolu kap içerisine koyulan beher içerisine aktarılmıştır. Amonyum sülfat tuzu kademeli olarak beher içerisine eklenmiştir ve manyetik karıştırıcı ve manyetik balık kullanılarak 15 dakika homojen hale gelmesi sağlanmıştır. Daha sonra teflon tüplere konularak (+4°C-15000 rpm) 30 dk. boyunca soğuk santrifüj uygulanmıştır. Santrifüj sonrasında pellet ve süpernatant birbirinden

ayrılmıştır ve daha sonra süpernatant mezüre boşaltılmıştır. Pellet 0,05 M Tuzlu tamponu (pH 6,8) içerisinde çözüldükten sonra 2 mL'lik ependorfa aktarılmıştır. Son hacim 2 mL olacak şekilde tuzlu tampon eklenmiştir ve daha sonra örnekler +4°C'ye kaldırılmıştır [145, 146]. Bu yöntem bütün çöktürme aralıkları için ayrı ayrı uygulanmıştır. Bütün çöktürme aralıklarından alınan örneklerin  $\beta$ -glukosidaz enzim aktiviteleri 410 nm'de ve Lowry Yöntemi ile protein miktarları 600 nm'de ölçülmüştür [147, 148].

### **2.3.8.2 Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığı Belirlendikten Sonraki HEK Öncesi $\beta$ -glukosidaz Enzim Saflaştırılması**

Amonyum sülfat çöktürme aralığı belirlendikten sonra aralığa göre formülde yerine konularak amonyum sülfat tuzu tartılıp buz dolu kap içerisine konulan beher içerisine kısmen saflaştırılmış 10 mL  $\beta$ -glukosidaz enzim eklenmiştir. 10 mL  $\beta$ -glukosidaz enziminden 500  $\mu$ L alınarak hem  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi ölçümü hem de Lowry yöntemi uygulanmak üzere ayrılmıştır. Daha sonra tartılan amonyum sülfat tuzu yavaş yavaş behere eklenmiştir. 15 dakika homojen hale gelinceye kadar manyetik karıştırıcı ve balık ile karıştırılmıştır. 15 dakika sonunda 2 saat (+4°C-15000 rpm) soğuk santrifüj uygulanmıştır. 2 saat sonunda süpernatant behere aktarılırken pellet atılmıştır ve formülden tartılması gereken amonyum sülfat tuzu belirlenmiştir. Buz dolu kap içerisinde bulunan beher içerisine tartılan amonyum sülfat tuzu yavaş yavaş eklenmiş ve 30 dakika homojen hale gelinceye kadar karıştırılmıştır. 30 dakika sonunda 2 saat 15000 rpm'de +4°C'de soğuk santrifüj uygulanmıştır [145, 146]. 2 saat sonunda süpernatant dökülmüş ve pellet kısmı 4 mL Tuzlu Tampon pH 6,8 içerisinde çözülmüştür. 3,5 mL'si Hidrofobik etkileşim kromatografisi için kolona yüklenmiştir. 500  $\mu$ L'si  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi ve Lowry yöntemi ile protein tayini için ayrılmıştır [147, 148].

### **2.3.8.3 $\beta$ -glukosidaz Enziminin Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Saflaştırılması**

Amonyum sülfat çöktürmesinden sonra  $\beta$ -glukosidaz enzim saflaştırılması için hidrofobik etkileşim kromatografisi yapılmıştır. HEK'ten önce tuzlu tampon pH 6,8 ile kolon dengeleme yapılmıştır. Kolon dengelemesinden sonra tuzlu tampon jele yaklaşıncaya kolona 3,5 mL amonyum sülfat çöktürmesi yapılan örnek yüklenmiştir. 0,05 M tuzlu tamponundan (pH 6,8) (yüksek tuz konsantrasyonundan) 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 6,8) Tuzsuz tamponuna doğru (düşük tuz konsantrasyonuna) tuz gradiyenti meydana getirilmiştir. Tuz gradiyenti ile 2 mL'lik ependorflere örnekler alınmıştır. Elde edilen her ependorftan  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi 410 nm'de ölçülmüştür. Elde edilen örneklerden  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi en yüksek

çıkan endorflerin kantitatif protein miktarları Lowry yöntemi ile 600 nm’de absorbansları ölçülmüştür. Elde edilen endorflerden kalitatif protein miktarlarının belirlenmesi için Warburg yöntemi ile 280 nm’de absorbansları ölçülmüştür. Warburg yöntemi ve  $\beta$ -glukosidaz enzim aktiviteleri sonuçlarından aktivite ve protein miktarı grafikleri çizilmiştir. Lowry yöntemi ve  $\beta$ -glukosidaz enzim aktiviteleri sonuçlarından saflaştırma tablosu yapılmıştır [149, 150].

### **2.3.9 *Trichoderma atroviride*’den Saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz’ın Alt Birim Sayısı/Varlığı ve Homojenliğinin SDS -PAGE Yöntemiyle Saptanması**

Proteinlerin moleküler ağırlığının saptanması, alt birim sayısının/varlığının belirlenmesi, proteinlerin homojenliğinin tespit edilmesi ve proteinlerin saflaştırılmasında elektroforez yöntemi kullanılmaktadır. PAGE metodunda proteinler; poliakrilamid jeller üzerinde elektrik akımı uygulanması ile yürütülerek ayrıştırılmaktadır. Akrilamid konsantrasyonu, jelin gözenek boyutu, protein yükü, proteinin yapısı ve büyüklüğü proteinlerin jelde yürüme hızını etkileyen faktörler arasında yer almaktadır. 1970 yılında Laemmli tarafından oluşturulan SDS-PAGE metodunda proteinlerin yapısını bozarak negatif yük ile yüklenmelerini sağlayan Sodyum Dodesil Sülfatın (SDS) deterjanı kullanılmaktadır. Bu yöntemde proteinler denatüre olduklarından dolayı molekül ağırlıklarına göre ayrıştırılmaktadır [104, 108, 109].

#### **2.3.9.1 *Trichoderma atroviride*’den Saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz’ın Alt Birim Sayısı/Varlığı ve Homojenliğinin SDS -PAGE Yöntemiyle Saptanması**

SDS-PAGE elektroforez cihazına ait olan iki adet cam plaka saf su ile yıkandıktan sonra etil alkol ile temizlenmiştir. Daha sonra elektroforez cihazına ait olan jel yürütme aparatına temiz camlar üst üste konularak yerleştirilmiştir. %10 SDS içeren yürütme jeli hazırlanarak cam plakaların üst kısmından 2-3 cm boşluk kalana kadar yürütme jeli dökülmüştür. Yürütme jelinin polimerizasyonun gerçekleşmesi için 60 dk. boyunca jelin donması sağlanmıştır. Hazırlanan yürütme jelinin üzerine yükleme jeli hazırlanarak cam plakaların arasından yavaşça ilave edilmiştir ve yükleme jelindeki kuyucukların oluşturulması için taraklar koyulmuştur. Yükleme jelinin polimerizasyonun gerçekleşmesi için 60 dk. süresince jelin donması sağlandıktan sonra taraklar jeldeki kuyucuklardan yavaşça ayrılmıştır. Daha sonra jel yürütme aparatı tanka konularak SDS-PAGE tank tamponu eklenmiş ve kuyucukların tank tamponu ile yıkanması sağlanmıştır. HEK ile saflaştırılmış maksimum aktivite gösteren  $\beta$ -glukosidaz enzimlerinden 10  $\mu$ L ve SDS-PAGE yükleme tamponundan 40  $\mu$ L karıştırılarak örnek çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan örnek çözeltileri 100°C sıcaklıkta 5 dk. boyunca

bekletilmiş ve daha sonra soğumaya bırakılmıştır. Yükleme jelindeki kuyucuklara 5 µL marker ve 15 µL hazırlanan örnek çözeltileri olacak şekilde yüklenmiştir. Ardından elektroforez tankının elektrotları güç kaynağına bağlanmış ve 80 V'da yükleme jelinin bitimine kadar yürütme yapılmıştır. Daha sonra güç kaynağı 100 V'a ayarlanarak yürütme jelinin sonundan 1 cm kalana kadar jelde örnekler yürütülmüştür. Yürütme işlemi sonunda güç kaynağı kapatılarak yürütme aparatındaki cam plakalar arasından jel dikkatlice çıkarılmıştır. Protein bantlarının görüntülenebilmesi için Bölüm (2.1.2.9)'deki formüle göre hazırlanmış jel boyama çözeltilisinin içerisinde 2 saat boyunca yavaş bir hızda çalkalanmıştır. Bu sürenin sonunda Bölüm (2.1.2.10)'deki formüle göre hazırlanmış jel yıkama çözeltisi ile jele zarar vermeden yıkanması sağlanmıştır. Bu işlem sonunda SDS-PAGE jelinde protein bantları gözlenmiştir [106, 108, 109].

### **2.3.10 *T. atroviride*'den Elde Edilip Saflaştırılan β-glukosidaz'ın Kinetik ve Biyokimyasal Karakterizasyonunun Saptanması**

#### **2.3.10.1 *T. atroviride*'den Elde Edilip Saflaştırılmış β-glukosidaz'ın Optimum pH Değerinin Saptanması**

Çeşitli pH'ların etkisini saptamak için saflaştırılan β-glukosidaz'ın aktivite ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Çeşitli pH'larda 25 mM C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>.3H<sub>2</sub>O tamponu (pH 2,0; pH 3,0; pH 4,0; pH 5,0), 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponu (pH 6,0; pH 7,0) ve 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH 8,0; pH 9,0) hazırlanmıştır. Bu tamponlar ile 0,005 M pNPG solüsyonları hazırlanmıştır. Aktivite ölçümlerini yapmak için örnek ve kontrol kuyucukları 96 kuyulu plakada hazırlanmıştır. Kontrol kuyularına, 70 µL saflaştırılan β-glukosidaz enzimi ve 70 µL çeşitli pH'larda hazırlanmış tamponlardan eklenmiştir. Örnek kuyularına, 70 µL saflaştırılmış β-glukosidaz enzimi ve 70 µL çeşitli pH'larda hazırlanmış pNPG çözeltileri ilave edilmiştir. Hazırlanan 96 kuyulu plaka 30 dk. süresince (37°C) inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda üzerine reaksiyon durdurucu olan 0,5 M Sodyum Karbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 70 µL ilave edilmiştir ve daha sonra 410 nm'de absorbans değerlerinin ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen absorbans değerlerinden β-glukosidaz aktiviteleri enzim ünitesi (EU) olarak belirlenmiştir [151, 152, 153].

#### **2.3.10.2 *T. atroviride*'den Saflaştırılmış β-glukosidaz'ın Optimum Sıcaklık Değerinin Saptanması**

β-glukosidaz'ın aktivite ölçümleri 96 kuyulu-plakada kontrol ve örnek kuyuları hazırlanarak gerçekleştirilmiştir. Kontrol kuyularına, 70 µL saflaştırılan β-glukosidaz ve 70 µL 50 mM

sodyum asetat trihidrat tamponu (pH 7) ilave edilmiştir. Örnek kuyularına ise, 70 µL saflaştırılmış β-glukosidaz ve 70 µL pNPG çözeltileri ilave edilmiştir. Aktivite ölçümlerini gerçekleştirmek için 96 kuyulu plakalar çeşitli sıcaklıklardaki (25°C, 35°C, 45°C, 55°C, 65°C, 75°C 85°C) inkübatörlerde 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda üzerine reaksiyon durdurucu olan 0,5 M sodyum karbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 70 µL ilave edilmiştir ve daha sonra 410 nm’de absorbans değerlerinin ölçülmesi sağlanmıştır. Elde edilen absorbans değerlerinden β-glukosidaz aktiviteleri enzim ünitesi (EU) olarak belirlenmiştir [151, 152, 153].

### **2.3.10.3 *T. atroviride*'den Elde Edilip Saflaştırılmış β-glukosidaz'ın Termal Kararlılığının Saptanması**

β-glukosidaz enzimi 45°C, 55°C, 65°C, 75°C ve 85°C sıcaklıklarda inkübe edilmiştir. Enzim sıcaklığa maruz kalmadan önce β-glukosidaz enzimi çözeltilisinden örnek alınıp aktivitesi ölçülmüştür ve bu aktivite değeri enzimin ilk aktivitesi olarak kabul edilmiştir. Enzimin termal kararlılığının tespit edilmesi için enzim 45°C, 55°C, 65°C ve 75°C sıcaklıklarda 120 dk. inkübe edilmiştir ve inkübasyon süresince 10 dakikada bir aktivite ölçümleri yapılmıştır. Enzimin 85°C’de sahip olduğu termal kararlılığının tespit edilmesi amacıyla 2 dk. aralıklar ile aktivitesi ölçülmüş ve enzim aktivitesini tamamen kaybedinceye kadar aktivite ölçümleri yapılmaya devam edilmiştir. Elde edilen absorbans değerlerinden β-glukosidaz aktiviteleri enzim ünitesi (EU) olarak belirlenmiş ve termal kararlılığı tespit edilmiştir [152, 153, 154].

### **2.3.10.4 *T. atroviride*'den Elde Edilip Saflaştırılan β-glukosidaz'ın K<sub>m</sub> ve V<sub>max</sub> Değerlerinin Saptanması**

Eşit miktarda β-glukosidaz enzimi ve 5-70 µL değişen pNPG substratının çeşitli konsantrasyonlarında 96 kuyulu plakada hazırlanmış ve aktivite ölçümleri yapılmıştır. Aktivite sonuçlarından, reaksiyon hızı [V] EU/mL olarak bulunmuştur. Reaksiyon hızından [V] faydalanılarak 1/[V] değeri ve reaksiyondaki substrat konsantrasyonlarından [S] faydalanılarak 1/[S] değerine ulaşılmıştır. Bu sonuçlardan Lineweaver-Burk grafiği oluşturulmuştur. Oluşturulan Lineweaver-Burk grafiğinin denkleminde yararlanılarak K<sub>m</sub> ile V<sub>max</sub> değerleri tespit edilmiştir. Bu grafiğin 1/V eksenini kestiği nokta olan 1/V<sub>max</sub> değerinden V<sub>max</sub> değeri, denklemin eğimi ise K<sub>m</sub>/V<sub>max</sub> değerine eşit olduğundan V<sub>max</sub> değeri yazılarak K<sub>m</sub> değeri bulunmuştur [151, 152, 153].

### **2.3.10.5 *T. atroviride*'den Elde Edilip Saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz'ın İnhibitörlerinin IC<sub>50</sub> Değerlerinin Saptanması**

$\beta$ -glukosidaz'ın aktivitesine inhibitörlerin etkisini belirlemek için D(+)-glukoz ve  $\delta$ -glukonolaktonun IC<sub>50</sub> değerleri belirlendi. 0,1 M D(+)-glukoz ve 0,001 M  $\delta$ -glukonolaktonun IC<sub>50</sub> değerlerini tespit etmek için *p*NPG substratının 1,25 mM konsantrasyonu kullanıldı. 0,1 M D(+)-glukoz ve 0,001 M  $\delta$ -glukonolaktonun bulunmadığı ortamdaki  $\beta$ -glukosidaz'ın aktivitesi % 100 olarak kabul edildi. 0,1 M D(+)-glukoz ve 0,001 M  $\delta$ -glukonolaktonun 1-60  $\mu$ L değişen inhibitörün çeşitli konsantrasyonlarında enzim aktivite ölçümleri yapıldı. Absorbans değerlerinden % aktivite değerleri bulunduktan sonra % aktivite-inhibitör konsantrasyonu grafikleri oluşturuldu. Oluşturulan grafiklerden yararlanarak  $\beta$ -glukosidaz'ın %50 oranında aktivitesini düşüren inhibitör konsantrasyonları (IC<sub>50</sub>) değerleri bulundu [149].

### **2.3.10.6 *T. atroviride*'den Elde Edilip Saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz'ın İnhibitörleri $\delta$ -glukonolakton ve D(+)-glukozun K<sub>i</sub> Değerlerinin Saptanması**

$\beta$ -glukosidaz'ın inhibitörleri 0,1 M D(+)-glukoz ve 0,0005 M  $\delta$ -glukonolaktonun K<sub>i</sub> değerleri ve inhibisyon tipleri belirlendi. K<sub>i</sub> değeri; genel inhibitörlerin bulunmadığı ortamda çeşitli (5-70  $\mu$ L) *p*NPG konsantrasyonlarında  $\beta$ -glukosidaz'ın aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerler [V] olarak kabul edildikten sonra 1/[V] değerleri belirlendi. 5-70  $\mu$ L *p*NPG substrat konsantrasyonları [S] olarak alındıktan sonra 1/[S] değerleri tespit edildi. Elde edilen değerler Lineweaver-Burk grafiği oluşturuldu ve daha sonra I<sub>0</sub> doğrusu çizildi. İki farklı sabit konsantrasyonda 0,1 M D(+)-glukoz ve 0,0005 M  $\delta$ -glukonolakton inhibitörlerinin bulunduğu çeşitli (5-70  $\mu$ L) *p*NPG konsantrasyonlarında  $\beta$ -glukosidaz'ın aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Elde edilen değerlerden 1/[V] ve farklı substrat konsantrasyonlarından 1/[S] değerleri bulundu. Bulunan değerlerden yararlanılarak Lineweaver-Burk grafiği oluşturuldu ve daha sonra I<sub>1</sub> ve I<sub>2</sub> doğruları çizildi.

K<sub>i</sub> değerleri ve inhibisyon tipleri Lineweaver-Burk grafiğinden tespit edildi. Lineweaver-Burk eğrisinde 1/[S] eksenini kestiği nokta olan  $-1/K_m(1+[I]/K_i)$  denklemi yarışmalı inhibisyonu, 1/[V] eksenini kestiği nokta olan  $1/V_{max}(1+[I]/K_i)$  denklemi yarışmasız inhibisyonu ve 1/[V] eksenini kestiği nokta olan  $1/V_{max}(1+[I]/K_i)$  denkleminde yarı yarışmalı inhibisyon tipi belirlendi. K<sub>i</sub> değerlerinin belirlenmesinde denklemlerdeki K<sub>m</sub> ve V<sub>max</sub> değerleri inhibitörlerin bulunmadığı ortamdaki değerlerdi [149, 155].



### 3. BULGULAR

#### 3.1 Patates Dekstroz Agar (%5 CMC) Besiyerinde Yetiştirilen Mikrofungusların $\beta$ -glukosidaz Aktivitesi Yönünden İncelenmesi

*Trichoderma atroviride* NRRL 25150'nin  $\beta$ -glukosidaz aktivite varlığının belirlenmesi için tek nokta yöntemiyle Karboksimetil Selüloz (%5 CMC) içeren PDA besiyerine inokülasyonu gerçekleştirildikten sonra 7 gün 25°C'de inkübasyonu sağlanmıştır. Bu sürenin sonunda *Trichoderma atroviride* kültürünün boyanma işlemi yapılarak şeffaf hidroliz zon oluşumunun belirlenmesi ile pozitif olarak değerlendirilerek çalışmalarda kullanılması kararlaştırılmıştır.

#### 3.2 Katı Substrat Fermentasyon Koşullarının *Trichoderma atroviride*'nin $\beta$ -glukosidaz Enzim Üretimine Etkisi

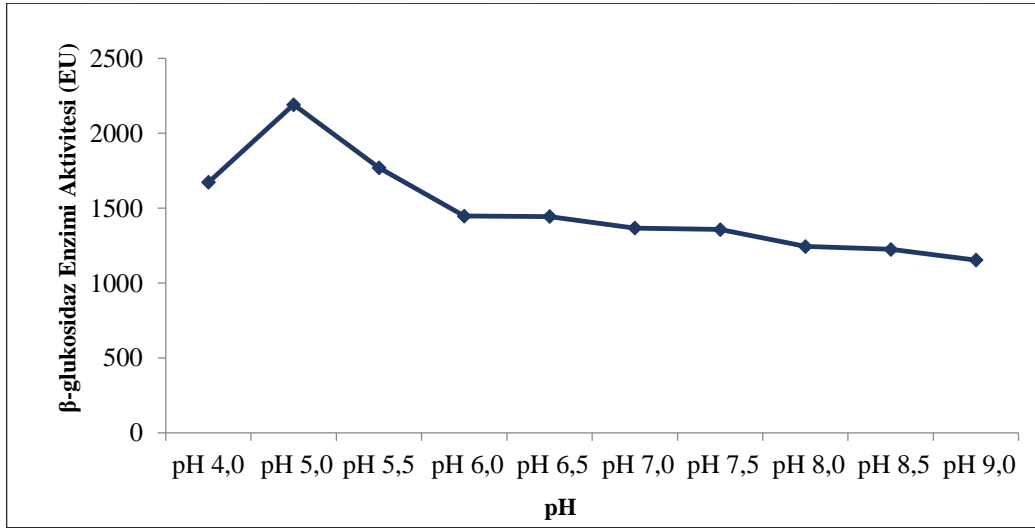
*Trichoderma atroviride*'nin öğütülmüş fasulye kabuğu ile KSF kültür koşullarında  $\beta$ -glukosidaz enzim elde edilmesi için optimum pH, nemlendirme sıvısı, optimum inkübasyon sıcaklığının ve süresi gibi değişkenler belirlenmiştir. Optimize edilen bu koşulların her biri sonraki aşamada sabit tutularak test mikrofungus yüksek aktivitede enzim ürettiği koşullarda geliştirilmiştir.

##### 3.2.1 KSF Ortamının Optimum pH ve Nemlendirme Sıvısının Saptanması

Katı substrat fermentasyonunda mikrofungusun geliştirilmesinde gerekli olan şartların etkisinin belirlenmesinde ilk olarak araştırılan parametreler nemlendirme sıvısı ve optimum pH'dır. Bu amaçla öğütülmüş fasulye kabuğu ile hazırlanan KSF ortamına 0,2 M 1,2,3-propantrikarboksilikasit tamponundan (pH 4; pH 5; pH 5,5); 0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 6; pH 6,5; pH 7; pH 7,5; pH 8) ve 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 8,5; pH 9,0) tamponlarından 2,75 mL ilave edilerek nemliliği %55'e ayarlanıp tamponlarından 2,75 mL ilave edilerek nemliliği %55'e ayarlanıp 121°C'de 20 dakika otoklavda sterilizasyonu yapılmıştır. Ardından Patates Dekstroz Broth besiyerinde geliştirilmiş olan *Trichoderma atroviride* kültüründen hazırlanan KSF ortamına 3 mL inoküle edilerek 7 gün (30°C) inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda en yüksek  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi pH=5 olan 0,2 M 1,2,3-propantrikarboksilikasit tamponu ile nemlendirilmiş KSF koşullarda ölçülmüştür.

**Tablo 3. 1:** Çeşitli pH'larda hazırlanan nemlendirme sıvılarının KSF ortam koşullarında *Trichoderma atroviride* 'den  $\beta$ -glukosidaz eldesine etkisi

Nemlendirme Sıvısı (pH )	$\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi (EU)
pH 4	1672,0867
<b>pH 5</b>	<b>2191,0569</b>
pH 5,5	1769,6476
pH 6	1447,1544
pH 6,5	1444,4444
pH 7	1367,2086
pH 7,5	1357,7235
pH 8	1243,9024
pH 8,5	1224,9322
pH 9	1153,1165



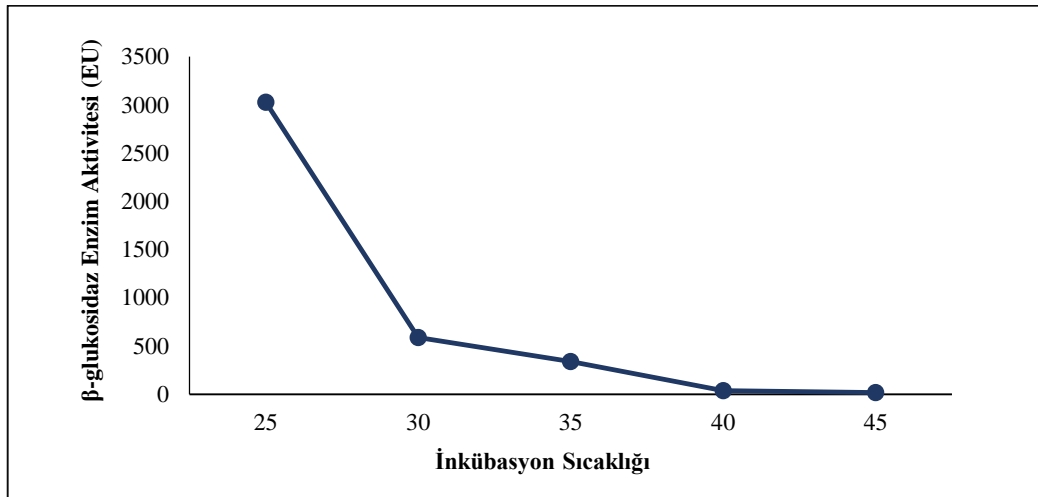
**Şekil 3. 1:** Çeşitli pH'larda hazırlanan nemlendirme sıvılarının KSF kültür koşullarında *Trichoderma atroviride* 'den  $\beta$ -glukosidaz eldesine etkisi

### 3.2.2 KSF Ortamının Optimum İnkübasyon Sıcaklığının Saptanması

Optimum inkübasyon sıcaklığının saptanması için KSF kültür ortamı daha önce optimize edilen pH ve nemlendirme sıvısı kullanılarak hazırlandı. Ardından Patates Dekstroz Broth besiyerinde geliştirilen *Trichoderma atroviride* sıvı kültüründen 3 mL ilave edilerek 25°C, 30 °C, 35°C, 40°C ve 45°C'deki inkübatörlerde 168 saat inkübe edildi. Süre sonlandığında  $\beta$ -glukosidaz enzimi üretimine sıcaklığın etkisini saptamak için enzim aktivitesi ölçümleri yapılarak *Trichoderma atroviride* için optimum inkübasyon sıcaklığı 25°C olarak saptandı.

**Tablo 3. 2:** Çeşitli inkübasyon sıcaklıkların KSF kültür ortamında *Trichoderma atroviride*'den  $\beta$ -glukosidaz enzim eldesine etkisi

İnkübasyon Sıcaklıkları (°C )	$\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi (EU)
25 °C	3029,81
30 °C	586,7209
35 °C	338,7534
40 °C	36,5853
45 °C	16,2601



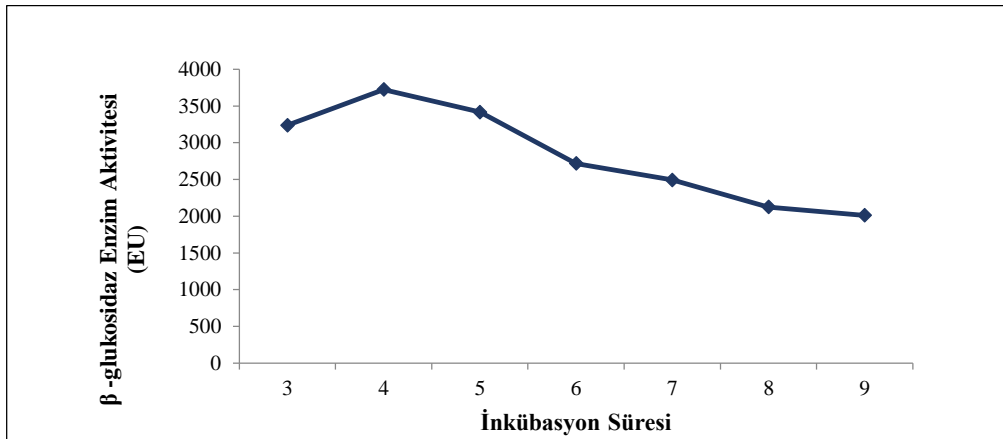
**Şekil 3. 2:** Çeşitli inkübasyon sıcaklıkların KSF kültür ortamında *Trichoderma atroviride*'den  $\beta$ -glukosidaz eldesine etkisi

### 3.2.3 KSF Ortamının Optimum İnkübasyon Süresinin Saptanması

Daha önceki basamaklarda saptanan pH'ı 5 olan 0,2 M sitrik asit monohidrat tamponu ile nemlendirilen KSF kültür ortamları otoklavda sterilize edildikten sonra Patates Dekstroz Broth besiyerinde geliştirilen *Trichoderma atroviride* sıvı kültüründen alınan 3 mL inokulum ile aşılanarak 25°C'de 3-9 gün süre ile geliştirilmiştir. Üçüncü günün sonundan itibaren saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin aktiviteleri ölçülmüş ve en yüksek aktivite 4. günde saptanmıştır.

**Tablo 3. 3:** Çeşitli inkübasyon sürelerinin KSF ortam şartlarında *Trichoderma atroviride*'den  $\beta$ -glukosidaz eldesine etkisi

İnkübasyon Süreleri (Gün)	$\beta$ - glukosidaz enzim aktivitesi(EU)
3.gün	3238,4823
<b>4.gün</b>	<b>3723,5772</b>
5.gün	3417,3441
6.gün	2716,8021
7.gün	2493,2249
8.gün	2124,6612
9.gün	2012,1951



**Şekil 3. 3:** Çeşitli inkübasyon sürelerinin KSF ortam şartlarında *Trichoderma atroviride*'den  $\beta$ -glukosidaz enzim eldesine etkisi

### **3.3 KSF Yöntemiyle Mikrofungusun Optimum Şartlarda Geliştirilmesi ve Kısmen Saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz Enzim Eldesi**

Öğütülmüş fasulye kabuklarıyla hazırlanan pH'ı 5 olan 0,2 M sitrik asit monohidrat tamponuyla %55 nem oranı ayarlananan KSF ortamı otoklavlanıp sterilize edilerek 3 mL *Trichoderma atroviride* NRRL 25150 sıvı kültürü ile inoküle edilerek 4 gün (25°C) inkübasyonu sağlanmıştır. Dördüncü günün sonunda, gelişen fungus kültürlerine 75 mL saf su eklenerek 150 rpm'de 120 dakika oda sıcaklığında çalkalamalı inkübatördeki inkübasyonu yapılmıştır. Ardından gazlı bez ile süzülükten sonra süzüntü 10 dakika 4°C'de ve 10000 rpm'de santrifüjlenip süpernatant kısmi saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz kaynağı olarak amonyum sülfat çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemleriyle saflaştırmaya tabi tutulmuştur.

### **3.4 *Trichoderma atroviride*'den Elde Edilen $\beta$ -glukosidaz'ın Saflaştırma Basamakları**

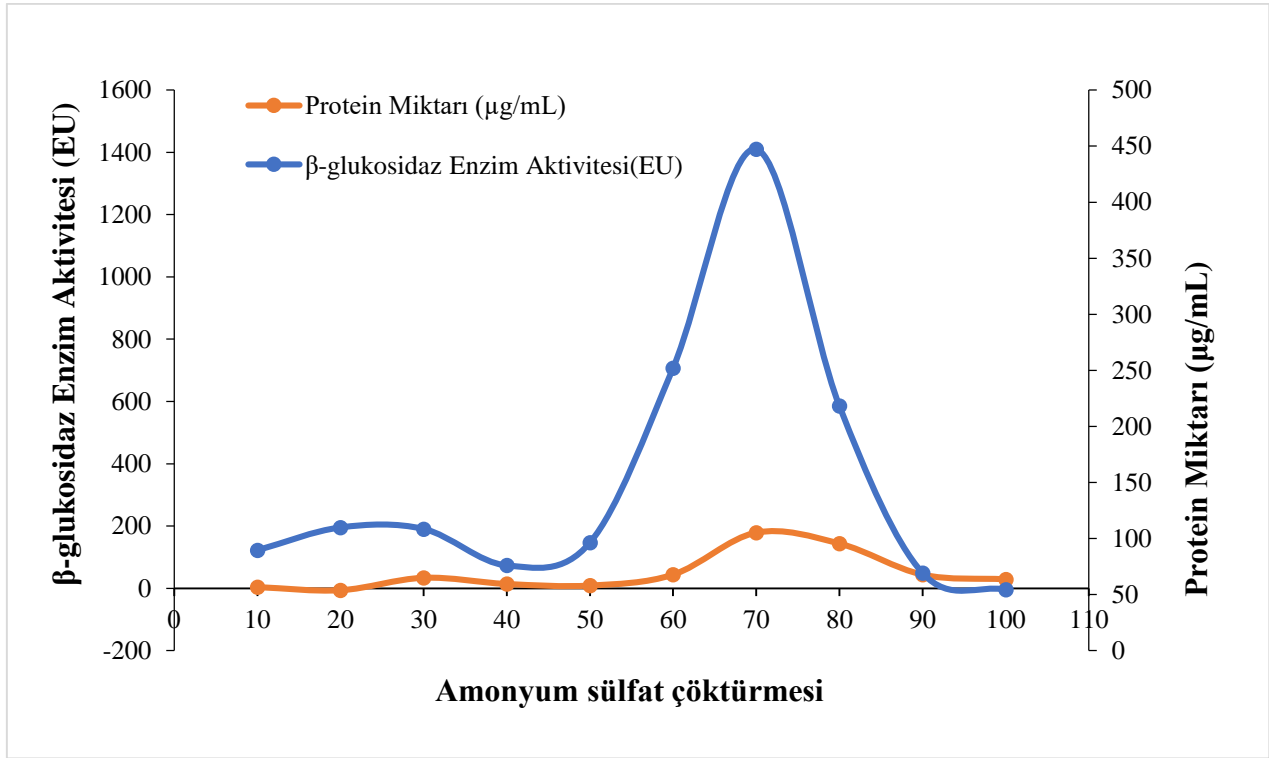
#### **3.4.1 Amonyum Sülfat Çöktürmesi**

*Trichoderma atroviride*'den elde edilen  $\beta$ -glukosidaz'ın saflaştırması için 10 farklı aralıkta amonyum sülfat çöktürmesi Tablo 3.4.1'de belirtilen değerlere göre yapılmıştır. Her bir aralık için  $\beta$ -glukosidaz aktivitesi (EU) 410 nm'de, protein miktarlarının (mg/mL) belirlenmesi için de Lowry yöntemi ile 600 nm'de ölçümler yapılmıştır.

**Tablo 3. 4:** Amonyum sülfat çöktürme aralıklarında *Trichoderma atroviride*'den kısmen saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin protein miktarları ve aktiviteleri

Aralık Değeri	Çöktürme Aralığı (%)	Hacim (mL)	Kullanılan Amonyum Sülfat Miktarı (g)	$\beta$ -glukosidaz Aktivitesi (EU)	Protein Miktarı ( $\mu$ g/mL)
1	0-10	10	0,514 g	89,4308	3,5
2	10-20	10	0,529 g	109,7561	6,5
3	20-30	10	0,546	108,4011	33,5
4	30-40	10	0,563	75,8807	13,5
5	40-50	10	0,582	96,2059	8,5
6	50-60	10	0,602	252,0325	43,5
7	60-70	10	0,623	447,1545	178,5
8	70-80	10	0,645	218,1572	143,5
9	80-90	10	0,670	69,1056	43,5
10	90-100	10	0,696	54,2005	28,5

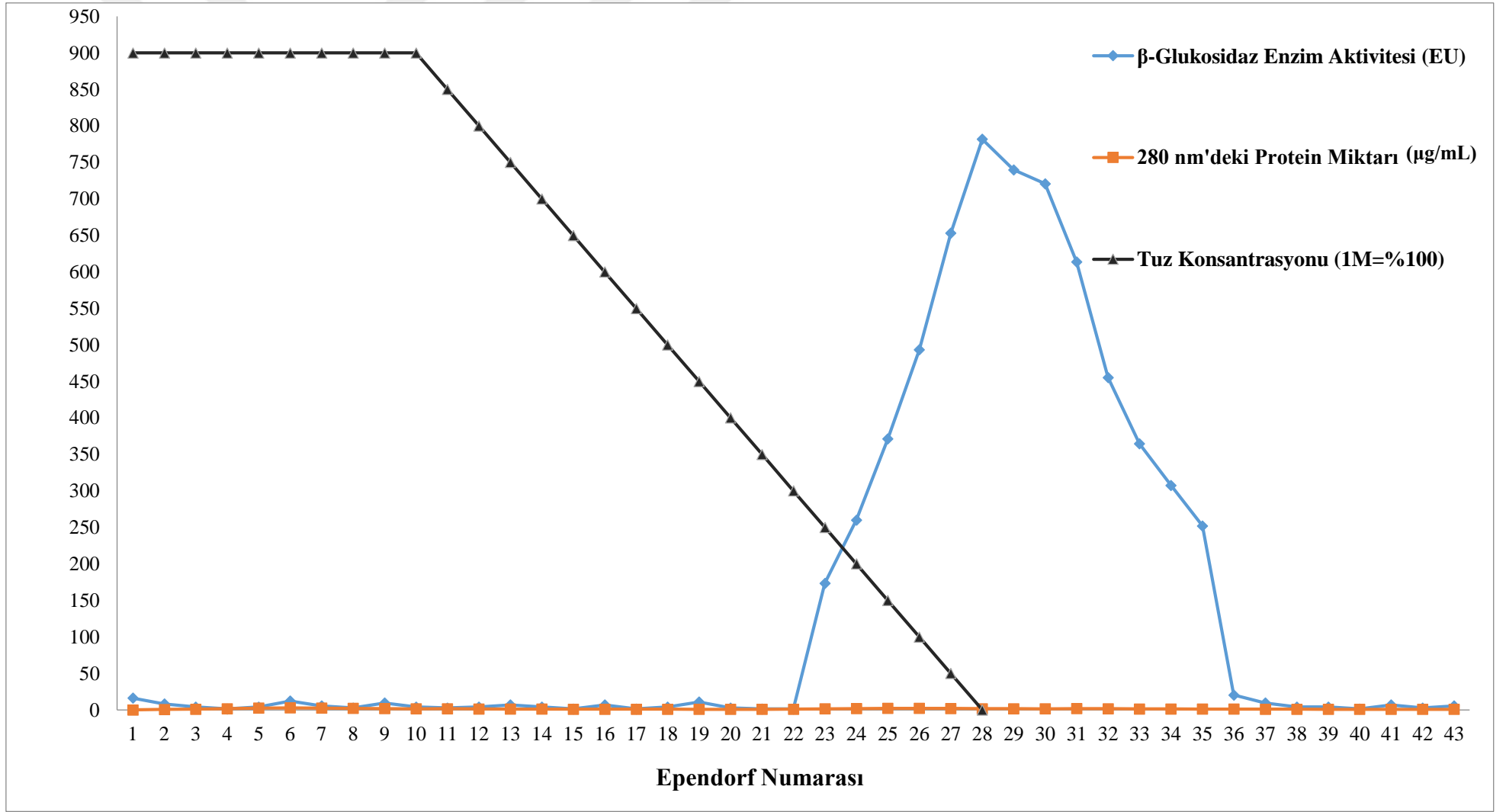
Amonyum sülfat çöktürme aralığının saptanması için elde edilen sonuçlardan  $\beta$ -glukosidaz enzimi protein miktarı ve aktivite grafiği oluşturulmuştur. Oluşturulan grafiğe (Şekil 3.4) göre ASÇ aralığı %50-90 olarak belirlenmiş ve HEK'te kullanılmak üzere %50-90 aralığında ASÇ yapılmıştır.



**Şekil 3. 4:** Amonyum sülfat çöktürme aralıklarında *Trichoderma atroviride*'den kısmen saflaştırılan β-glukosidaz enziminin protein miktarları ve aktiviteleri

### 3.4.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi

Amonyum sülfat çöktürmesi %50-90 aralığında yapılan *T. atroviride*'den elde edilen kısmi saflaştırılmış β-glukosidaz enziminin 3,5 mililitresi Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin jelini ihtiva eden kolona yüklenerek kolonda ilerleyen örnekler 2 mL'lik ependorflar içerisinde toplanmıştır. Hidrofobik etkileşim kromatografisinin sonlanmasından sonra ependorflardaki β-glukosidaz enzim aktiviteleri 410 nm'de ve Warburg Metodu ile protein analizleri 280 nm'de kalitatif olarak belirlenerek β-glukosidaz'ın elüsyon grafiği oluşturulmuştur (Şekil 3.5). Absorbans verilerinden aktivitenin en fazla olduğu ependorflar tespit edildikten sonra bu ependorflardan Lowry Metodu ile kantitatif olarak protein miktarı belirlenmiş ve bu verilerden faydalanılarak *T. atroviride*'den saflaştırılan β-glukosidaz enziminin saflaştırma tablosu yapılmıştır (Tablo 3.5).



Şekil 3. 5: HEK ile saflaştırılan *T. atroviride*'den saflaştırılan β-glukosidaz'ın elüsyon grafiği



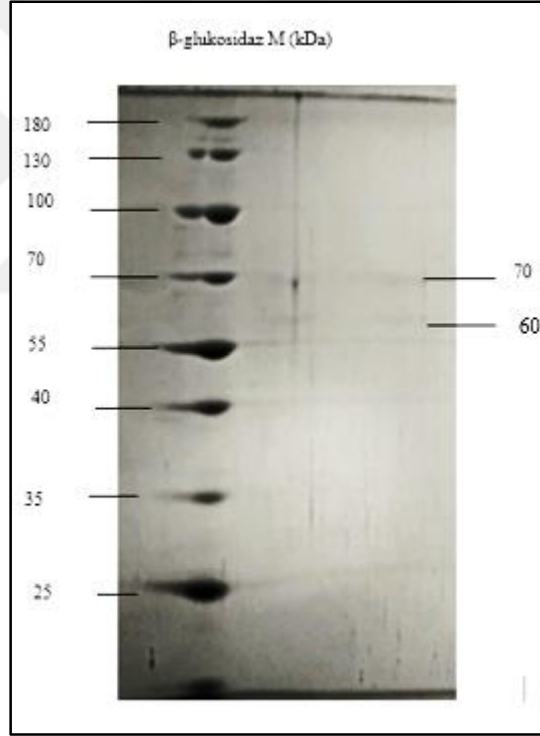
**Tablo 3. 5:** *T. atroviride*'den saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz'ın saflaştırma tablosu

<b>Saflaştırma Basamakları</b>	<b>Hacim (mL)</b>	<b>Aktivite (EU/mL)</b>	<b>Protein Miktarı (mg/mL)</b>	<b>Toplam Aktivite (EU/mL)</b>	<b>Toplam Protein (mg/mL)</b>	<b>Spesifik Aktivite (EU/mg)</b>	<b>%Verim</b>	<b>Saflaştırma Derecesi</b>
<b>Kısmi Saflaştırma</b>	10	1596,205	0,02535	15962,05	0,2535	62966,66	100	1
<b>Amonyum Sülfat Çöktürmesi (%50-90)</b>	4	1165,311	0,00385	4661,246	0,0154	302678,312	29,202	4,806
<b>Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi</b>	3,5	781,8428	0,00185	2736,4498	0,006475	422617,73	17,1434	6,7117

*Trichoderma atroviride*'den saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin saflaştırma tablosu (Tablo 3.5) verilerine göre Amonyum Sülfat Çöktürmesinin toplam aktivitesinin 4661,246 EU/mL ve toplam protein miktarının 0,0154 mg olduğu saptanmış ve %29,202 verim ile saflaştırılma derecesi 4,806 olarak hesaplanmıştır. HEK sonunda  $\beta$ -glukosidaz'ın toplam aktivitesi 2736,4498 EU/mL ve toplam protein miktarının 0,006475 mg olduğu belirlenerek %17,1434 verim ile saflaştırma derecesi 6,7117 olarak hesaplanmıştır.

**3.5 *T. atroviride*'den Elde Edilip Saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz'ın SDS-PAGE Elektroforez Yöntemi ile Homojenliğinin ve Alt Birimlerinin Sayısı/ Varlığının İncelenmesi**

SDS-PAGE elektroforez metodu ile saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz'ın homojenliğinin ve alt birimlerinin varlığı/sayısı incelenmiştir (Şekil 3.6).



**Şekil 3. 6:** *T. atroviride*'den saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin SDS-PAGE görüntüsü

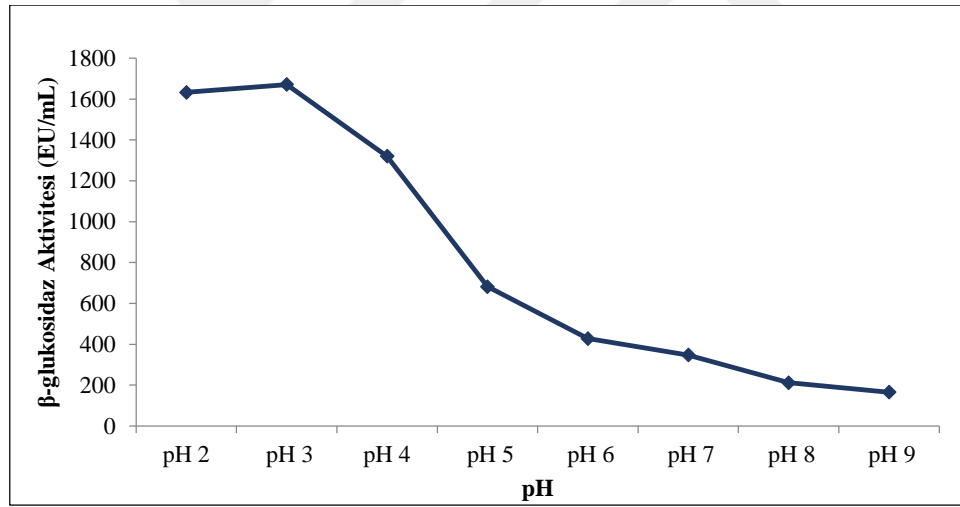
*T. atroviride*'den saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz'ın SDS-PAGE jel görüntüsü incelendiğinde 70 kDa ve 60 kDa moleküler ağırlığında iki bant gözlenmiştir.

### 3.6 *T. atroviride*'den Elde Edilip Saflaştırılan $\beta$ -glukosidazın Kinetik ve Biyokimyasal Karakterizasyonunun Saptanması

*T. atroviride*'den elde edilip amonyum sülfat çöktürmesi ve HEK ile saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz enziminin kinetik ve biyokimyasal karakterizasyonunun saptanması için optimum pH, optimum sıcaklık ve termal kararlılığı araştırılarak  $K_m$  ve  $V_{max}$ ,  $IC_{50}$  ve  $K_i$  değerleri saptanarak inhibisyon tipi belirlenmiştir.

#### 3.6.1 *T. atroviride*'den Saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz'ın Optimum pH Değerinin Saptanması

*T. atroviride*'den saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz'ın optimum pH'sının belirlenmesi için pH 2 ile pH 9 aralığında hazırlanan tampon çözeltiler ve bunlarla hazırlanan *p*NPG substrat çözeltileri ile  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitelerinin 410 nm'de ölçümleri yapılmıştır. Ölçülen aktivite değerlerine göre aktivite grafiği (Şekil 3.7) oluşturularak enzimin en yüksek aktivite gösterdiği pH değeri 3 olarak saptanmıştır.

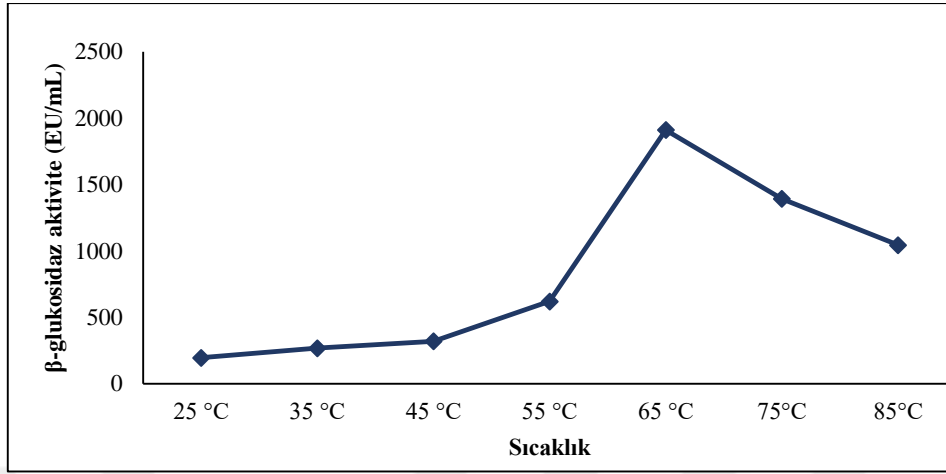


Şekil 3. 7: *Trichoderma atroviride*'den saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz'ın optimum aktivite gösterdiği pH grafiği

#### 3.6.2 *T. atroviride*'den Elde Edilip Saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz'ın Optimum Sıcaklık Değerinin Saptanması

*T. atroviride*'den saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz enziminin sodyum asetat tamponu ve bu tampon ile hazırlanan *p*NPG substrat çözeltileri ile hazırlanan 96 kuyucuklu plakada 25°C-85°C inkübe edildikten sonra  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitelerinin 410 nm'de ölçümleri

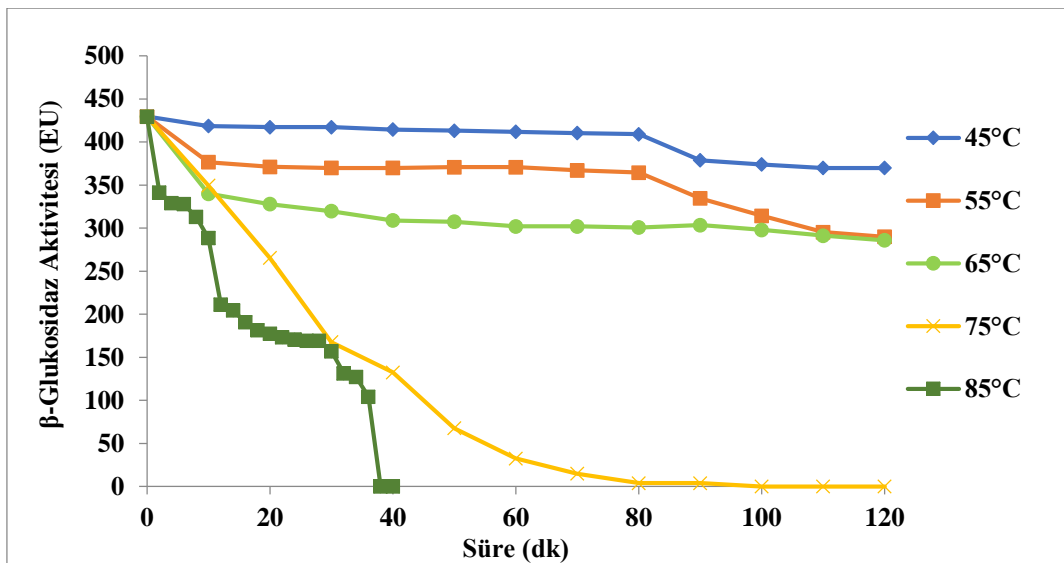
gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilere göre aktivite grafiği (Şekil 3.8) oluşturularak enzimin optimum sıcaklık değeri 65°C olarak saptanmıştır.



Şekil 3. 8: *Trichoderma atroviride*'den saflaştırılmış β-glukosidaz'ın optimum aktivite gösterdiği sıcaklık grafiği

### 3.6.3 *T. atroviride*'den Elde Edilip Saflaştırılan β-glukosidaz'ın Termal Kararlılığının Saptanması

Beş farklı (45°C, 55°C, 65°C, 75°C, 85°C) sıcaklık değerinde β-glukosidaz enzim bekletilip belirli aralıklarla β-glukosidaz aktivitesi ölçülmüş ve daha sonra elde edilen değerlerden β-glukosidaz'ın termal kararlılık grafiği oluşturulmuştur (Şekil 3.9).



Şekil 3. 9: *Trichoderma atroviride*'den saflaştırılmış β-glukosidaz'ın termal kararlılık grafiği

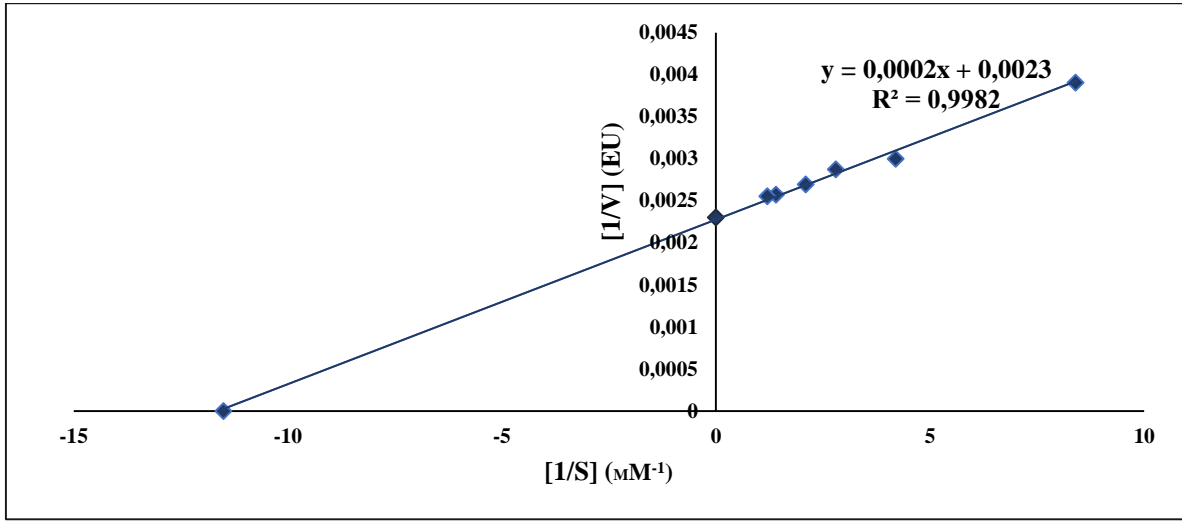
$\beta$ -glukosidaz enziminin beş farklı sıcaklığa ayarlanmış inkübatörlerde 120 dakika inkübasyonu neticesinde aktivite ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen aktivite ölçüm değerlerine göre 45°C'de %86.119, 55°C'de %67.507, 65°C'de %66.56, 75°C'de 90 dakikaya kadar aktivitesini koruduğu, 85°C'de ise 38 dakikaya kadar aktivitesini kaybetmediği belirlenmiştir.

#### **3.6.4 *Trichoderma atroviride*'den Saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz'ın $K_m$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Saptanması**

Saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz'ın *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopirenosit'e ilgisini gösteren  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplanmıştır. Enzim miktarı sabit tutularak *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopirenosit'in 5-70  $\mu$ L değişen konsantrasyonlarında  $\beta$ -glukosidaz aktiviteleri ölçülmüştür (Tablo 3.6). Elde edilen  $\beta$ -glukosidaz aktivitesi değerlerinden reaksiyon hızı [V] EU/mL olarak hesaplanmıştır.  $1/[V]$  değeri reaksiyonun hızından [V],  $1/[S]$  değeri ise reaksiyondaki substrat konsantrasyonlarından [S] elde edilmiştir. Elde edilen değerlerden faydalanılarak Lineweaver-Burk grafiği oluşturulmuştur (Şekil 3.10).

**Tablo 3. 6:** *T. atroviride*'den saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz'ın  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerinin saptanmasın kullanılan veriler.

50 mM Sodyum asetat tamponu ( $\mu$ L)	Saflaştırılmış Enzim Hacmi ( $\mu$ L)	<i>p</i> NPG Çözeltilisinin Hacmi ( $\mu$ L)	Toplam Hacim ( $\mu$ L)	Substrat Konsantrasyonu [S] mM	Absorbans Farkı $\Delta A$	$\beta$ -glukosidaz Enzim Aktivitesi (U/mL/dk.)	1/[V]	1/[S]
		5		0,119	0,189	256,0975	0,0039	8,403
		10		0,238	0,246	333,3333	0,003	4,201
		15		0,357	0,257	348,2384	0,0028	2,801
		20		0,476	0,274	371,2737	0,0026	2,1
		25		0,595	0,282	382,1138	0,0026	1,68
	70	30	210	0,714	0,287	388,8888	0,0025	1,40
		35		0,833	0,289	391,5989	0,0025	1,20
		40		0,952	0,271	367,2086	0,0027	1,050
		45		1,071	0,289	391,5989	0,0025	0,933
		50		1,190	0,296	401,0840	0,0024	0,840
		55		1,309	0,312	422,7642	0,0023	0,763
		60		1,428	0,327	443,0894	0,0022	0,700
		65		1,547	0,349	472,8997	0,0021	0,646
		70		1,666	0,358	485,0948	0,0020	0,600



Şekil 3. 10: *T. atroviride*'den saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz'ın  $K_m$  ve  $V_{max}$  Grafiği

Tablo 3. 7: *T. atroviride*'den saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz'ın  $K_m$ ,  $V_{max}$  ve  $V_{max}/K_m$  değerleri

Substrat	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (EU)	$V_{max}/K_m$
<i>p</i> NPG	0,0869	434,782	5003,245

### 3.6.5 *T. atroviride*'den Saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz Enziminin Genel İnhibitörlerinin $IC_{50}$ Değerlerinin Saptanması

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde  $\beta$ -glukosidaz'ın genel inhibitörleri olarak  $\delta$ -glukonolakton ve D(+)-glukoz ve karşımıza çıkmaktadır. Bundan dolayı enzimin genel inhibitörleri olarak  $\delta$ -glukonolakton ve D(+)-glukoz deneylerde kullanılmış ve bu inhibitörlerin  $\beta$ -glukosidaz enzimine olan etkileri araştırılmıştır.

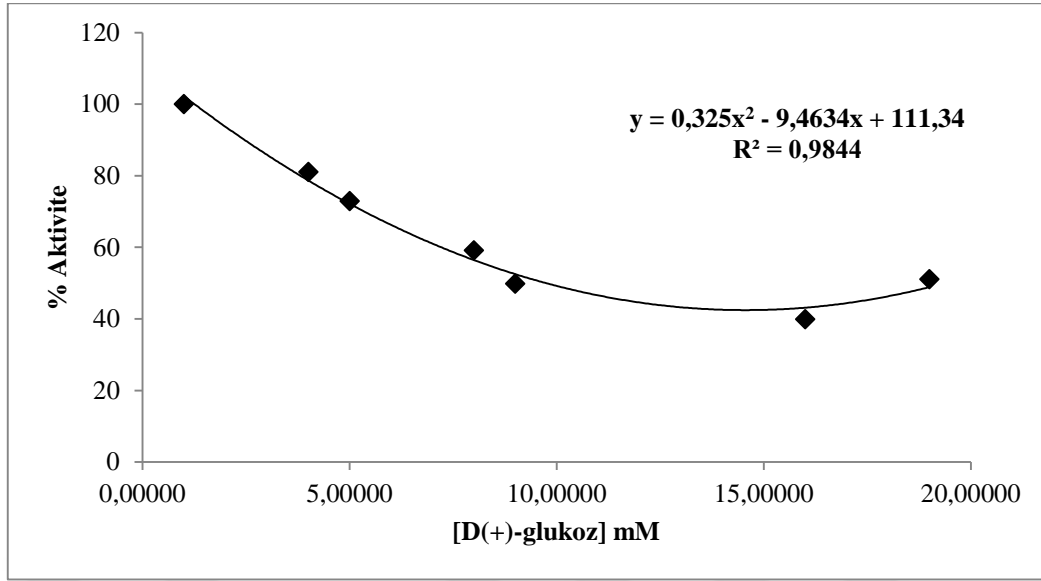
#### 3.6.5.1 *T. atroviride*'den Saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz Enziminin İnhibitörü D(+)-glukozun $IC_{50}$ Değerinin Saptanması

$\beta$ -glukosidaz enziminin aktivitesine D(+)-glukozun etkisi araştırılırken; *p*NPG konsantrasyonu reaksiyon hacminde 1,25 mM'dir. D(+)-glukoz olmadığı ortamdaki enzim aktivitesi %100 olarak kabul edilmiştir. 1-60  $\mu$ L arasında değişen D(+)-glukoz konsantrasyonlarında aktivite değerleri elde edilmiş ve bu verilerden faydalanılarak % aktivite- [I] grafiği oluşturularak  $IC_{50}$  değeri tespit edilmiştir.

**Tablo 3. 8:** *T. atroviride* 'den saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz inhibitörü 0,1 M D(+)-glukozun IC<sub>50</sub> değerinin tespit edilmesinde kullanılan solüsyon miktarları ve ulaşılan değerler

50 mM Sodyum asetat tamponu ( $\mu$ L)	Saflaştırılmış Enzim Hacmi ( $\mu$ L)	pNPG Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ L)	İnhibitör	Reaksiyon durdurucu Hacmi ( $\mu$ L)	İnhibitör Hacmi ( $\mu$ L)	İnhibitör Konsantrasyonu (mM)*10000	Absorbans Farkı $\Delta A$	$\beta$ -glukosidaz Aktivitesi (U/mL/dk.)	%Aktivite
60					-	-	0,311	421,409	100
59					1	0,4464	0,300	406,504	96,4630
59					1	0,8929	0,298	403,794	95,8199
59					1	1,7857	0,252	341,463	81,0289
59					1	3,5714	0,178	307,588	72,9166
57	70	70	D-(+)-glukoz	70	3	8,9286	0,280	302,168	71,7041
55					5	17,8571	0,308	288,618	68,4887
52					8	26,7857	0,184	249,322	59,1639
50					10	35,7143	0,155	210,027	49,8392
45					15	53,5714	0,236	319,783	75,8842
40					20	71,4286	0,231	313,008	74,2765
35					25	89,2857	0,236	319,783	75,8842
30					30	107,1429	0,197	266,938	63,3440
25					35	125,0000	0,165	223,577	53,0546
20					40	142,8571	0,200	271,003	64,3086
15					45	160,7143	0,124	168,022	39,8713
10					50	178,5714	0,024	32,520	7,71704
5					55	196,4286	0,126	170,732	40,5144
-					60	214,2857	0,159	215,447	51,1254





**Şekil 3. 11:** *T. atroviride*'den saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz'ın inhibitörü D(+)-glukozun  $IC_{50}$  değerinin grafiği

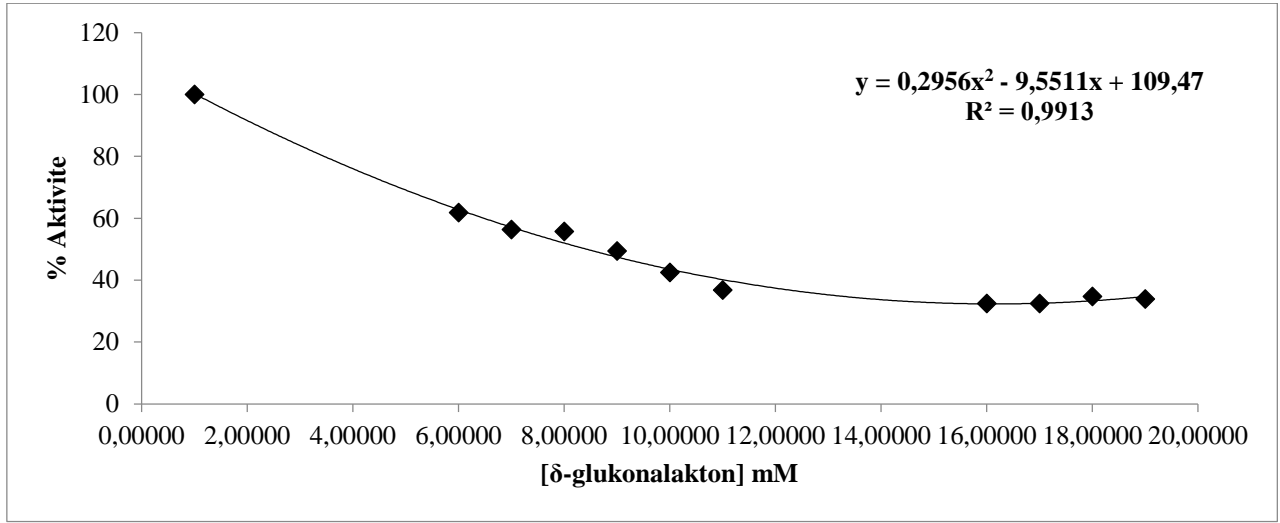
*p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopirenosit ve D(+)-glukozun bulunduğu ortamdaki % aktivite-[I] grafiği Şekil 3.11'de gösterilmiştir. Elde edilen grafikten faydalanılarak saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz'ın inhibitörü D(+)-glukoz için  $IC_{50}$  değeri 9,7395 mM olarak belirlenmiştir.

### 3.6.5.2 *T. atroviride*'den Saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz'ın İnhibitörü $\delta$ -glukonalaktonunu $IC_{50}$ Değerlerinin Saptanması

$\delta$ -glukonalaktonunu *Trichoderma atroviride*'den saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz aktivitesine etkisi araştırılırken; *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopirenosit'in reaksiyon hacmindeki konsantrasyonu 1,25 mM'dir. İnhibitör olmayan ortamdaki enzim aktivitesi %100 kabul edilmiştir. 1-60  $\mu$ L arasında değişen  $\delta$ -glukonalakton konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapılmıştır. Bu verilerden faydalanılarak % aktivite-[I] grafiği oluşturularak  $IC_{50}$  değeri belirlenmiştir.

**Tablo 3. 9:** *T. atroviride*'den saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin inhibitörü 0,001 M  $\delta$ -glukonalaktonun IC<sub>50</sub> değerinin belirlenmesinde kullanılan solüsyon miktarları ve ulaşılan değerler

50 mM Sodyum asetat tamponu ( $\mu$ L)	Saflaştırılmış Enzim Hacmi ( $\mu$ L)	pNPG Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ L)	Reaksiyon durdurucu ( $\mu$ L)	İnhibitör	İnhibitör Hacmi ( $\mu$ L)	İnhibitör Konsantrasyonu (mM)*10000	Absorbans Farkı $\Delta A$	$\beta$ -glukosidaz Enzim Aktivitesi (U/mL/dk.)	%Aktivite
60					-	-	0,348	471,545	100
59					1	0,4464	0,220	298,103	63,2183
59					1	0,8929	0,219	296,748	62,9310
59					1	1,7857	0,217	294,038	62,3563
59					1	3,5714	0,216	292,683	62,0689
57	70	70	80	$\delta$ -glukonalaktonun	3	8,9286	0,215	291,328	61,7816
55					5	17,8571	0,196	265,583	56,3218
52					8	26,7857	0,194	262,873	55,7471
50					10	35,7143	0,172	233,062	49,4252
45					15	53,5714	0,148	200,542	42,5287
40					20	71,4286	0,128	173,442	36,7816
35					25	89,2857	0,009	12,195	2,58620
30					30	107,1429	0,004	5,420	1,14942
25					35	125,0000	0,035	47,425	10,0574
20					40	142,8571	0,007	9,485	2,01149
15					45	160,7143	0,113	153,117	32,4712
10					50	178,5714	0,113	153,117	32,4712
5					55	196,4286	0,121	163,957	34,7701
-					60	214,2857	0,118	159,892	33,9080



**Şekil 3. 12:** *T. atroviride*'den saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz'ın inhibitörü  $\delta$ -glukonalaktonunu  $IC_{50}$  değerinin grafiği

$\delta$ -glukonalakton ve *p*NPG substratının bulunduğu ortamdaki %aktivite-[I] grafiği Şekil 3.12'de gösterilmiştir. Elde edilen grafikten faydalanılarak *T. atroviride*'den saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz'ın inhibitörü  $\delta$ -glukonalaktonun  $IC_{50}$  değeri 8,4214 mM olarak hesaplanmıştır.

### 3.6.6 *T. atroviride*'den Saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz'ın Genel İnhibitörlerinin $K_i$ Değerlerinin ve İnhibisyon Tiplerinin Saptanması

*T. atroviride*'den saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz'ın genel inhibitörleri 0,0005 M  $\delta$ -glukonalakton ve 0,1M D(+)-glukozun kullanılmasıyla enzimin  $K_i$  değerleri ve inhibisyon tipleri belirlenmiştir.

#### 3.6.6.1 *T. atroviride*'den Saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz Enziminin İnhibitörü D(+)-glukozun İnhibisyon Tipinin ve $K_i$ Değerinin Saptanması

*Trichoderma atroviride*'den saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz'ın inhibitörü D(+)-glukozun inhibisyon sabiti ( $K_i$ ) tespit edilirken, D(+)-glukozun içermeyen ve farklı *p*NPG konsantrasyonlarında enzimin aktivite ölçümleri yapılmıştır. Bu ölçümlere ek olarak D(+)-glukoz'un 1,7 mM ve 3,57 mM sabit konsantrasyonlarında ve çeşitli *p*-nitrofenil- $\beta$ -D -glukopirenosit konsantrasyonlarında  $\beta$ -glukosidaz enziminin aktiviteleri ölçülmüştür. Elde edilen verilerden  $1/[V]$  ve  $1/[S]$  değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafiğinde I1 ve I2 doğruları çizilmiştir. Daha sonra elde edilen grafikten faydalanılarak D(+)-glukozun  $K_i$  değeri ve inhibisyon tipi belirlenmiştir.

**Tablo 3. 10:** *T. atroviride* 'den saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz'ın inhibitörü D(+)-glukozun  $K_i$  değerinin ve inhibisyon tipinin saptanması için kullanılan solüsyon miktarları ve ulaşılan değerler

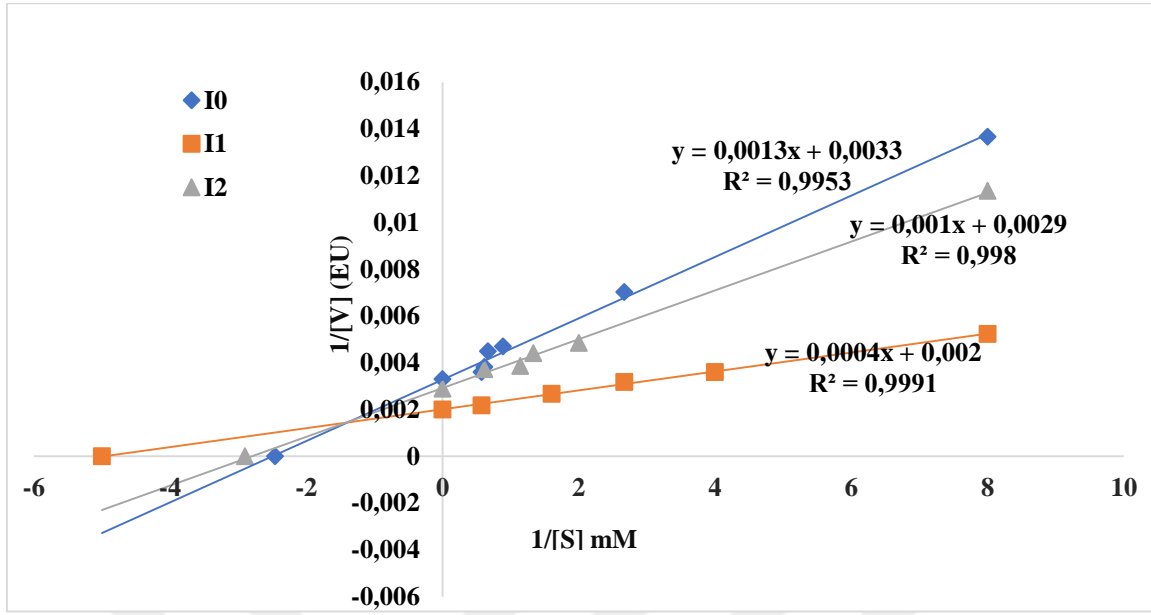
50 mM Sodyum asetat tamponu ( $\mu$ L)	Saflaştırılmış Enzim Hacmi ( $\mu$ L)	pNPG Çözeltilisinin Hacmi ( $\mu$ L)	Reaksiyon durdurucu ( $\mu$ L)	Toplam Hacmi ( $\mu$ L)	İnhibitör ( $\mu$ L)	Substrat Konsantrasyonu [S](mM)	İnhibitör Konsantrasyonu [I](mM)	Absorbans Farkı $\Delta A$	$\beta$ -glukosidaz Enzim Aktivitesi (U/mL/dk.)	1/[S]	1/[V]
125		5				0,125		0,054	73,1707	8	0,0136
120		10				0,25		0,06	81,3008	4	0,0123
115		15				0,375		0,105	142,2764	2,6666	0,0070
110		20				0,5		0,117	158,5365	2	0,0063
105		25				0,625		0,124	168,0216	1,6	0,0059
100		30				0,75		0,127	172,0867	1,3333	0,0058
95	70	35	80	280	0	0,875	0	0,133	180,2168	1,1428	0,0055
90		40				1		0,138	186,9918	1	0,0053
85		45				1,125		0,157	212,7371	0,8888	0,0047
80		50				1,25		0,097	131,4363	0,8	0,0076
75		55				1,375		0,178	241,1924	0,7272	0,0041
70		60				1,5		0,164	222,2222	0,6666	0,0045
65		65				1,625		0,193	261,5176	0,6153	0,0038
60		70				1,75		0,205	277,7777	0,5714	0,0036

**Tablo 3.10:** *T. atroviride*'den saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz'ın inhibitörü D(+)-glukozun  $K_i$  değerinin ve inhibisyon tipinin saptanması için kullanılan solüsyon miktarları ve ulaşılan değerler

50 mM Sodyum asetat tamponu ( $\mu$ L)	Saflaştırılmış Enzim Hacmi ( $\mu$ L)	pNPG Çözeltilisinin Hacmi ( $\mu$ L)	Reaksiyon durdurucu ( $\mu$ L)	Toplam Hacmi ( $\mu$ L)	İnhibitör ( $\mu$ L)	Substrat Konsantrasyonu [S](mM)	İnhibitör Konsantrasyonu [I](mM)	Absorbans Farkı $\Delta A$	$\beta$ -glukosidaz Enzim Aktivitesi (U/mL/dk.)	1/[S]	1/[V]
120		5				0,125		0,065	88,0758	8	0,0113
115		10				0,25		0,13	176,1517	4	0,0056
110		15				0,375		0,145	196,4769	2,6666	0,0050
105		20				0,5		0,152	205,9620	2	0,0048
100		25				0,625		0,098	132,7913	1,6	0,0075
95	70	30	80	280	5	0,75	1,7	0,167	226,2872	1,3333	0,0044
90		35				0,875		0,191	258,8075	1,1428	0,0038
85		40				1		0,117	158,5365	1	0,0063
80		45				1,125		0,134	181,5718	0,8888	0,0055
75		50				1,25		0,137	185,6368	0,8	0,0053
70		55				1,375		0,19	257,4525	0,7272	0,0038
65		60				1,5		0,182	246,6124	0,6666	0,0040
60		65				1,625		0,198	268,2926	0,6153	0,0037
55		70				1,75		0,139	188,3468	0,57142	0,0053

**Tablo 3.10:** *T. atroviride*'den saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz'ın inhibitörü D(+)-glukozun  $K_i$  değerinin ve inhibisyon tipinin saptanması için kullanılan solüsyon miktarları ve ulaşılan değerler

50 mM Sodyum asetat tamponu ( $\mu$ L)	Saflaştırılmış Enzim Hacmi ( $\mu$ L)	pNPG Çözeltilisinin Hacmi ( $\mu$ L)	Reaksiyon durdurucu ( $\mu$ L)	Toplam Hacmi ( $\mu$ L)	İnhibitör ( $\mu$ L)	Substrat Konsantrasyonu [S](mM)	İnhibitör Konsantrasyonu [I](mM)	Absorbans Farkı $\Delta A$	$\beta$ -glukosidaz Enzim Aktivitesi (U/mL/dk.)	1/[S]	1/[V]
115		5				0,125		0,065	88,0758	8	0,0113
110		10				0,25		0,13	176,1517	4	0,0056
105		15				0,375		0,145	196,476	2,6666	0,0050
100		20				0,5		0,152	205,9620	2	0,0048
95		25				0,625		0,098	132,7913	1,6	0,0075
90	70	30	80	280	10	0,75	3,57	0,167	226,2872	1,3333	0,0044
85		35				0,875		0,191	258,8075	1,1428	0,0038
80		40				1		0,117	158,536	1	0,0063
75		45				1,125		0,134	181,5718	0,8888	0,0055
70		50				1,25		0,137	185,6368	0,8	0,0053
65		55				1,375		0,19	257,4525	0,7272	0,0038
60		60				1,5		0,182	246,6124	0,6666	0,0040
55		65				1,625		0,198	268,2926	0,6153	0,0037
50		70				1,75		0,139	188,34688	0,5714	0,0053



**Şekil 3.13:** *T.atroviride*'den saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz'a farklı konsantrasyonlardaki D(+)-glukoz inhibisyon etkisi

Şekil 3.13'de gösterilen Lineweaver-Burk grafiğinden, *Trichoderma atroviride*'den saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz'ın D(+)-glukoz inhibitörü ve *p*NPG substratı bulunan ortamda, karışık inhibisyon tipi etki sergilediği saptanmıştır. D-(+)-glukozun [I1]= 1,7 mM ve [I2]= 3,57 mM konsantrasyonundaki aktivite değerlerinden faydalanılarak oluşturulan grafikten (Şekil 3.13)  $K_{i(1)}$ :  $4,31 \times 10^{-3}$  ve  $K_{i(2)}$ :  $29,45 \times 10^{-3}$  olarak tespit edilmiştir.

### 3.6.6.2 *T. atroviride*'den Saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz'ın İnhibitörü $\delta$ -glukonolaktonun $K_i$ Değerinin ve İnhibisyon Tipinin Saptanması

$\delta$ -glukonolaktonun inhibisyon sabiti ( $K_i$ ) tespit edilirken,  $\delta$ -glukonolakton'un bulunmadığı ortamda değişen *p*NPG konsantrasyonlarında enzimin aktivite ölçümleri yapılmıştır. Bu ölçümlere ek olarak  $\delta$ -glukonolakton'un 0,017 mM ve 0,0089 mM sabit konsantrasyonlarında ve *p*NPG çeşitli konsantrasyonlarında  $\beta$ -glukosidaz aktiviteleri ölçülmüştür.  $1/[V]$  ve  $1/[S]$  değerleri kullanılarak Lineweaver-Burk grafiğinde I1 ve I2 doğruları çizilmiştir. Çizilen doğrulardan karışık inhibisyon tipi gösterdiği belirlendikten sonra  $\delta$ -glukonolakton  $K_i$  değerleri tespit edilmiştir.

**Tablo 3. 11:** *T. atroviride*'den saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz'ın inhibitörü  $\delta$ -glukonolaktonun  $K_i$  değerinin ve inhibisyon tipinin saptanması için kullanılan solüsyon miktarları ve ulaşılan değerler

50 mM Sodyum asetat tamponu ( $\mu$ L)	Saflaştırılmış Enzim Hacmi ( $\mu$ L)	pNPG Solüsyonun Hacmi ( $\mu$ L)	Reaksiyon durdurucu ( $\mu$ L)	Toplam Hacmi ( $\mu$ L)	İnhibitör ( $\mu$ L)	Substrat Konsantrasyonu [S](mM)	İnhibitör Konsantrasyonu [I](mM)	Absorbans Farkı $\Delta A$	$\beta$ -glukosidaz Enzim Aktivitesi (U/mL/dk.)	1/[S]	1/[V]
125		5				0,125		0,054	73,1707	8	0,01366
120		10				0,25		0,06	81,3008	4	0,0123
115		15				0,375		0,105	142,2764	2,6666	0,00702
110		20				0,5		0,117	158,5365	2	0,0063
105		25				0,625		0,124	168,02168	1,6	0,0059
100		30				0,75		0,127	172,0867	1,3333	0,0058
95	70	35	80	280	0	0,875	0	0,133	180,2168	1,14285	0,0055
90		40				1		0,138	186,9918	1	0,0053
85		45				1,125		0,157	212,7371	0,8888	0,0047
80		50				1,25		0,097	131,4363	0,8	0,0076
75		55				1,375		0,178	241,1924	0,7272	0,0041
70		60				1,5		0,164	222,222	0,6666	0,0045
65		65				1,625		0,193	261,5176	0,6153	0,0038
60		70				1,75		0,205	277,7777	0,5714	0,0036

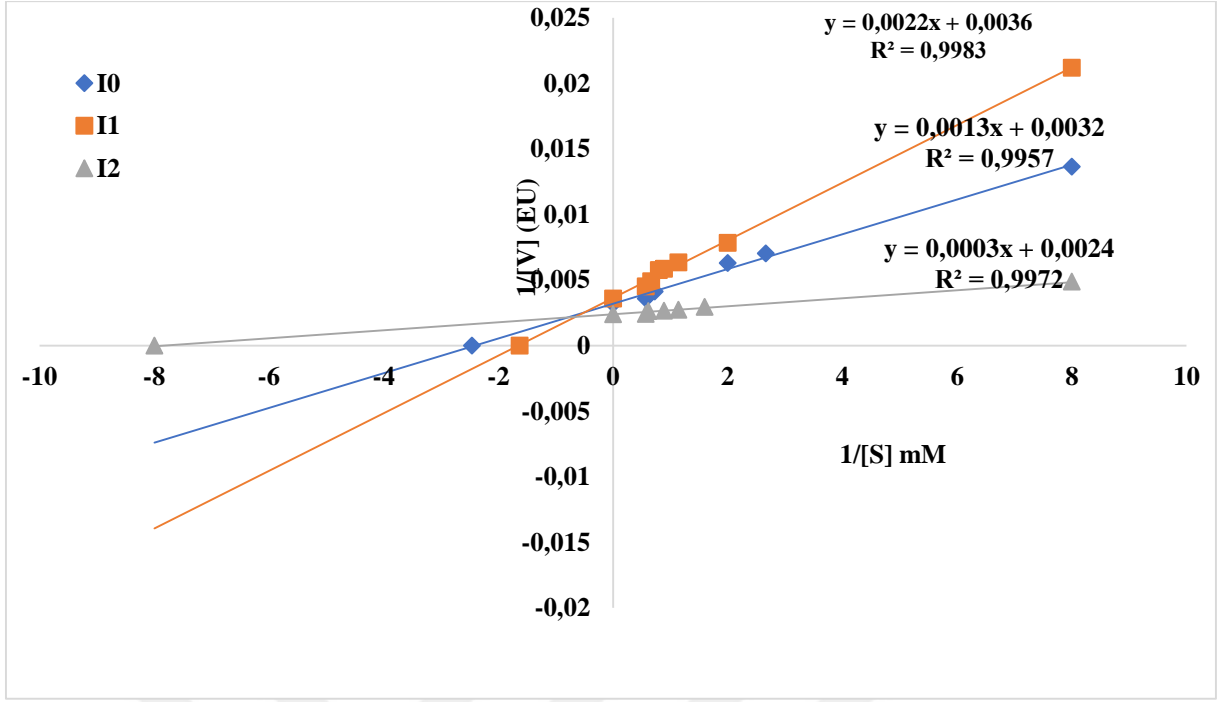


**Tablo 3.11:** *T. atroviride*'den saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz'ın inhibitörü  $\delta$ -glukonolaktonun  $K_i$  değerinin ve inhibisyon tipinin saptanması için kullanılan solüsyon miktarları ve ulaşılan değerler

50 mM Sodyum asetat tamponu ( $\mu$ L)	Saflaştırılmış Enzim Hacmi ( $\mu$ L)	pNPG Solüsyonun Hacmi ( $\mu$ L)	Reaksiyon durdurucu ( $\mu$ L)	Toplam Hacmi ( $\mu$ L)	İnhibitör ( $\mu$ L)	Substrat Konsantrasyonu [S](mM)	İnhibitör Konsantrasyonu [I](mM)	Absorbans Farkı $\Delta A$	$\beta$ -glukosidaz Enzim Aktivitesi (U/mL/dk.)	1/[S]	1/[V]
120		5				0,125		0,019	25,7452	8	0,0388
115		10				0,25		0,02	27,1002	4	0,0369
110		15				0,375		0,091	123,3062	2,6666	0,0081
100		20				0,5		0,094	127,3712	2	0,0078
100		25				0,625		0,133	180,2168	1,6	0,0055
95	70	30	80	280	5	0,75	0,0089	0,15	203,2520	1,3333	0,0049
90		35				0,875		0,116	157,1815	1,1428	0,0063
85		40				1		0,123	166,6666	1	0,006
80		45				1,125		0,126	170,7317	0,8888	0,0058
75		50				1,25		0,128	173,4417	0,8	0,0058
70		55				1,375		0,125	169,3766	0,7272	0,0059
65		60				1,5		0,15	203,2520	0,6666	0,0049
60		65				1,625		0,16	216,8021	0,6153	0,0046
55		70				1,75		0,163	220,8672	0,57142	0,0045

**Tablo 3.11:** *T. atroviride*'den saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz inhibitörü  $\delta$ -glukonolaktonun  $K_i$  değerinin ve inhibisyon tipinin saptanması için kullanılan solüsyon miktarları ve ulaşılan değerler

50 mM Sodyum asetat tamponu ( $\mu$ L)	Saflaştırılmış Enzim Hacmi ( $\mu$ L)	pNPG Solüsyonun Hacmi ( $\mu$ L)	Reaksiyon durdurucu ( $\mu$ L)	Toplam Hacmi ( $\mu$ L)	İnhibitör ( $\mu$ L)	Konsantrasyonu [S](mM)	İnhibitör Konsantrasyonu [I](mM)	Absorbans Farkı $\Delta A$	$\beta$ -glukosidaz Enzim Aktivitesi (U/mL/dk.)	1/[S]	1/[V]
115		5				0,125		0,151	204,6070	8	0,0048
110		10				0,25		0,18	243,9024	4	0,0041
105		15				0,375		0,185	250,6775	2,6666	0,0039
100		20				0,5		0,227	307,5880	2	0,0032
95		25				0,625		0,249	337,3983	1,6	0,0029
90	70	30	80	280	10	0,75	0,017	0,25	338,7533	1,3333	0,0029
85		35				0,875		0,269	364,4986	1,1428	0,0027
80		40				1		0,278	376,6937	1	0,0026
75		45				1,125		0,276	373,9837	0,8888	0,0026
70		50				1,25		0,265	359,0785	0,8	0,0027
65		55				1,375		0,267	361,7886	0,7272	0,0027
60		60				1,5		0,262	355,0135	0,6666	0,0028
55		65				1,625		0,278	376,6937	0,6153	0,0026
50		70				1,75		0,304	411,9241	0,5714	0,0024



**Şekil 3. 14:** *T. atroviride*'den saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz'ın farklı konsantrasyonlardaki  $\delta$ -glukonolaktonun inhibisyon etkisi

Şekil 3.14'de gösterilen Lineweaver-Burk grafiğinden, *T. atroviride*'den saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz'ının,  $\delta$ -glukonolakton inhibitörünün ve *p*NPG substratı bulunan ortamda karışık inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir.  $\delta$ -glukonolaktonun  $[I_1]=0,0089$  mM ve  $[I_2]=0,017$  mM konsantrasyonundaki aktivite değerlerinden faydalanılarak oluşturulan grafikten (Şekil 3.14)  $K_{i(1)}:0,0712 \times 10^{-3}$  ve  $K_{i(2)}: 0,068 \times 10^{-3}$  olarak tespit edilmiştir.

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Mikrobiyal kaynaklı enzimler son yıllarda endüstride sıklıkla kullanılmakta ve bu enzimlerin elde edilmesine yönelik araştırmalar önem kazanmaktadır. Çalışmamızda toprak, orman ve su gibi çeşitli ortamlarda yaygın olarak bulunan *Trichoderma* cinsine ait olarak *Trichoderma atroviride* NRRL 25150 substrat olarak da fasulye kabuğu kullanılarak KSF yöntemi ile  $\beta$ -glukosidaz enzimi elde edilmiştir.

Elde edilen  $\beta$ -glukosidaz enzimine amonyum sülfat çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi (HEK) metodları uygulanarak iki basamakta saflaştırma yapılmıştır. Saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz SDS-PAGE elektroforez metodu ile homojenliği ve alt birim sayısı/ varlığı belirlenmiştir. Saflaştırılan enzimin maksimum aktivite sergilediği sıcaklık, pH değeri ve termal kararlılığı da belirlenmiştir.  $\beta$ -glukosidaz'ın kinetik özellikleri olan  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri tespit edilmiştir. Buna ek olarak enzimin genel inhibitörleri  $\delta$ -glukonolakton ve D(+)-glukozun pNPG varlığında  $\beta$ -glukosidaz'a etkisi olan inhibisyon tipi tespit edilmiştir.

Çalışmada, PDA'da geliştirilen *Trichoderma atroviride*'nin  $\beta$ -glukosidaz enzimini üretip üretmediği araştırılmıştır. CMC (%5) içeren PDA besiyerine ekimi yapıp inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hidroliz zonunun görülmüştür ve *T. atroviride*'nin çalışmanın diğer aşamalarında  $\beta$ -glukosidaz kaynağı olarak kullanılmıştır. Shahriar ve ark. (2011), yaptıkları çalışmada *Aspergillus terreus* R4 izolatının CMC içeren besiyerinde hidroliz zonu oluşturduğunu bildirmişlerdir [156]. Mondal ve ark. (2020), yaptıkları çalışmada 18 fungus izolatından *Aspergillus fumigatus* SKF-2'nin selüloz ve nişasta içeren besiyerinde 1.1 cm'lik hidroliz zonu oluşturduğunu bildirmişlerdir [131]. Siva ve ark. (2022), CMC içeren besiyerinde *Aspergillus niger*'in hidroliz zonu oluşturduğunu rapor etmişlerdir [110]. Nasution ve ark. (2022)'da çalışmalarında *Oryctes rhinoceros* izolatlarının %1 CMC içeren besiyerinde en büyük hidroliz zonunu KO-15j izolatında gözlemlemişlerdir [157]. Bhati ve ark. (2023), *Aspergillus uvarum* izolatları ile yaptıkları çalışmada CMC içeren besiyerinde hidroliz zonu oluşturduklarını rapor etmişlerdir [111].

$\beta$ -glukosidaz elde edilmesinde KSF yönteminde kullanılacak mikroorganizma oldukça önem taşımaktadır. Bunun yanı sıra KSF metodunu etkileyen önemli parametreler de bulunmaktadır. Bu parametreler; katı substratın seçimi, nemlendirme sıvısı, pH ve inkübasyonun sıcaklığı ve süresi olarak karşımıza çıkmaktadır.

Çalışmamızda katı substrat olarak öğütülüp elenen fasulye kabuğu 80°C'de 24 saat boyunca kurutulup kullanılmıştır. KSF ortamında *Trichoderma atroviride*'nin geliştirilmesi ve enzimin üretmesindeki koşulların (nemlendirme sıvısı ve pH, inkübasyon süresi ve sıcaklığı) optimizasyonu sağlanmıştır.

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde KSF ortamında farklı substratlar tercih edilerek  $\beta$ -glukosidaz elde edildiği bildirilmiştir. Jeya ve ark. (2009), çalışmalarında katı substrat olarak pirinç samanı ve mısır sapı tozu kullanılarak *Penicillium purpurogenum* KJS506'dan  $\beta$ -glukosidaz elde etmişler ve optimum KSF şartlarını pH 4 ve inkübasyon sıcaklığı 32°C olduğunu bildirmişlerdir [158]. Bagewadi ve ark. (2018), substrat olarak tatlı sorgum küspesi, buğday kepeği, şeker kamışı küspesi, mısır koçanı, yer fıstığı kabukları, pirinç kepeği ve pirinç kabuğu kullanılması ile *Trichoderma harzianum* HZN1'dan  $\beta$ -glukosidaz enzimini elde etmişlerdir [159]. Bonfá ve ark. (2018), substrat olarak eşit hacimde şeker kamışı küspesi ve buğday kepeği kullanılarak *Myceliophthora thermophila* M.7.7'dan  $\beta$ -glukosidaz (BGL50) enzimini elde ettiklerini bildirmişlerdir [160]. Garcia ve ark. (2018), substrat olarak buğday samanı kullanarak *Lichtheimia ramosa*'dan  $\beta$ -glukosidaz elde etmişler ve KSF optimum koşulları % 65 nemlendirme oranı ve 35°C'de 96 saat olduğunu rapor etmişlerdir [161]. Martins ve ark. (2019), substrat olarak buğday kepeği kullanılarak *Thermomucor indicae-seudaticae*'dan  $\beta$ -glukosidaz elde etmişler ve enzimin en yüksek aktivite gösterdiği KSF koşullarını nemlendirme oranı %70, pH 5,5–6,0 ve inkübasyon sıcaklığı 40°C olduğunu bildirmişlerdir [162]. Ezeilo ve ark. (2019), hurma ağacının yapraklarını kullanarak *Trichoderma asperellum*'dan  $\beta$ -glukosidaz elde etmişler ve optimum KSF şartlarını pH 12, nemlendirme oranı %60, inkübasyon sıcaklığı 30°C ve süresini 4 gün olduğunu bildirmişlerdir [163]. Sugiwati ve ark. (2020), substrat olarak pirinç kabuğunun kullanılarak *Aspergillus niger*'den  $\beta$ -glukosidaz elde etmişler ve optimum KSF şartlarını pH 2, inkübasyon süresi 5 gün ve sıcaklığını 32°C olduğunu rapor etmişlerdir [136]. Kshirsagar ve ark. (2020), mısır samanını kullanarak

*Nocardiosis sp.*'dan  $\beta$ -glukosidaz elde etmişler ve optimum inkübasyon süresinin yedi gün olduğunu rapor etmişlerdir [164]. Albernaz ve ark. (2020), *Penicillium roqueforti* ATCC 10110'den  $\beta$ -glukosidaz enzimini *Nopalea cochenillifera*'yı substrat olarak kullanarak elde ettiklerini bildirmişlerdir [129]. Mondal ve ark., (2020), *Aspergillus fumigatus* SKF-2'dan  $\beta$ -glukosidaz eldesi için şeker kamışı küspesi, buğday kepeği ve portakal kabuğunu katı substrat olarak kullanmışlar ve KSF optimum koşullarını; pH 7 , inkübasyon sıcaklığı 30°C ve süresini beş gün olarak bildirmişlerdir [131]. Ezeilo ve ark. (2020), *Rhizopus oryzae*'den  $\beta$ -glukosidaz elde edilmesi için katı substrat olarak ham palmiye yağı yaprakları kullanmışlar ve KSF koşullarını; inkübasyon süresi ve sıcaklığını 6 gün, 30°C, nemlendirme oranı %40, pH 12 olarak bildirmişlerdir [165]. Legodi ve ark. (2023), substrat olarak muz yalancı kökünü kullanarak *Trichoderma longibrachiatum*, *T. harzianum* ve *Aspergillus fumigatus*,  $\beta$ -glukosidaz elde etmişlerdir ve optimum KSF koşullarını *Trichoderma longibrachiatum* için %75 nemlendirme oranı, 30°C ve 192 saat; *Aspergillus fumigatus* için %70 nemlendirme oranı, 40°C ve 72 saat; *T. harzianum* için %70 nemlendirme oranı, 40°C ve 144 saat olarak bildirmişlerdir [138]. Santos ve ark. (2021), yaptıkları çalışmada eşit hacimde buğday samanı ve mısır koçanını karıştırıp kullanarak *Penicillium sp.*'dan  $\beta$ -glukosidaz elde etmişlerdir. Sadece buğday samanının substrat olarak kullanıldığı KSF %60 nemlendirme oranında, 30°C'de 216 saatte  $\beta$ -glukosidaz'ın en yüksek aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir [166].

Çalışmamızda fasulye kabuğu katı subtrat olarak kullanılarak KSF metodu ile *Trichoderma atroviride*'nin en iyi  $\beta$ -glukosidaz üretimi için optimum gelişme şartları araştırılmış ve nemlendirme oranı %55, nemlendirme sıvısı sitrik asit monohidrat tamponu ve pH 5, inkübasyon sıcaklığı 25°C ve süresi 4 gün olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.1, Şekil 3.2, Şekil 3.3). Sonuçlarımızı literatürdeki verileri ile karşılaştırdığımızda; KSF yöntemiyle  $\beta$ -glukosidaz üretimi koşullarının mikrofungus ve substrata göre oldukça değişiklik gösterdiğini söyleyebiliriz.

Çalışmamızda *Trichoderma atroviride*'den kısmi saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz'ın ASÇ aralığı %50-90 olarak belirlenmiş ve ASÇ işlemi neticesinde verim ve saflaştırma katsayısı sırasıyla %29,202 ve 4,806 kat olarak belirlenmiştir (Tablo 3.5). Yapılan araştırmalara bakıldığında; Peshin ve Mathur (1999), %60-90 aralığında ASÇ *Aspergillus niger*'den

ürettikleri  $\beta$ -glukosidaz'a uyguladıklarını bildirmişlerdir [167]. Fadel ve ark. (2001), %20-40 aralığında ASC *Aspergillus niger*'den ürettikleri  $\beta$ -glukosidaz'a uyguladıklarını bildirmişlerdir [168]. Bonfá ve ark. (2018), *Myceliophthora thermophila*'den, Abdel-Sater ve ark. (2019), *Penicillium brevicompactum*'dan, Mondal ve ark. (2020), *Aspergillus fumigatus*'dan elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz enzimine %70 doygunlukta ASC yaptıklarını rapor etmişlerdir [131, 160, 169]. Watanabe ve ark. (2016), *Aspergillus oryzae*'den ürettikleri  $\beta$ -glukosidaz'a yapılan ASC sonunda verimi ve saflaştırma katsayısını sırasıyla %83 ve 32,2 kat olduğunu rapor etmişlerdir [170]. Bešić ve ark. (2016), *Brassica oleracea*'dan elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz ASC sonunda %8,37 verim ve 0,34 kat saflaştırdıklarını rapor etmişlerdir [171]. Narasimha ve ark. (2016), *Aspergillus niger*'den ürettikleri  $\beta$ -glukosidaz'a yapılan %90 doygunlukta ASC sonunda verimi ve saflaştırma katsayısını sırasıyla %63,1 ve 45,10 kat olduğunu bildirmişlerdir [172]. Costa ve ark. (2018), *Penicillium citrinum*'den saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaza yapılan %50 ASC sonucunda verimi ve saflaştırma katsayısını sırasıyla %77 ve 2 kat olduğunu bildirmişlerdir [173]. Karnchanat ve ark. (2007), *Daldinia eschscholzii*'den elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz enziminin % 31,83 verim ile 5,32 kat olduğunu rapor etmişlerdir [174]. Huang ve ark. (2021), *Aspergillus versicolor*'den elde ettikleri  $\beta$ -glukosidazı ASC sonunda %54,79 verimle ve 5,41 kat saflaştırdıklarını bildirmişlerdir [175].

Çalışmamızda gerçekleştirdiğimiz ASC bulguları literatürdeki verilerle kıyaslandığında; enzim saflaştırma katsayısı ve verimi benzerliğinin az olduğu gözlenmiştir. Bunun sebebi kullanılan mikrofungusun, gerçekleştirilen ASC aralığının ve katı substrat fermentasyonu koşullarındaki farklılıktan kaynaklanabileceği ifade edebiliriz.

Çalışmamızda *Trichoderma atroviride*'den üretilen  $\beta$ -glukosidaz enziminin ASC metodu ile ön saflaştırması yapıldıktan sonra HEK metodu ile enzim saflaştırılmıştır. HEK metodunda, Sepharose-4B-L-Tirozin-1-Naftilamin jeli aracılığıyla *T. atroviride*'den saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz enziminin verimi ve saflaştırma katsayısı sırasıyla % 17,1434 ve 6,7117 kat olarak belirlenmiştir (Tablo 3.5). Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, Bešić ve ark. (2016), HEK ile *Brassica oleracea*'dan saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz enziminin verimi ve saflaştırma katsayısı sırasıyla %4,13 ve 6,9 kat olduğunu rapor etmişlerdir [171]. Huang ve ark. (2021), HEK ile *Aspergillus versicolor*'den saflaştırılan  $\beta$ -

glukosidaz verimi ve saflaştırma katsayısı sırasıyla %49,77 ve 6,23 kat olduğunu rapor etmişlerdir [175].

Diğer kromatografi yöntemleri ile saflaştırmanın yapıldığı çalışmalarda ise; Qin ve ark. (2020), *Fusarium chlamyosporum*'dan Sephacryl S-200 High Resolution jel filtasyon kromatografisi ile  $\beta$ -glukosidaz enzimlerini (BG FH1, BG FH2) sırasıyla %4 verim ile 14 kat ve %20 verim ile 28,8 kat saflaştırdıklarını rapor etmişlerdir [176]. Peshin ve Mathur (1999), *Aspergillus niger*'den jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin saflaştırma katsayısı ve verimi sırasıyla 6 kat ve %33; Singhvi ve Zinjarde (2020), *Penicillium janthinellum* NCIM 1171'dan QAE Sephadex A-50 kromatografisi ile  $\beta$ -glukosidaz enzimini %58 verim ile 8,16 kat, Sephacryl-200 kolon ile %39,5 verim ile 44,4 kat; Mondal ve ark. (2020), *Aspergillus fumigatus*'dan elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz'ın saflaştırma katsayısı ve verimi sırasıyla 3,65 kat ve % 83,35 olduğunu bildirmişlerdir. [131, 139, 167].

Yapılan çalışmalar incelendiğinde *T. atroviride*'den  $\beta$ -glukosidaz enziminin saflaştırılmasını içeren çalışma gözlenmemiştir. Ayrıca *T. atroviride*'den  $\beta$ -glukosidaz enziminin saflaştırma verileri diğer çalışmalar ile benzerlik göstermemektedir. Enzim verimi ve saflaştırma katsayılarındaki bu farklılığın; mikroorganizma, kullanılan katı substrat, KSF ortam şartları, yapılan ASÇ aralığı ve tercih edilen kromatografi metodundan kaynaklanabileceği söylenebilir.

Çalışmamızda *T. atroviride*'den saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz'ın 70 kDa ve 60 kDa moleküler ağırlıkta iki alt birime sahip olduğu SDS-PAGE yöntemi ile belirlenmiştir (Şekil 3.6). Yapılan literatür çalışmalarında, El-Ghonemy, (2021) yaptığı çalışmada *Aspergillus sp.* DHE7'dan saflaştırdığı  $\beta$ -glukosidaz enziminin monomerik yapıda ve SDS-PAGE yöntemi ile 135 kDa moleküler ağırlığına sahip olduğunu bildirmiştir [177]. Peshin ve Mathur (1999), *Aspergillus niger* 322'den elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz enziminin SDS-PAGE ile moleküler ağırlığını 64 kDa; Parry ve ark. (2001), *Thermoascus aurantiacus*'den elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz'ın SDS-PAGE ile moleküler ağırlığını 120 kDa; Jeya ve ark. (2009), *Penicillium purpurogenum* KJS506'dan elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz'ın SDS-PAGE ile moleküler ağırlığını 110 kDa; He ve ark. (2013), *Aspergillus oryzae* HML366'den elde ettikleri BGHG1 ve BGHG2 enzimlerinin SDS-PAGE ile moleküler ağırlıklarını sırasıyla



93 kDa ve 138 kDa; Asha ve ark. (2016), *Aspergillus ochraceus* MTCC 1810'dan elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz'ın SDS-PAGE ile moleküler ağırlığını 43 kDa; Florindo ve ark. (2018), *Trichoderma harzianum*'dan saflaştırdıkları ThBgl1 and ThBgl2'in enzimlerinin SDS-PAGE ile moleküler ağırlıklarını sırasıyla 53 kDa ve 55 kDa; Bonfá ve ark. (2018), *Myceliophthora thermophila* M.7.7'den elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz'ın (BGL50) SDS-PAGE ile moleküler ağırlığını 50 kDa; Santa-Rosa ve ark. (2018), *Penicillium* sp. LMI01'dan elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz'ın SDS-PAGE ile moleküler ağırlığını 70-100 kDa aralığında; Jong ve ark. (2018), *Aspergillus* sp. YDJ1'den saflaştırdıkları BGL-A1, BGL-A2 ve BGL-A3 enzimlerinin moleküler ağırlıklarını SDS-PAGE ile sırasıyla 100, 45 ve 40 kDa; Mondal ve ark. (2020), *Aspergillus fumigatus* SKF-2'dan elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz enziminin moleküler ağırlığını SDS-PAGE ile 70 kDa; Qin ve ark. (2020), *Fusarium chlamydosporum*'dan HML278 elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz'ın SDS-PAGE ile moleküler ağırlıklarının BG FH1 için 93 kDa, BG FH2 için 52 kDa; Singhvi ve Zinjarde (2020), *Penicillium janthinellum* NCIM 1171'dan elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz enziminin moleküler ağırlığını SDS-PAGE ile monomer yapıda ve 100 kDa olduğunu rapor etmişlerdir [131, 139, 158, 160, 167, 176, 178, 179, 180, 181, 182, 183]. Cao ve ark. (2015), yaptıkları çalışmada *Aspergillus fumigatus* WL002'den saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz'ın NATIVE-PAGE ile moleküler ağırlığını 100 kDa; Su ve ark. (2020), yaptıkları çalışmada *Kluyveromyces marxianus*'dan saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz'ın NATIVE-PAGE ile moleküler ağırlığını 66 kDa olduğunu bildirmişlerdir [184, 185].

Çalışmamızda *T. atroviride*'den saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz'ın en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık ve pH değeri sırasıyla pH 3,0 ve 65°C olarak belirlenmiştir (Şekil 3.7, Şekil 3.8). Literatür incelendiğinde; Peshin ve Mathur (1999), *Aspergillus niger* 322'den elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz'ın en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık ve pH değerlerinin sırasıyla 50°C ve pH 5,5 olduğunu bildirmişlerdir [167]. Fadel ve ark. (2001), yaptıkları araştırmada *Aspergillus niger*'den elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz'ın optimum sıcaklık ve pH değerlerinin sırasıyla 65°C ve pH 4,5; Jeya ve ark. (2009), *Penicillium purpurogenum* KJS506'dan elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz'ın optimum sıcaklık ve pH değerlerinin sırasıyla 65°C ve pH 5,0; He ve ark. (2013), *Aspergillus oryzae* HML366'den saflaştırdıkları BGHG1 ve BGHG2 enzimlerinin optimum sıcaklık değerlerinin sırasıyla 50°C ve 55°C, optimum pH değeri her iki enzim için pH 5,0; Bonfá ve ark. (2018), *Myceliophthora thermophila* M.7.7'den saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz (BGL50) enziminin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık ve

pH değerlerinin sırasıyla 60°C ve pH 5,0; Jong ve ark. (2018), *Aspergillus sp.* YDJ1'den saflaştırdıkları BGL-A1, BGL-A2 ve BGL-A3 enzimlerinin optimum sıcaklık ve pH değerlerinin BGL-A1, BGL-A2 için 60°C ve pH 4,0; BGL-A3 için 50°C ve pH 5,0; Nanjundaswamy ve Okeke (2020), *Trichoderma sp.* SG2'den saflaştırdıkları β-glukosidaz enziminin optimum sıcaklık ve pH değerlerinin sırasıyla 70°C ve pH 5,0; Santa-Rosa ve ark. (2018), *Penicillium sp.* LMI01'dan saflaştırdıkları β-glukosidaz enziminin optimum sıcaklık ve pH değerlerinin sırasıyla pH 6,0 ve 60°C; Abdel-Sater ve ark. (2019), *Penicillium brevicompactum* AUMC 10987'dan elde ettikleri β-glukosidaz'ın en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık ve pH değerlerinin 50°C ve pH 4,8; Ezeilo ve ark. (2019), *Trichoderma asperellum* UC1'dan saflaştırdıkları β-glukosidaz enziminin optimum sıcaklık ve pH değerlerinin sırasıyla 60°C ve pH 4,0; Infanzón-Rodríguez ve ark. (2020), *Fusarium verticillioides* ITV03'den saflaştırdıkları β-glukosidaz enziminin optimum sıcaklık ve pH değerlerinin sırasıyla 60°C ve pH 5,0; Sulyman ve ark. (2020), *Aspergillus niger*'den elde ettikleri β-glukosidaz'ın optimum sıcaklık ve pH değerlerinin sırasıyla 40°C ve pH 4,0-5,0; Mondal ve ark. (2020), *Aspergillus fumigatus* SKF-2'dan elde ettikleri β-glukosidaz'ın en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık ve pH değerlerinin sırasıyla 30°C ve pH 7,0; Garbin ve ark. (2021), *Thermoascus crustaceus*'den elde ettikleri β-glukosidaz'ın en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık ve pH değerleri sırasıyla 65°C ve pH 4,5; Alex ve ark. (2022), *Aspergillus niger* 3T5B8'den elde ettikleri β-glukosidaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık ve pH değerlerinin sırasıyla 52.8°C ve pH 4,8; Singh ve ark. (2022), *Sporotrichum thermophile*'den elde ettikleri β-glukosidaz'ın optimum sıcaklık ve pH değerlerinin 60°C ve pH 5,0; Bhati ve ark. (2023), *Aspergillus uvarum* CBS 121591'den saflaştırdıkları selülaz enziminin optimum sıcaklık ve pH değerlerinin sırasıyla 60°C ve pH 7,0 olduğunu rapor etmişlerdir [111, 131, 137, 153, 158, 160, 163, 168, 169, 174, 179, 182, 183, 186, 187, 188, 189].

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde çeşitli mikroorganizmalardan saflaştırılmış β-glukosidaz'ın optimum pH değerleri 4,0-7,0 aralığında, sıcaklık değerlerinin ise 50-70°C aralığında olduğu belirlenmiştir. Bu verilere bakıldığında enzimin elde edileceği mikroorganizma, kullanılan saflaştırma metodlarındaki ve çalışma şartlarındaki farklılığın enzimin biyokimyasal parametrelerini etkilediği düşünülmektedir.

Çalışmamızda *T. atroviride*'den saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz enziminin termal kararlılığı araştırılmıştır. *T. atroviride*'den saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz'ın 120 dakika inkübasyonu sonucunda; 45°C'de %86,119 oranında, 55°C'de %67,507 oranında, 65°C'de %66,56 oranında, 75°C'de 90 dakikaya kadar aktivitesini kaybetmediği, 85°C'de ise 38 dakikaya kadar aktivitesini kaybetmediği belirlenmiştir (Şekil 3.9).

Parry ve ark. (2001), *Thermoascus aurantiacus*'dan elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz'ın 70°C'de 48 saat aktivitesini kaybetmediği ve 90°C'de ilk aktivitesinin %70'ini koruduğunu bildirmişlerdir [178]. Garcia ve ark. (2018), *Lichtheimia ramosa*'dan saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz enziminin 55°C'de 60 dakika inkübasyon sonunda enzimin ilk aktivitesinin %95'ini koruduğunu rapor etmişlerdir [161]. Jessica ve ark. (2018), *Trichoderma atroviride* 102C1'den saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz enziminin 60°C'de 30 dakika boyunca inkübasyonu sonucunda ilk aktivitesinin %50'sini koruduğunu, 50°C'de 30 dakika boyunca inkübasyonu sonucunda ilk aktivitesinin %65'ini koruduğunu rapor etmişlerdir [190]. Martins ve ark. (2019), *Thermomucor indicae-seudaticae*'den saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz enziminin 50°C'de 60 dakika inkübasyonu sonunda ilk aktivitesini koruduğu, 55°C'de 60 dakika inkübasyonu sonunda ilk aktivitesinin % 93'ünü ve 60°C'de 60 dakika inkübasyonu sonunda ilk aktivitesini %83,7'ini koruduğunu rapor etmişlerdir [162]. Mondal ve ark. (2020), *Aspergillus fumigatus* SKF-2'dan elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz enziminin termal kararlılığı 30°C, 60°C'de 1saat inkübasyon sonunda aktivitesinin %50'sini koruduğunu bildirmişlerdir [131]. Ezeilo ve ark. (2020), *Rhizopus oryzae* UC2 (MF767597)'den saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz enziminin 70°C'deki inkübasyonu sonucunda ilk aktivitesinin %94'nü korurken, 80°C'de inkübasyonu sonucunda ilk aktivitesinin %51'ini koruduğunu bildirmişlerdir [165]. Albernaz ve ark. (2020), *Penicillium roqueforti* ATCC 10110'den saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz enzimini 52°C'de 120 dk. inkübasyon sonunda ilk aktivitesinin %50'sini koruduğunu, 62°C'de 60 dk. inkübasyonu sonunda ilk aktivitesinin %50'sini koruduğunu bildirmişlerdir [129]. Singhvi ve Zinjarde (2020), *Penicillium janthinellum* NCIM 1171'dan saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz'ın 50°C'de 7 saat inkübasyon boyunca aktivitesini koruduğu, 60°C'de 7 saatte inkübasyon sonunda ilk aktivitesinin %60'ını koruduğu, 70°C'de 7 saatte inkübasyon sonucunda ilk aktivitesinin %20'ini koruduğunu rapor etmişlerdir [139]. Ratuchne ve Knob (2021), *Aspergillus fumigatus*'dan saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz enziminin 75°C'de 1 saat inkübe edilmesi sonucunda ilk aktivitesini koruduğu, 80°C 1 saat inkübe edilmesi

sonucunda ilk aktivitesinin %30'unu kaybettiğini, 85°C'deki inkübasyon sırasında aktivitesinde devamlı azalma gözlendiğini rapor etmişlerdir [191].

Çalışmamızda *T. atroviride*'den saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz'ın kinetik parametreleri araştırılmıştır.  $\beta$ -glukosidaz'ın *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranosite (*p*NPG) ilgisini gösteren  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri belirlenmiştir. Saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz'ın *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranosit için  $K_m$  değeri 0,0869 mM ve  $V_{max}$  değeri 434,782 EU olarak hesaplanmıştır. Ayrıca enzimin katalitik etkinliğinin ölçüsü olan  $V_{max}/K_m$  oranı ise 5003,245 olarak tespit edilmiştir (Tablo 3.7). Enzimlerin kinetik parametrelerinin tespit edilmesinde  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri önemli faktörlerdir.  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerinin tespit edilmesinde, *p*NPG farklı konsantrasyonları ile enzimin aktiviteleri ölçülmüştür. Elde edilen aktivite ölçümlerinden faydalanılarak Lineweaver-Burk grafiği oluşturulmuş ve bu grafiğin denklemi kullanılarak  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri belirlenmiştir. Enzimin konsantrasyonu sabit olduğunda, substrat konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen en yüksek hız noktasını  $V_{max}$  değeri, elde edilen  $V_{max}$  değerinin yarısının bulunduğu noktadaki substrat konsantrasyonu ise  $K_m$  değerini göstermektedir. Yapılan çalışmalarda ise; El-Ghonemy, (2021) yaptığı çalışmada *Aspergillus sp.* DHE7'dan saflaştırdığı  $\beta$ -glukosidaz enziminin  $K_m$  değerini 0,4 mM olarak bildirmiştir [177]. Peshin ve Mathur (1999), *Aspergillus niger* 322'den elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz'ın selobiyoz için  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 0,1 mmol/L ve 83,3 IU/mg; Parry ve ark. (2001), *Thermoascus aurantiacus*'dan elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz'ın *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukosid için  $K_m$  değerini 0,1137 mM; Jeya ve ark. (2009), *Penicillium purpurogenum* KJS506'dan elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz'ın  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerini 5,1 mM ve 934 U/mg; He ve ark.(2013), *Aspergillus oryzae* HML366'den saflaştırdıkları BGHG1 ve BGHG2 enzimlerinin *p*NPG için  $K_m$  değerleri sırasıyla 1,52 mM ve 1,25 mM;  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 336  $\mu$ mol/dkmg ve 638  $\mu$ mol/dkmg; Florindo ve ark. (2018), *Trichoderma harzianum*'dan saflaştırdıkları ThBgl1 ve ThBgl2'in 25 mM *p*NPG için  $K_m$  değerleri sırasıyla 0,9 mM ve 3,4 mM; Jong ve ark. (2018), *Aspergillus sp.* YDJ1'den saflaştırdıkları BGL-A1, BGL-A2 ve BGL-A3 enzimlerinin *p*NPG için  $K_m$  değerleri sırasıyla 0,25 mM, 0,27 mM ve 1,26 mM; Jong ve ark. (2018), *Aspergillus sp.* YDJ1'den saflaştırdıkları BGL-A1, BGL-A2 ve BGL-A3 enzimlerinin  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 131,0 U/ mg, 101,1 U/mg ve 213,5 U/mg; Garcia ve ark. (2018), *Lichtheimia ramosa*'dan saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz enzimini 25 mM glukozaya karşı  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 1,77 mM ve 35,0  $\mu$ ol/dk; Mondal ve ark. (2020),

*Aspergillus fumigatus* SKF-2'dan elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz'ın *p*NPG için  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerini sırasıyla; 16,27 mg/mL ve 371,47  $\mu$ mol/dk/mg; Qin ve ark. (2020), *Fusarium chlamyosporum* HML278 elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz'ın *p*NPG için  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerini sırasıyla 2,76 mg/mL ve 20,6 U/mg; Singhvi ve Zinjarde (2020), *Penicillium janthinellum* NCIM 1171'dan elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz'ın *p*-NPG için  $K_m$  değeri 0,5 mM ve  $V_{max}$  1001  $\mu$ mol/dk/mg; Singh ve ark. (2022), *Sporotrichum thermophile*'den elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz'ın *p*NPG için  $K_m$  değeri 0,285 mM ve  $V_{max}$  değeri 66,67 mmol/dk olduğunu bildirmişlerdir [131, 139, 158, 161, 167, 176, 179, 183, 189].

Çalışmamızda *T. atroviride*'den saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz'ın *p*NPG ilgisini belirlemek için hesaplanan  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri, diğer çalışmalarla benzerlik göstermemektedir. Çalışmamızda hesaplanan  $K_m$  değeri diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında çoğunlukla daha düşük,  $V_{max}$  değerinin ise daha fazla olduğu gözlenmektedir. Enzimin  $K_m$  değerinin düşük olması *p*NPG'ye ilgisinin daha yüksek olduğunu,  $V_{max}$  değerinin fazla olması  $\beta$ -glukosidaz'ın *p*NPG daha hızlı katalize ettiğini belirtmektedir. Diğer araştırmalarla elde ettiğimiz değerler kıyaslandığında, çalışmamızdaki  $\beta$ -glukosidaz enziminin farklı endüstrilerde kullanılabilmesinin daha avantajlı olduğunu ifade edebiliriz.

Çalışmamızda *T. atroviride*'den saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz'ın genel inhibitörü D(+)-glukozun ve *p*NPG substratının bulunduğu ortamda enzimin aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu olan  $IC_{50}$  değeri ve enzim aktivitesini etkileyen inhibisyon tipi tespit edilerek  $K_i$  değerleri bulunmuştur. *T. atroviride*'den saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz'ın genel inhibitörü D(+)-glukoz için  $IC_{50}$  değeri 9,7395 mM (Tablo 3.8, Şekil 3.11) ve  $K_i(1):4,31 \times 10^{-3}$  ve  $K_i(2): 29,45 \times 10^{-3}$  (Tablo 3.10, Şekil 3.13) bulunarak karışık inhibisyon sergilediği belirlenmiştir. Lin ve ark. (1999), *Thermomyces lanuginosus*'den elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz'ın *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranosit ve glukoz bulunan ortamdaki  $K_i$  değeri 0,55 mM olarak belirledikten sonra enzime karşı glukozun yarışmalı inhibisyon tipi gösterdiğini; Parry ve ark. (2001), *Thermoascus aurantiacus*'dan elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz enziminin glukoz için  $K_i$  değeri 0,29 mM olarak belirledikten sonra enzime karşı glukozun yarışmalı inhibisyon tipi gösterdiğini; Karnchanatat ve ark. (2007), *Daldinia eschscholzii*'den saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz'ın *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranosit ve glukoz bulunan ortamdaki  $K_i$  değeri 0,79 mM olarak belirledikten sonra enzime karşı

glukozun yarışmalı inhibisyon tipi gösterdiğini; Bhiri ve ark. (2008), *Penicillium occitanis*'den elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz'ın *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranosit ve glukoz bulunan ortamdaki  $K_i$  değeri 1 mM olarak belirledikten sonra enzime karşı glukozun yarışmalı inhibisyon tipi gösterdiğini; Korotkova ve ark. (2009), *Aspergillus japonicus*  $\beta$ -glukosidaz'ının *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranosit ve glukoz inhibitörü bulunan ortamdaki  $K_i$  değeri 2,73 mM olarak belirlendikten sonra enzime karşı glukozun yarışmalı inhibisyon tipi sergilediğini; Choi ve ark. (2011), yaptıkları çalışmada *Phoma* sp. KCTC11825BP'den elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz'ın glukoz ve *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranosit bulunan ortamdaki  $K_i$  değeri 1,7 mM olarak belirledikten sonra enzime karşı glukozun yarışmalı inhibisyon tipi gösterdiğini; Park ve ark. (2012), yaptıkları çalışmada *Penicillium italicum*'dan elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz'ın *p*NP-Glu ve glukoz inhibitörü bulunan ortamdaki  $K_i$  değeri 8,9 mM olarak belirledikten sonra enzime karşı glukozun yarışmasız inhibisyon tipi sergilediğini; Ramani ve ark. (2012), yaptıkları çalışmada *Penicillium funiculosum* NCL1'dan saflaştırdıkları Bgl3A'nın *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranosit ve glukoz bulunan ortamdaki  $K_i$  değeri 1,5 mM olarak belirledikten sonra enzime karşı glukozun yarışmalı inhibisyon tipi gösterdiğini; Ašić ve ark. (2015), *Agaricus bisporus*'dan saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz enziminin *p*NPG ve glukoz inhibitörü bulunan ortamdaki  $IC_{50}$  ve  $K_i$  değerlerini sırasıyla 19,185 mM ve 9,402 mM olarak belirleyerek enzimin glukoz inhibitörüne karşı kompetitif inhibisyon sergilediğini; Guo ve ark. (2016), *Trichoderma reesei* yabani tip CellA enziminin *p*NPG ve glukoz inhibitörü bulunan ortamdaki  $IC_{50}$  ve  $K_i$  değerlerini sırasıyla 50 mM ve 50 mM belirleyerek enzimin glukoz inhibitörüne karşı kompetitif inhibisyon gösterdiğini; Andrade ve ark. (2017), yaptıkları araştırmada *Chrysosporthe cubensis* 'den elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz'ın *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranosit ve glukoz bulunan ortamdaki  $K_i$  değeri 8,43 mM olarak belirledikten sonra enzime karşı glukozun yarışmalı inhibisyon tipi gösterdiğini; Bonfá ve ark. (2018), *Myceliophthora thermophila* M.7.7'den saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz'ın *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranosit ve glukoz bulunan ortamdaki  $K_i$  değeri 1,5 mM olarak belirledikten sonra enzime karşı glukozun yarışmalı inhibisyon tipi sergilediğini; Liu ve ark. (2019), saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz enziminin (Bgl1317) glukozu karşı  $IC_{50}$  değeri 0,8 M olduğunu; Huang ve ark. (2021), *Aspergillus versicolor*'dan saflaştırdıkları serbest ve immobilize edilmiş  $\beta$ -glukosidaz *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranosit ve glukoz inhibitörü bulunan ortamdaki  $K_i$  değerlerini sırasıyla 200 mM ve 300 mM olarak enzimin glukoz inhibitörüne karşı kompetitif inhibisyon gösterdiğini; Job ve ark. (2022), yaptıkları araştırmada *Paecilomyces variotii* MG3'den elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz izoenzim I'in *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranosit ve

glukoz bulunan ortamdaki  $K_i$  değerini 901,6 mM olduğunu bildirmişlerdir [149, 160, 174, 175, 178, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201]. Singh ve ark. (2023), *Neofusicoccum Parvum* F7'den elde ettikleri Bgl1, Bgl2 ve Bgl3 enzimlerinin *p*NPG substratı ve glukoz bulunan ortamdaki  $IC_{50}$  değerlerini sırasıyla 119,2 mM, 2,6 mM, 22,6 mM ve 319,5 mM olduğunu bildirmişlerdir [202].

Karışık inhibisyonda substrat ve inhibitör birlikte enzime bağlanabilmektedir. Fakat inhibitörün veya substratın enzime bağlanmasında iki molekülde birbirini etkilemektedir. Bu inhibisyon tipinde, substratın konsantrasyonu artırılarak inhibisyon azaltılabilir ancak inhibisyon tamamen engellenememektedir. Karışık inhibisyonda inhibitör madde enzimin aktif bölgesine bağlanmasının yanı sıra allosterik etkiyle birlikte enzimin farklı bir bölgesine de bağlanabilmektedir. Enzimin allosterik bölgesine bağlanan inhibitör enzimin üç boyutlu yapısını bozarak substratın aktif bölge ile etkileşimini engelleyebilmektedir. Bu açıklamalar dikkate alındığında D(+)-glukozun ve *p*NPG substratının bulunduğu ortamda *T. atroviride*'den saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimine D(+)-glukozun ve *p*NPG substratının birlikte bağlanabileceği söylenebilir. Yarışmalı inhibisyonda inhibitör molekül substrat ile benzer özellik gösterir ve böylece inhibitör ve substrat enzimin aktif bölgesine bağlanmak için yarışmaktadır. Bunun sonucunda inhibitör ve substrat birlikte enzime bağlanamamaktadır. Ancak, substratın konsantrasyonu artırılarak inhibisyon azaltılabilmektedir. Buna göre D(+)-glukozun ve *p*NPG substratının bulunduğu ortamda *T. atroviride*'den saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz enzimine D(+)-glukozun ve *p*NPG substratının bağlanmak için yarış halinde oldukları söylenebilir.

Çalışmamızda *T. atroviride*'den saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz'ın genel inhibitörü  $\delta$ -glukonolakton ve *p*NPG substratının bulunduğu ortamda enzimin aktivitesini yarıl原因an inhibitör konsantrasyonu olan  $IC_{50}$  değeri ve enzimin aktivitesini etkileyen inhibisyon tipi saptanarak  $K_i$  değerleri bulunmuştur. *T. atroviride*'den saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz'ın genel inhibitörü  $\delta$ -glukonolaktonun  $IC_{50}$  değeri 8,4214 mM (Şekil 3.12, Tablo 3.9);  $K_i(1)$ :  $0,0712 \times 10^{-3}$  ve  $K_i(2)$ :  $0,068 \times 10^{-3}$  (Tablo 3.11, Şekil 3.14) bulunarak karışık inhibisyon sergilediği tespit edilmiştir. Bhiri ve ark. (2008), *Penicillium occitanis*'den elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz'ın *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranosit ve  $\delta$ -glukonolakton bulunan ortamdaki  $K_i$  değerini 0,03 mM olarak belirleyerek enzimin D- $\delta$ -glukonolakton inhibitörüne karşı

yarıřmalđ inhibisyon sergilediğini; Choi ve ark. (2011), yaptıkları çalışmada *Phoma* sp. KCTC11825BP'den elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz'ın *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranosit ve  $\delta$ -glukonolakton bulunan ortamdaki  $K_i$  değerini 0,1 mM olarak belirleyerek enzimin D- $\delta$ -glukonolakton inhibitörüne karşı yarıřmalđ inhibisyon sergilediğini; Park ve ark. (2012), yaptıkları çalışmada *Penicillium italicum*'dan elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz'ın *p*NP-Glu,  $\delta$ -glukonolakton bulunan ortamdaki  $K_i$  değeri 11,3 mM olarak belirleyerek enzimin D- $\delta$ -glukonolakton inhibitörüne karşı yarışmasız inhibisyon sergilediğini; Ařić ve ark. (2015), *Agaricus bisporus*  $\beta$ -glukosidaz'ının *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranosit ve  $\delta$ -glukonolakton inhibitörü bulunan ortamdaki  $K_i$  ve  $IC_{50}$  değerleri 7,2  $\mu$ M ve 0,39 mM olarak belirleyerek enzimin D- $\delta$ -glukonolakton inhibitörüne karşı yarıřmalđ inhibisyon sergilediğini bildirmişlerdir [149, 193, 195, 196].

$\delta$ -glukonolakton ve *p*NPG substratının bulunduğu ortamda *T. atroviride*'den saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimine  $\delta$ -glukonolakton ve *p*NPG substratının birlikte bağlanabileceği söylenebilir. Yarıřmalđ inhibisyonda inhibitör molekül substrat ile benzer özellik gösterir ve böylece inhibitör ve substrat enzimin aktif bölgesine bağlanmak için yarışmaktadır. Bunun sonucunda inhibitör ve substrat birlikte enzime bağlanamamaktadır. Ancak, substratın konsantrasyonu artırılarak inhibisyon azaltılabilmektedir. Buna göre  $\delta$ -glukonolakton ve *p*NPG substratının bulunduğu ortamda *T. atroviride*'den saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz enzimine  $\delta$ -glukonolakton ve *p*NPG substratının bağlanmak için yarış halinde oldukları söylenebilir.

Selülaz enzim sistemlerinin bir parçası ve aynı zamanda çalışmamızın kaynağı olan  $\beta$ -glukosidaz enzimi çeşitli endüstrilerde kullanılabilmesi sebebiyle oldukça ilgi çekmektedir.  $\beta$ -glukosidaz enziminin elde edilmesinde genellikle mikroorganizmalar tercih edilmektedir.  $\beta$ -glukosidaz enzimi gıda endüstrisi, deterjan endüstrisi, hayvan yemi, kozmetik, tekstil, ekstraksiyon işlemlerinde, alkol üretimi, sağlık sektörü, biyoyakıt üretimi ve çeşitli aromatik bileşiklerin elde edilmesinde kullanılmaktadır.

Çalışmamızda, evre kirliliğinin ve hava kirliliğinin azaltılması için mikroorganizmaların geliştirilmesinde KSF ortamı olarak tarımsal yan ürünlerin kullanılması tercih edilmiştir.



Bunun yanı sıra çalışmamızda endüstriyel enzimlerden olan  $\beta$ -glukosidaz enziminin saflaştırılması ve biyokimyasal özelliklerinin tespit edilmesiyle bilim ve endüstride kullanılabilir sonuçların açığa çıkarılması açısından oldukça önem taşımaktadır. Ayrıca  $\beta$ -glukosidaz enziminin mikroorganizmalardan ucuz, kolay elde edilmesi ve enzimin üretimi için farklı mikroorganizmaların bulunmasıyla çeşitli endüstrilerde kullanımına katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.



## 5. KAYNAKÇA

- [1] H. El-Gendi, A. K. Saleh, R. Badierah, E. M. Redwan, Y. A. El-Maradny, and E. M. El-Fakharany, "A Comprehensive Insight into Fungal Enzymes: Structure, Classification, and Their Role in Mankind's Challenges," *Journal of Fungi*, vol. 8, no. 1, p. 23, Jan. 2022, doi: <https://doi.org/10.3390/jof8010023>.
- [2] P. Robinson, "Enzymes: principles and biotechnological applications," *Essays in Biochemistry*, vol. 59, no. 10.1042/bse0590001, pp. 1–41, Nov. 2015, doi: <https://doi.org/10.1042/bse0590001>.
- [3] U. Ejaz, M. Sohail, and A. Ghanemi, "Cellulases: From Bioactivity to a Variety of Industrial Applications," *Biomimetics*, vol. 6, no. 3, p. 44, Jul. 2021, doi: <https://doi.org/10.3390/biomimetics6030044>.
- [4] R. Sharada<sup>1</sup>, G.Venkateswarlu<sup>2</sup>, S.Venkateswar<sup>3</sup>, M. An, and Rao<sup>4</sup>, "Applications of Cellulases-Review," *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, vol. 4, no. 2, pp. 424–437, Jun. 2014, Accessed: Mar. 03, 2024. [Online]. Available: <https://www.ijpcbs.com/abstract/applications-of-cellulases-review-77852.html>
- [5] B. Horowitz, "What are Enzymes?," *The Scientific Monthly*, vol. 6, no. 3, pp. 253–259, 1918, Accessed: Oct. 10, 2021. [Online]. Available: <https://www.jstor.org/stable/22630>
- [6] C. M. Heckmann and F. Paradisi, "Looking Back: A Short History of the Discovery of Enzymes and How They Became Powerful Chemical Tools," *ChemCatChem*, vol. 12, no. 24, pp. 6082–6102, Oct. 2020, doi: <https://doi.org/10.1002/cctc.202001107>.
- [7] R. Copeland, "ENZYMES A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis SECOND EDITION." Available: <https://enzimo.files.wordpress.com/2012/09/enzymes-a-practical-guide2.pdf>
- [8] A. P. Payen, J. F. , "Memoir on diastase, the principal products of its reactions, and their applications to the industrial arts," *Annales de Chimie et de Physique*, vol. vol. 53, pp. 73–92, 1833.
- [9] J. Polaina and A. P. MacCabe, Eds., *Industrial Enzymes*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. doi: <https://doi.org/10.1007/1-4020-5377-0>.
- [10] "The Nobel Prize in Chemistry 1907," NobelPrize.org. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1907/buchner/biographical/>

- [11] “The Nobel Prize in Chemistry 1946,” NobelPrize.org. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1946/summer/facts/>
- [12] G. K. Meghwanshi et al., “Enzymes for pharmaceutical and therapeutic applications,” *Biotechnology and Applied Biochemistry*, vol. 67, no. 4, May 2020, doi: <https://doi.org/10.1002/bab.1919>.
- [13] J. Arnau, D. Yaver, and C. M. Hjort, “Strategies and Challenges for the Development of Industrial Enzymes Using Fungal Cell Factories,” *Grand Challenges in Fungal Biotechnology*, pp. 179–210, Sep. 2019, doi: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-29541-7\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-030-29541-7_7).
- [14] J. Chapman, A. Ismail, and C. Dinu, “Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks,” *Catalysts*, vol. 8, no. 6, p. 238, Jun. 2018, doi: <https://doi.org/10.3390/catal8060238>.
- [15] Y. Zhang, S. He, and B. K. Simpson, “Enzymes in food bioprocessing-novel food enzymes, applications, and related techniques,” *Current Opinion in Food Science*, vol. 19, pp. 30–35, Feb. 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.12.007>.
- [16] K. K. Großmann, *Enzymatic Hydrolysis of Vegetable and Insect Proteins Using Technical Enzyme Preparations*. Kommunikations-, Informations- und Medienzentrum der Universität Hohenheim, 2023. Accessed: Mar. 03, 2024. [Online]. Available: [https://books.google.com.tr/books/about/Enzymatic\\_Hydrolysis\\_of\\_Vegetable\\_and\\_Insect\\_Proteins\\_Using\\_Technical\\_Enzyme\\_Preparations.html?id=op-xzwEACAAJ&redir\\_esc=y](https://books.google.com.tr/books/about/Enzymatic_Hydrolysis_of_Vegetable_and_Insect_Proteins_Using_Technical_Enzyme_Preparations.html?id=op-xzwEACAAJ&redir_esc=y)
- [17] “Industrial Enzymes Market Size To Surpass USD 13.20 Bn By 2032,” [www.precedenceresearch.com](http://www.precedenceresearch.com). <https://www.precedenceresearch.com/industrial-enzymes-market>
- [18] Aehle, W., “Enzymes in Industry Production and Application”, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 484, 2004.
- [19] S. Boyce and K. F Tipton, "Enzyme classification and nomenclature", *Nature Encyclopedia of Life Sciences*, pp. 1-11, 2000.
- [20] E. Garcia-Quinto, R. Aranda-Cañada, P. García-García, and G. Fernández-Lorente, “Use of Potential Immobilized Enzymes for the Modification of Liquid Foods in the Food Industry,” *Processes*, vol. 11, no. 6, p. 1840, Jun. 2023, doi: <https://doi.org/10.3390/pr11061840>.
- [21] J. Lee et al., “Exploration of nanozymes in viral diagnosis and therapy,” *Exploration*, vol. 2, no. 1, p. 20210086, Jan. 2022, doi: <https://doi.org/10.1002/exp.20210086>.

- [22] “Enzyme Names - Naming & Classification, EC Numbers, Six Classes Of Enzymes,” BYJUS. <https://byjus.com/neet/enzyme-names/>
- [23] “EC 3. Hydrolases,” iubmb.qmul.ac.uk. <https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/EC3/>
- [24] G. Bingöl, Vitaminler ve Enzimler. Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları. Accessed: 1977. [Online]. Available: <file:///C:/Users/lenovo/Downloads/Vitaminler%20ve%20Enzimler.pdf>
- [25] D. Wellner, “Enzyme,” AccessScience | McGraw Hill’s AccessScience, 2021. <https://www.accessscience.com/content/article/a236000>
- [26] “Holoenzyme-MEDizzy,” medizzy.com. <https://medizzy.com/feed/34851723> (accessed Mar. 03, 2024).
- [27] C. Austin, “Enzyme,” National Human Genome Research Institute, May 10, 2022. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Enzyme>
- [28] A. Etale, A. J. Onyianta, S. R. Turner, and S. J. Eichhorn, “Cellulose: A Review of Water Interactions, Applications in Composites, and Water Treatment,” *Chemical Reviews*, vol. 123, no. 5, pp. 2016–2048, Jan. 2023, doi: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.2c00477>.
- [29] “Order in cellulose: Historical review of crystal structure research on cellulose,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 254, p. 117417, Feb. 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117417>.
- [30] S. P. Gautam, P. S. Bundela, A. K. Pandey, J. Jamaluddin, M. K. Awasthi, and S. Sarsaiya, “A review on systematic study of cellulose,” *Journal of Applied and Natural Science*, vol. 2, no. 2, pp. 330–343, Dec. 2010, doi: <https://doi.org/10.31018/jans.v2i2.143>.
- [31] J. T. McNamara, J. L. W. Morgan, and J. Zimmer, “A Molecular Description of Cellulose Biosynthesis,” *Annual review of biochemistry*, vol. 84, pp. 895–921, 2015, doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-033930>.
- [32] R. Sharada, G. Venkateswarlu, S. Venkateshwar, and M. A. Rao, “Production of Cellulase - a Review,” *International Journal of Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences*, vol. 3, no. 4, pp. 1070–1090, Oct. 2013, Accessed: Mar. 03, 2024. [Online]. Available: <https://web.p.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=0&sid=545e5e66-effd-42b2-8d3e-0da9192dac53%40redis>

- [33] J. A. Okolie, S. Nanda, A. K. Dalai, and J. A. Kozinski, "Chemistry and Specialty Industrial Applications of Lignocellulosic Biomass," *Waste and Biomass Valorization*, Jul. 2020, doi: <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01123-0>.
- [34] N. Bhardwaj, B. Kumar, K. Agrawal, and P. Verma, "Current perspective on production and applications of microbial cellulases: a review," *Bioresources and Bioprocessing*, vol. 8, no. 1, Oct. 2021, doi: <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00447-6>.
- [35] S. Sarsaiya, A. Jain, S. Kumar Awasthi, Y. Duan, M. Kumar Awasthi, and J. Shi, "Microbial dynamics for lignocellulosic waste bioconversion and its importance with modern circular economy, challenges and future perspectives," *Bioresource Technology*, vol. 291, p. 121905, Nov. 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121905>.
- [36] M. Y. Areeshi, "Microbial cellulase production using fruit wastes and its applications in biofuels production," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 378, p. 109814, Oct. 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109814>.
- [37] P. Maravi and A. Kumar, "Cellulase: Distribution, Production, Characterization and Industrial Applications," *Biotechnology Journal International*, pp. 36–71, May 2021, doi: <https://doi.org/10.9734/bji/2021/v25i330143>.
- [38] E. A. Bayer, H. Chanzy, R. Lamed, and Y. Shoham, "Cellulose, cellulases and cellulosomes," *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 8, no. 5, pp. 548–557, Oct. 1998, doi: [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(98\)80143-7](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(98)80143-7).
- [39] P. Saranraj, D. Stella, and D. Reetha, "Microbial Cellulases and Its Applications: A Review," Jan. 2012.
- [40] F. Islam and N. Roy, "Screening, purification and characterization of cellulase from cellulase producing bacteria in molasses," *BMC Research Notes*, vol. 11, no. 1, Jul. 2018, doi: <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3558-4>.
- [41] M. Guruk and M. Karaaslan, "Production and Biochemical Characterization of Cellulase Enzyme by *Trichoderma* Strains from Harran Plain," *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, Jul. 2020, doi: <https://doi.org/10.38001/ijlsb.756818>.
- [42] V. Anoop Kumar, R. Suresh Chandra Kurup, C. Snishamol, and G. Nagendra Prabhu, "Role of Cellulases in Food, Feed, and Beverage Industries," *Energy, Environment, and Sustainability*, pp. 323–343, Nov. 2018, doi: [https://doi.org/10.1007/978-981-13-3263-0\\_17](https://doi.org/10.1007/978-981-13-3263-0_17).

- [43] R. Abdullah *et al.*, “Enhanced production of  $\beta$ -glucosidase by locally isolated fungal strain employing submerged fermentation,” *Bioscience Journal*, vol. 35, no. 5, Aug. 2019, doi: <https://doi.org/10.14393/bj-v35n5a2019-47943>.
- [44] “An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications,” *Bioresource Technology Reports*, vol. 14, p. 100652, Jun. 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100652>.
- [45] G. E. Harman and C. P. Kubicek, “Application of *Trichoderma* enzymes in food and feed industries”, *Trichoderma And Gliocladium, Volume 2: Enzymes, Biological Control and commercial applications*. CRC Press, pp. 327–42, 1998b, Accessed: Mar. 04, 2024. [Online]. Available: <https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=20NZDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR2&dq=Enzymes>
- [46] G. E. Harman and C. P. Kubicek, “Application of *Trichoderma* enzymes in textile industry”, *Trichoderma And Gliocladium, Volume 2: Enzymes, Biological Control and commercial applications*. CRC Press, pp. 314-315, 1998. Accessed: Mar. 04, 2024. [Online]. Available: [https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=20NZDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA311&dq=Application+of+Trichoderma+enzymes+in+textile+industry&ots=QZkQe40A56&sig=gVgL1m47cOg3SqIDPeFMWEadeE&redir\\_esc=y#v=onepage&q=Application%20of%20Trichoderma%20enzymes%20in%20textile%20industry&f=false](https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=20NZDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA311&dq=Application+of+Trichoderma+enzymes+in+textile+industry&ots=QZkQe40A56&sig=gVgL1m47cOg3SqIDPeFMWEadeE&redir_esc=y#v=onepage&q=Application%20of%20Trichoderma%20enzymes%20in%20textile%20industry&f=false)
- [47] M. K. Bhat, “Cellulases and related enzymes in biotechnology,” *Biotechnology Advances*, vol. 18, no. 5, pp. 355–383, Aug. 2000, doi: [https://doi.org/10.1016/s0734-9750\(00\)00041-0](https://doi.org/10.1016/s0734-9750(00)00041-0).
- [48] M. Chandrasekaran, *Valorization of Food Processing By-Products*. CRC Press, 2012. Accessed: Mar. 04, 2024. [Online]. Available: [https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=l0HNBQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Valorization+of+food+processing+by-products&ots=6kJmuWxOzx&sig=iZrSznruQD0QnsAyZzs1\\_ggzQfs&redir\\_esc=y#v=onepage&q=Valorization%20of%20food%20processing%20by-products&f=false](https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=l0HNBQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Valorization+of+food+processing+by-products&ots=6kJmuWxOzx&sig=iZrSznruQD0QnsAyZzs1_ggzQfs&redir_esc=y#v=onepage&q=Valorization%20of%20food%20processing%20by-products&f=false)
- [49] S. S., “An Overview on Fungal Cellulases with an Industrial Perspective,” *Journal of Nutrition & Food Sciences*, vol. 06, no. 01, 2016, doi: <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000461>.

- [50] H. TC, N. ND, H. A. LT, V. TA, and M. PV, "Enzyme Assisted Extraction of Polyphenols from the Old Tea Leaves," *Journal of Nutrition and Health Sciences*, vol. 3, no. 4, Nov. 2016, doi: <https://doi.org/10.15744/2393-9060.3.404>.
- [51] S. Sharma and Syed Shams Yazdani, "Diversity of Microbial Cellulase System," *Elsevier eBooks*, pp. 49–64, Jan. 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63507-5.00006-x>.
- [52] R. C. Kuhad, R. Gupta, and A. Singh, "Microbial Cellulases and Their Industrial Applications," *Enzyme Research*, vol. 2011, pp. 1–10, 2011, doi: <https://doi.org/10.4061/2011/280696>.
- [53] S. H *et al.*, "Microbial Cellulases: A Review on Strain Development, Purification, Characterization and their Industrial Applications," *Journal of Bacteriology and Mycology*, vol. 8, no. 5, Jul. 2021, doi: <https://doi.org/10.26420/jbacteriolmycol.2021.1180>.
- [54] D. Neagu, L. F. Leopold, P. Thonart, J. Destain, and C. Socaciu, "Enzyme-Assisted Extraction of Carotenoids and Phenolic Derivatives from Tomatoes," *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science and Biotechnologies*, vol. 71, no. 1, pp. 20–26, May 2014, doi: <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-asb:71:1:10093>.
- [55] H. Belghith, S. Ellouz-Chaabouni, and A. Gargouri, "Biostoning of denims by *Penicillium occitanis* (Pol6) cellulases," *Journal of Biotechnology*, vol. 89, no. 2–3, pp. 257–262, Aug. 2001, doi: [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(01\)00309-1](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(01)00309-1).
- [56] P. Pathak, N. K. Bhardwaj, and A. K. Singh, "Production of Crude Cellulase and Xylanase From *Trichoderma harzianum* PPDDN10 NFCCI-2925 and Its Application in Photocopier Waste Paper Recycling," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 172, no. 8, pp. 3776–3797, Apr. 2014, doi: <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0758-9>.
- [57] Preeti Chutani and Krishna Kant Sharma, "Concomitant production of xylanases and cellulases from *Trichoderma longibrachiatum* MDU-6 selected for the deinking of paper waste," *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 39, no. 5, pp. 747–758, Feb. 2016, doi: <https://doi.org/10.1007/s00449-016-1555-3>.
- [58] J. Anne. Brown, K. Ogawa, and T. M. Wood, "Studies on the preparation and regeneration of protoplasts from the cellulolytic fungus *Penicillium pinophilum*," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 8, no. 9, pp. 527–532, Sep. 1986, doi: [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(86\)90035-9](https://doi.org/10.1016/0141-0229(86)90035-9).

- [59] A. Chen *et al.*, “Structural and Catalytic Characterization of TsBGL, a  $\beta$ -Glucosidase From *Thermofilum* sp. ex4484\_79,” vol. 12, Oct. 2021, doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.723678>.
- [60] G. Singh, A. K. Verma, and V. Kumar, “Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of  $\beta$ -glucosidases,” *3 Biotech*, vol. 6, no. 1, Dec. 2015, doi: <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0328-z>.
- [61] P. Kannan, M. Shafreen M, A. B. Achudhan, A. Gupta, and L. M. Saleena, “A review on applications of  $\beta$ -glucosidase in food, brewery, pharmaceutical and cosmetic industries,” *Carbohydrate Research*, vol. 530, p. 108855, Aug. 2023, doi: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2023.108855>.
- [62] A. Ahmed, F. ul-Hassan Nasim, K. Batool, and A. Bibi, “Microbial  $\beta$ -Glucosidase: Sources, Production and Applications,” *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, vol. 5, no. 1, pp. 31–46, Mar. 2017, doi: <https://doi.org/10.12691/jaem-5-1-4>.
- [63] P. González-Pombo, L. Fariña, F. Carrau, F. Batista-Viera, and B. M. Brena, “A novel extracellular  $\beta$ -glucosidase from *Issatchenkia terricola*: Isolation, immobilization and application for aroma enhancement of white Muscat wine,” *Process Biochemistry*, vol. 46, no. 1, pp. 385–389, Jan. 2011, doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.07.016>.
- [64] J. Krisch, M. Miklós Takó, T. Papp, and C. Vágvölgyi, “Characteristics and potential use of  $\beta$ -glucosidases from Zygomycetes,” in *Current Research; Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, M.-V. A, Ed., Formatex Research Center, 2010. Available: [https://www.researchgate.net/publication/268005280\\_Characteristics\\_and\\_potential\\_use\\_of\\_b-glucosidases\\_from\\_Zygomycetes](https://www.researchgate.net/publication/268005280_Characteristics_and_potential_use_of_b-glucosidases_from_Zygomycetes)
- [65] C. Schröder, Skander Elleuche, S. Blank, and Garabed Antranikian, “Characterization of a heat-active archaeal  $\beta$ -glucosidase from a hydrothermal spring metagenome,” vol. 57, pp. 48–54, Apr. 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.01.010>.
- [66] R. OPASSIRI *et al.*, “beta-Glucosidase, exo-beta-glucanase and pyridoxine transglucosylase activities of rice BGlul,” *Biochemical Journal*, vol. 379, no. 1, pp. 125–131, Apr. 2004, doi: <https://doi.org/10.1042/bj20031485>.
- [67] J. A. Marazza, M. S. Garro, and G. Savoy de Giori, “Aglycone production by *Lactobacillus rhamnosus* CRL981 during soymilk fermentation,” *Food Microbiology*, vol. 26, no. 3, pp. 333–339, May 2009, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.11.004>.



- [68] D. Liu *et al.*, “Characterization of a thermostable  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, and its functional expression in *Pichia pastoris* X33,” *Microbial Cell Factories*, vol. 11, no. 1, Feb. 2012, doi: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-25>.
- [69] S. Hati, S. Vij, B. P. Singh, and S. Mandal, “ $\beta$ -Glucosidase activity and bioconversion of isoflavones during fermentation of soymilk,” *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 95, no. 1, pp. 216–220, Jun. 2014, doi: <https://doi.org/10.1002/jsfa.6743>.
- [70] Z. Lewis Liu, S. A. Weber, M. A. Cotta, and S.-Z. Li, “A new  $\beta$ -glucosidase producing yeast for lower-cost cellulosic ethanol production from xylose-extracted corncob residues by simultaneous saccharification and fermentation,” *Bioresource Technology*, vol. 104, pp. 410–416, Jan. 2012, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.099>.
- [71] Y. Vervoort *et al.*, “Characterization of the recombinant *Brettanomyces anomalus*  $\beta$ -glucosidase and its potential for bioflavouring,” *Journal of Applied Microbiology*, vol. 121, no. 3, pp. 721–733, Sep. 2016, doi: <https://doi.org/10.1111/jam.13200>.
- [72] A. Schuster and M. Schmoll, “Biology and biotechnology of *Trichoderma*,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 87, no. 3, pp. 787–799, May 2010, doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2632-1>.
- [73] N. A. Zin and N. A. Badaluddin, “Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications,” *Annals of Agricultural Sciences*, vol. 65, no. 2, pp. 168–178, Dec. 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2020.09.003>.
- [74] “*Trichoderma atroviride* IMI 206040,” *NCBI*.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/452589/> (accessed Mar. 09, 2024).
- [75] “Index Fungorum - Names Record,” *www.indexfungorum.org*.  
<https://www.indexfungorum.org/Names/NamesRecord.asp?RecordID=451289>  
 (accessed Mar. 09, 2024).
- [76] V. J. Rodrigues and A. A. Odaneth, “Industrial application of cellulases,” *Current Status and Future Scope of Microbial Cellulases*, pp. 189–209, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821882-2.00007-7>.
- [77] Y. Toor, and U. Ilyas, “Optimization of Cellulase Production by *Aspergillus ornatus* by the Solid State Fermentation of *Cicer arietinum*”, *American Journal of Research Communication*, Vol. 2(1) ,pp. 125-141, 2013.

- [78] P. Leite *et al.*, “Recent advances in production of lignocellulolytic enzymes by solid-state fermentation of agro-industrial wastes,” *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, vol. 27, p. 100407, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.cogsc.2020.100407.
- [79] A. Mattedi *et al.*, “Solid-State Fermentation: Applications and Future Perspectives for Biostimulant and Biopesticides Production,” *Microorganisms*, vol. 11, no. 6, p. 1408, Jun. 2023, doi: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061408>.
- [80] S. Sadhu and T. K. Maiti, “Cellulase Production by Bacteria: A Review,” *British Microbiology Research Journal*, vol. 3, no. 3, pp. 235–258, Jan. 2013, doi: <https://doi.org/10.9734/bmrj/2013/2367>.
- [81] M. Sayed, *A review of Chromatography: principles, Classification, Applications*. Helwan University: Department of Chemistry, 2021. Available: [https://www.researchgate.net/publication/355493136\\_A\\_review\\_of\\_Chromatography\\_principles\\_Classification\\_Applications](https://www.researchgate.net/publication/355493136_A_review_of_Chromatography_principles_Classification_Applications)
- [82] M. Bhatti, “An overview on basic and advanced chromatographic techniques,” *Journal of Biomedical and Pharmaceutical Research*, vol. 8, no. 3, May 2019, doi: <https://doi.org/10.32553/jbpr.v8i3.599>.
- [83] J. A. Queiroz, C. T. Tomaz, and J. M. S. Cabral, “Hydrophobic interaction chromatography of proteins,” *Journal of Biotechnology*, vol. 87, no. 2, pp. 143–159, May 2001, doi: [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(01\)00237-1](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(01)00237-1).
- [84] M. E. Lienqueo, A. Mahn, J. C. Salgado, and J. A. Asenjo, “Current insights on protein behaviour in hydrophobic interaction chromatography,” *Journal of Chromatography B*, vol. 849, no. 1–2, pp. 53–68, Apr. 2007, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.11.019>.
- [85] Van Oss, R. J. Good, and M. K. Chaudhury, “Nature of the antigen-antibody interaction,” *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, vol. 376, pp. 111–119, Apr. 1986, doi: [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(00\)80828-2](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(00)80828-2).
- [86] W. Kauzmann, “Some Factors in the Interpretation of Protein Denaturation,” pp. 1–63, Jan. 1959, doi: [https://doi.org/10.1016/s0065-3233\(08\)60608-7](https://doi.org/10.1016/s0065-3233(08)60608-7).
- [87] M. Hedhammar, A. E. Karlström, and S. Hober, “Chromatographic methods for protein purification”. *Stockholm: Royal Institute of Technology*, pp.1-31, 2006.

- [88] M. Baca *et al.*, “A comprehensive study to protein retention in hydrophobic interaction chromatography,” *Journal of Chromatography B*, vol. 1032, pp. 182–188, Oct. 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.05.012>.
- [89] B. F. O’Connor and P. M. Cummins, “Hydrophobic Interaction Chromatography” D. Walls and S. T. Loughran (eds.), “Protein Chromatography: Methods and Protocols”, *Methods in Molecular Biology*, Chapter 18, vol. 1485, pp.355-363, 2017.
- [90] G. E. Harman and C. P. Kubicek, “Basic Biology, Taxonomy and Genetics”, *Trichoderma And Gliocladium*. CRC Press, vol. 1, 2002.
- [91] I.A. Fletcher, Effect of Temperature and Growth Media on Mycelium Growth of *Pleurotus Ostreatus* and *Ganoderma Lucidum* Strains. *Cohesive journal of microbiology and infectious disease*, 2 (5),” 2019, doi: <https://doi.org/10.31031/CJMI.2019.02.000549>.
- [92] A. K. Maurya, V. John, D. K. Srivastava, S. Simon, and H. Hemlata, Effect of media and substrates for spawn production of dhingri mushroom (*pleurotus ostreatus*), vol. 14. *Journal of Natural Resource and Development*, 2019, pp. 88–92.
- [93] Y. E. Agustin, L. Riadi, and T. P. Utami, “Xylanase production from combined *Reutealis trisperma* with potato dextrose broth by *Tricoderma reesei*: the effect of pretreatment,” *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, vol. 703, p. 012003, Dec. 2019, doi: <https://doi.org/10.1088/1757-899x/703/1/012003>.
- [94] M. Goyal and G. Soni, “Production and characterization of cellulolytic enzymes by *Pleurotus florida*,” *African Journal of Microbiology Research*, vol. 5, no. 10, pp. 1131–1136, May 2011, doi: <https://doi.org/10.5897/ajmr10.192>.
- [95] M. Slifkin and R. Cumbie, “Congo red as a fluorochrome for the rapid detection of fungi,” *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 26, no. 5, pp. 827–830, May 1988, doi: <https://doi.org/10.1128/jcm.26.5.827-830.1988>.
- [96] A. Sazci, K. Erenler, and A. Radford, “Detection of cellulolytic fungi by using Congo red as an indicator: a comparative study with the dinitrosalicylic acid reagent method,” *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 61, no. 6, pp. 559–562, Dec. 1986, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1986.tb01729.x>.
- [97] R. M. Teather and P. J. Wood, “Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 43, no. 4, pp. 777–780, Apr. 1982, doi: <https://doi.org/10.1128/aem.43.4.777-780.1982>.

- [98] H. M. Davidson and W. H. Fishman, "A Simplified Purification Procedure for Human Prostatic Acid Phosphatase Based on pH and Ammonium Sulfate Fractionation," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 234, no. 3, pp. 526–528, Mar. 1959, doi: [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)70238-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)70238-x).
- [99] R. K. Tripathi, C. Chaya Devi, and A. Ramaiah, "pH-dependent interconversion of two forms of tyrosinase in human skin," *Biochemical Journal*, vol. 252, no. 2, pp. 481–487, Jun. 1988, doi: <https://doi.org/10.1042/bj2520481>.
- [100] E. A. Pfannkoch, "The Preparation of Buffers and Other Solutions: A Chemist's Perspective," *Molecular Biology Problem Solver*, pp. 31–47, doi: <https://doi.org/10.1002/0471223905.ch3>.
- [101] P. Harnpicharnchai, V. Champreda, W. Sornlake, and L. Eurwilaichitr, "A thermotolerant  $\beta$ -glucosidase isolated from an endophytic fungi, *Periconia* sp., with a possible use for biomass conversion to sugars," vol. 67, no. 2, pp. 61–69, Oct. 2009, doi: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2008.05.022>.
- [102] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, "Protein measurement with the Folin phenol reagent," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 193, no. 1, pp. 265–275, Nov. 1951, doi: [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6).
- [103] A. Karnchanatat *et al.*, "Purification and biochemical characterization of an extracellular beta-glucosidase from the wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb.:Fr.) Rehm," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 270, no. 1, pp. 162–170, May 2007, doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00662.x.
- [104] U.K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4" *Nature*, vol. 227,(5259), pp. 680-685, 1970.
- [105] S.A. Shukolyukol, "NATIVE Electrophoresis in Cell Proteomic: BN-PAGE an CN-PAGE", *Cell and Tissue Biolog*, vol.5,(3), pp. 311-318, 2011.
- [106] S. R. Gallagher, "SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) Current Protocols Essential Laboratory Techniques" vol. 7, 3, pp.1-28, 2012.
- [107] S. Jiang, S. Liu, C. Zhao, ve C. Wu, "Developing Protocols of Tricine-SDS-PAGE for Separation of Polypeptides in the Mass Range 1-30 kDA with Minigel Electrophoresis System", *Int. J. Electrochem. Sci.*, vol. 11, pp. 640-649, 2016.
- [108] P. Christakopoulos, P. W. Goodenough, D. Kekos, B. J. Macris', M. Claeysens and M. K. Bhat, "Purification And Characterisation of an Extracellular  $\beta$ -Glucosidase

- with Transglycosylation and Exo-Glucosidase Activities from *Fusarium oxysporum*”, *Eur. J. Biochem.*, vol. 224, pp. 379-385, 1994.
- [109] Neipmann, M. and Zheng, J., “Discontinuous NATIVE Protein Gel Electrophoresis”, Institute of Biochemistry, 35392 Giessen, Germany, (2006).
- [110] D. Siva, G. Srivethi, P. T. Vasan, D. Rajesh, A. Alfarhan, and R. Rajagopal, “Enhanced cellulase enzyme production by *Aspergillus niger* using cellulase/iron oxide magnetic nano-composites,” *Journal of King Saud University - Science*, vol. 34, no. 1, p. 101695, Jan. 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101695>.
- [111] N. Bhati, Shreya, and A. K. Sharma, “Production and optimisation of cellulase enzyme by *Aspergillus uvarum* CBS 121591 isolated from soil,” *Vegetos*, Aug. 2022, doi: <https://doi.org/10.1007/s42535-022-00450-y>.
- [112] K. Grata, “Determining Cellulolytic Activity of Microorganisms,” *Chemistry-Didactics-Ecology-Metrology*, vol. 25, no. 1–2, pp. 133–143, Dec. 2020, doi: <https://doi.org/10.2478/cdem-2020-0010>.
- [113] I. Ferreira da Silva, J. M. Rodrigues da Luz, S. F. Oliveira, J. Humberto de Queiroz, and M. C. Megumi Kasuya, “High-yield cellulase and LiP production after SSF of agricultural wastes by *Pleurotus ostreatus* using different surfactants,” *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 22, p. 101428, Nov. 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101428>.
- [114] D. Witkowska *et al.*, “Survivability and storage stability of *Trichoderma atroviride* TRS40 preserved by fluidised bed drying on various agriculture by-products,” *Biocontrol Science and Technology*, vol. 26, no. 12, pp. 1591–1604, Oct. 2016, doi: <https://doi.org/10.1080/09583157.2016.1201457>.
- [115] B. R. Shruthi, R. N. H. Achur, and T. Nayaka Boramuthi, “Optimized Solid-State Fermentation Medium Enhances the Multienzymes Production from *Penicillium citrinum* and *Aspergillus clavatus*,” *Current Microbiology*, vol. 77, no. 9, pp. 2192–2206, May 2020, doi: <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02036-w>.
- [116] R. Intasit, B. Cheirsilp, Y. Louhasakul, P. Boonsawang, S. Chaiprapat, and J. Yeesang, “Valorization of palm biomass wastes for biodiesel feedstock and clean solid biofuel through non-sterile repeated solid-state fermentation,” *Bioresource Technology*, vol. 298, p. 122551, Feb. 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122551>.
- [117] R. Intasit, B. Cheirsilp, Y. Louhasakul, and N. Thongchul, “Enhanced biovalorization of palm biomass wastes as biodiesel feedstocks through integrated

- solid-state and submerged fermentations by fungal co-cultures,” *Bioresource Technology*, vol. 380, p. 129105, Jul. 2023, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129105>.
- [118] N. Kamsani, M. Md. Salleh, S. A. Basri, S. E. Mohamad, S. A. Aziz, and K. Kamaruddin, “Effects of Surfactant on the Enzymatic Degradation of Oil Palm Empty Fruit Bunch (OPEFB),” *Waste and Biomass Valorization*, vol. 9, no. 5, pp. 845–852, Feb. 2017, doi: <https://doi.org/10.1007/s12649-017-9838-8>.
- [119] G. B. Santos, Á. de Sousa Francisco Filho, J. Rêgo da Silva Rodrigues, and R. Rodrigues de Souza, “Cellulase production by *Aspergillus niger* using urban lignocellulosic waste as substrate: Evaluation of different cultivation strategies,” *Journal of Environmental Management*, vol. 305, p. 114431, Mar. 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.114431>.
- [120] Hemansi, R. Gupta, R. C. Kuhad, and J. K. Saini, “Cost effective production of complete cellulase system by newly isolated *Aspergillus niger* RCKH-3 for efficient enzymatic saccharification: Medium engineering by overall evaluation criteria approach (OEC),” *Biochemical Engineering Journal*, vol. 132, pp. 182–190, Apr. 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.01.019>.
- [121] C. Liang *et al.*, “Improving  $\beta$ -glucosidase and xylanase production in a combination of waste substrate from domestic wastewater treatment system and agriculture residues,” *Bioresource Technology*, vol. 318, p. 124019, Dec. 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124019>.
- [122] M.-N. Efthymiou, C. Pateraki, H. Papapostolou, C. S. K. Lin, and A. Koutinas, “Restructuring the sunflower-based biodiesel industry into a circular bio-economy business model converting sunflower meal and crude glycerol into succinic acid and value-added co-products,” *Biomass and Bioenergy*, vol. 155, p. 106265, Dec. 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106265>.
- [123] A. Dinil and A. Jacob, “Valorization of Agro-industrial Discards in Fermentation for the Production of Cellulase Enzyme,” *Journal of Pure and Applied Microbiology*, vol. 16, no. 1, pp. 347–354, Feb. 2022, doi: <https://doi.org/10.22207/jpam.16.1.25>.
- [124] P. R. K. Pooja and S. Aithal “Potential of agricultural waste residues as a novel media for the growth of *Aspergillus niger* for cellulase production,” *Dnyanopasak Research Journal*, vol. 1, no. 1, pp. 15–20.
- [125] V. Wonoputri, S. Subiantoro, M. T. A. P. Kresnowati, and R. Purwadi, “Solid State Fermentation Parameters Effect on Cellulase Production from Empty Fruit

- Bunch,” *Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis*, vol. 13, no. 3, p. 553, Dec. 2018, doi: <https://doi.org/10.9767/bcrec.13.3.1964.553-559>.
- [126] N. Darabzadeh, Z. Hamidi-Esfahani, and P. Hejazi, “Optimization of cellulase production under solid-state fermentation by a new mutant strain of *Trichoderma reesei*,” *Food Science & Nutrition*, vol. 7, no. 2, pp. 572–578, Oct. 2018, doi: <https://doi.org/10.1002/fsn3.852>.
- [127] S. Yasmina, G. Ouahiba, B. Azzeddine, A. Zahra, and S. Nouari, “Optimization of endoglucanase production from *Sarocladium kiliense* strain bbv1 under solid state fermentation, using response surface methodology,” *PONTE International Scientific Researches Journal*, vol. 77, no. 4, 2021, doi: <https://doi.org/10.21506/j.ponte.2021.4.3>.
- [128] M. Mushtaq, F. Khatoun and S. Batool, "Optimization of Culture Conditions for the Production of Endoglucanase from *Aspergillus sydowii* using Corn Cobs" *Pinnacle Biochemistry Research*, Vol. 1 (1) 2014, Article ID pbcr\_131, 202-208, 20
- [129] das Neves, C.A., de Menezes, L.H.S., Soares, G.A. *et al.* Production and biochemical characterization of halotolerant  $\beta$ -glucosidase by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 grown in forage palm under solid-state fermentation, *Biomass Conv. Bioref*, **12**, 3133–3144, 2022, <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00930-8>
- [130] R. M. Saleh, S. A. Kabli, S. M. Al-Garni, M. A. Al-Ghamdi, A. M. Abdel-Aty, and S. A. Mohamed, “Solid-state fermentation by *Trichoderma viride* for enhancing phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities in ginger,” *Letters in Applied Microbiology*, vol. 67, no. 2, pp. 161–167, Jun. 2018, doi: <https://doi.org/10.1111/lam.13003>.
- [131] S. Mondal, J. P. Soren, J. Mondal, S. Rakshit, S. Kumar Halder, and K. C. Mondal, “Contemporaneous synthesis of multiple carbohydrate debranching enzymes from newly isolated *Aspergillus fumigatus* SKF-2 under solid state fermentation: A unique enzyme mixture for proficient saccharification of plant bioresources,” *Industrial Crops and Products*, vol. 150, p. 112409, Aug. 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112409>.
- [132] A. Amsal Abd, A. Jamaluddin, D. L. A. Razak, N. Y. A. Rashid, and M. A. Manan, “Effect of nitrogen supplementation on the production of  $\beta$ -glucosidase in solid state fermentation of broken rice and rice bran by *Aspergillus oryzae*,” *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, pp. 173–178, Dec. 2018.

- [133] C. Zhang *et al.*, “The unique sugar conversion and complex CAZyme system of *Trichoderma brev* T069 during solid-state fermentation of cassava peel,” *Industrial Crops and Products*, vol. 193, pp. 116263–116263, Mar. 2023, doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116263>.
- [134] M. Grzegorzczak, A. Kancelista, W. Łaba, M. Piegza, and D. Witkowska, “The effect of lyophilization and storage time on the survival rate and hydrolytic activity of *Trichoderma* strains,” *Folia Microbiologica*, vol. 63, no. 4, pp. 433–441, Jan. 2018, doi: <https://doi.org/10.1007/s12223-017-0581-0>.
- [135] S. Nkala, S. L. Rabi, and T. Ncube, “Optimization of solid state fermentation conditions for improved production of cellulases by *didymella phacea*,” *Zimbabwe Journal of Science and Technology*, vol. 15, no. 1, pp. 34–37, 2020, Accessed: Mar. 23, 2024. [Online]. Available: <https://journals.nust.ac.zw/index.php/zjst/article/view/160>.
- [136] Sri Sugiwati, M. Hanafi, Hanifah Lioe, and Maggy Suhartono, “Effect of growth conditions on  $\beta$ -glucosidase production by local isolate of *Aspergillus niger* using rice bran substrate,” *Biodiversitas*, vol. 21, no. 9, Aug. 2020, doi: <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210917>.
- [137] A. Nanjundaswamy and B. C. Okeke, “Comprehensive Optimization of Culture Conditions for Production of Biomass-Hydrolyzing Enzymes of *Trichoderma* SG2 in Submerged and Solid-State Fermentation,” *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 191, no. 1, pp. 444–462, Apr. 2020, doi: <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03258-1>.
- [138] L. M. Legodi, D. C. La Grange, and E. L. J. van Rensburg, “Production of the Cellulase Enzyme System by Locally Isolated *Trichoderma* and *Aspergillus* Species Cultivated on Banana Pseudostem during Solid-State Fermentation,” *Fermentation*, vol. 9, no. 5, p. 412, May 2023, doi: <https://doi.org/10.3390/fermentation9050412>.
- [139] M. S. Singhvi and S. S. Zinjarde, “Production of pharmaceutically important genistein and daidzein from soybean flour extract by using  $\beta$ -glucosidase derived from *Penicillium janthinellum* NCIM 1171,” *Process Biochemistry*, vol. 97, pp. 183–190, Oct. 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.07.014>.
- [140] O. Warburg and W. Christian, "Isolation and Crystallization of Enolase", *Biochem Z*, vol. 310, pp. 384-421 1942.
- [141] N. Y. Toker, “Protein Saflaştırması ile İlgili Bazı Metotlar”, *İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg.*, vol. 26 (2), pp.403-412, 2000.



- [142] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–75.
- [143] K. C. Duong-Ly and S. B. Gabelli, “Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation,” *Methods in Enzymology*, vol. 541, no. 1, pp. 85–94, 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-420119-4.00007-0>.
- [144] R. R. Burgess, “Chapter 20 Protein Precipitation Techniques,” *Methods in Enzymology*, vol. 463, pp. 331–342, 2009, doi: [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(09\)63020-2](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(09)63020-2).
- [145] E.M. Fawzi, “Production and purification of  $\beta$ -glucosidase and protease by *Fusarium proliferatum* NRRL 26517 grown on *Ficus nitida* wastes”, *Annals of Microbiology*, 53, 463-476, 2003.
- [146] M. Fadel, “High-level xylanase production from sorghum flour by a newly isolate of *Trichoderma harzianum* cultivated under solid state fermentation.,” *Annals of Microbiology*, vol. 51, no. 1, pp. 61–78, Jan. 200
- [147] B. J. Macris, “Production and Characterization of Cellulase and  $\beta$ -Glucosidase from a Mutant of *Alternaria alternata*,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 47, no. 3, pp. 560–565, Mar. 1984, doi: <https://doi.org/10.1128/aem.47.3.560-565.1984>.
- [148] Krishna Prasad Nooralabettu, “Optimisation of ammonium sulfate precipitation method to achieve high throughput concentration of crude alkaline phosphatase from Brown shrimp (*Metapenaeus monoceros*) hepatopancreas,” vol. 2, no. 1, pp. 7–16, Mar. 2014.
- [149] A. Ašić, L. Bešić, I. Muhović, S. Dogan, and Y. Turan, “Purification and Characterization of  $\beta$ -Glucosidase from *Agaricus bisporus* (White Button Mushroom),” *The Protein Journal*, vol. 34, no. 6, pp. 453–461, Nov. 2015, doi: <https://doi.org/10.1007/s10930-015-9640-z>.
- [150] X. Zhao *et al.*, “A novel ginsenoside Rb1-hydrolyzing  $\beta$ -d-glucosidase from *Cladosporium fulvum*,” *Process Biochemistry*, vol. 44, no. 6, pp. 612–618, Jun. 2009, doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.01.016>.
- [151] N. Singh, B. Sithole, A. Kumar, and R. Govinden, “A glucose tolerant  $\beta$ -glucosidase from a newly isolated *Neofusicoccum parvum* strain F7: production, purification, and characterization,” *Scientific Reports*, vol. 13, no. 1, p. 5134, Mar. 2023, doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-32353-6>.
- [152] K. Nisar, R. Abdullah, A. Kaleem, M. Iqtedar, M. Aftab, and F. Saleem, “Purification, characterization and thermodynamic analysis of cellulases produced

- from *Thermomyces dupontii* and its industrial applications,” *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 29, no. 12, p. 103483, Dec. 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.103483>.
- [153] A. O. Sulyman, A. Igunnu, and S. O. Malomo, “Isolation, purification and characterization of cellulase produced by *Aspergillus niger* cultured on *Arachis hypogaea* shells,” *Heliyon*, vol. 6, no. 12, p. e05668, Dec. 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05668>.
- [154] P. Dhaver, B. Pletschke, B. Sithole, and R. Govinden, “Isolation, screening, preliminary optimisation and characterisation of thermostable xylanase production under submerged fermentation by fungi in Durban, South Africa,” *Mycology*, vol. 13, no. 4, pp. 271–292, Jun. 2022, doi: <https://doi.org/10.1080/21501203.2022.2079745>.
- [155] N. J. Parry, D. E. Beever, E. Owen, I. Vandenberghe, J.V. Beeumen and M. K. Bhat, “Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable  $\beta$ -glucosidase purified from *Thermoascus aurantiacus*,” *Biochem. J.*, vol. 353, pp. 117–127, 2001.
- [156] M. Shahriarin, M. N. Abd Wahab, A. Ariff, and R. Mohamad, “Screening, Isolation and Selection of Cellulolytic Fungi from Oil Palm Empty Fruit Bunch Fibre,” *Biotechnology (Faisalabad)*, vol. 10, no. 1, pp. 108–113, Jan. 2011, doi: <https://doi.org/10.3923/biotech.2011.108.113>.
- [157] A. F. Nasution, E. Munir, D Suryanto, and Y Yurnaliza, “Potential of cellulolytic fungi isolated from the intestine of *Asiatic rhinoceros* beetle (*Oryctes rhinoceros*),” *IOP conference series. Earth and environmental science*, vol. 1115, no. 1, pp. 012072–012072, Dec. 2022, doi: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1115/1/012072>.
- [158] M. Jeya *et al.*, “Characterization of  $\beta$ -glucosidase from a strain of *Penicillium purpurogenum* KJS506,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 86, no. 5, pp. 1473–1484, Dec. 2009, doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2395-8>.
- [159] Z. K. Bagewadi, S. I. Mulla, and H. Z. Ninnekar, “Optimization of endoglucanase production from *Trichoderma harzianum* strain HZN11 by central composite design under response surface methodology,” *Biomass Conversion and Biorefinery*, vol. 8, no. 2, pp. 305–316, Aug. 2018, doi: <https://doi.org/10.1007/s13399-017-0285-3>.
- [160] E. C. Bonfá, M. M. de Souza Moretti, E. Gomes, and G. O. Bonilla-Rodriguez, “Biochemical characterization of an isolated 50 kDa beta-glucosidase from the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* M.7.7,” *Biocatalysis and*

- Agricultural Biotechnology*, vol. 13, pp. 311–318, Jan. 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.01.008>.
- [161] N. F.L. Garcia, F. R. S. Santos, D. A. Bocchini, M. F. Paz, G. G. Fonseca, R. S. R. Leite, “Catalytic properties of cellulases and hemicellulases produced by *Lichtheimia ramosa*: Potential for sugarcane bagasse saccharification,” *Industrial Crops and Products*, vol. 122, pp. 49–56, Oct. 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.049>.
- [162] E. da S. Martins, E. Gomes, R. da S. R. B. Junior, “Production of cellulases by *Thermomucor indicae-seudaticae*: characterization of a thermophilic  $\beta$ -glucosidase,” *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, vol. 49, no. 8, pp. 830–836, Jul. 2019, doi: <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1625060>.
- [163] U. R. Ezeilo, C. T. Lee, F. Huyop, I. I. Zakaria, and R. A. Wahab, “Raw oil palm frond leaves as cost-effective substrate for cellulase and xylanase productions by *Trichoderma asperellum* UC1 under solid-state fermentation,” *Journal of Environmental Management*, vol. 243, pp. 206–217, Aug. 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.04.113>.
- [164] S. Kshirsagar, P. Waghmare, G. Saratale, M. Kurade, and S. Govindwar, “Composition of Synthesized Cellulolytic Enzymes Varied with the Usage of Agricultural Substrates and Microorganisms,” *Applied biochemistry and biotechnology*, vol. 191, no. 4, pp. 1695–1710, Mar. 2020, doi: <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03297-8>.
- [165] U. R. Ezeilo, R. A. Wahab, and N. A. Mahat, “Optimization studies on cellulase and xylanase production by *Rhizopus oryzae* UC2 using raw oil palm frond leaves as substrate under solid state fermentation,” *Renewable Energy*, vol. 156, pp. 1301–1312, Aug. 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.11.149>.
- [166] F. A. Santos, L. C. T. de Carvalho-Gonçalves, A. L. de C. Cardoso-Simões, and S. F. de M. Santos, “Evaluation of the production of cellulases by *Penicillium* sp. FSDE15 using corncob and wheat bran as substrates,” *Bioresource Technology Reports*, vol. 14, p. 100648, Jun. 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100648>.
- [167] A. Peshin and J. M. S. Mathur, “Purification and characterization of  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus niger* strain 322,” *Letters in Applied Microbiology*, vol. 28, no. 5, pp. 401–404, May 1999, doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00533.x>.

- [168] M. Fadel, "Production Physiology of Cellulases and  $\beta$ -glucosidase Enzymes of *Aspergillus niger* Grown under Solid State Fermentation Conditions," *Journal of Biological Sciences*, vol. 1, no. 5, pp. 401–411, May 2001, doi: <https://doi.org/10.3923/jbs.2001.401.411>.
- [169] M. Abdel-Sater, N. Hussein, N. Fetyan, and S. A. Gad, "Immobilization of Cellulases Produced by *Penicillium brevicompactum* AUMC 10987, using Cross-Linkage, Chitosan-Coating and Encapsulation," *Catrina*, vol. 18, no. 1, pp. 139–149, Mar. 2019, doi: <https://doi.org/10.21608/cat.2019.28624>.
- [170] A. Watanabe, M. Suzuki, S. Ujiie, and K. Gomi, "Purification and enzymatic characterization of a novel  $\beta$ -1,6-glucosidase from *Aspergillus oryzae*," *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 121, no. 3, pp. 259–264, Mar. 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.07.011>.
- [171] L. Bešić, A. Ašić, I. Muhović, S. Dogan, and Y. Turan, "Purification and Characterization of  $\beta$ -Glucosidase from *Brassica oleracea*," *Journal of Food Processing and Preservation*, vol. 41, no. 2, p. e12764, Apr. 2016, doi: <https://doi.org/10.1111/jfpp.12764>.
- [172] G. Narasimha, A. Sridevi, G. Ramanjaneyulu, and B. Rajasekhar Reddy, "Purification and Characterization of  $\beta$ -Glucosidase from *Aspergillus niger*," *International Journal of Food Properties*, vol. 19, no. 3, pp. 652–661, May 2015, doi: <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1023398>
- [173] S. G. da Costa *et al.*, "*Penicillium citrinum* UFV1  $\beta$ -glucosidases: purification, characterization, and application for biomass saccharification," *Biotechnology for Biofuels*, vol. 11, no. 1, Aug. 2018, doi: <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1226-5>.
- [174] A. Karnchanatat, A. Petsom, P. Sangvanich, J. Piaphukiew, A. J.S. Whalley, C. D. Reynolds and P. Sihanonth, "Purification and biochemical characterization of an extracellular  $\beta$ -glucosidase from the wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzii*" (Ehrenb.:Fr.) *Rehm FEMS Microbiol Lett.* vol.270, pp. 162–170, (2007)
- [175] C. Huang *et al.*, "Production, immobilization and characterization of beta-glucosidase for application in cellulose degradation from a novel *Aspergillus versicolor*," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 177, pp. 437–446, Apr. 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.154>.
- [176] Y. Qin, Q. Li, F. Luo, Y. Fu, and H. He, "One-step purification of two novel thermotolerant  $\beta$ -1,4-glucosidases from a newly isolated strain of *Fusarium*

- chlamydosporum* HML278 and their characterization,” *AMB Express*, vol. 10, no. 1, Oct. 2020, doi: <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01116-1>.
- [177] D. H. El-Ghonemy, “Optimization of extracellular ethanol-tolerant  $\beta$ -glucosidase production from a newly isolated *Aspergillus* sp. DHE7 via solid state fermentation using jojoba meal as substrate: purification and biochemical characterization for biofuel preparation,” *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, vol. 19, no. 1, Mar. 2021, doi: <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00144-z>.
- [178] N. J. Parry, D. E. Beever, E. Owen, I. Vandenberghe, J. V. Beeumen, and M. K. Bhat, “Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable  $\beta$ -glucosidase purified from *Thermoascus aurantiacus*,” *Biochemical Journal*, vol. 353, no. 1, pp. 117–127, Dec. 2001, doi: <https://doi.org/10.1042/bj3530117>.
- [179] H. He, Y. Qin, G. Chen, N. Li, and Z. Liang, “Two-Step Purification of a Novel  $\beta$ -Glucosidase with High Transglycosylation Activity and Another Hypothetical  $\beta$ -Glucosidase in *Aspergillus oryzae* HML366 and Enzymatic Characterization,” *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 169, no. 3, pp. 870–884, Jan. 2013, doi: <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9936-9>.
- [180] P. Asha, J. Divya, and I.S. Bright Singh, “Purification and characterisation of processive-type endoglucanase and  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus ochraceus* MTCC 1810 through saccharification of delignified coir pith to glucose,” *Bioresource technology*, vol. 213, pp. 245–248, Aug. 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.013>.
- [181] R. N. Florindo *et al.*, “Structural insights into  $\beta$ -glucosidase transglycosylation based on biochemical, structural and computational analysis of two GH1 enzymes from *Trichoderma harzianum*,” *New Biotechnology*, vol. 40, no. Pt B, pp. 218–227, Jan. 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.08.012>.
- [182] P. S. Santa-Rosa *et al.*, “Production of thermostable  $\beta$ -glucosidase and CMCCase by *Penicillium* sp. LMI01 isolated from the Amazon region,” vol. 31, pp. 84–92, Jan. 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.11.005>
- [183] Jong Min Oh, Jae Pil Lee, Seung Cheol Baek, Yang Do Jo, and H. Kim, “Characterization of Three Extracellular  $\beta$  -Glucosidases Produced by a Fungal Isolate *Aspergillus* sp. YDJ14 and Their Hydrolyzing Activity for a Flavone Glycoside,” *Journal of microbiology and biotechnology*, vol. 28, no. 5, pp. 757–764, May 2018, doi: <https://doi.org/10.4014/jmb.1802.02051>.

- [184] P. Cao, L. Wang, Y. Wang, N. Zhou, and Y. Chen, “Alkali-tolerant  $\beta$ -glucosidase produced by newly isolated *Aspergillus fumigatus* WL002 from rotten wood,” *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 105, pp. 276–282, Nov. 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.09.010>.
- [185] M. Su *et al.*, “Production of  $\beta$ -glucosidase from okara fermentation using *Kluyveromyces marxianus*,” *Journal of Food Science and Technology*, vol. 58, no. 1, pp. 366–376, Jul. 2020, doi: <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04550-y>.
- [186] M. I. Infanzón-Rodríguez, J. A. Ragazzo-Sánchez, S. D.Moral, M. Calderón-Santoyo, and M. G. Aguilar-Uscanga, “Production and characterization of an enzyme extract with cellulase activity produced by an indigenous strain of *Fusarium verticillioides* ITV03 using sweet sorghum bagasse,” *Biotechnology letters*, vol. 42, no. 11, pp. 2271–2283, Jun. 2020, doi: <https://doi.org/10.1007/s10529-020-02940-y>.
- [187] A. P. Garbin *et al.*, “ $\beta$ -glucosidase from thermophilic fungus *Thermoascus crustaceus*: production and industrial potential,” *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, vol. 93, Mar. 2021, doi: <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120191349>.
- [188] Alex *et al.*, “Production, concentration and partial characterization of an enzymatic extract produced by an *Aspergillus niger* mutant in solid state fermentation,” *Preparative biochemistry & biotechnology*, vol. 52, no. 10, pp. 1109–1118, Feb. 2022, doi: <https://doi.org/10.1080/10826068.2022.2033989>.
- [189] B. Singh, A. Bala, Anu, Alokika, V. Kumar, and D. Singh, “Biochemical properties of cellulolytic and xylanolytic enzymes from *Sporotrichum thermophile* and their utility in bioethanol production using rice straw,” *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, vol. 52, no. 2, pp. 197–209, May 2022, doi: <https://doi.org/10.1080/10826068.2021.1925911>.
- [190] C. A. S. Jéssica, L. G.-L. André, P. da S. B. Elba, R. R. C. Rosalie, and P. do N. Rodrigo, “*Trichoderma atroviride* 102C1: A promising mutant strain for the production of  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -xylosidase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase activities using agroindustrial by-products,” *African Journal of Biotechnology*, vol. 17, no. 38, pp. 1220–1231, Sep. 2018, doi: <https://doi.org/10.5897/ajb2018.16612>.
- [191] A. Ratuchne and A. Knob, “A new and unusual  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus fumigatus*: Catalytic activity at high temperatures and glucose tolerance,” *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, vol. 35, pp. 102064–102064, Aug. 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102064>.

- [192] J. Lin, B. Pillay, and S. Singh, “Purification and biochemical characteristics of  $\beta$ -D-glucosidase from a thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*–SSBP,” *Biotechnology and applied biochemistry online/Biotechnology and applied biochemistry*, vol. 30, no. 1, pp. 81–87, Aug. 1999, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1470-8744.1999.tb01163.x>.
- [193] F. Bhiri, S. E. Chaabouni, F. Limam, R. Ghrir, and N. Marzouki, “Purification and Biochemical Characterization of Extracellular  $\beta$ -Glucosidases from the Hypercellulolytic Pol6 Mutant of *Penicillium occitanis*,” *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 149, no. 2, pp. 169–182, Mar. 2008, doi: <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8146-y>.
- [194] O. G. Korotkova *et al.*, “Isolation and properties of fungal  $\beta$ -glucosidases,” *Biochemistry*, vol. 74, no. 5, pp. 569–577, May 2009, doi: <https://doi.org/10.1134/s0006297909050137>.
- [195] J.-Y. Choi, “Purification and Characterization of an Extracellular  $\beta$ -Glucosidase Produced by *Phoma* sp. KCTC11825BP Isolated from Rotten Mandarin Peel,” *Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 21, no. 5, pp. 503–508, May 2011, doi: <https://doi.org/10.4014/jmb.1102.02014>.
- [196] A. R. Park, J. H. Hong, J. J. Kim, and J. J. Yoon, “Biochemical Characterization of an Extracellular  $\beta$ -Glucosidase from the Fungus, *Penicillium italicum*, Isolated from Rotten Citrus Peel,” *Mycobiology*, vol. 40, no. 3, pp. 173–180, Sep. 2012, doi: <https://doi.org/10.5941/myco.2012.40.3.173>
- [197] G. Ramani, B. Meera, C. Vanitha, M. Rao, and P. Gunasekaran, “Production, Purification, and Characterization of a  $\beta$ -Glucosidase of *Penicillium funiculosum* NCL1,” vol. 167, no. 5, pp. 959–972, Mar. 2012, doi: <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9645-4>
- [198] B. Guo, Y. Amano, and K. Nozaki, “Improvements in Glucose Sensitivity and Stability of *Trichoderma reesei*  $\beta$ -Glucosidase Using Site-Directed Mutagenesis,” *PLoS one*, vol. 11, no. 1, pp. e0147301–e0147301, Jan. 2016, doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147301>.
- [199] L. G. Andrade *et al.*, “Sugarcane bagasse saccharification by purified  $\beta$ -glucosidases from *Chrysosporthe cubensis*,” *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, vol. 12, pp. 199–205, Oct. 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.10.007>
- [200] X. Liu, L. Cao, J. Zeng, Y. Liu, and W. Xie, “Improving the cellobiose-hydrolysis activity and glucose-tolerance of a thermostable  $\beta$ -glucosidase through rational

design,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 136, pp. 1052–1059, Sep. 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.029>

[201] J. Job, A. Abraham, and K. Jayachandran, “Purification and characterization of a highly glucose tolerant  $\beta$ -glucosidase isozyme from *Paecilomyces variotii* MG3,” *Sustainability Agri Food and Environmental Research*, vol. 11, Dec. 2022, doi: <https://doi.org/10.7770/safer.v11i1.2421>.

[202] N. Singh, B. Sithole, A. Kumar, and Roshini Govinden, “Purification and Characterization of a Glucose tolerant  $\beta$ -Glucosidase from a Newly Isolated *Neofusicoccum Parvum* strain F7: Production Optimization using Plackett Burman and Box Behnken,” *Research Square (Research Square)*, Feb. 2023, doi: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2571707/v1>.





# ÖZGEÇMİŞ

## Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Hatice AYDIN

Doğum tarihi ve yeri : Soma/Manisa

e-posta :

## Öğrenim Bilgileri

Derece	Okul/Program	Yıl
Y. Lisans	Balıkesir Üniversitesi/Moleküler Biyoloji ve Genetik	2021-2024
Lisans	Yıldız Teknik Üniversitesi/ Moleküler Biyoloji ve Genetik	2016-2020
Lise	Borsa İstanbul Zeytinburnu Anadolu Lisesi	2012-2015

## Deneyim Bilgileri

İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi 06.01.2020-17.01.2020  
• Moleküler Genetik Laboratuvarı (Staj)

İstanbul Medeniyet Üniversitesi 01.07.2019-29.07.2019  
• Kanser Araştırma ve Hücre Kültürü Laboratuvarı (Staj)

## Burslar

Tübitak 2210-A Yurt İçi Genel Yüksek Lisans Bursu (Tam zamanlı) 2022-2024

## Seminerler ve Sertifikalar

Taramalı Elektron Mikroskobu Sertifikalı Eğitim Programı 16.05.2024-17.05.2024  
Balıkesir Üniversitesi

8. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası Eğitimi 26.04.2024-05.05.2024  
Balıkesir Üniversitesi

Moleküler Biyoloji Genetik Alanında Uluslararası 14.05.2024  
Standartlar Gereklilikler

18. International Molecular Biology and Genetics Winter School 26.03.2021-28.03.2021  
T.C. İstanbul Üniversitesi

Biyoteknoloji V4 Konferansı  
Yıldız Teknik Üniversitesi

26.12.2020-27.12.2020

Biyoteknoloji V3 Konferansı  
Yıldız Teknik Üniversitesi

2019

5. Genetik Günleri  
Yıldız Teknik Üniversitesi

2019

