

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



**FARKLI *ASPERGILLUS* TÜRÜ FUNGUSLARDA SELÜLOZ  
VE HEMİSELÜLOZ PARÇALAYICI ENZİM  
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ASLI TANGÜNÜ**

**BALIKESİR, ARALIK - 2016**

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



**FARKLI *ASPERGILLUS* TÜRÜ FUNGUSLARDA SELÜLOZ  
VE HEMİSELÜLOZ PARÇALAYICI ENZİM  
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ASLI TANGÜNÜ**

**Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Ayşe Dilek AZAZ (Tez Danışmanı)**

**Doç. Dr. Olga SAK**

**Yrd. Doç. Dr. Fevzi UÇKAN**

**BALIKESİR, ARALIK - 2016**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

ASLI TANGÜNÜ tarafından hazırlanan “FARKLI *ASPERGILLUS* TÜRÜ FUNGUSLARDA SELÜLOZ VE HEMİSELÜLOZ PARÇALAYICI ENZİM AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ” adlı tez çalışmasının savunma sınavı tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

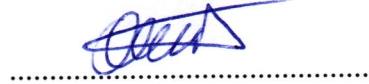
Jüri Üyeleri

İmza

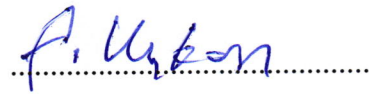
Danışman  
Prof. Dr. Ayşe Dilek AZAZ



Üye  
Doç Dr. Olga SAK



Üye  
Yrd. Doç. Dr. Fevzi UÇKAN



Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Doç. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

**Bu tez çalışması Balıkesir Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP 2014-111 nolu proje ile desteklenmiştir.**

## ÖZET

**FARKLI *ASPERGILLUS* TÜRÜ FUNGUSLARDA SELÜLOZ VE  
HEMİSELÜLOZ PARÇALAYICI ENZİM AKTİVİTELERİNİN  
İNCELENMESİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
ASLI TANGÜNÜ  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. AYŞE DİLEK AZAZ)**

**BALIKESİR, ARALIK - 2016**

Bu çalışmada, Katı Substrat Fermentasyon (KSF) yöntemiyle yetiştirilmiş, *Aspergillus caelatus* NRRL 26107 ve *Aspergillus oryzae* NRRL 5590' dan  $\beta$ -glukosidaz enzimi saflaştırılmış ve biyokimyasal karakterizasyonu yapılmıştır.

Birçok biyoteknolojik uygulamalarda ticari öneme sahip,  $\beta$ -glukosidaz enzimi, öncelikli olarak buğday samanının KSF ortamında kullanılmasıyla yetiştirilen *A.caelatus* (KSF ortamının nemlendirme sıvısı pH 7,0 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, optimum sıcaklık 30°C ve inkübasyon süresi 7 gün) ve *A.oryzae* (KSF ortamının nemlendirme sıvısı pH 6,5 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponu ile nemlendirilerek, optimum sıcaklık 25°C ve inkübasyon süresi 7 gün) suşlarından elde edilmiştir.  $\beta$ -glukosidaz enzimi, amonyum sülfat çöktürmesi ve Sepharose-4B-L-Tyrosine-1-Naphylamine kullanılarak Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile iki basamakta saflaştırılmıştır.

Çalışmamızda,  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi, *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranosit (*p*NPG) substratı kullanılarak belirlenmiştir. *A.caelatus*  $\beta$ -glukosidaz (Ac $\beta$ ) enzimi %6,330 verimle 31,196 kat; *A.oryzae*  $\beta$ -glukosidaz enzimi (Ao $\beta$ ) ise %4,350 verimle 5,855 kat saflaştırılmıştır. SDS-PAGE ve Native-PAGE ile Ac $\beta$  ve Ao $\beta$  enzimlerinin molekül ağırlıkları sırasıyla 30 kDa ve 31 kDa olarak belirlenmiş olup monomerik yapıda oldukları tespit edilmiştir. Ac $\beta$  ve Ao $\beta$  enzimlerin optimum pH değerleri sırasıyla 6,00 ve 5,25; optimum sıcaklık değerleri ise 65°C olarak saptanmıştır.

Ac $\beta$  enzimin K<sub>m</sub> ve V<sub>max</sub> değerleri sırasıyla 0,19 mM ve 322,58 EU; Ao $\beta$  enziminin ise 0,363 mM ve 454,54 EU olarak belirlenmiştir. Ayrıca  $\beta$ -glukosidaz inhibitörlerinden olan D(+)glukoz ve  $\delta$ -glukonolaktonun enzimler üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Ac $\beta$  enzimi D(+)glukoz ve  $\delta$ -glukonolakton inhibitörü sırasıyla yarışmasız ve yarışmalı olarak, Ao $\beta$  enzimini ise yarışmalı olarak inhibe ettikleri belirlenmiştir. Ac $\beta$  enzimin D(+)glukoz inhibitörü ile IC<sub>50</sub> ve K<sub>i</sub> değerleri 7,65x10<sup>-2</sup>mM ve 1,42x10<sup>-1</sup>±7,31x10<sup>-2</sup>;  $\delta$ -glukonolakton inhibitörü ile 7,31x10<sup>-4</sup> mM ve 2,98x10<sup>-5</sup>±1,35x10<sup>-5</sup> olarak; Ao $\beta$  enziminin IC<sub>50</sub> ve K<sub>i</sub> değerleri ise D(+)glukoz inhibitörü ile 8,80x10<sup>-2</sup>mM ve 9,58x10<sup>-4</sup>±8,02x10<sup>-5</sup>;  $\delta$ -glukonolakton inhibitörü ile 4,00x10<sup>-4</sup> mM ve 2,99x10<sup>-5</sup>±9,00x10<sup>-8</sup>, olarak hesaplanmıştır.

**ANAHTAR KELİMELER:** *Aspergillus caelatus*, *Aspergillus oryzae*,  $\beta$ -glukosidaz, Katı Substrat Fermentasyonu, Optimizasyon, Saflaştırma, Biyokimyasal, Elektroforetik ve Kinetik Özellikler

## ABSTRACT

### SCREENING OF CELLULOSE AND HEMICELLULOSE ENZYME ACTIVITIES IN DIFFERENT *ASPERGILLUS* SPECIES

MSC THESIS

ASLI TANGÜNÜ

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. AYŞE DİLEK AZAZ )

BALIKESİR, DECEMBER 2016

In this study, purification and biochemical characterization of  $\beta$ -glucosidase enzyme purified from *Aspergillus caelatus* NRRL26107 and *Aspergillus oryzae* NRRL5590 growth in solid state fermentation (SSF) was performed.

$\beta$ -glucosidase enzyme that has many biotechnological applications, was primarily obtained from *A.caelatus* (SSF conditions moistening  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7.0, temperature 30°C and incubated 7 days) and *A.oryzae* (SSF conditions moistening  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 6.5, temperature 25°C and 7 days) grown in SSF using wheat straw.  $\beta$ -glucosidase enzyme was purified using two-step procedures, namely ammonium sulfate precipitation and Sepharose-4B-L-Tyrosine-1-Naphthylamine Hydrophobic Interaction Chromatography.

In our study, activity of  $\beta$ -glucosidase enzyme was determined by using para-Nitrophenyl-beta-D-glucopyranoside (*p*NPG) substrate. The purification rate was found 31.196 fold with yield of 6.330% for the obtained  $\beta$ -glucosidase from *A.caelatus* (Ac $\beta$ ) and 5.5855, 4.350% yield for the obtained  $\beta$ -glucosidase from *A.oryzae* (Ao $\beta$ ). Molecular weights of Ac $\beta$  and Ao $\beta$  enzymes were determined 30kDa and 31kDa, respectively, using SDS and Native PAGE analysis, and found to be in monomeric structure. Optimum pH values of Ac $\beta$  and Ao $\beta$  enzymes were 6.00 and 5.25, respectively, optimum temperature values were determined as 65°C.

The  $K_m$  and  $V_{max}$  values of Ac $\beta$  enzyme were determined as 0.19mM and 322.58EU, respectively; while for the Ao $\beta$  enzyme 0.363mM and 454.545EU. The effect of the D(+)glucose and  $\delta$ -glukonolactone which is a  $\beta$ -glukosidaz inhibitors on enzymes were also investigated by using *p*NPG. While D(+)glucose and  $\delta$ -gluconalactone inhibitors were inhibited Ac $\beta$  enzyme noncompetitively and competitively, inhibited Ao $\beta$  enzyme competitively. The  $IC_{50}$  and  $K_i$  values of Ac $\beta$  enzyme for D(+)glucose inhibitor were determined  $7.65 \times 10^{-2}$ mM and  $1.42 \times 10^{-1} \pm 7.31 \times 10^{-2}$ , for the  $\delta$ -gluconalactone  $7.31 \times 10^{-4}$ mM and  $2.98 \times 10^{-5} \pm 1.35 \times 10^{-5}$  respectively. The  $IC_{50}$  and  $K_i$  values of Ao $\beta$  enzyme for D(+)glucose were determined as  $8,80.10^{-2}$ mM and  $9.58 \times 10^{-4} \pm 8.02 \times 10^{-5}$ , whereas for the  $\delta$ -gluconalactone  $4.00 \times 10^{-4}$ mM and  $2.99 \times 10^{-5} \pm 9.00 \times 10^{-8}$ , respectively.

**KEYWORDS:** *Aspergillus caelatus*, *Aspergillus oryzae*,  $\beta$ -glukosidase, Solid Substrate Fermentation, Optimization, Purification, Biochemical, Electrophoretic and Kinetic Properties

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ .....	viii
SEMBOL LİSTESİ.....	x
ÖNSÖZ.....	xi
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1 Enzimlerin Çalışma Prensipleri.....	3
1.2 Enzimlerin Adlandırılması .....	3
1.3 Selülozlar .....	4
1.4 $\beta$ -glukosidazlar .....	7
1.5 Katı Substrat Fermentasyonu (KSF) .....	8
1.6 Selüloz ve Hemiselüloz.....	9
1.7 <i>Aspergillus</i> Türü Fungusların Genel Özellikleri .....	10
1.8 Saflaştırma.....	12
1.9 Selülozların Kullanım Alanları.....	13
<b>2. MATERYAL VE METOT .....</b>	<b>16</b>
2.1 Materyal .....	16
2.1.1 $\beta$ -glukosidaz Aktivitesine Sahip Mikrofungusların Belirlenmesi ....	16
2.1.2 Deneylerde Kullanılan <i>Aspergillus</i> Türleri ve Genel Özellikleri ....	16
2.1.2.1 <i>Aspergillus oryzae</i> (Ahlburg) Cohn1884.....	16
2.1.2.2 <i>Aspergillus caelatus</i> HornB.W.(1997).....	17
2.1.3 Kullanılan Tamponlar ve Çözeltiler .....	18
2.1.3.1 Mikrofungus Kültürlerini Geliştirmede Kullanılan Besiyeri.....	18
2.1.3.2 Hidroliz Zonu Belirlenirken Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	19
2.1.3.3 Katı Besiyerinde Geliştirilen Mikrofungusların Sıvı Besiyerine Aktarılmasında Kullanılan Çözeltinin Hazırlanması.....	19
2.1.3.4 KSF Ortamında Nemlendirme Sıvısı Olarak Kullanılacak Tampon Çözeltilerin Hazırlanması.....	20
2.1.3.5 $\beta$ -glukosidaz Aktivitesinin Belirlenmesinde Kullanılan Substrat Çözeltisi ve Tampon Çözeltilerin Hazırlanması.....	20
2.1.3.6 Lowry Yöntemiyle Proteinlerin Kantitatif Tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	21
2.1.3.7 Hidrofobik Jele Bağlanmış $\beta$ -glukosidaz Enziminin Elüsyonu İçin Kullanılan Çözeltiler.....	22
2.1.3.8 SDS-PAGE Tekniğinde Kullanılan Çözeltiler.....	22
2.1.3.9 Native-PAGE Tekniğinde Kullanılan Çözeltiler.....	23
2.2 Metot .....	25
2.2.1 $\beta$ -glukosidaz Aktivitesine Sahip Olan Mikrofungusların Belirlenmesi.....	25
2.2.2 Mikrofungusların Üretimi ve Spor Eldesi .....	25

2.2.3	Katı Substrat Fermentasyon (KSF) Ortamının Hazırlanması .....	26
2.2.4	Katı Substrat Fermentasyonu (KSF) Kültür Ortamına Ekim ve Kısmi Saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz Enziminin Eldesi .....	26
2.2.5	Mikrofungusların Katı Substrat Fermentasyon Ortamında Geliştirilme Koşullarının Üretilen $\beta$ -glukosidaz Sentezi Üzerine Etkisi .....	27
2.2.5.1	Optimum pH ve Nemlendirme Sıvılarının Belirlenmesi .....	27
2.2.5.2	Optimum İnkübasyon Sıcaklığının Belirlenmesi .....	27
2.2.5.3	Optimum İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi .....	28
2.2.6	$\beta$ -glukosidaz Aktivitesinin Belirlenmesi .....	28
2.2.7	Protein Tayini .....	29
2.2.7.1	Kalitatif Protein Tayini .....	29
2.2.7.2	Lowry Metodu İle Proteinlerin Kantitatif Tayini .....	30
2.2.7.3	BSA Standart Grafiğinin Hazırlanması .....	31
2.2.8	Enzimin Saflaştırılması .....	32
2.2.8.1	Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi .....	32
2.2.8.2	Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile $\beta$ -glukosidaz Enziminin Saflaştırılması .....	33
2.2.9	Doğal/Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (Native/SDS-PAGE) ile $\beta$ -glukosidaz Enziminin Saflığı ve Alt Birimlerinin Belirlenmesi .....	33
2.2.9.1	SDS-PAGE ile $\beta$ -glukosidaz Enziminin Saflığının ve Alt Birimlerinin Kontrolü .....	34
2.2.9.2	Native-PAGE ile $\beta$ -glukosidaz Enziminin Saflığının ve Alt Birimlerinin Kontrolü .....	35
2.2.10	Saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi .....	36
2.2.10.1	Saflaştırılmış Olan $\beta$ -glukosidaz Enziminin Optimum pH Değerinin Belirlenmesi .....	36
2.2.10.2	Saflaştırılmış Olan $\beta$ -glukosidaz Enziminin Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi .....	36
2.2.10.3	Saflaştırılmış Olan $\beta$ -glukosidaz Enziminin Termal Kararlılığının Belirlenmesi .....	37
2.2.10.4	$\beta$ -glukosidaz Enziminin $p$ NPG Substratına Karşı $K_M$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Belirlenmesi .....	37
2.2.10.5	İnhibitörlerin $IC_{50}$ Değerlerinin Belirlenmesi .....	38
2.2.10.6	İnhibitörlerin $K_i$ Değerlerinin Bulunması .....	38
2.2.11	Kullanılan Alet ve Cihazlar .....	39
<b>3.</b>	<b>BULGULAR .....</b>	<b>41</b>
3.1	$\beta$ -glukosidaz Aktivitesine Sahip Mikrofungusların Belirlenmesi .....	41
3.2	Mikrofungusların Katı Substrat Fermentasyon Ortamında Geliştirilme Koşullarının Üretilen $\beta$ -glukosidaz Sentezi Üzerine Etkisi .....	41
3.2.1	Optimum pH ve Nemlendirme Sıvılarının Belirlenmesi .....	41
3.2.2	Optimum İnkübasyon Sıcaklığının Belirlenmesi .....	43
3.2.3	Optimum İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi .....	44
3.3	$\beta$ -glukosidaz Enziminin Saflaştırılması .....	45
3.3.1	Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi .....	45
3.3.2	Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile $\beta$ -glukosidaz Enziminin Saflaştırılması .....	48



3.4	$\beta$ -glukosidaz Enziminin Native/SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi İle Saflığının ve Alt Birimlerinin Kontrolü.....	54
3.5	Saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi .....	55
3.5.1	Saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz Enziminin Optimum pH Değerinin Belirlenmesi .....	55
3.5.2	Saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz Enziminin Aktivite Gösterdiği Maksimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi.....	57
3.5.3	Saf $\beta$ -glukosidaz Enziminin Termal Kararlılığı.....	58
3.5.4	$\beta$ -glukosidaz Enziminin <i>p</i> NPG Substratına Karşı $K_M$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Belirlenmesi.....	59
3.5.5	<i>Aspergillus caelatus</i> NRRL 26107 ve <i>Aspergillus oryzae</i> NRRL 5590' dan Saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz Enzimlerinin İnhibitörü Olan D(+)glukozun $IC_{50}$ Değerinin Belirlenmesi.....	64
3.5.6	<i>Aspergillus caelatus</i> NRRL 26107 ve <i>Aspergillus oryzae</i> NRRL 5590' dan Saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz Enzimlerinin İnhibitörü Olan $\delta$ -glukonolaktonun $IC_{50}$ Değerinin Belirlenmesi .....	68
3.5.7	<i>Aspergillus caelatus</i> NRRL 26107 ve <i>Aspergillus oryzae</i> NRRL 5590' dan Saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz Enzimlerinin İnhibitörü Olan D(+)glukozun İnhibisyon Tipinin ve $K_i$ Değerlerinin Belirlenmesi.....	72
3.5.8	<i>Aspergillus caelatus</i> NRRL 26107 ve <i>Aspergillus oryzae</i> NRRL 5590' dan Saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz Enzimlerinin İnhibitörü Olan $\delta$ -glukonolaktonun İnhibisyon Tipinin ve $K_i$ Değerlerinin Belirlenmesi.....	77
<b>4.</b>	<b>TARTIŞMA SONUÇ .....</b>	<b>85</b>
<b>5.</b>	<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>97</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 1.1 Selülozun enzimatik olarak parçalanması .....	6
Şekil 1.2 Sellobiyozun $\beta$ -glukozidaz enzimi tarafından hidrolizi.....	7
Şekil 1.3 Selülozun yapısı.....	10
Şekil 2.1 (a) <i>A.oryzae</i> NRRL 5590 petri (10x10); (b) <i>A. oryzae</i> NRRL5590 preparat (10x40) .....	17
Şekil 2.2 (a) <i>A.caelatus</i> NRRL26107 petri (10x10); (b) <i>A. caelatus</i> NRRL26107 preparat (10x40) .....	17
Şekil 2.3 Enzim aktivite tayininde kullanılan 210 $\mu$ L hacimli pNPG standart grafiği.....	29
Şekil 2.4 Lowry yöntemi ile protein miktarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik.....	31
Şekil 3.1 (a) <i>Aspergillus oryzae</i> NRRL 5590; (b) <i>Aspergillus caelatus</i> NRRL26107.....	41
Şekil 3.2 Farklı pH ve nemlendirme sıvılarının KSF kültür ortamında geliştirilen <i>A.caelatus</i> NRRL 26107 ve <i>A. oryzae</i> NRRL 5590' nın $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesine etkisi .....	42
Şekil 3.3 Farklı inkübasyon sıcaklıklarının KSF kültür ortamında geliştirilen <i>A.caelatus</i> NRRL 26107 ve <i>A.oryzae</i> NRRL 5590' nın $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi etkisi .....	44
Şekil 3.4 Farklı inkübasyon sürelerinin KSF kültür ortamında geliştirilen <i>A.caelatus</i> NRRL26107 ve <i>A. oryzae</i> NRRL 5590' nın $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesine etkisi .....	45
Şekil 3.5 <i>A.caelatus</i> NRRL 26107' un amonyum sülfat aralığının tespiti için kullanılan grafik .....	46
Şekil 3.6 <i>A.oryzae</i> NRRL 5590' nın amonyum sülfat aralığının tespiti için kullanılan grafik .....	48
Şekil 3.7 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi kullanılarak saflaştırılan <i>A.caelatus</i> NRRL 26107' dan elde edilen $\beta$ -glukosidaz enziminin elüsyon grafiği.....	49
Şekil 3.8 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi kullanılarak saflaştırılan <i>A.oryzae</i> NRRL 5590' dan elde edilen $\beta$ -glukosidaz enziminin elüsyon grafiği.....	52
Şekil 3.9 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile saflaştırılan <i>A.caelatus</i> NRRL 26107' dan elde edilen $\beta$ -glukosidaz enziminin Poliakrilamid Jel Elektroforez görüntüleri (a): SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi, (b): Native-Poliakrilamid Jel Elektroforezi .....	54
Şekil 3.10 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile saflaştırılan <i>A.oryzae</i> NRRL 5590' dan elde edilen $\beta$ -glukosidaz enziminin Poliakrilamid Jel Elektroforez görüntüleri (a) SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi, (b) Native-Poliakrilamid Jel Elektroforezi .....	55
Şekil 3.11 <i>A.caelatus</i> NRRL 26107' dan elde edilen saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz enziminin optimum pH grafiği .....	56
Şekil 3.12 <i>A.oryzae</i> NRRL 5590' dan elde edilen saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz enziminin optimum pH grafiği.....	56

<b>Şekil 3.13</b> <i>A.caelatus</i> NRRL 26107' dan elde edilip saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz enziminin sıcaklık grafiği .....	57
<b>Şekil 3.14</b> <i>A.oryzae</i> NRRL 5590' dan elde edilip saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz enziminin sıcaklık grafiği .....	57
<b>Şekil 3.15</b> <i>A.caelatus</i> NRRL 26107' dan elde edilip saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz enziminin termal kararlılık grafiği.....	58
<b>Şekil 3.16</b> <i>A.oryzae</i> NRRL 5590' dan elde edilip saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz enziminin termal kararlılık grafiği.....	59
<b>Şekil 3.17</b> <i>A.caelatus</i> NRRL 26107' dan elde edilip saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz enziminin $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerini gösteren Lineweaver-Burk Grafiği.....	63
<b>Şekil 3.18</b> <i>A.oryzae</i> NRRL 5590' dan elde edilip saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz enziminin $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerini gösteren Lineweaver-Burk Grafiği.....	63
<b>Şekil 3.19</b> <i>A.caelatus</i> NRRL 26107' dan elde edilip saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz enziminin inhibitörü D(+)-glukozun $IC_{50}$ değeri grafiği .....	67
<b>Şekil 3.20</b> <i>A.oryzae</i> NRRL 5590' dan elde edilip saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz enziminin inhibitörü D(+)-glukozun $IC_{50}$ değeri grafiği .....	67
<b>Şekil 3.21</b> <i>A.caelatus</i> NRRL 26107' dan elde edilip saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz enziminin inhibitörü $\delta$ -glukonolaktonun $IC_{50}$ değeri grafiği .....	71
<b>Şekil 3.22</b> <i>A.oryzae</i> NRRL 5590' dan elde edilip saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz enziminin inhibitörü $\delta$ -glukonolaktonun $IC_{50}$ değeri grafiği .....	71
<b>Şekil 3.23</b> <i>A.caelatus</i> NRRL 26107' dan elde edilip saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz enzimine, <i>p</i> NPG substratı varlığında, D(+)-glukozun inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği .....	76
<b>Şekil 3.24</b> <i>A.oryzae</i> NRRL 5590' dan elde edilip saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz enzimine, <i>p</i> NPG substratı varlığında, D(+)-glukozun inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği .....	77
<b>Şekil 3.25</b> <i>A.caelatus</i> NRRL 26107' dan elde edilip saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz enzimine, <i>p</i> NPG substratı varlığında, $\delta$ -glukonolaktonun inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği .....	83
<b>Şekil 3.26</b> <i>A.oryzae</i> NRRL 5590' dan elde edilip saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz enzimine, <i>p</i> NPG substratı varlığında, $\delta$ -glukonolaktonun inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği .....	84

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 2.1:</b> SDS-PAGE' de kullanılan ayırma ve yığıma jellerinin hazırlanışı.....	23
<b>Tablo 2.2:</b> Native-PAGE' de kullanılan ayırma ve yığıma jellerinin hazırlanışı.....	24
<b>Tablo 3.1:</b> Farklı pH ve nemlendirme sıvılarının KSF kültür ortamında geliştirilen <i>A.caelatus</i> NRRL 26107 ve <i>A. oryzae</i> NRRL 5590' nın $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesine etkisi .....	42
<b>Tablo 3.2:</b> Farklı inkübasyon sıcaklıklarının KSF kültür ortamında geliştirilen <i>A.caelatus</i> NRRL 26107 ve <i>A.oryzae</i> NRRL 5590' nın $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesine etkisi .....	43
<b>Tablo 3.3:</b> Farklı inkübasyon sürelerinin KSF kültür ortamında geliştirilen <i>A.caelatus</i> NRRL26107 ve <i>A.oryzae</i> NRRL 5590' nın $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesine etkisi .....	44
<b>Tablo 3.4:</b> <i>A.caelatus</i> NRRL 26107' dan elde edilen kısmi saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz enziminin amonyum sülfat çöktürme yöntemi sonucu elde edilen değerleri .....	46
<b>Tablo 3.5:</b> <i>A.oryzae</i> NRRL 5590' dan elde edilen kısmi saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz enziminin amonyum sülfat çöktürme yöntemi sonucu elde edilen değerleri .....	47
<b>Tablo 3.6:</b> <i>A.caelatus</i> NRRL 26107' dan elde edilen $\beta$ -glukosidaz enziminin saflaştırma tablosu.....	50
<b>Tablo 3.7:</b> <i>A.oryzae</i> NRRL 5590' dan elde edilen $\beta$ -glukosidaz enziminin saflaştırma tablosu.....	53
<b>Tablo 3.8:</b> <i>A.caelatus</i> NRRL 26107' dan elde edilip saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz enziminin $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri.....	61
<b>Tablo 3.9:</b> <i>A.oryzae</i> NRRL 5590' dan elde edilip saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz enziminin $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri.....	62
<b>Tablo 3.10:</b> <i>A.caelatus</i> NRRL 26107' dan elde edilip saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz enziminin $K_M$ , $V_{max}$ ve $V_{max} / K_M$ değerleri.....	63
<b>Tablo 3.11:</b> <i>A.oryzae</i> NRRL 5590' dan elde edilip saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz enziminin $K_M$ , $V_{max}$ ve $V_{max} / K_M$ değerleri.....	64
<b>Tablo 3.12:</b> <i>A.caelatus</i> NRRL 26107' dan elde edilip saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren D(+) <i>glukozun</i> , $IC_{50}$ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar .....	65
<b>Tablo 3.13:</b> <i>A.oryzae</i> NRRL 5590' dan elde edilip saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren D(+) <i>glukozun</i> $IC_{50}$ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar.....	66

<b>Tablo 3.14:</b> <i>A. caelatus</i> NRRL 26107' dan elde edilip saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren $\delta$ -glukonolaktonun IC <sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	69
<b>Tablo 3.15:</b> <i>A. oryzae</i> NRRL 5590' dan elde edilip saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren $\delta$ -glukonolaktonun IC <sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar .....	70
<b>Tablo 3.16:</b> <i>A. caelatus</i> NRRL 26107' dan elde edilip saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren D(+) $\beta$ -glukozun K <sub>i</sub> değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	73
<b>Tablo 3.17:</b> <i>A. oryzae</i> NRRL 5590' dan elde edilip saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren D(+) $\beta$ -glukozun K <sub>i</sub> değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	74
<b>Tablo 3.18:</b> <i>A. caelatus</i> NRRL 26107' dan elde edilip saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren $\delta$ -glukonolakton K <sub>i</sub> değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	79
<b>Tablo 3.19:</b> <i>A. oryzae</i> NRRL 5590' dan Elde Edilip saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren $\delta$ -glukonolakton K <sub>i</sub> değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	80

## SEMBOL LİSTESİ

g	Gram
mM	Milimolar
$\mu$ L	Mikrolitre ( $10^{-6}$ litre)
$\mu$ m	Mikrometre ( $10^{-6}$ metre)
$\mu$ g	Mikrogram ( $10^{-6}$ gram)
rpm	Rotary Per Minute
KSF	Katı Substrat Fermentasyonu
CMC	Karboksimetil Selüloz
$\beta$	Beta
$^{\circ}$ C	Santigrat Derece
<i>p</i> NPG	<i>p</i> -Nitrophenyl $\beta$ -D-glucopyranoside
EU	Enzim Ünitesi
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TEMED	N,N,N', N', -tetrametil etilen diamin
APS	Amonyum Persülfat
BSA	Bovin Serum Albumin (Sığır Serum Albumini)
[S]	Substrat Konsantrasyonu
[I]	İnhibitör Konsantrasyonu
$K_M$	Michaelis-Menten Sabiti
$V_{max}$	Maksimum Hız
IC50	İnhibe Edici Konsantrasyonun Yüzdesi

## ÖNSÖZ

Tez çalışmamın planlanmasında, araştırılmasında, oluşumunda ve tüm aşamalarında, engin bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, yönlendirme ve deneyimlerini benimle paylaşan, daha azimli olmamı sağlayan, çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren danışman hocam Prof. Dr. Ayşe Dilek AZAZ'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Çalışmamın her aşamasında yardımlarını benden hiç esirgemeyen, bilgi birikimini ve desteğini benimle paylaşan, her koşulda yanımda olan güler yüzlü hocam Yard. Doç. Dr. Selma ÇELEN'e teşekkür ederim.

Çalışmamda enzimin saflaştırılması, SDS-NATIVE PAGE ile molekül ağırlıklarının ve alt birimlerinin belirlenmesinde, enzimin biyokimyasal özelliklerinin incelenmesinde yardımlarını ve bilgisini benimle paylaşan sayın Dr. Ersin HOPA'ya teşekkür ederim.

Çalışmamdaki deneysel aşamaları gerçekleştirdiğim laboratuvar ortamında bir aile olduğumuz hocalarıma, çalışma arkadaşlarım Hüseyin Alper İRTEM'e ve Yaprak ALPINAR'a teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca desteğini benden esirgemeyen aileme teşekkürlerimi bir borç bilirim.

# 1. GİRİŞ

Enzimler, biyolojik sistemlerdeki reaksiyonları katalizleyen protein yapısındaki moleküllerdir. Hücrelerdeki organik maddelerin yapımı ve yıkımı, sindirim olayı, kas kasılması, hücre solunum gibi önemli fizyolojik olaylar ve bunların yanında çeşitli metabolik reaksiyonlar enzimlerin katalitik aktiviteleri ile gerçekleşmektedir. Bu aktiviteler sırasında enzimin yapısında herhangi bir değişiklik oluşmaz. Diğer kimyasal katalizörlerle kıyaslandığında da reaksiyonları  $10^3$ - $10^8$  kez daha fazla hızlandırdıkları birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir [1, 2, 3].

Enzimlerin protein yapısında oldukları 1800'lü yılların başından beri bilinmektedir. İlk olarak enzim terimi 1876 yılında W. Kühne tarafından kullanılmıştır. Eduard Buchner ise 1897 yılında sadece maya ekstraktı kullanılarak şekerlerin alkole dönüştürülebileceğini göstermiştir [1, 4].

Eski Mısırlılardan beri enzimlerden özellikle ekmek, peynir gibi gıdalarla çeşitli içeceklerin hazırlanmasında varlıkları ve görevleri bilinmeksizin yararlanılmıştır [5]. Son yıllarda özellikle peynir yapımında enzimlerden yararlanılabileceği birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir [6, 7, 8]. Afroz ve ark., (2015) peynir üretiminin yanında yoğurt üretiminde de enzimlerin kullanımının büyük önem taşıdığını rapor etmişlerdir [9]. Er ve Sarımehtetoğlu (2009) ise yapmış oldukları çalışmalarında, süt ve süt ürünlerinin üretim ve kalitesinin artırılmasında mikrobiyal kaynaklı proteaz, lipaz, katalaz, laktaz ve transglutaminaz enzimlerin kullanılabileceğini belirtmektedirler [10]. Amilazlar, proteazlar, hemiselülazlar, lipazlar gibi hidrolitik enzimler ise pasta ve kek gibi unlu mamüllerin üretim aşamasında hamurda gaz oluşumunu ve hamurun yumuşak bir yapıya sahip olmasını sağlamak gibi amaçlarla kullanılmaktadırlar [11]. Enzimler biyokimyasal reaksiyonlarda çok hızlı aktivite gösterirler ve substratları için yüksek özgülüğe sahiptirler. Enzimlerin hücre dışında da çoğunlukla bu aktivitelerini koruduklarının anlaşılmasının ardından enzimler saflaştırılarak endüstriyel alanlarda kullanılmaları gündeme gelmiştir [1, 4]. Sanchez-Porro ve ark., (2003) halofilik bakteriler ile yaptıkları çalışmalarında, bu bakterilerin hücre dışı hidrolitik enzimlerden amilaz, proteaz, lipaz, DNaz, pülulanaz aktivitesine sahip olduklarını tespit etmişlerdir [12].



Bu gibi hücre dışı hidrolitik enzimlerin gıda sanayi, yem katkı maddesi, biyomedikal bilimler ve kimya endüstrisi gibi farklı endüstriyel alanlarda yüksek oranda kullanıma sahip oldukları rapor edilmiştir [13].

Endüstriyel amaçlara yönelik kullanılan enzimlerin %90' ı mikroorganizmalardan fermentasyon yöntemi ile elde edilmektedir. Mikrobiyal kaynakların dışında endüstriyel amaçlar için bitkisel ve hayvansal kaynaklardan da enzimler elde edilmektedir [14]. Yapılan bir çalışmada fitaz enziminin çavdar (5130 ünite  $\text{kg}^{-1}$ ), buğday (1193 ünite  $\text{kg}^{-1}$ ), arpa (582 ünite  $\text{kg}^{-1}$ ), buğday kepeği (2957 ünite  $\text{kg}^{-1}$ ), buğday unu (3350 ünite  $\text{kg}^{-1}$ ) gibi bitkisel materyallerde aktivitelerinin yüksek olduğu saptanmıştır [15]. Hu ve ark., (2011) ise yaptıkları bir çalışmalarında *Aspergillus niger* ve *A.oryzae*' nin endüstriyel alanlarda kullanılan enzimlerin üretiminde önemli funguslar olduklarını rapor etmişlerdir [16].

Mikroorganizma kaynaklı enzimler yüksek katalitik aktiviteye sahip olmalarının yanında arzu edilmeyen yan ürün oluşturmamaları, ayrıca kararlılıkları, ucuz ve yüksek miktarlarda elde edilebilmeleri gibi nedenlerle bitkisel ve hayvansal kaynaklı enzimlere göre endüstriyel alanlarda daha çok tercih edilmektedirler. Ayrıca mikroorganizmaların çeşitlilikleri ve genetik değişikliklere uygunlukları gibi nedenlerle de enzim kaynağı olarak tercih edilmektedirler. Bunların dışında enzimlerin endüstriyel alanlarda kullanımlarının tercih edilebilmesi için ekonomik olarak elde edilebilmesi, farklı sektörlerde kullanılabilme özelliğinin bulunması ve sağlık açısından allerjen veya toksik özelliklere sahip olmaması kısaca güvenle kullanılabilmesi gerekmektedir [17, 18]. Pahoja ve Sethar (2002) bitkisel, hayvansal, böcek ve mikroorganizma kaynaklı lipazlar üzerinde yaptıkları çalışmalarında mikroorganizma kaynaklı lipazların pH aralıklarının daha geniş olduğunu tespit etmişlerdir [19]. Wodzinski ve Ullah (1996) yapmış oldukları bir çalışmada 22 ülkede yem katkı maddelerinin temizlenmesinde kullanılan, bitkisel, hayvansal ve mikroorganizma kaynaklı fitaz enzimini karşılaştırmalı olarak incelemişler ve en yüksek verime *A.niger* NRRL 3135 suşunun sahip olduğunu rapor etmişlerdir [20].

Son yıllarda endüstriyel alanlarda kullanılan enzimlerin %75' ini hidrolitik enzimlerin oluşturduğu belirtilmektedir [21]. Hidrolitik enzim grubunda yer alan selülozlar, selülozu glukoza kadar parçalayan enzimler olup [22] funguslar ve bakteriler başta olmak üzere birçok mikroorganizma tarafından

sentezlenebilmektedirler [23]. Bununla birlikte, funguslar genel olarak organik maddelerin ve özellikle de selülozik substratların ayrışmasında bilinen en iyi ajanlardır [24]. *Aspergillus* cinsine ait funguslardan elde edilen selülazların ise genellikle yüksek  $\beta$ -glukosidaz aktivitesine sahip oldukları rapor edilmiştir [25, 26]. *Aspergillus* türlerinin dışında; *Trichoderma*, *Melenascopus*, *Botrytis*, *Chaetomium*, *Fusarium*, *Humicola* cinslerine ait fungusların da  $\beta$ -glukosidaz aktivitesine sahip oldukları araştırmacılar tarafından saptanmıştır [25, 27, 28].

### 1.1 Enzimlerin Çalışma Prensipleri

Doğadaki bütün reaksiyonlar enzimler tarafından kontrol edilir. Enzimler bu reaksiyonlar esnasında değişikliğe uğramadan tepkimelerin aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyonları hızlandırır. Kimyasal tepkimelerde enzimin üzerinde aktivite gösterdiği molekül substrat, gerçekleşen reaksiyon sonunda açığa çıkan madde ise ürün olarak adlandırılır. Kimyasal tepkimelerin bir çoğu substrat molekülleri ve enzimlerin işevsel grupları (özgül amino asit yan zincirleri, metal iyonları, ve koenzimler) arasında gerçekleşir. Enzim-substrat kompleksi arasındaki bu ilişki ilk olarak 1880 yılında Adolphe Wurtz tarafından belirlenmiş olup bu kompleks Alman kimyacı Emil Fischer tarafından ‘anahtar-kilit’ uyumu şeklinde açıklanmıştır [1, 4].

### 1.2 Enzimlerin Adlandırılması

Enzimlerin tanımlanması ve adlandırmasında 1950’ lerin sonuna kadar çok hızlı bir artış olmuştur. Ancak enzimlerin bazılarında iki isim verilmesi veya bir enzime birden fazla isim verilmesinden dolayı isimlendirmede bir takım karışıklıklar ortaya çıkmıştır. Giderek artan enzimlerin sayısı ve bu tür belirsizlikler sebebiyle uluslararası bir anlaşma ile enzimleri sistemli olarak adlandırmak ve sınıflandırmak mümkün olmuştur [1, 4].

Katalizledikleri reaksiyonlar açısından enzimler Uluslararası Enzim Komisyonu (International Commission on Enzyme) raporu ile altı ayrı sınıfa ayrılırlar. Numaralandırma sisteminde E.C. ön eki ile başlayan her bir rakam, birbirinden noktalarla ayrılarak şunları ifade ederler.

1. Enzimin ayrılan sınıflardan hangisine ait olduğu ilk rakam ile ifade edilir.
2. İkinci rakam ise enzimin hangi alt sınıfa (Subclass) ait olduğunu belirtir
3. Adlandırmada kullanılan ikinci alt grup üçüncü rakam,
4. Enzimin sub-subclass içindeki seri numarasını ise dördüncü rakam belirtir [1,4].

Enzimin ilk rakamındaki altı ana sınıf ve fonksiyonları kısaca şöyledir:

1. Oksiredüktazlar: Oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarını katalizeleyen enzimlerdir.
2. Transferazlar: Bir molekülde yer alan hidrojen dışındaki grupların bir başka moleküle aktarılmasını sağlayan enzimlerdir.
3. Hidrolazlar: Hidroliz reaksiyonlarında görevli enzimlerdir.
4. Liyazlar: Molekülün yapısında yer alan grupların uzaklaştırılmasıyla çift bağlara grup eklenmesini ya da bu çift bağların oluşumunu sağlayan enzimlerdir.
5. İzomerazlar: Bir molekülün izomerik formlarının elde edilmesi için moleküldeki grupların transfer edilmesini sağlayan enzimlerdir.
6. Ligazlar: Karbon-Karbon, Karbon-Kükürt, Karbon-Oksijen ve Karbon-Azot bağlarının enerji kullanılması ile birbirlerine bağlanmasını sağlayan enzimlerdir [1, 4].

Örneğin;  $\alpha$ -amilazlar E.C. 3.2.2.1 olarak,  $\beta$ -amilazlar E.C. 3.2.1.2 olarak ve pullunazlar E.C. 3.2.1.41 olarak isimlendirilirler [1].

### 1.3 Selülazlar

Selülazlar, doğada en bol bulunan organik polimer olan selülozu hidrolizleme yeteneğindeki hidrolitik enzim grubudur. Selülaz enzimi, glukoz monomerleri arasındaki  $\beta$ -1,4-glukosidik bağları hidrolizlemeleri ile diğer glikosid hidrolazlardan ayrılır [24].

Selülotik enzimler birçok mikroorganizma tarafından sentezlenmekte olup funguslar ve bakteriler selüloz bozulmasının başlıca doğal ajanları olarak bilinmektedir [23]. Ayrıca aerobik ve anaerobik mezofilik bakteriler, ipliksi funguslar, termofilik ve alkalifilik bakteriler, aktinomisetler ve bazı protozoa türlerini içeren populasyonlarda selülaz enzimi salgılanarak selülozik substratlar glukoza hidrolizlenirler [29]. Bununla birlikte, funguslar genel olarak organik maddelerin ve özellikle de selülozik substratların ayrışmasında bilinen en iyi ajanlardır [24]. Mahmood ve ark., (2013) buğday samanını selülozik substrat olarak kullanarak termofilik bir fungus olan *A.fumigatus*' un ekzoglukanaz üreticisi bir fungus olduğunu belirlemişlerdir [30]. Saqib ve ark., (2010) buğday samanının selülozik substrat olarak kullanıldığı çalışmalarında *A.fumigatus*' un ham endoglukanaz enzimini de sentezleyebildiğini rapor etmişlerdir [31]. *A.fumigatus* ile yapılan bir başka çalışmada ise lignoselülozik atıkların substrat olarak kullanılmasıyla bu fungusun  $\beta$ -glukosidaz enzimini de sentezleyebildiği belirlenmiştir [32].

Selüloz en az üç farklı enzimin sinerjik çalışması ile glukoza hidrolize olabilir [22]. Bu selülotik enzimler;

- a.) Endoglukanazlar
- b.) Ekzoglukanazlar
- c.)  $\beta$ -glukozidazlar

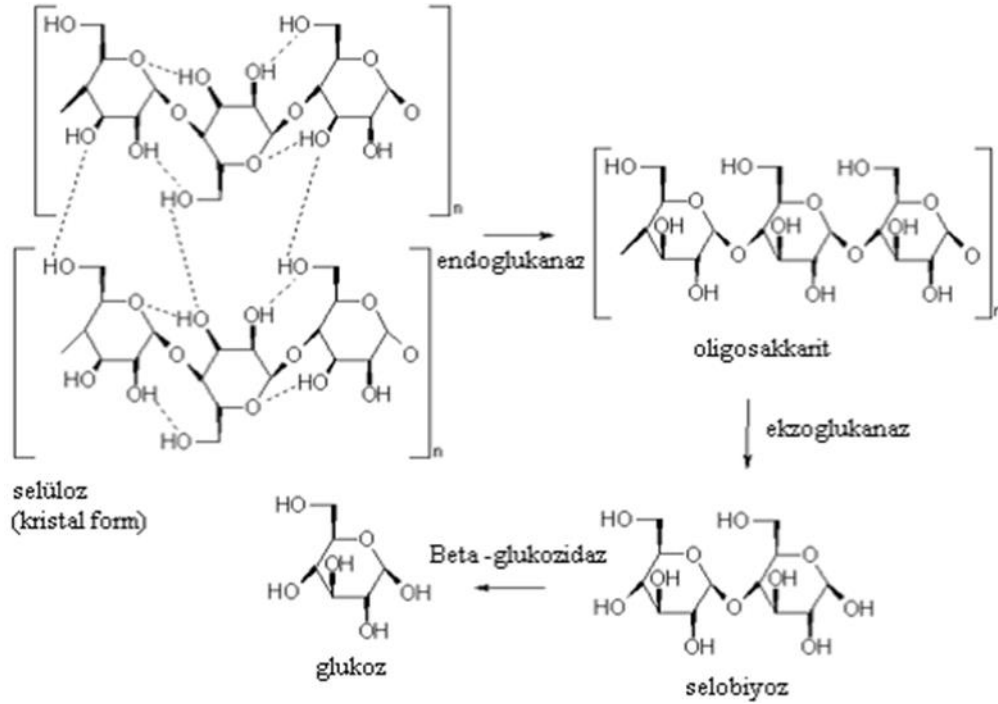
olarak gruplandırılmışlardır [24].

Endoglukanazlar (EG ya da CX); selülozun iç  $\beta$ -1,4 glukan zincirini rastgele hidrolizler ve kristalin selüloza karşı düşük hidrolitik aktivite gösterirler [24]. Dobrev ve Zhekova (2012)' nın endoglukanazlar ile yaptıkları bir çalışmada *A.niger*' den elde edilen endoglukanazın, pH 4,0' de 95 saatlik fermentasyon süresinin ardından 3,7 IU/mL' lik maksimum enzim aktivitesi verdiği tespit edilmiştir [33]. *A.niger*' den elde edilen ekstrasellüler endoglukanaz enziminin pH 5 ve 55°C' de maksimum ativiteye sahip olduğunu belirtmişlerdir [34].

Ekzoglukanazlar yani dış etkili sellobiyohidrolazlar (CBH); selüloz molekülünü indirgenen ve indirgenmeyen ucundan itibaren sırasıyla hidrolizler ve selüloz zincirinden glikoz ve sellobiyozu açığa çıkarırlar [24]. Auta ve ark., (2012) mısır koçanını karbon kaynağı olarak kullanarak *A.niger*' den elde edilen

ekzoglukanaz enziminin pH 5,0 ve 65°C' de maksimum aktiviteye sahip olduğunu belirlemişlerdir [35].

Selübiyoz ya da  $\beta$  -glukosidaz (BGL); selülozun depolimerizasyonunu tamamlar ve selübiyozu iki molekül glukoz üzere hidrolizlerler [24]. Dutt ve Kumar (2012)' ın yaptıkları bir çalışmada CMCse, FPase,  $\beta$ -glukosidaz, ksilanaz aktivite ve fungal protein konsantrasyonu, *A.niger* ve *A.flavus* fungal türleri için incelenmiş, bu iki türün  $\beta$ -glukosidaz aktivite sırasıyla 0,82 IU/mL ve 0,69 IU/mL olarak belirlenmiştir [36].



Şekil 1.1: Selülozun enzimatik olarak parçalanması

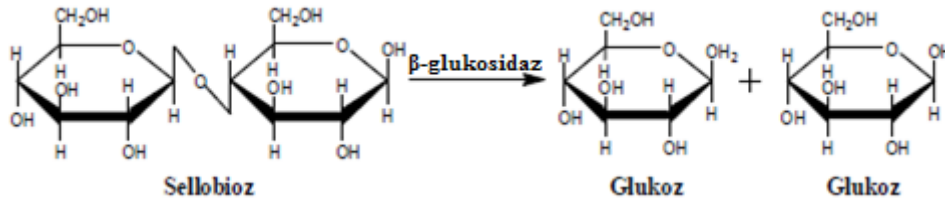
Selülaz enziminin, selülozun yüzeyine yapışarak substrat molekülü boyunca hareket edip şeklini bozduğu ve daha sonra substrattan ayrılıp aynı substrat molekülünün başka bir bölgesine yapışarak katalitik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir [37].

Yapılan çalışmalar incelendiğinde, *Aspergillus* cinsine ait türlerden elde edilen selülazlar genellikle yüksek  $\beta$ -glukosidaz aktivitesine sahip iken, daha düşük düzeyde endoglukanaz aktivitesi gösterdikleri görülmektedir. *Trichoderma* cinsine ait türlerde ise endoglukanaz aktivitesi yüksek iken  $\beta$ -glukosidaz aktivitesinin daha düşük düzeyde olduğu rapor edilmiştir [24, 25].

## 1.4 $\beta$ -glukosidazlar

$\beta$ -glukosidaz enzimi oligosakkaritler, polisakkaritler ve bunların eşleniklerinde bulunan glukosidik bağlarının seçici hidrolizinden sorumlu olan glukosid hidrolazlardır [38].

$\beta$ -glukosidaz enzimi; çeşitli bitkiler, hayvanlar, funguslar ve bakteriler tarafından üretilir [39]. Dharmawardhana ve ark., (1995) bir çam türü olan *Pinus contorta*' dan elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz enziminin 24 kDa'lık küçük alt birim ve 28 kDa'lık büyük alt birimden oluştuğunu belirlemişlerdir [40]. Kengen ve ark., (1993) bir arkea olan *Pyrococcus furiosus*' dan  $\beta$ -glukosidaz enzimini saflaştırmış ve  $58 \pm 2$  kDa alt birimden oluşan toplam  $230 \pm 20$  kDa molekül ağırlığına sahip olduğunu belirlemişlerdir [41]. Junior ve ark., (2014)'da yaptıkları bir çalışmada *A.niger*'den elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz enziminin moleküler ağırlığını 60 kDa olarak rapor etmişlerdir [42]. Bagudo ve ark., (2014) bir bakteri olan *Bacillus subtilis* ile yaptıkları çalışmalarında elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz enziminin  $60^\circ\text{C}$ ' de pH 7.0' da maksimum aktiviteye sahip olduğunu belirlemişlerdir [43]. Ayrıca bu enzimin yüksek sıcaklıklarda aktivitesini korumasının, endüstriyel alanlarda kullanımı için önem taşıdığı belirtilmiştir [43].



Şekil 1.2: Sellobiyozun  $\beta$ -glukosidaz enzimi tarafından hidrolizi

$\beta$ -glukosidazların substrat çeşitliliği,  $\beta$ -glukosidazın substratlarında bulunan sabit monosakkarite bağlı kimyasal grupların çeşitliliğine dayanır. Bu enzimin bitkilerdeki mono ve disakkaritlerde bulunan L-picein, salisin, arbutin, amigdalin, prunasin, visin ve linamarin gibi doğal substratları vardır [44].  $\beta$ -glukosidaz enzimleriyle ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde substrat olarak genellikle *p*NPG (*p*-Nitrophenyl  $\beta$ -D-glucopyranoside) ( $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}$ )'nin kullanıldığı görülmektedir. Kim ve ark., (2007) çalışmalarında *p*NPG substratını kullanarak  $\beta$ -glukosidaz enziminin maksimum aktivitedeki koşullarını; pH 6,5 ve  $55^\circ\text{C}$  olarak tespit etmişlerdir

[45]. Yeoh ve ark., (1988) yaptıkları bir çalışmada *A.niger*'den elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz enzimini saflaştırmış ve çalışmaları esnasında *pNPG* ve sellobiyoz substratını kullanmışlardır [46]. Benzer olarak Workman ve Day (1982)  $\beta$ -glukosidaz enziminin saflaştırılması ve özelliklerinin belirlenmesi çalışmalarında *pNPG* ve sellobiyoz substratlarını kullanmışlardır [47]. Kaur ve ark., (2007)' da  $\beta$ -glukosidaz enzimi ile yaptıkları çalışmalarında *pNPG* substratını kullanırken Chang ve ark., (2012) *A.niger*' den elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz enziminin karakterizasyonu ve saflaştırılması çalışmalarında substrat olarak *pNPG*' yi kullanmışlardır [27, 48].

$\beta$ -glukosidaz enzimi büyüme-gelişme, kimyasal savunma, parazit-konak etkileşimi, lignifikasyon, vitamin B<sub>8</sub> metabolizması, sinyelizasyon gibi temel biyolojik süreçlerde ayrıca biyokütle dönüşümü, gıda detoksifikasyonu ve içecek kalitesinin geliştirilmesi gibi biyoteknolojik süreçlerdeki önemli işlevleri ile son zamanlarda birçok araştırmanın odağı haline gelmiştir. Örneğin bitkisel  $\beta$ -glukosidazlar; haşerelere karşı savunmada, fitohormon aktivasyonu, lignifikasyon ve çimlenme sırasında endosperm hücre duvarının bozulması gibi işlevlere sahip enzimlerdir [38].

## 1.5 Katı Substrat Fermentasyonu (KSF)

Katı substrat fermentasyonu serbest su akışının olmadığı ve nemli-katı substrat üzerinde mikroorganizmaların üretildiği bir tekniktir [49]. Chahal D.S. (1985) *Trichoderma reesei* ile buğday samanının KSF ortamında selülozik substrat olarak kullanımı sonucu 250-430 IU/gr' lık bir selülaz verimi elde etmiş ve bu verimi sıvı hal fermentasyon tekniği ile kıyasladığında %72' lik bir artış olduğunu rapor etmiştir [50].

Çeşitli mikroorganizmaları (bakteriler, mayalar, funguslar) katı substrat fermentasyonu ile üretmek mümkün olmasına karşın bu tekniğe en uygun mikroorganizmaların funguslar olduğu birçok araştırmada rapor edilmiştir. KSF ile fungusların doğal yaşam ortamlarına benzer çevresel koşullar elde edildiğinden bu koşullar filamentli funguslara katı substratın içine girme olanağı vermekte bu nedenle de bu funguslar besinlerin kullanımı açısından diğer mikroorganizmalara oranla daha avantajlı olmaktadır [49, 13]. Bansal ve ark., (2012) yaptıkları bir çalışmada çeşitli tarımsal ve mutfak atıkları üzerinde geliştirdikleri *A.niger* NS-2'nin KSF ortamında

geniş sıcaklık (20-50°C) ve pH (3,0- 8,0) aralığı ile 1:1,5 dan 1:75'e varan substrat nemi koşullarında selüloz enziminin üretilebildiğini rapor etmişlerdir [51].

Substrat olarak tarımsal yan ürünler kullanılarak mikroorganizmalardan enzim eldesi için KSF metodu oldukça uygun bir metottur. Bu amaçla kullanılan substratlardan bazıları; buğday, pirinç, mısır unu, kepeği ve kabuğu ile talaş, muz ve çay atıkları, nişasta ve hindistan cevizi atıkları gibi ürünlerdir [13]. Adeleke ve ark., (2012) yaptıkları bir çalışmada portakal kabuğunu KSF ortamında substrat olarak kullanarak *Penicillium atrovenetum*, *A. flavus* ve *A. oryzae*'nin selüloz üretim kapasitelerini incelemiş ve en fazla verime *A. oryzae*'nin sahip olduğunu rapor etmişlerdir [52].

KSF ortamında genel olarak funguslardan selülozlar, ksilanazlar, pektinazlar gibi hidrolitik enzimler sıklıkla üretilebilmektedir. Bu enzimlerin üretimi için ise yaygın olarak *Aspergillus* ve *Trichoderma* türlerinin kullanıldığı Pandey ve ark., (1999) tarafından belirtilmektedir [13].

KSF işlemi; çevresel kontrol uygulamalarında, katı haldeki atıklardan kompost ve hayvan yemi üretiminde, tehlikeli bileşiklerin biyolojik olarak geri dönüşümünde, endüstriyel atıkların biyolojik arındırılmasında ve atık ürünlerin besin değerinin artırılmasında büyük ölçüde kullanıma sahiptir. Bu biyolojik yöntem; çeşitli fermente gıdaların, aroma bileşiklerinin ve enzimlerin üretiminde ayrıca birçok antibiyotik ve biyopestitin üretiminde kullanılmaktadır [53].

## 1.6 Selüloz ve Hemiselüloz

Selülozik materyaller yeryüzünde en çok bulunan ve en basit yapıya geri dönüşümü mümkün biyokütle olup kimyasal veya enzimatik hidroliz ile endüstriyel amaçlara dönük olarak kullanılabilir [54]. Shokri ve Adibkia (2013) selülozun hayvansal gıdalar, ahşap, kâğıt, elyaf, tekstil gibi birçok sanayi alanının yanında ilaç ve kozmetik endüstrisinde de çok yönlü olarak kullanılabilirliğini belirtmektedirler [55].

Selüloz bitkilerin yapısal polisakkariti olup lignoselülozik biyokütlerde %35-50 ile en çok bulunan materyaldir [56]. Selüloz yapısını oluşturan  $\beta$ -D-glukoz birimleri,

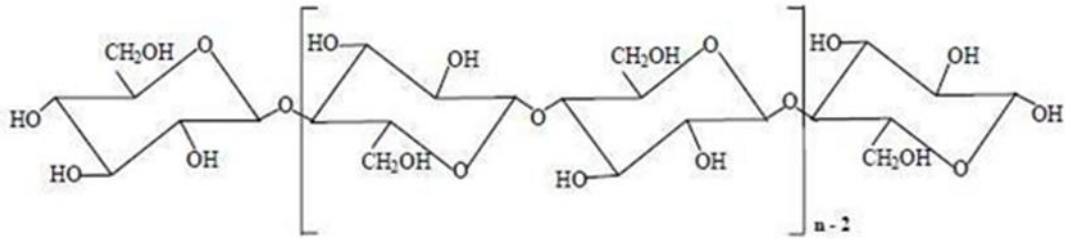


birbirlerine  $\beta$ -1,4-glikosidik bağlarla bağlanırken, selüloz zincirleri birbirlerine hidrojen bağlarıyla bağlanırlar. Selüloz molekülleri suda tamamen çözünmeyen doğrusal yapısı ile nişastadan, kristalin yapıya sahip olmaları ile de diğer polisakkaritlerden ayrılırlar [57, 21].

Bitki hücre duvarındaki selüloz moleküllerinin büyüklüğü (polimerizasyon derecesi) farklılık göstermekte olup genellikle demetler veya fibriller şeklinde düzenlenirler [57]. Demetler halindeki selüloz molekülleri genellikle kristalin ya da parakristalin yapıda bulunurlar [58].

Bitki biyokütlesinin sürekli yenilenmesini sağladığından fotosentez süreci, selülozik malzemeler için tükenmez bir kaynak yaratır [57]. Bitkiler, güneş ışığından sağladıkları enerjiyi kullanarak her yıl yaklaşık olarak  $10^{11}$  ton selüloz sentezlemektedirler [59]. Selüloz bitki hücre duvarının yapısında bulunmasının yanında birkaç bakteri ve tunikatlar gibi bazı canlılar tarafından da üretilmektedir [24].

Enerji kaynaklarının giderek azalması, sera gazlarının etkisi ve küresel ısınma gibi sebepler enerji kaynaklarının tükeneceği endişesini beraberinde getirmiş ve bu durum alternatif enerji kaynaklarının araştırılmasını sağlamıştır. Bu araştırmalar sonucu selüloz, hemiselüloz ve lignin içeren lignoselülozik materyaller kullanılmaya başlanmış ve selülozun lignoselülozik biyokütlenin ana bileşeni olarak önem taşıdığı belirlenmiştir [56, 59].



Şekil 1.3: Selülozun yapısı

### 1.7 *Aspergillus* Türü Fungusların Genel Özellikleri

*Aspergillus* türü funguslar yeryüzünde hemen her yerde yaygın olarak bulunan hifli mantarlardır. Doğadaki temel işlevleri karbon ve nitrojen çevrimi ile ilgili olup ürettikleri enzimler sayesinde organik maddeleri ayrıştırarak kullanırlar. Üreme hız ve

kapasiteleri yüksek olup saprofit olarak yaşarlar. Havaya karışan konidiyumları havada asılı kalarak taşınabilirler. Bu nedenle de *Aspergillus* türü fungusların konidiyumları havada en yüksek yoğunlukta bulunan fungus konidiyumlarından biri olarak kabul edilir [60].

*Aspergillus* ' lar Deuteromycota'daki Moniliaceae familyasında sınıflandırılan bir cinstir [1]. Genellikle ılıman iklimdeki toprakta çok yaygın olarak bulunurlar ayrıca kompostlarda, çürüyen bitki atıklarında, depolanmış tahıllarda vs. sıklıkla görülmektedir [61]. Ayrıca diğer mikroorganizmaların gelişemeyeceği çok düşük nem ve sıcaklık değerlerinde de gelişebildikleri belirlenmiştir [60].

*Aspergillus* türü funguslar hemen hemen bütün organik maddeleri sahip oldukları enzim sistemi yardımıyla parçalarlar [60]. Örneğin, 2009 yılında dünya genelinde *Aspergillus* türleri kullanılarak ticari açıdan 5 milyar dolarlık bir enzim üretimi gerçekleştirildiği rapor edilmiştir [62]. Bunun yanında evrensel olarak kullanılan fungal orjinli 80 rekombinant enzimin ve 55 farklı proteinin de *Aspergillus* türleri tarafından üretildiği Yoder ve Lehmerck (2004) belirtilmektedir [63].

Raper ve Fennel *Aspergillus* cinsinin 132 türünü tanımlamışlardır. Günümüzde ise *Aspergillus* cinsinin 180 den fazla türü ve 70 teleomorfı bulunduğu kabul edilmekte olup yeni türlerin tanımlanmasına devam edilmektedir [64].

*Aspergillus* türlerinin doğada yaygın olarak bulunmaları ve ekstrem koşullarda gelişebilmeleri nedeniyle selülaz, lakkaz, pektinaz, proteaz, rennin, lipaz, glukoz oksidaz gibi enzimlerin üretiminde bu funguslardan yararlanılmaktadır. *Aspergillus* türü funguslardan elde edilen bu enzimlerden de başlıca gıda endüstrisi olmak üzere çeşitli endüstriyel alanlarda değişik amaçlarla geniş ölçüde yararlanılmaktadır [65]. Örneğin; tümör gelişiminin baskılanmasında kullanılan L-glutaminaz, L-asparaginaz ve L-methioninaz gibi enzimlerin üretiminde *Aspergillus* türlerinden yararlanılmaktadır [66, 67].

Son yıllarda selülaz üretimi açısından *Aspergillus* cinsi üyelerini de kapsayan birçok mikroorganizma dikkati çekmektedir. *A.niger*' in selülaz enzim sisteminin tüm komponentlerini üretebildiği saptanmıştır [25]. Selülazlar *Aspergillus* türlerinin yanında *Penicillium*, Basidiomycetes üyeleri, *Humicola* ve *Bacillus* cinsi mikroorganizmalardan da elde edilebilmektedir [68, 69, 70, 71]. *A.sydowii*' nin

endoglukanaz, ekzoglukanaz ve  $\beta$ -glukosidaz üretebildiği Matkar ve ark., (2013), *A.fumigatus*'un ise endoglukanaz, ekzoglukanaz ve  $\beta$ -glukosidaza ilaveten ksilanaz enzimlerini de üretebildiği Ang ve ark., (2013) tarafından rapor edilmiştir [72, 73].

## 1.8 Saflaştırma

Proteinlerin saflaştırılması için günümüzde birçok kromatografik ve elektroforetik yöntem geliştirilmiştir. Proteinler çok hassas moleküller olduklarından kullanılacak yöntem ve tekniğin iyi seçilmesi gerekmektedir. Saflaştırmada kullanılacak yöntemler seçilirken proteinin; boyu ve şekil gibi fiziksel özelliklerine, kovalent bağlanma gibi kimyasal özelliklerine ve biyospesifik yakınlık gibi biyolojik özelliklerine dikkat edilmelidir. Jel filtrasyon kromatografisi ile konsantre haldeki proteinler birbirinden ayrılarak; iyon değişim kromatografisi ile proteinler taşıdıkları net yüke göre sıralanarak; hidrofobik etkileşim kromatografisi ile matriks üzerindeki hidrofobik grupların ve proteinlerin hidrofobik alanlarının etkileşimi ile saflaştırma yapılmaktadır. Ayrıca afinite kromatografisi, membran kromatografisi ve izoelektrik odaklama yöntemi proteinlerin saflaştırılmasında kullanılan diğer yöntemlerdir [74, 75, 1]. Koffi ve ark., (2012) iyon değişim kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kromatografisini kullanarak *Periplaneta americana*' dan elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz enzimini 9,93 kat saflaştırmışlardır [76]. Saha ve Bothans (1996)' da sıvı kültür ortamında geliştirilen *Candida peltata*' dan elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz enzimini farklı kromatografik tekniklerden yararlanarak % 36 verimle 1,800 kat saflaştırdıklarını rapor etmişlerdir [77].

$\beta$ -glukosidaz enziminin; bakteri, mantar, bitki ve hayvanların hücre ve dokularında buldukları bilinmektedir. Canlılar arasında oldukça geniş dağılım gösteren  $\beta$ -glukosidaz enzimlerinin birçok atık ürün kullanılarak saflaştırılabildiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Farklı araştırmacılar  $\beta$ -glukosidaz enzimini mısır [39], buğday samanı, pirinç samanı, buğday kepeği, küspe, selülozik atıklar, tarımsal atıklar [13], hindisatan cevizi [78], nohut atıkları [79] gibi maddeleri substrat olarak kullanarak saflaştırmış ve özelliklerini incelemişlerdir.

Yapılan çalışmalarda saflaştırma işlemlerine genellikle amonyum sülfat tuz çöktürmesiyle başlandığı ve ardından farklı kromatografik yöntemler ile çok

basamaklı saflaştırma işleminin yapıldığı görülmektedir [80, 48, 26]. Riou ve ark. (1998) yapmış oldukları bir çalışmalarında amonyum sülfat çöktürmesi, jel filtrasyon kromatografisi ve iyon değişim kromatografisini sırasıyla kullanarak *A. oryzae*' dan  $\beta$ -glukosidaz enzimini saflaştırmışlardır [81]. *Daldinia eschscholsii* ile yapılan bir başka  $\beta$ -glukosidaz enziminin saflaştırması çalışmasında ise amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim kromatografisi, hidrofobik etkileşim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi yöntemleri kullanıldığı rapor edilmiştir [82].

## 1.9 Selülazların Kullanım Alanları

Selülazlar endüstriyel uygulamalarda büyük role sahiptirler [21]. Selülazlarla ilgili ilk araştırmalar II. Dünya savaşında Amerikan Ordusunun çadırlarındaki çabuk yıpranmanın önlenmesi amacıyla başlamıştır [83, 84]. 1970' lerin başlarında *Trichoderma* türleri ile yapılan çalışmalar ile de selülaz enziminin ticari olarak üretilmesi başlamıştır. 1980' lerin ortasında da selülaz enzimi kotların taşlanması ve hayvan yemlerinde katkı maddesi olarak kullanılmak üzere üretilmeye başlanmıştır. Bu dönemlerde endüstriyel uygulamalar için daha çok *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Humicola* türlerinden yararlanılmıştır. 1990' lı yıllarda ise selülaz enzimi; tekstil uygulamalarında, arpa ve buğday yemlerinin sindirilebilirliğinin artırılmasında, meyve sularının iyileştirilmesinde ve ev tipi deterjan yapımı gibi uygulamalarda geniş ölçüde kullanılmaya başlamıştır [85].

Fosil yakıtların azalması insanları yenilenebilir enerji kaynaklarını bulma çalışmalarına yönlendirmiştir. Bu amaçla yapılan çalışmalarda lignoselülozik biyokütlenin hidrolizi amacı ile selülazlar ile diğer enzimler beraber kullanılmaya başlanmıştır [86].

Selülazlar gıda, kağıt, tekstil, deterjan, hayvan yemi, tıbbi ve farmasötik endüstri alanlarının yanında, sferoplast üretimi, genetik mühendislik uygulamaları ve çevre mühendisliği alanlarında kullanılmaktadır [87]. Bu alanların dışında selülazlar birçok biyoteknolojik alanda; yağ ekstraksiyonunda, meyve suyu üretimi, tarım sanayinde, fırıncılık, karotenoid ekstraksiyonu, bira, tekstil gibi çeşitli alanlarda ve biyo-taşlama, mürekkep ayırma, deterjan sanayi, renk giderilmesi, atıkların değerlendirilmesi gibi diğer alanlarda büyük öneme sahiptir [88]. Selülazlar ayrıca ilaç

sanayinde ve atık suların değerlendirilmesinde, metabolik ve genetik modifikasyon çalışmalarında, bazı virüslerin incelenmesinde ve bitki protoplast izolasyonunun yapılması çalışmalarında da kullanılmaktadır [89, 21, 90].

İçecek endüstrisinde ise meyve püresinin viskozitesini azaltarak meyve suyunun geri kazanılmasında ve meyve suyunun berraklaştırılmasında selüloz enzimlerinden yararlanılmaktadır [91]. Bira imalatında arpa maltının fermentasyonu sırasında *P.emersonii*, *A.niger*, *B.subtilis* ve *T.reesei* türlerinden elde edilen enzimlerinden yararlanılmaktadır [92]. Şarap endüstrisinde ise şarabın renginin berraklaştırılmasında, filtrasyonunda ve sarabın kalitesinin artırılması işlemleri sırasında selülozlar kullanılmaktadır [92]. Şarap endüstrisinde kullanılan ilk mikrobiyal enzim *Aspergillus* türü funguslardan elde edilen pektinazlardır. Pektinazlar; şarap üretiminde kullanılan üzümün ezilmesinde, meyve suyunun ekstraksiyonunun artırılmasında, arıtma süresinin kısaltılmasında, şarabın aromasının artırılmasında kullanılır [92].  $\beta$ -glukosidazlar ise şarabın doğal aromasını değiştirmelerinden dolayı dikkat çeken enzimler arasında yer almıştır [93, 94].

Hidrolazlar, monogastrik yemlerde kullanılan başlıca enzimler olup, bunlardan selülozlar ve hemiselülozlar oldukça fazla kullanıma sahiptir [21]. Bu enzimler yemlerdeki anti-besinsel faktörlerin ortadan kaldırılmasında, yemlerdeki bazı tahıl bileşenlerinin besin değerinin artırılmasında ve bazı hayvan yavrularının süttten kesilme dönemi sonrasında sindirim enzimlerine ilave olarak yemlere katılır. Ayrıca geniş getiren hayvanlarda süt veriminin artırılması ve vücut ağırlıklarının geri kazandırılması aşamalarında da selüloz enziminden yararlanılmaktadır [92].

Tekstil sanayinde son 10 yılda selülozik enzimler kumaş kalitesinin artırılması ve selülozik fibrillere şekil verilmesi gibi alanlardaki kullanımları ile en çok kullanılan üçüncü enzim grubu olmuştur. Selülozların tekstil endüstrisindeki diğer kullanım alanları ise biyo-taşlama ve biyo-parlatmadır [95].

Deterjan sanayinde ise selülozlar; kumaşların renk parlaklığının artırılması, yumuşaklığının geri kazandırılması ve yüzey tüyü olarak görünen liflerin ortadan kaldırılması gibi amaçlarla çamaşır deterjanlarında kullanılmaya başlamıştır. Deterjanların temizleme kapasitesinin artırılmasında, yağların kumaş fibrillerinden uzaklaştırılmasında ise alkalin selülozlar kullanılmaktadır [96].

Kot kumaşının taşlanması *Humicola insolens* ve *T.reesei*' den elde edilen selülozların kullanılmasıyla renk giderim süresi azalır ve kumaşlardaki yıpranmanın kontrolü sağlanır. Ayrıca selülozlar yıkama esnasında; çamaşır makinalarının bozulmalarının azaltılması, büyük makinaların verimliliğinin artırılması, ikinci kalite giysi oranının azalmasını ve pomza taşı kullanılmadığı için güvenli çalışma ortamının oluşmasını sağlar [95].

Selüloz enzimi kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde büyük kullanım potansiyeline sahiptir. Kağıt endüstrisindeki işlemler; hammadde olan odunun ve atık kağıdın işlenmesi, ağartılması, kağıdın yapımı ve atık suyun arıtılmasıdır. Selüloz enzimi ise bu basamaklarda kağıt ve kağıt hamurunun üretiminde kullanılmakta olup özellikle ağartma ve mürekkep giderimi işlemlerindeki kullanımları geniş ölçekli olarak araştırılan bir konudur [21, 97].

Doğal koşullarda bitkilerin büyümesi ve bitki hastalıklarının kontrol edilmesi amacıyla çeşitli selülozlar, hemiselülozlar ve pektinazlar günümüzde tarım endüstrisinde kullanılmaktadır. Genellikle ormanlar ve tarım alanları, tarım endüstrisinde yararlanılabilen veya yararlanılamayan selüloz kaynaklarıdır. Bu alanlarda ortaya çıkan ve endüstriyel alanlarda kullanılmayan selülozlar da çevre kirliliğine neden olmaktadır. Bu nedenle günümüzde bu atık ürünler şeker, biyoyakıt, fermentasyon için ucuz enerji kaynağı, insan besini ve hayvan yemlerinin zenginleştirilmesi gibi amaçlarla kullanılarak değerlendirilmekte böylece çevrede birikimleri de önlenmektedir [88].

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1 Materyal

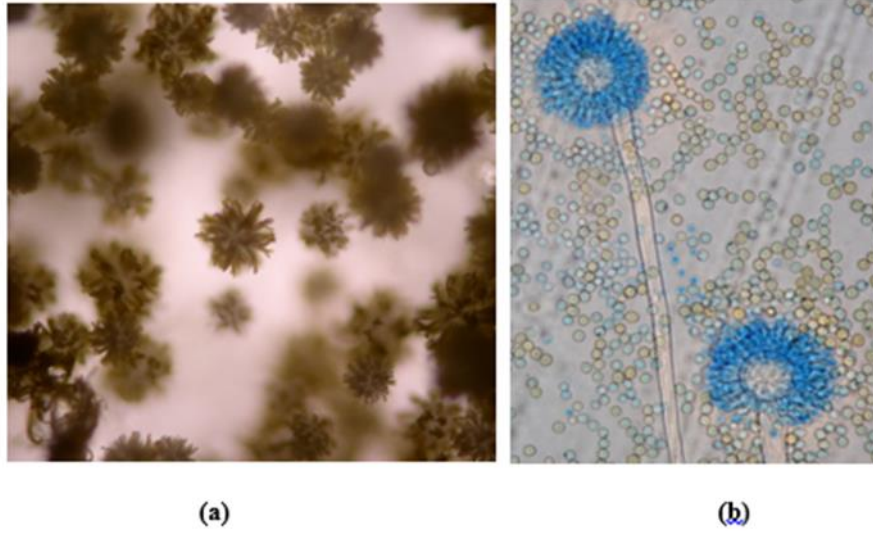
#### 2.1.1 $\beta$ -glukosidaz Aktivitesine Sahip Mikrofungusların Belirlenmesi

*Aspergillus oryzae* NRRL 5590, *Aspergillus caelatus* NRRL 26107, *Aspergillus bisporus* NRRL 3692 ve *Aspergillus sydowii* NRRL 4768 suşları  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitelerinin saptanması amacı ile CMC (Karboksimetil Selüloz, C<sub>28</sub>H<sub>30</sub>Na<sub>8</sub>O<sub>27</sub>) içeren besiyerine inokule edilerek burada oluşturdukları hidroliz zonları büyüklüğüne göre karşılaştırılmıştır. Yapılan incelemelerin sonunda *A.oryzae* NRRL 5590 ve *A.caelatus* NRRL 26107 suşlarının deneylerde kullanılmasına karar verilmiştir.

#### 2.1.2 Deneylerde Kullanılan *Aspergillus* Türleri ve Genel Özellikleri

##### 2.1.2.1 *Aspergillus oryzae* (Ahlburg) Cohn 1884

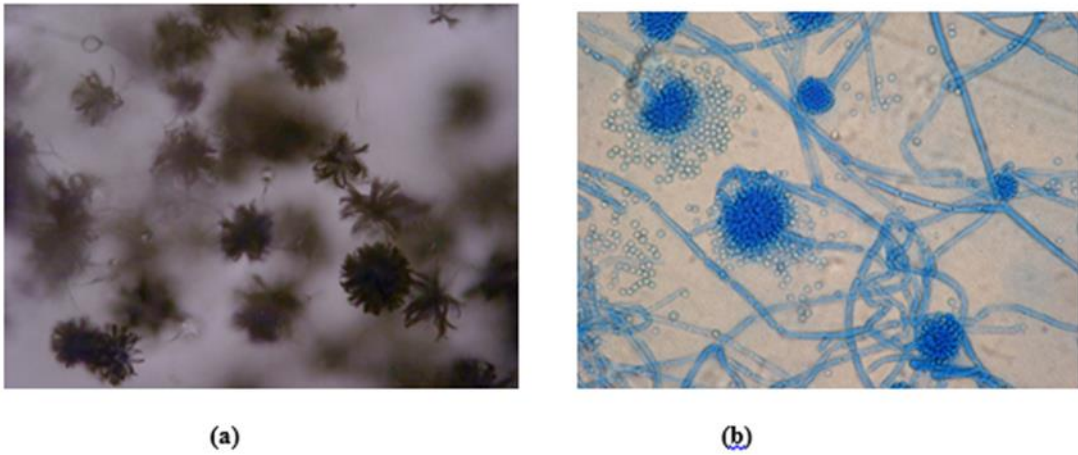
Czapek Dox Agar besiyerinde 7 günde 25°C' de 6 cm çapında koloni oluşturmakta, koloni yüzeyi unumsu görünümde, sarımsı-açık yeşil, koloni altı renksiz, konidi başları divergent konidi zincilerinden oluşmakta, konidiyofor renksiz, 7,5-12,5  $\mu$ m eninde, sterigma bütün yüzeyinde fertil, genellikle iki seri, birinci seri 7,5-15  $\mu$ m, ikinci seri 5,0-7,5  $\mu$ m ölçülerinde, konidiler globoz 5,0-6,25  $\mu$ m çapında, spinuloz, kültürde sklerosyum gelişimi gözlenmekte [98, 99, 100].



**Şekil 2.1:** (a) *A.oryzae* NRRL 5590 petri (10x10); (b) *A. oryzae* NRRL 5590 preparat (10x40)

#### 2.1.2.2 *Aspergillus caelatus* Horn B.W. (1997)

Czapek Dox Agar besiyerinde 7 günde 25°C’ de 6,5 cm çapında koloni oluşturmakta, koloni yüzeyi lanat yeşilimsi-sarı görünümde, koloni altı renksiz, konidi başları 100-200 µm çapında, radyat, konidiyofor 5,0-7,5 µm eninde, vezikül 12,5-17,5 µm çapında, globoz, sterigma iki seri; birinci seri 5,0-7,5 µm ikinci seri 3,5 – 5,0 µm ölçülerinde, konidiler 3,5-7,5 µm çapında, globoz, spinuloz [101, 102].



**Şekil 2.2:** (a) *A.caelatus* NRRL26107 petri (10x10); (b) *A. caelatus* NRRL26107 preparat (10x40)



## 2.1.3 Kullanılan Tamponlar ve Çözeltiler

### 2.1.3.1 Mikrofungus Kültürlerini Geliştirmede Kullanılan Besiyeri

#### Czapek Dox Agar :

Sakkaroz .....	30,0 g
NaNO <sub>3</sub> .....	3,0 g
MgSO <sub>4</sub> .....	0,5 g
KCl.....	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> .....	0,01 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1,0 g
Agar agar .....	13,0 g
Distile su .....	1000 mL

121°C' de 20 dakika otoklavda steril edilerek hazırlanmış ve steril petri plaklarına dökülmüştür [103, 104].

#### Czapek Dox Broth:

Sakkaroz .....	30,0 g
NaNO <sub>3</sub> .....	3,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> .....	0,5 g
KCl .....	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> .....	0,01 g
Distile su .....	1000 mL

121°C' de 20 dakika otoklavda steril edilerek hazırlanmıştır [103, 104, 78].

### **%5 Selüloz İçeren Czapek Dox Agar Besiyeri:**

Yukarıda formülü verilen Czapek Dox Agara 50 g Karboksimetil Selüloz ( $C_{28}H_{30}Na_8O_{27}$ ) ilave edilmesi ile hazırlanıp  $121^{\circ}C$ ' de 20 dakika otoklavda steril edilerek 9 cm' lik petri plaklarına dökülmüştür [105].

### **2.1.3.2 Hidroliz Zonu Belirlenirken Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması**

#### **%0,1' lik Kongo Kırmızısı Çözeltisi:**

Konga Kırmızısı ..... 0,1 g

Distile su .....100 mL

0,1 g Konga Kırmızısı, 100 mL distile suda çözülerek hazırlanmıştır [106, 107, 108].

#### **1 M Sodyum Klorür (NaCl) Çözeltisi:**

Sodyum Klorür (NaCl) .....14,625 g

Distile su .....250 mL

14,625 g NaCl, 250 mL distile suda çözülerek hazırlanmıştır [78, 108].

### **2.1.3.3 Katı Besiyerinde Geliştirilen Mikrofungusların Sıvı Besiyerine Aktarılmasında Kullanılan Çözeltinin Hazırlanması**

#### **%0,1' lik Tween 80 Çözeltisi:**

Tween 80 ..... 1 mL

Distile su ..... 1 L

1 mL Tween 80, 1 L distile suda çözüldükten sonra  $121^{\circ}C$ ' de 20 dakika otoklavda steril edilmiştir [109].

#### 2.1.3.4 KSF Ortamında Nemlendirme Sıvısı Olarak Kullanılacak Tampon Çözeltilerin Hazırlanması

##### 0,2M pH' ı 4,0 ve 5,0 Olan Sitrata Tamponu:

Sitrik Asit Monohidrat ( $C_6H_8O_7$ ) ..... 1,0507 g

Distile su ..... 25 mL

1,0507 g Sitrik Asit Monohidrat ( $C_6H_8O_7$ ) tartılıp pH 4,0 ve pH 5,0' e ayarlanarak son hacim 25 mL olacak şekilde distile su ilave edilmiştir [110, 111].

##### 0,2M pH' ı 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 Olan Fosfat Tamponu:

Sodyum Di-hidrojen Fosfat ( $NaH_2PO_4$ ) ..... 0,68995 g

Distile su ..... 25 mL

0,68995 g Sodyum Di-hidrojen Fosfat ( $NaH_2PO_4$ ) tartılıp pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 ve 8,0 ayarlanarak son hacim 25 mL olacak şekilde distile su ilave edilmiştir [111].

##### 0,2M pH' ı 8,5 ve 9,0 Olan Fosfat Tamponu;

Di-sodyum Hidrojen Fosfat Dihidrat ( $Na_2HPO_4$ ) .....1,7796 g

Distile su ..... 50 mL

1,7796 g Di-sodyum Hidrojen Fosfat Dihidrat ( $Na_2HPO_4$ ) tartılıp pH 8,5 ve pH 9,0' a ayarlanarak son hacim 50 mL olacak şekilde distile su ilave edilmiştir [112].

#### 2.1.3.5 $\beta$ -glukosidaz Aktivitesinin Belirlenmesinde Kullanılan Substrat Çözeltisi ve Tampon Çözeltilerin Hazırlanması

##### Sodyum Asetat Tamponu Hazırlanması (50 mM pH 7,0):

Sodyum Asetat Trihidrat ( $C_2H_3NaO_2$ ) .....1,701 g

Distile su ..... 250 mL

1,701 g Sodyum Asetat Trihidrat ( $C_2H_3NaO_2$ ) distile suda çözülerek pH 7,0' a ayarlandıktan sonra distile su ile 250 mL'ye tamamlanmıştır [113, 114].

#### **Substrat Çözeltisinin Hazırlanması:**

*p*-NPG (*p*-Nitrofenil  $\beta$ -D-glucopiranosit) ..... 0,0075 g

Sodyum Asetat Tampunu (50 mM, pH 7,0) ..... 5 mL

0,0075 g *p*-NPG (*p*-Nitrofenil  $\beta$ -D-glucopiranosit)'de 5 mL 50 mM pH 7,0 olan Sodyum Asetat Tamponu eklenip vortekste homojen hale getirilmesiyle hazırlanmıştır [82].

#### **Reaksiyon Durdurma Tamponunun Hazırlanması:**

Sodyum Karbonat ( $Na_2CO_3$ ) ..... 26,498 g

Distile suda ..... 500 mL

26,498 g Sodyum Karbonat ( $Na_2CO_3$ ) 500 mL distile suda çözülerek hazırlanmıştır [82].

### **2.1.3.6 Lowry Yöntemiyle Proteinlerin Kantitatif Tayininde Kullanılan Çözeltiler**

**A Çözeltisi:** 0,4001 g Sodyum Hidroksit (NaOH) 100 mL distile suda çözüldükten sonra 2 g Bakır Sülfat ( $Na_2CO_3$ ) hazırlanan NaOH çözeltisinde çözülüp +4°C' de buzdolabında saklanmıştır.

**B Çözeltisi:** 1,0 g Potasyum Sodyum Tartarat Tetrahidrat (NaK Tartarat;  $C_4H_4KNaO_6.4H_2O$ ) 100 mL distile suda çözülerek hazırlanıp buzdolabında +4°C' de saklanmıştır.

**C Çözeltisi:** 0,5 g Bakır Sülfat ( $CuSO_4$ ) 100 mL distile suda çözülüp buzdolabında +4°C' de saklanmıştır.

**D Çözeltisi:** 50 mL D çözeltisinden hazırlamak için, A Çözeltisinden 48 mL alınarak üzerine 1 mL B Çözeltisi ve 1 mL A Çözeltisinin ilave edilmesiyle taze olarak hazırlanmıştır.

**E Çözeltisi;** 1:1 oranındaki distile su ile Folin Fenol Reaktifi'nin karıştırılmasıyla taze olarak hazırlanmıştır.

**Sığır Serum Albümin (BSA):** 1:1 oranında BSA ve distile suyun karıştırılmasıyla taze olarak hazırlanmıştır [115].

### **2.1.3.7 Hidrofobik Jele Bağlanmış $\beta$ -glukosidaz Enziminin Elüsyonu İçin Kullanılan Çözeltiler**

Gradyent mikser kullanılarak tuzlu ve tuzsuz çözeltiler yardımıyla tuz gradiyenti oluşturulmuş ve hidrofobik jele bağlanmış  $\beta$ -glukosidaz enziminin saflaştırılması sağlanmıştır [82, 116].

**Tuzlu Tampon Çözelti:** 198,210 g Amonyum sülfat tuzu (1,5M) ( $\text{NH}_4(\text{SO}_2)$ ), 7,095 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (50 mM) ile karıştırılarak saf suda çözüldükten sonra 2M HCl ile pH' sını 6,8' e ayarlanarak saf su ile 1 L'ye tamamlanmıştır [82, 116].

**Tuzsuz Tampon Çözelti:** Saf suda çözülen 7,095 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (50 mM)'ün pH'sını 2M HCl ile pH 6,8' e ayarlanarak son hacim saf su ile 1 L' ye tamamlanmıştır [82, 116].

### **2.1.3.8 SDS-PAGE Tekniğinde Kullanılan Çözeltiler**

**Tank Tamponu:** 3 g Tris Base ( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ ) ve 14,4 g Glisin ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ ), 1 g Sodyum Dodesil Sülfat (SDS; $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$ ) distile suda çözülerek son hacim 1 L' ye tamamlanmıştır [117, 118, 119].

**Numune Tamponu:** 0,5M pH' sını 6,8 olan 2,5 mL Tris Base, 4 mL %10' luk SDS, 2 mL Gliserol ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ ), 1 mL  $\beta$ -merkaptoetanol ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ ) (% 99,5) ve 0,01 g Bromfenol mavisinin 0,5 mL distile suda karıştırılması ile hazırlanmıştır [117, 118, 119].

**Renklendirme Çözeltisi:** 0,66 g Coomassie Brilliant Blue G-250 120 mL Metanolde ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) çözüldükten sonra üzerine 24 mL saf asetik asit ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) ve 120 mL distile suyun eklenmesiyle hazırlanmıştır [117, 118, 119].

**Renk Açma Çözeltisi:** 75 mL Saf Asetik Asit ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), 50 mL Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) ve 875 mL distile su karıştırılarak hazırlanmıştır [117, 118, 119].

**%10 'luk SDS:** 1 g SDS distile suda çözüldükten sonra son hacim 10 mL' ye tamamlanmıştır [117, 118, 119].

**%10'luk Amonyum Persülfat ( $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ):** 1 g Amonyum Persülfat distile suda çözüldükten sonra son hacim 10 mL' ye tamamlanmıştır [117, 118, 119].

**SDS-PAGE' de Ayırma Jeli Hazırlanırken Kullanılan Alt Tampon:** 11,82 g Tris-Base (1,5M) distile suda çözüldükten sonra 1M NaOH ile pH 8,8 getirilerek distile su ile son hacim 50 mL olacak şekilde ayarlanmıştır [117, 118, 119].

**SDS-PAGE' de Kullanılan Yığıma Jeli Hazırlanırken Üst Tampon:** 3,94 g Tris-Base (0,5M) distile suda çözüldükten sonra 2M HCl ile pH 6,8'e getirilerek son hacim 50 mL' olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır [117, 118, 119].

**Tablo 2.1:** SDS-PAGE' de kullanılan ayırma ve yığıma jellerinin hazırlanışı

SDS-PAGE	Ayırma Jeli (%10)	Yığıma Jeli (%3)
Alt Tampon	3,125 mL	-----
Üst Tampon	-----	1,25 mL
SDS	125 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$
Distile Su	5,025 mL	3,05 mL
Akril amid/Bis (%30)	4,1625 mL	0,65 mL
TEMED( <i>N,N,N',N'</i> Tetrametil etilen diamine)	6,25 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$
%10' luk (w/v) APS	187,5 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$

### 2.1.3.9 Native-PAGE Tekniğinde Kullanılan Çözeltiler

**Tank Tamponu:** 3 g Tris Base ve 14,4 g Glisin, 1 L distile suda çözülerek hazırlanmıştır [117, 120, 121].

**Numune Tamponu:** 0,5M, pH 6,8 olan 2,5 mL Tris-Base, 2 mL Gliserol, 0,01 g Bromfenol Mavisi ve 5,5 mL distile su ile karıştırılarak hazırlanmıştır [117, 120, 121].

**Renklendirme Çözeltisi:** 0,66 g Coomassie Brilliant Blue G-250, 120 mL Metanolde çözüldükten sonra bu çözeltiye 24 mL Saf Asetik Asit ve 120 mL distile su ilave edilerek hazırlanmıştır [117, 120, 121].

**Renk Açma Çözeltisi:** 75 mL Saf Asetik Asit ve 50 mL Metanol 875 mL distile su ile karıştırılarak hazırlanmıştır [117, 120, 121].

**%10'luk Amonyum Persülfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>):** 1 g Amonyum Persülfat distile suda çözüldükten sonra son hacim 10 mL' ye tamamlanmıştır [117, 120, 121].

**Native-PAGE' de Ayırma Jeli Hazırlanırken Kullanılan Alt Tampon:** 1,5M 11,82 g Tris-Base 30 mL distile suda çözüldükten sonra 1N NaOH ile pH 8,8'e getirilerek distile su ile 50 ml' ye tamamlanmıştır [117, 120, 121].

**Native-PAGE' de Kullanılan Yığıma Jeli Hazırlanırken Üst Tampon:** 0,5M ve 3,94 g Tris-Base 30 mL distile suda çözüldükten sonra 2M HCl ile pH 6,8' e ayarlanarak 50 mL'ye tamamlanmıştır [117, 120, 121].

**Tablo 2.2:** Native-PAGE' de kullanılan ayırma ve yığıma jellerinin hazırlanışı

Native-PAGE	Ayırma Jeli (%10)	Yığıma Jeli (%3)
Alt Tampon	2,5 mL	-----
Üst Tampon	-----	1,25 mL
Distile Su	4,89 mL	3,07 mL
Akril amid/Bis (%30)	2,5 mL	625 µL
TEMED(N,N,N',N'Tetrametil etilen diamine)	10 µL	5 µL
%10' luk (w/v) APS	100 µL	50 µL

## 2.2 Metot

### 2.2.1 $\beta$ -glukosidaz Aktivitesine Sahip Olan Mikrofungusların Belirlenmesi

*A.oryzae* NRRL 5590, *A.caelatus* NRRL 26107, *A.sydowii* NRRL 4768 ve *A.bisporus* NRRL 3692 suşları  $\beta$ -glukosidaz enzimini sentezleyip sentezlemediklerini gözlemek amacıyla ile % 5 CMC ( $C_{28}H_{30}Na_8O_{27}$ ) içeren Czapek Dox Agar besiyerine tek nokta ekim tekniği ile inokule edilerek 30°C' de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda mikrofungus kolonilerinin üzeri %0,1' lik Kongo Kırmızısı çözeltisi ile kaplanıp 30°C' de 15 dakika inkübatörde bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda boya uzaklaştırılarak koloniler 1M NaCl çözeltisi ile yıkadıktan sonra koloni yüzeyini kaplayacak şekilde tekrar 1M NaCl çözeltisi uygulanıp 30°C' de 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından 1M NaCl çözeltisi uzaklaştırılarak koloni etrafında şeffaf hidroliz zonu oluşturan fungal suşlar  $\beta$ -glukosidaz pozitif olarak değerlendirilmiştir [122, 108].

Enzim eldesinde kullanılacak mikrofungusların belirlenmesinden sonra; mikrofungus gelişimi üzerine etkili olan parametrelerden pH, nemlendirme sıvısı, inkübasyon sıcaklığı ve inkübasyon süresinin optimizasyonları yapılmıştır. Optimize edilen bu parametreler birbirlerinden bağımsız olarak test edilerek daha sonraki basamakta sabitlenmiştir [78, 72].

### 2.2.2 Mikrofungusların Üretimi ve Spor Eldesi

$\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi açısından pozitif olarak değerlendirilen *Aspergillus* türü mikrofunguslar Czapek Dox Agar besiyeri içeren petri kaplarına tek nokta ekim tekniği ile inokule edilerek 25°C' de 7 gün inkübe edilmiştir. Daha sonra petri kaplarında gelişen mikrofungus kolonilerinin üzeri %0,1' lik Tween 80 ile kaplanarak spor süspansiyonları elde edilmiştir [109].



Elde edilen  $10^7$  CFU/ml spor süspansiyonundan 5 mL alınıp 150 mL Czapek Dox Broth besiyerine inokule edilerek 150 rpm ve  $30^\circ\text{C}$ ' de 72 saat süre ile inkübasyonları sağlanmıştır.

### **2.2.3 Katı Substrat Fermentasyon (KSF) Ortamının Hazırlanması**

Substrat olarak kullanılacak buğday samanı doğrayıcıda 3-5 cm' ye kadar küçültüldükten sonra 24 saat  $80^\circ\text{C}$ ' de kurutularak 250 mL' lik erlenlere 5' er g olacak şekilde yerleştirilmiştir. Bu işlemin ardından buğday samanının pH' ı 4,0 ve 5,0 olan 0,2M  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ; pH' ı 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 olan 0,2M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ve pH' ı 8,5 ve 9,0 olan 0,2M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  tamponları ile nem düzeyleri %55 olarak ayarlanıp,  $121^\circ\text{C}$ ' de 20 dakika süreyle otoklavlanarak sterilizasyonları sağlanmıştır [78, 72].

### **2.2.4 Katı Substrat Fermentasyonu (KSF) Kültür Ortamına Ekim ve Kısmi Saflaştırılmış $\beta$ -glukosidaz Enziminin Eldesi**

Buğday samanı ile hazırlanan KSF ortamlarına, Czapek Dox Broth besiyerinde geliştirilen *A.oryzae* NRRL 5590 ve *A.caelatus* NRRL 26107' un sıvı kültürlerinden 3 ml inokule edilerek  $30^\circ\text{C}$ ' de 7 gün süreyle statik inkübatörde fungus gelişimi için bekletilmiştir [109].

İnokülasyon süresinin sonunda KSF ortamına 75 mL distile su ilave edilerek 150 rpm' e ayarlanmış çalkalamalı inkübatörde 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminin ardından ekstrakt önce steril gazlı bezden, ardından da Whatman No:1 filtre kağıdından süzülerek filtrat alınmıştır. Filtrat  $4^\circ\text{C}$ ' de 10000rpm' de 10 dk. santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme işlemi ile filtratın süpernatant kısmı pellet kısmından ayrılmıştır ve elde edilen süpernatant kısmi saflaştırılmış enzim kaynağı olarak kullanılmıştır [109].

## 2.2.5 Mikrofungusların Katı Substrat Fermentasyon Ortamında Geliştirilme Koşullarının Üretilen $\beta$ -glukosidaz Sentezi Üzerine Etkisi

Katı Substrat Fermentasyonunda mikrofungustan  $\beta$ -glukosidaz enzimi üretiminde; pH, nemlendirme sıvısı, inkübasyon sıcaklığı ve inkübasyon süresi optimize edilmesi gereken önemli parametrelerdir. Bu parametrelerin herbiri bağımsız olarak test edilerek bir sonraki basamakta sabitlenmiştir [78, 72].

### 2.2.5.1 Optimum pH ve Nemlendirme Sıvılarının Belirlenmesi

Optimum pH ve nemlendirme sıvısını belirlemek için buğday samanı ile hazırlanan KSF ortamı, pH' ı 4,0 ve 5,0 olan 0,2M  $C_6H_8O_7$ ; pH' ı 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 olan  $NaH_2PO_4$  ve pH' ı 8,5; 9,0 olan  $Na_2HPO_4$  tamponları kullanılarak nem düzeyi %55 olarak ayarlanıp 121°C' de 20 dakika otoklavda steril edilmiştir [72, 78, 109].

*A.oryzae* NRRL 5590 ve *A.caelatus* NRRL 26107' un sıvı kültüründen 3 mL alınarak, KSF ortamına inokule edilmiş ve 30°C' de 7 gün süre ile statik inkübatörde inkübe edilmiştir [72, 78, 109].

İnkübasyon süresinin sonunda KSF ortamının üzerine 75 mL distile su konarak 150 rpm' lik çalkalamalı inkübatörde 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda ekstraktlar sırası ile steril gazlı bezden ve Whatman No:1 kağıdından süzülerek filtratları alınmıştır. Filtratlar 4°C' de 10000rpm de 10 dk. santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme işlemi ile filtratların süpernatant kısmı pellet kısmından ayrılmış ve elde edilen süpernatantlar kısmi saflaştırılmış enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Kısmi saflaştırılmış enzimlerin  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi ölçülüp, optimum pH' daki nemlendirme sıvısı belirlenmiştir [109].

### 2.2.5.2 Optimum İnkübasyon Sıcaklığının Belirlenmesi

KSF ortamına inkübasyon sıcaklığının etkisinin belirlenmesi için; buğday samanı ile hazırlanan KSF ortamları bir önceki basamakta optimize edilen pH' daki nemlendirme sıvısı ile nem düzeyi %55 olarak ayarlandıktan sonra üzerine *A.oryzae* NRRL 5590 ve *A.caelatus* NRRL 26107' nin sıvı kültürlerinden 3 mL inokule edilip

25, 30, 35, 40, 45°C' lik sıcaklıklarda 7 gün süre ile test mikrofunguslarının gelişimleri sağlanmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda kısmi saflaştırılmış enzimler elde edilerek  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi ölçülmüş ve optimum inkübasyon sıcaklığı belirlenmiştir [72, 78, 109].

### 2.2.5.3 Optimum İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi

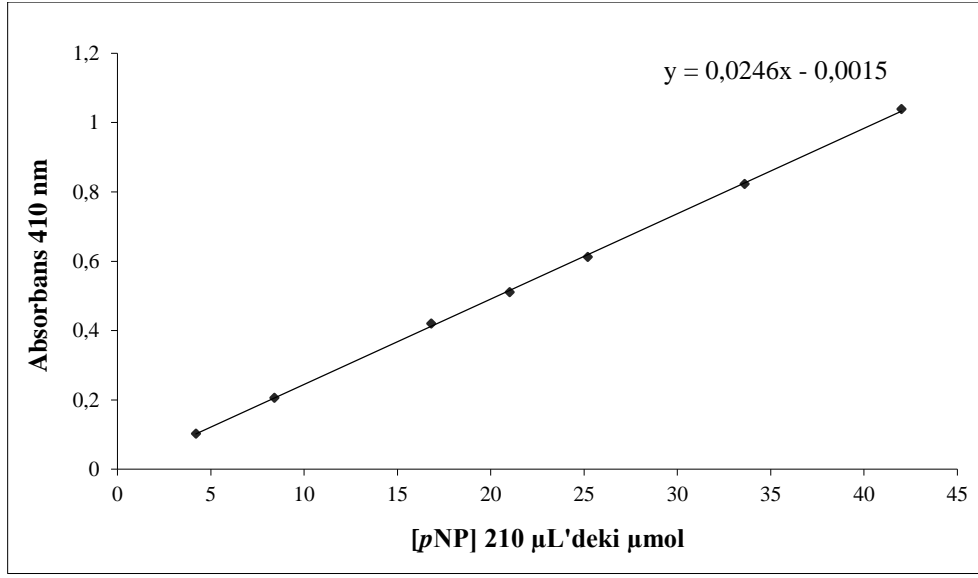
Optimum inkübasyon süresini belirlemek için; KSF ortamları önceki basamakta optimize edilen pH' daki nemlendirme sıvısı ile nem düzeyi %55 olarak ayarlandıktan sonra üzerine *A.oryzae* NRRL 5590 ve *A.caelatus* NRRL 26107' nin sıvı kültürlerinden 3 mL inokule edilerek daha önce belirlenen inkübasyon sıcaklığında test mikrofunguslarının geliştirilmesi sağlanmıştır. Ardından 4.günden itibaren enzim aktivitesinin düşüş gösterdiği güne kadar kısmi saflaştırılmış enzimler elde edilerek  $\beta$ -glukosidaz enzim aktiviteleri ölçülüp, optimum inkübasyon süresi belirlenmiştir [72, 78, 109].

### 2.2.6 $\beta$ -glukosidaz Aktivitesinin Belirlenmesi

$\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak 96 kuyucuklu plakalarda (Well-plate) tayin edilmiştir. Bu amaçla 96' lık plakada örnek ve kontrol kuyucukları oluşturulmuştur. Örnek kuyucuklarına; 70  $\mu$ l, 5 mM *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranosit (*p*NPG) ile hazırlanan substrat çözeltisi ve üzerlerine 70  $\mu$ l kısmi saflaştırılmış enzimden, her bir kontrol kuyucuğuna ise; 70  $\mu$ l, 50 mM ve pH' sı 7,0 olan Sodyum Asetat tamponu ve üzerine 70  $\mu$ l kısmi saflaştırılmış enzim eklenmiştir. Hazırlanan plakanın 37°C' de, 30 dakika inkübe edilmesinin ardından plakanın her bir kuyucuğuna 70  $\mu$ l, 0,5M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi ilave edilerek reaksiyonun durdurulması sağlandıktan sonra 410 nm' de absorbansları alınmıştır [116, 82].

$\beta$ -glukosidaz enzimi, *p*NPG substratını hidrolizleyerek serbest halde *p*-nitrofenol ve  $\beta$ -D-glukopiranosid ürünlerini ortaya çıkarır.  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi, enzim ünite hesaplamasında elde edilen absorbansa karşılık gelen *p*-nitrofenol ürün konsantrasyonunun  $\mu$ M cinsinden değeridir. Çalışmamızda ürün miktarının belirlenmesinde daha önceden hazırlanmış olan standart *p*NPG grafiği

kullanılmıştır. Standart grafik hazırlanırken son hacim 210 µL olacak şekilde *p*-nitrofenolün bir seri konsantrasyonunu hazırlanmış ve kör olarak aynı miktarda distile suya karşı 410 nm’ de absorbanları okunmuştur. Elde edilen absorban değerlerinden *p*-nitrofenol standart eğrisi oluşturulmuştur. Standart *p*NPG grafiğinden elde edilen denklem ile bir Enzim Ünitesi (EU), bir dakikada oluşan *p*-nitrofenolün µmol cinsinden değeri olarak hesaplanmıştır [82, 116].



Şekil 2.3: Enzim aktivite tayininde kullanılan 210 µL hacimli *p*NPG standart grafiği

## 2.2.7 Protein Tayini

### 2.2.7.1 Kalitatif Protein Tayini

Kalitatif protein tayini, Warburg Metodu olarak bilinen proteinlerin yapısında bulunan tirozin ve triptofan amino asitlerinin 280 nm’ de (UV) maksimum absorban göstermesi esasına dayanan yöntemle yapılmıştır. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi işleminden sonra eşit hacimde alınmış olan bütün tüplere bu yöntemle kalitatif protein tayini yapılmıştır. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi sonucu çıkan tüplerin her birinden 210 µL alınarak 96’ lık kuvarz plakanın her bir kuyusuna konulmuştur. Kör olarak ise 210 µL distile su konuldu ve spektrofotometrede 280 nm’ de köre karşı absorban değerleri okunmuştur [116, 123].

### 2.2.7.2 Lowry Metodu İle Proteinlerin Kantitatif Tayini

Amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen tüplerin ve Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile saflaştırma işlemi ardından en yüksek aktivite gösteren tüplerin  $\beta$ -glukosidaz enziminin protein miktarı Lowry Metodu ile belirlenmiştir. Bu metodun uygulanması için şu çözeltiler hazırlanmıştır;

A Çözeltisi; (w/v) %2  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,1M NaOH' da çözülerek hazırlanmıştır.

B Çözeltisi; (w/v) %1 NaK Tartaratın distile suyla çözülmesi ile hazırlanmıştır.

C Çözeltisi; (w/v) %0,5  $\text{CuSO}_4$ ' un distile suyla çözülmesi ile hazırlanmıştır.

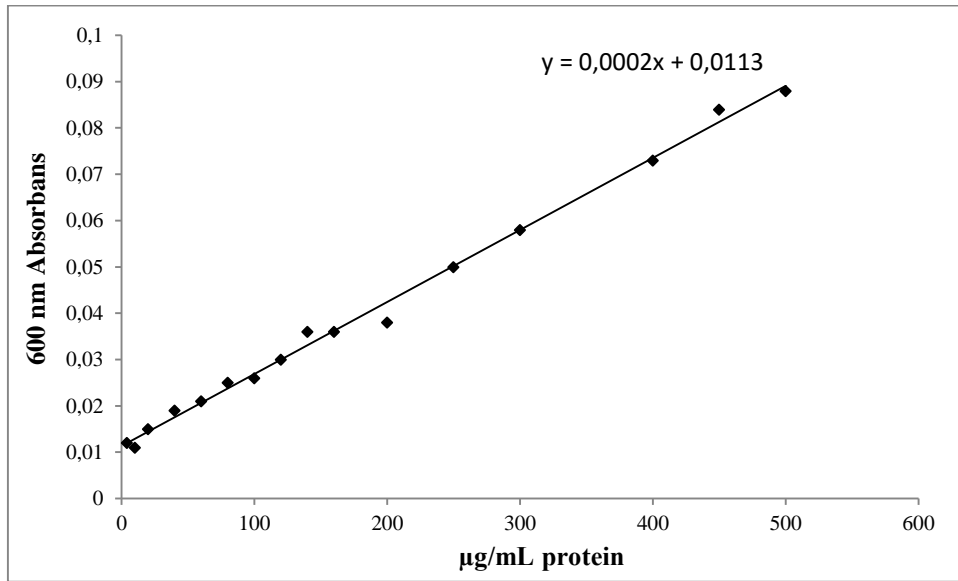
D Çözeltisi; 48 mL A çözeltisinden alınarak üzerine 1 mL B çözeltisinin ve 1 mL C çözeltisinin ilave edilmesiyle hazırlanmıştır.

E Çözeltisi; 1:1 oranında Folin ve distile suyun karıştırılmasıyla hazırlanmıştır [115].

Amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen tüplere ve saflaştırma işlemleri sonrasında elde edilen numunelerin protein miktarları belirlenirken şu yol izlenmiştir: Örnek tüplerine protein miktarı belirlenmesi amaçlanan numunenin 1/10 oranında distile suyla seyreltilmiş halinden 100  $\mu\text{l}$  alınmıştır. Üzerlerine 2000  $\mu\text{l}$  (2 mL) Çözelti D' den eklenmiştir. Kör tüplerine ise 100  $\mu\text{l}$  distile su konulmuş ve üzerine 2000  $\mu\text{l}$  Çözelti D' den eklenmiştir. Örnek ve kör tüpleri 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda örnek ve kör tüplerine taze olarak hazırlanan Çözelti E' den 200  $\mu\text{l}$  (0,2 mL) eklenip zaman kaybetmeden vorteks ile homojen hale getirilmiş ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda örnek ve kontrol tüplerinden 210  $\mu\text{l}$  alınak 96' lık plakalara konulmuş ve 600 nm spektrofotometrede absorbansları köre karşı okunmuştur. Bu absorbans değerler, BSA grafiğinden elde edilen formül ile hesaplanarak protein miktarı grafiği oluşturulmuştur [115].

### 2.2.7.3 BSA Standart Grafiğinin Hazırlanması

1:1 oranında hazırlanan standart sığır serum albümin çözeltilisinden tüplere sırasıyla 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µL olacak şekilde konulmuş ve son hacimleri distile suyla 100 µL' ye tamamlanmıştır. Ardından sırasıyla her tüpe 2 mL D Çözeltilisinden eklenmiş ve oda ısısında 10 dakika inkübasyonları sağlanmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda sırasıyla her tüpe 1:1 oranında hazırlanan E Çözeltilisinden 200 µL (0,2 mL) eklenmiş ve hemen ardından vortex ile homojenize edilmiştir. Daha sonra 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda örnekler 96' lık plakanın kuyucuklarına 210 µL konularak 600 nm' de köre karşılık gelen absorbans değerleri okunmuştur. Kör olarak BSA içermeyen 1. tüp kullanılmıştır. 600 nm' de elde edilen absorbans değerlerine karşılık gelen, µg protein değerleri kullanılarak daha sonraki çalışmalarda kullanılacak olan standart grafik çizilmiştir [115].



Şekil 2.4: Lowry yöntemi ile protein miktarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik

Elde edilen grafikten aşağıdaki formül elde edilmiş ve diğer örneklerin Lowry Metodu ile protein miktarı hesaplaması bu formül üzerinden yapılmıştır.

$$\text{Protein Miktarı (µg/mL)} = \frac{(\text{Örnek Tüpün Absorbansı} - \text{Kontrol tüpün Absorbansı}) - 0,0113}{0,0002}$$

## 2.2.8 Enzimin Saflaştırılması

### 2.2.8.1 Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi

Amonyum sülfat aralığının belirlenmesi için optimum koşullarda elde edilen kısmi saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz enzimine uygun konsantrasyondaki amonyum sülfat miktarı aşağıdaki formülle tespit edilmiştir:

$$g(NH_4)_2SO_4 = \frac{1.77xVx(S_2 - S_1)}{3.54 - S_2}$$

V : Ekstrakt hacmi

$S_1$  : 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

$S_2$  : 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

Optimum koşullarda elde edilen kısmi saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz enziminin amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesi için 0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, %' lik (w/v) oranlarında çöktürme yapılmıştır. Kısmi saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz enziminin her bir %' lik (w/v) aralık için yukarıdaki formüle göre hesaplanan miktardaki amonyum sülfat, 30 dakika boyunca buz üzerinde manyetik karıştırıcıda yavaş yavaş eklenerek çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra 15000 rpm' de 4°C'de 30 dakika santrifijlenmiş ve süpernatant kısım pellet kısmından ayrılıp, pellet kısım 4 mL, tuzlu tampon ile çözülmüştür [124].

Her bir aralık için çözülen örneklerin  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi tespit edilmiştir. Enzim aktivitesi belirlenirken 10 farklı tuz konsantrasyonu için 10 ayrı kör ve örnek kuyucukları hazırlanarak  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi ölçülmüştür. Ayrıca her bir aralık için örneklerin Lowry metodu ile kantitatif protein miktarları belirlenmiştir [124].

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

*A. oryzae* NRRL 5590 ve *A. caelatus* NRRL 26107' dan, buğday samanının KSF ortamı olarak kullanılması sonucu optimum koşullarda elde edilen  $\beta$ -glukosidaz enziminin saflaştırılması için amonyum sülfat çöktürmesinin ardından Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi metodu kullanılmıştır. Bu saflaştırma basamağında jel olarak Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin kullanılmıştır [116].

Hidrobik etkileşim kolonunun, saflaştırma işlemine hazırlanması için 1,5M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  içeren 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 6,8) ile dengelenmiştir. Tampon çözeltinin, kolon dengelendikten sonra jel seviyesinin 2 cm üzerine kadar inmesi beklenmiş ve amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen enzim çökeleği 4 mL, 1,5M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  içeren 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 6,8) ile çözülmüştür. Bu çözeltinin 500  $\mu\text{l}$ ' si protein tayini ve  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesini ölçmek için ayrıldıktan sonra kalan 3,5 mL' lik çözelti kolona yüklenmiştir. 1,5M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  içeren 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 6,8) kullanılarak yüksek tuz konsantrasyonundan düşük tuz konsantrasyonuna doğru tuz gradiyenti oluşturulmuştur. Oluşan tuz gradiyenti ile kolondan elüe edilen elüantlar 2 mL' lik ependorf tüplere alınmıştır. Elüsyon işlemine 280 nm' deki absorbans sıfır oluncaya kadar devam edilmiştir. Elüsyon işlemi sonunda ependorf tüplerdeki elüantların 280 nm' de kalitatif yolla protein miktarları tespit edilmiştir. Ardından her bir ependorf tüpteki elüantın  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi belirlenmiştir. Tüp numaralarına karşı elde edilen değerler ile aktivite ve protein miktarlarını içeren grafiği çizilmiştir [82, 116].

### **2.2.9 Doğal/Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (Native/SDS-PAGE) ile $\beta$ -glukosidaz Enziminin Saflığı ve Alt Birimlerinin Belirlenmesi**

$\beta$ -glukosidaz enzimleri amonyum sülfat çöktürmesi ardından Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile saflaştırıldıktan sonra SDS/Native olmak üzere iki farklı elektrofrez yöntemi ile saflığı ve alt birim varlığı/sayısı kontrol edilmiştir. Bunlardan birincisi, proteinlerin doğal yapılarını bozucu ajanların kullanılmadığı ve saflığının tayini içinde kullanılabilen Native-PAGE (Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez) dir.



İkincisi ise proteinlerin doğal yapılarını değiştiren ve onların eşit ylık yoğunluğuna sahip olmasını sağlayan bozucu ajanların (Merkaptoetanol ve SDS) kullanıldığı SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sulfat Poliakrilamid Jel elektroforezi)' dir. SDS-PAGE ile yapılan elektroforezde proteinlerin doğal yapıları bozulduğu için proteinler sadece moleköl ağırlığına göre ayrılmıştır. SDS-PAGE' de proteinlerin, birden fazla alt birime sahip olup olmadığı ve moleköl ağırlıklarının belirlenmesinde kullanılmıştır. Laemmli (1970) tarafından belirtilen yöntemle SDS-PAGE ve Native-PAGE elektroforezlerinde yığma jeli %3' lük ve ayırma jeli %10' luk olacak şekilde iki farklı akrilamid konsantrasyonuna sahip kesikli jeller hazırlanmıştır [117, 118, 119].

### **2.2.9.1 SDS-PAGE ile $\beta$ -glukosidaz Enziminin Saflığının ve Alt Birimlerinin Kontrolü**

SDS-PAGE tekniğinde jel hazırlamak için elektroforez cam plakaları önce distile su ile yıkanmıştır sonra etil alkol ile iyice temizlenmiştir. Ardından plakalar arasına plastik aralık oluşturucusu yerleştirilerek iki cam plaka birbiri üzerine konulmuş ve elektroforezin dökme aparatına sabitlenmiştir. Tablo 2.1' de belirtildiği gibi SDS kullanılarak ayırma jeli hazırlanmıştır ve plakalar arasına üstten 2-3 cm kalana kadar hava kabarcığı kalmayacak şekilde yavaşça dökülmüştür. Jel yüzeyinin düzgün olması için distile su ile ince bir tabaka oluşturulmuştur. 1-2 saat polimerizasyonun tamamlanması beklendikten sonra üst yüzeydeki distile su jele zarar vermeden dikkatlice boşaltılmıştır. Daha sonra cam plakaların arasındaki polimerleşmiş ayırma jelinin üzerine tamamen doluncaya kadar Tablo 2.1' de belirtildiği gibi SDS kullanılarak hazırlanan yığma jeli dökülmüştür. Cam plakalar arasındaki yükleme jelinin üzerine tarak aparatı dikkatlice yerleştirilerek 30 dk yığma jelinin polimerleşmesi beklenmiştir. Yığma jeli polimerleştikten sonra tarak kuyucuklarının arasının bozulmamasına dikkat edilecek şekilde dikkatlice çıkarılmıştır. Taraklar tarafından oluşan kuyucuklar önce saf suyla sonra tank tamponuyla yıkanmıştır. Polimerize jellerin bulunduğu cam plaka elektroforez tankına yerleştirilmiş ve tankın alt ve üst kısmına SDS'li yürütme tamponu konulmuştur [117, 118, 119].

Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi sonucunda elde edilen elüantlardan yüksek aktivite gösterenler birleştirilerek bir numune çözeltisi oluşturulmuştur. Elde

edilen bu çözelti toplam hacmi 50 µL olacak şekilde 1:1 oranında SDS ve β-merkaptolanol içeren numune yükleme tamponu ile karıştırılmıştır. Standart protein çözeltisinden yani markerdan 5 µL alınmıştır. Marker ve numuneler 5 dakika 95°C'ye ayarlanan termoblokta bekletilmiştir. Marker ve numunelerin soğuması beklenmiş ve soğuduktan sonra kuyucuklara yüklenmiştir. Güç kaynağı 80 volt'a ayarlanarak elektroforez tankına bağlanmıştır. Proteinlerin jeldeki hareketini incelemeye yarayan numune yükleme tamponu içindeki boyaya ait bant, ayırma jeline geldiğinde voltaj 150 volt'a yükseltilmiştir. Yürütme işlemine, proteinler ayırma jelinin bitişine 1 cm kalana kadar devam edilmiştir. Bantlar belirtilen noktaya ulaştığında akım kesilerek yürütme durdurulmuştur. Cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarılarak yığılma jeli kesilip ayrılmıştır. Protein bantlarını içeren ayırma jeli renklendirme çözeltisinin içine konulmuş ve 1,5-2 saat düşük çalkalama seviyesine ayarlanmış çalkalayıcı üzerine bırakılmıştır. Daha sonra jel renklendirme çözeltisinden çıkartılmış ve renk açma çözeltisine konulmuştur. Belirli aralıklarla değiştirmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp protein bantları belirginleşinceye kadar renk açma çözeltisi içerisinde çalkalanmıştır. Jel renk açma çözeltisinden çıkarıldıktan sonra jel görüntüleme sistemi (UVP) kullanılarak jel görüntüsü bilgisayara aktarılmıştır [117, 118, 119].

### **2.2.9.2 Native-PAGE ile β-glukosidaz Enziminin Saflığının ve Alt Birimlerinin Kontrolü**

Native-PAGE tekniğinde, SDS-PAGE tekniğindeki gibi ön hazırlıklar yapılmış ve sırasıyla Tablo 2.2' de belirtilen şekilde Native-PAGE ayırma jeli ve Native-PAGE yığılma jeli hazırlanmıştır. Hazırlanan jeller cam plaklar arasına dökülmüştür. Jel elektroforez tankına yerleştirilmiş ardından tankın alt ve üst kısmına Native-PAGE yürütme tamponu konulmuştur. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi sonucunda elde edilen elüantlardan yüksek aktivite gösterenler birleştirilerek bir numune çözeltisi oluşturulmuştur. Hazırlanan numune 50 µL olacak şekilde 1:1 oranında Native-PAGE numune yükleme tamponuyla karıştırılmıştır. Sadece molekül ağırlık standartlarını içeren standart protein çözeltisinden yani markerdan 5 µL alınmıştır. Daha sonra hazırlanan bu numuneler kuyucuklara yüklenmiştir. Diğer aşamalar SDS-PAGE tekniğinde belirtildiği gibi yapılmıştır. Son olarak jel, renk açma çözeltisinin içinden

çıkartıldıktan sonra jel görüntüleme sistemi (UVP) kullanılarak jel görüntüsü bilgisayara aktarılmıştır [117, 120, 121].

## **2.2.10 Saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi**

### **2.2.10.1 Saflaştırılmış Olan $\beta$ -glukosidaz Enziminin Optimum pH Değerinin Belirlenmesi**

KSF ortamında elde edilip saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin optimum pH değerini belirlemek için pH' ı pH 2,0; pH 3,0; pH 4,0; pH 5,0 olan 25 mM Sodyum Asetat Tamponu ve pH' ı 6,0; pH 7,0; pH 8,0; pH 9,0 olan 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu hazırlanmıştır. Hazırlanan tampon çözeltiler ile farklı pH değerindeki 5 mM *p*NPG substrat çözeltisi hazırlanmıştır [82].

Farklı pH değerlerindeki aktiviteleri belirlemek için 96' lık plakada kör ve örnek kuyucukları hazırlanmıştır. Kör kuyucuklarına; 70  $\mu$ L farklı pH değerindeki tampon çözeltilerden ve 70  $\mu$ L saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz enziminden konulmuştur. Örnek kuyucuklarına; 70  $\mu$ L farklı pH değerinde hazırlanan substrat çözeltilerinden ve 70  $\mu$ L saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminden konulmuştur. Ardından plaka statik inkübatörde 37°C' de, 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin ardından 70  $\mu$ L 0,5M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ile reaksiyon durdurulmuş ve zaman kaybetmeden spektrofotometrede 410 nm' de köre karşılık absorbans değeri okunmuştur. Absorbans değerlerinden *p*NPG standart grafiği kullanılarak enzim ünitesi (EU) hesaplanmıştır [82].

### **2.2.10.2 Saflaştırılmış Olan $\beta$ -glukosidaz Enziminin Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi**

Sıcaklığın, saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz enziminin aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95°C' lerde aktivite ölçümleri yapılmıştır. Enzimin farklı sıcaklıklardaki aktivitelerinin belirlenmesinde her sıcaklık değeri için

ayrı 96' lık plakada (well-plate) kör ve örnek kuyucukları hazırlanmıştır. Kör kuyucuklarına 70 µL Sodyum Asetat tampon çözeltisi ve 70 µL saflaştırılmış β-glukosidaz enziminden konulmuştur. Örnek kuyucuklarına ise 70 µL pNPG substrat çözeltisi ve 70 µL saflaştırılmış β-glukosidaz enziminden konulmuştur. Ardından plakalar (Well-plate) belirlenen sıcaklıklardaki inkübatörlerde 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin ardından 70 µL 0,5M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ile reaksiyon durdurulmuş ve spektrofotometrede 410 nm' de köre karşılık absorbans değeri okunmuştur. Absorbans değerlerinden pNPG standart grafiği kullanılarak enzim ünitesi (EU) hesaplanmıştır [82, 48].

### **2.2.10.3 Saflaştırılmış Olan β-glukosidaz Enziminin Termal Kararlılığının Belirlenmesi**

Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile saflaştırılan β-glukosidaz enziminin termal kararlılığının incelenmesi amacı ile β-glukosidaz enzimi 45, 55, 65, 75, 85°C'lerde ayrı ayrı inkübe edilmiştir. Isı ile muamele etmemiş enzim çözeltisinden alınan ve aktivitesine bakılan örnek, başlangıç enzim aktivitesi olarak kabul edilmiştir. 45°C' deki termal kararlılığın araştırılması için 120 dk boyunca β-glukosidaz enzimi 45°C' de inkübasyona bırakılmış ve her 10 dakikada bir β-glukosidaz enzim aktivitesi ölçülmüştür. Aynı işlemler 55, 65, 75°C' deki termal kararlılığın araştırılması için de yapılmıştır. 85°C' deki termal kararlılığın araştırılması için; 2 dakika aralıkla β-glukosidaz enzim aktivite ölçümü, aktivite sıfırlanana kadar sürdürülmüştür. Absorbans değerlerinden pNPG standart grafiği kullanılarak enzim ünitesi (EU) hesaplanmıştır [80].

### **2.2.10.4 β-glukosidaz Enziminin pNPG Substratına Karşı K<sub>M</sub> ve V<sub>max</sub> Değerlerinin Belirlenmesi**

β-glukosidaz enziminin pNPG substratına olan ilgisi K<sub>M</sub> ve V<sub>max</sub> değerlerinin belirlenmesi amacı ile pNPG substratının 5-70 µl arasında değişen konsantrasyonlarda enzim aktivitesinin ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen aktivite değerleri, reaksiyon hızı [V] (EU/mL) olarak hesaplanmıştır. Reaksiyon hızından (V) yararlanılarak 1/[V]

değeri ve kullanılan substratların konsantrasyonlarından (S) yararlanılarak  $1/[S]$  değeri elde edilmiştir. Bulunan bu değerlerden Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir.

Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen denklem ile  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri bulunmuştur. Bunun için grafiğin  $1/V$  eksenini kestiği nokta olan  $1/V_{max}$  değerinden  $V_{max}$  değeri belirlenmiştir. Denklemin eğimi olan  $K_M/V_{max}$  değerinden  $V_{max}$  yerine yazılarak  $K_M$  değeri hesaplanmıştır [82, 125].

### 2.2.10.5 İnhibitörlerin $IC_{50}$ Değerlerinin Belirlenmesi

D(+)-glukoz ve  $\delta$ -glukonolakton maddelerinin  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine etkisinin tayini yapılarak  $IC_{50}$  değerleri belirlenmiştir. Bunun için reaksiyon hacminde 0,01M konsantrasyondaki *p*NPG substratı ile çalışılmıştır. İnhibitör eklenmemiş ortamdaki enzim aktivitesi tespit edilip bu değer %100 aktivite olarak alınmıştır. 1-60  $\mu$ l arasında değişen inhibitör konsantrasyonlarda enzim aktivite değerleri bulunmuştur. Bu değerlerden % aktivite hesaplanarak % Aktivite-[I] (İnhibitör konsantrasyonu) grafikleri çizilmiştir. Bu grafiklerden yararlanılarak enzim aktivitesini %50 oranında azaltan inhibitör konsantrasyonu yani  $IC_{50}$  değerleri hesaplanmıştır [125, 126].

### 2.2.10.6 İnhibitörlerin $K_i$ Değerlerinin Bulunması

*p*NPG substratı kullanılarak  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine  $\delta$ -glukonolakton ve D(+)-glukozun inhibisyon tipleri ile  $K_i$  değerleri belirlenmiştir.  $K_i$  değerlerinin tespiti için; öncelikle inhibitörsüz ortamda farklı *p*NPG substrat konsantrasyonunda aktivite değerleri bulunmuştur. Bulunan bu aktivite değerleri [V] olarak alınarak  $1/[V]$  değerleri hesaplanmıştır. Değişen substrat konsantrasyonları [S] olarak alınarak,  $1/[S]$  değerleri hesaplanmıştır. Bu hesaplanan değerlerden Lineweaver-Burk grafiği çizildiğinde  $I_0$  doğrusu elde edilmiştir.

$\delta$ -glukonolakton ve D(+)-glukoz inhibitör maddelerinin iki farklı sabit konsantrasyonda *p*NPG substratının 5-70  $\mu$ l arasında farklı konsantrasyonda *p*NPG substratı ile aktivite değerleri tespit edilmiştir. İki farklı inhibitör konsantrasyonu

varlığında, farklı *p*NPG substrat konsantrasyonuna denk gelen aktiviteler ile  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri hesaplanarak Lineweaver-Burk grafiği çizilip  $I_1$ , ve  $I_2$  doğruları oluşturulmuştur.

Lineweaver-Burk grafiklerden yararlanarak  $K_i$  değerleri hesaplanmış ve inhibisyon tipleri belirlenmiştir.  $K_i$  değerleri; yarışmalı (kompetitif) inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrisinde  $1/[S]$  eksenini kestiği nokta olan  $-1/K_M (1+[I]/K_i)$  ifadesi, yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon için  $1/[V]$  eksenini kestiği nokta olan  $1/V_{max} (1+[I]/K_i)$  ifadesi, yarıyarışmalı (unkompetitif) inhibisyon tipi için  $1/[V]$  eksenini kestiği nokta olan  $1/V_{max} (1+[I]/K_i)$  ifadesi kullanılarak hesaplanmıştır.  $K_i$  değerlerinin hesaplanmasında kullanılan denklemlerdeki  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri inhibitörsüz ortamdaki değerlerdir [125, 127].

### 2.2.11 Kullanılan Alet ve Cihazlar

Bu çalışmada aşağı belirtilen alet ve cihazlardan yararlanılmıştır.

Soğutmalı Santrifüj	Sigma 3K15
Soğutmalı Ultrasantrifüj	Hettich EBA 12R
pH metre	Hanna HI 2210
UV-Spektrofotometre (Plaka okuyuculu)	Thermo Type 1510
Manyetik Karıştırıcı	Ikamag RH
Gradient Mikser	Atta C-10 Magnetik Karıştırıcı ve Gradient Tüp
Doğrayıcı	Arçelik
Terazi	Denver Instrument
Otomatik Pipetler	Thermo Scientific
Elektroforez Sistemi	Mini Protean Tetra Cell Bio-Rad
Kromatogafi Kolonu	Sigma (1 cm çap ve 15 cm uzunluk)
Buzdolabı (-20 °C)	Bosch

Vorteks	BioCote Stuart
Otoklav	Hirayama
Buz Makinesi	Fiocchetti AF 10
Sonikatör	Emla E 30H
İnkübatör	Memmert
Jel Görüntüleme Sistemi	Gel Doc-H Imaging System (UVP)

### 3. BULGULAR

#### 3.1 $\beta$ -glukosidaz Aktivitesine Sahip Mikrofungusların Belirlenmesi

$\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesine sahip mikrofungus suşunu belirlemek amacı ile %5 CMC içeren Czapek Dox Agar besiyerine *A.oryzae* NRRL 5590, *A.caelatus* NRRL26107, *A.sydowii* NRRL 4768 ve *A.bisporus* NRRL3692 suşları inoküle edilerek 30°C’ de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda *A.oryzae* NRRL 5590 ve *A.caelatus* NRRL 26107 suşlarının en geniş hidroliz zonuna sahip olduğu belirlendiğinden deneylerde bu suşların kullanılmasına karar verilmiştir (Şekil 3.1 a ve b).



Şekil 3.1: (a) *Aspergillus oryzae* NRRL 5590; (b) *Aspergillus caelatus* NRRL 26107

#### 3.2 Mikrofungusların Katı Substrat Fermentasyon Ortamında Geliştirilme Koşullarının Üretilen $\beta$ -glukosidaz Sentezi Üzerine Etkisi

##### 3.2.1 Optimum pH ve Nemlendirme Sıvılarının Belirlenmesi

Buğday samanı ile hazırlanan KSF ortamları pH’ ı 4,0 ve 5,0 olan 0,2M  $C_6H_8O_7$ ; pH’ ı 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 olan 0,2M  $NaH_2PO_4$  tamponu ve pH’ ı 8,5 ve 9,0 olan 0,2M  $Na_2HPO_4$  tamponu ile nem düzeyi %55 olacak şekilde nemlendirilerek 121°C’ de 20 dakika otoklavda steril edilmiştir. *A.caelatus* NRRL 26107’ un ve *A.oryzae* NRRL 5590’ nın Bölüm 2.2.2’ de anlatıldığı gibi hazırlanan sıvı kültürlerinden 3 mL alınarak KSF ortamlarına ayrı ayrı inokulasyonları yapılarak 7

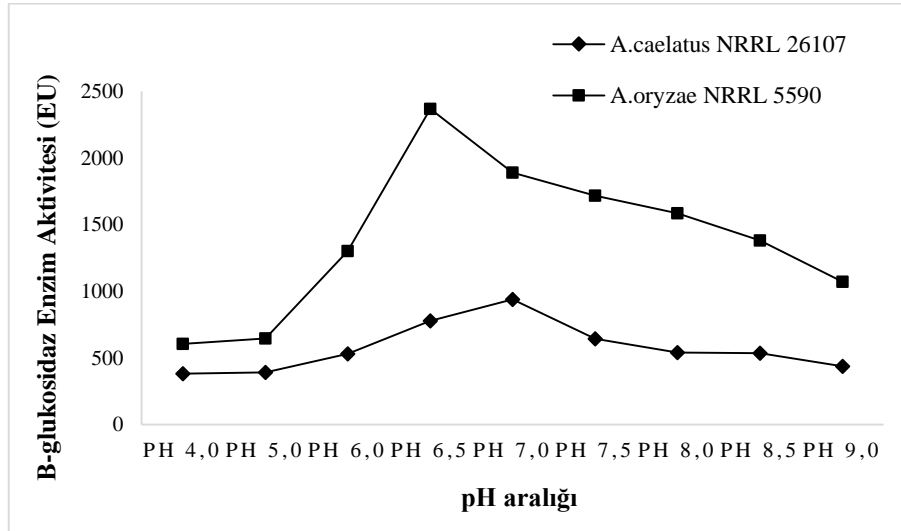


gün boyunca 30°C’ de inkübe edilmeleri sağlanarak bu sürenin sonunda Bölüm 2.2.4’ de anlatıldığı gibi elde edilen kısmi saflaştırılmış enzimlerin,  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi ölçümleri yapılmıştır.

$\beta$ -glukosidaz enzim aktivitelerinin en yüksek olduğu üretim koşulları *A.caelatus* NRRL 26107 için; optimum pH’ ı 7,0 olan 0,2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponu olduğu; *A.oryzae* NRRL 5590 için ise optimum pH’ı 6,5 olan 0,2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponu olduğu tespit edilmiştir (Tablo3.1, Şekil 3.2 ).

**Tablo 3.1:** Farklı pH ve nemlendirme sıvılarının KSF kültür ortamında geliştirilen *A.caelatus* NRRL 26107 ve *A. oryzae* NRRL 5590’ nın  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesine etkisi

Nemlendirme Sıvılarının pH’ı	$\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi (EU)	
	<i>A. caelatus</i> NRRL 26107	<i>A. oryzae</i> NRRL 5590
pH 4,0	382,1138	605,6911
pH 5,0	391,5989	646,3415
pH 6,0	531,1653	1302,1680
pH 6,5	779,1328	<b>2368,5640</b>
pH 7,0	<b>939,0244</b>	1891,5990
pH 7,5	644,9864	1716,8021
pH 8,0	542,0054	1585,3660
pH 8,5	535,2304	1380,7590
pH 9,0	437,6694	1071,8160



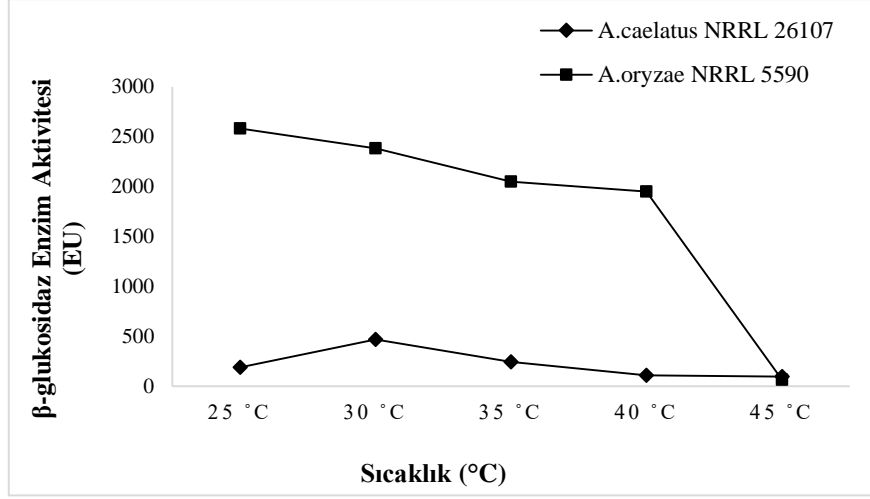
**Şekil 3.2:** Farklı pH ve nemlendirme sıvılarının KSF kültür ortamında geliştirilen *A.caelatus* NRRL 26107 ve *A. oryzae* NRRL 5590’ nın  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesine etkisi

### 3.2.2 Optimum İnkübasyon Sıcaklığının Belirlenmesi

*A.caelatus* NRRL 26107' nin optimum inkübasyon sıcaklığının tespiti için KSF ortamı bir önceki basamakta belirlenen pH' ı 7,0 olan 0,2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponu ile, *A.oryzae* NRRL 5590' nin optimum inkübasyon sıcaklığının belirlenmesi için ise KSF ortamı pH'ı 6,5 olan 0,2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponu ile nemlendirilmiştir. Nemlendirme işleminin ardından KSF ortamları 121°C' de 20 dk. otoklavlanarak sterilizasyonları sağlandıktan sonra *A.caelatus* NRRL 26107 ve *A.oryzae* NRRL 5590' nin sıvı kültürlerinden 3 mL inokule edilerek 25, 30, 35, 40 ve 45°C' lerde 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda Bölüm 2.2.4' de anlatıldığı şekilde elde edilen kısmi saflaştırılmış enzimlerin β-glukosidaz enzim aktivite ölçümleri yapılmış ve β-glukosidaz enzim aktivitesinin optimum olduğu inkübasyon sıcaklıkları *A.caelatus* NRRL 26107 için 30°C; *A.oryzae* NRRL 5590 için ise 25°C olarak tespit edilmiştir (Tablo 3.2; Şekil 3.3).

**Tablo 3.2:** Farklı inkübasyon sıcaklıklarının KSF kültür ortamında geliştirilen *A.caelatus* NRRL 26107 ve *A.oryzae* NRRL 5590' nin β-glukosidaz enzim aktivitesine etkisi

İnkübasyon Sıcaklığı	β-glukosidaz enzim aktivitesi (EU)	
	<i>A. caelatus</i> NRRL 26107	<i>A. oryzae</i> NRRL 5590
25°C	188,3469	<b>2582,6560</b>
30°C	<b>466,1247</b>	2382,1140
35°C	243,9024	2048,7800
40°C	108,4011	1948,5090
45°C	94,8509	62,3306



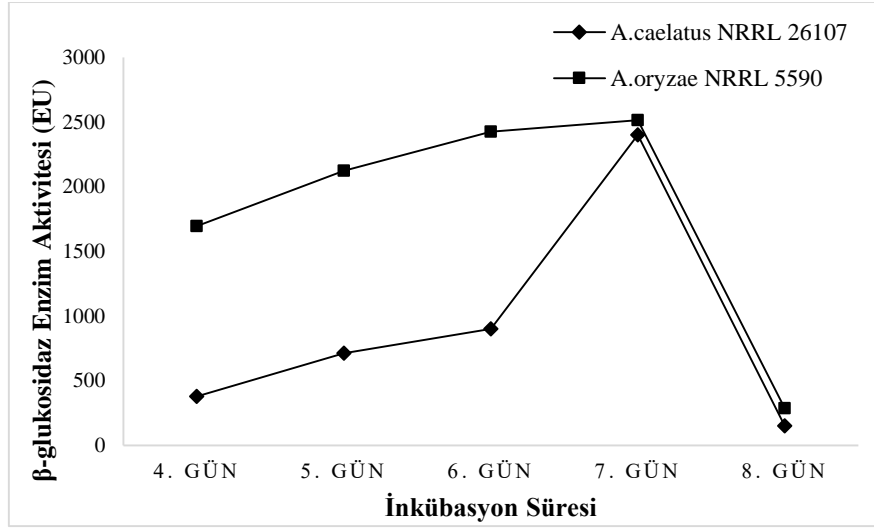
**Şekil 3.3:** Farklı inkübasyon sıcaklıklarının KSF kültür ortamında geliştirilen *A. caelatus* NRRL 26107 ve *A. oryzae* NRRL 5590  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesine etkisi

### 3.2.3 Optimum İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi

*A. caelatus* NRRL 26107 ve *A. oryzae* NRRL 5590' nın optimum inkübasyon sürelerini belirlemek için önceki basamaklarda tespit edilen verilerden yararlanarak *A. caelatus* NRRL 26107' un KSF ortamı pH' ı 7,0 olan 0,2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponu ile nemlendirilerek 30°C' de, *A. oryzae* NRRL 5590' nın KSF ortamı ise pH' ı 6,5 olan 0,2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponu ile nemlendirilerek 25°C' de inkübasyonları sağlanmıştır. İnkübasyonun 4. gününden itibaren enzim aktivitesinin düşüş gösterdiği güne kadar günlük enzim aktivite ölçümleri yapılmış ve bu ölçümler sonucunda her iki mikroorganizma için de  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitelerinin en yüksek olduğu inkübasyon süresi 7. gün olarak belirlenmiştir (Tablo 3.3; Şekil 3.4).

**Tablo 3.3:** Farklı inkübasyon sürelerinin KSF kültür ortamında geliştirilen *A. caelatus* NRRL26107 ve *A. oryzae* NRRL 5590' nın  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesine etkisi

İnkübasyon Süresi	$\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi (EU)	
	<i>A. caelatus</i> NRRL 26107	<i>A. oryzae</i> NRRL 5590
4. Gün	376,6938	1696,4770
5. Gün	712,7371	2124,6610
6. Gün	899,7290	2425,4740
7. Gün	<b>2401,0840</b>	<b>2516,2600</b>
8. Gün	149,0515	287,2629



Şekil 3.4: Farklı inkübasyon sürelerinin KSF kültür ortamında geliştirilen *A. caelatus* NRRL26107 ve *A. oryzae* NRRL 5590' nın  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesine etkisi

### 3.3 $\beta$ -glukosidaz Enziminin Saflaştırılması

*A. caelatus* NRRL 26107; önceki bölümde belirlenen koşullarda (pH' ı 7,0 olan 0,2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponu ile %55 oranında nemlendirme, 30°C' de 7 gün) geliştirilerek elde edilen süpernatant Bölüm 2.2.4' te anlatıldığı gibi ultrasantrifüjleme (10000rpm, 4°C' de, 10 dk.) işleminden sonra kısmi saflaştırılmış enzim olarak kullanılmıştır.

*A. oryzae* NRRL 5590' de daha önce belirlenen koşullarda (pH' ı 6,5 olan 0,2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponu ile %55 oranında nemlendirme, 25°C' de 7 gün) geliştirilerek elde edilen süpernatant Bölüm 2.2.4' te anlatıldığı şekilde yapılan ultrasantrifüjleme (10000rpm, 4°C' de, 10 dk.) işleminden sonra kısmi saflaştırılmış enzim olarak kullanılmıştır.

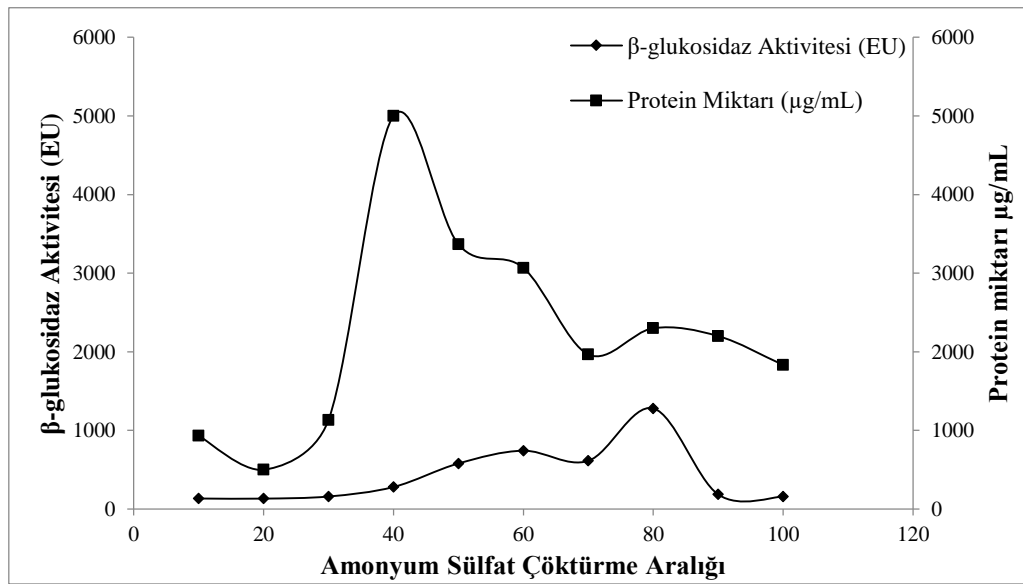
#### 3.3.1 Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi

*A. caelatus* NRRL 26107  $\beta$ -glukosidaz enziminin amonyum sülfat aralığının belirlenmesi için; kısmi saflaştırılmış enzime Tablo 3.4' de belirtilen miktarda amonyum sülfat tuzu eklenerek her bir aralık değerinin Lowry metodu ile protein miktarları (mg/mL) ve  $\beta$ -glukosidaz aktivite (EU) ölçümleri yapılmıştır (Tablo 3.4).

**Tablo 3.4:** *A.caelatus* NRRL 26107' dan elde edilen kısmi saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz enziminin amonyum sülfat çöktürme yöntemi sonucu elde edilen değerleri

Aralık Değeri	Çöktürme Aralığı	Kısmi Saflaştırılmış Enzim Hacmi (mL)	Kullanılan Amonyum Sülfat Miktarı (g)	$\beta$ -glukosidaz Enzimi Aktivitesi (EU)	Protein Miktarı (mg/mL)
1	0-10	10,0	0,5140	134,1463	933,3330
2	10-20	10,0	0,5290	132,7913	500,0000
3	20-30	10,0	0,5460	159,8916	1133,3330
4	30-40	10,5	0,5910	280,4878	5000,0000
5	40-50	10,0	0,5820	579,9458	3366,6670
6	50-60	10,0	0,6020	742,5474	3066,6670
7	60-70	10,5	0,6540	613,8211	1966,6670
8	70-80	10,5	0,6780	1280,4880	2300,0000
9	80-90	10,5	0,7030	185,6369	2200,0000
10	90-100	10,5	0,7310	158,5366	1833,3330

Tablo 3.4' deki değerler kullanılarak Şekil 3.5' de verilen Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığı-Enzim Aktivitesi-Protein Miktarı grafiği çizilmiştir. Çizilen grafikte enzim aktivitesinin yüksek olduğu aralık %50-90 olarak belirlenmiş ve *A.caelatus* NRRL 26107' un Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile saflaştırılması basamağında bu amonyum sülfat çöktürme aralığı kullanılmıştır.



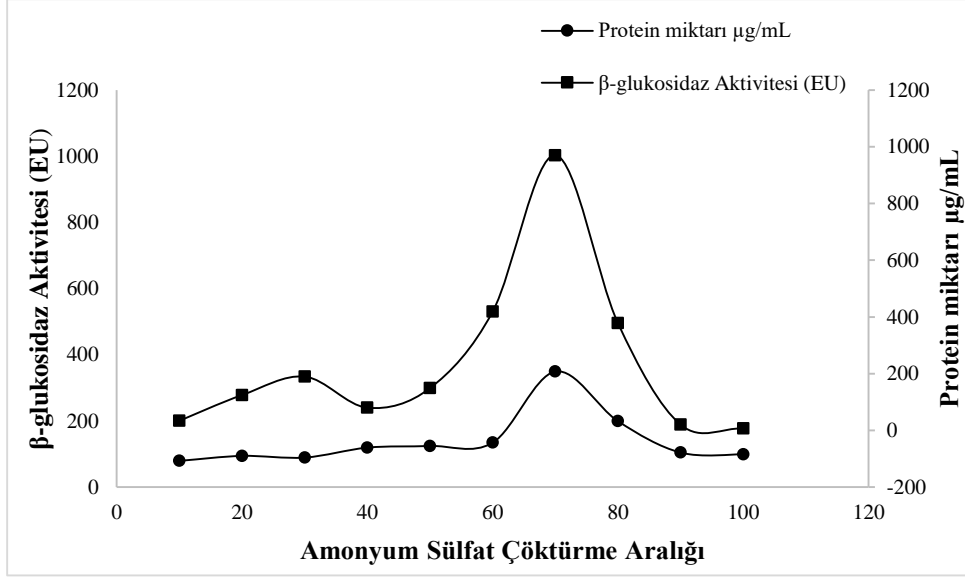
**Şekil 3.5:** *A.caelatus* NRRL 26107 amonyum sülfat aralığının tespiti için kullanılan grafik

*A.oryzae* NRRL 5590  $\beta$ -glukosidaz enziminin amonyum sülfat aralığının belirlenmesi için ise kısmi saflaştırılmış enzime Tablo 3.5’ de belirtilen miktarda amonyum sülfat tuzu eklenerek her bir aralık değerinin Lowry metodu ile protein miktarları ( $\mu\text{g/mL}$ ) ve  $\beta$ -glukosidaz aktivite (EU) ölçümleri gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.5).

**Tablo 3.5:** *A.oryzae* NRRL 5590’ dan elde edilen kısmi saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz enziminin amonyum sülfat çöktürme yöntemi sonucu elde edilen değerleri

Aralık Değeri	Çöktürme Aralığı	Kısmi Saflaştırılmış Enzim Hacmi (mL)	Kullanılan Amonyum Sülfat Miktarı (g)	$\beta$ -glukosidaz Enzimi Aktivitesi (EU)	Protein Miktarı (mg/mL)
1	0-10	10,0	0,5140	33,87534	79,3500
2	10-20	10,0	0,5290	124,6612	94,3500
3	20-30	10,0	0,5460	189,7019	89,3500
4	30-40	10,0	0,5636	79,9458	119,3500
5	40-50	10,5	0,6110	149,0515	124,3500
6	50-60	10,5	0,6320	418,6992	134,3500
7	60-70	10,5	0,6540	970,1897	349,3500
8	70-80	10,5	0,6780	378,0488	199,3500
9	80-90	10,5	0,7030	20,2352	104,3500
10	90-100	10,5	0,7310	6,7750	99,3500

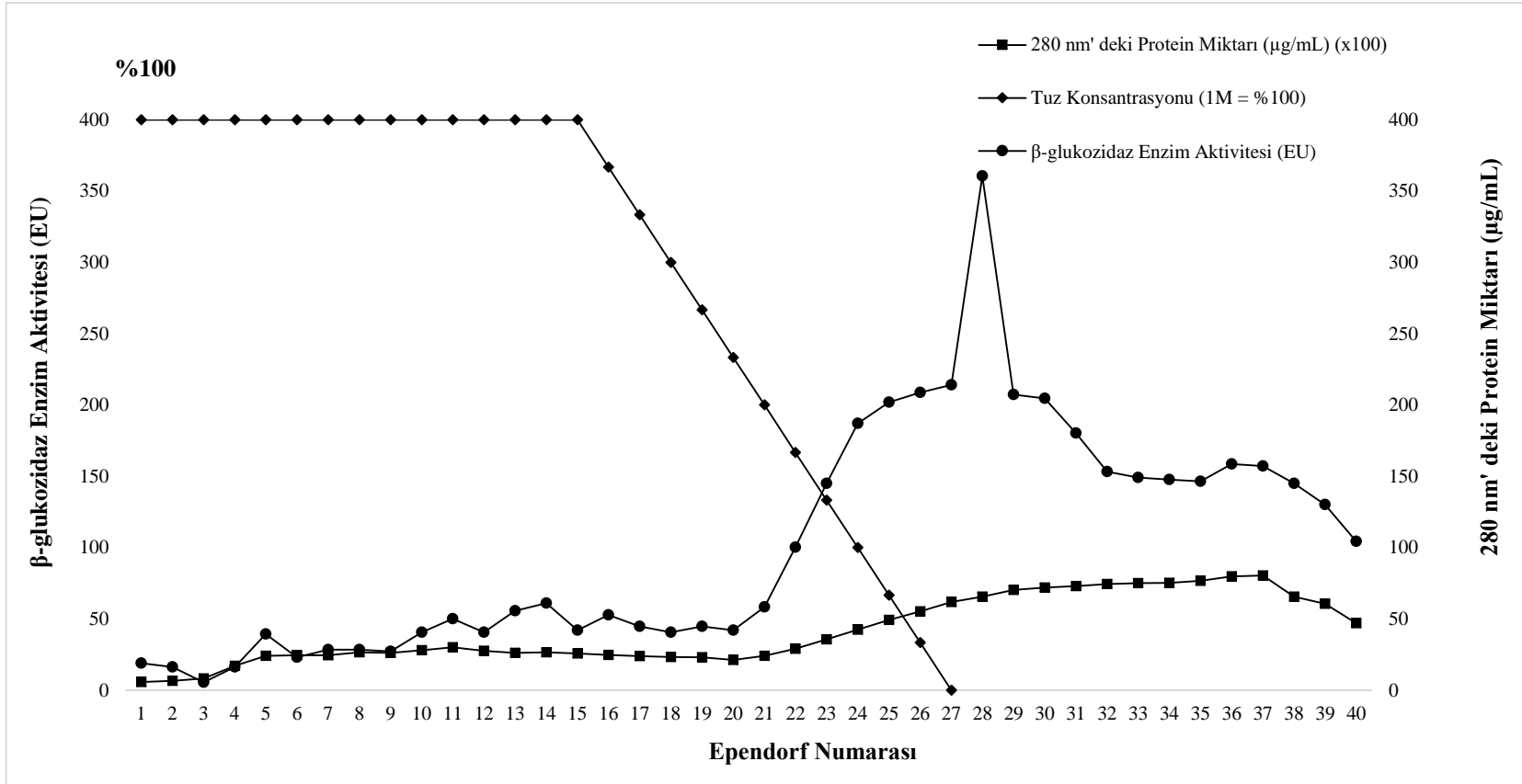
Tablo 3.5’ deki değerler kullanılarak Şekil 3.6’ da verilen Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığı-Enzim Aktivite-Protein Miktarı grafiği çizilmiştir. Çizilen grafikte enzim aktivitesinin yüksek olduğu aralık %50-90 olarak belirlendiğinden *A.oryzae* NRRL 5590’ nın Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile saflaştırılması basamağında bu konsantrasyonda amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır.



Şekil 3.6: *A.oryzae* NRRL 5590 amonyum sülfat aralığının tespiti için kullanılan grafik

### 3.3.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile β-glukosidaz Enziminin Saflaştırılması

*A.caelatus* NRRL 26107' dan elde edilen kısmi saflaştırılmış enzime %50-90 (w/v) oranında amonyum sülfat çöktürmesi uygulanmış, çöktürme sonucunda elde edilen enzim Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftlamin Hidrofobik Jelini içeren kolona yüklenmiştir. Kolondan elüe edilen elüantlar 2 mL' lik ependorf tüplere alındıktan sonra 280 nm' de Warburg Metodu ile kalitatif protein tayinleri yapılmış, ayrıca bu tüplerdeki elüantların β-glukosidaz enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Elde edilen bu ölçüm sonuçlarından yararlanılarak β-glukosidaz enzim elüsyon grafiği çizilmiştir (Şekil 3.7). Grafikten elde edilen sonuçlar ile yüksek aktivite gösteren eluantları içeren ependorf tüpleri belirlenerek bu tüplerin, Lowry metodu ile protein miktarları saptanmıştır. Tüm belirlenen ölçüm sonuçlarından yararlanılarak *A.caelatus* NRRL 26107' dan elde edilen β- glukosidaz enziminin saflaştırılma tablosu oluşturulmuştur (Tablo 3.6).



Şekil 3.7: Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi kullanılarak saflaştırılan *A. caelatus* NRRL 26107' dan elde edilen β-glukozidaz enziminin elüsyon grafiği

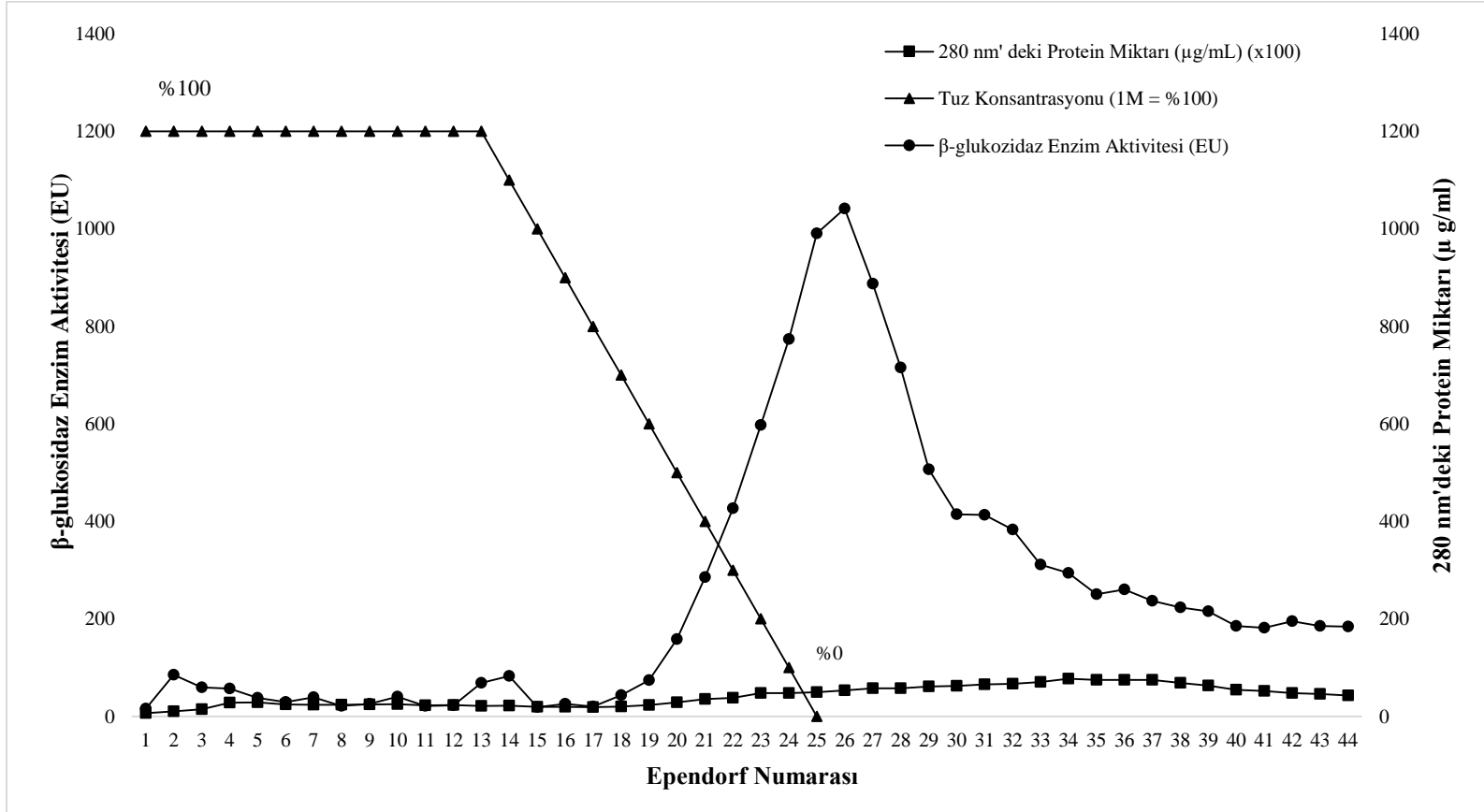


**Tablo 3.6:** *A.caelatus* NRRL 26107' dan elde edilen  $\beta$ -glukosidaz enziminin saflaştırma tablosu

<b>Basamak</b>	<b>HACİM (mL)</b>	<b>AKTİVİTE (EU/mL)</b>	<b>PROTEİN MİKTARI (mg/mL)</b>	<b>TOTAL AKTİVİTE (EU/mL)</b>	<b>TOTAL PROTEİN (mg)</b>	<b>SPESİFİK AKTİVİTE (EU/mg)</b>	<b>% VERİM</b>	<b>SAFLAŞTIRMA KATSAYISI</b>
<b>HAM EKSTRAKT</b>	30	349,5935	0,4435	10487,7900	13,3050	788,2590	100	1
<b>AMONYUM SÜLFAT ÇÖKTÜRMESİ</b>	4	1864,499	0,6785	7457,9960	2,7140	2747,9720	71,1110	3,4860
<b>HİDROFOBİK ETKİLEŞİM KROMATOĞRAFİSİ</b>	2	331,9783	0,0135	663,9560	0,0270	24590,9620	6,3300	31,1960

*A.caelatus* NRRL 26107' dan elde edilen  $\beta$ -glukosidaz enziminin saflaştırma tablosunda (Tablo 3.6) gösterildiği gibi amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda total aktivitesi ve total protein miktarı sırasıyla 7457,9960 EU/mL ve 2,7140 mg olarak belirlenmiş olup %71,1110 verimle 3,4860 kat saflaştırılması sağlanmıştır. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi sonunda ise total aktivite 663,9560 EU/mL ve total protein miktarı 0,0270 mg olarak tespit edilmiş olup  $\beta$ -glukosidaz enzimi %6,3300 verimle 31,1960 kat saflaştırılmıştır.

Çalışmalarımızda kullanılan ikinci mikrofungus olan *A.oryzae* NRRL 5590' dan elde edilen kısmi saflaştırılmış enzime daha önce belirlenen oranda (%50-90 (w/v)) amonyum sülfat çöktürmesi uygulanmıştır. Çöktürme sonucunda elde edilen kısmi saflaştırılmış enzim Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftlamin Hidrofobik Jelini içeren kolona yüklendikten sonra kolondan elüe edilen elüantlar 2 mL' lik ependorf tüplere alınmıştır. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi sonucu elde edilen eluantları içeren ependorf tüplerine 280 nm' de Warburg Metodu ile kalitatif protein tayini yapılmış ayrıca bu tüplerin  $\beta$ -glukosidaz enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Elde edilen bu verilerden yararlanılarak  $\beta$ -glukosidaz enzim elüsyon grafiği çizilmiştir (Şekil 3.8). Grafikten elde edilen sonuçlar ile yüksek aktivite gösteren eluantları içeren ependorf tüpleri belirlenerek bu tüplerdeki eluantların Lowry metodu ile protein miktarları saptanmıştır. Belirlenen tüm ölçüm sonuçlarından da yararlanılarak *A.oryzae* NRRL 5590' dan elde edilen  $\beta$ -glukosidaz enzimi için saflaştırma tablosu oluşturulmuştur (Tablo3.7).



Şekil 3.8: Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi kullanılarak saflaştırılan *A. oryzae* NRRL 5590' dan elde edilen β-glukosidaz enziminin elüsyon grafiği

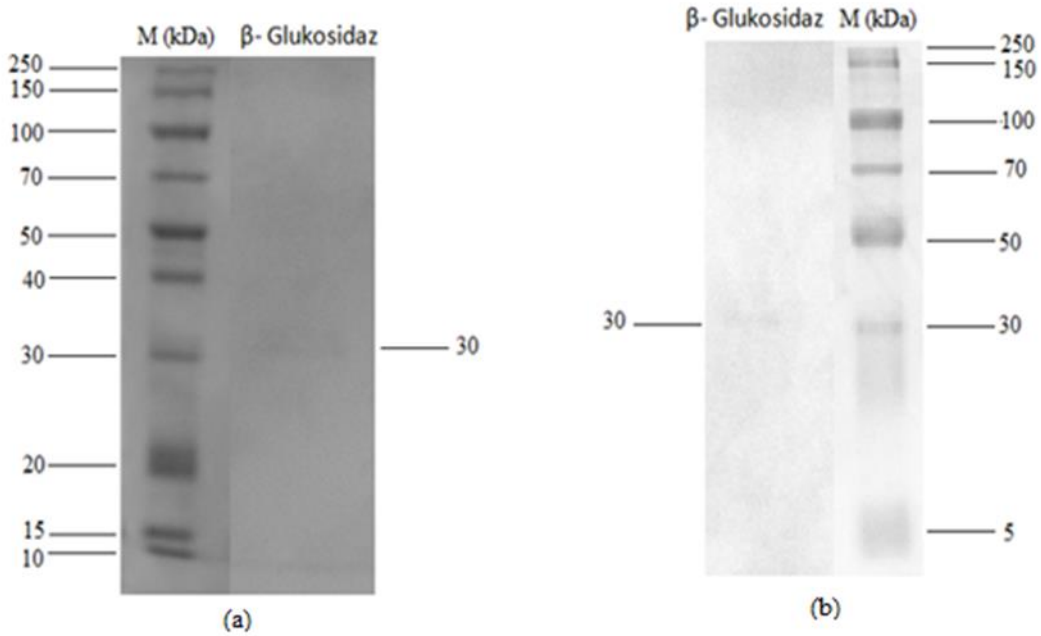
**Tablo 3.7:** *A.oryzae* NRRL 5590' dan elde edilen  $\beta$ -glukosidaz enziminin saflaştırma tablosu

<b>Basamak</b>	<b>HACİM (mL)</b>	<b>AKTİVİTE (EU/mL)</b>	<b>PROTEİN MİKTARI (mg/mL)</b>	<b>TOTAL AKTİVİTE (EU/mL)</b>	<b>TOTAL PROTEİN (mg)</b>	<b>SPESİFİK AKTİVİTE (EU/mg)</b>	<b>% VERİM</b>	<b>SAFLAŞTIRMA KATSAYISI</b>
<b>HAM EKSTRAKT</b>	50	957,9940	0,1265	47899,7000	6,3250	7573,0750	100	1
<b>AMONYUM SÜLFAT ÇÖKTÜRMESİ</b>	4	1917,3440	0,1485	7669,3760	0,5940	12911,4070	16,0110	1,7040
<b>HİDROFOBİK ETKİLEŞİM KROMATOĞRAFİSİ</b>	2	1042,0050	0,0235	2084,0100	0,0470	44340,6380	4,3500	5,8550

Bu tabloda (Tablo 3.7) gösterildiği gibi amonyum sülfat çöktürmesi sonucu, pellet kısmın total aktivitesi ve total protein miktarı sırasıyla 7669,376 EU/mL ve 0,594 mg olarak tespit edilmiş olup %16,011 verimle 1,704 kat saflaştırılmıştır. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi sonucu ise total aktivite 2084,01 EU/mL ve total protein miktarı 0,047 mg olarak belirlenmiş ve  $\beta$ -glukosidaz enzimi %4,350 verimle 5,855 kat saflaştırılmıştır.

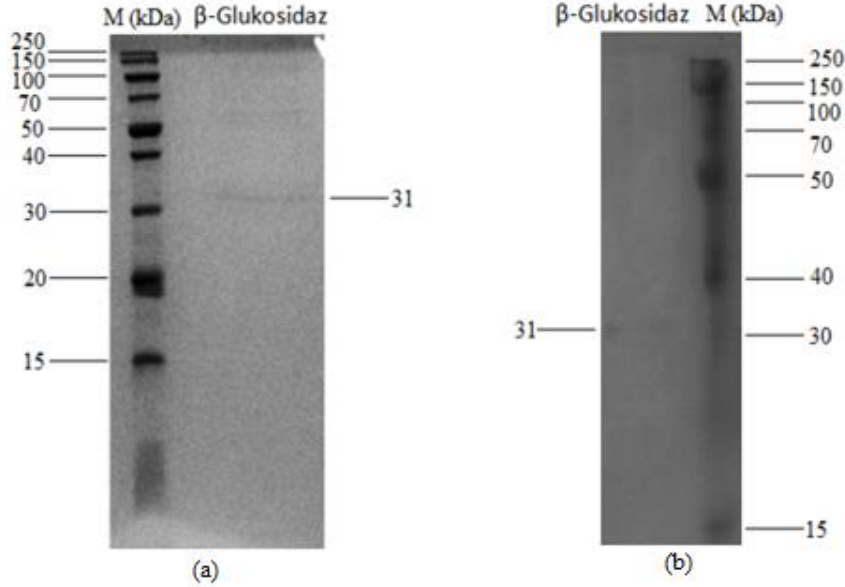
### 3.4 $\beta$ -glukosidaz Enziminin Native/SDS Poliakrilamid Jel Elektrofizi İle Saflığının ve Alt Birimlerinin Kontrolü

*A.caelatus* NRRL 26107 ve *A.oryzae* NRRL 5590' dan elde edilen ve Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin saflığının ve alt birimlerinin varlığının/sayısının belirlenmesi için SDS ve Native Poliakrilamid Jel Elektrofizi yapılmış ve elde edilen protein bantlarının bulunduğu jel görüntüleri jel görüntüleme sistemi (UVP) kullanılarak kaydedilmiştir (Şekil 3.9 (a)-(b)).



**Şekil 3.9:** Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile saflaştırılan *A.caelatus* NRRL 26107' dan elde edilen  $\beta$ -glukosidaz enziminin Poliakrilamid Jel Elektrofizi görüntüleri (a): SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofizi, (b): Native-Poliakrilamid Jel Elektrofizi

*A.caelatus* NRRL 26107' dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin molekül ağırlığı SDS-PAGE ve Native-PAGE'in her ikisinde de yaklaşık 30 kDa olarak belirlenmiş olup (Şekil 3.9 a ve b) enzimin tek alt üiteden oluştuğu saptanmıştır.



**Şekil 3.10:** Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile saflaştırılan *A.oryzae* NRRL 5590' dan elde edilen  $\beta$ -glukosidaz enziminin Poliakrilamid Jel Elektroforez görüntüleri (a) SDS-Poliakrilamid Jel Elektoroforezi, (b) Native-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

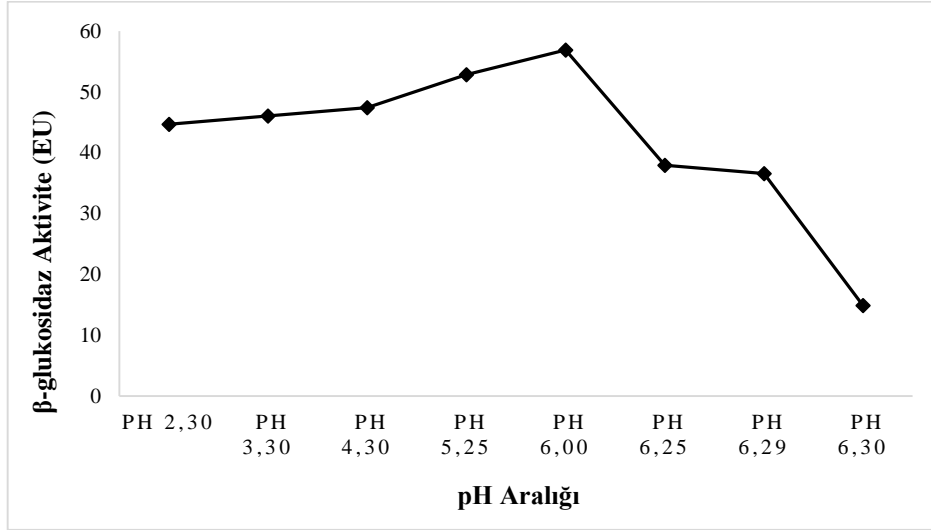
*A.oryzae* NRRL 5590' dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin molekül ağırlığı SDS-PAGE ve Native-PAGE ile yaklaşık 31 kDa olarak belirlenmiş olup (Şekil 3.10 a ve b) enzimin tek alt üiteden oluştuğu saptanmıştır.

### 3.5 Saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

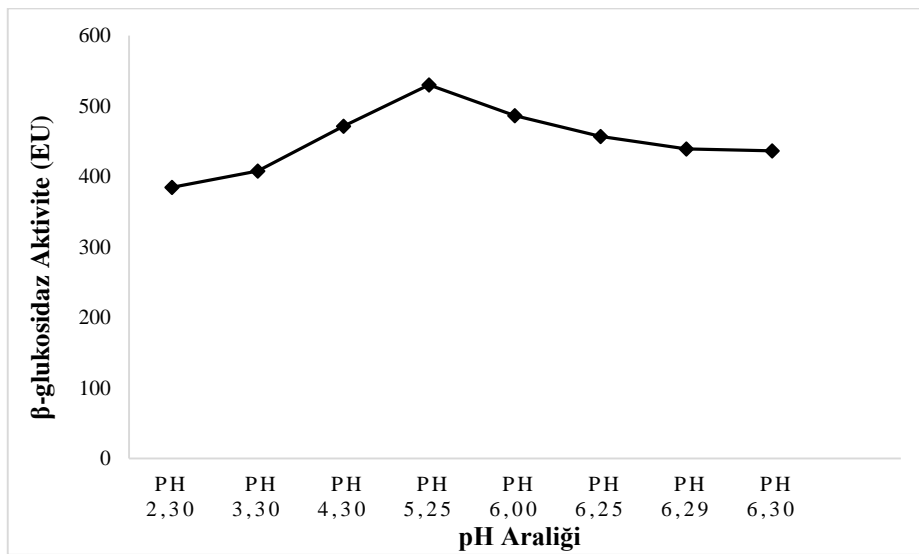
#### 3.5.1 Saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz Enziminin Optimum pH Değerinin Belirlenmesi

*A.caelatus* NRRL 26107 ve *A.oryzae* NRRL 5590' dan elde edilen ve Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi kullanılarak saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimlerinin optimum pH değerinin belirlenmesi için; farklı pH değerindeki tamponlar ve bu tampon çözeltilerle hazırlanmış olan *p*NPG substratları ile saf  $\beta$ -glukosidaz

enzimlerinin aktivite ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlarla da optimum pH grafiklerinin (Şekil 3.11; Şekil 3.12) çizilmesi sağlanmıştır. *A.caelatus* NRRL 26107' dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği pH değeri 6,0 (Şekil 3.11); *A.oryzae* NRRL 5590' dan elde edilen  $\beta$ -glukosidaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği pH değeri ise 5,25 (Şekil 3.12) olarak belirlenmiştir.



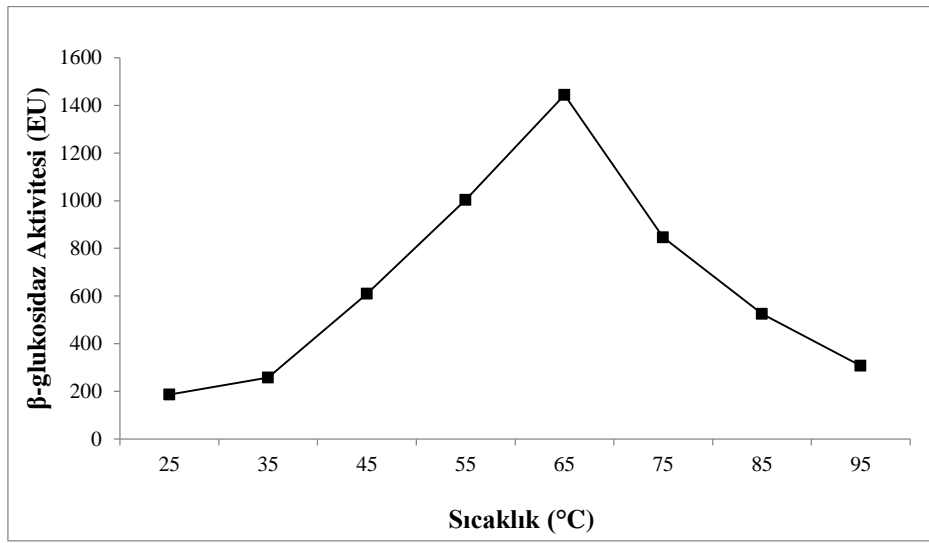
Şekil 3.11: *A.caelatus* NRRL 26107' dan elde edilen saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz enziminin optimum pH grafiği



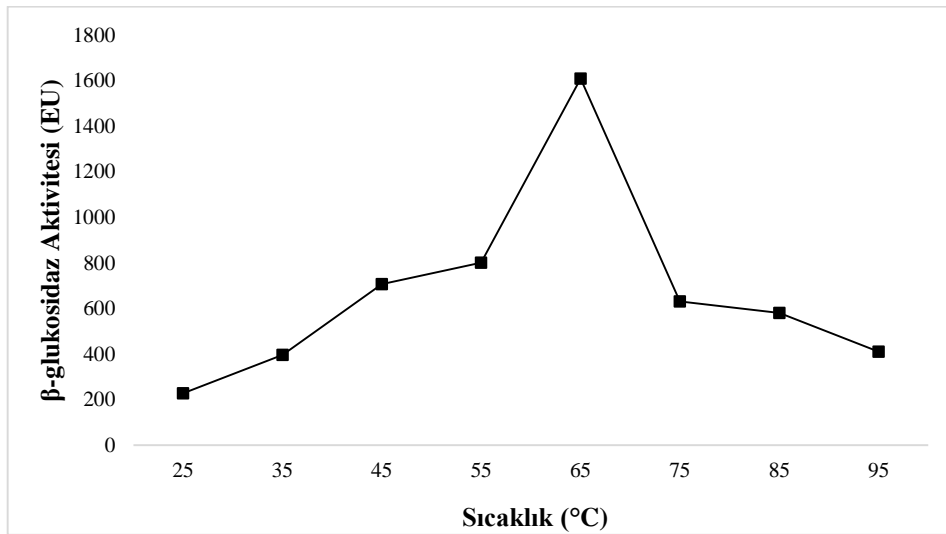
Şekil 3.12: *A.oryzae* NRRL 5590' dan elde edilen saflaştırılmış  $\beta$ -glukosidaz enzimi optimum pH grafiği

### 3.5.2 Saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz Enziminin Aktivite Gösterdiği Maksimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi

*A.caelatus* NRRL 26107 ve *A.oryzae* NRRL 5590' dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimlerinin maksimum aktivite gösterdikleri sıcaklık değerinin saptanması amacıyla farklı inkübasyon sıcaklıklarında  $\beta$ -glukosidaz enzimlerinin aktiviteleri ölçülerek sıcaklık grafikleri çizilmiştir (Şekil 3.13; Şekil 3.14) ve her iki mikroorganizmadan da elde edilen  $\beta$ -glukosidaz enzimlerinin en yüksek aktivite gösterdiği inkübasyon sıcaklığı 65°C olarak belirlenmiştir (Şekil 3.13; Şekil 3.14).



Şekil 3.13: *A.caelatus* NRRL 26107' dan elde edilip saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin sıcaklık Grafiği

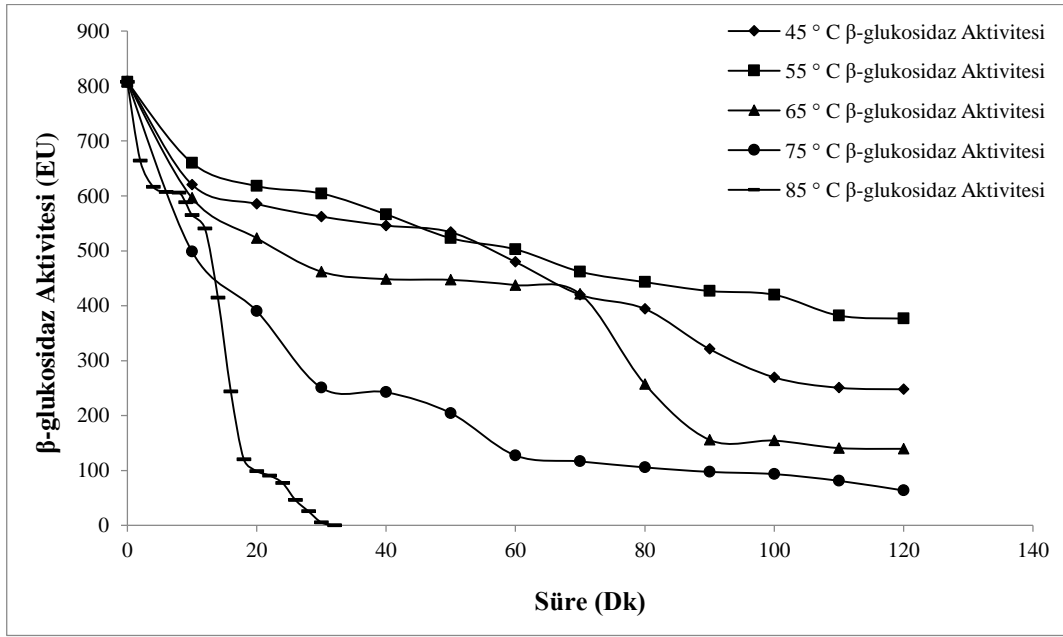


Şekil 3.14: *A.oryzae* NRRL 5590' dan elde edilip saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin sıcaklık grafiği



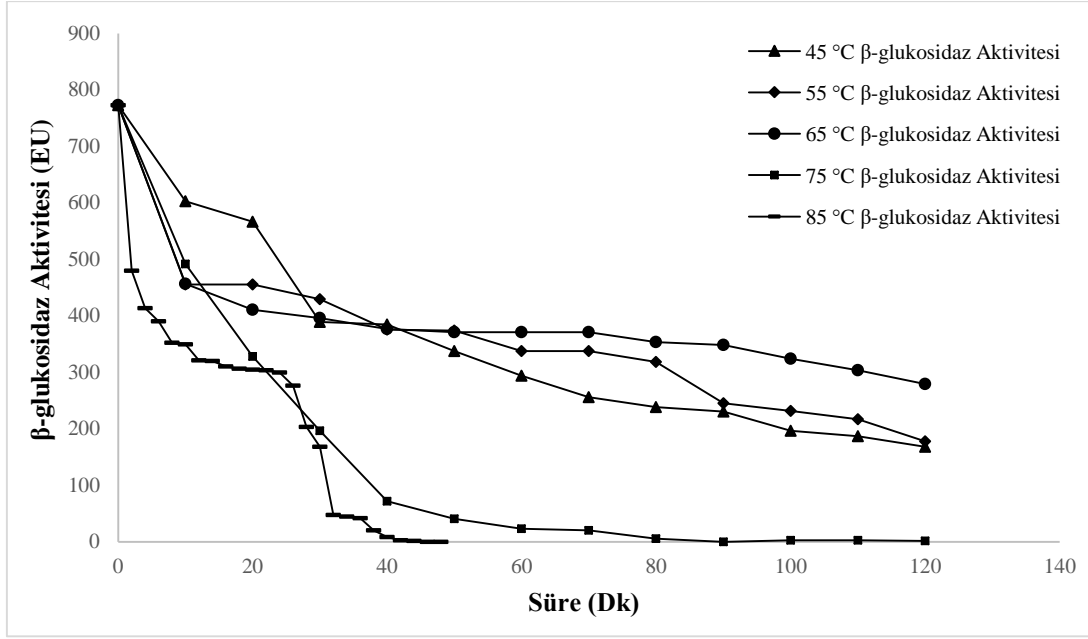
### 3.5.3 Saf $\beta$ -glukosidaz Enziminin Termal Kararlılığı

*A.caelatus* NRRL 26107 ve *A.oryzae* NRRL 5590' dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimlerinin termal kararlılıkları farklı sıcaklıklarda 120 dakika süresince onar dakika aralıklarla, 85°C de ise ikişer dakika aralıklarla enzim aktivitelerinin ölçülmesi sonucu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar ile her iki mikroorganizmadan da saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimlerinin termal kararlılık grafikleri çizilmiştir. (Şekil 3.15; Şekil 3.16).



Şekil 3.15: *A.caelatus* NRRL 26107' dan elde edilip saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin termal kararlılık grafiği

*A.caelatus* NRRL 26107' dan elde edilen  $\beta$ -glukosidaz enziminin; 120 dakikalık inkübasyon sonrasında 45°C'de %30 oranında, 55°C' de %46 oranında, 65°C' de %17 oranında ve 75°C' de %8 oranında aktivitesini koruduğu belirlenmiştir. 85°C' de ise enzimin aktivitesini 32 dakika koruduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.15).



**Şekil 3.16:** *A.oryzae* NRRL 5590' dan elde edilip saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin termal kararlılık grafiği

*A.oryzae* NRRL 5590' nın  $\beta$ -glukosidaz enziminin 120 dakikalık inkübasyonu sonunda 45°C %22, 55°C' de %23, 65°C' de %36 oranında enzim aktivitesini koruduğu 75°C' de enzim aktivitesinin 0 olduğu saptanmış olup 85°C' de ise 46 dakika süresince aktivitesini koruduğu saptanmıştır (Şekil 3.16).

### 3.5.4 $\beta$ -glukosidaz Enziminin *p*NPG Substratına Karşı $K_M$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Belirlenmesi

*A.caelatus* NRRL 26107 ve *A.oryzae* NRRL 5590' dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimlerinin  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin belirlenmesi amacı ile *p*NPG substratının değişen konsantrasyonlarına karşı 410 nm' de enzim aktivite ölçümleri yapılmıştır (Tablo 3.8; Tablo 3.9). Elde edilen aktivite değerleri ile reaksiyon hızları (EU/mL) olarak hesaplanmıştır. Reaksiyon hızından ( $V$ ) yararlanılarak  $1/[V]$  değeri, kullanılan substratların konsantrasyonlarından ( $[S]$ ) yararlanılarak da  $1/[S]$  değeri elde edilmiştir. Bulunan bu değerler ile Şekil 3.17 ve Şekil 3.18' de gösterilen Lineweaver-Burk grafiklerinin çizimi gerçekleştirilmiştir.

*A.caelatus* NRRL 26107' dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimi için çizilen Lineweaver-Burg grafiğinden (Şekil 3.17) elde edilen denklemden yararlanılarak;  $\beta$ -

glukosidaz enziminin *p*NPG substratı için  $K_M$  değeri 0,193 mM ve  $V_{max}$  değeri 322,58 EU olarak hesaplanmıştır (Tablo3.10).

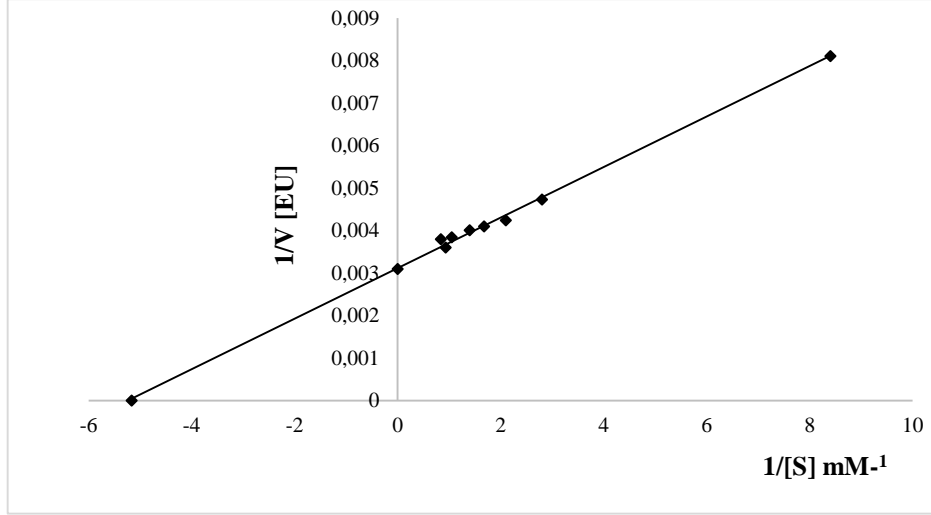
*A.oryzae* NRRL 5590' dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimi için ise çizilen Lineweaver-Burg grafiğinden (Şekil 3-18) elde edilen denklemden yararlanılarak;  $\beta$ -glukosidaz enziminin *p*NPG substratı için  $K_M$  değeri 0,363 mM ve  $V_{max}$  değeri 454,545 EU olarak hesaplanmıştır (Tablo 3.11).

**Tablo 3.8:** *A.caelatus* NRRL 26107' dan elde edilip saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite,  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri

50mM Na-Ac Tamponu ( $\mu$ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Substrat Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Kuyudaki Toplam Hacim ( $\mu$ l)	Kuyudaki Subs. Kons. [S] (mM)	A (410 nm)	Aktivite (U/mL dak)	$1/V$	$1/[S]$
65	70	5,0	210	0,1190	0,2130	123,3060	0,0081	8,4030
55		15		0,3570	0,2780	211,3820	0,0047	2,8010
50		20		0,4760	0,2960	235,7720	0,0042	2,1000
45		25		0,5950	0,3020	243,9020	0,0041	1,6800
40		30		0,7140	0,3060	249,3220	0,0040	1,4000
30		40		0,9520	0,3140	260,1630	0,0038	1,0500
25		45		1,0710	0,3270	277,7780	0,0036	0,9333
20		50		1,1900	0,3160	262,8730	0,0038	0,8400

**Tablo 3.9:** *A.oryzae* NRRL 5590' dan elde edilip saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite,  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri

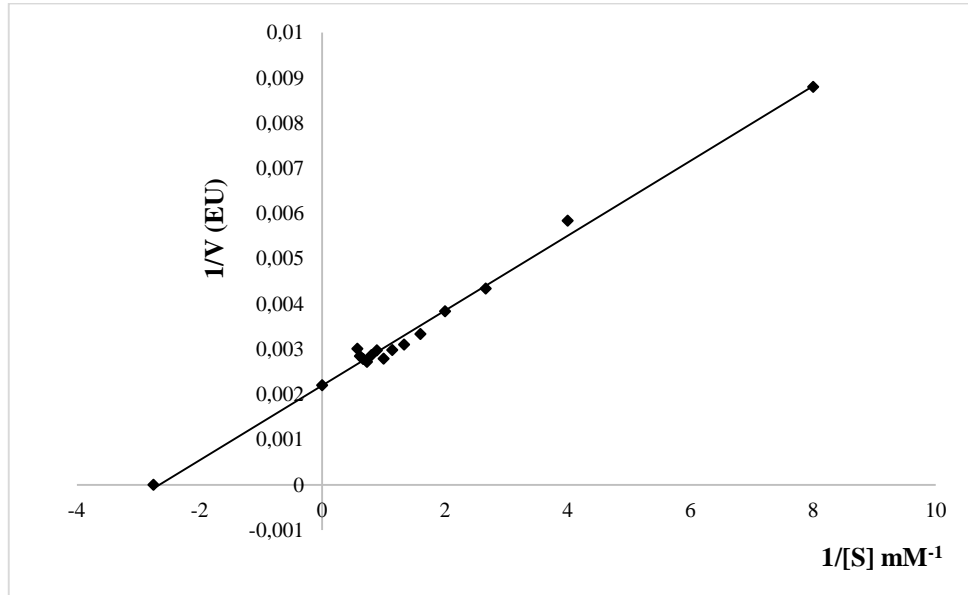
50mM Na-Ac Tamponu ( $\mu$ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Substrat Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Kuyudaki Toplam Hacim ( $\mu$ l)	Kuyudaki Substrat Kons. [S] (mM)	A (410 nm)	Aktivite (U/ml dak)	1/V	1/[S]
125	70	5,0	280	0,1250	0,2480	113,6170	0,0088	8,0000
120		10		0,2500	0,3170	171,2610	0,0058	4,0000
115		15		2,6667	0,3880	230,5760	0,0043	2,6667
110		20		2,0000	0,4240	260,6510	0,0038	2,0000
105		25		1,600	0,4710	299,9160	0,0033	1,6000
100		30		1,3333	0,4980	322,4720	0,0031	1,3333
95		35		1,1428	0,5140	335,8390	0,0029	1,1428
90		40		1,0000	0,5410	358,3960	0,0027	1,0000
85		45		0,8889	0,5150	336,6750	0,0029	0,8889
80		50		0,8000	0,5300	349,2060	0,0028	0,8000
75		55		0,7272	0,5520	367,5850	0,0027	0,7272
70		60		0,6667	0,5420	359,2310	0,0027	0,6667
65		65		0,6153	0,5330	351,7120	0,0028	0,6158
60		70		0,5914	0,5100	332,4970	0,0030	0,5714



Şekil 3.17: *A. caelatus* NRRL 26107' dan elde edilip saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerini gösteren Lineweaver-Burg grafiği

Tablo 3.10: *A. caelatus* NRRL 26107' dan elde edilip saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin  $K_M$ ,  $V_{max}$  ve  $V_{max} / K_M$  değerleri

Substrat	$K_M$ (mM)	$V_{max}$ (EU)	$V_{max}/K_M$
<i>p</i> NPG	0,1930	322,5800	1671,3980



Şekil 3.18: *A. oryzae* NRRL 5590' dan elde edilip saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerini gösteren Lineweaver-Burg grafiği

**Tablo 3.11:** *A.oryzae* NRRL 5590' dan elde edilip saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin  $K_M$ ,  $V_{max}$  ve  $V_{max} / K_M$  değerleri

Substrat	$K_M$ (mM)	$V_{max}$ (EU)	$V_{max}/K_M$
<i>p</i> NPG	0,3630	454,5450	1279,7380

### 3.5.5 *Aspergillus caelatus* NRRL 26107 ve *Aspergillus oryzae* NRRL 5590' dan Saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz Enzimlerinin İnhibitörü Olan D(+)*glukozun IC<sub>50</sub> Değerinin Belirlenmesi*

D(+)*glukozun, A.caelatus* NRRL 26107 ve *A.oryzae* NRRL 5590' dan elde edilip saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimleri üzerindeki inhibisyon etkisi *p*NPG substratı varlığında araştırılmıştır (Tablo 3.12; Tablo 3.13). İnhibitör maddenin yani D(+)*glukozun olmadığı ortamdaki enzim aktiviteleri %100 aktivite olarak kabul edilmiş olup D(+)*glukozun IC<sub>50</sub> değerleri belirlenirken; 1-60  $\mu$ l arasında değişen inhibitör konsantrasyonlarında enzim aktivite değerleri ölçölmüştür. Elde edilen bu sonuçlardan % aktiviteler hesaplanarak %Aktivite-İnhibitör Konsantrasyonu [I] grafikleri çizilmiştir (şekil 3.19; şekil 3.20).**

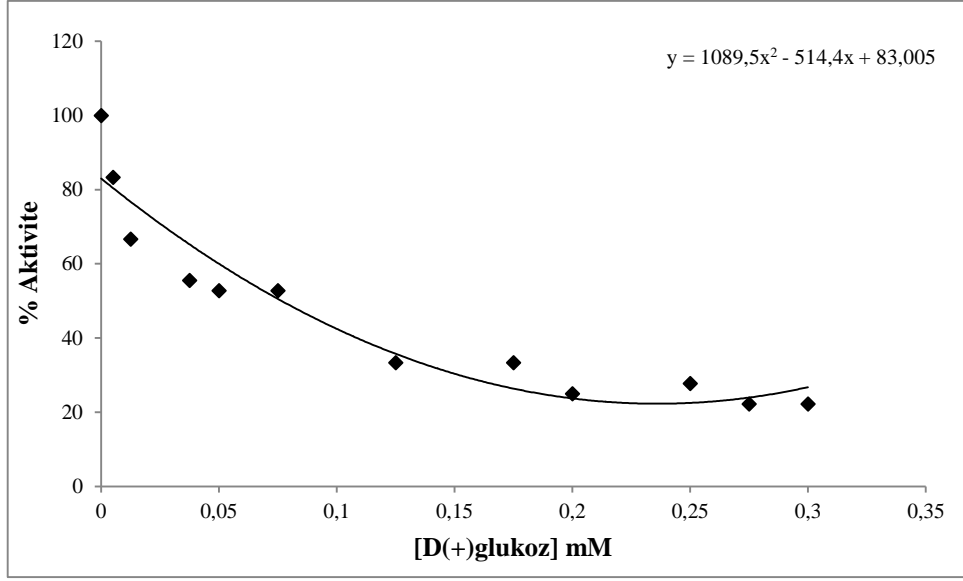
**Tablo 3.12:** *A.caelatus* NRRL 26107' dan elde edilip saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren D(+)glukozun, IC<sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar

50mM Na-Ac Tamponu ( $\mu$ l)	İnhibitör	Enzim Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Substrat Çözeltisinin Hacim ( $\mu$ l)	Inhibitor Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Kuyudaki İnhibitör Kons. (mM) (*100000)	$\Delta A$ (410nm)	Aktivite (U/mL dak)	% Aktivite
60	D(+)glukoz	70	70	0	0	0,1100	30,0751	100,0000
59				1,0	3,5700	0,1040	25,0626	83,3333
57,5				2,5	8,9200	0,0980	20,0501	66,6667
52,5				7,5	26,7800	0,0940	16,7084	55,5556
50				10	35,7100	0,0930	15,8730	52,7778
45				15	53,5700	0,0930	15,8730	52,7778
35				25	89,2800	0,0860	10,0250	33,3333
25				35	125,0000	0,0860	10,0250	33,3333
20				40	142,0000	0,0830	7,5187	25,0000
10				50	178,0000	0,0840	8,3542	27,7778
5				55	196,0000	0,0820	6,6833	22,2222
0				60	214,0000	0,0820	6,6833	22,2222



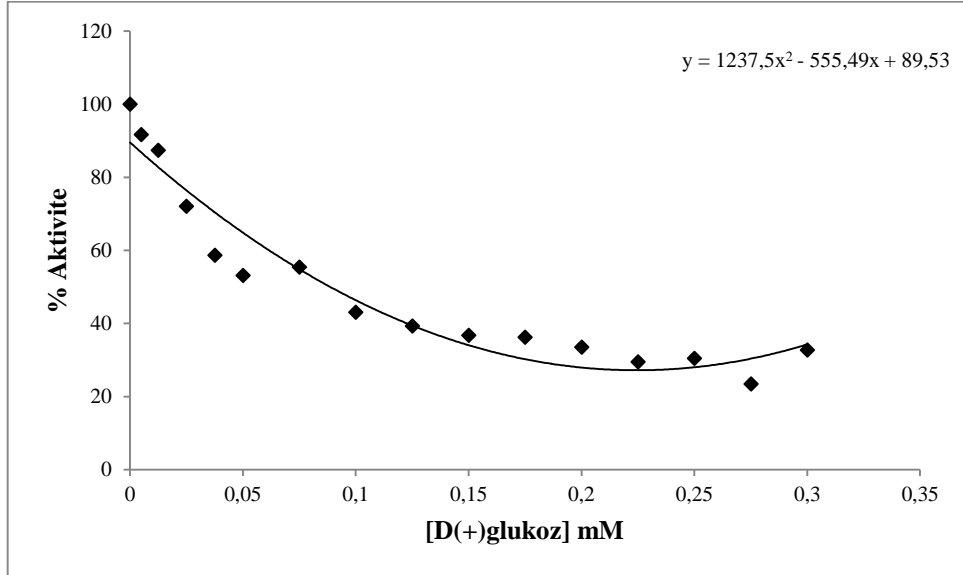
**Tablo 3.13:** *A.oryzae* NRRL 5590' dan elde edilip saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren D(+)glukozun IC<sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar

50mM Na-Ac Tamponu ( $\mu$ l)	İnhibitör	Enzim Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Substrat Çözeltisinin Hacim ( $\mu$ l)	Inhibitör Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Kuyudaki İnhibitör Kons. (mM) (*100000)	$\Delta$ A (410nm)	Aktivite (U/mL dak)	% Aktivite
60	D(+)-glukoz	70	70	0	0	0,4910	331,6620	100,0000
59				1	3,5700	0,4580	304,0930	91,6870
57,5				2,5	8,9200	0,4410	289,8910	87,4050
55				5	17,8500	0,3800	238,9300	72,0400
52,5				7,5	26,7800	0,3270	194,6530	58,6900
50				10	35,7100	0,3050	176,2740	53,1480
45				15	53,5700	0,3140	183,7920	55,4150
40				20	71,4200	0,2650	142,8570	43,0730
35				25	89,2800	0,2500	130,3250	39,2940
30				30	107,1000	0,2400	121,9710	36,7750
25				35	125,0000	0,2380	120,3000	36,2720
20				40	142,0000	0,2270	111,1110	33,5010
15				45	160,7000	0,2110	97,7440	29,4710
10				50	178,0000	0,2150	101,0860	30,4780
5				55	196,0000	0,1870	77,6940	23,4250
0				60	214,0000	0,2240	108,6040	32,7450



Şekil 3.19: *A. caelatus* NRRL 26107' dan elde edilip saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin inhibitörü D(+)-glukoz  $IC_{50}$  değeri grafiği

Tablo 3.12' deki veriler kullanılarak çizilen D(+)-glukoz varlığındaki %Aktivite-[I] grafiğinden (Şekil 3.19) elde edilen denklem ile *A. caelatus* NRRL26107' dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine D(+)-glukozun  $IC_{50}$  değeri  $7,65 \cdot 10^{-2}$  mM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.20: *A. oryzae* NRRL 5590' dan elde edilip saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin inhibitörü D(+)-glukozun  $IC_{50}$  değeri grafiği

Tablo 3.13' deki veriler kullanılarak çizilen D(+)glukoz varlığındaki %Aktivite-[I] grafiğinden (Şekil 3.20) elde edilen denklem ile de *A.oryzae* NRRL 5590  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine D(+)glukoz IC<sub>50</sub> değeri;  $8,80.10^{-2}$  mM olarak hesaplanmıştır.

### **3.5.6 *Aspergillus caelatus* NRRL 26107 ve *Aspergillus oryzae* NRRL 5590' dan Saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz Enzimlerinin İnhibitörü Olan $\delta$ -glukonolaktonun IC<sub>50</sub> Değerinin Belirlenmesi**

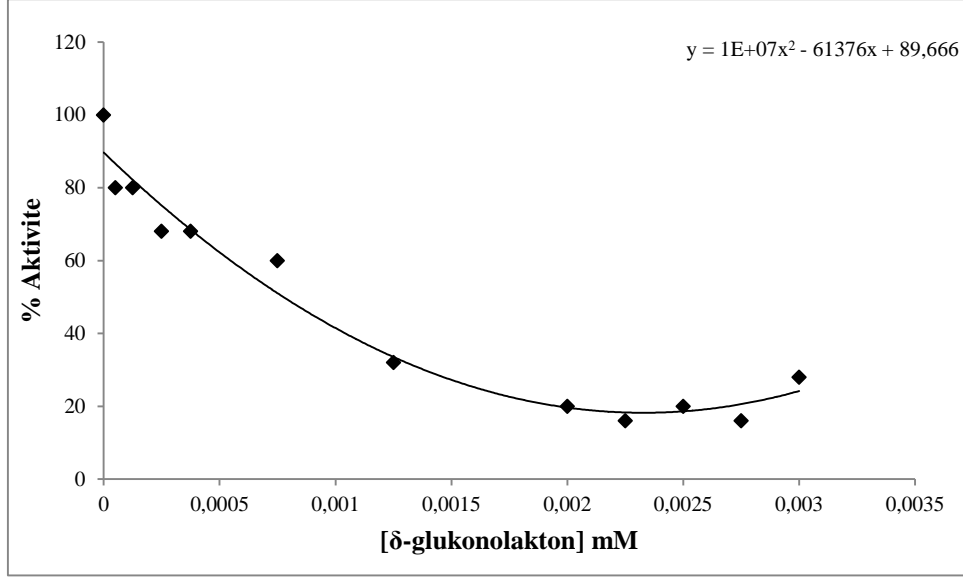
$\delta$ -glukonolaktonun *A.caelatus* NRRL 26107 ve *A.oryzae* NRRL 5590' dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimleri üzerindeki inhibisyon etkisi *p*NPG substratı varlığında araştırılmıştır (Tablo 3.14 Tablo 3.15).  $\delta$ -glukonolakton bulunmayan ortamdaki enzim aktiviteleri %100 aktivite olarak kabul edilmiştir. IC<sub>50</sub> değeri belirlenirken 1-60  $\mu$ l arasında değişen inhibitör konsantrasyonlarında enzim aktivite değerleri ölçülerek bu değerlerden % aktiviteler hesaplanmış ve %Aktivite-[I] grafiği çizilmiştir (Şekil 3.21 Şekil 3.22).

**Tablo 3.14:** *A.caelatus* NRRL 26107' dan elde edilip saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren  $\delta$ -glukonolaktonun IC<sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

50mM Na-Ac Tamponu ( $\mu$ l)	İnhibitör	Enzim Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Substrat Çözeltisinin Hacim ( $\mu$ l)	Inhibitör Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Kuyudaki İnhibitör Kons. (mM) (*100000)	$\Delta$ A (410nm)	Aktivite (U/mL dak)	% Aktivite
60	$\delta$ -Glukonolakton	70	70	0	0	0,1020	20,8855	100,0000
59				1,0	3,5700	0,0970	16,7084	80,0212
57,5				2,5	8,9200	0,0970	16,7084	80,0212
55				5,0	17,8500	0,0940	14,2021	68,0180
52,5				7,5	26,7800	0,0940	14,2021	68,0180
45				15	53,5700	0,0920	12,5313	60,0159
35				25	89,2800	0,0850	6,6833	32,0085
20				40	142,0000	0,0820	4,1771	20,0053
15				45	160,7000	0,0810	3,3416	16,0042
10				50	178,0000	0,0820	4,1771	20,0053
5				55	196,0000	0,0810	3,3416	16,0042
0				60	214,0000	0,0840	5,8479	28,0074

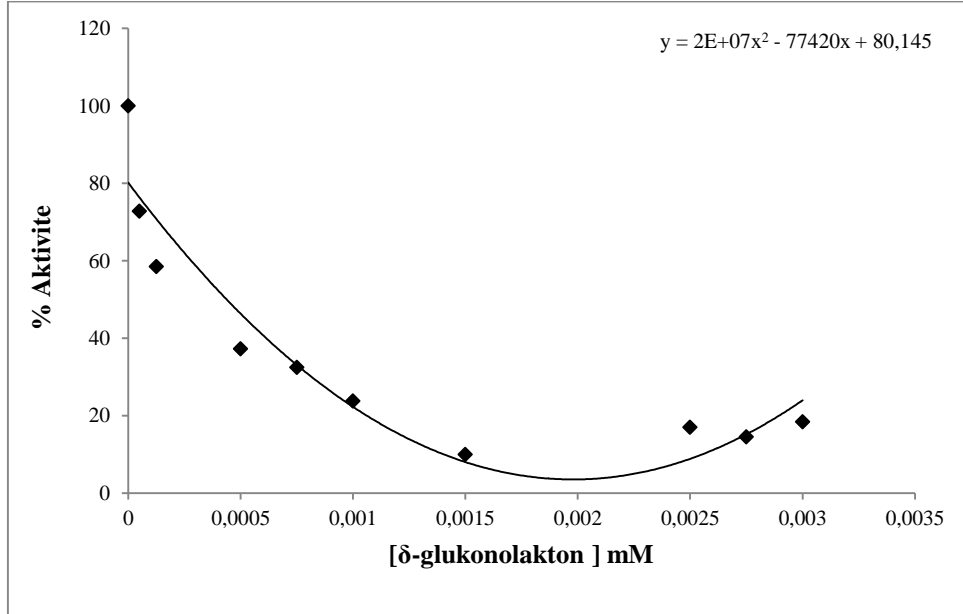
**Tablo 3.15:** *A.oryzae* NRRL 5590' dan elde edilip saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren  $\delta$ -glukonolaktonun IC<sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar

50mM Na-Ac Tamponu ( $\mu$ l)	İnhibitör	Enzim Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Substrat Çözeltisinin Hacim ( $\mu$ l)	Inhibitor Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Kuyudaki İnhibitör Kons. (mM) (*100000)	$\Delta$ A (410nm)	Aktivite (U/mL dak)	% Aktivite
60	$\delta$ -Glukonolakton	70	70	0	0	0,4510	298,2450	100,0000
59				1	3,5700	0,3540	217,2090	72,8290
57,5				2,5	8,9200	0,3030	174,6030	58,5430
50				10	35,7100	0,2270	111,1110	37,2540
45				15	53,5700	0,2100	96,9080	32,4930
40				20	71,4200	0,1790	71,0100	23,8090
25				35	125,0000	0,1720	65,1620	10,0000
10				50	178,0000	0,1550	50,9600	17,08680
5				55	196,0000	0,1460	43,4410	14,5650
0				60	214,0000	0,1600	55,1370	18,4870



Şekil 3.21: *A. caelatus* NRRL 26107' dan elde edilip saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimi inhibitörü  $\delta$ -glukonolakton  $IC_{50}$  değeri grafiği

Tablo 3.14' daki veriler kullanılarak çizilen  $\delta$ -glukonolakton varlığındaki %Aktivite-[I] grafiğinden (Şekil 3.21) elde edilen denklem ile *A. caelatus* NRRL 26107' dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine  $\delta$ -glukonolaktonun  $IC_{50}$  değeri,  $7,31 \cdot 10^{-4}$  mM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.22: *A. oryzae* NRRL 5590' dan elde edilip saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin inhibitörü  $\delta$ -glukonolaktonun  $IC_{50}$  değeri grafiği

Tablo 3.15’deki veriler kullanılarak çizilen  $\delta$ -glukonolakton varlığındaki % Aktivite-[I] grafiğinden (Şekil 3.22) elde edilen denklem ile de *A.oryzae* NRRL 5590’dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine  $\delta$ -glukonolakton IC<sub>50</sub> değeri;  $4,00 \cdot 10^{-4}$  mM olarak hesaplanmıştır.

### **3.5.7 *Aspergillus caelatus* NRRL 26107 ve *Aspergillus oryzae* NRRL 5590’ dan Saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz Enzimlerinin İnhibitörü Olan D(+)-glukozun İnhibisyon Tipinin ve K<sub>i</sub> Değerlerinin Belirlenmesi**

*A.caelatus* NRRL 26107 ve *A.oryzae* NRRL 5590’ dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimlerinin D(+)-glukoz inhibitörüne karşı K<sub>i</sub> sabitlerinin belirlenmesi için öncelikle reaksiyon ortamında inhibitör olmaksızın farklı pNPG substrat konsantrasyonuna bağlı enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Daha sonra D(+)-glukozun  $8,90 \cdot 10^{-3}$  mM ve  $7,10 \cdot 10^{-2}$  mM sabit konsantrasyonlarındaki ve pNPG substratının farklı konsantrasyonlarında enzim aktiviteleri belirlenmiştir (Tablo 16; Tablo 17). Bu sonuçlardan 1/V ve 1/[S] değerleri hesaplanarak Lineweaver–Burg grafiğinde I<sub>1</sub> ve I<sub>2</sub> doğruları çizilmiş (Şekil 3.23; Şekil 3.24) ve bu grafikten yararlanıp K<sub>i</sub> değerleri ile inhibisyon tipleri belirlenmiştir.

**Tablo 3.16:** *A.caelatus* NRRL 26107' dan elde edilip saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren D(+)glukozun  $K_i$  değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

50 mM Na-Ac Tamponu ( $\mu$ l)	Enzim Çöz. Hacmi ( $\mu$ l)	Subs. Çöz. Hacmi ( $\mu$ l)	İnh.Çöz. Hacmi ( $\mu$ l)	Kuyudaki Toplam Hacim ( $\mu$ l)	Kuyudaki Subs. Kons. [S] (mM)	Kuyudaki İnh. Kons. [I] (mM)	$\Delta A$ (410nm)	Aktivite (U/mL dak)	1/V	1/[S]
110	70	20	0	280	0,5000	0	0,1130	15,8730	0,0630	2,0000
95		35			0,8750		0,1210	22,5564	0,0443	1,1428
90		40			1,0000		0,1240	25,0627	0,0399	1,0000
85		45			1,1250		0,1260	26,7335	0,0374	0,8889
80		50			1,2500		0,1250	25,8981	0,0386	0,8000
75		55			1,3750		0,1000	30,0752	0,0332	0,7272
65		65			1,6250		0,1333	32,5815	0,0306	0,6153
95		70			30		5	280	0,7500	$8,90 \cdot 10^{-3}$
90	35		0,8750	0,1030	19,2147	0,0520			1,1428	
85	40		1,0000	0,1050	20,8855	0,0478			1,0000	
80	45		1,1250	0,1060	21,7210	0,0460			0,8889	
75	50		1,2500	0,1060	21,7210	0,0460			0,8000	
70	55		1,3750	0,1100	25,0627	0,0399			0,7272	
60	65		1,6250	0,1080	23,3918	0,0427			0,6153	
65	70	20	40	280	0,5000	$7,1 \cdot 10^{-2}$	0,9000	10,8605	0,0920	2,0000
55		35			0,8750		0,0930	13,3668	0,0748	1,1428
50		40			1,0000		0,0940	14,2022	0,0704	1,0000
45		45			1,1250		0,0970	16,7084	0,0598	0,8889
35		55			1,3750		0,1010	20,0501	0,0498	0,7272
20		70			1,7500		0,1010	20,5010	0,0498	0,5714

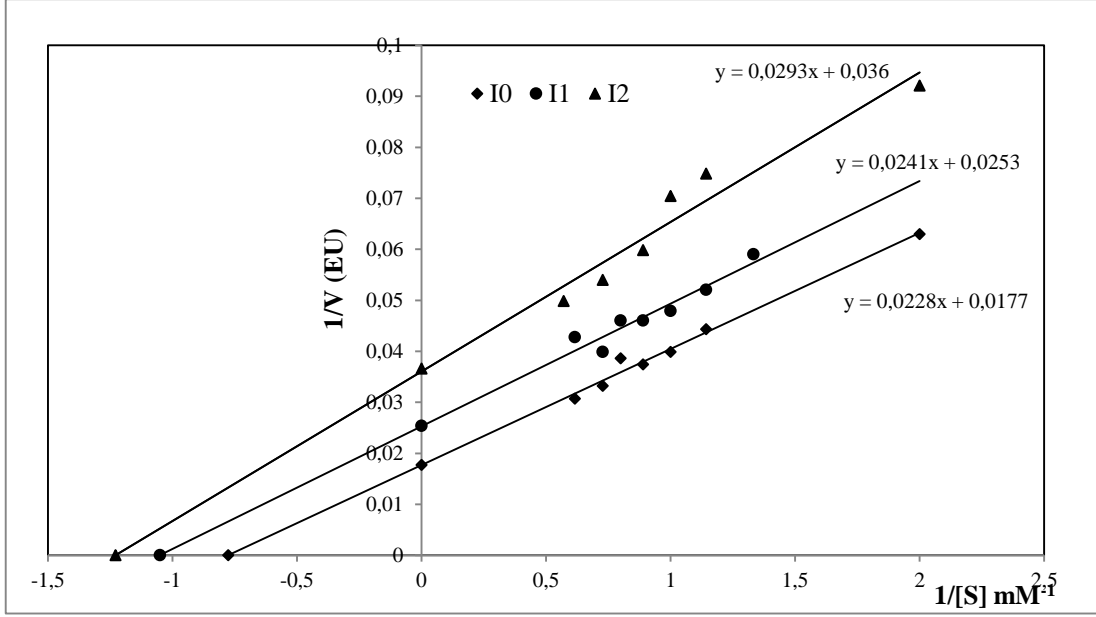


**Tablo 3.17:** *A.oryzae* NRRL 5590' dan elde edilip saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren D(+)-glukozun  $K_i$  değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

50 mM Na-Ac Tamponu ( $\mu$ l)	Enzim Çöz. Hacmi ( $\mu$ l)	Subs. Çöz. Hacmi ( $\mu$ l)	İnh. Çöz. Hacmi ( $\mu$ l)	Kuyudaki Toplam Hacim ( $\mu$ l)	Kuyudaki Subs. Hons. [S](mM)	Kuyudaki İnh. Kon. [I](mM)	$\Delta A$ (410 nm)	Aktivite (U/ml dak.)	1/V	1/[S]
125	70	5	0	280	0,1250	0	0,2480	113,6170	0,0088	8,0000
120		10			0,2500		0,3170	171,2610	0,0058	4,0000
115		15			0,3750		0,3880	230,5760	0,0043	2,6667
110		20			0,5000		0,4240	260,6510	0,0038	2,0000
105		25			0,6250		0,4710	299,9160	0,0033	1,6000
100		30			0,7500		0,4980	322,4720	0,0031	1,3333
95		35			0,8750		0,5140	335,8390	0,0029	1,1428
90		40			1,0000		0,5410	358,3960	0,0027	1,0000
85		45			1,1250		0,5150	336,6750	0,0029	0,8889
80		50			1,2500		0,5300	349,2060	0,0028	0,8000
75		55			1,3750		0,5520	367,5850	0,0027	0,7272
70		60			1,5000		0,5420	359,2310	0,0027	0,6667
65		65			1,6250		0,5330	351,7120	0,0028	0,6153
60		70			1,7500		0,5100	332,4970	0,0030	0,5714

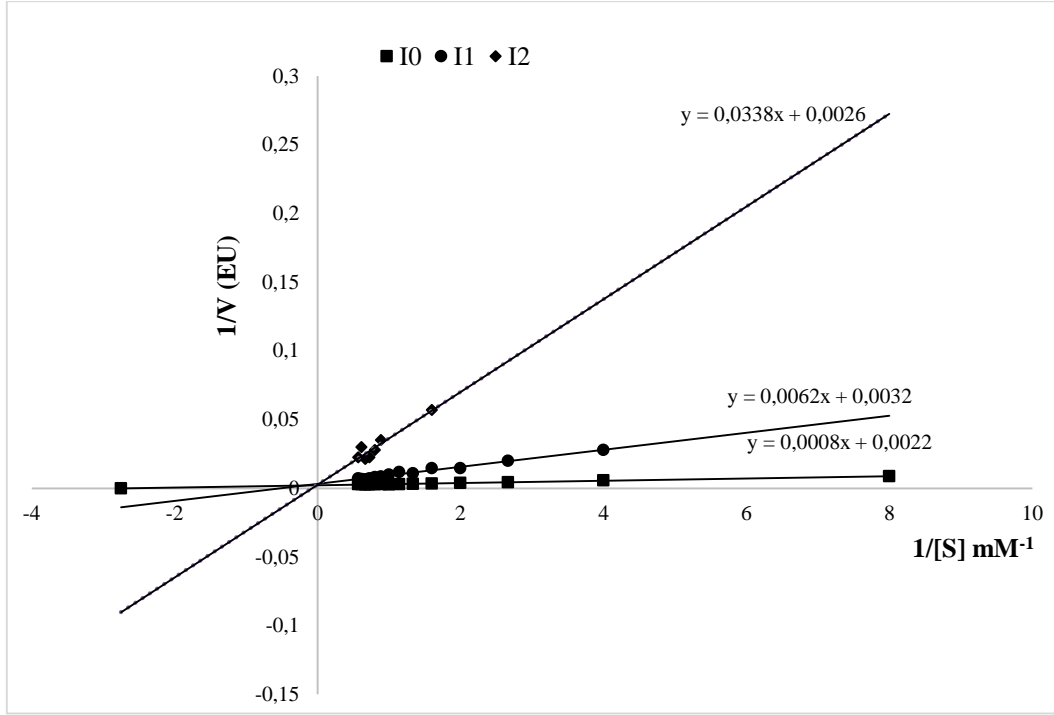
**Tablo 3.17:** (Devam) *A.oryzae* NRRL 5590' dan elde edilip saflaştırılan β-glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren D(+)glukozun  $K_i$  değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

50mM Na- Ac tamponu (μl)	Enzim Çöz. Hacmi (μl)	Subs. Çöz. Hacmi (μl)	İnh. Çöz. Hacmi (μl)	Kuyudaki Toplam Hacim (μl)	Kuyudaki Subs. Kons.[S] (mM)	Kuyudaki İnh. Kons [I] (mM)	ΔA (410 nm)	Aktivite (U/ml dak)	1/V	1/[S]				
115	70	10	5	280	0,2500	$8,90 \cdot 10^{-3}$	0,1560	35,9231	0,0278	4,0000				
110		15			0,3750		0,1730	50,1253	0,0199	2,6667				
105		20			0,5000		0,1950	68,5045	0,0145	2,0000				
100		25			0,6250		0,1950	68,5045	0,0145	1,6000				
95		30			0,7500		0,2230	91,8964	0,0108	1,3333				
90		35			0,8750		0,2150	85,2130	0,0117	1,1428				
85		40			1,0000		0,2350	101,9215	0,0098	1,0000				
80		45			1,1250		0,2550	118,6299	0,0084	0,8889				
75		50			1,2500		0,2610	123,6424	0,0080	0,8000				
70		55			1,3750		0,2800	139,5155	0,0071	0,7272				
65		60			1,5000		0,2980	154,5530	0,0064	0,6667				
60		65			1,6250		0,2920	149,5405	0,0668	0,6153				
55		70			1,7500		0,2800	139,5155	0,0071	0,5714				
65		70			25		40	280	0,6250	$7,10 \cdot 10^{-2}$	0,1410	17,5438	0,0570	1,6000
45					45				1,1250		0,1540	28,4043	0,0352	0,8889
40	50		1,2500	0,1630	35,9231	0,0278			0,8000					
35	55		1,3750	0,1730	44,2773	0,0225			0,7272					
30	60		1,5000	0,1760	46,7836	0,0213			0,6667					
25	65		1,6250	0,1600	33,4168	0,0299			0,6153					
20	70		1,7500	0,1730	44,2773	0,0225			0,5714					



**Şekil 3.23:** *A. caelatus* NRRL 26107' dan elde edilip saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimine, *p*NPG substratı varlığında, D(+)-glukozun inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burg grafiği

Şekil 3.23' daki Lineweaver-Burg grafiğinden, D(+)-glukozun *A. caelatus* NRRL 26107' dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin, *p*NPG substratı varlığında, nonkompetative (yarışmasız) tipte inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. D(+)-glukozun  $[I_1]=8,90 \cdot 10^{-3}$  mM ve  $[I_2]=7,10 \cdot 10^{-2}$  mM olarak iki farklı konsantrasyonundaki aktiviteler kullanılarak çizilen grafikten (Şekil 3.23)  $K_i$  değerinin  $1,42 \cdot 10^{-1} \pm 7,31 \cdot 10^{-2}$  olduğu hesaplanmıştır.



**Şekil 3.24:** *A. oryzae* NRRL 5590' dan elde edilip saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimine, *p*NPG substratı varlığında, D(+)-glukozun inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burg Grafiği

Şekil 3.24' daki Lineweaver-Burg grafiğinden, D(+)-glukozun *A. oryzae* NRRL5590' dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin, *p*NPG substratı varlığında, kompetative (yarışmalı) tipte inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. D(+)-glukozun  $[I_1]=8,90 \cdot 10^{-3}$  mM ve  $[I_3]=7,10 \cdot 10^{-2}$  mM olarak iki farklı konsantrasyonundaki aktiviteleri kullanılarak çizilen grafikten (Şekil 3.24)  $K_i$  değerinin  $9,58 \cdot 10^{-4} \pm 8,02 \cdot 10^{-5}$  olduğu hesaplanmıştır.

### 3.5.8 *Aspergillus caelatus* NRRL 26107 ve *Aspergillus oryzae* NRRL 5590' dan Saflaştırılan $\beta$ -glukosidaz Enzimlerinin İnhibitörü Olan $\delta$ -glukonolaktonun İnhibisyon Tipinin ve $K_i$ Değerlerinin Belirlenmesi

*A. caelatus* NRRL 26107 ve *A. oryzae* NRRL 5590' dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin  $\delta$ -glukonolakton inhibitörüne karşı  $K_i$  sabitinin belirlenmesi için, öncelikle reaksiyon ortamında inhibitör olmaksızın farklı *p*NPG substrat konsantrasyonuna bağlı enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Daha sonra  $1,70 \cdot 10^{-5}$  mM ve  $1,07 \cdot 10^{-4}$  mM sabit  $\delta$ -glukonolakton konsantrasyonlarındaki ve *p*NPG substratının

farklı konsantrasyonlarında enzim aktiviteleri belirlenmiştir (Tablo 3.18; Tablo 3.19). Bu değerlerden  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri hesaplanarak Lineweaver–Burg grafiğinde  $I_1$  ve  $I_2$  doğruları çizilip (Şekil 3.25; Şekil 3.26) bu grafikten yararlanarak da  $K_i$  değerleri ve inhibisyon türleri belirlenmiştir.

**Tablo 3.18:** *A.caelatus* NRRL 26107' dan elde edilip saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren  $\delta$ -glukonolakton  $K_i$  değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

50 mM Na-Ac Tamponu ( $\mu$ l)	Enzim Çöz. Hacmi ( $\mu$ l)	Subs.Çöz. Hacmi ( $\mu$ l)	İnh. Çöz. Hacmi	Kuyudaki Toplam Hacim ( $\mu$ l)	Kuyudaki Subs. Kons. [S](mM)	Kuyudaki İnh. Kons. [I](mM)	$\Delta A$ (410nm)	Aktivite (U/mL dak.)	1/V	1/[S]
120	70	10	0	280	0,2500	0	0,0990	15,0375	0,0665	4,0000
115		15			0,3750		0,1040	19,2147	0,0520	2,6667
110		20			0,5000		0,1050	20,0501	0,0498	2,0000
105		25			0,6250		0,1090	23,3918	0,0427	1,6000
95		35			0,8750		01130	26,7335	0,0374	1,1428
90		40			1,0000		0,1150	28,4043	0,0352	1,0000
85		45			1,1250		0,1170	30,0751	0,0332	0,8889
110		70			10		10	280	0,2500	$1,70 \cdot 10^{-5}$
105	15		0,3750	0,0930	10,0251	0,0997			2,6667	
100	20		0,5000	0,0980	14,2022	0,0704			2,0000	
95	25		0,6250	0,1020	17,5439	0,0570			1,6000	
90	30		0,7500	0,1020	17,5439	0,0570			1,3333	
85	35		0,8750	0,1030	18,3793	0,0544			1,1428	
80	40		1,0000	0,0980	16,7084	0,0598			4,0000	
75	70	15	40	280	0,3750	$1,07 \cdot 10^{-4}$	0,0900	10,0251	0,0997	2,6667
65		25			0,6250		0,0960	15,0376	0,0665	1,6000
60		30			0,7500		0,0970	15,8730	0,0630	1,3333
55		35			0,8750		0,0990	17,5439	0,0500	1,1428
50		40			1,0000		0,1010	19,2147	0,0520	1,0000

**Tablo 3.19:** *A.oryzae* NRRL 5590' dan Elde Edilip saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren  $\delta$ -glukonolakton  $K_i$  değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

50mM Na-Ac Tamponu ( $\mu$ l)	Enzim Çöz. Hacmi ( $\mu$ l)	Subs.Çöz.Hacmi ( $\mu$ l)	İnh.Çöz. Hacmi ( $\mu$ l)	Kuyudaki Toplam Hacim ( $\mu$ l)	Kuyudaki Subs.Kons. [S](mM)	Kuyudaki İnh. Kons. [I](mM)	$\Delta A$ (410 nm)	Aktivite (U/ml dak.)	1/V	1/[S]
125	70	5	0	280	0,1250	0	0,1940	82,7060	0,0120	8,0000
120		10			0,2500		0,3700	229,7410	0,0043	4,0000
115		15			0,3750		0,4270	277,3600	0,0036	2,6667
110		20			0,5000		0,4600	304,9290	0,0032	2,0000
105		25			0,6250		0,4950	334,1680	0,0029	1,6000
100		30			0,7500		0,5370	369,2560	0,0027	1,3333
95		35			0,8750		0,5930	416,0400	0,0024	1,1428
90		40			1,0000		0,5970	419,3810	0,0023	1,0000
85		45			1,1250		0,6020	423,5580	0,0023	0,8889
80		50			1,2500		0,5890	412,6980	0,0024	0,8000
75		55			1,3750		0,6120	431,9130	0,0023	0,7272
70		60			1,5000		0,6050	426,0650	0,0023	0,6667
65		65			1,6250		0,5790	404,3440	0,0024	0,6153
60		70			1,7500		0,5750	401,0020	0,0024	0,5714

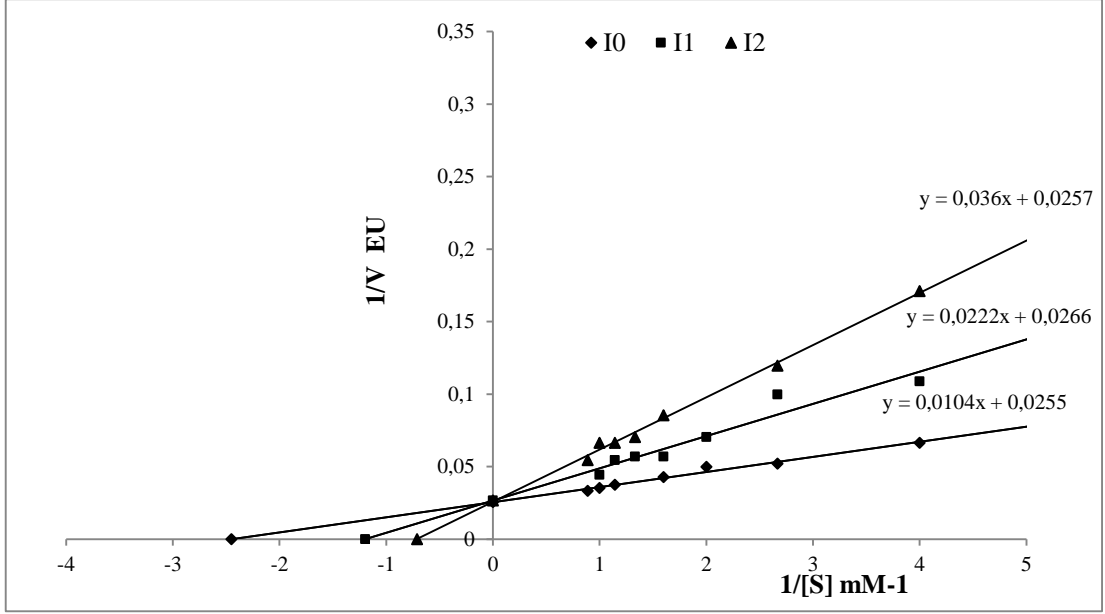
**Tablo 3.19:** (Devam) *A.oryzae* NRRL 5590' dan Elde Edilip saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren  $\delta$ -glukonolakton  $K_i$  değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

50 mM Na-Ac Tamponu ( $\mu$ l)	Enzim Çöz. Hacmi ( $\mu$ l)	Subs. Çöz. Hacmi ( $\mu$ l)	İnh. Çöz. Hacmi ( $\mu$ l)	Kuyudaki Toplam Hacim ( $\mu$ l)	Kuyudaki Subs. Kons. [S] (mM)	Kuyudaki İnh. Kons. [I] (mM)	$\Delta A$ (410 nm)	Aktivite (U/ml dak)	1/V	1/[S]
120	70	5	5	280	0,1250	$1,70 \cdot 10^{-5}$	0,1520	43,4419	0,0230	8,0000
115		10			0,2500		0,1810	67,4492	0,0147	4,0000
110		15			0,3750		0,2120	93,5673	0,0106	2,6667
105		20			0,5000		0,2370	114,4530	0,0087	2,0000
100		25			0,6250		0,2850	154,5530	0,0064	1,6000
95		30			0,7500		0,2780	148,7050	0,0067	1,3333
90		35			0,8750		0,3120	177,1090	0,0056	1,1428
85		40			1,0000		0,3330	194,6530	0,0051	1,0000
80		45			1,1250		0,3510	209,6910	0,0047	0,8889
75		50			1,2500		0,3380	198,8300	0,0050	0,8000
70		55			1,3750		0,3400	200,5010	0,0049	0,7272
65		60			1,5000		0,3870	239,7660	0,0041	0,6667
60		65			1,6250		0,3950	246,4490	0,0040	0,6153
55		70			1,7500		0,3820	235,5890	0,0042	0,5714



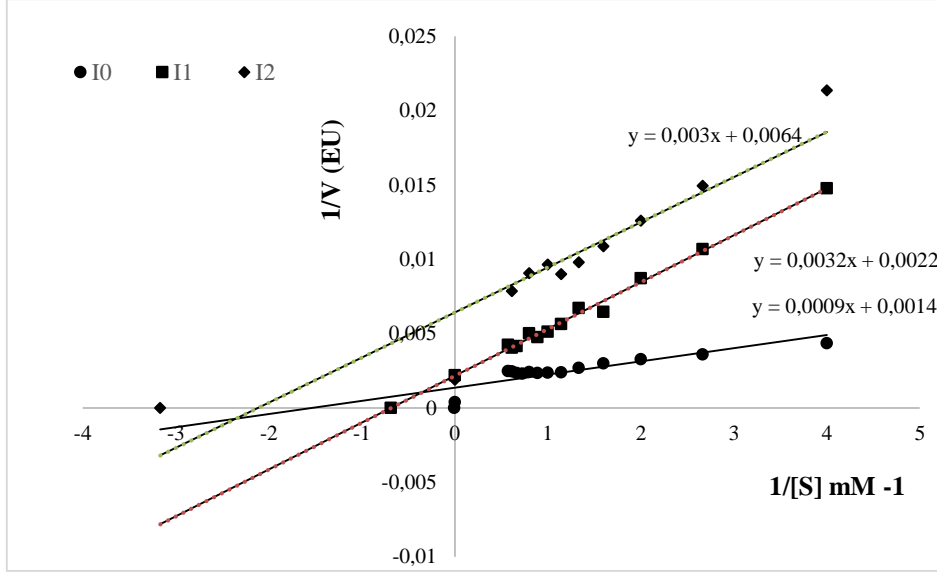
**Tablo 3.19:** (Devam) *A.oryzae* NRRL 5590' dan Elde Edilip saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren  $\delta$ -glukonolakton  $K_i$  değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

50mM Na-Ac Tamponu ( $\mu$ l)	Enzim Çöz. Hacmi ( $\mu$ l)	Subs.Çöz. Hacmi ( $\mu$ l)	İnh.Çöz. Hacmi ( $\mu$ l)	Kuyudaki Toplam Hacim( $\mu$ l)	Kuyudaki Subs. Kon [S] (mM)	Kuyudakş inh. Kons. [I] (mM)	$\Delta A$ (410 nm)	Aktivite (U/ml dak)	1/V	1/[S]
85	70	5	40	280	0,1250	$1,07 \cdot 10^{-4}$	0,1100	12,5313	0,0798	8,0000
80		10			0,2500		0,1290	24,4043	0,0352	4,0000
75		15			0,3750		0,1510	46,7836	0,0213	2,6667
70		20			0,5000		0,1750	66,8338	0,0149	2,0000
65		25			0,6250		0,1900	79,3651	0,0126	1,6000
60		30			0,7500		0,2050	91,8964	0,0108	1,3333
55		35			0,8750		0,2170	101,9210	0,0098	1,1428
50		40			1,0000		0,2280	111,1110	0,0090	1,0000
45		45			1,1250		0,2190	103,5920	0,0096	0,8889
40		50			1,2500		0,2570	135,3380	0,0073	0,8000
35		55			1,3750		0,2270	110,2760	0,0090	0,7272
30		60			1,5000		0,2430	123,6420	0,0080	0,6667



**Şekil 3.25:** *A. caelatus* NRRL 26107' dan elde edilip saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimine, *p*NPG substratı varlığında,  $\delta$ -glukonolaktonun inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burg grafiği

Şekil 3.25' deki Lineweaver-Burg grafiğinden,  $\delta$ -glukonolaktonun *A. caelatus* NRRL 26107' dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin *p*NPG substratı varlığında, kompetitive (yarışmalı) tipte inhibisyon etkisi gösterdiği saptanmıştır.  $\delta$ -glukonolakton  $[I_1]=1,70 \cdot 10^{-5}$  mM ve  $[I_2]=1,07 \cdot 10^{-4}$  mM olarak iki farklı konsantrasyonundaki aktiviteler kullanılarak çizilen grafikten (Şekil 3.25) ise  $K_i$  değerinin  $2,98 \cdot 10^{-5} \pm 1,35 \cdot 10^{-5}$  olduğu hesaplanmıştır.



**aŞekil 3.26:** *A.oryzae* NRRL 5590' dan elde edilip saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimine, *p*NPG substratı varlığında,  $\delta$ -glukonolaktonun inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burg grafiği

Şekil 3.26' daki Lineweaver-Burg grafiğinden,  $\delta$ -glukonolaktonun *A.oryzae* NRRL5590' dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin *p*NPG substratı varlığında, kompetative (yarışmalı) tipte inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir.  $\delta$ -glukonolakton  $[I_1]=1,70 \cdot 10^{-5}$  mM ve  $[I_3]=1,07 \cdot 10^{-4}$  mM olarak iki farklı konsantrasyonundaki aktiviteleri kullanılarak çizilen grafikten (Şekil 3.26) de  $K_i$  değerinin  $2,99 \cdot 10^{-5} \pm 9,00 \cdot 10^{-8}$  olduğu hesaplanmıştır.

#### 4. TARTISMA SONUÇ

Çalışmalarımıza araştırmamız süresince enzim kaynağı olarak kullanacağımız *Aspergillus* türlerinin belirlenmesiyle başlanmıştır. Bu amaçla *A.caelatus* NRRL 26107, *A.oryzae* NRRL 5590, *A.sydowii* NRRL 4768 ve *A.bisporus* NRRL 3692 suşları %5 CMC içeren Czapek Dox Agar besiyerine inokule edilerek oluşturdukları hidroliz zonları belirlenmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda, *A.oryzae* NRRL 26107 ve *A.caelatus* NRRL 5590' un en büyük hidroliz zon çapına sahip oldukları belirlendiğinden bu suşlar  $\beta$ -glukosidaz pozitif olarak değerlendirilmiş ve diğer basamaklarda  $\beta$ -glukosidaz üretici mikroorganizmalar olarak kullanılmalarına karar verilmiştir. Khokhar ve ark., (2012) *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Trichoderma* cinlerine ait 17 farklı fungus türü ile yaptıkları çalışmalarında test edilen türlerden sekizinin selüloz pozitif olduğunu rapor etmişlerdir [105]. Yapılan benzer bir çalışmada fungus, bakteri, maya ve aktinomisetlerden oluşan 36 izolatın hidroliz zonu tayini gerçekleştirmiş ve bu izolatlardan 25' inin farklı boyutlarda hidroliz zonu oluşturdukları belirlendiğinden selüloz pozitif olarak değerlendirildikleri belirtilmiş ve selüloz pozitif olarak değerlendirilen *Penicillium chrysogenum*' un en yüksek hidroliz zonuna sahip olduğu rapor edilmiştir [128]. Çalışmamızda, KSF ortamı olarak tarımsal yan ürün olan buğday samanı selülozik substrat kullanılmıştır. KSF ortamında nemlendirme sıvısının, pH'ın, inkübasyon sıcaklığı ve inkübasyon süresinin optimizasyon çalışmaları yapılarak, optimum koşullarda  $\beta$ -glukosidaz enzimi eldesi sağlanmıştır.

*A.caelatus* NRRL 26107 ve *A.oryzae* NRRL 5590 suşlarından optimum koşullarda elde edilen  $\beta$ -glukosidaz enzimleri; amonyum sülfat çöktürmesi ve ardından Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (Sephrose-4B-L-Tirozin-1-Naftilamin) ile iki basamakta saflaştırılmıştır. Saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimlerinin; Native ve SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile saflığı ve alt birimlerinin varlığı/sayısı kontrol edilmiştir. *A.caelatus* NRRL 26107 ve *A.oryzae* NRRL 5590 suşlarından saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimlerinin biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla; optimum pH aralığı, optimum inkübasyon sıcaklığı, enzimin termal kararlılığı, enzimin kinetik özelliğini gösteren  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri incelenmiştir. Ayrıca  $\beta$ -glukosidaz enziminin genel inhibitörleri olan D(+)glukoz ve  $\delta$ -glukonolaktonun saflaştırılan enzim üzerindeki inhibisyon etkisi *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-

glukopiranosit (pNPG) substratı varlığında araştırılmıştır. Yapılan literatür taraması sonunda farklı araştırmacıların *Penicillium atrovenetum*, *P.simplicissimum*, *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A.sydowii*, *Paecilomyces thermophile*, *Trichoderma harzianum*, *Daldinia eschscholzii* gibi farklı organizmalardan  $\beta$ -glukosidaz enzimi elde ederek elektroforetik ve biyokimyasal özelliklerini araştırdıkları belirlenmiştir [52, 129, 72, 130, 131, 132, 82].

Çalışmamızda canlılarda önemli fonksiyonları olan  $\beta$ -glukosidaz enzimi, buğday samanının KSF' da substrat olarak kullanılması ile  $\beta$ -glukosidaz pozitif olarak değerlendirilen *A. caelatus* NRRL 26107 ve *A.oryzae* NRRL 5590 suşlarından elde edilmiştir. Isaac ve Tahon (2015) yaptıkları çalışmalarında *A.terreus* AUMC10138' dan mısır koçanını KSF' da substrat olarak kullanılmasıyla selülazları elde ettiklerini rapor etmişlerdir. Çalışmalarında bu enzim grubunun FPase, CMCase ve  $\beta$ -glukosidaz aktivitelerinin optimum olduğu koşullar araştırılmış ve  $\beta$ -glukosidaz enziminin optimum sıcaklık değeri 45°C; tuzluluk oranı %5; optimum pH değeri 10,0; inkübasyon süresi 7 gün olarak kaydedilmiştir. Ayrıca çalışmada farklı inokulum miktarlarının enzim üretimine etkisi de araştırılmış ve inokulum miktarları KSF ortamının %10-50' si oranlarında denenmiş ve  $\beta$ -glukosidaz enzimi için inokulum miktarını %30 (4,5 mL) olarak belirlemişlerdir [133]. Mrudula ve Murugammal (2011) hindistan cevizinin KSF' de substrat olarak kullanılmasıyla *A. niger*' den elde ettikleri selülaz enziminin optimum sıcaklığını 30°C, pH'ı 6.0 ve inkübasyon süresini 72 saat olarak tespit etmişlerdir [78]. Adeleke ve ark., (2012) portakal kabuğunu KSF' nunda substrat olarak kullanarak *P.atrovenetum*, *A.flavus* ve *A.oryzae*' dan optimum koşullarda endoglukanaz enzimi elde etmeye çalışmışlardır. *P.atrovenetum*' dan elde ettikleri endoglukanaz enziminin pH:5.0, 40°C ve 7 günlük inkübasyonun ardından; *A.flavus*' dan elde ettikleri endoglukanaz enziminin pH:5.5, 40°C ve 7 günlük inkübasyonun ardından; *A.oryzae*' dan elde ettikleri endoglukanaz enziminin ise pH:5.5, 35°C ve 7 günlük inkübasyonun ardından maksimum enzim üretimi gerçekleştiğini belirtmişlerdir [52]. Omojasola ve Jilani (2009) üç farklı fungus kültürünü kullanarak yaptıkları çalışmalarında selülaz üretimi için; *A.niger*' in pH 4,5 45°C ve 7 günlük inkübasyon sonucunda maksimum aktiviteye sahip olduğunu rapor etmişlerdir [134]. Bizim çalışmamızda ise bu koşullar; *A. caelatus* NRRL 26107  $\beta$ -glukosidazı için KSF ortamının nemlendirme sıvısı NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponu, pH:7,0; optimum sıcaklık 30°C ve inkübasyon süresi 7 gün olarak; *A.oryzae* NRRL 5590  $\beta$ -

glukosidazı için ise nemlendirme sıvısı NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponu, pH:6.5, optimum sıcaklık 25°C ve inkübasyon süresi 7 gün olarak belirlenmiştir (Şekil 3.2; Şekil 3.3; Şekil 3.4). Bu sonuçlar doğrultusunda test mikroorganizmalarının β-glukosidaz üretimi için gerek duydukları ve optimize edilen bu koşulların daha önce yapılmış çalışmalarla benzerlik gösterdiğini söylemek mümkündür.

Çalışmamızda optimum koşullarda geliştirilen *A.caelatus* NRRL 26107 ve *A.oryzae* NRRL 5590 suşlarından elde edilen kısmi saflaştırılmış β-glukosidaz enziminin her iki mikroorganizma içinde amonyum sülfat çöktürme aralığı %50-90 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.5; Şekil 3.6). Daha önceki çalışmalar incelendiğinde farklı organizmalardan elde edilen β-glukosidaz enzimi için farklı amonyum sülfat çöktürme aralıkları elde edildiği rapor edilmiştir. Chang ve ark., (2012) *A.niger* KCCM 11239' den, Bai ve ark., (2013) ise *Penicillium simplicissimum* H11' den elde ettikleri β-glukosidaz enziminin amonyum sülfat çöktürme aralığını %30-90 olarak belirlediklerini rapor etmişlerdir [48, 131]. Riou ve ark., (1998) *A.oryzae* CBS12559' dan elde ettikleri β-glukosidaz enzimini %85'lik, Karnchanatat ve ark., (2007) ise *Daldinia eschscholzii* AB284189' den elde ettikleri aynı enzimi %80'lik amonyum sülfat çözeltisinde bir gece beklettikten sonra 10000rpm de santrifüjleyerek pellet kısmını kullandıklarını rapor etmişlerdir [81, 82]. Ahmed ve ark., (2009) *T.harzianum*' dan elde ettikleri β-glukosidaz enziminin amonyum sülfat çöktürmesini %0-80 aralığında çalışmış ve en yüksek verimin %25' lik amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edildiğini bildirmişlerdir [132]. Daha önce yapılan bu çalışmalarla karşılaştırıldığında, bizim çalışmamızda kullanılan her iki mikroorganizma içinde amonyum sülfat çöktürme aralığının (%50-90 ) daha dar olduğunu söylemek mümkündür.

Çalışmamızda amonyum sülfat çöktürmesi sonunda *A.caelatus* NRRL26107 β-glukosidaz enzimi %71,111 verimle 3,486 kat; *A.oryzae* NRRL5590 β-glukosidaz enzimi ise %16,011 verimle 1,704 kat saflaştırılmıştır (Tablo 3.6; Tablo 3.7). β-glukosidaz enzimi saflaştırması yapılan farklı çalışmalarda amonyum sülfat çöktürmesi sonunda; *A.niger* KCCM11239' den %21,5 verimle 9,2 kat; *A.oryzae* CBS 12559' dan %91 verimle 2,2 kat; *P.simplicissimum* H11' den %55,2 verimle 1,22 kat; *T.harzianum*' dan %12,58 verimle 0,29 kat; *D.escscholzii* AB284189' dan %31,83 verimle 5,32 kat saflaştırma gerçekleştirildiği rapor edilmiştir [48, 81, 131, 132, 82]. Bu sonuçlara göre verim ve saflaştırma katsayılarındaki farklılıkların paralellik

göstermediği, muhtemelen çalışma koşullarına ve mikroorganizma suşuna göre değişkenlik gösterebildiğini söyleyebiliriz. Aynı şekilde bizim çalışmamızda da amonyum sülfat çöktürme basamağı sonunda elde edilen saflaştırma katsayısı ve verimin test edilen iki mikroorganizma için çalışma koşullarının aynı olmasına rağmen farklı olduğu ve literatürdeki diğer türlerin verimi ile de yakın sonuç göstermediği görülmektedir.

Çalışmamızda amonyum sülfat çöktürmesinin ardından, Sepharose-4B-L-Tirozin-1-Naftilamin Hidrofobik Jeli ile Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi yöntemi uygulanarak iki aşamalı saflaştırma işlemi uygulanmıştır. Araştırmamızda *A.caelatus* NRRL26107  $\beta$ -glukosidaz enzimi Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile %6,330 verimle 31,196 kat; *A.oryzae* NRRL5590  $\beta$ -glukosidaz enzimi %4,350 verimle 5,855 kat saflaştırılmıştır (Tablo 3.6; Tablo 3.7). Asic ve ark., (2015) yaptıkları çalışmalarında *Agaricus bisporus*' dan elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz enzimini aynı yapıya sahip hidrofobik jelle %4,05 verimle 10,12 kat saflaştırmışlardır [116]. Farklı araştırmacıların değişik organizmalardan elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz enzimini, amonyum sülfat çöktürmesinin ardından çok aşamalı saflaştırma yöntemleri ile elde ettiklerini raporladıkları görülmektedir. Karnchanatat ve ark., (2007) *D.escscholzii* AB284189' den elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi ardından İyon Değişim, Hidrofobik Etkileşim ve Jel Filtrasyon Kromatografik yöntemleri ile %6,28 verimle 50,23 kat saflaştırmışlardır [82]. Daroit ve ark., (2008) *Monascus puroureus*' dan elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz enzimini Aseton Çöktürmesi, Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ve Jel Filtrasyon yöntemlerini kullanarak 92 kat saflaştırmışlardır [80]. Riou ve ark., (1998) *A.oryzae*' den elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz enzimini, amonyum sülfat çöktürmesi ardından Jel Filtrasyon ve İyon Değişim Kromatografisini kullanarak %4,5 verimle 176.9 kat; Chang ve ark., (2012) ise *A.niger* KCCM 11239' dan  $\beta$ -glukosidaz enzimini saflaştırmak için önce amonyum sülfat çöktürmesi ardından Jel Filtrasyon ve İyon Değişim Kromatografisi yöntemlerini kullanarak %1,5 verimle 46,5 kat saflaştırdıklarını rapor etmişlerdir [81, 48]. Ma ve ark., (2011)'da *A.glaucus*' dan elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi ardından Jel Filtrasyon ve Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi yöntemlerini kullanarak %83,3 verimle saflaştırarak rapor etmişlerdir [26]. Irshad ve ark., (2013) *T.viride*' den elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve Jel Filtrasyon Kromatografisi ile %8,1 verimle 7,1 kat

gerçekleştirmişlerdir [135]. Yang ve ark., (2008) ise *Paecilomyces thermophila* J18' den elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz enzimini İyon Değişim ve Jel Filtrasyon kromatografisi ile %21,7 verimle 105 kat saflaştırdıklarını belirtmişlerdir [130]. Odoux ve ark., (2003) vanilya bitkisinden elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz enzimini, amonyum sülfat çöktürmesi ardından İyon Değişim ve Hidrofobik Etkileşim Kromatografik yöntemlerini kullanarak %8,4 verimle 7,2 kat saflaştırmışlardır [136].

Çalışmamızda *A.oryzae* NRRL 5590' dan elde ettiğimiz  $\beta$ -glukosidaz enziminin saflaştırma sonuçları, Riou ve ark., (1998)' nin aynı organizmadan elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz enziminin saflaştırma sonuçları ile kıyaslandığında; yüzde verimlerinin birbirine oldukça yakın olduğu fakat saflaştırma katsayılarının belirgin derecede farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Farklılığın sebebi enzim saflaştırmada kullanılan metot ve koşullardaki farklılığın yanında enzim eldesinde kullanılan suşların farklı olmasından ortaya çıkmış olabileceğini söyleyebiliriz. Çalışmalarımızda kullandığımız diğer organizma olan *A.caelatus* NRRL 26107' dan elde edilen  $\beta$ -glukosidaz enziminin saflaştırılması ile ilgili ise literatür taramaları sonucunda herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır [81].

Çalışmamızda *A.caelatus* NRRL26107 ve *A.oryzae* NRRL5590' dan KSF ortamında elde edilip iki basamakta saflaştırılan;  $\beta$ -glukosidaz enziminin saflığını ve alt varlığını/sayısını belirlemek için SDS/Native poliakrilamid jel elektroforezi uygulanmıştır. SDS ve Native poliakrilamid jel elektroforezinin her ikisinde de Şekil 3.9'da görüldüğü gibi *A.caelatus* NRRL26107' dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin molekül ağırlığı yaklaşık olarak 30 kDa; *A.oryzae* NRRL5590'dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin ise Şekil 3.10' da görüldüğü gibi molekül ağırlığının yaklaşık 31 kDa olarak tek bir alt üniteden oluştuğu saptanmıştır. Riou ve ark., (1998) *A.oryzae* CBS 12559' den elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz enziminin SDS-PAGE ile 43 kDa; Chang ve ark., (2012) *A.niger* KCCM11239' den saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz enziminin SDS-PAGE ile 123 kDa; Liu ve ark., (2012) *A.fumigatus* Z5' den saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz enziminin SDS-PAGE ile 92 kDa; Bai ve ark., (2013) *P.simplicissimum* H11' den saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin SDS-PAGE ile 126,0 kDa; Irshad ve ark., (2013) *T.viride*'den saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz enziminin SDS-PAGE ile 62 kDa, Karnchanatat ve ark.,(2007) *D.eschscholzii* AB284189' den elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz enziminin SDS-PAGE ile 64,2 kDa moleküler ağırlığa sahip tek alt üniteden oluştuğunu rapor etmişlerdir [81, 48, 137, 131, 135, 82]. Ma ve ark.,



(2011) *A.glaucus*' dan elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz enziminin SDS-PAGE ile 23,5 kDa ve Native-PAGE ile 92,5 kDa molekül ağırlığına sahip tetramer olduğunu rapor etmişlerdir [26]. Bir başka çalışmada ise *A.bisporus*' dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin SDS-PAGE ile 46 ve 62 kDa'lık iki alt birimden oluştuğunu; Native-PAGE ile molekül ağırlığının 110 kDa olduğunu belirtmişlerdir [116]. Çalışmamızda SDS-PAGE ve Native-PAGE ile molekül ağırlığı incelenen *A.caelatus* NRRL26107 ve *A.oryzae* NRRL5590' dan saflaştırdığımız  $\beta$ -glukosidaz enzimlerinin, literatürlerde rapor edilen  $\beta$ -glukosidaz enzimlerinden daha küçük molekül ağırlığına sahip olduğu saptanmıştır.

*A.caelatus* NRRL26107 ve *A.oryzae* NRRL5590' dan KSF ortamında elde edilip saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimlerinin optimum pH ve sıcaklık değerleri belirlenmiştir. *A.caelatus* NRRL26107 ve *A.oryzae* NRRL5590' dan KSF ortamında elde edilip saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin optimum pH değerleri sırasıyla 6,0 ve 5,25; optimum sıcaklık değerleri ise her iki organizma için 65°C olarak saptanmıştır (Şekil 3.11; Şekil 3.12; Şekil 3.13; Şekil 3.14). Riou ve ark., (1998) *A.oryzae* CSB 12559' dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin optimum pH değerini 5,0 ve optimum sıcaklık değerini 50°C; Chang ve ark., (2012) *A.niger* KCCM 11239' dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin optimum pH değerini ve sıcaklık değerini sırasıyla 4,0 ve 70°C; Yan ve Lin (1997) *A.niger* CCRC 31494' den saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz enziminin optimum pH değerini 5,0 ; sıcaklık değerini 55°C; Xie ve ark., (2004) *A.niger* No.5.1.' den saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz enziminin optimum pH değerini ve sıcaklık değerini sırasıyla 6,0 ve 60°C; Ma ve ark., (2011) *A.glaucus*' dan saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz enziminin optimum pH değerini ve sıcaklık değerini 3,6 ve 60°C; Workman ve Day (1982) *A.terreus*' dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin optimum pH ve sıcaklık değerlerini 4,8 ve 50°C; Irshad ve ark., (2015) *T.viride*' den saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz enziminin optimum pH değerini 6,0, sıcaklık değerini ise 60°C; Karnchanat ve ark., (2007) *D.escscholzii* AB284189' den saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz enziminin optimum pH değerini 5,0, sıcaklık değerini 50°C; Asic ve ark., (2015) *A.bisporus*' dan saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz enzimlerinin optimum pH 4,0, sıcaklık değerlerini 55°C; Mallerman ve ark., (2015) *Flammulina velutiper*' den saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz enziminin optimum pH değerini 5,0 ve sıcaklık değerini 50°C; Silva ve ark., (2016) ise *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4' den saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz enziminin optimum pH değerini 5,0 olarak belirlemişler ve

60°C' ye kadar aktivitesini koruduğunu tespit etmişlerdir [81, 48, 138, 139, 26, 47, 135, 82, 116, 140, 141]. Bai ve ark., (2013) *P.simplicissimum* H-11' den saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz enziminin optimum pH ve sıcaklık değerlerinin sırasıyla 3,2 ve 60°C olduğunu ayrıca enzimin pH:2,8 ve 50°C' de 12 saat , pH:5,6' da 50°C' de 4 saat stabil kaldığını belirtmişlerdir [131]. Çalışmamızda *A.caelatus* NRRL 26107 ve *A.oryzae* NRRL 5590' dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimlerinin optimum pH ve sıcaklık değerleri literatürlerde rapor edilen değerlerle karşılaştırıldığında; her iki mikroorganizmadan da elde edilen enzimin optimum pH değerlerinin literatürde rapor edilen değerlere oldukça yakın olmasına rağmen, optimum sıcaklık değerinin biraz daha yüksek olduğunu ve bu sıcaklık değerinde stabilitesini 30 dakika süresince koruduğunu söyleyebiliriz.

*A.caelatus* NRRL 26107 ve *A.oryzae* NRRL 5590' dan KSF ortamında elde edilip saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimlerinin termal kararlılıkları da araştırılmıştır. *A.caelatus* NRRL26107' den elde edilip saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin 120 dakikalık inkübasyon sonrasında; 45°C' de %30, 55°C' de %46, 65°C' de %17 oranında ve 75°C' de %8 oranında aktivitesini koruduğu belirlenmiştir. 85 °C' de ise saflaştırılan enzimin aktivitesini 32 dakika koruduğu belirlenmiştir. *A.oryzae* NRRL5590' dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin ise 120 dakikalık inkübasyonun sonunda 45°C de %22; 55°C' de % 23; 65°C' de %36 oranında aktivitesini koruduğu, 75°C' de ise bu süre sonunda enzimin aktivitesini koruyamadığı belirlenmiştir. 85°C' de ise enzimin aktivitesini 46 dakika koruduğu belirlenmiştir (Şekil 3.15; Şekil 3.16). Daroit ve ark., (2008) *Monascus purpureus* NRRL1992' dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin 50, 60, 65 ve 70°C sıcaklıklarda termal kararlılığını araştırmışlar ve enzimin 50°C' de 2 saat aktivitesinin stabil kaldığını belirlemişlerdir. 60°C' de 1 saatlik inkübasyonun ardından enzimin aktivitesini %83 ve 2 saatlik inkübasyon süresinin ardından ise enzimin aktivitesini %78 oranında; 65°C' de aynı inkübasyon sürelerinde %50 ve %22 oranında koruduğunu belirlemişlerdir [80]. Yang ve ark., (2014) *Neosartorya fischeri* P1' den elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz enzime sıcaklığın etkisini araştırmış 120 dakikada 50-85°C' de aktivitesinin %50' den fazla olduğunu tespit etmişlerdir. 80°C' de ise 10 dakikalık süre sonunda %50, 120 dakikalık süre sonunda ise %11 oranında enzimin aktivitesini koruduğunu belirlemişlerdir [142]. Chang ve ark., (2012) *A.niger* KCCM11239' dan saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz enzime sıcaklığın etkisini araştırmış ve enzimin 60°C' nin üzerindeki sıcaklıklarda 2 saatlik

inkübasyonun ardından aktivitesini % 98 oranında kaybettiğini belirlemişlerdir. 70°C’ de ise enzim aktivitesinin sadece 10 dakika süre ile maksimum olduğunu rapor etmişlerdir [48]. Ma ve ark., (2011) *A.glaucus*’ dan elde ettikleri  $\beta$ -glukosidaz enziminin 30-80°C aralığında yaptıkları termal kararlılık çalışmalarında enzim aktivitesinin 60°C’ ye kadar kademeli olarak arttığını, 60°C’ de aktivitenin %60, 70°C ise %15 oranında korunduğunu belirtmişlerdir [26].

Yapmış olduğumuz çalışmada  $\beta$ -glukosidaz enziminin *p*NPG substratına karşı ilgisini belirten  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri belirlenmiştir. *A.caelatus* NRRL26107’ dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin *p*NPG substratına karşı  $K_m$  değeri 0,193 mM ve  $V_{max}$  değerleri 322,58 EU olarak bulunmuş ve katalitik etkinliğinin ölçüsü olan  $V_{max}/K_m$  oranı 1671,398 olarak hesaplanmıştır. *A.oryzae* NRRL5590’ dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin *p*NPG substratına karşı  $K_m$  değeri 0,363 mM ve  $V_{max}$  değerleri 454,545 EU olarak bulunmuş ve  $V_{max}/K_m$  oranı 1279,738 EU olarak belirlenmiştir (Tablo 3.10; Tablo 3.11). Çalışmamızın bu basamağında elde ettiğimiz  $V_{max}$  değeri; enzim konsantrasyonu sabit tutularak substrat konsantrasyonuna bağlı maksimum hızı belirtmekte olup, bu değer yüksek olması enzimin substratı daha hızlı parçaladığını gösterir.  $K_m$  değeri; enzimin  $V_{max}$  değerinin  $\frac{1}{2}$  olduğu andaki substrat konsantrasyonunu ifade etmekte olup bu değer düşük olması endüstriyel alanlarda büyük önem taşır.  $V_{max}/K_m$  değeri ise; enzimin substrata olan ilgisini belirtir ve endüstriyel uygulamalarda, en etkili enzimlerin seçiminde kullanılan önemli parametrelerden birisidir [143, 80, 47]. *A.caelatus* NRRL26107 ve *A.oryzae* NRRL5590’ dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimlerinin  $K_m$  değerlerinin oldukça düşük olması,  $V_{max}$  değerlerinin ve  $V_{max}/K_m$  değerinin ise yüksek olması *p*NPG substratına karşı ilgilerinin fazla olduğunu göstermektedir. Farklı çalışmalarda farklı organizmalardan elde edilen  $\beta$ -glukosidaz enziminin *p*NPG substratına karşı ilgisi belirlenmiştir. Workman ve Day (1982) *A.terreus*’ dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin *p*NPG substratına karşı  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerini sırasıyla 0,78 mM ve 210 U/mg; Yan ve Lin (1997) *A.niger* CCRC 31494’ den saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin *p*NPG substratına karşı  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerini 21,7 mM ve 124,4 U/mg; Xie ve ark., (2004) *A. niger* No.5.1’ den saflaştırıkları  $\beta$ -glukosidaz enziminin *p*NPG substratına karşı  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerini 5,34  $\mu$ M ve 2,57  $\mu$ M/mL.s; Saha ve ark., (1996) *Candida pelteta*’ dan saflaştırıkları  $\beta$ -glukosidaz enziminin *p*NPG substratına karşı  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerini 2,3mM ve 221 $\mu$ mol.min<sup>-1</sup>.mg; Karnchanat ve

ark.,(2007) *D.eschscholzii* AB294189' dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin *p*NPG substratına karşı  $K_m$  değerlerini 1,52mM ve  $V_{max}$  değerlerini 3,21U/dak/mg<sup>-1</sup>; Daroit ve ark., (2007) *M. purpureus* NRRL1992' den saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin *p*NPG substratına karşı  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerini 0,39 mM ve 6,51 U/mg olarak,  $V_{max}/K_m$  oranını ise 16,7; Koffi ve ark., (2012) *Periplana americana*' dan saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz enziminin *p*NPG substratına karşı  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerini 3,29 mM ve 41,67 U/mg olarak,  $V_{max}/K_m$  oranını ise 12,47; Guo ve ark., (2016) *T.reesei*' den dan saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz enziminin *p*NPG substratına karşı  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerini 2,48±0,75 mM ve 7,7±1,62 U/mg olarak;  $V_{max}/K_m$  oranını ise 3,06 olarak belirlemişlerdir [47, 138, 139, 77, 82, 80, 76, 126]. Belirtilen literatürlerdeki sonuçlar ile bizim çalışmamızdaki sonuçlar kıyaslandığında; her iki mikroorganizmadan da elde edilen  $\beta$ -glukosidaz enzimlerinin  $K_m$  değerlerinin oldukça düşük,  $V_{max}$  değerlerinin ve  $V_{max} /K_m$  değerinin yüksek olması; düşük substrat konsantrasyonlarında enzimin daha yüksek hızda çalışacağını ifade edeceğinden enzimin endüstriyel alanlarda kullanımı için avantaj sağlayacağını göstermektedir.

Çalışmamızda  $\beta$ -glukosidaz enziminin inhibitörlerinden olan D(+)-glukozun *p*NPG substratı varlığında; *A.caelatus* NRRL26107 ve *A.oryzae* NRRL559' dan elde edilerek saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimlerinin inhibisyon tipleri belirlenerek;  $IC_{50}$  ve  $K_i$  değerleri hesaplanmıştır. *A.caelatus* NRRL26107' dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin D(+)-glukoz inhibitörü için  $IC_{50}$  değeri 7,65.10<sup>-2</sup> mM;  $K_i$  değeri 1,42.10<sup>-1</sup>±7,31.10<sup>-2</sup> olarak hesaplanmıştır ve nankompetative inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 3.19; Şekil3.23). Buna durum D(+)-glukoz inhibitörünün *A.caelatus* NRRL26107' dan elde edilip saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin aktif bölgesinin dışında bir yere bağlandığını göstermektedir [4]. *A.oryzae* NRRL5590' dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin aynı inhibitör için  $IC_{50}$  değeri 8,80.10<sup>-2</sup> mM olarak,  $K_i$  değeri 9,58.10<sup>-4</sup>±8,02.10<sup>-5</sup> olarak hesaplanmış ve kompetative tipte inhibisyon etkisine sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.20; Şekil 3.24). Bu da glukoz inhibitörünün *A.oryzae* NRRL5590' dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin aktif bölgesine bağlanmak için *p*NPG substratı ile yarıştığını göstermektedir [4]. Asic ve ark., (2015) *A.bisporus*' dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesine glukoz inhibitörünün etkisini araştırmışlar,  $IC_{50}$  ve  $K_i$  değerlerini sırasıyla 19,185 ve 9,402  $\mu$ M olarak hesaplamış ve glukoz inhibitörünün kompetative tipte inhibisyon etkisi gösterdiğini belirtmişlerdir [116]. Harhangi ve ark., (2002) *Piromyces* sp. E2' den

saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesine glukoz inhibitörünün etkisini araştırmışlar,  $IC_{50}$  değerlerini 9,5 mM,  $K_i$  değerlerini 0,022mM olarak hesaplamış ve bu inhibitörün kompetative tipte inhibisyon etkisi gösterdiğini belirlemişlerdir [144]. Guo ve ark., (2016) *T.reesei*' den saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesini %50 oranında azaltan glukoz inhibitörünün konsantrasyonu yani  $IC_{50}$  değerini 600 mM; Lee ve ark., (2012) aynı organizmadan saflaştırdıkları bu enzimin  $IC_{50}$  değerini 48,5mM olarak tespit etmişlerdir [126, 145]. Riou ve ark., (1998) yaptıkları çalışmalarında glukozun, *A.oryzae* CSB12559' dan saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz enzimini kompetative tipte inhibe ettiğini ve  $K_i$  değerlerinin 1,36; Yang ve ark., (2008) *P. thermophila* J18' den saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz enziminin *p*NPG substratı varlığında glukoz inhibitörlerine karşı kompetative tipte inhibisyon gösterdiğini ve  $K_i$  değerlerinin 72 mM; Workman ve Day (1982) *A.terreus*' dan saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine glukozun *p*NPG substratı varlığında kompetative tipte inhibisyon etkisine sahip olduğu ve  $K_i$  değerinin 3,5 mM; Yan ve Lin (1997) *A.niger* CCRC 31494' den saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine glukozun *p*NPG substratı varlığında kompetative tipte inhibisyon etkisine sahip olduğunu ve  $K_i$  değerini 543 mM; Yun ve ark., (2001) *T.harzianum*' dan saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine glukozun *p*NPG substratı varlığında kompetative tipte inhibisyon gösterdiğini ve  $K_i$  değerini 1,8  $\mu$ m; Parry ve ark., (2001) *Thermoascus auranticus*' dan saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine glukozun *p*NPG substratı varlığında kompetative tipte inhibisyon gösterdiğini ve  $K_i$  değerini 0,29 mM; Saha ve Bothans (1996) *C.pelteta*' dan saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine glukozun *p*NPG substratı varlığında kompetative tipte inhibisyon gösterdiğini ve  $K_i$  değerini 1,4 M; Pitson ve ark., (1997) *Acremonium persicinum*' dan saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz enziminin *p*NPG substratı varlığında,glukoz inhibitörüne karşı kompetative tipte inhibisyon gösterdiği ve  $K_i$  değerinin 0,35 mM; Karnchanatat ve ark., (2007) *D.eschscholzii*' den saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz enziminin *p*NPG substratı varlığında, glukoz inhibitörüne karşı kompetative tipte inhibisyon gösterdiği ve  $K_i$  değerinin 0,79 mM olduğunu belirtmişlerdir [81, 130, 47, 138, 146, 147, 77, 148, 82].

Çalışmamızda  $\beta$ -glukosidaz enziminin bir diğer inhibitor madde olan  $\delta$ -glukonolaktonun *p*NPG substratı varlığında; *A.caelatus* NRRL26107 ve *A.oryzae* NRRL559' dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimlerinin aktivitesi üzerine inhibisyon

etkisi gösterdiği  $IC_{50}$  değeri ve inhibisyon tipleri belirlenerek  $K_i$  değerleri hesaplanmıştır. *A.caelatus* saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin  $\delta$ -glukonolakton inhibitörü için  $IC_{50}$  değeri  $7,31 \cdot 10^{-4}$  mM;  $K_i$  değeri  $2,98 \cdot 10^{-5} \pm 1,35 \cdot 10^{-5}$  olarak hesaplanmış ve kompetative tipte inhibisyon etkisine sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.21; Şekil 3.25). *A.oryzae* NRRL5590' dan elde edilip saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin  $\delta$ -glukonolakton inhibitörü için  $IC_{50}$  değeri  $4,00 \cdot 10^{-4}$  mM olarak,  $K_i$  değeri  $2,99 \cdot 10^{-5} \pm 9,00 \cdot 10^{-8}$  olarak hesaplanmış ve kompetative tipte inhibisyon etkisine sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.22; Şekil 3.26). Bu sonuçlara göre  $\delta$ -glukonolakton inhibitörünün *A.caelatus* NRRL 26107 ve *A.oryzae* NRRL5590' dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin aktif bölgesine bağlanmak için *p*NPG substratı ile yarıştığını göstermektedir. Asic ve ark., (2015) *A.bisporus*' dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesine  $\delta$ -glukonolaktonun etkisini araştırmışlar ve  $IC_{50}$  değerini 0,39 mM olarak belirlemişlerdir [116]. Bu inhibitörün, *p*NPG substratı varlığında kompetative tipte inhibisyon etkisi gösterdiğini ve  $K_i$  değerini 3,2  $\mu$ M; Harhangi ve ark., (2002) *Piromyces* sp. E2' den saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesine  $\delta$ -glukonolaktonun *p*NPG substratı varlığında kompetative tipte inhibisyon etkisi gösterdiğini ve  $K_i$  değerlerini 0,17 mM; Pitson ve ark., (1997) *A.persicinum*' dan saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz enzimini  $\delta$ -glukonolaktonun *p*NPG substratı varlığında kompetative tipte inhibisyon etkisi gösterdiğini ve  $K_i$  değerini 5,0  $\mu$ M; Parry ve ark., (2001) *T.auranticus*' dan saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine *p*NPG substratı varlığında  $\delta$ -glukonolaktonun kompetative tipte inhibisyon etkisine sahip olduğunu ve  $K_i$  değerini 8,3 mM; Riou ve ark., (1998) yaptıkları çalışmalarında *A.oryzae* CSB12559' dan saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz enzimini  $\delta$ -glukonolaktonun *p*NPG substratı varlığında kompetative tipte inhibisyon gösterdiğini ve  $K_i$  değerlerini 12,5 mM; Yang ve ark., (2008) *P.thermophila* J18' den saflaştırdıkları  $\beta$ -glukosidaz enziminin *p*NPG substratı varlığında,  $\delta$ -glukonolakton inhibitörlerinin kompetative tipte ihibisyon etkisi gösterdiği ve  $K_i$  değerlerinin 0,49 mM olduğunu rapor etmişlerdir [116, 144, 148, 147, 81, 130].

Endüstriyel enzim uygulamalarında, inhibitör maddelerin enzim aktivitesine etkisi önemli bir parametredir [138]. Daha önce yapılan ve yukarıda kısaca özetlenen çalışmalarda mikrobiyal  $\beta$ -glukosidaz üzerinde D(+)-glukoz ve  $\delta$ -glukonolakton inhibitörlerinin kompetative tipte inhibisyon etkisi gösterdiği rapor edilmiştir [138, 146, 147, 77]. Bizim çalışmamızda ise; D(+)-glukozun *A.caelatus* NRRL 5590' dan

saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimine nonkompetative ve *A.oryzae* NRRL 26107' dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimine ise kompetative tipte inhibisyon etkisi gösterdiği;  $\delta$ -glukonolakton inhibitörünün *A.caelatus* NRRL 5590 ve *A.oryzae* NRRL 26107' dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enzimlerinin her ikisini de kompetative tipte inhibisyon etkisi gösterdiği saptanmıştır. Yapmış olduğumuz çalışmada; *A.caelatus* NRRL 5590 ve *A.oryzae* NRRL 26107' dan saflaştırılan  $\beta$ -glukosidaz enziminin her ikisi için de D(+)glukoz inhibitörünün  $\delta$ -glukonolakton inhibitöründen daha güçlü olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak çalışmamız mikroorganizma kökenli yeni enzim kaynaklarının belirlenmesi, tarımsal yan ürünler kullanılarak enzimlerin elde edilmesi ve bu enzimlerin saflaştırılmasının bilime ve ekonomiye yapacağı katkıların yanında çevre üzerindeki olumlu etkileriyle de büyük önem taşıdığı düşünülmektedir. Çalışmamız doğrultusunda elde edilen veriler ile mikrobiyal kökenli  $\beta$ -glukosidaz enziminin yüksek sıcaklık ve pH' larda aktivitesini koruması başta gıda, kâğıt, tekstil, deterjan gibi alanlar olmak üzere birçok endüstriyel alanda kullanılmak üzere geliştirilebilir.

## 5. KAYNAKLAR

- [1] Aehle, W., *Enzymes in Industry*, Netherlands: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, (2004).
- [2] Bingöl, G., *Biyokimya*, Ankara: Güven Matbaası, 169-174, (1983).
- [3] Harvey, R. and Ferrier, D., *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry*, Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 53-68, (2011).
- [4] Nelson, D. L. and Cox, M. M., *Lehninger Principles of Biochemistry*, New York: W. H. Freeman and Company, 190-237, (2004).
- [5] Smith J. E., *Biotechnology*, Chambridge: Chambridge University Pres., 73-94, (1996).
- [6] Jacobs, M., Jaros, D. and Rohm H., "Recent Advances in Milk Clotting Enzymes", *International Journal of Dairy Technology*, 64, (1), 14-33, (2011).
- [7] Fox, P. F., "Proteolysis During Cheese Manufacture and Ripening", *Journal of Dairy Science*, 72, (6), 1379-1400, (1989).
- [8] Visser, S., "Proteolytic Enzymes and Their Relation to Cheese Ripening and Flavor: An Overview", *Journal of Dairy Science*, 76, (1), 329-350, (1993).
- [9] Afroz, Q. M., Khan, K. A., Ahmed P. and Uprit S., "Enzymes Used in Dairy Industries", *International Journal of Applied Research*, 1, (10), 523-527, (2015).
- [10] Er, B. ve Sarımehtemtoğlu B., "Süt Endüstrisinde Mikrobiyel Enzim Kullanımı", *Vet. Hekim Der. Derg.*, 80,(1), 26-30, (2009).
- [11] Miguel, A.S.M., Martins-Meyer, T.S., Figueiredo, E.V.C., Lobo, B.W.P. and Dellamora-Ortiz, G.M., "Enzymes in Bakery: Current and Future Trends", İN in *Food Industry*, ed I. Muzzalupo, *Intech Open Access Publisher*, Chapter: 14, 287-321, (2013).



- [12] Sanchez-Porro, C., Martin, E., Mellado, E. and Ventosa, A., “Diversity of Moderately Halophilic Bacteria Producing Extracellular Hydrolytic Enzymes”, *Journal of Applied Microbiology*, 94, 295-300, (2003).
- [13] Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C.R. and Nigam, P. “Solid State Fermentation for the Production of Industrial Enzymes”, *Bioresource Technology*, 77, 149-162, (1999).
- [14] Godfrey, T. and West, S., *Introduction to Industrial Enzymology*, Industrial Enzymology, 2<sup>nd</sup> Edition, New York: Stockton Pres, (1996).
- [15] Eeckhout, W. and De Paepe, M., “Total Phosphorus, Phytate-phosphorus and Phytase Activity in Plant Feedstuffs”, *Animal Feed Science and Tecnology*, 47(1-2), 19-29, (1994).
- [16] Hu, H.L., van den Brink, J., Gruben, B.S., Wösten, H.A.B., Gu, J.D. and De Vries R.P., “Improved Enzymes Production by Co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with Other Fungi”, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65, 248-252, (2011).
- [17] Wiseman, A., *Handbook of Enzyme Biotechnology The Application of Enzymes in Industry*, Second Edition, Chapter 3, 274-373, (1987).
- [18] Anbu, P., Gopinath, S.C.B., Cihan, A.C. and Chaulagain B.P., “Microbial Enzymes and Their Applications in Industries and Medicine”, *Biomed Research International*, 2013, 1-2, (2013).
- [19] Pahoja, M. and Sethar, M.A., “A Review of Enzymatic Properties of Lipase in Plants, Animals and Microorganism”, *Pakistan Journal of Applied sciences*, 2 (4), 474-484, (2002).
- [20] Wodzinski, R.J. and Ullah, A.H., “Phytase”, *Adv. Appl. Microbiol.* 42, 263-302, (1996).
- [21] Bhat, M.K. “Cellulose and Related Enzymes in Biotechnology”, *Biotechnology Advances*, 18(5), 355-458, (2000).

- [22] Jahangeer S., Khan N., Jahangeer S., Sohail M., Shahzad S., Ahmad A. and Khan S.A., “Screening and characterization of Fungal Cellulases Isolated From the Native Environmental Source”, *Pak. J. Bot.*, 37(3), 739-748, (2005).
- [23] Lederberg, J., *Cellulase. In: Encyclopedia of Microbiology*, Academic Press. Inc, Vol.1; A-C, (1992).
- [24] Lynd, L.R., Weimer, P.J., Van-Zyl, W.H. and Pretorius, I.S., “Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology”, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 506-577, (2002).
- [25] Sohail, M., Siddiqi, R., Ahmad, A. and Khan, S. A., “Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: Effect of temperature and pH”, *New Biotechnology*, 25 (6), 437-441, (2009).
- [26] Ma, S.-J., Leng, B., Xu, X.-Q., Zhu, X.-Z., Shi, Y., Tao, Y.-M., Chen, S.-X., Long, M.-N. and Chen, Q.-X, “Purification and Charecterization of  $\beta$ -1,4-glucosidase from *Aspergillus glaucus*”, *African Journal of Biotechnology*, 10(84), 19607-19614, (2011).
- [27] Kaur, J., Chadha, B.S., Kumar, B.A., Kaur, G.S. and Saini, H.S., “Purufication and Characterization of  $\beta$ -glucosidase from *Melanocarpus* SP. MTCC 3922”, *Electronic Journal of Biotechnology*, 10(2), 260-270, (2007).
- [28] Zhu, F.-M., Du, B., Gao, H.-S., Liu, C.-J. and Li, J., “Purification and Characterizaterization of an Intracellular  $\beta$ -Glucasidase from the Protoplast Fusant of *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger*”, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 46(6), 626-632, (2010).
- [29] Alexsander M., “Microbiology of Cellulose. In: Introduction to Soil Microbiology”, *Johnwiley and Son, Inc.*, (2<sup>nd</sup> Ed.) New York and London, (1961).
- [30] Mahmood, R.T. Asad, M.J., Mehboob, N., Mustaq, M., Minhas, N.M. and Hadri, S.H., “Production, Purification, and Characterization of Exoglucanase by *Aspergillus Fumigatus*”, *Appl. Biochem Biotechnol*, 170, 895-908, (2013).

- [31] Saqid, A.N., Hassan, M., Khan, N.F. and Baid S., “Thermostability of Crude Endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* Grown Under Solid State Fermentation (SSF) and Submerged Fermentation (SMF)”, *Process Biochemistry*, 45, 641-646, (2010).
- [32] Gupte, A. and Madamwar, D., “Solid State Fermentation of Lignocellulosic Waste for Cellulase and  $\beta$ - Glucosidase Production by Cocultivation of *Aspergillus ellipticus* and *Aspergillus fumigatus*”, *Biotechnol. Prog.* 13, 166-169, (1997).
- [33] Dobrev, G.T and Zhekova, B.Y., “Biosynthesis, Purification and Characterization of Endoglucanase from a Xylanase Producing strain *Aspergillus niger* B03”, *Brazilian journal of Microbiology*, ISBN: 15178382 ,70-77 ,(2012).
- [34] Pham, T.H., Quyen, D.T. and Nghiem, N.M., “Purification and Properties of Endoglucanase from *Aspergillus niger* VTCC-F021”, *Turk J.Biol.*, 36, 694-701, (2012).
- [35] Auto, R., James, A.S., Egwaikhide, A.P. and Bali, M.E., “Partial Purification and Characterization of Exoglucanase (EC 3.2.1.91) from *Aspergillus niger* S.L.1 Using Corn Cops as a Carbon source”, *Kaduna State University, Kaduna, Nigeria*, P016, (2012).
- [36] Dutt, D. and Kumar, A., “Optimization of Cellulase Production Under Solid-State Fermentation by *Aspergillus flavus* (AT-2) and *Aspergillus niger* (AT-3) and Its Impact on Stickies and Ink Particle Size of Sorted Office Paper”, *Cellulose Chemistry and Technology*, 247001, 287-298, (2012).
- [37] Wald, S., Wilke, C. and Blanch, H.W., “Kinetics of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. *Biotechnol*”, *Bioeng.*, 26(3), 221-230, (1984).
- [38] Czjzek, M., Çiçek, M., Zamboni, V., Burmeister, W.P., Bervan, D.R., Henrissat, B. and Esen, A., “Crystal structure of a Monocotyledon (Maize ZMGlu 1)  $\beta$ -glucosidase and a Model of Hs complex with *p*-nitrophenyl  $\beta$ -D- thioglucoside”, *Biochem. J.*, 354, 37-46, (2001).
- [39] Çiçek, M. and Esen, A., “Structure and Expression of a Dhurrinase ( $\beta$ -Glucosidase) form Sorghum”, *Plant Physiol*, 116, 1469-1478, (1998).

- [40] Dharmawardhana, D.P., Ellis B.E. and Carlson J.E., “A  $\beta$ -Glucosidase from Lodgepole Pine Xylem Specific for the Lignin Precursor Coniferin”, *Plant Physiol.*, 213, 331-339, (1995).
- [41] Kengen, S.W.M., Luesing, E.J., Stams A.J.M. and Zehnder, A.J.B., “Purification and Characterization of an Extremely Thermostable  $\beta$ -Glucosidase from the Hyperthermophilic Archeon *Pyrococcus furiosus*”, *Eur. J. Biochem.*, 213, 305-312, (1993).
- [42] Junior, A.B., Borges, D.G., Tardioli, P.W. and Farinas, C.S., “Characterization of  $\beta$ -glucosidase Produced by *Aspergillus niger* under Solid-State Fermentation and Partially Purified Using MANAE-Agarose”, *Biotechnology Research International*, 2014, 1-8, (2014).
- [43] Bagudo, A.I., Argungu, A.U., Suleiman, S.N. and Kalpana, S., “*Bacillus subtilis* as an Alternative Source of Beta-glucosidase” *International Journal of Modern Cellular and Molecular Biology*, 3(1), 1-9, (2014).
- [44] Gopalan, S., Gunnarsson, O. and Andersen, K., “Effects of Saddle-Point Singularities on the Electron Life Time”, *Phys. Rev. B.*, 46 (18), (1992).
- [45] Kim, S.J., Lee, C.M., Kim, M.Y., Yeo, Y.S., Yoon, S. H, Kang, H.C. and Koo, B. S., “Screening and Characterization of an Enzyme with Beta Glucosidase Activity from Environmental DNA”, *J. Microbiol Biotechnol*, 17 (6), 905-12, (2007).
- [46] Yeoh, H.H., Tan, T.K., Chua, S.L., and Lim, G., “Properties of  $\beta$ -glucosidase Purified from *Aspergillus niger*”, *MIRCEN Journal*, 4, 425-430, (1988).
- [47] Workman, W. E. and Day, D. F., “Purification and Properties of  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus terreus*”, *Applied and Environmental Microbiology*, 44 (6), 1289-1295, (1982).
- [48] Chang, K. H., Jo, M. N., Kim, K. T. and Paik, H.-D., “Purification and Characterization of a Ginsenoside Rb<sub>1</sub>-Hydrolyzing  $\beta$ -Glucosidase from *Aspergillus niger* KKCM 11239”, *Int. Mol. Sci.*, 13, 12140-12152, (2012).

- [49] Raimbault, M., “General and Microbiological Aspects of Solid Substrate Fermentation”, *EJB Electronic Journal of Biotechnology*, 1(3), 1-15, (1998).
- [50] Chahal, D.S., “Solid-State Fermentation with *Trichoderma reesei* for Cellulase Production”, *Applied and Environmental Microbiology*, 49(1), 205-210, (1985).
- [51] Bansal, N., Tewari, R., Soni, R. and Soni, S. K., “Production of Cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in Solid State Fermentation on Agricultural and Kitchen Waste Residues”, *Waste Management*, 32, 1341-1346, (2012).
- [52] Adeleke, A.J., Odunfa, S.A., Olanbiwonnu, A. and Owoseni, M.C., “Production of Cellulase and Pectinase from Orange Peels by Fungi”, *Nature and Science*, 10 (5), 107-112, (2012).
- [53] Raghavarao, K. S. M. S., Ranganathan, T. V. and Karanth, N. G., “Some Engineering Aspects of Solid State Fermentation”, *Biochemical Engineering Journal*, 13, 127- 135, (2002).
- [54] Andriani, D., Sunwoo, C., Ryu, H-W., Prasetya, B. and Park, D. H., “Immobilization of Cellulase from Newly Isolated Strain *Bacillus subtilis* TD6 Using Calcium Alginate as a Support Material”, *Bioprocess Biosyst Eng.*, 35, 29-33, (2012).
- [55] Shokri, J. and Adibkia, K., “Application of Cellulose and Cellulose Derivatives in Pharmaceutical Industries”, *Intech, Open Science/ In Minds*, Chapter 3, 47-66, (2013).
- [56] Mood, S. H., Golfeshan, A. H., Tabatabaei, M., Jouzani, G. S., Najafi, G. H., Gholami, M. and Ardjmand, M., “Lignocellulosic Biomass to Bioethanol, a Comprehensive Review with a Focus on Pretreatment”, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 77-93, (2013).
- [57] Walsh, G., Industrial Enzymes: Proteases and Carbohydrases. In: *Proteins; Biochemistry and Biotechnology*, John Wiley and Sons. Ltd. (2002).
- [58] Walter, H.R., Microcrystalline Cellulose Technology, In: *Polysaccharide Association Structure in Food*, Marcel Dekker, Inc., (1998).

- [59] Gallo, B. J., Natick, and Mass., “Cellulase-Producing Mikroorganism”, United States Patent Office, Patent No: 4,275,163 (1981).
- [60] Kantarcioğlu, A. S. and Yücel, A., “*Aspergillus* Cinsi Mantarlar ve İnvaziv Aspergilloz: Mikoloji, Patogenez, Laboratuvar Tanımı, Antifungallere Direnç ve Duyarlılık Deneyleri”, *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 34 (3), 140-157, (2003).
- [61] Domsch, K. H., Gams, W. Andersen, T., *Compendium of Soil Fungi*, London: Academic Press., (1980).
- [62] Lubertozzi, D. and Keasling, J. D., “Developing *Aspergillus* as a Host for Heterogenous Expression”, *Biotechnology Advances*, 27, 53-75, (2009).
- [63] Yoder, W. T. and Lehmbeck, J., “Heterogenous experssion and protein secretion on Filamentous Fungi”, *Advences in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture and Medicine*, Edited by Jan S. Tkacz and Lene Lange, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 201-219, (2004).
- [64] Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Vanoor.,Schat, C.A.N., *Introduction to Food- and Borne Fungi*, Centraalbureau Voor Schimmlercultures, Baarn, 27-52, (1981).
- [65] Pekin, B., *Biyoteknoloji*, Ege Üniversitesi Kimya Fak. Ders Notları Yayın Çoğaltma No: 29, 158-202, (1982).
- [66] Klimberg, V.S. and McClellan, J., “Glutamine, Cancer and Its Therapy”, *Am. J. Surg.*, 172, 418-424, (1996).
- [67] Ruiz-Herrera, J. and Starkey, R. L., “Dissimilation of Methionine by a Demethiolase of *Aspergillus* Species”, *J. Bacteriol*, 99 (3), 764-70, (1969).
- [68] Ritter, C. E. T. R., Camassola, M., Zampieri, D., Silveira, M. M. and Dillon, A. J. P., “Cellulase and Xylanase Production by *Penicillium echinulatum* in Submerged Media Containing Cellulose Amended with Sorbitol”, *Hindawa Publishing Corporation, Enzymes Research*, 2013, 1-9, (2013).
- [69] Tsiklauri, N. D., Khardziani, T. Sh., Kachlishvili, E. T. and Elisashvili, V. I., “Cellulase and Xylanase Activities of Higher Basidiomycetes Durig Bioconversion of Plant Raw Material Depending on the Carbon Source in the

- Nutrient Medium”, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 35 (3), 291-295, (1999).
- [70] Schülein, M., “Enzymatic Properties of Cellulases from *Humicola insolens*”, *Journal of Biotechnology*, 57 (1-3), 71-81, (1997).
- [71] Dake, D., Das, S. P., Sahoo, N., Das, D., Goyal, D. and Goyal, A., “Enhanced Cellulase Production from *Bacillus subtilis* by Optimizing Physical Parameters for Bioethanol Production”, *Hindawa Publishing Corporation, ISRN Biotechnology*, 2013, 1-11, (2013).
- [72] Matkar, K., Chapla, D., Divecha, J., Nighojkar, A. and Madamwar, D., “Production of Cellulase by a Isolated Strain of *Aspergillus sydowii* and Its Optimization under Submerged Fermentation”, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 78, 24-33, (2013).
- [73] Ang, S. K., Shaza, E. M., Adibah, Y., Suraini, A. A. and Madihah, M. S., “Production of Cellulase and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 Using Untereated Oil Palm Thunk Through Solid State Fermentation”, *Process Biochemistry*, 48, 1293-1302, (2013).
- [74] Toker, N. Y., “Protein Saflaştırması ile İlgili Bazı Metotlar”, *İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 26 (2), 403-412, (2000).
- [75] Ünlüsayın, M., Erdilal, R. and Çağatay, T., “Balık Proteinlerinin Saflaştırılmasında Kullanılan Son Yöntemler”, *Journal of Fisheries Sciences*, 3 (4), 298-309, (2009).
- [76] Koffi, Y. G., Konan, H. K., Kouadio, J. P. E. N., Dabonne, S., Due, E. A. and Kouame, L. P., “Purification and Biochemical Characterization of beta-glucosidase from Cockroach, *Periplaneta americana*”, *Journal of Animal & Plant Sciences*, 13 (2), 1747-1757, (2012).
- [77] Saha, B. S. and Bothast, R. J., “Production, Prufication and Characterization of a Highly Glucose-Tolerant Novel  $\beta$ -Glucosidase from *Candida peltata*”, *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (9), 3165-3170, (1996).

- [78] Mrudula, S. and Murugammal, R., “Production of Cellulase by *Aspergillus niger* under Submerged and Solid State Fermentation Using Coir Waste as a Substrate”, *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 1119-1127, (2011).
- [79] Toor, Y. and Ilyas, U., “Optimization of Cellulase Production by *Aspergillus ornatulus* by Solid State Fermentation of *Cicer arietinum*”, *American Journal of Research Communication*, 2 (1), 125-141, (2014).
- [80] Daroit, Daniel, J., Simonetti, A., Hertz, P. F. and Brandelli, A., “Purification and Characterization of an Extracellular  $\beta$ -Glucosidase from *Manusocus purpureus*”, *J. Microbiol Biotechnol*, 18 (5), 933-941, (2008).
- [81] Riou, C., Salmon, J.-M., Vallier, M.-J., Günata, Z. and Barre, P., “Purification, Characterization, and Substrate Specificity of a Novel Highly Glucose-Tolerant  $\beta$ -Glucosidase from *Aspergillus oryzae*”, *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (10), 3607-3614, (1998).
- [82] Karnchanatat, A., Petsom, A., Sangvanich, P., Piaphukiew, J., Whalley, A. J. S., Reynolds, C. D. and Sihanonth, P., “Purification and Biochemical Characterization of an Extracellular  $\beta$ -Glucosidase from the Wood-Decaying Fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb:Fr.) Rehm”, *FEMS Microbiol Lett.*, 270, 162-170, (2007).
- [83] Augustine, N. R., “Technology Transfer from Military Requirements to Public Need”, *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 6, 1-8, (1976).
- [84] Reese, E. T., “History of the Cellulase Program at the U.S. Army Natick Development Center”, *Biotechnol Bioeng. Symp.*, 6, 9-20, (1976).
- [85] Tolan, J. S. and Foody, B., “Cellulase from Submerged Fermentation”, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 65, 42-66, (1999).
- [86] Singhania, R. R., Sukumaran, R. K., Patel, A. K., Larocche, and C., Pandey, A., “Advancement and Comparative Profiles in the Production Technologies Using Solid-State and Submerged Fermentation for Microbial Cellulases”, *Enzyme and Microbial Technology*. 46, 541-549, (2010).



- [87] Bhat, M. K. and Bhat, S., “Cellulose Degrading Enzymes and Their Potential Industrial Applications”, *Biotechnology Advances*, 15, 583-620, (1997).
- [88] Kuhad, R. C., Gupta, R. and Singh, A., “Microbial Cellulases and Their Industrial Applications”, *SAGE-Hindawa Access to Research/Enzymes Research*, 2011, 1-10, (2011).
- [89] Alam, M. Z., Muhammad, N. M. and Erman, M. M., “Production of Cellulase Enzyme from Oil Palm Biomass as Substrate by Solid State Bioconversion”, *American J. Applied Sci.*, 2, 569-572, (2005).
- [90] Chandra, S. K.R., Snishamol, C. and Prabhu, N. G., “Cellulase Production by Native Bacteria Using Water Hyacinth as Substrate Under Solid State Fermentation”, *Mal. J. Microbiol*, 1(2), 25-29, (2005).
- [91] Grassin, C. and Fauquembergue, P., Wine; and Fruit juices. In: *Industrial Enzymology*, (2<sup>nd</sup> Ed.) (Eds): T. Godfrey and S. West. Macmillan Press Ltd. (1996).
- [92] Galante, Y. M., De Conti, A. and Monteverdi, R., *Application of Trichoderma Enzymes in Food and Feed Industries* , In: Harman, G. F., Kubicek, C. P., Editors, *Trichoderma & Gliocladium- Enzymes, Biological Control and Commercial Applications*. London: Taylor &Francis, 2, 327-342, (1998b).
- [93] Caldini, C., Bonomi, F., Pifferi, P. G., Lanzarini, G. and Galante, Y. M., “Kinetic and Immobilization Studies on Fungal Glycosidases for Aroma Enhancement in Wine”, *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 286-291, (1994).
- [94] Gunata, Y. Z., Bayonove, C. L., Cordonnier, R. E., Arnaud, A. and Galzy, P., “Hydrolysis of Grape Monoterpenyl Glycosides by *Candida molischiana* and *Candida wickerhamii*  $\beta$ -glucosidases”, *J. Sci. Food Agric.*, 50, 499-506, (1990).
- [95] Galante, Y. M., De Conti, A. and Monteverdi, R., *Application of Trichoderma Enzymes in Textile Industry*, In: Harman, G. F., Kubicek, C. P., Editors, *Trichoderma & Gliocladium- Enzymes, Biological Control and Commercial Applications*. London: Taylor &Francis, 2, 311-326, (1998a).

- [96] Uhlig, H., *Industrial Enzymes and Their Applications*, New York: John Wiley & Sons. Inc., pp: 435, (1998).
- [97] Karademir, A., Akgül, M. and Tutuş, A., “Kağıt Endüstrisinde Enzim Kullanımına Genel Bir Bakış: Enzimlerin Kabuk Soyma, Liflerin Modifikasyonu, Çözünebilir Kağıt Hamuru ve Selüloz Üretiminde Kullanımı (Bölüm 1)”, *KSF Fen ve Mühendislik Dergisi*, 5 (1), 61-71, (2002).
- [98] Kurtzeman, C.P., Smiley, M.J., Robnett, C.J. and Wicklow, D.T., “DNA Relatedness among Wild and Domesticated Species in the *Aspergillus flavus* Group” *Mycologia*, 78(6), 955-959, (1986).
- [99] Hasenekoğlu, İ., *Toprak Mikrofungusları*, Atatürk Üniversitesi Yayınları, 689, Cilt 1, 323-336, (1991).
- [100] Lee, C.-Z., Liou, G.-Y. and Yuan G.-F., “Comparison of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae* by Amplified Fragment Length Polymorphism”, *Both.Bull.Acat.Sin.*, 45, 61-68, (2004).
- [101] Horn, B.W. and Dorner, J.W., “Soil Populations of *Aspergillus* Species from Section *Flavi* along a Transect Through Peanut-Growing Regions of the United States”, *Mycologia*, 90(5), 767-776, (1998).
- [102] Horn, B.W., “Colonization of Wounded Peanut Seeds by Soil Fungi: Selectivity for Species from *Aspergillus* Section *Flavi*”, *Mycologia*, 97(1), 202-217, (2005).
- [103] Sarquis, M.I.M., Oliveira, E.M.M., Santos, A.S. and Costa, G.L., “Production of L-asparaginase by Filamentous Fungi”, *Mem. Inst. Oswaldo .Cruz.*, 99(5), 489-492, (2004).
- [104] Zain, M.E., Razak, A.A., El-Sheikh, H.H., Soliman, H.G. and Khalil, A.M., “Influence of Growth Medium on Diagnostic Characters of *Aspergillus* and *Penicillium* Species”, *African Journal of Microbiology Research*, 3(5), 280-286, (2009).

- [105] Khokhar, I., Haider, M. S., Mushtaq, S. and Mukhtar, I., "Isolation and Screening of Highly Cellulolytic Filamentous Fungi", *J. Appl. Sci. Environ. Manage, Sept.*, 16 (3), 223-226, (2012).
- [106] Slifkin, M. and Cumbie, R., "Congo Red as a Fluorochrome for the Rapid Detection of Fungi", *Journal of Clinical Microbiology*, 26(5), 827-830, (1988).
- [107] Sazcı, A., Radford, A. and Erenler, K., "Detection of Cellulolytic Fungi by Using Congo Red as an Indicator: A Comparative Study with the Diniro-salicylic Acid Reagent Method", *Journal of Applied Bacteriology*, 61, 559-562, (1986).
- [108] Teather, R.M. and Wood, P., "Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rumen", *Applied and Environmental Microbiology*, 43(4), 777-780, (1982).
- [109] Ijaz, A., Anwar, Z., Zafar, Y., Hussain, I., Muhammad, A., Irshad, M. and Memood, S., "Optimization of Cellulase Enzyme Production from Corn Cobs Using *Alternaria alternata* by Solid State Fermentation", *Journal of Cell and Molecular Biology*, 9(2), 51-56, (2011).
- [110] Davidson, H.M. and Fishman, W.H., "A Simplified Purification Procedure for Human Prostatic Acid Phosphatase Based on pH and Ammonium Sulfate Fractionation.", *J. Biol. Chem.*, 234(3), 526-528, (1958).
- [111] Tripathi, R.K., Devi, C.C. and Ramaiah, A., "pH-dependent Intercoversion of Two Forms of Tyrosinase in Human Skin", *Biochem. J.*, 252, 481-487, (1988).
- [112] Kilburn, J.O., O'Donnell, H.F., Silcox, V.A. and David, H.L., "Preparation of a Stable Mycobacteriol Tween Hydrolysis Test Substrate", *Applied Microbiology*, 26(5), 826, (1973).
- [113] Pfannkoch, E.A., "The Preparation of Buffers and Other Solutions a Chemist's Perspective", *Molecular Biology Problem Solver: A Laboratory Guide*, 32-37, (2001)
- [114] Johansen, J.B., Dannemand, M., Kong, W., Fan, W., Dragsted, J. and Furbo, S., "Thermal Conductivity Enhancement of Sodium Acetate Trihydrate by Adding

- Graphite Powder and the Effect on Stability of Supercooling”, *Energy Procedia*, 70, 249-256, (2015).
- [115] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., “Protein Measurement with Folin Phenol Reagent”, *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275, (1951).
- [116] Asic, A., Basic, L., Muhovic, I., Dogan, S. and Turan, Y., “Purification and Characterization of  $\beta$ -glucosidase from *Agaricus bisporus* (White Button Mushroom)”, *The Protein Journal*, 34 (6), 453-461, (2015).
- [117] Laemmli, U. K., “Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of Head of Bacteriophage-T4”, *Nature*, 227, 680-685, (1970).
- [118] Sambrook, J. and Russel, D.W., “SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins”, *Molecular Cloning*, 3, 1-9, (2001).
- [119] Jiang, S., Liu, S., Zhao, C. and Wu C., “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.*, 11, 640-649, (2016).
- [120] Niepmann, M. and Zheng, J., “Discontinuous NATIVE Protein Gel Electrophoresis”, *Institute of Biochemistry*, 35392 Giessen, Germany, (2006).
- [121] Shukolyukol, S.A., “NATIVE Electrophoresis in Cell Proteomic: BN-PAGE and CN-PAGE”, *Cell and Tissue Biolog*, 5(3), 311-318, (2011).
- [122] Voget, S., Steele, H.L. and Streit, W.R., “Characterization of Metagenome-Derived Halotolerant Cellulase”, *J Biotechnol*, 126, 26-36, (2006).
- [123] Warburg, O. and Christian, W., “Isolation and Crystallization of Enolase”, *Biochem Z*, 310, 384-421, (1942).
- [124] Nooralabettu, K.P., “Optimisation of Ammonium Sulfate Precipitation Method to Achieve High Throughput Concentration of Crude Alkaline Phosphatase from Brown shrimp (*Metapanaeus monoceros*) Hepatopancreas”, *Int. J. Anal. Bio-Sci.*, 2(1), 7-16, (2014).

- [125] Lineweaver, H. and Burk, D., “This Week’s Citation Classic: The Determination of Enzyme Dissociation Constants”, *J. Amer. Chem. Soc.*, 56, 658-666, (1934).
- [126] Guo, B., Amano, Y. and Nozaki, K., “Improvements in Glucose Sensitivity and Stability of *Trichoderma reesi*  $\beta$ -Glucosidase Using Site-Directed Mutagenesis”, *Research Article* 11(1), 1-12, (2016).
- [127] Dixon, M., “The Determination of Enzyme Inhibitor Constants”, *Biochemical Laboratory, University of Cambridge*, 55, 170-171, (1952).
- [128] Rathore, S. S., Mannivannan, A. and Narendhirakannan, R. T., “Screening and Cellulase Producing Microorganism from Lake Area Containing Water Hyacinth for Enzymatic Hydrolysis of Cellulose”, *Journal of Advanced Scientific Research*, 5 (3), 23-30, (2014).
- [129] Ang, S. K., Shaza, E. M., Adibah, Y., Suraini, A. A. and Madihah, M. S., “Production of Cellulase and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 Using Untreated Oil Palm Thunk Through Solid State Fermentation”, *Process Biochemistry*, 48, 1293-1302, (2013).
- [130] Yang, S., Jiang, Z., Yan, Q. and Zhu, H., “Characterization of a Thermostable Extracellular  $\beta$ -glucosidase with Activities of Exoglucanase and Transglycosylation from *Paecilomyces thermophila*”, *J. Agric. Food Chem.*, 56, 602-608, (2008).
- [131] Bai, H., Wang, H., Sun, J., Irfan, M., Han, M., Huang, Y., Han, X. and Yang, Q., “Production, Purification and Characterization of Novel Beta Glucosidase from Newly Isolated *Penicillium simplicissimum* H-11 in Submerged Fermentation”, *EXCLI Journal*, 12, 528-540, (2013).
- [132] Ahmed, S., Bashir, A., Saleem, H., Saadia, M. and Jamil, A., “Production and Purification of Cellulose- Degrading Enzymes from Filamentous Fungus *Trichoderma harzianum*”, *Pak. J. Bot.*, 41 (3), 1411-1419, (2009).
- [133] Isaac, G. S. and Abu-Tohan, M. A., “Enhanced Alkaline Cellulase Production by the Thermohalophilic *Aspergillus terreus* AUMC 10138 Mutated by Physical

- and Chemical Mutagens Using Corn Stover as Substrate”, *Brazilian Journal of Microbiology*, 46 (4), 1269-1277, (2015).
- [134] Omojasola, P. and Jilani, O. P., “Cellulase Production by *Trichoderma longi*, *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* Cultured on Plantain Peel”, *Research Journal of Microbiology*, 4 (2), 67-74, (2009).
- [135] Irshad, M., Anwar, Z., Ramzan, M., Mahmood, Z. and Nawaz, H., “Characterization of Purified  $\beta$ -glucosidase Produced from *Trichoderma viride* Through Bio-Processing of Orange Peel Waste”, *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 4, 941-944, (2013).
- [136] Odoux, E., Chauwin, A. and Brillouet, J.-M., “Purification and Characterization of Vanilla Bean (*Vanilla planifolia* Andrews)  $\beta$ -D-glucosidase”, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 3168-3173, (2003).
- [137] Liu, A., Zhang, R., Yang, X., Zhang, Z., Song, S., Miao, Y. and Shen, Q., “Characterization of a Thermostable  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, and Its Functional Expression in *Pichia pastoris* X33”, *Microbial Cell Factories*, 11 (25), 1-15, (2012).
- [138] Yan, T.-R. and Lin, C.-L., “Purification Characterization of a Glucose-tolerant  $\beta$ -Glucosidase from *Aspergillus niger* CCRC 31494”, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61(6), 965-970, (1997).
- [139] Xie, Y., Gao, Y. and Chan, Z., “Purification and Characterization of an Extracellular  $\beta$ -Glucosidase with High Transglucosylation Activity and Stability from *Aspergillus niger* No.5.1”, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 193(3) 229-240 (2004).
- [140] Mallerman, J., Papinutti, L. and Levin, L., “Characterization of  $\beta$ -Glucosidase Produced by the White Rot Fungus *Flammulina velutipes*”, *J. Microbiol. Biotechnol.* 25(1), 57-65, (2015).
- [141] Silva, V. C. T., Coto, A. L. S., Souza, R. C., Neves, M. B. S., Gomes, E. and Bonnilla-Rodriguez, G.O. B., “Effect of Temperature, and Chemical on the Endoglucanase and  $\beta$ -glucosidase from the Thermophilic Fungus

- Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4. Obtained by Solid-State and Submerged Cultivation”, *Biochemistry Research International*, 2016, 1-6, (2016).
- [142] Yang, X., Ma, R., Shi, P., Huang, H., Bai, Y., Wang, Y., Yang, P., Fan, Y. and Yao, B., “Molecular Characterization of a Highly-Active Thermophilic  $\beta$ -Glucosidase from *Neosartoya fischeri* P1 and Its Application in the Hydrolysis of Soybean Isoflavone Glycosides”, *Open Access Freely Available Online*, 9 (9), 1-9, (2014).
- [143] Ortega, N., Diego, S., Perez-Mateos, M. and Busto, M.D., “Kinetic Properties and Thermal Behaviour of Polygalacturonase Used in Fruit Juice Clarification”, *Food Chemistry*, 88, 209-217, (2004).
- [144] Harhangi, H.R., Steenbakkens, P. J. M., Akhmanova, A., Jetten M. S. M., Drift C. and Camp, H. J. M. O., “A Highly Expressed Family 1  $\beta$ -glucosidase with Transglycosylation Capacity from the Anaerobic Fungus *Piromyces* sp.E2”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1574, 293-303, (2002).
- [145] Lee, H.-L., Chang, C.-K., Jeng W.-Y., Wang, A. H.-J. and Liang, P.-H., “Mutations in the Substrate Entrance Region of  $\beta$ -glucosidase from *Trichoderma reesei* Improve Enzyme Activity and Thermostability”, *Protein Engineering, Design & Selection*, 25(11), 733-740, (2012).
- [146] Yun, S.-I., Jeong, C.-S., Chung, D.-K. and Choi, H.-S., “Purification and Some Properties of a  $\beta$ -glucosidase from *Trichoderma harzianum* Type C-4”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65(9), 2028-2032, (2001).
- [147] Parry, N. J., Beever, D. E., Owen, E., Vandenberghe, I., Van Beeumen, J. and Bhat, M. K., “Biochemical Characterization and Mechanism of Action of a Thermostable  $\beta$ -glucosidase Purified from *Thermoascus aurantiacus*”, *Biochem. J.*, 353, 117-127, (2001).
- [148] Pitson, S. M., Seviour, R. J. and McDougall, B., “Purification and Characterization of an Extracellular  $\beta$ -glucosidase from the Filamentous Fungus *Acremonium persicinum* and Its Probable Role in  $\beta$ -glucan Degradation”, *Enzyme and Microbial Technology*, 21, 182-190, (1997).

