

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



**KATI SUBSTRAT FERMENTASYONU İLE
TRICHODERMA HARZIANUM DA SELÜLAZ ÜRETİMİ,
SAFLAŞTIRILMASI VE BİYOKİMYASAL
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YAPRAK ALPINAR

BALIKESİR, HAZİRAN - 2017

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



**KATI SUBSTRAT FERMENTASYONU İLE
TRICHODERMA HARZIANUM DA SELÜLAZ ÜRETİMİ,
SAFLAŞTIRILMASI VE BİYOKİMYASAL
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LISANS TEZİ

YAPRAK ALPINAR

Jüri Üyeleri : Yrd.Doç.Dr. Selma ÇELEN YÜCETÜRK

(Tez Danışmanı)

Prof. Dr. Ayşe Dilek AZAZ

Yrd. Doç. Dr. Fevzi UÇKAN

BALIKESİR, HAZİRAN - 2017

KABUL VE ONAY SAYFASI

YAPRAK ALPINAR tarafından hazırlanan “KATI SUBSTRAT FERMENTASYONU İLE *TRICHODERMA HARZIANUM* DA SELÜLAZ ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI VE BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 22.06.2017 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
Yrd.Doç.Dr. Selma ÇELEN YÜCETÜRK


.....

Üye
Prof.Dr. Ayşe Dilek AZAZ


.....

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 2015/189 nolu proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

**KATI SUBSTRAT FERMENTASYONU İLE TRICHODERMA
HARZIANUM DA SELÜLAZ ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI VE
BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
YAPRAK ALPINAR
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

(TEZ DANIŞMANI: YRD.DOÇ.DR. SELMA ÇELEN YÜCETÜRK)

BALIKESİR, HAZİRAN - 2017

β -glukosidaz, çeşitli temel biyolojik süreçlerde önemli rol oynamaktadır. Bu çalışmada *Trichoderma harzianum* NRRL 13019' dan elde edilen β -glukosidaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi ve Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (Sephrose-4B-L-Tirozin-1-Naftilamin) ile saflaştırılmıştır.

β -glukosidaz enzimi, NaH_2PO_4 (pH 7), ile nemlendirilmiş öğütülmüş mısır koçanının substrat olarak kullanılması ile *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 suşundan elde edilmiştir. Katı hal fermentasyonu ile *T. harzianum* NRRL 13019' dan enzimin üretimi için optimum koşullar, 25 °C ve 7 gün olarak belirlenmiştir.

T. harzianum' dan elde edilen β -glukosidaz enzimi %18,02 verim ile 29,10 kat saflaştırılmıştır. β -glukosidaz enziminin SDS-PAGE/NATİVE-PAGE olmak üzere iki farklı elektroforez yöntemi ile saflığı ve alt birim varlığı/sayısı kontrol edilmiştir. Saflaştırılan enzim NATİVE ve SDS-PAGE üzerinde tek bir bant olarak göç etmiştir. β -glukosidaz enziminin monomerik yapıda ve 110 kDa ağırlığında olduğu belirlenmiştir. β -glukosidaz enzim aktivitesinin belirlenmesinde ise *p*-nitrofenil- β -D-glukopiranosit (*p*NPG) substratı kullanılmıştır. β -glukosidaz enziminin yüksek aktivite gösterdiği optimum pH değeri ve optimum sıcaklık değeri sırasıyla pH4 ve 65°C olarak tespit edilmiştir.

β -glukosidaz enziminin K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,334 mM ve 3333,334 EU olarak belirlenmiştir.

Lineweaver-Burk grafiğinden yararlanılarak, δ -glukonolakton ve D(+)-glukozun, β -glukosidaz enzimi üzerine, *p*NPG substratı varlığında, sırasıyla yarışmalı ve yarışmasız tipte inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. β -glukosidaz enziminin D(+)-glukoz ile IC_{50} ve K_i değerleri 4,95 mM ve $2,6 \times 10^{-3} \pm 1,42 \times 10^{-3}$ olarak; δ -glukonolakton inhibitörü ile 8,64 mM ve $3,9 \times 10^{-7} \pm 2,0 \times 10^{-8}$ olarak hesaplanmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: *Trichoderma harzianum*, β -glukosidaz, Katı Hal Fermantasyonu, Optimizasyon, Saflaştırma, Biyokimyasal ve Kinetik Özellikler

ABSTRACT

CELLULASE PRODUCTION FROM TRICHODERMA HARZIANUM BY THE SOLID STATE FERMENTATION PURIFICATION AND DETERMINATION OF BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS

MSC THESIS

YAPRAK ALPINAR

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: ASSIST. PROF. DR. SELMA ÇELEN YÜCETÜRK)

BALIKESİR, JUNE 2017

The β -glucosidase has been the focus of much research recently because of their important roles in a variety of fundamental biological processes β -glucosidase enzyme was purified ammonium sulfate precipitation and sepharose-4B-L-tyrosine-1-naphthylamine hydrophobic interaction chromatography from *Trichoderma harzianum* NRRL 13019.

The β -glucosidase was obtained from the strain of *T. harzianum* NRRL 13019 by using moistening with NaH_2PO_4 (pH 7.0), ground corn cob as medium. The optimum conditions for the production of the enzyme from *T. harzianum* NRRL 13019 by solid state fermentation were determined to be 25 °C and seven days.

The β -glucosidase enzyme obtained from *T. harzianum* was purified with 29.10 fold, a yield of 18.02%. The number of subunits and purification has been checked with two different electrophoresis methods to be SDS-PAGE/NATIVE-PAGE of β -glucosidase enzyme. The purified enzyme was migrated as a single band on NATIVE and SDS-PAGE. The enzyme was determined a monomeric structure of 110 kDa weight. Activity of β -glucosidase enzyme was determined by using *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (*p*NPG) substrate. The optimum pH value and optimum temperature which β -glucosidase has the highest activity was pH 4,0 and 65°C respectively.

The K_m and V_{max} values of β -glucosidase enzyme were determined as 0.334 mM and 3333.334 EU, respectively. Inhibition types of δ -gluconolactone and D(+)glucose were determined noncompetively and comeatively type on the β -glucosidase enzyme, respectively in the presence of *p*-nitrophenyl substrate by using Lineweaver-Burk Graphics.

The IC_{50} and K_i values of δ -gluconalactone were determined as 8.64 mM and $3.9 \times 10^{-7} \pm 2.0 \times 10^{-8}$ where as for the D(+)glucose 4.95 mM and $2.6 \times 10^{-3} \pm 1.42 \times 10^{-3}$, respectively.

KEYWORDS: *Trichoderma harzianum*, β -glycosidase, Solid State Fermentation, Optimization, Purification, Biochemical and Kinetic Properties

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ	vii
SEMBOL LİSTESİ	ix
ÖNSÖZ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Enzimlerin İsimlendirilmesi ve Sınıflandırılması	2
1.2 Enzimlerin Sınıflandırılması ve Numaralandırılması.....	3
1.2.1 Oksidoredüktazlar :	3
1.2.2 Transferazlar :	4
1.2.3 Hidrolazlar :	4
1.2.4 Liyazlar :	4
1.2.5 İzomerazlar :	5
1.2.6 Ligazlar :	5
1.3 Selülozun Yapısı ve Özellikleri.....	5
1.4 Selülaz Enziminin Yapısı ve Özellikleri	7
1.5 β -glukosidazlar	11
1.6 Katı Substrat Fermentasyon Tekniği (KSF)	12
1.7 <i>Trichoderma</i> Cinsi Genel Özellikleri	14
1.8 Saflaştırma ve Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi Tekniği	15
2. MATERYAL VE METOD	18
2.1 Materyal.....	18
2.1.1 Katı Besiyerinde Geliştirilen Mikrofungusun β -glukosidaz Aktivitesinin Belirlenmesi	18
2.1.1.1 <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai 1969	18
2.1.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Tamponlar ve Çözeltiler	19
2.1.2.1 Mikrofungusun Geliştirilmesinde Kullanılan Besiyerleri	19
2.1.2.2 Katı Besiyerinde Geliştirilen Mikrofungusun Hidroliz Zon Büyüklüğünün Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	20
2.1.2.3 Mikrofungus Spor Süspansiyonu Hazırlanmasında Kullanılan Çözelti.....	21
2.1.2.4 Katı Substrat Fermentasyonu (KSF) Kültür Ortamının Nemlendirme Sıvısının Belirlenmesinde Kullanılan Tampon Çözeltiler	21
2.1.2.5 β -glukosidaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesinde Kullanılan Tampon ve Substrat Çözeltiler	22
2.1.2.6 Lowry Metodu ile Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	23
2.1.2.7 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HIC) Tekniğinde Kullanılan Çözeltiler	24

2.1.2.8	SDS-PAGE Elektrofrezinde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	25
2.1.2.9	NATİVE-PAGE Elektrofrezinde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	29
2.2	Metod.....	32
2.2.1	Katı Besiyerinde Geliştirilen Mikrofungusun β -glukosidaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	32
2.2.2	Mikrofungus Spor Süspansiyonu Hazırlanması	32
2.2.3	Mısır Koçanının Katı Substrat Fermentasyonu (KSF) Kültür Ortamı Olarak Hazırlanması	33
2.2.4	Katı Substrat Fermentasyonu (KSF) Kültür Ortamına İnokülasyon ve Kısmi Saflaştırılmış β -glukosidaz Enziminin Eldesi.....	33
2.2.5	Mikrofungustan β -glukosidaz Enzim Üretimine Katı Substrat Fermentasyon (KSF) Ortam Koşullarının Etkisi	34
2.2.5.1	Nemlendirme Sıvıları ve Optimum pH' nın Belirlenmesi	34
2.2.5.2	İnkübasyon Sıcaklığının Belirlenmesi	35
2.2.5.3	İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi	35
2.2.6	β -glukosidaz Enzim Aktivitesinin Tespit Edilmesi	35
2.2.7	β -glukosidaz Enzimi Protein Miktarının Belirlenmesi.....	36
2.2.7.1	Warburg Metodu ile Kalitatif Protein Tayini.....	36
2.2.7.2	Lowry Yöntemi ile Kantitatif Protein Tayini.....	37
2.2.7.3	BSA Standart Eğrisinin Belirlenmesi	38
2.2.8	β -glukosidaz Enziminin Saflaştırma Basamakları.....	39
2.2.8.1	Amonyum Sülfat Tuzu ile Çöktürme.....	39
2.2.8.2	β -glukosidaz Enziminin Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HIC) Kullanılarak Saflaştırılması	40
2.2.9	<i>T.harzianum</i> NRRL 13019' dan Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin NATİVE/SDS-PAGE Tekniği ile Saflığının ve Alt Birimlerinin Varlığının/Sayısının Kontrolü	42
2.2.9.1	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) ile β -glukosidaz Enziminin Saflığının Kontrolü.....	42
2.2.9.2	Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez (NATİVE-PAGE) ile β -glukosidaz Enziminin Saflığının Kontrolü.....	44
2.2.10	<i>T.harzianum</i> NRRL 13019' dan Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	45
2.2.10.1	Saf β -glukosidaz Enziminin Optimum pH Değerinin Belirlenmesi	45
2.2.10.2	Saf β -glukosidaz Enziminin Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi	46
2.2.10.3	Saf β -glukosidaz Enziminin Termal Kararlılığının Belirlenmesi	46
2.2.10.4	Saf β -glukosidaz Enziminin K_M ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi	47
2.2.10.5	Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi	47
2.2.10.6	Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin K_i Değerlerinin Belirlenmesi	48
3.	BULGULAR	49

3.1	Katı Besiyerinde Geliştirilen Mikrofungusun β -glukosidaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	49
3.2	Mikrofungustan β -glukosidaz Enzim Üretimine Katı Substrat Fermentasyon (KSF) Ortam Koşullarının Etkisi.....	49
3.2.1	Nemlendirme Sıvıları ve Optimum pH' nın Belirlenmesi	49
3.2.2	İnkübasyon Sıcaklığının Belirlenmesi.....	51
3.2.3	İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi	52
3.3	β -glukosidaz Enziminin Saflaştırma Basamakları	54
3.3.1	Amonyum Sülfat Tuzu ile Çöktürme	54
3.3.2	β -glukosidaz Enziminin Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HIC) Kullanılarak Saflaştırılması.....	56
3.4	<i>T.harzianum</i> NRRL 13019' dan Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin NATİVE/SDS-PAGE Tekniği ile Saflığının ve Alt Birimlerinin Varlığının/Sayısının Kontrolü	59
3.5	<i>T.harzianum</i> NRRL 13019 β -glukosidaz Enziminin Biyokimyasal ve Kinetik Özelliklerinin Belirlenmesi	60
3.5.1	<i>T.harzianum</i> NRRL 13019 β -glukosidaz Enziminin Optimum pH Değerinin Belirlenmesi.....	61
3.5.2	<i>T.harzianum</i> NRRL 13019 β -glukosidaz Enziminin Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi	61
3.5.3	<i>T.harzianum</i> NRRL 13019 β -glukosidaz Enziminin Termal Kararlılığının Belirlenmesi	62
3.5.4	<i>T.harzianum</i> NRRL 13019' dan Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin K_M ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi	63
3.5.5	<i>T.harzianum</i> NRRL 13019' dan Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin Genel İnhibitörlerinin IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi.....	65
3.5.5.1	<i>T.harzianum</i> NRRL 13019' dan Saflaştırılan β -glukosidazın İnhibitörü Olan δ -Glukonolaktonun IC_{50} Değerinin Belirlenmesi.....	66
3.5.5.2	<i>T.harzianum</i> NRRL 13019' dan Saflaştırılan β -glukosidazın İnhibitörü Olan D(+)Glukozun IC_{50} Değerinin Belirlenmesi	68
3.5.6	<i>T.harzianum</i> NRRL 13019' dan Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin Genel İnhibitörlerinin İnhibisyon Tipinin ve K_i Değerinin Belirlenmesi.....	70
3.5.6.1	<i>T.harzianum</i> NRRL 13019 İçin β -glukosidazların Genel İnhibitörü Olan δ -glukonolaktonun İnhibisyon Tipinin ve K_i Değerinin Belirlenmesi.....	71
3.5.6.2	<i>T.harzianum</i> NRRL 13019 İçin β -glukosidazların Genel İnhibitörü Olan D(+)Glukozun İnhibisyon Tipinin ve K_i Değerinin Belirlenmesi.....	76
4.	TARTIŞMA SONUÇ	80
5.	KAYNAKLAR.....	94

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 Selülozun yapısı.....	6
Şekil 1.2 Selülozun enzimatik olarak parçalanması	7
Şekil 2.1 (a) <i>T.harzianum</i> NRRL 13019 petri (10x5); (b) <i>T.harzianum</i> NRRL 13019 preparat (10x40)	19
Şekil 2.2 Lowry yöntemi ile protein miktarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik.....	39
Şekil 3.1 KSF kültür ortamında farklı pH' lardaki nemlendirme sıvılarının <i>T.harzianum</i> NRRL 13019 β -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisini gösteren grafik	51
Şekil 3.2 KSF kültür ortamında farklı inkübasyon sıcaklıklarının <i>T.harzianum</i> NRRL 13019 β -glukosidaz enzim aktivitesine etki grafiği.....	52
Şekil 3.3 KSF kültür ortamında farklı inkübasyon sürelerinin <i>T.harzianum</i> NRRL 13019 β -glukosidaz enzim aktivitesine etki grafiği.....	54
Şekil 3.4 <i>T.harzianum</i> NRRL 13019 amonyum sülfat çöktürme aralığını gösteren grafik.....	56
Şekil 3.5 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi kolonunda <i>T.harzianum</i> NRRL 13019 β -glukosidaz enziminin elüsyon grafiği	57
Şekil 3.6 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile <i>T.harzianum</i> NRRL 13019' dan elde edilen β -glukosidaz enziminin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüleri (a) SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi, (b) Native-Poliakrilamid Jel Elektroforezi	60
Şekil 3.7 Saflaştırılan β -glukosidaz enziminin optimum pH grafiği	61
Şekil 3.8 Saflaştırılan β -glukosidaz enziminin optimum sıcaklık grafiği.....	62
Şekil 3.9 Saflaştırılmış <i>T.harzianum</i> NRRL 13019 β -glukosidaz enzimi termal kararlılık grafiği	63
Şekil 3.10 <i>T.harzianum</i> NRRL 13019 β -glukosidaz enziminin K_M ve V_{max} değerlerinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği	65
Şekil 3.11 <i>T.harzianum</i> NRRL 13019' dan saflaştırılan β -glukosidaz enzimi inhibitörü δ -glukonolakton IC_{50} değeri grafiği.....	68
Şekil 3.12 <i>T.harzianum</i> NRRL 13019' dan saflaştırılan β -glukosidaz enziminin inhibitörü D(+)glukoz IC_{50} değeri grafiği	70
Şekil 3.13 <i>T.harzianum</i> NRRL 13019' dan saflaştırılan β -glukosidaz enzimine, pNPG substratı varlığında, δ -glukonolakton inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burg grafiği	75
Şekil 3.14 <i>T.harzianum</i> NRRL 13019' dan saflaştırılan β -glukosidaz enzimine, pNPG substratı varlığında, D(+)glukoz inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği	79

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.1 KSF kültür ortamında farklı pH' lardaki nemlendirme sıvılarının <i>T.harzianum</i> NRRL 13019 β -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	50
Tablo 3.2 KSF kültür ortamında farklı inkübasyon sıcaklıklarının <i>T.harzianum</i> NRRL 13019 β -glukosidaz enzim aktivitesine etkisi	52
Tablo 3.3 KSF kültür ortamında farklı inkübasyon sürelerinin <i>T.harzianum</i> NRRL 13019 β -glukosidaz enzim aktivitesine etkisi.....	53
Tablo 3.4 <i>T.harzianum</i> NRRL 13019 amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesinde kullanılan değerler	55
Tablo 3.5 <i>T.harzianum</i> NRRL 13019' dan elde edilen β -glukosidaz enzimi saflaştırma tablosu.....	58
Tablo 3.6 <i>T.harzianum</i> NRRL 13019' dan elde edilerek saflaştırılan β -glukosidaz enziminin K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri.....	64
Tablo 3.7 <i>T.harzianum</i> NRRL 13019 β -glukosidaz enziminin K_M (mM), V_{max} (EU) ve V_{max}/K_M değerleri.....	65
Tablo 3.8 <i>T.harzianum</i> NRRL 13019' dan elde edilerek saflaştırılan β -glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren δ -glukonolaktonun IC_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bu miktarlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları, substrat ve elde edilen sonuçlar	67
Tablo 3.9 <i>T.harzianum</i> NRRL 13019' dan elde edilerek saflaştırılan β -glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren D(+) β -glukozun IC_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bu miktarlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları, substrat ile elde edilen sonuçlar	69
Tablo 3.10 <i>T.harzianum</i> NRRL 13019' dan elde edilerek saflaştırılan β -glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren δ -glukonolaktonun K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bu miktarlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları, substrat ve elde edilen sonuçlar	72
Tablo 3.11 <i>T.harzianum</i> NRRL 13019' dan elde edilerek saflaştırılan β -glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren δ -glukonolaktonun K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bu miktarlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları, substrat ve elde edilen sonuçlar	73
Tablo 3.12 <i>T.harzianum</i> NRRL 13019' dan elde edilerek saflaştırılan β -glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren δ -glukonolaktonun K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bu miktarlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları, substrat ve elde edilen sonuçlar	74
Tablo 3.13 <i>T.harzianum</i> NRRL 13019' dan elde edilerek saflaştırılan β -glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren	

	D(+) <i>Glukozun</i> K_i değerinin bulunmasında kullanılan özeltelerin miktarları ve bu miktarlara karşılık gelen inhibitor konsantrasyonları, substrat ve elde edilen sonuçlar77
Tablo 3.14	<i>T.harzianum</i> NRRL 13019' dan elde edilerek saflaştırılan β -glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren D(+) <i>Glukozun</i> K_i değerinin bulunmasında kullanılan özeltelerin miktarları ve bu miktarlara karşılık gelen inhibitor konsantrasyonları, substrat ve elde edilen sonuçlar78

SEMBOL LİSTESİ

g	Gram
μg	Mikrogram (10^{-6} gram)
mM	Milimolar
μm	Mikrometre (10^{-6} metre)
μL	Mikrolitre (10^{-6} litre)
rpm	Rotary Per Minute
KSF	Katı Substrat Fermentasyonu
CMC	Karboksimetil Selüloz
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat Derece
<i>p</i> NPG	<i>p</i> -Nitrophenyl β -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

Lisansüstü çalışmalarım süresince güler yüzlü, sakin ve anlayışlı bir şekilde her zaman yanımda olan, bilgisini ve tecrübesini her an benimle paylaşan, olumsuzluğa kapıldığım zamanlarda bile beni motive eden Yrd.Doç.Dr.Selma ÇELEN YÜCETÜRK' e sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisansa adım attığım andan itibaren bilgi ve birikimlerini benden esirgemeyen, bana olan desteğini her anlamda hissettiren, çalışma disiplini kendime örnek aldığım ve bu süreçte yolumu aydınlatan çok değerli hocam Prof.Dr.Ayşe Dilek AZAZ' a en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Laboratuvarda deneysel çalışmalarım süresince her zaman yanımda olan, yardımlarını esirgemeyen eki arkadaşlarım Hüseyin Alper İRTEM ve Aslı TANGÜNÜ' ne teşekkür ederim.

Üniversite hayatım boyunca hep yanımda olan kıymetli dostum Deniz TAŞKIRAN' a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca elimi tutmaktan bir an bile vazgeçmeyen, sevgi ve desteklerini her zaman üzerimde hissettiğim, bana olan güvenlerini hiçbir zaman kaybetmeyen ve eğitim hayatım süresince bana her türlü olanağı sağlayan anneme ve babama teşekkürü bir borç bilirim.

1. GİRİŞ

Enzimler, en basit tanımı ile canlı hücrelerdeki kimyasal tepkimeleri katalizleyen, protein yapısındaki moleküllerdir ve hücre içerisindeki maddelerin değişimleri, biyosentezleri ve parçalanmaları enzimler ile sağlanmaktadır [1].

Enzimler ile ilgili yapılan araştırmalara bakıldığında çok eski tarihlere dayandığı görülmektedir. Bu araştırmalar 1700' lü yılların başlarında başlamış ve yapılan ilk çalışmada mide salgılarının etin sindirimi üzerine etkileri incelenmiştir. 1800' lü yıllarda yapılan enzim ile ilgili çalışmalar da ise bitki ekstraktı ve tükürük salgısı tarafından nişastanın şekere dönüşümü araştırılmıştır. 1850' li yıllara gelindiğinde ise Louis Pasteur'ün mayalar ile yaptığı çalışmalar sonucunda "fermente" kelimesini kullanmasının ardından, 1897' li yıllarda Eduard Butcher, bu fermentasyon işleminin hücre dışında da meydana geldiğini ifade ederek, bu işlemin özelleşmiş moleküller tarafından gerçekleştirildiğini belirtmiştir. Yapılan bu araştırmalar sonucunda Frederic W. Kühne, bu özelleşmiş molekülleri "enzim" olarak tanımlamıştır. Tüm bu gelişmeler ışığında enzimler ile ilgili yapılan çalışmaların sayısı giderek artış göstermiş ve bu konudaki bilimsel gelişmelerin önü açılmıştır [2, 3].

Bilimsel alanda enzimlerle ilgili araştırmaların artmasına paralel olarak sanayi alanında da enzimler çok sayıda yeni uygulama alanında kullanılmaya başlanmıştır. On dokuzuncu yüzyılın ikinci yarısında keşfedilen enzimler, o zamandan beri birçok endüstriyel alanda yaygın olarak kullanılmaktadırlar [4]. Günümüzde ise özellikle gıda , yem, tarım, kağıt, deri ve tekstil sanayinde kullanılan enzimler önemli bir yere sahiptir [5]. Enzimler, reaksiyonları hızlandırdığı, yalnızca belirli substratlarda hareket ettiği, zayıf koşullar altında çalışabildiği, kontrol edilmesi kolay ve güvenli olduğu, sert kimyasalların yerini alabildiği ve biyolojik olarak parçalanabildiği için tekstil endüstrisinde tercih edilmektedirler [4, 5]. Yenilenebilir ham maddeler üzerinde çalışan enzimler meyve, süt, pamuk, deri ve ahşap gibi çeşitli endüstrilerde enzimatik dönüşüm için kullanılmaktadırlar.

Selülazlar, pektinazlar, hemiselülazlar, lipazlar ve katalazlar farklı pamuk ön işleme ve bitirme, ksilanazlar da kumaşı yumuşatma işlemlerinde kullanılmaktadırlar [4]. Ayrıca enzimler hayvan yemi endüstrisinde de yaygın bir şekilde kendine yer bulmuş olup, genel olarak yemlerin sindirilebilirliğini artırmak ve metabolik enerji değerlerini yükseltmek amacıyla kullanılmaktadırlar [6].

Ticari enzim kaynağı olarak hayvansal, bitkisel ve mikrobiyal kaynaklardan elde edilen enzimler tercih edilmektedir [4]. 1966'da Reed, yaptığı çalışma ile mikrobiyal laktazların sütü pıhtılaştırarak peynirin üretiminde kullanılabileceğini ve ayrıca meyve sularının berraklaştırılmasında da yine mikrobiyal enzimlerden faydalanabileceğini göstermiştir [7].

Mikrobiyal kaynaklı enzimlerin dünya genelindeki yıllık kullanım oranlarına bakıldığında, % 25 alkalın proteazlar, % 21 diğer proteazlar, % 18 amilazlar, % 10 renninler, % 3 tripsin, % 3 lipazlar, % 10 diğer karbonhidrat parçalayıcı enzimler, % 10 analitik ve farmasötik enzimler şeklinde dağılım gösterdiği tespit edilmiştir [8].

1.1 Enzimlerin İsimlendirilmesi ve Sınıflandırılması

Enzimler substratları için yüksek derecede spesifik olmakla birlikte, yalnızca tek tür kimyasal tepkimeyi katalizlerler. 1950'lerin sonlarına doğru bilinen enzimlerin sayılarının artması, aynı enzime çoğunlukla farklı isimlerin verilmesi ve bu isimlerin enzimin katalizlediği reaksiyon hakkında hiçbir bilgi içermiyor olması enzimler arasında karışıklığa sebep olmuştur. Bu karışık durumu düzeltmek için, 1956 yılında Uluslararası Biyokimya Birliğinin (IUB) gözetiminde enzimler için uluslararası bir komisyon kurulmuş ve 1961 yılında yayınlanan ilk rapor ile enzim isimlendirmesinin temeli oluşturulmuştur [9].

Enzimlerin isimlendirilmesi ve sınıflandırılmasında kabul görmüş sistem üç genel prensibi içermektedir. Birinci prensibe göre enzimler, -az (-ase) son eki ile sonlandırılarak isimlendirilirken; ikinci genel prensipte, katalizledikleri reaksiyonlara göre isimlendirilir ve sınıflandırılırlar ayrıca bu isimlendirme kimyasal reaksiyondaki değişikliği de kapsar. Üçüncü genel prensipte ise enzimler, katalizlenen reaksiyonların tipine göre isimlendirilir ve sınıflandırılırlar. Bu son prensip Enzim

Komisyonu (E.C.) tarafından belirlenen kod numaralarının kullanılmasıyla, enzimlerin açık bir şekilde tanımlanmalarına olanak sağlar [9].

Bir enzimin genellikle iki ismi vardır. Biri sistematik olan diğeri de tavsiye edilen ve genellikle mevcut kullanımdaki kısa ve daha kolay olan ismidir. Sistematik isim ve E.C. kod numaraları ile isimlendirme sayesinde enzimlerin belirsizliği ortadan kalkmıştır [9].

1.2 Enzimlerin Sınıflandırılması ve Numaralandırılması

Enzim Komisyonunun (E.C.) 1961 yılındaki ilk raporuna göre, enzimler katalize edilmiş reaksiyon tipine göre altı ana sınıfa ayrılırlar. Bu sınıflar E.C. tarafından nokta ile dört ögeye ayrılmış öneki içeren kod numaralarına ve aşağıdaki anlamlara göre belirlenir;

- I. Birinci rakam enzimin hangi sınıfa ait olduğunu gösterir,
- II. İkinci rakam enzimin alt sınıfını gösterir,
- III. Üçüncü rakam enzimin iki alt sınıfını (sub-subclass) gösterir ve
- IV. Dördüncü rakam ise sub-subclass enziminin seri numarasını gösterir [9, 10].

Örneğin; β -glukosidaz enzimi E.C. 3.2.1.21, Tripsin enzimi ise E.C. 3.4.21.4 şeklinde isimlendirilirler.

Bu altı ana sınıf aşağıda belirtilen şekilde birbirlerinden ayırt edilirler :

1.2.1 Oksidoredüktazlar

Oksidoredüktazlar, redoks reaksiyonları ile katalizlenmiş tüm enzimleri kapsar. Genellikle kullanılan ismi dehidrogenaz olup redüktaz olarak da kullanılabilirler. Oksidaz ise sadece O_2 ' nin azaltılması gereken durumlarda kullanılır. Sistematik adı vericiye göre: alıcı oksidoredüktaz olarak oluşturulmuştur.

Enzim komisyonunun isimlendirme kurallarına göre Laktat dehidrojenazlar E.C. 1.1.1.27 ve Glutasyon redüktazlar E.C. 1.6.4.2 olarak isimlendirilirler.

1.2.2 Transferazlar

Transferazlar glikozil, fosfat, metil, açıl, veya amino gibi özgül olan bir grubun, bir maddeden diğer bir maddeye transfer olmasını katalize ederler. Genellikle kullanılan ismi “alıcı transferaz grubu” veya “verici transferaz” dır. Sistematik adı vericiye göre: alıcı grup transferaz olarak oluşturulmuştur.

Enzim komisyonuna görede örneğin Hekzokinazlar E.C. 2.7.1.1 ve Aspartat transaminazlar E.C. 2.6.1.1 olarak isimlendirilirler.

1.2.3 Hidrolazlar

Hidrolazlar C-C, C-O, C-N ve başka bağların hidrolitik olarak ayrılmasını katalize ederler. İsimlendirilmelerinde genellikle substratın basit ismi ile –ase son ekinin ismi birlikte kullanılır. Sistematik ismi her zaman hidrolazdır.

Hidrolazlar grubundan α -amilazlar, enzim komisyonu isimlendirme kurallarına uygun olarak E.C. 3.2.2.1 şeklinde isimlendirilirler.

1.2.4 Liyazlar

Liyazlar C-C, C-O, C-N ve başka bağların eliminasyonu tarafından ayrılmasını katalize ederler. Liyazların isimlendirilmesi, dekarboksilaz, aldolaz ve dehidrataz (sırasıyla CO₂, aldehit ve suyun eliminasyonu) şeklindedir. Sistematik ismi ise substrata göre grup-liyaz olarak oluşturulmuştur.

Örneğin; Arjininosüksinat liyazlar EC 4.3.2.1 ve Sitrat sentazlar E.C. 4.1.3.7 olarak isimlendirilirler.

1.2.5 İzomerazlar

İzomerazlar bir molekül içerisindeki geometrik yada yapısal düzenlemeleri katalize ederler. Bu enzimin farklı isimleri, rasemöz, epimeraz, izomeraz, tatomeraz, mutaz yada sikloizomerazdır.

Örneğin Triozfosfat izomerazlar enzim komisyonu'na göre E.C. 5.3.1.1 olarak isimlendirilirler.

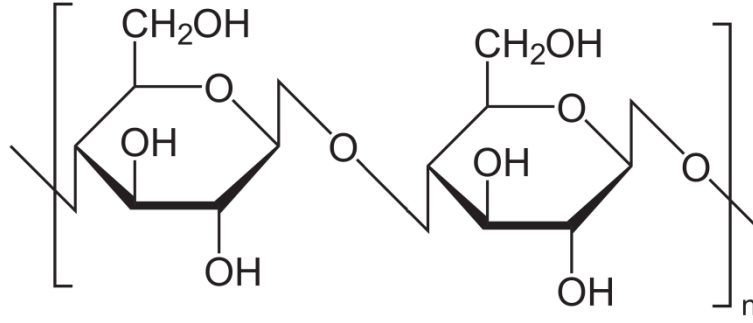
1.2.6 Ligazlar

Ligazlar enerji olarak zengin bir bağın hidrolizi ile iki molekülün birbirine bağlanmasını hidrolize ederler. ATP' nin pirofosfat bağı yada başka nükleozid trifosfat hidrolizi ile birleşirler [9, 10, 11].

Enzim komisyonuna göre isimlendirilmelerinde ligazlardan, DNA ligazlar E.C. 6.5.1.1 olarak isimlendirilirler [12].

1.3 Selülozun Yapısı ve Özellikleri

Selüloz, glukoz moleküllerinin β -1,4 glikozit bağları ile bağlanmasıyla oluşan, polimer yapılı bir polisakkarittir [13], olup biyosferde en bol bulunan yenilenebilir hammaddedir. Bitkiler her yıl yaklaşık olarak $4,0 \times 10^7$ ton selüloz sentezlemekte olup, bitki dokularındaki ortalama selüloz oranı % 20 ile 45 arasında değişirken, pamuk lifinde ise bu oran neredeyse % 90'dır [14].



Şekil 1.1 Selülozun yapısı

Son on yılda farklı bilimler ve sanayi endüstrisi arasındaki bilgi alışverişi sayesinde selülozların birçok teknolojik alanda kullanımı popüler hale gelmiş ve günümüzde selülozik materyallerin hidrolizi için yapılan biyoteknolojik çalışmaları arttırmıştır [15, 16]. Yenilenemeyen enerji kaynaklarının sayılarının azalmış olması selülozu enerji, yakıt ve gıda için temel ham materyal haline dönüştürmüştür [16]. Yapılan araştırmalarda selülozun etanol üretiminde kullanılabilir bir hammadde olabileceği bildirilmiştir. Bazı araştırmalar sonucunda şeker bileşenlerine hidrolize olan selülozun, fermantasyon teknolojileri sayesinde etanole dönüştürülebildiği saptanmıştır [17, 18].

Bu metodu kullanan Castro ve ark., (2016) çalışmalarında pirinç samanındaki selülozun hidrolizlenmesi sonucu elde edilen pentoz ve heksoz şekerlerinden etanol üretimini sağlamışlardır [19].

Selülozun diğer endüstri alanlarında da kullanılabilirliği yapılan araştırmalar ile rapor edilmiştir.

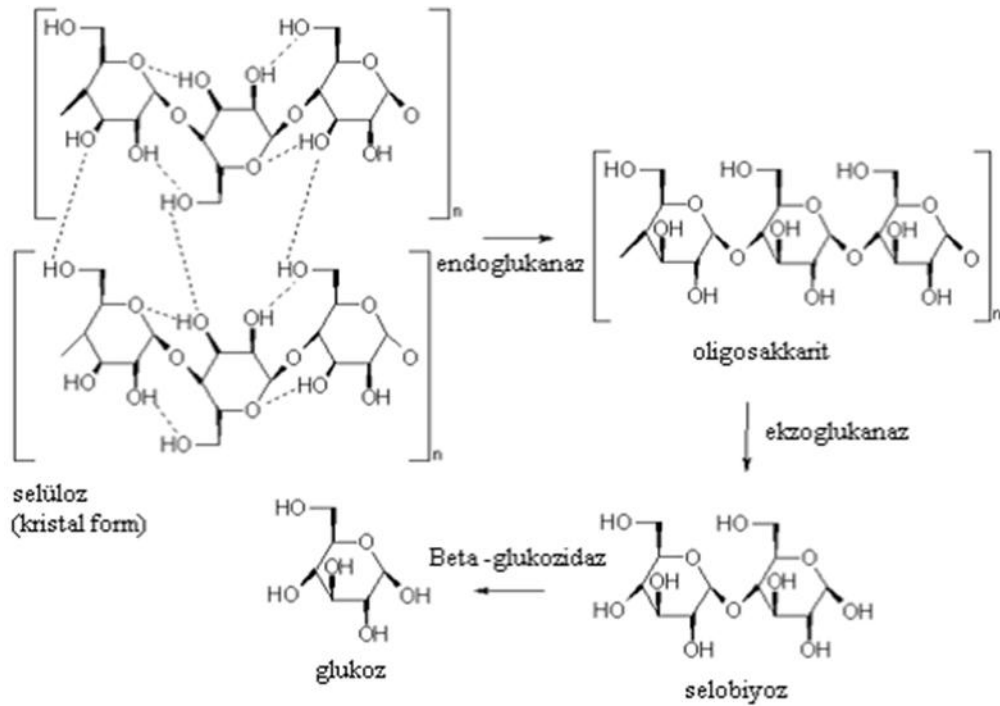
Bajpai (1999), yaptığı çalışma ile kağıt endüstrisinde; kağıdın ağartılması işleminde selülozun yüksek oranda bulunmasının enzimatik hidroliz açısından önemli bir yere sahip olduğunu rapor etmiştir [20].

Costa ve ark., (2013) araştırmalarında selülozik bir substrat olan şeker kamışı samanının, elyaf liflerine etkilerini incelemişler ve yapılan testler sonucunda elde edilen liflerin tekstil piyasasında bulunan liyosel lifler ile uyumlu olmasından dolayı tıbbi uygulamalarda kullanılan tekstil materyalleri açısından oldukça avantajlı olduğunu belirtmişlerdir [21].

Bakteriyel selüloz, bitkisel selüloza göre daha saf olması, üretim esnasında oluşabilecek değişimlere uyum sağlaması gibi özelliklerinden dolayı gıda endüstrisinde çeşitli şekerlemelerin üretiminde, dondurma ve salata soslarının bileşiminde, düşük kaloriye sahip tatlıların üretiminde kendisine geniş ölçüde yer bulmuştur [22].

1.4 Selüloz Enziminin Yapısı ve Özellikleri

Selülozik substratların hidrolizinden sorumlu olan enzim grubu selülozlar olarak isimlendirilir ve selüloz üç farklı enzimin koordine bir şekilde çalışması ile glukoz monomerine kadar hidrolize olur [23]. Bu selülozik enzimler Endoglukanazlar (EC 3.2.1.4), Ekzoglukanazlar (EC 3.2.1.91) ve β -glukosidazlar (EC 3.2.1.21)' dir. Endoglukanazlar; selüloz molekülünün rastgele bir biçimde hidrolizinden sorumludur, Ekzoglukanazlar; selüloz molekülünü sıralı bir biçimde hidrolizleyerek sellobiyoz ve glukoz moleküllerini oluşturur ve β -glukosidazlar ise sellobiyozu iki molekül glukoz verecek şekilde hidrolizleyerek selülozun hidrolizini tamamlarlar [23].



Şekil 1.2 Selülozun enzimatik olarak parçalanması

Selülazlar, çoğunlukla fungus ve bakterilerden elde edilmekte olup birçok biyoteknolojik alanda aktif olarak kullanılmaktadırlar [24].

Pettipher ve ark., (1978) gram pozitif anaerobik bir bakteri olan *Ruminococcus flavefaciens*'in bitki hücre duvarını parçalayabilen selülaz enzimi ürettiğini yaptıkları çalışma ile rapor etmişlerdir [25].

Koike ve Kobayashi (2001) bakteri türlerinin selülozik özellikleri ile ilgili araştırmalarında *Fibribacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* ve *Ruminococcus albus*' un selülaz enzimine sahip bakteriler olduğunu belirlemişlerdir [26].

Dias ve ark., (2014) şeker ve alkol endüstrisi tarafından kullanılan tropikal toprak üzerindeki incelemelerinde, şeker kamışı ekili olan topraktan izole ettikleri *Bacillus sp*' nin selülaz enzimi üreticisi olduğunu tespit etmişlerdir [27].

Sethi ve ark., (2013) topraktan izole ettikleri *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, ve *Serratia marcescens*' in selülaz üretebilen bakteriler olduklarını ve bunlar arasında *Pseudomonas fluorescens*' in en iyi selülaz üretici bakteri olduğunu rapor etmişlerdir [28].

Valaskova ve ark., (2007) *Basidiomycetes* türleri üzerinde yaptıkları araştırma sonucunda bu fungusların endoglukanaz, ekzoglukanaz ve β -glukosidaz aktivitesine sahip olduğunu rapor etmişlerdir [29].

Zheng ve ark., (2017) araştırmalarında yılda 685 milyon ton kullanılabilirliği ile dünya çapında önemli bir lignoselülozik kalıntı olan pirinç samanının, ticari olarak yüksek üretim kapasitesine sahip *Trichoderma reesei* tarafından üretilen selülaz üzerine etkilerini incelemişlerdir [30].

Libardi ve ark., (2017) evsel atık suyun substrat olarak kullanılmasıyla *Trichoderma harzianum*' dan selülaz elde etmişler ve bu çalışmalarında atık suyun yeniden kullanılması için sürdürülebilir bir sürecin geliştirilmesine katkıda bulunmuşlardır [31].

Ayrıca Gupta ve ark., (2015) yaptıkları çalışma ile *Trichoderma*, *Humicola*, *Penicillium* ve *Aspergillus* türlerinin, Narasimha ve ark., (2006) çalışmalarında

Aspergillus niger' in selülaz aktivitesine sahip funguslar olduğunu tespit etmişlerdir [32, 33].

Selülazlar, hem funguslar hem de bakteriler gibi birçok mikroorganizma türü tarafından sentezlenebildikleri için endüstriyel uygulamalarda sıkça tercih edilmektedirler. Bu mikroorganizmalar aerobik, anaerobik, mezofilik veya termofilik olabilir. *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermomonospora*, *Trichoderma* ve *Aspergillus* türleri üzerinde çok sayıda bilimsel araştırma yapılmış selülaz üretici mikroorganizmalardır [34].

Belirli bazı mikroorganizmalar tarafından üretilen selülazlar, endüstride ticari üretim açısından kullanılmakta olup [24], en çok *Trichoderma sp.* türleri tarafından üretilen selülaz enzimi tercih edilmektedir [35].

Ilmen ve ark., (1997) β -1,4 glikozidik bağlarını parçalayabilen selülaz enzimini fazla miktarda salgılamasından dolayı, *Trichoderma reesei*' nin selülaz üretimi açısından en yaygın kullanılan fungus türü olduğunu çalışmaları sonucunda tespit etmişlerdir [36].

Kovacs ve ark., (2008) *Trichoderma atroviride*' nin, yüksek oranda ekstrasellüler selülaz enzimini üretebilmelerinin yanı sıra β -glukosidaz enzimi de ürettiklerini yaptıkları incelemeler ile rapor etmişlerdir [37].

Liu ve Yang (2007) çalışmalarında *Trichoderma koningii*' nin, selülaz aktivitesine sahip bir fungus türü olduğunu belirtmişlerdir [38].

Delabona ve ark., (2012) yaptıkları çalışma ile amazon yağmur ormanlarından izole ettikleri *Trichoderma harzianum*' dan enzimatik aktivitesi yüksek selülazı üretmişlerdir [39].

Selülazlar ticari olarak 30 yılı aşkın bir süredir kullanılmaktadır. Enzim sisteminin karmaşıklığı ve endüstriyel alanlardaki kullanımlarının avantajlı olmasından dolayı selülazlar, hem akademik hem de endüstriyel araştırmalarda oldukça önemli bir kaynaktır. Karmaşık yapıları ve endüstriyel uygulamalardaki yaygın kullanımları ile biyokatalizörlerin odak noktası haline gelen mikrobiyal selülazlar, kağıt hamuru ve kağıt, tekstil, deterjan, çamaşır, kozmetik, ilaç, biyoyakıt

üretimi, gıda, yem sanayi, mayalanma ve tarım gibi endüstriyel alanlardaki çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadırlar [34, 40, 41].

Kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde selülozların kullanımı son 10 yılda önemli ölçüde artmıştır. Odunsu hammaddelerin inceltmesi ve öğütülmesi ile kağıt hamurunun mekanik olarak işlenmesinde, kağıt suyunun çıkarılmasında, elyaf üzerinden mürekkebin uzaklaştırılmasında, kağıt hamurunun olumsuz çevresel etkilerinin azaltılmasında, biyolojik olarak parçalanan kartonların, kağıt havlu ve yumuşak kağıtların imalatında selülozlar kullanılmaktadır [34, 20, 41].

Tekstil endüstrisinde ise selülozlar en başarılı şekilde kullanılan enzimlerdir. Pantolon ve diğer selülozik kumaşların biyolojik olarak cilalanması ve jean pantolonların kullanıma hazır hale getirilmesi selülozlar ile sağlanmakta olup, pamuklu kumaş üzerindeki etkileri, iplik yüzeyindeki küçük fibrilli uçları parçalamaları ve fazla boyayı seyreltmeleri selülozların tercih edilme sebeplerindedir. Ayrıca selülozlar, liflerin yumuşaklığını ve su emme özelliğini geliştirmelerinin yanında, liflerin herhangi bir kimyasal kaplamaya ihtiyaç duymadan kumaş görünüşünü, dokusunu ve rengini arttıran biyolojik parlatmada kullanılan en uygun enzim grubudurlar. Bunların dışında selülozlar kısa lifleri, yüzey bulanıklığını gidererek pürüzsüz ve parlak bir görünüm oluştururken, giysilerin yumuşatılmasına ve mikrofibril ağı içinde sıkışan kir partiküllerinin giderilmesine yardımcı olurlar [34, 41].

Fermentasyon süreçlerine bakıldığında selülozlar, bira ve şarap gibi alkollü içeceklerin üretilmesinde önemli rol oynamaktadırlar. Ayrıca bu enzimlerin fermentasyon ürünlerinin kalitesini ve verimini arttırdığı yapılan çalışmalar ile belirlenmiş olup selülozların gelecekte bira üretim süreçlerinin verimliliğini arttırması beklenmektedir [34, 42].

Gıda endüstrisinde ise selülozların geniş çapta potansiyel uygulamaları vardır. Yeşil çay, soya proteini, uçucu yağlar, aromatik ürünler ve tatlı patates nişastasından elde edilen bileşenlerin çıkarılmasında selülozlardan yararlanır. Ayrıca meyve ve sebze sularının üretimi, ekstraksiyonu ve berraklaştırılması esnasında bu enzimlerden geniş ölçüde faydalanılmakta ve narenciye meyvelerinin iyileştirilmesi ile meyve ve sebzelerin aromalarının arttırılmasında da selülozlar kullanılmaktadır [34, 40].

Hayvan yemlerinin besin değerlerinin arttırılmasında büyük ilgi gören selülozlar, yemlerin içerisindeki besleyici olmayan maddeleri, selülozu kolayca emebilen bileşene hidroliz ederek hayvan sağlığına olumlu yönde katkı sağlarlar [34, 43, 42].

Tarım endüstrisinde ise selülozlar, bitkilerin büyümesinde, bitkisel hastalıkların kontrol altına alınmasında, bitkilerden melez soyların üretilmesinde ve toprak kalitesinin iyileştirilmesinde kullanılmaktadırlar. Ayrıca *Trichoderma* sp., *Chaetomium* sp., *Penicillium* sp. ve *Geocladium* sp., gibi birçok selülozik fungus tohum çimlenmesi, hızlı bitki büyümesi, çiçek açma, kök sistemi ve artan mahsul verimini kolaylaştırarak tarıma önemli katkı sağlamıştır [34].

Deterjan endüstrisinde selülozlar, kumaşlardaki renk parlaklığının sağlanması ve pamuklu giysilerdeki kirin giderilmesinde kullanılmalarının yanı sıra, sıvı çamaşır deterjanlarının içeriğine katılarak lekelerin kolayca uzaklaştırılmasında da etkili olurlar [34, 41, 42].

1.5 β -glukosidazlar

Sistematik adı β -D-glukozid glukohidrolazlar (EC 3.2.1.21) olan, bitkiler, funguslar ve memelilerde bulunan β -glukosidaz enzimi [44], son yıllarda birçok araştırmanın konusu olmuş ve büyük ilgi görmüştür [45].

β -glukosidaz enzimi genel olarak substrat spesifikliği ve nükleotid dizilimlerinin farklı olması ile ayırt edilir [46]. Yapılan çalışmalar ile β -glukosidazların genellikle kullanılan substratının para-nitrofenil- β -D-glukopiranosit olduğu görülmektedir. Yapılan farklı çalışmalar ile *Monascus purpureus*, *Melocarpus* sp, *Periplaneta americana*, *Humicola* sp., *C. peltata*, *T. harzianum*, *Neurospora crassa*, *P. purpurogenum*, *Alternaria alternata*' dan elde edilen β -glukosidaz enziminin varlığı para-nitrofenil- β -D-glukopiranosit substrat ile belirlenmiştir [47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55].

Dünyada geniş ölçüde yayılıma sahip olan β -glukosidazlar, potansiyel olarak biyolojik ve biyoteknolojik süreçlerde büyük öneme sahiplerdir. β -glukosidaz enzimi, selülozik mikroorganizmalarda selüloz indüksiyonu ve selüloz hidrolizinde

[56, 57]; bitkilerde hücre duvarı gelişimi, pigment metabolizması, meyve olgunlaşması ve savunma mekanizmaları sırasında β -glukan sentezini etkilerken [58, 59], memelilerde ise glukosidik moleküllerin hidrolizini sağlamaktadır [60].

Mikroorganizmalardan β -glukosidaz enziminin üretiminde katı hal fermentasyonu ve sıvı hal fermentasyonu olmak üzere iki farklı yöntem kullanılmaktadır. Bu iki yöntemden Sıvı hal fermentasyonun da su miktarı ve pH'nın kontrolünün kolay olması, katı hal fermentasyonun da ise daha ucuz ve farklı substrat kaynaklarının kullanılabilir olması avantaj sağlamaktadır [23].

Katı hal fermentasyonu ile ipliksi fungusların doğal habitatlarına benzer koşullar elde edilebilir ve dolayısıyla enzim üretiminde daha yüksek verim alınır [61, 62]. Yapılan çalışmalar ile *Penicillium brasilianum*, *Aspergillus niger*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Penicillium decumbens*, *Paecilomyces* sp., *Trichoderma harzianum* ve *Fusarium oxysporum* gibi ipliksi funguslar ile genellikle *Candida* sp. türü mayalar ve birkaç bakteriden β -glukozidaz enziminin elde edilebildiği tespit edilmiştir [63, 64, 65, 66, 67, 68].

1.6 Katı Substrat Fermentasyon Tekniği (KSF)

Katı substrat fermentasyonu (KSF), katı substrat içeren ve serbest su akışının olmadığı bir ortamda mikroorganizmaların geliştirilmesini sağlayan bir tekniktir [69]. Serbest su akışının kullanıldığı fermentasyon teknikleri mikroorganizmaların gelişimini metabolik açıdan olumsuz yönde etkilediği için, genellikle KSF tekniğinin kullanımı tercih edilmektedir [70]. Bunun yanı sıra antik çağlardan beri kullanılan fermentasyon yöntemlerinin ilkeleri incelendiğinde, KSF yönteminde bu ilkelere dayandığı belirlenmiştir. Ortam koşullarının mikroorganizmaların geliştirilmesi ve metabolizmalarının desteklenmesi için yeterli oranda neme ve besin değerine sahip olması bu yöntemlerin ana prensipleridir [69].

KSF tekniğinde geliştirilecek olan mikroorganizma, kullanılan substrat ile sıkı bir temas halindedir ve bu ortam mikroorganizmaların doğal yaşam alanlarına çok benzer. Bu da mikroorganizmaların geliştirilmesi ve faydalı ürünlerin elde edilmesinde KSF tekniğinin tercih edilmesinin en önemli sebebidir [69].

KSF tekniği, düşük maliyetli tarımsal ürünleri kullanarak ekonomik açıdan avantaj sağlanmakta ve böylece çevre kirliliğine sebep olan atık ürün sorununu da ortadan kaldırılmış olmaktadır [69].

KSF tekniği çok eski tarihlerden beri tercih edilmiş bir teknik olup, bu teknik 5000 yıl önce funguslardan gıda üretmek için kullanılmıştır [70, 71, 72, 73]. *Aspergillus oryzae*'nin pirinci fermente etmesi ile koji üretimi, bilinen en eski fermentasyondur. Ayrıca *Penicillium roquefortii* kullanılarak peynir üretimi 4000 yıl öncesine ve soya sosunda kullanılması da 3000 yıl öncesine dayanmaktadır [74].

Günümüzde ise KSF tekniği yem, yakıt, gıda, endüstriyel kimyasallar ve eczacılık gibi alanlarda mikrobiyal ürünlerin üretimi için kullanılan potansiyel bir uygulamadır. Ayrıca biyokimyasal mühendislik ve biyoreaktörlerin tasarımında yararlanılan KSF tekniği, birçok tarımsal iyileştirme çalışmalarında geniş ölçüde kullanılan bir tekniktir [73].

Mikroorganizmalardan çeşitli primer ve sekonder metabolitler gibi ürünlerin üretilmesi, KSF tekniğinden yararlanarak sağlanmıştır [73]. Günümüzde pek çok araştırmacı KSF tekniği ile çeşitli tarımsal yan ürünlerden yararlanarak birçok enzimin üretimini sağlamışlardır. Germano ve ark., (2003) yaptıkları çalışma ile yağsız soya kekini KSF ortamında karbon ve nitrojen kaynağı olarak kullanarak, *Penicillium* sp. LPB-5' deki proteaz enziminin aktivitesini araştırmışlardır [75]. KSF ortamında Babassu yağıyla hazırlanan keki kullanan Gombert ve ark., (1999), *P. restrictum*' dan lipaz enziminin elde edilebileceğini belirtmişlerdir [76]. Hurma çekirdeğinin KSF ortamında kullanılması ile gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise *A. niger*' den ksilanaz enzimi üretimi sağlanmıştır [77]. Ucuz bir substrat olan yeşil gram kabuğunun KSF ortamında substrat olarak kullanıldığı bir başka çalışmada, *Bacillus* sp.' den alkalın proteaz elde edilebildiği tespit edilmiştir [78]. Bahrin ve ark., (2011) yaptıkları çalışma ile palmiye meyvesi ile oluşturdukları KSF ortamında, *Botryosphaeria* sp.' nin selülaz aktivitesine sahip olduğunu belirlemişlerdir [79]. Deschamps ve ark., (1985) buğday samanı ve buğday kepeğini karışım şeklinde kullanarak hazırladıkları KSF ortamında, *T. harzianum*' dan selülaz enzimini elde etmişlerdir [80].

1.7 *Trichoderma* Cinsi Genel Özellikleri

Trichoderma cinsini genel bir ifadeyle tanımlarsak; morfolojik olarak hızlı gelişen, pudransı ve yeşil kolonilere sahip iplikli bir fungustur [81]. Geniş bir yayılıma sahip olan *Trichoderma* türleri toprak mikroflorasının baskın bileşenleri olup [82], genellikle tarım ve bahçe toprakları dahil, humuslu orman topraklarında sıkça karşımıza çıkmaktadırlar [81]. *Trichoderma* 'nın morfolojik türlerini ayırt etmek için ilk sınıflandırma Rifai (1969) tarafından yapılmış [83, 82], ve *Trichoderma* ilk olarak 1794 yılında Almanya' da, Persoon tarafından bir genus olarak önerilmiştir [84].

Trichoderma türleri Dünya'nın her tarafına yayılmış olup, neredeyse tüm topraklar ve diğer doğal habitatlarda, özellikle organik madde oluşturan veya içeren topraklarda bulunmaktadır. Ayrıca *Trichoderma* türleri çeşitli bitkilerin kök yüzeylerinde, çürüyen kabuk üzerinde, özellikle de diğer funguslar tarafından hasar görmüş kısımlarda, sklerotlarda veya diğer fungusların üreme organlarının üzerinde bulunmaktadır [85].

Yeryüzünün hemen her yerine yayılmış olan *Trichoderma* türü funguslar birçok araştırmanın konusu olmuştur. Yapılan çalışmalarda *Trichoderma* türü fungusların kullanılması ile farklı enzimlerin üretildiği tespit edilmiştir. Kashmiri ve ark., (2006), lipaz enzimini; Gottschalk ve ark., (2010), β -glukosidaz enzimini; Liming ve Xueliang (2004), selülaz enzimini; Mohamed ve ark., (2011), α -amilaz enzimini; Silva ve ark., (2015), ksilanaz enzimini; Marco ve Felix (2002), proteaz enzimini *Trichoderma* türü funguslardan yararlanarak elde etmişlerdir [86, 87, 88, 89, 90, 91]. *Trichoderma* türlerinin, enzim üretiminin yanı sıra birçok farklı çalışmada da kullanıldığı görülmektedir. Elad ve ark., (1982), yaptıkları çalışmada bitki patojenlerinin parçalanması için; Yedidia ve ark., (2001), salatalık bitkilerinin büyümesi üzerine etkisinde; Wood ve McCRAE (1972), selülazların saflaştırılmasında; Chen ve ark., (2005), biyolojik kontrolde ve Bondkly (2006), yaptığı çalışma ile gen transferinde *Trichoderma* türü fungusları kullanmışlardır [92, 93, 94, 95, 96].

1.8 Saflaştırma ve Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi Tekniği

Kromatografi, bir karışımdaki bileşiklerin belirlenmesi ve tanımlanmasında kullanılan bir saflaştırma tekniğidir. Saflaştırma tekniğindeki genel amaç istenmeyen ürünlerin uzaklaştırılmasıdır [97]. Rus botanikçi Mikhail Tsvet, 1903 yılında kromatografi metodunu tanımlanış ve 1906 yılında da açıklamasını yaparak bilim tarihine yeni bir bakış açısı getirmiştir [98, 99].

Kromatografi, aynı molekül ağırlığına sahip olan karışımdaki bileşiklerin, birbirini takip ederek moleküllerinin ayrılmasını ifade eder. Kromatografik tekniklerin dışında farklı ayırma teknikleri de mevcuttur ancak bu teknikler daha genel ve zor şartlarda gerçekleştirildiği için genellikle kromatografik teknikler tercih edilmektedir [100].

Saflaştırılmak istenen materyal ve kullanılacak olan tekniğe göre zaman içerisinde farklı kromatografik yöntemler geliştirilmiştir. 1930' lu yılların sonunda ince tabaka kromatografisinin geliştirilmesi ile doğal yağların birbirinden ayrılması sağlanmış ve bu gelişme beraberinde filtre kağıdı kromatografisinin bulunmasına yol açmıştır. Ardından karotenoidlerin ve steroidlerin saflaştırılması kolon kromatografisi tekniğinin temellerini oluşturmuştur [100].

Proteinlerin saflaştırılmasında kromatografik tekniklerin kullanımına ise 1960' lı yıllarda başlanmıştır. Günümüzde de enzimler ve diğer proteinlerin yanı sıra inorganik moleküller gibi biyolojik maddelerin ayrılması ve saflaştırılmasında da kromatografik teknikler vazgeçilmez bir araç haline gelmiştir. Ariffin ve ark., (2006) selülaz enzimini iyon değişim kromatografisini kullanarak; Saha (2002) ksilanaz enzimini kolon ve jel filtrasyon kromatografisini kullanarak; Tan ve ark., (2015) lipaz enzimini iyon değişim, gel filtrasyon ve afinite kromatografisini kullanarak; Giraud ve ark., (1993) amilaz enzimini anyon değişim kromatografisini kullanarak; Yang ve ark., (2000) ise proteaz enzimini iyon değişim kromatografisini kullanarak saflaştırmışlardır [101, 102, 103, 104, 105, 100].

Proteinler temelde amino asit birimlerinden oluşmuş polimer yapıdaki moleküllerdir ve amino asitlerdeki fenilalanin, tirozin, triptofan, izölösin, metiyonin ve valin gibi yan zincirler, hidrofobik özellikte olabilir. Proteinler üç boyutlu bir yapıya sahiptir ve bu yapı dimer veya tetramer olabilir [100].

Proteinler kararsız moleküllerdir ve yüksek sıcaklık, aşırı pH ve organik çözücülerde kolaylıkla denatüre olurlar. Bu nedenle, herhangi bir kromatografik çalışma sırasında bu faktörlerin dikkate alınması büyük önem taşır. İyon değişim kromatografisi, proteinler üzerindeki iyonize olabilen gruplardan yararlanırken, afinite kromatografisi, amino asit zincirlerinin spesifik dizilimini ve proteinin konformasyonunu kullanır. Hidrofobik etkileşim kromatografisi ise proteinin hidrofobik yan zincirlerini kullanır [100].

Son yıllarda Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi birçok araştırmacı tarafından geliştirilmiş ve günümüzde endüstriyel anlamda proteinlerin saflaştırılmasında genellikle kullanılan bir teknik haline gelmiştir. Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile serum proteinleri, nükleer proteinler, hormonlar, rekombinant proteinler ve enzimler gibi birçok biyomolekülün saflaştırılması sağlanır [97].

Hidrofobik etkileşim kromatografisi; yüksek tuz konsantrasyonuna sahip bir çözelti ile kolonun dengelenmesinin ardından, bu tuzlu tamponda hizalanan numune çözeltisinin kolona yüklenmesi esasına dayanır. Hidrofobik etkileşim kromatografisinde kolona yüklenen numunenin eliminasyonu, daha düşük tuz konsantrasyonuna sahip bir çözelti ile sağlanır ve tuz konsantrasyonunun ayarlanmasında genellikle amonyum sülfat tuzu kullanılır.

Organik çözücüler ve iyonik olmayan deterjanlar ile pH, sıcaklık ve katkı maddeleri hidrofobik etkileşim kromatografisini olumsuz yönde etkileyebilir. Hidrofobik etkileşim kromatografisinin genellikle hafif koşullarda gerçekleşmesi, saflaştırılan bileşiklerin yapılarını korumalarına olanak sağlamakla birlikte [106], bağlanma kapasitesi ve geri kazanımları oldukça yüksek olan bir tekniktir. Ayrıca, hidrofobik etkileşim kromatografisi proteinlerin ve biyopolimerlerin saflaştırılmasında da en çok kullanılan tekniklerden biridir [107, 106].

Hidrofobik etkileşim kromatografisi farklı araştırmacılar tarafından birçok enzimin saflaştırılmasında kullanılan bir tekniktir. Toida ve ark., (1995) *A. oryzae*' dan elde ettikleri lipaz enzimini; Nazir ve ark., (2009) *A. terreus*' dan elde ettikleri endoglukanaz enzimi; Kiss ve Kiss (2000) *A. carbonarius*, *A. nidulans*, *A. niger* ve *A. oryzae*' dan elde ettikleri ekstraselüler β -D-ksilozidaz enzimini; Tomaz ve ark., (2002) *T. reesei*'den elde ettikleri selüloz enzimini; Wiater ve ark., (2001) *T.*

harzianum' dan elde ettikleri mutanaz enzimini; Wiater ve ark., (2013) *T. harzianum*' dan elde ettikleri α -(1→3)-glukanaz (EC 3.2.1.84) enzimini; Cunha ve ark., (2009) *P. simplicissimum*' dan elde ettikleri lipaz enzmini; Furniss ve ark., (2005) *P. funiculosum*' dan elde ettikleri ksilanaz enzimini; Riaz ve ark., (2007) *Humicola* sp.' den elde ettikleri glukoamilaz enzimini; Sugihara ve ark., (1992) *Pseudomonas cepacia*' dan elde ettikleri lipaz enzimini; Hsiao ve ark., (2014) *Rhizopus oryzae*' dan elde ettikleri endopeptidaz enzimini Hidrofobik Etkileşim Kromatografisini kullanarak saflaştırmışlardır [108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118].

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Materyal

2.1.1 Katı Besiyerinde Geliştirilen Mikrofungusun β -glukosidaz Aktivitesinin Belirlenmesi

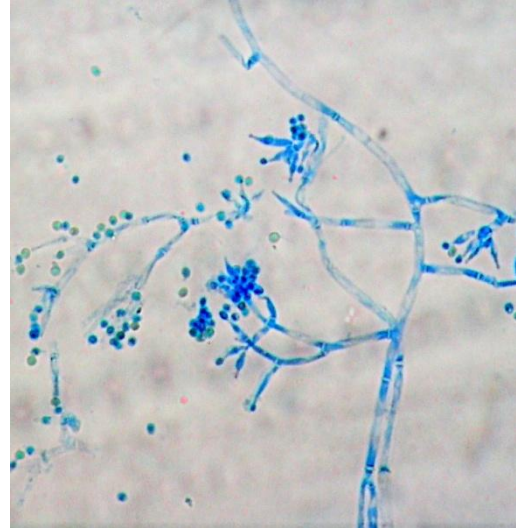
Trichoderma harzianum NRRL 13019 suşunun β -glukosidaz enzim aktivitesine sahip olup olmadığının belirlenmesi için, %5 Karboksimetil Selüloz (CMC) içeren Patates Dekstroz Agar (PDA) besiyeri plaklarının merkezine *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 suşu iğne öze yardımıyla tek nokta ekim yapılmış ve 25°C' de 7 günlük inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda yapılan hidroliz zon tayini ile β -glukosidaz pozitif olarak değerlendirilip çalışmada kullanılmasına karar verilmiştir.

2.1.1.1 *Trichoderma harzianum* Rifai 1969

Patates Dekstroz Agar besiyerinde 7 gün 25°C' de koloniler hızlı gelişmekte, koloni yüzeyi donuk yeşil renkli, koloni altı renksiz, hifler bölmeli, dallı, renksiz, 1,5-12 μm kalınlıkta, konidiyoforlar çok dallanmış ve ağaç şeklinde oldukça geniş yumaklar oluşturmakta, konidiyoforların ana dalları 4-5 μm eninde, çok sayıda yan dal oluşturmakta, yan dallar tek veya genellikle 2-3' lü gruplar oluşturmakta, fiyalidler kısa 5-7 x 3-3,5 μm , konidiler ortalama 2,97 x 2,69 μm , fiyalidlerin ucunda globoz başlar oluşturmakta, globoz veya obovoid [119, 81].



(a)



(b)

Şekil 2.1 (a) *T.harzianum* NRRL 13019 petri (10x4); (b) *T.harzianum* NRRL 13019 preparat (10x40)

2.1.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Tamponlar ve Çözeltiler

2.1.2.1 Mikrofungusun Geliştirilmesinde Kullanılan Besiyerleri

Patates Dekstroz Agar (PDA) Besiyeri

Patates ekstraktı	2,0 g
Dekstroz	10,0 g
Agar	7,5 g
Saf su	500 mL

19,5 g Patates Dekstroz Agar besiyeri 500 mL saf suda çözülmüş ve 121°C’de 20 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra steril petri plaklarına dökülerek kullanıma hazır hale getirilmiştir [120, 121].

Patates Dekstroz Broth (PDB) Besiyeri

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

12 g Patates Dekstroz Broth besiyeri 500 mL saf suda çözülmüş ve 121°C' de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir [122].

%5 Karboksimetil Selüloz (CMC) İçeren Patates Dekstroz Agar Besiyeri

PDA	19,5 g
Karboksimetil Selüloz ($C_{28}H_{30}Na_8O_{27}$)	25,0 g
Saf su	500 mL

19,5 g Patates Dekstroz Agar (PDA) ve 25 g Karboksimetil Selüloz (CMC) ($C_{28}H_{30}Na_8O_{27}$) 500 mL saf suda çözülmüş ve 121°C' de 20 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra steril petri plaklarına dökülerek kullanıma hazır hale getirilmiştir [123].

2.1.2.2 Katı Besiyerinde Geliştirilen Mikrofungusun Hidroliz Zon Büyüklüğünün Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

Kongo Kırmızısı (%0,1) Çözeltisi

Kongo Kırmızısı	0,05 g
Saf su	50 mL

0,05 g Kongo Kırmızısı, 50 mL saf suda çözülerek hazırlanmıştır [124].

1M Sodyum Klorür (NaCl) Çözeltisi

Sodyum Klorür (NaCl) 29,25 g

Saf su 500 mL

29,25 g NaCl, 500 mL saf suda çözülerek hazırlanmıştır [125].

2.1.2.3 Mikrofungus Spor Süspansiyonu Hazırlanmasında Kullanılan Çözelti

Tween 80 (%0,1) Çözeltisi

Tween 80 0,5 mL

Saf su 500 mL

0,5 mL Tween 80, 500 mL saf suda çözülüp, 121°C' de 20 dakika otoklavda steril edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir [125].

2.1.2.4 Katı Substrat Fermentasyonu (KSF) Kültür Ortamının Nemlendirme Sıvısının Belirlenmesinde Kullanılan Tampon Çözeltiler

0,2M pH' ı 4,0 ve 5,0 Olan Sitrat Tamponu

Sitrik Asit Monohidrat ($C_6H_8O_7$) 2,1014 g

Saf su 50 mL

Farklı pH'larda her bir sitrat tamponu için 2,1014 g Sitrik Asit Monohidrat ($C_6H_8O_7$) tartılarak pH' ları 4,0 ve 5,0' a ayarlayıp son hacimleri saf su ile 50 mL' ye tamamlanmıştır [126].

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

Sodyum di-hidrojen Fosfat (NaH_2PO_4)	1,3799 g
Saf su	50 mL

Farklı pH'larda her bir fosfat tamponu için 1,3799 g Sodyum di-hidrojen Fosfat (NaH_2PO_4) tartılarak pH' ları 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 ve 8,0' e ayrı ayrı ayarlanıp son hacimleri saf su ile 50 mL' ye tamamlanmıştır [127].

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

Di-sodyum Hidrojen Fosfat Dihidrat (Na_2HPO_4)	1,7796 g
Saf su	50 mL

Farklı pH'larda her bir fosfat tamponu için 1,7796 g Di-sodyum Hidrojen Fosfat Dihidrat (Na_2HPO_4) tartılarak pH' ları 8,5 ve 9,0' a ayarlanıp son hacimleri saf su ile 50 mL' ye tamamlanmıştır [127].

2.1.2.5 β -glukosidaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesinde Kullanılan Tampon ve Substrat Çözeltiler

50 mM Sodyum Asetat Tamponu (pH 7,0)

Sodyum Asetat Trihidrat ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$)	3,402 g
Saf su	500 mL

3,402 g Sodyum Asetat Trihidrat ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$) saf suda çözülerek pH' ı 7,0' ye ayarlanmış ve son hacim saf su ile 500 mL' ye tamamlanmıştır [128].

Substrat (*p*-Nitrofenil β -D-glucopiranosit) Çözeltisi

<i>p</i> -NPG (<i>p</i> -Nitrofenil β -D-glucopiranosit)	0,015 g
Sodyum Asetat Tamponu (50 mM, pH 7,0)	10 mL

0,015 g *p*-NPG (*p*-Nitrofenil β -D-glucopiranosit) 50 mM Sodyum Asetat Tamponunda (pH 7,0) çözülerek son hacim 10 mL' ye tamamlanmıştır [129].

Reaksiyon Durdurma Tamponu

Sodyum Karbonat (Na_2CO_3)	5,2996 g
Saf su	100 mL

5,2996 g Sodyum Karbonat (Na_2CO_3) 100 mL saf suda çözülmüştür [129].

2.1.2.6 Lowry Metodu ile Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler

A Çözeltisi

Sodyum Hidroksit (NaOH)	0,20005 g
Bakır Sülfat (Na_2CO_3)	1,0 g
Saf su	50 mL

0,20005 g Sodyum Hidroksit (NaOH) 50 mL saf suda çözülmüş ve ardından oluşan çözeltiliye 1 g Bakır Sülfat (Na_2CO_3)' ın eklenmesiyle A çözeltisi hazırlanmıştır [130].

B Çözeltisi

NaK Tartarat ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,5 g
Saf su	50 mL

0,5 g Potasyum Sodyum Tartarat Tetrahidrat (NaK Tartarat) ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 50 mL saf suda çözümlenerek B Çözeltisi hazırlanmıştır [130].

C Çözeltisi

Bakır Sülfat (CuSO_4)	0,25 g
Saf su	50 mL

0,25 g Bakır Sülfat (CuSO_4) 50 mL saf suda çözümlenerek C Çözeltisi hazırlanmıştır [130].

D Çözeltisi

A Çözeltisi	24 mL
B Çözeltisi	0,5 mL
C Çözeltisi	0,5 mL

50 mL D Çözeltisi; 24 mL A Çözeltisi, 0,5 mL B Çözeltisi ve 0,5 mL C Çözeltisinin karıştırılmasıyla taze olarak hazırlanmıştır [130].

E Çözeltisi

1:1 oranında Folin Fenol ayracı saf su ile karıştırılarak taze olarak hazırlanmıştır [130].

Sığır Serum Albümin (BSA)

1:1 oranında Sığır Serum Albümin (BSA) saf su ile karıştırılarak taze olarak hazırlanmıştır [130].

Hazırlanan A, B ve C çözeltileri +4 °C derecede kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir [130].

2.1.2.7 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HIC) Tekniğinde Kullanılan Çözeltiler

Tuzlu Tampon

Amonyum Sülfat Tuzu [1,5 M, NH ₄ (SO ₂)]	99,105 g
Na ₂ HPO ₄ (50 mM)	3,5475 g
Saf su	500 mL

99,105 g Amonyum Sülfat Tuzu [1,5 M, NH₄(SO₂)] ve 3,5475 g Na₂HPO₄ (50 mM) saf suda çözündürülüp pH' sı 6,8' e ayarlanmış ve son hacimi saf su ile 500 mL' ye tamamlanarak hazırlanmıştır [131, 132, 129].

Tuzsuz Tampon

Na ₂ HPO (50 mM)	3,5475 g
Saf su	500 mL

3,5475 g Na₂HPO (50 mM) saf suda çözündürülüp pH' sı 6,8' e ayarlanarak son hacimi saf su ile 500 mL' ye tamamlanarak hazırlanmıştır [131, 132, 129].

2.1.2.8 SDS-PAGE Elektrofrezinde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

Ayırma Jeli

Saf su	20,1mL
%30' luk Akrilamid/Bis	16,65 mL
Tris-Base (C ₄ H ₁₁ NO ₃) (pH' ı 8,8)	12,5 mL
SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) (C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S)	500,0 µL
Temed (<i>N,N,N',N'</i> Tetrametil etilen daimine)	25,0 µL
%10' luk APS [(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈] (Amonyum persülfat)	750,0 µL

Sırasıyla; 20,1mL saf su, %30' luk 16,65 mL Akrilamid/Bis, pH' ı 8,8 olan 12,5 mL Tris-Base (C₄H₁₁NO₃), 500 µL Sodyum Dodesil Sülfat (C₁₂H₂₅NaO₄S), 25 µL Temed (*N,N,N',N'*Tetrametil etilen daimine) ve %10' luk 750 µL Amonyum persülfat karıştırılarak hazırlanmış ve 30 dakika donmaya bırakılmıştır [133, 134, 135].

Ayırma Jeli Hazırlanırken Kullanılan Alt Tampon

Tris-Base (C ₄ H ₁₁ NO ₃) (1,5M)	5,91 g
NaOH	0,5 M
Saf su	25,0 mL

1,5M 5,91 g Tris-Base (C₄H₁₁NO₃) saf suda çözündürülüp, 0,5 M NaOH ile pH' ı 8,8'e ayarlandıktan sonra saf su ile son hacmi 25 mL' ye tamamlanmıştır [133, 134, 135].

Yığıma Jeli

Saf su	12,2 mL
Tris-Base (C ₄ H ₁₁ NO ₃) (pH' ı 6,8)	5,0 mL
%30' luk Akrilamid/Bis	2,6 mL
SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) (C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S)	200,0 µL
Temed (<i>N,N,N',N'</i> Tetrametil etilen daimine)	20,0 µL
%10' luk Amonyum Persülfat (APS) [(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈]	400,0 µL

Sırasıyla; 12,2 mL Saf su, pH' ı 6,8 olan 5,0 mL Tris-Base (C₄H₁₁NO₃), %30' luk 2,6 mL Akrilamid/Bis, 200,0 µL Sodyum Dodesil Sülfat (C₁₂H₂₅NaO₄S), 20,0 µL Temed (*N,N,N',N'*Tetrametil etilen daimine) ve %10' luk 400,0 µL Amonyum persülfat karıştırılarak hazırlanmış ve 30 dakika donmaya bırakılmıştır [133, 134, 135].

Yığıma Jeli Hazırlanırken Kullanılan Üst Tampon

0,5M Tris-Base (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	1,97 g
HCl	1 M
Saf su	25,0 mL

0,5M 1,97 g Tris-Base (C₄H₁₁NO₃) saf suda çözündürülüp, 1 M HCl ile pH' ı 6,8'e ayarlandıktan sonra saf su ile son hacmi 25 mL' ye tamamlanmıştır [133, 134, 135].

Amonyum Persülfat Çözeltisi (%10)

APS (Amonyum Persülfat) [(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈]	0,5 g
Saf su	5,0 mL

0,5 g Amonyum Persülfat saf suda çözülerek son hacmi 5 mL' ye tamamlanıp hazırlanmıştır [133, 134, 135].

Tank Tamponu

Tris-Base (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	1,5 g
Glisin (C ₂ H ₅ NO ₂)	7,2 g
SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) (C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S)	0,5 g
Saf su	500 mL

1,5 g Tris-Base (C₄H₁₁NO₃), 7,2 g Glisin (C₂H₅NO₂) ve 0,5 g Sodyum Dodesil Sülfat (C₁₂H₂₅NaO₄S) saf suda çözündürülüp son hacmi 500 mL' ye tamamlanarak hazırlanmıştır [133, 134, 135].

Yükleme Tamponu

0,5M pH' ı 6,8 Olan Tris-Base (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	2,5 mL
%10' luk SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) (C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S)	4,0 mL
Gliserol (C ₃ H ₈ O ₃)	2,0 mL
%99,5' lik β-merkaptolanol (C ₂ H ₆ OS)	1,0 mL
Bromfenol mavisi	0,01g
Saf su	0,5 mL

0,5M pH' ı 6,8 olan 2,5 mL Tris-Base (C₄H₁₁NO₃), %10' luk 4 mL Sodyum Dodesil Sülfat (C₁₂H₂₅NaO₄S), 2 mL Gliserol (C₃H₈O₃), %99,5' lik 1 mL β-merkaptolanol (C₂H₆OS), ve 0,01 g Bromfenol mavisi 0,5 mL saf suda karıştırılarak hazırlanmıştır [133, 134, 135].

Sodyum Dodesil Sülfat (%10)

SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) (C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S)	0,5 g
Saf su	5,0 mL

0,5 g Sodyum Dodesil Sülfat saf suda çözündürülüp son hacmi 5 mL' ye tamamlanmıştır [133, 134, 135].

Boyama Çözeltisi

Coomassie Brilliant Blue G-250	1,32 g
Metanol (CH ₃ OH) (%99-100)	240,0 mL
%96' lık Asetik Asit (CH ₃ COOH)	48,0 mL
Saf su	240,0 mL

1,32 g Coomassie Brilliant Blue G-250, 240 mL Metanol (CH₃OH) (%99-100) içerisinde çözülmesinin ardından %96' lık 48 mL Asetik Asit (CH₃COOH) ve 240 mL saf su eklenmesiyle hazırlanmıştır [133, 134, 135].

Yıkama Çözeltisi

%96' lık Asetik Asit (CH ₃ COOH)	75,0 mL
Metanol (CH ₃ OH) (%99-100)	50,0 mL
Saf su	875,0 mL

%96' lık 75 mL Asetik Asit (CH₃COOH), 50 mL Metanol (CH₃OH) (%99-100) ve 875 mL saf suyun karıştırılmasıyla hazırlanmıştır [133, 134, 135].

2.1.2.9 NATİVE-PAGE Elektrofrezinde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

Ayırma Jeli

Saf su	4,89 mL
%30' luk Akrlil amid/Bis	2,5 mL
1,5M pH' ı 8,8 Olan SDS' siz Tris-Base (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	2,5 mL
Temed (<i>N,N,N',N'</i> Tetrametil etilen daimine)	10,0 µL
%10' luk APS [(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈] (Amonyum persülfat)	100,0 µL

Sırasıyla; 4,89 mL Saf su, 1,5M pH' ı 8,8 olan 2,5 mL SDS' siz Tris-Base (C₄H₁₁NO₃), %30' luk 2,5 mL Akrlil amid/Bis, 10,0 µL Temed (*N,N,N',N'*Tetrametil etilen daimine) ve %10' luk 100,0 µL Amonyum persülfat (APS) [(NH₄)₂S₂O₈] karıştırılarak hazırlanmış ve 30 dakika donmaya bırakılmıştır [135, 136].

Ayırma Jeli Hazırlanırken Kullanılan Alt Tampon

1,5M Tris-Base (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	5,91 g
NaOH	0,5 M
Saf su	25,0 mL

1,5M 5,91 g Tris-Base (C₄H₁₁NO₃) saf suda çözündürülüp 0,5 M NaOH ile pH' ı 8,8'e ayarlandıktan sonra son hacmi saf su ile 25 mL' ye tamamlanarak hazırlanmıştır [135, 136].

Yığıma Jeli

Saf su	3,07 mL
%30' luk Akril amid/Bis	625,0 µL
0,5M pH' ı 6,8 Olan SDS' siz Tris-HCl (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	1,25 mL
Temed (N,N,N',N''Tetrametil etilen daimine)	5,0 µL
%10' luk Amonyum persülfat [(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈] (APS)	50,0 µL

Sırasıyla; 3,07 mL Saf su, %30' luk 625,0 µL Akril amid/Bis, 0,5M pH' ı 6,8 Olan 1,25 mL SDS' siz Tris-HCl (C₄H₁₁NO₃), 5,0 µL Temed (N,N,N',N''Tetrametil etilen daimine) ve %10' luk 50,0 µL Amonyum persülfat [(NH₄)₂S₂O₈] karıştırılarak hazırlanmış ve 30 dakika donmaya bırakılmıştır [135, 136].

Yığıma Jeli Hazırlanırken Kullanılan Üst Tampon

0,5M Tris-Base (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	1,97 g
HCl	1 M
Saf su	25,0 mL

0,5M 1,97 g Tris-Base (C₄H₁₁NO₃) saf suda çözündürülüp 1M HCl ile pH' ı 6,8'e ayarlandıktan sonra saf su ile son hacmi 25 mL' ye tamamlanarak hazırlanmıştır [135, 136].

Amonyum Persülfat Çözeltisi (%10)

APS (Amonyum Persülfat) [(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈]	0,5 g
Saf su	5,0 mL

0,5 g Amonyum Persülfat saf suda çözülüp son hacmi 5 mL' ye tamamlanarak hazırlanmıştır [135, 136].

Tank Tamponu

Tris-Base (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	1,5 g
Glisin (C ₂ H ₅ NO ₂)	7,2 g
Saf su	500 mL

1,5 g Tris-Base (C₄H₁₁NO₃) ve 7,2 g Glisin (C₂H₅NO₂) saf suda çözülüp son hacmi 500 mL' ye tamamlanarak hazırlanmıştır [135, 136].

Yükleme Tamponu

0,5M pH' ı 6,8 Olan Tris-Base (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	2,5 mL
Gliserol (C ₃ H ₈ O ₃)	2,0 mL
Bromfenol mavisi	0,01g
Saf su	5,5 mL

0,5M pH' ı 6,8 olan 2,5 mL Tris-Base (C₄H₁₁NO₃), 2 mL Gliserol (C₃H₈O₃) ve 0,01 g Bromfenol mavisi 5,5 mL saf suda karıştırılarak hazırlanmıştır [135, 136].

Boyama Çözeltisi

Coomassie Brilliant Blue G-250	1,32 g
Metanol (CH ₃ OH) (%99-100)	240,0 mL
%96' lık Asetik Asit (CH ₃ COOH)	48,0 mL
Saf su	240,0 mL

1,32 g Coomassie Brilliant Blue G-250, 240 mL Metanol (CH₃OH) (%99-100) içerisinde çözülmesinin ardından %96' lık 48 mL Asetik Asit (CH₃COOH) ve 240 mL saf su eklenmesiyle hazırlanmıştır [135, 136].

Yıkama Çözeltisi

%96' lık Asetik Asit (CH ₃ COOH)	75,0 mL
Metanol (CH ₃ OH) (%99-100)	50,0 mL
Saf su	875,0 mL

%96' lık 75 mL Asetik Asit (CH₃COOH), 50 mL Metanol (CH₃OH) (%99-100) ve 875 mL saf suyun karıştırılması ile hazırlanmıştır [135, 136].

2.2 Metod

2.2.1 Katı Besiyerinde Geliştirilen Mikrofungusun β -glukosidaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Trichoderma harzianum NRRL 13019 suşunun β -glukosidaz aktivitesine sahip olup olmadığının belirlenmesi için, %5 Karboksimetil Selüloz (CMC) içeren Patates Dekstroza Agar (PDA) besiyeri plaklarının merkezine *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 suşu iğne öze ile tek nokta ekim yapılmış ve 25°C' de 7 günlük inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun sonunda hidroliz zon tayinini gerçekleştirmek için, gelişen *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 suşunun koloni yüzeyi kongo kırmızısı çözeltisi (%0,1) ile kaplanıp 25°C' de 15 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda boyanın fazlası 1M' lık NaCl ile yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından koloni yüzeyi tekrar 1M' lık NaCl ile kaplanıp 25°C' de 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda 1M NaCl petri kabından uzaklaştırılmış ve koloni çevresinde şeffaf zon oluşturan *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 suşunun, β -glukosidaz pozitif olarak değerlendirilerek deneylerde kullanılmasına karar verilmiştir [137].

2.2.2 Mikrofungus Spor Süspansiyonu Hazırlanması

β -glukosidaz enzim aktivitesine sahip, saf kültür olarak seçilen *T.harzianum* NRRL 13019 suşunun üremesi ve canlılığını devam ettirebilmesi amacıyla Patates

Dekstroz Agar besiyerine tek nokta ekimi yapılarak 25°C’ de 7 günlük inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun sonunda petri plağında gelişen *T.harzianum* NRRL 13019 suşunun koloni yüzeyi %0,1’ lik Tween 80 ile kaplanarak spor süspansiyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan 10⁷ CFU/mL spor süspansiyonundan 5 mL alınarak, 150 mL Patates Dekstroz Broth besiyerine inoküle edilmiş ve çalkalamalı inkübatörde 30°C 150 rpm’ de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından katı substrat olarak belirlenen mısır koçanı ortamına inoküle edilmiştir [138].

2.2.3 Mısır Koçanının Katı Substrat Fermentasyonu (KSF) Kültür Ortamı Olarak Hazırlanması

KSF olarak kullanılacak olan mısır koçanı değirmende küçük parçalara ayrılıp sonrasında elekten geçirilerek toz haline getirilmiştir. Ardından 80°C’ de 24 saat boyunca kurutma fırınında bekletilmiş ve 5’ er gram olacak şekilde tartılıp 250 mL’ lik erlenlere konulmuştur [138].

KSF ortamı olarak kullanılan öğütülmüş mısır koçanının nemlendirme sıvısı; pH 4,0 ve pH 5,0 için 0,2M Sitrat tamponu, pH 6,0, pH 6,5, pH 7,0, pH 7,5, pH 8,0 için 0,2M Sodyum Dihidrojen Fosfat tamponu, pH 8,5 ve pH 9,0 için 0,2M Disodyum Hidrojen Fosfat tamponu kullanılarak ortamın nem düzeyi %55 olacak şekilde ayarlanıp 5’ er gramlık katı substratlara (250 mL’ lik erlenlerdeki) ayrı ayrı ilave edilmiştir. Bu işlemlerin sonrasında katı substratlar otoklavda 121°C’ de 20 dakika steril edilerek KSF kültür ortamı hazırlanmıştır [138].

2.2.4 Katı Substrat Fermentasyonu (KSF) Kültür Ortamına İnokülasyon ve Kısmi Saflaştırılmış β -glukosidaz Enziminin Eldesi

Öğütülmüş mısır koçanının substrat olarak kullanılmasıyla hazırlanan KSF kültür ortamına, *T.harzianum* NRRL 13019’ un sıvı kültüründen 3 mL aşılınmış ve fungusun gelişimi için 30°C’ de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır

İnkübasyonun ardından KSF kültür ortamına 75 mL saf su konularak çalkalamalı inkübatörde 150 rpm’ de 2 saat boyunca inkübasyona bırakılmış ve elde

edilen özüt steril gazlı bezden süzülerek filtrat alınmıştır. Daha sonra 4°C’de 10000 rpm’ de 10 dakika santrifüjlenmiş ve süre sonunda filtratın süpernatant kısmı pellet kısmından ayrılmıştır. Elde edilen süpernatant, kısmi saflaştırılmış enzim kaynağı olarak kullanılmıştır [138].

2.2.5 Mikrofungustan β -glukosidaz Enzim Üretimine Katı Substrat Fermentasyon (KSF) Ortam Koşullarının Etkisi

2.2.5.1 Nemlendirme Sıvıları ve Optimum pH’ nın Belirlenmesi

Optimizasyon işleminin ilk basamağı olan nemlendirme sıvısı ve optimum pH’ nın belirlenmesi amacıyla mısır koçanı ile hazırlanan KSF kültür ortamları, pH 4,0 ve pH 5,0 için 0,2M Sitrat tamponu, pH 6,0, pH 6,5, pH 7,0, pH 7,5, pH 8,0 için 0,2M Sodyum Dihidrojen Fosfat tamponu, pH 8,5 ve pH 9,0 için 0,2M Disodyum Hidrojen Fosfat tamponu kullanılarak ortamın nem düzeyi %55 olacak şekilde ayarlanıp, 121°C’ de 20 dakika otoklavlanarak sterilizasyonları sağlanmıştır [139, 38].

Mısır koçanının substrat olarak kullanılmasıyla hazırlanan bu KSF kültür ortamlarına, *T.harzianum* NRRL 13019’ un sıvı kültüründen 3 mL aşılınmış ve fungusun gelişimi için 30°C’de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır [139, 38].

İnkübasyonun ardından KSF kültür ortamına 75 mL saf su konularak çalkalamalı inkübatörde 150 rpm’ de 2 saat boyunca inkübasyona bırakılmış ve elde edilen özüt steril gazlı bezden süzülerek filtrat alınmıştır. Daha sonra 4°C’de 10000 rpm’ de 10 dakika santrifüjlenmiş ve süre sonunda filtratın süpernatant kısmı pellet kısmından ayrılmıştır. Elde edilen süpernatant, kısmi saflaştırılmış enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Optimum koşullarda mikrofungustan β -glukosidaz üretimi için kısmi saflaştırılmış enzimlerin aktiviteleri ölçülerek nemlendirme sıvısı ve optimum pH belirlenmiştir [139, 38].

2.2.5.2 İnkübasyon Sıcaklığının Belirlenmesi

Optimum ortam koşullarında mikrofungustan β -glukosidaz enzim üretiminin sağlanması için ikinci aşama olan optimum sıcaklığın belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için mısır koçanı kullanılarak hazırlanan KSF kültür ortamı bir önceki basamakta belirlenmiş olan nemlendirme sıvısı ve optimum pH ile nem düzeyi %55 olacak şekilde ayarlanıp 121°C'de 20 dakika otoklavda steril edilmiştir. Hazırlanan KSF kültür ortamlarına *T.harzianum* NRRL 13019' un sıvı kültüründen 3 mL inoküle edilerek 25, 30, 35, 40 ve 45°C' lik sıcaklıklara ayarlı statik inkübatörlerde 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından farklı sıcaklıklarda inkübasyona bırakılan kısmi saflaştırılmış β -glukosidaz enzimleri elde edilmiştir. Kısmi saflaştırılmış enzimlerin aktivite ölçümleri ile KSF ortamında mikrofungusun geliştiği optimum sıcaklık değeri belirlenmiştir [139, 38].

2.2.5.3 İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi

Optimum ortam koşullarında mikrofungustan β -glukosidaz enzim üretiminin sağlanmasında son aşama olan optimum inkübasyon süresinin belirlenmesi için, mısır koçanı kullanılarak hazırlanan KSF kültür ortamı önceki basamaklarda belirlenmiş olan nemlendirme sıvısı ve optimum pH ile nem düzeyi %55 olarak ayarlanmıştır. Hazırlanan KSF kültür ortamlarına *T.harzianum* NRRL 13019' un sıvı kültüründen 3 mL inoküle edilerek tespit edilen optimum sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra 4.günden itibaren enzim aktivitesinin düşüşe geçtiği güne kadar kısmi saflaştırılmış olan enzimler elde edilmiştir. Kısmi saflaştırılmış enzimlerin β -glukosidaz aktivite ölçümlerinden elde edilen sonuçlara göre optimum inkübasyon süresi tespit edilmiştir [139, 140].

2.2.6 β -glukosidaz Enzim Aktivitesinin Tespit Edilmesi

β -glukosidaz enzim aktivitesi belirlenirken; 96' lık Well-plate' de örnek ve kontrol kuyucukları oluşturularak aktivite ölçümü gerçekleştirilmiştir. Örnek kuyucuklarına; 70 μ l 5 mM *p*-nitrofenil- β -D-glukopiranosit (*p*NPG) ile hazırlanan substrat çözeltisi ve 70 μ l kısmi saflaştırılmış enzim, kontrol kuyucuklarına ise; 70 μ l

50 mM pH 7,0 olan sodyum asetat tamponu ve 70 µl kısmi saflaştırılmış enzim eklenmiştir. Hazırlanan Well-plate 37°C’de, 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda örnek ve kontrol kuyucuklarının tümüne 70 µl 0,5M Sodyum Karbonat (Na₂CO₃) reaksiyon durdurucu tamponun ilave edilmesiyle reaksiyon durdurulmuş ve spektrofotometrede 410 nm’ de okunmuştur [52].

2.2.7 β-glukosidaz Enzimi Protein Miktarının Belirlenmesi

β-glukosidaz enziminin protein miktarı belirlenirken iki farklı yol izlenmiştir. Bunlardan ilki Warburg Metodu ile 280 nm’ de kalitatif yolla, ikincisi ise Lowry Metodu ile 600 nm’ de kantitatif yolla protein miktarının belirlenmesidir.

2.2.7.1 Warburg Metodu ile Kalitatif Protein Tayini

Hidrofobik Etkileşim Kromatografisinden sonra protein olmayan maddelerin uzaklaştırılması, elde edilen saflaştırılmış proteinlerin yapısında bulunan tirozin ve triptofan amino asitlerinin doğrudan ölçülmesi esasına dayanır. Birçok proteinin bu aminoasitler sayesinde 280 nm’ de maksimum absorpsiyon gösterme özelliğinden yararlanılarak protein miktarının yaklaşık olarak bulunmasında kullanılan hızlı bir yöntemdir [141].

Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile saflaştırma basamağından elde edilen ependorf tüplerin her birinin, kalitatif yolla protein miktarları yaklaşık olarak belirlenmiştir. Bunun için ependorf tüplerin her birinden 210 µL alınarak 96’lık kuvarz well-platenin her bir kuyucuğuna konulmuş, kör olarak ise 210 µL saf su kullanılarak 280 nm’de köre karşı absorbans değerleri spektrofotometrik olarak okunmuştur [141].

2.2.7.2 Lowry Yöntemi ile Kantitatif Protein Tayini

Lowry yöntemi ile protein tayini, proteini oluşturan amino asitler arasındaki peptit bağlarının parçalanması prensibine dayanır. Lowry yöntemi ile daha az numune ve kimyasal malzeme kullanılarak daha çok ve hızlı analiz yapılması mümkün hale gelmiştir. Bu nedenle Lowry yöntemi ile proteinlerin ölçülmesi ideal bir yöntemdir [142].

Çalışmamızda saflaştırmanın ilk basamağı olan amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen örneklerin ve ikinci basamağı olan Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi sonucunda en yüksek aktiviteye sahip olan örneğin kantitatif protein tayini Lowry yöntemi kullanılarak ile tespit edilmiştir. Bu yöntemin uygulanmasında A, B, C, D ve E çözeltileri kullanılmıştır ve bu çözeltilerin hazırlanışları;

A Çözeltisi; (w/v) %2 Na₂CO₃, 0,1M NaOH' da çözülerek,

B Çözeltisi; (w/v) %1 NaK Tartaratın saf suyla çözülmesi ile,

C Çözeltisi; (w/v) %0,5 CuSO₄' un saf suyla çözülmesi ile,

D Çözeltisi; 48 mL A çözeltisi, 1 mL B çözeltisi ve 1 mL C çözeltisinin birleşimi ile,

E Çözeltisi; 1:1 oranında Folin ve saf suyun karıştırılmasıyla hazırlanmıştır.

Sığır Serum Albümin (BSA) ; 1:1 oranında Sığır Serum Albümin (BSA) saf su ile karıştırılarak taze olarak hazırlanmıştır.

Saflaştırmanın ilk basamağı olan amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen örneklerin ve ikinci basamağı olan Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi sonucunda en yüksek aktiviteye sahip olan örneğin kantitatif yolla protein miktarı belirlenirken aşağıdaki yol izlenir:

- Örnek tüpleri hazırlanırken, protein miktarı belirlenecek olan numunenin saf su ile 1/10 oranında seyreltilmiş halinden 100 µL alınmış ve üzerine 2000 µL D Çözeltisinden ilave edilmiştir.
- Kör tüplerinin hazırlanmasında ise, 100 µL saf su konulmuş ve üzerine 2000 µL D Çözeltisinden ilave edilmiştir.

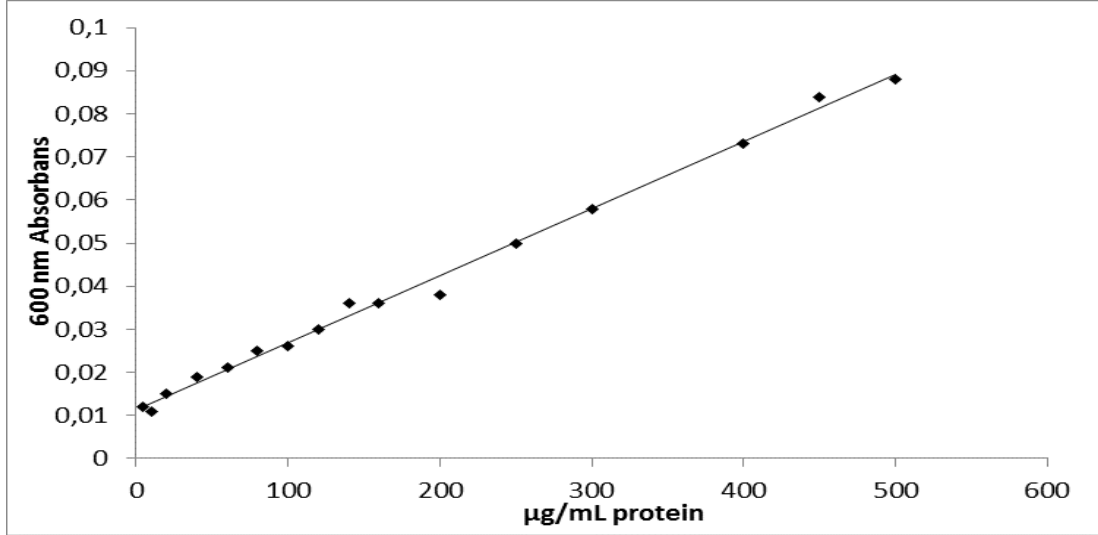
- Hazırlanan örnek ve kör tüplerinin her biri oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon süresi sonunda örnek ve kör tüplerinin her birine 200 µL E Çözeltisinden ilave edilmiş ve hemen ardından bekletilmeksizin vorteks yardımıyla homojen hale getirilerek oda sıcaklığında 30 dakikalık inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyon süresi sonunda hazırlanmış olan örnek ve kör tüplerinden 210 µL alınarak 96' lık well-plate ye konulmuş ve 600 nm' de spektrofotometrik ölçümleri köre karşı okunmuştur.
- Bu ölçüm sonuçlarından ortaya çıkan değerler, BSA grafiğinden elde edilen formül ile hesaplanarak protein miktarı grafiği oluşturulmuştur [142, 130].

2.2.7.3 BSA Standart Eğrisinin Belirlenmesi

Standart eğrinin belirlenmesi için;

- Öncelikle sığır serum albumin çözeltisinden 1:1 oranında hazırlanmıştır.
- Daha sonra hazırlanan çözelti sırasıyla 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µL olarak tüplere konulmuş ve saf suyla son hacimleri 100 µL' ye tamamlanmıştır.
- Sonra her bir tüpe sırasıyla 2000 µL D Çözeltisinden eklenmiş ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyonun ardından yine sırasıyla her bir tüpe 1:1 oranında E Çözeltisinden 200 µL eklenmiş ve vorteks yardımıyla homojenize edilerek 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonunda 96' lık Well plate' nin kuyucuklarına örneklerden 210 µL konulmuş, kör olarak ise BSA içermeyen 1.tüp kullanılarak 600 nm' de köre karşı spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır.

- Spektrofotometrik ölçüm, 600 nm' de absorbans değerlerine karşılık gelen, µg protein değerleri ile ölçülmüş ve standart grafik çizilmiştir.



Şekil 2.2 Lowry yöntemi ile protein miktarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik

Çizilen grafikten elde edilen formül ile diğer örneklerin de Lowry Yöntemiyle kantitatif olarak protein miktarları hesaplanmıştır.

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

2.2.8 β-glukosidaz Enziminin Saflaştırma Basamakları

2.2.8.1 Amonyum Sülfat Tuzu ile Çöktürme

Amonyum sülfat çöktürmesi, çözeltinin tuz konsantrasyonunu artırarak proteinin çözünürlüğünü değiştirmesi ve bunun sonucunda denatüre olmadan çökmesi esasına dayanan bir metottür. Amonyum sülfat, genellikle ucuz olması, çözünürlüğünün yüksek olması ve enzim yapılarına zarar vermemesinden dolayı çok tercih edilen bir çöktürücü ajandır.

Bu basamakta ilk olarak ham ekstrakta uygulanacak olan uygun konsantrasyondaki amonyum sülfat miktarı aşağıdaki formülle belirlenmiştir:

$$g \text{ (NH}_4\text{)}_2\text{SO}_4 = \frac{1.77 \times V_x (S_2 - S_1)}{3.54 - S_2}$$

V_h : Ölçülen süpernatantın hacmi

S_1 : Amonyum sülfatın ilk doygunluğu

S_2 : Amonyum sülfatın istenilen doygunluğu

Çöktürme aralığının belirlenmesi için ham ekstrakta 0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, %'lik (w/v) oranlarında amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır. Enzim çözeltisinin bulunduğu beher, protein yapılarının zarar görmemesi için buz dolu bir plastik kabın içerisine konulmuştur. Bu plastik kap manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilerek enzim çözeltisinin içerisine amonyum sülfat tuzu yavaşça ilave edilip düşük devirde karıştırılarak homojen hale gelmesi sağlanmıştır. Ardından homojen hale gelen çözelti 15000 rpm' de 4°C'de 30 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme işlemi sonunda süpernatant kısım pellet kısımdan ayrılarak pellet kısım 4 mL 50mM pH 6,8 sodyum fosfat tamponunda çözülmüştür [143, 55].

Her bir aralık için elde edilen numunelerin enzim aktivitesi ve Lowry yöntemi ile kantitatif protein miktarları ölçülmüştür. 0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100 aralıklarının tuz konsantrasyonu için ayrı kör ve örnek kuyucukları hazırlanarak β -glukosidaz aktivitesi belirlenmiştir [143, 55].

2.2.8.2 β -glukosidaz Enziminin Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HIC) Kullanılarak Saflaştırılması

Mısır koçanının KSF kültür ortamında substrat kaynağı olarak kullanılması ile *T.harzianum* NRRL 13019 suşundan optimum koşullarda elde edilen β -glukosidaz enziminin, amonyum sülfat çöktürmesinin ardından Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin' in jel olarak kullanılması sonucu Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir [131, 132].

Hidrofobik Etkileşim Kromatografisinde kolonun saflaştırma işlemine hazır hale gelmesi ve jelin içerisinde dağınık halde bulunan hidrofobik özellikteki naftilamin gruplarının açığa çıkması için, 1,5M (NH₄)₂SO₄ içeren 50 mM sodyum fosfat tamponunun (pH 6,8) kolondaki jel içerisinden geçişi sağlanmış ve böylece naftilamin uçları açığa çıkarak jel dengelenmiştir. Bu işlem jelin üzerindeki tampon çözeltiden 2 cm kalana kadar devam etmiştir. Belirlenen amonyum sülfat çöktürme aralığında gerçekleştirilen çöktürme işleminin sonunda, elde edilen çözeltinin pellet kısmı 4 mL 1,5M (NH₄)₂SO₄ içeren 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 6,8) ile çözülerek enzim çözeltisi oluşturulmuştur. Bu çözeltinin 3,5 mL' si dengelenen kolona yüklenmiş, 500 µl' si ise Lowry yöntemi ile protein tayini ve β-glukosidaz aktivitesinin belirlenmesi amacı ile ayrılmıştır [131, 132].

Jele yüklenen çözeltideki enzimler ve naftilamin grupları hidrofobik özelliğe sahip oldukları için birbirlerine tutunurlar. Jel içindeki enzim molekülleri naftilamin gruplarına 1,5M (NH₄)₂SO₄ içeren 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 6,8) sayesinde daha sıkı tutunurken, 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 6,8) ile jelden kopmaları sağlanır. Bu amaçla Hidrofobik Etkileşim Kromatografisinde 1,5M (NH₄)₂SO₄ içeren 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 6,8) ve 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 6,8) kullanılarak yüksek tuz konsantrasyonundan düşük tuz konsantrasyonuna doğru tuz gradiyenti oluşturulmuştur. Oluşan bu tuz gradiyenti ile kolondan elde edilen süzüntüler 2 mL' lik ependorf tüplere alınmış ve yapılan kromatografi sonucunda elde edilen ependorf tüplerin her birinin 280 nm' de kalitatif protein miktarları ve 410 nm' de β-glukosidaz enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Tüp numaralarına karşılık gelen değerler ile aktivite ve protein miktarlarını gösteren elüsyon grafiği çizilmiştir. Bu grafik ile en yüksek aktiviteye sahip ependorf tüpler belirlenmiş ve bu ependorf tüplerin Lowry metodu ile kantitatif protein miktarları belirlenmiştir. Bu yüksek aktiviteye sahip olan örneklerin ölçüm sonuçlarından faydalanılarak da saflaştırma tablosu oluşturulmuştur [131, 132].

2.2.9 *T.harzianum* NRRL 13019' dan Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin NATİVE/SDS-PAGE Tekniği ile Saflığının ve Alt Birimlerinin Varlığının/Sayısının Kontrolü

T.harzianum NRRL 13019' dan saflaştırılan β -glukosidaz enziminin saflığının, alt birim varlığının ve sayısının kontrolü, NATİVE ve SDS-PAGE poliakrilamid jel elektroforezi ile sağlanmıştır. Elektroforez terimi, moleküllerin elektrik yüklerine göre ayrılması olarak tanımlanır. Çok çeşitli elektroforez türü olmasına karşın amaç hepsinde aynıdır. Poliakrilamid jel elektroforez tekniği, jelin bileşimine göre SDS (sodyum dodesil sülfat) ve Native (doğal) jel elektroforezi olmak üzere ikiye ayrılır. Elektroforez uygulamalarından basit, hızlı ve en yaygın olarak kullanılan teknik, SDS-PAGE olup proteinlerin akrilamid jelde elektrik akımı etkisiyle hareket ettirilmesi ve sonunda jelde bu proteinlerin tespit edilmesini sağlayan tekniktir. SDS-PAGE' de proteinlerin doğal yapılarını değiştiren ve onların eşit yük yoğunluğuna sahip olmasını sağlayan Merkaptotanol ve SDS gibi denatüre edici ajanlar kullanılır. SDS-PAGE' de proteinlerin doğal yapıları bozulduğu için proteinler sadece moleköl ağırlığına göre ayrılır ve moleküllerin alt birime sahip olup olmadığı belirlenir. Native-PAGE' tekniği ise proteinlerin doğal yapılarını bozucu ajanlar kullanılmadan yapılan yöntem olup proteinlerin saflık derecesinin tayini için kullanılır. Laemmli (1970) tarafından belirtilen yöntemle SDS-PAGE ve NATİVE-PAGE elektroforezlerinde yığma jeli % 3'lük ve ayırma jeli % 10'luk olacak şekilde iki farklı akrilamid konsantrasyonuna sahip kesikli jeller hazırlanmıştır [133].

2.2.9.1 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile β -glukosidaz Enziminin Saflığının Kontrolü

SDS-PAGE tekniği Laemmli (1970)' nin belirttiği şekilde uygulanarak Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) varlığında β -glukosidaz enziminin saflığının ve alt birimlerinin kontrolü sağlanmıştır. SDS-PAGE tekniğinde ayırma ve yığma jellerini hazırlamadan önce, kullanılacak olan cam plakalar elektroforez sonunda jelin kolay bir şekilde ayrılması için saf su ve etil alkol ile iyice temizlenmiştir. Temizlenen cam plakalar arasına, plastik aralık oluşturucu yerleştirilerek birbiri üzerine konulmuş ve elektroforez dökme aparatına sabitlenmiştir. Bölüm 2.1.2.8' deki gibi %10' luk

olacak şekilde hazırlanmış olan ayırma jeli, cam plakalar arasına üstten 2-3 cm boşluk kalacak şekilde dökülmüş ve jelin üst yüzeyine saf su eklenmesiyle düz bir yüzey oluşturulmuştur. Ardından ayırma jelinin içerisinde bulunan kimyasalların polimerleşmesi için 1-2 saat kadar beklenmiş ve süre sonunda saf su jele zarar vermeden cam plakalar arasından uzaklaştırılmıştır. Sonrasında Bölüm 2.1.2.8' de belirtildiği şekilde %3' lük olacak şekilde hazırlanan yığma jeli, polimerleşmesi tamamlanmış olan ayırma jelinin üzerine eklenmiş ve taraklar zaman kaybetmeden yığma jelinin zarar görmemesine dikkat edilerek cam plakalar arasına yerleştirilmiştir. 30 dk kadar yığma jelinin de polimerleşmesi beklendikten sonra taraklar dikkatlice çıkarılmış ve oluşan kuyucuklar saf su ile temizlenmiştir. Elektroforez tankına jellerin bulunduğu cam plakalar yerleştirilmiş ve ardından bu cam plakaların üzeri Bölüm 2.1.2.8' de belirtildiği şekilde hazırlanmış olan SDS' li tank tamponu ile kaplanmıştır [133].

Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenen örnekler birleştirilerek bir numune çözeltisi elde edilmiştir. Elde edilen bu numune çözeltisi, Bölüm 2.1.2.8' de belirtildiği şekilde hazırlanmış olan numune yükleme tamponu ile toplam hacmi 50 µL olacak şekilde 1:1 oranında birleştirilerek, jele yüklenmek üzere hazır hale getirilmiştir. Ardından standart protein çözeltisinden yani markerdan 5 µL alınarak, hazırlanan numuneler ile birlikte 95°C' de 5 dk boyunca ısıya maruz bırakılmıştır. Soğumaları beklendikten sonra cam plakalar arasında oluşturulan kuyucuklara yüklenmiştir. Yükleme işleminin ardından elektroforez tankının üst kapağında bulunan ve elektrik akımını iletecek olan uçlar uygun şekilde bağlanarak güç kaynağı 80 volta ayarlanmış ve yürütme işlemi başlatılmıştır. Yığma jelindeki kuyucuklara yüklenen marker ve örneklerin protein bantları, ayırma jeline ulaşmaya kadar 80 voltluk elektrik akımı verilmeye devam etmiş, protein bantlarının ayırma jeline ulaşmasıyla birlikte elektrik akımı 150 volta yükseltilmiştir. Protein bantları, ayırma jelinin bitimine yaklaşık 1 cm kala elektrik akımı kesilerek, yürütme işlemi durdurulmuştur [133, 134].

Yürütme işlemi sona erdiğinde öncelikle cam plakalar dikkatli bir şekilde elektroforez tankından çıkarılmış ve bu cam plakaların arasında bulunan marker ve örneklere ait protein bantlarını içeren jeller zarar görmeyecek şekilde cam plakalardan ayrılmıştır. Ardından jeller, üzerindeki protein bantlarının net bir biçimde görülmesini sağlayan ve Bölüm 2.1.2.8' de belirtildiği şekilde hazırlanmış

olan boyama çözeltisi içerisine alınmıştır. 1-2 saat süresince düşük devire ayarlı çalkalamalı inkübatörde çalkalanmış ve süre sonunda jelin zemin rengi açılana kadar yıkama çözeltisi ile yıkanmıştır. Sonra tekrardan düşük devire ayarlı çalkalamalı inkübatörde çalkalanarak bantların belirgin bir şekilde ortaya çıkması sağlanmıştır. Yıkama çözeltisinden çıkarılan jellerin görüntüleri, Jel Görüntüleme Sistemi (UVP) yardımıyla bilgisayara aktarılmıştır [133, 134].

2.2.9.2 Doğal Poliakrilamid Jel Elektforezi (NATIVE-PAGE) ile β -glukosidaz Enziminin Saflığının Kontrolü

NATIVE-PAGE tekniği de Laemmli (1970)' nin belirttiği şekilde uygulanmış olup, SDS-PAGE tekniğindeki gibi β -glukosidaz enziminin saflığının ve alt birimlerinin kontrolü sağlanmıştır. Bölüm 2.1.2.9' da belirtildiği gibi ön hazırlıklar yapılarak sırasıyla NATIVE-PAGE ayırma jeli ve NATIVE-PAGE yığma jeli hazırlandı. Hazırlanan jeller cam plaklar arasına dökülerek jel elektforez tankına yerleştirildi ve tankın alt ve üst kısmına NATIVE-PAGE yürütme tamponu konuldu. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi sonucunda elde edilen ependorf içerisindeki numunelerden yüksek aktivite gösterenler birleştirilerek bir çözelti oluşturuldu. Hazırlanan çözelti 50 μ L olacak şekilde 1:1 oranında NATIVE-PAGE numune yükleme tamponuyla karıştırıldı. Sadece molekül ağırlık standartlarını içeren standart protein çözeltisinden yani markerdan 5 μ L alındı ve hazırlanan bu numuneler kuyucuklara yüklendi. Diğer aşamalar SDS-PAGE tekniğinde olduğu gibi yapıldı ve son olarak jel, renk açma çözeltisinin içinden çıkartıldıktan sonra jel görüntüleme sistemi (UVP) kullanılarak jel görüntüsü bilgisayara aktarıldı [135, 136].

2.2.10 *T.harzianum* NRRL 13019' dan Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Optimum inkübasyon koşullarında geliştirilmiş olan *T.harzianum* NRRL 13019 suşundan Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile saflaştırılan β -glukosidaz enziminin biyokimyasal ve kinetik özelliklerinin belirlenmesi amacı ile; optimum pH₁, optimum sıcaklığı ve termal kararlılığı araştırılmış, Km ve Vmax, IC50, Ki değerleri ve inhibisyon tipi tespit edilmiştir.

2.2.10.1 Saf β -glukosidaz Enziminin Optimum pH Değerinin Belirlenmesi

T.harzianum NRRL 13019' dan Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile saflaştırılan β -glukosidaz enziminin optimum pH değerinin belirlenmesi amacıyla; farklı pH değerindeki 25 mM Na-Ac Tamponu (pH 2,0; pH 3,0; pH 4,0; pH 5,0) ve 25 mM Sodyum Fosfat Tamponu (Na₂HPO₄.2H₂O) (pH 6,0; pH 7,0; pH 8,0; pH 9,0) hazırlanmıştır. Hazırlanan bu farklı pH değerindeki tampon çözeltiler ile her bir pH değeri için ayrı olacak şekilde 5 mM pNPG substrat çözeltisi hazırlanmıştır [52, 144].

Hazırlanan bu tampon ve substrat çözeltileri kullanılarak β -glukosidaz enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Bunun için öncelikle 96' lık Well-platede örnek ve kör kuyucukları hazırlanmıştır. Kör kuyucuklarına 70 μ L farklı pH değerindeki tampon çözeltiler ile 70 μ L saf β -glukosidaz enziminden; örnek kuyucuklarına ise 70 μ L farklı pH değerindeki tampon çözeltiler ile hazırlanmış olan substrat çözeltileri ile 70 μ L saf β -glukosidaz enziminden konulmuş ve well-plate 37°C'ye ayarlı inkübatörde 30 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda kör ve örnek kuyucuklarının her birine 70 μ L reaksiyon durdurucu tampon (0,5M Na₂CO₃) eklenerek reaksiyon durdurulmuş ve 410 nm'de köre karşı spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. Ölçüm sonunda elde edilen değerler ve pNPG standart grafiği kullanılarak enzim ünitesi (EU) hesaplanmıştır [52, 144].

2.2.10.2 Saf β -glukosidaz Enziminin Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi

T.harzianum NRRL 13019' dan Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile saflaştırılan β -glukosidaz enziminin optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi amacıyla; 25, 35, 45, 55, 65, 75 ve 85°C' lere aktivite ölçümleri yapılmıştır. 8 farklı sıcaklık değerindeki enzim aktivitelerini tespit etmek amacıyla, her bir sıcaklık değeri için 96' lık well-plate de ayrı ayrı örnek ve kör kuyucukları hazırlanmıştır. Kör kuyucuklarına 70 μ L Na-Ac tampon çözeltisi ile 70 μ L saf β -glukosidaz enziminden, örnek kuyucuklarına ise 70 μ L *p*NPG substrat çözeltisi ile 70 μ L saf β -glukosidaz enziminden konulmuş ve hazırlanan well-plate ler belirlenen sıcaklıklara ayarlanmış inkübatörlerde 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda kör ve örnek kuyucuklarının her birine 70 μ L reaksiyon durdurucu tampon (0,5M Na₂CO₃) eklenerek reaksiyon durdurulmuş ve 410 nm' de köre karşı spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. Ölçüm sonucunda elde edilen değerler ve *p*NPG standart grafik kullanılarak enzim ünitesi (EU) hesaplanmıştır [52, 144].

2.2.10.3 Saf β -glukosidaz Enziminin Termal Kararlılığının Belirlenmesi

T.harzianum NRRL 13019' dan Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HIC) ile saflaştırılan β -glukosidaz enziminin termal kararlılığını belirlemek için; saf β -glukosidaz enzimi 45, 55, 65, 75 ve 85°C' lere ayarlı inkübatörlerde ayrı ayrı inkübasyona bırakılmıştır. Başlangıç enzim aktivitesi [0(sıfır) noktası] olarak, ısı ile etkileşime uğramamış olan saf β -glukosidaz enzim çözeltisi kabul edilmiştir. 45, 55, 65 ve 75°C' deki termal kararlılıkların tespiti için; saf β -glukosidaz enzimi belirlenen sıcaklıklara ayarlanmış olan inkübatörlerde inkübasyona bırakılarak her 10 dakikada bir β -glukosidaz enzim aktivitesi ölçülmüştür. 85°C' deki termal kararlılığın tespitinde ise; saf β -glukosidaz enziminin 85°C' de inkübasyonu sağlanmış ve 2 dakikada bir enzim aktivite ölçümü yapılmıştır. Ölçümlerin sonunda elde edilen absorbans değerleri ile *p*NPG standart eğrisi kullanılarak enzim ünitesi (EU) hesaplanmıştır [145, 146].

2.2.10.4 Saf β -glukosidaz Enziminin K_M ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi

Saflaştırılan β -glukosidaz enziminin optimum pH, optimum sıcaklık ve termal kararlılığının belirlenmesinin ardından, enzimin *p*NPG substratına olan ilgisini gösteren K_M ve V_{max} değerleri tespit edilmiştir. K_M ve V_{max} değerlerinin tespiti için; enzim miktarı sabit tutularak *p*NPG substratının 5-70 μ l arasında farklı konsantrasyon değerindeki aktiviteleri ölçülmüş ve ölçüm sonuçlarından aktivite değerleri (EU/mL) hesaplanmıştır. Bu aktivite değerleri reaksiyon hızı [V] olarak kabul edilerek Lineweaver-Burk grafiğinin çiziminde kullanılacak olan 1/[V] değeri ve substratların konsantrasyonlarından [S] ise 1/[S] değerleri elde edilmiştir. Tüm bu elde edilen değerlerin Lineweaver-Burk grafiği çizilmiştir [33, 147].

K_M ve V_{max} değerleri Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen denklem ile bulunmuş ve grafiğin 1/V eksenini kestiği nokta olan $1/V_{max}$ değerinden V_{max} değeri belirlenmiş olup, denklemde K_M/V_{max} değerinde V_{max} yerine yazılarak K_M değeri hesaplanmıştır [33, 147].

2.2.10.5 Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi

Saflaştırılan β -glukosidaz enziminin IC_{50} değerlerini belirlemek için, enzim aktivitesi üzerine glukoz ve δ -glukonolakton inhibitörlerinin etkileri araştırılmış ve 0,01M konsantrasyondaki reaksiyon hacminde *p*NPG substratı kullanılmıştır. İnhibitör bulunmayan ortamdaki β -glukosidaz enziminin aktivitesi %100 aktivite olarak kabul edilmiş olup, 1-60 μ l arasında değişen inhibitör konsantrasyonlarındaki β -glukosidaz enziminin aktivite değerleri çalışılmıştır. Elde edilen bu değerlerden % aktivite hesaplanarak % Aktivite-[I] (İnhibitör konsantrasyonu) grafikleri çizilmiştir. Çizilen grafikler yardımıyla da enzim aktivitesini %50 oranında azaltan IC_{50} inhibitör konsantrasyonu değerleri hesaplanmıştır [131].

2.2.10.6 Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin K_i Değerlerinin Belirlenmesi

K_i değerleri, *p*NPG substratı kullanılarak *T.harzianum* NRRL 13019' dan saflaştırılan β -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine δ -glukonolakton ve glukozun inhibisyon tipleri ile tespit edilmiştir. K_i değerlerinin belirlenmesinde ilk olarak, inhibitör bulunmayan ortamda 5-70 μ l arasında farklı *p*NPG substrat konsantrasyonunda aktivite değerleri bulunmuş ve bu sonuçlardan $1/[V]$ değerleri hesaplanmıştır. $1/[V]$ ve $1/[S]$ değerleri ile Lineweaver-Burk grafiği çizilerek I_0 doğrusu elde edilmiştir. Her iki inhibitör maddenin üç farklı sabit konsantrasyonunda, *p*NPG substratının 5-70 μ l arasında *p*NPG substratı ile farklı konsantrasyonda aktivite değerleri belirlenmiştir. Üç farklı inhibitör konsantrasyonu varlığında, farklı substrat konsantrasyonuna karşılık gelen enzim aktiviteleri kullanılarak $1/[V]$ ve $1/[S]$ değerleri hesaplanmış ve Lineweaver-Burk grafiği çizilerek I_1 , I_2 ve I_3 doğruları oluşturulmuştur. K_i değerleri, Lineweaver-Burk grafikleri ile hesaplanmış ve inhibisyon tipleri tespit edilmiştir. 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 ise $1/[V]$ eksenini kestiği nokta olan $1/V_{max} (1+[I]/K_i)$ ifadesi, yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon tipi için $1/[V]$ eksenini kestiği nokta olan $1/V_{max} (1+[I]/K_i)$ ifadesi kullanılarak hesaplanmıştır. K_i değerlerinin hesaplanmasında denklemlerde kullanılan K_M ve V_{max} değerleri inhibitörsüz ortamdaki değerlerdir [131, 148].

3. BULGULAR

3.1 Katı Besiyerinde Geliştirilen Mikrofungusun β -glukosidaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Trichoderma harzianum NRRL 13019 suşunun β -glukosidaz enzim aktivitesine sahip olup olmadığı belirlenirken; %5 Karboksimetil Selüloz (CMC) içeren Patates Dekstroz Agar (PDA) besiyeri plaklarının merkezine *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 suşu inoküle edilmiş ve 25°C' de 7 gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda yapılan hidroliz zon tayini ile β -glukosidaz pozitif olarak değerlendirilip deneylerde kullanılmasına karar verilmiştir.

3.2 Mikrofungustan β -glukosidaz Enzim Üretimine Katı Substrat Fermentasyon (KSF) Ortam Koşullarının Etkisi

Çalışmamızda *T.harzianum* NRRL 13019 suşundan öğütülmüş mısır koçanı ile hazırlanmış olan KSF kültür ortamında optimum koşullarda β -glukosidaz enziminin üretimi için, nemlendirme sıvılarının pH'ı, sıcaklık ve inkübasyon süresi optimize edilen koşullardır. Optimize edilen her koşul bir sonraki aşamada sabitlenmiş ve böylece mikrofungusun yüksek aktiviteli enzim ürettiği optimum koşuldaki gelişimi sağlamıştır.

3.2.1 Nemlendirme Sıvıları ve Optimum pH' nın Belirlenmesi

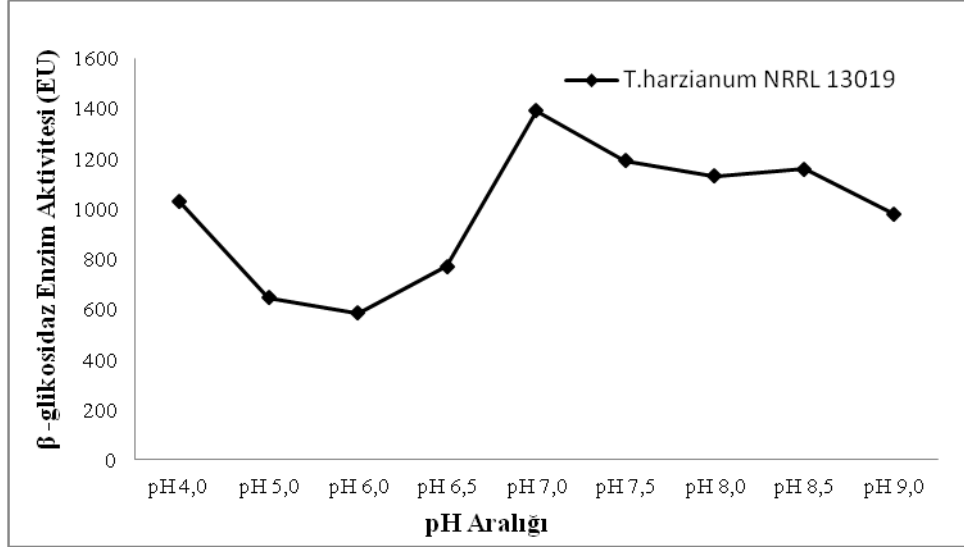
Optimizasyon işlemlerinin ilk aşamasında mikrofungusun β -glukosidaz enzimini yüksek aktivitede ürettiği nemlendirme sıvısı ve optimum pH' ın belirlenmesi için 9 farklı pH' daki nemlendirme sıvıları kullanılmıştır. Bu amaç doğrultusunda öğütülmüş mısır koçanı ile hazırlanmış olan KSF kültür ortamı; pH' ı 4,0 ve 5,0 olan 0,2 M Sitrat, pH'ı 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 olan 0,2 M Sodyum Dihidrojen Fosfat ve pH' ı 8,5 ve 9,0 olan 0,2 M Disodyum Hidrojen Fosfat tamponu ile ortamın

nem düzeyi %55 olacak şekilde ayarlanıp 121°C’ de 20 dakika otoklavlanarak sterilizasyonları sağlanmıştır. *T.harzianum* NRRL 13019’ un sıvı kültürünün 3 mL’ si, hazırlanan bu KSF kültür ortamlarına inoküle edilerek 30°C’ de 7 gün süresince inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda Bölüm 2.2.4’ de anlatıldığı şekilde kısmi saflaştırılmış enzimler elde edilmiş ve β-glukosidaz aktivite ölçümleri yapılmıştır.

Aktivite ölçüm sonuçlarına göre, *T.harzianum* NRRL 13019’ dan KSF kültür ortamında elde edilen β-glukosidaz enziminin optimum olduğu üretim koşulu pH’ ı 7,0 olan 0,2M Sodyum Dihidrojen Fosfat tamponu olduğu tespit edilmiştir (Tablo: 3.1, Şekil: 3.1).

Tablo 3.1 KSF kültür ortamında farklı pH’ lardaki nemlendirme sıvılarının *T.harzianum* NRRL 13019 β-glukosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Nemlendirme sıvılarının pH’ ı	β-glukosidaz enzim aktivitesi (EU) <i>T.harzianum</i>
pH 4,0	1028,4552
pH 5,0	646,3414
pH 6,0	584,0108
pH 6,5	771,0027
pH 7,0	1391,5989
pH 7,5	1192,4119
pH 8,0	1131,4363
pH 8,5	1158,5365
pH 9,0	979,6747



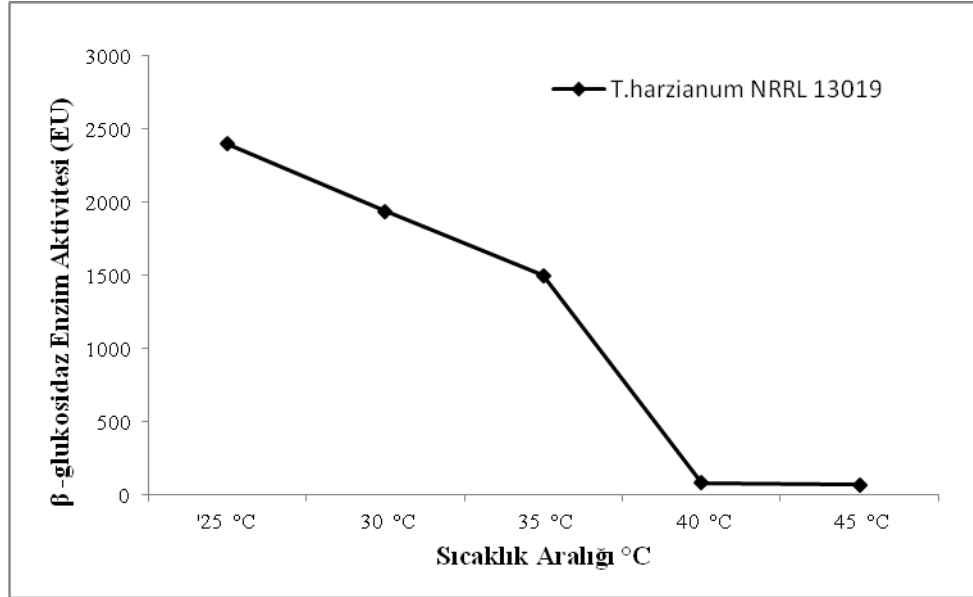
Şekil 3.1 KSF kültür ortamında farklı pH' lardaki nemlendirme sıvılarının *T.harzianum* NRRL 13019 β-glukosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisini gösteren grafik

3.2.2 İnkübasyon Sıcaklığının Belirlenmesi

Optimum inkübasyon sıcaklığının belirlenmesi amacı ile KSF kültür ortamında geliştirilen *T.harzianum* NRRL 13019' un 5 farklı sıcaklıkta inkübasyonları sağlanmıştır. Bu amaçla bir önceki aşamada belirlenen pH' ı 7,0 olan 0,2M Hidrojen Fosfat tamponu ile KSF kültür ortamları nemlendirilmiş ve 121°C' de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Hazırlanan bu KSF kültür ortamlarına *T.harzianum* NRRL 13019' un sıvı kültüründen 3 mL inoküle edilerek 25, 30, 35, 40 ve 45°C' ye ayarlanmış inkübatörlerde 7 gün süresince inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda β-glikosidaz aktivite ölçümleri yapılarak *T.harzianum* NRRL 13019' un optimum inkübasyon sıcaklığı 25°C olarak belirlenmiştir (Tablo: 3.2, Şekil: 3.2).

Tablo 3.2 KSF kültür ortamında farklı inkübasyon sıcaklıklarının *T.harzianum* NRRL 13019 β -glukosidaz enzim aktivitesine etkisi

İnkübasyon sıcaklığı (°C)	β -glukosidaz aktivitesi (EU)
25 °C	2399,7289
30 °C	1940,3794
35 °C	1498,6449
40 °C	79,9457
45 °C	70,4607



Şekil 3.2 KSF kültür ortamında farklı inkübasyon sıcaklıklarının *T.harzianum* NRRL 13019 β -glukosidaz enzim aktivitesine etki grafiği

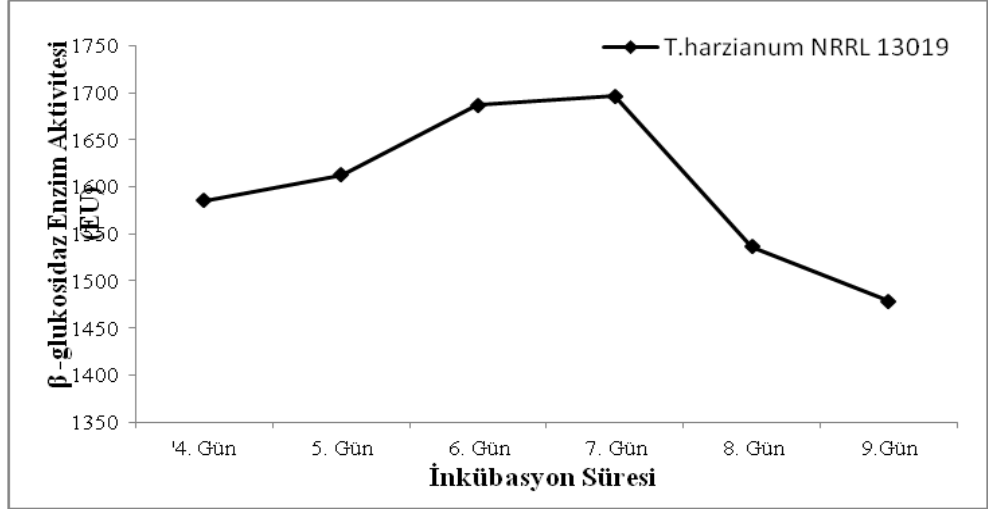
3.2.3 İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi

Optimizasyon işlemlerinin son aşamasında KSF kültür ortamında geliştirilen *T.harzianum* NRRL 13019' un enzim aktivitesinin maksimum olduğu inkübasyon süresi belirlenmiştir. Bu amaçla KSF kültür ortamları, önceki basamakta belirlenen pH' ı 7,0 olan 0,2M Disodyum Hidrojen Fosfat tamponu ile nemlendirilerek

otoklavda steril edilmiştir. Daha sonra hazırlanan KSF ortamlarına *T.harzianum* NRRL 13019 suşunun sıvı kültüründen 3' er mL inoküle edilerek bir önceki aşamada belirlenmiş olan inkübasyon sıcaklığında (25°C) gelişimleri sağlanmıştır. Ardından inkübasyonun 4.gününden itibaren elde edilen kısmi saflaştırılmış β -glukosidaz enzimlerinin aktivite ölçümleri yapılmış ve sonuçlara göre *T.harzianum* NRRL 13019' un optimum inkübasyon süresi 7.gün olarak belirlenmiştir.

Tablo 3.3 KSF kültür ortamında farklı inkübasyon sürelerinin *T.harzianum* NRRL 13019 β -glukosidaz enzim aktivitesine etkisi

İnkübasyon Süresi(Gün)	<i>T.harzianum</i> NRRL 13019 β-glukosidaz enzim aktivitesi (EU)
4. Gün	1585,3660
5. Gün	1612,4660
6. Gün	1686,9920
7. Gün	1696,4770
8. Gün	1536,5850
9. Gün	1478,3200



Şekil 3.3 KSF kültür ortamında farklı inkübasyon sürelerinin *T.harzianum* NRRL 13019 β -glukosidaz enzim aktivitesine etki grafiği

3.3 β -glukosidaz Enziminin Saflaştırma Basamakları

T.harzianum NRRL 13019 suşundan optimum koşullarda β -glukosidaz üretimi için KSF kültür ortamı, pH' ı 7,0 olan 0,2M Disodyum Hidrojen Fosfat tamponu ile nemlendirilerek 25°C' de 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından KSF kültür ortamına 75 mL saf su konularak çalkalamalı inkübatörde 150 rpm' de 2 saat boyunca inkübasyona bırakılmış ve elde edilen özüt steril gazlı bezden süzülerek filtrat alınmıştır. Daha sonra 4°C'de 10000 rpm' de 10 dakika santrifüjlenmiş ve süre sonunda filtratın süpernatant kısmı pellet kısmından ayrılmıştır. Elde edilen süpernatant, kısmi saflaştırılmış enzim kaynağı olarak amonyum sülfat tuzu ile çöktürme ve hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırma işlemlerinde kullanılmıştır.

3.3.1 Amonyum Sülfat Tuzu ile Çöktürme

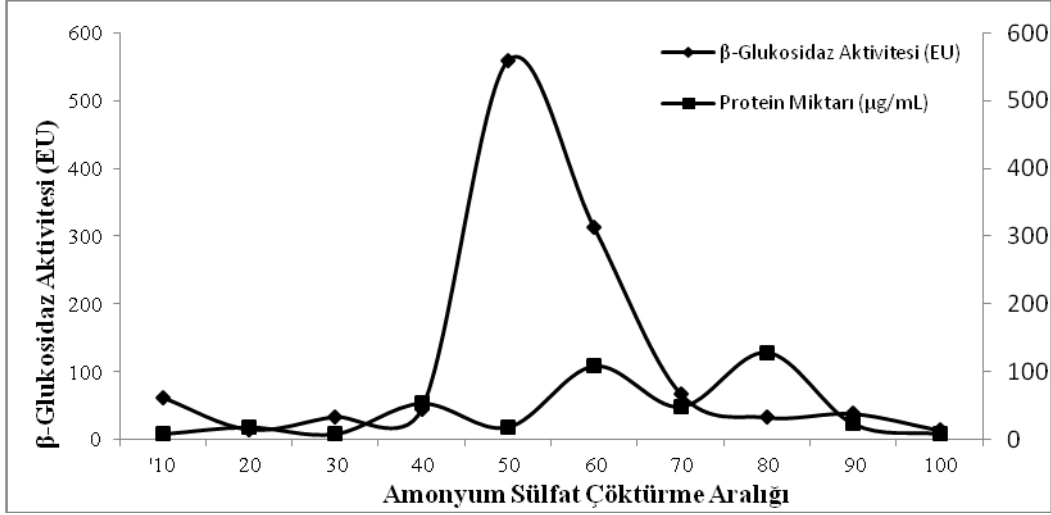
T.harzianum NRRL 13019 β -glukosidaz enziminin, amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesi amacı ile, optimum koşullar altında elde edilen kısmi saflaştırılmış enzime Bölüm 2.2.8.1' de anlatıldığı gibi 10 farklı aralık değeri için Tablo 3.4' de belirtilen miktarlarda amonyum sülfat tuzu [1,5 M, $\text{NH}_4(\text{SO}_2)$] eklenmiştir. Çöktürme işleminin ardından elde edilen numunelerin β -glukosidaz

aktiviteleri (EU) ve lowry yöntemi ile protein (mg/mL) miktarı ölçümleri yapılmıştır (Tablo 3.4). Ölçüm sonuçları ile amonyum sülfat çöktürme aralığını gösteren grafik çizilmiştir (Şekil 3.4).

Tablo 3.4 *T.harzianum* NRRL 13019 amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesinde kullanılan değerler

Aralık Değeri	Çöktürme Aralığı	Hacim (ml)	Kullanılan Amonyum Sülfat Miktarı (g)	Protein Miktarı (mg/ml)	Aktivite (U/ml)
1	0-10	10,0	0,5140	166,6670	62,3310
2	10-20	10,0	0,5290	300,0000	14,9050
3	20-30	10,0	0,5460	233,3330	33,8750
4	30-40	10,0	0,5630	466,6670	44,7150
5	40-50	10,5	0,6110	266,6670	559,6210
6	50-60	10,5	0,6320	666,6670	313,0080
7	60-70	10,5	0,6540	533,3330	67,7510
8	70-80	10,5	0,6780	1033,3330	32,5200
9	80-90	10,5	0,7030	533,3330	37,9400
10	90-100	10,5	0,7310	133,3330	13,5500

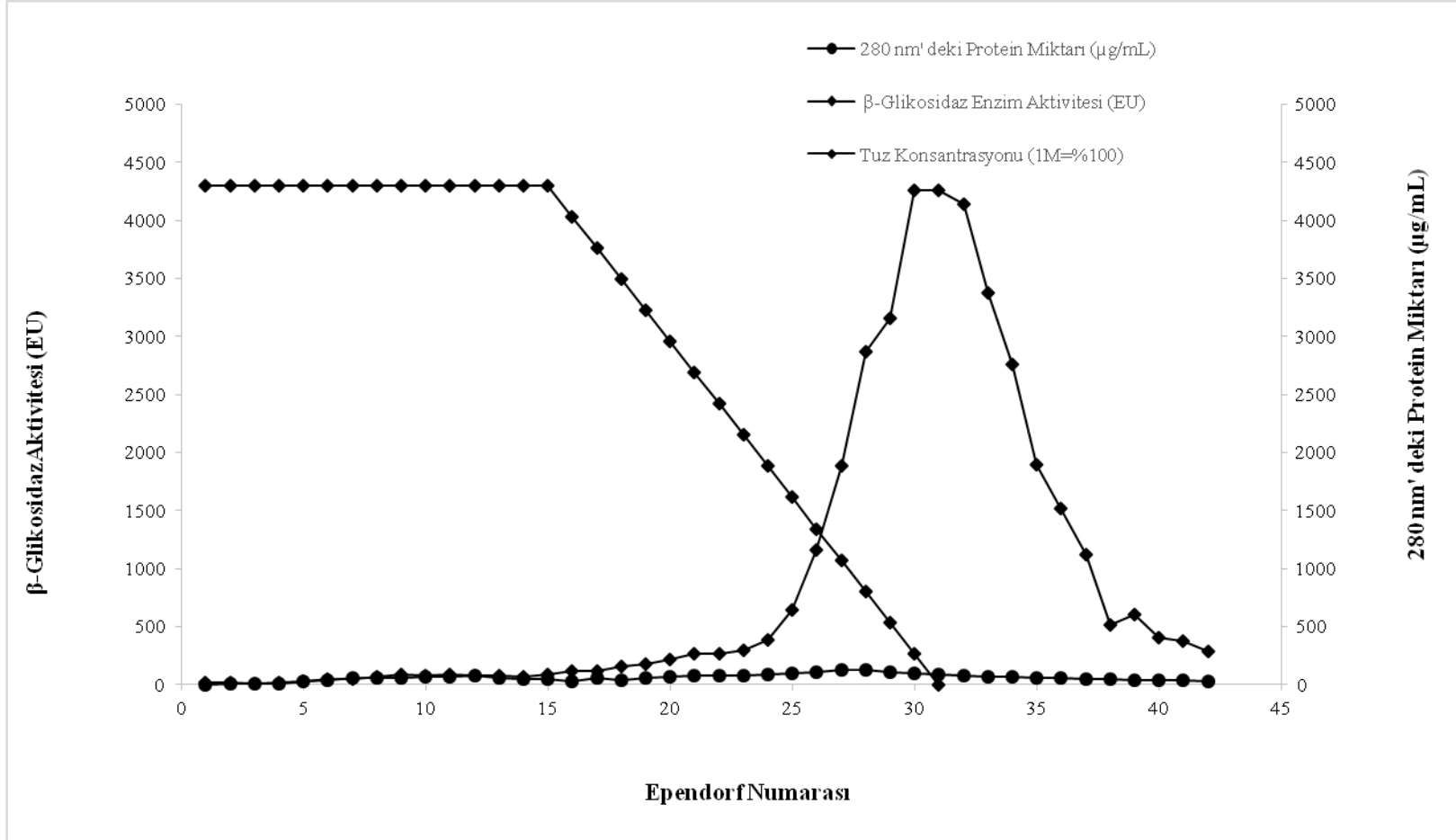
Ölçüm sonuçları ile elde edilen verilerden (Tablo 3.4) yararlanarak Şekil 3.4’deki amonyum sülfat çöktürme aralığı-β-glukosidaz aktivitesi-protein miktarı grafiği çizilmiştir. Çizilen bu grafiğe göre β-glukosidaz enzim aktivitesinin en yüksek olduğu amonyum sülfat çöktürme aralığı %40-70 olarak belirlenmiş ve saflaştırmanın ikinci aşaması olan Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile saflaştırma basamağında kısmi saflaştırılmış β-glukosidaz enzimine %40-70 tuz konsantrasyonunda amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır.



Şekil 3.4 *T.harzianum* NRRL 13019 amonyum sülfat çöktürme aralığını gösteren grafik

3.3.2 β -glukosidaz Enziminin Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HIC) Kullanılarak Saflaştırılması

KSF ortamında optimum koşullarda *T.harzianum* NRRL 13019' dan elde edilen kısmi saflaştırılmış β -glukosidaz enzimine %40-70 aralığında amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır. Çöktürme sonucu elde edilen çözelti Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin jelini içeren kolona yüklenmiş ve kolondan geçen numuneler, numaralandırılarak 2 mL' lik ependorf tüplere alınmıştır. Kromatografi sonunda ependorf tüplerin içerisine alınan numunelerin β -glukosidaz enzim aktivitesi ve Warburg Metodu ile 280 nm' deki kalitatif protein analizleri yapılmış ve elde edilen ölçüm sonuçları ile β -glukosidaz enziminin elüsyon grafiği çizilmiştir (Şekil 3.5). Grafikteki verilere göre yüksek aktiviteye sahip olan numaralandırılmış ependorf tüpleri tespit edilerek bu tüplerin Lowry yöntemi ile kantitatif protein miktarları belirlenmiş ve bütün bu sonuçlardan yararlanarak *T.harzianum* NRRL 13019 β -glukosidaz enziminin saflaştırma tablosu oluşturulmuştur (Tablo 3.5).



Şekil 3.5 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi kolonunda *T.harzianum* NRRL 13019 β-glukosidaz enziminin elüsyon grafiği

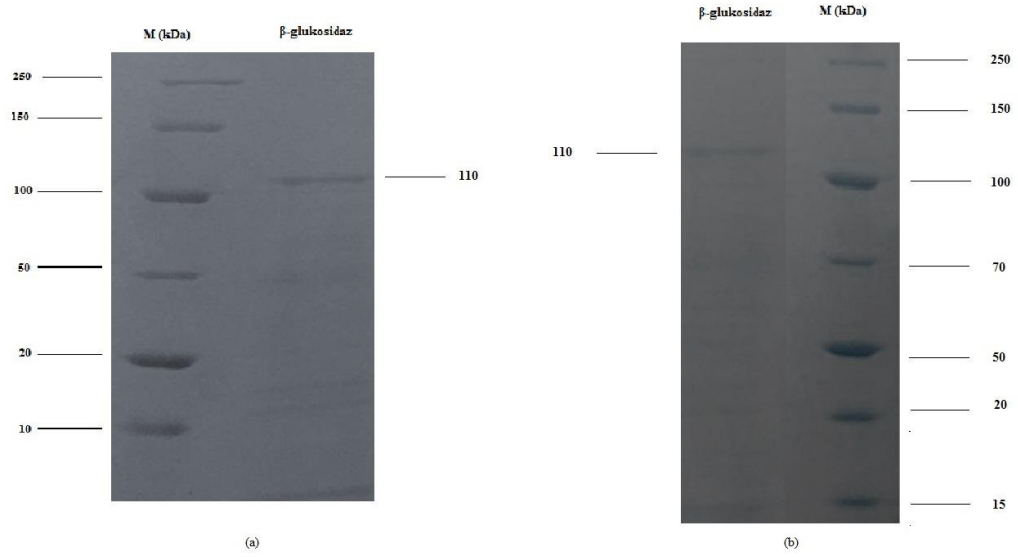
Tablo 3.5 *T.harzianum* NRRL 13019' dan elde edilen β -glukosidaz enzimi saflaştırma tablosu

Basamak	HACİM (mL)	AKTİVİTE (EU/mL)	PROTEİN MİKTARI (mg/mL)	TOTAL AKTİVİTE (EU/mL)	TOTAL PROTEİN (mg)	SPESİFİK AKTİVİTE (EU/mg)	% VERİM	SAFLAŞTIRMA KATSAYISI
HAM EKSTRAKT	50	945,7990	0,5265	47289,9720	26,3250	1796,3900	100	1
AMONYUM SÜLFAT ÇÖKTÜRMESİ	3,5	928,1840	0,3365	3248,6440	1,1777	2758,4640	6,8696	1,5355
HİDROFOBİK ETKİLEŞİM KROMATOĞRAFİSİ	2	4261,5176	0,0815	8523,0350	0,1630	52288,5580	18,0229	29,1075

T.harzianum NRRL 13019 β -glukosidaz enziminin saflaştırma tablosunda (Tablo 3.5), amonyum sülfat çökürmesinin total aktivitesi 3248,644 (EU/mL) protein miktarı ise 1,1777 (mg) olarak belirlenmiş ve %6,8696 verimle 1,5355 kat saflaştırılmıştır. Tablo 3.5' den elde edilen verilerden yararlanarak Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile *T.harzianum* NRRL 13019 β -glukosidaz enziminin total aktivitesi 8523,035 (EU/mL), protein miktarı 0,163 (mg) olarak belirlenmiş ve %18,0229 verimle 29,1075 kat saflaştırıldığı hesaplanmıştır.

3.4 *T.harzianum* NRRL 13019' dan Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin NATİVE/SDS-PAGE Tekniği ile Saflığının ve Alt Birimlerinin Varlığının/Sayısının Kontrolü

NATİVE ve SDS-PAGE poliakrilamid jel elektroforez tekniği kullanılarak *T.harzianum* NRRL 13019' dan saflaştırılan β -glukosidaz enziminin saflığı, alt birimlerinin varlığı ve sayısı kontrol edilmiştir. Bu tekniğin uygulanmasında Bölüm 2.2.9' daki yol izlenmiş ve jel görüntüleri, protein bantlarının net bir şekilde görülebilmesi amacıyla jel görüntüleme sistemi (UVP) ile bilgisayara aktarılmıştır.



Şekil 3.6 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile *T.harzianum* NRRL 13019' dan elde edilen β-glukosidaz enziminin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüleri (a) SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi, (b) Native-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

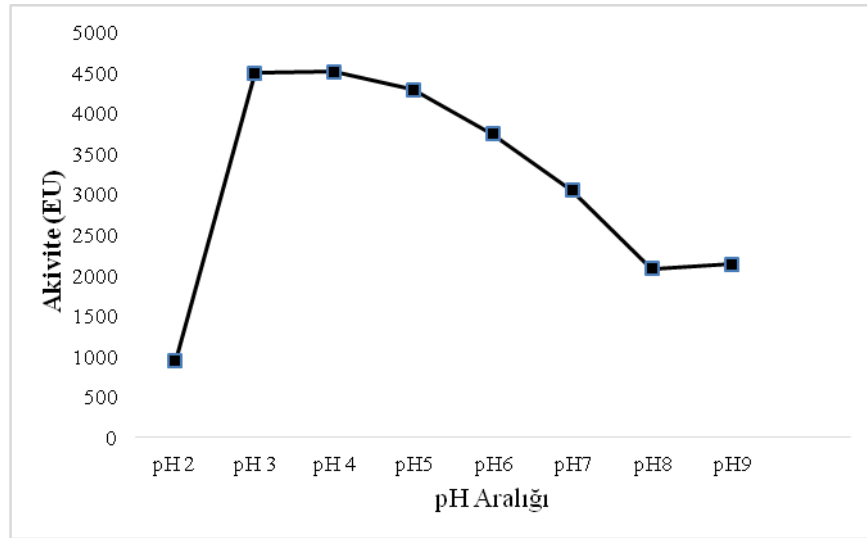
Trichoderma harzianum NRRL 13019' dan saflaştırılan β-glukosidaz enziminin SDS-PAGE ve NATİVE-PAGE'de yaklaşık 110 kDa hizasında tek bant gözlenmiştir (Şekil 3.6).

3.5 *T.harzianum* NRRL 13019 β-glukosidaz Enziminin Biyokimyasal ve Kinetik Özelliklerinin Belirlenmesi

Optimum inkübasyon koşullarında geliştirilen *T.harzianum* NRRL 13019' dan Hidrofobik etkileşim kromatografisi kullanılarak saflaştırılan β-glukosidaz enziminin biyokimyasal ve kinetik özelliklerinin belirlenmesi amacı ile; optimum pH' ı, optimum sıcaklığı ve termal kararlılığı araştırılmış, K_M ve V_{max} , IC_{50} , K_i değerleri ve inhibisyon tipi tespit edilmiştir.

3.5.1 *T.harzianum* NRRL 13019 β -glukosidaz Enziminin Optimum pH Değerinin Belirlenmesi

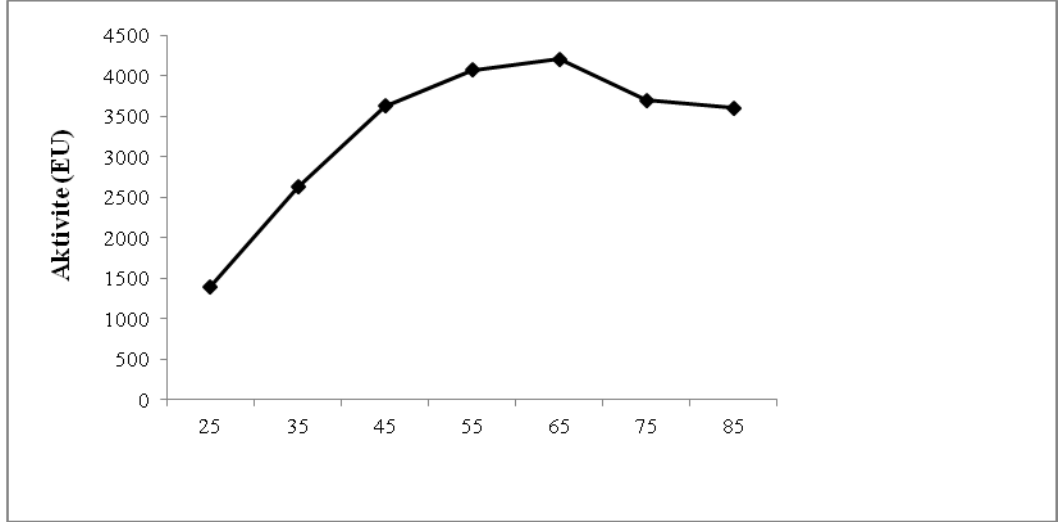
Saflaştırılan β -glukosidaz enziminin optimum pH değerinin belirlenmesi amacı ile; farklı pH değerindeki tampon çözeltiler ve bu tampon çözeltiler ile hazırlanan *p*NPG substratları kullanılarak β -glukosidaz aktivite ölçümleri yapılmıştır. Ölçüm sonucunda elde edilen verilerden yararlanarak Şekil 3.7’ daki β -glukosidaz enziminin optimum pH grafiği çizilmiş ve β -glukosidaz enziminin optimum pH değeri 4 olarak belirlenmiştir. (Şekil 3.7).



Şekil 3.7 Saflaştırılan β -glukosidaz enziminin optimum pH grafiği

3.5.2 *T.harzianum* NRRL 13019 β -glukosidaz Enziminin Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi

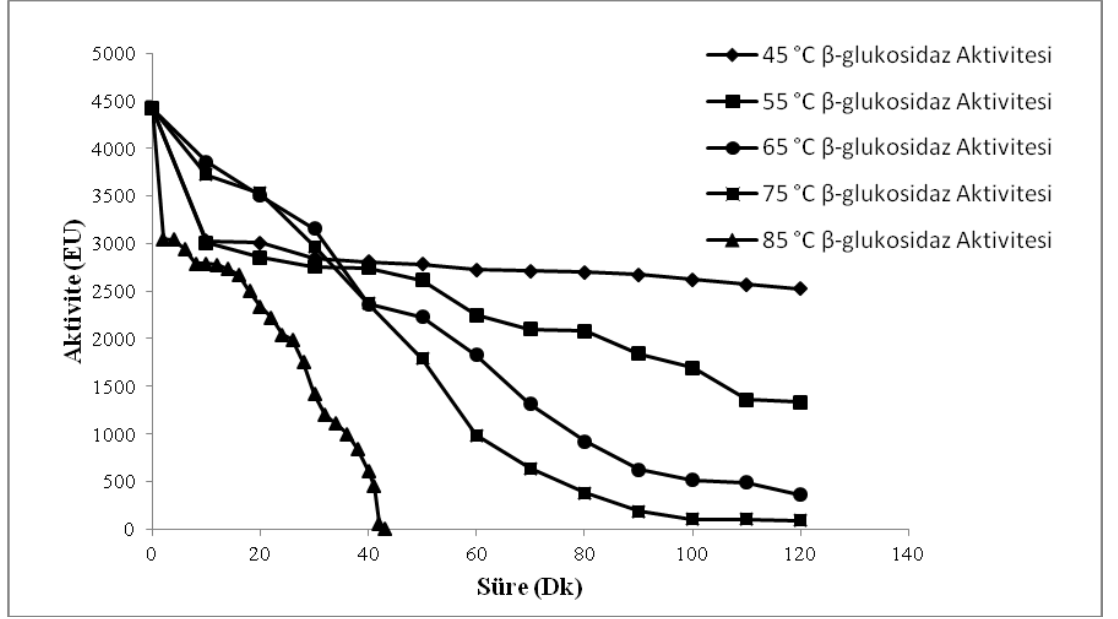
Saflaştırılan β -glukosidaz enziminin optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi amacı ile; farklı sıcaklıklarda inkübasyonları sağlanan β -glukosidaz enziminin aktivite ölçümleri yapılmıştır. Ölçüm sonucunda elde edilen verilerden yararlanarak Şekil 3.8’ deki β -glukosidaz enziminin optimum sıcaklık grafiği çizilmiş ve β -glukosidaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği optimum sıcaklık değeri 65°C olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8 Saflaştırılan β -glukosidaz enziminin optimum sıcaklık grafiği

3.5.3 *T.harzianum* NRRL 13019 β -glukosidaz Enziminin Termal Kararlılığının Belirlenmesi

Saflaştırılan β -glukosidaz enziminin termal kararlılığını belirlemek için; 5 farklı sıcaklıkta β -glukosidaz aktivite ölçümü yapılmış ve bu sonuçlarına göre *T.harzianum* NRRL 13019' dan saflaştırılan β -glukosidaz enziminin termal kararlılık grafiği çizilmiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.9 Saflaştırılmış *T.harzianum* NRRL 13019 β-glukosidaz enzimi termal kararlılık grafiği

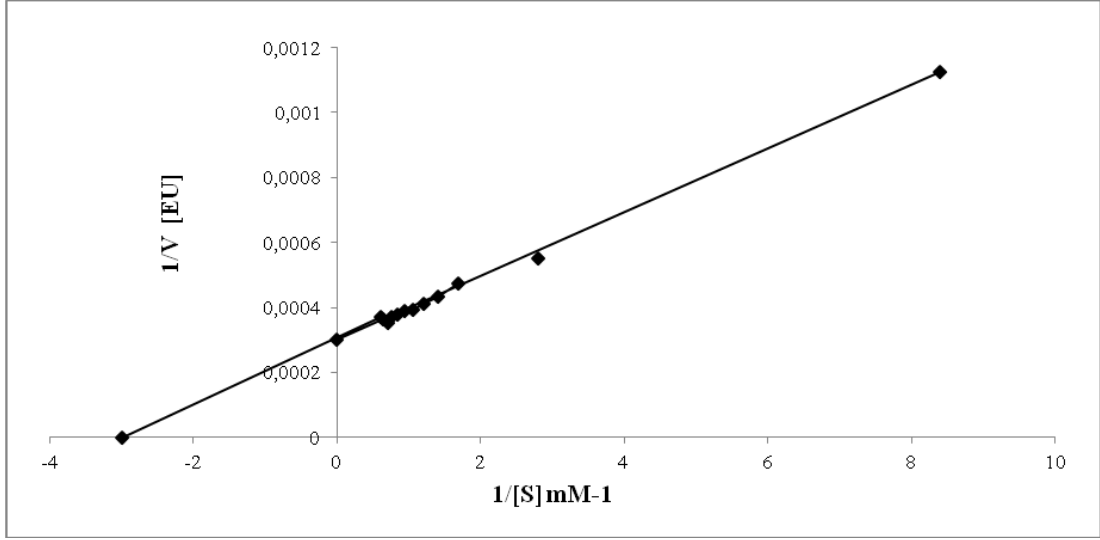
T.harzianum NRRL 13019' dan saflaştırılan β-glukosidaz enziminin 120 dakikalık inkübasyonunun ardından yapılan ölçüm sonuçlarına göre; 45 °C için % 57, 55 °C için % 30, 65 °C için % 8 ve 75 °C için % 2 oranlarında, 85 °C' de ise 43 dakika (2580 saniye) aktivitesini koruduğu belirlenmiştir.

3.5.4 *T.harzianum* NRRL 13019' dan Saflaştırılan β-glukosidaz Enziminin K_M ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi

T.harzianum NRRL 13019' un β-glukosidaz enziminin K_M ve V_{max} değerleri belirlenirken; *p*NPG substratının 5-70 μl arasında değişen konsantrasyonlarda 410 nm' deki enzim aktivite ölçümleri yapılmıştır (Tablo 3.6). Ölçüm sonuçlarından elde edilen aktivite değerleri ile reaksiyon hızları (EU/mL) hesaplanmıştır. Reaksiyon hızı (V) ile 1/[V] değeri, substrat konsantrasyonu [S] ile de 1/[S] değeri elde edilmiştir. Bu değerler ile Şekil 3.10' daki Lineweaver-Burk grafiği çizilmiştir.

Tablo 3.6 *T.harzianum* NRRL 13019' dan saflaştırılan β -glukosidaz enziminin K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan $\text{}zeltilerin$ hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri

50mM Na- Ac tamponu (μ l)	Enzim $\text{}zeltisinin$ Hacmi (μ l)	Substrat $\text{}zeltisinin$ Hacmi (μ l)	Kuyudaki Toplam Hacim (μ l)	Kuyudaki Substrat Kons. [S](mM)	ΔA (410 nm)	Aktivite (U/ml dak)	1/V	1/[S]
125		5		0,1190	0,6570	890,2439	0,0011	8,4030
120		10		0,2380	1,1260	1525,7450	0,0006	4,2010
115		15		0,3570	1,3430	1819,7830	0,0005	2,8010
110		20		0,4760	1,5620	2116,5310	0,0004	2,1000
105		25		0,5950	1,5550	2107,0460	0,0004	1,6800
100		30		0,7140	1,7110	2318,4280	0,0004	1,4000
95	70	35	210	0,8330	1,7940	2430,8940	0,0004	1,2000
90		40		0,9520	1,8810	2548,7800	0,0003	1,0500
85		45		1,0710	1,8970	2570,4610	0,0003	0,9330
80		50		1,1900	1,9530	2646,3410	0,0003	0,8400
75		55		1,3090	2,0000	2710,0270	0,0003	0,7630
70		60		1,4280	2,0950	2838,7530	0,0003	0,7000
65		65		1,5470	2,0260	2745,2570	0,0003	0,6460
60		70		1,6660	1,9920	2699,1870	0,0003	0,6000



Şekil 3.10 *T.harzianum* NRRL 13019 β -glukosidaz enziminin K_M ve V_{max} değerlerinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği

Tablo 3.7 *T.harzianum* NRRL 13019 β -glukosidaz enziminin K_M (mM), V_{max} (EU) ve V_{max}/K_M değerleri

Substrat	K_M (mM)	V_{max} (EU)	V_{max}/K_M
<i>p</i> NPG	0,3340	3333,3340	9980,0410

3.5.5 *T.harzianum* NRRL 13019' dan Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin Genel İnhibitörlerinin IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi

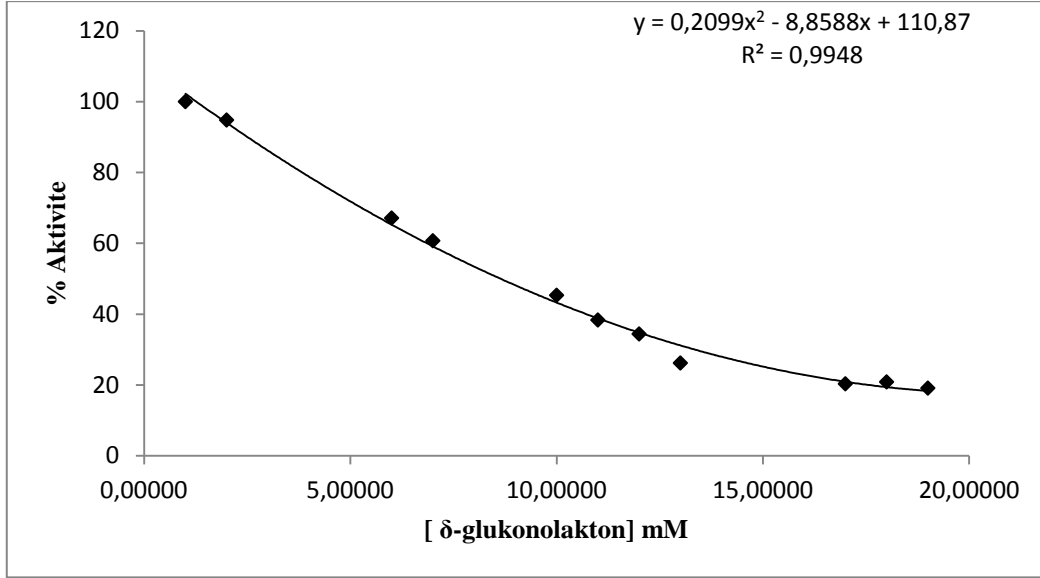
β -glukosidaz enzimlerinin literatürlerde karşımıza en sık çıkan inhibitörlerinin D(+)-Glukoz ve δ -glukonolaktan olduğu görülmektedir. Bundan dolayı bu iki inhibitör maddenin β -glukosidaz enzimi üzerine etkileri incelenmiştir.

3.5.5.1 *T.harzianum* NRRL 13019' dan Saflaştırılan β -glukosidazın İnhibitörü Olan δ -Glukonolaktonun IC₅₀ Değerinin Belirlenmesi

δ -glukonolaktonun *T.harzianum* NRRL 13019 β -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenirken, *p*NPG substratının reaksiyon hacmindeki konsantrasyonu 1,25 mM kullanıldı. δ -glukonolakton bulunmayan ortamdaki enzim aktivitesi %100 aktivite olarak alınmıştır. IC₅₀ değeri belirlenirken 1-60 μ l arasında değişen inhibitör konsantrasyonlarda enzim aktivite değerleri bulunmuş ve bu değerlerin % aktivite hesaplanarak % aktivite-[I] grafiği çizilmiştir.

Tablo 3.8 *T.harzianum* NRRL 13019' dan elde edilerek saflaştırılan β -glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren δ -glukonolaktonun IC₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bu miktarlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları, substrat ve elde edilen sonuçlar

50mM Na Ac Tamponu (μ l)	İnhibitör	Enzim Çözeltilisini n Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	İnhibitör Çözeltilisini n Hacmi (μ l)	Kuyudaki İnhibitör Konsantrasyonu (mM) (*100000)	Absorbans Farkı (ΔA) (410 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
60				0	-	2,0600	1720,9690	100
59				1	0,4464	1,9530	1631,5790	94,8058
59				1	0,8929	1,9580	1635,7560	95,0485
59				1	1,7857	1,8890	1578,1120	91,6990
59				1	3,5714	1,8330	1531,3280	88,9805
58				3	8,9286	1,5890	1327,4850	77,1359
55				5	17,8571	1,4570	1217,2100	70,7281
53				8	26,7857	1,3330	1113,6170	64,7087
50				10	35,7143	1,2310	1028,4040	59,7572
45				15	53,5714	0,9340	780,2840	45,3398
40	δ Glukonolakton	70	70	20	71,4286	0,7900	659,9830	38,3495
35				25	89,2857	0,7090	592,3140	34,4174
30				30	107,1429	0,5400	451,1280	26,2135
25				35	125,0000	0,4880	407,6860	23,6893
20				40	142,8571	0,3470	289,8910	16,8446
15				45	160,7143	0,3630	303,2580	17,6213
10				50	178,5714	0,4190	350,0420	20,3398
5				55	196,4286	0,4300	359,2310	20,8737
0				60	214,2857	0,3940	329,1560	19,1262



Şekil 3.11 *T.harzianum* NRRL 13019' dan saflaştırılan β-glukosidaz enzimi inhibitörü δ-glukonolakton IC₅₀ değeri grafiği

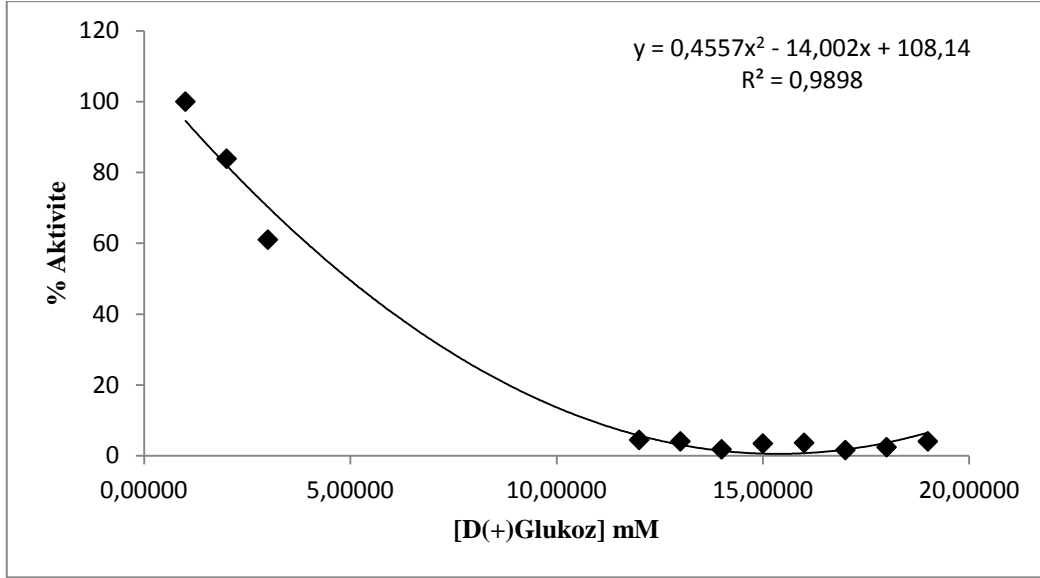
Tablo 3.8' deki veriler kullanılarak δ-glukonolaktonun *p*NPG substratı varlığındaki % Aktivite-[I] grafiği Şekil 3.11' daki gibi çizilmiştir. Grafikteki denklemden yararlanarak *T.harzianum* NRRL 13019 β-glukosidaz enzim aktivitesi üzerine δ-glukonolaktonun IC₅₀ değeri, 8,64 mM olarak hesaplanmıştır.

3.5.5.2 *T.harzianum* NRRL 13019' dan Saflaştırılan β-glukosidazın İnhibitörü Olan D(+)-Glukozun IC₅₀ Değerinin Belirlenmesi

D(+)-Glukozun *T.harzianum* NRRL 13019 β-glukosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenirken, *p*NPG substratının reaksiyon hacmindeki konsantrasyonu 1.25 mM kullanılmıştır. D(+)-Glukoz bulunmayan ortamdaki enzim aktivitesi %100 aktivite olarak alınmıştır. IC₅₀ değeri belirlenirken 1-60 µl arasında değişen inhibitör konsantrasyonlarda enzim aktivite değerleri bulunmuş ve bu değerlerin % aktivite olarak hesaplanarak % aktivite-[I] grafiği çizilmiştir.

Tablo 3.9 *T.harzianum* NRRL 13019' dan elde edilerek saflaştırılan β -glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren D(+)-Glukozun IC₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bu miktarlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları, substrat ile elde edilen sonuçlar

50mM Na Ac Tamponu (μ l)	İnhibitör	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (μ l)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Kuyudaki İnhibitör Konsantrasyonu (mM) (*100000)	Absorbans Farkı (Δ A) (410 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
60				-	-	0,9320	1262,8730	100
59				1	0,4464	0,8930	1210,0270	95,8154
59				1	0,8929	0,8660	1173,4420	92,9184
59				1	1,7857	0,8470	1147,6960	90,8798
59				1	3,5714	0,8270	1120,5960	88,7339
58				3	8,9286	0,7600	1029,8100	81,5450
55				5	17,8571	0,6270	849,5930	67,2746
53	D(+)-Glukoz	70	70	8	26,7857	0,6060	821,1380	65,0214
50				10	35,7143	0,5200	704,6070	55,7939
45				15	53,5714	0,4260	577,2360	45,7081
40				20	71,4286	0,3760	509,4850	40,3433
35				25	89,2857	0,3110	421,4090	33,3691
30				30	107,1429	0,2440	330,6230	26,1802
25				35	125,0000	0,2270	307,5880	24,3562
20				40	142,8571	0,1850	250,6780	19,8497
15				45	160,7143	0,1300	176,1520	13,9485
10				50	178,5714	0,1190	161,2470	12,7682
5				55	196,4286	0,0960	130,0810	10,3004
-				60	214,2857	0,0890	120,5960	9,5493



Şekil 3.12 *T.harzianum* NRRL 13019' dan saflaştırılan β -glukosidaz enziminin inhibitörü D(+)-glukoz IC_{50} değeri grafiği

Tablo 3.9' daki veriler kullanılarak D(+)-Glukozun *p*NPG substratı varlığındaki % Aktivite-[I] grafiği Şekil 3.12' deki gibi çizilmiştir. Grafikteki denklemden yararlanarak *T.harzianum* NRRL 13019 β -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine D(+)-Glukozun IC_{50} değeri, 4,95 mM olarak hesaplanmıştır.

3.5.6 *T.harzianum* NRRL 13019' dan Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin Genel İnhibitörlerinin İnhibisyon Tipinin ve K_i Değerinin Belirlenmesi

β -glukosidazların genel inhibitörü olan, D(+)-Glukoz ve δ -glukonolakton inhibitörleri kullanılarak *T.harzianum* NRRL 13019 β -glukosidaz enzimlerinin inhibisyon tipleri ve K_i değerleri belirlenmiştir.

3.5.6.1 *T.harzianum* NRRL 13019 İçin β -glukosidazların Genel İnhibitörü Olan δ -glukonolaktonun İnhibisyon Tipinin ve K_i Değerinin Belirlenmesi

T.harzianum NRRL 13019 β -glukosidaz enziminin δ -glukonolakton inhibitörüne karşı K_i sabiti belirlenirken, öncelikle inhibitörsüz reaksiyon ortamında farklı *p*NPG substrat konsantrasyonuna bağlı olarak aktiviteler bulunmuştur. Ardından $1,70 \cdot 10^{-5}$ mM ve $5,3 \cdot 10^{-6}$ mM sabit δ -glukonolakton konsantrasyonlarındaki ve *p*NPG substratının farklı konsantrasyonlarında enzim aktiviteleri belirlenmiştir (Tablo 3.10;Tablo 3.11;Tablo 3.12). Bu değerlerden $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri hesaplanarak Lineweaver–Burk grafiğinde I_1 ve I_2 doğruları çizilmişt (Şekil 3.13) bu grafikten yararlanarak K_i değerleri ve inhibisyon tipleri tespit edilmiştir.

Tablo 3.10 *T.harzianum* NRRL 13019' dan elde edilerek saflaştırılan β -glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren δ -glukonolaktonun K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bu miktarlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları, substrat ve elde edilen sonuçlar

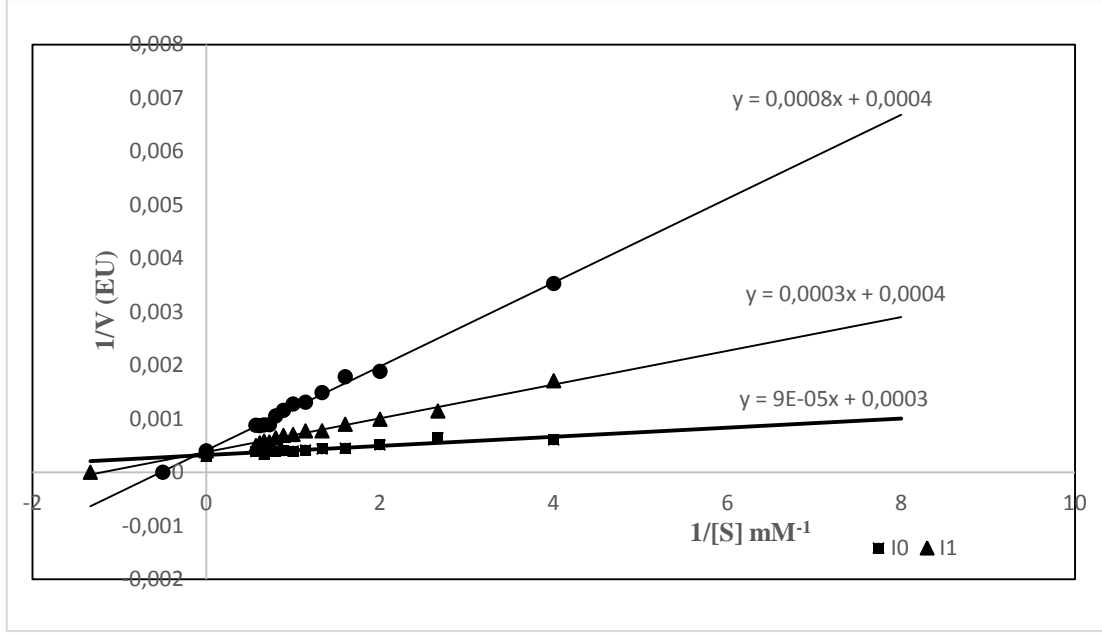
50mM Na-Ac Tamponu (μ l)	Enzim Çöz. Hacmi (μ l)	Subs.Çöz.Hacmi (μ l)	İnh.Çöz. Hacmi (μ l)	Kuyudaki Toplam Hacim (μ l)	Kuyudaki Subs.Kons. [S](mM)	Kuyudaki İnh. Kons. [I](mM)	ΔA (410 nm)	Aktivite (U/ml dak.)	1/V	1/[S]
120		10			0,2500		1,2190	1651,7620	0,0006	4,0000
115		15			0,3750		1,1430	1548,7800	0,0006	2,6667
110		20			0,5000		1,4370	1947,1540	0,0005	2,0000
105		25			0,6250		1,6410	2223,5770	0,0004	1,6000
100		30			0,7500		1,6920	2292,6830	0,0004	1,3333
95		35			0,8750		1,7720	2401,0840	0,0004	1,1428
90	70	40	0	280	1,0000	0	1,8660	2528,4550	0,0003	1,0000
85		45			1,1250		1,8390	2491,8700	0,0004	0,8889
80		50			1,2500		1,8560	2514,9050	0,0003	0,8000
75		55			1,3750		1,8450	2500,0000	0,0004	0,7272
70		60			1,5000		2,1850	2960,7050	0,0003	0,6667
65		65			1,6250		1,8350	2486,4500	0,0004	0,6153
60		70			1,7500		1,9080	2585,3660	0,0003	0,5714

Tablo 3.11 *T.harzianum* NRRL 13019' dan elde edilerek saflaştırılan β -glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren δ -glukonolaktonun K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bu miktarlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları, substrat ve elde edilen sonuçlar

50 mM Na-Ac Tamponu (μ l)	Enzim Çöz. Hacmi (μ l)	Subs. Çöz. Hacmi (μ l)	İnh. Çöz. Hacmi (μ l)	Kuyudaki Toplam Hacim (μ l)	Kuyudaki Subs. Kons. [S] (mM)	Kuyudaki İnh. Kons. [I] (mM)	ΔA (410 nm)	Aktivite (U/ml dak)	1/V	1/[S]
115		10			0,2500		0,4310	584,0108	0,0017	4,0000
110		15			0,3750		0,6440	872,6287	0,0011	2,6667
105		20			0,5000		0,7440	1008,1300	0,0009	2,0000
100		25			0,6250		0,8220	1113,8210	0,0008	1,6000
95		30			0,7500		0,9520	1289,9730	0,0007	1,3333
90		35			0,8750		0,9530	1291,3280	0,0007	1,1428
85	70	40	5	280	1,0000	$1,70 \cdot 10^{-5}$	1,0430	1413,2790	0,0007	1,0000
80		45			1,1250		1,0710	1451,2200	0,0006	0,8889
75		50			1,2500		1,1470	1554,2010	0,0006	0,8000
70		55			1,3750		1,3030	1765,5830	0,0005	0,7272
65		60			1,5000		1,2660	1715,4470	0,0005	0,6667
60		65			1,6250		1,3430	1819,7830	0,0004	0,6153
55		70			1,7500		1,4780	2002,7100	0,0004	0,5714

Tablo 3.12 *T.harzianum* NRRL 13019' dan elde edilerek saflaştırılan β -glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren δ -glukonolaktonun K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bu miktarlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları, substrat ve elde edilen sonuçlar

50mM Na-Ac Tamponu (μ l)	Enzim Çöz. Hacmi (μ l)	Subs.Çöz. Hacmi (μ l)	İnh.Çöz. Hacmi (μ l)	Kuyudaki Toplam Hacim(μ l)	Kuyudaki Subs. Kon [S] (mM)	Kuyudaki inh. Kons. [I] (mM)	ΔA (410 nm)	Aktivite (U/ml dak)	1/V	1/[S]
80		10			0,2500		0,2090	283,1978	0,0035	4,0000
70		20			0,5000		0,3910	529,8103	0,0018	2,0000
65		25			0,6250		0,4130	559,6206	0,0017	1,6000
60		30			0,7500		0,4950	670,7317	0,0014	1,3333
55	70	35	15	280	0,8750	$5,3 \cdot 10^{-6}$	0,5630	762,8726	0,0013	1,1428
50		40			1,0000		0,5780	783,1978	0,0012	1,0000
45		45			1,1250		0,6370	863,1436	0,0011	0,8889
40		50			1,2500		0,7000	948,5095	0,0010	0,8000
35		55			1,3750		0,8290	1123,3060	0,0008	0,7272
30		60			1,5000		0,8330	1128,7260	0,0008	0,6667



Şekil 3.13 *T.harzianum* NRRL 13019' dan saflaştırılan β -glukosidaz enzimine, *p*NPG substratı varlığında, δ -glukonolakton inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burg grafiği

Lineweaver-Burk grafiğinden (Şekil 3.13), δ -glukonolaktonun *T.harzianum* NRRL 13019 β -glukosidaz enziminin, *p*NPG substratı varlığında, kompetitive (yarışmalı) tipte inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. δ -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 3.13) K_i değerinin $3,9 \times 10^{-7} \pm 2,0 \times 10^{-8}$ olduğu hesaplanmıştır.

3.5.6.2 *T.harzianum* NRRL 13019 İçin β -glukosidazların Genel İnhibitörü Olan D(+)*Glukozun İnhibisyon Tipinin ve K_i Değerinin Belirlenmesi*

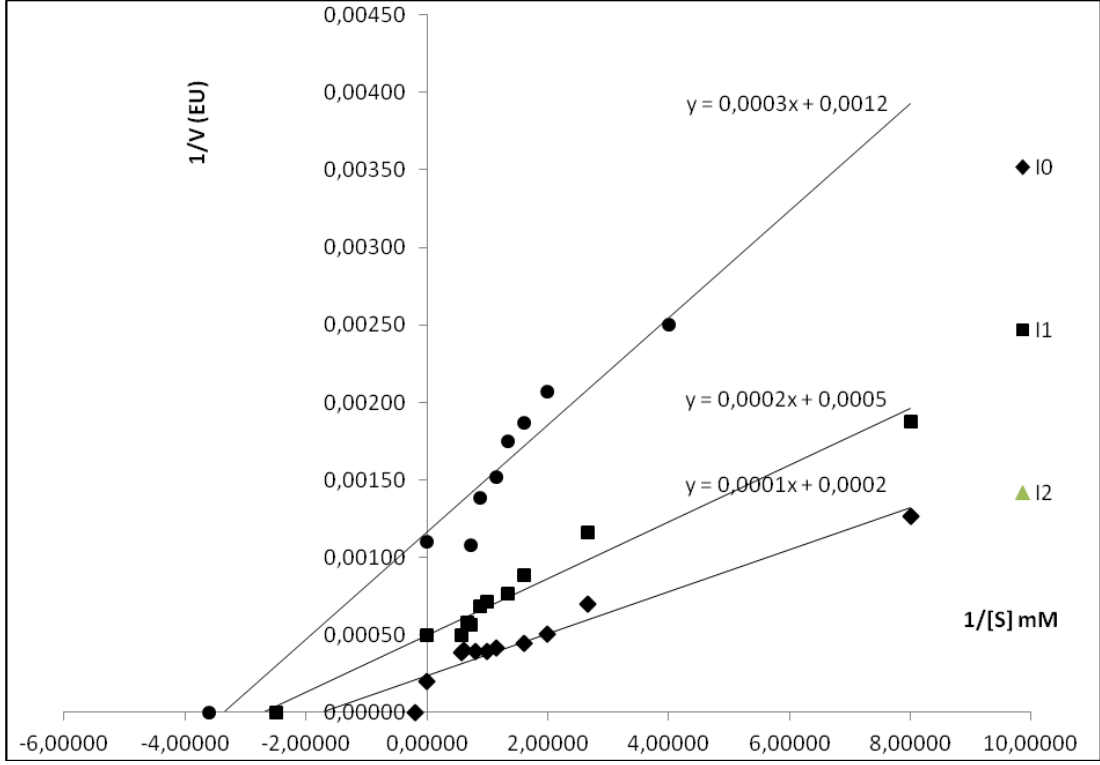
T.harzianum NRRL 13019 β -glukosidaz enziminin D(+)*glukoz inhibitörüne karşı K_i sabiti belirlenirken, öncelikle inhibitörsüz reaksiyon ortamında farklı *p*NPG substrat konsantrasyonuna bağlı olarak aktiviteler bulunmuştur. Ardından D(+)*glukozun $1,70 \cdot 10^{-5}$ mM ve $1,07 \cdot 10^{-4}$ mM sabit konsantrasyonlarındaki ve *p*NPG substratının farklı konsantrasyonlarında enzim aktiviteleri belirlenmiştir (Tablo 3.13;Tablo 3.14). Bu aktivitelerden $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri hesaplanarak Lineweaver–Burk grafiğinde I_1 ve I_2 doğruları çizilmiş (Şekil 3.14) bu grafikten yararlanarak K_i değerleri ve inhibisyon tipleri tespit edilmiştir.**

Tablo 3.13 *T.harzianum* NRRL 13019' dan elde edilerek saflaştırılan β -glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren D(+)-Glukozun K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bu miktarlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları, substrat ve elde edilen sonuçlar

50mM Na-Ac Tamponu (μ l)	Enzim Çöz. Hacmi (μ l)	Subs.Çöz. Hacmi (μ l)	İnh.Çöz. Hacmi (μ l)	Kuyudaki Toplam Hacim (μ l)	Kuyudaki Subs.Kons. [S](mM)	Kuyudaki İnh. Kons. [I](mM)	ΔA (410 nm)	Aktivite (U/ml dak.)	1/V	1/[S]
125		5			0,1250		0,5820	788,6178	0,0012	8,0000
115		15			0,3750		1,0500	1.422,7642	0,0007	2,6667
110		20			0,5000		1,4560	1.972,8997	0,0005	2,0000
105		25			0,6250		1,6620	2.252,0325	0,0004	1,6000
95	70	35	0	280	0,8750	0	1,7700	2.398,3739	0,0004	1,1428
90		40			1,0000		1,8860	2.555,5555	0,0003	1,0000
80		50			1,2500		1,8650	2.527,1002	0,0004	0,8000
65		65			1,6250		1,8510	2.508,1300	0,0004	0,6153
60		70			1,7500		1,9210	2.602,9810	0,0003	0,5714
120		5			0,1250		0,3930	532,5203	0,0018	8,0000
110		15			0,3750		0,6350	860,4336	0,0011	2,6667
100		25			0,6250		0,8320	1.127,3712	0,0008	1,6000
95		30			0,7500		0,9600	1.300,8130	0,0007	1,3333
85	70	40	5	280	1,0000	$1,70 \cdot 10^{-5}$	1,0330	1.399,7290	0,0007	1,0000
80		45			1,1250		1,0810	1.464,7696	0,0006	0,8889
70		55			1,3750		1,3120	1.777,7777	0,0005	0,7272
65		60			1,5000		1,2760	1.728,9972	0,0005	0,6667
55		70			1,7500		1,4770	2.001,3550	0,0005	0,5714

Tablo 3.14 *T.harzianum* NRRL 13019' dan elde edilerek saflaştırılan β -glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren D(+)-Glukozun K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bu miktarlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları, substrat ve elde edilen sonuçlar

50mM Na-Ac Tamponu (μ l)	Enzim Çöz. Hacmi (μ l)	Subs.Çöz. Hacmi (μ l)	İnh.Çöz. Hacmi (μ l)	Kuyudaki Toplam Hacim(μ l)	Kuyudaki Subs. Kon [S] (mM)	Kuyudaki inh. Kons. [I] (mM)	ΔA (410 nm)	Aktivite (U/ml dak)	1/V	1/[S]
80		10			0,2500		0,2950	399,7290	0,0025	4,0000
70		20			0,5000		0,3560	482,3848	0,0020	2,0000
65		25			0,6250		0,3950	535,2303	0,0018	1,6000
60	70	30	40	280	0,7500	$1,07 \cdot 10^{-4}$	0,4210	570,4607	0,0017	1,3333
55		35			0,8750		0,4850	657,1815	0,0015	1,1428
45		45			1,1250		0,5330	722,2222	0,0013	0,8889
35		55			1,3750		0,6840	926,8292	0,0010	0,7272



Şekil 3.14 *T.harzianum* NRRL 13019' dan saflaştırılan β -glukosidaz enzimine, *p*NPG substratı varlığında, D(+)-glukoz inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği

Lineweaver-Burk grafiğinden (Şekil 3.14), D(+)-glukozun *T.harzianum* NRRL 13019 β -glukosidaz enziminin, *p*NPG substratı varlığında, nonkompetatif (yarışmasız) tipte inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. D(+)-glukoz [I1]= $1,70 \cdot 10^{-5}$ mM ve [I2]= $1,07 \cdot 10^{-4}$ mM olarak iki farklı konsantrasyonundaki aktiviteler kullanılarak çizilen grafikten (Şekil 3.14) K_i değerinin $2,6 \cdot 10^{-3} \pm 1,42 \cdot 10^{-3}$ olduğu hesaplanmıştır.

4. TARTIŞMA SONUÇ

Araştırmamızda dünyada geniş bir yayılıma sahip olan ve çoğunlukla toprak mikrofungusu olarak bilinen *Trichoderma* cinsine ait *Trichoderma harzianum* türü enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. *Trichoderma harzianum*'dan KSF tekniği ile tarımsal yan ürün olan mısır koçanının substrat olarak kullanımıyla β -glukosidaz enzimi elde edilmiş ve bu enzim saflaştırılarak biyokimyasal, elektroforetik ve kinetik özelliklerinin belirlenmesi sağlanmıştır.

β -glukosidaz enziminin saflaştırma işlemi sırasıyla, amonyum sülfat çöktürmesi ve Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (Sephrose-4B-L-Tirozin-1-Naftilamin) yöntemleri kullanılarak iki basamakta gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan β -glukosidaz enziminin SDS ve Native Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile saflığı ve alt birimlerinin varlığı/sayısı kontrol edilerek elektroforetik özellikleri belirlenmiştir. *Trichoderma harzianum* NRRL 13019' dan saflaştırılan β -glukosidaz enziminin biyokimyasal özellikleri ise optimum pH, optimum sıcaklık ve enzimin termal kararlılığı ile tespit edilmiş olup bu enzimin kinetik özelliklerinin belirlenmesi için de K_m ve V_{max} değerleri incelenmiştir. Bunun yanı sıra β -glukosidaz enziminin genel inhibitörleri olan D(+)glukoz ve δ -glukonolaktonun saflaştırılan enzim aktivitesine olan inhibisyon etkisi *p*-nitrofenil- β -D-glukopiranosit (*p*NPG) substratı varlığında tespit edilmiştir.

Tezin ilk basamağında *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 suşu, %5 Karboksimetil Selüloz (CMC) içeren Patates Dekstroz Agar (PDA) besiyeri plaklarına inoküle edilmiş ve inkübasyon süresi sonunda yapılan hidroliz zon tayini ile β -glukosidaz pozitif olarak değerlendirilip deneylerde kullanılmasına karar verilmiştir. Saddler, (1982) çalışmasında bazı selülozik funguslara hidroliz zon tayini uygulamış ve elde ettiği veriler ışığında bu funguslar arasından en fazla selüloz üreticisi fungusun *Trichoderma viride* E58 suşu olduğunu ve bunu *Trichoderma viride* D43 suşunun izlediğini belirtmiştir [149]. Benzer şekilde Devi ve Kumar (2012) araştırmalarında *Aspergillus* türüne ait 6 suş ile yaptıkları hidroliz zon tayini sonucunda *Aspergillus* sp. PIW-1 ve *Aspergillus* sp. TSMW-1 izolatlarının selüloz pozitif olduğunu rapor etmişlerdir [150]. Prasad ve ark., (2013) ise Hint

topraklarından izole ettikleri *Streptomyces griseorubens* türüne ait 15 farklı izolat ile gerçekleştirdikleri hidroliz zon tayini sonucunda bu türe ait St-1 suşunun yüksek selüloz aktivitesine sahip olduğunu rapor etmişlerdir [151]. Shahriarinnour ve ark., (2011) 7' si *Aspergillus* ,3' ü *Trichoderma* olmak üzere 10 farklı izolat ile gerçekleştirdikleri hidroliz zon tayini sonucunda, en büyük hidroliz zonuna sahip fungusu *Aspergillus terreus* R4 olarak belirlediklerini çalışmalarını sonucunda rapor etmişlerdir [152]. Benzer bir çalışmada Rathore ve ark., (2014) fungus, bakteri, maya ve aktinomiset olmak üzere 36 farklı mikroorganizma izolatını oluşturdukları hidroliz zonları açısından değerlendirmiş ve *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Rhizopus* ve *Trichoderma* cinslerine ait izolatların çoğunun selüloz pozitif olduğunu, bu cinslere ait *Trichoderma koningii*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. ve *Penicillium* sp. türlerinin ise en fazla selüloz üreticisi funguslar olduğunu belirtmişlerdir [153].

Uygun mikroorganizmanın seçimi KSF için oldukça önem taşımaktadır. Bununla birlikte KSF sürecini etkileyen birçok önemli parametre vardır. Bunlar; mikroorganizma için uygun substrat seçimi, ortamın nemlendirme sıvısı ve pH'ı, inkübasyon sıcaklığı ve inkübasyon süresidir. Çalışmamızın bir sonraki basamağında KSF kültür ortamında tarımsal yan ürün olan mısır koçanı öğütülüp 24 saat süre ile kurutulduktan sonra katı substrat olarak kullanılmış ve yukarıda bahsedilen parametreler çalışılarak, β -glukosidaz enzim üretimi için mikrofungusun optimum gelişme koşulları belirlenmiştir.

Yapmış olduğumuz çalışmada β -glukosidaz enzimi, KSF ortamında öğütülmüş mısır koçanının katı substrat olarak kullanılması ile β -glukosidaz aktivitesine sahip olduğu belirlenen *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 suşundan elde edilmiştir. Liu ve Yang (2007) araştırmalarında sirke üretim posası (100g) ve buğday kepeğini (150g) KSF' de substrat olarak kullanarak *Trichoderma koningii* AS3.4262' den optimum koşullarda selüloz enzimi elde ettiklerini rapor etmişlerdir. İncelemeleri sonucunda selüloz aktivitesinin yüksek olduğu mikrofungusun gelişme koşulları araştırılmış ve selüloz enzimi için, optimum sirke üretim posası miktarı %40; optimum pH değeri 5,0; optimum sıcaklık değeri 30°C; optimum inkübasyon süresi ise 84 saat olarak kaydedilmiştir [38]. Iqbal ve ark., (2010) ise çalışmalarında buğday samanını KSF' de substrat olarak kullanarak *Trichoderma harzianum*' un selüloz enzim üretimi için optimum gelişme sıcaklığını 35°C, optimum pH değerini

5,5 ve optimum inkübasyon süresini 7 gün olarak saptadıklarını belirlemişlerdir. Ayrıca araştırmalarında farklı nem miktarlarının enzim üretimine etkisini de incelemişler ve KSF ortamında %10-50 arasında nem miktarlarını çalışarak, selüloz enzimi üretimi için nem miktarını %40 olarak tespit etmişlerdir. Bunun yanı sıra selüloz enziminin üretimi için farklı inokulum miktarının etkisini de araştırmışlar ve KSF ortamının %5-25(v/v) arasında inokulum miktarını deneyerek maksimum selüloz aktivitesi için inokulum miktarını %10 (v/v) olarak saptamışlardır [139]. Maurya ve ark., (2012) buğday kepeğini KSF' de substrat olarak kullanarak *Trichoderma reesei* NCIM 992' den selüloz enzimi elde ettikleri çalışmalarında selüloz enzimi eldesi için optimum koşulları belirlemişler ve optimum sıcaklığı 30°C, optimum pH'ı 5,0 ve optimum inkübasyon süresini 6 gün, nem miktarlarını ise %70 olarak rapor etmişlerdir [154]. Wang ve ark., (2005) çalışmalarında mısır samanını KSF'de substrat olarak kullanarak *Trichoderma reesei* LW1' den optimum koşullarda selüloz elde etmişlerdir. Araştırmalarında FPase ve CMCase aktiviteleri için optimum mikrofungus gelişim koşulları araştırmışlar ve optimum sıcaklık değerini 28°C, pH değerini 5,5 ve maksimum aktivitenin gözlemlendiği optimum inkübasyon süresini ise 72 saat olarak belirlemişlerdir [155]. Nadagouda ve ark., (2016) ise pirinç kepeğini KSF' de substrat olarak kullanarak *Trichoderma viride* GSG12' den optimum koşullarda selüloz elde ettiklerini yaptıkları çalışma ile rapor etmişlerdir. Araştırmaları sonucunda selüloz eldesi için optimum sıcaklık değerini 32°C, optimum inkübasyon süresini 120 saat, optimum pH değerini 5,5, nem miktarını %70 ve inokulum miktarını 2×10^8 olarak tespit etmişlerdir [156]. Fatma ve ark., (2010) yaptıkları çalışmalarında KSF' de pirinç samanını substrat olarak kullanarak *Trichoderma reesei* F-418' den optimum koşullarda selüloz elde etmişlerdir. Bu amaçla *Trichoderma reesei* F-418'in maksimum enzim üretimi için optimum nem miktarını %75, sıcaklık değerini $28 \pm 2^\circ\text{C}$, nemlendirme sıvısı olarak sodyum hidroksit, pH değerini 4,8 ve inkübasyon süresini 5 gün olarak belirlemişlerdir [157]. Ghadi ve ark., (2011) çalışmalarında pirinç kabuğunun KSF' de substrat olarak kullanılması ile *Trichoderma reesei* PTCC 5142 suşunun maksimum selüloz enzimi aktivitesini belirlemek için mikrofungus gelişim sıcaklık değerini 30°C, optimum inkübasyon süresini ise 4 gün olarak rapor etmişlerdir [140].

Çalışmamızda ise öğütülmüş mısır koçanının KSF' de substrat olarak kullanılması ile *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 suşundan β -glukosidaz enzimi eldesi için; nemlendirme sıvısı Na_2HPO_4 tamponu ve nem oranı %55, optimum

inkübasyon sıcaklığı 25°C, optimum pH değeri 7,0 ve optimum inkübasyon süresi 7 gün olarak belirlenmiştir (Şekil 3.2;Şekil 3.1;Şekil 3.3). Elde edilen bu değerler literatür verileri ile karşılaştırıldığında ise; maksimum enzim aktivitesi için *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 suşunun optimum gelişme sıcaklığı ve nem isteğinin literatürlerde yer alan diğer *Trichoderma* suşlarına göre daha düşük, inkübasyon süresinin biraz daha uzun ve pH değerinin ise nötral değerde olduğu belirlenmiştir.

Trichoderma harzianum NRRL 13019 suşundan elde edilen kısmi saflaştırılmış β-glukosidaz enziminin amonyum sülfat çöktürme aralığı çalışmamızda %40-70 olarak bulunmuş ve sonraki saflaştırma işlemlerinde kısmi saflaştırılmış ekstrakta %40-70 doygunluğunda amonyum sülfat tuz çöktürmesi uygulanmıştır. Önceki araştırmalar β-glukosidaz enziminin saflaştırılması için kullanılan amonyum sülfat çöktürme aralıklarının farklılık gösterdiği görülmektedir. Macris (1984) *Alternaria alternata*' dan optimum koşullarda elde ettiği β-glukosidaz enziminin amonyum sülfat çöktürme aralığını %20-80, Rashid ve Siddiqui (1997) *Aspergillus niger* NIAB280' den ve Ramani ve ark., (2012) ise *Penicillium funiculosum* NCL1' den elde ettikleri β-glukosidaz enziminin amonyum sülfat çöktürme aralıklarını sırasıyla %55-70 ve %25-50 olarak belirlemişlerdir [55, 158, 159]. Zhang ve ark., (2011) ise β-glukosidaz enzimini *Tolypocladium cylindrosporum* Syzx4' ten optimum koşullarda elde etmişler ve elde ettikleri ham enzimi %80' lik amonyum sülfat çözeltisinde bir gece bekletip sonrasında santrifüjleyerek ön saflaştırma yapmışlardır [160].

Ayrıca Amouri ve Gargouri (2006) filamentli bir fungus olan *Stachybotrys* suşlarından, Liu ve ark., (2012) ise *Aspergillus fumigatus* Z5' ten optimum koşullarda elde ettikleri β-glukosidaz enzimine %80, Souza ve ark., (2010) ise termofilik bir fungus olan *Humicola insolens*' den elde ettikleri β-glukosidaz enzimine %75, Madhu ve ark., (2009) da *Aspergillus sydowii* BTMFS 55' ten optimum koşullarda elde ettikleri β-glukosidaz enzimine %60 doygunluğunda amonyum sülfat çöktürmesi uyguladıklarını yaptıkları çalışmalar ile rapor etmişlerdir [161, 162, 163, 164]. Tüm bu araştırmalar ile karşılaştırıldığında, bizim çalışmamız sonucunda belirlenen amonyum sülfat çöktürme aralığının (%40-70) bu araştırmalarla bir benzerlik göstermediği ve birkaçına göre geniş olmakla birlikte geneline bakıldığında daha dar bir aralığa sahip olduğu görülmektedir.

Araştırmamızda amonyum sülfat çöktürme işlemi sonunda *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 β -glukosidaz enzimi % 6,869 verimle 1,535 kat saflaştırılmıştır (Tablo 3.5). Amonyum sülfat çöktürmesi sonunda belirlenen bu parametrelerin yapılan farklı araştırmalarda; *Alternaria alternata*' dan elde edilen β -glukosidaz enziminin %72 verimle 1,8 kat; *Tolyocladium cylindrosporum* Syzx4' ten elde edilen β -glukosidaz enziminin %70,27 verimle 1,38 kat; *Aspergillus fumigatus* Z5' ten elde edilen β -glukosidaz enziminin %92,8 verimle 1,1 kat; *Humicola insolens*' den elde edilen β -glukosidaz enziminin %95 verimle 1,5 kat saflaştırıldığı belirlenmiştir [55, 160, 162, 163].

Diğer çalışmalarda ise amonyum sülfat çöktürme yöntemiyle *Aspergillus sydowii* BTMFS 55' ten, *Penicillium simplicissimum* H-11' den, *Aspergillus ochraceus* MTCC 1810' dan ve *Aspergillus oryzae*' dan elde edilen β -glukosidaz enziminin sırasıyla %4 verimle 2 kat, %49,8 verimle 1,12 kat; %81,73 verimle 1,94 kat %83 verimle 32,2 kat saflaştırıldığı belirtilmiştir [164, 165, 166].

Bu araştırmaların amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda enzimin % verim ve saflaştırma katsayı sonuçlarına bakıldığında değerlerin birbirinden farklı olduğu görülmekte olup, bu farklılığın çalışılan mikroorganizmadan, uygulanan amonyum sülfat miktarından veya incelemelerin yapıldığı ortam koşullarından kaynaklanabileceğini söylemek mümkündür.

Yapmış olduğumuz bu çalışmada amonyum sülfat çöktürmesinden sonra Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi tekniğinin kullanılmasıyla birlikte, saflaştırma işlemi iki basamakta gerçekleştirilmiştir. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi işlemi Sepharose-4B-L-Tirozin-1-Naftilamin hidrofobik jelinin kullanılmasıyla, *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 suşundan elde edilen β -glukosidaz enzimi %18,022 verimle 29,107 kat saflaştırılmıştır (Tablo 3.5). Yun ve ark., (2001) *Trichoderma harzianum* C-4 suşundan elde ettikleri β -glukosidaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi, Jel Filtrasyon, Anyon Değişim ve Kolon Kromatografisi tekniklerini kullanarak %6 verimle 24,7 kat; Asic ve ark., (2015) *Agaricus bisporus*' dan elde ettikleri β -glukosidaz enzimini Sepharose-4B-L-Tirozin-1-Naftilamin jelini kullanarak Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile %4,05 verimle 10,12 kat; Nazir ve ark., (2009) da *Aspergillus terreus* AN₁ suşundan elde ettikleri aynı enzimi Phenyl-Sepharose jelini kullanarak Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi tekniği ile %9,19 verimle 76,6 kat saflaştırdıklarını çalışmalarını sonunda rapor etmişlerdir [52, 131, 109]. Literatürlerde farklı organizmalardan elde edilen β -glukosidaz enziminin

amonyum sülfat çöktürmesi sonunda birkaç aşamalı kromatografik yöntemler kullanılarak saflaştırıldıkları rapor edilmiştir. Zhao ve ark., (2009) *Cladosporium fulvum*' dan elde ettikleri β -glukosidaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi ardından İyon Değişim Kromatografisi, Jel Filtrasyon Kromatografisi ve Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi tekniklerini kullanarak %6,8 verimle 540 kat saflaştırmışlardır [132]. Rashid ve Siddiqui (1997) *Aspergillus niger* NIAB280' den elde ettikleri β -glukosidaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesinin ardından Hidrofobik Etkileşim, Anyon Değişim ve Jel Filtrasyon Kromatografisi teknikleri ile %28 verimle 46,12 kat saflaştırdıklarını çalışmalarında belirtmişlerdir [158]. Qi ve ark., (2009) da *Aspergillus sp.* MT-0204 suşundan elde ettikleri β -glukosidaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi, İyon Değişim ve Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi tekniklerini kullanarak %24,5 verimle 23,44 kat saflaştırmışlardır [167]. Bhatti ve ark., (2006) *Aspergillus niger* NFCCP' den elde ettikleri β -glukosidaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi sonunda Anyon Değişim ve Jel Filtrasyon Kromatografisi tekniklerini kullanarak %28,43 verimle 7,50 kat; Bhat ve ark., (1993) *Sporotrichum thermophile* IIS 220' den elde ettikleri β -glukosidaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesinin ardından İyon Değişim ve Jel Filtrasyon Kromatografisi ile %46 verimle 16 kat; Kitprechanich ve ark., (1986) *Aspergillus fumigatus*' dan elde ettikleri β -glukosidaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesinin sonunda Jel Filtrasyon, İyon Değişim ve Hidroksilapatit Kromatografisini kullanarak %22 verimle 131 kat saflaştırdıklarını çalışmaları sonucunda rapor etmişlerdir [168, 169, 170]. Ayrıca Christakopoulos ve ark., (1994) *Fusarium oxysporum* F3' den elde ettikleri β -glukosidaz enzimini Jel Filtrasyon ve İyon Değişim Kromatografisini kullanarak %65,4 verimle 17,6 kat; Chirico ve Brown (1987) *Trichoderma reesei* QM9414' den elde ettikleri β -glukosidaz enzimini Anyon ve Katyon Kromatografisini kullanarak %31 verimle 250 kat; Workman ve Day (1982) *Aspergillus terreus*' dan elde ettikleri β -glukosidaz enzimini İyon Değişim ve Afinite Kromatografisi ile %6 verimle 125 kat; Saibi ve Gargouri (2011) *Stachybotrys microspora*' dan elde ettikleri β -glukosidaz enzimini İyon Değişim ve Jel Filtrasyon Kromatografisi tekniklerini kullanarak %75 verimle 16 kat saflaştırdıklarını yaptıkları çalışmalar sonucunda rapor etmişlerdir [134, 171, 172, 173]. Li ve ark., (2005) ise çalışmalarında *Camellia sinensis*'den elde ettikleri β -glukosidaz enzimini aseton ve amonyum sülfat çöktürmesinin ardından İyon Değişim ve Sıvı Kromatografisi tekniklerini kullanarak %1,26 verimle 117 kat saflaştırdıklarını rapor etmişlerdir [174].

Çalışmamızda *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 suşundan elde edilen β -glukosidaz enziminin saflaştırma sonuçlarını, Yun ve ark., (2001)' nin aynı organizmadan elde ettikleri β -glukosidaz enziminin saflaştırma sonuçları ile karşılaştırdığımızda; hem % verimleri hem de saflaştırma katsayılarının bizim çalışmamızda daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu farklılığın sebebinin kullanılan suşların, çalışmaların yapıldığı ortam koşullarının, uygulanan amonyum sülfat doygunluğunun ve kullanılan kromatografi tekniklerinin farklı olmasından kaynaklandığını söyleyebiliriz.

Çalışmamızda mısır koçanının katı substrat olarak kullanılması ile *Trichoderma harzianum* NRRL 13019' dan KSF ortamında optimum inkübasyon koşullarında elde edilen ve iki aşamada saflaştırılan β -glukosidaz enziminin saflığını ve alt birimlerinin varlığı/sayısını kontrol etmek için NATİVE/SDS poliakrilamid jel elektroforezi yapılmıştır. Şekil 3.6' da görüldüğü üzere *Trichoderma harzianum* NRRL 13019' dan saflaştırılan β -glukosidaz enziminin SDS-PAGE ve NATİVE-PAGE'de yaklaşık 110 kDa hizasında tek bant gözlenmiştir. Yapılan farklı çalışmalarda Pal ve ark., (2010) filamentli bir fungus olan *Termitomyces clypeatus* MTCC 5091' den saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin SDS-PAGE ile 110 kDa; Souza ve ark., (2010) termofilik bir fungus olan *Humicola insolens*' den saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin SDS-PAGE ile 55 kDa; Christakopoulos ve ark., (1994) *Fusarium oxysporum* F3' den saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin SDS-PAGE ile 110 kDa; Ramani ve ark., (2012) *Penicillium funiculosum* NCL1' den saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin SDS-PAGE ile yaklaşık 120 kDa; Rashid ve Siddiqui (1997) *Aspergillus niger* NIAB280' den saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin SDS-PAGE ile 100 kDa; Nazir ve ark., (2009) *Aspergillus terreus* AN₁ suşundan saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin SDS-PAGE ile 98 kDa; Zhao ve ark., (2009) *Cladosporium fulvum*' dan saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin SDS-PAGE ile 97 kDa; Qi ve ark., (2009) *Aspergillus* sp. MT-0204' den saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin SDS-PAGE ile 42 kDa; Bhat ve ark., (1993) *Sporotrichum thermophile* IIS 220' den saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin SDS-PAGE ile 110 kDa molekül ağırlığına sahip olduğunu belirtmişlerdir [175, 163, 134, 159, 158, 109, 132, 167, 169].

Trichoderma harzianum NRRL 13019' dan saflaştırılan β -glukosidaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH ve sıcaklık değerleri belirlenmiş ve pH

değeri 4,0 ve sıcaklık ise 65°C olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.7;Şekil 3.8). Farklı araştırmacıların yaptıkları çalışmalarda, Narasimha ve ark., (2016) *Aspergillus niger*' den saflaştırdıkları β-glukosidaz enziminin optimum pH değerini 5,0 , sıcaklık değerini 50°C; Ma ve ark., (2011) *Aspergillus glaucus*' dan saflaştırdıkları β-glukosidaz enziminin optimum pH değerini 3,6 ve optimum sıcaklık değerini 60°C; Irshad ve ark., (2013) *Trichoderma viride*' den saflaştırdıkları β-glukosidaz enziminin optimum pH ve optimum sıcaklık değerlerini sırasıyla 6,0 ve 60°C; Pal ve ark., (2010)' nın *Termitomyces clypeatus* MTCC 5091' den saflaştırdıkları β-glukosidaz enziminin optimum pH ve sıcaklık değerlerini sırasıyla 5,0 ve 45°C; Kitpreechavanich ve ark., (1986) *Aspergillus fumigatus*' dan saflaştırdıkları β-glukosidaz enziminin optimum pH değerini 4,5 ve optimum sıcaklık değerini 65°C; Yun ve ark., (2001) *Trichoderma harzianum* C-4' den saflaştırdıkları β-glukosidaz enziminin optimum pH değerini 5,0 ve optimum sıcaklık değerini 45°C; Karnchanatat ve ark., (2007) *Daldinia aschscholzii*' den saflaştırdıkları β-glukosidaz enziminin optimum pH değerini ve optimum sıcaklık değerini sırasıyla 5,0 ve 50°C; Bhatti ve ark., (2006) *Aspergillus niger* NFCCP' den saflaştırdıkları β-glukosidaz enziminin optimum pH değerini 5,5 ve optimum sıcaklık değerini 40°C; Okamoto ve ark., (2011) *Fomitopsis palustris* BC315' den saflaştırdıkları β-glukosidaz enziminin optimum pH değerini 2,5 ve optimum sıcaklık değerini 55°C; Yan ve Lin (1997) *Aspergillus niger* CCRC 31494' den saflaştırdıkları β-glukosidaz enziminin optimum pH değerini ve optimum sıcaklık değerini sırasıyla 5,0 ve 55°C; Murray ve ark., (2004) *Talaromyces emersonii* CBS 814.70' den saflaştırdıkları β-glukosidaz enziminin optimum pH değerini 4,02 ve optimum sıcaklık değerini 71,5°C; Wei ve ark., (1996) *Xylaria regalis*' den saflaştırdıkları β-glukosidaz enziminin optimum pH değerini ve optimum sıcaklık değerini sırasıyla 5,0 ve 50°C; Pitson ve ark., (1997) ise *Acremonium persicinum* QM107' den saflaştırdıkları β-glukosidaz enziminin optimum pH değerini 5,5 olarak tespit etmişler ve 50°C' ye kadar aktivitesini koruduğunu rapor etmişlerdir [33, 176, 177, 175, 170, 52, 129, 168, 178, 179, 180, 146, 181]. Bu veriler doğrultusunda farklı organizmalarda β-glukosidaz enzim aktivitesinin optimum olduğu pH değerinin genellikle 6'nın altında ve optimum sıcaklık değerlerinin ise 50- 71,5 °C arasında değiştiğini söyleyebiliriz. Aynı şekilde çalışmamızda kullandığımız *Trichoderma harzianum* türünden Yun ve ark., (2001) nın elde ettikleri aynı enzimin optimum pH değeri 5, sıcaklık değeri ise 45°C olarak rapor edilirken, biz optimum pH'ı 4, sıcaklığı ise 65°C olarak belirlemiş

bulunmaktayız. Bu sonuçlarda bize enzim eldesindeki çalışma koşullarındaki farklılığın ve aynı türün farklı ırklarının bile enzimin optimum aktivite gösterdiği biyokimyasal parametreler üzerinde etkili olabileceğini göstermektedir.

Öğütülmüş mısır koçanının substrat olarak kullanıldığı KSF kültür ortamında *Trichoderma harzianum* NRRL 13019'dan saflaştırılan β -glukosidaz enziminin termal kararlılığı da belirlenmiştir. *Trichoderma harzianum* NRRL 13019' dan saflaştırılan β -glukosidaz enziminin 120 dakikalık inkübasyonun ardından yapılan ölçüm sonuçlarına göre; 45 °C için % 57, 55 °C için % 30, 65 °C için % 8 ve 75 °C için % 2 oranlarında, 85 °C' de ise 43 dakika aktivitesini koruduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.9). Souza ve ark., (2010) *Humicola insolens*' den saflaştırılan β -glukosidaz enzimine sıcaklığın etkisini araştırmışlar ve enzimin 50°C' de 1 saate kadar aktivitesinin stabil kaldığını ve 55°C' de ise yarılanma süresinin yaklaşık 44 dakika olduğunu tespit etmişlerdir [163]. Bai ve ark., (2013) *Penicillium simplicissimum* H-11' den saflaştırılan β -glukosidaz enziminin 50°C' de 4 saat aktivitesini koruduğunu fakat 80°C' ye kadar olan yüksek sıcaklıklarda enzimin denatüre olduğunu rapor etmişlerdir [165]. Elshafei ve ark., (2011) *Aspergillus terreus* NRRL 265' den saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin 50°C' de 2 saate kadar aktivitesinin stabil kaldığını, 60°C' de 1 saat boyunca aktivitesinin %82' sini koruduğunu, 70°C' de 5 dakikalık süre sonunda aktivitesinin %83' ünü koruduğunu ve sonrasında hızla düştüğünü, 80°C ve üzeri sıcaklıklarda ise enzimin aktivitesini tamamen kaybettiğini yaptıkları çalışmada belirtmişlerdir [182]. Ahmed ve ark., (2015) ise *Aspergillus niger*' den elde ettikleri β -glukosidaz enziminin 40, 45, 50, 55, 60, 65 ve 70°C sıcaklıklarda termal kararlılığını araştırmışlar ve enzimin 55°C' de 120 dakikalık inkübasyonun ardından aktivitesinin %11 azaldığını rapor etmişlerdir [145]. Wei ve ark., (1996) ise 30, 40, 50, 60 ve 70°C sıcaklıklarda *Xylaria regalis*' den saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin termal kararlılığını araştırmışlardır. Saflaştırılan enzimin 50°C' de 30 dakikalık inkübasyon süresinin ardından aktivitesini %78 koruduğu ancak 60°C ve üzerindeki sıcaklıklarda ise aktivitesini hızla kaybettiğini tespit etmişlerdir [146]. Bu sonuçlara göre aynı enzimin farklı sıcaklık derecelerinde gösterdiği kararlılığın elde edildiği mikroorganizma kaynağına göre değişiklik gösterdiğini söyleyebiliriz.

Çalışmamızda *Trichoderma harzianum* NRRL 13019' dan saflaştırdığımız β -glukosidaz enziminin kinetik parametreleride belirlenmiştir. β -glukosidaz enziminin

spesifik substratı *p*NPG karşı ilgisini gösteren K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır. Saflaştırılan β -glukosidaz enziminin *p*NPG substratı için K_m değeri 0,3340 mM ve V_{max} değeri 3333,3340 EU olarak bulunmuş, katalitik etkinliğinin ölçüsü olan V_{max}/K_m oranı ise 9980,0410 olarak hesaplanmıştır (Tablo 3.7). Bir enzimin kinetik özelliklerinin belirlenmesinde önemli parametrelerden biri olan K_m ve V_{max} değerleri, değişik substrat konsantrasyonları kullanılarak elde edilir. Bu değerler Michaelis-Menten denkleminin ters çevrilmesiyle elde edilen Lineweaver-Burk denklemiyle hesaplanır. V_{max} değeri enzim konsantrasyonu sabit tutularak, substrat konsantrasyonuna bağlı maksimum hızı, K_m değeri ise maksimum hızın yarısına karşılık gelen substrat konsantrasyonunu ifade eder ve enzim ile substratın yapısına bağlı olarak değişir. Ayrıca K_m değeri enzimin substrata olan ilgisini gösterir ve bu değer küçük olması, daha düşük substrat konsantrasyonunda enzimin maksimum hıza ulaştığını belirtir [2, 183, 47]. Birçok çalışmada farklı organizmalardan elde edilen β -glukosidaz enzimini değişik metotlar kullanarak saflaştırmış ve kinetik parametrelerden olan K_m ve V_{max} değerlerini belirlemişlerdir. Kalyani ve ark., (2012) *Neosartorya fischeri* NRRL181' den saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin *p*NPG substratına karşı K_m ve V_{max} değerlerini sırasıyla 68 mM ve 886 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg-protein}^{-1}$; Wei ve ark., (1996) *Xylaria regalis*' den saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin *p*NPG substratına karşı K_m ve V_{max} değerlerini sırasıyla 1,72 mM ve 326 $\mu\text{mol/min/mg}$; Narasimha ve ark., (2016) *Aspergillus niger*' den saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin *p*NPG substratına karşı K_m değerini 8,0 mM ve V_{max} değerini 166 $\mu\text{mol/min/mg}$; Gao ve ark., (2010) *Cladosporium fulvum*' dan saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin *p*NPG substratına karşı K_m ve V_{max} değerlerini 0,18mM ve 46,7 $\mu\text{mol/min/mg}$; Ramachandran ve ark., (2012) *Neosartorya fischeri* NRRL181' den saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin *p*NPG substratına karşı K_m değerini 2,8 mM ve V_{max} değerini 1693 U mg-protein^{-1} ; Zahoor ve ark., (2011) *Aspergillus niger* NRRL 599' dan saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin *p*NPG substratına karşı K_m değerini 3,11 mM ve V_{max} değerini 20,83 U/mg; Zhang ve ark., (2011) *Tolypocladium cylindrosporum* Syzx4' den saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin *p*NPG substratına karşı K_m ve V_{max} değerlerini 0,85 mmol/L ve 85,23 mmol/(Ls); Freer (1985) *Candida wickerhamii* NRRL Y-2563' den elde edilen β -glukosidaz enziminin *p*NPG substratına karşı K_m ve V_{max} değerlerini 4,17 mM ve 794,0 olarak; Qi ve ark., (2009) *Aspergillus* sp. MT-0204' den saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin *p*NPG substratına karşı K_m ve V_{max} değerlerini 22.47 mM $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ve 5,2

mM min⁻¹mg⁻¹ olarak belirlemişlerdir [184, 146, 33, 185, 147, 186, 160, 187, 167]. Bazı araştırmacılar ise farklı organizmalardan saflaştırdıkları β-glukosidaz enziminin K_m ve V_{max} değerlerini birden fazla substrat kullanarak belirlemişlerdir. Amouri ve Gargouri (2006) *Stachybotrys* sp.' den saflaştırdıkları β-glukosidaz enziminin K_m ve V_{max} değerlerini, pNPG başta olmak üzere sellobiyoz, salisin ve CMC substratlarını kullanarak belirlemişler ve pNPG substratının K_m ve V_{max} değerlerini sırasıyla 0,3 mM ve 78 U/mg olarak tespit etmişlerdir [161]. Yan ve ark., (1998) da *Aspergillus niger* CCRC 31494' den saflaştırdıkları β-glukosidaz enziminin K_m ve V_{max} değerlerini pNPG ve sellobiyoz olmak üzere iki farklı substrat kullanarak belirlemişlerdir. Bu iki substratın K_m değerlerinin sırasıyla 2,2 mM ve 15,4 mM; V_{max} değerlerinin ise 10,2 ünite/mg ve 464 ünite/mg olduğunu çalışmalarında rapor etmişlerdir [188]. Saibi ve Gargouri (2011) de aynı şekilde pNPG ve sellobiyoz substratlarını kullanarak *Stachybotrys microspora*' dan elde ettikleri β-glukosidaz enziminin K_m değerlerini 0,9 mM ve 1,9 mM olarak, V_{max} değerlerini ise 27,77 U/mg ve 21,14 U/mg olarak belirlemişlerdir [173]. Yan ve Lin (1997) ise *Aspergillus niger* CCRC 31494' den saflaştırdıkları β-glukosidaz enziminin K_m ve V_{max} değerlerini pNPG ve pNPX (para-nitrofenil-β-D-ksilosit) substratlarına karşı araştırarak K_m değerlerini 21,7 mM ve 14,2 mM; V_{max} değerlerini ise 124,4 U/mg ve 21,6 U/mg olarak tespit etmişlerdir [179]. Guo ve ark., (2016) *Trichoderma reesei* QM9414' den saflaştırdıkları β-glukosidaz enziminin pNPG substratına karşı K_m ve V_{max} değerlerini sırasıyla 2.48 ± 0.75 ve 7.7 ± 1.62 olarak, V_{max}/K_m oranını ise 3,06; Madhu ve ark., (2009) ise *Aspergillus sydowii* BTMFS 55' den saflaştırdıkları β-glukosidaz enziminin pNPG substratına karşı K_m ve V_{max} değerlerini 0,67 mM ve 83,3 U/mL olarak, V_{max}/K_m oranını ise 123,37; Patino ve ark., (1990) *Penicillium oxalicum* 1331' den saflaştırdıkları β-glukosidaz enziminin pNPG substratına karşı K_m ve V_{max} değerlerini 0,37 mM ve 55,77 U mg⁻¹ olarak, V_{max}/K_m oranını ise 150,72 olarak rapor etmişlerdir [189, 164, 190]. Çalışmamızın bu basamağında *Trichoderma harzianum* NRRL 13019' den saflaştırılan β-glukosidaz enziminin pNPG substratına karşı belirlediğimiz K_m ve V_{max} değerleri ile literatürlerdeki değerlerin farklılık gösterdiği ve bizim çalışmamızda elde edilen Km değerlerinin literatürlerdeki sonuçlara göre oldukça düşük, Vmax değerlerinin ise oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Km değerinin düşük olması enzimin pNPG substratına ilgisinin fazla olduğunu, V_{max} değerlerinin yüksek olması ise enzimin substratı daha hızlı parçaladığını göstermektedir. Literatürlerde elde edilen enzimler ile kıyaslandığında

bu durum, bizim enzimimiz için avantaj sağlamakta ve bu avantaj enzimimizin endüstriyel çalışmalar için daha uygun olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda δ -glukonolaktonun *p*NPG substratı varlığında *Trichoderma harzianum* NRRL 13019' dan saflaştırılan β -glukosidaz enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu olarak ifade edilen IC_{50} değeri ve enzim aktivitesini azaltan inhibisyon tipi belirlenerek K_i değerleri hesaplanmıştır. *Trichoderma harzianum* NRRL 13019' dan saflaştırılan β -glukosidaz enziminin δ -glukonolakton inhibitörü için IC_{50} değeri 8,64 mM; K_i değeri $3,9 \times 10^{-7} \pm 2,0 \times 10^{-8}$ olarak belirlenmiş ve yarışmalı (kompetatif) tipte inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 3.11; Şekil 3.13). Bu durum glukonolakton inhibitörünün, *Trichoderma harzianum* NRRL 13019' dan saflaştırılan β -glukosidaz enziminin aktif bölgesine bağlanmak için substrat molekülü ile yarıştığı anlamına gelir [2]. Asic ve ark., (2015) *Agaricus bisporus*' dan saflaştırdıkları β -glukosidaz enzimini glukonolakton inhibitörü varlığında IC_{50} ve K_i değerlerini sırasıyla 0,39 mM ve 7,2 μ M olarak belirlemişlerdir [131]. Deshpande ve ark., (1978) *Sporotrichum pulverulentum*' dan elde ettikleri β -glukosidaz enzimini saflaştırma basamağında A ve B olmak üzere iki şekilde saflaştırmışlardır. Bu iki enzimin glukonolakton inhibitörü varlığında kompetatif tipte inhibisyon etkisi gösterdiğini ve K_i değerlerinin sırasıyla $3,5 \times 10^{-7}$ ve 15×10^{-7} olduğunu tespit etmişlerdir [191]. Li ve ark., (2004) *Orpinomyces* PC-2' den saflaştırdıkları β -glukosidaz enzimini glukonolakton inhibitörünün kompetatif tipte inhibe ettiğini ve K_i değerinin 0,05 mM olduğunu belirlemişlerdir [192]. Masson ve Pellerin (1998) de *Aspergillus niger*' den elde ettikleri β -glukosidaz enzimini saflaştırma basamağında β -glukosidaz enzimini A ve B olmak üzere iki şekilde saflaştırmışlar ve bu iki enzimi glukonolakton inhibitörünün kompetatif tipte inhibe ettiğini ve K_i değerlerinin sırasıyla 0,15 mM ve 0,005 mM olduğunu tespit etmişlerdir [193]. Parry ve ark., (2001) *Thermoascus aurantiacus* IMI 216529' dan saflaştırdıkları β -glukosidaz enzimini glukonolakton inhibitörünün kompetatif tipte inhibe ettiğini ve K_i değerinin 8,3 mM olduğunu rapor etmişlerdir [148]. Yun ve ark., (2001) da *Trichoderma harzianum* C-4' den saflaştırdıkları β -glukosidaz enzimini glukonolakton inhibitörü varlığında kompetatif tipte inhibe ettiğini ve K_i değerinin 1,8 μ M olduğunu belirtmişlerdir [52]. Lymarr ve ark., (1995) ise *Phanerochaete chrysosporium* OGC101' den saflaştırdıkları β -glukosidaz enzimini glukonolakton

inhibitörünün kompetatif tipte inhibe ettiğini ve K_i değerinin 0,004 mM olduğunu tespit etmişlerdir [194].

Ayrıca çalışmamızda β -glukosidaz enziminin diğer bir inhibitörü olan D(+)glukozun *p*NPG substratı varlığında *Trichoderma harzianum* NRRL 13019' dan saflaştırılan β -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösterdiği IC_{50} değeri ve inhibisyon tipide belirlenerek K_i değeri hesaplanmıştır. *Trichoderma harzianum* NRRL 13019' dan saflaştırılan β -glukosidaz enziminin D(+)glukoz inhibitörü için IC_{50} değeri 4,95 mM; K_i değeri $2,6 \times 10^{-3} \pm 1,42 \times 10^{-3}$ olarak belirlenmiş ve yarışmasız (nonkompetatif) tipte inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 3.12; Şekil 3.14). Bu durum glukoz inhibitörünün *Trichoderma harzianum* NRRL 13019' dan saflaştırılan β -glukosidaz enziminin substrat molekülü ile oluşturduğu komplekse bağlandığı anlamına gelir [2]. Lee ve ark., (2012) *Trichoderma reesei*' den saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin glukoz inhibitörü varlığında IC_{50} değerini 48,5 mM olarak; Guo ve ark.(2016) ise *Trichoderma reesei* QM9414' den elde ettikleri β -glukosidaz enziminin glukoz inhibitörü varlığında IC_{50} ve K_i değerlerini sırasıyla 600 mM ve 50 mM olarak tespit etmişlerdir [195, 189]. Bissett ve Sternberg (1978) *Aspergillus phoenicis* QM 329' dan saflaştırdıkları β -glukosidaz enzimini glukozun kompetatif yönde inhibe ettiğini ve K_i sabitinin 1,8 mM olduğunu belirlemişlerdir; Li ve ark., (2004) *Orpinomyces* PC-2' den saflaştırdıkları β -glukosidaz enzimini glukoz için kompetatif tipte inhibe ettiğini ve K_i değerinin 3,6 mM olduğunu belirtmişlerdir [196, 192]. Masson ve Pellerin (1998) ise *Aspergillus niger*' den elde ettikleri β -glukosidaz enzimini saflaştırma basamağında A ve B olmak üzere iki şekilde saflaştırmışlar ve bu iki enzimi glukoz inhibitörünün kompetatif tipte inhibe ettiğini ve K_i değerlerinin sırasıyla 2,5 mM ve 0,40 mM olduğunu belirlemişlerdir [193]. Ng ve ark., (2010) *Penicillium citrinum* YS40-5' den saflaştırdıkları β -glukosidaz enzimini glukoz inhibitörünün kompetatif tipte inhibe ettiğini ve K_i değerinin 17,59 mM olduğunu; Parry ve ark., (2001) *Thermoascus aurantiacus* IMI 216529' dan saflaştırdıkları β -glukosidaz enzimini glukoz inhibitörünün kompetatif tipte inhibe ettiğini ve K_i değerinin 0,29 mM olduğunu; Smith ve Gold (1979) *Phanerochaete chrysosporium* ME446' dan saflaştırdıkları β -glukosidaz enzimini glukoz inhibitörünün kompetatif tipte inhibe ettiğini ve K_i değerinin $5,0 \times 10^{-4}$ M olduğunu; Yun ve ark., (2001) *Trichoderma harzianum* C-4' den saflaştırdıkları β -glukosidaz enzimini glukoz inhibitörünün

kompetatif tipte inhibe ettiğini ve K_i değerinin 1 mM olduğunu; Yan ve Lin (1997) *Aspergillus niger* CCRC 31494' den saflaştırdıkları β -glukosidaz enzimini glukoz inhibitörünün kompetatif tipte inhibe ettiğini ve K_i değerinin 543 mM olduğunu; Yan ve ark., (1998) *Aspergillus niger* CCRC 31494' den saflaştırdıkları β -glukosidaz enzimini glukoz inhibitörünün kompetatif tipte inhibe ettiğini ve K_i değerinin 5,7 mM olduğunu; Lymarr ve ark., (1995) ise *Phanerochaete chrysosporium* OGC101' den saflaştırdıkları β -glukosidaz enzimini glukoz inhibitörünün kompetatif tipte inhibe ettiğini ve K_i değerinin 0,27 mM olduğunu yaptıkları çalışmalar ile rapor etmişlerdir [197, 148, 198, 52, 179, 188, 194].

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar ile literatürlerdeki sonuçlar karşılaştırıldığında, glukonolakton inhibitörünün β -glukosidaz enzimini daha önce yapılan çalışmalarda rapor edildiği gibi kompetatif (yarışmalı) tipte inhibe ettiği, glukoz inhibitörünün ise literatürlerden farklı olarak nonkompetatif (yarışmasız) tipte inhibe ettiği belirlenmiştir. Ayrıca yapmış olduğumuz bu çalışma ile *Trichoderma harzianum* NRRL 13019' dan saflaştırılan β -glukosidaz enzimini glukoz inhibitörünün glukonolakton inhibitörüne göre daha güçlü şekilde inhibe ettiği de belirlenmiştir.

Sonuç olarak bilimsel yararlarının dışında yeni enzim kaynaklarının belirlenmesi ve mikroorganizmalardan enzimlerin daha kolay ve ucuz maliyetle elde edilebilir olmasından dolayı çalışmamız endüstriyel açıdan da önem arz etmektedir. Son yıllarda özellikle çalışmamıza konu olan β -glukosidaz enziminin gıda, tekstil, kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi, biyo-yakıt, hayvan yemi üretimi ve deterjan endüstrisi gibi alanlarda kendine kullanım alanı bulmasından dolayı yapılan bu çalışmanın ülke ekonomisine katkı sağlayacağından bu alanlarda değerlendirilmek üzere geliştirilebileceğini söylemek mümkündür.

5. KAYNAKLAR

- [1] Topal, Ş., “Enzimler, Mikrobiyolojik Yolla Enzim Üretimi ve Bu Teknolojide Rennin'nin Yeri “, *TÜBİTAK Marmara Araş. Enst. Gebze-Kocaeli*, 10(1), 25-37, 1985.
- [2] Nelson, D. L. and Cox, M. M., *Lehninger Principles of Biochemistry*, New York: W. H. Freeman and Company, 190-237, (2004).
- [3] Tipton, K. ve Boyce, S., “History of the Enzyme Nomenclature System “, *Department of Biochemistry*, 16(1), 34-40, (2000).
- [4] Mojsov, K., “Application Of Enzymes İn The Textile Industry : A Review Primena Na Enzımı Vo Tekstilnata Industrija : Pregled “, *II International Congress “Engineering, Ecology and Materials in the Processing Industry”*, 1, 1-17, (2011).
- [5] Van Beilen, J. B. ve Li, Z., “Enzyme technology: an overview“, *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 338-344, (2002).
- [6] Karademir, G., ve Karademir, B., “Yem Katkı Maddesi Olarak Kullanılan Biyoteknolojik Ürünler“, *Lalahan Hay. Enst. Derg.*, 43(1), 61-74, (2003).
- [7] Reed, G., *Enzymes in Food Processing*, New York, Academic Press, INC, Chater 1, 1-5, (1966).
- [8] ”Molecular ve Biotechnological Aspects of Microbial Proteases “
Microbiology And Molecular Biology Reviews, 62(3),597-635, (1998).
- [9] Aehle, W., *Enzymes in Industry*, Netherlands: Wiley-VCH Verlag GmbH &Co.KGaA, (2004).
- [10] Boyce, S., Tipton, K. F., “Enzyme Classification and Nomenclature“, *Encyclopedia Of Life Sciences*, 1, (2001).

- [11] "Current IUBMB Recommendations on Enzyme Nomenclature ve Kinetics", *Persectives in Science*, 1, 74-87, (2014).
- [12] Moss, G.P., *Recommendations of the Nomenclature Committee*. International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyse <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/> (17.03.2017).
- [13] "Improved Production of Bacterial Cellulose and Its Application Potential", *Polymer Degrnddon and Sfabihfy*, 59, 91-99, 1998.
- [14] Bakare, M. K., Adewale, I. O., Ajayi, A., ve Shonukan, O. O., "Purification ve Characterization of Cellulase from the Wild-Type ve Two Improved Mutants of *Pseudomonas fluorescens*", *African Journal of Biotechnology*, 4(9), 898-904, (2005).
- [15] Ciolacu, D., Ciolacu, F., ve Popa, V. I., "Amorphous Cellulose – Structure and Characterization", *Cellulose Chemistry And Technology*, 45(1-2), 13-21, (2011).
- [16] Krishna, S. H., Rao, K.C. S., Babu, J. S., ve Reddy, D. S., "Studies on the Production and Application of Cellulase from *Trichoderma reesei* QM-9414", *Bioprocess Engineering*, 22, 467-470, (2000).
- [17] Chung, I.S. ve Lee Y.Y., "Ethanol Fermentation of Crude Acid Hydrolyzate of Cellulose Using High-Level Yeast Inocula ", *Biotechnol Bioeng*, 27(3), 308-315, (1985).
- [18] Zheng, Y., Pan, Z., ve Zhang, R., "Overview of Biomass Pretreatment for Cellulosic Ethanol Production", *Int J Agric & Biol Eng*, 2(3), 51 – 68, (2009).
- [19] Castro, R.C. de A., Fonseca, B.G., Dos Santos H.T.L., Ferreira I.S., Mussatto S.I., ve Roberto I.C., "Alkaline Deacetylation as a Strategy to Improve Sugars Recovery and Ethanol Production from Rice Straw Hemicellulose and Cellulose", *Industrial Crops and Products*, (2016).

- [20] Bajpai, P., “Application of Enzymes in the Pulp and Paper Industry”, *Biotechnol. Prog.*, 15, 147-157, (1999).
- [21] Costa, S. M., Mazzola, P. G., Silva, J. C. A. R., Pahl, R., Pessoa, Jr. A., Costa, S. A., “Use of Sugar Cane Straw as a Source of Cellulose for Textile Fiber Production”, *Industrial Crops and Products*, 42, 189-194, (2013).
- [22] Akoğlu, A., Karahan A.G., Çakmakçı M.L., Çakır İ., “Bakteriyel Selülozun Özellikleri ve Gıda Sanayisinde Kullanımı”, *Gıda*, 35(2), 127-134, 2010.
- [23] Singhanian, R. R., *Beta-Glucosidase from Aspergillus niger NII 08121-Molecular Characterization and Applications in Bioethanol production*, Science & Technology – CSIR, INDIA, (2011).
- [24] John, F. K., *Enzyme Technology* (H.J. Rehm., G. Reed editor). Biotechnology Vol. 7A. New York s 37-62, (1987).
- [25] Pettipher, G. L. ve Latham, M. J., “Characteristics of Enzymes Produced by *Ruminococcus flavefaciens* which Degrade Plant Cell Walls”, *Journal of General Microbiology*, 110, 21-27, (1979).
- [26] Koike, S., Kobayashi, Y., “Development and Use of Competitive PCR Assays for the Rumen Cellulolytic Bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*”, *FEMS Microbiology Letters*, 204, 361-366, (2001).
- [27] Dias, P. V. S., Ramos, K. O., Padilha, I. Q. M., Araujo, D. A. M., Santos, S. F. M., Silva, F. L. H., “Optimization of Cellulase Production by *Bacillus Sp.* Isolated from Sugarcane Cultivated Soil”, *Chemical Engineering Transactions*, 38, 277-282, (2014).
- [28] Sethi, S., Datta. A., Gupta. B. L., ve Gupta, S., “Optimization of Cellulase Production from Bacteria Isolated from Soil”, *ISRN Biotechnology*, 1-7, (2013).
- [29] Valaskova, V., Snajdr, J., Bittner, B., Cajthaml, T., Merhautova, V., Hofrichter, M., Baldrian, P., “Production of Lignocellulose-Degrading

- Enzymes and Degradation of Leaf Litter by Saprotrophic Basidiomycetes Isolated from a *Quercus Petraea* Forest”, *Soil Biology & Biochemistry* 39, 2651–2660, (2007).
- [30] Zheng, W., Zheng, Q., Xue, Y., Hu, J., ve Gao, M. T., “Influence of Rice straw Polyphenols on Cellulase Production by *Trichoderma reesei*”, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, (Article in pres), 1-8, (2017).
- [31] Libardi, N., Soccol, C. R., Goes-Neto, A., De Oliveira, J., Vandenberghe, L. P. de S., “Domestic Wastewater as Substrate for Cellulase Production by *Trichoderma harzianum*”, *Process Biochemistry*, (Article in pres), 1-10, (2017).
- [32] Gupta, C., Jain, P., Kumar, D., Dixit, A. K., ve Jain, R. K., “Production of Cellulase Enzyme from Isolated Fungus and its Application as Efficient Refining Aid for Production of Security Paper”, *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research*, 3, 11-19, (2015).
- [33] Narasimha, G., Sridevi, A., Ramanjaneyulu, G., ve Reddy, B. R., “Purification and Characterization of β -Glucosidase from *Aspergillus niger*”, *International Journal of Food Properties*, 19, 652–661, (2016).
- [34] Kuhad, R. C., Gupta, R., ve Singh, A., “Microbial Cellulases and Their Industrial Applications”, *Enzyme Research*, 2011, 1-10, (2011).
- [35] Teeri, T. T., Koivula, A., Linder, M., Wohlfahrt, G., Divne, C., Jones, T.A., “*Trichoderma reesei* Cellobiohydrolases: Why so Efficient on Crystalline Cellulose”, *Biochemistry Society Trans* 26, 173-178, (1998).
- [36] Ilmen, M., Saloheimo, A., Onnela, M. L., ve Penttilä, M. E., “Regulation of Cellulase Gene Expression in the Filamentous Fungus *Trichoderma reesei*”, *Applied and Environmental Microbiology*, 63(4), 1298–1306, (1997).
- [37] Kovacs, K., Megyeri, L., Szakacs, G., Kubicek, C. P., Galbe, M., Zacchi, G., “*Trichoderma atroviride* Mutants with Enhanced Production of Cellulase and β -glucosidase on Pretreated Willow”, *Enzyme and Microbial Technology* 43, 48–55, (2008).

- [38] Liu, J., ve Yang, J., “Cellulase Production by *Trichoderma koningii* AS3.4262 in Solid-State Fermentation Using Lignocellulosic Waste from the Vinegar Industry”, *Food Technol. Biotechnol.* 45(4), 420–425, (2007).
- [39] Delabona, P. da S., Farinas, C. S., Da Silva M. R., Azzoni S. F., Pradella J. G. da C., “Use of a New *Trichoderma harzianum* ;Strain Isolated from the Amazon Rainforest with Pretreated Sugar Cane Bagasse for On-Site Cellulase Production”, *Bioresource Technology*, 107, 517-521, (2012).
- [40] Soares, I., Tavora, Z., Barcelos, R. P., ve Baroni, S., “*Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry*”, InTech Europe, 83-488, (2012).
- [41] Kirk, O., Borchert, T. V., ve Fuglsang, C. C., “*Industrial enzyme applications*”, *Current Opinion in Biotechnology* , 13, 345–351, (2002).
- [42] Sukumaran, R. K., Singhanian, R. R., ve Pandey, A., “Microbial Cellulases- Production, Applications and Challenges”, *Journal of Scientific & Industrial Research*, 64, 832-844, (2005).
- [43] Zoppas, F. M., Meneguzzi, A., Tramontina, F., “Alternatives for Cellulase Production in Submerged Fermentation with Agroindustrial Wastes”, *International Journal of Modern Engineering Research (IJMER)*, 3, 2374-2381, (2013).
- [44] Woodward, J., Wiseman, A., “Fungal and other β -D-glucosidases, their properties and applications”, *Enzyme Microb. Technol.* 4, 73-93, (1982).
- [45] Wood, T. M., ve Mccrae, S. I., “Purification and Some Properties of the Extracellular β -D-Glucosidase of the Cellulolytic Fungus *Trichoderma koningii*”, *Journal of General Microbiology*, 128, 2973-2982, (1982).
- [46] Henrissat, B., Bairoch, A., “Updating the Sequence-Based Classification of Glycosyl Hydrolases”, *Biochem. J.*, 316, 695-696, (1996).
- [47] Daroit, Daniel, J., Simonetti, A., Hertz, P. F. ve Brandelli, A., “Purification and Characterization of an Extracellular β -Glucosidase from *Manusocus purpureus*”, *J. Microbiol Biotechnol*, 18(5), 933-941, (2008).

- [48] Kaur, J., Chadha, B. S., Kumar, B. A., Kaur, G. S., Saini, H. S., “Purification and Characterization of β -glucosidase from *Melanocarpus* sp. MTCC 3922”, *Electronic Journal of Biotechnology*, 10(2), 260-270, (2007).
- [49] Koffi, Y. G., Konan, H. K., Kouadio, J. P. E. N., Dabonne, S., Due, E. A., ve Kouame, L. P., “Purification and Biochemical Characterization of Beta-Glucosidase from Cockroach, *Periplaneta americana*”, *Journal of Animal & Plant Sciences*, 13(2), 1747-1757, (2012).
- [50] Araujo, E. F., Barros, E. G., Caldas, R. A., Silva, D. O., “Beta-Glucosidase Activity of a Thermophylic Cellulolytic Fungus, *Humicola* sp.”, *Biohechnology Letters*, 5, 781-784, (1983).
- [51] Saha, B. S. and Bothast, R. J., “Production, Prufication and Characterization of a Highly Glucose-Tolerant Novel β -Glucosidase from *Candida peltata*”, *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (9), 3165-3170, (1996).
- [52] Yun, S.-I., Jeong, C.-S., Chung, D.-K. ve Choi, H.-S., “Prufication and Some Properties of a β -glucosidase from *Trichoderma harzianum* Type C4”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65(9), 2028-2032, (2001).
- [53] Eberhart, B. M., ve Beck, R. S., “Induction of β -Glucosidases in *Neurospora crassa*”, *Journal of Bacteriology*, 116, 295-303, (1973).
- [54] Hidalgo, M., Steiner, J., ve Eyzaguirre, J., “ β -Glucosidase from *Penicillium purpurogenum*: Purification and Properties”, New Orleans Louisiana, 1-7, (1992).
- [55] Macris, B. J., “Production and Characterization of Cellulase and β -Glucosidase from a Mutant of *Alternaria alternata*”, *Applied and Environmental Microbiology*, 47, 560-565, (1984).
- [56] Bisaria, V. S., Mishra, S., “Regulatory Aspects of Cellulase Biosynthesis and Secretion”, *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* 9, 61-103, (1989).

- [57] Tomme, P. R., Warren, A. J., Gilkes, N. R., “Cellulose Hydrolysis by Bacteria and Fungi”, *Adv. Microbiol. Physiol*, 37, 1–81, (1995).
- [58] Esen, A., β -glucosidases: overview, In Esen A (ed), *β -Glucosidases: Biochemistry and Molecular Biology*, American Chemical Society, Washington, DC, 1–14, (1993).
- [59] Brzobohaty, B., Moore, I., Kristoffersen, P., Bako, L., Campos, N., Schell, J., Palme, K., “Release of Active Cytokinin by a Beta-Glucosidase Localized to the Maize Root Meristem”, *Science*, 262(5136), 1051-1054, (1993).
- [60] Lieberman, R. L., Wustman, B. A., Huertas, P., Powe, A. C., Jr., Pine, C. W., Khanna, R., Schlossmacher, M. G., Ringe, D., Petsko, G. A., “Structure of Acid β -Glucosidase with Pharmacological Chaperone Provides Insight Into Gaucher Disease Nat”, *Chem. Biol.* 3, 101–107, (2007).
- [61] Raimbault, M., “General and Microbiological Aspects of Solid Substrate Fermentation”, *Electronic Journal of Biotechnology*, 1, 1–15, (1998).
- [62] Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C. R. ve Nigam, P. “Solid State Fermentation for the Production of Industrial Enzymes”, *Bioresource Technology*, 77, 149-162, (1999).
- [63] Krogh, K. B. R., Harris, P. V., Olsen, C. L., Johansen, K. S., Hojer-Pedersen, J., Borjesson, J., Olsson, L., “Characterization and Kinetic Analysis of a Thermostable GH3 β -Glucosidase from *Penicillium Brasilianum*”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86(1), 143-154, (2010).
- [64] Gunata, Z., Vallier, M. J., “Production of a Highly Glucose-Tolerant Extracellular β -Glucosidase by Three *Aspergillus* Strains”, *Biotechnol. Lett.* 21, 219–223, (1999).
- [65] Tsukada, T., Igarashi, K., Yoshid, M., Samejima, M., “Molecular Cloning and Characterization of Two Intracellular β -Glucosidases Belonging to Glycoside Hydrolase Family 1 from The Basidiomycete *Phanerochaete Chrysosporium*”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73(4), 807-814, (2006).

- [66] Chen, M., Qin, Y., Liu, Z., Liu, K., Wang, F., Qu, L., “Isolation and Characterization of a β -glucosidase from *Penicillium decumbens* and Improving Hydrolysis of Corncob Residue by Using it as Cellulase Supplementation”, *Enz. Microb. Technol.* 46(6), 444-449, (2010).
- [67] Yang, S., Wang, L., Yan, Q., Jiang, Z., Li, L., “Hydrolysis of Soybean Isoflavone Glycosides by a Thermostable β -glucosidase from *Paecilomyces thermophila*”, *Food Chem.* 115(4), 1247-1252, (2009).
- [68] Mangalanayaki, R., ve Madhavan, S., “Cellulase Production by *Trichoderma Harzianum* and *Fusarium Oxysporum* Under Solid State Fermentation”, *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4, 1822-1828, (2015).
- [69] Singhania, R. R., Patel, A. K., Soccol, C. R., Pandey, A., “Recent Advances in Solid-State Fermentation”, *Biochemical Engineering Journal*, 44, 13–18, (2009).
- [70] Hölker, U., Höfer, M., Lenz, J., “Biotechnological Advantages of Laboratory-Scale Solid-State Fermentation with Fungi”, *Appl Microbiol Biotechnol* 64, 175–186, (2004).
- [71] Mitchell, D. A., Krieger, N., Stuart, D. M., Pandey, A., “New Developments in Solid-State Fermentation: II. Rational Approaches to Design, Operation and Scale-Up of Bioreactors”, *Process Biochem*, 35, 1211–1225, (2000a).
- [72] Mitchell, D. A., Berovic, M., Krieger, N., “Biochemical Engineering of Solid State Bioprocessing”, *Adv Biochem Eng Biotechnol* 68, 61–138, (2000b).
- [73] Pandey, A., “Solid-State Fermentation”, *Biochemical Engineering Journal*, 13, 81–84, (2003).
- [74] Pandey, A., Soccol, C. R., Rodriguez-Leon, J. A., Nigam, P., *Solidstate fermentation in biotechnology: fundamentals and applications*, Asiatech, New Delhi, (2001).

- [75] Germano, S., Pandey, A., Osaku, C. A., Rocha, S. N., Soccol, C. R., “Characterization and Stability of Proteases from *Penicillium* Sp. Produced by Solid-State Fermentation”, *Enzyme and Microbial Technology* 32, 246–251, (2003).
- [76] Gombert, A. K., Pinto, A. L., Castilho, L. R., Freire, D. M. G., “Lipase Production by *Penicillium Restrictum* in Solid-State Fermentation Using Babassu Oil Cake as Substrate”, *Process Biochemistry* 35, 85–90, (1999).
- [77] Kheng, P. P., ve Omar, I. C., “Xylanase Production by a Local Fungal Isolate, *Aspergillus Niger* USM AI 1 Via Solid State Fermentation Using Palm Kernel Cake (PKC) as Substrate”, *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 27(2), 325-336, (2005).
- [78] Prakasham, R. S., Rao, Ch. S., Sarma, P. N., “Green Gram Husk—an Inexpensive Substrate for Alkaline Protease Production by *Bacillus* Sp. in Solid-State Fermentation”, *Bioresource Technology*, 97, 1449–1454, (2006).
- [79] Bahrin, E. K., Seng, P. Y., ve Abd-Aziz, S., “Effect of Oil Palm Empty Fruit Bunch Particle Size on Cellulase Production by *Botryosphaeria* sp. Under Solid State Fermentation”, *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(3), 276-280, (2011).
- [80] Deschamps, F., Giuliano, C., Asther, M., Huet, M. C., ve Roussos, S., “Cellulase Production by *Trichoderma harzianum* in Static and Mixed Solid-state Fermentation Reactors Under Nonaseptic Conditions”, *Biotechnology and Bioengineering*, 27, 1385-1388, (1985).
- [81] Samuels, G. J., “Trichoderma: A Review of Biology and Systematics of The Genus”, *Mycological Research*, 100, 923-935, (1996).
- [82] Gams, W., ve Bissett, J., “Morphology and Identification of *Trichoderma*”, *Trichoderma and Gliocladium*, 1, 3-34, (1998).
- [83] Rifai, M. A., “A Revision of the Genus *Trichoderma*”, *Mycological Papers*, 116, 1-56, (1969).

- [84] Samuels, G. J., “*Trichoderma*: Systematics, The Sexual State, and Ecology”, *Phytopathology*, 96, 195-206, (2006).
- [85] Papavizas, G. C., “Trichoderma and Gliocladium: Biology, Ecology, and Potential for Biocontrol”, *Ann. Rev. Phytopathol*, 23, 23-54, (1985).
- [86] Kashmiri, M. A., Adnan, A., ve Butt, B. W., “Production, Purification and Partial Characterization of Lipase from *Trichoderma Viride*”, *African Journal of Biotechnology*, 5(10), 878-882, (2006).
- [87] Gottschalk, L. M. F., Oliveira, R. A., Bon, E. P. da S., “Cellulases, Xylanases, β -Glucosidase and Ferulic Acid Esterase Produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* Act Synergistically in The Hydrolysis of Sugarcane Bagasse”, *Biochemical Engineering Journal*, 51, 72–78, (2010).
- [88] Liming, X., Xueliang, S., “High-Yield Cellulase Production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on Corn cob Residue”, *Bioresource Technology*, 91, 259–262, (2004).
- [89] Mohamed, S. A., Azhar, E. I., Ba-Akdah, M. M., Tashkandy, N. R., ve Kumosani, T. A., “Production, Purification and Characterization of α -Amylase from *Trichoderma Harzianum* Grown on Mandarin Peel”, *African Journal of Microbiology Research*, 5(7), 930-940, (2011).
- [90] Silva, L. A. O., Terrasan, C. R. F., Carmona, E. C., “Purification and Characterization of Xylanases from *Trichoderma inhamatum*”, *Electronic Journal of Biotechnology*, 18, 307–313, (2015).
- [91] Marco, J. L., ve Felix, C. R., “Characterization of a Protease Produced by a *Trichoderma Harzianum* Isolate which Controls Cocoa Plant Witches Brom Disease”, *BMC Biochemistry*, 3(3), 1-7, (2002).
- [92] Elad, Y., Chet, I., ve Henis, Y., “Degradation of Plant Pathogenic Fungi by *Trichoderma harzianum*”, *Can. J. Microbiol*, 18, 719-725, (1982).

- [93] Yedidia, I., Srivastva, A. K., Kapulnik, Y., ve Chet, I., “Effect of *Trichoderma harzianum* on Microelement Concentrations and Increased Growth of Cucumber Plants”, *Plant and Soil*, 235, 235–242, (2001).
- [94] Wood, T. M., ve McCrae, S. I., “The Purification and Properties of the C₁ Component of *Trichoderma koningii* Cellulase”, *Biochem. J.*, 128, 1183-1192, (1972).
- [95] Chen, J., Harman, G. E., Comis, A., ve Cheng, G. W., “Proteins Related to the Biocontrol of *Pythium* Damping-off in Maize with *Trichoderma harzianum* Rifai”, *Journal of Integrative Plant Biology*, 47(8), 988–997, (2005).
- [96] Bondkly, A. M., “Gene Transfer Between Different *Trichoderma* Species and *Aspergillus Niger* Through Intergeneric Protoplast Fusion to Convert Ground Rice Straw to Citric Acid and Cellulases”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 135, 117-132, (2006).
- [97] Queiroz, J. A., Tomaz, C. T., Cabral, J. M. S., “Hydrophobic Interaction Chromatography of Proteins”, *Journal of Biotechnology*, 87, 143–159, (2001).
- [98] Heftmann, E., History of Chromatography and Electrophoresis. In: Chromatography. A Laboratory Handbook of Chromatographic and Electrophoretic Methods (E. Heftmann, ed.), Van Nostrand-Reinhold, New York, pp. 19–26, (1973).
- [99] Heftmann, E., Chromatography: Fundamentals and Applications of Chromatographic and Electrophoretic Methods Part A: Fundamentals and Techniques, Elsevier, Amsterdam, (1983).
- [100] Kumpalume, P. ve Ghose, S., “Chromatography: The High-Resolution Technique For Protein Separation”, in Isolation and Purification of Proteins, Current aIiation: University of Cambridge, Cambridge, England, (2003).

- [101] Ariffin, H., Abdullah, N., Umi Kalsom, M. S., Shirai, Y. ve Hassan, M. A., “Production and Characterisation of Cellulase by *Bacillus Pumilus* EB3”, *International Journal of Engineering and Technology*, 3(1), 47-53, (2006).
- [102] Saha, B. C., “Production, Purification and Properties of Xylanase from A Newly Isolated *Fusarium Proliferatum*”, *Process Biochemistry*, 37, 1279-1284, (2002).
- [103] Tan, C. H., Show, P. L., Ooi, C. W., Ng, E. P., Lan, J. C., Ling, T. C., “Novel Lipase Purification Methods – A Review of the Latest Developments”, *Biotechnol J.*, 10(1), 31-44, (2015).
- [104] Giraud, E., Gosselin, L., Marin, B., Parada, J. L., ve Raimbault, M., “Purification and Characterization of an Extracellular Amylase from *Lactobacillus Plantarum* Strain A6”, *Journal of Applied Bacteriology*, 75, 276-282, (1993).
- [105] Yang, J-K., Shih, I-L., Tzeng, Y-M., Wang, S-L., “Production and Purification of Protease from a *Bacillus Subtilis* that Can Deproteinize Crustacean Wastes”, *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 406–413, (2000).
- [106] Queiroz, J. A., Garcia, F. A. P., Cabral, J. M. S., “Hydrophobic Interaction Chromatography of *Chromobacterium Viscosum* Lipase on Polyethylene Glycol Immobilized on Sepharose”, *J. Chromatogr. A.*, 734, 213–219, (1996).
- [107] Staby, A., Mollerup, J., “Solute retention of lysozyme in hydrophobic perfusion chromatography”, *J. Chromatogr. A.*, 734, 205–212, (1996).
- [108] Toida, J., Kondoh, K., Fukuzawa, M., Ohnishi, K., ve Sekiguchi, J., “Purification and Characterization of a Lipase from *Aspergillus oryzae*”, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59(7), 1199-1203, (1995).
- [109] Nazir, A., Soni, R., Saini, H. S., Manhas, R. K., ve Chadha, B. S., “Regulation of Expression of Multiple β -Glucosidases of *Aspergillus terreus* and Their Purification and Characterization”, *BioResources*, 4(1), 155-171, (2009).

- [110] Kiss, T., Kiss, L., “Purification and Characterization of an Extracellular β -D-Xylosidase from *Aspergillus carbonarius*”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(5), 465-470, (2000).
- [111] Tomaz, C. T., Rocha, A. S., ve Queiroz, J. A., “Hydrophobic Interaction Chromatography of *Trichoderma reesei* Cellulases on Polypropylene Glycol-Sepharose”, *Separation Science and Technology*, 37, 1641-1651, (2002).
- [112] Wiater, A., Szczodrak, J., ve Rogalski, J., “Purification and Characterization of an Extracellular Mutanase from *Trichoderma harzianum*”, *Mycol. Res.*, 105(11), 1357-1363, (2001).
- [113] Wiater, A., Pleszczyńska, M., Rogalski, J., Szajnecka, L., ve Szczodrak, J., “Purification and Properties of an α -(1 \rightarrow 3)-Glucanase (EC 3.2.1.84) from *Trichoderma harzianum* and Its Use for Reduction of Artificial Dental Plaque Accumulation”, *Biochimica Polonica*, 60(1), 123-128, (2013).
- [114] Cunha, A. G., Fernandez-Lorente, G., Gutarra, M. L. E., Bevilacqua, J. V., Almeida, R. V., Paiva, L. M. C., Fernández-Lafuente, R., Guisan, J. M., Freire, D. M. G., “Separation and Immobilization of Lipase from *Penicillium simplicissimum* by Selective Adsorption on Hydrophobic Supports”, *Appl Biochem Biotechnol*, 156, 563–575, (2009).
- [115] Furniss, C. SM., Williamson, G., ve Kroon, P. A., “The Substrate Specificity and Susceptibility to Wheat Inhibitor Proteins of *Penicillium funiculosum* Xylanases from a Commercial Enzyme Preparation”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 574-582, (2005).
- [116] Riaz, M., Perveen, R., Javed, M. R., Nadeem, H., Rashid, M. H., “Kinetic and Thermodynamic Properties of Novel Glucoamylase from *Humicola* sp.”, *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 558–564, (2007).
- [117] Sugihara, A., Ueshima, M., Shimada, Y., Tsunasawa, S., ve Tominaga, Y., “Purification and Characterization of a Novel Thermostable Lipase from *Pseudomonas cepacia*”, *J. Biochem.*, 112, 598-603, (1992).

- [118] Hsiao, N-W., Chen, Y., Kuan, Y-C., Lee, Y-C., Lee, S-K., Chan, H-H., Kao, C-H., “Purification and Characterization of an Aspartic Protease from the *Rhizopus oryzae* Protease Extract, Peptidase R”, *Electronic Journal of Biotechnology*, 17, 89–94, (2014).
- [119] Hasenekoğlu, İ., *Toprak Mikrofungusları*, Atatürk Üniversitesi Yayınları, 689, Cilt 7, 323-336, (1991).
- [120] Sazcı, A., Radford, A. and Erenler, K., “Detection of Cellulolytic Fungi by Using Congo Red as an Indicator: A Comparative Study with the Dinirosalicylic Acid Reagent Method”, *Journal of Applied Bacteriology*, 61, 559-562, (1986).
- [121] Griffith, G. W., Easton¹, G. L., Detheridge, A., Roderick, K., Edwards, A., J. Worgan, H., Nicholson, J., ve Perkins, W. T., “Copper Deficiency in Potato Dextrose Agar Causes Reduced Pigmentation in Cultures of Various Fungi”, *FEMS Microbiol Lett*, 276, 165–171, (2007).
- [122] Bitty, B. M., ve Nair, N. N., “Research Article Role of Broth Media on Growth of *Aspergillus niger*”, *International Journal of Recent Scientific Research Research*, 5(12), 2283-2285, (2014).
- [123] Cai, Y. J., Chapman, S. J., Buswell, J. A., ve Chang, S.-T., “Production and Distribution of Endoglucanase, Cellobiohydrolase, and β -Glucosidase Components of the Cellulolytic System of *Volvariella volvacea*, the Edible Straw Mushroom”, *Applied and Environmental Microbiology*, 65(2), 553-559, (1999).
- [124] Slifkin, M. ve Cumbie, R., “Congo Red as a Fluorochrome for the Rapid Detection of Fungi”, *Journal of Clinical Microbiology*, 26(5), 827-830, (1988).
- [125] Teather, R. M. ve Wood, P., “Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rumen”, *Applied an environmental Microbiology*, 43(4), 777-780, (1982).

- [126] Davidson, H. M. ve 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).
- [127] Tripathi, R. K., Devi, C. C. ve Ramaiah, A., “pH-dependent Intercoversion of Two Forms of Tyrosinase in Human Skin”, *Biochem. J.*, 252, 481-487, (1988).
- [128] Pfannkoch, E. A., “The Preparation of Buffers and Other Solutions a Chemist’s Perspective”, *Molecular Biology Problem Solver: A Laboratory Guide*, 32-37, (2001).
- [129] 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 β -Glucosidase from the Wood-Decaying Fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb:Fr.) Rehm”, *FEMS Microbiol Lett.*, 270, 162-170, (2007).
- [130] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. ve Randall, R. J., “Protein Measurement with Folin Phenol Reagent”, *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275, (1951).
- [131] Asic, A., Basic, L., Muhovic, I., Dogan, S. and Turan, Y., “Purification and Caharacterization of β -glucosidase from *Agaricus bisporus* (White Button Mushroom)”, *The Protein Journal*, 34 (6), 453-461, (2015).
- [132] Zhao, X., Gao, L., Wang, J., Bi, H., Gao, J., Du, X., Zhou, Y. ve Tai, G., “A novel ginsenoside Rb₁-hydrolyzing β -D-glucosidase from *Cladosporium fulvum*”, *Process Biochemistry*, 44, 612–618, (2009).
- [133] Jiang, S., Liu, S., Zhao, C. ve 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).
- [134] Christakopoulos, P., Goodenough, P. W., Kekos, D., Macris', B. J., Claeysens M. ve Bhat, M. K., “Purification And Characterisation of an

- Extracellular β -Glucosidase with Transglycosylation and Exo-Glucosidase Activities from *Fusarium Oxysporum*”, *Eur. J. Biochem.*, 224, 379-385 (1994).
- [135] Laemmli, U. K., “Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of Head of Bacteriophage-T4”, *Nature*, 227, 680-685, (1970).
- [136] Shukolyukol, S. A., “NATIVE Electrophoresis in Cell Proteomic: BN-PAGE an CN-PAGE”, *Cell and Tissue Biolog*, 5(3), 311-318, (2011).
- [137] Voget, S., Steele, H.L. ve Streit, W.R., “Characterization of Metagenome-Derived Halotolerant Cellulase”, *J Biotechnol*, 126, 26-36, (2006).
- [138] Ijaz, A., Anwar, Z., Zafar, Y., Hussain, I., Muhammad, A., Irshad, M. ve 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).
- [139] Iqbal, H. M. N., Asgher, M. Ahmed, I. ve Hussain, S., “Media Optimization for Hyper-production of Carboxymethyl Cellulase using proximally analyzed agro-industrial residue with *Trichoderma harzianum* under SSF”, *IJAVMS*, 2(4), 47-55, (2010).
- [140] Ghadi, A., Mahjoub, S., ve Mehravar, R., “Management of Glucose Production Process from Rice Husk by Solid State Fermentation Method”, *2011 International Conference on Biotechnology and Environment Management*, 18, (2011).
- [141] Warburg, O.ve Christian, W., “Isolation and Crystallization of Enolase”, *Biochem Z*, 310, 384-421, (1942).
- [142] Toker, N. Y., “Protein Saflaştırması ile İlgili Bazı Metotlar”, *İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 26 (2), 403-412, (2000).
- [143] 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).

- [144] Zimbardi, A. L. R. L., Sehn, Ce., Meleiro, L. P., Souza, F. H. M., Masui, D. C., Nozawa, M. S. F., Guimarães, L. H. S., Jorge, J. A. ve Furriel, R. P. M., “Optimization of β -Glucosidase, β -Xylosidase and Xylanase Production by *Colletotrichum graminicola* under Solid-State Fermentation and Application in Raw Sugarcane Trash Saccharification”, *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 2875-2902, (2013).
- [145] Ahmed, S. A., El-Shayeb, Nefisa M.A., Hashem, A.-G. M., Saleh, S. A.A., Abdel-Fattah, A.F., “Chemical modification of *Aspergillus niger* β -glucosidase and its catalytic properties” , *Brazilian Journal of Microbiology* 46(1), 23-28, (2015).
- [146] Wei, D.-L., Kirimura, K., Usami, S. ve Lin, T.-H., “Purification and Characterization of an Extracellular β -Glucosidase from the Wood-Grown Fungus *Xylaria regalis*”, *Current Microbiology*, 33, 297–301, (1996).
- [147] Ramachandran, P., Tiwaria, M. K., Singha, R. K., Hawb, J.-R., Jeya, M. ve Lee, J.-K., “Cloning and characterization of a putative β glucosidase (NfBGL595) from *Neosartorya fischeri*”, *Process Biochemistry*, 47, 99–105, (2012).
- [148] Parry, N. J., Beaver, D. E., Owen, E., Vandenberghe, I., Beeumen J.V. ve Bhat, M. K., “Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable β -glucosidase purified from *Thermoascus aurantiacus*”, *Biochem. J.*, 353, 117-127, (2001).
- [149] Saddler, J. N., “Screening of highly cellulolytic fungi and the action of their cellulase enzyme systems”, *Enzyme and Microbial Technology*, 4, 414-418, (1982).
- [150] Devi, M. C. ve Kumar, M. S., “Production, Optimization and Partial purification of Cellulase by *Aspergillus niger* fermented with paper and timber sawmill industrial wastes”, *J. Microbiol. Biotech. Res.*, 2(1), 120-128, (2012).

- [151] Prasad, P., Singh, T. ve Bedi, S., “Characterization of the cellulolytic enzyme produced by *Streptomyces griseorubens* (Accession No. AB184139) isolated from Indian soil”, *Journal of King Saud University – Science*, 25, 245–250, (2013).
- [152] Shahriarinnour, M., Abd Wahab, M. N., Ariff, A. ve Mohamad, R., “Screening, Isolation and Selection of Cellulolytic Fungi from Oil Palm Empty Fruit Bunch Fibre”, *Biotechnology*, 10(1), 108-113, (2011).
- [153] Rathore, S. S., Mannivannan A. ve Narendhirakannan, R. T., “Screening of Cellulase Producing Microorganisms from Lake Area Containing Water Hyacinth for Enzymatic Hydrolysis of Cellulose”, *Narendhirakannan et al, J Adv Sci Res*, 5(3), 23-30, (2014).
- [154] Maurya, D. P., Singh, D., Pratap, D. ve Maurya, J. P., “Optimization of solid state fermentation conditions for the production of cellulase by *Trichoderma reesei*”, *J. Environ. Biol.*, 33, 5-8, (2012).
- [155] Wang, J. Sh, Wang, J ve Gulfranz, M., “Efficient Cellulase Production from Corn Straw by *Trichoderma reesei* LW1 through Solid State Fermentation Process”, (2005).
- [156] Nadagouda, M., Lingappa, K., Bheemareddy, V. S. ve Malipatil S. “Optimization of Solid State Fermentation Conditions for the Production of Cellulase by Using *Trichoderma viride* GSG12”, *Bioscience Discovery*, 7(1), 01-06, (2016).
- [157] Fatma, H. A. El-Z. ve Fadel, M., “Production of Bioethanol Via Enzymatic Saccharification of Rice Straw by Cellulase Produced by *Trichoderma Reesei* Under Solid State Fermentation”, *New York Science Journal*, 3(4), 72-78, (2010).
- [158] Rashid, M.H. ve Siddiqui, K.S., “Purification and Characterization of a β -Glucosidase from *Aspergillus niger*”, *Folia Microbiol.* 42 (6), 544-550 (1997).

- [159] Ramani G., Meera, B., Vanitha, C., Rao M. ve Gunasekaran, P., “Production, Purification, and Characterization of a β -Glucosidase of *Penicillium funiculosum* NCL1”, *Appl Biochem Biotechnol.*, 167, 959–972, (2012).
- [160] Zhang Y.-B., Yuan L.-J., Chen Z.-J., Fu L., Lu J.-H., Meng Q.-F., He H., Yu X.-X., Lin F. ve Teng L.-R., “Purification and Characterization of β -Glucosidase from a Newly Isolated Strain *Tolypocladium cylindrosporium* Syzx4”, *Chem. Res. Chinese Universities*, 27(4), 557-561, (2011).
- [161] Amouri, B. ve Gargouri, A., “Characterization of a novel β -glucosidase from a *Stachybotrys* strain”, *Biochemical Engineering Journal*, 32, 191–197, (2006).
- [162] Liu, D., Zhang, R., Yang, X., Zhang, Z., Song, S., Miao Y., ve Shen, Q., “Characterization of a thermostable b-glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, and its functional expression in *Pichia pastoris* X33”, *Microbial Cell Factories*, 11(25), 1-15, (2012).
- [163] Souza, F. H. M., Nascimento, C. V., Rosa , J. C., Masui, D. C., Leone, F. A., Jorge, J. A. ve Furriel, R. P. M., “Purification and biochemical characterization of a mycelial glucose- and xylose-stimulated β -glucosidase from the thermophilic fungus *Humicola insolens*”, *Process Biochemistry*, 45, 272–278, (2010).
- [164] Madhu, K. M., Beena, P. S. ve Chandrasekaran, M., “Extracellular β -glucosidase Production by a Marine *Aspergillus sydowii* BTMFS 55 under Solid State Fermentation Using Statistical Experimental Design”, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14, 1-10, (2009).
- [165] Bai, H., Wang, H., Sun, J., Irfan, M., Han, M., Huang, Y., Han, X. ve Yang, Q., “Production, Prufication and Characterization of Novel Beta Glukosidase form Newly Isolated *Penicillium simplicissimum* H-11 in Submerged Fermentation”, *EXCLI Journal*, 12, 528-540, (2013).
- [166] Asha, P., Jose, D. ve Singh, I.S. B., “Purification and characterisation of processive-type endoglucanase and β -glucosidase from *Aspergillus ochraceus*

- MTCC 1810 through saccharification of delignified coir pith to glucose”, *Bioresource Technology*, 213, 245–248, (2016).
- [167] Qi, B., Wang, L. ve Liu, X., “Purification and characterization of β -glucosidase from newly isolated *Aspergillus* sp. MT-0204”, *African Journal of Biotechnology*, 8(10), 2367-2374, (2009).
- [168] Bhatti, H.N., Madeeha, M., Asgher, M. ve Batool, N., “Purification and thermodynamic characterization of glucose oxidase from a newly isolated strain of *Aspergillus niger*”, *Can. J. Microbiol.* 52, 519–524, (2006).
- [169] Bhat, K. M., Gaikwad J . S. ve Maheshwari, R., “Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase from the thermophilic fungus *Sporotrichum termophile* and its influence on cellulase activity”, *Journal of General Microbiology*, 139, 2825-2832, (1993).
- [170] Kitpreechavanich, V., Hayashi M. ve Nagai, S., “Purification and Characterization of Extracellular β -Xylosidase and β -Glucosidase from *Aspergillus fumigatus*” *Agric. Biol. Chem.*, 50 (7), 1703-1711, (1986).
- [171] Chirico W.J. ve Brown, R. D., “Purification and characterization of a β -glucosidase from *Trichoderma reesei*”, *Eur. J. Biochem.*, 165, 333-341, (1987).
- [172] Workman, W. E. and Day, D. F., “Purification and Properties of β -glucosidase from *Aspergillus terreus*”, *Applied and Environmental Microbiology*, 44 (6), 1289-1295, (1982).
- [173] Saibi, W. ve Gargouri, A., “Purification and Biochemical Characterization of an Atypical β -glucosidase from *Stachybotrys microspora*”, *Journal of Molecular Catalysis*, 72, 107– 115, (2011).
- [174] Li, Y.-Y., Jiang, C.-J., Wan, X.-C., Zhang, Z.-Z. ve Li, D.-X., “Purification and Partial Characterization of β -Glucosidase from Fresh Leaves of Tea Plants (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze)”, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37(6), 363–370, (2005).

- [175] Pal, S., Banik, S. P., Ghorai, S., Chowdhury, S. ve Khowala, S., “Purification and characterization of a thermostable intra-cellular β -glucosidase with transglycosylation properties from filamentous fungus *Termitomyces clypeatus*”, *Bioresource Technology*, 101, 2412–2420, (2010).
- [176] 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 Characterization of β -1,4-glucosidase from *Aspergillus glaucus*”, *African Journal of Biotechnology*, 10(84), 19607-19614, (2011).
- [177] Irshad, M., Anwar, Z., Ramzan, M., Mahmood, Z. and Nawaz, H., “Characterization of Purified β -glucosidase Produced from *Trichoderma viride* Through Bio-Processing of Orange Peel Waste”, *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 4, 941-944, (2013).
- [178] Okamoto, K., Sugita, Y., Nishikori, N., Nitta, Y. ve Yanase, H., “Characterization of two acidic β -glucosidases and ethanol fermentation in the brown rot fungus *Fomitopsis palustris*”, *Enzyme and Microbial Technology*, 48, 359–364, (2011).
- [179] Yan, T.-R. ve Lin, C.-L., “Purification and Characterization of a Glucosetolerant-Glucosidase from *Aspergillus niger* CCRC 31494”, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61(6), 965-970, (1997).
- [180] Murray, P., Aro, N., Collins, C., Grassick, A., Penttila, M., Saloheimo, M. ve Tuohy, M., “Expression in *Trichoderma reesei* and characterisation of a thermostable family 3 β -glucosidase from the moderately thermophilic fungus *Talaromyces emersonii*”, *Protein Expression and Purification*, 38, 248–257, (2004).
- [181] Pitson, S. M., Seviour, R. J. and McDougall, B., “Purification and Characterization of an Extracellular β -glucosidase from the Filamentous Fungus *Acremonium persicinum* and Its Probable Role in β -glucan Degradation”, *Enzyme and Microbial Technology*, 21, 182-190, (1997).
- [182] Elshafei, A. M., Hassan, M. M., Morsi N. M., ve Elghonamy, D. H., “Purification and some kinetic properties of β - glucosidase from *Aspergillus*

- terreus* NRRL 265”, *African Journal of Biotechnology*, 10(84), 19556-19569, (2011).
- [183] Ortega, N., Diego, S., Perez-Mateos, M. ve Busto, M.D., “Kinetic Properties and Thermal Behaviour of Polygalacturonase Used in Fruit Juice Clarification”, *Food Chemistry*, 88, 209-217, (2004).
- [184] Kalyani, D., Lee, K.-M., Tiwari, M. K., Ramachandran, P., Kim, H., Kim I.-W., Jeya, M. ve Lee, J.-K., “Characterization of a recombinant aryl β -glucosidase from *Neosartorya fischeri* NRRL181”, *Appl Microbiol Biotechnol*, 94, 413–423, (2012).
- [185] Gao, J., Zhao, X., Liu, H., Fan, Y., Cheng, H., Liang, F., Chen, X., Wang, N., Zhou, Y. ve Tai, G., “A highly selective ginsenoside Rb₁-hydrolyzing β -D-glucosidase from *Cladosporium fulvum*”, *Process Biochemistry*, 45, 897–903, (2010).
- [186] Zahoor, S., Javed, M. M., Aftab, S., Latif, F. ve Ikram-ul-Haq, “Metabolic engineering and thermodynamic characterization of an extracellular β glucosidase produced by *Aspergillus niger*”, *African Journal of Biotechnology*, 10(41), 8107-8116, (2011).
- [187] Freer, S. N., “Purification and Characterization of the Extracellular ,6-Glucosidase Produced by *Candida wickerhamii*”, *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, 243(2), 515-522, (1985).
- [188] Yan, T.-R., Lin, Y.-H. ve Lin, C.-L., “Purification and Characterization of an Extracellular β -Glucosidase II with High Hydrolysis and Transglucosylation Activities from *Aspergillus niger*”, *J. Agric. Food Chem.*, 46, 431-437, (1998).
- [189] Guo, B., Amano, Y. and Nozaki, K., “Improvements in Glucose Sensitivity and Stability of *Trichoderma reesi* β -Glucosidase Using Site-Directed Mutagenesis”, *Rsearch Article* 11(1), 1-12, (2016).

- [190] Copa-Patino, J. L., Rodriguez, J. and Perez-Leblic, M. I., “Purification and properties of a fl-glucosidase from *Penicillium oxalicum* autolysates”, *FEMS3 Microbiology Letters*, 67, 191-196, (1990).
- [191] Deshpande, V., Eriksson, K.-E. ve Pettersson, B., “Production, Purification and Partial Characterization of 1,4- β -Glucosidase Enzymes from *Sporotrichum pulverulentum*”, *Eur. J. Biochem.*, 191-198, (1978).
- [192] Li, X.-L., Ljungdahl, L. G., Ximenes, E. A., Chen, H., Felix, C. R., Cotta, M. A. ve Dien, B. S., “Properties of a Recombinant β -Glucosidase from Polycentric Anaerobic Fungus *Orpinomyces* PC-2 and Its Application for Cellulose Hydrolysis”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vol. 113–116, 233-250, (2004).
- [193] Traon-Masson, M.-P. ve Pellerin, P., “Purification and characterization of two β -D-glucosidases from an *Aspergillus niger* enzyme preparation: affinity and specificity toward glucosylated compounds characteristic of the processing of fruits”, *Enzyme and Microbial Technology*, 22, 374–382, (1998).
- [194] Lyman, E. S., Li, B. ve Renganathan, V., “Purification and Characterization of a Cellulose-Binding β -Glucosidase from Cellulose-Degrading Cultures of *Phanerochaete chrysosporium*”, *Applied And Environmental Microbiology*, 61(8), 2976–2980, (1995).
- [195] Lee, H.-L., Chang, C.-K., Jeng, W.-Y., Wang A. H.-J. ve Liang, P.-H., “Mutations in the substrate entrance region of β -glucosidase from *Trichoderma reesei* improve enzyme activity and thermostability”, *Protein Engineering, Design & Selection*, 25(11), 733–740, (2012).
- [196] Bissett, F. ve Sternberg, D., “Immobilization of *Aspergillus* Beta-Glucosidase on Chitosan”, *Applied and Environmental Microbiology*, 35(4), 750-755, (1978).
- [197] Ng I-S., Li, C.-W., Chan, S.-P., Chir, J.-L., Chen P. T., Tong, C.-G., Yu, S.-M. ve Ho, T.-H. D., “High-level production of a thermoacidophilic β -glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-5 by solid-state fermentation with rice bran”, *Bioresource Technology*, 101, 1310–1317, (2010).

- [198] Smith, M. H. ve Gold, M. H., "Phanerochaete chrysosporium β Glucosidases: Induction, Cellular Localization, and Physical Characterization", *applied and environmental microbiology*, 37(5), 938-942, (1979).