

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



**KATI SUBSTRAT FERMENTASYONU (KSF) İLE
TRICHODERMA HARZIANUM VE *TRICHODERMA VİRİDE*
TÜRÜ FUNGUSLARDA KSİLANAZ ÜRETİMİ,
SAFLAŞTIRILMASI VE BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİN
BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

HÜSEYİN ALPER İRTEM

BALIKESİR, MAYIS - 2018

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



KATI SUBSTRAT FERMENTASYONU (KSF) İLE
TRICHODERMA HARZIANUM VE *TRICHODERMA VİRİDE*
TÜRÜ FUNGUSLARDA KSİLANAZ ÜRETİMİ,
SAFLAŞTIRILMASI VE BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİN
BELİRLENMESİ

DOKTORA TEZİ

HÜSEYİN ALPER İRTEM

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

Prof. Dr. Hilmi NAMLI

Prof. Dr. Güven ÖZDEMİR

Prof. Dr. Ataç UZEL

Prof. Dr. Olga SAK

BALIKESİR, MAYIS - 2018

KABUL VE ONAY SAYFASI

HÜSEYİN ALPER İRTEM tarafından hazırlanan “KATI SUBSTRAT FERMENTASYONU (KSF) İLE *TRICHODERMA HARZIANUM* VE *TRICHODERMA VİRIDE* TÜRÜ FUNGUSLARDA KSİLANAZ ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI VE BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİN BELİRLENMESİ” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 03 Mayıs 2018 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof. Dr. Ayşe Dilek AZAZ

Üye
Prof. Dr. Hilmi NAMLI

Üye
Prof. Dr. Güven ÖZDEMİR

Üye
Prof. Dr. Ataç UZEL

Üye
Prof. Dr. Olga SAK


.....

.....

.....

.....

.....

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

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

Bu tez çalışması Balıkesir Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2014-094 nolu proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

KATI SUBSTRAT FERMENTASYONU (KSF) İLE *TRICHODERMA HARZIANUM* VE *TRICHODERMA VIRIDE* TÜRÜ FUNGUSLARDA KSİLANAZ ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI VE BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİN BELİRLENMESİ

DOKTORA TEZİ

HÜSEYİN ALPER İRTEM

BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

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

BALIKESİR, MAYIS - 2018

Bu çalışmada, Katı Substrat Fermentasyon (KSF) kültür ortamında geliştirilen *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418'den β -ksilosidaz enzimi saflaştırılmış ve biyokimyasal karakterizasyonu yapılmıştır.

Birçok biyoteknolojik uygulamalarda ticari öneme sahip, β -ksilosidaz enzimi, KSF ortamında substrat olarak buğday kepeğinin kullanılmasıyla geliştirilen *Trichoderma harzianum* (KSF ortamının nemlendirme sıvısı pH 4,0 Sitrik asit monohidrat ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$), optimum sıcaklık $35^\circ C$ ve inkübasyon süresi 7 gün) ve *Trichoderma viride* (KSF ortamının nemlendirme sıvısı pH 8,5 Di-sodyum hidrojen fosfat dihidrat ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) tamponu ile nemlendirilerek, optimum sıcaklık $25^\circ C$ ve inkübasyon süresi 7 gün) suşlarından elde edilmiştir. β -ksilosidaz enzimi, amonyum sülfat çöktürmesi ve Sepharose-4B-L-Tyrosine-1-Naphthylamine kullanılarak Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile iki basamakta saflaştırılmıştır.

Saflaştırılan β -ksilosidaz enzim aktivitesi, *p*-nitrofenil- β -D-ksilopiranosit (*p*NPX) substratı kullanılarak belirlenmiştir. *Trichoderma harzianum* β -ksilosidaz enzimi ($Th\beta$) %50,48 verimle 215,76 kat; *Trichoderma viride* β -ksilosidaz ($Tv\beta$) ise %33,43 verimle 92,39 kat saflaştırılmıştır. SDS-PAGE ve Native-PAGE ile $Th\beta$ ve $Tv\beta$ enzimlerinin molekül ağırlıkları sırasıyla 20 kDa ve 25 kDa olarak belirlenmiş olup tek alt üniteden oluştukları tespit edilmiştir. $Th\beta$ ve $Tv\beta$ enzimlerinin optimum pH değerleri 6,0; optimum sıcaklık değerleri ise sırasıyla $75^\circ C$ ve $65^\circ C$ olarak saptanmıştır.

$Th\beta$ enzimin K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,25 mM ve 2500 EU; $Tv\beta$ enziminin ise 0,5 mM ve 2500 EU olarak belirlenmiştir. Ayrıca saflaştırılan β -ksilosidaz enzimlerinin aktiviteleri bir β -ksilosidaz inhibitörü olan D-(+)-ksiloz karşı belirlenmiştir. D-(+)-ksiloz inhibitörünün $Th\beta$ enzimini karışık, $Tv\beta$ enzimini ise yarışmalı olarak inhibe ettiği belirlenmiştir. D-(+)-ksilozun $Th\beta$ enzim aktivitesi üzerine IC_{50} ve K_i değerleri sırasıyla $1,1 \times 10^{-1}$ mM ve $1,10 \times 10^{-3} / 5,57 \times 10^{-3}$; $Tv\beta$ enziminin IC_{50} ve K_i değerleri ise $7,1 \times 10^{-2}$ mM ve $2,64 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-5}$ olarak hesaplanmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* β -ksilosidaz, katı substrat fermentasyonu, optimizasyon, saflaştırma, biyokimyasal, elektroforetik ve kinetik özellikler

ABSTRACT

XYLANASE PRODUCTION, PURIFICATION AND IDENTIFICATION OF BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF *TRICHODERMA HARZIANUM* AND *TRICHODERMA VIRIDE* SPECIES FUNGI THROUGH SOLID STATE FERMENTATION

PH.D THESIS

HÜSEYİN ALPER İRTEM

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. AYŞE DİLEK AZAZ)

BALIKESİR, MAY 2018

In this study, purification and biochemical characterization of β -xylosidase enzyme purified from *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 and *Trichoderma viride* NRRL 6418 growth in solid state fermentation (SSF) was performed.

β -xylosidase enzyme that has many biotechnological applications, was primarily obtained from *Trichoderma harzianum* (SSF conditions moistening citric acid monohydrate ($C_6H_8O_7H_2O$) pH 4.0, temperature 35°C and incubated 7 days) and *Trichoderma viride* (SSF conditions moistening disodium hydrogen phosphate dihydrate ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) pH 8.5, temperature 25°C and 7 days) grown in SSF using wheat bran as a substrate. β -xylosidase enzyme was purified using two-step procedures, namely ammonium sulfate precipitation and Sepharose-4B-L-Tyrosine-1-Naphthylamine Hydrophobic Interaction Chromatography.

In our study, purified β -xylosidase enzyme activity was determined by using para-Nitrophenyl-beta-D-xylopyranoside (*p*NPX) substrate. The purification rate was found 215.76 fold with yield of 50.48% for the obtained β -xylosidase from *Trichoderma harzianum* (Th β) and 92.39, 33.43% yield for the obtained β -xylosidase from *Trichoderma viride* (Tv β). Molecular weights of Th β and Tv β enzymes were determined 20kDa and 25kDa, respectively, using SDS and Native PAGE analysis, and are formed in sub-unit. Optimum pH values of Th β and Tv β enzymes were 6.0; respectively, optimum temperature values were determined as 75°C and 65°C.

The K_m and V_{max} values of Th β enzyme were determined as 0.25 mM and 2500 EU, respectively; while for the Tv β enzyme 0.5 mM and 2500 EU. In addition, the activities of purified β -xylosidase enzymes were determined against D-(+)-xylose which is a β -xylosidase inhibitor. It is determined that D-(+)-xylose inhibitor inhibited the Th β enzyme mixed and the Tv β enzyme competitively. The IC_{50} and K_i values for D-(+)-xylose Th β enzyme activity were calculated according to an order as 1.1×10^{-1} mM and $1.10 \times 10^{-3} / 5.57 \times 10^{-3}$; respectively IC_{50} and K_i values of Tv β enzyme as 7.1×10^{-2} mM and $2.64 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-5}$.

KEYWORDS: *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, β -xylosidase, solid substrate fermentation, optimization, purification, biochemical, electrophoretic and kinetic properties

İÇİNDEKİLER

Sayfa

| | |
|---|-----------|
| ÖZET..... | i |
| ABSTRACT | ii |
| İÇİNDEKİLER | iii |
| ŞEKİL LİSTESİ..... | vi |
| TABLO LİSTESİ | viii |
| SEMBOL LİSTESİ..... | x |
| ÖNSÖZ..... | xi |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 1.1 Enzimlerin özellikleri..... | 3 |
| 1.1.1 Enzimler ve sınıflandırma..... | 4 |
| 1.2 Ksilan ve ksilanazların genel özellikleri | 6 |
| 1.2.1 Ksilan | 6 |
| 1.2.2 Ksilanazlar | 7 |
| 1.2.3 Ksilanaz kaynakları..... | 9 |
| 1.2.4 Ksilanazların çeşitliliği ve sınıflandırması..... | 9 |
| 1.2.5 Ksilanazların genel özellikleri | 10 |
| 1.2.6 Ksilanazların biyoteknoloji ve endüstriyel uygulama alanları..... | 11 |
| 1.2.6.1 Ksilanazların biyoteknolojideki uygulama alanları | 11 |
| 1.2.6.2 Ksilanazların endüstriyel uygulama alanları | 11 |
| 1.3 Ksilanaz üretimi | 14 |
| 1.3.1 Katı substrat fermentasyon (KSF) yöntemi | 15 |
| 1.3.1.1 Katı substrat fermentasyonunda avantajlar ve dezavantajlar | 17 |
| 1.4 <i>Trichoderma</i> cinsinin genel özellikleri | 18 |
| 2. MATERYAL VE METOT | 20 |
| 2.1 Materyal | 20 |
| 2.1.1 Ksilanaz aktivitesine sahip mikrofungusların belirlenmesi | 20 |
| 2.1.2 Deneyleerde kullanılan <i>Trichoderma</i> türleri ve genel özellikleri..... | 20 |
| 2.1.2.1 <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai 1969 | 20 |
| 2.1.2.2 <i>Trichoderma viride</i> Pers. Ex Gray 1821 | 21 |
| 2.1.3 Kullanılan tamponlar ve çözeltiler..... | 22 |
| 2.1.3.1 Mikrofungus kültürlerini geliştirmek için hazırlanan besiyerleri | 22 |
| 2.1.3.2 Hidroliz zonu belirlenirken kullanılan çözeltiler | 23 |
| 2.1.3.3 Mikrofungusların spor süspansiyonları elde edilirken kullanılan çözelti..... | 23 |
| 2.1.3.4 KSF ortamında nemlendirme sıvısı olarak kullanılacak tampon çözeltilerin hazırlanması | 24 |
| 2.1.3.5 Ksilanaz aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan substrat çözeltisi ve tampon çözeltilerin hazırlanması..... | 24 |
| 2.1.3.6 Hidrofobik etkileşim kromatografisi kolonunda kullanılan jelin sentezlenmesi | 25 |
| 2.1.3.6.1 Sefaroz (Sephacrose) 4B jelini aktifleştirme | 25 |
| 2.1.3.6.2 L-Tirozin bağlama..... | 25 |
| 2.1.3.6.3 1-Naftilamin bileşiğinin bağlanması | 26 |

| | | |
|----------|--|----|
| 2.1.3.7 | Lowry yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözeltiler | 26 |
| 2.1.3.8 | Hidrofobik etkileşim kromatografisi (HEK) yönteminde kullanılan çözeltiler | 27 |
| 2.1.3.9 | SDS-PAGE tekniğinde kullanılan çözeltiler | 27 |
| 2.1.3.10 | NATIVE-PAGE tekniğinde kullanılan çözeltiler | 29 |
| 2.2 | Metot | 30 |
| 2.2.1 | Ksilanaz aktivitesine sahip olan mikrofungusların belirlenmesi | 30 |
| 2.2.2 | Mikrofungusların üretimi ve spor eldesi | 30 |
| 2.2.3 | Katı substrat fermentasyon (KSF) ortamının hazırlanması | 31 |
| 2.2.4 | Katı substrat fermentasyonu (KSF) kültür ortamına ekim ve kısmi saflaştırılmış ksilanaz enziminin eldesi | 31 |
| 2.2.5 | Üretim koşullarının katı substrat fermentasyon (KSF) kültür koşullarında geliştirilen mikrofungus β -ksilosidaz enzim sentezi üzerine etkisinin belirlenmesi | 32 |
| 2.2.5.1 | Optimum pH ve nemlendirme sıvılarının belirlenmesi | 32 |
| 2.2.5.2 | Optimum inkübasyon sıcaklığının belirlenmesi | 32 |
| 2.2.5.3 | Optimum inkübasyon süresinin belirlenmesi | 33 |
| 2.2.6 | β -ksilosidaz aktivitesinin belirlenmesi | 33 |
| 2.2.7 | Protein tayini | 35 |
| 2.2.7.1 | Kalitatif protein tayini | 35 |
| 2.2.7.2 | Lowry metodu ile proteinlerin kantitatif tayini | 35 |
| 2.2.7.3 | BSA standart grafiğinin hazırlanması | 36 |
| 2.2.8 | Enzim saflaştırma | 37 |
| 2.2.8.1 | Amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesi | 37 |
| 2.2.8.2 | Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile β -ksilosidaz enziminin saflaştırılması | 38 |
| 2.2.9 | NATIVE/SDS-PAGE yöntemi kullanılarak β -ksilosidaz enziminin saflığı ve alt birimlerinin belirlenmesi | 38 |
| 2.2.9.1 | SDS-PAGE yöntemi kullanılarak β -ksilosidaz enziminin saflığının ve alt birimlerinin kontrolü | 39 |
| 2.2.9.2 | NATIVE-PAGE yöntemi kullanılarak β -ksilosidaz enziminin saflığının ve alt birimlerinin kontrolü | 40 |
| 2.2.10 | Saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi | 41 |
| 2.2.10.1 | Saflaştırılan β -ksilosidaz enziminine farklı pH'ların etkisi | 41 |
| 2.2.10.2 | Saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerinin belirlenmesi | 42 |
| 2.2.10.3 | Saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin termal kararlılığının belirlenmesi | 42 |
| 2.2.10.4 | β -ksilosidaz enziminin p-nitrofenil β -D-ksilopiranosit (<i>p</i> NPX) substratına karşı K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi | 43 |
| 2.2.10.5 | İnhibitör olarak kullanılan D-(+)-ksilozun IC_{50} değerinin belirlenmesi | 43 |
| 2.2.10.6 | İnhibitör olarak kullanılan D-(+)-ksilozun K_i değerinin bulunması | 43 |

| | |
|---|------------|
| 3. BULGULAR | 45 |
| 3.1 β -ksilosidaz aktivitesine sahip mikrofungusların belirlenmesi..... | 45 |
| 3.2 Üretim koşullarının katı substrat fermentasyon (KSF) ortamında Üretilen fungus β -ksilosidaz enzimi sentezi üzerine etkisi..... | 45 |
| 3.2.1 Optimum pH ve nemlendirme sınırlarının belirlenmesi | 46 |
| 3.2.2 Optimum inkübasyon sıcaklığının belirlenmesi | 48 |
| 3.2.3 Optimum inkübasyon süresinin belirlenmesi..... | 49 |
| 3.3 β -ksilosidaz enziminin saflaştırılması..... | 50 |
| 3.4 Amonyum sülfat tuzu kullanılarak çöktürme aralığının belirlenmesi..... | 51 |
| 3.5 Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile β -ksilosidaz enziminin saflaştırılması | 54 |
| 3.6 <i>Trichoderma harzianum</i> NRRL 13019 ve <i>Trichoderma viride</i> NRRL 6418'den elde edilerek saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin NATIVE/SDS PAGE tekniği kullanılarak saflığının ve alt birimlerinin kontrolü..... | 60 |
| 3.7 Saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi..... | 62 |
| 3.7.1 <i>Trichoderma harzianum</i> NRRL 13019 ve <i>Trichoderma viride</i> NRRL 6418'den elde edilerek saflaştırılan β -ksilosidaz enzim aktivitesine farklı pH'ların etkisi | 62 |
| 3.7.2 <i>Trichoderma harzianum</i> NRRL 13019 ve <i>Trichoderma viride</i> NRRL 6418'den elde edilerek saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerlerinin belirlenmesi | 63 |
| 3.7.3 <i>Trichoderma harzianum</i> NRRL 13019 ve <i>Trichoderma viride</i> NRRL 6418'den elde edilerek saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin termal kararlılığının belirlenmesi..... | 64 |
| 3.7.4 <i>Trichoderma harzianum</i> NRRL 13019 ve <i>Trichoderma viride</i> NRRL 6418'den elde edilerek saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin pNPX substratına karşı K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi..... | 66 |
| 3.7.5 <i>Trichoderma harzianum</i> NRRL 13019 ve <i>Trichoderma viride</i> NRRL 6418'den saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin inhibitörü olan D-(+)-ksilozun IC_{50} değerlerinin belirlenmesi | 70 |
| 3.7.6 <i>Trichoderma harzianum</i> NRRL 13019 ve <i>Trichoderma viride</i> NRRL 6418'den saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin inhibitörü olan D-(+)-ksilozun inhibisyon tipinin ve K_i değerlerinin belirlenmesi | 74 |
| 4. TARTIŞMA VE SONUÇ | 83 |
| 5. KAYNAKLAR | 101 |

ŞEKİL LİSTESİ

| | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| Şekil 1.1: Ksilanın tam hidrolizinde gerekli enzimler ve etki bölgeleri..... | 8 |
| Şekil 2.1: (a) <i>Trichoderma harzianum</i> NRRL 13019 petri (10x10); (b) <i>Trichoderma harzianum</i> NRRL 13019 preparat (10x40)..... | 21 |
| Şekil 2.2: (a) <i>Trichoderma viride</i> NRRL 6418 petri (10x10); (b) <i>Trichoderma viride</i> NRRL 6418 preparat (10x40)..... | 22 |
| Şekil 2.3 Enzim aktivite tayininde kullanılan 210 µL hacimli pNPX standart grafiği..... | 34 |
| Şekil 2.4: Lowry yöntemi ile protein miktarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik..... | 36 |
| Şekil 3.1: (a) <i>Trichoderma harzianum</i> NRRL 13019; (b) <i>Trichoderma viride</i> NRRL 6418. | 45 |
| Şekil 3.2: Katı substrat fermentasyon kültür ortamında farklı pH'lardaki nemlendirme sıvılarının <i>Trichoderma harzianum</i> NRRL 13019 ve <i>Trichoderma viride</i> NRRL 6418'den elde edilen β-ksilosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi. | 47 |
| Şekil 3.3: Katı substrat fermentasyon kültür ortamında farklı inkübasyon sıcaklıklarının <i>Trichoderma harzianum</i> NRRL 13019 ve <i>Trichoderma viride</i> NRRL 6418'den elde edilen β-ksilosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi. | 49 |
| Şekil 3.4: Katı substrat fermentasyon kültür ortamında farklı inkübasyon sürelerinin <i>Trichoderma harzianum</i> NRRL 13019 ve <i>Trichoderma viride</i> NRRL 6418'den elde edilen β-ksilosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi. | 50 |
| Şekil 3.5: <i>Trichoderma harzianum</i> NRRL 13019 amonyum sülfat çöktürme aralığı-enzim aktivite-protein miktarı grafiği..... | 52 |
| Şekil 3.6: <i>Trichoderma viride</i> NRRL 6418 amonyum sülfat çöktürme aralığı-enzim aktivite-protein miktarı grafiği..... | 53 |
| Şekil 3.7: Hidrofobik etkileşim kromatografisi kullanılarak saflaştırılan <i>Trichoderma harzianum</i> NRRL 13019'dan elde edilen β-ksilosidaz enziminin elüsyon grafiği. | 55 |
| Şekil 3.8: Hidrofobik etkileşim kromatografisi kullanılarak saflaştırılan <i>Trichoderma viride</i> NRRL 6418'den elde edilen β-ksilosidaz enziminin elüsyon grafiği. | 58 |
| Şekil 3.9: <i>Trichoderma harzianum</i> NRRL 13019'dan saflaştırılan β-ksilosidaz enziminin poliakrilamid jel elektroforez görüntüleri (a): SDS-poliakrilamid jel elektroforezi, (b): Native-poliakrilamid jel elektroforezi. | 61 |
| Şekil 3.10: <i>Trichoderma viride</i> NRRL 6418'den saflaştırılan β-ksilosidaz enziminin poliakrilamid jel elektroforez görüntüleri (a): SDS-poliakrilamid jel elektroforezi, (b): Native-poliakrilamid jel elektroforezi. | 61 |

| | |
|--|----|
| Şekil 3.11: <i>Trichoderma harzianum</i> NRRL 13019 ve <i>Trichoderma viride</i> NRRL 6418'den saflaştırılan β -ksilosidaz enzim aktivitesine farklı pH ların etkisi. | 63 |
| Şekil 3.12: <i>Trichoderma harzianum</i> NRRL 13019 ve <i>Trichoderma viride</i> NRRL 6418'den saflaştırılan β -ksilosidaz enzim aktivitesine Sıcaklığın etkisi. | 64 |
| Şekil 3.13: <i>Trichoderma harzianum</i> NRRL 13019'dan elde edilen Saflaştırılmış β -ksilosidaz enziminin termal kararlılığı. | 65 |
| Şekil 3.14: <i>Trichoderma viride</i> NRRL 6418'den elde edilen saflaştırılmış β -ksilosidaz enziminin termal kararlılığı..... | 65 |
| Şekil 3.15: <i>Trichoderma harzianum</i> NRRL 13019'dan saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin KM ve Vmax değerlerini gösteren Lineweaver-Burk grafiği. | 69 |
| Şekil 3.16: <i>Trichoderma viride</i> NRRL 6418'den saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin KM ve Vmax değerlerini gösteren Lineweaver-Burk grafiği. | 70 |
| Şekil 3.17: <i>Trichoderma harzianum</i> NRRL 13019'dan saflaştırılan β -ksilosidaz enzim inhibitörü olan D-(+)-ksiloza ait IC50 grafiği.... | 73 |
| Şekil 3.18: <i>Trichoderma viride</i> NRRL 6418'den saflaştırılan β -ksilosidaz enzim inhibitörü olan D-(+)-ksiloza ait IC50 grafiği..... | 73 |
| Şekil 3.19: Lineweaver-Burk grafiği üzerinde <i>Trichoderma harzianum</i> NRRL 13019 β -ksilosidaz enzimine D-(+)-ksilozun farklı konsantrasyonlarının inhibisyon etkisi..... | 78 |
| Şekil 3.20: Lineweaver-Burk grafiği üzerinde <i>Trichoderma viride</i> NRRL 6418 β -ksilosidaz enzimine D-(+)-ksilozun farklı konsantrasyonlarının inhibisyon etkisi..... | 82 |

TABLO LİSTESİ

| | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| Tablo 2.1: SDS-PAGE'deki jellerin hazırlanması | 28 |
| Tablo 2.2: Native-PAGE'deki jellerin hazırlanması | 29 |
| Tablo 3.1: Katı substrat fermentasyon kültür ortamında farklı pH'lardaki nemlendirme sıvılarının <i>Trichoderma harzianum</i> NRRL 13019 ve <i>Trichoderma viride</i> NRRL 6418'den elde edilen β -ksilosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi | 47 |
| Tablo 3.2: Katı substrat fermentasyon kültür ortamında farklı sıcaklıkların <i>Trichoderma harzianum</i> NRRL 13019 ve <i>Trichoderma viride</i> NRRL 6418'den elde edilen β -ksilosidaz enzim aktivitesi Üzerine etkisi..... | 48 |
| Tablo 3.3: Katı substrat fermentasyon kültür ortamında farklı inkübasyon sürelerinin <i>Trichoderma harzianum</i> NRRL 13019 ve <i>Trichoderma viride</i> NRRL 6418'den elde edilen β -ksilosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi | 50 |
| Tablo 3.4: <i>Trichoderma harzianum</i> NRRL 13019'dan elde edilen kısmi saflaştırılmış β -ksilosidaz enziminin amonyum sülfat çöktürme yöntemi sonundaki β -ksilosidaz enzimaktivitesi ve protein miktarı | 51 |
| Tablo 3.5: <i>Trichoderma viride</i> NRRL 6418'den elde edilen kısmi saflaştırılmış β -ksilosidaz enziminin amonyum sülfat çöktürme yöntemi sonundaki β -ksilosidaz enzimaktivitesi ve protein miktarı | 53 |
| Tablo 3.6: <i>Trichoderma harzianum</i> NRRL 13019'dan elde edilen β -ksilosidaz enziminin saflaştırma tablosu | 56 |
| Tablo 3.7: <i>Trichoderma viride</i> NRRL 6418'den elde edilen β -ksilosidaz enziminin saflaştırma tablosu..... | 59 |
| Tablo 3.8: <i>Trichoderma harzianum</i> NRRL 13019 β -ksilosidaz enziminin kinetik parametreleri | 67 |
| Tablo 3.9: <i>Trichoderma viride</i> NRRL 6418 β -ksilosidaz enziminin kinetik parametreleri..... | 68 |
| Tablo 3.10: <i>Trichoderma harzianum</i> NRRL 13019'dan saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin K_M , V_{max} ve V_{max}/K_M değerleri | 69 |
| Tablo 3.11: <i>Trichoderma viride</i> NRRL 6418'den saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin K_M , V_{max} ve V_{max}/K_M değerleri | 70 |
| Tablo 3.12: <i>Trichoderma harzianum</i> NRRL 13019'dan saflaştırılan β -ksilosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren D-(+)-ksilozun, IC_{50} değerinin hesaplanmasında kullanılan veriler | 71 |
| Tablo 3.13: <i>Trichoderma viride</i> NRRL 6418'den saflaştırılan β -ksilosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren D-(+)-ksilozun, IC_{50} değerinin hesaplanmasında kullanılan veriler | 72 |

| | |
|---|----|
| Tablo 3.14: <i>Trichoderma harzianum</i> NRRL 13019'dan saflaştırılan β -ksilosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren D-(+)-ksilozun K_i değerinin hesaplanmasında kullanılan veriler | 75 |
| Tablo 3.15: <i>Trichoderma viride</i> NRRL 6418'den saflaştırılan β -ksilosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren D-(+)-ksilozun K_i değerinin hesaplanmasında kullanılan veriler | 79 |

SEMBOL LİSTESİ

| Sembol | Sembol Açıklaması veya Adı |
|------------------|---|
| g | Gram |
| mM | Milimolar |
| M | Molar |
| μ L | Mikrolitre (10^{-6} litre) |
| μ m | Mikrometre (10^{-6} metre) |
| μ g | Mikrogram (10^{-6} gram) |
| rpm | Rotary Per Minute |
| kDA | Kilodalton |
| KSF | Katı Substrat Fermentasyonu |
| SKF | Sıvı Kültür Fermentasyonu |
| β | Beta |
| $^{\circ}$ C | Santigrat Derece |
| <i>p</i> NPX | <i>p</i> -Nitrofenil β -D-ksilopiranosit |
| EU | Enzim Ünitesi |
| E.C | Enzyme Commission |
| SDS | Sodyum Dodesil Sülfat |
| PAGE | Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi |
| TEMED | N,N,N',N', -tetrametil etilen diamin |
| APS | Amonyum Persülfat |
| BSA | Bovin Serum Albumin (Sığır Serum Albumini) |
| [S] | Substrat Konsantrasyonu |
| [I] | İnhibitör Konsantrasyonu |
| KM | Michaelis-Menten Sabiti |
| V_{max} | Maksimum Hız |
| IC ₅₀ | İnhibe Edici Konsantrasyonun Yüzdesi |
| <i>p</i> NPA | <i>p</i> -Nitrofenil α -L-Arabinofuranosit |
| <i>o</i> NPX | <i>o</i> -Nitrofenil β -D-ksilopiranosit |

ÖNSÖZ

Bana araştırma olanağı sağlayan, tez çalışmamın her aşamasını planlayarak bana yol gösteren, engin bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, yönlendirme ve deneyimlerini benimle paylaşan, desteğini hep hissettiğim, çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren danışman hocam Prof.Dr. Ayşe Dilek AZAZ'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, bilgi birikimi ve desteğiyle yanımda olan Yrd.Doç.Dr. Selma ÇELEN YÜCETÜRK'e teşekkür ederim.

Tezin deneysel aşamalarını gerçekleştirdiğim laboratuvar ortamında ekip olmanın önemini, birlikte hareket etmenin gücünü sürekli olarak vurgulayan hocalarıma, çalışma arkadaşlarım Aslı TANGÜNÜ ve Yaprak ALPINAR'a teşekkür ederim.

Yoğun çalışma sürecimde beni her zaman destekleyen, anlayış gösteren, yanımda olan Eşim biyolog Yasemin İRTEM ve oğlum Gökhan İRTEM'e beni yetiştiren ve bugünlere gelmemi sağlayan anne ve babama en içten duygularıyla teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

Enzimler, hayvansal ve bitkisel hücrelerde biyokimyasal tepkimeleri katalizleyen protein yapısında organik moleküllerdir. Hücrede önemli metabolik görevlere sahip olan enzimler farklı amaçlarla kullanılmak üzere ekonomik ve günlük hayata girmiştir [1,2,3].

Enzim terimi ilk kez W. Kühne tarafından ferment yerine kullanılmıştır. Kelimenin orijini Yunanca olup “maya” anlamını taşımaktadır. İnsanlar enzimatik reaksiyonlardan çok eski tarihlerden itibaren yararlanmışlardır. Örneğin şarap, yoğurt, ekmek, boza ve kıymız yapmışlardır. Tüm bu gıda maddelerini üretirken enzimlerden, enzimlerin katalitik etkilerinden nasıl olduğunu bilmedikleri halde yararlanmışlardır [3,4].

İlk defa 1783'te Spallanzi atmaca mide öz suyunun eti erittiğini göstererek hücre dışında da enzimlerin bir aktiviteye sahip olduğunu kanıtlamıştır. Kirchoff 1811'de buğday nişastasının şekere dönüştüğünü tespit etmiştir [5].

İlk kez 1833 yılında Persoz ve Payen, alkol kullanarak malt ekstresinden nişastayı sindiren enzimi ayırt ederek buna “Diyastaz” ismini vermişlerdir [4,6]. 1836 yılında Schwan mide suyundan pepsin enzimini elde etmiştir. Kristal haldeki ilk enzim olan üreaz ancak 1926'da Summer tarafından izole edilmiştir. Tripsin, pepsin ve kimotripsin enzimlerinin kristal halleri ise 1930-1936 yılları arasında Northrop tarafından elde edilmiştir [4].

Enzimler hayvansal, bitkisel ve mikroorganizma kaynaklı olabilmekle birlikte endüstriyel uygulamalarda kullanılanlar genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bu durumun başlıca sebepleri, mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin hayvansal veya bitkisel kaynaklardan elde edilen enzimlere oranla yüksek katalitik aktivitelerinin olması, ucuz ve daha stabil olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, yüksek saflıkta ve çok miktarda üretilebilmeleridir [1,7].

Endüstriyel alanda kullanım için mikroorganizmalar çok uygun canlılardır. Mikroorganizmaların çeşitliliğinin korunması ve tespit edilmesi, biyoendüstrinin gelişimine önemli katkılarda bulunmaktadır. Genetik olarak değiştirilmiş, çok yönlü

yapıdaki, yüksek büyüme hızına sahip mikroorganizmalar, yeni endüstriyel alanların oluşturulmasında yüksek kullanım potansiyeli taşımaktadırlar [8,9]. Mikroorganizmaların genetik ve metabolik potansiyellerine ilişkin olarak elde edilen bilgiler; tıbbi ve endüstriyel açıdan önemli enzimlerin üretilmesi, gıda ve biyoinsektisitlerin üretimi ve saklanması, çevre kirliliğinin engellenmesi, kimyasal yollarla üretimi mümkün olmayan steroid hormonları ve bazı antibiyotikleri içine alan farmasötiklerin üretilmesi gibi pek çok sahada biyoteknolojik proseslerin kullanımını ve geliştirilmesini artırmıştır [9].

Ticari amaçla kullanılan ve üretimi yapılan enzimlerin büyük kısmını, mikroorganizmalar üretmekte ve endüstriyel alanda enzimlerin kullanılması dünya çapında hızlı bir şekilde artmaktadır. Mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin biyoteknolojiden yararlanılarak üretilmesi onların çeşitli matrikslere bağlanarak kararlı hale gelmeleri, farklı endüstrilerde kullanılmalarındaki artışın ana sebeplerindendir [9].

Enzimler, hücrede bütün metabolik tepkimeleri idare eden ve son derece özel protein yapıdaki katalizörlerdir. Organik kimya alanında kullanılan yöntemler ile çok sayıda kimyasal reaksiyonun doğru enzim varlığında, özgül ve basitçe gerçekleşebilmesi, canlı hücreden enzimin izolasyonu ve canlı dışında farklı hedeflere yönelik kullanımına ilişkin çalışmaların önemini artırmıştır [9].

Enzimatik proseslerin çevre kirliliğine daha az neden olması, kimyasal proseslerden daha uygun şartlarda ve daha az maliyetle gerçekleşmesinden dolayı deri, tekstil ve deterjan endüstrisi ile atıkların giderilmesi sürecindeki kullanımları büyük ölçüde artmıştır [9].

Son yıllarda endüstriyel alanda kullanılan enzimlerin yaklaşık %90'ı mikroorganizmalardan fermentasyon yöntemi kullanılarak üretilmektedir [10]. Dünya geneline bakıldığında endüstriyel enzimlerin ticari pazar payı tahmini olarak 7 milyar dolardır. Bu enzimlerin kullanıldığı alanlar %56 genel amaçlı teknik alanlar, %29 gıda ve %15 hayvan yemi endüstrisidir [11,12].

Enzimler birçok endüstriyel uygulamada yaygın olarak kullanılmaktadır. Daha kararlı, yüksek aktiviteli ve spesifik enzimler için talep hızla artmaktadır. Dünya genelinde endüstriyel alanda kullanılan enzimlerin %60'ı Avrupa'da, %40 ise Japonya ve ABD'de üretilmektedir [13].

Ayrıca, endüstriyel enzimlerin yaklaşık %75'ini hidrolazlar oluşturmakta olup karbonhidrolazlar ikinci en büyük grup olma özelliğindedirler. Selülazlar ve hemiselülazlar 1980'lerin başında ilk olarak hayvan yemlerinde kullanılmaya başlanmış, ardından gıda, tekstil, kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde kullanılmıştır. Son yirmi yılda selülazların, hemiselülazların ve pektinazların kullanımı önemli derecede artmıştır. Günümüzde bu enzimler dünya enzim pazarında yaklaşık %20'lik yere sahip olup çoğunlukla *Trichoderma* ve *Aspergillus* türlerinden elde edilmektedirler [13].

Özellikle mikroorganizma kökenli enzimlerin endüstriyel alanlarda kullanımları ve önemleri giderek artmaktadır. Bu nedenle yeni enzim kaynaklarının belirlenmesi ayrıca elde edilen enzimlerin endüstriyel uygulamalarda kullanılabilirliklerini belirleyecek olan biyokimyasal ve kinetik özelliklerinin saptanması çalışmamızın hedefini oluşturmaktadır.

1.1 Enzimlerin Özellikleri

Enzimler protein yapıdaki biyolojik katalizörlerdir. Hücre içinde üretilmelerine karşın çoğu hücre dışında da aktivitesini sürdürür. Enzimler, endüstriyel alanlarda bu özellikten dolayı etkili bir şekilde kullanılmaktadır. Enzimlerin aktivasyonu, sahip oldukları katalitik yapıdan kaynaklanır ve reaksiyon esnasında aktivasyon enzim tüketilmeksizin gerçekleşir.

Substrat, enzimin spesifik olarak etki ettiği maddedir. Enzimatik bir tepkimenin sonucunda substrattan meydana gelen maddeye de ürün adı verilmektedir. Enzimler, etki ettikleri maddenin adının sonuna “-az” eki getirililerek isimlendirilir. Enzimlerin şifresi genler üzerinde yer alır. Bu sebeple her enzimin amino asit dizilişi spesifikdir. Doğadaki bütün metabolik reaksiyonlar enzimlerin kontrolünde gerçekleşmektedir. Reaksiyon sırasında enzimlerin yapısı değişikliğe uğramadığından farklı bir substrat ile yeniden reaksiyona girebilmektedirler. Kimyasal katalizörlerin çoğu çok sayıda reaksiyonu katalizleyebilmektedir. Fakat bu katalizörler çoğunlukla hem seçici hem de özgül değildirler. Enzimler ise oldukça seçici olduğundan spesifik reaksiyonlarda katalizör olarak görev almaktadırlar. Enzim molekülünün şeklinden kaynaklanmakta olan bu özellik, enzim substrat

ilişkinini “anahtar-kilit” uyumu olarak açıklar. Bazı enzimler iki farklı kısımdan oluşmaktadır. Bu yapılar Koenzim (Organik ya da İnorganik kısım) ve Apoenzim (protein kısım) olarak isimlendirilir. Ne Koenzim ne de apoenzim tek başlarına işlevseldir. Metabolizmadaki eser elementler, bakır, çinko, mangan, demir ve diğer elementler bu enzimatik tepkimelerde aktivatördür. Bazı enzimlerin etkinliği yapısında yer alan metal iyonları ile ilişkilidir. Dolayısıyla koenzim kısmında, potasyum, magnezyum, kalsiyum, çinko bulunuyor ise kofaktör ismini almaktadır. Koenzim kısmı organik ise ve apoenzime kovalent bağlarla bağlanırsa prostetik grup olarak isimlendirilir. Apoenzim ve Koenzim (Prostetik grup) birlikteliği Holoenzim olarak ifade edilmektedir.

Genellikle globüler yapıda bulunan bir enzim molekülünün, molekül içi veya moleküller arası bağlarla tersiyer ya da sekonder yapısı korunur. Sıcaklık ve pH’daki değişimler ile proteinlerin bu yapıları bozulabilmektedir. Bu nedenle, bir enzimin katalitik aktivitesi sıcaklığa ve pH’a duyarlı olmaktadır. Tepkimede yer alacak moleküller sıcaklıktaki artışa bağlı olarak kinetik enerji ile yüklenir ve böylece moleküllerin tepkime için karşılaşma ihtimali artar. Tüm enzimler katalitik aktivitelerinin en yüksek olduğu bir sıcaklık değerine sahiptir. Bu değere “optimum sıcaklık” değeri denir. Optimum değer üstündeki sıcaklıkta molekül içi veya arası bağlardaki kopma sonucunda enzimin yapısı denatüre olmaya başlamaktadır. Benzer şekilde her enzim en iyi iş gördüğü bir optimum pH aralığına sahiptir. pH’daki değişim enzimlerde molekül yapısını etkilemektedir. Enzimin aktif bölgesine bağlanan bazı maddeler enzimin katalitik aktivitesinin düşmesine neden olabilir hatta tamamen durdurabilir. Bu tür maddeler ‘inhibitör’ olarak adlandırılmaktadır [4,14].

1.1.1 Enzimler ve Sınıflandırma

1950’li yılların sonuna kadar enzimlerin sayısı artış göstermiş ve birçok kişinin aynı enzime farklı isimler vermesi nedeniyle isimlendirmelerde karışıklıklar çıkmasına neden olmuştur. İsimlendirilen birçok enzimin katalizlediği tepkime hakkında herhangi bir bilginin olmaması da bu karışıklığın artmasına neden olmuştur. 1956 yılında bu karışıklığın ortadan kaldırılması amacıyla Uluslararası Enzim Komisyonu (EC) çalışmalarına başlamıştır. İsimlendirme ve sınıflandırmada sistem 3 ana prensibe sahiptir. Birinci prensip; “-az” takısıyla biten enzim

isimlerinin, sadece bir enzim için kullanılmasıdır. Çok sayıda sisteme sahip enzimler için birinci prensip uygulanmamalıdır. İkinci prensipte; enzimler etki ettikleri tepkimelere göre isimlendirilir ve sınıflandırılırlar. Üçüncü prensipte; enzimler katalizlenen tepkimelerin tipine göre sınıflandırılır ve isimlendirilir. Sistemde komisyonunun (EC) belirlediği kodlar kullanılarak enzimler açıkça tanımlanır. Enzimde genel olarak iki ad bulunmaktadır. Birincisi sistematik ya da önerilen, ikincisi ise yaygın olarak kullanılan, kolayca uygulanan ve daha kısa olan genel adıdır. Enzimler, sistematik isimleriyle ve EC kodlarıyla tanımlandıktan sonra tavsiye edilen isimleri herhangi bir karışıklığa sebep olmadan kullanılmaktadır [14].

Enzim komisyonu tarafından hazırlanan rapora göre enzimler etki ettikleri reaksiyona göre 6 ana sınıfa ayrılmakta ve kod numaralarıyla tanımlanmaktadır. Ön ek EC ile başlayan numaralar noktalarla birbirinden ayrılan 4 ana ögeyi belirtmektedir.

Birinci rakam, enzimin altı ana sınıftan hangisinde yer aldığını,

İkinci rakam, enzimin hangi alt sınıfta yer aldığını (Subclass),

Üçüncü rakam, enzimin hangi ikinci alt grupta yer aldığını (Sub-Subclass),

Dördüncü rakam, enzimin sub-subclass içerisindeki seri numarasını belirtmektedir.

Örnek olarak; EC 3.2.1.1 fungal α -amilazın kod numarasını belirtmektedir.

Sistemde birinci rakam aşağıdaki sınıfları göstermektedir.

1. Oksidoredüktazlar (Biyolojik oksidasyonlarla ilgili enzimlerdir),
2. Transferazlar (Belirli grupların bir bileşikten diğerine transferini katalize eden enzimlerdir),
3. Hidrolazlar (Substrata su ekleyerek hidrolize neden olan enzimlerdir),
4. Liyazlar (Hidrolizle değil fakat bağları kopararak ya da tersine ekleyerek bir substrattan grupları ayıran enzimlerdir),
5. İzomerazlar (Molekül içinde yeniden düzenlenmeyi katalize eden enzimlerdir),
6. Ligazlar (C-S, C-O, C-C veya C-N bağlarını kuran, iki ayrı molekülün birleşerek yeni bir bileşik meydana gelmesini katalize eden enzimlerdir) [4,14].

1.2 Ksilan ve Ksilanazların Genel Özellikleri

1.2.1 Ksilan

Bitki hücre duvarları hücrenin fiziksel bütünlüğünü korumakta ve mikroorganizmaların canlı bitki dokusuna girişini engellemek için bir bariyer oluşturmaktadır [15,16]. Ksilan bitki hücre duvarında bulunan hemiselülozun temel bileşenidir. Doğada selülozdan sonra ikinci sırada en yaygın olarak bulunan polisakkarittir. Toplam biyokütlenin yaklaşık %20-30'unu oluşturmaktadır [17-20]. Bir heteropolimer olan ksilan temel zinciri, birbirlerine β -1,4-glikosidik bağlarıyla bağlı beş karbonlu bir şeker olan ksiloz ünitelerinden oluşmaktadır. Kara bitkilerinde temel zinciri oluşturan ksiloz üniteleri birbirlerine β -1,4-glikosidik bağlarıyla bağlyken alglerde durum farklı olup ksiloz üniteleri birbirine β -1,3-glikosidik bağlarıyla bağlıdır. Temel zincire bağlı dallanmış yapıda D-ksiloz ünitelerine çoğunlukla 0-3 pozisyonlarında bağlı L-arabinofuranoz, 0-2 pozisyonlarında bağlı D-glukuronik asit ya da 4-O-metil-D-glukuronik asit üniteleri yer alabilmektedir. Yan zincirlerdeki şekerler α -glikosidik bağlarıyla bağlıdır [20,21].

Ksilanın, iskeletini meydana getiren asetil, galaktozil, glukuronozil ve arabinozil en yaygın gruplardır [21-24]. Diğer yandan, homoksilanlar sadece ksilozil yapılarından oluşur. Bu tip tütün sapı, guar tohumu ve esparto çimi kabuğundan izoledir [22]. Bunun yanında, deniz alglerinin bazılarında β -1,3 bağlı ksiloz iskeletine sahip ksilanların olduğu; çimenlerde ve yıllık bitkilerde bulunan ksilanın, arabinoksilan yapısı gösterdiği rapor edilmiştir [21].

Sert odunsu bitkilerden elde edilen ksilan yüksek miktarda asetil grupları içermektedir. Asetil grupları ksilanın suda çözünürlüğü üzerinde kısmen etkilidir. Yumuşak odunsu bitkilerden elde edilen ksilan asetil grubu içermez, asetil grupları yerine α -L-arabinofuronaz üniteleri içermektedir. Yumuşak odunsu bitkilerdeki ksilan, sert odunsu bitkilere göre daha kısa zincirlidir [20].

1.2.2 Ksilanazlar

Ksilanın kompleks yapıda olması sebebiyle molekülün tamamının hidrolizi için çeşitli enzimlere gereksinim duyulur. Ksilanın hidrolizini gerçekleştiren enzimlerin tümü ksilanolitik enzim sistemi olarak adlandırılır. Bu sistem içerisinde Endo-1,4- β -ksilanaz (EC 3.2.1.8), β -ksilosidaz (EC 3.2.1.37), α -L-arabinofuranozidaz (EC 3.2.1.55), α -Glukuronidaz (EC 3.2.1.139), Asetil Ksilan Esteraz (EC 3.1.1.72) ve Ferulik asit (Ferulik ve *p*-Kumarik asit) esteraz (EC 3.1.1.73) yer almaktadır.

Ksilanazlar, doğada yaygın olarak bulunan bir enzim grubudur. Ksilandaki β -1,4-glikozidik bağını zincirde iç bölümden kıran glikosidazlardır (*o*-glikozid hidrolazlar; EC 3.2.1). Hücreye gerekli karbonu sağlar ve bitki hücrelerinin patojenler tarafından enfekte edilmesi durumunda önemli rol alır [15].

Endo-1,4- β -ksilanaz (EC 3.2.1.8); ksilan iskeletini gelişi güzel hidrolizleyerek kısa oligosakkaritlerin oluşumunu sağlamaktadır.

β -ksilosidaz (EC 3.2.1.37); (ksilobiaz; β -ksilosidaz; ekzo-1,4- β -ksilosidaz; β -D-ksilopiranosidaz; ekzo-1,4-ksilosidaz; ekzo-1,4- β -D-ksilosidaz; 1,4- β -D-ksilan ksilohidrolaz) kısa oligosakkaritlerin ve ksilobiyozun indirgen olmayan uçlarına etki ederek ksiloz oluşturmaktadır.

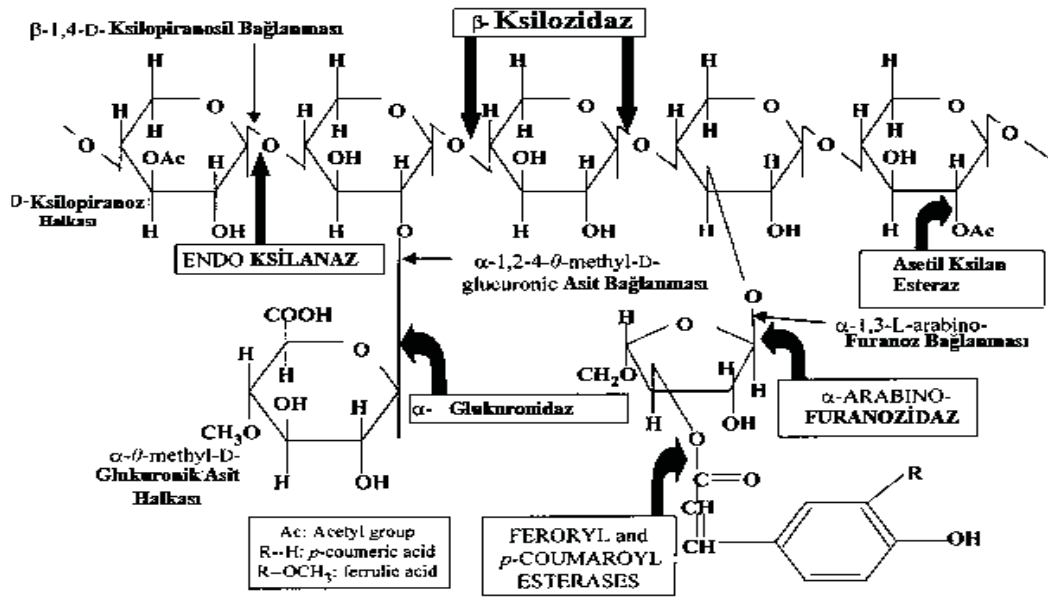
α -L-Arabinofuranozidaz (EC 3.2.1.55), α -glukuronidaz (EC 3.2.1.139), asetil ksilan esterazlar (EC 3.1.1.72), Ferulik asit esteraz (EC 3.1.1.73) ve *p*-Kumarik asit esteraz (EC 3.1.1.-) tarafından temel zincire bağlı yan grupların hidrolizinde etkilidirler.

β -ksilosidaz indirgen olmayan uç kısımdan D-ksilozları uzaklaştırarak 1,4- β -D-ksilooligosakkaritlerin hidrolizini katalizlemektedir. Ksilan hidrolizi esnasında ksilozu koparan endoksilanazların, β -ksilosidaz tarafından kolay bir şekilde hidrolize edilen ksilobioz aktivitesi bulunmamaktadır. α -Arabinofuranozidazlar (EC 3.2.1.55), arabinogalaktanların, arabinanların ve arabinoksilanların indirgenmeyen α -L-arabinofuranosil uç kısmını hidrolize etmektedirler.

α -D-glukuronidazlar (EC 3.2.1.1) ksiloz ve D-glukuronik asit ya da 4-*o*-metileter arasında yer alan α -1,2-glikozidik bağların hidrolize edilmesinde rol

oyunlar. Ksilanın enzimlerle hidrolize edilmesinde α -1,2 bağları hidroliz hızını düşüren kısımlardır.

Doğal glukuronidazların hidrolizasyon işlemi sırasında etkili olabilmeleri için esterazlar gereklidir. Bunlar, ksilandaki fenolik asit ve asetik asitleri koparırlar. Feruloyl, Asetil, ve *p*-kumoryllerin ksilan iskeletinden uzaklaştırılması, lignin koparılmasında önemli bir basamağı oluşturarak lignin ve hemiselüloz arasında yer alan ester bağlarının koparılmasıyla ligninin degradasyonuna katkıda bulunmaktadır [25-27].



Şekil 1.1: Ksilanın Tam Hidrolizinde Gerekli Enzimler ve Etki Bölgeleri [21].

Ksilan hidrolizasyonunda görev alan enzimlerde sinerjik etkileşimden bahsedilebilir. Hidrolizasyon esnasında aktif olduğu gözlenmekte olan enzimler 1,4-β-D-ksilan iskeletinde etkili olurlar ve yan zincirleri kopartırlar. Endoksilanaz ve asetil ksilan esteraz arasındaki sinerji asetil ksilanların degradasyonunda etkilidir.

Asetik asitin, asetil ksilan esteraz enzimi tarafından uzaklaştırılması, ksilanın iskeletini endoksilanazın etki edebilmesine hazır hale getirmektedir. Bunun sonucunda hidroliz oldukça hızlı bir şekilde gerçekleşmektedir. β-ksilosidazlar, endoksilanaz inhibisyonunu sağlayacak son ürünleri parçalar ve ksilanın hidrolizasyonunun seviyesini artırır. Benzer olarak, α-arabinofuranozidazların endoksilanazlara ilavesi, arabinoksilanlarda şekerleştirilme durumunu artırır.

1.2.3 Ksilanaz Kaynakları

Endoksilanazların genellikle fungus ve bakteriler tarafından üretildikleri saptanmıştır. Ayrıca, bitkilerden elde edilen endoksilanazlar da bulunmaktadır. Bu enzimlerin meyvelerde olgunlaşma döneminin bitiminde üretildiği belirlenmiştir.

Ksilanazlar, çoğunlukla ksilan ya da ksilanın bolca bulunduğu ortamlarda gelişebilen mikroorganizmalarda bulunan enzimlerdir. Ksilanazlar; bazı ksilooligosakkaritler, L-sorboz, lignoselüloz ve ksiloz birimleri gibi bileşikler tarafından indüklendikleri; bakteriler, mayalar, protozoalar, funguslar, algler, artropodlar ve karındanbacaklıların da içinde bulunduğu organizma grubu tarafından üretilbildikleri rapor edilmiştir [21,28].

1.2.4 Ksilanazların Çeşitliliği ve Sınıflandırması

Ksilanazlar bir organizmadan diğerine farklılık gösterebildiği gibi, aynı türe ait mikroorganizmalarda da birden çok ksilanaz enziminin olduğu da saptanmıştır. Örnek olarak; *Aspergillus niger*'de 15 çeşit ekstraselüler ksilanaz ve *Trichoderma viride*'de 13 tip ksilanaz izoenzimi tespit edilmiştir. Ksilanazların çeşitliliği; yapılarında bulunan selüloz bağlama, termal stabilite, ksilan bağlama ve fonksiyonu henüz belirlenememiş farklı bölgelerin varlığıyla açıklanmaktadır [15].

Ksilanazlar hakkında yapılan ilk sınıflandırma çalışmalarında, fizikokimyasal özellikleri esas alınarak iki farklı grup önerilmiştir. Bu gruplar; düşük molekül ağırlığına sahip ($< 30\text{kDa}$), 180-240 amino asit birimi olan ksilanazlar ve yüksek molekül ağırlığına sahip ($> 30\text{kDa}$), 270-800 amino asit birimini olan ksilanazlardır [22].

Yapılan sınıflandırma çalışmasında fungal ksilanazların %30'u bu iki grup içerisinde sınıflandırılmamış, enzim aileleri oluşturulurken enzimde bulunan katalitik alanların primer yapıları karşılaştırılmıştır. Oluşturulan sistemde, ksilanazlar familya 10 (familya F) ve 11 (familya G) de sınırlanmıştır. Fakat, literatürler incelendiğinde familya 5, 7, 8 ve 43'te de endo-1,4- β -ksilanaz aktivitesine sahip çeşitli katalitik alanların bulunduğu görülmektedir. 5, 7, 8, 10, 11 ve 43 familyalarında bulunan ksilanaz yapılarının, fizikokimyasal özelliklerinin, etki etme

tarzlarının ve substrat spesifikliklerinin birbirinden farklı olduğu belirlenmiştir [15,28].

1.2.5 Ksilanazların Genel Özellikleri

Ksilanazlarda, hidrolitik aktiviteden sorumlu katalitik bölümlerle, substrat bağlama ve termal stabiliteden sorumlu katalitik etkisi bulunmayan bölümler mevcuttur. Genellikle, fungal kaynaklı olanların pH 4-6, bakteri kaynaklı olanların ise pH 5-9 aralığında etkili oldukları, kaynakları farklı olan endoksilanazların izoelektrik noktalarının pI 3-10 aralığında değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Fungal ksilanazlar genellikle bakteri kaynaklı ksilanazlardan daha düşük ısı direncine sahiptir.

Ksilanazların optimum sıcaklık aralığı 35-60°C gibi oldukça geniş aralıkta değişir. Optimum sıcaklık değeri 70-90°C aralığında bazı ksilanazlar da bulunmaktadır. Ksilanazların düşük amonyum sülfat konsantrasyonunda çözünürlükleri sıcaklıkla birlikte artış göstermektedir. Farklı kaynaklardan elde edilen ksilanaz bileşimlerinde ağırlıklı olarak glutamik ve aspartik asit, serin, glisin ve treonin bulunmaktadır. β -ksilosidaz ve ksilanaz aktiviteleri, ksilooligosakkaritlerin zincir uzunluğuna bağlıdır. Ksilanaz aktivitesi, zincir uzunluklarının azalmasıyla genellikle azalmakta iken β -ksilosidaz aktivitesinin artış gösterdiği, yüksek dallanma derecesine sahip ksilozun, polisakkaritlerin de ksilanazın aktivitesini genellikle engellediği ve ksilanazların çeşitliliğinin incelendiği araştırmalarda, pH değerleri ve moleküllerin ağırlıkları arasında, belirli bir ilişkinin olması dikkate değer bir durum olmuş; molekül ağırlıkları küçük ksilanazların bazik, molekül ağırlıkları büyük olanların ise asidik olduğu belirlenmiştir [21,22,28].

1.2.6 Ksilanazların Biyoteknoloji ve Endüstriyel Uygulama Alanları

1.2.6.1 Ksilanazların Biyoteknolojideki Uygulama Alanları

Mikroorganizma kaynaklı ksilanolitik enzimler, çok sayıda endüstriyel işlemlerde biyoteknolojik potansiyele sahip olmalarından dolayı ilgi odağı haline gelmiştir. Bakteri ve mayalardan daha güçlü üreticiler olarak kabul edildiklerinden özellikle filamentli funguslar elli yıldan daha uzun bir süreden beri endüstriyel enzim üretiminde kullanılmaktadırlar [21,29]. Son yıllarda ksilan ve ksilanazların biyoteknolojide kullanımı dikkate değer bir oranda artış göstermiştir [13,21,30]. Endüstriyel şirketler hemiselüloz içeren maddelere yapılan işlemlerde asit hidrolizi yerine etkili enzimatik süreçlerin geliştirilmesine önem vermektedirler. Ticari ksilanazlar Finlandiya, Japonya, İrlanda Cumhuriyeti, Almanya, Danimarka, Kanada ve ABD’de endüstriyel olarak üretilmektedir. Bu enzimlerin elde edilmesinde kullanılan başlıca mikroorganizmalar *Aspergillus niger*, *Trichoderma* sp. ve *Humicola insolens*’dir. Aynı zamanda ticari ksilanazlar bakterilerden de elde edilmektedir. Ksilanazlar, selüloz ve pektinazlarla birlikte dünya enzim pazarının %20’sini oluşturmaktadırlar [31]. Özellikle kağıt hamuru ve kağıt olmak üzere hayvan yemi ve gıda gibi farklı endüstriyel alanlarda temel enzim olma yolunda ksilanazların önemi artmıştır [21,30].

1.2.6.2 Ksilanazların Endüstriyel Uygulama Alanları

Kağıt hamuru ve kağıt endüstrisi: Çevresel düzenlemeler kağıt hamuru ve kağıt endüstrisindeki ağartma işlemi sırasında klorun kullanımını sınırlandırmıştır [32,33]. Günümüzde doğayı endüstriyel atıkların zararlı etkilerinden korumak amacıyla kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde mikrobiyal enzimlerin kullanılması büyük önem kazanmıştır [34]. Bundan dolayı çevre kirliliğinin azaltılması yollarından birisi de, kağıt hamurunun ksilanaz enzimi kullanılarak ön işlemden geçirilmesidir. Bu işlem, ağartmada kullanılan kimyasalların özellikle de klor bileşiklerinin büyük oranda indirgenmesine ve kirliliğin azaltılmasını sağlamaktadır [35]. İlk olarak 1986 yılında kağıt hamurunu ağartma işleminde endoksilanazların

kullanılmasının kimyasalları indirgediği bildirilmiştir [36]. Çok sayıdaki araştırma bunu doğrulamış ve bu teknolojiyi ticari konuma getirmiştir [37].

Enzimle yapılan uygulamalar sonucunda, kâğıt hamuru fibrilasyonu ve suyu tutma kapasitesi artar, işlem görmemiş kâğıt hamurunun çırpma/dövme sayısı azalır, atık kâğıt hamurunun bağları onarılır, çözünen kağıt hamurundan ksilanın uzaklaştırılması sağlanır. Ayrıca ksilanazların varlığında odun hamurunda biobeyazlatma, sentetik ipek üretimi, hamurdan selüloz eldesi gerçekleştirilmektedir [21,35-38].

Kâğıt hamurunun ağartılmasında kullanılan biyolojik yöntemlerde, kullanılan ksilanaz, ksilanın %20'sini seçici olarak uzaklaştırarak klorlu ağartma kimyasallarının kullanımını %25 oranında azaltmaktadır [39].

Ksilanazlar kâğıt hamuru ve kâğıt endüstrisinde yoğun olarak kullanılmakla beraber lignoselülozik materyallerin dönüşümünde, tarımsal atık ürünlerin fermantatif ürünlere parçalanmasında, meyve suyunun berraklaştırılmasında, biradaki kıvamın olgunlaşmasında, hayvan besinlerinin sindirimini artırılmasında da büyük önem taşımaktadır [40,41]. Ksilanazlar ekonomik olarak önemli birçok yararlı ürünün istenilen seviyede üretiminde önemli bir potansiyele sahiptir [21].

Gıda endüstrisi: Ksilanazların gıda endüstrisinde de oldukça geniş bir kullanım alanı bulunmaktadır. Fırıncılıkta 1970'lerden itibaren kullanılmaya başlanan ksilanazların ekmek ve hamur kalitesinin artırılmasında, hamurun yapışkanlığının azalmasında, raf ömrünün uzamasında oldukça etkili olduğu bilinmektedir. Özellikle hamurun işlenebilirliğini ve ürün hacmini geliştirerek nihai ürün kalitesini etkilemektedir. Buğday unundaki ksilanaz için substrat olan arabinoksilan hakkında çok sayıda çalışmaya yapılmıştır [39,42,43]. Ksilanazın ekmek kalitesini artırmadaki rolü ekmek hacminin artışı ve daha yumuşak ekmek eldesi ile kendini açıkça göstermektedir. Bu işlem ksilanazla birlikte amilazında kullanımını sayesinde daha da artırılmaktadır [44]. Meyve suyu ve şarap endüstrisi de enzim pazarının oldukça önemli bir bölümünü oluşturmaktadır [31].

Ksilanazlar gıda endüstrisinde, sebze ve meyvelerin sıvılaştırılmasında ve meyve sularının berraklaştırılmasında selülaz ve pektinazla beraber kullanılmaktadır. α -L-Arabinofuranosidaz ve β -D-glukopiranozidazlar, şarap, meyve suları, ve aromatik özütlerin işlenmesinde kullanılmaktadır [20,21,45]. Bira üretiminde arpanın

yapısında bulunan uzun zincirli arabinoksilanların parçalanmasına olanak sağlayarak arpanın hidrolize olmasını kolaylaştırırlar [20].

Hayvan yemi endüstrisi: Ksilanazların diğer bir kullanım alanı yem endüstrisidir. Özellikle piliçlerin çavdar içeren yemlerine ksilanazın ilave edilmesiyle intestinal viskosite indirgenir ve bu sayede yemlerin etkinliğini artırarak piliçlerin ağırlık kazancına etkili olur [20,41]. Ksilanazlar hayvan beslenmesi süresince glukonaz, pektinaz, selülaz, proteaz, amilaz, fitaz, galaktosidaz ve lipaz ile birlikte kullanılmaktadır [46].

Ksilan, tarım ve gıda endüstrisine ait atıklarda çok fazla miktarda bulunması sebebiyle, ksilanaz atık sudaki ksilanın ksiloza dönüştürülmesi için de kullanılmaktadır [47]. Bitki hücrelerinde ksilanaz uygulamalarıyla fitosterollerin yağ açılışını ve glikozilasyonu indüklenmektedir [48].

Tekstil endüstrisi: Ksilanazlar kendir ya da keten gibi bitkisel liflerin işlenmesi prosesinde tekstil endüstrisinde kullanılmaktadır. Bunun için ksilanazın selüloolitik enzimlerden arındırılmış olması gerekmektedir [31].

Ksilooligosakkaritlerin üretimi: Ksilanazların ksilooligosakkaritlerin üretiminde sahip oldukları potansiyel sayesinde önemleri artmaktadır. Ksilooligosakkaritler ksiloz ünitelerinden oluşan şeker oligomerlerinden oluşmaktadırlar ve endüstriyel olarak lignoselülozik biyokütleden üretilmektedirler [49]. Ksilooligosakkaritler, kolesterol ve kolon kanseri riskini azaltması, gastrointestinal sistemi koruması ve tip-II diyabet üzerinde olumlu etkiye sahip olması nedeniyle sağlık üzerinde olumlu etkilere sahip yararlı ürünlerdendir [50,51]. Ksilanazlar ksilanı hidroliz etme yeteneklerinden dolayı, lignoselülozik atıklardan ksilooligosakkaritler üretiminde önemli role sahiptirler [49].

Diğer taraftan ksilanazlar; ksiloz, ksilo-oligomerler ve yapay bir tatlandırıcı olan ksilitol üretiminde de kullanılmaktadır. Ksilooligosakkaritler prebiyotik özellik göstermekte olup gıda, yem, ilaç gibi endüstrilerde kullanım alanı bulmaktadırlar. Son yıllarda fonksiyonel ksilooligomerlerin üretimine ilgi büyüktür. Başka bir bakış açısıyla da ksilanazlar, lignoselülozik atıkların değerlendirilip katma değeri yüksek ürünlere dönüştürülmesi açısından da büyük önem taşımaktadırlar. Örneğin; buğday kepeği, pirinç kepeği, mısır koçanı, şeker pancarı küspesi gibi endüstriyel atıklar ve yan ürünler ksilanaz üretiminde kullanılmaktadır [20].

Pektinolitik enzim sistemlerinin ksilanolitik enzim sistemleri ile birlikte uygulandığı başlıca alanlar arasında, kenevir ve jüt bitkilerinin reçineden arındırılması bulunmaktadır. Pektinaz-ksilanaz enzim sistem birlikteliği odunun işlenmesinde ilk aşama olan kabuktan arındırmada da kullanılmaktadır. Ksilanazların bazıları bitki hücrelerinden protoplast üretiminde hücre duvarının yumuşatılmasında da kullanılmaktadır [15,21].

Biyo-etanol ve Biyo-yakıt üretimi: Ksilanazlar, ligninaz, mannaz, glukanaz, ksilosidaz, glikosidaz gibi diğer farklı enzimlerle beraber lignoselülozik materyallerden etanol üretiminde kullanılmaktadır. Etanolün üretilmesinde kullanılacak serbest şekerlerin elde edilmesi için, karbonhidrat polimer zincirlerinin depolimerizasyonunun ardından hemiselüloz, selüloz ve ligninin ayrıştırılmasıyla delignifikasyon gerçekleştirilmektedir [21,33,51,52]. Sonuç olarak; etanol üretiminde heksoz ve pentozdan meydana gelen karışım fermentasyon için kullanılmaktadır. Lignoselülozik materyaller ikinci nesil biyo-yakıt üretimde ilk kez kullanılmışlardır [33].

İlaç ve kimyasal uygulamalar: Ksilanaz ve ksilanın küçük bir kısmı ilaç endüstrisinde kullanılmaktadır. Ksilanazlar bazen bir besin takviyesi olarak sindirimi düzenlemek amacıyla hemiselülaz, proteaz ve diğerleriyle beraber kullanılmaktadır [31].

1.3 Ksilanaz Üretimi

Biyoteknolojideki gelişmelere paralel olarak endüstriyel enzim kullanımı da giderek artmaktadır. Enzim üretimlerinin büyük kısmı sıvı kültür fermentasyon yöntemiyle gerçekleştirilirken, günümüzde katı kültür fermentasyon yönteminin kullanımında da kayda değer bir artış söz konusudur. Bunun başlıca nedenleri arasında yüksek verim, düşük maliyet, basit alet ve ekipman kullanımı, saflaştırmada kolaylık yer almaktadır.

Ayrıca tarımsal materyallerin ve endüstriyel atıkların katı ortam olarak kullanılmasına olanak sağlanmasıyla organik asitler, proteinler ve enzimler gibi yüksek ticari değere sahip ürünlerin üretilmesi gerçekleşmektedir [53].

Ksılanazlar, hem Katı Kültür Fermantasyon/Katı Substrat Fermentasyon (KSF) hem de Sıvı Kültür Fermantasyon (SKF) ile üretilebilmektedirler [20].

1.3.1 Katı Substrat Fermentasyon (KSF) Yöntemi

KSF genel olarak suyun serbest bulunmadığı nemli olan katı substratın üstünde mikroorganizmaların üretilebildiği yöntemdir [54-60]. Bu yöntemde kullanılan substrat, mikroorganizmaların üremesi ve metabolik faaliyetlerini sürdürebilmeleri için gerekli olan nemi sağlamalıdır [56,61]. Kullanılacak substrat, fiziki destek ve besin kaynağı olarak görev alacağından uygun substrat seçimi oldukça önem gösterir. Bu sebeple, substratın kimyasal bileşimi, por yapısı ve parça büyüklüğü de önem taşımaktadır. Kullanılacak substratın ortamda bolca bulunması, kolayca elde edilmesi ve pahalı olmaması önemlidir [62,63]. Funguslar, bakteriler ve mayalar katı olan substratlar üzerinde gelişebilirler özellikle funguslar kullanıma çok uygun olduklarından tercih edilmektedirler. Su aktivesinin düşük olduğu ortamlara uyum gösterebilmeleri ve misel yapıda çoğalmaları beyaz çürükçül fungusların kullanılma olasılığını artırmaktadır. Ekonomik yönden daha avantajlı olması, kullanılan substratın ucuz ve bolca temin edilebilen tarım atıklarından seçilmesi sebebiyle katı substrat fermentasyonunu, geleneksel sıvı fermentasyonundan önemli hale getirmektedir [54,64]. Kullanılan tarım atıklarının çoğunda ligninolitik aktivite indükleyici olarak görev alan hemiselüloz, selüloz ve lignin bulunmaktadır. Hemiselüloz, selüloz ve ligninin yüksek miktarda şeker bulundurması işlemleri ekonomik hale getirmektedir [62].

KSF yönteminde, tarımsal atıkların substrat olarak değerlendirilmesi tarımsal atıklardan ortaya çıkabilecek çevresel sorunların çözümünde alternatif bir yöntemdir. KSF koşulları mikroorganizmaların çoğu için doğadaki ile benzerlik gösterdiğinden üremeleri için uygun ortam oluşturulabilir. Farklı tarımsal substratlar kullanılarak beyaz çürükçül funguslardan başarılı şekilde enzim üretilebilmektedir [65,66].

Denizlerdeki yaşamın %98'inden fazlasının su altı katı substratlarının üzerinden izole edilmesi, denizde yaşayan mikroorganizmaların bile suda serbest halde yaşamayı istemediğini göstermektedir [58,60].

KSF, Asya'da kullanılan çok eski bir yöntemdir. Batıda 1940'lı yıllardan itibaren kullanılmıştır. Sıvı fermentasyon yöntemi ile penisilin üretimi dönemin araştırmacılarını Sıvı Kültür Fermentasyonu (SKF)'na yönlendirmiş bu nedenle batı ülkelerinde KSF 1940'lı yıllardan sonra önem kazanmaya başlamıştır [56,60,67]. KSF'nin en tipik örnekleri geleneksel fermentasyon yöntemleridir. Örneğin Japonya'da buharla işlem görmüş pirincin kullanıldığı "koji", Endonezya'da küfün mikrobiyal kaynak ve buhar uygulanmış bezelye tohumlarının ise katı substrat olarak kullanıldığı "tempeh", Hindistan'a özgü "ragi". *Penicillium roquefortii* veya *Penicillium camemberti* ile küflü peynir üretilmesi uygulanan KSF'lere örnektir. Küf sporlarının üretimi, çevresel faktörlerin kontrolü ve peynirin mekanik durumunun geliştirilmesi sayesinde Fransa'da küflü peynir üretimi modernize edilmiştir. Fungusların az sayıda üretilmesini sağlayan kompost işlemi de ABD ve Avrupa'da modernize edilmiştir [54,58,60].

KSF yönteminde; mısır küspesi, şeker kamışı, portakal, pirinç, muz ve mercimek kabuğu, buğday kepeği, pirinç sapı, pirinç, buğday, mısır, nohut ve soya unu, manyok kökü gibi genelde katı atıklar, zirai-endüstriyel substrat olarak kullanılabilir [68-70].

Araştırmacılar çalışmalarında KSF'nin, SKF'ye üstünlüğünü belirtmişlerdir. SKF sentetik ortamda gerçekleşen yöntemdir. SKF'nde sıvı ortamlar kullanılmaktadır. Mikroorganizmalar KSF'de doğal ortamlarına benzer bir ortamda bulduklarından daha etkin aktivite göstermektedirler [55]. KSF'de en yüksek verimi elde edebilmek için, kullanılan mikroorganizmanın çevresel koşullarının iyi bilinmesi önemlidir. Yapılan araştırmalar, substrat olarak kullanılan ham materyallerin kolay bulunabilmesinin ve ucuz olmasının KSF'nin önemli avantajlarından olduğunu göstermektedir. Tarımsal ve gıda atıkları bolca üretilir. Tarımsal ve gıda atıkları karbohidratlar ile çeşitli besinler bakımından oldukça zengin olduklarından KSF yöntemi ile enzimlerin ve önemli kimyasalların üretiminde substrat olarak kullanılmaktadırlar. Aynı zamanda çevre kirliliğinin azalmasında önemli role sahiptirler. Biyokütlenin fazla miktarda bulunması, üretimde yüksek verimlilik ve proteinlerin daha az bozulması, KSF'de daha kaliteli üretimin gerçekleşmesini sağlamaktadır. KSF'den elde edilen enzimin yüksek kararlılık göstermesi bu tekniğin önemli avantajlarından birisidir [71,72].

Optimum koşulların ve parametrelerin seçimi, KSF uygulamalarında dikkat edilmesi gereken önemli özelliklerin başında gelmektedir. Bu özellikler; uygun substratın seçilmesi, pH, mutlak nem, çalkalama hızı, inkübasyon zamanı, inokülüm hacmi, üreme sıcaklığı, ilave edilen karbon ve azot kaynağıdır [55,60].

1.3.1.1 Katı Substrat Fermentasyonunda Avantajlar ve Dezavantajlar

KSF, SKF'ye göre ürün konsantrasyonu, verimlilik ve atık oluşumu gibi haller bakımından belirgin avantajlara sahiptir. Bunlar; KSF'de uygulamaya bağlı olarak daha yüksek oranda verim ve daha kararlı ürünlerin elde edilebilmesi, suyun az olmasından dolayı bakteri ve maya kontaminasyon riskinin daha az olması, atık su miktarının çok az oluşundan dolayı çevre kirliliğine daha az yol açması, sporla inokulasyonun ortamda düzenli dağılımı kolaylaştırması, kullanılan substratların bol ve ucuz olması, düşük maliyet ve tekrarlanabilir harcamalar, köpüklenmenin olmaması, kolay ve yüksek bir oranda havalandırmaya imkan sağlaması, küçük ölçeklerde bile ekonomik kullanım sağlaması, substrat üreme için gerekli besinleri sağladığından basit bir fermentasyon ortamının oluşması, mikroorganizmaların doğal habitatlarına benzer çevresel koşullarda gelişimine izin vermesi, enerji gereksiniminin düşük olması, bazen buhar uygulamasına, otoklavlamaya, mekanik çalkalamaya ve havalandırma işlemine gereksinimin olmaması, oksijenin sirkülasyonunun iyi olması, katabolik baskılamanın genelde düşük olması şeklinde ifade edilebilmektedir [62,65,73-78].

Yukarıda açıklanan avantajlara rağmen KSF yöntemi, SKF yöntemi ile karşılaştırıldığında bazı dezavantajlara da sahiptir. Bunlar; Nadir de olsa fungal ve bakteriyel kontaminasyonların meydana gelmesi, sadece düşük nem seviyesinde üreyebilen mikroorganizma türlerinin (Flamentli fungus) kullanılabilmesi, çalkalama işlemi güç olabileceğinden statik koşulların tercih edilmesi, sporla üretime başlanacaksa çimlenme ihtiyacı nedeniyle uzun lag süresine ihtiyaç duyulması, katı doğal substratın işlemsel parametrelerinin (nem miktarı, pH, substratın oksijen ve biyokütle konsantrasyonu) kontrolü ve belirlenmesinde güçlüklerin ortaya çıkması, katı substratların genelde ön işlemden geçirilmeye ihtiyaç duyması (parçalama, öğütme, kimyasal, fiziksel ve enzimatik hidroliz, homojenizasyon, buhar uygulaması gibi), biyokütle (üreme) miktarının saptanmasının zor olması (Katı substrat ve misel

arasındaki sıkı penetrasyonun biyokütlenin tamamen elde edilmesini engellemesi), üreme esnasında oluşan metabolik sıcaklığın uzaklaştırılmasının zor olması, üretim zamanının daha uzun olması, bazı işlemlerde yüksek miktarda katı substrat konsantrasyonu nedeniyle oksijen sirkülasyonunun zorlaşması şeklinde ifade edilmektedir [74,75].

1.4 *Trichoderma* Cinsinin Genel Özellikleri

Trichoderma cinsi hızlı gelişen filamentli bir fungustur. Tüm dünyada geniş bir yayılışa sahiptir. Toprakta sıklıkla bulunan toprak mikroflorasının baskın bir elemanıdır. 1969 yılına kadar sınıflandırılmasında çeşitli zorluklarla karşılaşmıştır [79-82]. İlk kez Rifai tam olarak bir sınıflandırma çalışması yapmış, tür morfolojisini araştırmıştır [83]. 1991'de Bissett *Trichoderma* cinsine ait sınıflandırmayı yeniden incelemiş, morfolojik olarak *Pachybasium*, *Trichoderma*, *Hypocreanum* ve *Longibrachiatum* olmak üzere 4 grup oluşturmuştur [84-86].

Koloniler kültürde çok hızlı gelişim gösterir. Başlangıçta koloni yüzeyi düz, neredeyse tümü şeffaf ve su beyazıdır. Devamında kompakt/flukkoz yumakçıklar gelişir. Yeşil/beyazın çeşitli tonları gözlenir. Oluşan pigment, agar üzerinde yayılır ya da koloninin alt kısmı değişmez. İzole edilen bazı türlerde karakteristik olarak Hindistan cevizi kokusu algılanır.

Hifler morfolojik olarak; çok dallı, bölmeli, çeperli/düz, şeffaftır. Genellikle türlerde klamidiospor oluşmaktadır. İnterkalar/hiflerin yan dallarının üstünde globoz, elipsoidal veya terminal, düz ve renksiz çeperli konidiler bol dallanma göstermektedir. Gevşek/kompakt halde yumaklar, genelde konsantrik halka şeklinde göze çarpan konidi zonları oluşmaktadır.

Konidiyofor yapıları havai hifler üzerinde tek/düzensiz şekilde oluşur. Ana eksenin yan dallar gelişir, bu yapıdan da daha küçük dallar oluşur. Bu durum birkaç basamak daha devam eder. Tüm yan dallar kendilerini oluşturan dallar üzerinde geniş açıyla gelişir. Aynı zamanda uç kısım uzamayı sürdürür ve iğne yapraklı ağaca benzeyen bir dallanma yapısı gözlemlenir.

Türlerin bazıları dışında her dalın uç kısmında bir fialid bulunur. Fialid bulunmayan türlerin konidiyoforlarının uçlarında uzun, basit/dallı, düz/kıvrık, kancalı/dalgalı kamçı yapısında hif uzantıları bulunur. Fialidler armut/şişe/tamamen ovoid, orta kısım şişkin, taban daralmış ve aniden dar konik/sub-silindirik bir boyun şeklinde inceler. Fialidler de konidiyofor dalları gibi dallardan geniş açıyla gelişir ve sıkıca/düzensiz şekilde bir arada bulunabilir veya seyrek olarak yayılabilir hatta tek, düzensiz aralıklarla yerleşebilir. Konidiler sümüksü ve yapışkan fialokonidi şeklindedir. Fialidlerin uçlarında subgloboz/globoz başlar oluştururlar. Baş yapısı genelde 15 µm'den küçük çaptadır. Nadiren kısa zincirlere rastlanır. Konidiler hafif pürüzlü veya düz çeperli, şeffaf veya sarımsı-yeşil-koyu yeşil, subgloboz, obovoid, kısa ovoid veya elipsoidal veya eliptik-silindirik, hemen tamamen oblong, bazen açılı, tabanları bazen belirgin olarak trunkattır [80,81,87].

2. MATERİYAL VE METOT

2.1 Materyal

2.1.1 Ksilanaz Aktivitesine Sahip Mikrofungusların Belirlenmesi

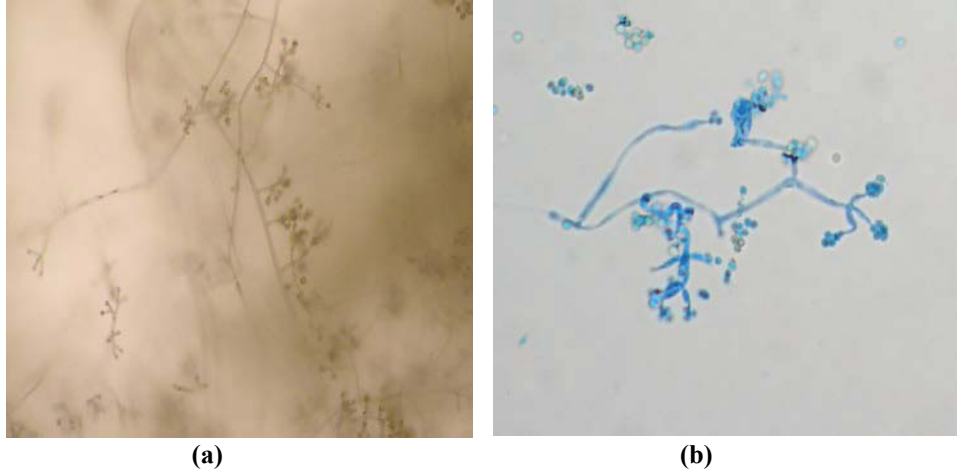
Trichoderma harzianum NRRL 13019, *Trichoderma viride* NRRL 6418, *Trichoderma atroviride* NRRL 25150, *Trichoderma koningii* NRRL 54330 ve *Trichoderma virens* NRRL 2314 suşları ksilanaz enzim aktivitelerinin saptanması amacı ile %5 ksilan [(Sigma; Huş ağacı ksilan; Poli- β -D-ksilopiranoz 1 \rightarrow 4)] içeren besiyerine inokule edilerek ksilanaz pozitif oldukları belirlenen *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418, suşlarının deneylerde kullanılmasına karar verilmiştir.

2.1.2 Deneylerde Kullanılan *Trichoderma* Türleri ve Genel Özellikleri

2.1.2.1 *Trichoderma harzianum* Rifai 1969

Koloniler 25°C'de hızlı gelişmekte, Malt Ekstrakt Agar (MEA) besiyerinde önce yüzey düz, su beyazı veya beyaz, havai misel seyrek, daha sonra havai hifler bol miktarda gelişmekte, konidilerin geliştiği yerler beyazımsı yeşil, daha sonra parlak yeşil fakat hemen sonra oldukça donuk yeşil; Patates Dekstroz Agar (PDA)'da ise yoğun sarı yeşil renkli olmakta, koloni altı renksiz, hifler bölmeli, dallı, düz çeperli, renksiz, 1,5-12 μ m kalınlıkta, konidiyoforlar çok dallanmış ve ağaç şeklinde, oldukça gevşek yumaklar oluşturmakta, konidiyoforların ana dalları 4,5 μ m eninde, çok sayıda yan dal oluşturmakta, yan dallar tek veya genellikle 2-3'lü gruplar halinde, bunlardan da daha küçük yan dallar gelişmekte, genel görünüşü konik veya piramidal fiyalidler kısa, taban kısmında ortaya nazaran daha dar, uçta birden bire daralmakta ve konik keskin uçlu bir boyun oluşturmakta 5-7 x 3-3,5 μ m, dalların

uçlarında olan fiyalidler daha uzun ve daha ince, $18 \times 2,5 \mu\text{m}$, konidiler fiyalidlerin ucunda globoz başlar oluşturmakta, globoz veya kısa ovoid, tabanları genellikle geniş trunkat, düz çeperli, tek olarak soluk yeşil, kitle halinde daha koyu görünmekte [87].



Şekil 2.1: (a) *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 petri (10x10); (b) *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 preparat (10x40)

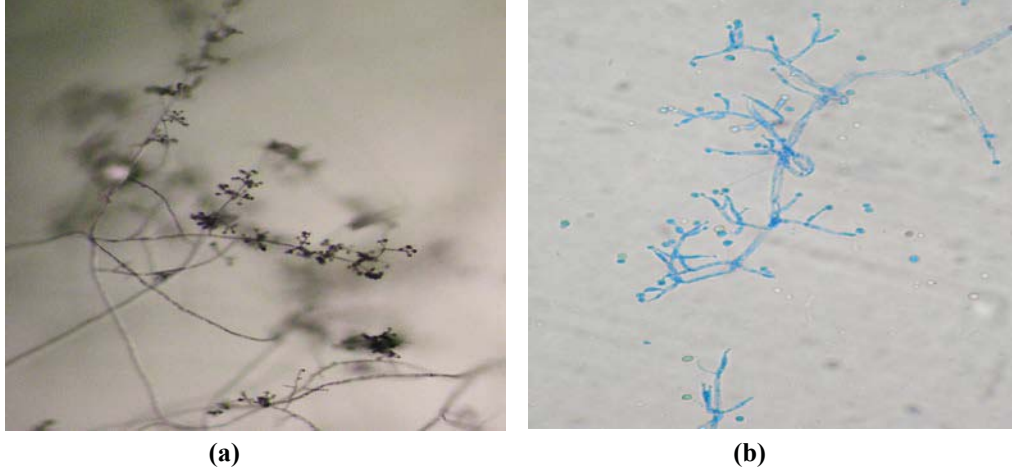
2.1.2.2 *Trichoderma viride* Pers. Ex Gray 1821

Syn: *Trichoderma lignorum* Tode ex Harz 1871

Trichoderma glaucum Abbott 1926

Koloniler MEA ve PDA’da hızlı gelişmekte, 25°C ’de dört günde petri kabını tamamen doldurmakta, önce düz yüzeyle, havai hifler çok seyrek, daha sonra gevşek ve seyrek havai hiflerin gelişmesinden dolayı tüylü görünümde ve beyazımsı, olgunlukta konidilerin geliştiği alanlar karakteristik olarak koyu yeşil koloni altı renksiz, yaşlı kültürlerde tipik Hindistan cevizi kokusu duyulmakta, hifler düz çeperli, çok dallı, $1,5-12 \mu\text{m}$ eninde, konidiyoforlar çok dallı, kompakt veya yumaklar oluşturmakta, koloni yüzeyinde halka benzeri zonlar halinde, bunların dışında daha az komplike konidiyoforlar oluşabilmekte, konidiyofor ana dalları $4,5 \mu\text{m}$ eninde, bir çok yan dal oluşturmakta, bunlar tek veya gruplar halinde, genel görünümü düzensiz bir konifer benzeri, bütün dallar geniş açılarla gelişmekte, fiyalidler terminal fiyalidlerin altında az veya çok halkalar şeklinde gelişmekte, her grupta 2,3 fiyalid bulunmakta, fiyalidler aynı zamanda tek olarak veya karşılıklı

çiftler halinde de gelişmekte, 8-14 x 2,4-3 µm, terminal olanlar daha uzun 20 µm, tabanda daralmakta, ortada hafif geniş ve uca doğru oldukça uzun bir boyun oluşmakta, konidiler globoz veya kısa obovoid veya nadiren geniş elipsoidal, hafif pürüzlü yeşil renkli, 3,6-4,5 µm çapında veya 4-4,8 x 3,5-4 µm, fiyalid uçlarında globoz başlar oluşturmakta [87].



Şekil 2.2: (a) *Trichoderma viride* NRRL 6418 petri (10x10); (b) *Trichoderma viride* NRRL 6418 preparat (10x40)

2.1.3 Kullanılan Tamponlar ve Çözeltiler

2.1.3.1 Mikrofungus Kültürlerini Geliştirmek İçin Hazırlanan Besiyerleri

Patates Dekstroz Agar (PDA) Besiyeri (Oxoid)

| | |
|------------------------|--------|
| Patates ekstraktı..... | 1,0 g |
| Dektroz..... | 5,0 g |
| Agar..... | 3,75 g |
| Saf Su..... | 250 ml |

121°C sıcaklıkta 20 dakika süreyle otoklavda steril edilerek hazırlanmış ve steril petri plaklarına dökülmüştür [88-91].

Patates Dekstroz Broth (PDB) (Difco)

Patates nişastası..... 1,0 g
Dekstroz..... 5,0 g
Saf Su..... 250 ml

121°C’de 20 dakika otoklavda steril edilerek hazırlanmıştır [88,91-93].

%5 Ksilan İçeren Patates Dekstroz Agar Besiyeri

Yukarıda formülü açıklanan Patates Dekstroz Agara 12,5 g ksilan ilave edilerek hazırlanıp 121°C’de 20 dk. otoklavda steril edilerek 90 mm’lik steril petri plaklarına dökülmüştür [94-96].

2.1.3.2 Hidroliz Zonu Belirlenirken Kullanılan Çözeltiler

% 0,1’lik Kongo Kırmızısı Çözeltisi

Kongo Kırmızısı 0,1 g
Distile su 100 mL

100 mL saf su içerisinde 0,1 g kongo kırmızısının çözülmesiyle hazırlanmıştır [97,98].

1 M Sodyum Klorür (NaCl) Çözeltisi

Sodyum Klorür14,625 g
Distile su250 mL

14,625 g NaCl, 250 mL distile suda çözülerek hazırlanmıştır [99].

2.1.3.3 Mikrofungusların Spor Süspansiyonları Elde Edilirken Kullanılan Çözelti

% 0,1’lik Tween 80 Çözeltisi

Tween 801 mL
Distile su1000 mL

1 mL Tween 80, 1000 mL distile suda çözüldükten sonra 121°C’de 20 dk otoklavda steril edilmiştir [89,100].

2.1.3.4 KSF Ortamında Nemlendirme Sıvısı Olarak Kullanılacak Tampon Çözeltilerin Hazırlanması

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

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

Distile su25 mL

1,0507 g Sitrik Asit Monohidrat tartılıp pH 4,0 ve pH 5,0'e ayarlanarak son hacim 25 mL olacak şekilde distile su ilave edilmiştir [101, 102].

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

Sodyum Di-hidrojen Fosfat ($NaH_2PO_4.H_2O$)0,68995 g

Distile su25 mL

0,6899 g Sodyum Di-hidrojen Fosfat tartılıp pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 ve 8,0 ayarlanarak son hacim 25 mL olacak şekilde distile su ilave edilmiştir [102].

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

Di-sodyum Hidrojen Fosfat Dihidrat ($Na_2HPO_4.2H_2O$)1,7796 g

Distile su50 mL

1,7796 g Di-sodyum Hidrojen Fosfat Dihidrat tartılıp pH 8,5 ve pH 9,0'a ayarlanarak 50 mL saf su ilave edilmiştir [102].

2.1.3.5 Ksilanaz Aktivitesinin Belirlenmesinde Kullanılan Substrat Çözeltisi ve Tampon Çözeltilerin Hazırlanması

Sodyum fosfat tamponu (50 mM pH 6,0)

Sodyum dihidrojen fosfat ($NaH_2PO_4.H_2O$)0,1724 g

Distile su25 ml

0,1724 g Sodyum dihidrojen fosfat distile suda çözülerek pH 6,0 olarak ayarlanmış ve saf suyla 25 ml'ye tamamlanmıştır [103, 104].

Substrat Çözeltisi

p-NPX (*p*-Nitrofenil β -D-ksilopiranosit).....0,006780 g

Sodyum dihidrojen fosfat (50 mM pH 6,0).....5 mL

0,006780 g *p*-NPX (*p*-Nitrofenil β -D-ksilopiranosit)'e Sodyum dihidrojen fosfat (NaH₂PO₄.H₂O) (50 mM, 5 mL, pH'ı 6,0) eklenip vortekste homojenize hale getirilerek hazırlanmıştır [105,106].

Reaksiyon Durdurma Tamponu

Sodyum Karbonat (Na₂CO₃)26,498 g

Distile su500 mL

26,498 g Sodyum Karbonat (Na₂CO₃) 500 mL distile suda çözülerek hazırlanmıştır [105,106].

2.1.3.6 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi Kolonunda Kullanılan Jelin Sentezlenmesi

2.1.3.6.1 Sefaroz (Sepharose) 4B Jelini Aktifleştirme

Sefaroz 4B jeli (10 mL), distile su yardımıyla yıkanmış dekante edilmiştir. Eşit hacimdeki saf suyla birleştirilmiştir. Karıştırılmakta olan jel süspansiyona 4 g siyanojen bromürün (CNBr) tamamı ilave edilmiş, süspansiyon pH'ı 4 M NaOH kullanılarak hızlıca 11'e çıkarılmış ve reaksiyonun bu pH değeri korunmuştur. 10-15 dk. boyunca reaksiyon pH'ı değişmeye kadar işleme devam edilmiştir. Süspansiyona çok miktarda buz ilave edilerek karışım buhner huniye nakledilmiştir. Ardından soğutulmuş NaHCO₃ (250 mL, 0,1 M) tamponu (pH 10) ile yıkanmıştır [107].

2.1.3.6.2 L-Tirozin Bağlama

Siyanojen bromür ile aktifleştirilmiş matrikse, 20 mL'de 15 mg tirozinin bulunduğu NaHCO₃ (0,1 M, pH 10) soğuk tampon çözeltisi ilave edilmiş ve 90 dk süreyle karıştırılmıştır. Ardından hazırlanan süspansiyon 16 saat süreyle 4°C'de

bekletilmiştir. Süspansiyon oda sıcaklığındaki saf suda yaklaşık olarak 2 saat boyunca yıkanmış, süzülen yıkanma suyu absorban (280 nm) vermeyinceye kadar işleme devam edilmiştir. Bu sayede reaksiyonda kullanılmayan tirozinin tümünün uzaklaştırılması sağlanmıştır. Yıkama işlemi NaHCO_3 (100 mL, 0,2 M, pH 8,8) tamponuyla tekrarlanmış, tirozin ile modifiye edilmiş sefaroze 4B aynı tampon (40 mL) içine alınmıştır [107].

2.1.3.6.3 1-Naftilamin Bileşiğinin Bağlanması

0°C civarında 25 mg 1-naftilamin, HCl (10mL, 1M)'de çözülmüştür. 75 mg NaNO_2 içeren 0°C sıcaklıktaki 5 mL çözelti, 1-naftilamin çözeltisi (çözeltinin hazırlanması sırasında etanol eklenerek ısıtılmıştır) içerisine damlalar şeklinde ilave edilmiştir. 10 dakikalık reaksiyonun ardından diazolan 1-naftilamin, sefaroze-4B-L-tirozin süspansiyonuna (40 mL) ilave edilmiştir. [1-naftilamin çözeltisi NaNO_2 çözeltisi içine hızlıca aktarılıp karıştırılarak hemen sepharose-4B-L-tirozin (yaklaşık pH 8,5) içine ilave edilmiştir] Yaklaşık olarak 6-7'ye düşen pH, 4 M NaOH ile 9,5'e çıkarılarak sabit tutulmuştur. 3 saat süreyle buz üzerinde karıştırılmış ardından 1 L saf su ve devamında 200 mL Na_2HPO_4 (0,01M, pH 6,0) tamponuyla yıkanarak bu tamponun içinde saklanmıştır [107].

2.1.3.7 Lowry Yöntemiyle Proteinlerin Kantitatif Tayininde Kullanılan Çözeltiler

A Çözeltisi: 0,4001 g Sodyum Hidroksit (NaOH) 100 mL distile suda çözüldükten sonra 2 g Bakır Sülfat (CuSO_4), hazırlanan NaOH çözeltisinde çözümlenip +4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

B Çözeltisi: 1,0 g Potasyum Sodyum Tartarat Tetrahidrat (NaK Tartarat; $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 100 mL distile suda hazırlanıp buzdolabında +4°C'de saklanmıştır.

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

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

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

Sığır Serum Albümin (BSA) (Sigma Aldrich): 1:1 oranında BSA ve distile suyun karıştırılmasıyla taze olarak hazırlanmıştır [108,109].

2.1.3.8 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HEK) Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren, 50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tamponu (pH 6,8) ve 50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tamponu (pH 6,8) ile gradient mikser kullanılarak tuz gradienti oluşturularak hidrofobik jele bağlanmış ksilanaz enziminin saflaştırılması sağlanmıştır.

Tuzlu Tampon Çözelti: 198,210 g amonyum sülfat tuzu (1,5M NH_4SO_2), 7,095 g Na_2HPO_4 (50 mM) ile karıştırılarak saf suda çözüldükten sonra 2M HCl ile pH'sı 6,8'e ayarlanarak saf su ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır [110-112].

Tuzsuz Tampon Çözelti: Saf suda çözülen 7,095 g Na_2HPO_4 (50 mM)'ün pH'ı 2M HCl ile pH 6,8 olacak şekilde ayarlanarak son hacim distile suyla 1000 mL'ye tamamlanmıştır [110-112].

2.1.3.9 SDS-PAGE Tekniğinde Kullanılan Çözeltiler

Tank Tamponu: 3 g Tris Base ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$) ve 14,4 g Glisin ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$), 1 g Sodyum Dodesil Sülfat (SDS; $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$) distile suda çözülerek son hacim 1 L'ye tamamlanmıştır [113-115].

Numune Tamponu: 0,5M pH'sı 6,8 olan 2,5 mL Tris Base, 4 mL SDS (% 10), Gliserol (2 mL) ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$), β -merkaptöetanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$) (1 mL, % 99,5) ve 0,01 g Bromfenol mavisinin 0,5 mL distile suda karıştırılması ile hazırlanmıştır [113-115].

Renklendirme Çözeltisi: Coomassie Brilliant Blue G-250 (0,66 g), Metanolde (CH₃OH) (120 mL) çözüldükten sonra üzerine saf asetik asit (CH₃COOH) (24 mL) ile saf suyun (120 mL) eklenmesiyle hazırlanmıştır [113-115].

Renk Açma Çözeltisi: 75 mL Saf Asetik Asit (CH₃COOH), 50 mL Metanol (CH₃OH) ve 875 mL distile su karıştırılarak hazırlanmıştır [113-115].

% 10'luk SDS: 1 g SDS distile suda çözüldükten sonra son hacim 10 mL'ye tamamlanmıştır [113-115].

% 10'luk Amonyum Persülfat ((NH₄)₂S₂O₈): 1 g Amonyum Persülfat distile suda çözüldükten sonra son hacim 10 mL'ye tamamlanmıştır [113-115].

SDS-PAGE'de Ayırma Jeli Hazırlanırken Kullanılan Alt Tampon: 11,82 g Tris-Base (1,5M) distile suda çözüldükten sonra 1M NaOH'le pH'ı 8,8'e getirilerek saf suyla son hacim 50 mL olacak şekilde ayarlanmıştır [113-115].

SDS-PAGE'de Yığıma Jeli Hazırlanırken Kullanılan Üst Tampon: 3,94 g Tris-Base (0,5M) distile suda çözüldükten sonra 2M HCl ile pH 6,8'e getirilerek hacim saf suyla 50 mL'ye tamamlanmıştır [113-115].

Tablo 2.1: SDS-PAGE'deki jellerin hazırlanması.

| SDS-PAGE | Ayırma Jeli (%10) | Yığıma Jeli (%3) |
|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Tampon (Alt) | 3,125 mL | ----- |
| Tampon (Üst) | ----- | 1,25 mL |
| SDS | 125 µL | 50 µL |
| Distile Su | 5,025 mL | 3,05 mL |
| Akril Amid/Bis (% 30) | 4,1625 mL | 0,65 mL |
| TEMED | 6,25 µL | 5 µL |
| APS %10'luk (w/v) | 187,5 µL | 100 µL |

2.1.3.10 NATIVE-PAGE Tekniğinde Kullanılan Çözeltiler

Tank Tamponu: 3 g Tris Base ve 14,4 g Glisin, 1 L distile suda çözülerek hazırlanmıştır [116,117].

Numune Tamponu: 0,5M, pH 6,8 olan 2,5 mL Tris-Base, 2 mL Gliserol, 0,01 g Bromfenol Mavisi ve 5,5 mL distile su ile karıştırılarak hazırlanmıştır [116,117].

Renklendirme Çözeltisi: Coomassie Brilliant Blue G-250 (0,66 g), Metanolde (120 mL) çözüldükten sonra çözelti içerisine Saf Asetik Asit (24 mL) ve distile su (120 mL) ilavesiyle hazırlanmıştır [116,117].

Renk Açma Çözeltisi: Saf Asetik Asit (75 mL) ve Metanol (50 mL), distile suyla (875 mL) karıştırılarak hazırlanmıştır [116,117].

%10'luk Amonyum Persülfat ((NH₄)₂S₂O₈): 1 g Amonyum Persülfat distile suda çözüldükten sonra son hacim 10 mL'ye tamamlanmıştır [116,117].

Native-PAGE'de Ayırma Jeli Hazırlanırken Kullanılan Alt Tampon: 1,5M 11,82 g Tris-Base 30 mL distile suda çözüldükten sonra 1N NaOH'la pH'ı 8,8'e getirilerek distile suyla 50 mL olarak hazırlanmıştır [116,117].

Native-PAGE'de Yığıma Jeli Hazırlanırken Kullanılan Üst Tampon: 0,5M ve 3,94 g Tris-Base 30 mL distile suda çözüldükten sonra 2M HCl'le pH'ı 6,8 olacak şekilde ayarlanarak 50 mL'ye tamamlanmıştır [116,117].

Tablo 2.2: Native-PAGE'deki jellerin hazırlanması.

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

2.2 Metot

2.2.1 Ksilanaz Aktivitesine Sahip Olan Mikrofungusların Belirlenmesi

Trichoderma harzianum NRRL 13019, *Trichoderma viride* NRRL 6418, *Trichoderma atroviride* NRRL 25150, *Trichoderma koningii* NRRL 54330 ve *Trichoderma virens* NRRL 2314 suşlarının ksilanaz enzimini sentezleyip sentezlemediklerini gözlemek amacıyla ile %5 ksilan içeren Patates Dekstroz Agar besiyerine tek nokta ekim tekniği ile inokule edilerek 30°C sıcaklıkta 7 gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından mikrofungus kolonilerinin üzeri % 0,1'lik Kongo Kırmızısı çözeltisi ile kaplanıp 30°C'de 15 dk. inkübatörde bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda boya uzaklaştırılarak koloniler 1M NaCl çözeltisi ile yıkadıktan sonra koloni yüzeyini kaplayacak şekilde tekrar 1M NaCl çözeltisi uygulanıp 30°C'de 15 dk. inkübasyona bırakılmıştır [99,118]. *Trichoderma* türlerinin inkübasyon süresinin 4. gününden itibaren tüm petriyi kaplayacak şekilde gelişme göstermeleri nedeniyle 1M NaCl çözeltisinin uzaklaştırılmasıyla koloni üzerindeki Kongo Kırmızısından kaynaklanan kırmızı rengin açıldığı fungal suşlar ksilanaz pozitif olarak değerlendirilmiştir

Enzim eldesinde kullanılacak mikrofungusların belirlenmesinden sonra; mikrofungus gelişimi üzerine etkili olan parametrelerden pH, nemlendirme sıvısı, inkübasyon sıcaklığı ve inkübasyon süresinin optimizasyonları yapılmıştır. Optimize edilen bu parametreler birbirlerinden bağımsız olarak test edilerek daha sonraki basamakta sabitlenmiştir [119,120].

2.2.2 Mikrofungusların Üretimi ve Spor Eldesi

Ksilanaz enzim aktivitesi açısından pozitif olarak değerlendirilen *Trichoderma* türü mikrofunguslar Patates Dektroz Agar besiyeri içeren petri kaplarına tek nokta ekim tekniği ile inokule edilerek 30°C'de 7 gün inkübe edilmiştir. Daha sonra petri kaplarında gelişen mikrofungus kolonilerinin üzeri % 0,1'lik Tween 80 ile kaplanarak spor süspansiyonları elde edilmiştir. Thoma lamında sayım yapılarak spor yoğunluğu 10^7 ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Elde edilen 10^7

ml spor süspansiyonundan 3 mL alınıp 150 mL Patates Dektroz Broth besiyerine inokule edilerek 150 rpm ve 30°C'de 72 saat süre ile inkübasyonları sağlanmıştır [24,119].

2.2.3 Katı Substrat Fermentasyon (KSF) Ortamının Hazırlanması

Substrat olarak kullanılacak buğday kepeği 24 saat süreyle 80°C'de kurutularak 250 mL'lik erlenlere 5'er g olacak şekilde yerleştirilmiştir. Bu işlemin ardından buğday kepeğinin pH'ı 4,0 ve 5,0 olan 0,2 M sitrat tamponu (C₆H₈O₇); pH'ı 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 olan 0,2M fosfat tamponu (NaH₂PO₄.H₂O) ve pH'ı 8,5 ve 9,0 olan 0,2 M fosfat tamponu (Na₂HPO₄.2H₂O) ile nem düzeyleri %55 olarak ayarlanıp, 121°C'de 20 dakika süreyle otoklavlanarak sterilizasyonları sağlanmıştır [119,121,122].

2.2.4 Katı Substrat Fermentasyonu (KSF) Kültür Ortamına Ekim ve Kısmi Saflaştırılmış Ksilanaz Enziminin Eldesi

Buğday kepeği ile hazırlanan KSF ortamlarına, Patates Dektroz Broth besiyerinde geliştirilen *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418'nin sıvı kültürlerinden 3 ml inokule edilerek 30°C'de 7 gün süreyle statik inkübatörde fungus gelişimi için bekletilmiştir [89,123-125].

İnkübasyon süresinin sonunda KSF ortamına 75 mL distile su ilave edilerek 150 rpm'e ayarlanmış çalkalamalı inkübatörde oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminin ardından ekstrakt önce steril gazlı bezden, ardından da Whatman No:1 filtre kağıdından süzülerek filtrat alınmıştır. Filtrat 4°C'de 10000 rpm'de 10 dk. santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme işlemi ile filtratın süpernatant kısmı pellet kısmından ayrılmış ve elde edilen süpernatant, kısmi saflaştırılmış enzim kaynağı olarak kullanılmıştır [89,123-125].

2.2.5 Üretim Koşullarının Katı Substrat Fermentasyon (KSF) Kültür Koşullarında Geliştirilen Mikrofungus β -Ksilosidaz Enzim Sentezi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Katı Substrat Fermentasyonunda mikrofungustan ksilanaz enzimi üretiminde; pH, nemlendirme sıvısı, inkübasyon sıcaklığı ve inkübasyon süresi optimize edilmesi gereken önemli parametrelerdir. Bu parametrelerin herbiri bağımsız olarak test edilerek bir sonraki basamakta sabitlenmiştir [89,123-125].

2.2.5.1 Optimum pH ve Nemlendirme Sıvılarının Belirlenmesi

Optimum pH ve nemlendirme sıvısını belirlemek için buğday kepeği ile hazırlanan KSF ortamı, pH'ı 4,0 ve 5,0 olan 0,2 M sitrat tamponu ($C_6H_8O_7$); pH'ı 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 olan fosfat tamponu ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) ve pH'ı 8,5; 9,0 olan fosfat tamponu ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) kullanılarak nem düzeyi %55 olarak ayarlanıp 121°C'de 20 dakika otoklavda steril edilmiştir [89,123-125].

Trichoderma harzianum NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418'nin sıvı kültüründen 3 mL alınarak, KSF ortamına inokule edilmiş ve 30°C'de 7 gün süre ile statik inkübatörde inkübe edilmiştir [89,123-125].

İnkübasyon süresinin sonunda KSF ortamının üzerine 75 mL distile su konarak 150 rpm'lik çalkalamalı inkübatörde oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilmiştir. Süresinin sonunda ekstraktlar sırasıyla gazlı bez (steril) ve Whatman No:1 kağıdından süzülerek filtratları alınmıştır. Filtratlar 4°C'de 10000 rpm'de 10 dk. santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme işlemi ile filtratların süpernatant kısmı pellet kısmından ayrılmış ve elde edilen süpernatantlar kısmi saflaştırılmış enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Kısmi saflaştırılmış enzimlerin ksilanaz enzim aktivitesi ölçülüp, optimum pH'daki nemlendirme sıvısı belirlenmiştir [89,123-125].

2.2.5.2 Optimum İnkübasyon Sıcaklığının Belirlenmesi

Mikrofungusun β -ksilosidaz enzimi üretimine inkübasyon sıcaklığının etkisinin belirlenmesi için; buğday kepeği ile hazırlanan KSF ortamları bir önceki

basamakta optimize edilen pH'daki nemlendirme sıvısı ile nem düzeyi %55 olarak ayarlandıktan sonra üzerine *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418'nin sıvı kültürlerinden 3 mL inokule edilip 25, 30, 35, 40, 45°C'lik sıcaklıklarda 7 gün süre ile test mikrofunguslarının gelişimleri sağlanmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda kısmi saflaştırılmış enzimler elde edilerek ksilanaz enzim aktivitesi ölçülmüş ve optimum inkübasyon sıcaklığı belirlenmiştir [89,123-125].

2.2.5.3 Optimum İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi

Optimum inkübasyon süresini belirlemek için; KSF ortamları önceki basamakta optimize edilen pH'daki nemlendirme sıvısı ile nem düzeyi %55 olarak ayarlandıktan sonra üzerine *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418'nin sıvı kültürlerinden 3 mL inokule edilerek daha önce belirlenen inkübasyon sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 4. günden itibaren enzim aktivitesinin düşüş gösterdiği güne kadar kısmi saflaştırılmış enzimler elde edilerek ksilanaz enzim aktiviteleri ölçülüp, optimum inkübasyon süresi belirlenmiştir [89,123-125].

2.2.6 β -Ksilosidaz Aktivitesinin Belirlenmesi

β -ksilosidaz enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak 96 kuyucuklu plakalar (Well-plate) kullanarak belirlenmiştir. Bu amaçla 96'lık plakada örnek ve kontrol kuyucukları oluşturulmuştur. Örnek kuyucuklarına; 70 μ l, 5 mM *p*-nitrofenil- β -D-ksilopiranosit (*p*NPX) ile hazırlanan substrat çözeltisi ve üzerlerine 70 μ l kısmi saflaştırılmış enzim, her bir kontrol kuyucuğuna ise; 70 μ l, 50 mM ve pH'sı 6,0 olan Sodyum dihidrojen fosfat tamponu ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) ve üzerine 70 μ l kısmi saflaştırılmış enzim eklenmiştir. Hazırlanan plakanın 37°C'de, 30 dk. inkübe edilmesinin ardından plakanın her bir kuyucuğuna 70 μ l, 0,5M Na_2CO_3 çözeltisi ilave edilerek reaksiyon durdurulmuş daha sonra 410 nm'de absorbanları alınmıştır [126-130].

β -ksilosidaz enzimi, *p*-nitrofenil- β -D-ksilopiranosit substratını hidrolizleyerek serbest halde *p*-nitrofenol ve β -D-ksilopiranosit ürünlerini ortaya çıkarır. β -ksilosidaz enzim aktivitesi, enzim ünite hesaplamasında elde edilen absorbansa karşılık gelen *p*-nitrofenol ürün konsantrasyonunun μM cinsinden değeridir. Çalışmamızda ürün miktarının belirlenmesinde daha önceden hazırlanmış olan standart *p*-nitrofenil- β -D-ksilopiranosit grafiği kullanılmıştır. Standart grafik hazırlanırken son hacim $210 \mu\text{L}$ olacak şekilde *p*-nitrofenolün bir seri konsantrasyonu hazırlanmış ve kör olarak aynı miktarda distile suya karşı 410 nm 'de absorbansları okunmuştur. Elde edilen absorbans değerlerinden *p*-nitrofenol standart eğrisi oluşturulmuştur.

Standart *p*NPX grafiğinden elde edilen denklem ile bir Enzim Ünitesi (EU), bir dakikada oluşan *p*-nitrofenolün μmol cinsinden değeri olarak hesaplanmıştır

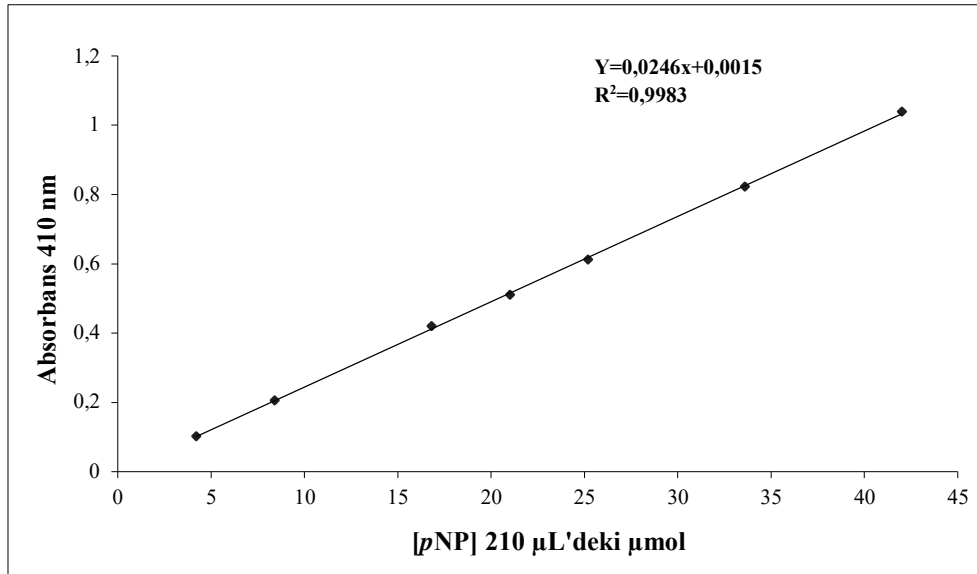
$$\text{EU} = [(\Delta E / \Sigma 410) \times 1000] / \Delta t$$

$\Delta E = 410 \text{ nm}$ dalga boyunda ölçülen absorbans farkı,

$\Delta t =$ İnkübasyon süresi (30 dk.),

$\Sigma 410 = 410 \text{ nm}$ 'deki *p*-Nitrofenilin'e ait ekstraksiyon katsayısı, (0,0246)

[126,128-130].



Şekil 2.3 Enzim aktivite tayininde kullanılan $210 \mu\text{L}$ hacimli *p*NPX standart grafiği.

2.2.7 Protein Tayini

2.2.7.1 Kalitatif Protein Tayini

Kalitatif protein tayini, Warburg Metodu olarak bilinen proteinlerin yapısında bulunan tirozin ve triptofan amino asitlerinin 280 nm'de (UV) maksimum absorbands göstermesi esasına dayananak belirlenmiştir. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HEK) işleminden sonra eşit hacimde tüplere alınmış elüantlara bu yöntemle kalitatif protein tayini yapılmıştır. HEK sonucu çıkan tüplerin her birinden 210 µL alınarak 96'lık kuartz plakanın her bir kuyusuna konulmuştur. Kör olarak ise 210 µL distile su ilave edilmiş ve spektrofotometrede 280 nm'de köre karşı absorbands değerleri okunmuştur [126,131,132].

2.2.7.2 Lowry Metodu ile Proteinlerin Kantitatif Tayini

Amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen tüplerin ve HEK ile saflaştırma işlemi ardından en yüksek aktivite gösteren tüplerin ksilanaz enziminin protein miktarı Lowry Metodu ile belirlenmiştir. Bu metodun uygulanması için şu çözeltiler hazırlanmıştır;

Çözelti A; %2'lik (w/v) CuSO₄, NaOH (0,1 M)'da çözülerek,

Çözelti B; %1' lik (w/v) NaK tartarat distile suyla çözülerek,

Çözelti C; % 0,5'lik (w/v) CuSO₄ distile suyla çözülerek,

Çözelti D; A, 1 mL Çözelti B, 1 mL Çözelti C'den alınarak,

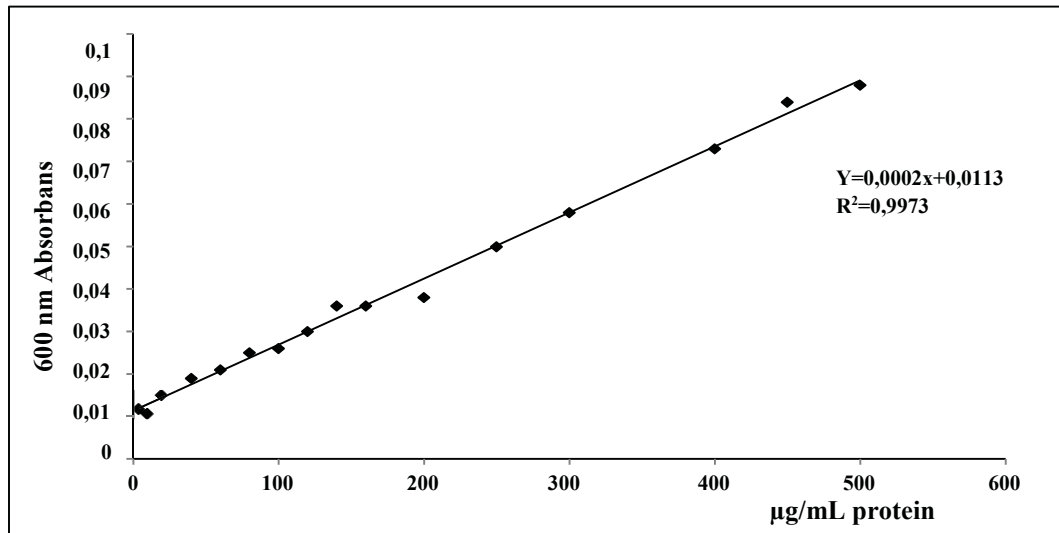
Çözelti E; 1:1 oranında Folin fenol ve distile suyla hazırlanmıştır. Numunelerin protein miktarları belirlenirken aşağıda açıklanan yol takip edilmiştir.

Örnek tüplerine protein miktarı belirlenmesi amaçlanan numunenin 1/10 oranında distile suyla seyreltilmiş halinden 100 µl alınmıştır. Üzerlerine 2000 µl Çözelti D'den eklenmiştir. Kör tüplerine ise 100 µl distile su konulmuş ve üzerine 2000 µl Çözelti D'den eklenmiştir. Örnek ve kör tüpleri 10 dk. oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda örnek ve kör tüplerine taze olarak hazırlanan Çözelti E'den 200 µl eklenip zaman kaybetmeden vorteks ile homojen

hale getirilmiş ve oda sıcaklığında 30 dk. inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda örnek ve kontrol tüplerinden 210 µl alınak 96'lık plakalara konulmuş ve 600 nm spektrofotometrede absorbansları köre karşı okunmuştur. Bu absorbans değerler, BSA grafiğinden elde edilen formül ile hesaplanarak protein miktarı grafiği oluşturulmuştur [108,109].

2.2.7.3 BSA Standart Grafiğinin Hazırlanması

1:1 oranında hazırlanan standart sığır serum albümin çözeltilisinden tüplere sırasıyla 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µL olacak şekilde konulmuş ve son hacimleri distile suyla 100 µL'ye tamamlanmıştır. Ardından sırasıyla her tüpe 2 mL D Çözeltilisinden eklenmiş ve oda ısısında 10 dk. inkübasyonları sağlanmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda sırasıyla her tüpe 1:1 oranında hazırlanan E Çözeltilisinden 200 µL eklenmiş ve hemen ardından vorteks ile homojenize edilmiştir. Daha sonra 30 dk. oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda örnekler 96'lık plakanın kuyucuklarına 210 µL konularak 600 nm'de köre karşılık gelen absorbans değerleri okunmuştur. Kör olarak BSA içermeyen 1. tüp kullanılmıştır. 600 nm'deki absorbans değerlerine karşılık gelen, µg protein değerleri kullanılarak daha sonraki çalışmalarda kullanılacak olan standart grafik çizilmiştir [108].



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

Elde edilen grafikten aşağıdaki formül elde edilmiş ve diğer örneklerin Lowry Metodu ile protein miktarı (µg/ml) hesaplaması bu formül kullanılarak yapılmıştır.

$$\text{Protein Miktarı}=(\text{Örnek Tüp Absorbansı}-\text{Kontrol Tüp Absorbansı})-0,0113/0,0002$$

2.2.8 Enzim Saflaştırma

2.2.8.1 Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi

Amonyum sülfat tuzu, sıklıkla doygunluk dereceleri farklı olan farklı proteinlerin çökmesini gerçekleştiren +2 değerlikte kullanılmaktadır. Öncelikle, kısmi saflaştırma için ham ekstrakta kullanılacak uygun amonyum sülfat konsantrasyonu aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

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

V : Ölçülen süpernatantın hacmi

S₁ : Amonyum sülfatın ilk doygunluğu

S₂ : Amonyum sülfatın istenilen doygunluğu

Optimum koşullarda elde edilen kısmi saflaştırılmış β-ksilosidaz enziminin amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesi için 0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, %'lik (w/v) oranlarında çöktürme yapılmıştır. Kısmi saflaştırılmış β-ksilosidaz enziminin her bir %'lik (w/v) aralık için yukarıdaki formüle göre hesaplanan miktardaki amonyum sülfat, 30 dk. boyunca buz üzerinde manyetik karıştırıcıda yavaş yavaş eklenerek çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra 15000 rpm'de 4°C'de 30 dk. santrifüjlenmiş ve süpernatant pelletten ayrılarak, pellet 4 mL tuzlu tampon ile çözülmüştür.

Her bir aralık için çözülen örneklerin β-ksilosidaz enzim aktivitesi belirlenmiştir. Enzim aktivitesi belirlenirken 10 farklı tuz konsantrasyonu için 10 ayrı kör ve örnek kuyucukları hazırlanarak β-ksilosidaz enzim aktivitesi ölçülmüştür. Ayrıca her bir aralık için örneklerin Lowry metodu ile kantitatif protein miktarları belirlenmiştir [133].

2.2.8.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile β -ksilosidaz Enziminin Saflaştırılması

Trichoderma harzianum NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418'den, buğday kepeğinin KSF ortamı olarak kullanılması sonucu optimum koşullarda elde edilen β -ksilosidaz enziminin saflaştırılması için amonyum sülfat çöktürmesinin ardından HEK metodu kullanılmıştır. Bu saflaştırma basamağında jel olarak laboratuvarımızda sentezlenen Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin kullanılmıştır [126,134].

Hidrofobik etkileşim kolonunun, saflaştırma işlemine hazırlanması için 1,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren 50 mM NaH_2PO_4 (pH 6,8) ile dengelenmiştir. Tampon çözeltinin, kolon dengelendikten sonra jel seviyesinin 2 cm üzerine kadar inmesi beklenmiş ve amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen pellet 4 mL, 1,5M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren 50 mM NaH_2PO_4 (pH 6,8) ile çözülmüştür. Bu çözeltinin 500 μl 'si protein tayini ve β -ksilosidaz enzim aktivitesini ölçmek için ayrıldıktan sonra kalan 3,5 mL'lik çözelti kolona yüklenmiştir. 1,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren 50 mM NaH_2PO_4 (pH 6,8) kullanılarak yüksek tuz konsantrasyonundan düşük tuz konsantrasyonuna doğru tuz gradyenti oluşturulmuştur. Oluşan tuz gradyenti ile kolondan alınan elüantlar 2 mL'lik ependorf tüplere alınmıştır. Elüsyon işlemine devam edilerek absorbans sıfırlanmıştır. Elüsyon işlemi sonunda ependorf tüplerdeki elüantların 280 nm'de kalitatif yolla protein miktarları tespit edilmiştir. Ardından her bir ependorf tüpteki elüantın β -ksilosidaz enzim aktivitesi belirlenmiştir. Tüp numaralarına karşı elde edilen değerler ile aktivite ve protein miktarlarını içeren grafik çizilmiştir [126,134,135].

2.2.9 NATIVE/SDS-PAGE Yöntemi Kullanılarak β -Ksilosidaz Enziminin Saflığı ve Alt Birimlerinin Belirlenmesi

β -ksilosidaz enzimleri amonyum sülfat çöktürmesi ardından HEK ile saflaştırıldıktan sonra NATIVE/SDS olmak üzere iki farklı elektroforez yöntemi ile saflığı ve alt birim varlığı/sayısı kontrol edilmiştir. Bunlardan birincisi, proteinlerin doğal yapılarını bozucu ajanların kullanılmadığı ve saflığının tayini içinde kullanılabilen NATIVE-PAGE (Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi)'dir. İkincisi

ise proteinlerin doğal yapılarını değiştiren ve onların eşit ylık yoğunluğuna sahip olmasını sağlayan bozucu ajanların (Merkaptoetanol ve SDS) kullanıldığı SDS-PAGE'dir. SDS-PAGE ile yapılan elektroforezde proteinlerin doğal yapıları bozulduğu için proteinler sadece moleköl ağırlığına göre ayrılmıştır. SDS-PAGE proteinlerin, birden fazla alt birime sahip olup olmadığının ve moleköl ağırlıklarının belirlenmesinde kullanılmıştır. Laemmli tarafından 1970 yılında belirtilen yöntemle SDS-PAGE ve NATIVE-PAGE elektroforezlerinde yığma jeli % 3'lük ve ayırma jeli % 10'luk olacak şekilde iki farklı akrilamid konsantrasyonuna sahip kesikli jeller hazırlanmıştır [113,114,136,137].

2.2.9.1 SDS-PAGE Yöntemi Kullanılarak β -Ksilosidaz Enziminin Saflığının ve Alt Birimlerinin Kontrolü

SDS-PAGE yönteminde jel hazırlamak için elektroforeze ait cam plakalar ilk olarak distile suyla yıkanmış ve etil alkolle detaylıca temizlenmiştir. Ardından plastik aralık oluşturucusu plakalar arasına iki adet cam plaka üst üste konulup yerleştirilmış ve jel dökme aparatıyla sabitlenmiştir. Tablo 2.1'deki gibi SDS kullanılarak ayırma jeli hazırlanmış ve plakaların arasındaki bölgeye üst taraftan 2-3 cm boşluk kalıncaya dek hava kabarcığı kalmayacak şekilde dikkatlice dökülmüştür. Jelin yüzey kısmının düz olabilmesi için distile suyla ince bir katman oluşturulmuştur. 1-2 saat polimerizasyonun tamamlanması beklendikten sonra üst yüzeydeki distile su jele zarar vermeden dikkatlice boşaltılmıştır. Daha sonra cam plakaların arasındaki polimerleşmiş ayırma jelinin üzerine tamamen doluncaya kadar Tablo 2.1'de belirtildiği gibi SDS kullanılarak hazırlanan yığma jeli dökülmüştür. Cam plakalar arasındaki yükleme jelinin üzerine tarak aparatı dikkatlice yerleştirilerek 30 dk. yığma jelinin polimerleşmesi beklenmiştir. Yığma jeli polimerleştikten sonra tarak kuyucuklarının arasının bozulmamasına dikkat edilecek şekilde dikkatlice çıkarılmıştır. Taraklar tarafından oluşturulan kuyucuklara ilk olarak distile su ile ardından tank tamponu ile yıkama işlemi uygulanmıştır. Polimerize edilen jellerin yer aldığı cam plaka elektroforeze ait tanka yerleştirilmış ve tankın alt/üst bölümüne SDS'li yürütme tamponu konulmuştur [113,114,136,137].

Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi sonucunda elde edilen elüantlardan yüksek aktivite gösterenler birleştirilerek bir numune çözeltisi (Havuz)

oluşturulmuştur. Bu çözeltiye toplam hacim 50 µL olacak şekilde 1:1 oranında SDS ve β-merkaptöetanol içeren numune yükleme tamponu karıştırılmıştır. Standart protein çözeltisinden yani markerdan 5 µL alınmıştır. Marker ve numuneler 5 dk. 95°C'ye ayarlanan termoblokta bekletilmiştir. Marker ve numunelerin soğuması beklenmiş ve soğuduktan sonra kuyucuklara yüklenmiştir. Güç kaynağı 80 V olacak şekilde ayarlanarak elektroforez tankına bağlanmıştır. Proteinlerin jel üzerindeki hareketlerinin incelenmesini sağlayan numune yükleme tamponunda bulunan boyadaki bant, ayırma jeline geldiğinde gerilim 150 V değerine yükseltilmiştir. Yürütme işlemine, proteinler ayırma jelinin bitişine 1 cm kalana kadar devam edilmiştir. Bantlar belirtilen noktaya ulaştığında akımın kesilmesiyle yürütme durdurulmuştur. Cam plakaların arasında yer alan jel çok dikkatli bir şekilde çıkarılmış yığıma jeli kesilerek ayrılmıştır. Proteine ait bantların yer aldığı ayırma jeli, renklendirme çözeltisine konulmuş ve 1,5-2 saat düşük çalkalama seviyesine ayarlanmış çalkalayıcı üzerine bırakılmıştır. Daha sonra jel renklendirme çözeltisinden çıkartılmış ve renk açma çözeltisine konulmuştur. Renk açma çözeltisi belli aralıklarda değiştirilerek jelin zemin rengi açılmış, protein bantları belirginleşinceye dek renk açma çözeltisi içerisinde çalkalanmıştır. Jel, renk açma çözeltisi içerisinde çıkarılmış ardından jel görüntüleme sisteminin (UVP) kullanılması ile jelin görüntüsü bilgisayar üzerine aktarılmıştır [113,114,136,137].

2.2.9.2 NATIVE-PAGE Yöntemi Kullanılarak β-Ksilosidaz Enziminin Saflığının ve Alt Birimlerinin Kontrolü

NATIVE-PAGE yönteminde, SDS-PAGE yöntemindeki gibi ön hazırlıklar yapılmış ve sırasıyla Tablo 2.2'de belirtilen şekilde NATIVE-PAGE ayırma jeli ve NATIVE-PAGE yığıma jeli hazırlanmıştır. Hazırlanan jeller cam plaklar arasına dökülmüştür. Jel, elektroforez tankına yerleştirilmiş, ardından tankın alt/üst bölümüne NATIVE-PAGE yürütme tamponu konulmuştur. HEK işleminin sonunda alınan elüantlardan, aktivitesi yüksek olanlar birleştirilerek bir numune çözeltisi (Havuz) oluşturulmuştur. Hazırlanan numune 50 µL olacak şekilde 1:1 oranında NATIVE-PAGE numune yükleme tamponuyla karıştırılmıştır. Sadece molekül ağırlık standartlarını içeren standart protein çözeltisinden yani markerdan 5 µL alınmıştır. Daha sonra hazırlanan bu numuneler kuyucuklara yüklenmiştir. Diğer

aşamalar SDS-PAGE tekniğinde belirtildiği gibi yapılmıştır. Son olarak jel, renk açma çözeltisinin içinden çıkartıldıktan sonra jel görüntüleme sistemi (UVP) kullanılarak jelin görüntüsü bilgisayara aktarılmıştır [116,117,138].

2.2.10 Saflaştırılan β -Ksilosidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

2.2.10.1 Saflaştırılan β -Ksilosidaz Enzim Aktivitesine Farklı pH'ların Etkisi

Katı substrat fermentasyon ortamında elde edilip HEK ile saflaştırılan β -ksilosidaz enzim aktivitesine farklı pH'ların etkisini belirlemek için 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 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) tamponu (pH 6,0; pH 7,0; pH 8,0; pH 9,0) hazırlanmıştır. Hazırlanan tampon çözeltiler ile farklı pH değerindeki 5 mM *p*-Nitrofenil β -D-ksilopiranosit (*p*NPX) substrat çözeltisi hazırlanmıştır.

Farklı pH değerlerindeki aktiviteleri belirlemek için 96'lık plakada (well-plate) kör ve örnek kuyucukları hazırlanmıştır. Kör kuyucuklarına; 70 μL farklı pH değerindeki tampon çözeltilerden ve 70 μL saflaştırılmış β -ksilosidaz enziminden konulmuştur. Örnek kuyucuklarına ise 70 μL farklı pH değerinde hazırlanan substrat çözeltilerinden ve 70 μL saflaştırılan β -ksilosidaz enziminden ilave edilmiştir. Ardından 96'lık plaka statik inkübatörde 37°C'de, 30 dk. inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin ardından 70 μL 0,5 M Na_2CO_3 ile reaksiyon durdurulmuş ve zaman kaybetmeden spektrofotometrede 410 nm'de köre karşılık absorbans değeri okunmuştur. Absorbans değerlerinden *p*-Nitrofenil β -D-ksilopiranosit (*p*NPX) standart grafiği kullanılarak enzim ünitesi (EU) hesaplanmıştır [136,139-143].

2.2.10.2 Saflaştırılan β -Ksilosidaz Enziminin Maksimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi

Sıcaklığın, saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95°C sıcaklıklarda aktivite ölçümleri yapılmıştır. Enzimin farklı sıcaklıklardaki aktivitelerinin belirlenmesinde her sıcaklık değeri için ayrı 96'lık well-plate kör ve örnek kuyucukları hazırlanmıştır. Kör kuyucuklarına 70 μ L sodyum fosfat tampon çözeltisi ve saflaştırılan β -ksilosidaz enziminden 70 μ L ilave edilmiştir. Örnek kuyucuklarına ise 70 μ L *p*-Nitrofenil β -D-ksilopiranosit (*p*NPX) çözeltisi ve saflaştırılan β -ksilosidaz enziminden 70 μ L ilave edilmiştir. Ardından hazırlanan Well-plate'ler belirlenen sıcaklıklardaki inkübatörlerde 30 dk. süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin ardından 70 μ L 0,5M Na₂CO₃ ile reaksiyon durdurulmuş ve zaman kaybetmeden spektrofotometrede 410 nm'de köre karşılık absorbans değeri okunmuştur. Absorbans değerlerinden *p*-Nitrofenil β -D-ksilopiranosit (*p*NPX) standart grafiği kullanılarak enzim ünitesi (EU) hesaplanmıştır [136,139-143].

2.2.10.3 Saflaştırılan β -Ksilosidaz Enziminin Termal Kararlılığının Belirlenmesi

Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin termal kararlılığının belirlenmesi amacı ile β -ksilosidaz enzimi 45, 55, 65, 75, 85°C sıcaklıklarda ayrı ayrı inkübasyona bırakılmıştır. Isı ile muamele edilmemiş enzim çözeltisinden alınan ve aktivitesi ölçülen örneğe ait aktivite değeri başlangıç enzim aktivitesi olarak kabul edilmiştir. 45°C'deki termal kararlılığın araştırılması için 120 dk. süre ile β -ksilosidaz enzimi 45°C'de inkübasyona bırakılmış ve her 10 dakikada bir β -ksilosidaz enzim aktivitesi ölçülmüştür. Aynı işlemler 55, 65, 75°C'deki termal kararlılığın araştırılması için de yapılmıştır. 85°C'deki termal kararlılığın araştırılmasında her 2 dakikada bir zaman kaybetmeksizin β -ksilosidaz enzim aktivitesi ölçülmüş bu işlem aktivite sıfırlanana kadar sürdürülmüştür. Absorbans değerlerinden *p*-Nitrofenil β -D-ksilopiranosit (*p*NPX) standart grafiği kullanılarak enzim ünitesi (EU) hesaplanmıştır [136,139-143].

2.2.10.4 β -Ksilosidaz Enziminin *p*-Nitrofenil β -D-ksilopiranosit (*p*NPX) Substratına Karşı K_M ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi

β -ksilosidaz enziminin *p*NPX substratına olan ilgisini gösteren K_M ve V_{max} değerlerinin tespit edilmesi amacıyla *p*NPX substratının 5-70 μ l arasında değişen konsantrasyonlarda enzim aktivitesinin ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen aktivite değerleri, reaksiyon hızı [V] EU/mL cinsinden hesaplanmıştır. Reaksiyon hızından [V] yararlanılarak $1/[V]$ değeri ve kullanılan substratların konsantrasyonlarından [S] yararlanılarak $1/[S]$ değeri elde edilmiştir. Bulunan bu değerlerden Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir.

Çizilen Lineweaver-Burk grafiklerine ait denklemden K_M ile V_{max} değerleri bulunmuştur. Bu şekilde grafiğin $1/V$ eksenini kestiği nokta olan $1/V_{max}$ değerinden V_{max} değeri belirlenmiştir. Denklemin eğimi olan K_M/V_{max} ifadesinde V_{max} değeri yerine yazılarak K_M hesaplanmıştır [143-147].

2.2.10.5 İnhibitör Olarak Kullanılan D-(+)-Ksilozun IC_{50} Değerinin Belirlenmesi

D-(+)-Ksilozun, β -ksilosidaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisinin belirlenerek IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. D-(+)-Ksilozun IC_{50} değerini bulmak için, *p*NPX substratının 1,25 mM konsantrasyonu çalışılmıştır. İnhibitör eklenmemiş ortamdaki enzim aktivitesi tespit edilerek bu değer % 100 aktivite olarak alınmıştır. 1-60 μ l arasında değişen inhibitör konsantrasyonlarında enzim aktivite değerleri bulunmuştur. Bu değerlerden % aktivite hesaplanarak, % Aktivite-[I] (İnhibitör konsantrasyonu) grafikleri çizilmiştir. Bu grafiklerden yararlanılarak enzim aktivitesini %50 oranında azaltan inhibitör konsantrasyonu olan IC_{50} değerleri hesaplanmıştır [144,146-151].

2.2.10.6 İnhibitör Olarak Kullanılan D-(+)-Ksilozun K_i Değerinin Bulunması

*p*NPX substratı kullanılarak, β -ksilosidaz enzim aktivitesi üzerine D-(+)-Ksilozun inhibisyon tipi ile K_i değeri belirlenmiştir. K_i değerinin tespiti için;

öncelikle inhibitörsüz ortamda 5-70 µl arasında farklı *p*NPX substrat konsantrasyonunda aktivite değerleri bulunmuştur. Bulunan bu aktiviteler [V] olarak alınarak 1/[V] değerleri hesaplanmıştır. Değişen substrat konsantrasyonları [S] olarak alınarak, 1/[S] değerleri hesaplanmıştır. Bu hesaplanan değerlerden Lineweaver-Burk grafiği çizildiğinde I_0 doğrusu elde edilmiştir.

D-(+)-Ksilozun inhibitör olarak kullanıldığı iki farklı sabit konsantrasyonda, *p*NPX substratının 5-70 µl arasında farklı konsantrasyonda, *p*NPX substratı ile aktivite değerleri tespit edilmiştir. İki farklı inhibitör konsantrasyonu varlığında, farklı *p*NPX substrat konsantrasyonuna karşılık gelen aktivite değerleri ve 1/V ile 1/[S] hesaplanarak Lineweaver-Burk grafiği çizilip I_1 ve I_2 doğruları oluşturulmuştur.

Lineweaver-Burk grafiklerinden yararlanılarak K_i değerleri hesaplanmış ve inhibisyon tipleri belirlenmiştir. K_i değerleri; yarışmalı (kompetitif) inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrisinde 1/[S] eksenini kestiği nokta olan $-1/K_M (1+[I]/K_i)$ ifadesi, yarışmasız (nonkompetitif) ve karışık (mix type) inhibisyonlar için 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 kullanılan denklemlerdeki K_M ve V_{max} değerleri inhibitörsüz ortamdaki değerlerdir [144,150,152-154].

3. BULGULAR

3.1 β -Ksilosidaz Aktivitesine Sahip Mikrofungusların Belirlenmesi

Araştırmada test mikroorganizması olarak kullanılacak β -ksilosidaz enzim aktivitesine sahip mikrofungus suşlarını belirlemek amacı ile %5 ksilan içeren Patates Dekstroz Agar besiyerine *Trichoderma harzianum* NRRL 13019, *Trichoderma viride* NRRL 6418, *Trichoderma atroviride* NRRL 25150, *Trichoderma koningii* NRRL 54330 ve *Trichoderma virens* NRRL 2314 inoküle edilerek 30°C’de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418 suşlarının deneylerde kullanılmasına karar verilmiştir (Şekil 3.1 a ve b).



Şekil 3.1: (a) *Trichoderma harzianum* NRRL 13019; (b) *Trichoderma viride* NRRL 6418.

3.2 Üretim Koşullarının Katı Substrat Fermentasyon (KSF) Ortamında Üretilen Fungus β -Ksilosidaz Enzimi Sentezi Üzerine Etkisi

Katı substrat fermentasyonu kültür koşullarında geliştirilen test mikrofunguslarının enzim üretimlerinde etkili olan pH, nemlendirme sıvıları, inkübasyon sıcaklığı ve inkübasyon süreleri optimize edilen parametrelerdir.

Parametreler birbirlerinden bağımsız olarak test edilerek, optimize edilen her bir parametre bir sonraki deneyde sabitlenmiş ve mikrofungusun yüksek aktiviteli enzim ürettiği optimum gelişim koşulları belirlenmiştir.

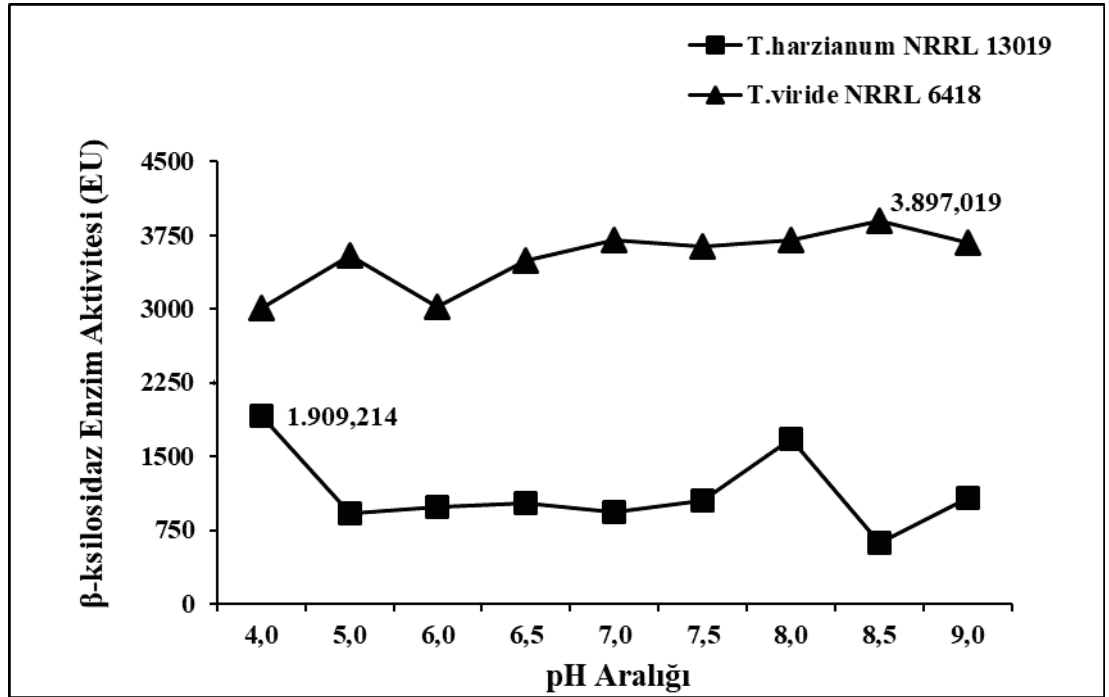
3.2.1 Optimum pH ve Nemlendirme Sıvılarının Belirlenmesi

Optimizasyon işleminin ilk basamağında test mikrofunguslarının β -ksilosidaz enzimini yüksek aktivitede ürettikleri nemlendirme sıvısı ve optimum pH'ın belirlenmesi amacıyla 9 farklı pH'da hazırlanan nemlendirme sıvıları kullanılmıştır. Bu amaç için; Buğday kepeği ile hazırlanan katı substrat fermentasyon ortamları pH'ı 4,0 ve 5,0 olan 0,2 M sitrat tamponu ($C_6H_8O_7$); pH'ı 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 olan 0,2 M Sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4) tamponu ve pH'ı 8,5 ve 9,0 olan 0,2 M Di-sodyum hidrojen fosfat dihidrat tamponu (Na_2HPO_4) ile nem düzeyleri %55 olacak şekilde nemlendirilerek 121°C'de 20 dk. otoklavda steril edilmiştir. *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418'in Bölüm 2.2.2'de açıklandığı şekilde hazırlanan sıvı kültürlerinden 3 mL alınarak KSF ortamlarına ayrı ayrı inokulasyonları yapılarak 7 gün süreyle 30°C sıcaklıkta inkübe edilmeleri sağlanmış, bu sürenin sonunda Bölüm 2.2.4'de anlatıldığı gibi elde edilen kısmi saflaştırılmış enzimlerin, β -ksilosidaz enzim aktivitesi ölçümleri yapılmıştır.

β -ksilosidaz enzim aktivitelerinin en yüksek olduğu üretim koşulları *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 için; optimum pH'ı 4,0 olan 0,2 M sitrat tamponu ($C_6H_8O_7$) olduğu; *Trichoderma viride* NRRL 6418 için ise optimum pH'ı 8,5 olan 0,2 M Di-sodyum hidrojen fosfat dihidrat tamponu (Na_2HPO_4) olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.1, Şekil 3.2).

Tablo 3.1: Katı substrat fermentasyon kültür ortamında farklı pH'lardaki nemlendirme sıvılarının *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418'den elde edilen β -ksilosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.

| Nemlendirme Sıvısı (pH) | β -ksilosidaz Enzim Aktivitesi (EU) | |
|-------------------------|---|-------------------------------------|
| | <i>Trichoderma harzianum</i> NRRL 13019 | <i>Trichoderma viride</i> NRRL 6418 |
| 4,0 | 1.909,214 | 3.009,485 |
| 5,0 | 922,764 | 3.536,585 |
| 6,0 | 987,805 | 3.017,615 |
| 6,5 | 1.020,325 | 3.494,580 |
| 7,0 | 930,894 | 3.692,412 |
| 7,5 | 1.052,846 | 3.631,436 |
| 8,0 | 1.674,797 | 3.695,122 |
| 8,5 | 626,016 | 3.897,019 |
| 9,0 | 1.073,171 | 3.676,152 |



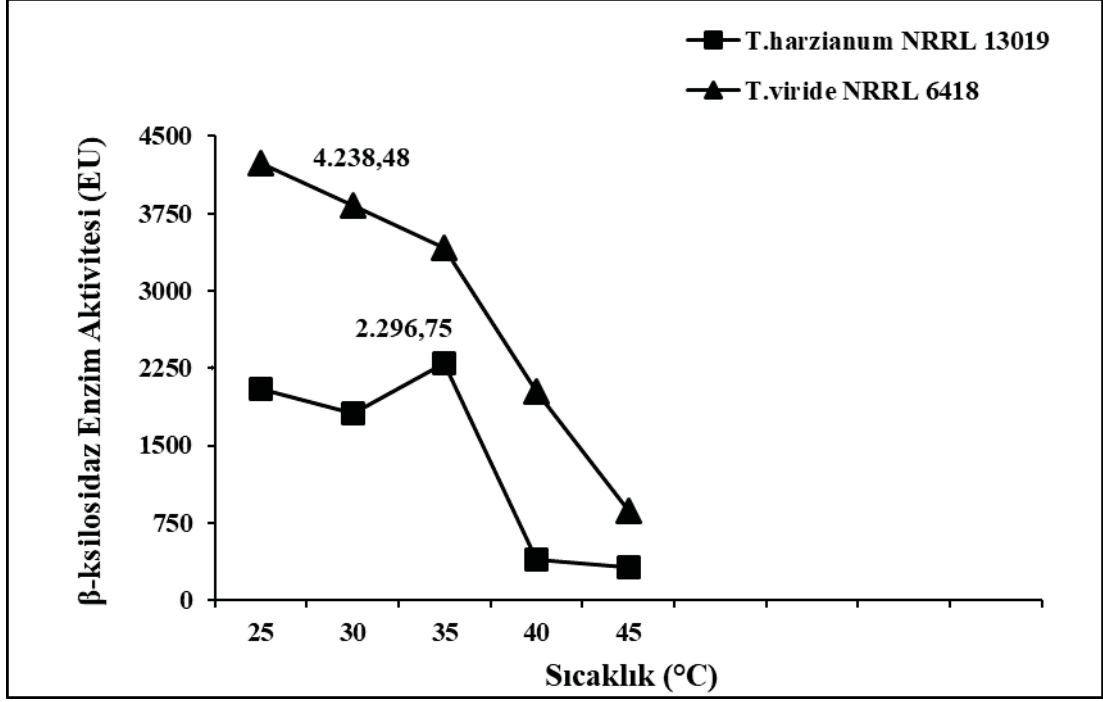
Şekil 3.2: Katı substrat fermentasyon kültür ortamında farklı pH'lardaki nemlendirme sıvılarının *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418'den elde edilen β -ksilosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.

3.2.2 Optimum İnkübasyon Sıcaklığının Belirlenmesi

Optimum inkübasyon sıcaklığının belirlenmesi amacı ile KSF kültür ortamında geliştirilen *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418'in 5 farklı sıcaklıkta inkübasyonları sağlanmıştır. *Trichoderma harzianum* NRRL 13019'un optimum inkübasyon sıcaklığının tespiti için KSF ortamı bir önceki basamakta saptanan pH'ı 4,0 olan 0,2 M sitrat tamponu ($C_6H_8O_7$) ile, *Trichoderma viride* NRRL 6418'nin optimum inkübasyon sıcaklığının belirlenmesi için ise KSF ortamı pH'ı 8,5 olan 0,2 M Di-sodyum hidrojen fosfat dihidrat tamponu (Na_2HPO_4) ile nemlendirilmiştir. Nemlendirme işleminin ardından KSF ortamları 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak sterilizasyonları sağlanmış ve sonrasında *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418'nin sıvı kültürlerinden 3 mL inokule edilerek 25, 30, 35, 40 ve 45°C sıcaklık değerlerinde 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda Bölüm 2.2.4'de anlatıldığı şekilde elde edilen kısmi saflaştırılmış enzimlerin β -ksilosidaz enzim aktivite ölçümleri yapılmış ve β -ksilosidaz enzim aktivitesinin optimum olduğu inkübasyon sıcaklıkları *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 için 35°C; *Trichoderma viride* NRRL 6418 için ise 25°C olarak tespit edilmiştir (Tablo 3.2; Şekil 3.3).

Tablo 3.2: Katı substrat fermentasyon kültür ortamında farklı sıcaklıkların *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418'den elde edilen β -ksilosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.

| İnkübasyon Sıcaklığı (°C) | β -ksilosidaz Enzim Aktivitesi (EU) | |
|---------------------------|---|-------------------------------------|
| | <i>Trichoderma harzianum</i> NRRL 13019 | <i>Trichoderma viride</i> NRRL 6418 |
| 25 | 2.048,780 | 4.238,482 |
| 30 | 1.806,233 | 3.821,138 |
| 35 | 2.296,748 | 3.418,699 |
| 40 | 388,889 | 2.025,745 |
| 45 | 325,203 | 865,854 |



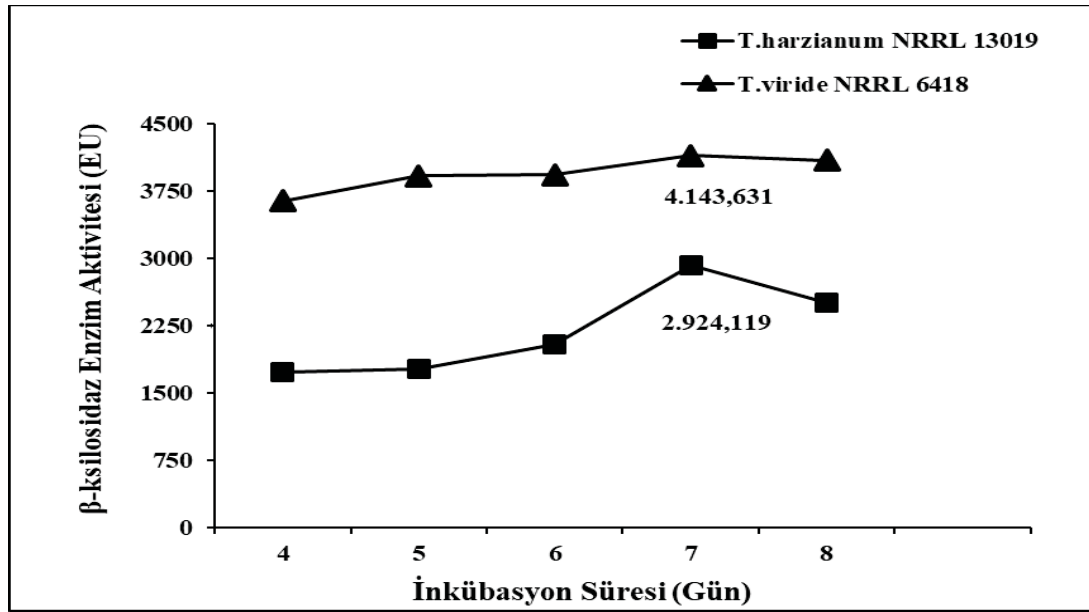
Şekil 3.3: Katı substrat fermentasyon kültür ortamında farklı inkübasyon sıcaklıklarının *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418'den elde edilen β -ksilosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.

3.2.3 Optimum İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi

Optimizasyon işlemlerinin son aşamasında KSF kültür ortamında geliştirilen *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418'in β -ksilosidaz enzim aktivitesinin maksimum olduğu inkübasyon süresi belirlenmiştir. *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418'in optimum inkübasyon sürelerini belirlemek için önceki basamaklarda tespit edilen verilerden yararlanarak *Trichoderma harzianum* NRRL 13019'un Katı Substrat Fermentasyon ortamı pH'ı 4,0 olan sitrat tamponu ($C_6H_8O_7$) ile nemlendirilerek $35^\circ C$ ' de, *Trichoderma viride* NRRL 6418'in Katı Substrat Fermentasyon ortamı ise pH'ı 8,5 olan 0,2 M Di-sodyum hidrojen fosfat dihidrat tamponu (Na_2HPO_4) ile nemlendirilerek $25^\circ C$ 'de inkübasyonları sağlanmıştır. İnkübasyonun 4. gününden itibaren enzim aktivitesinin düşüş gösterdiği güne kadar günlük enzim aktivite ölçümleri yapılmış ve bu ölçümler sonucunda her iki mikrofungus için de β -ksilosidaz enzim aktivitelerinin en yüksek olduğu inkübasyon süresi 7. gün olarak belirlenmiştir (Tablo 3.3; Şekil 3.4).

Tablo 3.3: Katı substrat fermentasyon kültür ortamında farklı inkübasyon sürelerinin *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418'den elde edilen β -ksilosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.

| İnkübasyon Süresi (Gün) | β -ksilosidaz Enzim Aktivitesi (EU) | |
|-------------------------|---|-------------------------------------|
| | <i>Trichoderma harzianum</i> NRRL 13019 | <i>Trichoderma viride</i> NRRL 6418 |
| 4 | 1.733,062 | 3.640,921 |
| 5 | 1.766,938 | 3.915,989 |
| 6 | 2.039,295 | 3.929,539 |
| 7 | 2.924,119 | 4.143,631 |
| 8 | 2.508,130 | 4.090,786 |



Şekil 3.4: Katı substrat fermentasyon kültür ortamında farklı inkübasyon sürelerinin *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418'den elde edilen β -ksilosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.

3.3 β -Ksilosidaz Enziminin Saflaştırması

Trichoderma harzianum NRRL 13019; önceki bölümde tespit edilen optimum koşulların (pH'ı 4,0 olan sitrat tamponu ($C_6H_8O_7$) ile %55 oranında nemlendirme, $35^{\circ}C$ 'de 7 gün) kullanılmasıyla geliştirilerek elde edilen süpernatant Bölüm 2.2.4'te açıklandığı şekilde yapılan ultrasantrifüjleme (10000 rpm, $4^{\circ}C$ 'de, 10 dk.) işleminden sonra filtratın süpernatant kısmı pellet kısmından ayrılmıştır. Aynı şekilde; *Trichoderma viride* NRRL 6418; önceki bölümde tespit edilen optimum koşulların (pH'ı 8,5 olan 0,2 M Di-sodyum hidrojen fosfat dihidrat tamponu

(Na₂HPO₄) ile %55 oranında nemlendirme, 25°C’de 7 gün) kullanılmasıyla geliştirilerek elde edilen süpernatant, Bölüm 2.2.4’te açıklandığı şekilde yapılan ultrasantrifüjleme (10000 rpm, 4°C’de, 10 dk.) işleminden sonra filtratın süpernatant kısmı pellet kısmından ayrılmıştır. Elde edilen süpernatantlar, kısmi saflaştırılmış enzim kaynağı olarak amonyum sülfat tuzu ile çöktürme ve hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırma işlemlerinde kullanılmıştır.

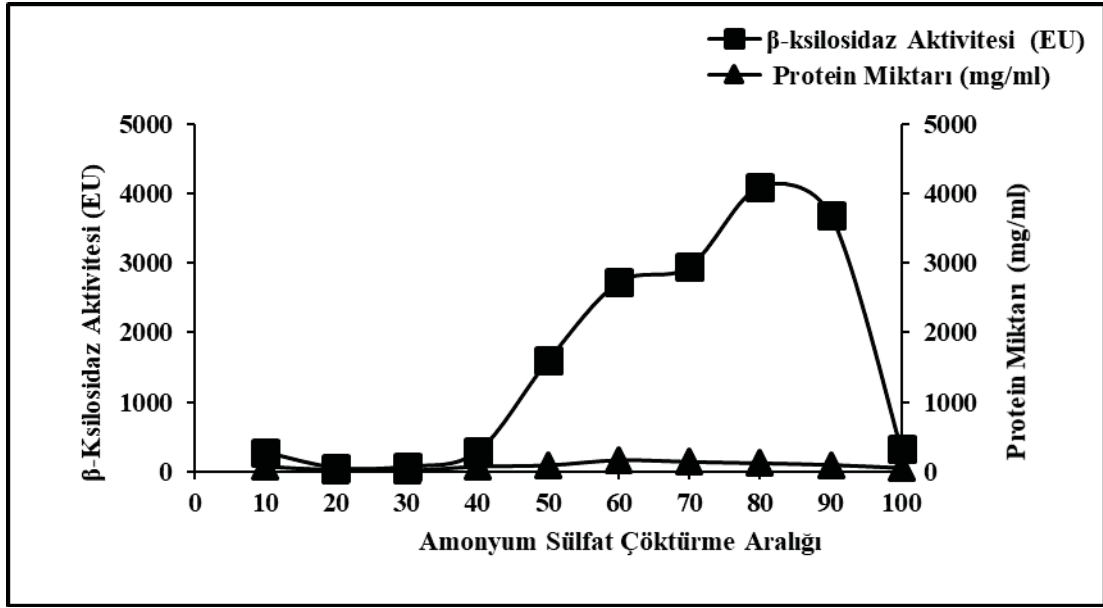
3.4 Amonyum Sülfat Tuzu Kullanılarak Çöktürme Aralığının Belirlenmesi

Trichoderma harzianum NRRL 13019’dan elde edilen β-ksilosidaz enziminin amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesi için; belirlenen optimum koşullar kullanılarak elde edilen kısmi saflaştırılmış enzime 10 farklı aralık değeri için Tablo 3.4’ de belirtilen miktarda amonyum sülfat tuzu [1,5 M, NH₄(SO₂)] eklenerek, her bir aralık değerinin Lowry metodu ile protein miktarları (mg/mL) ve β-ksilosidaz aktivite (EU) ölçümleri yapılmıştır (Tablo 3.4).

Tablo 3.4: *Trichoderma harzianum* NRRL 13019’dan elde edilen kısmi saflaştırılmış β-ksilosidaz enziminin amonyum sülfat çöktürme yöntemi sonundaki β-ksilosidaz Enzim Aktivitesi ve Protein Miktarı.

| Aralık Değeri | Çöktürme Aralığı | Hacim (ml) | Kullanılan Amonyum Sülfat Miktarı (g) | β-ksilosidaz Enzim Aktivitesi (U/ml) | Protein Miktarı (mg/ml) |
|---------------|------------------|------------|---------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| 1 | 0-10 | 10 | 0,5140 | 279,1328 | 68,5000 |
| 2 | 10-20 | 10 | 0,5290 | 59,6206 | 18,5000 |
| 3 | 20-30 | 10 | 0,5460 | 75,8808 | 8,5000 |
| 4 | 30-40 | 10,5 | 0,5910 | 291,3279 | 68,5000 |
| 5 | 40-50 | 10,5 | 0,6110 | 1601,6260 | 88,5000 |
| 6 | 50-60 | 10,5 | 0,6320 | 2722,2222 | 163,5000 |
| 7 | 60-70 | 10,5 | 0,6540 | 2947,1545 | 138,5000 |
| 8 | 70-80 | 10,5 | 0,6780 | 4096,2060 | 118,5000 |
| 9 | 80-90 | 10,5 | 0,7030 | 3686,9919 | 93,5000 |
| 10 | 90-100 | 10,5 | 0,7310 | 326,5583 | 48,5000 |

Tablo 3.4'te yer alan değerler kullanılarak Şekil 3.5'teki Amonyum Sulfat öktürme Aralığı-Enzim Aktivitesi-Protein Miktarı grafiği çizilmiştir. öktürme aralığının belirlenmesinde protein miktarının düşük ancak enzim aktivitesinin yüksek olduğu aralık tespit edilmeye çalışılmıştır. Çizilen grafikten enzimin aktivitesinin yüksek olduğu aralık %40-90 olarak belirlenmiş ve *Trichoderma harzianum* NRRL 13019'un Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile saflaştırılması basamağında belirlenen bu amonyum sulfat çöktürme aralığı kullanılmıştır.



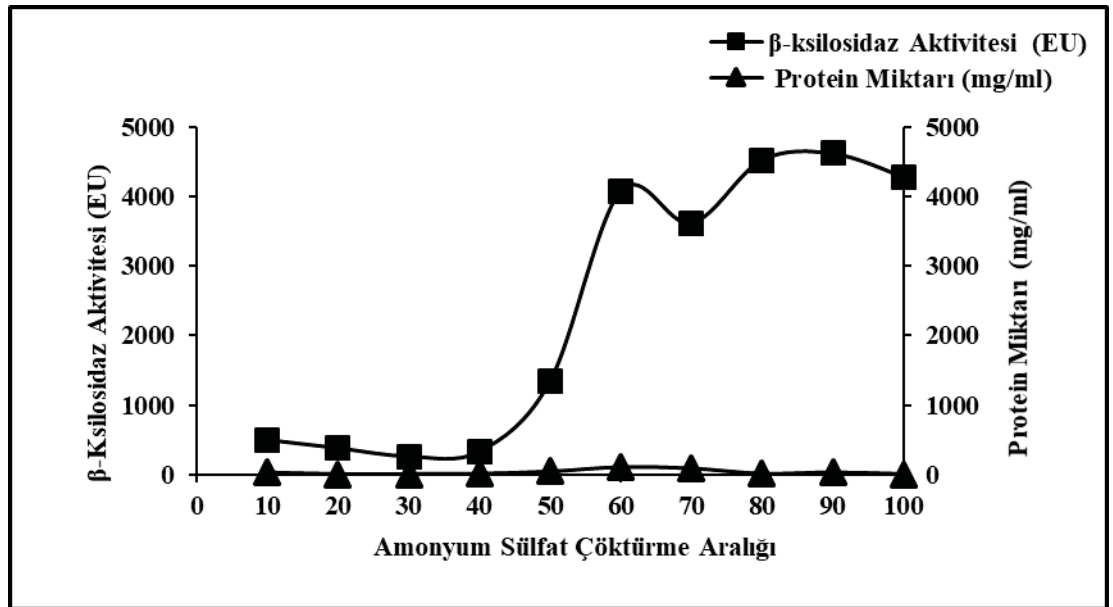
Şekil 3.5: *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 Amonyum Sulfat öktürme Aralığı-Enzim Aktivite-Protein Miktarı grafiği.

Trichoderma viride NRRL 6418'den elde edilen β-ksilosidaz enziminin amonyum sulfat çöktürme aralığının belirlenmesi için belirlenen optimum koşullar kullanılarak elde edilen kısmi saflaştırılmış enzime 10 farklı aralık değeri için Tablo 3.5'te belirtilen miktarda amonyum sulfat tuzu [1,5 M, NH₄(SO₂)] eklenerek her bir aralık değerinin Lowry metodu ile protein miktarları (mg/mL) ve β-ksilosidaz aktivite (EU) ölçümleri gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.5).

Tablo 3.5: *Trichoderma viride* NRRL 6418'den elde edilen kısmi saflaştırılmış β -ksilosidaz enziminin amonyum sülfat çöktürme yöntemi sonundaki β -ksilosidaz Enzim Aktivitesi ve Protein Miktarı.

| Aralık Değeri | Çöktürme Aralığı | Hacim (ml) | Kullanılan Amonyum Sülfat Miktarı (g) | β -ksilosidaz Enzim Aktivitesi (U/ml) | Protein Miktarı (mg/ml) |
|---------------|------------------|------------|---------------------------------------|---|-------------------------|
| 1 | 0-10 | 10 | 0,5140 | 500,0000 | 28,5000 |
| 2 | 10-20 | 10 | 0,5290 | 382,1138 | 3,5000 |
| 3 | 20-30 | 10 | 0,5460 | 262,8726 | 3,5000 |
| 4 | 30-40 | 10,5 | 0,5910 | 334,6883 | 8,5000 |
| 5 | 40-50 | 10,5 | 0,6110 | 1350,9485 | 43,5000 |
| 6 | 50-60 | 10,5 | 0,6320 | 4081,3008 | 113,5000 |
| 7 | 60-70 | 10,5 | 0,6540 | 3616,5312 | 93,5000 |
| 8 | 70-80 | 10,5 | 0,6780 | 4523,0352 | 8,5000 |
| 9 | 80-90 | 10,5 | 0,7030 | 4617,8862 | 28,5000 |
| 10 | 90-100 | 10,5 | 0,7310 | 4280,4878 | 3,5000 |

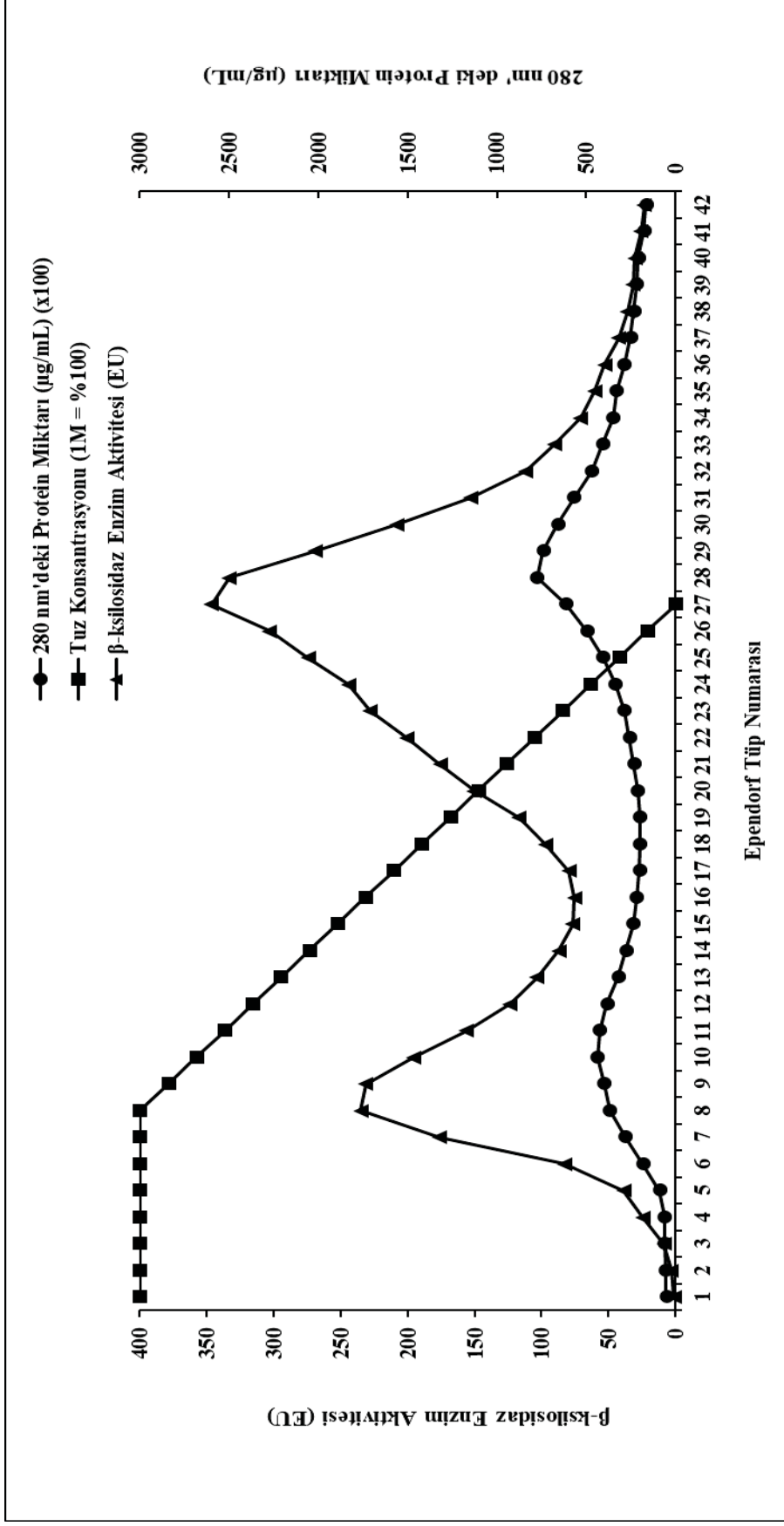
Tablo 3.5'te yer alan değerler kullanılarak Şekil 3.6'daki Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığı-Enzim Aktivite-Protein Miktarı grafiği çizilmiştir. Çöktürme aralığının belirlenmesinde protein miktarının düşük ancak enzim aktivitesinin yüksek olduğu aralık tespit edilmeye çalışılmıştır. Çizilen grafikten enzimin aktivitesinin yüksek olduğu aralık %50-100 olarak belirlenmiş ve *Trichoderma viride* NRRL 6418'nin Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile saflaştırılması basamağında belirlenen bu amonyum sülfat çöktürme aralığı kullanılmıştır.



Şekil 3.6: *Trichoderma viride* NRRL 6418 Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığı-Enzim Aktivite-Protein Miktarı grafiği.

3.5 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile β -Ksilosidaz Enziminin Saflaştırılması

Trichoderma harzianum NRRL 13019'dan elde edilen kısmi saflaştırılmış enzime %40-90 aralığında amonyum sülfat çöktürmesi uygulanmış, çöktürme sonucunda elde edilen enzim laboratuvarımızda sentezlenen Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftlamin Hidrofobik Jelini içeren kolona yüklenmiştir. Kolondan geçen numuneler her biri numara verilmiş 2 mL'lik ependorf tüpler içerisine alınmış ve kromatografinin tamamlanmasından sonra ependorf tüpler içerisine alınmış olan bu numunelerin β -ksilosidaz enzim aktiviteleri ve Warburg Yöntemi kullanılarak 280 nm dalga boyunda kalitatif protein değerleri ölçülerek tayinleri yapılmıştır. Elde edilen bu ölçüm sonuçlarından yararlanılarak β -ksilosidaz enzim elüsyon grafiği çizilmiştir (Şekil 3.7). Grafikte yer alan veriler kullanılarak yüksek aktivite gösterdiği tespit edilen numuneleri içeren ependorf tüpleri belirlenerek bu tüplerde yer alan numunelerin Lowry Yöntemi kullanılarak kantitatif protein değerleri ölçülerek tayinleri yapılmıştır. Tüm ölçüm sonuçlarından yararlanılarak *Trichoderma harzianum* NRRL 13019'dan elde edilen β -ksilosidaz enziminin saflaştırılma tablosu oluşturulmuştur (Tablo 3.6).



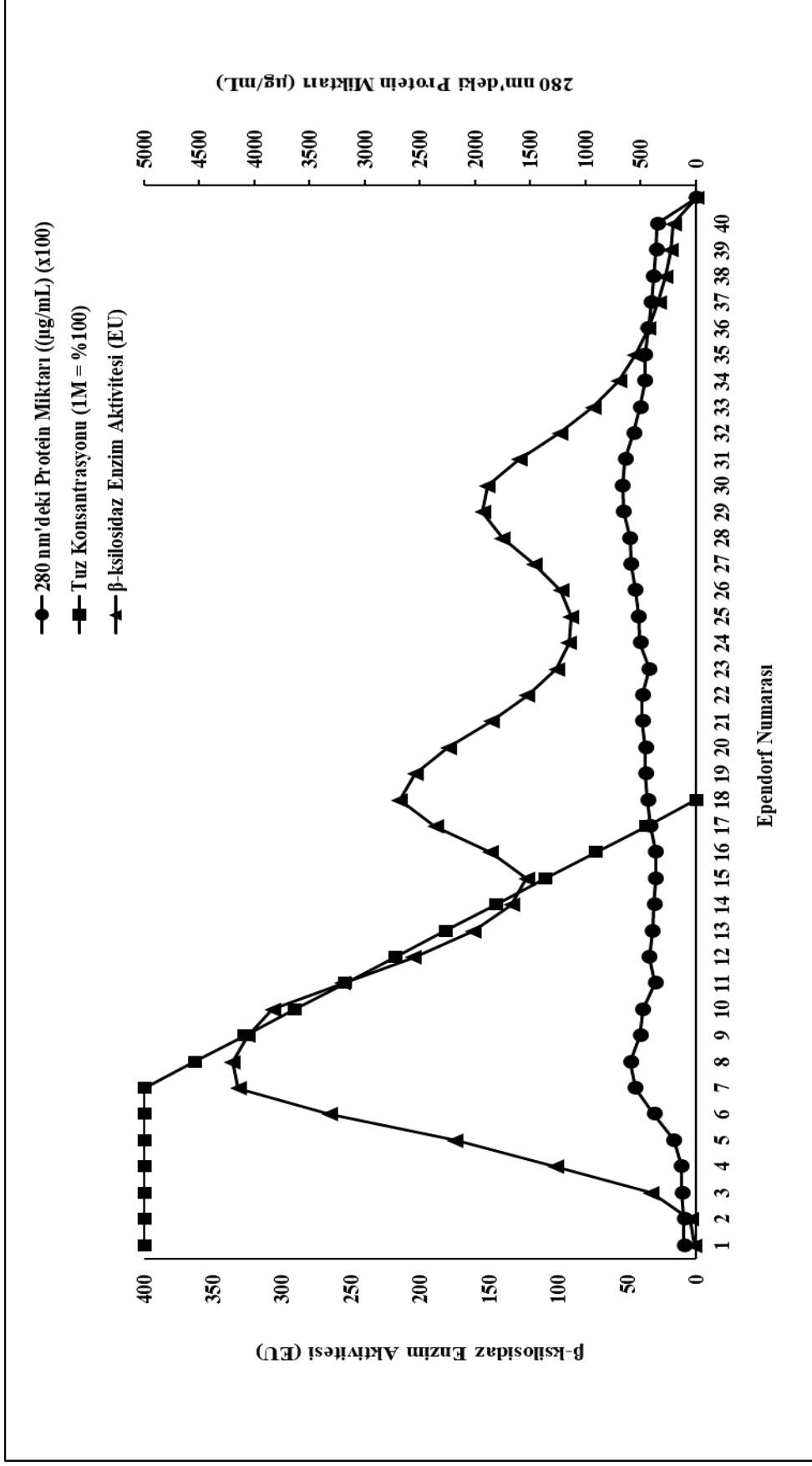
Şekil 3.7: Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi kullanılarak saflaştırılan *Trichoderma harzianum* NRRL 13019'dan elde edilen β -ksilosidaz enziminin elüsyon grafiği.

Tablo 3.6: *Trichoderma harzianum* NRRL 13019’ dan elde edilen β -ksilozidaz enziminin saflaştırma tablosu.

| Basamak | Hacim (mL) | Aktivite (EU/mL) | Protein Miktarı (mg/mL) | Toplam Aktivite (EU/mL) | Toplam Protein (mg) | Spesifik Aktivite (EU/mg) | % Verim | Saflaştırma Derecesi |
|--|-------------------|-------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------|----------------------------------|----------------|-----------------------------|
| Ham ekstrakt | 10 | 1803,5230 | 0,5235 | 18035,2304 | 5,2350 | 3445,1252 | 100,0000 | 1 |
| Amonyum Sülfat Çöktürmesi (Havuz) | 4 | 3383,4688 | 0,2935 | 13533,8753 | 1,1740 | 11528,0028 | 75,0413 | 3,3462 |
| Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi | 3,5 | 2601,6260 | 0,0035 | 9105,6911 | 0,0123 | 743321,7189 | 50,4884 | 215,7604 |

Trichoderma harzianum NRRL 13019'dan elde edilen β -ksilosidaz enziminin saflaştırma tablosunda (Tablo 3.6) gösterildiği gibi amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda total aktivitesi ve total protein miktarı sırasıyla 13533,8753 EU/mL ve 1,1740 mg olarak belirlenmiş olup %75,0413 verimle 3,3462 kat saflaştırılması sağlanmıştır. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi sonunda ise total aktivite 9105,6911 EU/mL ve total protein miktarı 0,0123 mg olarak tespit edilmiş olup β -ksilosidaz enzimi %50,4884 verimle 215,7604 kat saflaştırılmıştır.

Çalışmalarımızda yer verdiğimiz ikinci mikrofungus olan *Trichoderma viride* NRRL 6418'den elde edilen kısmi saflaştırılmış enzime % 50-100 aralığında amonyum sülfat çöktürmesi uygulanmış, çöktürme sonucunda elde edilen kısmi saflaştırılmış enzim, laboratuvarımızda sentezlenen Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftlamin Hidrofobik Jelini içeren kolona yüklendikten sonra kolondan geçen numuneler her biri numara verilmiş 2 mL'lik ependorf tüpler içerisine alınmış ve kromatografinin tamamlanmasından sonra ependorf tüpler içerisine alınmış olan bu numunelerin β -ksilosidaz enzim aktiviteleri ve Warburg Yöntemi kullanılarak 280 nm dalga boyunda kalitatif protein değerleri ölçülerek tayinleri yapılmıştır. Elde edilen bu ölçüm sonuçlarından yararlanılarak β -ksilosidaz enzim elüsyon grafiği çizilmiştir (Şekil 3.8). Grafikte yer alan veriler kullanılarak yüksek aktivite gösterdiği tespit edilen numuneleri içeren ependorf tüpleri belirlenerek bu tüplerde yer alan numunelerin, Lowry Yöntemi kullanılarak kantitatif protein değerleri ölçülerek tayinleri yapılmıştır. Tüm ölçüm sonuçlarından yararlanılarak *Trichoderma viride* NRRL 6418'den elde edilen β -ksilosidaz enziminin saflaştırılma tablosu oluşturulmuştur (Tablo 3.7).



Şekil 3.8: Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi kullanılarak saflaştırılan *Trichoderma viride* NRRRL 6418'den elde edilen β -ketoglutarate enziminin elüsyon grafiği.

Tablo 3.7: *Trichoderma viride* NRRL 6418'den elde edilen β -ksilosidaz enziminin saflaştırma tablosu.

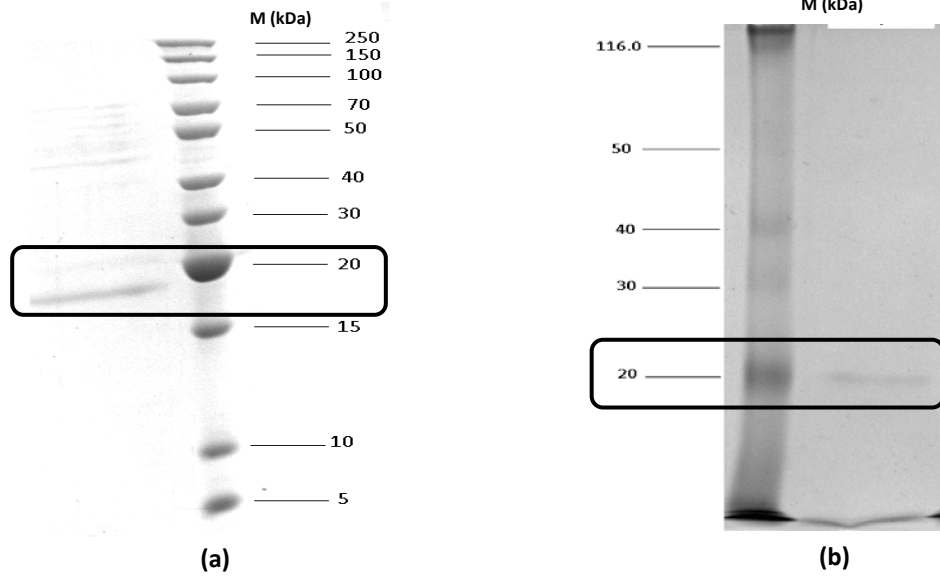
| Basamak | Hacim (mL) | Aktivite (EU/mL) | Protein Miktarı (mg/mL) | Toplam Aktivite (EU/mL) | Toplam Protein (mg) | Spesifik Aktivite (EU/mg) | % Verim | Saflaştırma Derecesi |
|--|-------------------|-------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------|----------------------------------|----------------|-----------------------------|
| Ham ekstrakt | 10 | 4397,0190 | 0,3385 | 43970,1897 | 3,3850 | 12989,7163 | 100,0000 | 1,0000 |
| Amonyum Sülfat Çöktürmesi (Havuz) | 4 | 4398,3740 | 0,2885 | 17593,4959 | 1,1540 | 15245,6637 | 40,0123 | 1,1737 |
| Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi | 3,5 | 4200,5420 | 0,0035 | 14701,8970 | 0,0123 | 1200154,8587 | 33,4361 | 92,3927 |

Trichoderma viride NRRL 6418'den elde edilen β -ksilosidaz enziminin saflaştırma tablosunda (Tablo 3.7) gösterildiği gibi amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda total aktivitesi ve total protein miktarı sırasıyla 17593,4959 EU/mL ve 1,154 mg olarak belirlenmiş olup %40,0123 verimle 1,1737 kat saflaştırılması sağlanmıştır. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi sonunda ise total aktivite 14701,8970 EU/mL ve total protein miktarı 0,0123 mg olarak tespit edilmiş olup β -ksilosidaz enzimi %33,4361 verimle 92,3927 kat saflaştırılmıştır.

3.6 *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418'den Elde Edilerek Saflaştırılan β -Ksilosidaz Enziminin NATIVE/SDS PAGE Tekniği Kullanılarak Saflığının ve Alt Birimlerinin Kontrolü

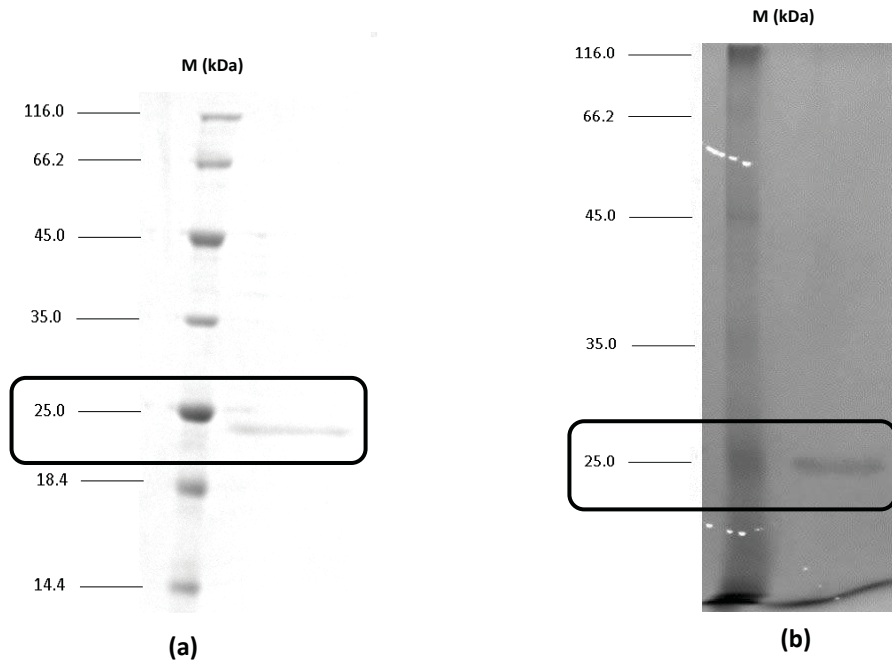
Trichoderma harzianum NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418'den elde edilerek HEK ile saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin saflığının ve alt birimlerinin varlığının/sayısının belirlenmesi için SDS ve NATIVE PAGE tekniği uygulanmış ve elde edilen jel görüntülerindeki protein bantlarının net bir şekilde gözlenebilmesi amacıyla jel görüntüleme sistemi (UVP) kullanılmıştır.

Trichoderma harzianum NRRL 13019'dan elde edilerek saflaştırılan enzimin SDS-PAGE/NATIVE-PAGE olmak üzere iki farklı elektroforez yöntemi ile saflığı ve alt birim varlığı/sayısı kontrol edilmiştir. β -ksilosidaz enziminin SDS PAGE'de yaklaşık 20 kDa bölgesinde tek bant verdiği ve NATIVE PAGE'de de 20 kDa bölgesinde tek bant verdiği görüntülenmiştir [Şekil 3.9 (a)-(b)]. Saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin 20 kDa büyüklüğünde tek bir protein yapısında olduğu saptanmıştır.



Şekil 3.9: *Trichoderma harzianum* NRRL 13019'dan saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin Poliakrilamid Jel Elektroferez görüntüleri (a): SDS-Poliakrilamid Jel Elektroferezi, (b): Native-Poliakrilamid Jel Elektroferezi.

Trichoderma viride NRRL 6418'den elde edilerek saflaştırılan enzimin SDS-PAGE/NATIVE-PAGE olmak üzere iki farklı elektroferez yöntemi ile saflığı ve alt birim varlığı/sayısı kontrol edilmiştir. β -ksilosidaz enziminin SDS PAGE'de yaklaşık 25 kDa bölgesinde tek bant verdiği ve NATIVE PAGE'de de 25 kDa bölgesinde tek bant verdiği görüntülenmiştir [Şekil 3.10 (a)-(b)]. Saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin 25 kDa büyüklüğünde tek bir protein yapısında olduğu saptanmıştır.



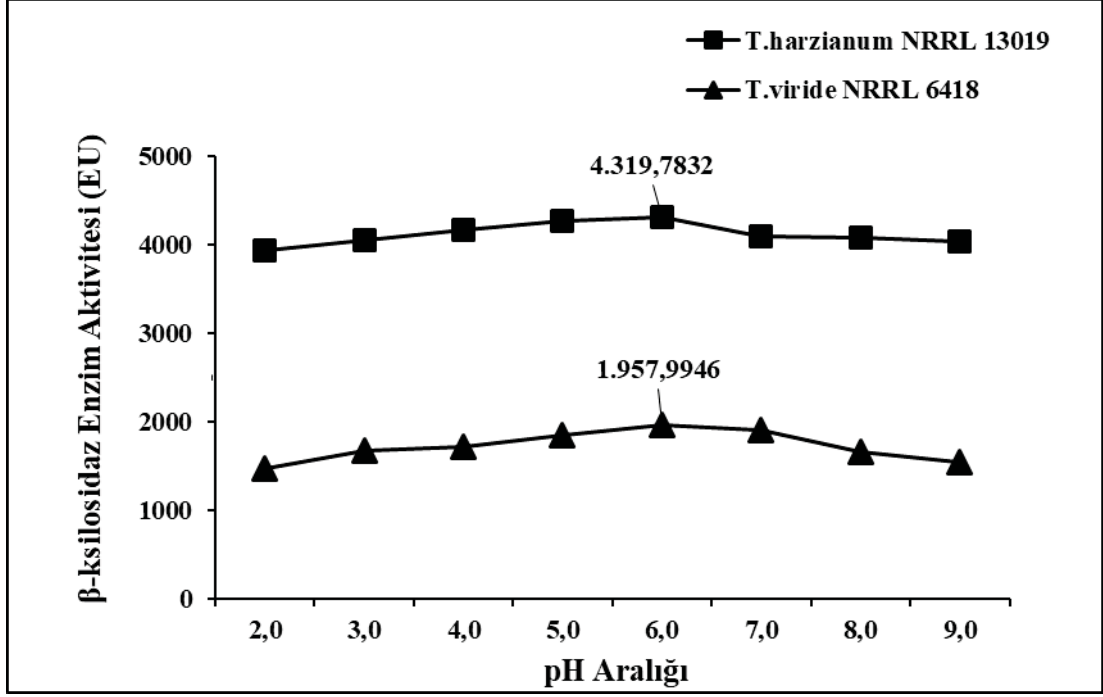
Şekil 3.10 : *Trichoderma viride* NRRL 6418'den saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin Poliakrilamid Jel Elektroferez görüntüleri (a): SDS-Poliakrilamid Jel Elektroferezi, (b): Native-Poliakrilamid Jel Elektroferezi.

3.7 Saflaştırılan β -Ksilosidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Belirlenen optimum inkübasyon koşullarında geliştirilen *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* 6418'den elde edilen kısmi saflaştırılmış enzimin HEK tekniğiyle saflaştırılması neticesinde açığa çıkan β -ksilosidaz enziminin biyokimyasal ve kinetik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla optimum pH, optimum sıcaklık ve termal kararlılıkları araştırılmış, K_M , V_{max} , IC_{50} , ve K_i değerleri ile inhibisyon tipleri tespit edilmiştir.

3.7.1 *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418'den Elde Edilerek Saflaştırılan β -Ksilosidaz Enzim Aktivitesine Farklı pH'ların Etkisi

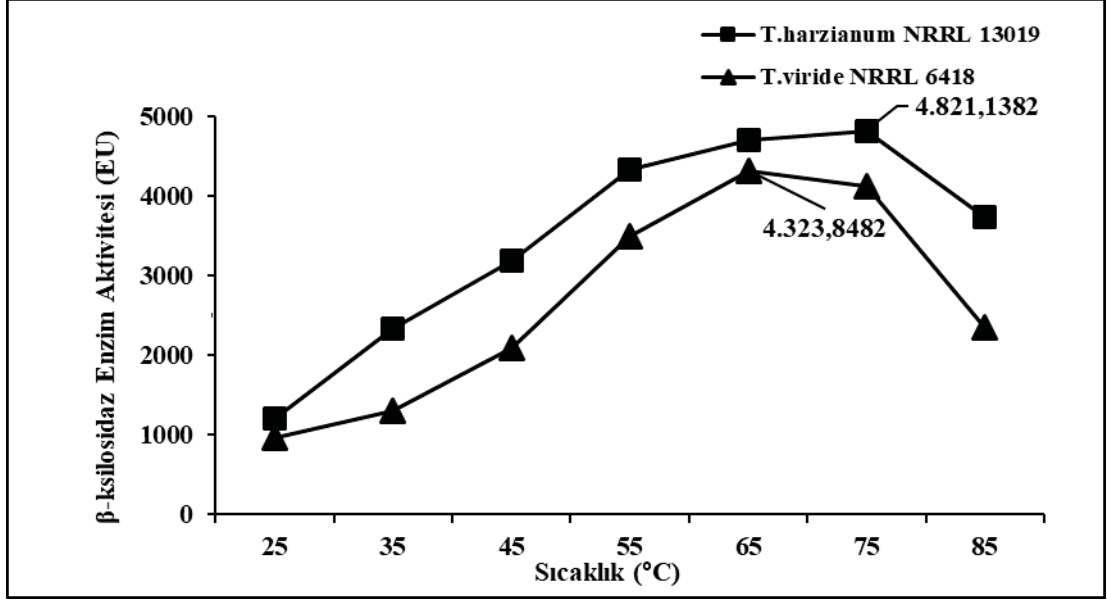
Trichoderma harzianum NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418'den belirlenen optimum koşullarda elde edilen kısmi saflaştırılmış enzimin HEK tekniği kullanılarak saflaştırılması neticesinde açığa çıkan β -ksilosidaz enziminin optimum pH değerinin belirlenmesi için; farklı pH değerinde tamponlar ve bu tampon özeltiiler kullanılarak hazırlanmış *p*NPX substratıyla, saf β -ksilosidaz enziminin aktivite ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen verilerden yararlanarak oluşturulan pH grafiği (şekil 3.11) izilmiştir. *Trichoderma harzianum* NRRL 13019'dan saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği pH değeri 6,0 (şekil 3.11); *Trichoderma viride* NRRL 6418'den elde edilen β -ksilosidaz enziminin de en yüksek aktivite gösterdiği pH değerini 6,0 (şekil 3.11) olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.11: *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418'den saflaştırılan β -ksilosidaz enzim aktivitesine farklı pH'ların etkisi.

3.7.2 *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418'den Elde Edilerek Saflaştırılan β -Ksilosidaz Enziminin Maksimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi

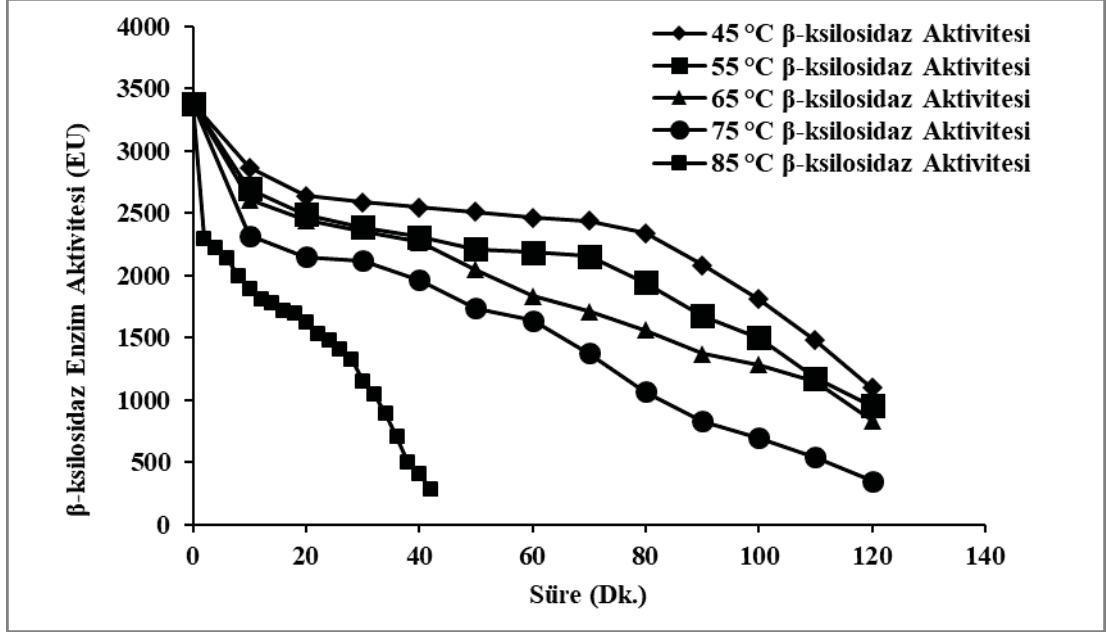
Trichoderma harzianum NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418'den belirlenen optimum koşullarda elde edilen kısmi saflaştırılmış enzimin HEK tekniği kullanılarak saflaştırılması sonucunda elde edilen β -ksilosidaz enziminin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerlerinin saptanması amacıyla farklı inkübasyon sıcaklıklarında β -ksilosidaz enzim aktiviteleri ölçülerek sıcaklık grafikleri çizilmiştir (Şekil 3.12). *Trichoderma harzianum* NRRL 13019'dan saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği inkübasyon sıcaklığı 75°C (Şekil 3.12); *Trichoderma viride* NRRL 6418'den elde edilen β -ksilosidaz enziminin de en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık değeri 65°C (Şekil 3.12) olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.12: *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418'den saflaştırılan β -ksilosidaz enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi.

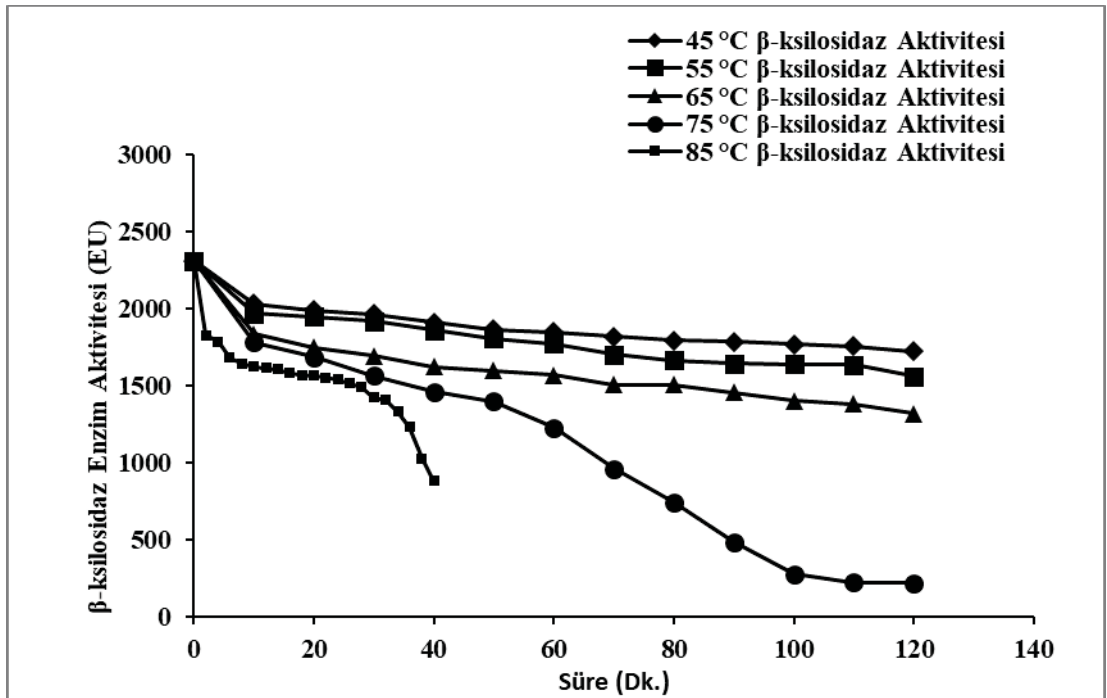
3.7.3 *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418'den Elde Edilerek Saflaştırılan β -Ksilosidaz Enziminin Termal Kararlılığının Belirlenmesi

Saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin termal kararlılığını belirlemek için; 5 farklı sıcaklıkta (45°C, 55°C, 65°C, 75°C ve 85°C) 120 dk. boyunca 10'ar dk. aralıklarla, 85°C sıcaklıkta ise 2'şer dk. aralıklarla β -ksilosidaz enzim aktivite ölçümleri yapılmış ve elde edilen sonuçlar kullanılarak *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418'den elde edilerek saflaştırılan β -ksilosidaz enzimlerine ait termal kararlılık grafikleri çizilmiştir (Şekil 3.13 ve 3.14).



Şekil 3.13: *Trichoderma harzianum* NRRL 13019'dan elde edilen saflaştırılmış β-ksilosidaz enziminin termal kararlılığı.

Trichoderma harzianum NRRL 13019'dan elde edilen β-ksilosidaz enziminin; 120 dakikalık inkübasyon sonunda 45°C'de %32 oranında, 55°C'de %28 oranında, 65°C'de %24 oranında ve 75°C'de %10 oranında aktivitesini koruduğu, termal kararlılık sıcaklığının ise 45°C olduğu ve 85°C'de enzimin aktivitesini 42 dk. koruduğu belirlenmiştir (Şekil 3.13).



Şekil 3.14: *Trichoderma viride* NRRL 6418'den elde edilen saflaştırılmış β-ksilosidaz enziminin termal kararlılığı.

Trichoderma viride NRRL 6418'den elde edilen β -ksilosidaz enziminin; 120 dk. inkübasyon sonrasında 45°C'de %74 oranında, 55°C'de %67 oranında, 65°C'de %57 oranında ve 75°C'de %9 oranında aktivitesini koruduğu, termal kararlılık sıcaklığının ise 45°C olduğu ve 85°C'de enzimin aktivitesini 40 dk. koruduğu belirlenmiştir (Şekil 3.14).

3.7.4 *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418'den Elde Edilerek Saflaştırılan β -Ksilosidaz Enziminin *p*NPX Substratına Karşı K_M ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi

Trichoderma harzianum NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418'den belirlenen optimum gelişme koşullarında elde edilen ve HEK ile saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin *p*NPX substratına olan ilgisi K_M ve V_{max} değerleri bulunarak tespit edilmiştir. Bu değerlerin belirlenmesi amacı ile *p*NPX substratının 5-70 μ l arasında değişen konsantrasyonlarında 410 nm dalga boyunda enzim aktivite ölçümleri yapılmıştır (Tablo 3.8; Tablo 3.9). Elde edilen aktivite değerleri ile reaksiyon hızları (V) EU/mL olarak hesaplanmıştır. Reaksiyon hızından yararlanılarak $1/[V]$ değeri ve kullanılan substratın konsantrasyonlarından $[S]$ yararlanılarak da $1/[S]$ değeri elde edilmiştir. Bulunan bu değerler kullanılarak Şekil 3.15 ve Şekil 3.16'daki Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir.

Trichoderma harzianum NRRL 13019'dan saflaştırılan β -ksilosidaz enzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiğinden (Şekil 3.15) elde edilen doğru denklemi kullanılarak β -ksilosidaz enziminin *p*NPX substratı için K_M değeri 0,25 mM ve V_{max} değeri 2500 EU olarak hesaplanmıştır (Tablo 3.10).

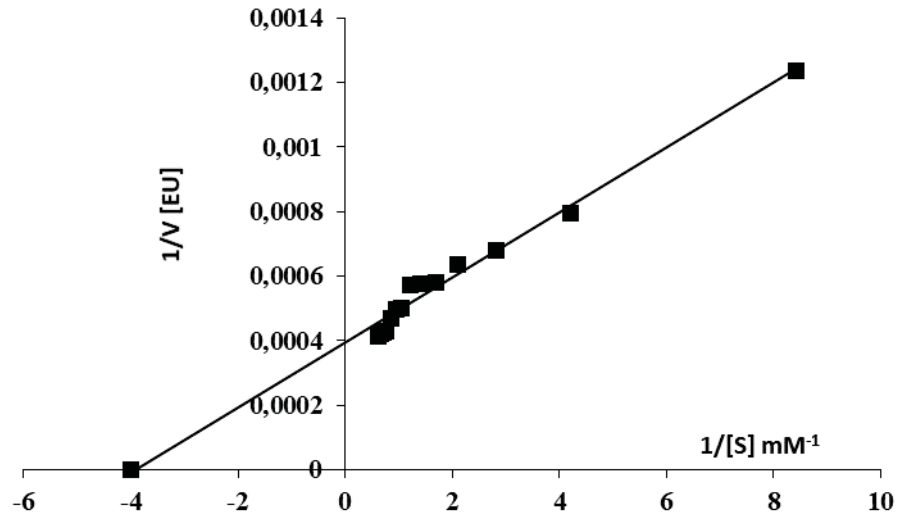
Trichoderma viride NRRL 6418'den saflaştırılan β -ksilosidaz enzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiğinden (Şekil 3.16) elde edilen doğru denklemi kullanılarak β -ksilosidaz enziminin *p*NPX substratı için K_M değeri 0,5 mM ve V_{max} değeri 2500 EU olarak hesaplanmıştır (Tablo 3.11).

Tablo 3.8: *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 β-ksilosidaz enziminin kinetik parametreleri.

| 50mM Sodyum Fosfat tamponu (µl) | Enzim Çözeltisinin Hacmi (µl) | Substrat Çözeltisinin Hacmi (µl) | Kuyudaki Toplam Hacim (µl) | Kuyudaki Substrat Konsantrasyonu [S] (mM) | ΔA (410 nm) | Aktivite (U/ml dk.) | 1/V | 1/[S] |
|---------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|----------------------------|---|-------------|---------------------|--------|--------|
| 65 | 70 | 5 | 210 | 0,1190 | 0,5960 | 807,5881 | 0,0012 | 8,4030 |
| 60 | | 10 | | 0,2380 | 0,9250 | 1.253,3875 | 0,0008 | 4,2010 |
| 55 | | 15 | | 0,3570 | 1,0830 | 1.467,4797 | 0,0007 | 2,8010 |
| 50 | | 20 | | 0,4760 | 1,1550 | 1.565,0407 | 0,0006 | 2,1000 |
| 45 | | 25 | | 0,5950 | 1,2680 | 1.718,1572 | 0,0006 | 1,6800 |
| 40 | | 30 | | 0,7140 | 1,2750 | 1.727,6423 | 0,0006 | 1,4000 |
| 35 | | 35 | | 0,8330 | 1,2880 | 1.745,2575 | 0,0006 | 1,2000 |
| 30 | | 40 | | 0,9520 | 1,4640 | 1.983,7398 | 0,0005 | 1,0500 |
| 25 | | 45 | | 1,0710 | 1,4810 | 2.006,7751 | 0,0005 | 0,9330 |
| 20 | | 50 | | 1,190 | 1,5730 | 2.131,4363 | 0,0005 | 0,8400 |
| 15 | | 55 | | 1,3090 | 1,7110 | 2.318,4282 | 0,0004 | 0,7630 |
| 10 | | 60 | | 1,4280 | 1,7240 | 2.336,0434 | 0,0004 | 0,7000 |
| 5 | | 65 | | 1,5470 | 1,7460 | 2.365,8537 | 0,0004 | 0,6460 |
| - | | 70 | | 1,660 | 1,7840 | 2.417,3442 | 0,0004 | 0,6000 |

Tablo 3.9: *Trichoderma viride* NRRL 6418 β -ksilosidaz enziminin kinetik parametreleri.

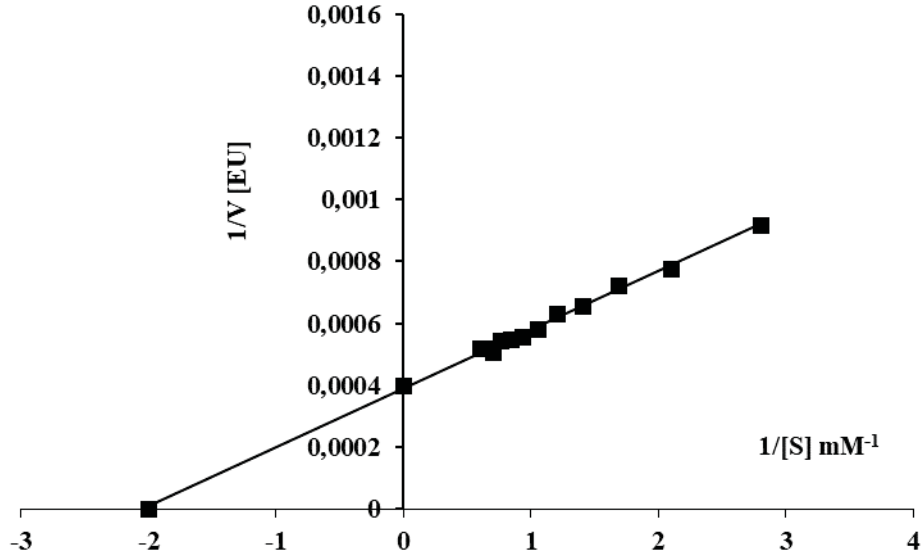
| 50mM Sodyum Fosfat tamponu (μ l) | Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l) | Substrat Çözeltisinin Hacmi (μ l) | Kuyudaki Toplam Hacim (μ l) | Kuyudaki Substrat Konsantrasyonu [S] (mM) | A (410 nm) | Aktivite (U/ml dk.) | 1/V | 1/[S] |
|---------------------------------------|-------------------------------------|--|----------------------------------|---|------------|---------------------|--------|--------|
| 65 | 70 | 5 | 210 | 0,1190 | 0,4570 | 619,2412 | 0,0016 | 8,4030 |
| 60 | | 10 | | 0,2380 | 0,6610 | 895,6640 | 0,0011 | 4,2010 |
| 55 | | 15 | | 0,3570 | 0,8030 | 1.088,0759 | 0,0009 | 2,8010 |
| 50 | | 20 | | 0,4760 | 0,9480 | 1.284,5528 | 0,0008 | 2,1000 |
| 45 | | 25 | | 0,5950 | 1,0220 | 1.384,8238 | 0,0007 | 1,6800 |
| 40 | | 30 | | 0,7140 | 1,1270 | 1.527,1003 | 0,0007 | 1,4000 |
| 35 | | 35 | | 0,8330 | 1,1700 | 1.585,3659 | 0,0006 | 1,2000 |
| 30 | | 40 | | 0,9520 | 1,2710 | 1.722,2222 | 0,0006 | 1,0500 |
| 25 | | 45 | | 1,0710 | 1,3260 | 1.796,7480 | 0,0006 | 0,9330 |
| 20 | | 50 | | 1,190 | 1,3450 | 1.822,4932 | 0,0005 | 0,8400 |
| 15 | | 55 | | 1,3090 | 1,3600 | 1.842,8184 | 0,0005 | 0,7630 |
| 10 | | 60 | | 1,4280 | 1,4580 | 1.975,6098 | 0,0005 | 0,7000 |
| 5 | | 65 | | 1,5470 | 1,4200 | 1.924,1192 | 0,0005 | 0,6460 |
| - | | 70 | | 1,1660 | 1,4170 | 1.920,0542 | 0,0005 | 0,6000 |



Şekil 3.15: *Trichoderma harzianum* NRRL 13019'dan saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin K_M ve V_{max} değerlerini gösteren Lineweaver-Burk grafiği.

Tablo 3.10: *Trichoderma harzianum* NRRL 13019'dan saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin K_M , V_{max} ve V_{max}/K_M değerleri.

| Substrat | K_M (mM) | V_{max} (EU) | V_{max}/K_M |
|--------------|------------|----------------|---------------|
| <i>p</i> NPX | 0,25 | 2500 | 10.000 |



Şekil 3.16: *Trichoderma viride* NRRL 6418'den saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin K_M ve V_{max} değerlerini gösteren Lineweaver-Burk grafiği.

Tablo 3.11: *Trichoderma viride* NRRL 6418'den saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin K_M , V_{max} ve V_{max}/K_M değerleri.

| Substrat | K_M (mM) | V_{max} (EU) | V_{max}/K_M |
|--------------|---------------|-------------------|---------------|
| <i>p</i> NPX | 0,5 | 2500 | 5.000 |

3.7.5 *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418'den Saflaştırılan β -Ksilosidaz Enziminin İnhibitörü Olan D-(+)-Ksilozun IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi

β -ksilosidaz enzimiyle ilgili olarak yapılan literatür araştırmalarında karşımıza çıkan inhibitörler arasında yer alan D-(+)-ksilozunun β -ksilosidaz enzimi üzerine etkisi substrat olarak kullanılan *p*NPX varlığında araştırılmıştır (Tablo 3.12; Tablo 3.13).

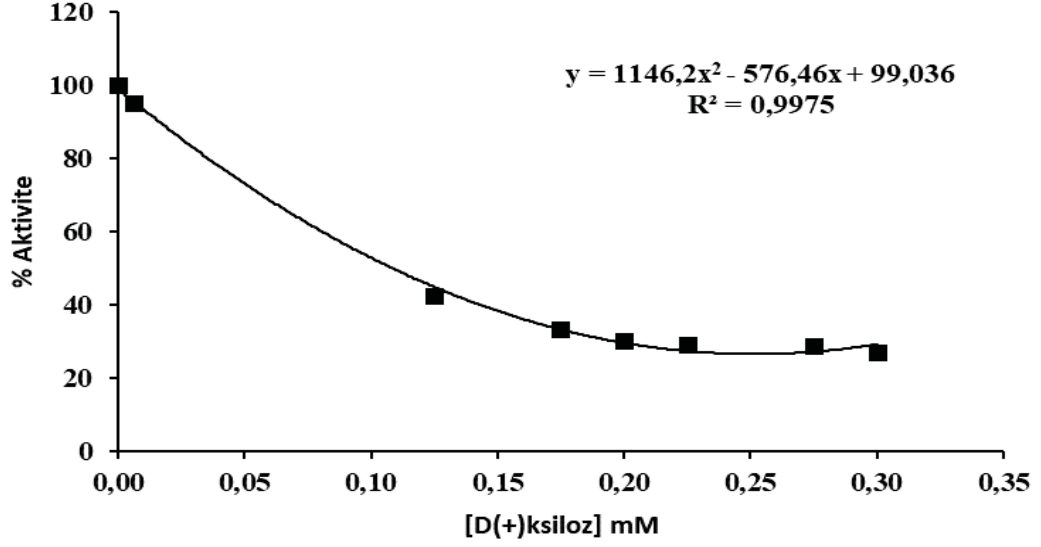
D-(+)-ksilozun IC_{50} değerlerini bulmak için, *p*NPX substratının reaksiyon hacminde 1,25 mM konsantrasyonu çalışılmış D-(+)-ksilozun olmadığı ortamdaki enzim aktivitesi % 100 aktivite olarak alınmıştır. D-(+)-ksilozun IC_{50} değeri belirlenirken; 1-60 μ l arasında değişen inhibitör konsantrasyonlarda enzim aktivite değerleri ölçülmüş elde edilen bu değerlerden % aktivite hesaplanarak % aktivite-inhibitör konsantrasyonu [I] grafikleri çizilmiştir (Şekil 3.17; Şekil 3.18).

Tablo 3.12: *Trichoderma harzianum* NRRL 13019' dan saflaştırılan β -ksilozidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren D-(+)-ksilozun, IC₅₀ değerinin hesaplanmasında kullanılan veriler.

| 50mM Sodyum Fosfat Tamponu (μ l) | Inhibitör | Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l) | Substrat Çözeltisinin Hacmi (μ l) | Inhibitör Çözeltisinin Hacmi (μ l) | Kuyudaki İnhibitör Konsantrasyonu (mM) (*10000) | Δ A (410 nm) | Aktivite (U/mL dk.) | % Aktivite |
|---------------------------------------|--------------|-------------------------------------|--|---|---|---------------------|---------------------|------------|
| 60 | | | | - | - | 1,5720 | 2.130,0813 | 100 |
| 59 | | | | 1 | 0,4464 | 1,4950 | 2.025,7453 | 95,1018 |
| 59 | | | | 1 | 0,8929 | 1,3120 | 1.777,7778 | 83,4606 |
| 59 | | | | 1 | 1,7857 | 1,1640 | 1.577,2358 | 74,0458 |
| 59 | | | | 1 | 3,5714 | 1,0390 | 1.407,8591 | 66,0941 |
| 58 | | | | 3 | 8,9286 | 0,8410 | 1.139,5664 | 53,4987 |
| 55 | | | | 5 | 17,8571 | 0,9410 | 1.275,0678 | 59,8601 |
| 53 | | | | 8 | 26,7857 | 0,8710 | 1.180,2168 | 55,4071 |
| 50 | | | | 10 | 35,7143 | 0,8210 | 1.112,4661 | 52,2265 |
| 45 | D-(+)-ksiloz | 70 | 70 | 15 | 53,5714 | 0,7520 | 1.018,9702 | 47,8372 |
| 40 | | | | 20 | 71,4286 | 0,7070 | 957,9946 | 44,9746 |
| 35 | | | | 25 | 89,2857 | 0,6690 | 906,5041 | 42,5573 |
| 30 | | | | 30 | 107,1429 | 0,6390 | 865,8537 | 40,6489 |
| 25 | | | | 35 | 125,0000 | 0,5250 | 711,3821 | 33,3969 |
| 20 | | | | 40 | 142,8571 | 0,4720 | 639,5664 | 30,0254 |
| 15 | | | | 45 | 160,7143 | 0,4570 | 619,2412 | 29,0712 |
| 10 | | | | 50 | 178,5714 | 0,5360 | 726,2873 | 34,0967 |
| 5 | | | | 55 | 196,4286 | 0,4530 | 613,8211 | 28,8168 |
| - | | | | 60 | 214,2857 | 0,4260 | 577,2358 | 27,0992 |

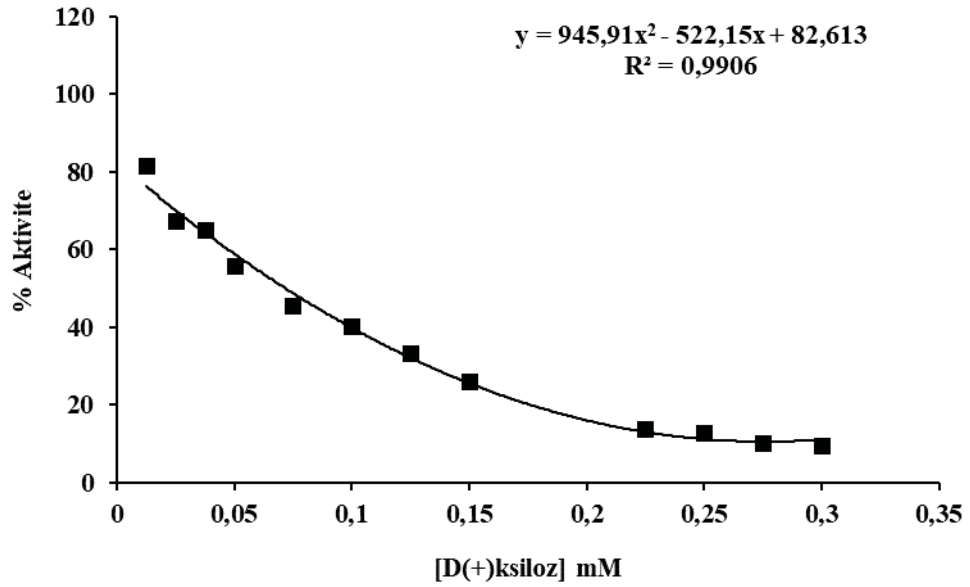
Tablo 3.13: *Trichoderma viride* NRRL 6418'den saflaştırılan β -ksilozidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren D-(+)-ksilozun, IC₅₀ değerinin hesaplanmasında kullanılan veriler.

| 50mM Sodyum Fosfat Tamponu (μ l) | İnhibitör | Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l) | Substrat Çözeltisinin Hacmi (μ l) | Inhibitör Çözeltisinin Hacmi (μ l) | Kuyudaki İnhibitör Konsantrasyonu (mM) (*10000) | ΔA (410 nm) | Aktivite (U/mL dk.) | % Aktivite |
|---------------------------------------|--------------|-------------------------------------|--|---|---|---------------------|---------------------|------------|
| 60 | | | | - | - | 0,9320 | 1.262,8726 | 100 |
| 59 | | | | 1 | 0,4464 | 0,8930 | 1.210,0271 | 95,8155 |
| 59 | | | | 1 | 0,8929 | 0,8660 | 1.173,4417 | 92,9185 |
| 59 | | | | 1 | 1,7857 | 0,8470 | 1.147,6965 | 90,8798 |
| 59 | | | | 1 | 3,5714 | 0,8270 | 1.120,5962 | 88,7339 |
| 58 | | | | 3 | 8,9286 | 0,7600 | 1.029,8103 | 81,5451 |
| 55 | | | | 5 | 17,8571 | 0,6270 | 849,5935 | 67,2747 |
| 53 | | | | 8 | 26,7857 | 0,6060 | 821,1382 | 65,0215 |
| 50 | | | | 10 | 35,7143 | 0,5200 | 704,6070 | 55,7940 |
| 45 | D-(+)-ksiloz | 70 | 70 | 15 | 53,5714 | 0,4260 | 577,2358 | 45,7082 |
| 40 | | | | 20 | 71,4286 | 0,3760 | 509,4851 | 40,3433 |
| 35 | | | | 25 | 89,2857 | 0,3110 | 421,4092 | 33,3691 |
| 30 | | | | 30 | 107,1429 | 0,2440 | 330,6233 | 26,1803 |
| 25 | | | | 35 | 125,0000 | 0,2270 | 307,5881 | 24,3562 |
| 20 | | | | 40 | 142,8571 | 0,1850 | 250,6775 | 19,8498 |
| 15 | | | | 45 | 160,7143 | 0,1300 | 176,1518 | 13,9485 |
| 10 | | | | 50 | 178,5714 | 0,1190 | 161,2466 | 12,7682 |
| 5 | | | | 55 | 196,4286 | 0,0960 | 130,0813 | 10,3004 |
| - | | | | 60 | 214,2857 | 0,0890 | 120,5962 | 9,5494 |



Şekil 3.17: *Trichoderma harzianum* NRRL 13019'dan saflaştırılan β -ksilosidaz enzim inhibitörü olan D-(+)-ksiloza ait IC₅₀ grafiği.

Tablo 3.12'de yer alan veriler kullanılarak çizilen inhibitör konsantrasyonu [I]-Aktivite grafiğinden (Şekil 3.17) elde edilen denklem kullanılarak *Trichoderma harzianum* NRRL 13019'dan elde edilerek saflaştırılan β -ksilosidaz enzim aktivitesi üzerine D-(+)-ksilozun IC₅₀ değeri 0,11 mM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.18: *Trichoderma viride* NRRL 6418'den saflaştırılan β -ksilosidaz enzim inhibitörü olan D-(+)-ksiloza ait IC₅₀ grafiği.

Tablo 3.13’de yer alan veriler kullanılarak çizilen inhibitör konsantrasyonu [I]-Aktivite grafiğinden (Şekil 3.18) elde edilen denklem kullanılarak *Trichoderma viride* NRRL 6418’den elde edilerek saflaştırılan β -ksilosidaz enzim aktivitesi üzerine D-(+)-ksilozun IC₅₀ değeri 0,071 mM olarak hesaplanmıştır.

3.7.6 *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418’den Saflaştırılan β -Ksilosidaz Enziminin İnhibitörü Olan D-(+)-Ksilozun İnhibisyon Tipinin ve K_i Değerlerinin Belirlenmesi

Trichoderma harzianum NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418’den elde edilerek saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin D-(+)-ksiloz inhibitörüne karşı K_i sabitlerinin belirlenebilmesi için, ilk önce reaksiyon ortamında inhibitörün olmadığı 14 farklı pNPX substrat konsantrasyonuna bağlı olarak enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Daha sonra 0,0017 mM ve 0,0053 mM sabit D-(+)-ksiloz konsantrasyonlarında aktiviteler ölçülmüştür (Tablo 3.14; Tablo 3.15). Ölçülen bu değerlerden 1/V ve 1/[S] değerleri hesaplanarak Lineweaver–Burk grafiğindeki I₀, I₁ ve I₂ doğruları çizilmiştir (Şekil 3.19; Şekil 3.20). Bu grafikten yararlanılarak K_i değerleri ile inhibisyon tipleri belirlenmiştir.

Tablo 3.14: *Trichoderma harzianum* NRRL 13019'dan saflaştırılan β -ksilozidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren D-(+)-ksilozun K_i değerinin hesaplanmasında kullanılan veriler.

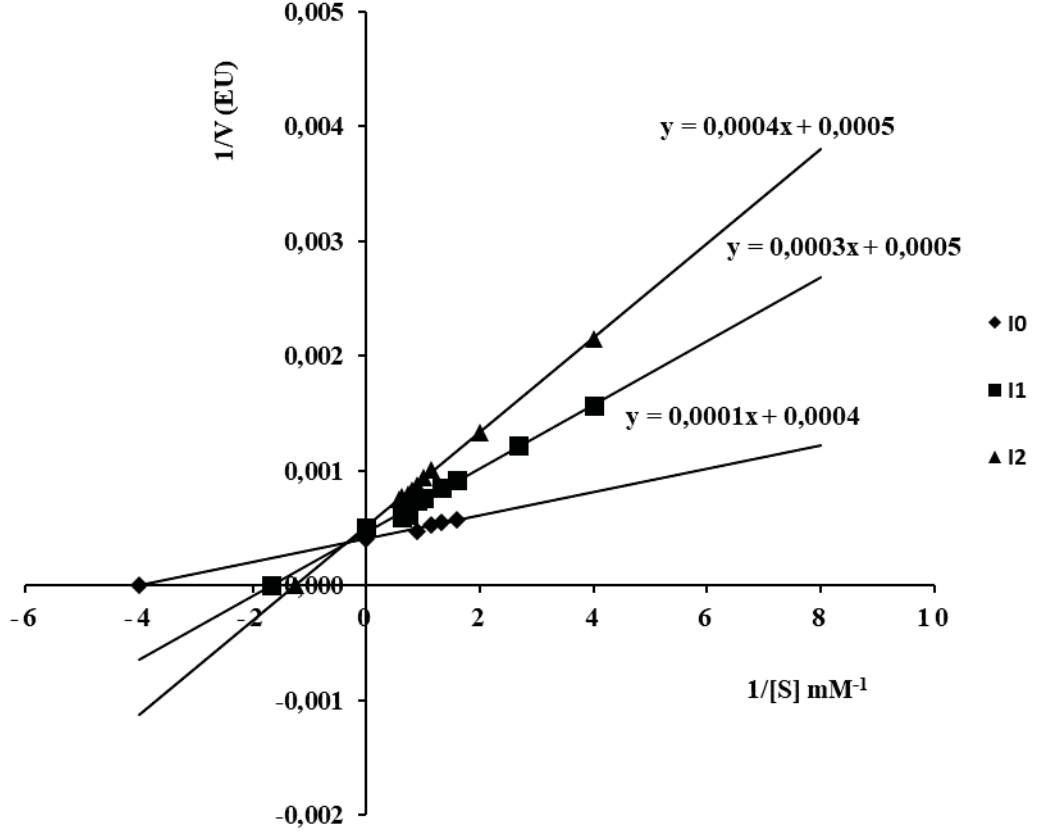
| 50mM Sodyum Fosfat Tamponu (μ l) | Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l) | Substrat Çözeltisinin Hacmi (μ l) | İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (μ l) | Kuyudaki Toplam Hacim (μ l) | Kuyudaki Substrat Konsantrasyonu [S] (mM) | Kuyudaki İnhibitör Konsantrasyonu [I] (mM) | ΔA (410nm) | Aktivite (U/mL dk.) | 1/V | 1/[S] |
|---------------------------------------|-------------------------------------|--|---|----------------------------------|---|--|--------------------|---------------------|--------|--------|
| 125 | 70 | 5 | 0 | 280 | 0,1250 | 0 | 0,5650 | 765,5827 | 0,0013 | 8,0000 |
| 120 | | 10 | | | 0,2500 | | 0,7610 | 1.031,1653 | 0,0010 | 4,0000 |
| 115 | | 15 | | | 0,3750 | | 0,9760 | 1.322,4932 | 0,0008 | 2,6667 |
| 110 | | 20 | | | 0,5000 | | 1,1110 | 1.505,4201 | 0,0007 | 2,0000 |
| 105 | | 25 | | | 0,6250 | | 1,2830 | 1.738,4824 | 0,0006 | 1,6000 |
| 100 | | 30 | | | 0,7500 | | 1,3440 | 1.821,1382 | 0,0005 | 1,3333 |
| 95 | | 35 | | | 0,8750 | | 1,4070 | 1.906,5041 | 0,0005 | 1,1429 |
| 90 | | 40 | | | 1,0000 | | 1,6200 | 2.195,1220 | 0,0005 | 1,0000 |
| 85 | | 45 | | | 1,1250 | | 1,5490 | 2.098,9160 | 0,0005 | 0,8889 |
| 80 | | 50 | | | 1,2500 | | 1,6590 | 2.247,9675 | 0,0004 | 0,8000 |
| 75 | | 55 | | | 1,3750 | | 1,6920 | 2.292,6829 | 0,0004 | 0,7273 |
| 70 | | 60 | | | 1,5000 | | 1,7820 | 2.414,6341 | 0,0004 | 0,6667 |
| 65 | | 65 | | | 1,6250 | | 1,6140 | 2.186,9919 | 0,0005 | 0,6154 |
| 60 | | 70 | | | 1,7500 | | 1,5300 | 2.073,1707 | 0,0005 | 0,5714 |

Tablo 3.14: (Devam)

| 50mM Sodyum Fosfat Tamponu (µl) | Enzim Çözeltisinin Hacmi (µl) | Substrat Çözeltisinin Hacmi (µl) | İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (µl) | Kuyudaki Toplam Hacim (µl) | Kuyudaki Substrat Konsantrasyonu [S] (mM) | Kuyudaki İnhibitör Konsantrasyonu [I] (mM) | ΔA (410nm) | Aktivite (U/mL dk.) | 1/V | 1/[S] |
|---------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|---|--|------------|---------------------|--------|--------|
| 120 | 70 | 5 | 5 | 280 | 0,1250 | 0,0017 | 0,2640 | 357,7236 | 0,0028 | 8,0000 |
| 115 | | 10 | | | 0,2500 | | 0,4710 | 638,2114 | 0,0016 | 4,0000 |
| 110 | | 15 | | | 0,3750 | | 0,6060 | 821,1382 | 0,0012 | 2,6667 |
| 105 | | 20 | | | 0,5000 | | 0,6830 | 925,4743 | 0,0011 | 2,0000 |
| 100 | | 25 | | | 0,6250 | | 0,8000 | 1.084,0108 | 0,0009 | 1,6000 |
| 95 | | 30 | | | 0,7500 | | 0,8640 | 1.170,7317 | 0,0009 | 1,3333 |
| 90 | | 35 | | | 0,8750 | | 0,9990 | 1.353,6585 | 0,0007 | 1,1429 |
| 85 | | 40 | | | 1,0000 | | 0,9630 | 1.304,8780 | 0,0008 | 1,0000 |
| 80 | | 45 | | | 1,1250 | | 0,9990 | 1.353,6585 | 0,0007 | 0,8889 |
| 75 | | 50 | | | 1,2500 | | 1,1840 | 1.604,3360 | 0,0006 | 0,8000 |
| 70 | | 55 | | | 1,3750 | | 1,1890 | 1.611,1111 | 0,0006 | 0,7273 |
| 65 | | 60 | | | 1,5000 | | 1,3100 | 1.775,0678 | 0,0006 | 0,6667 |
| 60 | | 65 | | | 1,6250 | | 1,2340 | 1.672,0867 | 0,0006 | 0,6154 |
| 55 | | 70 | | | 1,7500 | | 1,1050 | 1.497,2900 | 0,0007 | 0,5714 |

Tablo 3.14: (Devam)

| 50mM Sodyum Fosfat Tamponu (µl) | Enzim Çözeltisinin Hacmi (µl) | Substrat Çözeltisinin Hacmi (µl) | İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (µl) | Kuyudaki Toplam Hacim (µl) | Kuyudaki Substrat Konsantrasyonu [S] (mM) | Kuyudaki İnhibitör Konsantrasyonu [I] (mM) | ΔA (410nm) | Aktivite (U/mL.dk.) | 1/V | 1/[S] |
|---------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|---|--|------------|---------------------|--------|--------|
| 110 | 70 | 5 | 15 | 280 | 0,1250 | 0,0053 | 0,1980 | 268,2927 | 0,0037 | 8,0000 |
| 105 | | 10 | | | 0,2500 | | 0,3430 | 464,7696 | 0,0022 | 4,0000 |
| 100 | | 15 | | | 0,3750 | | 0,4470 | 605,6911 | 0,0017 | 2,6667 |
| 95 | | 20 | | | 0,5000 | | 0,5540 | 750,6775 | 0,0013 | 2,0000 |
| 90 | | 25 | | | 0,6250 | | 0,6480 | 878,0488 | 0,0011 | 1,6000 |
| 85 | | 30 | | | 0,7500 | | 0,6980 | 945,7995 | 0,0011 | 1,3333 |
| 80 | | 35 | | | 0,8750 | | 0,7310 | 990,5149 | 0,0010 | 1,1429 |
| 75 | | 40 | | | 1,0000 | | 0,7830 | 1.060,9756 | 0,0009 | 1,0000 |
| 70 | | 45 | | | 1,1250 | | 0,8480 | 1.149,0515 | 0,0009 | 0,8889 |
| 65 | | 50 | | | 1,2500 | | 0,8920 | 1.208,6721 | 0,0008 | 0,8000 |
| 60 | | 55 | | | 1,3750 | | 0,9300 | 1.260,1626 | 0,0008 | 0,7273 |
| 55 | | 60 | | | 1,5000 | | 1,0020 | 1.357,7236 | 0,0007 | 0,6667 |
| 50 | | 65 | | | 1,6250 | | 0,9570 | 1.296,7480 | 0,0008 | 0,6154 |
| 45 | | 70 | | | 1,7500 | | 0,9810 | 1.329,2683 | 0,0008 | 0,5714 |



Şekil 3.19: Lineweaver-Burk grafiği üzerinde *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 β -kcsilosidaz enzimine D-(+)-kcsilozun farklı konsantrasyonlarının inhibisyon etkisi.

Şekil 3.19'daki Lineweaver-Burk grafiğinden, D-(+)-kcsilozun *Trichoderma harzianum* NRRL 13019'dan elde edilerek saflaştırılan β -kcsilosidaz enziminin, pNPX substratı varlığında, karışık tipte inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. D-(+)-kcsilozun $[I_1]=0,0017$ mM ve $[I_2]=0,0053$ mM olarak iki farklı konsantrasyonundaki aktiviteleri ölçülmüş, ölçülen aktiviteler kullanılarak çizilen grafikten (Şekil 3.19) 0,00110 ve 0,00557 olmak üzere iki ayrı K_i değeri hesaplanmıştır.

Tablo 3.15: *Trichoderma viride* NRRL 6418'den saflaştırılan β -ksilozidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren D-(+)-ksilozun K_i değerinin hesaplanmasında kullanılan veriler.

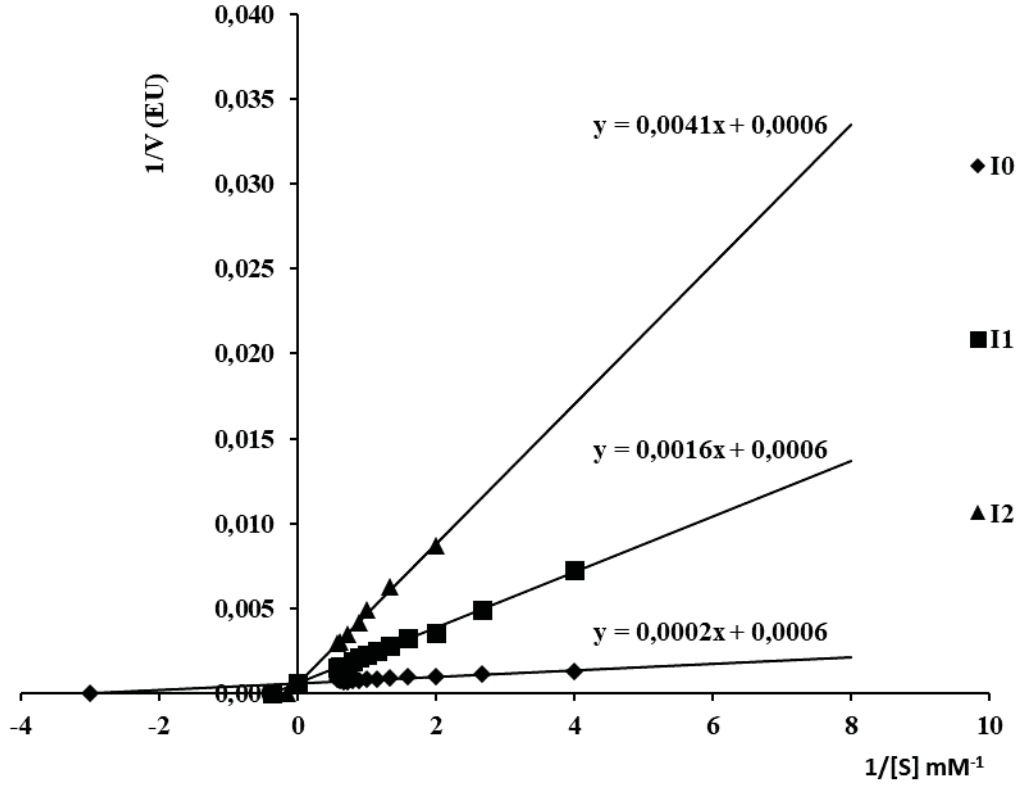
| 50mM Sodyum Fosfat Tamponu (μ l) | Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l) | Substrat Çözeltisinin Hacmi (μ l) | İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (μ l) | Kuyudaki Toplam Hacim (μ l) | Kuyudaki Substrat Konsantrasyonu [S] (mM) | Kuyudaki İnhibitör Konsantrasyonu [I] (mM) | ΔA (410nm) | Aktivite (U/mL dk.) | 1/V | 1/[S] |
|---------------------------------------|-------------------------------------|--|---|----------------------------------|---|--|--------------------|---------------------|--------|--------|
| 125 | 70 | 5 | 0 | 280 | 0,1250 | 0 | 0,4480 | 607,0461 | 0,0016 | 8,0000 |
| 120 | | 10 | | | 0,2500 | | 0,5660 | 766,9377 | 0,0013 | 4,0000 |
| 115 | | 15 | | | 0,3750 | | 0,6480 | 878,0488 | 0,0011 | 2,6667 |
| 110 | | 20 | | | 0,5000 | | 0,7190 | 974,2547 | 0,0010 | 2,0000 |
| 105 | | 25 | | | 0,6250 | | 0,7660 | 1.037,9404 | 0,0010 | 1,6000 |
| 100 | | 30 | | | 0,7500 | | 0,8190 | 1.109,7561 | 0,0009 | 1,3333 |
| 95 | | 35 | | | 0,8750 | | 0,8470 | 1.147,6965 | 0,0009 | 1,1429 |
| 90 | | 40 | | | 1,0000 | | 0,8780 | 1.189,7019 | 0,0008 | 1,0000 |
| 85 | | 45 | | | 1,1250 | | 0,9360 | 1.268,2927 | 0,0008 | 0,8889 |
| 80 | | 50 | | | 1,2500 | | 0,9600 | 1.300,8130 | 0,0008 | 0,8000 |
| 75 | | 55 | | | 1,3750 | | 1,0320 | 1.398,3740 | 0,0007 | 0,7273 |
| 70 | | 60 | | | 1,5000 | | 1,1240 | 1.523,0352 | 0,0007 | 0,6667 |
| 65 | | 65 | | | 1,6250 | | 0,9990 | 1.353,6585 | 0,0007 | 0,6154 |
| 60 | | 70 | | | 1,7500 | | 0,9070 | 1.228,9973 | 0,0008 | 0,5714 |

Tablo 3.15: (Devam)

| 50mM Sodyum Fosfat Tamponu (µl) | Enzim Çözeltisinin Hacmi (µl) | Substrat Çözeltisinin Hacmi (µl) | İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (µl) | Kuyudaki Toplam Hacim (µl) | Kuyudaki Substrat Konsantrasyonu [S] (mM) | Kuyudaki İnhibitör Konsantrasyonu [I] (mM) | ΔA (410nm) | Aktivite (U/mL dk.) | 1/V | 1/[S] |
|---------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|---|--|------------|---------------------|--------|--------|
| 120 | 70 | 5 | 5 | 280 | 0,1250 | 0,0017 | 0,0550 | 74,5257 | 0,0134 | 8,0000 |
| 115 | | 10 | | | 0,2500 | | 0,1020 | 138,2114 | 0,0072 | 4,0000 |
| 110 | | 15 | | | 0,3750 | | 0,1500 | 203,2520 | 0,0049 | 2,6667 |
| 105 | | 20 | | | 0,5000 | | 0,2080 | 281,8428 | 0,0035 | 2,0000 |
| 100 | | 25 | | | 0,6250 | | 0,2270 | 307,5881 | 0,0033 | 1,6000 |
| 95 | | 30 | | | 0,7500 | | 0,2600 | 352,3035 | 0,0028 | 1,3333 |
| 90 | | 35 | | | 0,8750 | | 0,2930 | 397,0190 | 0,0025 | 1,1429 |
| 85 | | 40 | | | 1,0000 | | 0,3260 | 441,7344 | 0,0023 | 1,0000 |
| 80 | | 45 | | | 1,1250 | | 0,3470 | 470,1897 | 0,0021 | 0,8889 |
| 75 | | 50 | | | 1,2500 | | 0,3820 | 517,6152 | 0,0019 | 0,8000 |
| 70 | | 55 | | | 1,3750 | | 0,4520 | 612,4661 | 0,0016 | 0,7273 |
| 65 | | 60 | | | 1,5000 | | 0,4560 | 617,8862 | 0,0016 | 0,6667 |
| 60 | | 65 | | | 1,6250 | | 0,4680 | 634,1463 | 0,0016 | 0,6154 |
| 55 | | 70 | | | 1,7500 | | 0,4750 | 643,6314 | 0,0016 | 0,5714 |

Tablo 3.15: (Devam)

| 50mM Sodyum Fosfat Tamponu (µl) | Enzim Çözeltisinin Hacmi (µl) | Substrat Çözeltisinin Hacmi (µl) | İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (µl) | Kuyudaki Toplam Hacim (µl) | Kuyudaki Substrat Konsantrasyonu [S] (mM) | Kuyudaki İnhibitör Konsantrasyonu [I] (mM) | ΔA (410nm) | Aktivite (U/mL dk.) | 1/V | 1/[S] |
|---------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|---|--|------------|---------------------|--------|--------|
| 110 | 70 | 5 | 15 | 280 | 0,1250 | 0,0053 | 0,0310 | 42,0054 | 0,0238 | 8,0000 |
| 105 | | 10 | | | 0,2500 | | 0,0550 | 74,5257 | 0,0134 | 4,0000 |
| 100 | | 15 | | | 0,3750 | | 0,0740 | 100,2710 | 0,0100 | 2,6667 |
| 95 | | 20 | | | 0,5000 | | 0,0850 | 115,1762 | 0,0087 | 2,0000 |
| 90 | | 25 | | | 0,6250 | | 0,1230 | 166,6667 | 0,0060 | 1,6000 |
| 85 | | 30 | | | 0,7500 | | 0,1180 | 159,8916 | 0,0063 | 1,3333 |
| 80 | | 35 | | | 0,8750 | | 0,1590 | 215,4472 | 0,0046 | 1,1429 |
| 75 | | 40 | | | 1,0000 | | 0,1510 | 204,6070 | 0,0049 | 1,0000 |
| 70 | | 45 | | | 1,1250 | | 0,1770 | 239,8374 | 0,0042 | 0,8889 |
| 65 | | 50 | | | 1,2500 | | 0,1990 | 269,6477 | 0,0037 | 0,8000 |
| 60 | | 55 | | | 1,3750 | | 0,2110 | 285,9079 | 0,0035 | 0,7273 |
| 55 | | 60 | | | 1,5000 | | 0,2440 | 330,6233 | 0,0030 | 0,6667 |
| 50 | | 65 | | | 1,6250 | | 0,2450 | 331,9783 | 0,0030 | 0,6154 |
| 45 | | 70 | | | 1,7500 | | 0,2510 | 340,1084 | 0,0029 | 0,5714 |



Şekil 3.20: Lineweaver-Burk grafiği üzerinde *Trichoderma viride* NRRL 6418 β-ksilozidaz enzimine D-(+)-ksilozun farklı konsantrasyonlarının inhibisyon etkisi.

Şekil 3.20'deki Lineweaver-Burk grafiğinden, D-(+)-ksilozun *Trichoderma viride* NRRL 6418'den elde edilerek saflaştırılan β-ksilozidaz enziminin, pNPX substratı varlığında, yarışmalı (kompetative) tipte inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. D-(+)-ksilozun [I1]=0,0017 mM ve [I2]=0,0053 mM olarak iki farklı konsantrasyonundaki aktiviteleri ölçülmüş, ölçülen aktiviteler kullanılarak çizilen grafikten (Şekil 3.20) K_i değeri $0,000264 \pm 0,00001$ olarak hesaplanmıştır.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Enzim teknolojisindeki gelişmeler, oluşan ürünlerin kullanım alanının çeşitliliği ve ekonomik öneminin yüksek oluşu gibi sebeplerden dolayı özellikle endüstriyel enzimlerle ilgili yapılan araştırmaların önemini artırmaktadır.

Çalışmamızda, doğada oldukça geniş bir yayılışa sahip, hızlı şekilde gelişen filamentli bir fungus olan ve toprak mikroflorasının baskın üyeleri olma özelliğindeki *Trichoderma* cinsine ait *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418 türleri enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418'den KSF tekniği ile buğday kepeğinin substrat olarak kullanılmasıyla elde edilen β -ksilosidaz enzimi saflaştırılarak enzime ait biyokimyasal, elektroforetik ve kinetik özellikler belirlenmiştir.

β -ksilosidaz enziminin saflaştırma işlemi sırasıyla, amonyum sülfat çöktürmesi ve laboratuvarımızda sentezlediğimiz Sepharose-4B-L-Tirozin-1-Naftilamin'in kullanıldığı HEK yöntemlerinin kullanılmasıyla iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin NATIVE/SDS PAGE teknikleri ile saflığı ve alt birimlerinin varlığı/sayısı kontrol edilerek elektroforetik özellikleri tespit edilmiştir. *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418'den elde edilerek saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin biyokimyasal özellikleri ise optimum pH, optimum sıcaklık ve enzimin termal kararlılığı ile belirlenmiş, enzimin kinetik özelliklerinin belirlenmesi için de K_M ve V_{MAX} değerleri incelenmiştir. Buna ilave olarak β -ksilosidaz enziminin genel inhibitörü olan D-(+)-ksilozun saflaştırılan enzim aktivitesine olan inhibisyon etkisi *p*-nitrofenil- β -D-ksilopiranosit (*p*NPX) substratı varlığında belirlenmiştir.

Çalışmamızın ilk aşamasında, *Trichoderma harzianum* NRRL 13019, *Trichoderma viride* NRRL 6418, *Trichoderma atroviride* NRRL 25150, *Trichoderma koningii* NRRL 54330 ve *Trichoderma virens* NRRL 2314 suşları, %5 Ksilan [(Sigma; Huş ağacı ksilan; Poli- β -D-ksilopiranoz 1 \rightarrow 4)] içeren Patates Dekstroz Agar (PDA) besiyeri plaklarına inoküle edilerek oluşturdukları hidroliz zonları büyüklüklerine göre karşılaştırılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda,

Trichoderma harzianum NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418'nin en büyük hidroliz zon çapına sahip oldukları belirlendiğinden bu suşlar β-ksilosidaz pozitif olarak değerlendirilmiş ve çalışmamızın devamında β-ksilosidaz kaynağı mikroorganizmalar olarak kullanılmalarına karar verilmiştir.

Haltrich ve ark., (1996) endüstriyel açıdan filamentli fungusların enzimlerinin ekstraselüler olması sebebiyle maya ve bakterilerden daha yüksek verimli lignoselüloolitik enzim üreticileri olduklarını rapor etmişlerdir [155]. Ja'afaru (2013) çalışmasında ksilanaz ve selülaz enzimlerini üretmek için toplam 110 fungusu topraktan (57), talaştan (32) ve çürümekte olan odundan (19) izole etmiş, *Trichoderma* ve *Aspergillus* türlerinin yüksek performans gösterdiklerini ve özellikle *Trichoderma viride* Fd18'in ksilanaz üretiminde en yüksek aktiviteye sahip olduğunu rapor etmiştir [156]. Sridevi ve ark., (2011) çürüyen ağaç, tarımsal atıklar ve tarım arazisinden izole ederek tanımladıkları 30 fungus izolatını ekstraselüler ksilanaz üretme yetenekleri açısından taramışlar, tek karbon kaynağı olarak ksilan içeren besi ortamında 5 günlük inkübasyonun ardından petri plaklarında oluşan hidroliz zonlarından *Alternaria*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Trichoderma* cinslerinin ksilanolitik enzim üreten izolatlar olduğunu belirlemişler, özellikle *Trichoderma* türlerinin geniş ksilanaz aktivitesi gösterdiğini maksimum ksilanaz üretiminin ise *Trichoderma* CDC-140 (495 U/ml) türü tarafından gerçekleştirildiğini rapor etmişlerdir [118]. Sater ve ark., (2001) pirinç samanı, buğday samanı ve şeker kamışı küspesi kullanılan ortamda gelişen 13 cinse ait 26 tür belirlemiş, *Aspergillus avus*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium corylophilum*, *Penicillium oxalicum* ve *Trichoderma harzianum*'un her üç substrat üzerinde de gelişen türler olduğunu seçilen izolatlar ile yapılan çalışmada ekstraselüler ksilanaz üretiminin ksilanın tek bir karbon kaynağı olarak kullanıldığı bir ortamda büyümeleri sırasında oluşan hidroliz zonları varlığıyla karakterize edildiği sonuç olarak, test edilen izolatların %93.3'ünün ksilanı parçalayabildiği ve ksilana karşı en yüksek ksilanolitik aktivitenin *Aspergillus avus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma harzianum* ve *Trichoderma viride* tarafından gerçekleştirildiği rapor etmişlerdir [157].

Katı Substrat Fermentasyon tekniğinin uygulanmasında uygun mikroorganizma seçimi oldukça önemlidir. Bunun yanında KSF'nin uygulanmasında

süreci etkileyen çok sayıda önemli faktör bulunmaktadır. Sırasıyla bunlar; uygun substrat seçimi, ortamın pH'ı ve nemlendirme sıvısı, inkübasyon sıcaklığı ve inkübasyon süresidir.

Çalışmamızın bir sonraki aşamasında buğday kepeği 24 saat süre ile 80°C'de kurutulduktan sonra katı substrat olarak kullanılmış ve KSF kültür koşullarında test mikrofungusların gelişimlerini ve β -ksilosidaz enzimi üretiminde etkili olacak parametrelerin (uygun substrat seçimi, ortamın pH'ı ve nemlendirme sıvısı, inkübasyon sıcaklığı ve inkübasyon süresi) optimizasyonları sağlanmıştır.

Çalışmamızda β -ksilosidaz enzimi, KSF kültür ortamında buğday kepeğinin katı substrat olarak kullanılmasıyla β -ksilosidaz aktivitesine sahip olduğu tespit edilen *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418 suşlarından elde edilmiştir. Yapılan literatür çalışması sonunda çok sayıda araştırmacı tarafından *Aspergillus avus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus sydowii*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus ficuum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium corylophilum*, *Penicillium oxalicum*, *Penicillium corylophilum*, *Penicillium duclauxii*, *Penicillium purpurogenum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma reseei*, *Trichoderma lignorum*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma pseudokoningii*, *Schizophyllum commune*, *Drechslera teres*, *Fusarium oxysporum*, *Gliocladium virens*, *Pichia stipitis*, *Bacillus thermantarcticus*, *Streptomyces cyaneus* gibi farklı organizmalardan ksilanaz ve β -ksilosidaz enzimleri elde edilerek elektroforetik ve biyokimyasal özelliklerinin rapor edildiği belirlenmiştir [118,155-161]. Ayrıca, farklı araştırmacılar tarafından KSF ortamında buğday kepeği, küspe, pirinç kabuğu, çay atıkları, palm yağı değirmeni atıkları, huş ağacı, yulaf, mısır gövdesi gibi farklı substratlar kullanılarak ksilanaz ve β -ksilosidaz enzimleri elde edildiği belirlenmiştir [162,163]. Lembo ve ark., (2002) çalışmalarında buğday kepeğini (5 g) KSF kültür ortamında substrat olarak kullanarak portakal suyundan izole edilen *Aureobasidium* sp.'den optimum koşullarda β -ksilosidaz enzimi elde ettiklerini rapor etmişlerdir. Araştırmada *Aureobasidium* sp.'nin β -ksilosidaz enzimi üretimi için gelişim koşulları araştırılmış ve optimum gelişme sıcaklığı 28°C, inkübasyon süresi 7 gün, nem miktarı ise %67 ve inokulum miktarı 1×10^6 CFU/ml spor olarak rapor edilmiştir [164]. El-Gindy ve ark., (2015) çalışmalarında 55°C'de 24 saat kurutulmuş yulaf KSF kültür ortamında

substrat olarak kullanarak mısır yağı örneklerinden izole edilen *Aspergillus tamarii*'den optimum koşullarda β -ksilosidaz enzimi elde ettiklerini belirtmişlerdir. Araştırmada *Aspergillus tamarii*'nin gelişim koşulları araştırılmış ve β -ksilosidaz enzim üretimi için optimum gelişim sıcaklığı 30°C, optimum pH 5.5, inkübasyon süresi 6 gün ve inokulum miktarı ise 1×10^6 CFU/ml spor olarak rapor edilmiştir [165]. Lembo ve ark., (2006) çalışmalarında oat spelt xylanı KSF kültür ortamında substrat olarak kullanarak Brezilya'da topraktan izole edilen *Humicola grisea* var. *thermoidea*'dan optimum koşullarda β -ksilosidaz enzimi elde ettiklerini rapor etmişlerdir. Araştırmalarında *Humicola grisea* var. *thermoidea*'nin gelişim koşulları belirlenmiş ve β -ksilosidaz enzim üretimi için optimum sıcaklık 40°C, optimum pH 7.0, inkübasyon süresi 12 saat, inokulum miktarı 1×10^7 CFU/ml spor olarak rapor edilmiştir [105]. Ximenes ve ark., (1996) çalışmalarında buğday kepeğini KSF kültür ortamında substrat olarak kullanarak *Trichoderma harzianum*'den optimum koşullarda β -ksilosidaz enzimi elde ettiklerini rapor etmişlerdir. Çalışmalarında *Trichoderma harzianum*'un β -ksilosidaz enzim üretimi için gelişim koşulları; optimum sıcaklık 28°C, optimum pH 5,0, inkübasyon süresi 7 gün, inokulum miktarını 1×10^7 CFU/ml spor ve nemlendirme sıvısı sodyum asetat olarak belirlemişlerdir [146]. Başaran ve Özcan, (2008) çalışmalarında kıyılmış mısır koçanını bütün gece 100°C'de kurutarak KSF kültür ortamına %1-3 oranında substrat olarak eklemiş ve *Pichia stipitis* NP54376'dan optimum koşullarda β -ksilosidaz enzimi elde ettiklerini rapor etmişlerdir. Çalışmada *Pichia stipitis* NP54376'in gelişim koşulları araştırılmış ve β -ksilosidaz enzimi üretimi için optimum gelişim sıcaklığı 30°C, optimum pH 5,5, inkübasyon süresi 4 gün, inokulum miktarını %3 (v/v) olarak rapor edilmiştir [142]. Inoue ve ark., (2016) ise çalışmalarında ortama %4 oranında ilave edilen pirinç samanını substrat olarak kullanarak *Trichoderma asperellum* KIF125'den optimum koşullarda β -ksilosidaz enzimi elde ettiklerini belirtmişlerdir. Araştırmada *Trichoderma asperellum* KIF125'un β -ksilosidaz enzimi üretimi için gelişim koşulları; optimum sıcaklık 28°C, optimum pH 4,8, inkübasyon süresi 4 gün olarak kaydedilmiştir [166]. Horta ve ark., (2014) çalışmalarında şeker kamışı küspesini substrat olarak kullanarak KSF kültür koşullarında *Trichoderma harzianum* IOC-3844'den β -ksilosidaz enzimi elde ettiklerini rapor etmişlerdir. Araştırmada *Trichoderma harzianum* IOC-3844'un gelişim koşulları araştırılmış ve β -ksilosidaz enzimi üretimi için optimum sıcaklık 29°C, optimum pH 5,2, inkübasyon süresi 129 saat, inokulum miktarı 9×10^5 CFU/ml

spor olarak kaydetmişlerdir [167]. Irfan ve ark., (2014) çalışmalarında 50°C’de 1 saat kurutulan şeker kamışı küspesini KSF kültür ortamında substrat olarak kullanarak *Trichoderma viride* IR05’den optimum koşullarda β-kilosidaz enzimi elde ettiklerini rapor etmişlerdir. Çalışmada *Trichoderma viride* IR05’in gelişim koşulları araştırılmış ve β-kilosidaz enzimi üretimi için optimum sıcaklık 30°C, optimum pH 4.5-5.0, inkübasyon süresi 7 gün, nem miktarı ise %80, distile su ve sitrat nemlendirme sıvısı olarak ayarlandığında en iyi aktivitenin elde edildiğini rapor etmişlerdir [168].

Çalışmamızda buğday kepeğinin KSF kültür ortamında substrat olarak kullanılması ile *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 suşundan β-kilosidaz enzimi eldesi için; nemlendirme sıvısı sitrat tamponu ve nem oranı %55, optimum inkübasyon sıcaklığı 35°C, optimum pH değeri 4,0 ve optimum inkübasyon süresi 7 gün olarak (Şekil 3.2; 3.3; 3.4), *Trichoderma viride* NRRL 6418 suşundan ise β-kilosidaz enzimi eldesi için; nemlendirme sıvısı Na₂HPO₄ Tamponu ve nem oranı %55, optimum inkübasyon sıcaklığı 25°C, optimum pH değeri 8,5 ve optimum inkübasyon süresi 7 gün olarak belirlenmiştir (Şekil 3.2; 3.3; 3.4).

Çalışmamızda kullanılan test mikroorganizmalarının maksimum β-kilosidaz enzim aktiviteleri için gereksinim duydukları optimum gelişme koşulları literatürde karşılaşılan *Trichoderma* ve diğer bazı β-kilosidaz üreticisi mikrofungus suşlarına ait veriler ile karşılaştırıldığında;

Trichoderma harzianum NRRL 13019’a ait inkübasyon sıcaklığı 35°C (Lembo ve ark., 2002), *Aureobasidium* sp. 28°C (El-Gindy ve ark., 2015), *Aspergillus tamarii* 30°C (Ximenes ve ark., 1996), *Trichoderma harzianum* 28°C (Başaran ve Özcan, 2008), *Pichia stipitis* NP54376 30°C (Inoue ve ark., 2016), *Trichoderma asperellum* KIF125 28°C (Horta ve ark., 2014), *Trichoderma harzianum* IOC-3844 29°C (Irfan ve ark., 2014), *Trichoderma viride* IR05 30°C’den yüksek, *Humicola grisea* var. *thermoidea* 40°C’den düşüktür (Lembo ve ark., 2006).

Trichoderma harzianum NRRL 13019 için optimum pH değeri 4,0 (El-Gindy ve ark., 2015) *Aspergillus tamarii* için 5,5 (Ximenes ve ark.,1996), *Trichoderma harzianum* için 5,0 (Başaran ve Özcan, 2008), *Pichia stipitis* NP54376 için 5,5 (Inoue ve ark.,2016), *Trichoderma asperellum* KIF125 için 4,8 (Horta ve ark.,2014), *Trichoderma harzianum* IOC-3844 için 5,2 (Irfan ve ark., 2014), *Trichoderma viride*

IR05 için 4,5 ve *Humicola grisea* var. *thermoidea* için 7,0 (Lembo ve ark., 2006)'dan düşük olarak kaydedilmiştir.

Optimum inkübasyon süreleri ise *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 için 7 gün (Horta ve ark., 2014), *Trichoderma harzianum* IOC-3844 için 129 saat (Lembo ve ark.,2006), *Humicola grisea* var. *thermoidea* için 12 saat (El-Gindy ve ark., 2015), *Aspergillus tamarisii* için 6 gün (Başaran ve Özcan,2008), *Pichia stipitis* NP54376 için 4 gün (Inoue ve ark.,2016), *Trichoderma asperellum* KIF125 için 4 günden yüksek (Lembo ve ark., (2002), *Aureobasidium* sp.için 7 gün (Ximenes ve ark., 1996) *Trichoderma harzianum* için 7 gün (Irfan ve ark., 2014) *Trichoderma viride* IR05 için 7 gün olarak rapor edilmiştir.

Trichoderma harzianum NRRL 13019'un gelişiminde kullanılan substratın nem düzeyi %55 (Lembo ve ark., (2002), *Aureobasidium* sp.substratı için nem düzeyi %67'den düşük ve *Trichoderma viride* IR05 substratı için nem düzeyi %80'den düşük olarak kaydedilmiştir (Irfan ve ark., (2014).

Literatürlerde *Trichoderma viride* NRRL 6418'e ait inkübasyon sıcaklığı 25°C (Lembo ve ark., 2002), *Aureobasidium* sp. için 28°C (El-Gindy ve ark., 2015) *Aspergillus tamarisii* için 30°C (Ximenes ve ark., 1996), *Trichoderma harzianum* için 28°C (Başaran ve Özcan, 2008), *Pichia stipitis* NP54376 için 30°C (Inoue ve ark., 2016), *Trichoderma asperellum* KIF125 için 28°C (Horta ve ark., 2014) *Trichoderma harzianum* IOC-3844 için 29°C (Irfan ve ark., 2014), *Trichoderma viride* IR05 için 30°C ve *Humicola grisea* var. *thermoidea* için 40°C'den düşük olarak rapor edilmiştir (Lembo ve ark., 2006).

Mikroorganizmaların maksimum β -ksilozidaz enzim aktiviteleri için gereksinim duydukları optimum gelişim pH değerleri ise; *Trichoderma viride* NRRL 6418 için 8,5 (El-Gindy ve ark., 2015), *Aspergillus tamarisii* için 5,5 (Ximenes ve ark., 1996), *Trichoderma harzianum* için 5,0 (Başaran ve Özcan, 2008), *Pichia stipitis* NP54376 için 5,5 (Inoue ve ark., 2016), *Trichoderma asperellum* KIF125 için 4,8 (Horta ve ark., 2014), *Trichoderma harzianum* IOC-3844 için 5,2 (Irfan ve ark., 2014), *Trichoderma viride* IR05 için 4,5 ve *Humicola grisea* var. *thermoidea* için 7,0'dan yüksek olarak kaydedilmiştir (Lembo ve ark., 2006).

Trichoderma viride NRRL 6418'e için optimum inkübasyon süresi 7 gün (Horta ve ark., 2014), *Trichoderma harzianum* IOC-3844 için 129 saat (Lembo ve

ark., 2006), *Humicola grisea* var. *thermoidea* için 12 saat (El-Gindy ve ark., 2015), *Aspergillus tamarii* için 6 gün (Başaran ve Özcan, 2008), *Pichia stipitis* NP54376 için 4 gün (Inoue ve ark., 2016), *Trichoderma asperellum* KIF125 için 4 günden yüksek (Lembo ve ark., 2002), *Aureobasidium* sp. için 7 gün (Ximenes ve ark., 1996), *Trichoderma harzianum* için 7 gün ve *Trichoderma viride* IR05 için 7 gün olarak rapor edilmiştir (Irfan ve ark., 2014).

Trichoderma viride NRRL 6418'in gelişiminde kullanılan substratın nem düzeyi %55 (Lembo ve ark., 2002), *Aureobasidium* sp. substratı için nem düzeyi %67'den düşük ve *Trichoderma viride* IR05 %80'den düşük olarak kaydedilmiştir (Irfan ve ark., 2014).

Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda, test organizmaları olarak kullanılan *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418 suşlarının, maksimum β -ksilosidaz enzim aktivitesi için gerek duydukları gelişme koşullarının daha önce yapılmış çalışmalarla benzerlik göstermediğini söylemek mümkündür.

Çalışmamızda *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418 suşlarından elde edilen kısmi saflaştırılmış β -ksilosidaz enziminin amonyum sülfat çöktürme aralığı sırasıyla %40-90 ve %50-100 olarak belirlenmiştir. Sonraki saflaştırma işlemlerinde kısmi saflaştırılmış ekstrakta *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 için %40-70 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418 için ise 50-100 doygunluğunda amonyum sülfat çöktürmesi uygulanmıştır. Daha önce yapılan araştırmalardan β -ksilosidaz enziminin saflaştırılmasında kullanılan amonyum sülfat çöktürme aralıklarının farklılık gösterdiği görülmektedir. Optimum koşullarda elde edilen β -ksilosidaz enziminin amonyum sülfat çöktürme aralığını *Penicillium sclerotiorum* ile yaptıkları araştırmalarında Knob ve Carmona, (2012) %0-60; Duenas ve Estrada (1998) *Trichoderma reesei* QM 9414 ile yaptıkları araştırmalarında %20-60, Pinphanichakarn ve ark., (2004) *Streptomyces* sp. CH7 ile yaptıkları araştırmalarında %40-70 olarak rapor etmişlerdir [145,169,170]. Ximenes ve ark., (1996) substrat olarak buğday kepeği kullanarak *Trichoderma harzianum* strain C'den optimum koşullarda elde ettikleri ham enzimi %20, Armand ve ark., (1996) *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* strain B6A-RI'dan optimum koşullarda elde ettikleri ham enzimi %50, El-Gindy ve Ark., (2015) *Aspergillus tamarii*'den optimum koşullarda elde ettikleri ham enzimi %60, Matsuo ve ark., (1976) *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea* No. 48'den optimum koşullarda elde

ettikleri ham enzimi %80 ve Matsuo ve ark., (1984) *Trichoderma viride*'den optimum koşullarda elde ettikleri ham enzime %80 doyunluğunda amonyum sülfat çöktürmesi uyguladıklarını yaptıkları çalışmalar ile rapor etmişlerdir [146,147,165,171,172]. Tüm bu araştırmalar ile karşılaştırıldığında, bizim çalışmamız sonucunda *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418 suşlarından elde edilen β -ksilosidaz enziminin belirlenen amonyum sülfat çöktürme aralıklarının (sırasıyla %40-90 ve %50-100) bu araştırmalarla bir benzerlik göstermediği ve daha geniş bir aralığa sahip olduğunu söylemek mümkündür.

Araştırmamızda amonyum sülfat çöktürme işlemi sonunda *Trichoderma harzianum* NRRL 13019'dan elde edilen β -ksilosidaz enzimi %75,0413 verimle 3,3462 kat (Tablo 3.6), *Trichoderma viride* NRRL 6418'den elde edilen β -ksilosidaz enzimi %40,0123 verimle 1,1737 kat (Tablo 3.7) saflaştırılmıştır.

Yapılan farklı çalışmalarda amonyum sülfat çöktürmesi sonunda; *Aspergillus versicolor*'dan elde edilen β -ksilosidaz enziminin %25 verimle 12,3 kat; *Penicillium sclerotiorum*'dan elde edilen β -ksilosidaz enziminin %94,72 verimle 2,39 kat; *Streptomyces* sp. CH7'den elde edilen β -ksilosidaz enziminin %49,3 verimle 2,2 kat; *Trichoderma harzianum* strain C'den elde edilen β -ksilosidaz enziminin %50,1 verimle 1,5 kat; *Trichoderma viride*'den elde edilen β -ksilosidaz enziminin %56,1 verimle 2,8 kat; *Pichia stipitis*'den elde edilen β -ksilosidaz enziminin %72,28 verimle 3,05 kat saflaştırıldığı rapor edilmiştir [146,147,161,165,169,170,172].

Amonyum sülfat çöktürmesi sonunda enzim verimi ve saflaştırma katsayılarında belirlenen farklılığın çalışmalarda kullanılan mikroorganizmadan, uygulanan amonyum sülfat miktarından veya araştırmaların yapıldığı ortam şartlarından kaynaklanabileceğini söylemek mümkündür.

Çalışmamızda amonyum sülfat çöktürmesini takip eden sonraki aşamada Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HEK)'nin kullanılmasıyla saflaştırma işlemi iki basamakta gerçekleştirilmiştir. HEK işleminde laboratuvarımızda sentezlediğimiz Sepharose-4B-L-Tirozin-1-Naftilamin hidrofobik jelinin kullanılmasıyla, *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 suşundan elde edilen β -ksilosidaz enzimi %50,4884 verimle 215,7604 kat (Tablo 3.6) ve *Trichoderma viride* NRRL 6418

suşundan elde edilen β -ksilosidaz enzimi %33,4361 verimle 92,3927 kat saflaştırılmıştır (Tablo 3.7).

Literatürde çeşitli organizmalardan elde edilen β -ksilosidaz enziminin amonyum sülfat çöktürmesi sonunda birkaç aşamalı kromatografik yöntemler kullanılarak saflaştırıldıkları rapor edilmiştir.

Ximenes ve ark., (1996) *Trichoderma harzianum* strain C'den elde ettikleri β -ksilosidaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi, Sephacryl S-100 Jel Filtrasyon, İyon Değişim Kromatografisi tekniklerini kullanarak %4 verimle 13,15 kat [146]; Matsuo ve Yasui, (1984) *Trichoderma viride*'den elde ettikleri β -ksilosidaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Sephadex kromatografisi, jel filtrasyon tekniklerini kullanarak %26,7 verimle 2,81 kat [147]; Andrade ve ark., (2004) *Aspergillus versicolor*'den elde ettikleri β -ksilosidaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-selüloz kromatografisi, jel filtrasyon tekniklerini kullanarak %66 verimle 3 kat [161]; El-Gindy ve ark., (2015) *Aspergillus tamarisii*'den elde ettikleri β -ksilosidaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi ardından İyon Değişim Kromatografisi ve Sephadex G-100 Jel Filtrasyon tekniklerini kullanarak %40,57 verimle 35,73 kat [165]; Knob ve Carmona, (2012) *Penicillium sclerotiorum*'den elde ettikleri β -ksilosidaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesinin ardından moleküler exclusion Kromatografisi tekniklerini kullanarak %46,07 verimle 2,42 kat [169]; Pinphanichakarn ve ark., (2004) *Streptomyces* sp. CH7'den elde ettikleri β -ksilosidaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi, Anyon Değişim Kromatografisi ve jel filtrasyon tekniklerini kullanarak %30 verimle 9,3 kat [170]; Matsuo ve ark., (1976) *Malbranchea pulchella*'den elde ettikleri β -ksilosidaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-selüloz kolon kromatografisi, ultrafiltrasyon ve Sephadex G-200 jel filtrasyon tekniklerini kullanarak %28,43 verimle 7,50 kat saflaştırdıklarını rapor etmişlerdir [172].

Çalışmamızda *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 suşundan elde edilen β -ksilosidaz enziminin saflaştırma sonuçlarını, Ximenes ve ark., (1996)'nın aynı organizmanın farklı bir suşundan elde ettikleri β -ksilosidaz enziminin saflaştırma sonuçları ile karşılaştırdığımızda; hem % verimlerinin hem de saflaştırma katsayılarının bizim çalışmamızda daha yüksek olduğu görülmektedir. Aynı şekilde çalışmamızda kullanılan ikinci mikrofungus olan *Trichoderma viride* NRRL 6418 suşundan elde edilen β -ksilosidaz enziminin saflaştırma sonuçlarını Matsuo ve

Yasui, (1984)'nin aynı organizmadan elde ettikleri β -ksilosidaz 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 doyumluğunun ve kullanılan kromatografi tekniklerinin farklı olmasından kaynaklanmış olabileceğini söyleyebiliriz.

Çalışmamızda buğday kepeğinin katı substrat olarak kullanılması ile *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418 suşlarından KSF kültür ortamında optimum inkübasyon koşullarında elde edilen ve iki aşamada saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin saflığını ve alt birimlerinin varlığı/sayısını kontrol etmek için NATIVE/SDS PAGE yöntemi kullanılmıştır. SDS-PAGE ve NATIVE-PAGE'de *Trichoderma harzianum* NRRL 13019'dan elde edilerek saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin yaklaşık 20 kDa hizasında tek bant (Şekil 3.9), *Trichoderma viride* NRRL 6418'den elde edilerek saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin ise yaklaşık 25 kDa hizasında yine tek bant (Şekil 3.10) oluşturduğu gözlenmiştir.

Yapılan farklı çalışmalarda; Lembo ve ark., (2006) *Humicola grisea* var *thermoidea*'dan saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin SDS-PAGE ile 50 kDa; Inoue ve ark., (2016) *Trichoderma asperellum* KIF125'den saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin SDS-PAGE ile 80,2 kDa; Lama ve ark., (2004) *Bacillus thermantarcticus*'dan saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin SDS-PAGE ile 75 kDa ve NATIVE-PAGE ile 150 kDa; Ximenes ve ark., (1996) *Trichoderma harzianum* strain C'den saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin SDS-PAGE ile 60 kDa; Matsuo ve Yasui (1984) *Trichoderma viride*'den saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin SDS-PAGE ile 101 kDa; El-Gindy ve ark., (2015) *Aspergillus tamaritii*'den saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin SDS-PAGE ile 91 kDa; Pinphanichakarn ve ark., (2004) *Streptomyces* sp. CH7'den saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin SDS-PAGE ile 87 kDa ve NATIVE-PAGE ile 173 kDa; Lee ve ark., (2007) *Paenibacillus* sp. DG-22'den saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin SDS-PAGE ile 80 kDa; Shao ve Wiegel, (1992) *Thermoanaerobacter ethanolicus*'dan saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin SDS-PAGE ile 85 kDa; Poutanen ve Puls, (1988) *Trichoderma reesei*'den saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin SDS-PAGE ile 100 kDa; Kumar ve Ramon, (1996) *Aspergillus nidulans*'dan saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin SDS-PAGE

ile 85 kDa; Nanmori ve ark., (1990) *Bacillus stearothermophilus*'dan saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin SDS-PAGE ile 150 kDa molekül ağırlığına sahip olduğunu rapor etmişlerdir [105,106,134,146,147,159,165,166,170,173-175].

Trichoderma harzianum NRRL 13019'dan saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değeri 6,0, sıcaklık ise değeri 75°C (Şekil 3.11;Şekil 3.12), *Trichoderma viride* NRRL 6418'den saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değeri 6,0 ve sıcaklık değeri ise 65°C (Şekil 3.11;Şekil 3.12) olarak belirlenmiştir.

Yapılan farklı çalışmalarda; Matsuo ve ark., (1984) *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea* No.48'den saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin optimum pH değerini 6,7 ve sıcaklık değerini 50°C; Andrade ve ark., (2003) *Aspergillus versicolor*'dan saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin optimum pH değerini 6,0 ve optimum sıcaklık değerini 40°C; Knob ve Carmona, (2012) *Penicillium sclerotiorum*'dan saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin optimum pH değerini 2,5 ve optimum sıcaklık değerini 60°C; Başaran ve Özcan, (2008) *Pichia stipitis*'den saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin optimum pH değerini 5,0 ve optimum sıcaklık değerini 50°C; Tuncer, (2000) *Thermomonospora fusca* BD25'den saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin optimum pH değerini 8,0 ve optimum sıcaklık değerini 65°C; Fengxia ve ark., (2008) *Aspergillus ficuum* AF-98'den saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin optimum pH değerini 5,0 ve optimum sıcaklık değerini 45°C; Duenas ve Estrada, (1998) *Trichoderma reesei* QM 9414'den saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin optimum pH değerini 4,0 ve optimum sıcaklık değerini 55°C; Lama ve ark., (2004) *Bacillus thermantarcticus*'dan saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin optimum pH değerini 6,0 ve optimum sıcaklık değerini 70°C; Ximenes ve ark., (1996) *Trichoderma harzianum* strain C'den saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin optimum pH değerini 4-4,5 ve optimum sıcaklık değerini 70°C; Matsuo ve Yasui, (1984) *Trichoderma viride*'den saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin optimum pH değerini 4,5 ve optimum sıcaklık değerini 55°C; El-Gindy ve ark., (2015) *Aspergillus tamarii*'den saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin optimum pH değerini 5,5 ve optimum sıcaklık değerini 55°C; Pinphanichakarn ve ark., (2004) *Streptomyces* sp. CH7'den saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin optimum pH değerini 6,5 ve optimum sıcaklık değerini 55°C; Lee ve ark., (2007) *Paenibacillus* sp. DG-22'den saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin optimum pH değerini 5,5 ve optimum sıcaklık

değerini 65°C; Poutanen ve Puls, (1988) *Trichoderma reesei*'den saflaştırdıkları β-kilosidaz enziminin optimum pH değerini 4,0 ve optimum sıcaklık değerini 60°C; Lembo ve ark., (2006) *Humicola grisea* var. *thermoidea*'dan saflaştırdıkları β-kilosidaz enziminin optimum pH değerini 6,5 ve optimum sıcaklık değerini 55°C; Kumar ve Ramon, (1996) *Aspergillus nidulans*'dan saflaştırdıkları β-kilosidaz enziminin optimum pH değerini 5,0 ve optimum sıcaklık değerini 50°C olarak rapor etmişlerdir [105,106,142,145-147,159-161,165,169,170,172-174,176].

Yapılan literatür çalışması sonucunda elde edilen veriler incelendiğinde; farklı organizmalardan elde edilerek saflaştırılmış olan β-kilosidaz enzim aktivitesinin maksimum olduğu optimum pH değerleri arasında en düşük 2,5, en yüksek 8,0 değerlerinin bulunduğu tespit edilmiştir. Karşılaştığımız bu uç değerler dışında pH değerinin ortalama 4,0-6,5 aralığında yoğunlaştığını söyleyebiliriz. Aynı şekilde sıcaklık değerlerine ait veriler incelendiğinde en düşük 40°C ve en yüksek 70°C sıcaklık değerlerinin bulunduğu tespit edilmiştir. Özellikle 50 ve 55°C'lerde yığılmanın olduğunu da söyleyebiliriz. Çalışmamızda β-kilosidaz elde etmek üzere kullandığımız *Trichoderma harzianum*'dan, Ximenes ve ark., (1996)'nın elde ettikleri aynı enzimin pH değeri 4-4,5, sıcaklık değeri ise 70°C olarak rapor edilirken, biz optimum pH değerini 6,0, sıcaklığını ise 75°C olarak, çalışmamızda kullandığımız ikinci mikrofungus olan *Trichoderma viride*'den Matsuo ve Yasui, (1984)'nın elde ettikleri aynı enzimin pH değeri 4,5, sıcaklığı ise 55°C olarak rapor edilirken, biz optimum pH değerini 6,0, sıcaklığını ise 65°C olarak belirlemiş bulunmaktayız. Bu sonuçlar; enzimin elde edilmesindeki çalışma koşullarının farklılığının ve aynı türün farklı ırklarının dahi enzimin optimum aktivite gösterdiği biyokimyasal parametreler üzerinde etkili olabileceğini ifade etmektedir.

Çalışmamızda buğday kepeğinin substrat olarak kullanıldığı KSF kültür ortamında *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418'den elde edilerek saflaştırılan β-kilosidaz enziminin termal kararlılığı da belirlenmiştir. *Trichoderma harzianum* NRRL 13019'dan elde edilen β-kilosidaz enziminin; 120 dakikalık inkübasyon sonrasında 45°C'de %32 oranında, 55°C'de %28 oranında, 65°C'de %24 oranında ve 75°C'de %10 oranında aktivitesini koruduğu ve 85°C'de enzimin aktivitesini 42 dk. koruduğu (Şekil 3.13), *Trichoderma viride* NRRL 6418'den elde edilen β-kilosidaz enziminin; 120 dk. inkübasyon sonrasında 45°C'de %74 oranında, 55°C'de %67 oranında, 65°C'de %57

oranında ve 75°C'de %9 oranında aktivitesini koruduğu ve 85°C'de enzimin aktivitesini 40 dk. koruduğu (Şekil 3.14) belirlenmiştir.

Knob ve Carmona, (2012) *Penicillium sclerotiorum*'den elde edilerek saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin termal kararlılığını araştırmışlar ve enzimin 65°C'de 90 dakikadan daha az bir süre aktivite gösterdiğini, 65°C'de ise yüksek termal kararlılığa sahip olduğunu, 375 dakikada aktivitesinin yarıya düştüğünü, Matsuo ve Yasui, (1984) *Trichoderma viride*'den elde edilerek saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin termal kararlılığını araştırmışlar ve enzimin 55°C'de kararlı olduğunu ve 75°C'de 30 dakikada aktivitesini kaybettiğini, Lee ve ark., (2007) *Paenibacillus* sp. DG-22'den elde edilerek saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin 60°C'de oldukça kararlı olduğunu ve 60 dk. sonra başlangıç aktivitesinin %80 düştüğünü, 65°C'de aktivitenin önemli bir şekilde kaybedildiğini ve 25dk. sonra enzim aktivitesinin yarıya düştüğünü; Lembo ve ark., (2005) *Humicola grisea* var. *thermoides*'den elde edilerek saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin 50°C'de 6h inkübasyonu sonunda aktivitesinin %60 olduğu, Kumar ve Ramon, (1996) *Aspergillus nidulans*'den elde edilerek saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin 45°C'nin üzerinde tam olarak kararlı olmadığını, 40-45°C arasında 8h boyunca kararlılığını koruduğunu, optimum sıcaklık değeri olan 50°C'de 4-6h aktivitesi kaybettiği, 60°C'de tüm aktivitesini kaybettiği, 55°C'de ise aktivitesinin %50 olduğu, Rasmussen ve ark., (2006) *Talaromyces emersonii* ve *Trichoderma reesei*'den elde edilerek saflaştırılan β XTE ve β XTR enzimlerinin termal kararlılığını araştırmışlar her iki enziminde 60°C'de kararlı olduğunu ancak β XTE enziminin 80°C'de 30 dakikada tamamen aktivitesini kaybettiğini bunun yanında β XTR enziminin ise 70°C'de tamamen aktivitesini kaybettiğini, Pinphanichakarn ve ark., (2004) *Streptomyces* sp. CH7'den elde edilerek saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin substrat yokluğunda 30 dakika süreyle 50°C sıcaklığa kadar kararlı olduğunu, Matsuo ve ark., (1976) *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea*'den elde edilerek saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin termal kararlılığını 40°C, 50°C, 60°C ve 70°C için araştırmışlar ve enzimin substrat yokluğunda 15 dakika süreyle 50°C sıcaklıkta aktivitesinin yaklaşık %80'ini koruduğunu rapor etmişlerdir [105,147,153,169,170,172-174]. Bu sonuçlara göre aynı enzimin farklı sıcaklık derecelerinde gösterdiği kararlılığın elde edildiği mikroorganizma kaynağına göre değişiklik gösterdiğini söyleyebiliriz.

Çalışmamızda *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418'den elde ederek saflaştırdığımız β -ksilosidaz enziminin kinetik parametreleri belirlenmiştir. β -ksilosidaz enziminin spesifik substratı olan *p*-nitrofenil- β -D-ksilopiranosite (*p*NPX) karşı ilgisini gösteren K_M ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır. *Trichoderma harzianum* NRRL 13019'dan elde edilerek saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin *p*NPX substratı için K_M değeri 0,25 mM ve V_{max} değeri 2500 EU, katalitik etkinliğinin ölçüsü olan V_{max}/K_M oranı ise 10.000 olarak hesaplanmıştır (Tablo 3.10). *Trichoderma viride* NRRL 6418'den elde edilerek saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin *p*NPX substratı için K_M değeri 0,5 mM ve V_{max} değeri 2500 EU, katalitik etkinliğinin ölçüsü olan V_{max}/K_M oranı ise 5.000 olarak hesaplanmıştır (Tablo 3.11). Bir enzimin kinetik özelliklerinin ifade edilmesinde K_M ve V_{max} değerleri önemli parametrelerdir. β -ksilosidaz enziminin *p*NPX substratına olan ilgisini gösteren K_M ve V_{max} değerlerinin tespit edilmesi amacıyla *p*NPX substratının farklı konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapılmış elde edilen aktivite değerlerinden yararlanılarak Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir. Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen denklem yardımıyla K_M ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır. Bir enzime ait V_{max} değeri enzim konsantrasyonu sabit tutularak, substrat konsantrasyonuna $[S]$ bağlı maksimum hızı (V), K_m değeri ise maksimum hızın yarısına karşılık gelen substrat konsantrasyonunu ifade etmektedir. Ayrıca V_{max} / K_M değeri enzimin substrata olan ilgisini göstermekte olup bu değer artması enzimin substrata karşı artan ilgisini, değer küçülmesi ise enzimin substrata karşı azalan ilgisinin bir göstergesidir.

Çok sayıda çalışmada farklı organizmalardan elde edilen β -ksilosidaz enziminin değişik metotlar kullanarak saflaştırıldığı, *p*NPX substratına karşı K_M ve V_{max} değerlerinin hesaplandığı rapor edilmiştir. Andrade ve ark., (2003) *Aspergillus versicolor*'dan elde ederek saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin K_M ve V_{max} değerlerini sırasıyla 0,32 mM ve 922 U/mg protein; Kiss ve Kiss, (2000) *Aspergillus carbonarius*'dan elde ederek saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin K_M ve V_{max} değerlerini 0,198 mM ve 3,64 U mg⁻¹; El-Gindy ve ark., (2015) *Aspergillus tamarii*'den elde ederek saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin K_M ve V_{max} değerlerini 0,075 mg/ml ve 71,42 U/mg; Lee ve ark., (2007) *Paenibacillus* sp. DG-22'den elde edilerek saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin K_M ve V_{max} değerlerini 0,53 mM ve 3,18 U/mg; Ximenes ve ark., (1996) *Trichoderma harzianum*'dan elde

edilerek saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin K_M ve V_{max} değerlerini 0,103 mM ve 0,0065 IU ml⁻¹; Lembo ve ark., (2006) *Humicola grisea* var. *thermoidea*'dan elde edilerek saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin K_M değerini 1,37 mM ve V_{max} değerini 12,98 IU ml⁻¹; Kumar ve Ramon, (1996) *Aspergillus nidulans*'dan elde edilerek saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin K_M ve V_{max} değerlerini 1,1 mM ve 25,6 μ mol/min/mg; Gomez ve ark., (2001) *Trichoderma reesei* QM 9414'den elde edilerek saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin K_M ve V_{max} değerlerini 3,11 mM ve 3,33 μ mol olarak rapor etmişlerdir [105,146,154,161,165,173,174,177].

Bazı araştırmacılar ise farklı organizmalardan elde ederek saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin K_M ve V_{max} değerlerini birden fazla substrat kullanarak belirlemişlerdir. Tuncer, (2000) *Thermonospora fusca* BD25'den elde edilerek saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin K_M ve V_{max} değerlerini, *p*NPX ve Paranitrofenil alfa-arabinofuranosid (*p*NPA) substratlarını kullanarak K_M ve V_{max} değerlerini sırasıyla *p*NPX için 0,5 mM ve 0,83 μ mol ml⁻¹ dk⁻¹, *p*NPA için 0,18 mM ve 0,04 μ mol ml⁻¹ dk⁻¹, Pinphanichakarn ve ark., (2004) *Streptomyces* sp. CH7'den elde edilerek saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin K_M ve V_{max} değerlerini, *p*NPX ve 2 nitrofenil β -D ksilopiranosid (*o*NPX) substratlarını kullanarak K_M ve V_{max} değerlerini sırasıyla *p*NPX için 0,56 mM ve 26,3 U/mg protein, *o*NPX için 0,94 mM ve 6,6 U/mg protein olarak tespit etmişlerdir [170,176].

Trichoderma harzianum NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418'den elde edilerek saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin *p*-nitrofenil- β -D-ksilopiranosit (*p*NPX) substratına karşı belirlediğimiz K_M ve V_{max} değerleri ile literatürlerdeki değerlerin farklılık gösterdiği, çalışmamızda elde ettiğimiz K_M değerlerinin literatür sonuçlarına göre genellikle oldukça düşük, V_{max} değerlerinin ise oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Dolayısı ile bizim çalışmamızda elde ettiğimiz β -ksilosidaz enziminin endüstriyel uygulamalarda kullanımı açısından literatürlerde saflaştırılarak kinetik özellikleri belirten β -ksilosidaz enzimlerine göre daha avantajlı olduğunu söylemek mümkündür.

Yaptığımız çalışmada; D-(+)-ksilozun *p*NPX substratı varlığında *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418'den elde edilerek saflaştırılan β -ksilosidaz enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu olarak ifade edilen IC₅₀ değerleri ve enzim aktivitesini azaltan inhibisyon tipleri belirlenerek K_i değerleri hesaplanmıştır. *Trichoderma harzianum*

NRRL 13019'dan elde edilerek saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin D-(+)ksiloz inhibitörü için IC_{50} değeri 0,11 mM (Tablo 3.12; Şekil 3.17); K_i değerleri 0,00110 ve 0,00557 olmak üzere iki ayrı K_i değeri hesaplanmış (Tablo 3.14; Şekil 3.19) ve karışık tipte inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 3.19). *Trichoderma viride* NRRL 6418'den elde edilerek saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin D-(+)ksiloz inhibitörü için IC_{50} değeri 0,071 mM (Tablo 3.13; Şekil 3.18); K_i değeri $2,64 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-5}$ olarak hesaplanmış (Tablo 3.15; Şekil 3.20) ve yarışmalı tipte inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 3.20).

Karışık inhibisyon tipinde; inhibitörle substratın enzime bağlanması aynı anda gerçekleşebilir. Ancak, inhibitor ve substrat bağlanma esnasında birbirlerini etkilemektedir. Substrat konsantrasyonu artırılırsa inhibisyon azaltılır ancak bütünüyle engellenemez. Karışık inhibisyonda, inhibitörlerin enzimin aktif bölgesine bağlanması mümkündür. Bu inhibisyon tipi, inhibitörlerin genellikle enzimler üzerindeki farklı yerlere bağlanmaları sonucunda meydana gelen allosterik etkinin sonucudur. Bu durum enzimin konformasyonunu değiştirerek substratında enzimin aktif bölgesine olan ilgisini azaltır. Yukarıdaki açıklamalardan yararlanarak substrat olarak *pNPX* ve inhibitör olarak D-(+)-ksilozun kullanıldığı, *Trichoderma harzianum* NRRL 13019'dan elde edilerek saflaştırılan β -ksilosidaz enzimine *pNPX* ve D-(+)ksilozun aynı zamanda bağlanabileceği ifade edilebilir. Yarışmalı tip inhibisyonda ise substrat ve inhibitör enzime aynı zamanda bağlanamaz çünkü; enzimin üzerinde aktif bölgeye karşı hem substrat hemde inhibitörün ilgisi bulunmaktadır. Substratla inhibitör enzim üzerindeki aktif bölgeye bağlanabilmek için yarışır. Substratın konsantrasyonu yeteri kadar artırıldığında inhibisyonda bu durumla başa çıkılabilir. Bu tipteki inhibitörler, yapı bakımından genellikle asıl substrata benzemektedirler. *Trichoderma viride* NRRL 6418'den elde edilerek saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin aktif bölgesine bağlanabilmek için *pNPX* ve D-(+)-ksilozun yarış halinde olduğu ifade edilebilir.

Poutanen ve ark., (1988) *Trichoderma reesei*'den elde ederek saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin *pNPX* substratı ve ksiloz inhibitörü varlığında K_i değeri 2,3 mM olarak hesaplanmış ve β -ksilosidaz enzimine karşı ksilozun kompetatif tipte inhibisyon etkisi gösterdiğini belirlemişlerdir [106]. Gomez ve ark., (2001) *Trichoderma reesei* QM 9414'den elde ederek saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin substrat olarak *pNPX*, inhibitör olarak D-ksiloz varlığında K_i değerini 3,11 mM

olarak hesaplamış ve β -ksilosidaz enzimine karşı D-ksilozun kompetatif tipte inhibisyon etkisi gösterdiği rapor etmişlerdir [154]. Chakrabarti ve Ranu, (1995) *Aspergillus terreus* (IJIRA6.2)'den elde ederek saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin *p*NPX substratı ve D-(+)-ksiloz inhibitörü varlığında K_i değeri 10,5 mM olarak hesaplanmış ve β -ksilosidaz enzimine karşı D-(+)-ksilozun kompetatif tipte inhibisyon etkisi gösterdiği belirlemişlerdir [178]. Tuncer, (2000) *Thermomonospora fusca* BD25'den elde ederek saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin *p*NPX substratı ve D-ksiloz inhibitörü varlığında K_i değerini 10 mM olarak hesaplamış ve D-ksilozun β -ksilosidaz enzim aktivitesinde %10 oranında azalmaya neden olduğu rapor etmiştir [176]. Hudson ve ark., (1991) *Escherichia coli*'den elde ederek saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin *p*NPX substratı ve ksiloz inhibitörü varlığında K_i değerini 40 mM olarak hesaplamış ve β -ksilosidaz enzimine karşı ksilozun kompetatif tipte inhibisyon etkisi gösterdiğini rapor etmişlerdir [179]. Pinphanichakarn ve ark., (2004) *Streptomyces* sp. CH7'den elde ederek saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin *p*NPX substratı ve ksiloz inhibitörü varlığında K_i değeri 40 mM olarak hesaplanmış ve β -ksilosidaz enzimine karşı ksilozun kompetatif tipte inhibisyon etkisi gösterdiği rapor edilmiştir [170]. Hwa ve ark., (1998) *Bacillus* sp. KK-1'den elde ederek saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin *p*NPX substratı ve ksiloz inhibitörü varlığında K_i değeri 10 mM olarak hesaplanmış ve β -ksilosidaz enziminin ksiloz tarafından tamamen inhibe edildiği rapor edilmiştir [180]. Saha, (2003) *Fusarium proliferatum*'dan elde ederek saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin *p*NPX substratı ve ksiloz inhibitörü varlığında K_i değeri 5 mM olarak hesaplanmış ve β -ksilosidaz enzimine karşı ksilozun kompetatif tipte inhibisyon etkisi gösterdiği rapor edilmiştir [181]. Rasmussen ve ark., (2006) *Talaromyces emersonii* ve *Trichoderma reesei*'den elde ederek saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin *p*NPX substratı ve D-ksiloz inhibitörü varlığında K_i değerlerini sırasıyla 1,3 mM ve 2,4 mM olarak hesaplanmış β -ksilosidaz enzimine karşı D-ksilozun kompetatif tipte inhibisyon etkisi gösterdiği rapor edilmiştir [153]. Knob ve Carmona, (2012) *Penicillium sclerotorum*'dan elde ederek saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin *p*NPX substratı ve D-ksiloz inhibitörü varlığında K_i değeri 32,1 mM olarak hesaplanmış ve β -ksilosidaz enziminin ksiloz tarafından inhibe edildiği bildirilmiştir [169]. Kumar ve Ramon, (1996) *Aspergillus nidulans*'dan elde ederek saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin *p*NPX substratı ve D-ksiloz inhibitörü varlığında K_i değeri 25 mM olarak hesaplanmış ve β -ksilosidaz enziminin ksiloz tarafından %44 oranında inhibe edildiği bildirilmiştir [173].

Andrade ve ark., (2004) *Aspergillus versicolor*'dan elde ederek saflaştırdıkları β -ksilosidaz enziminin *p*NPX substratı ve ksiloz inhibitörü varlığında K_i değeri 5,3 mM olarak hesaplanmış ve β -ksilosidaz enzimine karşı ksilozun kompetatif tipte inhibisyon etkisi gösterdiği rapor edilmiştir [161]. Literatürde farklı kaynaklardan elde edilerek saflaştırılan β -ksilosidaz enziminin D-(+)-ksiloz/ksiloz inhibitörünün varlığında genellikle kompetatif (yarışmalı) tipte inhibisyon gösterdiği belirlenmiştir. Bu durum bizim test mikroorganizmalarımızdan *Trichoderma viride* NRRL 6418'den elde edilen sonuçlarla uyumlu olduğu halde, *Trichoderma harzianum* NRRL 13019'dan saflaştırılan β -ksilosidaz enzimi D-(+)-ksiloz inhibitörünün varlığında mix (karışık) tipte inhibisyon göstermiştir.

Mikroorganizmalardan elde edilen ksilanolitik enzimler, birçok endüstriyel işlemlerde biyoteknolojik potansiyellerinden dolayı büyük ilgi görmektedir. Kağıt ve kağıt hamuru başta olmak üzere gıda, tarım, hayvan yemi, tekstil endüstrileri, biyoyakıt üretimi, atık arıtım ve değerlendirme prosesleri ile farmakolojik olarak aktif polisakkarit üretimi gibi alanlarda temel endüstriyel enzim olma yolundadır.

Bu çalışmamız ile; *Trichoderma harzianum* NRRL 13019 ve *Trichoderma viride* NRRL 6418'den elde edilen fungal ksilanazın saflaştırılması ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi ile bilime ve endüstriye katkı sağlayacak sonuçların elde edildiğini söylemek mümkündür. Sonuç olarak; bilimsel faydalarının yanında yeni ve farklı enzim kaynaklarının ortaya çıkarılması, özellikle mikroorganizmalardan enzimlerin elde edilmesinin oldukça kolay ve düşük maliyetli olması, çalışmamıza endüstriyel açıdan da büyük bir önem kazandırmaktadır.

5. KAYNAKLAR

- [1] Kıran, Ö.E., Çömlekçioğlu, U., Dostbil, N., “Bazı Mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları”, KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi, 9, (1), 12-19, (2006).
- [2] Kravkaz Kuşcu İ.S., Karaöz M.Ö., “Soil Enzymes and Characteristics”, International Journal of Engineering Sciences & Research Tecnology, January, 34-38, (2015).
- [3] Topal, Ş., “Enzimler, mikrobiyolojik yolla enzim üretimi ve bu teknolojiye rennin’in yeri”, 10, (1), 25, (1985).
- [4] Ası, T., “Tablolarla Biyokimya”, 39-69, (1999).
- [5] Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B., “Microbial α -amylases: a biotechnological perspective”, Process Biochem., 1-18, (2003).
- [6] Bingöl, G., “Vitaminler ve Enzimler”, 42, (1977).
- [7] Kıran, Ö.E. ve Çömlekçioğlu, U., “Zeytinli Ilıcası (Kahramanmaraş)’ndan termofil alkafilik amilolitik *Bacillus* sp. suşlarının izolasyonu ve amilaz üretme yetenekleri üzerine azot kaynaklarının etkisi”, KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi, 6, (2), 41-48, (2003).
- [8] Rao, M.B., Tanksale, A.M. Gathe, M.S., Deshpande, W., “Molecular and biotechnological aspect of microbial proteases”, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62, (3), 597-635, (1998).
- [9] Gümüşel, F., “Biyoteknoloji, genetik ve sağlık sektörü”, Kocaeli Sanayii için teknolojik uzgörü ortak projesi, 73-135, (2002).
- [10] Godfrey, T., West, S., “Introduction to Industrial Enzymology”, (Godfrey, T. and West, S. editör) Industrial Enzymology, 2nd Edition, Stockton Pres, New York, (1996).

- [11] Schallmey, M., Singh, A., Ward, O.P., “Developments in the Use of *Bacillus* Species for Industrial Production”, *Canadian Journal of Microbiology*, 50, 1-17, (2004).
- [12] Fester, G., Detzel, C., Maas, R., “Industrial biotechnology-Markets and industry structure”, 18, 11-21, (2012).
- [13] Bhat, M.K., “Cellulase and related enzymes in biotechnology”, *Biotechnology Advances*, 18, (5), 355-383, (2000).
- [14] Aehle, W., “Enzymes in Industry Production and Application”, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 484, (2004).
- [15] Collins, T., Gerday, C., Feller, G. “Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases”, *FEMS Microbiology Reviews*, 29 (1), 3-23, (2005).
- [16] Gamerith, G., Groicher, R., Zeilinger, S., Herzog, P., Kubicek, C.P., “Cellulase-Poor Xylanases Produced by *Trichoderma reesei* RUT C-30 on Hemicellulose Substrates”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 315-322, (1992).
- [17] Yang, V.W., Zhuang, Z., Elegir, G., Jeffries, T.W., “Alkaline-active xylanase produced by an alkaliphilic *Bacillus* sp. _solat from kraft pulp”, *Journal of Industrial Microbiology*, 15, 434-441, (1995).
- [18] Salles, B.C., Cunha, R.B., Fantes, W., Sousa, M.V., Filho, E.X.F., “Purification and Characterization of a new xylanase from *Acrophialophora nainiana*”, *Journal of Biotechnology*, 81, 199-204, (2000).
- [19] Mountfort, D.O., Asher, R.A., “Production of xylanase by the ruminal anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*”, *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 1016-1022, (1989).
- [20] Yeğin, S., Büyükkilleci, A.O., “Mikrobiyal ksilanazlar ve gıda endüstrisinde kullanım alanları”, *Akademik Gıda*, 13, (4), 317-326, (2015).

- [21] Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L., Hoondal, G.S., “Microbial xylanases and their industrial applications: a review”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56, 326-338, (2001).
- [22] Wong, K.K.Y., Tan, L.U.L., Saddler, J.N. “Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: Functions and applications”, *Microbiological Reviews*, 52, 3, 305-317, (1988).
- [23] Gilbert, H.J., Hazlewood, G.P., “Bacterial cellulases and Xylanases”, *J. Gen. Microbiol.*, 139, 187-194, (1993).
- [24] Sorgatto, M., Guimaraes, N.C.A., Zanoelo, F.F., Marques, M.R., Peixoto-Nogueira, S.C., Giannese, G.G., “Purification and characterization of an extracellular xylanase produced by the endophytic fungus, *Aspergillus terreus*, grown in submerged fermentation”, *African Journal of Biotechnology*, 11, 32, 8076-8084, (2012).
- [25] Subramaniyan, S., Prema, P., “Cellulase-free xylanases from *Bacillus* and other microorganisms”, *FEMS Microbiology Letters*, 183, 1-7, (2000).
- [26] Yeğın, S., “*Aureobasidium pullulans* ile ksilanaz üretimine etki eden biyoproses parametrelerinin belirlenmesi”, *Gıda*, 42, 1, 67-75, (2017).
- [27] Adıgüzel, A.O., “Lignoselülozik materyallerden biyoetanol üretimi için kullanılan ön-muamele ve hidroliz yöntemleri”, *SAÜ. Fen Bilimleri Dergisi*, 17, 3, 381-397, (2013).
- [28] Yeğın, S., Büyükkilleci, A.O., “Mikrobiyal ksilanazlar ve gıda endüstrisinde kullanım alanları”, *Akademik Gıda*, 13, 4, 317-326, (2015).
- [29] Ahmed, S., Riaz, S., Jamil, A., “Molecular cloning of fungal xylanases: an overview”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 84, 19-35, (2009).
- [30] Subramaniyan, S., Prema, P., “Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology and application”, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 22, 33-64, (2002).

- [31] Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., Amorim, D. S., “Xylanases from fungi: properties and industrial applications”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67, 577-591, (2005).
- [32] Yang, V. W., Zhuang, Z., Elegir, G., Jeffries, T. W., “Alkaline-active xylanase produced by an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolated from kraft pulp”, *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 15, 434-441 (1995).
- [33] Kumar, D., Kumar, S.S., Kumar, J., Kumar, O., Mishra, S.V., Kumar, R., Malyan, S.K., “Xylanases and their industrial applications: a review”, *Biochem. Cell. Arch.*, 17, (1), 353-360, (2017).
- [34] Lin, J., Ndlovu, L.M., Singh, S., Pillay, B., “Purification and biochemical characteristics of β -D-xylanase from a thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*-SSBP”, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 30, 73-79, (1999).
- [35] Christov, L.P., Akhtar, M., Prior B.A., “Impact of xylanase and fungal pretreatment on alkali solubility and brightness of dissolving pulp”, *Holzforschung*, 50, 579-582, (1996).
- [36] Viikari, L., Ranva, M., Kantelinen, A., Sandquist, J., Linko, M., “Bleaching with Enzymes”, *Third International Conference in Biotechnology in Pulp And Paper Industry*, 16-19 June, Stockholm, 67-69, (1986).
- [37] Gessesse, A., “Purification and properties of two thermostable alkaline xylanases from an alkaliphilic *Bacillus* sp.”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 3533-3535, (1998).
- [38] Hongpattarakere, T., “Hyperthermostable cellulolytic and hemicellulolytic enzymes and their biotechnological applications”, *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 24, (3), 481-491, (2002).
- [39] Chen, X., Whitmire, D., Bowem, J.P., “Xylanase homology modeling using the inverse protein folding approach”, *Protein Sci.*, 5, 705-708, (1996).

- [40] Jeffries, T.W., Yang, V.W., Davis, M.W., “Comparative study of xylanase kinetics using dinitrosalicylic, arsenomolybdate, and ion chromatographic assays”, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 70, 72, 257-265, (1998).
- [41] Wong, K.K.Y., Richardson, J.D., Mansfield, S.D., “Enzymatic treatment of mechanical pulp fibers for improving paper making properties”, *Biotechnol. Prg.*, 16, 1025-1029,(2000).
- [42] Keskin, S.Ö., Sumnu, G., Sahin, S., “Usage of enzymes in a novel baking process”, *Nahrung/Food*, 2, 156-160, (2004).
- [43] Butt, M.S., Nadeem, M.T., Ahmad, Z., Sultan, M.T., “Xylanases and applications in baking industry”, *Food Technol. Biotechnol.* 46, (1), 22-31, (2008).
- [44] Güner, K.G., Dağlıoğlu, O., “Ksilanaz enziminin ekmek yapımında kullanımı”, *Türkiye 10. Gıda Kongresi, Erzurum*, 21-23 Mayıs (2008).
- [45] Kulkarni, N., Shendye, A., Rao, M., “Molecular and biotechnological aspects of xylanases”, *FEMS Microbiol.*, 23, 411-456, (1999).
- [46] Harris, A.D., Ramalingam, C., “Xylanases and its application in food industry a review”, *Journal of Experimental Sciences*, 1, (7), 1-11, (2010).
- [47] Rani, S., Nand, K., “Development of cellulase-free xylanase producing anaerobic consortia for the use of lignocellulosic wastes”, *Enzyme. Microb. Technol.*, 18, 23-28, (1996).
- [48] Moreau, R.A., Powell, M.J., Whitaker, B.D., Bailey, B.A., Anderson, J.D., “Xylanase treatment of plant cells induces glycosylation and fatty acylation of photosterols”, *Physiol. Plant.*, 91, 575-580, (1994).
- [49] Vazquez, M.J., Alonso, J.L., Dominquez, H., Parajo, J.C., “Xylooligosaccharides: manufacture and applications”, *Trends Food Sci. Technol.*, 11, 387-393, (2000).

- [50] Akpınar, O., Erdogan, K., Bostancı, S., “Production of xylo-oligosaccharides by controlled acid hydrolysis of lignocellulosic materials”, *Carbohydr. Res.*, 344, 660-666, (2009).
- [51] Khandeparker, R., Numan, M.Th., “Bifunctional xylanases and their potential use in biotechnology”, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 35, 635-644, (2008).
- [52] Dodd, D., Isaac, K., Cann, O., “Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production”, *GCB Bioenergy*, 1, 2-17, (2009).
- [53] Üstok, F.I., Tarı, C., Göğüş, N., “Katı kültür fermentasyon yöntemi ile *Aspergillus sojae* ATCC 20235 suşundan üretilen pektinaz enziminin optimizasyonu ve sıvı kültür yöntemiyle karşılaştırılması”, *Türkiye 9. Gıda kongresi*, 243-246, (2006).
- [54] Raimbault M., “General and microbiological aspects of solid substrate fermentation”, *EJB Electronic Journal of Biotechnology*, 717-3458, (1998).
- [55] Pandey, A., Bogar, B., Szakacs, G., Linden, J.C., Tengerdı, R.P., “Optimization of phytase production by solid substrate fermentation”, *Society for Industrial Microbiology*, 33, 183-189, (2003).
- [56] Pandey A., “Solid-state fermentation”, *Biochemical Engineering Journal*, 13, 81-84, (2003).
- [57] Gervais, P., Molin, P., “The role of water in solid state fermentation”, *Biochemical Engineering Journal*, 13, 85-101, (2003).
- [58] Hölker U., Höfer M., Lenz J., “Biotechnological advantages of laboratoryscale solid-state fermentation with fungi”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 175-186, (2004).
- [59] Bhargav, S., Panda, B.P., Ali, M., Javed, S., “Solid state fermentation: an overview”, *Chemical Biochemical Engineering*, 22, (1), 49-70, (2008).
- [60] Singhanıa, R.R., Patel, A.K., Soccol, C.R., Pandey, A., “Recent advances in solidstate fermentation”, *Journal Biochemical Engineering*, 44, 13-18, (2009).

- [61] Ganesh Kumar, A., Sekaran, G., Krishnamoorthy, S., "Solid state fermentation of *Achras zapota* lignocellulose by *Phanerochaete chrysosporium*", *Bioresource Technology*, 97, 1521-1528, (2006).
- [62] Osma, J.F., Herrera, J.L.T., Couto, S.R., "Banana skin: A novel waste for laccase production by *Trametes pubescens* under solid-state conditions. Application to synthetic dye decolouration", *Dyes and pigments*, 1-6, (2007).
- [63] Raghavarao, K.S.M.S., Ranganathan, T.V., Karanth, N.G., "Some engineering aspects of solid-state fermentation", *Biochemical Engineering Journal*, 13, 127-135, (2003).
- [64] Shankar, S.K., Mulimani, V.H. "α-Galactosidase production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation", *Bioresource Technology*, 98, 958-961, (2007).
- [65] Gomez, J., Pazos, M., Couto, S.R., Sanroman, M.A., "Chestnut shell and barley bran as potential substrates for laccase production by *Coriolopsis rigida* under solid-state conditions", *Journal of Food Engineering*, 68, 315-319, (2005).
- [66] Milagres, A.M.F., Santos, E., Piovan, T., Roberto, I.C., "Production of xylanase by *Thermoascus aurantiacus* from sugar cane bagasse in an aerated growth fermentor", *Process Biochemistry*, 39, 1387-1391, (2004).
- [67] Krishna, C., "Solid state fermentation system an overview", *Critical reviews in biotechnology*, 25, 1-30, (2005).
- [68] Uyar, F., Baysal, Z., "Production and optimization of process parameters for alkaline protease production by a newly isolated *Bacillus* sp. under solid state fermentation", *Process Biochemistry*, 39, 1893-1898, (2004).
- [69] Mukherjee, A.K., Adhikari, H., Rai, S.K., "Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid state fermentation (SSF) condition using imperate *Cylindrica* gres and potato peel as low-cost medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulation", *Journal Biochemical Engineering*, 39, 353-361, (2008).

- [70] Economou, C.N., Makri, A., Aggelis, G., Pavlou, S., Vayena, D.V., “Semi-solid state fermentation of sweet sorghum for the biotechnological production of single cell oil”, *Bioresource Technology*, 101, 1385-1388, (2010).
- [71] Couto, S.R., Sanromán, M.R., “Effect of two wastes from groundnut processing on laccase production and dye decolourisation ability”, *Journal of Food Engineering*, 76, 291-302, (2006).
- [72] George S., Roju, V. Subramanion, T.V., Jayaraman. K., “Comparative study of protease production in solid substrate fermentation versus submerged fermentation”, *BioprocessEngineering*, 16, 381-382, (1997).
- [73] Pandey A., Soccol, C.R., Mitchell, D., “New Developments in Solid State Fermentation: Bioprocesses and Products”, *Process Biochemistry*, 35, 1153-1169, (2000).
- [74] Perez-Guerra N., Torrado- Agrasar A., Lopez-Macias C., Pastrana L. “Main characteristics and applications of solid substrate fermentation”, *Electronic Journal of Environmental Agricultural and Food Chemistry*, 2, (3), (2003).
- [75] Rahardjo, Y.S.P., Korona, Haemers, D.S., Weber, F.J., Tramper, J.A., Rinzema, “Limitations of membrane cultures as a model solid-state fermentation system”, *Letters in Applied Microbiology*, 39, 504-508, (2004).
- [76] Pandey, A. “Comparison of phytase production on wheat bran and oilcakes in solid-state fermentation by *Mucor racemosus*”, *Concise encyclopedia of bioresource technology*, 16, 578-584, (2006).
- [77] Hölker, U., Höfer, M., Lenz, J., “Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64, 175-186, (2004).
- [78] Kumar, D.V., Jain, K., Shanker, G., Srivastava, A., “Utilisation of fruits waste for citric acid production by solid state fermentation”, *Process Biochemistry*, 38, 1725-1729, (2003).

- [79] Samuels, G.J., “*Trichoderma*: A review of biology and systematics of the genus”, *Mycological Research*, 100, 923-935, (1996).
- [80] Gupta V.K., Schmoll, M., Estrella, A.H., Upadhyay, R.S., Druzhinina, I., Tuohy, M.G., “Biotechnology and biology of *Trichoderma*, Elsevier publications, 1-32, (2014).
- [81] Kubicek, C.P., Harman, G.E., “*Trichoderma* and *Gliocladium* volume 1, 3-60, (2002).
- [82] Samuels, G.J., “*Trichoderma*: Systematics, The Sexual State, and Ecology”, *Phytopathology*, 96, 195-206, (2006).
- [83] Rıfai, M.A., “A Revision of the Genus *Trichoderma*”, *Mycological Papers*, 116, 1-56, (1969).
- [84] Bissett, J., “A revision of the genus *Trichoderma* II. Infrageneric classification”. *Canadian Journal of Botany*, 69, 2357-2372, (1991a).
- [85] Bissett, J., “A revision of the genus *Trichoderma* III. Section *Pachybasium*”, *Canadian Journal of Botany* 69, 2373-2417, (1991b).
- [86] Bissett, J., “A revision of the genus *Trichoderma* IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*”, *Canadian Journal of Botany* 69, 2418-2420, (1991c).
- [87] Hasenekeoğlu, İ., *Toprak Mikrofungusları* cilt 7, 213-237, (1991).
- [88] Pfannkoch, E.A., “The preparation of buffers and other solutions: a chemist’s perspective”, *Molecular Biology Solver: A Laboratory Guide*, 31-47, (2001).
- [89] Anthony, T., Raj Chandra, K., Rajendran, A., Gunesakaran, P., “High molecular weight cellulase free xylanase from alkali tolerant *Aspergillus fumigatus* AR1”, *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 647-654, (2003).

- [90] Jahan, N., Sultana, S., Adhikary, S.K., Rahman, S., Yasmin, S., “Evaluation of the growth performance of *Trichoderma harzianum* (Rifai) on different culture media”, IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science”, 3, 44-50, (2013).
- [91] Sirivastava, M., Singh, V., Shahid, M., Singh, A., Kumar, V., “Determination of biochemical and physiological aspects of a biocontrol agent *Trichoderma harzianum* Th azad”, Pfannkoch, International Journal of Advanced Research, 2, 3, 841-849, (2014).
- [92] Zhang, L., Liu, Y., Niu, X., Liu, Y., Liao, “Effects of acid and alkali treated lignocellulosic materials on cellulase/xylanase production by *Trichoderma reesei* RUT C-30 and corresponding enzymatic hydrolysis”, Biomass and Bioenergy, 37, 16-24, (2012).
- [93] Bitty, B.M., Nair, N.N., “Research article role of broth media on growth of *Aspergillus niger*”, International Journal of Recent Scientific Research, 5,12, 2283-2285, (2014).
- [94] Ikura, Y., Horikoshi, K., “Stimulatory effect of certain amino acids on xylanase production by alkalophilic *Bacillus* sp.”, Agric. Biol. Chem., 51, 11, 3143-3145, (1987).
- [95] Ahmed, S., Jabeen, A., Jamil, A., “Xylanase from *Trichoderma harzianum*: Enzyme Characterization and gene isolation”, Jour.Chem.Soc.Pak., 29, 2, 176-182, (2007).
- [96] Alves de Oliveira da Silva, L., Carmona, E.C., “Production and characterization of cellulase free xylanase from *Trichoderma harzianum*”, Appl.Biochem.Biotechnol., 150, 117-125, (2008).
- [97] Slifkin, M. and Cumbie, R., “Congo Red as a Fluorochrome for the Rapid Detection of Fungi”, Journal of Clinical Microbiology, 26(5), 827-830, (1988).

- [98] 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).
- [99] Teather, R.M. and 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).
- [100] Küçük, Ç., Kıvanç, M., “Isolation of Trichoderma Spp. And dtermination of their antifungal, biochemical and physiological features”, *Türk J.Biol.*, 27, 247-253, (2003).
- [101] Davidson, H.M. and Fishman, W.H., “A Simplified Purification Procedure for Human Prostatic Acid Phosphatase Based on pH and Ammonium Sulfate Fractionation.”, *J. Biol. Chem.*, 234(3), 526-528, (1958).
- [102] Tripathi, R.K., Devi, C.C. and Ramaiah, A., “pH-dependent Intercoversion of Two Forms of Tyrosinase in Human Skin”, *Biochem. J.*, 252, 481-487, (1988).
- [103] Çömlekçioğlu, U., Aygan, A., Yazdıç, F.C., Özköse, E., “Effect of various agro wastes on xylanase and b-xylosidase production of anaerobic ruminal fungi”, *Journal of Scientific & Industrial Research*, 70, 293-299, (2011).
- [104] Çömlekçioğlu, U., Aygan, A., Yazdıç, F.C., Keser, S., Kelleci, M.B., Battaloğlu, G., Özköse, E., “*Neocallimastix* sp. ve *Orpinomyces* sp.’nin enzim üretimleri üzerine karbon kaynaklarının etkisi”, *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 18, 5, 799-806, (2012).
- [105] Lembo, T., Azevedo, M.O., Jr. Bloch, C., Filho, E.X.F., “Purification and partial characterization of a new b-xylosidase from *Huminicola grisea* var *thermoidea*”, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 22, 475-479, (2006).

- [106] Poutanen, K., Puls, J., “Characteristics of *Trichoderma reesei* b-xylosidase and its use in the hydrolysis of solubilized xylans”, Appl. Microbiol. Biotechnol., 28, 425-432, (1988).
- [107] Sinan, S., “İnsan Serum Paraoksonaz Enziminin Yeni Bir Yöntemle Saflaştırılması ve Bazı Antibiyotiklerin Enzim Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması”, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2005).
- [108] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., “Protein Measurement with Folin Phenol Reagent”, Journal of Biological Chemistry, 193, 265-275, (1951).
- [109] Toker, N. Y., “Protein Saflaştırması ile İlgili Bazı Metotlar”, İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg., 26 (2), 403-412, (2000).
- [110] Ingraham, R.H., Lau, S.Y.M., Taneja, A.K., Hodges, R.S., “Denaturation and effects of temperature on hydro-phobic-interaction and reversed-phase high performance liquid chromatography of proteins”, Journal of Chromatography, 327, 77-92, (1985).
- [111] Xiong, H., Nyssöla, A., Janis, J., Pastinen, O., Weyman, N., Leisola, M., Turunen, O., “Characterization of the xylanase produced by submerged cultivation of *Thermomyces lanuginosus* DSM 10635”, Enzyme and Microbial Technology 35, 93-99, (2004).
- [112] Xiong, H., “Production and Characterization of *Trichoderma reesei* and *Thermomyces lanuginosus* xylanase”, Helsinki University of Technology Laboratory of Bioprocess Engineering, Technical Biochemistry Report, 1-46, (2004).
- [113] Sambrook, J. and Russel, D.W., “SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins”, Molecular Cloning, 3, 1-9, (2001).

- [114] Jiang, S., Liu, S., Zhao, C. and Wu C., “Developing Protocols of Tricine-SDS-PAGE for Separation of Polypeptides in the Mass Range 1-30 kDA with Minigel Electrophoresis System”, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 11, 640-649, (2016).
- [115] Törrönen, A., March, R.L., Messner, R., Gonzalez, R., Kalkkinen, N., Harkki, A., Kubicek, C.P., “The two major xylanase from *Trichoderma reesei*: characterization of both enzyme and genes”, Nature Publishing Group, 1461-1465, (1992).
- [116] Niepmann, M. and Zheng, J., “Discontinuous NATIVE Protein Gel Electrophoresis”, Institute of Biochemistry, 35392 Giessen, Germany, (2006).
- [117] Shukolyukov, S.A., “NATIVE Electrophoresis in Cell Proteomic: BN-PAGE an CN-PAGE”, *Cell and Tissue Biol.*, 5(3), 311-318, (2011).
- [118] Sridevi, B., Charya Singara, M.A., “Isolation, identification and screening of potential cellulose free xylanase producing fungi”, *African Journal of Biotechnology*”, 10, 22, 4624-4630, (2011).
- [119] Mutheshilan, R., Ashok, R., Jayalakshmi, S., “Production and optimization of thermostable alkaline xylanase by *Penicillium oxalicum* in solid state fermentation”, *African Journal of Biotechnology Research*”, 20-28, (2007).
- [120] Goyal, M., Kalra, K.L., Sareen, V.K., Soni, G., “Xylanase production with xylan rich lignocellulosic wastes by a local soil isolate of *Trichoderma viride*”, *Brazilian Journal of Microbiology*”, 39, 535-541, (2008).
- [121] Botella, C., Diaz, A., De Ory, I., Webb, C., Blandino, A., “Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation”, *Process Biochemistry*, 42, 98-101, (2007).
- [122] Senthilkumar, S.R., Ashokkumar, B., Chandra Raj, K., Gunasekaran, P., “Optimization of medium composition for alkali-stable xylanase production by *Aspergillus fischeri* Fxn 1 in solid state fermentation using central composite rotary design”, *Bioresource Technology*, 96, 1380-1386, (2005).

- [123] Sanghi, A., Kuhar, K., Kuhad, R.C., Gupta, V.K., “Optimization of xylanase production using inexpensive agro residues by alkalophilic *Bacillus subtilis* ASH in solid state fermentation”, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 633-640, (2008).
- [124] Ijaz, A., Anwar, Z., Zafar, Y., Hussain, I., Muhammad, A., Irshad, M. and Memood, S., “Optimization of Cellulase Enzyme Production from Corn Cobs Using *Alternaria alternata* by Solid State Fermentation”, *Journal of Cell and Molecular Biology*, 9(2), 51-56, (2011).
- [125] Kheng, P.P., Che Omar, I., “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).
- [126] Asic, A., Basic, L., Muhovic, I., Dogan, S. and Turan, Y., “Purification and Characterization of β -glucosidase from *Agaricus bisporus* (White Button Mushroom)”, *The Protein Journal*, 34 (6), 453-461, (2015).
- [127] Manzanares, P., Ramon, D., Querol, A., “Screening of non-Saccharomyces wine yeasts for the production of β -D-xylosidase activity”, *International Journal of Food Microbiology*, 46, 105-112, (1999).
- [128] Joseph A. Smith, Michael E. Scharf, Roberto M. Pereira, Philip G. Koehler,” Comparisons of Gut Carbohydrase Activity Patterns in *Reticulitermes flavipes* and *Coptotermes formosanus*”, *Sociobiology*, 53,1,(2009).
- [129] Inoue, T., Murashima, K., Azuma, J.L., Sugimoto, A., Slaytor, M., “Cellulose and xylan utilization in the lower termite *Reticulitermes speratus*”, *J. Insect Physiol.*, 43, 235-242, (1997).
- [130] Çömlekçioğlu, U., Yazdıç, F.C., Keser, S., Kelleci, B.M., Battaloğlu, G., Özköse, E., “*Neocallimastix* sp. ve *Orpinomyces* Sp.’nin enzim üretimleri üzerine karbon kaynaklarının etkisi”, *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 18, 5, 799-806, (2012).

- [131] Warburg, O., Christian, W., "Isolation and Crystallization of Enolase", *Biochem Z*, 310, 384-421, (1941).
- [132] Sudan, R., Bajaj K.B., "Production and biochemical characterization of xylanase from an alkali-tolerant novel species *Aspergillus niveus* RS2", *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 23, 491-500, (2007).
- [133] 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).
- [134] Shao, W., Wiegel, J., "Purification and Characterization of a Thermostable β -Xylosidase from *Thermoanaerobacter ethanolicus*", *American Society for Microbiology*, 174, 18, 5848-5853, (1992.)
- [135] Shao, W., Wiegel, J., "Purification and characterization of two thermostable acetyl xylan esterases from *Thermoanaerobacterium* sp. Strain JW/SL-YS485", *Applied and Environmental Microbiology*, 729-733, 8 (1995).
- [136] Nakamura, S., Wakabayashi, K., Nakai, R., Aono, R., Horikoshi, K., "Purification and some properties of an alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain 41M-1", *Applied and Environmental Microbiology*, 2311-2316, (1993).
- [137] Khasin, A., Alchanati, I., Shoham, Y., "Purification and characterization of a Thermostable xylanase from *Bacillus Stearothermophilus* T-6", *Applied and Environmental Microbiology*, 1725-1730, (1993).
- [138] Bachmann, S.L., McCarthy, A.J., "Purification and cooperative activity of enzymes constituting the xylan degrading system of *Thermomonospora fusca*", *Applied and Environmental Microbiology*, 2121-2130, (1991).
- [139] Arribas, A.R., Abalos-Fernandez, J.M., Sanchez, P., Garda, A., Santamaria, R., "Overproduction, Purification, and Biochemical Characterization of a Xylanase (Xys1) from *Streptomyces halstedii* JM8", *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 6, 2414-2419, (1995).

- [140] Rajaram, S., Varma, A., “Production and characterization of xylanase from *Bacillus thermoalkalophilus* grown on agricultural wastes”, *Appl Microbiol Biotechnol.*, 34, 141-144, (1990).
- [141] Ahmed, S., Imbad, S.S., Jamil, A., “Comparative study for the kinetics of extracellular xylanases from *Trichoderma harzianum* and *Chaetomium thermophilum*”, *Electronic Journal of Biotechnology*, 15, 3, 1-8, (2012).
- [142] Başaran, P., Özcan, M., “Characterization of b-xylosidase enzyme from a *Pichia stipitis* mutant”, *Bioresource Technology*, 99, 38-43, (2008).
- [143] Khandeparkar, R.D.S., Bhosle, N.B., “Isolation, purification and characterization of the xylanase produced by *Arthrobacter* sp MTCC 5214 when grown in solid-state fermentation”, *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 4, 732-742, (2006).
- [144] Lineweaver, H. and Burk, D., “This Week’s Citation Classic: The Determination of Enzyme Dissociation Constants”, *J.Amer. Chem. Soc.*, 56, 658-666, (1934).
- [145] Duenas, M.J., Estrada, P., “Immobilization of β -xylosidase from *Trichoderma reesei* QM 9414 on nylon powder”, *Biocatalysis and Biomimetic Chemistry*, 17, 139-161, (1998).
- [146] Ximenes, F.A., Silveira, F.Q.P., Ximenes, E., Filho, F., “Production of β -xylosidase activity by *Trichoderma harzianum* strains”, *Current Microbiology*, 33, 71-77, (1996).
- [147] Matsuo, M., Yasui, T., “Purification and some properties of β -xylosidase from *Trichoderma viride*”, *Agric. Biol. Chem.*, 48, 7, 1845-1852, (1984).
- [148] F., Wei, Song, R., Zhang, X., Zhang, X., Zhang, X., Wang, X., Fang, Z., Xiao, Y., “Characterization of a Novel β -Glucosidase from *Gongronella* sp. W5 and Its Application in the Hydrolysis of Soybean Isoflavone Glycosides”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 11688-11695, (2014).

- [149] Cao, J., “Biochemical Characterization of β -Xylan Acting Glycoside Hydrolases from the Thermophilic Bacterium *Caldicellulosiruptor sacharolyticus*”, The Degree of the Master of Science in Chemical Engineering, Dayton, Ohio, (2012).
- [150] Herrmann, M.C., Vrsanska, M., Jurickova, M., Hirsch, J., Biely, P. & Kubicek, C.P., “The β -D-xylosidase of *Trichoderma reesei* is a multifunctional β -D-xylan xylohydrolase”, *Biochemical Journal* 321, 375–381, (1997).
- [151] Zanoelo, F. F., Polizeli, M.L., Jorge, J.A. “Purification and biochemical properties of a thermostable xylosetolerant β -D-xylosidase from *Scytalidium thermophilum*”, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 31, 170-176, (2004).
- [152] Bowden Cornish, A., Eisenthal, R., “The direct linear plot a new graphical procedure for estimating enzyme kinetic paramaters”, *Biochem. J.*, 139, 715-720, (1974).
- [153] Rasmussen, L.E., Sorensen, H.R., Vind, J., Nilsen-Vikso, A., “Mode of action and properties of the β -xylosidase from *Talaromyces emersonii* and *Trichoderma reesei*”, *Biotechnology and Bioengineering*, 94, 5, 869-876, (2006).
- [154] Gomez, M., Isorna, P., Rojo, M., Estrada, P., “Kinetic mechanism of β -xylosidase from *Trichoderma reesei* QM 9414”, *Journal of molecular Catalysis B: Enzymatic*, 16, 7-15, (2001).
- [155] Haltrich, D., Nidetzky, B., kulbe, K.D., Steiner, W., Zupancic, S., “Production of fungal xylanases”, *Bioresource tecnology*, 58, 137-161, (1996).
- [156] Ja’afaru, M.I., “Screening of fungi isolated from environmental samples for xylanase and cellulase production”, *ISRN Microbiology*, (2013).

- [157] Abdel-Sater, M.A., El-Said, A.H.M., “Xylan-decomposing fungi and xylanolytic activity in agricultural and industrial wastes”, *International biodeterioration & biodegradation*, 47, 15-21, (2001).
- [158] Ninawe, S., Kapoor, M., Kuhad, R.C., “Purification and characterization of extracellular xylanase from *Streptomyces cyaneus* SN32”, *Bioresource technology*, 99, 1252-1258, (2008).
- [159] Lama, L., Calandrelli, V., Gambacorta, A., Nicolaus, B., “Purification and characterization of thermostable xylanase and β -xylosidase by the thermophilic bacterium *Bacillus thermantarcticus*”, *Research in microbiology* 155, 283-289, (2004).
- [160] Fengxia, L., Mei, L., Zhaoxin, L., Xiaomei, B., Haizhen, Z., Yi, W., “Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98”, *Bioresource technology*, 99, 5938-5941, (2008).
- [161] Andrade, S.V., Lourdes, M., Polizeli, T.M., “Effect of carbon source on the biochemical properties of β -xylosidases produced by *Aspergillus versicolor*”, *Process biochemistry*, 39, 1931-1938, (2004).
- [162] Pandey A., Selvakumar P., Soccol C.R., Nigam P., “Solid state fermentation for the production of industrial enzymes”, *Bioresource Technology*, 77, 149-162, (1999).
- [163] Smits, J.P., Rinzema, A., Tramper, J., Van Sonsbeek, H.M., Knol, W., “Solid-state fermentation of wheat bran by *Trichoderma reesei* QM9414: substrate composition changes, C balance, enzyme production, growth and kinetics”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 46, 489-496 (1996).
- [164] Lembo, T., Silva, R., Pagnocca, F.C., Gomes, E., “Production, characterization, and properties of β -Glucosidase and β -xylosidase from a strain of *Aureobasidium* sp.”, *Applied biochemistry and microbiology*, 38, 6, 639-643, (2002).

- [165] El-Gindy, A.A., Saad, R.R., Fawzi, E.M., “Purification of β -xylosidases from *Aspergillus tamaris* using ground oats and a possible application on the fermented hydrolysate by *Pichia stipitis*”, *Ann. Microbiol.*, 65, 965-974, (2015).
- [166] Inoue, H., Kitao, C., Yano, S., Sawayama, S., “Production of β -xylosidase from *Trichoderma asperellum* KIF125 and its application in efficient hydrolysis of pretreated rice straw with fungal cellulase”, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 32, 186 (2016).
- [167] Horta, M.A.C., Vicentini, R., Delabona, P.S., Laborda, P., Crucello, A., Freitas, S., Kuroshu, R.M., Polikarpov, I., Pradella, J.G.C., Souza, A.P., “Transcriptome profile of *Trichoderma harzianum* IOC-3844 induced by sugarcane bagasse”, *Plos one*, 9, 2, (2014).
- [168] Irfan, M., Nadeem, M., Syed, Q., “One-factor at a time (OFAT) optimization of xylanase production from *Trichoderma viride*-IR05 in solid-state fermentation”, *Journal of radiation research and applied sciences*, (2014).
- [169] Knob, A., Carmona, E.C., “Purification and properties of an acid β -xylosidase from *Penicillium sclerotiorum*”, *Ann. Microbiol.*, 62, 501-508, (2012).
- [170] Pinphanichakarn, P., Tangsakul, T., Thongnumwon, T., Talawanich, Y., Thamchaipenet, A., “Purification and characterization of β -xylosidase from *Streptomyces* sp. CH7 and its gene sequence analysis”, (2004).
- [171] Armand, S., Vieille, C., Gey, C., Heyraud, A., Zeikus, J.G., Henrissat, B., “Stereochemical course and reaction products of the action of β -xylosidase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* strain B6A-RI”, *Eur. J. Biochem.*, 236, 706-713, (1996).
- [172] Matsuo, M., Yasui, T., Kobayashi, T., “Purification and some properties of β -xylosidase from *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea* No.48”, *Agric. Biol. Chem.*, 41 (9), 1593-1599, (1976).

- [173] Kumar, S., Ramon, D., “Purification and regulation of the synthesis of a β -xylosidase from *Aspergillus nidulans*”, FEMS Microbiology Letters, 135, 287-293, (1996).
- [174] Lee, T.H., Lim, O.P., Lee, Y.E., “Purification and characterization of β -xylosidase from *Paenibacillus* sp. DG-22”, Journal of life science”, 17, 10, 1341-1346, (2007).
- [175] Nanmori, T., Watanabe, T., Shinke, R., Kohno, A., Kawamura, Y., “Purification and properties of thermostable xylanase and β -xylosidase produced by a newly isolated *Bacillus stearothermophilus* strain”, Journal of bacteriology”, 6669-6672, (1990).
- [176] Tuncer, M., “Characterization of β -xylosidase and α -L-Arabinofuranosidase activities from *Thermomonospora fusca* BD25”, Turk J.Biol., 24, 753-767, (2000).
- [177] Kiss, T., Kiss, L., “Purification and characterization of an extracellular β -D-xylosidase from *Aspergillus carbonarius*”, World Journal of Microbiology & Biotechnology, 16, 465-470, (2000).
- [178] Chakrabarti, S.K., Ranu, R.S., “Characterization of β -xylosidase from *Aspergillus terreus* (IJIRA 6.2), J. Plant iochemistry & Biotechnology, 4, 117-120, (1995).
- [179] Hudson, C., Schofield, L.R., Coolbear, T., Daniel, R.M., Morgan, H.W., “Purification and properties of an aryl β -xylosidase from a cellulolytic extreme thermophile expressed in *Escherichia coli*”, Biochem. J., 273, 645-650, (1991).
- [180] Hwa, J.K., Chun, Y.C., Lee, J.C., Park, S.H., Yoon, K.H., “Purification and characterization of the *Bacillus* sp. KK-1 β -xylosidase from a recombinant *Escherichia coli*”, J. Microbiol. Biotechnol. 8, (3), 258-263, (1998).
- [181] Saha, B.C., “Purification and properties of an extracellular β -xylosidase from newly isolated *Fusarium proliferatum*”, Bioresource Technology, 90, 33-38, (2003).