

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



***TRICHOTHECIUM ROSEUM*'DAN KATI SUBSTRAT
FERMENTASYONU İLE β -GLUKOSİDAZ ÜRETİMİ,
SAFLAŞTIRILMASI VE BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ**

EMRE YANIK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jüri Üyeleri : **Dr. Öğr. Üyesi Selma ÇELEN YÜCETÜRK (Tez Danışmanı)**
 Prof. Dr. Ayşe Dilek AZAZ (Eş Danışman)
 Prof. Dr. Alev HALİKİ UZTAN
 Doç. Dr. Aylin ER
 Doç. Dr. Hatice YILDIRIM

BALIKESİR, OCAK - 2020

KABUL VE ONAY SAYFASI

EMRE YANIK tarafından hazırlanan “*TRICHOTHECIUM ROSEUM*’DAN KATI SUBSTRAT FERMENTASYONU İLE β -GLUKOSİDAZ ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI VE BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 24 Ocak 2020 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / ~~oy çokluğu~~ ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Selma ÇELEN YÜCETÜRK
Balıkesir Üniversitesi

Eş Danışman

Prof. Dr. Ayşe Dilek AZAZ
Balıkesir Üniversitesi

Üye

Prof. Dr. Alev HALİKİ UZTAN
Ege Üniversitesi

Üye

Doç. Dr. Aylin ER
Balıkesir Üniversitesi

Üye

Doç. Dr. Hatice YILDIRIM
Balıkesir Üniversitesi

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

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Necati ÖZDEMİR

ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “*Trichothecium roseum*’dan Katı Substrat Fermentasyonu ile β -glukosidaz Üretimi, Saflaştırılması ve Biyokimyasal Özellikleri” başlıklı tezde;

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

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

Emre YANIK

(imza)


Bu tez çalışması Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından (BAP 2018/090) nolu proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

**TRICHOTHECIUM ROSEUM'DAN KATI SUBSTRAT FERMENTASYONU İLE
β-GLUKOSİDAZ ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI VE BİYOKİMYASAL
ÖZELLİKLERİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
EMRE YANIK
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**(TEZ DANIŞMANI:DR. ÖĞR. ÜYESİ SELMA ÇELEN YÜCETÜRK)
(EŞ DANIŞMAN:PROF. DR. AYŞE DİLEK AZAZ)
BALIKESİR, OCAK - 2020**

Bu çalışmada, Katı Substrat Fermentasyonu (KSF) kültür koşullarında pirinç kabuğunun substrat olarak kullanılmasıyla *Trichothecium roseum*'dan elde edilen β-glukosidaz enzimi, Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HEK) yöntemleriyle saflaştırılmıştır.

T. roseum'un KSF ortamında β-glukosidaz enzimi üretimi için ihtiyaç duyduğu optimum koşullar; nemlendirme sıvısı Disodyum Monohidrojen Fosfat (Na₂HPO₄); optimum pH 8,5; optimum sıcaklık 30°C ve optimum inkübasyon süresi 6 gün olarak belirlenmiştir.

Elde edilen β-glukosidaz enziminin saflaştırma oranı %27,24 verim ile 21,90 kat olarak hesaplanmıştır. Enzimin saflığı ve alt birim varlığı/sayısının kontrolü SDS-PAGE ve NATIVE-PAGE olmak üzere iki farklı elektroforetik yöntemin kullanılmasıyla sağlanmıştır. Saflaştırılan β-glukosidaz enziminin büyüklüğü SDS-PAGE görüntüsünde yaklaşık 38 ve 60 kDa bölgesinde iki bant olarak, NATIVE-PAGE görüntüsünde de yaklaşık 98 kDa bölgesinde tek bant olarak saptanmıştır. Bu verilere göre;β-glukosidaz enziminin 98 kDa büyüklüğünde ve iki alt üniteden oluştuğu saptanmıştır. β-glukosidaz enzim aktivitesinin belirlenmesinde ise *p*-nitrofenil-β-D-glukopiranosit (*p*NPG) substratı kullanılmış ve β-glukosidaz enziminin yüksek aktivite gösterdiği optimum pH değeri ve optimum sıcaklık değerleri sırasıyla pH 4,0 ve 55°C olarak tespit edilmiştir.

Saflaştırılmış enzimin K_m ve V_{max} değerleri ise sırasıyla 0,25 mM ve 1250 EU olarak belirlenmiştir. Ayrıca, β-glukosidaz enzimi üzerinde, D-(+)-glukoz ve δ-glukonolakton inhibitörlerinin, *p*NPG substratı varlığında iki inhibitörün de kompetitif (yarışmalı) tipte inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. D-(+)-glukoz inhibitörünün IC₅₀ ve K_i değerleri sırasıyla 6,20 mM ve 2,16x10⁻⁴ ± 1,0x10⁻⁴, δ-glukonolakton inhibitörünün IC₅₀ ve K_i değerleri ise sırasıyla 6,22 mM ve 8,71x10⁻⁶ ± 1,92x10⁻⁷ olarak belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: *Trichothecium roseum*, β-glukosidaz, Katı Substrat Fermentasyonu, Optimizasyon, Saflaştırma, Biyokimyasal Özellikler

ABSTRACT

β -GLUCOSIDASE PRODUCTION, PURIFICATION AND BIOCHEMICAL PROPERTIES OF *TRICHO THECIUM ROSEUM* BY THE SOLID STATE FERMENTATION

MSC THESIS

EMRE YANIK

BALIKESIR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

MOLECULAR BIOLOGY AND GENETIC

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

(CO-SUPERVISOR:PROF. DR. AYSE DILEK AZAZ)

BALIKESİR, JANUARY - 2020

In this study, the β -glucosidase enzyme was purified by ammonium sulfate precipitation and Hydrophobic Interaction Chromatography (HIC) which was obtained from *Trichothecium roseum* by using rice husk as substrate under culture conditions of Solid Substrate Fermentation (SSF).

Optimum conditions for the production of β -glucosidase enzyme from *T. roseum* by SSF medium; the humidifying liquid Disodium Monohydrogen Phosphate (Na_2HPO_4) was determined as optimum pH 8.5, optimum temperature 30°C and optimum incubation period of 6 days.

The purification rate of β -glucosidase enzyme obtained was calculated as 21.90 fold in 27.24% yield. The control of purity and subunit presence/number of enzyme was achieved by using two different electrophoretic methods, SDS-PAGE and NATIVE-PAGE. Size of purified β -glucosidase enzyme was detected as two bands in the SDS-PAGE image at approximately 38 and 60 kDa region, and as a singleband at the 98 kDa region in NATIVE-PAGE image. According to these data, it was found that the β -glucosidase enzyme consists of two subunits with a size of 98 kDa. In the determination of β -glucosidase activity, *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (*p*NPG) substrate was used and the optimum pH value and optimum temperature values of the β -glucosidase enzyme were determined as pH 4.0 and 55 °C, respectively.

K_m and V_{max} values of the purified β -glucosidase was determined as 0.25 mM and 1250 EU, respectively. In addition, it has been determined that the inhibitors D-(+)-glucose and δ -gluconolactone have a competitive effect on the β -glucosidase in the presence of the *p*NPG substrate. IC_{50} and K_i values of D-(+)-glucose inhibitor were 6.20 mM and $2.16 \times 10^{-4} \pm 1.0 \times 10^{-4}$ and IC_{50} and K_i values of δ -gluconolactone inhibitor were 6.22 mM and $8.71 \times 10^{-6} \pm 1.92 \times 10^{-7}$, respectively.

KEYWORDS: *Trichothecium roseum*, β -glucosidase, Solid State Fermentation, Optimization, Purification, Biochemical Properties

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	vi
TABLO LİSTESİ	vii
SEMBOL LİSTESİ	viii
ÖNSÖZ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1 Enzimlerin İsimlendirilmesi ve Sınıflandırılması	2
1.2 Selülozun Yapısı ve Özellikleri	4
1.3 Selülaz Enziminin Yapısı ve Özellikleri	4
1.4 β -glukosidazlar	8
1.4.1 β -glukosidazların Endüstriyel Uygulamaları	8
1.5 <i>Trichothecium</i> Cinsi Fungusların Genel Özellikleri	10
1.5.1 <i>Trichothecium</i> 'un Sınıflandırılması	11
1.5.2 <i>Trichothecium</i> 'un Karakteristik Özellikleri	11
1.6 Katı Substrat Fermantasyonu	12
1.7 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi	13
2. MATERYAL VE METOD	16
2.1 Materyal	16
2.1.1 Katı Besiyerinde Geliştirilen Mikrofungusun β -glukosidaz Aktivitesinin Belirlenmesi	16
2.1.1.1 <i>Trichothecium roseum</i> (Pers.) Link 1809	16
2.1.1.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	17
2.1.1.2.1 <i>Trichothecium roseum</i> 'un Geliştirilmesinde Kullanılan Besiyerleri.....	17
2.1.1.2.2 Katı Besiyerinde Geliştirilen Mikrofungusun Hidroliz Zon Büyüklüğünün Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	18
2.1.1.2.3 Spor Süspansiyonunda Kullanılan Çözelti	18
2.1.1.2.4 Katı Substrat Fermantasyon Ortamının Nemlendirme Sıvısı ve Optimum pH'sının Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	18
2.1.1.2.5 Ezim Aktivitesinin Ölçümünde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	19
2.1.1.2.6 Lowry Metoduyla Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	20
2.1.1.2.7 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HEK) Yönteminde Kullanılan Çözeltiler	21
2.1.1.2.8 SDS-PAGE Tekniğinde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	22
2.1.1.2.9 NATIVE-PAGE Tekniğinde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	24
2.1.1.2.10 SDS\NATIVE-PAGE'de Kullanılan Boyama Çözeltileri.....	26
2.2 Metod	27
2.2.1 Katı Besiyerinde Geliştirilen Mikrofungusun β -glukosidaz Aktivitesinin Belirlenmesi	27
2.2.2 Mikrofungusun Üretimi ve Spor Eldesi	27

2.2.3 Katı Substrat Fermantasyon Ortamının Hazırlaması	27
2.2.4 Katı Substrat Fermentasyonu Kültür Ortamına Ekim ve Kısmi Saflaştırılmış β -glukosidaz Enziminin Eldesi.....	28
2.2.5 Katı Substrat Fermentasyonu Kültür Ortamında Üretim Koşullarının Mikrofungustan β -glukosidaz Enzim Eldesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	28
2.2.5.1 Nemlendirme Sıvısı ve Optimum pH'nın Belirlenmesi	28
2.2.5.2 Optimum İnkübasyon Sıcaklığının Belirlenmesi	29
2.2.5.3 Optimum İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi	29
2.2.6 β -glukosidaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	29
2.2.7 Protein Miktarının Belirlenmesi.....	30
2.2.7.1 Warburg Metodu	30
2.2.7.2 Lowry Metodu.....	30
2.2.7.3 Bovin Serum Albumin (BSA) Standart Grafiğinin Hazırlanması.....	31
2.2.8 β -glukosidaz Enziminin Saflaştırma Basamakları	32
2.2.8.1 Amonyum Sülfat Çöktürmesi.....	32
2.2.8.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile β -glukosidaz Enziminin Saflaştırılması	33
2.2.9 Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin SDS -PAGE ve NATIVE-PAGE Yöntemi Kullanılarak Saflığının ve Alt Birim Varlığı/Sayısının Belirlenmesi	33
2.2.9.1 Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) Yöntemi Kullanılarak Saflığının ve Alt Birim Varlığı/Sayısının Belirlenmesi	34
2.2.9.2 Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi (NATIVE-PAGE) Yöntemi Kullanılarak Saflığının ve Alt Birim Varlığı/Sayısının Belirlenmesi	35
2.2.10 Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin Biyokimyasal ve Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi	36
2.2.10.1 Saflaştırılan β -glukosidaz Enzimine Farklı pH'ların Etkisinin Belirlenmesi.....	36
2.2.10.2 Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminine Farklı Sıcaklıkların Etkisinin Belirlenmesi	36
2.2.10.3 Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin Termal Kararlılığının Belirlenmesi.....	37
2.2.10.4 Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin <i>p</i> -nitrofenil- β -D glukopirenosit (<i>p</i> NPG) Substratına Karşı K_M ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi.....	37
2.2.10.5 Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin İnhibitörü Olarak Kullanılan D-(+)-glukoz ve δ -glukonolaktonun IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi	37
2.2.10.6 Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin İnhibitörü Olarak Kullanılan D-(+)-glukoz ve δ -glukonolaktonun K_i Değerlerinin Belirlenmesi	38
3. BULGULAR.....	39
3.1 Mikrofungusun Katı Besiyerinde β -glukosidaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	39
3.2 Katı Substrat Fermantasyon Ortamı Koşullarının Mikrofungustan β -glukosidaz Enzimi Üretimine Etkisi	39
3.2.1 Nemlendirme Sıvısı ve Optimum pH'nın Belirlenmesi.....	39
3.2.2 Optimum İnkübasyon Sıcaklığının Belirlenmesi	40
3.2.3 Optimum İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi	41
3.3 Katı Substrat Fermentasyonu Kültür Ortamına Ekim ve Kısmi Saflaştırılmış β -glukosidaz Enziminin Eldesi.....	43
3.4 β -glukosidaz Enziminin Saflaştırılması	43
3.4.1 Amonyum Sülfat Çöktürmesi	43
3.4.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi	45

3.5 <i>Trichothecium roseum</i> 'dan Elde Edilerek Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin Elektroferez Yöntemleri ile Saflığının ve Alt Birimlerinin Varlığının/Sayısının Kontrolü	48
3.6 <i>Trichothecium roseum</i> 'dan Elde Edilerek Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin ve Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi	49
3.6.1 <i>Trichothecium roseum</i> 'dan Elde Edilerek Saflaştırılan β -glukosidaz Enzimine Farklı pH'ların Etkisi	49
3.6.2 <i>Trichothecium roseum</i> 'dan Elde Edilerek Saflaştırılan β -glukosidaz Enzimine Farklı Sıcaklıkların Etkisi	50
3.6.3 <i>Trichothecium roseum</i> 'dan Elde Edilerek Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin Termal Kararlılığının Belirlenmesi	50
3.6.4 <i>Trichothecium roseum</i> 'dan Elde Edilerek Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin K_M ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi.....	51
3.6.5 <i>Trichothecium roseum</i> 'dan Elde Edilerek Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin Genel İnhibitörlerinin IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi	53
3.6.5.1 <i>Trichothecium roseum</i> 'dan Elde Edilerek Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin İnhibitörü Olan D-(+)-glukozun IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi	54
3.6.5.2 <i>Trichothecium roseum</i> 'dan Elde Edilerek Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin İnhibitörü Olan δ -glukonolaktonun IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi	56
3.6.6 <i>Trichothecium roseum</i> 'dan Elde Edilerek Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin Genel İnhibitörlerinin İnhibisyon Tiplerinin ve K_i Değerlerinin Belirlenmesi	58
3.6.6.1 <i>Trichothecium roseum</i> 'dan Elde Edilerek Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin İnhibitörü Olan D-(+)-glukozun İnhibisyon Tipinin ve K_i Değerinin Belirlenmesi .	59
3.6.6.2 <i>Trichothecium roseum</i> 'dan Elde Edilerek Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin İnhibitörü Olan δ -glukonolaktonun İnhibisyon Tipinin ve K_i Değerinin Belirlenmesi	64
4. TARTIşMA VE SONUÇ	69
5. KAYNAKLAR	80
ÖZGEÇMİş	94

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Selülozun selülaz enzimleriyle katalize edilen reaksiyonları.	6
Şekil 2.1: (a) <i>Trichothecium roseum</i> (petri 10x10), (b) <i>Trichothecium roseum</i> (10x40)	16
Şekil 2.2: Lowry metoduyla protein miktarlarının belirlenmesinde kullanılan BSA standart grafiği.....	31
Şekil 3.1: Katı substrat fermentasyonu kültür ortamında farklı pH'lardaki nemlendirme sıvılarının <i>Trichothecium roseum</i> 'dan β -glukosidaz enzimi üretimi üzerine etkisi.....	40
Şekil 3.2: Katı substrat fermentasyonu kültür ortamında farklı inkübasyon sıcaklıklarının <i>Trichothecium roseum</i> 'dan β -glukosidaz enzimi üretimi üzerine etkisi.	41
Şekil 3.3: Katı substrat fermentasyonu kültür ortamında farklı inkübasyon sürelerinin <i>Trichothecium roseum</i> 'dan β -glukosidaz enzimi üretimi üzerine etkisi.	42
Şekil 3.4: <i>Trichothecium roseum</i> 'dan elde edilen kısmi saflaştırılmış β -glukosidaz enziminin amonyum sülfat çöktürme aralıklarında enzim aktiviteleri ve protein miktarları.....	45
Şekil 3.5: Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi kullanılarak saflaştırılan <i>Trichothecium roseum</i> 'dan elde edilen β -glukosidaz enziminin elüsyon grafiği.	46
Şekil 3.6: <i>Trichothecium roseum</i> 'dan Hidrofobik Etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan β -glukosidaz enziminin (a) SDS-PAGE, (b) NATIVE-PAGE görüntüleri.	48
Şekil 3.7: Saflaştırılan β -glukosidaz enzimine farklı pH'ların etkisi.....	49
Şekil 3.8: Saflaştırılan β -glukosidaz enzimine farklı sıcaklıkların etkisi.....	50
Şekil 3.9: Saflaştırılan β -glukosidaz enziminin termal kararlılık grafiği.....	51
Şekil 3.10: <i>Trichothecium roseum</i> 'dan saflaştırılan β -glukosidaz enziminin K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği.....	53
Şekil 3.11: <i>Trichothecium roseum</i> 'dan saflaştırılan β -glukosidaz enziminin inhibitörü olan D-(+)-glukozun IC_{50} değeri grafiği.....	56
Şekil 3.12: <i>Trichothecium roseum</i> 'dan saflaştırılan β -glukosidaz enziminin inhibitörü olan δ -glukonolaktonun IC_{50} değeri grafiği.....	58
Şekil 3.13: Lineweaver-Burk grafiği üzerinde <i>T. roseum</i> 'dan saflaştırılan β -glukosidaz enzimine D-(+)-glukoz inhibitörünün farklı konsantrasyonlarının inhibisyon etkisi.....	63
Şekil 3.14: Lineweaver-Burk grafiği üzerinde <i>Trichothecium roseum</i> 'dan saflaştırılan β -glukosidaz enzimine δ -glukonolakton inhibitörünün farklı konsantrasyonlarının inhibisyon etkisi.....	68

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.1: Katı substrat fermentasyonu kültür ortamında farklı pH'lardaki nemlendirme sıvılarının <i>T.roseum</i> 'dan β -glukosidaz enzimi üretimi üzerine etkisi.	40
Tablo 3.2: Katı substrat fermentasyonu kültür ortamda farklı inkübasyon sıcaklıklarının <i>Trichothecium roseum</i> 'dan β -glukosidaz enzimi üretimi üzerine etkisi.	41
Tablo 3.3: Katı substrat fermentasyonu kültür ortamında farklı inkübasyon sürelerinin <i>Trichothecium roseum</i> 'dan β -glukosidaz enzimi üretimi üzerine etkisi.	42
Tablo 3.4: <i>Trichothecium roseum</i> 'dan elde edilen kısmi saflaştırılmış β -glukosidaz enziminin amonyum sülfat çöktürme aralıklarında enzim aktiviteleri ve protein miktarları.....	44
Tablo 3.5: <i>Trichothecium roseum</i> 'dan elde edilen β -glukosidaz enziminin saflaştırma tablosu.....	47
Tablo 3.6: <i>Trichothecium roseum</i> 'dan saflaştırılan β -glukosidaz enziminin K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesinde kullanılan değerler.	52
Tablo 3.7: <i>Trichothecium roseum</i> 'dan saflaştırılan β -glukosidaz enziminin K_M , V_{max} ve.	53
Tablo 3.8: <i>Trichothecium roseum</i> 'dan saflaştırılan β -glukosidaz enzimi inhibitörü D-(+)-glukozun IC_{50} değerinin belirlenmesinde kullanılan çözelti miktarları ve elde edilen sonuçlar.	55
Tablo 3.9: <i>Trichothecium roseum</i> 'dan saflaştırılan β -glukosidaz enzimi inhibitörü δ -glukonolaktonun IC_{50} değerinin belirlenmesinde kullanılan çözelti miktarları ve elde edilen sonuçlar.....	57
Tablo 3.10: <i>Trichothecium roseum</i> 'dan saflaştırılan β -glukosidaz enzimi inhibitörü D-(+)-glukoz'un K_i değerinin belirlenmesinde kullanılan çözelti miktarları ve elde edilen sonuçlar.	60
Tablo 3.11: <i>Trichothecium roseum</i> 'dan saflaştırılan β -glukosidaz enzimi inhibitörü δ -glukonolakton'un K_i değerinin belirlenmesinde kullanılan çözelti miktarları ve elde edilen sonuçlar.	65

SEMBOL LİSTESİ

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

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle her aşamada bana yol gösteren ve her konuda destek olan, her türlü ilgiyi, yardımı ve fedakârlığı gösteren hocalarım Prof. Dr. Ayşe Dilek AZAZ'a ve Dr. Öğr. Üyesi Selma ÇELEN YÜCETÜRK'e teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca her türlü olumlu veya olumsuz koşullarda her zaman yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Murat GÜNAL, Kübra PASPAL, Saliha Derya KESKİN ve Candan ALTUNTAŞ'a teşekkür ederim.

Hayatımın her anında yanımda bulunan ve koşulsuz destekle benim bugünlere gelmemi sağlayan annem Aysel YANIK, babam Nuri YANIK, kardeşlerim Ebru YANIK ve Enes YANIK'a teşekkür ederim.

Balıkesir, 2020

Emre YANIK

1. GİRİŞ

Enzimler, belirli bir biyokimyasal reaksiyonda katalizör görevi gören canlı bir organizma tarafından üretilen makromoleküllerdir. Hücre içerisinde olduğu kadar hücre dışında da biyolojik ve biyokimyasal reaksiyonları hızlandırmaya yardımcı olan enzimler genellikle "Biyokatalizör" olarak da bilinirler [1]. Bilinen tüm enzimler, temel olarak peptid bağlarıyla bağlantılı amino asit zincirlerinden meydana gelen yüksek molekül ağırlıklı bileşikler olan protein yapısındadırlar [2].

Doğada bulunan enzimler antik zamanlardan beri peynir, hamur mayası, bira, şarap ve sirke gibi gıda ürünlerinin üretiminde ve deri, keten gibi giyim materyallerin işlenmesinde kullanılmıştır [3]. Enzimlerin çeşitli kullanım alanlarıyla ilgili özel bilgiler zanaatkarlar, ev hanımları ve aşçılar tarafından nesilden nesile aktarılmıştır [4]. Aynı zamanda ekmeğin mayalanarak pişirilmesi, mayalanmış likörlerin hazırlanması, üzüm suyunun şarap yapımı için fermantasyonu, süttten peynir yapımı ve peynir suyu eldesi, papaya meyvelerinde bulunan papainle etin yumuşatılması gibi uygulamalar antik çağlardan beri insanlar tarafından kullanılmaktadır [5,6,7].

Fransız kimyager Anselme Payen'nin 1833 yılında diyastaz enzimini bulmasıyla enzimlerle ilgili çalışmalar hız kazanmıştır [8]. Jons Jacob Berzelius tarafından 1835 yılında nişastanın diyastazla hidrolizinin katalitik bir reaksiyon olduğu tanımlandıktan sonra, 1836 yılında Alman fizyolog Theodor Schwann, sindirim enzimi pepsini keşfetmiştir [9,10]. Louis Pasteur, Ferdinand Cohn ve Robert Koch ile birlikte 1862'de mayalar tarafından şekerin alkole fermantasyonunu araştırırken, fermantasyonun sadece canlı maya hücrelerinde bulunan bir güç tarafından katalizlediğini belirtmişler ve bu güce "Ferment" demişlerdir [1]. Hans ve Eduard Buchner kardeşler ise 1897 yılında glukozun etanole dönüşümünün hücresiz ortamda mayalardan elde edilen ekstraktlardaki kimyasal maddeler (enzimler) tarafından yapılabileceğini göstermişlerdir. Danimarka'lı kimyager Christian Hanse'de 1870 yılında buzağların midesinden elde etmeyi başardığı saf peynir mayasının peynir yapımında kullanımını sağlanmasıyla hem ürün miktarı hem de kalitesinde önemli gelişmelere yol açtı. Peynir mayası üretimini sanayileştirmesiyle de enzimler üretim endüstrisine hareket ve hız kazandırdı [10].

Her ne kadar yüzyıllar önce bile insanlar enzimlerden çeşitli alanlarda faydalanmış olsalar da Yunanca bir kelime olan “enzim” terimi bilimsel terminolojiye 1877’de Wilhelm Friedrich Kühne tarafından kazandırılmıştır [1].

Günümüzde bitkisel, hayvansal ve mikroorganizma kaynaklı ve belirli bir kimyasal tepkime türü için özgül yaklaşık 4000 enzim bilinmekte olup bunların yaklaşık olarak 200 kadarı ticari olarak kullanılmaktadır [11,12]. Mikroorganizma kaynaklı enzimlerin ise dünya genelinde yıllık kullanımına bakıldığında %25 alkalın proteazların, %21 diğer proteazların, %18 amilaz, %10 renin, %3 tripsin, %3 lipaz, %10 oranında diğer karbonhidrat parçalayan enzimlerin (selülaz ve ksilanaz gibi) ve %10 oranında da analitik ve farmasötik enzimlerin kullanıldıkları dikkati çekmektedir [13].

1.1 Enzimlerin İsimlendirilmesi ve Sınıflandırılması

Uluslararası Biyokimya Birliği’nin 1956’da kurulmasından önce aynı enzime çeşitli isimler verilebildiğinden bazı karışıklıklara neden oluyordu. Bu karışıklığı önlemek için Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) ile birlikte Uluslararası Enzim Komisyonu’nu kuruldu. Bu komisyon tarafından enzimlerin etkiledikleri reaksiyonlara göre isimlendirilip sınıflandırılmalarının yapılması ve enzim listesine kabul edilen her enzime sistematik bir ad ve Enzim Kodu (EC) numarası verilmesi önerilmiştir [14].

Enzim sınıflandırma ve isimlendirmesi ile ilgili ilk kitabın 1961’de yayınlanmasından sonra 1984’de bazı kritik güncellemeler bültenler halinde duyuruldu. Son (altıncı) revizyonun ise 1992’de yayınlanmasının ardından, bir başka güncelleme elektronik ortamda 2000 yılında yayınlandı [15]. İnternetin gelişmesiyle birlikte enzim sınıflandırma ve isimlendirmesi hakkında en güncel bilgilere Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliğinin (<https://iubmb.org/>) web sitesinden ulaşmak mümkün hale gelmiştir [14].

Enzimlerin isimlendirilmesinde ilk prensip az (-ase) takısı ile biten isimlerin sadece tek enzim için kullanılmasıdır. İkinci prensip enzimler, katalize ettikleri reaksiyona göre sınıflandırılır ve adlandırılır. Üçüncü prensip enzimler, katalize edilen reaksiyonların tipine göre gruplara ayrılır [14].

Enzim Komisyonununun 1961'deki ilk raporunda, enzimlere EC kodlarının atamasına temel oluşturan bir sistem geliştirdi. Yaygın olarak kullanımda olan bu kod numaraları (EC) dört öge içerir:

1. İlk sayı, enzimin altı anasınıftan hangisine ait olduğunu,
2. İkinci sayı, enzimin alt sınıfını,
3. Üçüncü sayı enzimin ikinci alt sınıfını gösterir,
4. Dördüncü rakam ise enzimin altsınıfındaki seri numarasıdır [15].

Bu sistemde enzimler etki ettikleri reaksiyon mekanizmalarına yani ilk rakamlarına göre altı sınıfa ayrılırlar:

Oksidoredüktazlar (E.C.1): Oksidoredüktazlar, oksidasyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimleri içerir. Oksitlenmiş substrat hidrojen veya elektron donörü olarak kabul edilir.

Transferazlar (E.C.2): Moleküllerin yapılarında bulunan hidrojen dışındaki belirli grupların bir molekülden diğerine aktarılmasını sağlarlar.

Hidrolazlar (E.C.3): Ester, eter, peptid, glikozid, anhidrit, C-halojenür veya P-N bağlarının bir H₂O molekülünün katılmasıyla hidrolizini katalizleyen enzimlerdir.

Liyazlar (E.C.4): Liyazlar hidroliz veya oksidasyondan başka yollarla C-C, C-O, C-N ve diğer bağları parçalayan enzimlerdir.

İzomerazlar (E.C.5): Bu enzimler, bir molekül içindeki geometrik veya yapısal değişiklikleri katalize eder. İlgili izomerizm türüne göre, bunlar rasemaz, epimeraz, cis-trans izomeraz, izomeraz, tautomeraz, mutaz veya sikloizomeraz olarak adlandırılabilir.

Ligazlar (E.C.6): Ligazlar, iki molekülün ATP veya benzeri bir trifosfat içindeki difosfat bağının hidrolizi ile birleştirilmesini katalize eden enzimlerdir. Oluşan bağlar genellikle yüksek enerjili bağlardır. "Ligaz" ortak ad için yaygın olarak kullanılır, ancak birkaç durumda "sentaz" veya "karboksilaz" kullanılır [14, 15, 16].

1.2 Selülozun Yapısı ve Özellikleri

Selüloz, bitki biokütlesinde en çok bulunan bileşendir. Doğada neredeyse sadece bitki hücre duvarlarında bulunur, nadiren bazı hayvanlar tarafından da üretilir, örneğin, Urochordata, ayrıca selüloz az sayıda bakteri türünde de bulunur [17]. Selülozu Fransız kimyacı Anselme Payen, bitki dokularını öncelikle asit ve amonyak ile muamele edip daha sonra su ve alkol ile ekstre ederek izole edip keşfetmiş, ilk kez “selüloz” terimini kullanmış ve moleküler formülünü “C₆H₁₀O₅” olarak element analiziyle belirlemiştir [18,19].

Selüloz suda tamamen çözünmez, β 1-4 glikosidik bağlarla birleştirilmiş glikoz altbiriminden oluşan doğrusal, dallanmamış bir homopolisakkarittir [20]. Bireysel selüloz molekülleri (polimer) uzunluk bakımından geniş ölçüde değişir ve genellikle demetler veya fibriller halinde düzenlenir [21]. Demetler halindeki selüloz molekülleri, kristalin veya parakristalin (amorf) yapılarda oluşabilir [22]. Fotosentez işlemi yoluyla bitki biokütlesinin sürekli olarak yenilenmesi, selüloz gibi bitkisel moleküllerin tükenmez bir şekilde tedarik edilmesini sağlar. Selülotik materyali etkili ve ekonomik olarak glukozu kadar parçalayabilen herhangi bir işlemin endüstride birçok açıdan önemi büyüktür [21].

Günümüzde bitki biokütlesi, insanlık için tek sürdürülebilir yakıt ve malzeme kaynağı olarak kabul edilmektedir. Ayrıca selülozik malzemeler maliyet açısından avantajlı ve bol miktarda elde edilebilir olması nedeniyle ilgi çekicidir. Selülozik biyokütlenin yaygın kullanımı için düşük maliyetli teknolojinin yetersizliği bu önemli kaynağın daha yaygın kullanımını engellemektedir. Bu engelin üstesinden gelmek için geliştirilen umut verici stratejiler; selülotik enzimlerin üretimi, biyokütlenin hidrolizi ve elde edilen şekerlerin istenen ürünlere fermantasyonunu selülotik mikroorganizmalar veya mikroorganizmaların iş birliği ile tek bir işlem adımıyla gerçekleştirilmesidir. Bu tür birleşik biyoproseslerde gerekli substrat kullanımı ve ürün oluşturma özelliğine sahip mikroorganizmalar geliştirilmesi düşük maliyetli teknolojinin geliştirilmesinde büyük önem taşımaktadır [17].

1.3 Selülaz Enziminin Yapısı ve Özellikleri

Selüloz yıkımındaki ilk adım, polimerlerin enzimatik hidrolizidir. Hidrolizle ilgili enzim veya enzim kompleksine selülazlar adı verilmiştir [23]. Mikroorganizmaların çözünmeyen selülozu hidrolize etmesi ve metabolize etmesi için, serbest veya hücre ile ilişkili olan hücre dışı selülazların üretilmesi gerekir. Selülaz sistemlerinin aerobik ve anaerobik bakteri ve mantarlardan biyokimyasal analizi, son yirmi yılda kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Selülaz

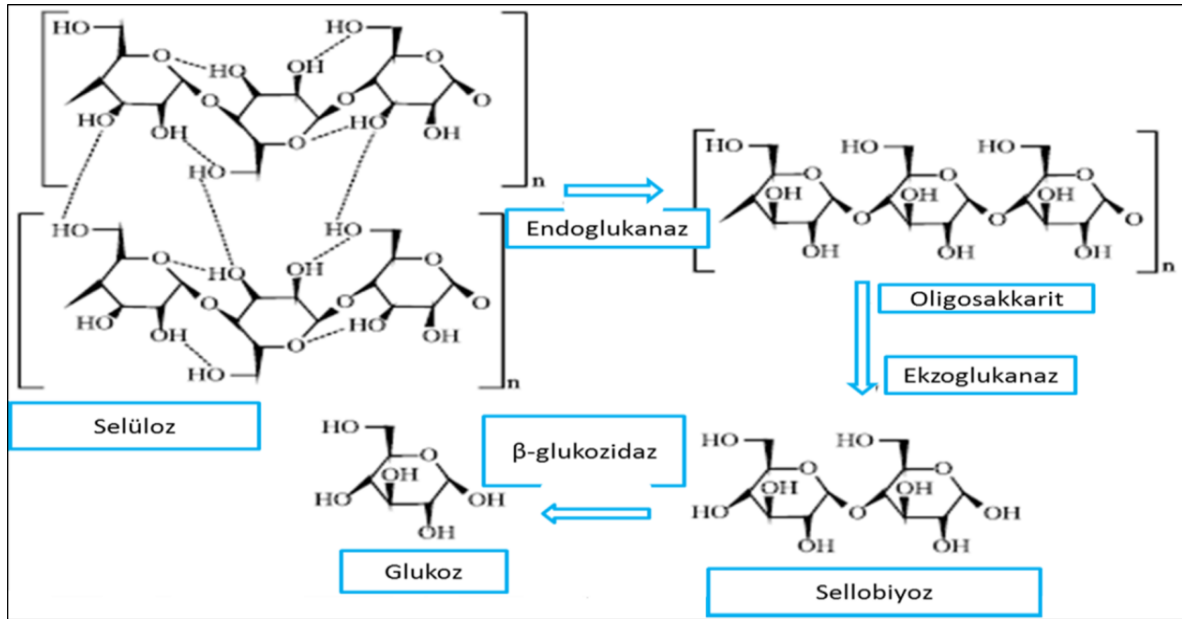
sistemlerinin bileşenleri ilk önce katalitik etki tarzlarına göre sınıflandırılmış ve daha yakın zamanda yapısal özelliklere göre sınıflandırılmıştır [24].

Selüloz sistemi birden fazla farklı enzimden oluşmaktadır. Selülozun glukoza hidrolizi en az üç farklı enzimin sinerjistik çalışması ile gerçekleşmektedir [17]; Bu enzimler; endoglukanazlar (E.C. 3.2.1.4), ekzoglukanazlar E.C. 3.2.1.91), ve β -glukosidazlardır(E.C. 3.2.1.21) [17,25].

Endoglukanazlar, selüloz polisakarit zincirindeki dahili amorf bölgelerde rastgele keserek çeşitli uzunluklarda oligosakaritler ve bunun sonucunda yeni zincir uçları oluşturur. Bu yeni zincir uçları daha sonra diğer selüloz enzimleri tarafından kolayca reaksiyona uğrar. Bu enzimin en yüksek aktivitesi genellikle çözünür selüloz formlarına veya asitle muamele edilmiş amorf selüloza karşı meydana gelir [17].

Ekzoglukanazlar selüloz polisakarit zincirlerinin indirgeyici veya indirgeyici olmayan uçları üzerinde etkilidir ve ana ürünler olarak glukozu veya sellobiyozu açığa çıkarırlar. Ekzoglukanlar ayrıca, selüloz zincirlerini mikrokristal yapıdan ayıran mikrokristalli selüloza da etkilidir[17,25,26].

β -glukosidazlar ise ekzoglukanazların parçalaması sonucu ana ürün olarak açığa çıkan sellobiyozu glukoz monomerine dönüştürürler [27].



Şekil 1.1: Selülozun selülaaz enzimleriyle katalize edilen reaksiyonları.

Selülazlar, endüstriyel uygulamalarda büyük bir potansiyele sahiptirler. Selülozik substrattan üretilen glukoz, etanol, bütanol, metan vb. değerli son ürünlerin üretilmesinde fermantasyon veya diğer işlemler için substrat olarak kullanılabilir [21].

Gıda endüstrisinde selülazlar, meyve ve sebze sularının ekstraksiyonunda ve berraklaşmasında, meyve nektarlarının ve pürelerin üretiminde ve zeytinyağının ekstraksiyonunda kullanılırlar [28]. Ayrıca selülazlardan, gıda renklendirici olarak kullanılmak üzere karotenoid ekstraksiyonda da yararlanılır [29].

Yem sanayisinde selülazlar, hemiselülaaz ve pektinaz ile birlikte kullanıldığında yemlerin besleyici özelliğini arttığı anlaşılmıştır [29]. Bedford ve arkadaşları (2003), *Trichoderma*'dan elde edilen selülaz enziminin yemin besleyici özelliğini arttırdığını ve tahıl bazlı yemlerin sindirimini kolaylaştırdığını bunun için yem katkı maddesi kullanılabileceğini belirlemişlerdir [30].

Kağıt endüstrisinde de selülazların kullanılması son yıllarda önemli ölçüde artmıştır [31]. Odunsu hammaddelerin rafine edilmesi ve öğütülmesi gibi mekanik kağıt hamur işleme işlemleri, büyük oranda enerji gerektirir ve kirliliğe yol açar. Buna karşın, selülazlar kullanılarak kağıt hamuru yapımındaki biyomekanik işlemlerde, rafine edilme sırasında önemli miktarda enerji tasarrufu (%20-40) sağlanmış ve ayrıca, mukavemet özelliklerinde

iyileştirmeler sağlanmıştır [32,33,34,35]. Günümüzde selülazlar, tek başlarına veya ksilanazlar ile kombine olarak farklı kağıt atıklarının mürekkepten arındırılması işlemlerinde de kullanılmaktadır [36].

Bazı mikroorganizmalar selüolitik enzimler sentezleyebilir. Özellikle bazı funguslar ve bakteriler, selüloz parçalanmasındaki doğal ajanlardır [20]. Selüloz parçalayabilen organizmaları aerobik ve anaerobik mezofilik bakteriler, filamentli funguslar, termofilik ve alkaliptik bakteriler, aktinomisetler ve bazı tek hücreler oluşturur [23]. Fakat funguslar genel olarak organik maddenin ve özellikle selülozik substratın parçalanması için bilinen en iyi ajanlardır [17].

Çeşitli çalışmalarda, özellikle *Trichoderma reesei*'den elde edilen endoglukanaz varyantlarının deterjanlarda kullanım için uygun olduğunu gösterilmiştir [37]. *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum* ve *Aspergillus niger* selülazların endüstriyel olarak kullanılmasındaki diğer doğal kaynaklarıdır. Selülazlar, özellikle endoglukanaz ve selobiohidrolaz, tekstil temizliği için deterjanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Çoğunlukla *Humicola* türlerine (*H. insolens* ve *H. grisea* var. *thermoidea*) ait alkalifilik ve termofilik selülazlar, yıkama tozlarında ve deterjanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır [38].

Tekstil endüstrisinde de selülaz enziminden yararlanılmaktadır. Geleneksel olarak kullanılan sünger taşlarının yerine kot kıyafetlerinin yumuşaklığını ve soluk görünümünü vermek için “Biyotaşlama” kullanılır [35]. *H. insolens*'den elde edilen selülazlar, biyotaşlama işleminde yaygın şekilde kullanılmaktadır, bununla birlikte *Trichoderma*'dan elde edilen asidik selülazlarda proteazlarla birlikte kullanıldığında aynı etkiyi yaratmaktadır. Selülazlar, kumaştaki küçük elyaf uçlarını sindirmek için kullanılır ve daha iyi bir yüzey elde edilir. Selülazlar aynı zamanda kumaşların sertliğini gidermede, defibrilasyon ve liflerin renk yoğunluğunda lokalize değişiklikler sağlayan işlemlerde de kullanılmaktadır [39,40].

Biyogaz (metan), mevcut diğer herhangi bir biyoyakıt türünden (örn., biyodizel, biyoetanol) daha fazla enerji üretme potansiyeline sahiptir. Biyogaz, birçok lignoselülozik biokütleden üretilir [41,42]. Yapılan çalışmalarda mısır, buğday, çavdar, ayçiçeği ve diğer lignoselülozik biokütle çeşitlerinin biyogaz üretimi için verimli bir şekilde kullanılabileceği anlaşılmıştır [43]. Selülozik enzimlerin ya da mikroorganizmaların lignoselülozik biokütleye

uygulanması, ayrışma sürecini hızlandırabilir ve bu da biyogaz üretimini mümkün kılabilir [44].

1.4 β -glukosidazlar

β -glukosidazlar (EC 3.2.1.21), β 1,4-glikozidik bağın hidrolizini katalize eder ve sellobiyoz ve oligosakkaritlerin indirgenmeyen uçlarından D-glukoz salgılar [45,46]. Selülaz sisteminin bir parçası olarak görev yapan β -glukosidaz, sellobiyozun endo ve ekso- β -glukanazların inhibisyonunu etkileyerek selüloz hidrolizinin hızını ve derecesini düzenler [45,47,48]. β -glukosidaz enzimi, kozmetik, tekstil, deterjan, hayvan yemi, tütün ve gıda endüstrileri, doğal polimer modifikasyonları, organik kimyasal sentez ve atık kağıttan baskı mürekkebinin çıkarılması gibi yaygın uygulamalarından ötürü önemli endüstriyel değerler taşımaktadır [49,50].

β -glukosidaz'ın farklı glikosidik substratları kullanabilme kabiliyeti, fermente edilebilir şekerlerin elde edilmesi için selülozun enzimatik hidrolizi sağlayarak çeşitli endüstriyel prosesler için uygun hale getirir. Enzim, soya türevli fonksiyonel gıdaların üretimi ve ayrıca şarap ve diğer üzüm türevlerinin aromatik kalitesini artıracak meyve suyu ve içecek endüstrisinde de kullanılır [49].

1.4.1 β -glukosidazların Endüstriyel Uygulamaları

Selülaz enzim kompleksinin bir parçası olarak β -glukosidazlar sellobiyozu ve selooligosakkaritleri glikoza hidrolize ederler [51]. β -glukosidaz enzimi hem hidrolitik aktivite hemde sentez aktivitesinde rol oynamaktadır [52]. Bundan dolayı β -glukosidaz enzimi birçok biyolojik yollarda görev alır. Bu biyolojik olayların bazıları hücre sinyalizasyonu, yapısal ve depo polisakaritlerinin biyosentez ve yıkımı, konukçu-patojen etkileşimidir [53]. β -glukosidazlar, disakaritlerin β (1-4) glikosidik bağlarının, örneğin, sellobiyoz, oligosakkaritler ve yapısında glikoz bulunan moleküllerin hidrolizinde bulunduğu gibi bazı yeni β -glukosidaz β (1-3), β (1-6), β (1-2) bağları gibi bağları da hidrolize edebilirler. Bu özelliklerinden dolayı biyoteknolojik işlemlerde de önemli bir enzimdir [52].

Artan enerji tüketimi talebi ve fosil kaynakların tükenmesi, sürdürülebilir biyoyakıt üretimine yönelmeyi sağlamıştır [54]. Biyoyakıt için bol ve ucuz bir malzeme olarak özel enerji bitkileri veya selülozik tarımsal atık şeklinde bitki biyokütle kullanımı, endüstrinin yeni arge çalışmalarındandır. Li ve ark., (2014) *Miscanthus sinensis* (Çin kılıçotu) ile beslenen sığırların

işkembelerinde bulunan mikroorganizmalardan β -glukosidaz enzimini saflaştırarak karakterize etmişler ve bu bitkinin ideal bir biyoyakıt kaynağı olarak kullanılabilceğini tespit etmişlerdir [55]. Selülozdan etanol üretimi, selülozun selooligosakaritlere ve glikoza parçalanması, ardından glikozun mikroorganizmalar tarafından etanole dönüştürülmesi yoluyla gerçekleştirilir [51]. β -glukosidazın polimer nanofiberlere kaplanması da selülozik etanol üretimi için daha verimli bulunmuştur [56].

β -glukosidazlar, lezzet ve aroma iyileştirmek için içecek endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Bitkilerde bulunan yüzlerce farklı β -glukosidik lezzet öncülerinden aromatik bileşiklerin salınmasında β -glukosidazların katalizledikleri hidroliz reaksiyonlarıyla anahtar rol üstlandıkları kaydedilmiştir [57]. β -glukosidazlar, meyve suları, çay, şıra ve şarap gibi fermente ürünlerin yapımı sırasında aromatik bileşiklerin enzimatik salınmasında önemli rol oynarlar. Liu ve ark. (2012), lignoselüolitik bir fungus olan *Aspergillus fumigatus* Z5'ten termostabil doğal bir β -glukosidaz izole etmişlerdir. İzole edilen bu enzimi lignoselüolitik malzemelerle reaksiyona soktuklarında fenolik bileşiklerin salınımında bir artışın olduğunu belirleyerek selüloz parçalayıcı enzimlerin polifenolik bileşiklerin parçalanmasında da etkili olduklarını göstermişlerdir [58]. Üzümlerdeki monoterenoller (örneğin, linalol, geraniol, nerol, sitronclol, α -terpineol ve linalol oksit), şarabın tadına katkıda bulunan diglukozidlere bağlıdır. Bu bileşiklerin enzimatik hidrolizi, monoglukosidlerin parçalanması sıralı bir reaksiyon gerektirir. Monoglukozitler β -glukosidazların etkisiyle hidrolize edilir ve şarabın aroması artar. Funguslardan (örneğin, *A.oryzae*) izole edilen glukoza toleranslı eksojen β -glukosidaz ilavesinin, glukokonjü edilmiş aromatik bileşiklerin hidrolizini arttırdığı ve şarap kalitesini arttırdığı gösterilmiştir [59]. Gonzalez-Pombo ve ark. (2011), beyaz Maskat şarabının aroma lezzetini arttırmada immobilize edilmiş enzimin verimliliğini incelemek için *Issatchenkia terricola*'dan ekstraselüler bir β -glukosidaz izole etmiş ve karakterize etmişlerdir [60]. Krisch ve ark. (2010), çay endüstrisinde β -glukosidaz kullanımının uçucu yağların içeriğini arttırdığını tespit etmişlerdir [61]. β -glukosidazlar, narenciye meyve sularının organoleptik özelliklerini geliştirmek için de kullanılmaktadırlar. Bir glukosidik bileşik olan naringinden (4,5,7 trihidroksiflavanon-7-ramnanokosid) kaynaklanan acılığı azalttıkları birçok araştırmacı tarafından kaydedilmiştir [62,63,64]. Meyve sularının β -glukosidaz ile muamelesinden sonra meyve acılığının veya gellan hidrolizinin azalmasının meyve suyunun viskozitesinde de bir azalmaya yol açtığı çeşitli araştırmacılar tarafından kaydedilmiştir [57]. Keerti ve ark. (2014), *Bacillus subtilis*'ten termostabil bir β -glukosidaz enzimi izole ve

karakterize ederek, aljinat taneciklerine immobilize ettikten sonra şeker kamışı suyunun kalitesini arttırmak için uygulamalar yaptıklarını kaydetmişlerdir [63].

β -glukosidaz enzimi gıdalarda aroma ve lezzet arttırmanın yanı sıra, vitaminler, antioksidanlar ve diğer faydalı bileşiklerin glikozitlerinden salınmasını sağlamak suretiyle gıdaların besinsel olarak iyileştirilmesine katkı sağlamaktadır. Opasiri ve ark. (2004), pirinçte bulunan B6 vitamininin (piridoksin) β -glukosidaz enzimiyle piridoksinglukositten salınabileceğini göstermişlerdir [65]. Hayvan yemlerinde de β -glukosidaz enziminin yemin besin kalitesini artırdığı belirlenmiş ve özellikle domuzlar ve tavuklar gibi tek mideli hayvanlar için faydalı olduğu kaydedilmiştir [66].

Soya fasulyesi birçok yiyecek ve içecek ürününün bir parçasıdır ve soya daidzin, genistin ve glisitinin gibi birçok glukosidikizoflavon içerir. β -glukosidaz enzimi soya bazlı gıdalarda izoflavonları esas olarak aglikonlara (daidzein, genistein ve glisitine) dönüştürmek için uygulanır [67]. Soyanın aglikonizoflavon formları, glikosidik formlarından daha yüksek biyolojik aktivite sergilerler ve ayrıca sindirim sırasında daha yüksek miktarlarda hızlı emilirler [68]. Soya fasulyesinde bulunan izoflavonlar fitoöstrojenik özellikler sergiler, kardiyovasküler hastalıklar, osteoporoz, prostat ve meme kanseri gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde kullanılırlar [69,70]. Bir araştırmada soya sütündeki aglikon içeriği β -glukosidaz ile muamele edilerek ya da β -glukosidaz üreten bir *Lactobacillus* suşu ile fermentasyonu sonucunda önemli ölçüde arttırıldığı kaydedilmiştir [71].

Terapötik ve büyümeyi teşvik edici ajan olarak kullanılmalarının yanında gübreleme, embriyogenez ve hücre çoğalması gibi biyolojik sistemlerde önemli fonksiyonlara sahip olan oligosakkaritlerin ve alkil-glikozitlerin β -glukosidazlar ile sentezlerinin de mümkün olduğu gösterilmiştir [72]. Alkil-glikozitler, biyolojik olarak parçalanabilirliği yüksek iyonik olmayan yüzey aktif maddelerdir ve ayrıca antimikrobiyal özelliklere sahiptirler. β -glukosidazlar, alkil-glikozitleri hidroliz edilebildiklerinden dolayı onların farmasötik, kimyasal, kozmetik, gıda ve deterjan endüstrilerinde kullanılmasını da sağlarlar [72].

1.5 *Trichothecium* Cinsi Fungusların Genel Özellikleri

Trichothecium Link ex Fr. küçük ve heterojen bir fungus cinsidir. Mycobank'ta bu cins altında 73 farklı tür kaydedilmiştir. Cinsin önde gelen üyelerinden bazıları *T. cystosporium*, *T. luteum*, *T. parvum*, *T. polybrochum*, *T. pravicovi*, ve *T. roseum*'dur. Tip türlerindeki konidiyal gelişimleri yoğun olarak incelenmiştir. 1809'dan *Trichothecium* 'u ilk olarak Link bildirilmiştir [73].

1.5.1 *Trichothecium*'un Sınıflandırılması

Trichothecium'un günümüzde geçerli olan sınıflandırılması birçok uluslararası bilimsel komitelerin işbirliğiyle yapılmıştır. Uluslararası Mikoloji Birliği, Uluslararası Mantar Taksonomisi Komisyonu, Sistematik Mikoloji ve Mikrobiyoloji Laboratuvarı (Mantar Veritabanları, ABD Tarımsal Araştırma Servisi (USDA ARS)), Uluslararası Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI) ve Index Fungorum bu cinsi şu şekilde sınıflandırmaktadır;

Alem, Fungi;

Alt alem, Dikarya;

Şube, Ascomycota;

Altşube, Pezizomycotina;

Sınıf, Sordariomycetes;

Altsınıf, Hypocreomycetidae;

Takım, Hypocreales

Cins, *Trichothecium* [73].

1.5.2 *Trichothecium*'un Karakteristik Özellikleri

Koloniler düz, tanecikli ve tozlidir. Anteriyorda renk başlangıçta beyazdır ve şeftali renginde soluk pembe renk alır. Fungus, kadifemsi veya tozlu, beyazımsı gri, sarımsı veya pembe koloniler oluşturur. Gelişen *Trichothecium* konidileri, sürünen hifleri oluştururlar. Hif; septat, dallanmış, pürüzsüz duvarlı, hiyalin veya subhiyalin olabilir. Konidioforlar tek başlarına veya gevşek gruplar oluşturabilirler. Dik, düz, biraz esnek; çoğunlukla basit ama bazen dallı olabilirler. Hifler; bölmeli ve karakteristik zincirler oluşturmak için temel dizilimde konidi üretme kabiliyetine sahip olup meristematik uçları neredeyse tamamen şişmiş durumdadır. Konidioforlar, birinci konidium üretilinceye kadar vejetatif hif'ten ayırt edilemezler ve her bir konidiumun oluşumu ile aşamalı olarak kısalırlar. Karakteristik bazipetal halkasal konidi kümesi ve konidilerin asimetric bazal hücresi, *Trichothecium* cinsinin tür teşhisinde büyük tanısal değeri olan karakterlerdir [73].

Konidiler, konidiofor ucunun bir tarafından ortaya çıkar ve ilk konidium tam olarak olgunlaşmadan önce bir sonraki konidium karşı taraftan ortaya çıkar. Böylece konidiler birbiri

ardına sıkıştırılır ve karakteristik zikzak zincirleri oluşturmak için birbirine tutturulur. Bu zikzak sütununun dibinden yeni konidiler üretilir ve eklenir. Konidiofora bağlanma noktaları belirgin bir şekilde kesilir. Konidiler (12–18x8–10 mm) pürüzsüz, hafif kalın duvarlı oval veya armut biçimlidir ve iki hücrelidir; apikal hücre eğri ve konik olan bazal hücreden daha büyüktür. Konidiler mikroskop altında açık pembe veya soluk renklidir ve hiyalin görünür, ancak kültürde veya konakçıda kitlelerde pembedir. Konidiler, konidiofora, bazal hücrelerinin sivri ucunda tutturulmuştur [73].

1.6 Katı Substrat Fermantasyonu

Katı Substrat Fermantasyonu (KSF) terim olarak, serbest formda sıvı olmadan katı substrat varlığında mikroorganizmaların gelişimiyle meydana gelen fermantasyon olarak tanımlanmaktadır. İpliksi funguslar, lifsel gelişimlerinden ötürü KSF konusunda en çok çalışılan funguslardır. Fungusların yüzeyde ve substrat tanecikleri içerisinde gelişme özellikleri vardır. Mikroorganizmanın gelişmesi için serbest su esastır, bu su katı destek üzerinde adsorblanmakta ya da katı matriks içinde kompleks hale getirilmektedir. Bu yöntemin, gıda endüstrisi, yakıt endüstrisi, ilaç endüstrisi gibi mikrobiyal ürünlerin üretildiği sektörler için çok potansiyelli olduğunu kanıtlamıştır [74].

Katı substrat fermantasyonu, diğer fermantasyon çeşitlerine göre daha doğal olarak kabul edilmektedir. Çünkü bu sürecin koşulları, doğadaki çoğu mikroorganizmanın yetiştirme koşullarına benzemektedir [75]. Az miktarda atık suyun ortaya çıktığı, düşük miktarda enerji gerektiren çevre dostu bir yöntemdir. Düşük su miktarı gerektirdiğinden kontaminasyon riski daha azdır [76]. Bu fermantasyonun kültür ortamı daha kolaydır ve çoğu katı ortam uygun besinlerle birlikte direkt geliştirilme ortamı olarak kullanılabilir. Gelişim için sınırlayıcı faktör besinlerin difüzyonudur. Ayrıca KSF ile, saflaştırma daha kolay, maliyet daha düşük ve ürün daha yüksek konsantrasyonlarda elde edilebilmektedir. Bu yöntem düşük sermaye yatırımı, düşük işletim giderleri, kolay ekipman ve reaktör hacmi başına yüksek üretiminden dolayı da ekonomik bir yöntemdir. Bu işlem sırasında küçük boyutlu reaktörler kullanılabilir [77].

Katı substratlar; bakteriler, ipliksi funguslar ve mayalar içeren mikrobiyal ortama iyi bir destekleyici ve besleyici bir çevre sağlamaktadırlar [74]. Katı substrat fermantasyonunun en önemli avantajı ise lignoselülozik atığın substrat olarak kullanılabilmesidir. Ek olarak, KSF gelişim koşulları ipliksi fungusların doğal çevrelerine benzerlik göstermesidir. Katı substrat

fermantasyonunun kullanılmasıyla mikroorganizma ve substrat arasında daha iyi bir etkileşim gerçekleşmekte, böylece daha yüksek enzim konsantrasyonları elde edilebilmektedir [78].

Substrat seçimi, esas olarak maliyet ve kullanılabilirlik gibi faktörlere bağlıdır. Diğer faktörler ise tanecik boyutu ve nem miktarıdır. Daha küçük substrat tanecikleri, mikroorganizmaların çoğalması için daha geniş yüzey alanı yaratmaktadırlar. Fakat substrat taneciklerinin çok küçük olması da, solunum verimini engelleyip gelişimin yavaş gerçekleşmesiyle az miktarda enzim üretilmesine neden olacaktır. Geniş partikül ile daha verimli bir havalandırma ve solunum gerçekleşebilmektedir. Bu da yüzey alanında düşüş meydana getirmektedir. Bu yöntemde substratın nem içeriği optimize edilerek, su miktarının daha yüksek veya daha düşük olmasının mikrobiyal aktiviteyi ters yönde etkileyebilmesi önlenmelidir [79].

1.7 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi

Kromatografi yöntemi, 1906 yılında Mikhail Tswett tarafından bitki pigmentlerinin (klorofil) ayrılması amacıyla kullanılmıştır. Daha sonraları biyokimyasal moleküllerin saflaştırılmasında ve tanımlanmasını sağlayan bir teknik olarak kullanılmaya başlanmıştır [80]. Kromatografi, bir karışımdaki moleküllerin yüzeye veya katıya uygulandığında akışkanın sabit fazının hareketli faz yardımı ile hareket ederken birbirlerinden ayrıldığı prensibine dayanır. Kromatografi işleminde etkili olan faktörler, adsorpsiyon, ayırma ve afinite ile ilgili moleküllerin karakteristikleri ve moleküler ağırlıkları arasındaki farkları içerir [81].

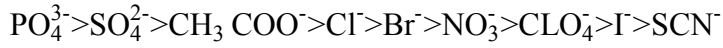
Spesifik bir proteinin izole edilebilmesinde uygun saflaştırma yönteminin seçilebilmesi için proteine ait fiziksel ve kimyasal özelliklerinin biliniyor olması gerekmektedir [82]. Proteinlerin yük, boyut, çözünürlük ve spesifik bağlanma gibi farklılıklar ortamdaki diğer proteinlerden etkili bir şekilde saflaştırılmalarını sağlamaktadır. Proteinlerin yapılarında bulunan glutamik asit, aspartik asit, histidin, arginin ve lizanamino asitleri protein yüklerinin özelliklerini etkilerken; yüzeylerinde bulunan polar ve apolar amino asitler proteinlerin çözünürlüğünü etkilemektedir. Proteinler kararlı yapıda olmadığından yüksek sıcaklık ve pH şartları, ortamdaki organik çözücüler varlığı gibi durumlarda denatüre olmaktadır. Polar ve apolar proteinler hidrofobik etkileşim kromatografisiyle, farklı yüklere sahip proteinler iyon değişim kromatografisiyle, farklı büyüklükteki proteinler ise jel filtrasyon kromatografisi ile etkili bir biçimde saflaştırılabilmektedirler [83,84].

Hidrofobik proteinler sulu bir çözelti içinde çözüldüğünde kendiliğinden birleşecek veya etkileşime girecektir. Bu kendi kendine ilişkilene, protein katlanması, protein substrat etkileşimleri ve proteinlerin hücrel membranlar boyunca taşınması gibi çeşitli biyolojik etkileşimlerin temelini oluşturur [85]. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HEK) hem analitik hem de hazırlık ölçekli protein saflaştırma uygulamalarında kullanılır. HEK, kromatografi adsorbanları üzerindeki hidrofobik ligandlara bağlanan makromoleküllerde bulunan hidrofobik bölgeleri kullanır. Etkileşim, tuz konsantrasyonu yüksek bir sulu çözelti gibi hidrofobik etkileşimleri destekleyen bir ortamda gerçekleşir [86].

HEK'de, proteinlerin ayrılması temel olarak, proteinin hidrofobik yüzey bölgelerinin, hidrokarbon kuyruğu (oktil, butil veya heksil) gibi etkileşimli bir noniyonik gruba veya çapraz bağlı agaroz veya sefaroze gibi inert sabit mikro gözenekli matrise immünize edilmiş bir aromatik halkaya (fenil- gibi) geri dönüşümlü bağlanmasıyla oluşur. HEK genellikle, bir afinite etiketine sahip olmayan proteinler için ve iyon değişim kromatografisi ile etkili bir ayrılma veya saflaştırma elde edilmediğinde saflaştırma yöntemi olarak seçilir. Destek matrisinin herhangi bir iyonik yük taşıması ve indirgenmiş şartlar altında alkaline hidroliz ile etkisiz hale getirilmesi hayati önem taşımaktadır. Bu muamele, çapraz bağlı agaroz / sefaroze matrisinin etkin bir şekilde sülfatlarını koparır. Daha sonra, sabit ve hareketsiz matrislere yüklenmemiş bir "ara kolu" tutturulur ve hidrofobik gruplar, karşılık gelen glisidil eter ile reaksiyona girerler. Hidrofobik gruplar böylece yüksüz, kimyasal olarak stabil eter bağlantıları ile matrise bağlanmış olur [87].

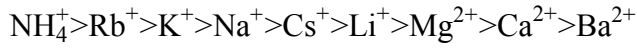
Tek başına, su (polar çözücü) polar olmayan moleküller için zayıf bir çözücüdür. Böyle bir ortamda, proteinler en düşük termodinamik enerji durumuna ulaşmak için kendiliğinden birleşecek veya toplanacaktır. Kendiliğinden birleşmeden önce, su molekülleri her bir makromolekülün çevresinde oldukça düzenli yapılar oluşturur. Polar çözücüyle polar olmayan moleküllerin (proteinler gibi) kendi kendine birleşmesi, çevrenin entropisinde net bir artış gösterir. Birleştirme işlemi sırasında, polar çözücüye maruz kalan proteinin hidrofobik alanlarının genel yüzey alanı azalır, bu da tercih edilen termodinamik durum olan daha az yapılandırılmış (daha yüksek entropi) bir durumla sonuçlanır. Bu durum, bir adsorbana tutturulmuş hidrofobik ligandlar ve ilgilenilen proteinler arasındaki etkileşimden de sorumludur. Protein ya da hidrofobik ligand arasındaki birlik ve hidrofobik etkileşim, temel olarak genel entropinin artmasıyla sonuçlanır [86].

Çözücünün polaritesi, hidrofobik etkileşim kromatografisi adsorbanı ve protein arasındaki hidrofobik etkileşimleri güçlendirebilen ya da zayıflatabilen tuzlar veya organik çözücüler ilave edilerek kontrol edilebilir. İyonların hidrofobik etkileşime etkisi, Hofmeister serisini takip etmektedir [88]. Hidrofobik etkileşimi arttıran anyonlar, en büyüğü (etkileşimin kuvvetini azaltmada) soldan sağa sıralanmıştır [89]:



Hidrofobik etkileşimleri teşvik eden iyonlara liyotroplar, hidrofobik etkileşimleri bozan (zayıflatanlar) ise kaotroplar denir. Yukarıdaki seride fosfat iyonları en güçlü hidrofobik etkileşimi teşvik ederken, tiyosiyanat iyonları hidrofobik etkileşimleri bozar [86].

Kasyonlar için, Hofmeister serisi şu aşağıda gösterilmektedir (azalan liyotropik kuvvete göre sıralanmıştır):



Bu tuzlar, protein saflaştırması için hidrofobik etkileşim kromatografisinde yaygın olarak kullanılır [86].

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Materyal

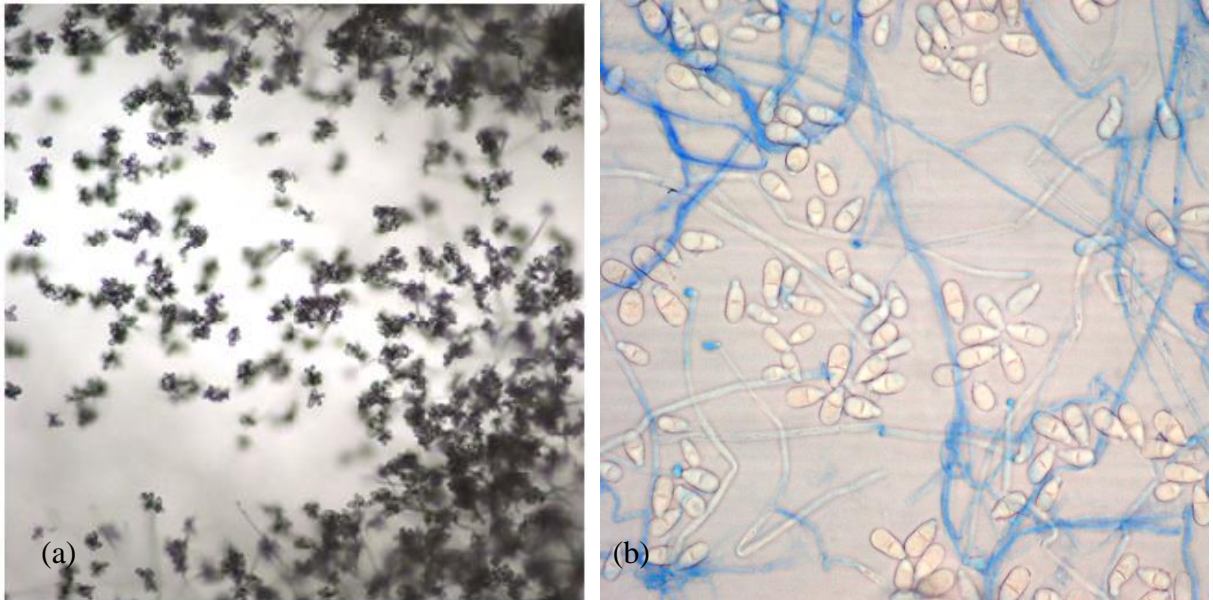
2.1.1 Katı Besiyerinde Geliştirilen Mikrofungusun β -glukosidaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Daha önce laboratuvarımızda topraktan izole edilerek teşhisi yapılan ve Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde saklanan *Trichothecium roseum* β -glukosidaz enzim aktivitesinin saptanması amacı ile, %5 Karboksimetil Selüloz (CMC) içeren Malt Ekstrakt Agar (MEA) besiyerine inoküle edilerek β -glukosidaz pozitif olarak değerlendirilmiş ve çalışmalarda kullanılmasına karar verilmiştir.

2.1.1.1 *Trichothecium roseum* (Pers.) Link 1809

Koloniler pembemsi ve tozlu, konidiyoforlar dik veya yarı dik, tek veya gruplar halinde, basit veya seyrek dallı, şeffaf bölmeli, uç kısımlarında bazipetal imbrikat zig-zag zincirler şeklinde konidiler gelişmekte, konidiler musilajlı tabaka ile bir arada tutulmakta, büyük iki hücreli, şeffaf, tabanları belirgin şekilde trunkattır [90].

Tip tür: *Trichothecium roseum*



Şekil 2.1: (a)*Trichothecium roseum* (petri 10x10), (b) *Trichothecium roseum* (10x40)

2.1.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

2.1.2.1 *Trichothecium roseum*'un Geliştirilmesinde Kullanılan Besiyerleri

Malt Ekstrakt Agar (MEA) Besiyeri

Malt Ekstrakt	15g
Mikolojik Pepton	2,5g
Agar	7,5 g
Distile Su	500 ml

Bu formüle göre hazırlanan besiyeri 121°C' de 20 dk otoklavda sterilize edildikten sonra steril petri kaplarına dökülerek katılaşması sağlanmıştır [91].

Malt Ekstrakt Broth (MEB) Besiyeri

Malt Ekstrakt	3 g
Maltoz	0,9 g
Dextroz	3 g
Maya Özütü	0,6 g
Distile Su	500 ml

Yukarıdaki içeriğe göre hazırlanan besiyeri vidalı kapaklı tüplere aktarılarak ve 121°C' de 20 dk. süreyle otoklavda sterilize edilmiştir [91].

%5 Karboksimetil Selüloz (CMC) İçeren Malt Ekstrakt Agar (MEA) Besiyeri

Malt Ekstrakt Agar	25 g
Karboksimetil Selüloz ($C_{28}H_{30}Na_8O_{27}$)	25 g
Distile Su	500 ml

Formüle göre hazırlanan besiyeri 121°C' de 20 dk. sterilize edilerek steril petri kaplarına dökülerek katılaşması sağlanmıştır [92].

2.1.2.2 Katı Besiyerinde Geliştirilen Mikrofungusun Hidroliz Zon Büyüklüğünün Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

Kongo Kırmızısı (% 1) Çözeltisi

Kongo Kırmızısı	0,5 g
Distile Su	50 ml

0,5 g Kongo Kırmızısı 50 ml distile suda çözülmüştür [93,94,95].

1M Sodyum Klorür (NaCl) Çözeltisi

Sodyum Klorür (NaCl)	29,25 g
Distile Su	500 ml

29,25 g Sodyum Klorür (NaCl) 500 ml distile suda çözdürülmüştür [95].

2.1.2.3 Spor Süspansiyonunda Kullanılan Çözelti

Tween 80.....	0,5 ml
Distile Su	500 ml

0,5 ml Tween 80, 500ml distile suda çözdürülerek 121°C' de 20 dk. sterilize edilmiştir [95].

2.1.2.4 Katı Substrat Fermantasyon Ortamının Nemlendirme Sıvısı ve Optimum pH'sının Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

0,2M Sitrik Asit Monohidrat Tamponu (pH 4 ve pH 5 için)

Sitrik Asit Monohidrat (C ₆ H ₈ O ₇)	2,1014 g
Distile Su	50 ml

Hazırlanan tampon çözeltinin pH'ları 4 ve 5' e ayarlanarak son hacimleri 50 ml olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır [96].

0,2 M Sodyum Dihidrojen Fosfat Tamponu (pH6, pH6,5, pH7, pH 7,5 ve pH 8 için)

Sodyum Dihidrojen Fosfat (NaH_2PO_4) 1,3799 g
Distile Su 50 ml

1,3799 g Sodyum Dihidrojen Fosfat tartılarak pH'ları (pH6, pH6,5, pH7, pH7,5 ve pH 8) ayarlanıp son hacimleri 50 ml olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır [97].

0,2 M için Disodyum Hidrojen Fosfat Tamponu (pH 8,5 ve pH9)

Disodyum Hidrojen Fosfat (Na_2HPO_4) 1,7796 g
Distile Su 50 ml

1,7796 g Disodyum Hidrojen Fosfat tartılarak pH'ları 8,5 ve 9'a ayarlanıp son hacimleri 50 ml olacak şekilde distile su eklenmiştir [97].

2.1.2.5 Ezim Aktivitesinin Ölçümünde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

50 mM Sodyum Asetat Tamponu (pH 7)

Sodyum Asetat Trihidrat ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$) 0,1701 g
Distile Su 25 ml

0,1701 g Sodyum Asetat Trihidrat tartılıp distile suda çözünmesi sağlandıktan sonra pH 7'ye ayarlanarak üzerine son hacim 25 ml olacak şekilde distile su eklenmiştir [98].

5 mM *p*-nitrofenil- β -D glukopirenosit Çözeltisi

p-nitrofenil- β -D glukopirenosit..... 0,0037 g
Sodyum Asetat Tamponu 2,5 ml

0,0037 g *p*-nitrofenil- β -D glukopirenosit tartılarak, 50 mM Sodyum Asetat Tamponunda (pH 7) çözünmesi sağlanıp son hacim 2,5 ml'ye tamamlanmıştır [99].

Reaksiyon Durdurma Tamponu

Sodyum Karbonat (Na_2CO_3)	1,3248 g
Distile Su	25 ml

1,3248 g Sodyum Karbonat distile su ile çözümlenilip son hacim 25 ml'ye tamamlanmiştir [99].

2.1.2.6 Lowry Metoduyla Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler

A Çözeltisi

Sodyum Hidroksit (NaOH)	0,20005 g
Bakır Sülfat	1,0 g
Distile Su.....	50 ml

0,20005 g Sodyum Hidroksit (NaOH) 50 ml distile suda çözümlenilip ardından oluşan çözeltiye 1 g Bakır Sülfat'ın eklenmesiyle A çözeltisinin hazırlanması sağlanmıştır [100].

B Çözeltisi

Potasyum Sodyum Tartarat.....	1,0 g
Distile Su.....	100 ml

1,0 g Potasyum Sodyum Tartarat ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)'ın 100 ml distile suda çözümlenmesiyle B çözeltisi hazırlanmıştır [100].

C Çözeltisi

Bakır Sülfat.....	0,5 g
Distile Su.....	100 ml

0,5 g Bakır Sülfat (CuSO_4)'ın 100 ml distile suda çözümlenmesiyle C çözeltisi hazırlanmıştır [100].

D Çözeltisi

A Çözeltisi	48 ml
B Çözeltisi	1ml
C Çözeltisi	1ml

A Çözeltisinden 48 ml alınarak üzerine 1ml B Çözeltisi ve 1 ml C Çözeltisi ilave edilerek taze olarak 50 mL D çözeltisi hazırlanmıştır [100].

E Çözeltisi; 1:1 oranındaki Folin Fenol Reaktifi'nin ile distile su karıştırılmasıyla taze olarak hazırlanmıştır [100].

Sığır Serum Albümin (BSA):1:1 oranında BSA ve distile suyun karıştırılmasıyla taze olarak hazırlanmıştır [100].

2.1.2.7 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HEK) Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

Tuzlu Tampon Çözeltisi

Amonyum Sülfat Tuzu (1,5M) ($\text{NH}_4(\text{SO}_2)$).....	198,210 g
Na_2HPO_4 (50 mM).....	7,095 g
Distile Su.....	1000 ml

1,5 M 198,210 g Amonyum Sülfat Tuzu ($\text{NH}_4(\text{SO}_2)$), 50 mM 7,095 g Na_2HPO_4 ile karıştırılarak distile suda çözündürüldükten sonra pH'sı 6,8' e ayarlanarak saf su ile 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır [101].

Tuzsuz Tampon Çözeltisi

Na_2HPO_4 (50 mM).....	7,095 g
Distile Su.....	1000 ml

50 mM 7,095 g Na_2HPO_4 distile suda çözündürüldükten sonra pH'ı 6,8 olacak şekilde ayarlanarak son hacim distile suyla 1000 ml'ye tamamlanmıştır [101].

2.1.2.8 SDS-PAGE Tekniğinde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

Ayırma Jeli

Distile Su.....	20,1 ml
Tris-Base (C ₄ H ₁₁ NO ₃)(pH 8,8)	12,5 ml
SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)(C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S)	500 µl
%30'luk Akrilamid/Bis.....	16,65 ml
Temed (N,N,N,N Tetrametil etilen diamine)	25 µl
%10'luk APS (Amonyum persülfat)((NH ₄) ₂ S ₂ O ₈)	750µl

Yukarıdaki formüle göre hazırlanan jelin 30 dakika süresince donması sağlanmıştır [102].

Ayırma Jeli Hazırlanırken Kullanılan Alt Tampon

Tris-Base (1,5M).....	11,82 g
Distile Su	50 ml

11,82 g Tris-Base (1,5M) distile su ile çözüldükten sonra pH'ı 8,8 olarak ayarlanıp distile su ile son hacim 50 ml'ye tamamlanmıştır [102].

Yığıma Jeli

Distile Su	12,2 ml
Tris-Base (C ₄ H ₁₁ NO ₃)(pH 6,8)	5 ml
SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)(C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S)	200µl
%30'luk Akrilamid/Bis.....	2,6 ml
Temed (N,N,N,N Tetrametil etilen diamine)	20µl
%10'luk Amonyum persülfat (APS)	400µl

Yukarıdaki formüle göre hazırlanan jelin 30 dakika süreyle donması sağlanmıştır [102].

Yığıma Jeli Hazırlanırken Kullanılan Üst Tampon

Tris-Base (0,5M).....	3,94 g
Distile Su	50 ml

3,94 g Tris-Base (0,5M) distile suda çözüldükten sonra pH 6,8'e getirilip, distile su ile son hacim 50 ml'ye tamamlanmıştır [102].

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

APS (Amonyum persülfat)((NH ₄) ₂ S ₂ O ₈)	1 g
Distile Su	10 ml

1 g APS (Amonyum persülfat) distile suda çözündükten sonra son hacim 10 ml'ye tamamlanmıştır [102].

Tank Tamponu

Tris-Base (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	3 g
Glisin (C ₂ H ₅ NO ₂)	14,4 g
SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)(C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S)	1 g
Distile Su	1000 ml

3 g Tris-Base ve 14,4 g Glisin, 1 g SDS distile suda çözündükten sonra ve son hacim 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır [102].

Yükleme Tamponu

Tris-Base (6,8)(C ₄ H ₁₁ NO ₃)	2,5 ml
%10'luk SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)(C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S)	4 ml
Gliserol(C ₃ H ₈ O ₃)	2 ml
β-merkptoetanol (C ₂ H ₆ OS)	1 ml
Bromfenol mavisi	0,01 g
Distile Su	0,5 ml

0,5M pH'sı 6,8 olan 2,5 ml Tris Base, %10'luk 4 ml SDS, 2 ml Gliserol, % 99,5'luk 1 ml β-merkptoetanol ve 0,01 g Bromfenol mavisinin 0,5 ml distile suda karıştırılarak hazırlanmıştır [102].

%10'luk SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)

%10'luk SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) (C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S)	0,5 g
Distile Su	5 ml

0,5 g SDS distile suda çözündürülüp son hacmi 5 ml'ye tamamlanmıştır [102].

2.1.2.9 NATIVE-PAGE Tekniğinde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

Ayırma Jeli

Distile Su	4,89 ml
Tris-Base (C ₄ H ₁₁ NO ₃)(pH 8,8)	2,5 ml
%30'luk Akrilamid/Bis.....	2,5 ml
Temed (N,N,N,N Tetrametil etilen diamine)	10µl
%10'luk APS (Amonyum persülfat)((NH ₄) ₂ S ₂ O ₈)	100µl

Sırasıyla; 4,89 ml Distile Su, 2,5 ml Tris-Base (pH 8,8), 2,5 ml %30'luk Akrilamid/Bis,10µl Temed ve 100µl %10'luk APS karıştırılarak hazırlanmış ve 30 dakika boyunca donmaya bırakılmıştır [102,103].

Ayırma Jeli Hazırlanırken Kullanılan Alt Tampon

Tris-Base (1,5M).....	11,82 g
Distile Su	50 ml

11,82 g Tris-Base (1,5M) distile su ile çözüldükten sonra pH'ı 8,8'e getirilerek distile suyla son hacim 50 ml olacak şekilde ayarlanmıştır [102,103].

Yığılma Jeli

Distile Su	12,2 ml
Tris-Base (C ₄ H ₁₁ NO ₃)(pH 6,8)	5 ml
%30'luk Akrilamid/Bis.....	2,6 ml
Temed (N,N,N,N Tetrametil etilen diamine)	20µl
%10'luk Amonyum persülfat (APS)	400µl

Sırasıyla; 12,2 ml Distile Su, 5ml Tris-Base (pH 6,8), 2,6 ml %30'luk Akrilamid/Bis, 20µl Temed ve 400µl %10'luk APS karıştırılıp 30 dakika boyunca donmaya bırakılmıştır [102,103].

Yığma Jeli Hazırlanırken Kullanılan Üst Tampon

Tris-Base (0,5M).....	3,94 g
Distile Su	50 ml

3,94 g Tris-Base (0,5M) distile suda çözüldükten sonra pH 6,8'e getirilerek distile suyla son hacim 50 ml olacak şekilde ayarlanmıştır [102,103].

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

APS (Amonyum persülfat)((NH ₄) ₂ S ₂ O ₈).....	1 g
Distile Su	10 ml

1 g APS distile suda çözüldükten sonra son hacim 10 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır [102,103].

Tank Tamponu

Tris-Base (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	3 g
Glisin (C ₂ H ₅ NO ₂)	14,4 g
Distile Su	1000 ml

3 g Tris-Base ve 14,4 g Glisin distile suda çözünürülüp son hacim 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır [102,103].

Yükleme Tamponu

Tris-Base (6,8)(C ₄ H ₁₁ NO ₃)	2,5 ml
Gliserol(C ₃ H ₈ O ₃)	2 ml
Bromfenol mavisi	0,01 g
Distile Su	0,5 ml

0,5M pH'sı 6,8 olan 2,5 ml Tris Base, 2 ml Gliserol ve 0,01 g Bromfenol mavisinin 0,5 ml distile suda karıştırılmasıyla hazırlanmıştır [102,103].

2.1.2.10 SDS\NATIVE-PAGE'de Kullanılan Boyama Çözeltileri

Gümüş Boyama Çözeltileri

%0,02'lik Sodyum Tiyosülfat Çözeltisi

Sodyum Tiyosülfat	0,04 g
Distile Su.....	200 ml

0,04 g Sodyum Tiyosülfat, 200 ml distile suda çözünerek hazırlanmıştır [104].

%0,1'lik AgNO₃ Çözeltisi

Gümüş Nitrat (AgNO ₃).....	0,2 g
%35'lik Formaldehit.....	40µl
Distile Su.....	200 ml

0,2 g Gümüş Nitrat, 200 ml distile suda çözünerek +4°C' de kullanılmak üzere saklanmıştır. Gümüş Nitrat Çözeltisi kullanılmadan hemen önce 40µl %35'lik Formaldehit çözeltiye eklenmiştir [104].

%3'lük Sodyum Karbonat Çözeltisi

Sodyum Karbonat (Na ₂ CO ₃)	7,5 g
%35'lik Formaldehit.....	125 µl
Distile Su.....	250 ml

7,5 g Sodyum Karbonat 250 ml distile suda çözündürülüp 125 µl %35'lik Formaldehit çözeltiye eklenmiştir [104].

Yıkama Çözeltileri

%5'lik Asetik Asit Çözeltisi

Asetik Asit	5 ml
Distile Su.....	95 ml

5 ml Asetik Asit, 95 ml distile su ile karıştırılarak hazırlanmıştır [104].

%1'lik Asetik Asit Çözeltisi

Asetik Asit	1 ml
Distile Su.....	99 ml

1 ml Asetik Asit, 99 ml distile su ile karıştırılarak hazırlanmıştır [104].

2.2 Metod

2.2.1 Katı Besiyerinde Geliştirilen Mikrofungusun β -glukosidaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Trichothecium roseum'un β -glukosidaz enzim aktivitesine sahip olup olmadığının belirlenmesi için, %5 Karboksimetil Selüloz (CMC) içeren Malt Ekstrakt Agar (MEA) besiyerine tek nokta ekimi yapılarak ve 25°C' de 7 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun sonunda hidroliz zon tayinini gerçekleştirmek için, gelişen *Trichothecium roseum*'un koloni yüzeyi kongo kırmızısı çözeltisi (%1) ile kaplanıp 25°C' de 15 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda boyanın fazlası 1M' lık NaCl ile yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından koloni yüzeyi tekrar 1M' lık NaCl ile kaplanıp 25°C' de 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda 1M NaCl petri kabından uzaklaştırılmıştır ve koloni çevresinde şeffaf zon oluşturan *T. roseum*, β -glukosidaz pozitif olarak değerlendirilmiştir.

2.2.2 Mikrofungusun Üretimi ve Spor Eldesi

Trichothecium roseum'dan spor elde etmek için Malt Ekstrakt Agar (MEA) besiyerine tek nokta ekimi yapıldı ve 25°C 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra kültürün üzeri %1'lik Tween 80 ile kaplandı ve steril plastik öze ile sporların Tween 80'e geçmesi sağlanmıştır. Elde edilen spor süspansiyonu Thoma lamında sayılarak spor yoğunluğu 10^7 CFU/ml olarak ayarlanmıştır. Daha sonra 250 ml'lik erlende hazırlanmış 150 ml'lik Malt Ekstrakt Broth (MEB) besiyerine 5'er ml 10^7 CFU/ml spor süspansiyonu inoküle edilmiştir. Üremenin homojen bir şekilde olması için çalkalamalı inkübatörde 30°C, 150 rpm'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda katı substrat olarak kullanılacak pirinç kabuğu ortamına inokulasyon gerçekleştirilmiştir [105].

2.2.3 Katı Substrat Fermantasyon Ortamının Hazırlaması

Katı substrat olarak kullanılacak olan pirinç kabuğu öncelikle parçalayıcıyla küçük parçalara ayrılıp elekten geçirilerek toz haline getirilmiştir. Ardından 80°C' de 24 saat pastör fırınında

bekletilerek kuruması sağlandıktan sonra 500 ml'lik erlenlere 5'er gram olacak şekilde yerleştirilmiştir [105].

Katı substrat olarak kullanılan pirinç kabuğunun nemlendirme sıvısı pH4 ve pH 5 için Sitrik Asit Monohidrat tamponu, pH6, pH6,5, pH7, pH7,5 ve pH8 için Sodyum Dihidrojen Fosfat tamponu, pH8,5 ve pH 9 için Disodyum Monohidrojen Fosfat tamponu kullanılarak nem %55 olacak şekilde ayarlanıp, 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak sterilizasyonları gerçekleştirilmiştir [105].

2.2.4 Katı Substrat Fermentasyonu Kültür Ortamına Ekim ve Kısmi Saflaştırılmış β -glukosidaz Enziminin Eldesi

Substrat olarak pirinç kabuğunun kullanılmasıyla hazırlanan steril KSF ortamına *T. roseum*'un sıvı kültüründen 3 ml inoküle edilerek mikrofungusun gelişimi için 30°C'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin ardından KSF kültür ortamına 75 ml distile su konularak 150 rpm'e ayarlanmış çalkalamalı inkübatörde 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve sürenin sonunda elde edilen ekstrakt steril gazlı bezden süzülerek filtratı alınmıştır. Alınan 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 [105].

2.2.5 Katı Substrat Fermentasyonu Kültür Ortamında Üretim Koşullarının Mikrofungustan β -glukosidaz Enzim Eldesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

2.2.5.1 Nemlendirme Sıvısı ve Optimum pH'nın Belirlenmesi

Katı Substrat Fermentasyon ortamının üretim koşullarının etkisinin belirlenmesinde ilk basamak nemlendirme sıvısı ve optimum pH'nın belirlenmesidir. Nemlendirme sıvısı ve optimum pH'nın belirlenmesi için farklı pH'larda (pH4 ve pH 5 için Sitrik Asit Monohidrat; pH6, pH6,5, pH7, pH7,5 ve pH 8 için Sodyum Dihidrojen Fosfat; pH8,5 ve pH 9 için Disodyum Monohidrojen Fosfat tamponu) tamponlar kullanılarak nem yüzeyi %55(2,75 ml) olacak şekilde ayarlanıp, 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak sterilizasyonları gerçekleştirilmiştir [106,107].

Sterilizasyonları gerçekleşen katı substrat ortamları soğutulduktan sonra *T. roseum* sıvı kültüründen 3 ml inoküle edilmiş ve fungus gelişimi için 30°C' de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda katı substrat ortamlarına 75 ml distile su konularak

çalkalamalı inkübatörde 150 rpm' de 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmış ve elde edilen ekstrakt steril gazlı bezle süzülerek filtratı alınmıştır. Daha sonra filtrat teflon tüplere aktarılarak ultrasantrifüjde +4°C, 10000 rpm'de 10 dk. santrifüjlenerek süpernatant kısmının pellet kısmından ayrılması sağlanmıştır. Ayrılan bu süpernatant kısmi saflaştırılmış enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Optimum koşullarda mikrofungusun β -glukosidaz üretimi için nemlendirme sıvısı ve optimum pH'ı belirlemek için kısmi saflaştırılmış enzimlerin aktiviteleri ölçülmüş ve mikrofungusun en yüksek β -glukosidaz enzim aktivitesi gösterdiği pH ve nemlendirme sıvısı KSF ortamı hazırlamak için seçilmiştir [106,107].

2.2.5.2 Optimum İnkübasyon Sıcaklığının Belirlenmesi

Katı Substrat Fermentasyonu kültür ortamının mikrofungustan β -glukosidaz enzim üretimine etkisinin belirlenmesinde ikinci basamak optimum sıcaklığın belirlenmesidir. Optimum sıcaklığı belirlemek için öncelikle ilk basamakta belirlenen nemlendirme sıvısı ve pH'ı kullanılarak KSF ortamları hazırlanmıştır. Hazırlanan katı substrat ortamlarına sıvı kültürden 3'er ml inoküle edilerek 25, 30, 35, 40 ve 45°C'ye ayarlanmış inkübatörlere konularak 7 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Farklı sıcaklıklarda inkübasyona bırakılan katı substrat kültürlerinden kısmi saflaştırılmış enzimler elde edilip enzim aktivitelerinin ölçümü yapılarak optimum inkübasyon sıcaklığı belirlenmiştir [106,107].

2.2.5.3 Optimum İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi

Katı Substrat Fermentasyonu kültür ortamında üretim koşullarının mikrofungustan β -glukosidaz Enzimi üretimine etkisinin belirlenmesinde son basamak optimum inkübasyon süresinin belirlenmesidir. Optimum inkübasyon süresini belirlemek için daha önceki basamaklarda belirlenen nemlendirme sıvısı ve optimum pH'da ayarlanan KSF ortamlarına *T. roseum* sıvı kültüründen 3'er ml inoküle edilerek belirlenen optimum sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra 4. günden başlayarak enzim aktivitesinin düşüşe geçtiği güne kadar kısmi saflaştırılmış enzimler elde edilerek her gün ölçümleri yapılmış ve optimum inkübasyon süresi belirlenmiştir [106,107].

2.2.6 β -glukosidaz Aktivitesinin Belirlenmesi

β -glukosidaz enzim aktivitesi belirlenirken; 96'lık Well-plate'de örnek ve kontrol kuyucukları oluşturulmuş ve aktivite ölçümü gerçekleştirilmiştir. Örnek kuyucuklarına 70 μ l 5 mM *p*-nitrofenil- β -D-glukopiranosit (*p*NPG) ile hazırlanan substrat çözeltisi ve 70 μ l kısmi saflaştırılmış enzim, kontrol kuyucuklarına ise; 70 μ l 50 mM pH 7,0 olan Sodyum Asetat

tamponu ve 70 µl kısmi saflaştırılmış enzim eklenmiştir. Hazırlanan Well-plate 37°C’de, 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda örnek ve kontrol kuyucuklarının tümüne 70 µl 0,5 M Sodyum Karbonat reaksiyon durdurucu tampon ilave edilerek reaksiyon durdurularak spektrofotometrede 410nm’de ölçüm yapılmıştır [108].

2.2.7 Protein Miktarının Belirlenmesi

Protein miktarı belirlenirken Warburg ve Lowry Metodu olmak üzere iki farklı metod kullanıldı. Warburg Metodu kullanılarak 280 nm’de kalitatif yolla, Lowry Metodunda ise 600 nm’de kantitatif yolla protein miktarı belirlenmiştir.

2.2.7.1 Warburg Metodu

Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile β-glukosidaz enzimi saflaştırma işleminden sonra eşit hacimde tüplere alınmış örneklere Warburg Metodu kullanılarak kalitatif protein tayini yapılmıştır. Örnek kuyucukları olarak Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi sonucu çıkan tüplerin her birinden 210 µl alınarak 96’lık kuartz Wellplate’lere her bir kuyusuna ayrı ayrı konuldu. Kontrol kuyucukları olarak ise 210 µl distile su ilave edilip ve spektrofotometrede 280 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür [109].

2.2.7.2 Lowry Metodu

Amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen numunelerin Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile saflaştırma işlemlerinin ardından en yüksek aktivite gösteren numunelerin β-glukosidaz enziminin protein miktarı Lowry Metodu kullanılarak belirlenmiştir [100, 110]. Bu yöntemin uygulanması için aşağıdaki çözeltiler hazırlanmıştır;

A Çözeltisi; %2’lik (w/v) Na₂CO₃, 0,1 M NaOH’da çözündürülerek,

B Çözeltisi; %1’ lik (w/v) KNaC₄H₄O₆ distile suyla çözündürülerek,

C Çözeltisi; % 0,5’lik (w/v) CuSO₄ distile suyla çözündürülerek,

D Çözeltisi; 48 ml A çözeltisi, 1 ml B çözeltisi, 1 ml C çözeltisinden alınarak,

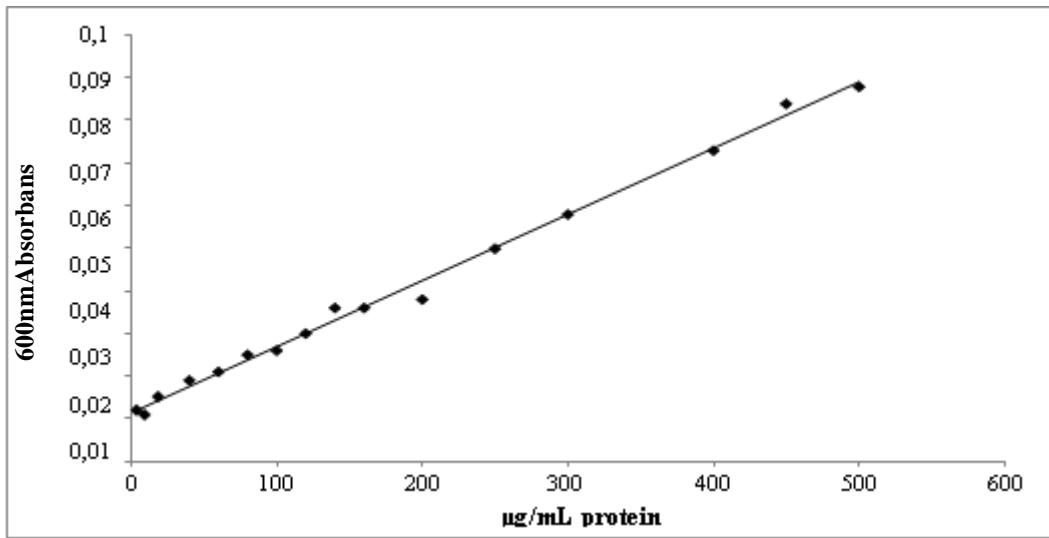
E Çözeltisi; 1:1 oranında Folin fenol ve distile suyla hazırlanmıştır.

Protein miktarının belirlenmesi amaçlanan numunelerin örnek tüplerine 1/10 oranında distile suyla seyreltilmiş halinden 100 µl alınarak üzerlerine 2000 µl D çözeltisinden eklenmiştir. Kontrol tüplerine ise 100 µl distile su ve üzerine 2000 µl D çözeltisinden eklenerek örnek ve kontrol tüpleri oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin

sonunda örnek ve kontrol tüplerine taze olarak hazırlanan E çözeltisinden 200 µl eklenip vakit kaybetmeden vorteks ile homojen hale getirilip ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda örnek ve kontrol tüplerinden 210 µl alınarak 96 Well-plate'lere konulup ve 600 nm spektrofotometrede absorbands ölçümleri yapılmıştır. Alınan absorbands değerleri, BSA grafiğinden elde edilen formül ile hesaplanarak protein miktarı grafiği çizilmiştir [100, 110].

2.2.7.3 Bovin Serum Albumin (BSA) Standart Grafiğinin Hazırlanması

Bovin Serum Albumin (BSA) çözeltisinden 1:1 oranında hazırlanan tüplere sırasıyla 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µl olacak şekilde konulup ve son hacimleri distile suyla 100 µl'ye tamamlanmıştır. Sırasıyla tüplere 2 ml D Çözeltisinden eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda sırasıyla tüplere 1:1 oranında hazırlanan E Çözeltisinden 200 µl eklenip ve hemen ardından vorteks ile homojenize edilerek 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda 96 Wellplate'in örnek kuyucuklarına 210 µl örneklerden konulmuştur. Kontrol kuyucuklarına ise olarak BSA içermeyen 1 numaralı tüp kullanıldı ve 600 nm'deki spektrofotometrik ölçümleri alınarak standart grafik çizilmiştir [100].



Şekil 2.2: Lowry metoduyla protein miktarlarının belirlenmesinde kullanılan BSA standart grafiği.

Çizilen grafikten aşağıdaki formül elde edilmiştir ve diğer örneklerin Lowry Metodu ile protein miktarı bu formül kullanılarak hesaplanmıştır.

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

2.2.8 β -glukosidaz Enziminin Saflaştırma Basamakları

T. roseum 'dan katı substrat olarak pirinç kabuğu kullanılarak elde edilen kısmi saflaştırılmış β -glukosidaz enzimine Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi kullanılarak saflaştırma işlemleri uygulanmıştır.

2.2.8.1 Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Kısmi saflaştırılmış β -glukosidaz enziminin ön saflaştırması Amonyum Sülfat Çöktürme yöntemiyle yapılmıştır. Farklı tuzlarda çöktürücü olarak kullanılabilir olmasına rağmen; Amonyum Sülfat, protein yapısına zarar vermeyen, hızlı çözünen, nispeten ucuz, kolay temin edilebilir olmasından dolayı oldukça fazla tercih edilen bir çöktürücüdür [111]. Çöktürme aralığının belirlenmesinde öncelikle kısmi saflaştırılmış β -glukosidaz enzim kaynağı için uygun Amonyum Sülfat konsantrasyonu aşağıda verilen formül kullanılarak hesaplanmıştır;

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

V : Ölçülen süpernatantın hacmi

S₁ : Amonyum Sülfatın ilk doygunluğu

S₂ : Amonyum Sülfatın istenilen doygunluğu

Amonyum Sülfat çöktürme aralığının belirlenmesi için kısmi saflaştırılmış β -glukosidaz enzim kaynağına 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. Her bir aralık için, kısmi saflaştırılmış β -glukosidaz enzim kaynağı buz üzerinde manyetik karıştırıcıyla düşük devirde karıştırılarak amonyum sülfat tuzu yavaş yavaş ilave edilip ve homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır [112, 113].

Homojen hale gelen enzim çözeltisi 15000 rpm, +4°C'de 30 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj işleminin ardından süpernatant kısımdan ayrılan pellet kısım 4 ml tuzlu tampon çözeltisi içerisinde çözülmüştür. Her bir aralıktan elde edilen çöktürme örneklerinin β -

glukosidaz enzim aktiviteleri ve Lowry Metodu kullanılarak protein miktarları belirlenmiştir [112, 113].

2.2.8.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile β -glukosidaz Enziminin Saflaştırılması

T. roseum'dan, pirinç kabuğunun katı substrat fermantasyon ortamında substrat olarak kullanılması sonucu optimum koşullarda elde edilen β -glukosidaz enziminin saflaştırılması için Amonyum Sülfat Çöktürmesinin ardından Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir [114, 115].

Hidrobik Etkileşim Kromatografisinde, 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. Kolon dengelendikten sonra tampon çözeltinin jel seviyesinin 2 cm üzerine kadar inmesi beklenip ve Amonyum Sülfat Çöktürmesi sonucu elde edilen pellet 4ml, 1,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren 50 mM NaH_2PO_4 (pH 6,8) ile çözünmüştür. Çözeltinin 500 μl 'si protein tayini ve β -glukosidaz enzim aktivitesini belirlemek 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 elde edilen örnekler 2 ml'lik ependorf tüplere alınmıştır. Ependorf tüplerdeki örneklerin 280 nm'de Warburg yöntemi ile kalitatif yolla protein miktarları tespit edilmiştir. Ardından her bir ependorf tüpteki örneklerin 410 nm'de β -glukosidaz enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Tüp numaralarına karşı elde edilen değerler ile aktivite ve protein miktarlarını içeren grafik çizildi. Çizilen grafik ile en yüksek aktiviteye sahip ependorf tüpün 600 nm'de Lowry Metodu kullanılarak kantitatif yolla toplam protein miktarı belirlenmiş ve alınan bu sonuçlar ile saflaştırma tablosu oluşturulmuştur [114, 115].

2.2.9 Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin SDS -PAGE ve NATIVE-PAGE Yöntemi Kullanılarak Saflığının ve Alt Birim Varlığı/Sayısının Belirlenmesi

T. roseum'dan saflaştırılan β -glukosidaz enziminin saflığının, alt birim varlığı ve sayısının kontrolünü belirlemek amacıyla SDS-PAGE ve NATIVE-PAGE olmak üzere iki farklı elektroforez yöntemi kullanılmıştır. Elektroforez, karmaşık protein karışımlarını ayırmak, alt birim bileşimlerini araştırmak, protein örneklerinin homojenliğini doğrulamak ve başka uygulamalarda kullanım için proteinleri saflaştırmak için kullanılır. Poliakrilamid jel elektroforezinde proteinler, bir poliakrilamid jel matrisindeki gözeneklerden elektriksel alana

yanıt olarak göç eder; akrilamid konsantrasyonunun artmasıyla gözenek büyüklüğü azalır. Gözenek büyüklüğü, protein yükünün, boyutunun ve şeklinin kombinasyonu, proteinin göç oranını belirler [116]. SDS-PAGE için en yaygın kullanılan yöntem, Laemmli (1970) tarafından belirlenen ve negatif yüklü bir deterjan olan Sodyum Dodesil Sülfatın (SDS), proteinleri denatüre etmek ve sabit bir negatif yük-kütle oranı vermek üzere kullanıldığı bir sistemdir. SDS-PAGE ile proteinler doğal yapılarının bozulmasıyla sadece molekül ağırlıklarına göre ayrılırlar. SDS-PAGE proteinlerin alt birim sayısının kontrolü ve molekül ağırlıklarının belirlenmesinde kullanılmıştır. NATIVE-PAGE proteinlerin doğal hallerinin korunduğu ve saflığının tespiti için kullanılan bir yöntemdir. NATIVE-PAGE proteinlerin, toplam molekül ağırlığının ve saflığının belirlenmesinde kullanılmıştır [102, 117].

2.2.9.1 Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) Yöntemi Kullanılarak Saflığının ve Alt Birim Varlığı/Sayısının Belirlenmesi

Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi kullanılarak saflaştırılan β -glukosidaz enziminin saflığının ve alt birim varlığı/sayısının kontrolü sağlanmıştır. SDS-PAGE yönteminde ayırma ve yığma jelleri hazırlanmadan önce elektroforeze ait cam plakalar ilk olarak distile suyla yıkandı ve etil alkolle temizliği sağlanmıştır. Ardından elektroforez jel yürütme aparatına iki adet cam plaka üst üste konulup yerleştirilerek sabitlenmiştir. Bölüm (2.1.2.8)'de belirtildiği gibi %10'luk SDS kullanılarak ayırma jeli hazırlanıp plakaların arasındaki bölgeye üst kısımdan 2-3 cm boşluk kalana kadar hava kabarcığı kalmayacak şekilde dikkatlice dökülmüş ve jel yüzeyinin düz olabilmesi için distile su konulmuştur. Ayırma jeli polimerizasyonun sağlanması için 30 dakika beklenmiş ve bu süre sonunda üst yüzeydeki distile su jele zarar vermeden uzaklaştırılmıştır. Daha sonra polimerizasyonu sağlanan ayırma jelinin üzerine Bölüm (2.1.2.8)'de belirtildiği gibi hazırlanan yığma jeli dökülmüş ve sonrasında hemen tarak aparatı yerleştirilmiştir. Yığma jeli polimerizasyonun sağlanması için 30 dakika beklenmiş ve bu süre sonunda tarak aparatı yığma jelinde oluşan kuyucuklara zarar vermeden çıkarılmıştır. Sonrasında jellerin bulunduğu elektroforez jel yürütme aparatı elektroforez tankına yerleştirilmiş ve üzerine Bölüm (2.1.2.8)'de belirtildiği gibi hazırlanan tank tamponu konulmuştur [117].

Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile yüksek aktiviteye sahip olduğu tespit edilen örnekler birleştirilerek numune çözeltisi elde edilmiştir. Elde edilen bu numune çözeltisi Bölüm (2.1.2.8)' de belirtildiği gibi hazırlanmış olan numune SDS-PAGE yükleme tamponu ile

toplam hacim 50 µl olacak şekilde 1:1 oranında hazırlanmıştır. Hazırlanan numuneler 5 dakika boyunca 100 °C sıcaklığa maruz bırakılmıştır. Ardından numunelerin soğuması beklenmiş ve soğutulduktan sonra marker ile birlikte kuyucuklara yüklenmiştir. Yükleme işleminin ardından elektroforez tankının elektrotlar bağlanarak güç kaynağı 80 V'a ayarlanarak yürütme işlemi başlatılmıştır. Yürütme işlemi, numunelerin ayırma jelinin bitimine 1cm kalana kadar devam edilmiş ve numuneler bu noktaya ulaştığında elektrik akımı kesilerek yürütme durdurulmuştur [117,118].

Yürütme işleminin ardından cam plakalar dikkatlice elektroforez tankından alınmıştır. Cam plakalar arasında bulunan jel zarar vermeden cam plakalardan ayrılmıştır. Jeldeki protein bantlarının gözlemlenebilmesi için Gümüş boyama yapılmıştır. Jel, Bölüm (2.1.2.10)'de belirtildiği gibi hazırlanan boyama çözeltileri içerisinde bekletilmiştir. Boyama işlemi tamamlandığında yıkama çözeltileri kullanılarak jele yıkama işlemi uygulanmış ve protein bantlarının net bir şekilde gözlemlenebilmesi sağlanmıştır [104, 117, 118].

2.2.9.2 Saflaştırılan β-glukosidaz Enziminin Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi (NATIVE-PAGE) Yöntemi Kullanılarak Saflığının ve AltBirim Varlığı/Sayısının Belirlenmesi

Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi (NATIVE-PAGE) yöntemi SDS-PAGE yönteminde olduğu gibi saflaştırılan β-glukosidaz enziminin saflığının ve alt birim varlığı/sayısının kontrolü sağlanmıştır. Bölüm (2.1.2.9)' de belirtildiği gibi sırasıyla ayırma jeli ve yağma jeli hazırlanarak cam plakalar arasına dökülmüştür. Cam plakalar elektroforez tankına yerleştirilip elektroforez tankına yürütme tamponu konulmuştur. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile yüksek aktiviteye sahip olduğu tespit edilen örnekler birleştirilerek numune çözeltisi elde edilmiştir. Hazırlanan numune NATIVE-PAGE yükleme tamponu ile toplam hacim 50 µl olacak şekilde 1:1 oranında hazırlanmıştır. Ardından hazırlanan numuneler marker ile birlikte kuyucuklara yüklenmiştir. Sonraki aşamalar yöntemi SDS-PAGE yönteminde olduğu gibi yapılmıştır. Sonrasında jel Gümüş boyama yapılmak için Bölüm (2.1.2.10)'de belirtildiği gibi hazırlanan boyama çözeltileriyle boyanmasının ardından yıkama çözeltileri kullanılarak jele yıkama işlemi uygulanmış ve protein bantlarının net bir şekilde gözlemlenebilmesi sağlanmıştır [102,103,104].

2.2.10 Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin Biyokimyasal ve Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi

2.2.10.1 Saflaştırılan β -glukosidaz Enzimine Farklı pH'ların Etkisinin Belirlenmesi

T. roseum'dan Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile saflaştırılan β -glukosidaz enzimine farklı pH'ların etkisini belirlemek amacıyla aktivite ölçümleri yapılmıştır. Farklı pH değerindeki 25 mM Sodyum Asetat tamponu (pH 2,0; pH 3,0; pH 4,0; pH 5,0) ve 25 mM Sodyum Fosfat tamponu (pH 6,0; pH 7,0; pH 8,0; pH 9,0) hazırlanmıştır. Hazırlanan tampon çözeltiler ile farklı pH değerinde 5 mM *p*-nitrofenil- β -D glukopirenosit (*p*NPG) substrat çözeltileri hazırlanmıştır [108,119].

Farklı pH değerlerindeki β -glukosidaz enzim aktivitelerini belirlemek amacıyla 96 well-plate'de kontrol ve örnek kuyucukları hazırlanmıştır. Kontrol kuyucuklarına; 70 μ l farklı pH değerinde tampon çözeltileri ve üzerlerine 70 μ l saflaştırılmış β -glukosidaz enzimi konulmuştur. Örnek kuyucuklarına ise 70 μ l farklı pH değerlerinde hazırlanan substrat çözeltileri ve üzerlerine 70 μ l saflaştırılan β -glukosidaz enziminden konulmuştur. Ardından 96 well-plate statik inkübatörde 37°C'de, 30 dk. inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin ardından 70 μ l 0,5 M Na₂CO₃ ile reaksiyon durdurulmuş ve spektrofotometrede 410 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür. Absorbans değerleri *p*-nitrofenil- β -D glukopirenosit (*p*NPG) standart grafiği kullanılarak farklı pH değerlerindeki β -glukosidaz enzim aktiviteleri enzim ünitesi (EU) olarak hesaplanmıştır [108,119].

2.2.10.2 Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminine Farklı Sıcaklıkların Etkisinin Belirlenmesi

T. roseum'dan Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile saflaştırılan β -glukosidaz enzimine farklı sıcaklıkların etkisini belirlemek amacıyla 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85°C'lerde aktivite ölçümleri yapıldı. Her bir sıcaklık değeri için ayrı ayrı 96 Well-plate'lerde örnek ve kontrol kuyuları hazırlandı. Kontrol kuyularına 70 μ l Sodyum Fosfat tampon çözeltisi ve üzerlerine saflaştırılan β -glukosidaz enziminden 70 μ l konuldu. Örnek kuyularına ise 70 μ l *p*-nitrofenil- β -D glukopirenosit (*p*NPG) çözeltisi ve üzerlerine 70 μ l saflaştırılan β -glukosidaz enziminden konuldu. Ardından hazırlanan Well-plate'ler belirlenen sıcaklıklardaki inkübatörlerde 30 dk. süre ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin ardından 70 μ l 0,5M Na₂CO₃ ile reaksiyon durduruldu ve spektrofotometrede 410 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Absorbans değerleri *p*-nitrofenil- β -D glukopirenosit (*p*NPG) standart grafiği kullanılarak farklı sıcaklık değerlerindeki β -glukosidaz enzim aktiviteleri enzim ünitesi (EU) olarak hesaplanmıştır [108,119].

2.2.10.3 Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin Termal Kararlılığının Belirlenmesi

T. roseum'dan Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile saflaştırılan β -glukosidaz enziminin termal kararlılığını belirlemek amacıyla 45, 55, 65, 75, 85°C sıcaklıklarda ayrı ayrı inkübasyona bırakılmıştır. Başlangıç enzim aktivite noktası olarak sıcaklık ile etkileşime uğratılmamış β -glukosidaz enzimi çözeltisinden alınan ve aktivitesi ölçülen örneğe ait aktivite değeri kabul edilmiştir [120, 121].

45, 55, 65, 75°C'lerdeki termal kararlılığın belirlenmesi için β -glukosidaz enzimi 120 dakika süresince 45, 55, 65, 75°C'lerde inkübasyona bırakıldı ve her 10 dakikada bir β -glukosidaz enzim aktiviteleri ölçüldü. 85°C'deki termal kararlılığın belirlenmesi için ise her 2 dakikada bir β -glukosidaz enzim aktivitesi ölçüldü bu işlem aktivite sıfırlanana kadar sürdürülmüştür. Absorbans değerlerinden *p*-nitrofenil- β -D glukopirenosit (*p*NPG) standart grafiği kullanılarak β -glukosidaz enzim aktiviteleri enzim ünitesi (EU) olarak hesaplanmış ve enzimin termal kararlılığı belirlenmiştir [120, 121].

2.2.10.4 Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin *p*-nitrofenil- β -D glukopirenosit (*p*NPG) Substratına Karşı K_M ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi

β -glukosidaz enziminin *p*NPG substratına olan ilgisini gösteren K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi amacıyla enzim miktarı sabit tutularak *p*NPG substratının 5-70 μ l arasında değişen konsantrasyonlarda enzim aktivitesinin ölçümleri yapılarak aktivite değerleri hesaplandı. Elde edilen aktivite değerleri, reaksiyon hızı [V] EU/ml cinsinden hesaplandı. Reaksiyon hızından [V] yararlanılarak $1/[V]$ değeri ve kullanılan substrat konsantrasyonlarından [S] yararlanılarak $1/[S]$ değeri elde edilmiştir. Elde edilen bu değerlerden Lineweaver-Burk grafiği çizilmiştir [122, 123].

Çizilen Lineweaver-Burk grafiğine ait denklemden K_M ile V_{max} değerleri bulunmuştur. Grafiğin $1/V$ eksenini kestiği nokta olan $1/V_{max}$ değerinden V_{max} değeri, denklemin eğimi olan K_M/V_{max} ifadesinde V_{max} değeri yerine yazılarak K_M hesaplanmıştır [122, 123].

2.2.10.5 Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin İnhibitörü Olarak Kullanılan D-(+)-glukoz ve δ -glukonolaktonun IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi

Saflaştırılan β -glukosidaz enziminin, enzim aktivitesi üzerine D-(+)-glukoz ve δ -glukonolaktonun inhibisyon etkileri belirlenerek IC_{50} değerleri hesaplandı. D-(+)-glukoz ve δ -glukonolaktonun IC_{50} değerlerini bulunmasında, *p*NPG substratının 1,25 mM konsantrasyonu

çalışıldı. İnhibitör uygulanmamış ortamdaki enzim aktivitesi tespit edilerek bu değer % 100 aktivite olarak alındı. 1-60 µl arasında değişen inhibitör konsantrasyonlarında enzim aktivite değerleri bulundu. Bulunan bu değerlerden % aktivite hesaplanarak, % Aktivite-[I] (İnhibitör konsantrasyonu) grafikleri çizildi. Çizilen bu grafikler kullanılarak enzim aktivitesini %50 oranında azaltan inhibitör konsantrasyonları olan IC₅₀ değerleri hesaplandı [114].

2.2.10.6 Saflaştırılan β-glukosidaz Enziminin İnhibitörü Olarak Kullanılan D-(+)-glukoz ve δ-glukonolaktonun K_i Değerlerinin Belirlenmesi

Saflaştırılan β-glukosidaz enziminin inhibitörü olarak kullanılan D-(+)-glukoz ve δ-glukonolaktonun K_i değerleri belirlenerek inhibisyon tipleri tespit edildi. K_i değerinin tespiti için; inhibitör uygulanmayan ortamda 5-70 µl arasında değişen pNPG substrat konsantrasyonlarında aktivite değerleri tespit edildi. Tespit edilen bu aktivite değerleri [V] olarak alınarak 1/[V] değerleri hesaplandı. Değişen substrat konsantrasyonları [S] olarak alınarak, 1/[S] değerleri hesaplandı. Hesaplanan bu değerler kullanılarak Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve I₀ doğrusu elde edildi [48, 114].

Kullanılan her iki inhibitör maddenin 2 farklı sabit konsantrasyonunda, 5-70 µl arasında değişen pNPG substrat konsantrasyonlarında aktivite değerleri belirlendi. Farklı iki inhibitör konsantrasyonu varlığında farklı substrat konsantrasyonlarına karşılık gelen enzim aktiviteleri kullanılarak 1/[V] ve 1/[S] değerleri hesaplandı. Hesaplanan bu değerler kullanılarak Lineweaver-Burk grafiği çizilerek I₁ ve I₂ doğruları oluşturuldu [48, 114].

Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak K_i değerleri ve inhibisyon tipleri belirlendi. K_i değerleri; yarışmalı (kompetitif) inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrisinde 1/[S] eksenini kestiği nokta olan $-1/K_M (1+[I]/K_i)$ denklemi, yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon için 1/[V] eksenini kestiği nokta olan $1/V_{max} (1+[I]/K_i)$ denklemi, yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon tipi için 1/[V] eksenini kestiği nokta olan $1/V_{max} (1+[I]/K_i)$ denklemi kullanılarak hesaplandı. K_i değerlerinin hesaplanmasında kullanılan denklemlerdeki K_M ve V_{max} değerleri inhibitörsüz ortamdaki değerlerdi [48, 114].

3. BULGULAR

3.1 Mikrofungusun Katı Besiyerinde β -glukosidaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Trichothecium roseum fungusunun β -glukosidazaktivitesine sahip olup olmadığını belirlemek için %5' lik Karboksimetil Selüloz (CMC) içeren Malt Ekstrakt Agar besiyerine iğne öze inokülasyonu yapıldı ve 25°C'de 7 gün boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda hidroliz zonu tayini için yapılan boyama sonunda *T. roseum* kolonisi etrafında zon gözlemlendiğinden *T.roseum*'un β -glukosidaz enzim üretimi pozitif olarak değerlendirilip deneylerde kullanılmasına karar verildi.

3.2 Katı Substrat Fermantasyon Ortamı Koşullarının Mikrofungusdan β -glukosidaz Enzimi Üretimine Etkisi

Öğütülmüş pirinç kabuğu kullanılarak katı substrat fermentasyon ortamında geliştirilen fungusun enzim üretiminde etkili olan nemlendirme sıvısı ve pH'sı, inkübasyon sıcaklığı ve inkübasyon süresi parametreleri optimize edildi. Her bir parametrenin optimizasyonu sonucunda elde edilen bulgular bir sonraki optimizasyon basamağı için sabitlendi ve fungusun enzim üretimi için yüksek aktivite gösterdiği optimum gelişim koşulları belirlendi.

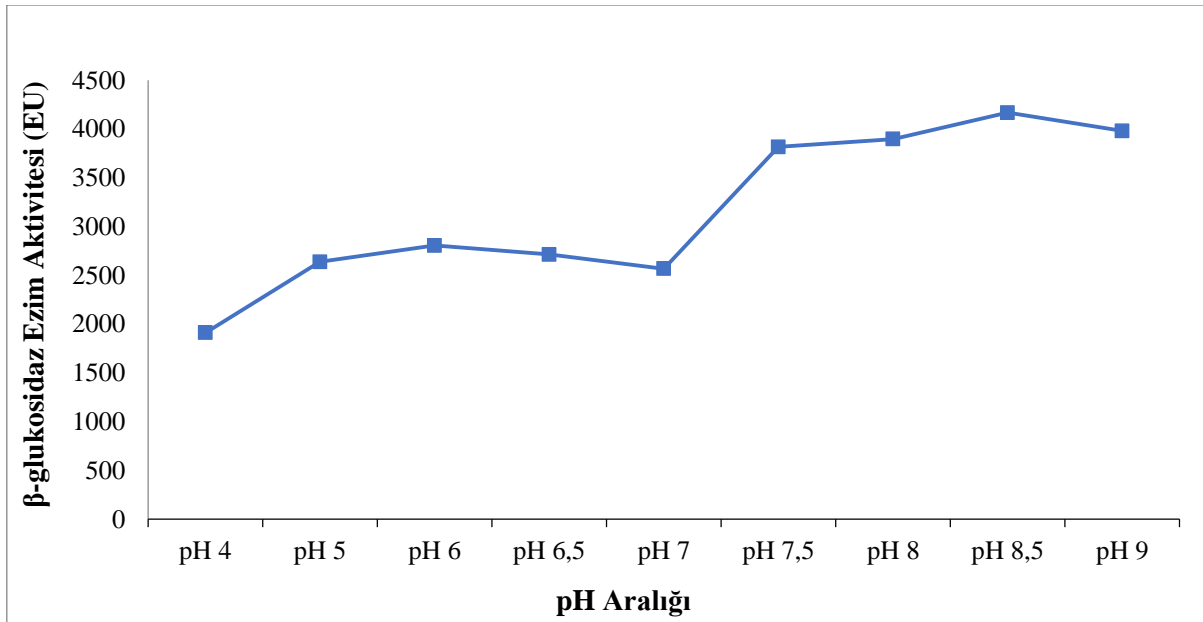
3.2.1 Nemlendirme Sıvısı ve Optimum pH'nın Belirlenmesi

Optimizasyon çalışmalarının ilk basamağında *T. roseum*'un katı substrat fermentasyon kültür ortamında en yüksek aktivitede β -glukosidaz enzimi ürettiği optimum pH'nın belirlenmesi amacıyla 9 farklı pH'da nemlendirme sıvıları kullanılmıştır. Öğütülmüş pirinç kabuğu kullanılarak hazırlanan kültür ortamı; pH4 ve pH 5 için 0,2 M Sitrik Asit Monohidrat, pH 6 ve pH8 arası pH'lar için 0,2 M Sodyum Dihidrojen Fosfat, pH 8,5 ve pH 9 için Disodyum Monohidrojen Fosfat tamponları kullanılarak nem yüzeyi %55 olarak ayarlanıp, 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak hazırlandı. Hazırlanan katı substrat fermentasyon ortamlarına *T. roseum* sıvı kültüründen 3 ml inoküle edildi ve fungus gelişimi için 30°C' de 7 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda Bölüm (2.2.6)'da anlatıldığı üzere elde edilen kısmi saflaştırılmış enzimlerin β -glukosidaz enzim aktivite ölçümleri yapıldı.

Ölçüm sonuçlarına göre *T. roseum*'um en yüksek β -glukosidaz enzimi aktivitesi gösterdiği katı substrat fermentasyon ortamının pH değeri 8,5, nemlendirme sıvısının ise Disodyum Monohidrojen Fosfat tamponu olduğu belirlendi (Şekil 3.1; Tablo 3.1).

Tablo 3.1: Katı substrat fermentasyonu kültür ortamında farklı pH'lardaki nemlendirme sıvılarının *T.roseum*'dan β -glukosidaz enzimi üretimi üzerine etkisi.

Nemlendirme sıvılarının pH Değerleri	<i>Trichothecium roseum</i> 'dan elde edilen β -glukosidaz enzimlerinin aktivitesi(EU)
pH 4	1910,569
pH 5	2638,211
pH 6	2804,878
pH 6,5	2714,092
pH 7	2567,751
pH 7,5	3815,718
pH 8	3897,019
pH 8,5	4168,022
pH 9	3981,030



Şekil 3.1: Katı substrat fermentasyonu kültür ortamında farklı pH'lardaki nemlendirme sıvılarının *Trichothecium roseum*'dan β -glukosidaz enzimi üretimi üzerine etkisi.

3.2.2 Optimum İnkübasyon Sıcaklığının Belirlenmesi

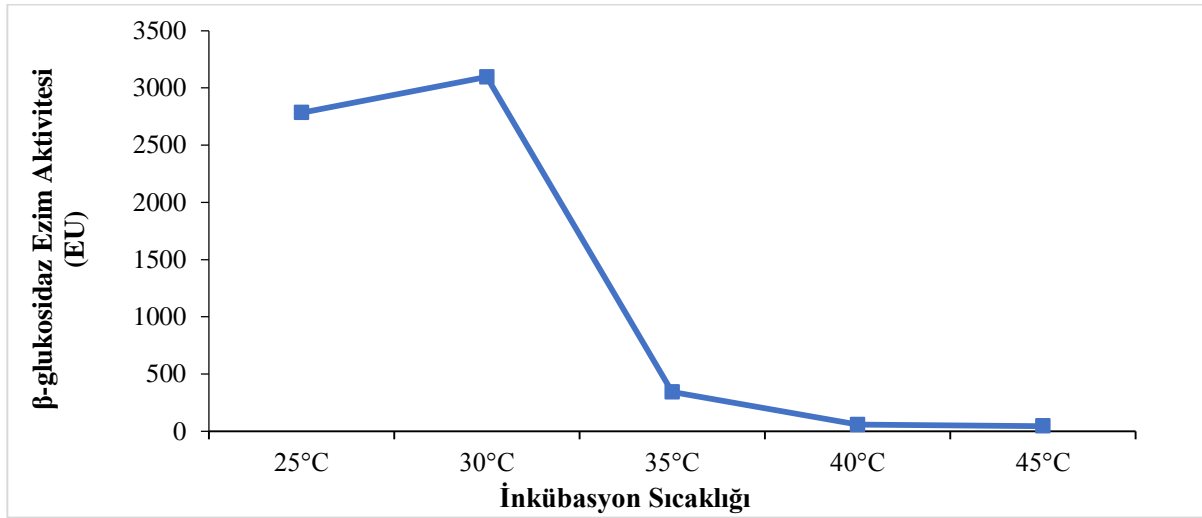
Optimizasyon işlemlerinin bir diğer basamağı olan optimum inkübasyon sıcaklığının belirlenmesi amacıyla Katı Substrat Fermantasyonu ortamları bir önceki basamakta belirlenen pH'ı 8,5 olan 0,2 M Disodyum Monohidrojen Fosfat tamponu ile nemlendirilip 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak sterilizasyonları gerçekleştirildi. Hazırlanan KSF ortamlarına *T.*

roseum'un sıvı kültüründen 3 ml inokule edilerek 25, 30, 35, 40 ve 45°C sıcaklıklarda 7 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda Bölüm (2.2.6)'da anlatıldığı şekilde elde edilen kısmi saflaştırılmış enzimlerin β -glukosidaz enzim aktivite ölçümleri yapıldı.

Yapılan ölçümlerin sonuçlarına göre KSF ortamında *T. roseum*'un en yüksek aktivitede β -glukosidaz enzimi ürettiği optimum inkübasyon sıcaklığının 30°C olduğu belirlendi (Şekil 3.2; Tablo 3.2).

Tablo 3.2: Katı substrat fermentasyonu kültür ortamında farklı inkübasyon sıcaklıklarının *Trichothecium roseum*'dan β -glukosidaz enzimi üretimi üzerine etkisi.

İnkübasyon sıcaklığı(°C)	<i>Trichothecium roseum</i> 'dan elde edilen β -glukosidaz enzimlerinin aktivitesi (EU)
25	2783,198
30	3094,851
35	342,8184
40	56,91057
45	44,71545



Şekil 3.2: Katı substrat fermentasyonu kültür ortamında farklı inkübasyon sıcaklıklarının *Trichothecium roseum*'dan β -glukosidaz enzimi üretimi üzerine etkisi.

3.2.3 Optimum İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi

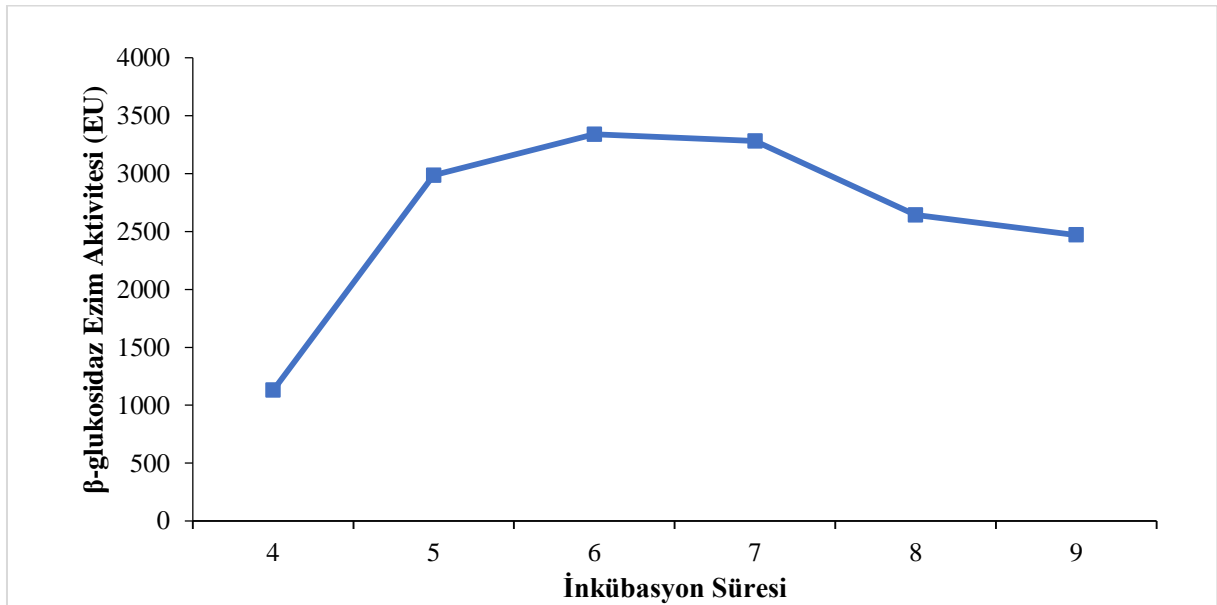
Optimizasyon işlemlerinin son basamağı olan optimum inkübasyon süresinin belirlenmesi amacıyla *Trichothecium roseum*'un katı substrat fermentasyon ortamı üzerinde enzim aktivitesinin en yüksek olduğu inkübasyon süresi belirlendi. *T.roseum*'un optimum inkübasyon süresinin belirlenmesi amacıyla KSF ortamları önceki basamakta belirlenen pH'ı

8,5 olan 0,2 M Disodyum Monohidrojen Fosfat tamponu ile nemlendirilip 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edildi. Hazırlanan fermentasyon ortamlarına *T. roseum*'un sıvı kültüründen 3 ml inokule edilerek bir önceki basamakta belirlenen inkübasyon sıcaklığında (30°C) gelişimleri sağlandı. 4. günden başlayarak *T. roseum*'dan elde edilen kısmi saflaştırılmış β -glukosidaz enzimlerinin Bölüm (2.2.6)'da anlatıldığı gibi aktivite ölçümleri yapıldı.

Yapılan ölçümlerin sonuçlarına göre KSF ortamında *T. roseum*'un en yüksek aktivitede β -glukosidaz enzim aktivitesi gösterdiği optimum inkübasyon süresinin 6. gün olduğu belirlendi (Tablo3.3, Şekil 3,3).

Tablo 3.3: Katı substrat fermentasyonu kültür ortamında farklı inkübasyon sürelerinin *Trichothecium roseum*'dan β -glukosidaz enzimi üretimi üzerine etkisi.

İnkübasyon süresi(gün)	<i>Trichothecium roseum</i> 'dan elde edilen β -glukosidaz enzimlerinin aktivitesi (EU)
4	1128,726
5	2985,095
6	3340,108
7	3281,843
8	2642,276
9	2470,190



Şekil 3.3: Katı substrat fermentasyonu kültür ortamında farklı inkübasyon sürelerinin *Trichothecium roseum*'dan β -glukosidaz enzimi üretimi üzerine etkisi.

3.3 Katı Substrat Fermentasyonu Kültür Ortamına Ekim ve Kısmi Saflaştırılmış β -glukosidaz Enziminin Eldesi

β -glukosidaz üretimi için öğütölmüş pirinç kabuğuylaile hazırlanan pH'ı 8,5 olan Disodyum Monohidrojenle %55 nemlendirilen steril KSF ortamına *T. roseum*'un sıvı kültüründen 3 ml inoküle edildi ve belirlenen optimum koşullarda (30°C'de 6 gün) geliştirildi. Geliştirilen Katı Substrat Fermentasyonu kültür ortamı üzerine 75 ml distile su konularak 150 rpm'de 2 saat çalkalamalı inkübatörde inkübe edildikten sonra steril gazlı bezle süzölerek filtratı alındı. Ardından ultrasantirföjle 4C'de 10000 rpm'de 10 dakika santriföjleme işlemi yapılarak filtratın süpernatant kısmı pellet kısmından ayrıldı. Elde edilen süpernatant kısım, kısmi saflaştırılmış enzim kaynağı olarak saflaştırma işlemlerinde (Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi) kullanıldı.

3.4 β -glukosidaz Enziminin Saflaştırılması

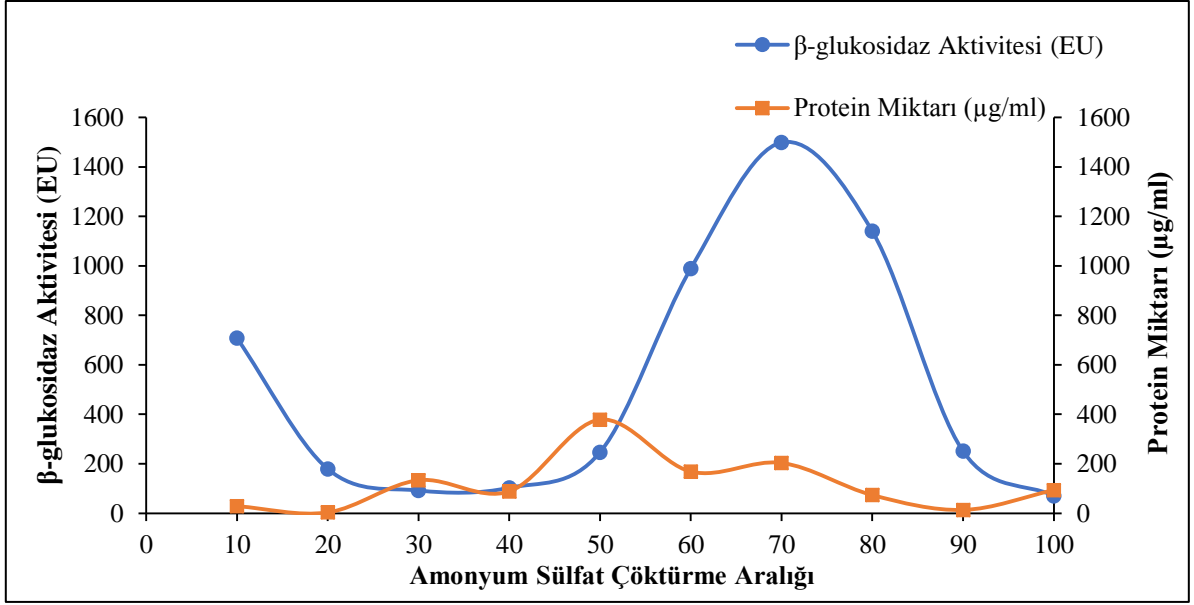
3.4.1 Amonyüm Sülfat Çöktürmesi

T. roseum'dan elde edilen β -glukosidaz enziminin Amonyum Sülfat çöktürme aralığını belirlemek için; kısmi saflaştırılmış enzime 10 farklı aralık değeri için Tablo 3.4' de belirtilen miktarlarda amonyum sülfat tuzu [1,5 M, $\text{NH}_4(\text{SO}_2)$] eklenerek çöktürme işlemi yapıldı. Çöktürme işleminin ardından her bir aralık değerinin β -glukosidaz aktivitesi (EU) ve Lowry metodu ile protein miktarı (mg/ml) ölçümleri yapıldı.

Tablo 3.4: *Trichothecium roseum*'dan elde edilen kısmi saflaştırılmış β -glukosidaz enziminin amonyum sülfat çöktürme aralıklarında enzim aktiviteleri ve protein miktarları.

Aralık Değeri	Çöktürme Aralığı (%)	Hacim (ml)	Kullanılan Amonyum Sülfat Miktarı (g)	β -glukosidaz Aktivitesi (EU)	Protein Miktarı (μ g/ml)
1	0-10	10	0,5145	707,3171	28,5
2	10-20	10	0,5299	178,8618	3,5
3	20-30	10	0,5462	92,14092	133,5
4	30-40	10	0,5636	102,981	88,5
5	40-50	10	0,5822	246,6125	378,5
6	50-60	10,5	0,6321	989,1599	168,5
7	60-70	10,5	0,6544	1498,645	203,5
8	70-80	10,5	0,6782	1139,566	73,5
9	80-90	10,5	0,7039	250,6775	13,5
10	90-100	10,5	0,7316	70,4607	93,5

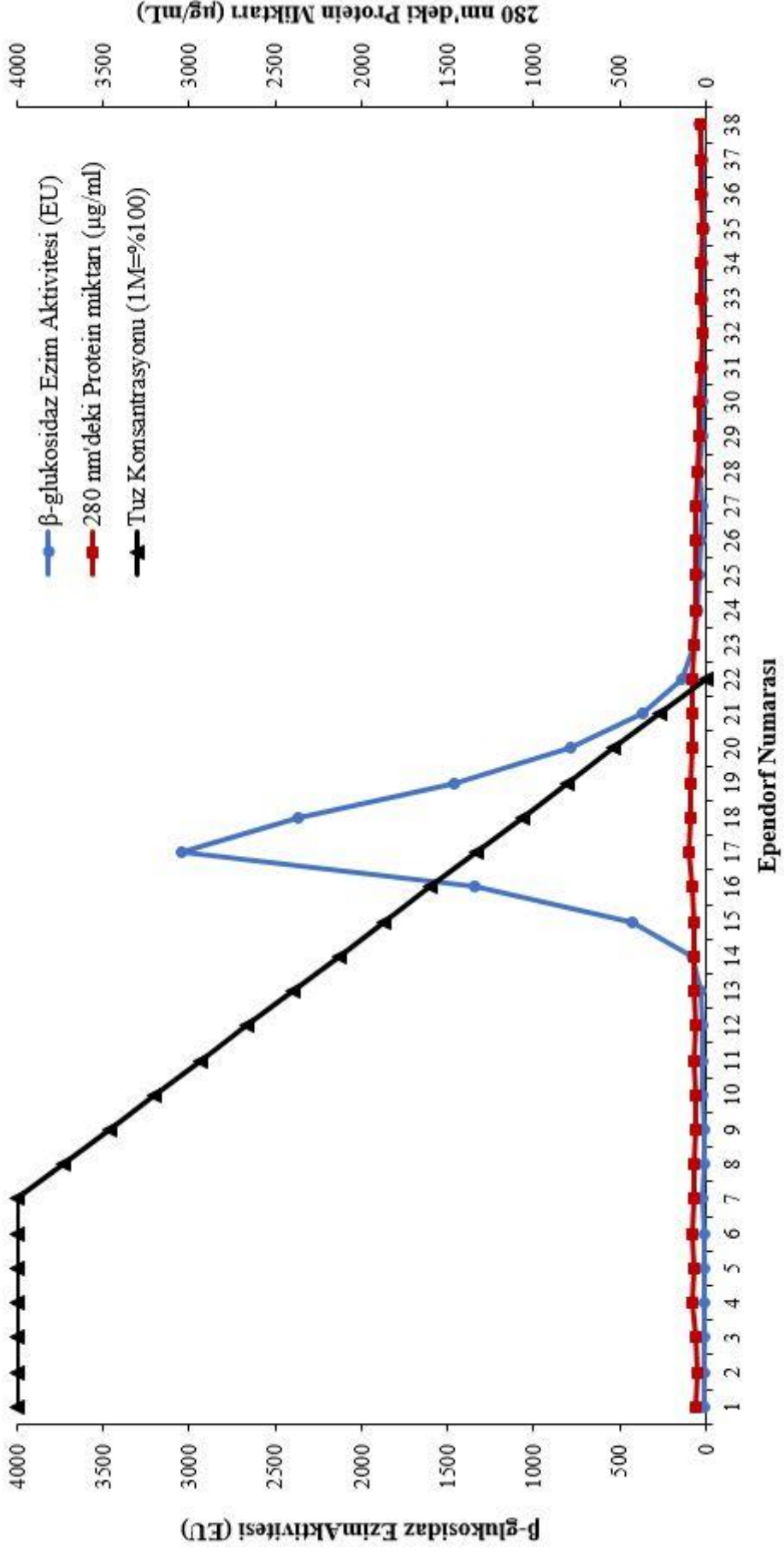
Ölçüm sonuçlarından elde edilen veriler kullanılarak Şekil 3.4'deki amonyum sülfat çöktürme aralığı- β -glukosidaz enzim aktivitesi-protein miktarı grafiği çizildi. Çizilen bu grafiğe göre β -glukosidaz enzim aktivitesinin en yüksek olduğu Amonyum Sülfat çöktürme aralığı %50-90 olarak belirlendi ve Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi'nde kullanılmak üzere kısmi saflaştırılmış enzim kaynağına %50-90 tuz konsantrasyonunda Amonyum Sülfat Çöktürmesi yapıldı.



Şekil 3.4: *Trichothecium roseum*'dan elde edilen kısmi saflaştırılmış β-glukosidaz enziminin amonyum sülfat çöktürme aralıklarında enzim aktiviteleri ve protein miktarları.

3.4.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi

T.roseum'dan elde edilen kısmi saflaştırılmış enzim kaynağına %50-90 aralığında Amonyum Sülfat Çöktürmesi yapılarak, çöktürme sonucunda elde edilen enzim numuneleri Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftlamin jeli içeren kolona yüklendi. Kolondan geçen numuneler sırasıyla numaralandırılan 2 ml'lik ependorf tüpler içerisinde toplandı. Kromatografinin tamamlanmasının ardından ependorf tüpler içerisinde toplanan numunelerin β-glukosidazenzim aktiviteleri ve Warburg Yöntemi ile 280 nm'de kalitatif protein değerlerinin ölçümleri yapıldı. Elde edilen sonuçlar kullanılarak β-glukosidaz enzim elüsyon grafiği çizildi (Şekil 3.5). Grafikte yer alan verilerden yararlanarak yüksek aktivite gösterdiği tespit edilen numuneleri içeren ependorf tüpleri belirlendi ve bunlara Lowry Yöntemi kullanılarak kantitatif protein ölçümleri yapıldı. Yapılan bu ölçüm sonuçlarından yararlanılarak *T.roseum*'dan elde edilen β-glukosidaz enziminin saflaştırılma tablosu oluşturuldu (Tablo 3.5).



Şekil 3.5: Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi kullanılarak saflaştırılan *Trichothecium roseum*'dan elde edilen β -glukosidaz enziminin elüsyon grafiği.

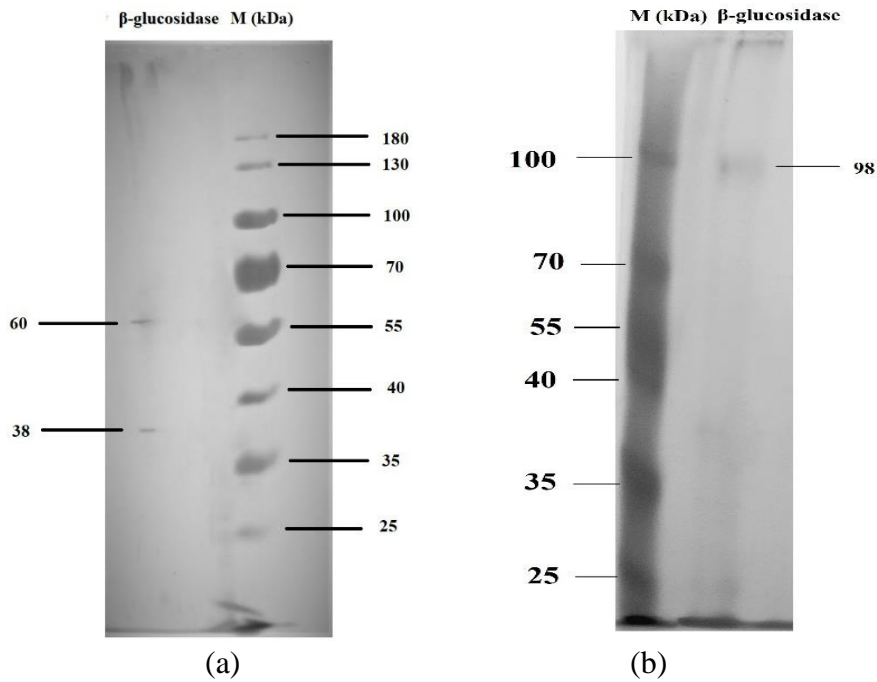
Tablo 3.5: *Trichothecium roseum*' dan elde edilen β -glukosidaz enziminin saflaştırma tablosu

Saflaştırma Aşamaları	Hacim (ml)	Enzim Aktivitesi (EU/ml)	Protein Miktarı (mg/ml)	Toplam Enzim Aktivite (EU/ml)	Toplam Protein Miktarı (mg)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	% Verim	Saflaştırma Derecesi
Ham Ekstrakt (Kısmi saflaştırılmış)	10	3911,924	0,0985	39119,24	0,985	39714,9644	100	1
Ammonyum Sülfat Çöktürmesi	4	3975,61	0,0135	15902,44	0,054	294489,6296	40,651199	7,415079771
Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi	3,5	3044,715	0,0035	10656,5025	0,01225	869918,5714	27,241078	21,9040501

T. roseum'dan elde edilen β -glukosidaz enziminin saflaştırma tablosunda (Tablo 3.5) gösterildiği gibi Amonyum Sülfat Çöktürmesi sonucunda total aktivitesi 15902,44 EU/ml ve total protein miktarı 0,054 mg olarak belirlenerek %40,65 verimle 7,41 kat saflaştırıldığı hesaplandı. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi sonucunda ise β -glukosidaz enziminin total aktivitesi 10656,5025 EU/ml ve total protein miktarı 0,01225 mg olarak belirlendi %27,24 verimle 21,90 kat saflaştırıldığı hesaplandı.

3.5 *Trichothecium roseum*'dan Elde Edilerek Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin Elektroforez Yöntemleri ile Saflığının ve Alt Birimlerinin Varlığının/Sayısının Kontrolü

T. roseum'dan elde edilerek saflaştırılan β -glukosidaz enziminin Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez ve Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez olmak üzere iki farklı elektrofrez metoduyla ile saflığının ve alt birimlerinin varlığının/sayısının kontrolü sağlandı (Şekil 3.6).



Şekil 3.6: *Trichothecium roseum*'dan Hidrofobik Etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan β -glukosidaz enziminin (a) SDS-PAGE, (b) NATIVE-PAGE görüntüleri.

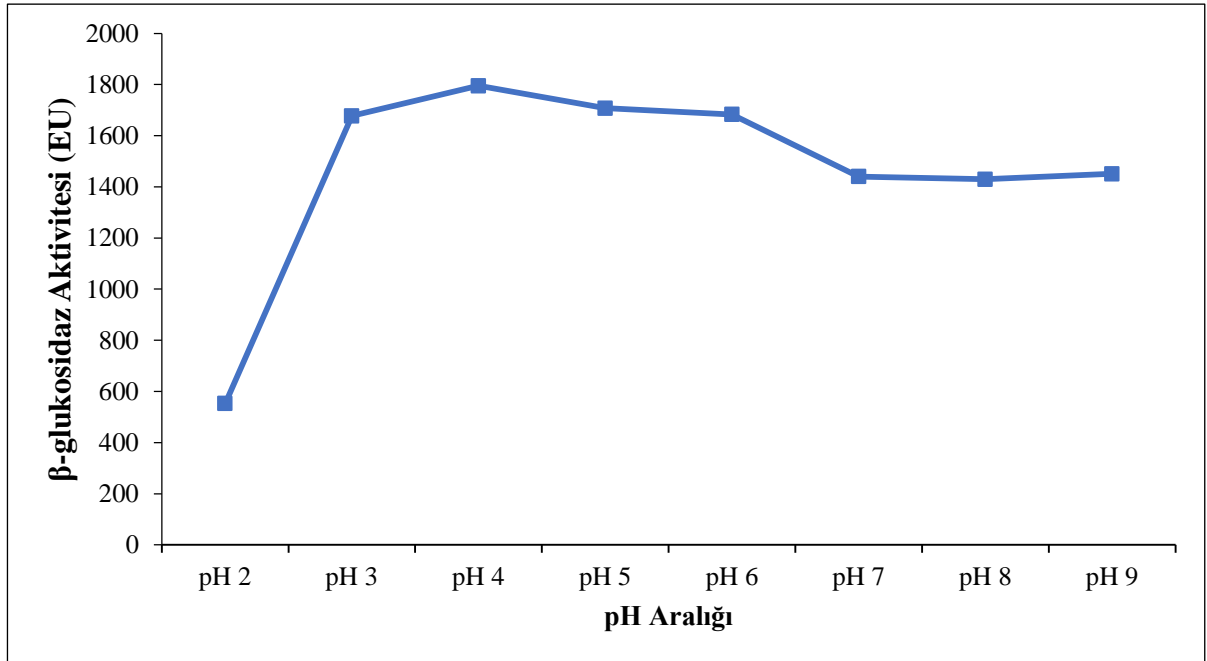
T. roseum'dan saflaştırılan β -glukosidaz enziminin SDS-PAGE jel görüntüsünde yaklaşık 38 ve 60 kDa bölgesinde iki bant verdiği, NATIVE-PAGE jel görüntüsünde de yaklaşık 98 kDa bölgesinde tek bant verdiği belirlendi. Saflaştırılan β -glukosidaz enziminin 98 kDa büyüklüğünde, iki alt üniteden oluştuğu tespit edildi.

3.6 *Trichothecium roseum*'dan Elde Edilerek Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin ve Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi

T. roseum'dan Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi yöntemi ile saflaştırılan β -glukosidaz enziminin biyokimyasal özelliklerinin ve kinetik parametrelerin belirlenmesi amacıyla farklı pH değerleri, farklı sıcaklık değerleri ve termal kararlılıkları araştırıldı, K_M , V_{max} , IC_{50} ve K_i değerleri ile inhibisyon tipleri tespit edildi.

3.6.1 *Trichothecium roseum*'dan Elde Edilerek Saflaştırılan β -glukosidaz Enzime Farklı pH'ların Etkisi

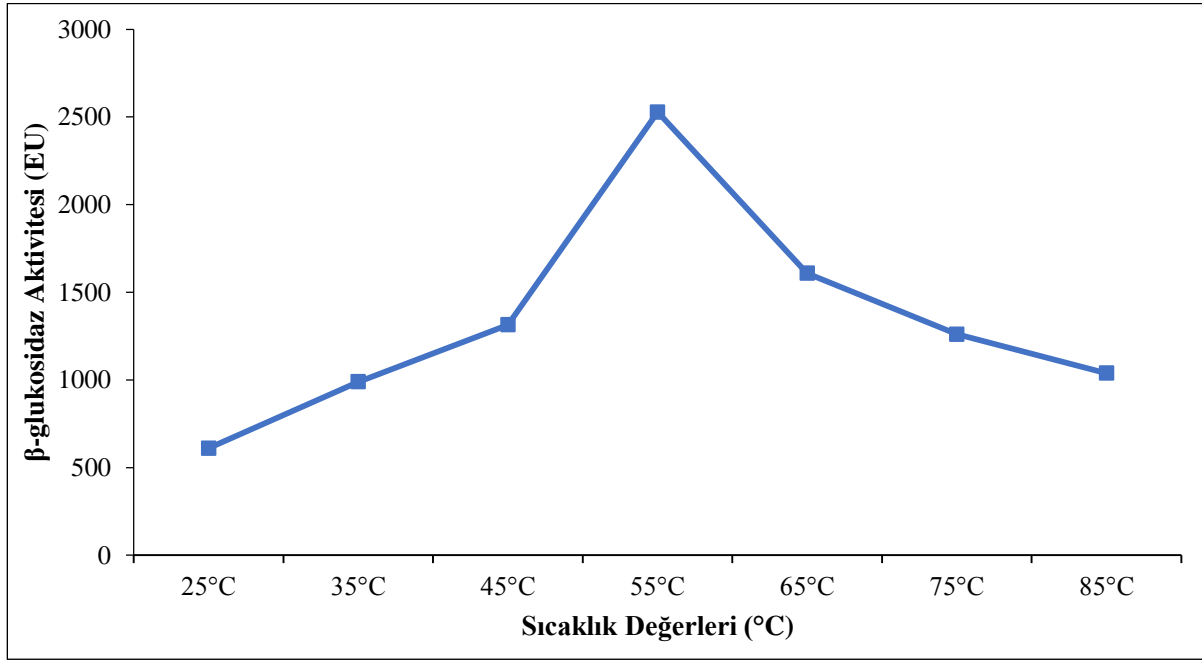
Saflaştırılan β -glukosidaz enzime farklı pH'ların etkisinin belirlenmesi amacıyla; farklı pH (pH2 ile pH9 arası) değerlerindeki tampon çözeltilere ve bu tampon çözeltiler ile hazırlanan *p*NPG substratları kullanılarak β -glukosidaz aktivite ölçümleri yapıldı. Ölçümler sonunda elde edilen verilerden yararlanılarak Şekil 3.7'deki β -glukosidaz enziminin farklı pH'lardaki aktivite grafiği çizildi ve en yüksek aktivite gösterdiği pH değeri 4 olarak belirlendi.



Şekil 3.7: Saflaştırılan β -glukosidaz enzime farklı pH'ların etkisi.

3.6.2 *Trichothecium roseum*'dan Elde Edilerek Saflaştırılan β -glukosidaz Enzimine Farklı Sıcaklıkların Etkisi

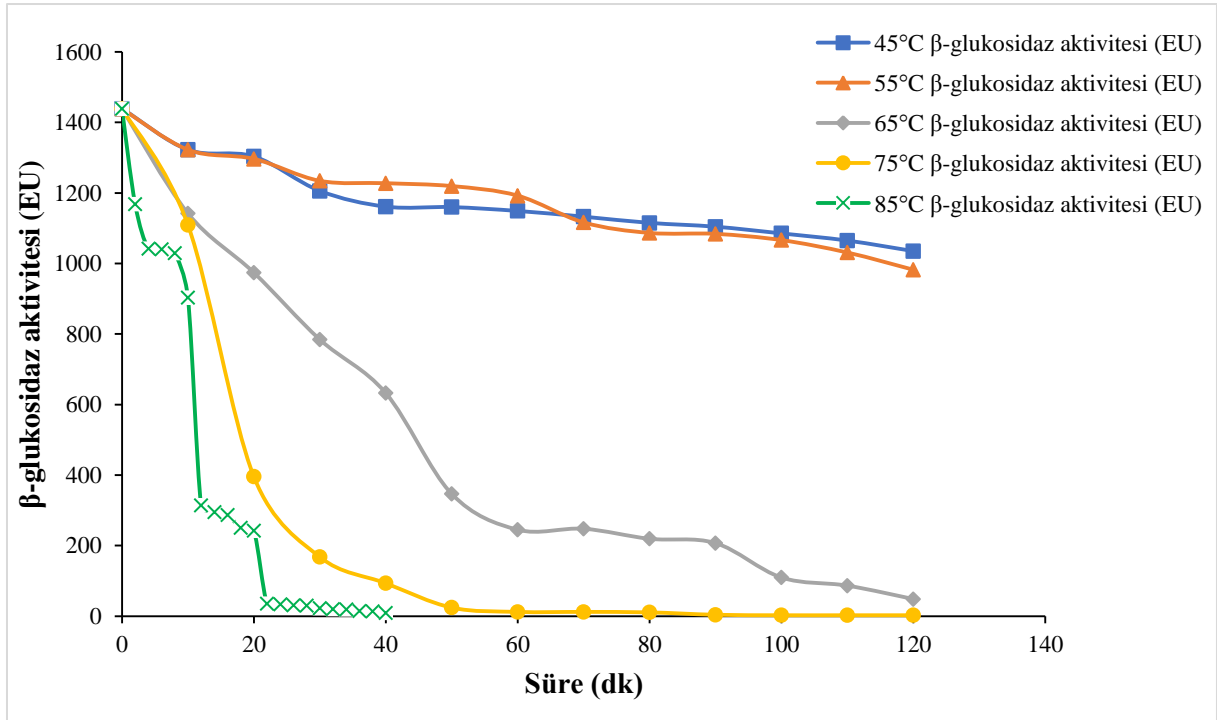
Saflaştırılan β -glukosidaz enzimine farklı sıcaklıkların etkisinin belirlenmesi amacıyla; farklı sıcaklıklarda (25°C ile 85°C arası) β -glukosidaz aktivite ölçümleri yapıldı. Ölçümler sonunda elde edilen verilerden yararlanılarak Şekil 3.8'deki β -glukosidaz enziminin farklı sıcaklıklardaki aktivite grafiği çizildi ve en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık değeri 55°C olarak belirlendi.



Şekil 3.8: Saflaştırılan β -glukosidaz enzimine farklı sıcaklıkların etkisi.

3.6.3 *Trichothecium roseum*'dan Elde Edilerek Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin Termal Kararlılığının Belirlenmesi

Saflaştırılan β -glukosidaz enziminin termal kararlılığının belirlenmesi amacıyla; 5 farklı sıcaklık değerlerinde β -glukosidaz aktivite ölçümü yapıldı ve β -glukosidaz enziminin termal kararlılık grafiği çizildi (Şekil 3.9).



Şekil 3.9: Saflaştırılan β-glukosidaz enziminin termal kararlılık grafiği.

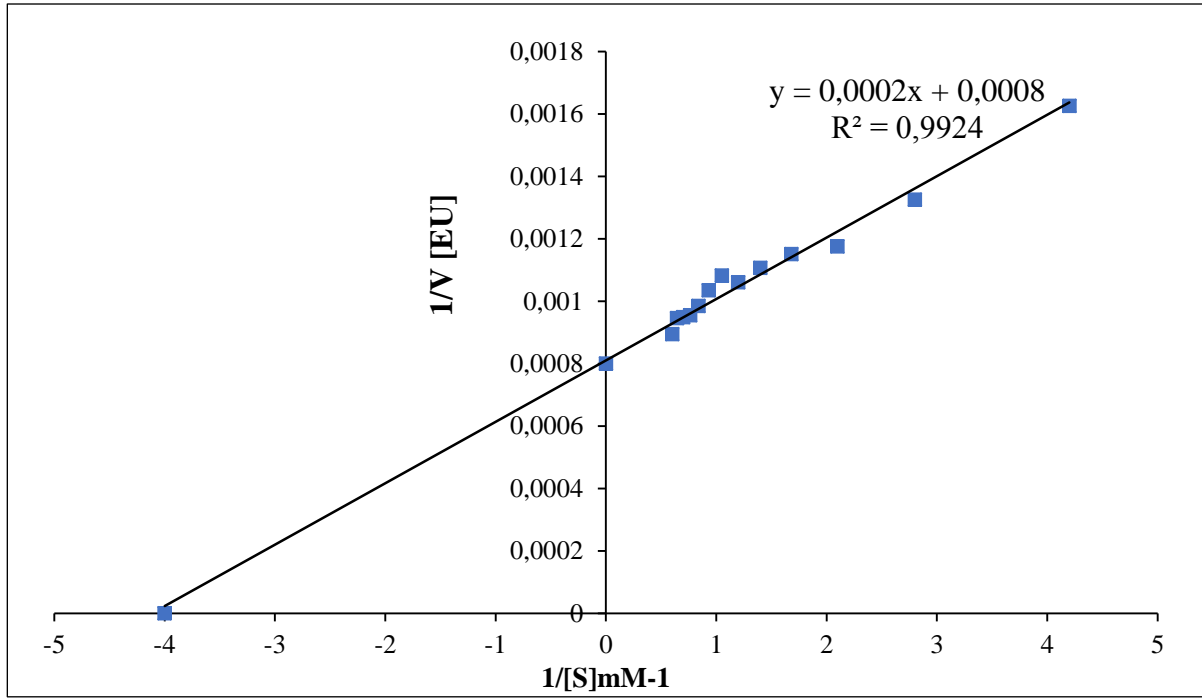
T. roseum'dan saflaştırılan β-glukosidaz enziminin farklı sıcaklıklardaki 120 dakikalık inkübasyonunun ardından yapılan ölçüm sonuçlarına göre; 45°C'de % 71,94, 55°C'de % 68,27, 65°C'de % 3,39, 75°C'de % 0,188 oranlarında, 85°C' de ise 40 dakika boyunca hızla azalan enzim aktivitesi gösterdiği tespit edildi.

3.6.4 *Trichothecium roseum*'dan Elde Edilerek Saflaştırılan β-glukosidaz Enziminin K_M ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi

T. roseum'dan saflaştırılan β-glukosidaz enziminin *p*NPG substratına olan ilgisi K_M ve V_{max} değerleri ile belirlendi. Öncelikle *p*NPG substratının 5-70 µl arasında değişen konsantrasyonlarına karşın enzim miktarı sabit tutularak enzim aktivitesinin ölçümleri yapıldı ve aktivite değerleri hesaplandı (Tablo 3.6). Ölçüm sonuçlarından elde edilen aktivite değerleri reaksiyon hızı [V] EU/ml cinsinden hesaplandı. Reaksiyon hızı [V] ile 1/[V] değeri ve kullanılan substratın konsantrasyonları [S] ile de 1/[S] değeri elde edildi. Elde edilen bu değerler kullanılarak Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 3.10).

Tablo 3.6: *Trichothecium roseum*' dan saflaştırılan β -glukosidaz enziminin K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesinde kullanılan değerler.

50mM NaH_2PO_4 tamponu (μ l)	Saflaştırılmış Enzim Hacmi (μ l)	pNPG Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Plate Kuyusundaki Toplam Hacim (μ l)	Plate Kuyusundaki Substrat Konsantrasyonu [S](mM)	AA (410 nm)	β -glukosidaz enzim Aktivitesi (U/ml dk.)	1/[V]	1/[S]
125		5		0,119	0,330	447,1545	0,002236	8,403
120		10		0,238	0,454	615,1762	0,001626	4,201
115		15		0,357	0,557	754,7425	0,001325	2,801
110		20		0,476	0,628	850,9485	0,001175	2,100
105		25		0,595	0,641	868,5637	0,001151	1,680
100		30		0,714	0,667	903,7940	0,001106	1,400
95		35		0,833	0,696	943,0894	0,001060	1,200
90	70	40	210	0,952	0,682	924,1192	0,001082	1,050
85		45		1,071	0,713	966,1247	0,001035	0,933
80		50		1,190	0,749	1014,905	0,000985	0,840
75		55		1,309	0,773	1047,425	0,000955	0,763
70		60		1,428	0,778	1054,201	0,000949	0,700
65		65		1,547	0,780	1056,911	0,000946	0,646
60		70		1,666	0,825	1117,886	0,000895	0,600



Şekil 3.10: *Trichothecium roseum*'dan saflaştırılan β-glukosidaz enziminin K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği.

Tablo 3.7: *Trichothecium roseum*'dan saflaştırılan β-glukosidaz enziminin K_M , V_{max} ve V_{max}/K_m değerleri.

Substrat	K_m (mM)	V_{max} (EU)	V_{max}/K_m
pNPG	0,25	1250	5000

3.6.5 *Trichothecium roseum*'dan Elde Edilerek Saflaştırılan β-glukosidaz Enziminin Genel İnhibitörlerinin IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi

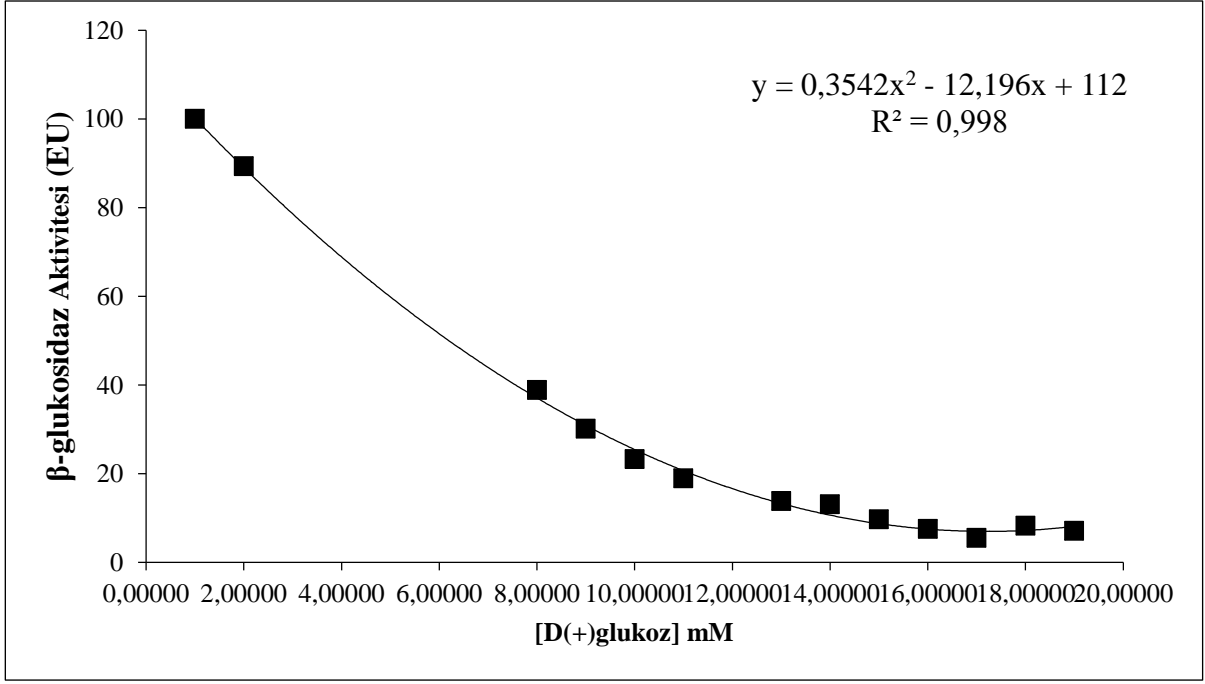
β-glukosidaz enzimiyle ilgili olarak yapılan literatür araştırmalarında karşımıza çıkan inhibitörler arasında D-(+)-glukoz ve δ-glukonolakton yer almaktadır. Bu nedenden dolayı β-glukosidaz enzimi üzerine bu inhibitör maddelerin etkileri incelendi.

3.6.5.1 *Trichothecium roseum*'dan Elde Edilerek Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin İnhibit6r6 Olan D-(+)-glukozun IC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi

D-(+)-glukozun *T. roseum*'dan saflaştırılan β -glukosidaz enziminin aktivitesi 6zerine etkisi incelenirken; *p*NPG substratının reaksiyon hacmindeki konsantrasyonu 1,25 mM olarak kullanılmıştır. D-(+)-glukoz bulunmayan ortamdaki enzim aktivitesi %100 aktivite olarak alındı. IC₅₀ değeri belirlenirken 1-60 μ l arasında değişen inhibit6r konsantrasyonlarında enzim aktivite değerleri bulundu ve bu değerlerin % aktiviteleri hesaplanarak % Aktivite- [I] grafiği çizildi.

Tablo 3.8: *Trichothecium roseum*'dan saflaştırılan β -glukosidaz enzimi inhibitörü D-(+)-glukozun IC₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözelti miktarları ve elde edilen sonuçlar.

50mM NaH ₂ PO ₄ Tamponu (µl)	Inhibitör	Enzim Hacmi (µl)	pNPG Substratı Hacim (µl)	Inhibitör Hacmi (µl)	Plate Kuyusundaki İnhibitör Konsantrasyonu (mM) (*10000)	ΔA (410 nm)	Aktivite (U/ml dk.)	% Aktivite
60	-	-	-	-	-	0,686	929,539	100
59	1	1	0,4464	1	0,4464	0,613	830,623	89,3586
59	1	1	0,8929	1	0,8929	0,604	818,428	88,0466
59	1	1	1,7857	1	1,7857	0,581	787,263	84,6938
59	1	1	3,5714	1	3,5714	0,483	654,472	70,4081
58	3	3	8,9286	3	8,9286	0,449	608,401	65,4518
55	5	5	17,8571	5	17,8571	0,334	452,575	48,6880
53	8	8	26,7857	8	26,7857	0,267	361,789	38,9212
50	10	10	35,7143	10	35,7143	0,207	280,488	30,1749
45	15	70	53,5714	15	53,5714	0,160	216,802	23,3236
40	20	70	71,4286	20	71,4286	0,130	176,152	18,9504
35	25	70	89,2857	25	89,2857	0,143	193,767	20,8454
30	30	70	107,1429	30	107,1429	0,095	128,726	13,84839
25	35	70	125,0000	35	125,0000	0,090	121,951	13,11953
20	40	70	142,8571	40	142,8571	0,067	90,786	9,7667
15	45	70	160,7143	45	160,7143	0,052	70,461	7,5801
10	50	70	178,5714	50	178,5714	0,038	51,491	5,5393
5	55	70	196,4286	55	196,4286	0,057	77,236	8,3090
-	60	70	214,2857	60	214,2857	0,049	66,396	7,1428



Şekil 3.11: *Trichothecium roseum*'dan saflaştırılan β-glukosidaz enziminin inhibitörü olan D-(+)-glukozun IC₅₀ değeri grafiği.

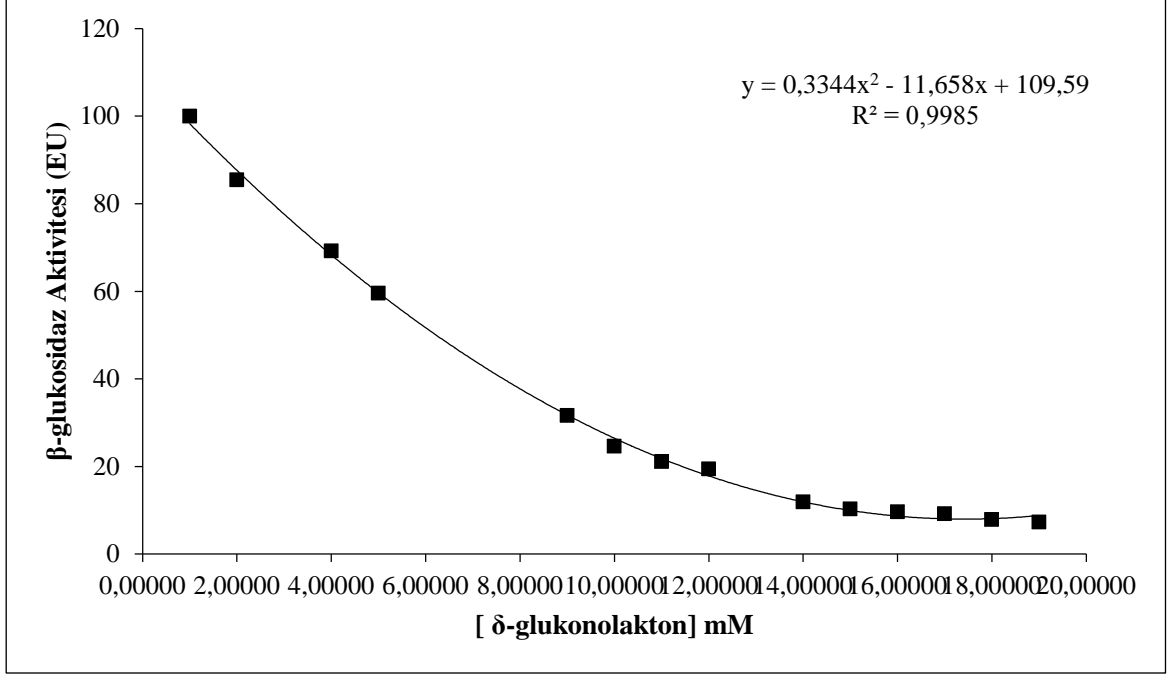
Tablo 3.8'deki verilerden yararlanılarak D-(+)-glukozun *p*NPG substratı varlığındaki % Aktivite- [I] grafiği Şekil 3.11'de gösterilmektedir. Grafikteki denklemden yararlanılarak *T. roseum*'dan saflaştırılan β-glukosidaz enziminin aktivitesi üzerine D-(+)-glukozun IC₅₀ değeri 6,20 mM olarak hesaplandı.

3.6.5.2 *Trichothecium roseum*'dan Elde Edilerek Saflaştırılan β-glukosidaz Enziminin İnhibitörü Olan δ-glukonolaktonun IC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi

δ-glukonolaktonun *T. roseum*'dan saflaştırılan β-glukosidaz enziminin aktivitesi üzerine etkisi incelenirken; *p*NPG substratının reaksiyon hacmindeki konsantrasyonu 1,25 mM olarak kullanıldı. δ-glukonolakton bulunmayan ortamdaki enzim aktivitesi %100 aktivite olarak alındı. IC₅₀ değeri belirlenirken 1-60 µl arasında değişen inhibitör konsantrasyonlarında enzim aktivite değerleri bulundu ve bu değerlerin % aktivite hesaplanarak % Aktivite- [I] grafiği çizildi.

Tablo 3.9: *Trichothecium roseum*' dan saflaştırılan β -glukosidaz enzimi inhibitörü δ -glukonolaktonun IC₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözelti miktarları ve elde edilen sonuçlar.

50mM NaH ₂ PO ₄ Tamponu (μ l)	İnhibitör	Enzim Hacmi (μ l)	pNPG Substratı Hacim (μ l)	İnhibitör Hacmi (μ l)	Plate Kuyusundaki İnhibitör Konsantrasyonu (mM) (*10000)	ΔA (410nm)	Aktivite (U/ml dk.)	% Aktivite
60	-	-	-	-	-	0,974	813,701	100
59				1	0,4464	0,832	695,071	85,4209446
59				1	0,8929	0,809	675,856	83,0595483
59				1	1,7857	0,674	563,074	69,1991786
59				1	3,5714	0,580	484,545	59,5482546
58				3	8,9286	0,602	502,924	61,8069815
55				5	17,8571	0,392	327,485	40,2464066
53				8	26,7857	0,316	263,993	32,4435318
50				10	35,7143	0,308	257,310	31,6221766
45		70	70	15	53,5714	0,240	200,501	24,6406571
40	δ -glukonolakton	70	70	20	71,4286	0,206	172,097	21,1498973
35				25	89,2857	0,189	157,895	19,4045175
30				30	107,1429	0,079	65,998	8,11088296
25				35	125,0000	0,116	96,909	11,9096509
20				40	142,8571	0,100	83,542	10,2669405
15				45	160,7143	0,094	78,530	9,65092402
10				50	178,5714	0,090	75,188	9,24024641
5				55	196,4286	0,077	64,327	7,90554415
-				60	214,2857	0,071	59,315	7,28952772



Şekil 3.12: *Trichothecium roseum*'dan saflaştırılan β -glukosidaz enziminin inhibitörü olan δ -glukonolaktonun IC_{50} değeri grafiği.

Tablo 3.9'daki verilerden yararlanılarak δ -glukonolaktonun *p*NPG substratı varlığındaki % Aktivite-[I] grafiği Şekil 3.12'de gösterilmektedir. Grafikteki denklemden yararlanılarak *T. roseum*'dan saflaştırılan β -glukosidaz enziminin aktivitesi üzerine δ -glukonolaktonun IC_{50} değeri 6,22 mM olarak hesaplandı.

3.6.6 *Trichothecium roseum*'dan Elde Edilerek Saflaştırılan β -glukosidaz Enziminin Genel İnhibitörlerinin İnhibisyon Tiplerinin ve K_i Değerlerinin Belirlenmesi

β -glukosidaz enziminin genel inhibitörleri olan D-(+)-glukoz ve δ -glukonolakton kullanarak *T. roseum*'dan saflaştırılan β -glukosidaz enziminin inhibisyon tiplerine ve K_i değerleri belirlendi.

3.6.6.1 *Trichothecium roseum*'dan Elde Edilerek Safılaştırılan β -glukosidaz Enziminin İnhibitörü Olan D-(+)-glukozun İnhibisyon Tipinin ve K_i Değerinin Belirlenmesi

T. roseum'dan safılaştırılan β -glukosidaz enziminin D-(+)-glukoz inhibitörüne karşı K_i sabiti belirlenirken, ilk olarak inhibitör bulunmayan reaksiyon ortamında farklı *p*NPG substratı konsantrasyonlarına bağlı aktiviteleri ölçümleri yapıldı. Daha sonra D-(+)-glukoz'un 1,7 mM ve 5,3 mM sabit konsantrasyonlarında *p*NPG substratının farklı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümleri yapıldı. Bu değerler kullanılarak $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri hesaplanıp Lineweaver-Burk grafiğinde I_1 ve I_2 doğruları çizildi ve bu grafikten yararlanılarak K_i değeri ve inhibisyon tipi belirlendi.

Tablo 3.10: *Trichothecium roseum*' dan saflaştırılan β -glukosidaz enzimi inhibitörü D-(+)-glukoz'un K_i değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltili miktarları ve elde edilen sonuçlar.

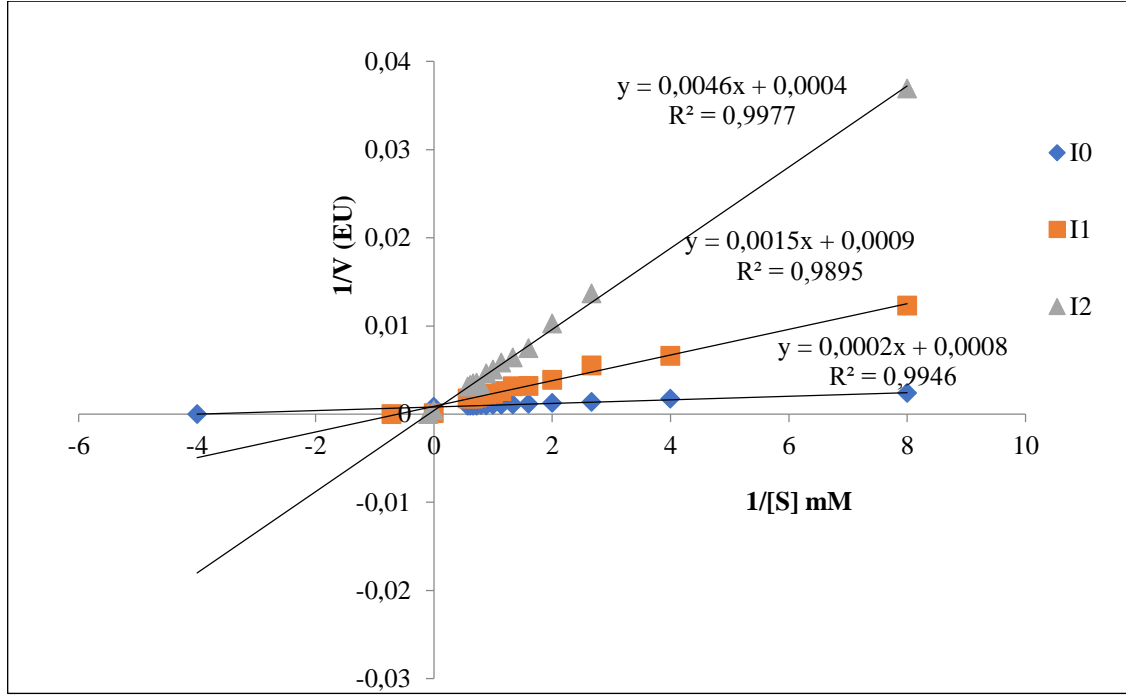
50mM NaH ₂ PO ₄ Tamponu (μ l)	Enzim Hacmi (μ l)	pNPG Substratı Hacmi (μ l)	Inhibitör Hacmi (μ l)	Plate Kuyusundaki Toplam Hacim (μ l)	Plate Kuyusundaki Substrat Konsantrasyonu [S] (mM)	Plate Kuyusundaki Inhibitör Konsantrasyonu [I] (mM)	ΔA (410nm)	Aktivite (U/ml dk.)	1/V	1/[S]
125		5			0,1250		0,309	418,6991	0,002388	8,0000
120		10			0,2500		0,427	578,5907	0,001728	4,0000
115		15			0,3750		0,545	738,4823	0,001354	2,6667
110		20			0,5000		0,587	795,3929	0,001257	2,0000
105		25			0,6250		0,65	880,7588	0,001135	1,6000
100		30			0,7500		0,684	926,8292	0,001079	1,3333
95	70	35	0	280	0,8750	0	0,725	982,3848	0,001018	1,1429
90		40			1,0000		0,725	982,3848	0,001018	1,0000
85		45			1,1250		0,781	1058,2655	0,000945	0,8889
80		50			1,2500		0,749	1014,9051	0,000985	0,8000
75		55			1,3750		0,792	1073,1707	0,000932	0,7273
70		60			1,5000		0,806	1092,1409	0,000916	0,6667
65		65			1,6250		0,782	1059,6205	0,000944	0,6154
60		70			1,7500		0,798	1081,3008	0,000925	0,5714

Tablo 3.10: *Trichothecium roseum*'dan saflaştırılan β -glukosidaz enzimi inhibitörü D-(+)-glukoz'un K_i değerinin belirlenmesinde kullanılan çözelti miktarları ve elde edilen sonuçlar (Devam).

50mM NaH ₂ PO ₄ Tamponu (μ l)	Enzim Hacmi (μ l)	pNPG Substratı Hacmi (μ l)	İnhibitör Hacmi (μ l)	Plate Kuyusundaki Toplam Hacim (μ l)	Plate Kuyusundaki Substrat Konsantrasyonu [S] (mM)	Plate Kuyusundaki İnhibitör Konsantrasyonu [I] (mM)	ΔA (410nm)	Aktivite (U/ml dk.)	1/N	1/[S]
120		5			0,1250		0,06	81,3008	0,0123	8,0000
115		10			0,2500		0,112	151,7615	0,0065	4,0000
110		15			0,3750		0,134	181,5718	0,0055	2,6667
105		20			0,5000		0,191	258,8075	0,0038	2,0000
100		25			0,6250		0,233	315,7181	0,0031	1,6000
95		30			0,7500		0,236	319,7831	0,0031	1,3333
90	70	35	5	280	0,8750	1,7	0,286	387,5338	0,0025	1,1429
85		40			1,0000		0,318	430,8943	0,0023	1,0000
80		45			1,1250		0,336	455,2845	0,0021	0,8889
75		50			1,2500		0,348	471,5447	0,0021	0,8000
70		55			1,3750		0,397	537,9403	0,0018	0,7273
65		60			1,5000		0,422	571,8157	0,0017	0,6667
60		65			1,6250		0,423	573,1707	0,0017	0,6154
55		70			1,7500		0,419	567,7506	0,0017	0,5714

Tablo 3.10: *Trichothecium roseum*'dan saflaştırılan β -glukosidaz enzimi inhibitörü D-(+)-glukoz'un K_i değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltili miktarları ve elde edilen sonuçlar (Devam).

50mM NaH ₂ PO ₄ TampONU (μ l)	Enzim Hacmi (μ l)	pNPG Substratı Hacmi (μ l)	İnhibitör Hacmi (μ l)	Plate Kuyusunda ki Toplam Hacim (μ l)	Plate Kuyusundaki Substrat Konsantrasyonu [S] (mM)	Plate Kuyusundaki İnhibitör Konsantrasyonu [I] (mM)	ΔA (410nm)	Aktivite (U/ml dk.)	1/V	1/[S]
110		5			0,1250		0,020	27,1002	0,0369	8,0000
105		10			0,2500		0,052	70,4607	0,0141	4,0000
100		15			0,3750		0,054	73,1707	0,0136	2,6667
95		20			0,5000		0,072	97,5609	0,0102	2,0000
90		25			0,6250		0,099	134,1463	0,0074	1,6000
85		30			0,7500		0,115	155,8265	0,0064	1,3333
80	70	35	15	280	0,8750	5,3	0,127	172,0867	0,0058	1,1429
75		40			1,0000		0,147	199,1869	0,0050	1,0000
70		45			1,1250		0,161	218,1571	0,0045	0,8889
65		50			1,2500		0,233	315,7181	0,0031	0,8000
60		55			1,3750		0,209	283,1978	0,0035	0,7273
55		60			1,5000		0,213	288,6178	0,0034	0,6667
50		65			1,6250		0,225	304,8780	0,0032	0,6154
45		70			1,7500		0,238	322,4932	0,0031	0,5714



Şekil 3.13: Lineweaver-Burk grafiği üzerinde *T. roseum*'dan saflaştırılan β -glukosidaz enzimine D-(+)-glukoz inhibitörünün farklı konsantrasyonlarının inhibisyon etkisi.

Şekil 3.13'deki Lineweaver-Burk grafiğinden, D-(+)-glukoz inhibitörünün *T. roseum*'dan saflaştırılan β -glukosidaz enziminin, *p*NPG substratı varlığında, yarışmalı tipte inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. D-(+)-glukozun $[I_1] = 1,7$ mM ve $[I_2] = 5,3$ mM olarak iki farklı konsantrasyonundaki aktiviteleri ölçülerek çizilen grafikten (Şekil 3.13) K_i değeri $2,16 \times 10^{-4} \pm 1,0 \times 10^{-4}$ olarak hesaplanmıştır.

3.6.6.2 *Trichothecium roseum*'dan Elde Edilerek Safılaştırılan β -glukosidaz Enziminin İnhibitörü Olan δ -glukonolaktonun İnhibisyon Tipinin ve K_i Değerinin Belirlenmesi

T. roseum'dan safılaştırılan β -glukosidaz enziminin δ -glukonolakton inhibitörüne karşı K_i sabiti belirlenirken, ilk olarak inhibitör bulunmayan reaksiyon ortamında farklı *p*NPG substratı konsantrasyonlarına bağlı aktiviteleri ölçümleri yapılmıştır. Daha sonra δ -glukonolakton'un 0,0089 mM ve 0,017 mM sabit konsantrasyonlarında *p*NPG substratının farklı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümleri yapılmıştır. Bu değerler kullanılarak $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri hesaplanıp Lineweaver-Burk grafiğinde I_1 ve I_2 doğruları çizildi ve bu grafikten yararlanılarak K_i değeri ve inhibisyon tipi belirlenmiştir.

Tablo 3.11: *Trichothecium roseum* 'dan saflaştırılan β -glukosidaz enzimi inhibitörü δ -glukonolakton' un K_i değerinin belirlenmesinde kullanılan çözelti miktarları ve elde edilen sonuçlar.

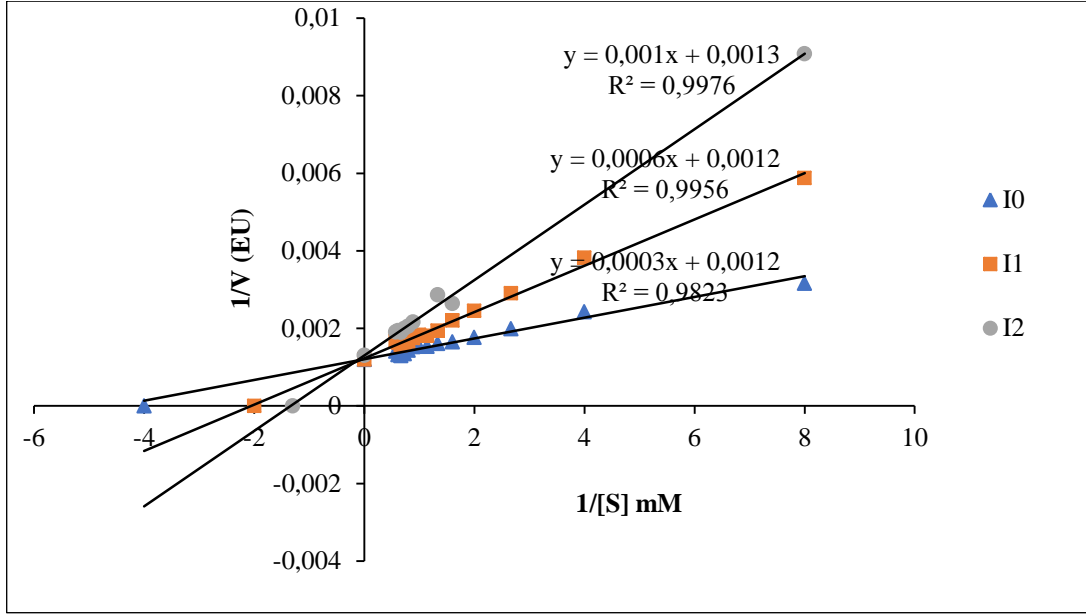
50mM NaH ₂ PO ₄ Tamponu (μ l)	Enzim Hacmi (μ l)	pNPG Substratı Hacmi (μ l)	İnhibitör Hacmi (μ l)	Plate Kuyusundaki Toplam Hacim (μ l)	Plate Kuyusundaki Substrat Konsantrasyonu [S] (mM)	Plate Kuyusundaki İnhibitör Konsantrasyonu [I] (mM)	ΔA (410 nm)	Aktivite (U/ml dk.)	1/V	1/[S]
125		5		0,1250			0,322	316,6175	0,003158	8,0000
120		10		0,2500			0,419	411,9961	0,002427	4,0000
115		15		0,3750			0,512	503,4415	0,001986	2,6667
110		20		0,5000			0,576	566,3717	0,001766	2,0000
105		25		0,6250			0,616	605,703	0,001651	1,6000
100		30		0,7500			0,633	622,4189	0,001607	1,3333
95	70	35	0	0,8750	280	0	0,661	649,9508	0,001539	1,1429
90		40		1,0000			0,664	652,9007	0,001532	1,0000
85		45		1,1250			0,666	654,8673	0,001527	0,8889
80		50		1,2500			0,709	697,1485	0,001434	0,8000
75		55		1,3750			0,754	741,3963	0,001349	0,7273
70		60		1,5000			0,787	773,8446	0,001292	0,6667
65		65		1,6250			0,771	758,1121	0,001319	0,6154
60		70		1,7500			0,721	708,9479	0,001411	0,5714

Tablo 3.11: *Trichothecium roseum*'dan saflaştırılan β -glukosidaz enzimi inhibitörü δ -glukonolakton'un K_i değerinin belirlenmesinde kullanılan çözelti miktarları ve elde edilen sonuçlar (Devam).

50mM NaH ₂ PO ₄ Tamponu (μ l)	Enzim Hacmi (μ l)	pNPG Substratı Hacmi (μ l)	İnhibitör Hacmi (μ l)	Plate Kuyusundaki Toplam Hacim (μ l)	Plate Kuyusundaki Substrat Konsantrasyonu [S] (mM)	Plate Kuyusundaki İnhibitör Konsantrasyonu [I] (mM)	ΔA (410nm)	Aktivite (U/ml dk.)	1/V	1/[S]
120		5			0,1250		0,069	67,84661	0,014739	8,0000
115		10			0,2500		0,137	134,7099	0,007423	4,0000
110		15			0,3750		0,183	179,941	0,005557	2,6667
105		20			0,5000		0,247	242,8712	0,004117	2,0000
100		25			0,6250		0,345	339,233	0,002948	1,6000
95		30			0,7500		0,299	294,002	0,003401	1,3333
90	70	35	5	280	0,8750	0,0089	0,368	361,8486	0,002764	1,1429
85		40			1,0000		0,383	376,5978	0,002655	1,0000
80		45			1,1250		0,537	528,0236	0,001894	0,8889
75		50			1,2500		0,458	450,3441	0,002221	0,8000
70		55			1,3750		0,508	499,5084	0,002002	0,7273
65		60			1,5000		0,529	520,1573	0,001922	0,6667
60		65			1,6250		0,456	448,3776	0,00223	0,6154
55		70			1,7500		0,447	439,528	0,002275	0,5714

Tablo 3.11: *Trichothecium roseum* dan saflaştırılan β -glukosidaz enzimi inhibitörü δ -glukonolakton'un K_i değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltili miktarları ve elde edilen sonuçlar (Devam).

50mM NaH ₂ PO ₄ Tamponu (μ l)	Enzim Hacmi (μ l)	pNPG Substratı Hacmi (μ l)	İnhibitör Hacmi (μ l)	Plate Kuyusundaki Toplam Hacim (μ l)	Plate Kuyusundaki Substrat Konsantrasyonu [S] (mM)	Plate Kuyusundaki İnhibitör Konsantrasyonu [I] (mM)	ΔA (410nm)	Aktivite (U/ml dk.)	1/V	1/[S]
110		5			0,1250		0,112	110,1278	0,00908	8,0000
105		10			0,2500		0,168	165,1917	0,006054	4,0000
100		15			0,3750		0,238	234,0216	0,004273	2,6667
95		20			0,5000		0,262	257,6205	0,003882	2,0000
90		25			0,6250		0,385	378,5644	0,002642	1,6000
85		30			0,7500		0,355	349,0659	0,002865	1,3333
80	70	35	10	280	0,8750	0,017	0,381	374,6313	0,002669	1,1429
75		40			1,0000		0,396	389,3805	0,002568	1,0000
70		45			1,1250		0,471	463,1268	0,002159	0,8889
65		50			1,2500		0,495	486,7257	0,002055	0,8000
60		55			1,3750		0,509	500,4916	0,001998	0,7273
55		60			1,5000		0,535	526,057	0,001901	0,6667
50		65			1,6250		0,525	516,2242	0,001937	0,6154
45		70			1,7500		0,238	322,4932	0,001904	0,5714



Şekil 3.14: Lineweaver-Burk grafiği üzerinde *Trichothecium roseum*'dan saflaştırılan β -glukosidaz enzime δ -glukonolakton inhibitörünün farklı konsantrasyonlarının inhibisyon etkisi.

Şekil 3.14'deki Lineweaver-Burk grafiğinden, δ -glukonolakton inhibitörünün *T. roseum*'dan saflaştırılan β -glukosidaz enziminin, *p*NPG substratı varlığında, yarışmalı tipte inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edildi. δ -glukonolaktonun $[I_1]=0,0089$ mM ve $[I_2]=0,017$ mM olarak iki farklı konsantrasyonundaki aktiviteleri ölçülerek çizilen grafikten (Şekil 3.14) K_i değeri $8,71 \times 10^{-6} \pm 1,92 \times 10^{-7}$ olarak hesaplanmıştır.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Son yıllarda endüstriyel uygulamalarda genellikle mikroorganizma kaynaklı enzimler daha fazla tercih edilmektedir. Çalışmamızda dünyada geniş bir dağılıma sahip olan *Trichothecium* cinsine ait *Trichothecium roseum* β -glukosidaz enzim kaynağı olarak kullanıldı. *T. roseum*'dan β -glukosidaz enzimi elde etmek için tarımsal yan ürün olan pirinç kabuğunun substrat olarak kullanıldığı KSF tekniği uygulandı. Elde edilen β -glukosidaz enzimi saflaştırılarak biyokimyasal, kinetik ve elektroforetik özelliklerinin belirlenmesi sağlandı.

β -glukosidaz enziminin saflaştırma işlemi sırasıyla, Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HEK) yöntemlerinin kullanılmasıyla iki aşamada gerçekleştirildi. Saflaştırılan β -glukosidaz enziminin SDS-PAGE ve NATIVE-PAGE elektroforetik yöntemleri ile saflığı ve alt birimlerinin varlığı/sayısının kontrolü sağlandı. *T.roseum*'dan saflaştırılan β -glukosidaz enziminin biyokimyasal özelliklerinden en yüksek aktivite gösterdiği pH ve sıcaklık değerleri ayrıca enzimin termal kararlılığı belirlendi. Enzimin kinetik özelliklerinin K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı ve bununla birlikte β -glukosidaz enziminin genel inhibitörleri olan D-(+)-glukoz ve δ -glukonolaktonun *p*-nitrofenil- β -D glukopirenosit (*p*NPG) substratı varlığında saflaştırılan enzim aktivitesine olan inhibisyon etkisi belirlendi.

Çalışmanın ilk basamağında katı besiyerinde *T. roseum*'un β -glukosidaz enzimi üretip üretmediği incelendi. Bunun için *T. roseum*'un %5'lik Karboksimetil Selüloz (CMC) içeren Malt Ekstrakt Agar besiyerine inoküle edilerek inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda yapılan hidroliz zon tayini sonucunda *T. roseum* β -glukosidaz pozitif olarak değerlendirilip deneylerde kullanılmasına karar verildi. Saroj ve ark. (2018), 15 farklı fungus türü ile yaptıkları çalışmada %1 CMC içeren Czapek Dox Agar besiyerinde en büyük hidroliz zon çapı oluşturan türleri *A. fumigatus* JCM 10253 ve *A. terreus* olarak bildirmişlerdir [124]. Jamroo ve ark. (2015), kaplıca suyu, deniz suyu, odun, pirinç samanı ve inek gübresi gibi farklı kaynaklardan izole ettikleri 8 farklı *Aspergillus fumigatus* izolatlarını %2 CMC içeren Mendel Bazal Besiyerine inoküle edip inkübasyondan sonra hidroliz zon tayini yapmışlar ve bu izolatlar arasında en fazla selülaz üreticisinin *A. fumigatus*'un H2, SW1 ve C1 suşlarının olduğu rapor etmişlerdir [125]. Verma ve Verma (2016), yaptıkları çalışmada CMC içeren Bazal Salt Agar'da geliştirilen 38 test

fungusundan 15'inin hidroliz zonu oluşturduğunu belirlemişler ve büyük zon çapının *Periconia hispidula* ve *Mucor hiemalis*, en küçük zon çapının *Alternaria alternata* ve *Cladosporium oxysporum*'un oluşturduğunu tespit etmişlerdir [126]. Sazcı ve ark. (1986), *Trichoderma reesei* QM9414, *Trichoderma harzianum*, *Trichothecium roseum*, *Neurospora crassa*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium italicum*'u %1 CMC içeren Patates Dekstroz Agar'a inoküle etmişler inkübasyon süresinin sonrasında tüm fungusların hidroliz zonu oluşturduğunu ve en büyük hidroliz zon çapının *T. harzianum* ve *N. crassa*'da meydana geldiğini belirtmişlerdir [94].

Çalışmamızda katı substrat olarak kullanılan pirinç kabuğu öğütülüp 80°C'de 24 saat kurutulduktan sonra KSF kültür ortamında fungusun gelişimi ve β -glukosidaz enzimi üretiminde etkili olacak parametrelerin (optimum pH ve nemlendirme sıvısı, inkübasyon sıcaklığı ve inkübasyon süresi) optimizasyonları sağlanmıştır.

T. roseum'dan β -glukosidaz enzimi, Katı Substrat Fermentasyon (KSF) yöntemiyle substrat olarak öğütülmüş pirinç kabuğu kullanılarak elde edildi. Farklı araştırmalarda KSF ortamı olarak çeşitli substratlar kullanılıp β -glukosidaz enzimi üretildiği rapor edilmiştir. Garcia ve ark. (2015), yaptıkları çalışmada, KSF kültür ortamı olarak buğday kepeği, soya kepeği, mısır koçanı, mısır sapı, pirinç kabuğu ve şeker kamışı küspesi substratlarını kullanarak *Lichtheimi aramosa*'dan β -glukosidaz enzimi üretimlerini karşılaştırmışlar ve en yüksek aktiviteyi buğday kepeği substratının gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca buğday kepeğinin substrat olarak kullanılması ile *L. ramosa*'dan β -glukosidaz enziminin en verimli üretildiği nem oranı %65, pH değeri 5,0, inkübasyon sıcaklığı 35°C ve inkübasyon süresi 96 saat olarak belirlemişlerdir [127]. Ng ve ark. (2010), yaptıkları çalışmada pirinç samanı, pirinç kepeği, şeker kamışı küspesi ve α -selülozu substrat olarak kullanarak *Penicillium citrinum* YS40-5'den β -glukosidaz enzimi elde etmişler ve en yüksek aktivitenin pirinç kepeğinde verdiğini ve optimum kültür koşullarının pH 6, 30°C ve % 90 nem içeriği olduğunu rapor etmişlerdir [128]. Elyas ve ark. (2010), yaptıkları çalışmada buğday kepeğini substrat olarak kullanarak *Aspergillus* SA 58' den β -glukosidaz enzim üretimi için optimum pH değerini 5,0, optimum sıcaklık değerini 30°C, optimum inkübasyon süresini 6 gün ve nem içeriğini %60 olarak belirtmişlerdir [129]. Bhatti ve ark. (2013), yaptıkları çalışmada pirinç kabuğunu substrat olarak kullanarak *Fusarium solani*'den β -glukosidaz enzim üretimi için optimum pH değerini 5,0, optimum inkübasyon süresini 72 saat ve nem içeriğini %60 olarak rapor

etmişlerdir [130]. Leite ve ark. (2008), buğday kepeğinin substrat olarak kullanılması ile termofilik fungus olan *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 ve mezofilik fungus *Aureobasidium pullulans* ER-16'dan β -glukosidaz enzim eldesinde sırasıyla; nem içeriklerini %60 ve %70, sıcaklık değerlerini 50°C ve 28°C olacak şekilde ayarlayarak optimum inkübasyon süresini 72 ve 120 saat olarak tespit etmişlerdir [49]. Qian ve ark. (2012) buğday kepeğinin substrat olarak kullanılması ile *Aspergillus niger* AS 3.4309'dan β -glukosidaz enzim üretimi için optimum pH değerini 6,0, optimum sıcaklık değerini 28°C, optimum inkübasyon süresini 72 saat ve nem içeriğini % 70 olarak rapor etmişlerdir [131]. Martins ve ark. (2019), buğday kepeğinin substrat olarak kullanılması ile *Thermomucor indicaeseudaticae*'den β -glukosidaz enzim üretiminde optimum şartları pH 5,0, sıcaklık 45°C ve nem içeriği %70, inkübasyon süresini 10 gün olarak belirlediklerini rapor etmişlerdir [132]. Fadel (2000), buğday kepeğinin substrat olarak kullanılması ile *Aspergillus niger* F-119'dan β -glukosidaz enzim üretiminde optimum pH değerini 4,5, optimum sıcaklık değerini 32°C, optimum inkübasyon süresini 72 saat ve nem içeriğini % 70 olarak belirlemiştir [133]. Raza ve ark. (2011), farklı substratlar kullanılarak (çay atığı, talaş, buğday kepeği, buğday samanı ve pirinç samanı) *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori* ve *Aspergillus oryzae*'nin saf ve karışık kültürlerinden β -glukosidaz enzimi üretimlerini karşılaştırmışlar; en yüksek aktiviteyi buğday kepeği substratında ve *A. oryzae* ve *A. niger* karışık kültürünün gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca buğday kepeğinin substrat olarak kullanılması ile *A. oryzae* ve *A. niger* karışık kültüründen β -glukosidaz enziminin 35°C inkübasyon sıcaklığında en verimli üretildiği pH değeri 5,5 ve inkübasyon süresi 72 saat olarak belirlemiştir [134].

Yaptığımız çalışmada ise öğütülmüş pirinç kabuğunun substrat olarak kullanıldığı KSF yöntemiyle *T.roseum*'un en yüksek β -glukosidaz enzim aktivitesi için gerek duyduğu optimum gelişme koşulları nem oranı %55, nemlendirme sıvısı pH değeri 8,5 olan Disodyum Monohidrojen Fosfat tamponu, inkübasyon sıcaklığı 30°C ve inkübasyon süresi 6 gün olarak belirlenmiştir (Şekil 3.1,Şekil 3.2,Şekil 3.3). Belirlediğimiz bu değerler literatür verileri ile karşılaştırıldığında; diğer mikrofunguslara göre *T. roseum*'un en yüksek β -glukosidaz enzim aktivitesi için gerek duyduğu optimum pH değerinin daha yüksek, optimum inkübasyon sıcaklığının aynı yada ortalamaya yakın değerlerde, optimum inkübasyon süresinin daha uzun olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda *T.roseum*'dan elde edilen kısmi saflaştırılmış β -glukosidaz enziminin Amonyum Sülfat çöktürme aralığı %50-90 olarak tespit edilmiş ve Hidrofobik Etkileşim Kromatografisinde kullanılmak üzere kısmi saflaştırılmış enzim kaynağına %50-90 aralığında Amonyum Sülfat tuzu çöktürmesi uygulanarak ön saflaştırma işlemi yapılmıştır. Yapılan farklı araştırmalarda Peshin ve Mathur (1999), *Aspergillus niger* 332'den elde ettikleri β -glukosidaz enziminin Amonyum Sülfat çöktürme aralığını %60-90 olarak rapor etmişlerdir [135]. Fadel (2000), *Aspergillus niger* F-119'dan elde ettikleri β -glukosidaz enziminin Amonyum Sülfat çöktürme aralığını %20-40 olarak belirlemiştir [133]. Ramani ve ark. (2012), *Penicillium funiculosum* NCL1'den elde ettikleri β -glukosidaz enziminin Amonyum Sülfat çöktürme aralığını %20-50 olarak rapor etmişlerdir [136]. Ni ve ark. (2011), *Aspergillus niger*'den elde ettikleri β -glukosidaz enziminin Amonyum Sülfat çöktürme aralığını %40-80 olarak tespit etmişlerdir [137]. Bhatti ve ark. (2013), *Fusarium soloni*'den elde ettikleri β -glukosidaz'a %95 doyumlukta; Gong ve ark. (2014), *Aspergillus niger* Au0847'den elde ettikleri β -glukosidaz'a %80 doyumlukta; Narasimha ve ark. (2016), *Aspergillus niger*'den elde ettikleri β -glukosidaz enzimine % 90 doyumlukta; Ma ve ark. (2011), *Aspergillus glaucus*'dan elde ettikleri enzime % 90 doyumlukta Amonyum Sülfat çöktürmesi uyguladıklarını bildirmişlerdir [122, 130, 138, 141]. Yapılan araştırmaları ile karşılaştırıldığında çalışmamız *T. roseum*'dan elde edilen β -glukosidaz enziminin belirlenen Amonyum Sülfat çöktürme aralığının (%50-90) bu araştırmalarla benzerlik göstermediği ve daha geniş bir aralığa sahip olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda *T. roseum*'dan elde edilen β -glukosidaz enzimi %50-90 aralığında yapılan Amonyum Sülfat çöktürme işlemi sonunda % 40,65 verimle 7,41 kat saflaştırılmıştır (Tablo3.5). Yapılan diğer çalışmalarda Amonyum Sülfat çöktürmeleri sonunda Peshin ve Mathur (1999), *Aspergillus niger* 332'den β -glukosidaz enzimini %40 verimle 3,2 kat; Gong ve ark. (2014). *Aspergillus niger* Au0847'den β -glukosidaz enzimini % 89,1 verimle 1,14 kat; Ni ve ark. (2011), *Aspergillus niger*'den saflaştırdıkları β -glukosidaz enzimini % 79,5 verimle 2,31 kat; Karnchanatat ve ark. (2007), *Daldinia eschscholzii*'den β -glukosidaz enzimini % 31,83 verimle 5,32 kat; Narasimha ve ark. (2016), *Aspergillus niger*'den β -glukosidaz enzimini % 63,1 verimle 45,1 kat saflaştırdıklarını rapor etmişlerdir [101,122,135,137,138].

Yapılan Amonyum Sülfat Çöktürmesi sonuçları literatür verileri ile karşılaştırıldığında enzim verimi ve saflaştırma katsayılarının birbirlerinden farklı olduğu, bu farklılıkların

çalışmalarda kullanılan mikroorganizmanın, uygulanan Amonyum Sülfat çöktürme aralığının ve KSF ortam şartlarının sebep olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda *T. roseum*'dan elde edilen kısmı saflaştırılmış β -glukosidaz enzimine Amonyum Sülfat Çöktürmesi yöntemiyle ön saflaştırma işlemi yaptıktan sonra Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi yöntemiyle saflaştırma işlemi yapıldı. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi yönteminde Sepharose-4B-L-Tirozin-1-Naftilamin jelinin kullanılmasıyla, *T. roseum*'dan elde edilen β -glukosidaz enzimi % 27,24 verimle 21,90 kat saflaştırılmıştır (Tablo 3.5). Yapılan farklı çalışmalarda; Karnchanatat ve ark. (2007), *Daldinia eschscholzii*'den Phenyl Sepharose Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile β -glukosidaz enzimini % 31,83 verimle 5,32 kat saflaştırdıklarını rapor etmişlerdir [101]. Daroit ve ark. (2008), *Monascus purpureus*'den Aseton çöktürmesi, jel filtrasyon kromatografisi ve Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile β -glukosidaz enzimini % 23 verimle 92,0 kat saflaştırdıklarını bildirmişlerdir [139]. Rashid ve Siddiqui (1997), *Aspergillus niger*'den Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile β -glukosidaz enzimini % 39 verimle 15,62 kat saflaştırdıklarını bildirmişlerdir [140].

Diğer kromatografi yöntemleri kullanılarak saflaştırma yapılan çalışmalar: Peshin ve Mathur (1999), *Aspergillus niger* 332'den Sephadex G-75 kolonuyla jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak β -glukosidaz enzimini %33 verimle 6 kat saflaştırdıklarını bildirmişlerdir [135]. Gong ve ark. (2014), *Aspergillus niger* Au0847'den DEAE-Sepharose Fast Flow anyonik değişim kolonu ile β -glukosidaz enzimini % 88,1 verimle 4,47 kat ve Sephacryl S-200HR jel filtrasyon kolonu ile ise % 77,8 verimle 15,8 kat saflaştırdıklarını rapor etmişlerdir [138]. Kaur ve ark. (2007), *Melanocarpus sp.* MTCC 3922'den DEAE-Sepharose İyon Değişim Kromatografisi ile β -glukosidaz enzimini %30,15 verimle 3,03 kat saflaştırdıklarını belirtmişlerdir [142]. Ni ve ark. (2011), *Aspergillus niger*'den DEAE-Sepharose kromatografisi β -glukosidaz enzimini % 33,28 verimle 29,89 kat saflaştırdıklarını bildirmişlerdir [137]. Yang ve ark. (2008), *Paecilomyces thermophila* J18'den iyon değiştirme kromatografisi ve jel filtrasyonu teknikleri kullanılarak saflaştırdıkları β -glukosidaz enzimini % 21,7 verimle 105 kat saflaştırdıklarını belirtmişlerdir [143]. Narasimha ve ark. (2016), *Aspergillus niger*'den β -glukosidaz enzimini Sephadex G-75 jel filtrasyon kromatografisi ile % 36,1 verimle 86,5 kat saflaştırdıklarını rapor etmişlerdir [122].

Literatürdeki araştırmalara bakıldığında *T. roseum*'dan β -glukosidaz enzim eldesi ve saflaştırılmasıyla ilgili bir çalışmaya rastlanmadı. *T. roseum*'dan elde edilen β -glukosidaz enziminin saflaştırma sonuçları ile literatürde geçen farklı funguslarla yapılan çalışmalara bakıldığında enzim verimi ve saflaştırma katsayılarının birbirlerinden farklı olduğu, bu farklılıkların kullanılan mikroorganizmanın, çalışmaların yapıldığı ortam koşullarının, uygulanan Amonyum Sulfat miktarının ve kullanılan kromatografik yöntemlerinden kaynaklanabileceğini söylemek mümkündür.

Çalışmamızda pirinç kabuğunun substrat olarak kullanılmasıyla KSF ortamında *T. roseum*'dan optimum kültür koşullarında elde edilen, Amonyum Sulfat öktürmesi ve Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi yöntemleri kullanılarak saflaştırılan β -glukosidaz enziminin saflığının ve alt birimlerinin varlığı/sayısının kontrolü için SDS/NATIVE-PAGE teknikleri kullanılmıştır. Uyguladığımız elektroforez tekniklerinden SDS-PAGE' de yaklaşık 38 ve 60 kDa bölgesinde iki bant varlığı, NATIVE-PAGE'de ise yaklaşık 98 kDa bölgesinde tek bant varlığı belirlenmiştir (şekil 3.6). Peshin ve Mathur (1999), *A. niger* 332'den saflaştırdıkları β -glukosidaz enzimini SDS-PAGE ile 64 kDa; Gong ve ark. (2014), *A. niger* Au0847'den saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin SDS-PAGE ve NATIVE-PAGE yöntemleriyle 110 ve 120 kDa; Ni ve ark. (2011), *A. niger*'den saflaştırdıkları β -glukosidaz enzimini SDS-PAGE ile 110 kDa; Ramani ve ark. (2012), *Penicillium funiculosum* NCL1'den saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin SDS-PAGE ve NATIVE-PAGE ile 120 kDa; Watanabe ve ark. (1992), *A. niger*'den saflaştırdıkları β -glukosidaz enzimini SDS-PAGE ile 120 kDa; Chirico ve Brown (1987), *Trichoderma reesei* QM9414'den saflaştırdıkları β -glukosidaz enzimini SDS-PAGE ile 81,6 kDa molekül ağırlığına sahip olduğunu; Malaghaes ve ark. (2006), *Ceriporiopsis subvermispora*'dan saflaştırdıkları β -glukosidaz enzimini SDS-PAGE ile 110 ve 53 kDa molekül ağırlığında iki alt üniteye sahip olduğunu; Zanoelo ve ark. (2004), *Scytalidium thermophilum*'dan saflaştırdıkları β -glukosidaz enzimini SDS-PAGE ile 42 ± 3 kDa molekül ağırlığına sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Narasimha ve ark. (2016), *A. niger*'den saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin SDS-PAGE ile 95 kDa molekül ağırlığına sahip olduğunu rapor etmişlerdir [122, 135, 136, 137, 138, 144, 145, 146, 147].

Çalışmamızda *T. roseum*'dan elde edilip saflaştırılan β -glukosidaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği pH değerı 4,0; en yüksek sıcaklık değerı ise 55°C olarak tespit edilmiştir (şekil 3.7, şekil 3.8). Ng ve ark. (2010), yaptıkları çalışmada *Penicillium citrinum* YS40-

5'den saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin en yüksek aktivite verdiği pH değerini 5,0 ve sıcaklık değerini 70°C; Joo ve ark. (2010), *P. pinophilum*'dan saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin en yüksek aktivite verdiği pH değerini 5,0 ve sıcaklık değerini 60°C; Ma ve ark. (2011), *A. glaucus*'dan saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin en yüksek aktivite verdiği pH değerini 3,6 ve sıcaklık değerini 60°C; Elshafei ve ark. (2011), *A. terreus* NRRL 265'den saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin en yüksek aktivite verdiği pH değerini 5,0 ve sıcaklık değerini 60°C; Peshin ve Mathur (1999), *A. niger* 332'den saflaştırılan β -glukosidaz enziminin en yüksek aktivite verdiği pH değerini 5,0 ve sıcaklık değerini 50°C; Gong ve ark. (2014), *A. niger* Au0847'den saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin en yüksek aktivite verdiği pH değerini 4,6 ve sıcaklık değerini 65°C; Watanabe ve ark. (1992), *A. niger*'den saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin en yüksek aktivite verdiği pH değerini 4,5 ve sıcaklık değerini 55°C; Malaghaes ve ark. (2006), *Ceriporiopsis subvermispora*'dan saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin en yüksek aktivite verdiği pH değerini 3,5 ve sıcaklık değerini 60°C; Hidalgo ve ark. (1992), *Penicillium purpurogenum*'dan saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin en yüksek aktivite verdiği pH değerini 3,5 ve sıcaklık değerini 60°C; Lin ve ark. (1999), *Thermomyces lanuginosus*-SSBP'den saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin en yüksek aktivite verdiği pH değerini 6,0 ve sıcaklık değerini 65°C olduğunu rapor etmişlerdir [128, 135, 138, 141, 144, 146, 148, 149,150, 151].

Yapılan literatür araştırmaları sonucunda; farklı organizmalardan elde edilerek saflaştırılmış olan β -glukosidaz enzim aktivitesinin en yüksek aktivite gösterdiği pH değerleri 3,5-6,0 aralığında olduğu görülmektedir. Aynı şekilde enzim aktivitesinin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık değerlerine ait verilere bakıldığında 50-70°C olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak saflaştırılan enzimin kaynağının ve çalışma koşullarındaki farklılığının biyokimyasal parametreler üzerinde etkili olabileceğini söyleyebiliriz.

Çalışmamızda *T. roseum*'dan elde edilip saflaştırılan β -glukosidaz enziminin termal kararlılığı incelenmiştir. *T. roseum*'dan elde edilip saflaştırılan β -glukosidaz enziminin 120 dakikalık inkübasyon süresi sonunda; 45°C'de %71,94 oranında, 55°C'de 68,27 oranında, 65°C'de 3,39 oranında, 75°C'de 0,19 oranında, 85°C'de ise 40 dakikaya kadar aktivitesini koruduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.9). Gong ve ark. (2014), *A. niger* Au0847'den

saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin termal kararlılığı incelediler ve 60°C’de kararlı olduğunu 70°C’de 15 dakika sonunda %50 oranında aktivitesini koruduğu tespit etmişlerdir [138]. Lin ve ark. (1999), *Thermomyces lanuginosus*–SSBP’den saflaştırdıkları β -glukosidaz enzimin aktivitesini, 50°C’de 30 dakikalık inkübasyonun ardından aktivitesini koruduğunu, fakat inkübasyon sıcaklığı 55°C 'nin üstüne çıktığında önemli ölçüde aktivitesinin azaldığını ve 70°C 'de 30 dakikalık bir inkübasyondan sonra aktivitesini kaybettiğini bildirmişlerdir [151]. Elshafei ve ark. (2011), *A. terreus* NRRL 265’den saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin termal kararlılıklarını incelediklerinde; 50°C’de 2 saatlik inkübasyonun sonunda enzimin kararlılığını koruduğunu, 60°C’de 60 dakikalık inkübasyonun ardından aktivitesinin %82’sini koruduğunu, 70°C’de 5 dakikalık inkübasyonun ardından aktivitesinin %83’ünü, 10 ve 15 dakika sonrasında ise sırasıyla %33 ve %20’sini koruduğunu tespit etmişlerdir [149]. Bu sonuçlara göre aynı enzimin farklı sıcaklık değerlerinde gösterdiği kararlılığın elde edildiği mikroorganizma kaynağına göre farklılık gösterdiğini söyleyebiliriz.

Çalışmamızda *T. roseum*’dan elde edilip saflaştırılan β -glukosidaz enziminin kinetik parametreleri incelenmiştir. β -glukosidaz enzime özgü substrat olan *p*-nitrofenil- β -D-glukopiranosite (*p*NPG) karşı ilgisini gösteren K_M ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır. Saflaştırılan β -glukosidaz enziminin *p*NPG substratı için K_M değeri 0,25 mM ve V_{max} değeri 1250 EU katalitik etkinliğinin ölçüsü olan V_{max}/K_M oranı ise 5000 olarak hesaplanmıştır (Tablo 3.7). Bir enzimin kinetik özelliklerinin belirlenmesinde K_M ve V_{max} değerleri önemli parametrelerdir. β -glukosidaz enziminin substralara olan ilgisini gösteren K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesinde, *p*NPG substratının farklı konsantrasyonları kullanılarak enzim aktivite ölçümleri yapılmıştır. Yapılan aktivite ölçümlerinden yararlanılarak Lineweaver-Burk grafiği çizilmiş ve bu grafikten elde edilen denklem yardımıyla K_M ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır. Bir enzimin V_{max} değeri enzim konsantrasyonu sabit tutularak, substrat konsantrasyonuna bağlı olarak ulaşılan maksimum hız noktası, K_m değeri ise maksimum hızın yarısının gözlemlendiği noktadaki substrat konsantrasyonu ifade etmektedir. Bhatti ve ark. (2013) *Fusarium soloni*’den saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin *p*NPG substratı için K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla; 1 mM ve 55,6 $\mu\text{mol min}^{-1}$; Pereira ve ark. (2015) *T. indicae-seudaticae* N31’den saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin *p*NPG substratı için K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla; 0,85 mM ve 0,41 mmol/min; Gong ve ark. (2014), *A. niger* Au0847’den saflaştırdıkları β -glukosidaz

enziminin *p*NPG substratı için K_M ve V_{max} değerlerini sırasıyla; 2,933 mmol/l ve 0,372 mmol.l⁻¹; Ramani ve ark. (2012) *Penicillium funiculosum* NCL1'den saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin *p*NPG substratı için K_M ve V_{max} değerlerini sırasıyla; 0,057 mM ve 1,920 U/mg; Malaghaes ve ark. (2006), *Ceriporiopsis subvermispota*'dan saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin *p*NPG substratı için K_M ve V_{max} değerlerini sırasıyla 3,29 mmol l⁻¹ve 0,113 μ mol min⁻¹; Zanoelo ve ark. (2004), *Scytalidium thermophilum*'dan saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin *p*NPG substratı için K_M ve V_{max} değerlerini sırasıyla 0,29 \pm 0,03 mM ve 13,27 \pm 1,32 U mg protein⁻¹; Narasimha ve ark. (2016), *Aspergillus niger*'den saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin *p*NPG substratı için K_M ve V_{max} değerlerini sırasıyla; 8,0 mM ve 166 μ mol/min/mg protein olarak hesaplamışlardır [122, 130, 136, 138, 146, 147, 152].

Çalışmamızda *T. roseum*'dan elde edilip saflaştırılan β -glukosidaz enziminin *p*NPG substratına karşı tespit ettiğimiz K_M ve V_{max} değerleri, literatürlerdeki değerlerle farklılık göstermektedir. Çalışmamızda elde edilen K_M değeri literatür sonuçlarına göre genellikle oldukça düşük, V_{max} değeri ise oldukça yüksek olduğu görülmektedir. K_M değerinin düşük olması substrata ilginin daha fazla olduğunu V_{max} değerinin yüksek olması enzimin substratı daha hızlı parçaladığını göstermektedir. Literatürdeki verilerle karşılaştırdığımızda çalışmamızda elde ettiğimiz β -glukosidaz enziminin endüstriyel alanlarda kullanımı açısından daha avantajlı olduğunu söylemek mümkündür.

Çalışmamızda *T. roseum*'dan elde edilip saflaştırılan β -glukosidaz enziminin inhibitörü olan D-(+)-glukozun *p*NPG substratı varlığında enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu olarak ifade edilen IC₅₀ değeri ve enzim aktivitesini azaltan inhibisyon tipi tespit edilerek K_i değeri hesaplanmıştır. *T. roseum*'dan elde edilip saflaştırılan β -glukosidaz enziminin D-(+)-glukoz inhibitörü için IC₅₀ değeri 6,20 mM (Tablo 3.8, Şekil 3.11) ve K_i değeri $2,16 \times 10^{-4} \pm 1,0 \times 10^{-4}$ (Tablo 3.10, Şekil 3.13) olarak hesaplanarak kompetitif (yarışmalı) tipte inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. Ramani ve ark. (2012), *Penicillium funiculosum* NCL1'den saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin *p*NPG substratı ve glukoz inhibitörü varlığında K_i değeri 1,5 mM olarak hesaplayarak β -glukosidaz enzimine karşı glukozun kompetitif tipte inhibisyon etkisi gösterdiğini; Lyman ve ark. (1995), *Phanerochaete chrysosporium*'dan saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin *p*NPG substratı ve glukoz inhibitörü varlığında K_i değeri 0,27 mM olarak hesaplayarak β -glukosidaz enzimine karşı glukozun kompetitif tipte inhibisyon etkisi gösterdiğini; Hidalgo

ve ark. (1992), *Penicillium purpurogenum*'dan saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin *p*NPG substratı ve glukoz inhibitörü varlığında K_i değeri 1,4 mM olarak hesaplayarak β -glukosidaz enzime karşı glukozun kompetitif tipte inhibisyon etkisi gösterdiğini; Lin ve ark. (1999), *Thermomyces lanuginosus*-SSBP'den saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin aktivitesini *p*NPG substratı ve glukoz inhibitörü varlığında K_i değeri 0,55 mM olarak hesaplayarak β -glukosidaz enzime karşı glukozun kompetitif tipte inhibisyon etkisi gösterdiğini; Yang ve ark. (2008), *Paecilomyces thermophila* J18'den saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin *p*NPG substratı ve glukoz inhibitörü varlığında K_i değeri 73 mM olarak hesaplayarak β -glukosidaz enzime karşı glukozun kompetitif tipte inhibisyon etkisi gösterdiğini; Elshafei ve ark. (2011), *Aspergillus terreus* NRRL 265'den saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin *p*NPG substratı ve glukoz inhibitörü varlığında K_i değeri 13,6 mM olarak hesaplayarak β -glukosidaz enzime karşı glukozun kompetitif tipte inhibisyon etkisi gösterdiğini tespit etmişlerdir [136,143,149,150,151].

Ayrıca çalışmamızda *T. roseum*'dan elde edilip saflaştırılan β -glukosidaz enziminin bir diğer inhibitörü olan δ -glukonolaktonun *p*NPG substratı varlığında enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisini gösteren IC_{50} değeri ve inhibisyon tipi de tespit edilerek K_i değeri hesaplanmıştır. *T. roseum*'dan elde edilip saflaştırılan β -glukosidaz enziminin δ -glukonolakton inhibitörü için IC_{50} değeri 6,22 mM (Tablo 3.9, Şekil 3.12) ve K_i değeri $8,71 \times 10^{-6} \pm 1,92 \times 10^{-7}$ (Tablo 3.11, Şekil 3.14) olarak hesaplanarak yarışmalı tipte inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. Lymar ve ark. (1995), *Phanerochaete chrysosporium*'dan saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin *p*NPG substratı ve glukonolakton inhibitörü varlığında K_i değeri 0,004 mM olarak hesaplayarak β -glukosidaz enzime karşı glukonolaktonun kompetitif tipte inhibisyon etkisi gösterdiğini; Hidalgo ve ark (1992), *Penicillium purpurogenum*'dan saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin *p*NPG substratı ve δ -glukonolakton inhibitörü varlığında K_i değeri 0,067 mM olarak hesaplayarak β -glukosidaz enzime karşı δ -glukonolakton mixed (karışık) tipte inhibisyon etkisi gösterdiğini; Yang ve ark. (2008), *Paecilomyces thermophila* J18'den saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin *p*NPG substratı ve δ -glukonolakton inhibitörü varlığında K_i değeri 0,49 mM olarak hesaplayarak β -glukosidaz enzime karşı δ -glukonolaktonun kompetitif tipte inhibisyon etkisi gösterdiğini; Elshafei ve ark. (2011), *A. terreus* NRRL 265'den saflaştırdıkları β -glukosidaz enziminin *p*NPG substratı ve δ -glukonolakton inhibitörü varlığında K_i değeri 1,9 mM olarak hesaplayarak β -glukosidaz enzime karşı δ -

glukonolaktonun kompetitif tipte inhibisyon etkisi gösterdiğini tespit etmişlerdir [143,149,150, 153].

Kompetitif (yarışmalı) inhibisyonda, inhibitör, enzimin aktif bölgesi için substrat ile yarış halindedir. İnhibitör enzimin aktif bölgesine bağlandığında reaksiyon gerçekleşmez ve inhibitör aktif yeri bölgedeyken substratın enzime bağlanmasını engeller. Kompetitif inhibisyonda inhibitör madde, enzimin substrata olan ilgisini azaltmaktadır. İnhibitör, yapısal olarak substrata benzeyen, enzime dönüşümlü bağlanma özelliği gösteren bir bileşiktir. Kompetitif inhibisyonda, inhibitör enzime dönüşümlü olarak bağlandığından yarışma, ortama daha fazla substrat eklenerek substrattan yana çevrilebilir. Ortamda yeterli substrat bulunduğu inhibitorün enzime bağlanma olasılığı azalır. *T. roseum*'dan elde edilerek saflaştırılan β -glukosidaz enziminin aktif bölgesine bağlanabilmek için *p*NPG substratının ve D-(+)-glukoz ve δ -glukonolakton inhibitörlerinin yarış halinde oldukları ifade edilebilir. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar ile literatürdeki veriler karşılaştırıldığında, D-(+)-glukoz ve δ -glukonolakton inhibitörlerinin önceki çalışmalarda olduğu gibi kompetitif (yarışmalı) tipte inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir.

Mikroorganizmalardan elde edilen selülozlar ve bunlardan çalışmamızın konusunu da oluşturan β -glukosidaz enzimi biyoteknolojik özelliklerinden dolayı büyük ilgi görmektedirler. Mikroorganizma kaynaklı β -glukosidaz etanol ve biyoyakıt üretiminde, kozmetik ve deterjan endüstrilerinde, meyve sularının stabilizasyonunda, alkol ve alkol türevlerinin eldesinde, içecek, gıda ve yem ürünlerinin kalitelerinin artırılması gibi birçok alanda temel endüstriyel enzim olma yolundadır.

Sonuç olarak; özellikle tarımsal sanayi atıklarının büyüme substratları olarak değerlendirilmesi sonucu; başta CO₂ emisyonunun düşürülmesi ile çevre ve atmosferik kirliliğin önlenmesine sağlayacağı katkılardan dolayı çalışmamız büyük önem taşımaktadır. Ayrıca çalışmamız ticari açıdan önemli enzimler arasında yerini almış olan β -glukosidaz için mikroorganizma kökenli yeni enzim kaynağının ortaya çıkarılması, uygun maliyetle üretimi, saflaştırılması ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesiyle bilime olduğu kadar endüstriyel ölçeklerde üretimi ve kullanılmasının ortaya konması bakımından da büyük önem taşımaktadır.

5. KAYNAKLAR

- [1] N. Gurung, S. Ray, S. Bose, and V. Rai, "A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond," (in eng), *Biomed Res Int*, vol. 2013, p. 329121, 2013.
- [2] T. P. Bennett, *Modern Topics in Biochemistry: Structure and Function of Biological Molecules*, Macmillan, 1966.
- [3] O. Kirk, T. V. Borchert, and C. C. Fuglsang, "Industrial enzyme applications", (in eng), *Curr Opin Biotechnol*, vol. 13, no. 4, pp. 345-51, Aug 2002.
- [4] M. R. Kula, "Microbial genetic engineering and enzyme technology", C. P. Hollenberg and H. Sahm, Eds., ed. Stuttgart ;: G. Fischer Verlag, 1987.
- [5] S. L. Neidleman, "Enzymes in the food industry", *Food Technology*, vol. 45(1), p. 88, 1991.
- [6] A. L. Demain, "Industrial microbiology", (in eng), *Science*, vol. 214, no. 4524, pp. 987-95, Nov 27 1981.
- [7] J. H. Litchfield, "Single-cell proteins," (in eng), *Science*, vol. 219, no. 4585, pp. 740-6, Feb 11 1983.
- [8] A. P. Payen, J. F. , "Memoir on diastase, the principal products of its reactions, and their applications to the industrial arts," *Annales de Chimie et de Physique*, vol. vol. 53, pp. 73–92, 1833.
- [9] A. Ullmann, "Pasteur-Koch: distinctive ways of thinking about infectious diseases," *Microbe*, vol.2, pp. 383–387, 2007.
- [10] J. Polaina and A. P. MacCabe, "Industrial Enzymes Structure, Function and Applications" *Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos* ed. CSIC: Valencia, Spain, 2007.
- [11] R. Sharma, Y. Chisti, and U. C. Banerjee, "Production, purification, characterization, and applications of lipases," (in eng), *Biotechnol Adv*, vol. 19, no. 8, pp. 627-62, Dec 2001.
- [12] K. Wilson and J. Walker, "Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology", *Cambridge University Press*, p. 736, 2010.
- [13] M. B. Rao, A. M. Tanksale, M. S. Ghatge, and V. V. Deshpande, "Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases," (in eng), *Microbiol Mol Biol Rev*, vol. 62, no. 3, pp. 597-635, Sep 1998.

- [14] H. Ako, W. K. Nip, "Enzyme Classification and Nomenclature", *Food Biochemistry and Food Processing*, pp. 135-154, 2006.
- [15] S. Boyce and K. F Tipton, "Enzyme classification and nomenclature", *Nature Encyclopedia of Life Sciences*, pp. 1-11, 2000.
- [16] P. K. Robinson, "Enzymes: principles and biotechnological applications," (in eng), *Essays Biochem*, vol. 59, pp. 1-41, 2015.
- [17] L. R. Lynd, P. J. Weimer, W. H. van Zyl, and I. S. Pretorius, "Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology," (in eng), *Microbiol Mol Biol Rev*, vol. 66, no. 3, pp. 506-77, table of contents, Sep 2002.
- [18] A. Brogniart, Pelonze, A.B., Dumas, R., "Report on a Memoir of M. Payen, on the Composition of the Woody Nature ", *Polysaccharide*, pp. 51–53., 1839.
- [19] D. M. Harris, "Molecular and chemical dissection of cellulose biosynthesis in plants," Plant Physiology, University of Kentucky, Kentucky, 2011.
- [20] J. Lederberg, "Cellulases." *Encyclopaedia of Microbiology*, Vol. 1; A-C, Academic Press, Inc, 1992.
- [21] G. Walsh, "Industrial enzymes: proteases and carbohydrases" In: *Proteins; Biochemistry and Biotechnology*. John Wiley and Sons. Ltd., 2002.
- [22] H.R. Walter, "Microcrystalline cellulose technology ", *Polysaccharide Association Structure in Food*. Marcel Dekker, Inc., 1998.
- [23] M. Alexander, "Microbiology of cellulose", *Introduction to Soil Microbiology (2nd Ed.)*. John Wiley and Son, Inc. New York and London., 1961.
- [24] B. Henrissat, T. T. Teeri, and R. A. J. Warren, "A scheme for designating enzymes that hydrolyse the polysaccharides in the cell walls of plants", *FEBS Lett.* vol.425, pp.352–354, 1998.
- [25] V. Arantes, J. N. Saddler, "Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis", *Biotechnol. Biofuels*, vol.3, pp.4, 2010.
- [26] R. Kumar, S Singh., O. V. Singh, "Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives", *Microbiol. Biotechnol.*, vol.35, pp.377-391, 2008.
- [27] A. Aygan, "Haloalkalofil *Bacillus* sp. İzolasyonu, Amilaz, Selülaz ve Ksilanaz Enzimlerinin Üretimi, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulamalarda Kullanılabilirliği", *Çukurova Üniversitesi*, Adana, 2008.
- [28] Y.M. Galante., A.De Conti, and R. Monteverdi, "Application of *Trichoderma* enzymes in food and feed industries". *Harman G.F. & Kubicek C.P. (Eds.)*,

- Trichoderma & Gliocladium - Enzymes, Biological Control and Commercial Applications*, vol 2, pp. 327-342. London, Taylor & Francis, 1998.
- [29] H. Graham and D. Balnave “Dietary enzymes for increasing energy availability”, Wallace R.J. and Chesson A. (Eds.) *Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feedings*, pp. 296-309, Weinheim, VHC, 1995.
- [30] M. R. Bedford, A. J. Morgan, T. Fowler, K. A. Clarkson, M. A. Ward, K. D Collier and E.A. Larenas, “ Enzyme feed additive and animal feed including it”, *US Pat 6562340*, 2003.
- [31] C. Mai,, U. Kües, and H. Miltz, 2004. “Biotechnology in the wood industry”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 63, no. 5, pp. 477–494. 2004.
- [32] A. Singh, R. C. Kuhad and O. P. Ward, “Industrial application of microbial cellulases”, *Lignocellulose Biotechnology: Future Prospects*, R. C. Kuhad and A. Singh, Eds., pp. 345– 358, I.K.International Publishing House, New Delhi, India, 2007.
- [33] M. Akhtar, “Biochemical pulping of aspen wood chips with three strains of *Ceriporiopsis subvermispota*”, *Holzforchung*, vol. 48, pp. 199–202, 1994.
- [34] J. Pere, A. Puolakka, P. Nousiainen and J. Buchert, “Action of purified *Trichoderma reesei* cellulases on cotton fibers and yarn”, *Journal of Biotechnology*, vol. 89, no. 2-3, pp. 247–255. 2001.
- [35] M. K. Bhat, “Cellulases and related enzymes in biotechnology”, *Biotechnology Advances*, vol. 18, no. 5, pp. 355–383, 2000.
- [36] R. C. Kuhad, G. Mehta, R. Gupta and K. K. Sharma, “Fed batch enzymatic saccharification of newspaper cellulose improves the sugar content in the hydrolysates and eventually the ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*,” *Biomass and Bioenergy*, vol. 34, no. 8, pp. 1189-1194, 2010.
- [37] Y. M. Galante and C. Formantici, “Enzyme applications in detergency and in manufacturing industries“, *Curr Org Chem*, vol. 7, pp.1399-1422, 2003.
- [38] H. Uhlig, “Industrial Enzymes and their Applications“*John Wiley & Sons Inc*, pp. 435, New York, 1998.
- [39] J.M. Cortez, J. Ellis, and D.P. Bishop, “Cellulase finishing of woven, cotton fabrics in jet and winch machines”, *J Biotechnol*, vol 89, pp. 239-245, 2001.
- [40] R.K. Sukumaran, R.R. Singhanian, and A. Pandey, “Microbial cellulases: Production, application and challenges“, *J Sci Ind Res*, vol. 64, pp. 832-844, 2005.

- [41] D. Antoni, V.V. Zverlov and W.H. Schwarz, "Biofuels from microbes", *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 77, pp. 23–35, 2007.
- [42] D.B. Levin,, H. Zhu,, M. Beland, N Cicek, and B.E. Holbein, "Potential for hydrogen and methane production from biomass residues in Canada", *Bioresour Technol*, vol. 98, pp. 654– 660, 2007.
- [43] T. Amon, B. Amon, V. Kryvoruchko, A. Machmuller, K. Hopfner-Sixt, V. Bodiroza, R. Hrbek, J. Friedel, E. Potsch, H. Wagentristl, M. Schreiner and W. Zollitsch, "Methane production through anaerobic digestion of various energy crops grown in sustainable crop rotations", *Bioresour Technol*, vol. 98, pp. 3204–3212, 2007.
- [44] S.K. Khandelwal, "Degradation of organic wastes under anaerobic conditions using chemical inducers and microorganisms for biogas production", *Department of Biochemistry, Rajasthan College of Agriculture, Maharana Pratap University of Agriculture & Technology, Udaipur, India*, 2004.
- [45] P. Harnpicharnchai,, V. Champreda,, W. Sornlakea, and L. Eurwilaichitra, "A thermotolerant β -glucosidase isolated from an endophytic fungi, *Periconia* sp., with a possible use for biomass conversion of sugars", *Protein Expr. Purif.*, vol. 67, (2), pp. 61-69, 2009.
- [46] Y.J. Cai,, S.J. Chapman , J.A. Buswell, and S. Chang, "Production and distribution of endo- β -glucanase, cellobiohydrolase and β -glucosidase components of the cellulolytic system of *Volvariella volvacea*, the edible straw mushroom", *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 65,(2), pp. 553-559, 1999.
- [47] Y.H. Wang, J. Zhou, J. Chu, S. L. Zhanga and Y.P. Zhuanga, "Production and distribution of β -glucosidase in a mutant strain *Trichoderma viride* T 100-14" *N. Biotechnol.*, vol. 26, (3-4), 150-6, 2009.
- [48] N. J. Parry,, D. E. Beever,, E. Owen,, I. Vandenberghe, J.V. Beeumen and M. K. Bhat, "Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable β -glucosidase purified from *Thermoascus aurantiacus*", *Biochem. J.*, vol. 353, pp. 117-127, 2001.
- [49] R.S.R. Leite, H.F. Alves-Prado, H. Cabral, F.C. Pagnocca, E. Gomes, R. Silva, "Production and characteristics comparison of crude β -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes", *Enzyme Microb Technol*, vol. 43,391–5., 2008.

- [50] A.B. Dhake, and M.B. Patil, "Production of β -glucosidase by *Penicillium purpurogenum*", *Braz. J. Microbiol.*, vol. 36, pp. 170-176, 2005.
- [51] A. Kotaka, H.Kaya, M. Kato-Murai, K. Kuroda, H. Sahara, Y. Hata, A. Kondo, M. Ueda, "Direct ethanol production from barley β -glucan by sake yeast *Aspergillus oryzae* β -glucosidase and endoglucanase", *J Biosci Bioeng*, vol.105, (6), pp. 622–627, 2008.
- [52] A. Ahmed, F. Nasim, H. Batool, K. A. Bibi, "Microbial β -Glucosidase: Sources, Production and Applications", *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, Vol. 5, No. 1, pp. 31-46, 2017.
- [53] G. Singh, A. K. Verma and V. Kumar, "Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of β -glucosidases", *Biotech*, vol. 6,3, 2016.
- [54] A. Sorensen, M. Lubeck, P.S. Lubeck, B.K. Ahring, "Fungal beta-glucosidases: a bottleneck in industrial use of lignocellulosic materials", *Biomolecules*, vol. 3, pp. 612–631, 2013.
- [55] Y. Li, N. Liu, H. Yang, F. Zhao, Y. Yu, Y. Tian, X. Lu "Cloning and characterization of a new β -Glucosidase from a metagenomic library of Rumen of cattle feeding with *Miscanthus sinensis*. ", *BMC Biotechnol*, vol.14, pp. 85–94, 2014.
- [56] S.M. Lee, L.H.Jin, J.H Kim, S.O Han, H.B. Na, T. Hyeon, Y.M. Koo, J. Kim, J.H . Lee " β -Glucosidase coating on polymer nanofibers for improved cellulosic ethanol production", *Bioprocess Biosyst Eng*, vol. 33, pp. 141–147, 2010.
- [57] C. Schroder, S. Elleuche, S. Blank, G. "Antranikian Characterization of a heat-active archaeal β -glucosidase from a hydrothermal spring metagenome", *Enzyme Microbial Technol.*, vol. 57, pp. 48–54, 2014.
- [58] D. Liu, R. Zhang, X. Yang, Z. Zhang, S. Song, Y. Miao, Q. Shen, "Characterization of a thermostable beta-glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, and its functional expression in *Pichia pastoris* X33" , *Microb Cell Fact*, vol. 11, pp. 25–29, 2012.
- [59] C. Riou, J.M. Salmon, M.J Vallier, Z. Gunata, P. Barre "Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus oryzae* ", *Appl Environ Microbiol*, vol. 64:3, pp. 607–3614, 1998.
- [60] P. Gonzalez-Pombo, L. Farina, F.Carrau, F. Batista-Viera, B.M.Brena, " A novel extracellular β -glucosidase from *Issatchenkia terricola*: isolation, immobilization

- and application for aroma enhancement of white Muscat wine”, *Process Biochem*, vol.46, (1), pp. 385–389, 2011.
- [61] J. Krisch, M. Tako, T. Papp, C. Vagvolgyi, “Characteristics and potential use of β -glucosidases from Zygomycetes”, *Mendez- Vilas A (ed) Current Research, Technology and Education, Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, pp. 891–896, 2010.
- [62] M. Roitner, T. Schalkhammer, F. Pittner “Characterization of naringinase from *Aspergillus niger*”, *Monatshefte fur Chemie/ Chem Mon*, vol. 115, pp. 1255–1267, 1984.
- [63] Keerti, A. Gupta, V. Kumar, A. Dubey, A.K. Verma, “Kinetic characterization and effect of immobilized thermostable β -glucosidase in alginate gel Beads on sugarcane juice”, *ISRN biochemistry*, vol 2014, pp. 8, 2014.
- [64] G. Fan, Y. Xu, X. Zhang, S. Lei, S. Yang, S. Yang, “Characteristics of immobilised β -glucosidase and its effect on bound volatile compounds in orange juice”, *Int J Food Sci Technol*, vol. 46(11), pp. 2312–2320, 2011.
- [65] R. Opassiri, Y. Hua, O. Wara-Aswapati, T. Akiyama, J. Svasti, A. Esen, J.R.K Cairns “Beta-glucosidase, exo-beta-glucanase and pyridoxine transglucosylase activities of rice”, *Biochem J* .,vol. 379, pp. 125–131, 2004.
- [66] Z. Zhang, R.R. Marquardt, G. Wang, W. Guenter, G.H. Crow, Z.Han, M.R. Bedford, “A simple model for predicting the response of chicks to dietary enzyme supplementation. ”, *J Anim Sci*, vol. 74, pp. 394–402, 1996.
- [67] S. Hati, S. Vij, B.P Singh, S. Mandal “ β -Glucosidase activity and bioconversion of isoflavones during fermentation of soymilk”, *J Sci Food Agric*, vol. 95, pp 216–220, 2015.
- [68] T. Izumi, M.K. Piskula, S. Osawa, A. Obata, K. Tobe, M. Saito, S. Kataoka, Y. Kubota, M. Kikuchi “Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. ”, *J Nutr*, vol. 130, pp. 1695–1699, 2000.
- [69] G. Rimbach, C.S. Boesch, J. Frank, D. Fuchs, U. Wenzel, H. Daniel, W.L. Hall, P.D. Weinberg, “Dietary isoflavones in the prevention of cardiovascular disease—a molecular perspective”, *Food Chem Toxicol*, vol. 46, pp. 1308–1319. 2008.
- [70] J. Liggins, L.J. C. Bluck, S. Runswick, C. Atkinson, W.A. Coward, S.A Bingham, “Daidzein and genistein contents of vegetables”, *Br J Nutr*, vol. 84, p.p 717–725, 2000.

- [71] J.A. Marazza, M.S. Garro, G. Savoy de Giori “Aglycone production by *Lactobacillus rhamnosus* CRL981 during soymilk fermentation. ”, *Food Microbiol*, vol. 26, pp. 333–339, 2009.
- [72] E. Bankova, N. Bakalova, S. Petrova, D. Kolev,“ Enzymatic synthesis of oligosaccharides and alkylglycosides in waterorganic media via transglycosylation of lactose”, *Biotechnol and Biotechnol Equip.*, vol. 20, pp. 14–119, 2006.
- [73] Sharma A, A. Sharma, S Gautam, and B.B Mishra, “*Trichothecium*”,*Encyclopedia of Food Microbiology*, Bhabha Atomic Research Centre, Mumbai, India, vol. 3, pp. 647-652, 2014.
- [74] Y. Toor, and U. Ilyas ,“Optimization of Cellulase Production by *Aspergillus ornatus* by the Solid State Fermentation of *Cicer arietinum*”, *American Journal of Research Communication*, Vol. 2(1) ,pp. 125-141, 2013.
- [75] F.M Zoppas, A. Meneguzzi, and F. Tramontina, “Alternatives for Cellulase Production in Submerged Fermentation with Agroindustrial Wastes”, *International Journal of Modern Engineering Research*, vol. 3(4), pp. 2374-2381, 2013.
- [76] S. Manpreet,, S Sawraj., S. Pankaj and U.C. Banarjee, “Influence of Process Parameters on the Production of Metabolites in Solid State Fermentation”, *Mal. J.Microbiol.*, vol. 1(2), pp. 1-9, 2005.
- [77] H.M.N. Iqbal, I. Ahmed, M.A. Zia, and M. Irfan, “Purification and characterization of the kinetic parameters of cellulase produced from wheat straw by *Trichoderma viride* under SSF and its detergent compatibility”, *Advances in Bioscience and Biotechnology*, vol. 2, pp. 149-150, 2011.
- [78] F.M. Cunha, M.N. Esperança, T.C. Zangirolami , A.C. Badino and C.S. Farinas, “Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse for the production of cellulase”, *Bioresource Technology*, vol. 112, pp. 270–274, 2012.
- [79] S. Sadhu and T.K. Maiti, “Cellulase Production by Bacteria: A Review”, *British Microbiology Research Journal*, vol. 3, (3), pp.235-258, 2013.
- [80] B. Eser and A. Sepici Dinçel, “Introduction to Chromatography, Basic Working Tips for High Performance Liquid Chromatography” *Journal of Health Services and Education*, vol.2, (2), pp. 51-57, 2018.
- [81] Coskun O., “Separation techniques: Chromatography” *North Clin Istanbul*, vol.3, (2), pp.156–160, 2016.

- [82] Ü. İ. Konak, İ. Turhan, M. Certel, “Proteinlerin Kromatografik Yöntemlerle Saflastırılması”, *Akademik Gıda*, vol.12, (2), pp.79-87, 2014
- [83] P. Kumpalume, S. Ghose, “Chromatography: The High-Resolution Technique for Protein Separation. In: Isolation and Purification of Proteins”, R. H. Kaul and B. Mattiasson (Editors), Marcel Dekker, pp. 29-56, New York, 2003.
- [84] S. Doonan, and P. Cutler, “General Strategies. In: Protein Purification Protocols”, P. Cutler (Editor), *Humana Press*, pp. 1-13, New Jersey. 2004.
- [85] J. C. Janson, and L. Ryde'n (eds.), “Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications”, 2nd edn., p. 284. *Wiley-VCH*, New York, 1997.
- [86] J. T. McCue, “Theory and Use of Hydrophobic Interaction Chromatography in Protein Purification Applications”, *Methods in Enzymology*, vol. 463, pp.405-414, 2009.
- [87] B. F. O'Connor and P. M. Cummins, “Hydrophobic Interaction Chromatography” D. Walls and S. T. Loughran (eds.), “Protein Chromatography: Methods and Protocols”, *Methods in Molecular Biology*, Chapter 18, vol. 1485, pp.355-363, 2017.
- [88] F. Hofmeister, “On regularities in the albumin precipitation reactions with salts and their relationship to physiological behavior”, *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, vol. 24, pp. 247–260, 1988.
- [89] S. Pålman, J. Rosengren, and S. Hjerten, “Hydrophobic interaction chromatography on uncharged Sepharose derivatives” *J. Chromatogr.* vol.131, pp. 99–108, 1977.
- [90] K.H. Domsch, W. Gams and T.H. Anderson, “Compendium Of Soil Fungi” *Academic Pres*, London, New York, Toronto, Sydney, Sanfransisco, pp.859,1980.
- [91] L. Levin, C. Herrmann, V. L. Papinutti, “Optimization of lignocellulolytic enzyme production by the white-rot fungus *Trametes trogii* in solid-state fermentation using response surface methodology”, *Biochemical Engineering Journal*, vol. 39, pp. 207–214, 2008.
- [92] M. Goyal and G.Soni, “Production and characterization of cellulolytic enzymes by *Pleurotus florida*”, *African Journal of Microbiology Research* Vol. 5,(10), pp. 1131-1136, 2011.
- [93] M. Slifkin and R. Cumbie, “Congo Red as a Fluorochrome for the Rapid Detection of Fungi”, *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 26,(5), pp. 827-830, 1988.

- [94] A. Sazci, A. Radford and K. Erenler, "Detection of Cellulolytic Fungi by Using Congo Red as an Indicator: A Comparative Study with the Dinirosalicylic Acid Reagent Method", *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 61, pp.559-562, 1986.
- [95] R.M. Teather and P. Wood, "Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rumen", *Applied an enveronmental Microbiology*, vol. 43(4), pp. 777-780, 1982.
- [96] H.M. Davidson and W.H. Fishman, "A Simplified Purification Procedure for Human Prostatic Acid Phosphatase Based on pH and Ammonium Sulfate Fractionation.", *J. Biol. Chem.*, vol. 234,(3), pp. 526-528, 1958.
- [97] R.K. Tripathi, C.C. Devi, and A. Ramaiah, "pH-dependent Intercoversion of Two Forms of Tyrosinase in Human Skin", *Biochem. J.*, vol. 252, pp.481-487, 1988.
- [98] E. A. Pfannkoch, "The Preparation of Buffers and Other Solutions: A Chemist's Perspective" Edited by Alan S. Gerstein, *Molecular Biology Problem Solver: A Laboratory Guide*, pp.31-47. 2011.
- [99] P. Harnpicharnchai, V. Champreda, W. Sornlake, L. Eurwilaichitr, "A thermotolerant β -glucosidase isolated from an endophytic fungi, *Periconia* sp., with a possible use for biomass conversion to sugars", *Protein Expression and Purification*, vol.67, pp. 61–69, 2009.
- [100] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, "Protein Measurement with Folin Phenol Reagent", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 193, pp.265-275, 1951.
- [101] A. Karnchanatat, A. Petsom, P. Sangvanich, J. Piaphukiew, A. J.S. Whalley, C. D. Reynolds and P. Sihanonth, "Purification and biochemical characterization of an extracellular β -glucosidase from the wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzi*" (Ehrenb.:Fr.)*Rehm FEMS Microbiol Lett.* vol.270, pp. 162–170, (2007)
- [102] U.K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4" *Nature*, vol. 227,(5259), pp. 680-685, 1970.
- [103] S.A. Shukolyukol, "NATIVE Electrophoresis in Cell Proteomic: BN-PAGE an CN-PAGE", *Cell and Tissue Biolog*, vol.5,(3), pp. 311-318, 2011.
- [104] M. Chevallet, S. Luche and T. Rabilloud, "Silver staining of proteins in polyacrylamide gels", *Nature Protocols*, vol.1, no.4, pp. 1852-1858, 2006
- [105] A. Ijaz, Z. Anwar, Y. Zafar, I. Hussain, A. Muhammad, M. Irshad and S. Memood, "Optimization of Cellulase Enzyme Production from Corn Cobs Using *Alternaria*

- alternata by Solid State Fermentation”, *Journal of Cell and Molecular Biology*, vol.9, (2), pp. 51-56. 2011.
- [106] S. Voget, H.L. Steele, W.R. Streit, "Characterization of Metagenome-Derived Halotolerant Cellulase" *J. Biotechnol.* vol.126, pp.26-36, 2006.
- [107] K. Matkar, D. Chapla, J. Divecha, A. Nighojkar, D. Madamwar, “Production of Cellulase by a Newly Isolated Strain of *Aspergillus sydowii* and Its Optimization Under Submerged Fermentation”, *International Biodeterioration and Biodegradation*, vol. 78, pp.24-33 2013.
- [108] S. İ. Yun, C. S. Jeong, D.-K. Chung and H. S. Choi, “Purification and Some Properties of a β -glucosidase from *Trichoderma harzianum* Type C4”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 65, (9), pp.2028-2032, 2001.
- [109] O. Warburg and W. Christian, "Isolation and Crystallization of Enolase", *Biochem Z*, vol. 310, pp. 384-421 1942.
- [110] N. Y. Toker, “Protein Saflaştırması ile İlgili Bazı Metotlar”, *İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg.*, vol. 26 (2), pp.403-412, 2000.
- [111] R. R. Burgess, “Purification Procedures: Bulk Methods”, *Protein Precipitation Techniques Methods in Enzymology*, Chapter 20, Volume 463, pp. 331-341, 2009.
- [112] B. J. Macris, “Production and Characterization of Cellulase and β -Glucosidase from a Mutant of *Alternaria alternata*”, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 47, pp. 560-565, 1984.
- [113] K. P. Nooralabettu, “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.*, vol. 2(1), pp. 7-16, 2014.
- [114] A. Asic, L. Basic, I. Muhovic, S. Dogan, and Y. Turan, "Purification and Characterization of β -glucosidase from *Agaricus bisporus* (White Button Mushroom)", *The Protein Journal*, vol.34, (6), pp. 453-461, 2015.
- [115] X. Zhao, L. Gao, J. Wang, H. Bi, J. Gao, X. Du, Y. Zhou and G. Tai, “A novel ginsenoside Rb1-hydrolyzing β -D-glucosidase from *Cladosporium fulvum*”, *Process Biochemistry*, 44, 612—618, 2009.
- [116] S. R. Gallagher, “SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) Current Protocols Essential Laboratory Techniques” vol. 7, 3, pp.1-28, 2012.

- [117] S. Jiang, S. Liu, C. Zhao, ve C. Wu, "Developing Protocols of Tricine-SDS-PAGE for Separation of Polypeptides in the Mass Range 1-30 kDA with Minigel Electrophoresis System", *Int. J. Electrochem. Sci.*, vol. 11, pp. 640-649, 2016.
- [118] P. Christakopoulos, P. W. Goodenough, D. Kekos, B. J. Macris', M. Claeysens and M. K. Bhat, "Purification And Characterisation of an Extracellular β -Glucosidase with Transglycosylation and Exo-Glucosidase Activities from *Fusarium oxysporum*", *Eur. J. Biochem.*, vol. 224, pp. 379-385, 1994.
- [119] A. L. R. L. Zimbaridi, C. Sehn, L. P. Meleiro, F. H. M. Souza, D. C. Masui, M. S. F. Nozawa, L. H. S. Guimarães, J. A. Jorge and R. P. M. Furriel, "Optimization of β -Glucosidase, β -Xylosidase and Xylanase Production by *Colletotrichum graminicola* under Solid-State Fermentation and Application in Raw Sugarcane Trash Saccharification", *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, pp. 2875-2902, 2013.
- [120] Ahmed, S. A., El-Shayeb, Nefisa M.A., Hashem, A.-G. M., Saleh, S. A.A., Abdel-Fattah, A.F. "Chemical modification of *Aspergillus niger* β -glucosidase and its catalytic properties" , *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 46, (1), pp. 23-28, 2015.
- [121] D. L. Wei, K. Kirimura, S. Usami and T.H. Lin, "Purification and Characterization of an Extracellular β -Glucosidase from the Wood-Grown Fungus *Xylaria regalis*", *Current Microbiology*, vol. 33, pp. 297-301, 1996.
- [122] G. Narasimha, A. Sridevi, G. Ramanjaneyulu, and B. R. Reddy, "Purification and Characterization of β -Glucosidase from *Aspergillus niger*", *International Journal of Food Properties*, vol. 19, pp. 652-661, 2016.
- [123] P. Ramachandrana, M. K. Tiwaria, R. K. Singha, J. R. Hawb, M. Jeya and J. K. Lee, "Cloning and characterization of a putative β -glucosidase (NfBGL595) from *Neosartorya fischeri*", *Process Biochemistry*, vol. 47, pp. 99-105, 2012.
- [124] P. Saroj, P. Manasa and K. Narasimhulu, "Characterization of thermophilic fungi producing extracellular lignocellulolytic enzymes for lignocellulosic hydrolysis under solid- state fermentation", *Bioresour. Bioprocess*, vol.5, pp. 31, 2018.
- [125] N. A. Jamroo, N. A. Umor, Kamsani, "Isolation and Screening of Thermo-Stable Cellulase Enzyme Fungal Producer At Different Temperature", *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, vol. 19, No. 4, pp. 860–865, 2015.
- [126] P. Verma and R. K. Verma, "Screening of Cellulase Production by Fungal Isolates from Rhizosphere Region of Mine Degraded Land in Dalli-Rajhara

- (Chhattishgarh)", *International Journal of Basic and Applied Biology*, Volume 3, Issue 2; April-June, pp. 162-165, 2016.
- [127] N. F. L. Garcia, F. R. . S. Santos, F. A. Gonçalves, M. F. Paz, G. G. Fonseca, R. S. R. Leite, "Production of β -glucosidase on solid-state fermentation by *Lichtheimia ramosa* in agroindustrial residues: Characterization and catalytic properties of the enzymatic extract", *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 18, pp. 314–319, 2015.
- [128] I. S. Ng, C. W. Li, S. P. Chan, J. L. Chir, P. T. Chen, C. G. Tong, S. M. Yu, T. H. D. Ho, "High-level production of a thermoacidophilic β - glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-5 by solid-state fermentation with rice bran", *Bioresource Technology*, vol.101, pp. 1310–1317, 2010.
- [129] K.K. Elyas, A. Mathew, R. K. Sukumaran, P.P. M. Ali, K. Sapna, S. R. Kumar and K. R. R. Mol, "Production optimization and properties of beta glucosidases from a marine fungus *Aspergillus*-SA 58", *New Biotechnology*, Volume 27, Number 4, pp. 347-351, 2010.
- [130] H. N. Bhatti, S. Batool and N. Afzal, "Production and Characterization of a Novel β -Glucosidase from *Fusarium solani*", *Int. J. Agric. Biol.*, vol. 15, pp. 140–144, 2013.
- [131] L. C. Qian, S. J. Fu, H.M. Zhou, J. Y. Sun and X. Y. Weng, "Optimization of Fermentation Parameters for β -Glucosidase Production by *Aspergillus niger*", *Journal of Animal and Veterinary Advances*, Volume: 11, Issue: 5, pp. 583-591, 2012.
- [132] E. S. Martins, E. Gomes, R. Silva and R. B. Junior, "Production of cellulases by *Thermomucor indicaeseudaticae*: characterization of a thermophilic β -glucosidase", *Preparative Biochemistry And Biotechnology*, vol. 49, No. 8, pp. 830–836, 2019.
- [133] M. Fadel, "Production Physiology of Cellulases and β -glucosidase Enzymes of *Aspergillus niger* Grown under Solid State Fermentation Conditions", *OnLine Journal of Biological Sciences*, vol. 1, (5), pp. 401-411, 2000.
- [134] F. Raza, N. A. Raza, U. Hameed, I. U. Haq and I. Mariam, "Solid State Fermentation for The Production of β -glucosidase by Co-Culture of *Aspergillus niger* and *A. oryzae*" *Pak. J. Bot.*, vol. 43, (1), pp. 75-83, 2011.

- [135] A. Peshin and J.M.S. Mathur, "Purification and characterization of β -glucosidase from *Aspergillus niger* strain 322", *Letters in Applied Microbiology*, vol.28, pp. 401–404, 1999.
- [136] G. Ramani, B. Meera, C. Vanitha, M. Rao and P. Gunasekaran, "Production, Purification, and Characterization of a β -glucosidase of *Penicillium funiculosum* NCL1", *Appl Biochem Biotechnol*, vol.167, pp. 959–972, 2012.
- [137] H. Ni, H. Cai, F. Chen, Q. You, A. Xiao and Y. Wang, "Purification and Characterization of β -D-glucosidase From *Aspergillus niger* Naringinase", *Journal of Food Biochemistry*, ISSN 1745-4514, 2011.
- [138] G. Gong, Z. Zheng, H. Liu, L. Wang, J. Diao, P. Wang, and G. Zhao, "Purification and Characterization of a β -Glucosidase from *Aspergillus niger* and Its Application in the Hydrolysis of Geniposide to Genipin", *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol.24,(6), pp. 788–794, 2014.
- [139] D. J. Daroit, A. Simonetti, P. F. Hertz and A. Brandelli, "Purification and Characterization of an Extracellular β -Glucosidase from *Monascus purpureus*." *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 18,(5), pp. 933–941, 2008.
- [140] M.H. Rashid and K.S. Siddiqui, "Purification and Characterization of a β -Glucosidase from *Aspergillus niger*", *Folia Microbiol.*, vol. 42, (6), pp. 544-550, 1997.
- [141] S. J. Ma, B. Leng, X. Q. Xu, X. Z. Zhu, Y. Shi, Y. M. Tao, S. X. Chen, M. N. Long and Q.X. Chen, "Purification and characterization of β -1,4 glucosidase from *Aspergillus glaucus*", *African Journal of Biotechnology*, Vol. 10,(84), pp. 19607-19614, 26 December, 2011.
- [142] J. Kaur, B. S. Chadha, B. A. Kumar, G. S. Kaur and H. S. Saini, "Purification and characterization of β -glucosidase from *Melanocarpus* sp. MTCC 3922", *Electronic Journal of Biotechnology*, ISSN: 0717-3458, Vol.10, No.2, Issue of April 15, 2007.
- [143] S. Yang, Z. Jiang, Q. Yan and H. Zhu, "Characterization of a Thermostable Extracellular β -Glucosidase with Activities of Exoglucanase and Transglycosylation from *Paecilomyces thermophila*", *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, pp. 602–608, 2008.
- [144] T. Watanabe, T. Sato, S. Yoshioka, T. Koshijima and M. Kuwahara, "Purification and properties of *Aspergillus niger* β -glucosidase", *Eur. J. Biochem.*, vol. 209, pp. 651 -659, 1992.

- [145] W. J. Chirico and R. D. Brown, Jr., "Purification and characterization of a β -glucosidase from *Trichoderma reesei*", *Eur. J. Biochem*, vol. 165, pp.333-341, 1987.
- [146] P.O. Magalhaes, A. Ferraz and A.F.M. Milagres. "Enzymatic properties of two β -glucosidases from *Ceriporiopsis subvermispora* produced in biopulping conditions", *Journal of Applied Microbiology*, vol. 101, pp. 480–486, 2006.
- [147] F. F. Zanoelo, M. L. T. M. Polizeli, H. F. Terenzi, J. A. Jorge, " β -Glucosidase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* is stimulated by glucose and xylose". *FEMS Microbiology Letters*, vol. 240, pp.137–143, 2004.
- [148] A. R. Joo, M. Jeya, K. M. Lee, K. M. Lee, H. J. Moona, Y. S. Kim, J. K. Lee, "Production and characterization of β -1,4-glucosidase from a strain of *Penicillium pinophilum*" *Process Biochemistry*, vol. 45, pp. 851–858, 2010.
- [149] A. M. Elshafei, M. M. Hassan, N. M. Morsi and D. H. Elghonamy, "Purification and some kinetic properties of β -glucosidase from *Aspergillus terreus* NRRL 265" *African Journal of Biotechnology*, Vol. 10,84, pp. 19556-19569,26, December, 2011.
- [150] M. Hidalgo, J. Steiner, J. Eyzaguirre, "Beta-glucosidase from *Penicillium purpurogenum*: purification and properties", *Biotechnol Appl Biochem.*,vol. 15(2), pp. 185-91. Apr, 1992.
- [151] J. Lin, B. Pillay and S. Singh, "Purification and biochemical characteristics of β -D-glucosidase from a thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*-SSBP" *Biotechnol. Appl. Biochem*, vol. 30, pp. 81–87,1999.
- [152] J. de Cassia Pereira, R.S.R. Leite, do H.F.A. Prado, D.A. Bocchini Martins, E. Gomes, R. da Silva, "Production and Characterization of β -glucosidase Obtained by the Solid-State Cultivation of the Thermophilic Fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31", *Applied biochemistry and biotechnology*, vol. 175,(2), pp. 723-732. 2015.
- [153] E. S. Lyman, B. Li, and V. Renganathan, "Purification and Characterization of a Cellulose-Binding β -Glucosidase from Cellulose-Degrading Cultures of *Phanerochaete chrysosporium*" *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 61, No. 8, pp. 2976–2980, Aug. 1995.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı :Emre YANIK
Doğum tarihi ve yeri :05/03/1994
e-posta :emre.yanik94@gmail.com

Öğrenim Bilgileri

Derece	Okul/Program	Yıl
Y. Lisans	Balıkesir Üniversitesi/ Moleküler Biyoloji ve Genetik	2017-2020
Lisans	Bartın Üniversitesi/ Moleküler Biyoloji ve Genetik	2012-2016
Lise	Mustafakemalpaşa Lisesi	2008-2012

Katıldığı Ulusal ve Uluslararası Kongreler

Emre YANIK, Selma ÇELEN YÜCETÜRK, Ayşe Dilek AZAZ, β -glucosidase Production, Purification and Biochemical Properties of *Trichothecium roseum* by the Solid State Fermentation 2nd International Eurasian Mycology Congress, 04-06 Eylül 2019 Konya, p:128 (Sözlü Sunum)

Fatma Durdu Tuğçe ŞAN, Emre YANIK, Selma ÇELEN YÜCETÜRK, Erkek Üreme Sistemi Bozuklukları ve Lökospermi, 1. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi, 27-29 Nisan 2018 Balıkesir, p:38 (sözlü bildiri)

Ömer İLTER, Emre YANIK, Selma ÇELEN YÜCETÜRK, Onkojenik Virüsler ve Kanser 1. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi, 27-29 Nisan 2018 Balıkesir, p:23 (poster bildiri)

Rümeysa KOÇ, Emre YANIK, Selma ÇELEN YÜCETÜRK, Hastane Enfeksiyonlarına Sebep Olan Çoğul Dirençli Mikroorganizmalar, 1. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi, 27-29 Nisan 2018 Balıkesir, p:36 (poster bildiri)

Edanur AKARSU, Emre YANIK, Selma ÇELEN YÜCETÜRK, Tüberküloz Hastalığının Mikrobiyolojik İncelenmesi ve Moleküler Tanı Yöntemleri, 1. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi, 27-29 Nisan 2018 Balıkesir, p:37 (poster bildiri)

Mustafa Said ATALAY, Emre YANIK, Selma ÇELEN YÜCETÜRK, Mefv Geninin Ailesel Akdeniz Ateşi İle İlgisi, 1. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi, 27-29 Nisan 2018 Balıkesir, p:43 (poster bildiri)