

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



**AĞAÇ KABUKLARINDAN İZOLE EDİLEN *ASPERGİLLUS*
NİGER KÜFÜNDEN BETA GLİKOZİDAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

CEREN BAYBAŞ

BALIKESİR, ARALIK - 2014

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



**AĞAÇ KABUKLARINDAN İZOLE EDİLEN *ASPERGİLLUS*
NİGER KÜFÜNDEN BETA GLİKOZİDAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

CEREN BAYBAŞ

BALIKESİR, ARALIK - 2014

KABUL VE ONAY SAYFASI

Ceren BAYBAŞ tarafından hazırlanan "Ağaç Kabuklarından İzole Edilen *Aspergillus niger* Küfünden Beta Glikosidaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu" adlı tez çalışmasının savunma sınavı 22.12.2014 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Doç. Dr. Tülin AŞKUN

Eş Danışman
Yrd. Doç. Dr. Hatibe KARA

Üye
Prof. Dr. Gülendamar TÜMEN

Üye
Yrd. Doç. Dr. Funda YÜKRÜK

Üye
Yrd. Doç. Dr. Seda BEYAZ


.....

.....

.....

.....

.....

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

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Cihan ÖZGÜR

.....

Bu tez çalışması Balıkesir Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından 2013/33 nolu proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

**AĞAÇ KABUKLARINDAN İZOLE EDİLEN *ASPERGILLUS NİGER*
KÜFÜNDEN BETA GLİKOZİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE
KARAKTERİZASYONU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
CEREN BAYBAŞ
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: DOÇ.DR. TÜLİN AŞKUN)
(EŞ DANIŞMAN: YRD.DOÇ.DR HATİBE KARA)
BALIKESİR, ARALIK - 2014**

Bu çalışmada, ağaç kabuklarından izole edilen *Aspergillus niger* küfü kullanılmıştır. İzolasyon işleminden önce ağaç kabuğu örnekleri sodyum hipoklorür çözeltisiyle yıkanmıştır. İzolasyon için, ağaç kabukları örneklerine çift seri dilüsyon işlemi uygulandıktan sonra dikloran rose bengal kloramfenikol (DRBC) besiyeri kullanılarak yayma plak yöntemi yapılmıştır. Örnekler 7 gün boyunca 27°C’ de inkübasyona bırakılmıştır. İzole edilen örnekler yatık malt ekstrat besiyerinde saf kültür halinde, tanılama işlemi için -20°C saklanmıştır. Tanılama işlemi için Malt ekstrat (MEA), czapeck-dox (CZA) ve czapeck-dox yeast (CYA) besiyerleri hazırlanmıştır ve *Aspergillus niger* MEA, CZA, CYA içeren petri kaplarına ekim yapıldıktan sonra 27°C inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra mikroskopik ve makroskopik incelemeleri yapılmıştır. *A. niger* hifleri ve sporları malt broth besiyerine inoküle edilmiştir. 27°C’ de 180 rpm’ de çalkamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. 10 gün sonra hücreler santrifüjle uzaklaştırılarak supernatant ham ekstrat olarak kullanılmıştır.

Ağaç kabuklarından izole edilen *Aspergillus niger* β -glukosidazı amonyum sülfat çöktürme ve hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemi kullanılarak saflaştırılmıştır. İşlem sonunda enzimin %19,34 verimle 2.18 kat saflaştırıldığı hesaplanmıştır. Enzim saflığının kontrolü için SDS-PAGE yapılarak tek bant gözlenmiş ve enzimin molekül ağırlığı yaklaşık 70 kDa bulunmuştur. Enzimin *p*-NPG ve *o*-NPG substratlarına karşı ilgisi araştırıldığında, 5,122 mM K_m değeri ve 2,71 EU V_{max} değeri ile *p*-NPG substratına ilgisinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Optimum sıcaklık ve pH değerlerinin sırasıyla 60°C ve 5.0 olduğu bulunmuştur. Enzim aktivitesi üzerine Fe^{+3} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Ag^{+2} ve Pb^{+2} ağır metallerinin etkisi incelendiğinde Fe^{+3} ‘ün enzimi aktive ettiği, diğer ağır metallerin ise inhibisyona neden olduğu belirlenmiştir. Enzimin genel inhibitörlerinden glukoz ve δ -glukonolaktonun inhibisyon etkisi araştırılmış ve her iki inhibitörün de enzimi yarışmalı olarak inhibe ettiği bulunmuştur.

ANAHTAR KELİMELER: *Aspergillus niger*, β -glukosidaz, hidrofobik etkileşim kromatografisi

ABSTRACT

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF BETA GLUCOSIDASE FROM *ASPERGILLUS NIGER* STRAIN THAT ISOLATED ON TREE BARKS

MCS THESIS

CEREN BAYBAŞ

BALIKESIR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR:ASSOC. PROF. DR. TULIN ASKUN)

(CO-SUPERVISOR:ASSIST. PROF. DR. HATIBE KARA)

BALIKESIR, DECEMBER 2014

In this study, we studied with *Aspergillus niger* which was isolated from tree barks. Tree barks' samples were washed with sodium hypochloride solution before the isolation process. For the isolation, after double dilution process applied to the tree barks' samples, spread plate technique was used with-using dichloran rose bengal chloramphenicol medium. Samples were incubated for seven days at 27°C. Isolated samples were stored as pure cultures at -20°C for identification. Malt extract agar (MEA), czapeck-dox agar (CZA), czapeck-dox yeast agar (CYA) were prepared for identification and then *Aspergillus niger* was inoculated in the petri dishes containing MEA, CZA, CYA and incubated at 27°C. After the incubation the microscopic and macroscopic characteristics were observed. The *A.niger* strain was incubated at 27°C with shaking at 180 rpm in the malt broth. After 10 days of incubation, the cells were removed by centrifugation and the supernatant was used in the enzyme purification procedure.

β -glucosidase enzyme was purified from *Aspergillus niger* which was isolated from tree barks by using ammonium sulfate precipitation and hydrophobic interaction chromatography. β -glucosidase enzyme was purified 2.18 fold with %19,34 yield by this method. The purified beta-glucosidase enzyme, was observed as a single band as approximately 70 kDa molecular weight with SDS-PAGE. The specificity of fungus beta-glucosidase enzyme was determined used *p*NPG, *o*NPG substrates. It was determined that the enzyme had more affinity to *p*NPG substrate with K_m value of 5,122 mM and V_{max} value of 2,71 EU. Relative activities of Fe^{+3} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Ag^{+2} and Pb^{+2} metals were investigated. Metal Fe^{+3} has affected as activation on enzyme activity. Optimum pH and temperature were found to be 5.0 and 60°C. The effects of general inhibitors of β -glucosidase enzyme which are glucose and δ -gluconoolactone, were investigated on fungus β -glucosidase enzyme. It was determined that both compound have competitive inhibition effect on purified enzyme activity.

KEYWORDS: *Aspergillus niger*, β -glucosidase, hydrofobic interaction chromatography

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ	vi
SEMBOL LİSTESİ	vii
ÖNSÖZ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Selülozun Yapısı ve Özellikleri	1
1.2 Selülazların Yapısal Özellikleri	2
1.3 Selülazların Sınıflandırılması.....	4
1.4 Selülazların Genel Reaksiyon Mekanizmaları.....	4
1.5 Selülaz Aktivite Tayin Yöntemleri	5
1.5.1 Endoglukanaz Aktivite Tayini	6
1.5.2 Ekzoglukanaz Aktivite Tayini	6
1.5.3 β -Glukozidaz Aktivite Tayini	7
1.6 Selülazların Bulunduğu Organizmalar.....	7
1.7 Selülazların Kullanım Alanları	9
1.7.1 Kağıt ve Kağıt Hamuru Endüstrisinde Selülazlar.....	9
1.7.2 Gıda Endüstrisinde Selülazlar.....	9
1.7.3 Bira Endüstrisinde Selülazlar.....	10
1.7.4 Şarap Endüstrisinde Selülazlar	11
1.7.5 Tekstil Endüstrisinde Selülazlar	11
1.7.6 Tarım Alanında Selülazlar	12
1.8 <i>Aspergillus niger</i> Kufünün Özellikleri.....	13
1.9 Bu Çalışmanın Amacı	14
2. MATERYAL METOD.....	16
2.1 Kullanılan Materyaller	16
2.1.1 Kullanılan Cihazlar	16
2.1.2 Fungus İzolasyonu İçin Kullanılan Materyaller	17
2.1.2.1 Besiyerleri	17
2.1.3 Fungus Tanılaması İçin Kullanılan Besiyerleri	18
2.1.4 Plastik, Cam ve Diğer Malzemeler	20
2.1.5 Kimyasal Malzemeler	20
2.1.6 Malzemelerin Sterilizasyonu	20
2.1.7 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması.....	20
2.1.7.1 İdentifikasyon için Kullanılan Çözeltiler	20
2.1.7.2 Enzimin Saflaştırılmasında Kullanılan Çözeltiler.....	21
2.1.7.3 Proteinlerin Kantitatif Tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	22
2.1.7.4 SDS-PAGE Tekniğinde Kullanılan Çözeltiler.....	23
2.2 YÖNTEMLER	25
2.2.1 Ağaç Kabuğu Örneklerinden Küf İzolasyonu	25
2.2.2 Ham Ekstratın Hazırlanması.....	26
2.2.3 Enzim Aktivite Tayini	26
2.2.4 Protein Tayini	27
2.2.4.1 Kalitatif Protein Tayini	27
2.2.4.2 Lowry Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini.....	27
2.2.5 Enzimin Saflaştırılması.....	29

2.2.5.1	Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi	29
2.2.5.2	Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması.....	30
2.2.5.3	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü	31
2.2.6	β -Glukosidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	32
2.2.6.1	Saflaştırılan Enzimin Optimum pH Değerinin Bulunması	32
2.2.6.2	Saf Enzimin Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi.....	32
2.2.7	Enzimin Farklı Substratlara Karşı K_M ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi	33
2.2.8	Enzimin Aktivitesi Üzerine Bazı Ağır Metallerin Etkisinin Belirlenmesi	33
2.2.9	İnhibitörlerin IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi.....	33
2.2.9.1	İnhibitörlerin K_i Değerlerinin Bulunması	34
3.	BULGULAR	35
3.1	Fungusun Tanılanması	35
3.2	Enzimin Saflaştırılması.....	36
3.2.1	Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi.....	38
3.2.2	Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi İle Enzimin Saflaştırılması ...	39
3.2.3	<i>Aspergillus niger</i> Beta-Glukosidaz Enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi.....	42
3.3	Farklı Substratlara Karşı K_m ve V_{max} Değerlerinin Bulunması	42
3.3.1	<i>p</i> -NPG Substratına Karşı K_m ve V_{max} Değerlerinin Bulunması.....	42
3.3.2	<i>o</i> -NPG Substratına Karşı K_m ve V_{max} Değerlerinin Bulunması	45
3.4	Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren Maddelerin IC_{50} Değerlerinin Bulunması.....	47
3.4.1	β -Glukosidazların Genel İnhibitörlerinin IC_{50} Değerlerinin Bulunması	47
3.4.1.1	β -Glukosidazların Genel İnhibitörleri Olan δ -glukonolaktanın IC_{50} Değerinin Bulunması	47
3.4.1.2	β -Glukosidazların Genel İnhibitörleri Olan Glukozun IC_{50} Değerinin Bulunması	50
3.4.2	β -glukosidazların Genel İnhibitörü Olan Maddelerin İnhibisyon Tipinin ve K_i Değerlerinin Belirlenmesi.....	52
3.4.2.1	β -glukosidazların Genel İnhibitörü Olan δ -glukonolaktanın İnhibisyon Tipinin ve K_i Değerlerinin Belirlenmesi.....	52
3.4.2.2	β -glukosidazların Genel İnhibiörü Olan Glukozun İnhibisyon Tipinin ve K_i Değerinin Belirlenmesi	55
3.4.3	Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi Araştırılan Bazı Ağır Metallerin Relative Aktivitelerinin Bulunması	57
3.5	β -Glukosidaz Enziminin Optimum Sıcaklığının Araştırılması.....	57
3.6	β -Glukosidaz Enziminin Optimum pH' nın Araştırılması.....	58
4.	TARTIŞMA VE SONUÇ	60
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	66
6.	KAYNAKLAR.....	67
7.	EKLER.....	78

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Selülozun yapısı (Van ve Block, 2010)	2
Şekil 1.2: Selülozun enzimli hidrolizi (Ayşe TURAN, 2011)	5
Şekil 2.1: Lowry yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik	28
Şekil 2.2: Hidrofobik etkileşim kromotografisinde kullanılan hidrofobik jel (Selma Sinan, Doktora Tezi, 2005)	30
Şekil 3.1: <i>Aspergillus niger</i> 'in mikroskopik görüntüsü	36
Şekil 3.2: Enzim aktivite tayininde kullanılan 210 µL hacimli p-NP standart grafiği	37
Şekil 3.3: Enzim aktivite tayininde kullanılan 280 µL hacimli p-NP standart grafiği	37
Şekil 3.4: Amonyum sülfat çöktürme aralığının tespitinde kullanılan grafik	39
Şekil 3.5: Hidrofobik etkileşim kromotografisi kolonundan fungus β -glukosidaz enziminin elüsyon grafiği	40
Şekil 3.6: Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan <i>Aspergillus niger</i> β -glukosidaz enziminin SDS -poliakrilamid jel elektroforozu	42
Şekil 3.7: p-NPG Substratının K_m ve V_{max} değerlerinin bulunmasında kullanılan Lineweaver-Burk grafiği	43
Şekil 3.8: o-NPG Substratının K_m ve V_{max} değerlerinin bulunmasında kullanılan Lineweaver-Burk grafiği	45
Şekil 3.9: Saflaştırılmış fungus beta-glukosidaz enzimi üzerine 39,76 mM p-NPG substratı konsantrasyonunda glukozun % aktivite-[I] grafiği	48
Şekil 3.10: Saflaştırılmış fungus beta-glukosidaz enzimi üzerine 39,76 mM p-NPG substratı konsantrasyonunda glukozun % aktivite-[I] grafiği	50
Şekil 3.11: Fungus β -glukosidaz enzimine, pNPG substratı varlığında, δ -glukonolakton inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği	52
Şekil 3.12: Fungus β -glukosidaz enzimine, pNPG substratı varlığında, glukoz inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği	55
Şekil 3.13: <i>Aspergillus niger</i> β -glukosidaz enzimine ait optimum sıcaklık grafiği	58
Şekil 3.14: <i>Aspergillus niger</i> β -glukosidaz enzimine ait optimum pH grafiği	59

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1: Selülaz üreten organizmalar (Coughlan, 1985)	8
Tablo 3.1: Amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesinde kullanılan çözelti hacimleri, kullanılan tuz miktarı ve tespit edilen değerler.....	38
Tablo 3.2: <i>Aspergillus niger</i> ' in saflaştırma tablosu	41
Tablo 3.3: Fungus Beta-glukosidaz enziminin pNPG substratı kullanılarak, K_m ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri.....	44
Tablo 3.4: Fungus Beta-glukosidaz enziminin oNPG substratı kullanılarak, K_m ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri.....	46
Tablo 3.5: Fungus β -glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etki gösteren δ -glukonolakton maddesinin IC_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar.....	49
Tablo 3.6: Fungus β -glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etki gösteren glukoz maddesinin IC_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar	51
Tablo 3.7: Fungus beta-glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren δ -glukonolaktonun K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	54
Tablo 3.8: Fungus beta-glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren glukozun K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	56
Tablo 3.9: Ağır metallerin <i>Aspergillus niger</i> β -glukosidaz enzimi üzerine relative aktivitesini gösteren tablo.....	57

SEMBOL LİSTESİ

MEA	:	Malt ekstrakt agar
CZA	:	Czapeck-dox agar
CYA	:	Czapeck-dox yeast agar
DRBC	:	Dikloranfenikol rose bengal agar
<i>p</i>-NPG	:	4-Nitrofenil β -D-glukopiranosid
<i>o</i>-NPG	:	2-Nitrofenil β -D-glukopiranosid
<i>p</i>-NP	:	4-Nitrofenol
Na-Ac	:	Sodyum Asetat
EU	:	Enzim Ünitesi
SDS	:	Sodyum Dodesil Sülfat
PAGE	:	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TEMED	:	N,N,N', N', -tetrametiletildiamin
BSA	:	Bovin Serum Albumin (Sığır Serum Albumini)
[S]	:	Substrat Konsantrasyonu
K_M	:	Michaelis-Menten Sabiti
V_{max}	:	Maksimum Hız
mM	:	Milimolar
μL	:	Mikrolitre

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimimde bana her zaman destek olan, insanlara yaklaşımı ve bilimsel yönleriyle hayatımı aydınlatan, çok kıymetli danışman hocam sayın Doç. Dr. Tülin AŞKUN' a teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarımın her evresinde bilgilerini ve desteklerini benden esirgemeyen sayın eş danışmanım Yrd. Doç. Dr. Hatibe KARA' ya teşekkür ederim.

Hayatım boyunca maddi, manevi her türlü yardımı ve desteği esirgemeyen anneme, babama ve kardeşime teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

Enzimler aktivasyon enerjisini düşürerek kimyasal reaksiyonları katalizleyen ve hızlandıran doğal katalizörlerdir. Biyolojik katalizörler olarak da bilinen enzimler, makromoleküllerin yıkıldığı, kimyasal enerjinin depolandığı ve şeklinin değiştirildiği, basit makromoleküllerin yapıldığı, metabolik yollarda yüzlerce reaksiyon basamağını katalize ederler. Yüksek substrat özgülüğü göstermeleri, kimyasal ve biyoteknolojik işlemler sırasında daha az yan ürün oluşturmaları ve düşük reaksiyon şartları altında bile çalışabilir olmaları enzimlerin avantajlarıdır (Seiboth vd., 2011). Teknolojinin ilerlemesiyle endüstride enzim kullanımı giderek artmakta ve meydana gelen çevre kirliliğini engellemek için de bir ihtiyaç haline gelmiştir. Bu sebepten dolayı farklı birçok materyalden enzim saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmaları gün geçtikçe artmaktadır.

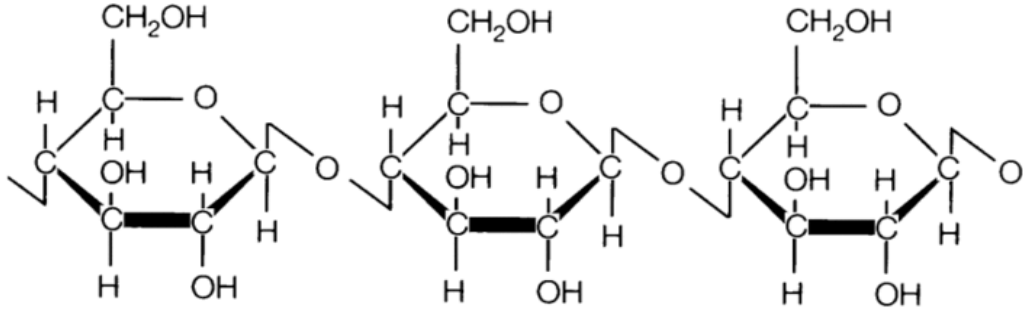
Selülozlar, hidrolazlar sınıfına ait bir enzim kompleksidir. Bu enzim kompleksi 3 ayrı enzimi içermektedir: Endo $\beta(1,4)$ glukanaaz (E.C. 3.2.1.73), glukana zincirleri arasındaki çapraz bağları kırar; Ekzoglukanaaz (E.C. 3.2.1.91) , glukana zincirlerini hidrolize ederek sellobiyozun serbest kalmasını sağlar; β -glukozidaz (E.C. 3.2.1.21), sellobiyozu glukozla çevirir (Wen vd., 2005). Bu sayede selüloz enzim kompleksi 3 aşamada selülozlu glukozla kadar parçalayabilir. Selülozların keşfi 1980'li yıllara dayanır ve günümüze kadar birçok endüstriyel alanda kullanılmıştır. Örneğin; hayvan yemlerinde, gıda uygulamalarında, tekstil ve kağıt endüstrisi gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Bhat, 2000).

Bu çalışmanın amacı, ağaç kabuğundan izole edilen filamentöz fungus *Aspergillus niger*' den biyoteknolojik öneme sahip β -glukozidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonudur.

1.1 Selülozun Yapısı ve Özellikleri

Selüloz glukozun β -1,4-glikozidik bağlarla birlikte bağlı olduğu doğrusal bir polimerdir . Bu molekülün fibrilli ve sert bir yapısı vardır ve suda çözünmeyen bir

moleküldür. Bitkilerin özellikle sap, dal, gövde ve tüm odunsu kısımlarında bulunur. Selüloz odunun büyük bir kısmını, pamuğun da tamamını oluşturur. Selüloz molekülü doğrusal ve dallanmamış bir yapıya sahiptir. Birkaç selüloz zincirinin yan yana uzamasıyla zincirler zincir içindeki hidrojen bağlarıyla sabitlenen yapı düzgün, durağan ve sağlam bir supramoleküler lif oluşturur (Nelson, 2004).



Şekil 1.1: Selülozun yapısı (Van ve Block, 2010)

Selüloz doğada bol bulunur ve bitkilerin yapısal elemanıdır. Aynı zamanda son zamanlarda yenilenebilir enerji kaynağı olmaya adaydır. Bu biyomolekül, yüzyıllar boyunca insanlar tarafından farklı amaçlar için kullanılmaktadır. Bu polimeri kullanışlı yapan özelliği ise glukoza kadar parçalanabilir olmasıdır. Selülozun hidrolizi biyoetanol oluşumu için gerekli olan glukozun üretimini sağlar. Bu sayede biyoyakıt üretimini sağlayacak gerekli hammadde açığa çıkmış olur. Bu yüzden pahalı olmayan selüloz kaynağı ve atıklarının etkili bir şekilde hidrolizi ve işlenmesi ile ilgili yeni yöntemler geliştirilmesi günümüzde ekonomik açıdan oldukça önemlidir (Bhat, 2000).

1.2 Selülazların Yapısal Özellikleri

Selülazlarla ilgili çalışmalar 1950'li yılların başına dayanmaktadır. Lignoselülozu, dünyada bol bulunan ve yenilenebilir enerji kaynağı olan, glukoza ve diğer çözülebilir şekerlere parçalayabilme potansiyeli yüksektir. Basit ve uygulamalı

araştırmalar 1970' lerde başlamıştır. Fakat lignoselülozun glukoza parçalayabilmek o zaman için zordur ve ekonomik değildir. Selülozlar üzerindeki araştırmalar devam ettikçe biyoteknolojik değeri endüstride önem kazanmıştır. İlk olarak selülozlar hayvan yemleri endüstrisinde kullanılmaya başlanmış ve bunu çamaşır, tekstil, şarap, bira ve kağıt endüstri takip etmiştir. Ticari olarak satılması planlanan bu enzimlerin %75'ini hidrolazlar ve karbohidrolazlar oluşturmaktadır. Bugün dünyada büyük öneme sahip olan bu enzimlerin %20' si *Trichoderma* ve *Aspergillus*' tan elde edilmektedir (Bhat, 2000). Selülozlar hidrolaz sınıfına aittir ve enzim kompleksi olarak bilinmektedir. Üç ana enzimden oluşur:

a) Endo β (1,4) glukanaaz (E.C. 3.2.1.73): Glukan zincirleri arasındaki çapraz bağları kırar.

b) Ekzogluksanaaz (E.C. 3.2.1.91): Glukan zincirlerini hidrolize ederek sellobiyozun serbest kalmasını sağlar.

c) β -glukoziğaz (E.C. 3.2.1.21): Sellobiyozu glukoza çevirir.

Fungal ve bakteriyal selülozlar yapısal ve fonksiyonel olarak iki domain içermektedir: katalitik domain (CD) ve selüloz bağlayıcı domain (CBD). CBD genellikle aerobik organizmaların kompleks olmayan sistemlerinin enzimlerini düzenler. CBD, enzimin bir kanca gibi selüloz yüzeyine tutunmasını sağlar. Bu, katalitik domainin selüloza bağlanma ihtiyacını azaltır. Böylece enzimin verimi artmış olur. Fungal CBD' lerin selüloz liflerine penetre olduklarına, yapıyı bozduğuna ve katalitik aktiviteye sahip olduklarına dair herhangi bir kanıt bulunamamıştır (Sandgren, 2003).

CD ise selülozom biriminden sorumlu dockerin domainine dahildir ve anaerobik organizmaların kompleks sistemlerinin enzimlerini düzenler (Ohmiya vd., 1997). İlk çözümlenen katalitik domain yapısı *Trichoderma reesi*' den elde edilen ekzosellobiyohidrolaz II (CBHII)' dir. Bu yapı merkezde α/β ' lardan oluşmuş varil yapı içerir. Bu varil 5 α -heliks ve 7 β -ipliğinden oluşmaktadır. Aktif bölge, tünel şeklinde uzayan iki düğümle çevrelenmiştir. Tünel şeklindeki bu bölge indirgen olmayan uçlardan selüloz zincirini hidrolize eder. CBHI, 4 kısa α -heliks ve 15 antiparalel β -ipliğinden oluşmaktadır. Aktif bölge tüneli CBHII' dekinden iki kat daha uzundur. CBHI selüloz zincirini indirgeyici uçlardan ayırır (Tomme vd., 1995).

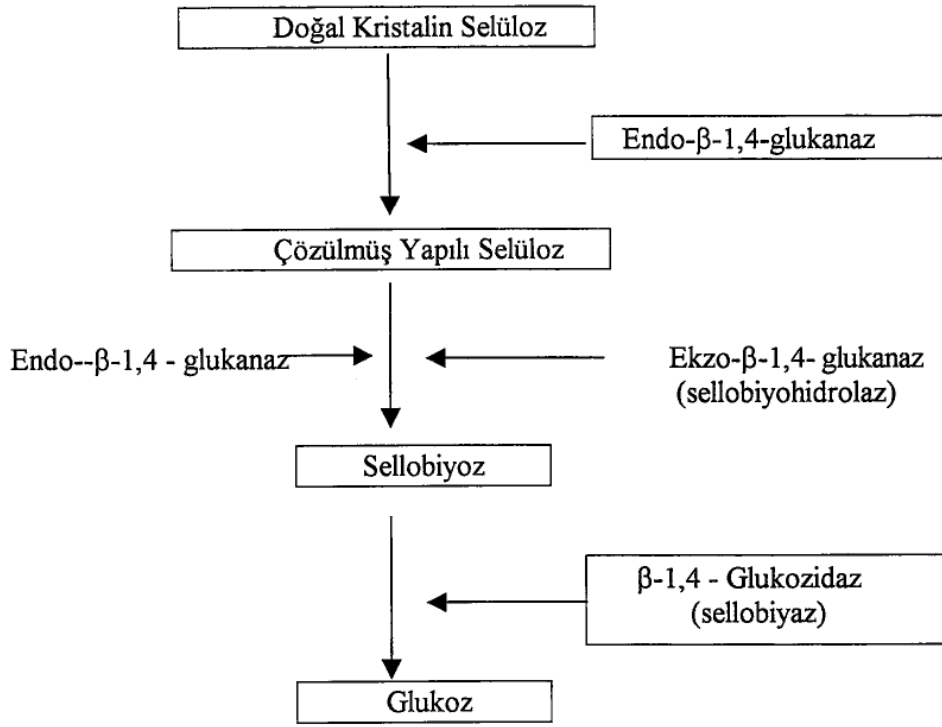
1.3 Selülazların Sınıflandırılması

Selülazları da içeren gliozil hidrolazlar amino asit dizilişinin benzerlik göstermesine dayanarak 115 aile içinde sınıflandırılmıştır (Zhang vd., 2013) . Selülazların katalitik birimlerinin toplam protein oranı % 70'den daha fazladır. Dizi analizine dayanarak yapılan domain analizleri selülazlar arasında önemli farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur. Buna rağmen, katalitik bölgelerin hidrofobik Cluster analizlerini kullanarak, selülazlar ve hemiselülazlar yapısal olarak ilişkili on bir aileye ayrılmıştır (Henrissat, 1989).

İlk sınıflandırmaya göre Aile A, B, F, H ve K bakteriyel ve fungal enzimleri içermekte, Aile E bakteriyel ve bitki enzimlerini, Aile C ise sadece fungal enzimleri, D, G, I ve J de sadece bakteriyel enzimleri içermektedir. Her bir ailenin üyeleri aynı protein katlanmasına sahiptir ve aynı genel hidroliz mekanizmasını paylaşan bir stereo seçimlilik gösterir. Oysa ki, 301 glikozil hidrolazın amino asit sıraları karşılaştırıldığında bu enzimler 35 ailede gruplandırılmıştır. Son zamanlarda ise 482 glikozil hidrolazın amino asit sırasını kullanarak bu enzimler 45 ailede sınıflandırılmıştır. Son gruplamaya göre on bir selülaz ailesi (A-K) 5–12, 26, 44 ve 45. glikozil hidrolaz ailelerine sırayla uymaktadır. Bu yüzden selülazların altında sınıflandırılması eğer bir aile üyesinin yapısı biliniyorsa, aynı ailedeki enzimlerin üç boyutlu yapılarının tahmin edilmesine yardımcı olabilir (Bhat ve Bhat, 1997).

1.4 Selülazların Genel Reaksiyon Mekanizmaları

Doğada, selüloz selülaz enzim kompleksinin sinerjistik çalışmasıyla hidrolize olur. Selülaz enzim kompleksi üç farklı enzimden oluşur. Bunlar: Endo $\beta(1,4)$ glukanaaz (E.C. 3.2.1.73), glukana zincirleri arasındaki çapraz bağları kırar; Ekzoglukanaaz (E.C. 3.2.1.91) , glukana zincirlerini hidrolize ederek sellobiyozun serbest kalmasını sağlar; β -glukozidaz (E.C. 3.2.1.21), sellobiyozu glukozu çevirir. Selülazlar endüstriyel açıdan büyük öneme sahiptir (Zhang ve Zhang, 2013).



Şekil 1.2: Selülozun enzimli hidrolizi (Ayşe TURAN, 2011)

1.5 Selülaz Aktivite Tayin Yöntemleri

Çoğu enzim tahlil yöntemi bir enzim için ve çözünebilir substratlarla yapılır. Ama selülaz bir enzim kompleksidir ve çözünemeyen polimer olan selülozu parçalar (Mandels vd, 1976). Bu yüzden selülaz aktivite tayini için geliştirilen en iyi yöntem filtre kağıdı yöntemidir (Coughlan, 1985). Filtre kağıdı selüloz içermektedir. Belirlenen optimum sıcaklık ve pH' ta bir saat içinde filter kağıdında oluşan indirgenmiş şekerlerin miktarının ölçülmesiyle aktivite belirlenir (Coughlan, 1985; Jorgensen vd., 2003). İndirgenmiş şekeri ölçmek için DNS kullanımı, glukoz oksidaz (GOD), HPLC kullanımı gibi farklı metodları da vardır (Juturu ve Wu, 2014).

1.5.1 Endoglukanaz Aktivite Tayini

Endoglukanazlar (EG) selüloz zincirleri arasındaki glikozidik bağları hidrolize ederler. EG aktivitesi çözülebilir selüloz türevleri ya da karboksimetil selüloz (KMS) kullanılarak ölçülebilir (Mandels vd., 1976). Mandels vd. tarafından belirlenen bu metotta pH 4.8, 50°C’ de enzimin substratına etki etmesi sonucunda ortaya çıkan indirgenmiş şekerler ölçülür. İndirgenmiş şeker farklı metodlarla da ölçülebilir. Örneğin HPLC (Fujita vd., 2002) ile ya da glukoz oksidaz/peroksidaz reaktif ile (Trinder, 1969) ya da alkali bakırların inorganik oksidant olarak kullanıldığı Somogyi-Nelson metodu gibi renk ölçüm metoduyla ölçülebilir (Mehdi vd., 2010). Bakır iyonları indirgenmiş şekerin aldehit grubundan elektron alarak Cu(I)’ e indirgenir. Daha sonra indirgenmiş Cu(I) iyonları tekrar kromojenik bileşiklerle oksitlenerek Cu(II)’ ye yükseltgenir. İndirgenmiş kromojenik bileşikler kolorimetre cihazında ölçülebilen renkler ortaya çıkarır ve indirgenmiş şeker miktarını belirlemek için hazırlanan standartlarla karşılaştırılır (Nelson,1944; Somogyi, 1952).

1.5.2 Ekzoglukanaz Aktivite Tayini

Ekzoglukanaz, β -1,4 glikozidik bağları kırarak sellobiyozu zincirden serbest bırakır. Avicel (mikrokristalin selüloz da denir), selülozun polimerizasyon derecesinden daha düşük bir dereceye sahip olduğu için ekzoglukanaz aktivitesini ölçmek için kullanılır (Mehdi vd., 2010). Ekzoglukanaz aynı zamanda *p*-nitrofenil- β -d-sellobiyozidin aglikonik bağlara etki ederek onu sellobiyoz ve *p*-nitrofenile ayırır (Deshpande vd., 1984). Diğer daha az kullanılan substratları ise; PNP-*p*-d-sellobiyozid (Kohring vd.,1990), bakteriyal mikrokristal seluloz (BMKS) (Caspi vd.,2008), ve MU- β -d-sellobiyozid (MU-C) (Courty vd.,2005).

1.5.3 β -Glukozidaz Aktivite Tayini

β -glukozidaz aktivite tayini, *p*-nitrofenil- β -D-glukozid' ten serbest kalan *p*-nitrofenol' ün ölçülmesiyle belirlenir. Ayrıca selülaz hidrolizinden sonra ortaya çıkan indirgenmiş şekerlerin ölçülmesinde kullanılan en popüler iki yöntem DNS (dinitrosalisiklat) ve Nelson-Somogyi metodlarıdır. (Coughlan., 1985; Miller, 1959; Nelson, 1952). 4-metillumbelliferil- β -D-glukopiranozid ve β -naftil- β -D-glukopiranozid' te enzimin substratlarıdır.

1.6 Selülazların Bulunduğu Organizmalar

Selülitik mikroorganizmalar birincil karbonhidrat parçalayıcısıdır ve genellikle enerji kaynağı olarak yağ ve proteinleri kullanamazlar. Birçok anaerobik mikroorganizma selüloz parçalayabilmede yetersizken, *Cellulomonas* ve *Cytophaga* gibi bakteriler ve birçok fungus türü selüloz da dahil birçok karbonhidratı parçalayabilme yeteneğine sahiptir. Selülaz enzimlerinin en çok çalışıldığı tür *Trichoderma reesei*' dir. Diğer çok çalışılan fungus türleri: *Humicola*, *Penicillium*; *Aspergillus*; bakteriler: *Pseudomonas*, *Cellulomonas*, *Bacilli*; actinomycetes: *Streptomyces*, *Actinomucor*' dur. Birkaç farklı fungus selülozu enerji kaynağı olarak kullanabilirken, sadece birkaçı onu selülozu glukoza kadar parçalayabilir (Sukumaran vd., 2005).

Genel olarak selülitik funguslar çok miktarda selülaz üretirler. Mantarlar bu enzimi bitki hücrelerinin duvarını parçalamak için kullanırlar (Wallace, 1994). Örneğin, *Aspergillus terreus* selülaz üreten yaygın bir toprak fungusudur (Workman ve Day, 1982). *Aspergillus niger* ve *Aspergillus phoenicis* selülozu birincil karbon kaynağı olarak kullanırlar. Bu yüzden her ikisi de iyi birer selülaz üreticisidir (Wen vd., 2005). Filamentöz fungus *Trichoderma reesei* selülaz ve hemiselülaz üretiminde bugün bir paradigim haline gelmiştir. Birçok araştırmacı tarafından çok çalışılmıştır (Seiboth vd., 2011). *Aspergillus japonicus*, *Penicillium verruculosum*, *Penicillium funiculosum* da selülaz enzim üretebilirliği araştırılmış türlerdir (Ramani vd., 2012; Korotkova vd., 2008).

Tablo 1.1: Selülaz üreten organizmalar (Coughlan, 1985)

Grup	Organizma	Organizma
Bakteri	<i>Acetivibrio cellulolyticus</i>	<i>Myceliophthora thermophila</i>
	<i>Bacteroides cellulosolvens</i>	<i>Pellicularia filamentosa</i>
	<i>Cellulomonas spp.</i>	<i>Penicillium citrinum</i>
	<i>Cellvibrio fulvus</i>	<i>Penicillium funiculosum</i>
	<i>Cellvibrio vulgaris</i>	<i>Penicillium irensis</i>
	<i>Clostridium thermocellulaseum</i>	<i>Penicillium janthinellum</i>
	<i>Clostridium thermocellum</i>	<i>Penicillium variabile</i>
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Polyporus adustus</i>
	<i>Ruminococcus albus</i>	<i>Polyporus tulipiferae</i>
Actino- mycetes		<i>Polyporus versicolor</i>
	<i>Streptomyces griseus</i>	<i>Poria spp.</i>
	<i>Thermoactinomyces spp.</i>	<i>Sporotrichum cellulophilum</i>
	<i>Thermomonospora curvata</i>	<i>Sporotrichum dimorphosporum</i>
	<i>Thermomonospora fusca</i>	<i>Sporotrichum pulverulentum</i>
Fungi		<i>Sporotrichum pruinosum</i>
		<i>Sporotrichum thermophile</i>
	<i>Agaricus bisporus</i>	<i>Talaromyces emersonii</i>
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Thermoascus aurantiacus</i>
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Thielavia terrestris</i>
	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Tranetes sanguine</i>
	<i>Botryodiplodia theobromae</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>
	<i>Chaetomium thermophilum</i>	<i>Trichoderma koningii</i>
	<i>Eupenicillium javenicum</i>	<i>Trichoderma lignorum</i>
	<i>Fusarium solani</i>	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
	<i>Humicola insolens</i>	<i>Trichoderma reesei</i>
	<i>Macrophomina phaseolina</i>	<i>Trichoderma pseudo-koningii</i>
	<i>Myrothecium verrucaria</i>	<i>Trichosporon cutaneum</i>
		<i>Trichosporon pullulans</i>

1.7 Selülazların Kullanım Alanları

Selülazlar üzerinde yapılan çalışmalar biyoteknolojik önemi arttırmıştır. Birçok endüstri alanında kullanılmaktadır: gıda, hayvan yemi, maya ve şarap, tarım, kağıt ve kağıt hamuru, tekstil ve çamaşır endüstrisi. Kağıt endüstrisi son zamanlarda popüler hale gelmiştir (Kuhad vd., 2011).

1.7.1 Kağıt ve Kağıt Hamuru Endüstrisinde Selülazlar

- Tahta ham materyalleri kağıt hamuru haline getirmek için uygulanan mekanik işlemler çok fazla enerji harcanmasına neden olur. Biyo-mekanik işlemlerin uygulanması ise hem enerji tasarrufu sağlar hem de kağı kalitesini artırır (Akhtar, 1994; Leatham vd., 1990; Bhat, 2000).
- Hemiselülazların kağıt hamurlarındaki hemiselülozları hidrolizi ambalaj hamurlarındaki ligninin çıkartılabilirliğini arttırır bu da hamurun beyazlamasını sağlar. Böylece beyazlatmak için kullanılan klor ihtiyacını azaltır (Bhat, 2000).
- Selülaz ve hemiselülazların birlikte kullanılması lif özelliklerini geliştirir böylece kağıt makinalarının drenajı, öğütebilirliği ve performansı artar (Noe vd., 1986; Pommier vd., 1989, 1990; Bhat, 2000).
- Biyolojik olarak parçalanabilen karton, havlu kağıt, peçete üretimi sağlar (Kuhad vd., 2011).

1.7.2 Gıda Endüstrisinde Selülazlar

- Meyve ve sebze sularının ekstraksiyonu ve berraklaştırılması için kullanılırlar (Galante vd., 1998b; Grassin ve Fauquembergue, 1996a; Bhat, 2000)
- Meyve ve sebze sularının viskozitesini azaltır ve filtre edilebilirliğini arttırır (Bhat, 2000).
- Zeytin yağı elde etmek için zeytinler büyük bir taşın altında ya da çekiçli değirmende ezilir ve yüksek hızda santrifüjle yağ iyileştirilir. Bu yöntemle 100 kg zeytinden yaklaşık 16-20 kilo yağ elde edilir. Bu işlemler soğuk koşullar altında yapılır, bu da zeytinin aroma kaybetmesine ve zeytin yağının

yüksek asit oranına sahip olmasına neden olur (Galante vd., 1998b; Bhat, 2000). Enzimlerin kullanılması 100kg zeytinde kilo başına düşen yağ miktarını 2 kg kadar arttırır. Yağdaki E vitamini ve anti-oksidan değerlerini arttırır (Galante vd., 1998b; Bhat, 2000).

- Hemiselülazlar, özellikle endo-ksilanazlar unlu mamüllerin (ekmek, bisküvi, kek, hamur vb.) kalitesini arttırır. Bunun yanı sıra ksilanazlar hamur yoğrulması sırasında insan sağlığı için yararlı olduğu bilinen arabino ksilo-oligosakkaritlerin konsantrasyonunu arttırır (Poutanen, 1997; Bhat, 2000).
- Narenciye meyvelerinin acılığının kontrol edilmesini sağlar (Baker ve Wicker, 1996; Youn vd., 2004; Rai vd., 2007).
- Meyve ve sebze sularının tatlarını, aromalarını geliştirir (Kuhad ve ark., 2011; Singh vd., 2007; Bhat, 2000; Humpf ve Schireier, 1991; Marlatt vd., 1992).

1.7.3 Bira Endüstrisinde Selülazlar

- Bira yapımında önemli faktörler maltlama, fermentasyondur. Maltlama arpa tohumunun çimlenmesine bağlıdır. Çimlenme sırasında α - ve β -amilazlar, karbosipeptidazlar ve β -glukanazların biyosentezi gerçekleşir.
- Bu enzimler optimum koşullar altında iyi bir malt oluşturmak için sinerjistik biçimde çalışır. Yine de bira yapımı maltlanmamış ya da düşük kaliteli arpa, hasatın az olması ya da farklı ekim yöntemlerine bağlı olarak kötü sonuçlanabilir. Bunlar da malt filtrasyonun zayıf olmasına ve verimin düşmesine neden olur.
- Bu problemlerin üstesinden gelmek için mikrobiyal β -glukanazlar kullanılır. Böylece maltın viskozitesi azalır ve fermentasyon kalitesi artar.
- Bu β -glukanazlar genellikle *Penicillium emersonii*, *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis* ve *Trichoderma reesei*' den elde edilir(Galante vd., 1998b; Bhat, 2000).
- Bu organizmalardan elde edilen β -glukanazlar karşılaştırıldığında en iyi performansı *Trichoderma*' dan elde edilen enzim göstermiştir (Bhat, 2000).

- Her ne kadar en iyi çalışan enzim *Trichoderma*' dan elde edilen olsa da her birinden oluşan ürünün kalitesi aynıdır (Canales vd., 1988; Galante vd., 1998b; Bhat, 2000)
- Yapılan birçok çalışmaya göre β -glukanazlar düşük kaliteli arpadan yüksek kaliteli bira üretmek için en iyi yöntemdir (Galante vd., 1998b; Bhat, 2000).

1.7.4 Şarap Endüstrisinde Selülazlar

- Bu, maya hücrelerinin ve enzimlerin anahtar rol oynadıkları biyoteknolojik bir süreçtir.
- Yıllardır maya hücrelerinin üzümü daha iyi fermente edebilmesi ile ilgili çalışmalar yapıldığı gibi enzimlerinde şarap yapım sürecindeki işlevleri araştırılmıştır.
- Şarap yapımında önemli olan üç temel enzim vardır: Hemiselülaz, pektinaz, β -glukanaz (Galante vd., 1998b; Bhat, 2000).
- Üzümlerin daha iyi renk vermesini, daha berrak görünmesini ve kolay filtrasyon sağlar.
- Şarabın kalitesini artırır (Galante vd., 1998b; Bhat, 2000).
- Zamanla dördüncü bir enzim, β -glukozidaz, da şarabın aromasını arttırmasından dolayı şarap endüstrisinde yerini almıştır (Caldini vd., 1994; Gunata vd., 1990; Bhat, 2000).

1.7.5 Tekstil Endüstrisinde Selülazlar

- Tekstil atölyelerinde mavi iplikler kolalanır kot fabrikalarında sıkıca dokunurdu böylece kotlar sağlam ve uzun süre dayanıklı hale gelirdi. Fakat bu işlemlerden sonra kot kumaşı sert ve rahatsız edici bir yapı kazanırdı. Beyazlatılmış, eskitilmiş görünümlü kot pantolonlar moda olunca kot pantolonların bu görünümü kazanması için yeni bir yöntem ortaya çıktı. Bu yöntemin prensibi, yaklaşık 1-2 kg küçük ponza taşlarının bir cihazdan yüksek basınçla 1 saat boyunca pantolon üzerine püskürtülmesidir. Bu yönteme “ Stone-wash” yani “taşlama” denilmektedir. Böylece pantolonlara

esktilmiş başka bir deyişle “ taşlanmış” bir görüntü kazandırıldı. Fakat bu yöntemde kullanılan taşların pahalı olması, güvenli olmayan çalışma koşulları, çevre kirliliği ve tedavisi olmayan hastalıklar gibi birçok olumsuz koşullara neden oldu. Teknolojinin ilerlemesiyle taşlama yöntemine alternatif olarak “bio-stoning” yani “biyo-taşlama” yöntemi geliştirildi. Bu yöntemde ponza taşları yerine selülazlar kullanılmaktadır. Selülazlar %100 pamuk içerikli olan kot kumaş ipliklerine etki ederek mavi rengin açılmasını sağlamaktadır. Böylece kot taşlanmış görüntüsü kazanırken, daha az enerji harcanmış olur. Ayrıca çevre sorunları azaltılarak daha güvenli çalışma koşulları sağlanır (Galante vd., 1998b; Bhat, 2000).

- Tekstilde kullanılan hemen her kumaş selülozik içeriklidir. Tekstildeki sorunlardan biri de kumaşın havlanması, tüylenmesidir. Bu özellik selülozik kumaşların negatif yönü olarak değerlendirilir. Selülazların kullanıldığı “ bio-polishing” denilen bir prosesle bu problemler giderilmektedir (Galante vd., 1998b; Bhat, 2000).
- Bio-polishing, temizleme, boyama, ağartma ve parlatma işlemlerini içeren genellikle işlemin ıslak aşamasında gerçekleştirilen bir prostedir. Bu işlem süresince selülazlar, mekanik hareketin söktüğü, kumaş yüzeyinde çıkıntı yapan küçük lif uçlarına etki eder ve kumaşı parlatır. Bu yöntem sayesinde kumaştaki tüylenme ve kabarmalar gidilir. Kumaş daha pürüzsüz bir görünüm kazanır. Kumaşın renk parlaklığı artar. Çevreye zarar vermez. Aslında bio-polishing tekstil endüstrisinde kaliteli giyecekler üretmek için anahtar basamaktır (Bhat, 2000).

1.7.6 Tarım Alanında Selülazlar

- *Trichoderma harzianum*’ dan elde edilen β -1,3-glukanazlar bitki patojeni olan *Botrytis cinerea*’ nın çimlenmesini ve çimlenme túbünün uzamasını engeller (Lorito vd., 1994; Bhat,2000). Bunun gibi *Rhizoctonia solani* ve *Fusarium sp* gibi birçok bitki patojenlerinin üremesini engeller. Böylece bitkilerde hastalık kontrolünü sağlar (Benizet vd., 1998; Bhat, 2000).
- *Trichoderma* ve *Penicillium* tarafından üretilen selülazlar bitki ve fungus protoplastlarının üretimi için kullanılır. Bu protoplastlar istenilen özelliklere

sahip hibrid ya da mutant türler üretmek için bir araya getirilebilir. Ayrıca selülozlar ve ilgili enzimler yüksek seviyede ticari enzim üretebilen yeni türlerin üretilmesinde kullanılabilir (Beguin ve Aubert, 1994; Bhat ve Bhat, 1997; Brown vd., 1986; Bhat, 2000).

- *Trichoderma sp.*, *Geocladium sp.*, *Chaetomium sp.* ve *Penicillium sp.* gibi birçok fungusun tohum çimlenmesini, bitki büyümesini, çiçeklenmesini ve kök sistemlerini geliştirdiği belirtilmiştir (Bailey ve Lumsden, 1998; Harman ve Björkman, 1998; Harman ve Kubicek, 1998; Kuhad vd., 2011).
- Selülitik funguslar *Aspergillus*, *Trichoderma* ve *Chaetomium* ile yapılan çalışmalarda, selülozların toprağa uygulanması ile topraktaki mineral miktarının arttığı, aynı zamanda selüloz dekompozisyonunu hızlandırdığı gösterilmiştir. Böylece toprağın kalitesi artmış ve suni gübreye olan ihtiyaç azalmıştır. (Bowen ve Harper, 1990; Tiwari vd., 1987; Fontain vd., 2004; Ortiz ve Hue, 2008; Tejada vd., 2008; Kuhad vd., 2011).

1.8 *Aspergillus niger* Küfünün Özellikleri

Aspergillus ismi 1729' da, Michelli tarafından verilmiştir. Mikroskopta spor yapılarını incelerken bu yapıları katolik kiliselerinde rahiplerin ayin boyunca kutsal suyu saçtıkları “*asperges*” denilen araca benzetmiştir. Bu yüzden bu mikroorganizmaya *Aspergillus* adını vermiştir (Benett, 2010). *Aspergillus niger* endüstrilerin ve bilimsel araştırmaların en önemli konularından biridir. 1919' da keşfedilen sitirik asit üretme yeteneği endüstride önem kazanmasına neden olmuştur. Bunun yanı sıra çok fazla ekonomik önemi olmayan glukonik ve fumarik asiti de üretir. 1960' larda değerli sayılan endüstrinin göz bebeği enzimlerin kaynağı olduğu keşfedilmiş ve bu enzimlerden teknik olarak gıda ve fırıncılık endüstrisinde yararlanılmaya başlanılmıştır. Aynı zamanda gen teknolojisi de *A. niger*' i gen ekspresyon çalışmalarında yabancı proteinler üretmek için kullanmıştır (Schuster vd., 2002).

Birçok siyah renkli *Aspergilli* dünyada her yerden izole edilebilir. *A. niger* organik materyaller üzerinde aerobik olarak yaşayabilen filamentöz bir fungustur. Doğada toprakta, çöpte, ölü bitki artıklarında bulunur. *A. niger* geniş sıcaklık aralıklarında (6-47 °C) gelişebilir. Optimum sıcaklığı da yüksektir (35-37°C).

Büyümesi için gerekli olan su aktivitesi 0.88 a_w ' dir. Diğer *Aspergillus* türlerine göre yüksek bir değerdir. Gelişme gösterebildiği pH aralığı da oldukça geniştir. pH 1.4-9.8 arasında gelişme gösterebilir. Bu yetenekleri ve konidioforlarının hava yoluyla dağılabilmesi sayesinde türleri hemen her yerde üreyebilir (Rippel-Baldes, 1995; Schuster vd., 2002).

Aspergillus cinslerinin sayısız kimyasal maddeler üretebilmesinden dolayı onlara “ mikrobiyal fabrikalar” da denmektedir. *Aspergillus niger*' i endüstriyel açıdan önemli hale getiren olay, fermentasyonla sitrik asit üretmesidir. Sitrik asit, asit düzenleyici olarak gıda, kozmetik ve ilaç endüstrisinde de kullanılmaktadır (Benett, 2010; Schuster vd., 2002). İlaç endüstrisinde, demir ve sitrik asit kaynağı olan demir sitrat kan saklamak için koruyucu olarak kullanılır. *Aspergillus niger* aynı zamanda birçok değerli enzim de üretir: Pektinaz, pektin esteraz, endo- ve ekzo-poligalakturonidaz, pektin liyaz, selülaz, hemiselülaz, proteaz, amiloglukozidaz gibi (Frost ve Moss, 1987; Schuster, 2002). Amiloglukozidaz glukoz şurubu ve alkol endüstrisinde kullanılmaktadır. Pektin esteraz, endo- ve ekzo- poligalakturonidaz, pektin liyaz şarap ve meyve suyu endüstrisinde viskoziteyi azaltmak ve berraklığı arttırmak için kullanılmaktadır (Grassin and Fauguenbergue, 1999). Hemiselülaz fırıncılıkta hamur karıştırma sırasında eklenir. Hamurun daha iyi kabarmasını sağlar (Schuster, 2002).

1.9 Bu Çalışmanın Amacı

Endüstride kullanılan hammaddelerin pahalı olması, yenilenebilir olmaması ve çevreye zarar vermesi bilim insanlarının yeni hammadde arayışlarının nedenlerini oluşturmaktadır. Teknolojinin ilerlemesiyle enzimler –özellikle mikrobiyal enzimler- endüstrilerde kullanılmaya başlanmıştır. Örneğin deterjan endüstrisinde kan, yumurta gibi protein içerikli lekelerin çamaşırdan çıkmasında proteazlar kullanılır. Fermentasyonla oluşan enzimler süt ürünlerinin üretiminde, bira ve şarap yapımında, fırıncılıkta kullanılır. Son zamanlarda önem kazanan selülazlar ise daha çok kağıt sanayinde, tekstil, tarım, gıda sanayinde kullanılır ve yakın gelecekte biyoyakıt oluşumunda kullanılması düşünülmektedir (Bhat., 2000).

Dünya üzerindeki enerji kaynaklarının azalmaya başlaması, fosil yakıtların neden olduğu kirliliklerin artması ve küresel ısınma sorunun giderek büyümesi yenilenebilir enerji kaynaklarının önemini arttırmış ve bilim adamlarının yeni enerji kaynakları araştırmasının nedeni olmuştur. Yapılan araştırmalar sonucunda yeni enerji kaynağı olarak biyoetanol bulunmuştur. Biyoetanol biyoyakıtın hammaddesi ve biyodönüşümle oluşan sıvı bir maddedir. Biyoetanolün oluşması glukozun fermentasyonu ile gerçekleşmektedir. Glukoz hemen hemen yediğimiz her besinde bulunmaktadır. Fakat biyoetanol için besin kaynaklarının kullanılması dünyadaki besin miktarının azalmasına buna bağlı olarak besin fiyatlarının artışına ve kıtlığa neden olacaktır. Bu yüzden glukozu elde etmek için pahalı olmayan ve bol bulunan selüloz bu çalışmalar için uygun bir hammaddedir. Selülozu glukozu kadar parçalayabilen selülazlar sayesinde bu mümkün görünmektedir (Adıgüzel, 2013).

Bu çalışmanın amacı, ağaç kabuklarından izole edilen *Aspergillus niger*' den selüloz enzim kompleksinin son enzimi olan, selüloz parçalama reaksiyonlarının son basamağını gerçekleştiren β -glukozidaz enziminin hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılması ve karakterizasyonunun yapılmasıdır. Bu enzimin karakterizasyonundan elde edilecek verilerin bundan sonraki çalışmalara temel oluşturacağı düşünülmektedir. Özellikle enzimlerin aktivitelerini daha uzun süre koruyabilmeleri ve tekrar tekrar kullanılabilmesi için immobilizasyon çalışmaları yapılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda selülozun glukozu kadar yıkılmasında immobilize- β -glukozidaz enzimlerinin ve özellikle de funguslardan izole edilen selülazların kullanıldığı göz önüne alındığında elde edilen sonuçların değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. MATERYAL METOD

2.1 Kullanılan Materyaller

2.1.1 Kullanılan Cihazlar

Bu çalışmada aşağıdaki alet ve cihazlardan yararlanılmıştır.

Soğutmalı Santrifüj	Sigma 3K15
Soğutmalı Ultrasantrifüj	Hettich EBA 12R
Multi Santrifüj (Falkon Santrifüjü)	Thermo IEC
pH metre	Hanna HI 2210
UV-Şpektrofotometre (Plaka okuyuculu)	Thermo Type 1510
Gradient Mikser	Atta C-10 Magnetik Karıştırıcı ve Gradient Tüp
Terazi	Sartorius BL 210S
Otomatik Pipetler	Eppendorf
Elektroforez Sistemi	Mini Protean Tetra Cell Bio-Rad
Kromatografi Kolonu	Sigma (1 cm çap ve 15 cm uzunluk)
Derin Dondurucu (-80 °C)	CFC Free
Buzdolabı (-20 °C)	Arçelik
Vorteks	Electromag
Otoklav	Hirayama HV 85
Buz Makinesi	Fiocchetti AF 10
İnkübatör	Nuare CO ₂ -Water Jacket Incubator
Jel Görüntüleme Sistemi	Gel Doc-H Imaging System (UVP)
Manyetik Karıştırıcı	İkamag

Commercial Blender	Waring
Etüv	Termal
Pasteur Fırını	FN 300
Mikroskop	Olympus
Çalkalayıcı İnkübatör	Zhicheng-ZHWY

2.1.2 Fungus İzolasyonu İçin Kullanılan Materyaller

2.1.2.1 Besiyerleri

Besiyeri 1.	Dichloran- Rose-Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC)
Pepton.....	5.0 g
D-Glukoz	10.0 g
Potasyum Dihidrojen Fosfat	1.0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0.5 g
Rose Bengal.....	0.025 g
Kloramfenikol	0.1 g
Dikloran	0.002 g
Agar	15.0 g

Merck 1.004667hazır besiyeri kullanıldı.

Tahıllar, gıdalar ve diğer kaynaklardaki maya ve küflerin izolasyonu ve koloni sayımında kullanılan seçici bir besiyeridir.

Besiyerinden 6,44 g tartılarak 200 ml distile su içinde çözdürüldü ve kaynayıp tamamen çözülene kadar ısıtıldı. 121°C’de 15 dakika otoklavda steril edildi, yaklaşık 45°C’ye kadar soğuması beklenildi, her birinde 13-15 ml olacak

şekilde steril petrilere paylaştırıldı. Hazırlanan ortamın rengi pembe-kırmızıdır ve ortam fungus izolasyonunda kullanılmaktadır.

Besiyeri 2 Malt Extract Agar (MEA)

Malt Extract.....	20.0 g
Pepton.....	1.0 g
D-Glukoz	20.0 g
Agar	20.0 g

Merck 1.05398 hazır besiyeri kullanıldı.

Besiyeri hazırlandıktan sonra kaynatıldı. Stok kültürler hazırlamak için kullanıldığından kaynatma işlemi sonrasında cam tüplere her tüpe 5 ml gelecek şekilde paylaştırıldı. 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edildi ve yatık halde stok kültürlerin saklanması için kullanıldı. Bu ortam küf ve mayaların kültüre alınmasında, sayımında, özellikle *Aspergillus* ve *Penicillium* türlerinin tanımlanmasında ve stok olarak saklanması için kullanılır.

2.1.3 Fungus Tanılaması İçin Kullanılan Besiyerleri

Besiyeri 1 Malt Extract Agar (MEA)

Malt Extract.....	20.0 g
Pepton.....	1.0 g
D-Glukoz	20.0 g
Agar	20.0 g

Merck 1.05398 hazır besiyeri kullanıldı.

Besiyeri hazırlandıktan sonra kaynatıldı. Stok kültürler hazırlamak için kullanıldığından kaynatma işlemi sonrasında cam tüplere her tüpe 5 ml gelecek şekilde paylaştırıldı. 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edildi ve yatık halde stok kültürlerin saklanması için kullanıldı. Bu ortam küf ve mayaların kültüre alınmasında, sayımında, özellikle *Aspergillus* ve *Penicillium* türlerinin tanımlanmasında ve stok olarak saklanması için kullanılır.

Besiyeri 2 Czapeks Dox Agar (CZ)

K ₂ HPO ₄	1.0 g
Czapek Konsantresi	10.0 ml
Sükroz	30.0 g
Agar	15.0 g

Merck 1.05460 hazır besiyeri kullanıldı.

Bu besiyeri *Aspergillus* türlerinin tanılanmasında kullanılmaktadır. (Klich, 2002). Besiyeri tartılarak 200 ml distile suyun içerisinde çözüldürüldü; kaynayana kadar ısıtıldı ve 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edildi. Daha sonra petri başına 12-14 ml gelecek şekilde standart petrilere paylaştırıldı.

Besiyeri 3 Czapek Yeast Extract Agar

K ₂ HPO ₄	1.0 g
Czapek Konsantresi	10.0 ml
Yeast Extract	5.0 g
Sükroz	30.0 g
Agar	15.0 g

Yeast extract, 200 ml czapeck dox agar için 0,50 gr tartıldı. Merck 1.13116 hazır besiyeri kullanıldı.

Bu besiyeri *Aspergillus* ve *Penicillium* genuslarının tür tayininde kullanılmaktadır. Besiyeri uygun oranda tartıldı ve 200 ml distile su eklenerek karıştırıldı. Ortam kaynayana kadar ısıtılıp karıştırıldıktan sonra 121°C’de 15 dakika otoklavda steril edildi. Daha sonra steril petrilere paylaştırıldı.

Her üç besiyeri de ayrı ayrı hazırlandıktan sonra üç nokta ekimi yapıldı ve 27°C derecedeki etüve kondu. İki hafta boyunca hergün mikroskopik incelemeler yapıldı.

2.1.4 Plastik, Cam ve Diğer Malzemeler

Çalışmamızın bu aşamasında cam deney tüpleri, cam bagetler, cam petripler, steril plastik petripler, farklı ölçülerde erlen ve beherler, balon joje, pamuk, alüminyum folyo, kaşık, Waring blender kabı, filtre kağıtları, pipetler, pipet uçları, süzgeç dispenser, kreya, eldiven kullanıldı.

2.1.5 Kimyasal Malzemeler

Çalışmamızın bu aşamasında etanol, zefiran, sodyum klorür (NaCl) kullanıldı.

2.1.6 Malzemelerin Sterilizasyonu

Besiyerleri, serum fizyolojik, distile su, süzgeç ve pipet uçları otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildi. Blender kabı, erlenler, kaşık, cam bagetler, cam petripler pastör fırınında 200 °C'de 10 dakika steril edildi.

2.1.7 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

2.1.7.1 İdentifikasyon için Kullanılan Çözeltiler

Laktofenol Çözeltisi:

Fenol	20.0 g.
Laktik asit	20.0 g.
Gliserin	40.0 g.
Distile Su	20. ml.

Tüm bileşenler karıştırılarak elde edildi.

2.1.7.2 Enzimin Saflaştırılmasında Kullanılan Çözeltiler

Enzim aktivitesinin ölçüldüğü ve substrat çözeltisinin hazırlandığı tampon: 50 mM sodyum asetat tamponu (pH 5,5); 6,804 g (0,05 mol) Na-Ac 900 mL distile suda çözüldü. Glacial asetik asit ile pH'sı 5,5'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

Substrat çözeltisi: 5 mM pNPG çözeltisi; 0,0075 g pNPG 5 mL, 50 mM sodyum asetat tamponu içinde vortekste karıştırılarak çözüldü.

Reaksiyon durdurma tamponu: 0,5 M Na_2CO_3 tamponu; 25,5 g Na_2CO_3 son hacim 500 mL olacak şekilde distile suda çözüldü.

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda oluşan pelletin alındığı tampon: 1 M $(NH_4)_2SO_4$ içeren, 50 mM Na_2HPO_4 tamponu (pH 6,8); 132,14 g (1 mol) $(NH_4)_2SO_4$ ve 7,09 g (0,05 mol) Na_2HPO_4 950 mL distile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 6,8'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

Hidrofobik jelin dengelenmesi için kullanılan tampon: 1 M $(NH_4)_2SO_4$ içeren, 50 mM Na_2HPO_4 tamponu (pH 6,8); 132,14 g (1 mol) $(NH_4)_2SO_4$ ve 7,09 g (0,05 mol) Na_2HPO_4 950 mL distile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 6,8'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

Hidrofobik jele bağlanmış β -glukosidaz enziminin elüsyonu için kullanılan tampon: 1 M $(NH_4)_2SO_4$ içeren, 50 mM Na_2HPO_4 tamponu (pH 6,8) ve 50 mM Na_2HPO_4 tamponu (pH 6,8) ile gradient mikser kullanılarak tuz gradienti oluşturuldu; 132,14 g (1 mol) $(NH_4)_2SO_4$ ve 7,09 g (0,05 mol) Na_2HPO_4 950 mL distile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 6,8'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı. 7,09 g (0,05 mol) Na_2HPO_4 950 mL distile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 6,8'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

2.1.7.3 Proteinlerin Kantitatif Tayininde Kullanılan Çözeltiler:

Lowry yöntemi için aşağıdaki çözeltiler hazırlandı.

Çözelti A: 0,1 M NaOH içeren %2'lik Na_2CO_3 çözeltisi; 1 g (0,025 mol) NaOH ve 5 g Na_2CO_3 200 mL distile suda çözüldü ve son hacim 250 mL'ye tamamlandı.

Çözelti B: %1'lik NaK tartarat; 1 g NaK 90 mL distile suda çözüldü ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

Çözelti C: %0.5'lik $CuSO_4$; 0,5 g $CuSO_4$ 90 mL distile suda çözüldü ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

Çözelti D: 48 mL Çözelti A, 1 mL Çözelti B ve 1 mL Çözelti C alınarak hazırlandı.

Çözelti E: Folin fenol ve distile su (1:1 v/v); 2,5 mL folin fenol 2,5 mL distile su ile karıştırılarak hazırlandı.

Sığır Serum Albumini (BSA): 5 mg BSA 5 mL distile suda çözünerek taze olarak hazırlandı.

2.1.7.4 SDS-PAGE Tekniğinde Kullanılan Çözeltiler

SDS-PAGE' de kullanılan tank tamponu;

Tris-HCl	3g
Glisin	14,4g
SDS	1,0g

SDS-PAGE' de kullanılan numune tamponu;

0,5M Tris-HCl (ph 6,8)	2,5mL
%10' luk SDS	4,0mL
Gliserol	2,0mL
β -merkaptoetanol	1,0mL
Bromfenol mavisi	0,01g
Distile su	0,5mL

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi; 0,66 g Coomassie brilliant blue G-250, 120 mL metanolde çözüldü. Bu çözeltiliye 24 mL saf asetik asit ve 120 mL distile su ilave edildi.

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renk açma çözeltisi; Hacimce % 7,5 asetik asit, % 5 metanol ve % 87,5 mL distile su içermektedir. Bu amaçla 75 mL asetik asit ve 50 mL metanol, 875mL distile su ile karıştırıldı.

Ayırma Jeli (%10'luk)	Yığıma Jeli (%3'lük)
1. Akiril amid/Bis 2,08mL	330µL
15 g Akiril amid 0,4 g	
alınarak son hacim distile su ile 50 mL' ye tamamlanır.	
2. Distile su 2,5 mL	1,53 mL
3. 1.5 M tris-Base (pH 8.8) 1,56 mL	-
Tris-Base 18,17 g	
alınarak pH 8.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave	
4. 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) -	630 µL
Tris-HCl 6,05 g	
alınarak pH 6.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave	
edilerek son hacim distile su ile 100 mL' ye tamamlanır.	
5. %10' luk SDS 62.5 µL	25 µl
SDS 1 g	
alınarak son hacim distile su ile 10 mL' ye tamamlanır	
6. TEMED 3.13 µL	2.5 µL
7. %10' luk amonyum persulfat 93.75 µL	50 µL
Amonyum persulfat 1 g	
alınarak son hacim distile su ile 10 mL' ye tamamlanır.	

2.2 YÖNTEMLER

2.2.1 Ağaç Kabuğu Örneklerinden Küf İzolasyonu

Fungal floranın tayini için 'Yayma Plaka Yöntemi' kullanıldı. Çalışılacak ağaç kabuğu örneğinden 50 gr alınarak 1/1000 oranında hazırlanmış çamaşır suyu çözeltisi içerisinde 40 saniye bekletildi. Daha sonra süzgeç içerisinde alınarak steril edilmiş distile su ile yıkandı. Steril edilen örnek steril kaşık yardımıyla blender kabına alındı ve üzerine 450 ml serum fizyolojik kondu. Ağaç kabuklarının parçalanması için 10 dakika yüksek devirde homojenize edildi. Böylece örnek 1/10 oranında seyreltilmiş oldu. Elde edilen bu homojenat 10^{-1} lik dilüsyon olarak kabul edildi. İçlerinde 9'ar ml % serum fizyolojik bulunan tüplere seri halinde 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ve 10^{-5} seyreltmeler hazırlandı. Seyreltmeler diğer mikrobiyolojik analizlere göre yapılsa da küf sporları çok kolay dibe çöktükleri için ekim mümkün olduğu kadar kısa sürede yapıldı.

121°C 'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilen ve 45°C 'ye kadar soğutulmuş besiyerleri aseptik koşullar altında döküldü. 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ve 10^{-5} dilüsyonlarından çift paralel olacak şekilde steril standart petri kaplarına 1'er ml aktarıldı ve cam bağetler yardımıyla besiyeri üzerine yayıldı. Besiyerinin donması beklendikten sonra petriyerler 27°C 'de 5-7 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra petride oluşan koloni sayıları tespit edildi. Petriyerler ters çevrilerek asetat kalemiyle işaretlenmek suretiyle sayıldı. Sayım sonucu dilüsyon katsayısı ile çarpılarak aynı seriye ait iki petrinin ortalaması alınarak sonuç cfu/ml cinsinden verildi. İzole edilen birbirinden farklı fungus kolonileri MEA' lı yatık tüplere aseptik koşullarda çekildi ve saf kültür haline getirildi. Tanılama aşamasına geçilene kadar tüplerdeki izolatlar $+4^{\circ}\text{C}$ 'lik buzdolabında muhafaza edildi.

2.2.2 Ham Ekstratın Hazırlanması

Besiyeri Malt Extract Broth

Malt Extract	6.0 g
Maltoz	1.8 g
Dekstroz	6.0 g
Yeast Extract	1.2 g

Merck 1,05397 hazır besiyeri kullanıldı.

Ham ekstrat hazırlamak için 100 ml' lik malt broth hazırlandı. 100 ml malt brotha 10 ml inokülasyon yapıldı. 10 gün boyunca 27 °C' de 180 rpm' de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Daha sonra fungus sporlarını sıvı besiyerinden ayırmak için filtrasyon yapıldı. Filtrasyon sonrasında elde edilen sıvı besiyeri ham ekstrat olarak kullanıldı.

2.2.3 Enzim Aktivite Tayini

Fungus β -glukosidaz enziminin aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edildi. Aktivite ölçümü için 70 μ L, 5 mM pNPG substrat çözeltisi ve üzerine 70 μ L enzim çözeltisi 96'lık plakaya (well-plate) koyuldu. Kör olarak ise 70 μ L 50 mM (pH 5,5) Na-Ac tamponu ve üzerine 70 μ L enzim çözeltisi koyuldu. Etüvde 37 °C'de, 30 dakika inkübe edildi. 30 dk'nın sonunda reaksiyon 70 μ L 0,5 M Na₂CO₃ ile durduruldu. Spektrofotometrede 405 nm'de köre karşılık absorbans değeri okundu.

Beta-glukosidaz enzimi, pNPG substratını hidroliz ederek serbest halde p-Nitrofenol ve β -D-glukopiranozid ürünlerini ortaya çıkarır. β -glukosidaz enziminin aktivitesi p-Nitrofenolün 405 nm'deki spektrofotometrik ölçümü yoluyla belirlendi. Diğer bir ifade ile enzim çözeltisinin aktivitesi, spektrofotometrik olarak absorbansına bakılan 96'lık plaka kuyucuğunun, son hacimde bulunan p-Nitrofenol ürünün konsantrasyonu belirlenerek bulundu.

2.2.4 Protein Tayini

2.2.4.1 Kalitatif Protein Tayini

Kalitatif protein tayini, proteinlerin yapısında bulunan aromatik gruplara sahip tirozin ve triptofan amino asitlerinin 280 nm'de (UV) maksimum absorbands göstermesi esasına dayanan Warburg Metodu olarak bilinen yolla gerçekleştirildi. Hidrofobik etkileşimi kromatografisi işleminden sonra eşit hacimde alınmış olan bütün tüplere kalitatif protein tayini yapıldı. Her bir tüpten 96'lık kuvarz plakanın (well-plate) her bir kuyucuğuna 280 µL konuldu. Kör olarak 280 µL saf su konuldu. Spektrofotometrede 280 nm'de köre karşı absorbandsları okundu.

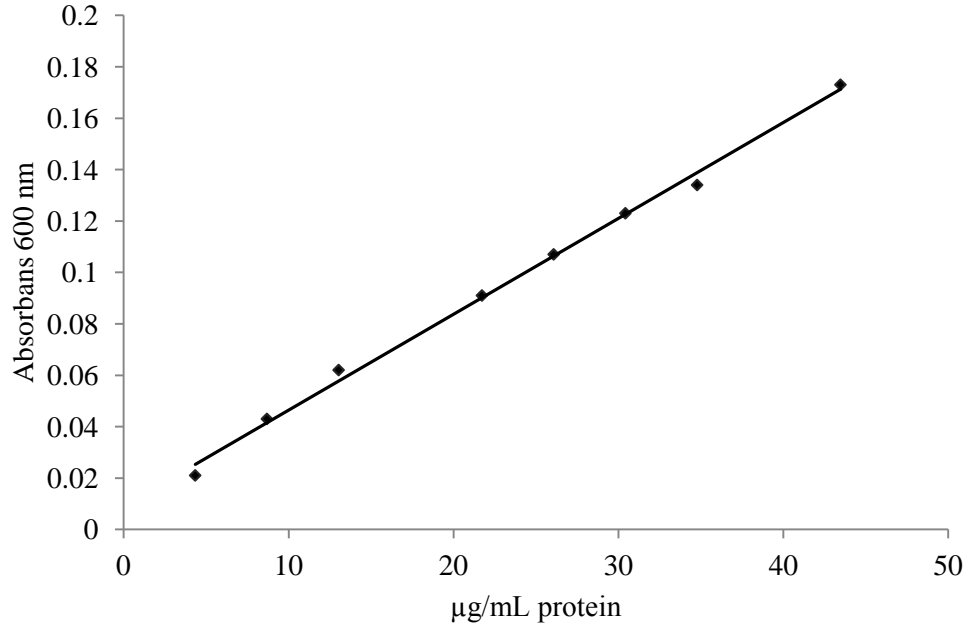
2.2.4.2 Lowry Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini

Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında ve saflaştırma basamaklarında elde edilen çözeltilerdeki protein miktar tayinleri bu yöntemle belirlendi. Bu yöntem alkali koşullar altında biüret reaksiyonu ve aromatik aminoasitlerin Cu^{+2} katalizli oksidasyonundan sonra, ayıraçta bulunan fosfomolibdik, fosfotungisdik asiti ile heteropolimolibden mavisine indirgenmeyi içeren Folin-Ciocalteu reaksiyonunun bir kombinasyonudur. Özetle yöntemin prensibi alkali ortamda proteinlerin peptid bağlarının ve tirozin artıklarının bakır ile kompleks oluşturması esasına dayanır. Koyu mavi renk oluşumu karakteristiktir ve 600 nm dalga boyunda absorbands verir. Hassasiyet aralığı 5-100 µg/mL'dir. Ayrıca ayıracın triptofan ve tirozin aminoasitlerine karşı daha yüksek hassasiyet göstermesi bu aminoasitleri içeriğinde fazla olarak barındıran proteinlerin miktar tayini için avantaj sağlar.

Protein tayini işleminde şu yol izlendi: 1 mL'sinde 1 mg protein içeren standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µL alındı ve her tüpün son hacmi 100 µL olacak şekilde üzerleri saf su ile tamamlandı. Daha sonra her tüpe 2 ml Çözelti D eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 10 dk sonunda tüplere 0,2 mL Çözelti E eklenip vorteks ile zaman kaybetmeden karıştırıldı ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

Örnekler 96'lık plakanın kuyucuklarına 200'er μL koyularak 600 nm'de absorbanları köre karşı okundu. Kör olarak BSA içermeyen 1. tüp kullanıldı.

Amonyum sülfat aralıklarında ve saflaştırma basamaklarında protein miktarı belirlenecek numunelerden 100'er μL tüplere alındı ve Lowry yöntemiyle standart grafik oluşturmak için uygulanan basamaklar aynı şekilde numune tüpleri için de uygulandı. Daha sonra numunelerin içindeki protein miktarı, standart grafikten elde edilen doğru denklemi kullanılarak hesaplandı.



Şekil 2.1: Lowry yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik

2.2.5 Enzimin Saflaştırılması

2.2.5.1 Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi

Amonyum sülfat, belirli doygunluk derecelerine göre belirli proteinlerin çökmesini sağlayan 2 değerlikli, çok kullanılan bir tuzdur. Öncelikle, kısmi saflaştırma için ham ekstrakta kullanılacak uygun amonyum sülfat konsantrasyonu aşağıda verilen formülle tespit edildi:

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

V : Ekstrakt hacmi

S₁ : 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

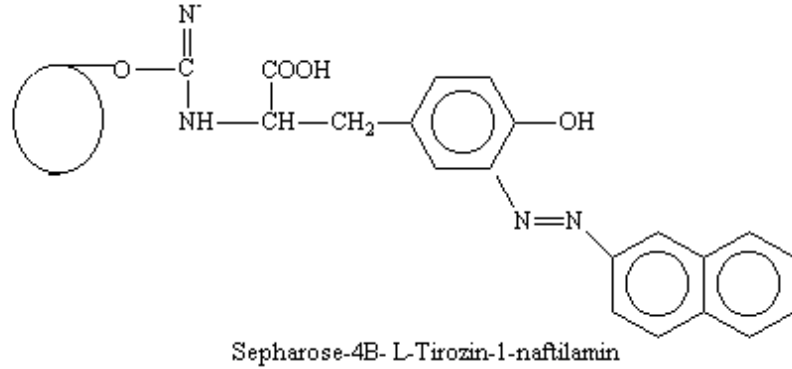
S₂ : 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

Amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesi için ham ekstrakta 0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100 aralıklarında çöktürme yapıldı. Her bir aralık için yukarıdaki formüle göre hesaplanan amonyum sülfat miktarları, 30 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda buz üstünde (0°C'de) yavaşça eklenerek, çözünmesi sağlandı. Daha sonra 15000 rpm'de 4°C'de 30 dakika santrifüj edildi. Çökeleklerin her biri 2 mL, 50 mM (pH 6,8) sodyum fosfat tamponunda çözüldü.

Her bir aralık için çözülen örneklerin enzim aktivitesi ve Lowry metodu ile kantitatif protein miktarları belirlendi. Enzim aktiviteleri belirlenirken, enzim çözeltisi renksiz olduğu için enzim çözeltisi kör olarak ortama eklendi. Bu durumda 10 farklı tuz konsantrasyonu aralığı için tek bir kör kullanıldı. 37°C'de 30 dakika inkübe sonunda reaksiyonlar 70 µL 0,5 M Na₂CO₃ ile durduruldu ve 405 nm'de absorbans değerleri okundu. Her bir aralığın kantitatif protein miktarları Bölüm 2.2.4.2'de verilen Lowry metoduna göre hesaplandı.

2.2.5.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması

Aspergillus niger β -glukosidaz enziminin saflaştırılmasında, amonyum sülfat çöktürmesinin ardından, hidrofobik etkileşim kromatografisi tercih edildi. Bu saflaştırma basamağı için laboratuarda sentezlenen ve Şekil 2.2’ te verilen hidrofobik jel, sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin kullanılmıştır.



Şekil 2.2: Hidrofobik etkileşim kromatografisinde kullanılan hidrofobik jel
(Selma Sinan, Doktora Tezi, 2005)

Hazırlanan hidrofobik etkileşim kolonu önce 1 M (NH₄)₂SO₄ içeren 50 mM, pH (6,8) sodyum fosfat tamponu ile dengelendi. Kolonun dengeleme işlemi bittikten sonra, jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine kadar indirildi. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen enzim çökeleği en küçük hacimde 1 M (NH₄)₂SO₄ içeren 50 mM, (pH 6,8) sodyum fosfat tamponunda çözüldü. Ardından çözeltinin enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak belirlendikten sonra kolona tatbik edildi. Kolona 1 M (NH₄)₂SO₄ içeren 50 mM, (pH 6,8) sodyum fosfat tamponu ve 50 mM, pH (6,8) sodyum fosfat tamponu ile oluşturulan yüksek tuz konsantrasyonundan düşük tuz konsantrasyonuna doğru tuz gradienti uygulandı. Tuz gradienti ile kolondan elüe edilen elüatlar 2 mL halinde ependorf tüplerine alındı. Elüsyon işlemine 280 nm’deki absorbans sıfır oluncaya kadar devam edildi. 50 mM, pH (6,8) sodyum fosfat tamponu kör olarak kullanılarak her bir tüpte 280 nm’de kalitatif protein tayini ve 405 nm’de aktivite tayini yapıldı. Elde edilen değerlerin tüp numarasına karşı aktivite ve protein miktarı grafiği çizildi (Şekil 3.3).

2.2.5.3 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü

Beta-glukosidaz enziminin hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılmasından sonra iki farklı akrilamid konsantrasyonunda; yığıma jeli % 3, ayırma jeli % 10 olacak şekilde kesikli sodyum dodesil sülfat jel elektrofrez (SDSPAGE) Laemli tarafından belirtilen yöntemle yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi (Laemmli,1970).

Bu amaçla elektrofrez cam plakaları önce su, sonra etil alkol ile iyice temizlendi. Daha sonra plakalar arasına plastik aralık oluşturucusu yerleştirilerek iki cam plaka birbiri üzerine konuldu ve elektrofrezin dökme aparatına sabitlendi. Sayfa 24' te belirtildiği şekilde hazırlanan ayırma jeli plakalar arasına üstten 2-3 cm kalana kadar enjektörle döküldü. Jel içerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için saf su ile ince bir tabaka oluşturuldu. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra (1-2 saat) üst yüzeydeki su döküldü. Daha sonra cam plakaların arasına tamamen doluncaya kadar polimerleşmiş ayırma jelinin üzerine yığıma jeli ilave edildi. Jel kasetindeki yükleme jelinin üzerine tarak dikkatlice yerleştirilerek jelin polimerleşmesi beklendi (30 dakika). Yükleme jeli polimerleştikten sonra tarak kuyucukların arasının bozulmamasına dikkat edilerek çıkarıldı. Kuyucuklar önce saf suyla sonra tank tamponuyla yıkandı. Polimerice jellerin bulunduğu kaset elektrofrez tankına yerleştirildi. Elektrofrez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu.

Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonucunda elde edilen fraksiyonlardan yüksek aktivite gösterenler birleştirildi. Elde edilen çözelti toplam hacim 50 µl olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. Jele yüklenecek numuneler 5 dakika 95°C'de termoblok da bekletildi. Numuneler soğutulularak kuyucuklara yüklendi. Elektrofrez güç kaynağına bağlanarak 80 volt'a ayarlandı. Proteinlerin jeldeki hareketini incelemeye yarayan numune tamponu içindeki boyaya ait bant ayırma jeline ulaştığında voltaj 150 volt'a yükseltildi. Yürütme işlemine proteinler, jelin altına 1cm kalana kadar devam edildi. Daha sonra akım kesilerek yürütme durduruldu. Cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı yığıma jeli kesilip ayrıldıktan sonra protein bantlarını içeren ayırma jeli renklendirme çözeltisi içine konuldu ve 1,5-2 saat kadar çalkalayıcı üzerine bırakıldı. Daha sonra jel renklendirme çözeltisinden çıkartılarak renksizleştirme çözeltisine kondu. Belirli

aralıklarla değistirmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp protein bantları belirginlesinceye kadar bu çözelti içinde çalkalandı. Jel renksizleştirme çözeltisinden çıkarıldıktan sonra jel görüntüleme sistemi (UVP) ile görüntü bilgisayara aktarıldı.

2.2.6 β -Glukosidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

2.2.6.1 Saflaştırılan Enzimin Optimum pH Değerinin Bulunması

Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan fungus β -glukosidaz enziminin optimum pH'sını belirlemek amacıyla bir seri farklı pH (4-10) değerlerine sahip 50 mM Na-Ac tamponu hazırlandı. Hazırlanan Na-Ac tamponlarının her birini de son konsantrasyonu 5 mM olacak şekilde pNPG substratı çözüldü. Enzimin farklı pH değerlerindeki substratlara karşı gösterdiği aktivite belirlenirken; 70 μ L, farklı pH'a sahip 5 mM pNPG substrat çözeltisi üzerine 70 μ L enzim çözeltisi eklenerek 96'lık plakaya (well-plate) koyuldu. Kör olarak 70 μ L 50 mM (pH 5,5) Na-Ac tamponu ve üzerine 70 μ L enzim çözeltisi koyuldu. Etüvde 37 $^{\circ}$ C'de, 30 dakika inkübe edildi. 30 dk'nın sonunda reaksiyon 70 μ L 0,5 M Na₂CO₃ ile durduruldu. Spektrofotometrede 405 nm'de köre karşılık absorbans değeri okundu. Absorbans değerlerinden p-NPG standart grafik kullanılarak enzim aktivitesi (EU) hesaplandı.

2.2.6.2 Saf Enzimin Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi

Saflaştırılan beta-glukosidaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla, 25-85 $^{\circ}$ C sıcaklık aralığında, sıcaklık 10 $^{\circ}$ C arttırılarak aktivite tayini yapıldı. Enzimin farklı sıcaklıklarda aktivitesini belirlemek için Bölüm 2.2.3'de belirtilen yöntemin sadece inkübasyon sıcaklıkları değiştirildi. Farklı sıcaklıklarda gerçekleşen reaksiyonlar dururulduktan sonra 405 nm'de absorbansları alındı ve p-NPG standart grafik kullanılarak enzim aktivitesi (EU) hesaplandı.

2.2.7 Enzimin Farklı Substratlara Karşı K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi

Aspergillus niger' den saflaştırılan β -glukozidaz enziminin *p*-NPG ve *o*-NPG substratlarına olan ilgisi K_m ve V_{max} değerleri bulunarak tespit edildi. Bunun için *p*-NPG ve *o*-NPG substratlarının on iki farklı konsantrasyonunda enzim aktivitesi ölçüldü. $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. K_m ve V_{max} değerleri grafiğin denkleminde yararlanılarak bulundu. Bunun için grafiğin $1/V$ eksenini kestiği nokta olan $1/V_{max}$ değerinden V_{max} değeri bulundu ve denklemin eğimi olan K_m/V_{max} değerinde V_{max} yerine yazılarak K_m değeri hesaplandı.

2.2.8 Enzimin Aktivitesi Üzerine Bazı Ağır Metallerin Etkisinin Belirlenmesi

Aspergillus niger' den saflaştırılan β -glukosidaz aktivitesi üzerine bazı metallerin etkisini incelemek amacıyla Fe^{+3} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Ag^{+2} ve Pb^{+2} iyonlarını içeren 100 mM stok çözeltiler hazırlandı. Metal iyonlarının reaksiyon ortamındaki son konsantrasyonu 1,43 mM olacak şekilde aktivite tayinleri yapıldı. Metal iyonu içermeyen enzim çözeltilerinin aktivitesi % 100 olarak kabul edildi. Metal iyonu içeren enzim çözeltilerinin aktiviteleri, içermeyen çözeltilerinin aktivitesi ile kıyaslanarak, % kalan aktivite olarak hesaplanmıştır.

2.2.9 İnhibitörlerin IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi

Enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırılan inhibitör maddelerin IC_{50} değerlerini bulmak için, *p*-NPG substratının reaksiyon hacminde 39,76 mM konsantrasyonu çalışıldı. İnhibitör eklenmemiş ortamda enzim aktivitesi bulunarak bu değer %100 aktivite olarak alındı. Farklı inhibitör konsantrasyonlarında enzim aktivite değerleri bulundu ve % aktivite değerleri hesaplandı. % Aktivite-[I] grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanarak enzim aktivitesini % 50 oranında azaltan inhibitör konsantrasyonu olan IC_{50} değerleri hesaplandı.

2.2.9.1 İnhibitörlerin K_i Değerlerinin Bulunması

β -glukozidazların yaygın substratı olan p-NPG substratı kullanılarak *Aspergillus niger*' den saflaştırılan β -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine δ -glukonolakton ve glukozun inhibisyon tipleri ile K_i değerleri belirlendi. K_i değerlerinin tespiti için, inhibitörsüz ortamda on üç farklı pNPG substrat konsantrasyonu varlığında aktivite değerleri bulundu. Bulunan bu aktivitelerden $1/V$ değerleri hesaplandı. $1/V-1/[S]$ değerleri ile Lineweaver-Burk grafiği çizildiğinde I_0 doğrusu elde edildi. Her bir inhibitör maddenin iki farklı sabit konsantrasyonunda, pNPG substratının altı değişik konsantrasyonuna karşılık gelen enzim aktiviteleri belirlendi. İki farklı inhibitör konsantrasyonu varlığında, farklı substrat konsantrasyonuna karşılık gelen aktiviteler kullanılarak çizilen Lineweaver-Burk grafiğinde $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri ile I_1 ve I_2 doğruları oluşturuldu. Lineweaver-Burk grafiklerden yararlanarak K_i değerleri hesaplandı ve inhibisyon türleri tespit edildi. K_i değerleri yarışmalı (kompetitif) inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrisinde $1/[S]$ eksenini kestiği nokta olan $-1/K_M (1+[I]/K_i)$ ifadesinden, yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon için $1/V$ eksenini kestiği nokta olan $1/V_{max} (1+[I]/K_i)$ ifadesinden, yarıyarışmalı (unkompetitif) inhibisyon tipi için $1/V$ eksenini kestiği nokta olan $1/V_{max} (1+[I]/K_i)$ ifadesinden yararlanılarak hesaplandı. K_i değerlerinin hesaplanmasında kullanılan denklemlerdeki K_m ve V_{max} değerleri inhibitörsüz ortamda bulunan değerlerdir.

3. BULGULAR

3.1 Fungusun Tanınması

Koloni Renkleri ve Tekstür. CYA 'da konidia siyah ya da çok koyu kahverengidir ve yoğundur; hifler genelde gösterişsiz, beyaz ya da soluk sarı renkli; sklerotia, eğer mevcutsa, krem, sarımsı bej, soluk pembe renklidir; eksuda eğer mevcutsa renksizdir. Ters yüzey renksiz ya da sarı renkli olabilir; çözünür pigment bulunmaz ve koloni tekstürü granüler, yünümsü ya da bazen ışınsal sulkattır. MEA'da konidial alanlar siyah; miselyum beyaz ve gösterişsiz; ters yüzey renksiz; koloniler granüler ya da yünümsüdür. CZ' de koloniler görünüm olarak CYA'dakilere benzerler.

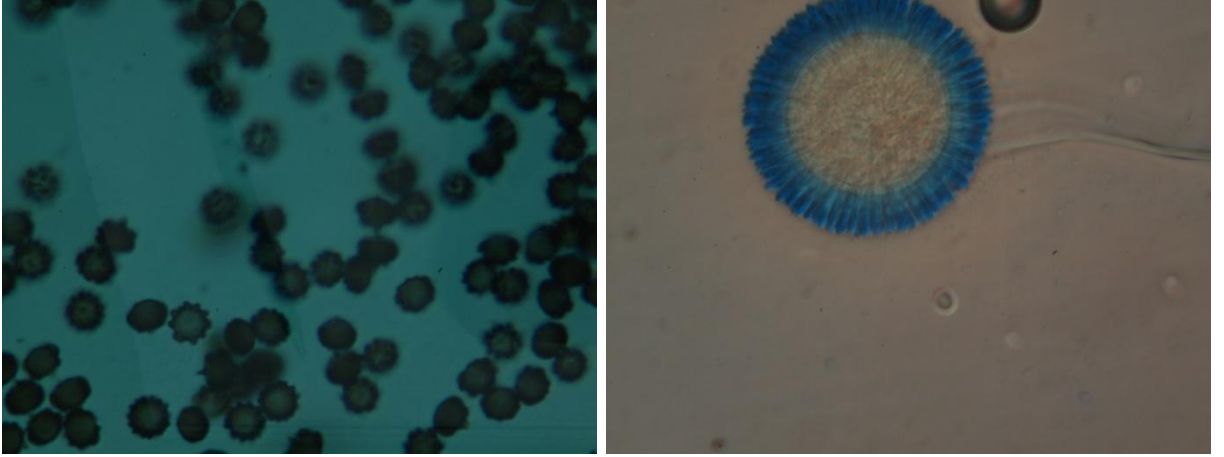
Mikroskopik Karakteristikler. Konidial başlar ışınsaldır; konidioforlar (300) 400–3000 x (7) 12–17 (20) µm, konidiofor çeperi düz, hyalin ya da özellikle apikale yakın kısımlarda hafif kahverengidir; veziküller (20) 30–75 (85) µm genişliğinde, küresele yakın; biseriattır (çok nadiren uniseriat). Metula vezikülün tüm yüzeyini kaplar, 12–20 (40) x 3–6 µm boyutlarındadır; phialidler 7–10 x 3–4 µm'dir. Konidia globoz (3) 3,5–4,5 (5) µm çapındadır; çeperi genelde çok pürüzlü, nadiren az pürüzlüdür.

Ayrt Edici Özellikleri. Yaygın görülen bu tür çok koyu kahverengi ve siyah koloniler, büyük vezikülü ve biseriatt konidial baş, uzun metula ve düzensiz olarak pürüzlenmiş konidiası ile ayrt edilir.

Habitat. Yaygın görülen bu tür genelde topraktan, bitki atıklarından, bitki rhizosferlerinden, tahıllar, kurutulmuş meyveler ve fındık gibi sert kabuklu yemişlerden izole edilir. Gıda kaynaklı olarak en sık rapor edilen ve iç alanlarda en sık görülen türlerden biridir.

Temel Mikotoksinler. Okratoksin A.

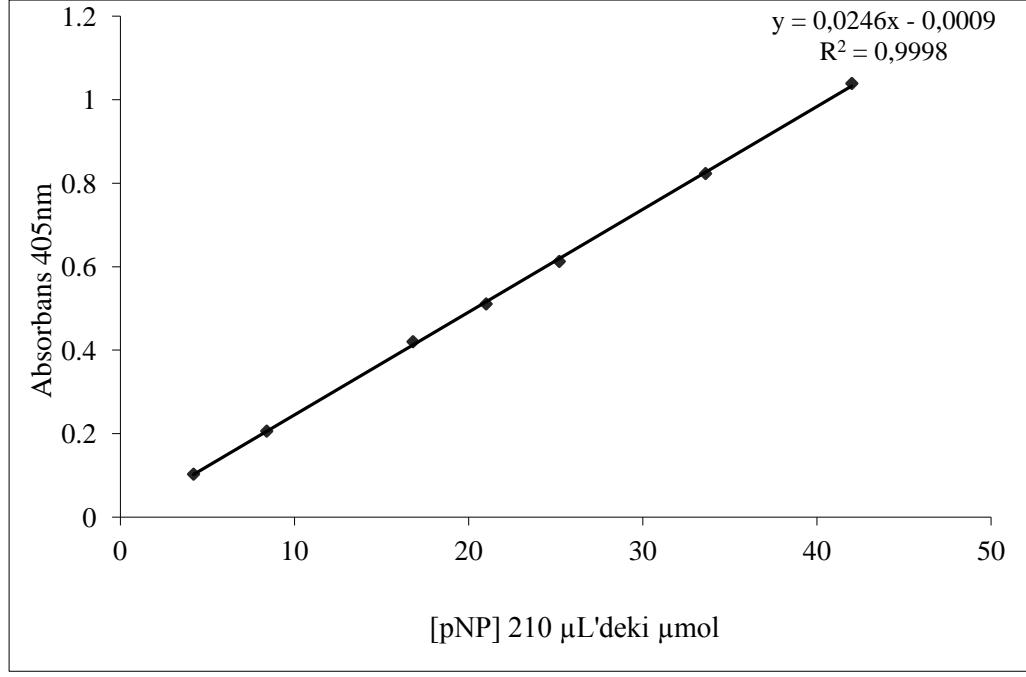
Bu türün tanınması Klich (2002)'e göre yapılmıştır.



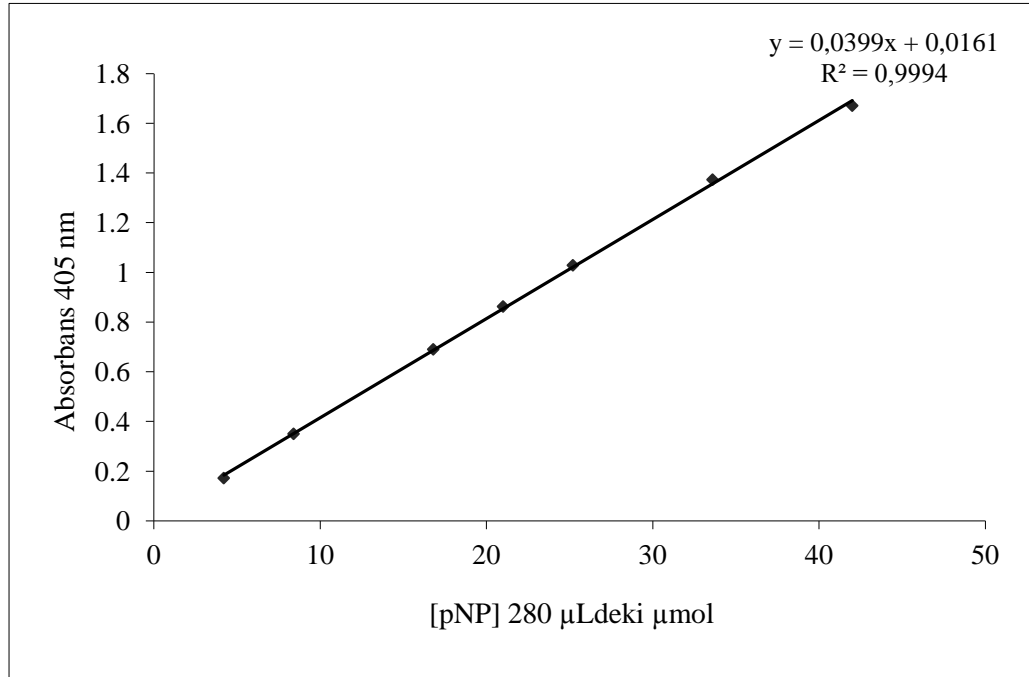
Şekil 3.1: *Aspergillus niger* 'in mikroskopik görüntüsü

3.2 Enzim Aktivite Tayini için Kullanılan Standart Eğri

Enzimin aktivite tayini, β -glukosidaz enzim hidrolizi ile glikopiranozide bağlı olan p-Nitrofenolün serbest kalması esası referans olarak yapıldı. Bu amaçla 210 μ L ve 280 μ L'lik son reaksiyon hacimlerinde p-NP standart grafikleri oluşturuldu. Bu grafikleri oluşturmak için p-Nitrofenol standart olarak kullanıldı. Standart çözeltideki μ mol p-Nitrofenole karşılık gelen absorbans değerleri Bölüm 2.2.3'de anlatılan yöntemle bulunarak Şekil 3.2 ve 3.3 'deki standart grafikler çizildi.



Şekil 3.2: Enzim aktivite tayininde kullanılan 210 µL hacimli p-NP standart grafiği



Şekil 3.3: Enzim aktivite tayininde kullanılan 280 µL hacimli p-NP standart grafiği

3.3 Enzimin Saflaştırılması

3.3.1 Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi

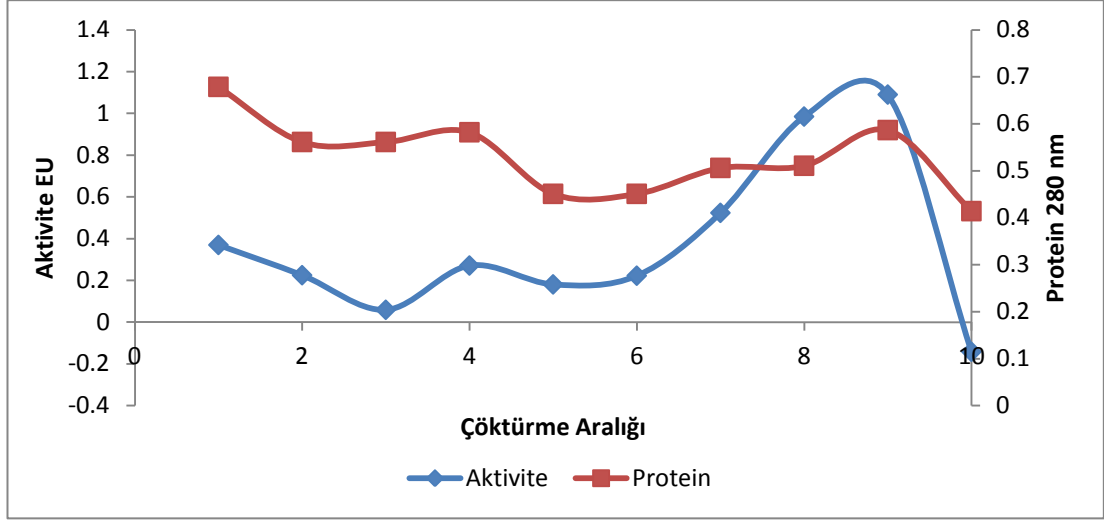
Amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesi için ham ekstrakta Tablo 3.1’de verilen amonyum sülfat miktarları eklenerek Bölüm 2.2.5.1’de belirtilen yöntem uygulanmıştır.

Tablo 3.1: Amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesinde kullanılan çözelti hacimleri, kullanılan tuz miktarı ve tespit edilen değerler

ARALIK DEĞERİ	ÇÖKTÜRME ARALIĞI	HACİM (mL)	KULLANILAN AMONYUM SÜLFAT MİKTARI (g)	PROTEİN MİKTARI (mg/mL)	AKTİVİTE
1	0-10	8	0,416	0,6785	0.036947
2	10-20	8	0,424	0,5612	0.022447
3	20-30	8	0,437	0,5612	0.00588
4	30-40	8	0,451	0,5819	0.02708
5	40-50	7,53	0,438	0,4508	0.018047
6	50-60	7,52	0,453	0,4508	0.022214
7	60-70	7,5	0,467	0,5060	0.052314
8	70-80	7,5	0,484	0,5106	0.098447
9	80-90	7,5	0,503	0,5865	0.10898
10	90-100	7,5	0,522	0,4140	-0.01422

Tablo 3.1’deki değerler kullanılarak amonyum sülfat çöktürme aralığı-Aktivite grafiği çizilmiştir. Özellikle çöktürme aralığının belirlenmesinde protein

miktarının düşük ancak enzim aktivitesinin yüksek olduğu aralık tespit edilmeye çalışılmıştır. Grafikten, enzimin çöktüğü tuz konsantrasyonu %0-90 aralığı olarak tespit edilmiş ve saflaştırma işlemlerinde %90 amonyum sülfat tuz çöktürmesi uygulanmıştır.

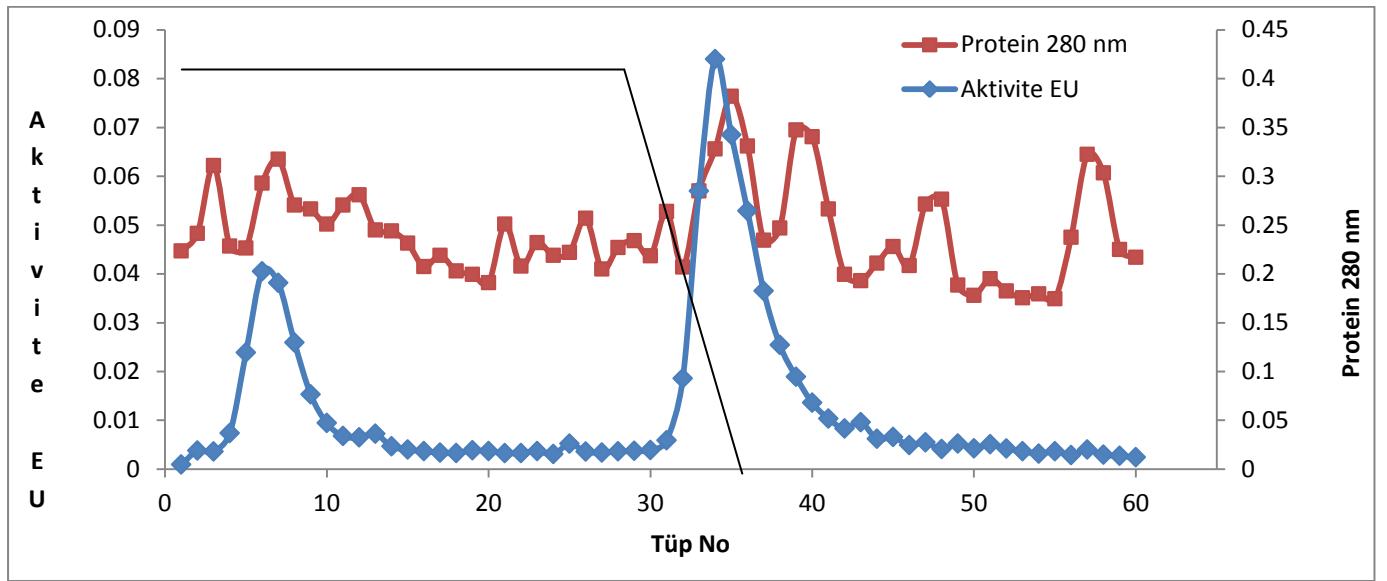


Şekil 3.4: Amonyum sülfat çöktürme aralığının tespitinde kullanılan grafik

3.3.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi İle Enzimin Saflaştırılması

Bölüm 2.2.5.2’de belirtildiği gibi %90 amonyum sülfat çöktürmesi sonunda elde edilen numune diyaliz edilmeden daha önceden laboratuvarında sentezlenmiş hidrofobik yapıdaki sepharose 4B-L-tirozin-1-naftilamin hidrofobik jelini içeren kolona uygulanmıştır. Kolondaki jel yüksekliği 5 cm ve çap 1 cm’dir. Kolondan alınan numunelerin 50 mM sodyum fosfat pH 6.8 tamponu kör kullanılarak, 280 nm’de kalitatif protein tayini yapılmıştır. Elüsyondaki her bir tüpün aktivite tayini kendi numunesinden oluşan köre karşı yapılmıştır. Şekil 3.2’de görüldüğü gibi elde edilen değerlerin tüp numarasına karşı aktivite ve protein miktarı grafiğinden 60 yüksek aktivite gösteren tüplerden 32, 33, 35, 36, 37, 38 ve 39 numaralı tüpler birleştirilmiştir. Kolona tatbik edilen ve birleştirilen elüatlar için Lowry metoduyla kantitatif protein ve aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler ve saflaştırma oranları tespit edilmiştir (Tablo 3.2).

Tablo 3.2' deki saflaştırma tablosunda gösterildiği gibi amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda çözülen çökeleğin toplam aktivitesi 657,59 U/ml ve toplam protein miktarı 0,0327 mg/ml olarak belirlenmiş ve %24,2 verimle 3,21 kat saflaştırılmış olduğu hesaplanmıştır. Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonunda 32-39. tüplerin oluşturduğu saf enzimin %19,34 verimle 2,18 kat saflaştırılmış olduğu belirlenmiştir. Yapılan hidrofobik etkileşim kromatografisinde 1-0 M amonyum sülfat gradienti uygulanmış ve elüsyonun 35. tüpünde gradient işlemi bitirilmiştir. Bu açıdan incelendiğinde enzimin 36.-39. tüplede gelmesi tuz konsantrasyonunun oldukça azaldığı bir değerde kolona tutunamadığı görülmüştür.



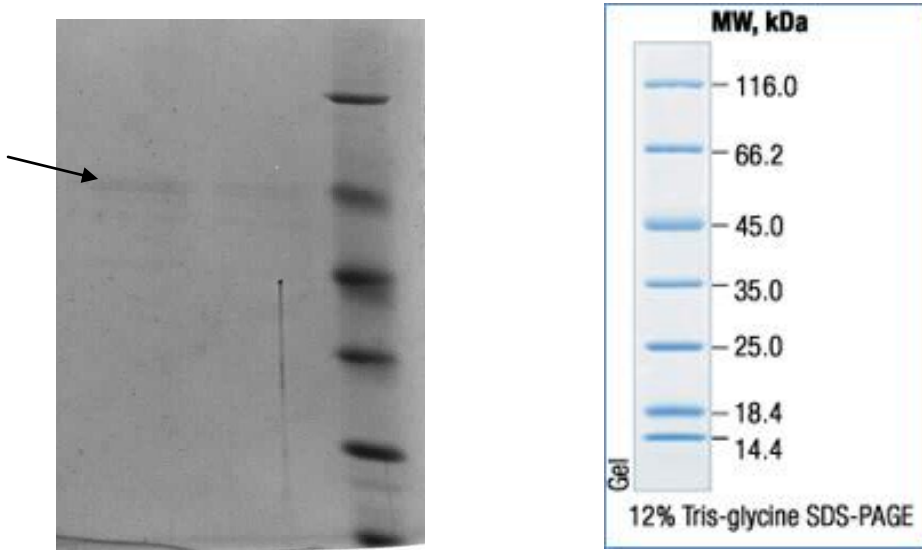
Şekil 3.5: Hidrofobik etkileşim kromatografisi kolonundan fungus β - glukosidaz enziminin elüsyon grafiği

Tablo 3.2: *Aspergillus niger*' in saflaştırma tablosu

Basamak	Hacim (ml)	Aktivite (U/ml)	Toplam Aktivite (U/ml)	Protein Miktarı (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	% Verim	Saflaştırma Derecesi
Ham ekstrakt	4	4,55	18,2	0,0354	0,1416	128,53	100	-
Amonyum Sülfat Çöktürmesi	1	4,54	4,54	0,0327	0,0327	138,84	24,15	1,08
Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi	2	7,09	14,17	0,0253	0,0506	280,04	19,34	2,18

3.3.3 *Aspergillus niger* Beta-Glukosidaz Enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi

Hidrofobik etkileşim kolonundan saflaştırılan *Aspergillus niger* β -glukosidaz enziminin saflığını kontrol etmek için bölüm 2.2.5.3' te anlatıldığı gibi hazırlanan SDS poliakrilamid jel elektrofrezine saflaştırılmış enzim numunesi uygulandı. Protein bantları içeren jelin görüntüsü jel görüntüleme sistemine aktarıldı.



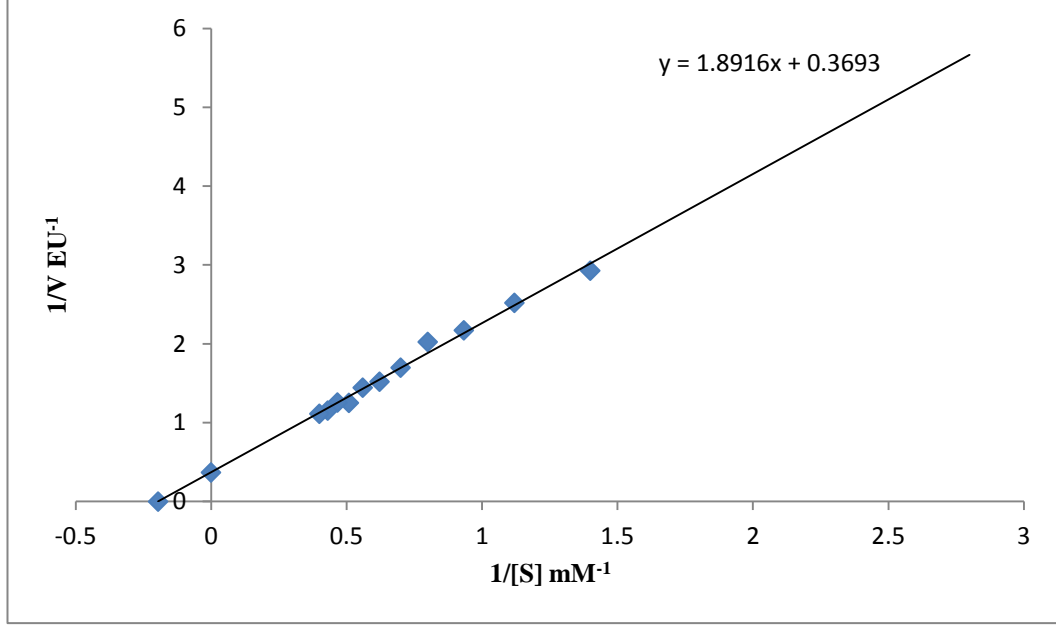
Şekil 3.6: Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan *Aspergillus niger* β -glukosidaz enziminin SDS -poliakrilamid jel elektrofrezisi

3.4 Farklı Substratlara Karşı K_m ve V_{max} Değerlerinin Bulunması

3.4.1 pNPG Substratına Karşı K_m ve V_{max} Değerlerinin Bulunması

K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması amacıyla pNPG substratının değişen konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. 405 nm' de ölçülen aktivite değerleri ile reaksiyon hızı $V(U/mL)$ olarak yapıldı. $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri kullanılarak Şekil 3.5' de gösterilen Linewarver-Burk grafiği çizildi. Grafik denkleminde yararlanılarak *Aspergillus niger* beta-glukosidaz enzimine ilişkin

pNPG substratu için K_m değeri 5.122 mM ve V_{max} değeri 2.71U/mg olarak hesaplandı.



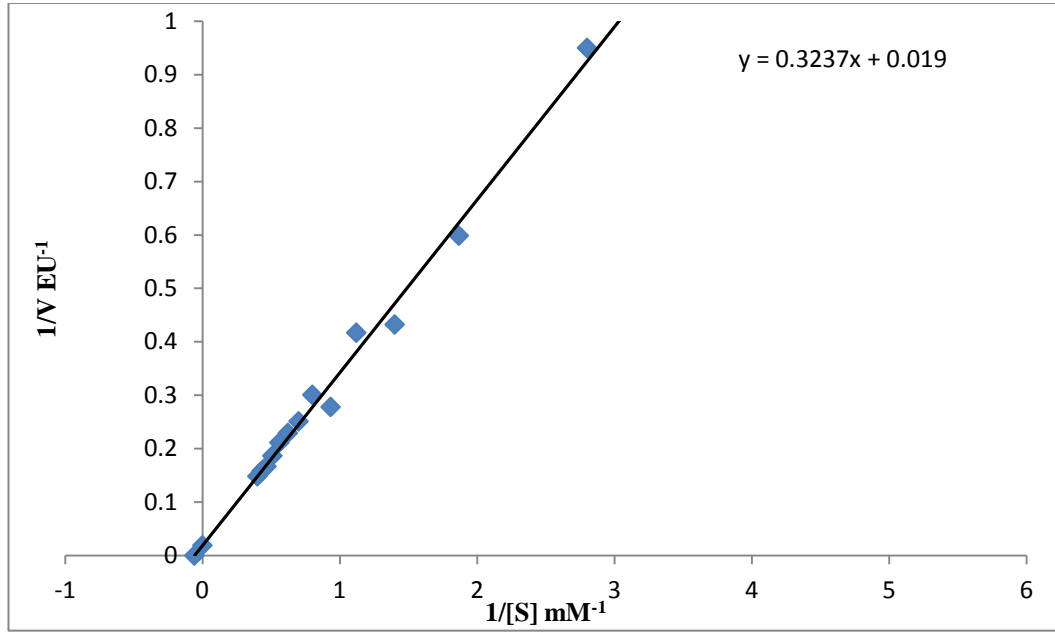
Şekil 3.7: p-NPG Substratının K_m ve V_{max} değerlerinin bulunmasında kullanılan Lineweaver-Burk grafiği

Tablo 3.3: Fungus Beta-glukosidaz enziminin *p*-NPG substratı kullanılarak, K_m ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri

50mM Na-Ac Tamponu (μ l)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Substrat çözeltilisinin hacmi (μ l)	Kuyucuk toplam hacim (μ l)	Kuyucuk Substrat Kons [S] (mM)	ΔA (405 nm)	Aktivite (U/mL dak)	$1/[S]$	$1/V \times 10^{-3}$
70	50	20	210	0,714286	0,2511	0,341463	1,4	2,93
65		25		0,892857	0,2919	0,396748	1,12	2,52
60		30		1,071429	0,3389	0,460434	0,93	2,17
55		35		1,25	0,3636	0,493902	0,8	2,02
50		40		1,428571	0,4336	0,588753	0,7	1,70
45		45		1,607143	0,4845	0,657724	0,62	1,52
40		50		1,785714	0,5098	0,692005	0,56	1,44
35		55		1,964286	0,5885	0,798645	0,51	1,25
30		60		2,142857	0,5864	0,795799	0,466	1,26
25		65		2,321429	0,6387	0,866667	0,43	1,15
20		70		2,5	0,6617	0,897832	0,4	1,11

3.4.2 *o*-NPG Substratına Karşı K_m ve V_{max} Değerlerinin Bulunması

K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması amacıyla *o*-NPG substratının değişen konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. 420 nm’ de ölçülen aktivite değerleri ile reaksiyon hızı $V(U/mL)$ olarak yapıldı. $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri kullanılarak Şekil 3.6’ de gösterilen Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Grafik denkleminde yararlanılarak *Aspergillus niger* beta-glukosidaz enzimine ilişkin *o*-NPG substratı için K_m değeri 17,04 mM ve V_{max} değeri 52,63U/mg olarak hesaplandı.



Şekil 3.8: *o*-NPG Substratının K_m ve V_{max} değerlerinin bulunmasında kullanılan Lineweaver-Burk grafiği

Tablo 3.4: Fungus Beta-glukosidaz enziminin *o*-NPG substratı kullanılarak, K_m ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri

50mM Na-Ac Tamponu (μ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat çözeltisinin hacmi (μ l)	Kuyucuk toplam hakim (μ l)	Kuyucuk Substrat Kons [S] (mM)	$\Delta A(405 \text{ nm})$	Aktivite (U/mL dak)	$1/[S]$	$1/V \times 10^{-3}$
80	50	10	210	0,357143	0,0833	3,422764	2,8	0,292462
75		15		0,535714	0,0985	4,04065	1,86	0,247485
70		20		0,714286	0,1143	4,682927	1,4	0,213542
65		25		0,892857	0,1164	4,768293	1,12	0,209719
60		30		1,071429	0,1459	5,96748	0,93	0,167575
55		35		1,25	0,1392	5,695122	0,8	0,175589
50		40		1,428571	0,1554	6,353659	0,7	0,15739
45		45		1,607143	0,1647	6,731707	0,62	0,148551
40		50		1,785714	0,1738	7,101626	0,56	0,140813
35		55		1,964286	0,1892	7,727642	0,51	0,129406
30		60		2,142857	0,2048	8,361789	0,46	0,119592
25		65		2,321429	0,2127	8,682927	0,43	0,115169
20		70		2,5	0,2232	9,109756	0,4	0,109772

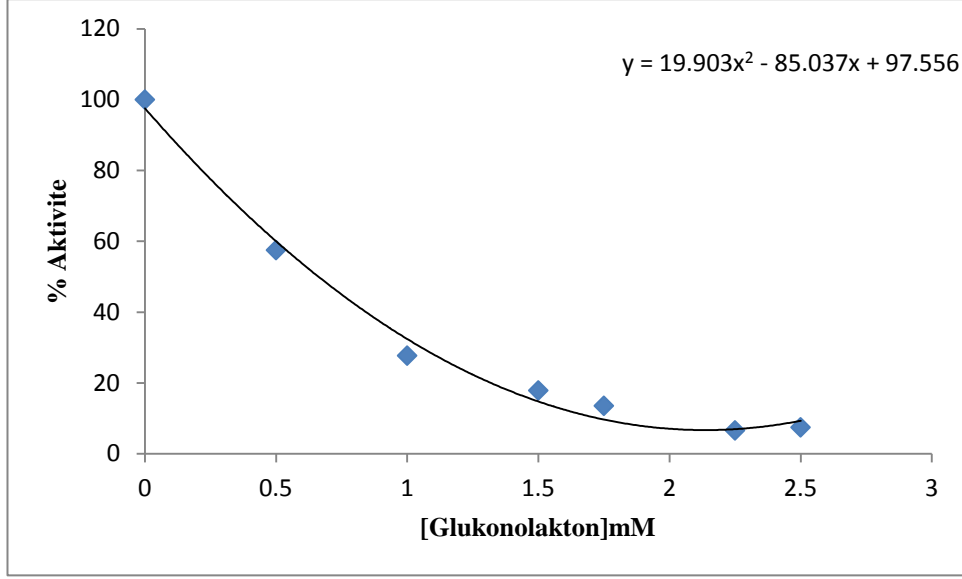
3.5 Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren Maddelerin IC₅₀ Değerlerinin Bulunması

3.5.1 β-Glukosidazların Genel İnhibitörlerinin IC₅₀ Değerlerinin Bulunması

β-glukosidaz enzimlerinin literatürde en sık bahsedilen inhibitörleri glukoz ve 6-glukonolaktondur. Bu nedenle bu iki maddenin *Aspergillus niger* β-glukosidaz enzimi üzerine etkileri araştırıldı.

3.5.1.1 β-Glukosidazların Genel İnhibitörleri Olan 6-glukonolaktonun IC₅₀ Değerinin Bulunması

6-glukonolaktonun *Aspergillus niger* beta-glukosidaz enzimi üzerine etkisi incelenirken, pNPG substratının reaksiyon hacmindeki konsantrasyonu 39,76 mM kullanıldı. 6-glukonolakton bulunmayan ortamda enzim aktivitesi %100 aktivite kabul edildi ve 6-glukonolaktonun 0-2,5 mM değişen konsantrasyonlarında %aktivite değerleri hesaplandı.



Şekil 3.9: Saflaştırılmış fungus beta-glukosidaz enzimi üzerine 39,76 mM *p*-NPG substratı konsantrasyonunda glukozun % aktivite-[I] grafiği

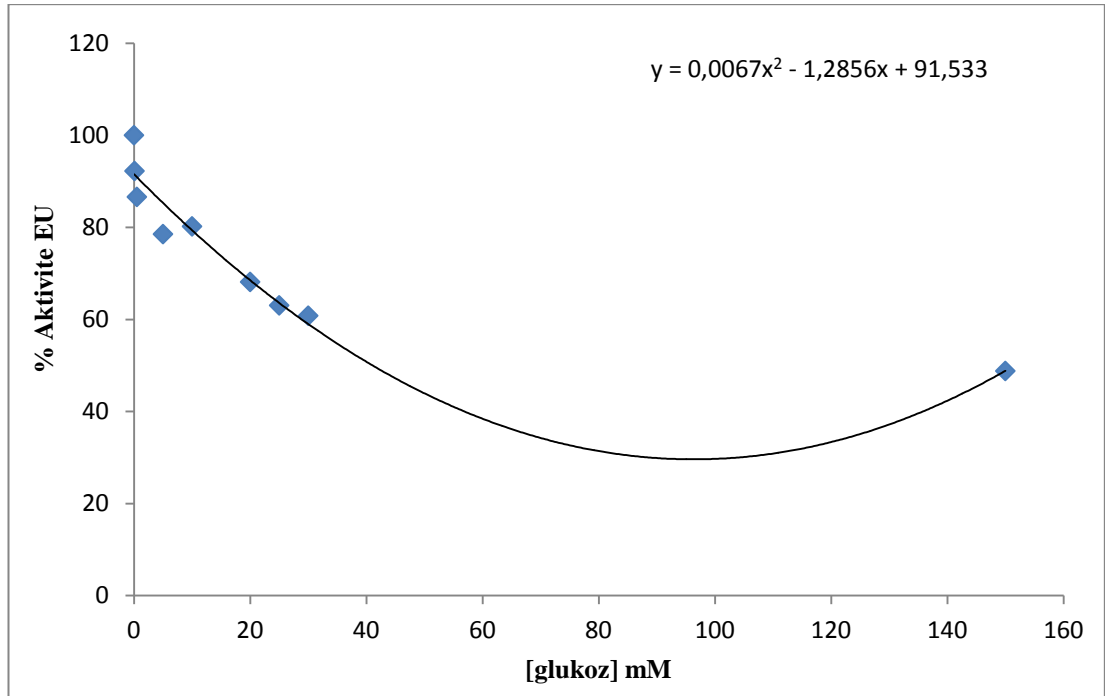
Grafikteki denklemden yararlanılarak *Aspergillus niger* beta-glukosidaz enzim aktivitesi üzerine β -glukonolaktonun IC_{50} değeri 0,67 mM olarak hesaplandı.

Tablo 3.5: Fungus β -glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etki gösteren δ -glukonolakton maddesinin IC_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar

50 mM Na-Ac Tamponu (μ l)	İnhibitör	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat çözeltisinin hacmi (μ l)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Kuyudaki İnhibitör Kons. [I] (mM)	ΔA (405 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
50	δ -glukonolakton	70	70	10	2,5	0,042	0,021637	100,00
40				20	0,5	0,135	0,099332	34,37
30				30	1	0,112	0,080117	27,72
25				35	1,5	0,078	0,051713	17,90
20				40	1,75	0,063	0,039181	13,56
10				50	2,25	0,039	0,019131	6,62
60				-	0	0,362	0,288972	7,49

3.5.1.2 β -Glukosidazların Genel İnhibitörleri Olan Glukozun IC_{50} Değerinin Bulunması

Glukozun *Aspergillus niger* beta-glukosidaz enzimi üzerine etkisi incelenirken, *p*NPG substratının reaksiyon hacmindeki konsantrasyonu 39,76 mM kullanıldı. Glukoz bulunmayan ortamda enzim aktivitesi %100 aktivite kabul edildi ve glukozun 150-0.1 mM değişen konsantrasyonlarında %aktivite değerleri hesaplandı.



Şekil 3.10: Saflaştırılmış fungus beta-glukosidaz enzimi üzerine 39,76 mM *p*-NPG substratı konsantrasyonunda glukozun % aktivite-[I] grafiği

Grafikteki denklemden yararlanılarak *Aspergillus niger* beta-glukosidaz enzim aktivitesi üzerine glukozun IC_{50} değeri 17.8 mM olarak hesaplandı.

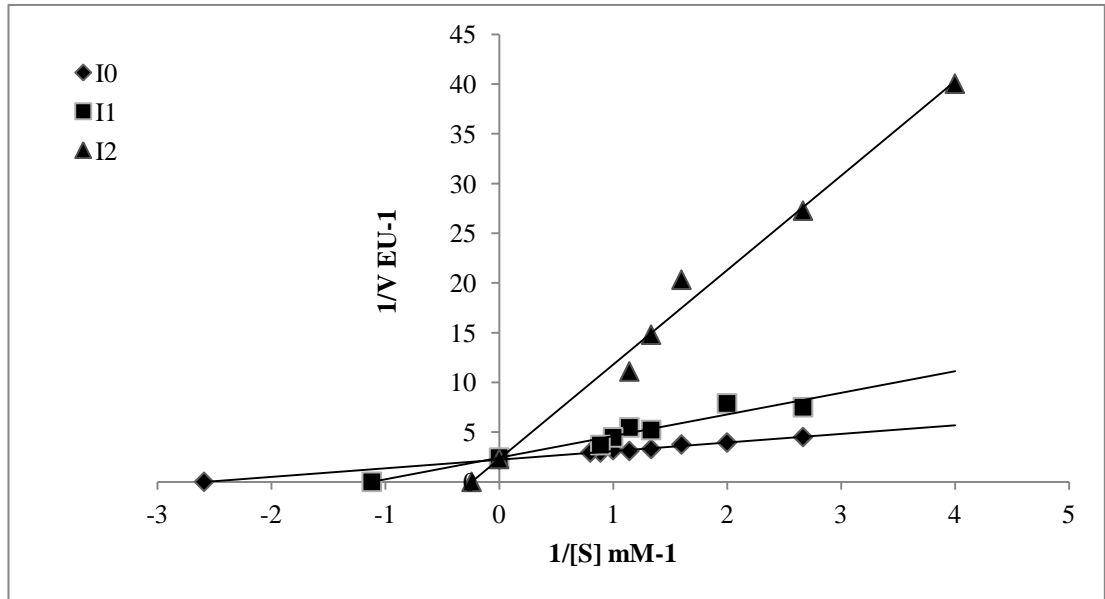
Tablo 3.6: Fungus β -glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etki gösteren glukoz maddesinin IC_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar

50 mM Na-Ac Tamponu (μ l)	İnhibitör	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat çözeltisinin hacmi (μ l)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Kuyudaki İnhibitör Kons. [I] (mM)	ΔA (405 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
80	Glukoz	50	70	-	-	0,6793	0,554052	100
60				20	0,1	0,6499	0,52949	92,23
60				20	0,5	0,6112	0,49716	86,60
60				20	5	0,5557	0,4507794	78,52
40				40	10	0,4956	0,400585	69,78
60				20	10	0,5672	0,460401	80,20
40				40	20	0,4843	0,391145	68,13
60				60	30	0,4339	0,349039	60,80
60				20	25	0,4493	0,361905	63,04
20				60	150	0,3514	0,280117	48,79

3.5.2 β -glukosidazların Genel İnhibitörü Olan Maddelerin İnhibisyon Tipinin ve K_i Değerlerinin Belirlenmesi

3.5.2.1 β -glukosidazların Genel İnhibitörü Olan δ -glukonolaktonun İnhibisyon Tipinin ve K_i Değerlerinin Belirlenmesi

δ -glukonolaktonun K_i sabitinin bulunması amacıyla, önce reaksiyon ortamında inhibitör yokken 13 farklı *p*NPG substrat konsantrasyonuna bağlı olarak aktiviteler bulundu. Daha sonra 0,025 mM ve 0,1 mM sabit δ -glukonolakton konsantrasyonlarında aktiviteler belirlendi. Belirlenen bu değerlerden $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri hesaplanarak, Lineweaver-Burk grafiğinde I_1 , I_2 doğruları çizildi. Bu grafikten yararlanarak K_i değerleri ve inhibisyon türleri tespit edildi. K_i değerleri hesaplandı.



Şekil 3.11: Fungus β -glukosidaz enzimine, *p*NPG substratı varlığında, δ -glukonolakton inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği

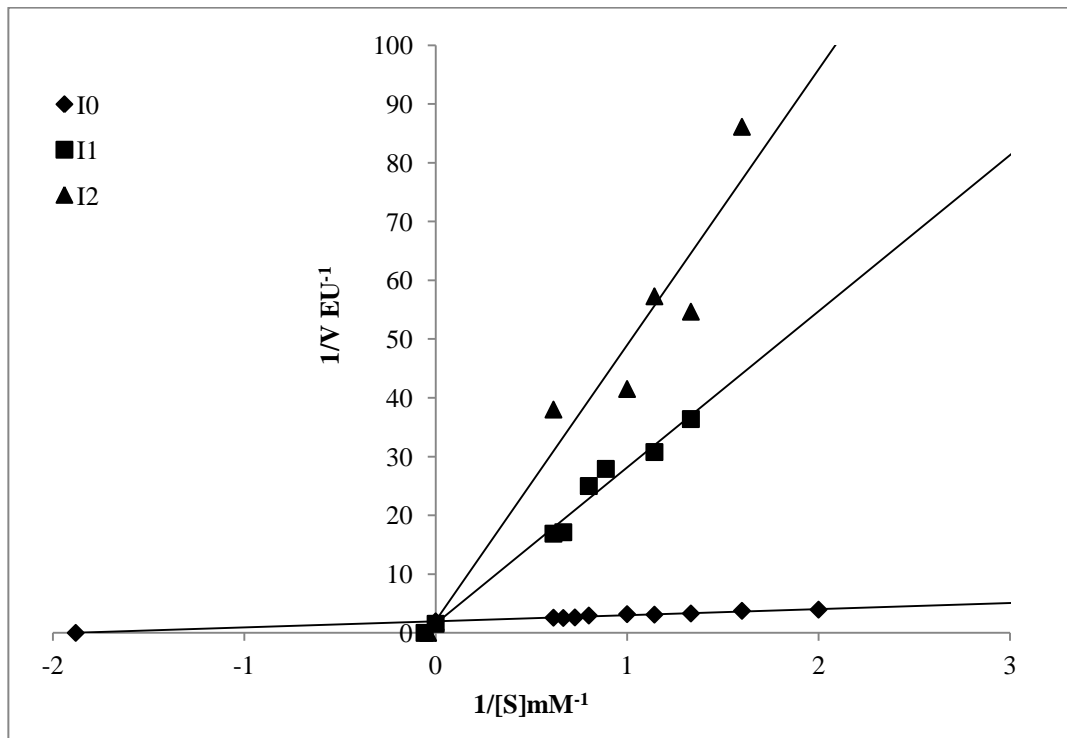
Şekil 3.11'deki Lineweaver-Burk grafiğinden, δ -glukonolakton, pNPG substratı varlığında *mfungus* β -glukosidaz enziminin üzerine kompetitif (yarışmalı) tipte inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. δ -glukonolaktonun $[I_1]= 0,025$ mM ve $[I_2]= 0,1$ mM olarak iki farklı konsantrasyondaki aktiviteler kullanılarak çizilen grafikten K_i değeri $0,01455\pm 0,00425$ mM olarak hesaplanmıştır.

Tablo 3.7: Fungus beta-glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren δ -glukonolaktonun K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

50mM Na-Ac tamponu (μ l)	Enzim Çözeltisi Hacmi (μ l)	Substrat çözeltisi hacmi (μ l)	İnhibitör Çözeltisi Hacmi (μ l)	Kuyudaki Toplam Hacim (μ l)	Kuyudaki Substrat Kons. [S] (mM)	Kuyudaki İnhibitör Kons. [I] (mM)	ΔA (405 nm)	Aktivite (U/ml dak)	1/V	1/[S]		
115	70	15	0	200	0,375	0	0,282	0,222139	4,50	2,66		
110		20			0,5		0,319	0,253049	3,95	2		
105		25			0,625		0,335	0,266416	3,75	1,6		
100		30			0,75		0,379	0,303175	3,30	1,33		
95		35			0,875		0,402	0,322389	3,10	1,14		
90		40			1		0,392	0,314035	3,18	1		
85		45			1,125		0,422	0,339098	2,95	0,88		
80		50			1,25		0,422	0,339098	2,95	0,8		
110		15			5		0,025	0,375	0,168	0,126901	7,88	2,66
105		20						0,5	0,182	0,126901	7,88	2
95		30	0,75			0,246		0,192063	5,21	1,33		
90		35	0,875			0,235		0,182874	5,47	1,14		
85		40	1			0,284		0,22381	4,47	1		
80		45	1,125			0,34		0,270593	3,69	1,125		
100		10	20			0,1		0,25	0,046	0,024979	40,03	4
95		15						0,375	0,06	0,036675	27,26	2,66
85		25			0,625		0,075	0,0449206	20,32	1,6		
80		30			0,75		0,097	0,067586	14,80	1,33		
75		35			0,875		0,124	0,090142	11,09	1,14		

3.5.2.2 β -glukosidazların Genel İnhibiörü Olan Glukozun İnhibisyon Tipinin ve K_i Değerinin Belirlenmesi

Glukozun K_i sabitinin bulunması amacıyla, önce reaksiyon ortamında inhibitör yokken 13 farklı pNPG substrat konsantrasyonuna bağlı olarak aktiviteler bulundu. Daha sonra 12,5 mM ve 50 mM sabit glukoz konsantrasyonlarında aktiviteler elde edildi. Belirlenen bu değerlerden $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri hesaplanarak, Şekil 3.12'deki Lineweaver-Burk grafiğindeki I_1 , I_2 doğruları çizildi. Bu grafikten yararlanarak K_i değerleri ve inhibisyon türleri tespit edildi.



Şekil 3.12: Fungus β -glukosidaz enzimine, pNPG substratı varlığında, glukoz inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği

Şekil 3.12'deki Lineweaver-Burk grafiğinden, glukoz, pNPG substratı varlığında fungus β -glukosidaz enziminin üzerine kompetitif (yarışmalı) tipte inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. δ -glukonolaktonun $[I_1]= 12,5$ mM ve $[I_2]= 50$ mM olarak iki farklı konsantrasyondaki aktiviteler kullanılarak çizilen grafikten K_i değeri $0,74\pm 0,34$ mM olarak hesaplanmıştır.

Tablo 3.8: Fungus beta-glukosidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren glukozun K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

50mM Na-Ac tamponu (μ l)	Enzim Çözeltisi Hacmi (μ l)	Substrat çözeltisi hacmi (μ l)	İnhibitör Çözeltisi Hacmi (μ l)	Kuyudaki Toplam Hacim (μ l)	Kuyudaki Substrat Kons. [S] (mM)	Kuyudaki İnhibitör Kons. [I] (mM)	ΔA (405 nm)	Aktivite (U/ml dak)	1/V	1/[S]	
115	70	15	0	200	0,375	0	0,282	0,222139	4,50	2,66	
110		20			0,5		0,319	0,253049	3,95	2	
105		25			0,625		0,335	0,266416	3,75	1,6	
100		30			0,75		0,379	0,303175	3,30	1,33	
95		35			0,875		0,402	0,322389	3,10	1,14	
90		40			1		0,392	0,314035	3,18	1	
85		45			1,125		0,422	0,339098	2,95	0,88	
80		50			1,25		0,422	0,339098	2,95	0,8	
80		30			0,75		0,049	0,027485	36,38	1,33	
75		35			0,875		0,055	0,032498	30,77	1,14	
65		45	1,125		0,59	0,03584	27,90	0,88			
60		50	1,25		0,64	0,040017	24,99	0,8			
50		60	1,5		0,86	0,05896	17,12	0,66			
45		65	1,625		0,87	0,059231	16,88	0,61			
100		25	0,625		5	0,625	12,5	0,03	0,011612	86,11	1,6
95		30	0,75			0,038		0,018296	54,65	1,33	
90		35	0,875			0,037		0,01746	57,27	1,14	
85		40	1			0,045		0,024144	41,42	1	
80		45	1,125			0,046		0,024979	40,03	0,61	
60		65	1,625								

3.5.3 Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi Araştırılan Bazı Ağır Metallerin Relative Aktivitelerinin Bulunması

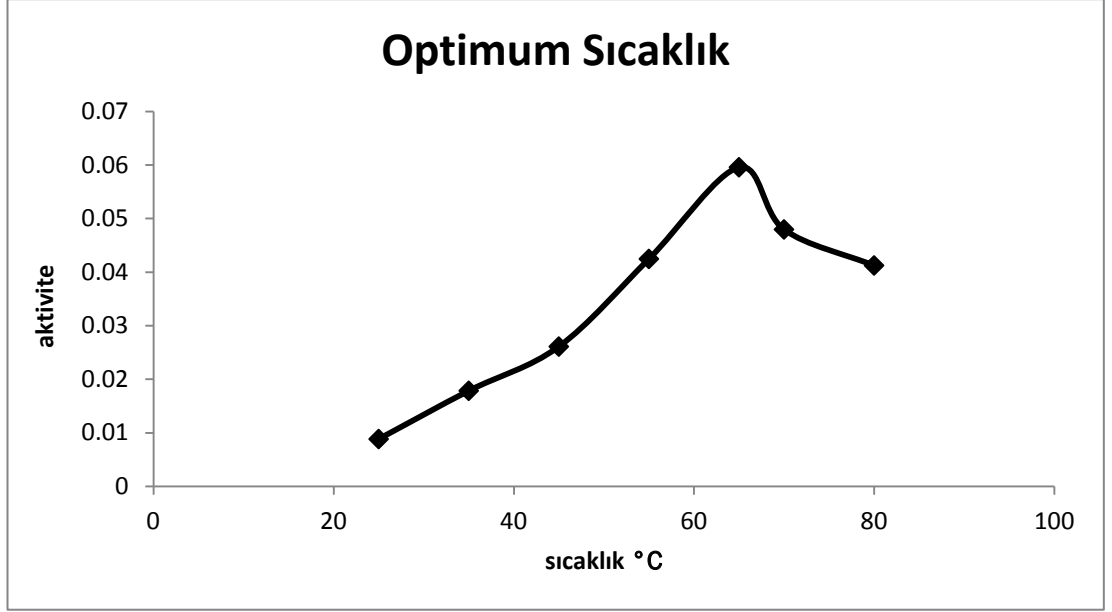
Aspegillus niger fungusundan saflaştırılan beta-glikosidaz enzimi üzerine Fe, Zn, Cu, Ag, Pb ağır metallerinin etkisi araştırıldı. İnhibitör konsatrasyonu 1.43 mM kullanıldı. İnhibitör bulunmayan ortamın aktivitesi %100 kabul edildi.

Tablo 3.9: Ağır metallerin *Aspergillus niger* β -glukosidaz enzimi üzerine relative aktivitesini gösteren tablo

Ağır Metal	[I] mM	% Akt.
Fe	1.43	133.9
Cu	1.43	47.4
Pb	1.43	92.2
Zn	1.43	64.6
Ag	1.43	16.3

3.6 β -Glukosidaz Enziminin Optimum Sıcaklığının Araştırılması

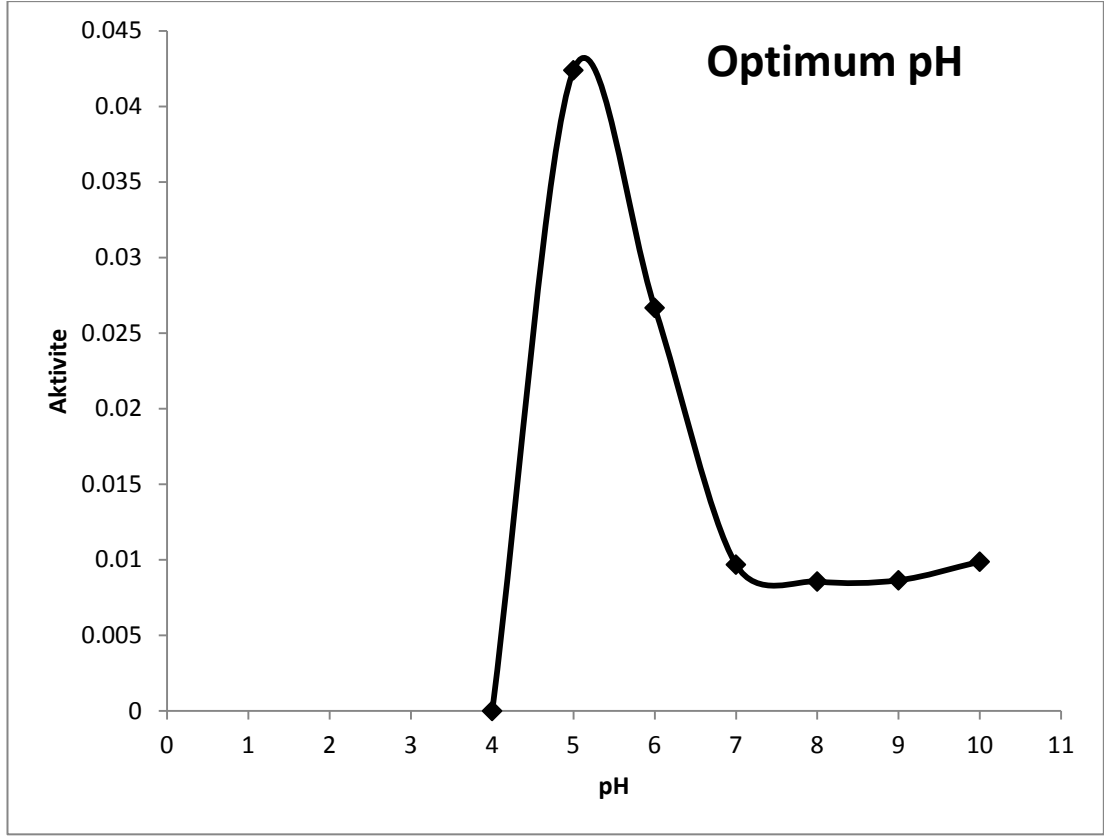
Aspergillus niger' den saflaştırılan beta-glukosidaz enziminin optimum sıcaklığını araştırmak için 25 - 85°C sıcaklık aralığında 10' ar derece aralıklarla aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre aktivite-sıcaklık grafiği çizildi.



Şekil 3.13: *Aspergillus niger* β -glukosidaz enzimine ait optimum sıcaklık grafiği

3.7 β -Glukosidaz Enziminin Optimum pH' nın Araştırılması

Aspergillus niger' den saflaştırılan beta-glukosidaz enziminin optimum pH' nı araştırmak için farklı pH derecelerinde (4-10) Na-Ac tamponları hazırlandı ve aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre aktivite-pH grafiği çizildi.



Şekil 3.14: *Aspergillus niger* β -glukosidaz enzimine ait optimum pH grafiği

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, biyoteknolojik önemi bulunan β -glukosidaz enzimi ağaç kabuğu *Aspergillus niger* fungusundan saflaştırılmış ve enzimatik özellikleri incelenmiştir. Literatüre bakıldığında funguslarla yapılan çoğu çalışmaların ticari olarak satılan suşlarla yapıldığı gözlemlenmiştir. Biz çalışmamızda *Aspergillus niger*' i, ürettiği enzimin, selülozu diğer ticari suşlarına göre daha fazla hidrolize edebileceği olasılığı nedeniyle ağaç kabuklarından izole ettik. Saflaştırma işleminde amonyum sülfat çöktürmesi ve ardından hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemleri uygulanmıştır. Saflaştırılan enzimin elektroforetik özellikleri, kinetik özellikleri incelenmiş ve bazı ağır metaller ile genel inhibitörlerinden glukoz ve δ -glukonolaktonun enzim aktivitesi üzerine etkileri belirlenmiştir.

Aspergillus niger ekstrasellüler β -glukosidazının saflaştırılması için amonyum sülfat çöktürme aralığı çalışmamızda % 0-90 olarak bulunmuş ve saflaştırma işlemlerinde ham ekstrakta % 90 amonyum sülfat tuz çöktürmesi uygulanmıştır. Yapılan çalışmalarda β -glukosidaz enziminin saflaştırılması için amonyum sülfat çöktürme aralıkları farklı kaynaklarda değişik aralıklar tespit edilmiştir. Riou ve ark.'nın yapmış olduğu bir çalışmada *Aspergillus oryzae* mantarından β -glukosidaz enzimi saflaştırılması için mantar kültür ortamına %85 (Riou vd., 1995), *Aspergillus oryzae* ile yapılan başka bir çalışmada %50-80 (Zhang vd., 2007), *Penicillium funiculosum* mantarından β -glukosidaz saflaştırılması çalışmasında %25-50 (Ramani vd, 2012), yine *Aspergillus niger* USDB0335 ile yapılan bir çalışmada amonyum sülfat çöktürme aralığı %90 olarak bulunmuştur (Yeoh vd., 1988). *Termonascus aurantiacus* mantarından β -glukosidaz saflaştırılması çalışmasında %80 (Parry vd., 2001), *Daldinia eschscholzii* mantarından β -glukosidaz saflaştırılması çalışmasında mantar kültürü süpernatantına %80 amonyum sülfat çöktürmesi uygulandığı belirtilmiştir (Karnchanatat vd., 2007). Ayrıca *Lepista flaccida* makro mantarından β -glukosidaz enzimi saflaştırılması çalışmasında %10-80 (Elvan, 2009), *Climacocystis borealis* makromantarından β -glukosidaz enziminin saflaştırılması çalışmasında da %10-90 amonyum sülfat çöktürme aralığının kullanıldığı bildirilmiştir (Demirkan, 2009). Yaptığımız çalışmada kullanılan amonyum sülfat çöktürme aralığının β -glukosidaz enziminin fungus materyallerinden

saflaştırılması sırasında kullanılan aralıklara yakın olduğu görülmektedir. Araştırmamızda amonyum sülfat çöktürmesi işlemi sonunda *Aspergillus niger* fungusundan β -glukosidaz enziminin % 24,2 verimle 1,08 kat saflaştırılmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesi sonundaki bu değerlerin, *Penicillium funiculosum* ile yapılan bir çalışmada β -glukosidaz enzimi saflaştırılmasında %27,4 verimle 35 kat (Ramani vd., 2012), *Aspergillus niger* USDB0335 ile yapılan çalışmada %97 verimle 6 kat (Yeoh vd., 1988), *Aspergillus oryzae* ile yapılan çalışmada %91 verimle 2,2 kat (Riou vd., 1998), *Aspergillus oryzae* ile yapılan başka bir çalışma da %76,8 verimle 2,3 kat (Zhang vd., 2007), *Daldinia eschscholzii* mantarından %31,83 verimle 5,32 kat (Karnchanatat vd., 2007) olduğu görülmektedir. Çalışmamızda amonyum sülfat çöktürme basamağı sonunda elde edilen saflaştırma kat sayısının belirtilen diğer çalışmalardakine yakın olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda amonyum sülfat çöktürmesi sonunda hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemleri kullanılarak iki aşamalı saflaştırma işlemi yapılmıştır. Bu şekilde iki aşamalı saflaştırma yöntemi kullanılarak enzimin aktivitesini kaybetmemesi amaçlanmıştır. Ayrıca tuz çöktürmesinden sonra hidrofobik etkileşim kromatografisi için ortamdaki tuzun uzaklaştırılması gerekmemektedir. Hidrofobik etkileşim kromatografisinde, laboratuvarımızda sentezlenmiş sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin hidrofobik jeli kullanılmıştır. Yapmış olduğumuz çalışmada hidrofobik etkileşim kromatografisi sonunda yüksek aktivite gösteren tüpler birleştirilmiş ve saf enzim olarak çalışmalarda kullanılmıştır. Araştırmamızda hidrofobik etkileşim kromatografisi sonunda söz konusu enzim %19,34 verimle 2,18 kat saflaştırılmıştır. *Aspergillus oryzae* ile yapılan bir çalışmada amonyum sülfat çöktürme işleminden sonra iyon değişim kromatografisi yapılarak enzim %12,9 verimle 12,6 kat (Zhang vd., 2007), yine *Aspergillus oryzae* ile yapılan başka bir çalışmada amonyum sülfat çöktürme işleminden sonra uygulanan jel filtrasyon ve iyon değişim kromatografisi yapılarak enzim %4,5 verimle 176,9 kat (Riou vd., 1998), *Aspergillus terreus* ile yapılan çalışmada amonyum sülfat çöktürmesi uygulanmadan iyon değişim kromatografisi sonra agaroz jel kromatografisi ve tekrar iyon değişim kromatografisi yapılarak enzim %6 verimle 125 kat (Workman ve Day, 1982), *Aspergillus niger* USDB0335 ile yapılan çalışmada amonyum sülfat çöktürmesi işleminden sonra iyon değişim kromatografisi yapılarak enzim %30 verimle 120 kat (Yeoh vd., 1988), *Phanerochaete chrysosporium* ile yapılan bir çalışmada amonyum sülfat çöktürme işlemi yapılmadan iki kez iyon değişim kromatografisi ardından jel filtrasyon ve iki

kez hızlı protein sıvı kromatografisi yapılarak enzim %1,5 verimle 129,9 kat (Lymar vd., 1995), *Penicillium funiculosum* ile yapılan çalışmada amonyum sülfat çöktürmesi işleminden sonra anyon değişim kromatografisi yapılarak enzim %3,6 verimle 19 kat (Ramani vd., 2012), *Penicillium canescens* ile yapılan çalışmada amonyum sülfat çöktürme işlemi yapılmadan iki kez iyon değişim kromatografisi ardından jel fitrasyon yapılarak enzim %133,3 verimle 121 kat (Dubrovskaya vd., 2012), *Daldinia eschscholzii* ile yapılan çalışmada amonyum sülfat çöktürme işleminden sonra iyon değişim kromatografisi, hidrofobik etkileşim kromatografisi ve jel filtrasyon yapılarak enzim %6,28 verimle 50,23 kat saflaştırılmıştır (Karnchanatat vd., 2007).

Yapmış olduğumuz çalışmada *Aspergillus niger* ekstrasellüler β -glukosidazının 19,34 verimle saflaşmış olması Lymar vd., 1995 , Karnchanatat vd., 2007, Workman ve Day, 1982), Zhang vd., 2007 çalışmalarına göre daha yüksek verim olduğu görülmüştür. Ancak saflaştırma katsayısının birçok çalışmaya göre düşük olmasının sebebi enzimi ekstrasellüler ortamdan saflaştırma olarak düşünülmüştür. Ayrıca ağaç kabuğundan izole edilmiş *A. niger* ekstrasellüler β -glukosidazının hidrofobiklik özelliğinin çok yüksek olmadığı sonucuna da ulaşılabilir.

Çalışmamızda iki basamakta saflaştırılan *Aspergillus niger*' den elde edilen β -glukosidaz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla, enzim SDS jel elektroforezi uygulanmıştır. Bizim çalışmamızda enzimin yaklaşık 70 kDa boyutunda olduğu tespit edilmiştir. *Aspergillus oryzae* ile yapılan çalışmada 77 kDa (Zhang vd., 2007), *Aspergillus oryzae* ile yapılan başka bir çalışmada 43 kDa (Riou vd., 1998), *Penicillium funiculosum* ile yapılan çalışmada 120kDa (Ramani vd., 2012), *Penicillium canescens* ile yapılan çalışmada 64 kDa (Dubrovskaya vd., 2012), *Daldinia eschscholzii* ile yapılan çalışmada 64,2 kDa (Karnchanatat vd., 2007), *Aspergillus niger* ile yapılan çalışmada 60 kDa (Junior vd., 2014), *Aspergillus niger* USDB0335 ile yapılan başka bir çalışmada 325 kDa (Yeoh vd., 1988), *Thermoascus aurantiacus* ile yapılan çalışmada 120 kDa (Parry vd., 2001) olduğu tespit edilmiştir. Fungus β -glukosidazları için SDS jel elektroforezinde görüntülenen alt birimlerin 40-480 kDa arasında olduğu belirtilmektedir (Karnchanatat vd., 2007). Yapmış olduğumuz çalışmada ağaç kabuğundan izole edilen *Aspergillus niger* ekstrasellüler β -glukosidaz enziminin SDS poliakrilamid jel elektroforezinde görüntülenen 70 kDa'luk molekül ağırlığı, literatürde yapılan farklı fungus β -glukosidaz

çalışmalarından Dubrovskaya, Karnchanatat ve Zhang'ın nın elde ettikleri değerlere yakın olduğu görülmektedir (Dubrovskaya vd., 2012, Karnchanatat vd., 2007, Zhang vd., 2007).

β -glukosidaz enziminin yapay substratlarından *p*-NPG ve *o*-NPG substratlarına karşı ilgisinin ifadesi olan K_m ve V_{max} değerleri bulunarak substrat spesifikliğı belirlenmiştir. Kinetik parametrelerin belirlenmesi çalışmalarında saflaştırılmış enzimle *p*-NPG substratı için K_m değeri 5,122 mM ve V_{max} değeri 2,71 EU olarak bulunmuş, katalitik etkinliğın ölçüsü olan V_{max}/K_m oranı 0,52 olarak hesaplanmıştır. Saflaştırılmış fungus β -glukosidaz enziminin *o*-NPG substratı için K_m değeri 17,04mM ve V_{max} değeri 52,63 EU olarak bulunmuş ve V_{max}/K_m değeri 3,09 olarak hesaplanmıştır. Araştırmamızda *Aspergillus niger*' den saflaştırılan β -glukosidaz enziminin *p*-NPG substratına karşı ilgisinin *o*-NPG substratına göre da diğeri substratlara oranla yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Literatürde yapılan β -glukosidaz enzimini substrat spesifikliğı çalışmalarında K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesinden ziyade karşılaştırmalı enzim aktivitelerinin belirlenmiş olduğu görülmektedir. *Aspergillus niger*' den saflaştırılan β -glukosidaz enziminin sellobiyoz substratına ilgisinin daha fazla olduğu belirtilmiştir (Watanabe vd., 1992). *Melanocarpus sp.* (Kaur vd., 2007) ve *Daldinia eschscholzii* (Karnchanatat vd., 2007) ile yapılan çalışmalarda söz konusu enzimin *p*-NPG substratına ilgisinin yüksek olduğu gösterilmiştir. *Thermoascus aurantiacus* ile yapılan çalışmada söz konusu enzimin sophorose substratına ilgisinin yüksek olduğu belirtilmiştir (Parry vd., 2001).

Yaptığımız çalışmada *Aspergillus niger* ekstrasellüler enziminin optimum pH' ı 5.0, optimum sıcaklığı 60°C olarak bulunmuştur. *Aspergillus oryzae* ile yapılan çalışmada optimum pH 5.0, optimum sıcaklık 50°C (Riou vd., 1995) olarak bulunmuştur. *Aspergillus niger* USDB0335 suşuyla yapılan çalışmada optimum pH 4.6, optimum sıcaklık 60°C olarak bulunmuştur (Yeoh vd., 1988). *Daldinia eschscholzii* ile yapılan çalışmada optimum pH 5.0, optimum sıcaklık 50°C olarak bulunmuştur (Karnchanatat vd., 2007). Bu anlamda elde ettiğimiz bulguların literatürdeki farklı fungus β -glukosidazlarıyla benzer olduğu görülmektedir.

β -glukosidaz enziminin genel inhibitörlerinden olan glukozun *Aspergillus niger* ekstrasellüler β -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırıldığında IC50 değerinin 17,8 mM olduğu bulunmuştur. Glukozun *p*-NPG substratı varlığındaki K_i değeri ise 0,74±0,34 olarak hesaplanmıştır. İnhibisyon tipi ise yarışmalı olarak

bulunmuştur. *Aspergillus terreus* ile yapılan bir çalışmada K_i değeri 3.5 mM olarak bulunmuştur ve glukoz inhibisyon tipinin yarışmalı olduğu belirtilmiştir (Workman ve Day, 1982). *Phanerochaete chrysosporium* ile yapılan çalışmada K_i değeri 0,27 mM, inhibisyon tipi yarışmalı olarak bulunmuştur (Lyman vd., 1995). *Penicillium funiculosum* ile yapılan çalışmada K_i değeri 1,5mM, inhibisyon tipi yarışmalı (Ramani vd., 2012); *Aspergillus niger* USDB0335 ile yapılan çalışmada K_i değeri 2,89mM, inhibisyon tipi yarışmalı (Yeoh vd., 1988); *Daldinia eschscholzii* ile yapılan çalışmada K_i değeri 0,79 mM, inhibisyon tipi yarışmalı (Karnchanatat vd., 2007); *Aspergillus oryzae* ile yapılan çalışmada K_i değeri 1,36 mM, inhibisyon tipi yarışmalı (Riou vd., 1998) olarak bulunmuştur.

Aynı çalışmada β -glukozidaz enziminin genel inhibitörlerinden olan δ -glukonolaktonun da enzim aktivitesi üzerine araştırıldığında IC50 değeri 0,67 mM olarak, inhibisyon tipi yarışmalı olarak bulunmuştur. *Phanerochaete chrysosporium* ile yapılan çalışmada K_i değeri 0,004 mM, inhibisyon tipi yarışmalı olarak bulunmuştur (Lyman vd., 1995). *Aspergillus niger* USDB0335 ile yapılan çalışmada K_i değeri 0,7 mM, inhibisyon tipi yarışmasız (Yeoh vd., 1988); *Aspergillus oryzae* ile yapılan çalışmada K_i değeri 12,5 mM, inhibisyon tipi yarışmalı (Riou vd., 1998) olarak bulunmuştur. β -glukozidaz enziminin genel inhibitörleri olarak bilinen glukoz ve δ -glukonolakton maddelerinin saflaştırılan toplam β -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine etkileri karşılaştırıldığında her iki maddenin de enzimi yarışmalı olarak inhibe ettiği fakat glukozun enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisinin δ -glukonolaktona göre daha zayıf olduğu belirlenmiştir.

Aspergillus niger ekstrasellüler β -glukozidaz enzim aktivitesini hem glukoz hem de δ -glukonolakton düşürmektedir. Ancak glukozun inhibisyon etkisinin δ -glukonolaktona göre daha düşük olduğu, dolayısıyla glukoz toleransının yüksek olduğu görülmüştür.

Aspergillus niger ekstrasellüler β -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine Fe^{+2} , Cu^{+2} , Pb^{+2} , Zn^{+2} , Ag^+ ağır metallerinin etkisi araştırılmıştır. Fe^{+2} metali hariç diğer bütün metallerin enzimi inhibe ettiği görülmektedir. *p*-NPG substratı varlığındaki enzim aktivitesi üzerine yapılan çalışmalarda Fe^{+2} nin enzim aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir. Riou ve ark. Ag^+ , Cu^{+2} , Hg^{+2} , Zn^{+2} ve Fe^{+3} , nin *Aspergillus oryzae* β -glukozidazını inhibe ettiğini bildirmişlerdir (Riou vd., 1998). Bazı metal iyonları enzimi inhibe ederken bazıları da enzim aktivasyonunu arttırıcı özellik göstermektedir. Karnchanatat vd.' nin *Daldinia eschscholzii* ile yaptığı çalışmada

Fe^{+2} 'nin enzimi aktive ettiđini bildirmiřlerdir (Karnchanatat vd., 2007). Metal iyonlarının enzimin aktif bölgesiyle iliřkili olduđu dűřünlmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

- *Aspergillus niger* β -glukosidaz enzimi Sepharose 4B-L-tirozin-1-naftilamin kimyasal yapısına sahip hidrofobik etkileşim kromatografisi jeli ile saflaştırılmıştır.
- Amonyum sülfat çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemi ile saflaştırılan fungus β -glukosidaz enzimi SDS-PAGE tekniğinde ise 70 kDa molekül ağırlığında tek bant gözlenmiş ve enzimin birbirine eşit iki alt birimden oluştuğu belirlenmiştir.
- Saflaştırılan fungus β -glukosidaz enzimi için optimum pH 5,0 ve optimum sıcaklık 60 °C olarak tespit edildi.
- Fungus β -glukosidaz enzimi üzerine Fe, Cu, Pb, Zn, ve Ag ağır metallerinin etkisi incelendiğinde Fe'in enzim aktivitesini arttırdığı, Ag metalinin güçlü bir inhibitör olduğu ve diğer metallerin ise enzimi inhibe ettiği görülmüştür.
- *Aspergillus niger*' den saflaştırılan β -glukosidaz enziminin pNPG ve oNPG, substratlarına olan ilgisi araştırılmış ve en yüksek katalitik etkinliğinin pNPG substratı varlığında olduğu tespit edilmiştir.
- β -glukosidaz enzimlerinin genel inhibitörlerinden glukoz ve δ -glukonolaktonun saflaştırılmış enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırılmış, her iki maddenin de enzimi yarışmalı olarak inhibe ettiği ve δ -glukonolaktonun inhibisyon etkisinin glukozu göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

6. KAYNAKLAR

- Adıgüzel, A. O. (2013). Biyoetanolün genel özellikleri ve üretimi için gerekli hammadde kaynakları. *BEÜ Fen Bilimleri Dergisi*, 2, 204-220.
- Akhtar, M. (1994). Biochemical pulping of aspen wood chips with three strains of *Ceriporiopsis subvermispora*. *Holzforschung*, 48, 199–202.
- Bailey, B. A. and Lumsden, R. D. (1998). Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to pathogens. (eds: G. F. Harman and C. P. Kubicek), *Trichoderma & Gliocladium—Enzymes, vol. 2 of Biological Control and Commercial Applications*, London, UK: Taylor & Francis, 327–342.
- Baker, R. A. and Wicker, L. (1996). Current and potential applications of enzyme infusion in the food industry. *Trends Food Sci Technol*, 7, 279–84.
- Bayer, E. A., Chanzy, H., Lamed, R. and Shoham, Y. (1998). Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Curr Opin Struct Biol.*, 8, 5, 548-557.
- Beguin P. and Aubert, J.P. (1994). The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Lett.*, 13, 25–58.
- Benitez, T., Limon, C., Delgado-Jarana, J. and Rey, M. (1998). Glucanolytic and other enzymes and their genes. (eds: Harman GF, Kubicek CP), *Trichoderma & Gliocladium—Enzymes, biological control and commercial applications*, London: Taylor & Francis, 2, 101–27.
- Bhat, M. K. and Bhat, S. (1995). Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnol Adv*, 15, 583–620.
- Bhat, M.K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnol. Adv.*, 18, 355–383.
- Bowen, R. M. and Harper, S. H. T. (1990). Decomposition of wheat straw and related compounds by fungi isolated from straw in arable soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 22, 393–399.

- Brown, A. J., Ogawa, K. and Wood, T. M. (1986). Studies on the preparation and regeneration of protoplasts from the cellulolytic fungus, *Penicillium pinophilum*. *Enzyme Microb Technol*, 9, 527–32.
- Caldini, C., Bonomi, F., Pifferi, P. G., Lanzarini, G. and Galante, Y. M. (1994). Kinetic and immobilization studies on fungal glycosidases for aroma enhancement in wine. *Enzyme Microb Technol*, 16, 286–91.
- Canales, A. M., Garza, R., Sierra, J. A. and Arnold, R. (1988). The application of a β -glucanase with additional side activities in brewing. *MBAA Tech Q*, 25, 27–31.
- Coughlan, M. P. (1985). The Properties of Fungal and Bacterial Cellulases with Comment on their Production and Application. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 3, 39-109.
- Dashtban, M., Maki, M., Leung, K.T., Mao, C. and Qin, W. (2010). Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30, 1–8.
- Dashtban, M., Schraft, H., Syed, T. A. and Qin, W. (2010). Fungal Biodegradation and Enzymatic Modification of Lignin. *Int J Biochem Mol Biol*, 1, 36-50.
- Demirkan, G. (2009). *Climacocystis borealis*'den β -glukozidaz enziminin saflastırılması ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, KATÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalı, Trabzon.
- Dubrovskaya, Y. V., Sova, V. V., Slinkina, N. N., Anastyuk, S. D., Pivkin, M. V. and Zvyagintseva, T. N. (2012). Extracellular β -D-Glucosidase of the *Penicillium canescens* Marine Fungus. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48, 401-408.
- Ducros, V., Czjzek, M., Belaich, A., Gaudin, C., Fierobe, H. P., Belaich, J. P., Davies, G. J. and Haser, R. (1995). Crystal structure of the catalytic domain of a bacterial cellulase belonging to family 5. *Structure*, 3, 9, 939-949.
- Elvan, H. (2009). *Lepista flaccida* (sowerby : fr.) pat. mantarından β -glukozidaz ve endoglukanaz enzimlerinin kısmiolarak saflastırılması ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, KATÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalı, Trabzon.

- Fontaine, S., Bardoux, G., Benest, D., Verdier, B., Mariotti, A., and Abbadie, L. (2004). Mechanisms of the priming effect in a Savannah Soil amended with cellulose. *Soil Science Society of America Journal*, 68, 125–131.
- Galante, Y. M., De Conti, A. and Monteverdi, R. (1998b). Application of *Trichoderma* enzymes in food and feed industries. (eds:Harman GF, Kubicek CP), *Trichoderma & Gliocladium—Enzymes, biological control and commercial applications*, London: Taylor & Francis, 2, 327–42.
- Ghose, T. K. (1987). Measurement of Cellulase Activities. *Pure & Appl. Chem.*, 59, 2, 257-268.
- Grassin, C. and Fauquembergue, P. (1996a). Fruit juices. (eds: Godfrey, T and West, S.), *Industrial enzymology*, UK:Macmillan, 2, 226–4.
- Gunata, Y. Z., Bayonove, C. L., Cordonnier, R. E. Arnaud, A. and Galzy, P. (1990). Hydrolysis of grape monoterpenyl glycosides by *Candida molischiana* and *Candida wickerhamii* β -glucosidases. *J Sci FoodAgric*, 50, 499–506.
- Harman, G. E. and Bjorkman, T. (1998). Potential and existing uses of *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement. (eds: C. P. Kubicek and G. E.Harman), *Trichoderma and Gliocladium*, 2, London, UK: Taylor and Francis, 229–265.
- Harman, G. E. and Kubicek, C. P. (1998). *Trichoderma and Gliocladium: Enzymes, vol. 2 of Biological Control and Commercial Applications*, London, UK: Taylor & Francis.
- Henrissat, B. (1991). A Classification of Glycosyl Hydrolases based on Amino Acid Sequence Similarities. *Biochem. J.*,280, 309–316.
- Henrissat, B. and Bairoch, A. (1993). New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.*, 293, 781-788.
- Henrissat, B. and Bairoch, A. (1996). Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.*, 316, 695-696.
- Henrissat, B. and Dies, G. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3, 853-859.

- Henrissat, B., (1998). Glycosidase families. *Biochem. Soc. Trans.* 26, 153–156.
- Humpf, H. U. and Schrier, P. (1991). Bound aroma compounds from the fruit and the leaves of Blackberry (*Rubus laciniata* L.). *J Agric Food Chem*, 39, 1830–2.
- Jorgensen, H., Kutter, J. P. and Olsson, L. (2003). Separation and quantification of cellulase and hemicellulases by capillary electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 317, 85-93.
- Kara, H., (2010),. β -Glukozidaz Enziminin Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile *Olea europea* Meyvesinden Saflaştırılması, karakterizasyonu ile Bazı Pestisit ve Ağır Metaller Karşı Afinitesinin Araştırılması. Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Balıkesir.
- Karita, S., Kimura, T., Saka, K. and Ohmiya K. (1997). Purification of the *Ruminococcus albus* endoglucanase IV using a cellulose-binding domain as an affinity tag. *J Ferment. Bioeng.*, 84, 354-57.
- Karnchanatat, A., Petsom, A., Sangvanick, P., Piaphukiew, J. Whalley A, Reynolds, C. and Sihanont P. (2007). Purification and chemical characterization of an beta-glucosidase from the food decaying fungus *Daldinia eschscholzii*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 270, 162-170.
- Klich, M.A. (2002). *Identification of Common Aspergillus Species*. Netherlands: Centraal Bureau voor Schimmelcultures.
- Kuhad, R. C., Gupta, R. Singh, A. (2011). Microbial Cellulases and Their Industrial Applications, *Review Article*, 2011, 1-10.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Leatham, G., Myers, G. and Wegner, T. (1990). Biochemical pulping of aspen chips: energy savings resulting from different fungal treatments. *Tappi J*, 73, 197–200.
- Ledger, T.N., Jaubert, S., Bosseluta, N., Abada, P. and Rosso, M.N. (2006). Characterization of a new β -1,4-endoglucanase gene from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and evolutionary scheme for phytonematode family 5 glycosyl hydrolases. *Gene*, 382, 121-128.

- Lorito, M., Hayes, C. K., Di Pietro, A., Woo, S. L. and Harman, G. E. (1994). Purification, characterisation, and synergistic activity of a glucan-1,3-glucosidase and N-acetyl-b-glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Phytopathol*, 84, 398–405.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Lymar, E. S., Li, B. and Renganathan, V. (1995). Purification and Characterization of a Cellulose-Binding (beta)-Glucosidase from Cellulose-Degrading Cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 2976-2980.
- Mandels, M., Andreotti, R. and Roche, C. (1976). Measurement of saccharifying cellulose. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 6, 21-33.
- Marlatt, C., Ho, C. T. and Chien, M. (1992). Studies of aroma constituents bound as glycosides in tomato. *J Agric Food Chem*, 40, 249–52
- Nelson, N. (1944). A Photometric Adaptation of the Somogyi Method for the Determination of Glucose. *J. Biol. Chem.*, 153, 375-380.
- Nelson, N.D. and Cox, M.M. (2004). *Lehninger Principles of Biochemistry*. Newyork, NY. USA : W.H Freeman ve Company,. 280-306.
- Noe, P., Chevalier, J., Mora, F. and Comtat, J. (1986). Action of enzymes in chemical pulp fibres. Part II: enzymatic beating. *J Wood Chem Technol*, 6, 167–84.
- Ohmiya, K., Sakka, K., Karita, S. and Kimura, T. (1997). Structure of Cellulases and Their Applications. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 14, 365-414.
- Ortiz Escobar, M. E. and Hue, N. V. (2008). Temporal changes of selected chemical properties in three manure—amended soils of Hawaii. *Bioresource Technology*, 99, 8649–8654.
- Parry, N. J., Beever, D. E., Owen, E., Vandenberghe, I. and Beeumen, J. V. (2001). Biochemical characterization and mechanism of a thermostable β -glucosidase purified from *Thermoascus auranticus*. *Biochem J*. 353, 117-127.

- Pommier, J. C., Fuentes, J. L. and Goma, G. (1989). Using enzymes to improve the product quality in the recycled paper industry Part 1: the basic laboratory work. *Tappi J*, 72, 187–91.
- Poutanen, K. (1997). Enzymes: an important tool in the improvement of the quality of cereal foods. *Trends Food Sci Technol*, 8, 300–6.
- Ramani, G., Meera, B., Vanitha, C., Rao, M. and Gunasekaran, P. (2012). Production, Purification, and Characterization of a β -Glucosidase of *Penicillium funiculosum* NCL1. *Appl Biochem Biotechnol*, 167, 959–972.
- Riou, C, Salmon J. M., Vallier, M. J., Gunata, Z. and Barre, N. (1998). Purification, Characterization, and Substrate Specificity of a Novel Highly Glucose- Tolerant β -Glucosidase from *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3607–3614.
- Robyt, J. F. and White, B. J. (1990). Biochemical Techniques Theory and Practice. *Waveland Pres*, 10, 407.
- Sandgren, M. (2003). Structural and Functional Studies of Glycoside Hydrolase Family 12 Enzymes from *Trichoderma reesei* and other Cellulolytic Microorganisms, Ph.D Thesis, *Uppsala University*, Sweden.
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J.C. and van Dijck, P. W. M. (2002). On the safety of *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 59, 426–435.
- Seiboth, B., Ivanova, C., Seiboth, V. (2011). *Trichoderma reesei*: A Fungal Enzyme Producer for Cellulosic Biofuels”. (ed: Marco Aurelio Dos Santos Bernardes), *Biofuel Production-Recent Developments and Prospects*, Intech, 309-340.
- Silva, D. M., Batista, L. R., Rezende, E. F., Fungaro, M. H. P., Sartori, D. and Alves, E. (2011). Identification of Fungi of the Genus *Aspergillus* section *nigri* Using Polyphasic Taxonomy. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 761-773.
- Sinan, S., Kockar and F., Arslan, O. (2006). Novel purification strategy for human PON1 and inhibition of the activity by cephalosporin and aminoglikozide derived antibiotics. *Biochimie* 88, 565–574.

- Singh, A., Kuhad, R.C., Ward, O. P. (2007). Industrial application of microbial cellulases. (eds: R. C. Kuhad and A. Singh), *Lignocellulose Biotechnology:Future Prospects*, New Delhi, India : I.K.International Publishing House, 345–358.
- Somogyi, M. (1952). Notes on Sugar Determination. *J. Biol. Chem.*, 195, 19-23.
- Sukumuran, R. K., Singhania, R. R. and Pandey, A. (2005). Microbial Cellulases. *Journal of Sciencitific & Industrial Research*, 64, 832-844.
- Suto, M. and Tomita, F. (2001). Induction and Catabolite Repression Mechanism of Cellulase in Fungi. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92, 305-311.
- Tejada, M., Gonzalez, J. L., Garcia-Martinez, A. M. and Parrado, J. (2008). Application of a green manure and green manure composted with beet vinasse on soil restoration: effects on soil properties. *Bioresource Technology*, 99, 4949–4957.
- Tinder, P. (1969). Determination of Blood Glucose Using 4-amino phenazone as Oxygen Acceptor. *J Clin Pathol.*, 22, 246.
- Tiwari, V. N., Pathak, A. N. and Lehri, L. K. (1987). Effect of plant waste incorporation by different methods under uninoculated and inoculated conditions on wheat crops. *Biological Wastes*, 21, 267–273.
- Tomme, P., Warren, R.A.J. and Gilkes, N.R. (1995b). Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Advances in Microbial Physiology*, 37, 1-81.
- Turan, A. (2011). *Armillaria mellea*’ dan β -Glukozidaz Enziminin Kısmi Olarak Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, KATÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalı, Trabzon.
- Van, C. and Block, D. (2010). Cellulose [online]. (4 Haziran 2010), <https://myorganicchemistry.wikispaces.com/Cellulose>.
- Wallace, R.J. (1994). Ruminant microbiology, biotechnology and ruminant nutrition: progress and problems. *J. Anim. Sci.*, 72, 2992–3003.
- Wang, Y., Yuana, H., Wang, J. and Yua, Z. (2009). Truncation of the cellulose binding domain improved thermal stability of endo- β -1,4-glucanase from *Bacillus subtilis* JA18. *Bioresource Technol.*, 100, 345-349.

- Watanabe, T., Sato, T., Yoshioka, S., Koshijima, T. and Kuwahara, M. (1992). Purification and properties of *Aspergillus niger* β -glucosidase. *Eur. J. Biochem.* 209, 651 -659
- Whitaker, J. R., Voragen, A. G. J. and Wong, D. W. S. (2003). *Handbook of Food Enzymology*. New York: Marcel Dekker, 122, 791-803.
- Wilson, D. B. (2011). Microbial Diversity of Cellulose Hydrolysis. *Current Opinion in Microbiology*, 14, 1–5.
- Wilson, D. B. (2012). Processive and Nonprocessive Cellulases for Biofuel Production-Lessons from Bacterial Genomes and Structural Analysis. *Appl Microbiol Biotechnol*, 93, 497–502.
- Workman, E.W. and Day, F.D. (1982). Purification and Properties of β -Glucosidase from *Aspergillus terreus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 44, 1289-1295.
- Xi, J., Du, W. and Zhong, L. (2013). Probing the Interaction Between Cellulose and Cellulase with a Nanomechanical Sensor. (eds: T. V. de Ven and L. Godbout), *Cellulose-Medical, Pharmaceutical and Electronic Applications*, InTech, 125-140.
- Yeoh, H. H., Tan, T. K., Chua, S. L. and Lim, G. (1988). The Properties of β -glucosidase Purified from *Aspergillus niger*. *Mircen Journal*, 4, 425-430.
- Zhang, X. Z. and Zhang, Y. H. P. (2013). Cellulases: Characteristics, Sources, Production, and Applications. (eds: S. T. Yang, H. A. El-Enshasy, and N. Thongchul), *Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers*, New Jersey: John Wiley & Sons, 1, 131-144.

EKLER

7. EKLER

EK A