

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

***Lepista flaccida* (Sowerby : Fr.) Pat. MANTARINDAN β -GLUKOZİDAZ VE
ENDOGLUKANAZ ENZİMLERİNİN KISMİ OLARAK SAFLAŞTIRILMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hamide ELVAN

TEMMUZ 2009

TRABZON

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

***Lepista flaccida* (Sowerby : Fr.) Pat. MANTARINDAN β -GLUKOZİDAZ VE
ENDOGLUKANAZ ENZİMLERİNİN KİSMİ OLARAK SAFLAŞTIRILMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

Kimyager Hamide ELVAN

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"Yüksek Lisans (Kimya)"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 22.06.2009
Tezin Savunma Tarihi : 10.07.2009**

**Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ahmet ÇOLAK
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Faik Ahmet AYZAZ**

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Salih TERZİOĞLU

Trabzon 2009

ÖNSÖZ

“*Lepista flaccida*’dan β -glukozidaz ve endoglukanaz enzimlerinin kısmi olarak saflaştırılması ve karakterizasyonu” adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Yüksek Lisans tez danışmanlığımı üstlenerek bu çalışmanın planlanıp değerlendirilmesinde yardımını ve ilgisini esirgemeyen, sürekli anlayış ve yardımını gördüğüm değerli hocam sayın Yrd. Doç.Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA’ya, Biyokimya bilimini tanımadamda ve bu alanda çalışmayı seçmemde büyük katkıları olan değerli hocam sayın Doç. Dr. Ahmet ÇOLAK’a, tezin hazırlanmasında ve geliştirilmesinde büyük katkıları olan Arş. Gör. Melike YILDIRIM’a ve Öğr. Gör. Dr. Yakup KOLCUOĞLU’na, çalışmalar esnasında kullandığımız mantarların toplanmasında ve tanımlanmasında yardımcı olan sayın Prof. Dr. Ertuğrul SESLİ’ye ve Biyokimya Lisansüstü Araştırma Laboratuvarındaki arkadaşlarıma teşekkürü ve minneti bir borç bilirim.

Maddi ve manevi desteğini, ilgisini, sevgisini ve sabrını eksik etmeyen aileme çok teşekkür ederim. Hakkınızı ödeyemem, sizleri çok seviyorum. Sizlere sahip olduğum için çok şanslıyım.

Hamide ELVAN
Trabzon 2009

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER	III
ÖZET	VI
SUMMARY	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ	IX
SEMBOLLER DİZİNİ	X
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Selülozun Yapısı ve Özellikleri	2
1.3. Selülazların Yapısal Özellikleri	3
1.4. Selülazların Organizasyonu ve Sınıflandırılması	4
1.5. Selülazların Genel Reaksiyon Mekanizması	6
1.6. Selülaz Üretiminin İndüklenmesi ve İnhibisyonu	7
1.7. Selülaz Aktivite Tayin Yöntemleri	7
1.7.1. Endoglukonaz Aktivitesi	8
1.7.2. Ekzoglukanaz Aktivitesi	8
1.7.3. β -Glukozidaz Aktivitesi	10
1.8. Selülazların Bulunduğu Organizmalar	10
1.9. Selülazların Uygulama Alanları	14
1.10. <i>Lepista flaccida</i> Makromantarının Özellikleri	16
1.11. Çalışmanın Amacı	17
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	19
2.1. Kullanılan Materyaller	19
2.1.1. Cihazlar	19
2.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler	20
2.1.3. Çözeltiler ve Tamponlar	20

2.1.3.1. Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	20
2.1.3.2. Protein Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler.....	21
2.1.3.3. Tampon Çözeltiler	22
2.1.3.4. Substrat Çözeltileri ve Enzim Aktivitesi Tayininde Kullanılan Diğer Çözeltiler	23
2.2. Deneysel Çalışmalar	24
2.2.1. Ham Enzim Özütünün Hazırlanması.....	24
2.2.2. Enzim Aktivitesinin Tayini	24
2.2.3. Amonyum Sülfat Çöktürmesi.....	25
2.2.4. Amonyum Sülfat ile Kısmi Saflaştırma ve Diyaliz.....	25
2.2.5. Protein Tayini	26
2.2.6. Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE) ile β -Glukozidaz Aktivitesinin Ortaya Konulması.....	26
2.2.7. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi	27
2.2.8. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	27
2.2.9. pH Kararlılığının İncelenmesi	28
2.2.10. Isıl Kararlılığın İncelenmesi	28
2.2.11. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi.....	28
2.2.12. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi	29
2.2.13. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasalların Etkisinin İncelenmesi	29
3. BULGULAR	30
3.1. Ham Enzim Özütünün Hazırlanması.....	30
3.2. Amonyum Sülfat Çöktürmesi.....	31
3.3. Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE).....	32
3.4. Kısmi Olarak Saflaştırılan β -Glukozidaz ve Endoglukanaz Enzimlerinin Biyokimyasal Olarak Karakterizasyonu	32
3.4.1. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisinin İncelenmesi	33
3.4.2. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi	34
3.4.3. pH Kararlılığının İncelenmesi	35
3.4.4. Isıl Kararlılık	37
3.4.5. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisinin İncelenmesi ...	39
3.4.6. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisinin İncelenmesi	41
3.4.7. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasalların Etkisinin İncelenmesi	42
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	44

5.	ÖNERİLER	52
6.	KAYNAKLAR.....	54
ÖZGEÇMİŞ		

ÖZET

Bu çalışmada, Trabzon'un Hıdırnebi Yaylası'ndan toplanan *Lepista flaccida* makromantarından β -glukozidaz ve endoglukanaz enzimleri kısmen saflaştırıldı ve karakterize edildi. Farklı pH'larda tamponlar kullanılarak hazırlanan ham özütlerde β -glukozidaz ve endoglukanaz aktiviteleri bakılarak en uygun ekstraksiyon pH'ları belirlendi. Hazırlanan ham özütte ve amonyum sülfat çöktürmesi sonrası elde edilen çözeltide β -glukozidaz varlığı doğal poliakrilamid jel elektroforezi ve substrat boyaması ile ortaya konuldu. Ham özütte üç bandın varlığı gözlenirken, çöktürme sonrası elde edilen çözeltide bu bantlardan sadece bir tanesinin olduğu gözlemlendi. Ayrıca *L. flaccida* mantarından hazırlanan ham özütler gradientli amonyum sülfat çöktürme yöntemi ile çöktürülüp her bir enzim için spesifik aktivitelerin en yüksek olduğu konsantrasyonlar tespit edildi. β -Glukozidaz için %20, 30 ve 40 ve endoglukanaz için %70-80'lik çöktürmeler sonrası elde edilen çözeltide en yüksek spesifik aktivite ve saflaştırma katsayılarına ulaşıldığı tespit edildi. Kısmen saflaştırılan enzimler biyokimyasal olarak karakterize edildi. Her iki enzim için optimum pH değeri 4,0 olarak bulundu. Optimum sıcaklık değeri ise β -glukozidaz için 60 °C, endoglukanaz için 50 °C olarak bulundu. Enzimlerin pH kararlılıkları incelendiğinde endoglukanazın β -glukozidaza nazaran daha kararlı olduğu görüldü. Enzimlerin ısıl kararlılık profilleri incelendiğinde ise β -glukozidazın özellikle düşük sıcaklıklarda 48 saat sonunda kararlılığını endoglukanaza göre daha çok koruduğu görüldü. Yapılan kinetik çalışmalar sonucu β -glukozidaz için *p*NPG substratı varlığında V_{maks} ve K_m değerleri sırası ile 5,78 nmol.dak⁻¹mg⁻¹ protein ve 1,06 mM olarak, endoglukanaz için ise CMS varlığında $[S]_{0,5}$ veya $K_{0,5}$ değeri 7,7 mg/mL, V_{maks} değeri 25 μ mol.dak⁻¹mg⁻¹ protein olarak bulundu. Ayrıca bazı metal iyonları ve kimyasal maddelerin her iki enzim aktivitesini de farklı şekillerde etkilediği tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: *Lepista flaccida*, β -Glukozidaz, Endoglukanaz, Selülaz, Kısmi Saflaştırma, Karakterizasyon

SUMMARY

Partial Purification and Characterization of β -glucosidase and Endoglucanase from *Lepista flaccida* (Sowerby : Fr.) Pat.

In this study, β -glucosidase and endoglucanase were partially purified and characterized from *Lepista flaccida* mushroom picked up at Hıdırnebi Plateau in Trabzon, Turkey. The activity of β -glucosidase and endoglucanase were determined in the crude extracts prepared by using buffers having different pH values and the suitable buffers were chosen for the extraction. The presences of β -glucosidase in the crude enzyme extract and in the solution obtained after ammonium sulfate precipitation were put forward by native polyacrylamid gel electrophoresis. While three bands were observed in the crude extract a single band was observed after ammonium sulfate precipitation. Besides, the crude extract from *L. flaccida* mushroom was gradient precipitated by ammonium sulfate and the specific activities of the enzymes calculated. The highest β -glucosidase and endoglucanase activities were determined at 20, 30, 40% and 70-80% ammonium sulfate concentration, respectively. Partially purified enzymes were biochemically characterized. The optimum pH values for the both enzymes were found to be 4.0. Optimum temperatures for β -glucosidase and endoglucanase were found to be 60 °C and 50 °C, respectively. When the pH stability of each enzyme was examined, it was seen that endoglucanase was more stabile then β -glucosidase. When the thermal stability profiles of the enzymes were investigated, it was observed that β -glucosidase conserved its activity more then endoglucanase at especially low temperatures. V_{max} and K_m values of β -glucosidase in presence of *p*NPG were found to be 5.78 nmol.min⁻¹mg⁻¹ protein and 1.06 mM, respectively. For endoglucanase, $[S]_{0.5}$ or $K_{0.5}$ and V_{max} in the presence of CMC 7.7 mg/ml and 25 μ mol.min⁻¹.mg⁻¹ protein, respectively. Also, some metal ions and chemicals were effected enzymes activities in different ratio.

Key Words: *Lepista flaccida*, β -glucosidase, Endoglucanase, Cellulase, Partial Purification, Characterization

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Selüloz molekülünün yapısı	2
Şekil 2. <i>T. reesei</i> 'deki CBH I ve II'nin yapısal gösterimi.....	4
Şekil 3. Selülaz enzim sisteminin selülozu hidrolizlemesinin şematik olarak gösterimi.....	9
Şekil 4. <i>Lepista flaccida</i> mantarının früktofikasyon organları.....	17
Şekil 5. Farklı pH'larda hazırlanmış <i>L. flaccida</i> ham özütlerindeki β -glukozidaz enziminin doğal jel elektroforez profili	30
Şekil 6. Amonyum sülfat çöktürmesi sonrası elde edilen enzim özütündeki β -glukozidaz aktivitesinin doğal jel elektroforez görüntüsü	32
Şekil 7. <i>Lepista flaccida</i> 'dan kısmen saflaştırılan β -glukozidaz enzimine ait %bağlı aktivite-pH grafiği	33
Şekil 8. <i>Lepista flaccida</i> 'dan kısmen saflaştırılan endoglukanaz enzimine ait %bağlı aktivite- pH grafiği	34
Şekil 9. <i>Lepista flaccida</i> 'dan kısmen saflaştırılan β -glukozidaz enzimine ait %bağlı aktivite-sıcaklık grafiği	35
Şekil 10. <i>L. flaccida</i> 'dan kısmen saflaştırılan endoglukanaz enzimine ait %bağlı aktivite-sıcaklık grafiği	35
Şekil 11. <i>Lepista flaccida</i> 'dan kısmen saflaştırılan β -glukozidaz enzimine ait %kalan aktivite-pH grafiği	36
Şekil 12. <i>Lepista flaccida</i> 'dan kısmen saflaştırılan endoglukanaz enzimine ait %kalan aktivite-pH grafiği	37
Şekil 13. <i>Lepista flaccida</i> 'dan kısmen saflaştırılan β -glukozidaz ve endoglukanaz enzimlerine ait 30 dakika sonunda elde edilen %kalan aktivite-sıcaklık grafiği	38
Şekil 14. <i>Lepista flaccida</i> 'dan kısmen saflaştırılan β -glukozidaz enzimine ait %kalan aktivite-sıcaklık grafiği	38
Şekil 15. <i>Lepista flaccida</i> 'dan kısmen saflaştırılan endoglukanaz enzimine ait %kalan aktivite-sıcaklık grafiği	39
Şekil 16. <i>pNPG</i> varlığında β -glukozidazın substrat doygunluk eğrisi	40
Şekil 17. <i>CMS</i> varlığında endoglukanazın substrat doygunluk eğrisi	40
Şekil 18. <i>pNPG</i> varlığında β -glukozidaz aktivitesi için Lineweaver-Burk eğrisi.....	41

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Fungal selüloz bileşenleri ve selüloz zinciri üzerindeki etkileri	6
Tablo 2. Selüloz üreten mikroorganizmalar	11
Tablo 3. Bazı organizmalardan saflaştırılan β -glukozidaz enzimlerinin biyokimyasal ve kinetik özellikleri.....	12
Tablo 4. Bazı organizmalardan saflaştırılan endoglukanaz enzimlerinin biyokimyasal ve kinetik özellikleri.....	13
Tablo 5. Kullanılan cihazlar	19
Tablo 6. Kullanılan kimyasal madde ve malzemeler	20
Tablo 7. Doğal PAGE bileşenleri	27
Tablo 8. <i>Lepista flaccida</i> 'dan hazırlanan ham enzim özütlerinde β -glukozidaz ve endoglukanaz enzimlerinin farklı pH'lardaki ekstraksiyonlarının % bağlı aktivite sonuçları	31
Tablo 9. <i>Lepista flaccida</i> β -glukozidazı ve endoglukanazı için amonyum sülfat çöktürmeleri	31
Tablo 10. <i>Lepista flaccida</i> 'dan kısmen saflaştırılan β -glukozidaz ve endoglukanaz enzim aktiviteleri üzerine bazı metal iyonlarının etkisi.....	42
Tablo 11. <i>Lepista flaccida</i> 'dan kısmen saflaştırılan β -glukozidaz ve endoglukanaz enzim aktiviteleri üzerine bazı kimyasalların etkisi	43

SEMBOLLER DİZİNİ

APS	: Amonyum persülfat
BSA	: Bovin serum albumin (Sığır Serum Albumini)
CMS	: Karboksimetil selüloz
CBD	: Selüloz bağlanma bölgesi
CBH	: Sellobiyohidrolaz
DNS	: 3,5-Dinitrosalisilikasit
E.C.	: Enzim kod numarası
EDTA	: Etilendiamin tetraasetikasit
mM	: Milimolar
MUG	: 4- Metilbelliferil- β -D-glukopiranozit
nmol	: Nanomol
PAGE	: Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi
<i>p</i> NPG	: 4-Nitrofenil- β -D-glukopranozit
[S]	: Substrat konsantrasyonu
[S] _{0,5} veya $K_{0,5}$: Bir enzim tarafından katalizlenen tepkimenin yarı en yüksek hızındaki substrat derişiminin
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TEMET	: N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
Tris	: Tris (hidroksimetil) aminometan
V_{maks}	: Maksimum Hız
μ mol	: Mikromol
μ M	: Mikromolar
K_m	: Michaelis-Menten sabiti

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

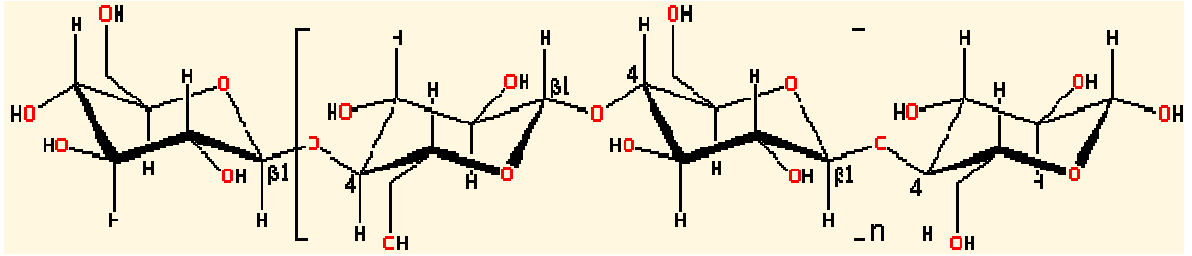
Gen ve protein mühendisliğini de içine alan biyoloji ve kimya alanlarında son yıllarda sağlanan önemli ilerlemeler, canlılığın temeli hakkında aydınlatılmayı bekleyen konulara ışık tutmakta, ayrıca elde edilen bilimsel veri ve sonuçların değerlendirilerek, sağıktan gıdaya kadar birçok alanda pratikte kullanımı sağlanmaktadır. Kaydedilen bu gelişme ve ilerlemelere paralel olarak canlı sistemlerde bulunan biyomoleküllerin (proteinler, enzimler, hormonlar vs.) insanlığın yararına farklı alanlarda kullanımı günden güne artmaktadır. Enzimler, doğanın katalizörleridirler ve dolayısıyla enzimsiz bir hayatın var olması düşünülemez. Bu yüzden enzimlerin özelliklerinin ve davranış biçimlerinin yaklaşık 200 yıldır inceleniyor olması sürpriz değildir. Endüstride enzim kullanımının gün geçtikçe yaygınlaşması, çok değişik kaynaklardan enzimlerin saflaştırılması ve karakterizasyonunu da beraberinde getirmektedir (Ertunga, 2006).

Hidrolaz sınıfına ait enzimler olan selülazlar selülozun glukozu kadar parçalanmasını sinerjik olarak katalizleyen enzim sistemine verilen isimdir. Selülazlar temelde 3 farklı enzimden meydana gelmektedir. Bunlar; selülozun iç β -1,4-glikozidik bağlarını hidrolizle keserek yeni zincir uçlarının oluşmasını sağlayan endoglukanazlar, oluşan bu yeni selüloz zincirlerini uçlarından keserek çözünür sellobiyoz birimlerini oluşturan ekzoglukanazlar ve çözünür sellobiyoz birimlerini glukoz birimlerine hidrolizleyen β -glukozidazlardır (Bhat ve Bhat, 1997). Selülazların biyoteknolojisi 1980'li yılların başında başlamış, öncelikle hayvan yemi ve takiben de gıda sanayinde kullanılmaya başlanmıştır. Artık bu enzimler tekstil, deterjan, kağıt, küspe gibi bir çok endüstri dalında da kullanılmaktadır. Bugün selüloz parçalayıcı enzimler dünya pazarının %20'sine sahiptir (Bhat, 2000).

Bu çalışmanın amacı, yenilebilir bir makromantar türü olan *Lepista flaccida*'daki ticari ve endüstriyel öneme sahip endoglukanaz ve β -glukozidaz enzimlerinin kısmi saflaştırılması, biyokimyasal olarak karakterizasyonudur.

1.2. Selülozun Yapısı ve Özellikleri

Selüloz glukozun β -1,4-glikozidik bağlarla birlikte bağlı olduğu doğrusal bir polimerdir (Şekil 1). 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 arası ve zincir içindeki hidrojen bağlarıyla sabitlenen yapı düzgün, durağan ve sağlam bir supramoleküler lif oluşturur (Nelson, 2004; Beguin ve Aubert, 1994).



Şekil 1. Selüloz molekülünün yapısı (URL-1, 2009).

Kompleks ve yoğun oluşu selülozu başlıca kimyasal ve mekaniksel yıkım ya da şişmelerin harici durumlarda hidrolize oldukça dirençli yapar. Doğal selüloz genellikle ksilan ya da lignin gibi diğer polisakaritlerle birlikte bulunur ve bitki hücrelerinin iskeletini oluştururlar (URL-2, 2009).

Selüloz doğada en bol bulunan yenilenebilir enerji, gıda, yakıt ve kimyasal maddelerin organik kaynağıdır. Bu biyomolekül insanlar tarafından yüzyıllardır farklı amaçlar için kullanılmaktadır. Bu polimerin kullanılabilirliği onun glukozu hidroliz olmasına bağlıdır. Selülozun yenilenebilir bir enerji kaynağı olarak önemli bir potansiyele sahip olması, selülaz parçalayıcı enzimler ya da selülazlar ortaya çıktıktan sonra olmuştur. Pahalı olmayan selüloz atıklarının etkili bir şekilde muamelesi ve işlenmesi ile ilgili yeni metodlar geliştirmesi günümüzde ekonomik açıdan oldukça önemlidir. Selülazlar selülozik biyokütlenin etkili bir şekilde işlenmesinde kilit role sahiptirler (Bhat, 2000).

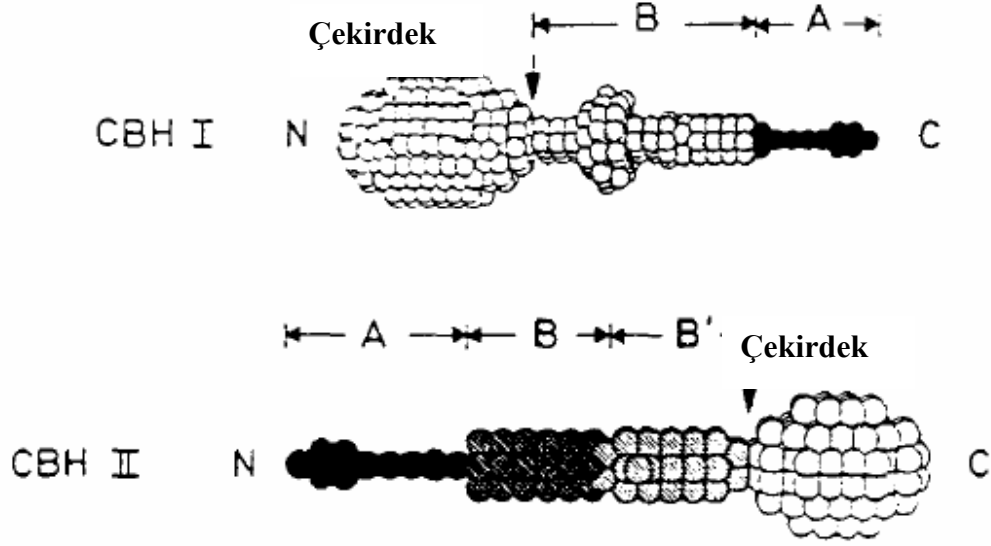
1.3. SelülaZların Yapısal Özellikleri

Çözünmeyen polisakkaritlerin etkili enzimatik yıkımı enzim ve substratı arasında kuvvetli bir bağlanmayı gerektirir. Tipik olarak bakteriyel ve fungal selülaZlar en az bir selüloz bağlanma bölgesi (CBD) ve bir katalitik bölgeden oluşur. İki birim bağımsız olarak hareket eder. Katalitik birim substratın hidrolizini katalizlerken, CBD'ler ise selülaZ ve selüloz arasındaki bağlantıyı sağlar (Wang vd., 2009). Farklı olarak termit, kerevit ve midye gibi omurgasızlar tarafından üretilen selülaZlar ise bağlayıcı ve CBD'lerden yoksundurlar (Ledger vd., 2006). SelülaZlara ilave olarak ksilanazlarda ve α -L-arabinofuranozid, asetilksilan esteraz ve β -mannaz gibi diğer bitki duvarlarını hidroliz eden enzimlerde de CBD'ler bulunur. CBD'nin bağlama gücü orijinine göre farklılık gösterir (Karita vd., 1997).

Kompleks olmayan mantar selülaZlarından farklı olarak, anaerobik mikroorganizmalar selülozomlar olarak isimlendirilen kompleks selülaZ sistemlerine sahiptir. Ayrıca anaerobik selüloz yıkımı toplam selüloz yıkımının sadece %5-10'unu oluşturmaktadır. SelülaZ aktivitesinin en genel durumunda, enzim kompleksi selülozu β -glukoza parçalar. Bu tip selülaZlar başlıca otçulların geniş getirme bölgesindeki simbiyotik bakteriler tarafından üretilir. Geviş getiren hayvanlar dışında, insan ve birçok hayvan vücutlarında selülaZ üretemezler ve bu yüzden bitki materyalindeki enerjinin çoğu bu canlılar için kullanılamazdır. Hemiselülozu hidrolizleyen enzimler ise genel olarak selülaZlar altında sınıflandırılır ve çoğunlukla hemiselülaZ olarak ifade edilirler. Lignini kesen enzimler de çoğunlukla selülaZ enzim sınıfına dahildir, fakat bu durum çoğunlukla doğru değildir (Chapin vd., 2002).

CBH I ve II'nin *T. reesei*'deki yapısı X-ışını analizi ile belirlenmiştir. Her iki enzimin de izotropik bir baş ve uzun esnek bir kuyrukla, kurbağa yavrusuna benzer bir şekle sahip olduğu bulunmuştur (Şekil 2). *T. reesei*'deki CBH II enzimi bir α/β proteini dir. CBH II'nin aktif bölgesi, β -paralel tabakanın karboksi terminal ucunda lokalize olmuştur. Enzimin tünelimsi merkezinde bulunan iki aspartik asit birimi büyük ihtimalle katalitik birimlerdir. CBH I'de ise aktif bölge tüneli CBH II β -yapısından iki kat daha uzundur ve yedi glikozid birimiyle bağlandığı tahmin edilmektedir. Katalitik birimlerin glutamik asitten oluştuğu düşünülmektedir. Oysaki CBH I enzimi selüloz zincirinin indirgen uçlarından selülozu keser ve sellobiyoz birimlerini açığa çıkarır. CBH II ise indirgen olmayan uçlardan aynı substratı hidrolizler. CBH I ve II sırasıyla Aile 7 ve 6'ya aittir.

Endoglukanaz ve ekzo glukanazlar arasındaki ana farklılık substratın aktif bölgeye ulaşabilme derecesidir (Bhat ve Bhat, 1997).



Şekil 2. *T. reesei*'deki CBH I ve II'nin yapısal gösterimi (Bhat ve Bhat, 1997).

1.4. Selülazların Organizasyonu ve Sınıflandırılması

Tüm selülazların katalitik birimleri toplam proteinlerinin % 70'inden daha fazlasını oluşturur. Sıra analizine dayanarak yapılan bölge 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 vd., 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 stereoseçimlilik gösterir. Oysaki, 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 farklı aileler altında sınıflandırılması eğer bir aile üyesinin yapısı biliniyorsa,

aynı ailedeki enzimlerin üç boyutlu yapılarının tahmin edilmesine yardımcı olabilir (Bhat ve Bhat, 1997).

Katalizlediği reaksiyonun tipine göre ise beş genel tip selülaz enzimi vardır;

1. Endo-Selülaz (EC 3.2.1.4, Endoglukanaz, Karboksimetil Selülaz, Endo-1,4- β -D-Glukanaz); Selülozun kristal yapısını bozarak içindeki bağları parçalar ve ayrı ayrı selüloz polisakkarit zincirlerini açığa çıkarır.
2. Ekzo-selülaz (EC 3.2.1.91, Ekzoglukanaz, Sellobiyohidrolaz, ekzo-1,4- β -D-glukanaz); Endo-selülaz tarafından üretilen zincirlerin uçlarından 2–4 birim keser ve sellobiyoz gibi disakkaritler ya da tetrasakkaritleri oluşturur. Başlıca iki tür ekzo-selülaz vardır; birinci türü selülozun indirgen uçlarında, diğeri ise selülozun indirgen olmayan uçlarında etkindir.
3. β -Glukozidaz (EC 3.2.1.21, Sellobiyaz, β -Glukozid Glukohidrolaz); Ekzo-selülazın ürünlerini ayrı ayrı monosakkaritlere hidroliz eder.
4. Oksidatif selülazlar; Selülozu radikal reaksiyonlarla depolimerize ederler, örneğin sellobiyoz dehidrojenaz gibi.
5. Selüloz fosforilazlar; Su yerine fosfatı kullanarak selülozu depolimerize ederler (Chapin vd., 2002).

Bu enzim sınıfları içinde aşamalı ve aşamalı olmayan tipler vardır. Aşamalı selülazlar sürekli tek bir polisakkarit zinciri ile etkileşimini sürdürür, aşamalı olmayan selülazlar ise bir polisakkarite önce bağlanıp sonra ayrılırlar ve daha sonra başka bir polisakkarite bağlanırlar (Chapin vd., 2002). Bu enzimlerden ilk üç tanesinin genel özellikleri Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Fungal selülaaz bileşenleri ve selüloz zinciri üzerindeki etkileri (Ryu ve Mandel, 1980; Bhat ve Bhat, 1997).

Enzim Tipi	EC Kodu	Diğer Adı	Etki Şekli
Endo-(1,4)-β-D-glukanaz	EC 3.2.1.4	Endoglukanaz veya endoselülaaz	$\begin{array}{c} -G-G-G-G- \\ \uparrow \quad \uparrow \\ \text{Bağları rastgele keser} \end{array}$
Ekzo-(1,4)-β-D-glukanaz	EC 3.2.1.91	Sellobiyohidrolaz veya ekzoselülaaz	$\begin{array}{c} -G-G-G-G- \\ \uparrow \\ \text{İndirgen ya da indirgen olmayan uçlardan sellobiyoz açığa çıkarır} \end{array}$
Ekzo-(1,4)-β-D-glukanaz	EC 3.2.1.74	Ekzoglukanaz veya glukohidrolaz	$\begin{array}{c} -G-G-G-G- \\ \uparrow \\ \text{İndirgen olmayan uçlardan sellobiyozu açığa çıkarır} \end{array}$
β-glukozidaz	EC 3.2.1.21	Sellobiyaz	$\begin{array}{c} -G-G-G-G-G- \\ \uparrow \quad \uparrow \\ \text{Sellobiyoz ve kısa zincirli selooligosakkaritlerden glukozu açığa çıkarır} \end{array}$

1.5. Selülaazların Genel Reaksiyon Mekanizması

Tam bir selülaaz sisteminin üç sınıf enzimden oluştuğu bilinmektedir; endoglukanaz iç glikozidik bağları, ekzoglukanaz selüloz zincirlerinin uçlarındaki sellobiyozil birimlerini ve β-glukozidaz ise selooligosakkaritleritlerdeki glukoz birimlerini keser (Şekil 3). Selülozik materyallerin hidolizi bu enzimlerin kompleks reaksiyonuyla olur (Bhat ve Bhat, 1997; Yi vd., 1999; Ye vd., 2001; Sun ve Cheng., 2002; Fernando vd., 2006; Thongekkaew vd., 2008). Bu enzimlerin biyodönüşüm teknolojisinde iki önemli noktası; reaksiyon şartları ve bu enzim sistemiyle üretim maliyetidir. Bu yüzden birçok çalışma yüksek spesifik aktivitede ve yüksek etkinlikte selülotik enzimler üreten yeni organizmaların keşfini amaçlamaktadır (Lee vd., 2007).

1.6. Selüloz Üretimini İndüklenmesi ve İnhibisyonu

Selülozun doğrudan enzimin indüklenmesini sağladığı düşünülmektedir, çünkü selüloz çözümlü bir substrat değildir. Bunun yerine selüloz, bazal seviyede üretilen selülozlarla selooligosakkaritler gibi çözümlü selüloz moleküllerine parçalanabilir. Böylece oluşan sakkarit molekülleri hücre içine girebilir ve indükleyiciye dönüştürülebilir (Gong ve Tsao, 1979).

Çeşitli selooligosakkaritler ve onların türevleri selüloz indüklenme özellikleri açısından incelenmiş ve selobiyozun β -1,4 bağlarıyla bağlı en küçük selooligosakkarit olarak selülozu indüklediği birçok çalışma tarafından ortaya konulmuştur (Eberhart vd., 1977; Canevascini vd., 1979; Rho vd., 1982). Selülozlar çoğu mantarda sadece selüloz veya bir indükleyici mevcudiyetinde indüklenir.

Selülozun transkripsiyonel seviyesinde üç basamaklı bir regülasyon mekanizması vardır; bazal seviyede ekspresyon, indükleyiciler tarafından indüklenmesi ile enzimin sentezi ve glukoz veya katabolit baskılanma. Bazal seviyede ekspresyon selülozun küçük miktarlardaki selüloz tarafından çözümlü oligosakkaritlere hidrolizini içerirken, indükleyici ile hidrolizinde ise enzimin indükleyici molekülleri hücre içine girdiğinde aktivatör protein ve aktivatör elementlerin aracılığıyla selüloz geninin tam olarak ve bolca sentezini teşvik eder. Selüloz büyük oranda glukozu parçalandıktan sonra ise glukoz, katabolit baskılayıcı olarak gen sentezini baskılar (Suto ve Tomita, 2001).

1.7. Selüloz Aktivite Tayin Yöntemleri

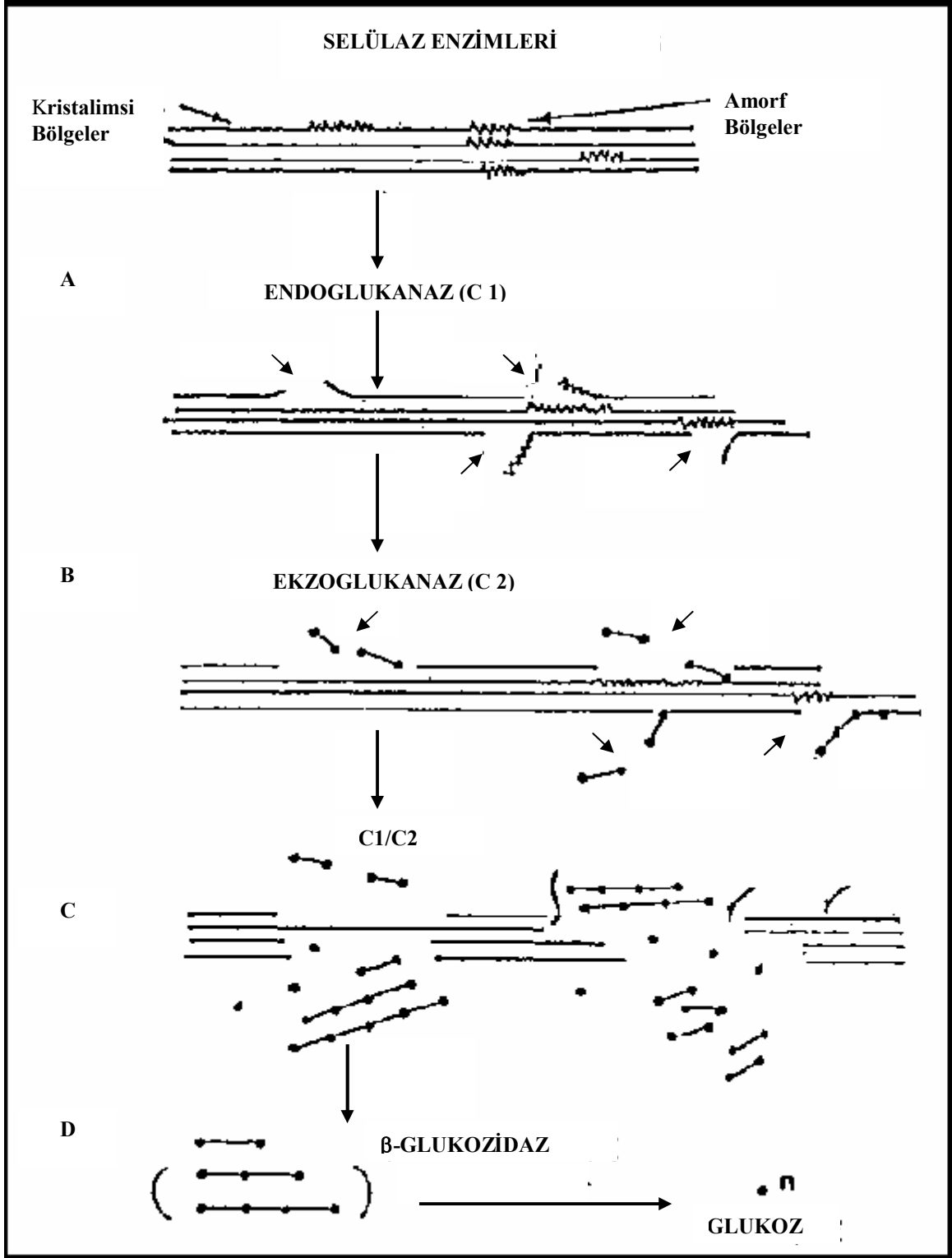
Farklı enzimleri belirlemek için en çok kullanılan metodlar enzimatik aktiviteleri ölçmektir. Toplam selüloz aktivitesini ölçmenin en yaygın yolu filtre kağıdında oluşan indirgen şekerlerin oluşumunu ölçen filtre kağıdı deneyidir (Mandels vd., 1976). Enzimatik deneyleri uygularken karşılaşılan problem endo ve ekzoglukanazlar arasında nasıl bir fark olduğudur. Endoglukanaz aktivitesini ölçmek için spesifik deneyler modifiye selüloz (CMS gibi) kullanımını içermektedir. Diğer bir yöntem de daha hızlı sonuç veren renkli selüloz türevlerinin kullanılmasıdır. Bu durumda, sonuçlar selobiyohidrolaz aktivitesi mevcudiyetinden etkilenir ve farklı tip boyalar farklı sonuçlar verirler. Bu da sonuçlar hakkında yorum yapmayı güçleştirir (Baraznenok, 1997).

1.7.1. Endoglukanaz Aktivitesi

Bu enzimin aktivitesi çoğunlukla yüksek polimerizasyon derecesine sahip çözünür bir selüloz türevi ile, örneğin karboksi metil selüloz (CMS) gibi, ölçülür. Endoglukanaz aktivitesi substrat vizkozitesindeki azalmayla ya da indirgen şeker testiyle belirlenen indirgen uçların artışının ölçümüne dayanır (Percival vd., 2006).

1.7.2. Ekzoglukanaz Aktivitesi

Ekzoglukanazlar selüloz moleküllerinin ulaşılabilir uçlarını keserek glukoz ve sellobiyoz açığa çıkarır. *p*-nitrofenil- β -D-sellobiyozidin hidrolizi ile açığa çıkan *p*-nitrofenolün oluşum hızı tayin edilerek ekzoglukanaz aktivitesi tespit edilebilir (Percival vd., 2006). Ayrıca Avicel kullanılarak açığa çıkan indirgen şekerlerin belirlenmesiyle de tespit edilebilir (Bhat ve Bhat, 1997).



Şekil 3. Selülaaz enzim sisteminin selülozu hidrolizlemesinin şematik olarak gösterimi

1.7.3. β -Glukozidaz Aktivitesi

4-metilumbelliferil- β -D-glukopiranozid ve β -naftil- β -D-glukopiranozid gibi substratların hidrolizlenmesiyle açığa çıkan floresan ya da *p*-nitrofenil- β -D-1,4-glukopiranozid substratının hidrolizi ile açığa çıkan renkli ürünün (*p*-nitrofenol) ölçümüne dayanır (Percival vd., 2006). Ayrıca substrat olarak sellobiyozun kullanılması ve açığa çıkan glukozun tayini ile tespit edilebilir (Bhat ve Bhat, 1997).

1.8. Selülazların Bulunduğu Organizmalar

Geniş bir grup mikroorganizmanın selüloz parçalama yeteneğine sahip olduğu yapılan çalışmalar sonucu ortaya konulmuştur. Birçok selülitik bakteri ve mantar büyük miktarlarda selülaz üretmektedir (Mawadza vd., 2000). Biyoteknolojik potansiyelinden dolayı özellikle mantarlarda selülitik enzimler çalışılmıştır (Gilbert vd., 1992; Xue vd., 1992). Biyoteknolojide kullanılan selülazların çoğu mezofilik bakteri ve mantarlardan üretilmektedir. Selülazların termofilik ve alkalofilik bakteriler tarafından üretimi de gerçekleştirilmiştir (Bischoff vd., 2006; Endo vd., 2001; Sánchez-Torres vd., 1996).

Genel olarak selülitik mantarlar oldukça fazla selülaz enzimi üretirler (Wallace, 1994; Trinci vd., 1994). Mantarlar başlıca bu enzimleri polisakkarit bitki hücrelerinin duvarlarını parçalamak için kullanırlar (Ye vd., 2001). Birçok ipliksi mantar iyi birer selülaz ve hemiselülaz üreticisidir, özellikle hafif bir küf mantarı olan *Trichoderma reesei* çok miktarda enzim yayma yeteneğinden dolayı oldukça detaylı çalışılmıştır (Wood, 1985; Durand vd., 1988). Ayrıca *Aspergillus* ve *Rhizopus* gibi mantar türlerindeki selülazlar da birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır (Murashima vd., 2002; Saito vd., 2003). Yenilebilir bir mantardan selülaz aktivitesinin belirlenmesi ve incelenmesi ile ilgili çalışmalar *Agaricus bisporus* ile sınırlıdır (Ding vd., 2001). Ayrıca Tablo 2’de selülaz aktivitesine sahip bazı mikroorganizmalar, Tablo 3 ve 4’te de literatürde karakterize edilen bazı β -glukozidaz ve endoglukanaz enzimlerinin özellikleri verilmiştir.

Tablo 2. Selülaz üreten mikroorganizmalar (URL-3, 2009).

	Mikroorganizma		Mikroorganizma
Mantarlar	<i>Acremonium cellulolyticus</i>	Bakteriler	<i>Clostridium thermocellum</i>
	<i>Aspergillus acculeatus</i>		<i>Ruminococcus albus</i>
	<i>Aspergillus fumigatus</i>		<i>Streptomyces sp.</i>
	<i>Aspergillus niger</i>		<i>Bacillus sp.</i>
	<i>Fusarium solani</i>		
	<i>Irpex lacteus</i>	Aktinomisitler	<i>Streptomyces sp.</i>
	<i>Penicillium funmiculosum</i>		<i>Thermoactinomyces sp.</i>
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>		<i>Thermomonospora curvata</i>
	<i>Schizophyllum commune</i>		
	<i>Sclerotium rolfsii</i>		
	<i>Sporotrichum cellulophilum</i>		
	<i>Talaromyces emersonii</i>		
	<i>Thielavia terrestris</i>		
	<i>Trichoderma koningii</i>		
	<i>Trichoderma reesei</i>		
	<i>Trichoderma viride</i>		

Tablo 3. Bazı organizmalardan saflaştırılan β -glukozidaz enzimlerinin biyokimyasal ve kinetik özellikleri*

Organizma Adı	Organizma Türü	Mr (kDa)	Dördüncül Yapı	Km (mM)	Opt. pH	Opt. Sic. (°C)	V_{maks} (U/mg)	Kaynak
<i>Lepista flaccida</i>	Mantar	-	-	1,06	4,0	60	$5,78 \times 10^{-3}$	
<i>Apis mellifera</i>	Bal arısı	72	Monomer	11,3			$7,6 \times 10^{-1}$	Pontoh ve Low, 2002
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Maya	-	-	1,5	4,5	50	0,8	Pombo vd., 2008
Mısır sapı	Bitki	62,4	-	1,03		37	3,76	Han ve Chen, 2008
Jade snail	Salyangoz	230	Dimer	0,33	5,6	70	$2,5 \times 10^{-1}$	Luan vd., 2006
Papaya meyvesi	Bitki	27	Dimer	0,11	5,0	50	$3,0 \times 10^{-2}$	Schreier ve Schreier, 1986
<i>Stachybotrys</i> sp.	Mantar	85	Dimer	0,27	5,0	50	78	Amouri ve Gargouri, 2006
<i>Aspergillus niger</i>	Mantar	105	Dimer	21,7	5,0	55	199	Yan ve Lin, 1996
<i>Melamocarpus</i> sp.	Mantar	92	Monomer	3,3	6,0	60	44	Kaur vd., 2007
<i>Daldinia eschscholzii</i>	Mantar	64	Monomer	1,5	5,0	50	3,2	Karnchanatat vd., 2007
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	Mantar	110	-	3,3	3,5	60	0,13	Magalhaes vd. 2006
<i>Piptoporus betulinus</i>	Mantar	36	Monomer	1,8	4,0	60	19	Valaskova ve Baldrian, 2006
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Mantar	114	-	1,0	4-5,2	-	33	Lymar vd., 1995
<i>Xylaria regalis</i>	Mantar	85	-	1,7	5,0	50	326	Wei vd., 1996
<i>Aspergillus niger</i>	Mantar	330	Tetramer	1,1	4,6-5,3	70	-	Rashid ve Siddiqui, 1997
<i>Fomitopsis pinicola</i>	Mantar	105	Monomer	1,8	4,5	50	1,710	Joo vd., 2008
<i>Acremonium persicinum</i>	Mantar	128	Monomer	0,3	5,5	40	-	Pitson vd., 1996
<i>Fomis palustris</i>	Mantar	138	Monomer	0,117	4,5	70	-	Yoon vd., 2008
<i>Aspergillus phoenics</i>	Mantar	-	-	-	5,0	60	-	Zhang vd., 2007
<i>Aspergillus oryzae</i> sp. 100	Mantar	-	-	0,92	5,0	60	-	Zhang vd., 2007
<i>Volvariella volvacea</i>	Mantar	380	Tetramer	0,2	6,4	50	-	Li vd., 2005
<i>Aspergillus niger</i> 322	Mantar	64	-	0,1	5,5	50	-	Peshin ve Mathur, 1999
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Maya	49	Monomer	1,5	4,5	50	0,8	Pombo vd., 2008
<i>Picha pastoris</i>	Maya	275	Tetramer	0,12	7,3	40	10	Turan ve Zheng, 2005
<i>Flavobacterium johnsonae</i>	Bakteri	72	Monomer		7,0	45	-	Okamoto vd., 2000
Vanilla Bean	Bitki	201	Tetramer	1,1	6,5	40	4,5	Odoux vd., 2003
<i>Tricholoma matsutake</i>	Mantar	160		0,22	5,0	60	2,89	Kusuda vd., 2006

*Kinetik parametreler pNPG substratı varlığında elde edilmiştir.

Tablo 4. Bazı organizmalardan saflaştırılan endoglukanaz enzimlerinin biyokimyasal ve kinetik özellikleri*

Organizma Adı	Organizma Türü	Mr (kDa)	Dördüncül Yapı	Km	Opt. pH	Opt. Sıc. (°C)	V_{maks} (U/mg)	Kaynak	
<i>Lepista flaccida</i>	Mantar	-	-	7,7 mg/ml	4,0	50	25		
<i>Bacillus licheniformis</i>	Bakteri	37	-	-	4,5	65	-	Bischoff vd., 2006	
<i>Fusarium oxysporum</i>	Mantar	47,2	-	0,57 mg/ml	5,4	75	94,1	Shuyan vd., 2006	
<i>Aspergillus aculeatus</i>	Mantar	45	Monomer	-	5,0	40	-	Naika vd., 2007	
<i>Bacillus</i> sp.AC-1	Bakteri	67	-	-	4,5-6,5	70	-	Li vd., 2006	
<i>Volvariella volvacea</i>	Mantar	42	-	-	7,5	55	-	Ding vd., 2002	
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	Mantar	-	-	-	5,0	55-60	-	Geimba vd., 1999	
<i>Trichoderma reesei</i>	Mantar	105	Dimer	-	4,6-5,0		-	Qin vd., 2008	
<i>Aspergillus aculeatus</i>	Mantar	25	-	-	4,5	50	-	Murao vd., 1988	
		38	-	-	4,0	65	-		
		66	-	-	5,0	70	-		
		68	-	-	2,5	60	-		
<i>Aspergillus niger</i>	Mantar	31	-	-	-	4,0	-	Okada, 1988	
<i>Coriolus versicolor</i>	Mantar	29,5	-	-	5,0	55	-	Idogaki ve Kitamoto, 1992	
<i>Rhizopus oryzae</i>	Mantar	41	-	-	5,0-6,0	55	-	Murashima vd., 2002	
		61	-	-	5,0-6,0	55	-		
<i>Trichoderma koningii</i>	Mantar	13	-	-	-	-	-	Wood ve McCrac, 1977	
		31	-	-	-	-	-		
		48	-	-	-	-	-		-
		48	-	-	-	-	-		-
<i>Trichoderma viride</i> QM 9414	Mantar	23,5	-	-	5,5	-	-	Voragen vd., 1988	
		45	-	-	4,0	-	-		
		50	-	-	5,1	-	-		
		52	-	-	4,5	-	-		
		57	-	-	4,5	-	-		
<i>Aspergillus terreus</i>	Mantar	80	-	14,2 mM	4,0	60	0,2.10 ⁴	Nazir vd., 2009	
<i>Catharanthus roseus</i>	Bitki	96	Tetramer	0,44 mg/ml	5,2	30-35		Sanwal, 1999	

*Kinetik parametreler CMS substratı varlığında elde edilmiştir.

1.9. Selülozların Uygulama Alanları

Fotosentezin başlıca ürünü ve biyosferde en bol bulunan yenilenebilir enerji kaynağı olan selülozun (yaklaşık 100 milyar kuru ton/yıl) yakın gelecekte enerji, kimyasal ve gıda problemlerine çözüm olabileceği düşünülmektedir. Selülozların kimyasal (asit) ve enzimatik muamelesi sonucu heksozlar ve pentozlar gibi düşük moleküler ağırlıklı çözümler ürünler oluşur. Selülozun enzimatik olarak hidrolizi, atık selüloz kütlelerinin kullanışlı ürünlere dönüştürüldüğü oldukça önemli işlemlerdir. Özellikle yenilenebilir lignoselülozik materyallerden biyobazlı ürünlerin ve biyoenerjinin üretimi insanoğlunun sürdürülebilir gelişimi için oldukça önemlidir (Percival vd., 2006). Fosil yakıtlarının azalması, sera gazı emisyonu ve fosil yakıtlarının tam olmayan yanması ile oluşan hava kirliliği biyoetanolün lignoselülozik materyalden üretimi üzerine ilginin artmasına ve lignoselülozik materyalin enzimatik hidrolizini gerçekleştirmek için selülozların ve hemiselülozların kullanılması olasılığının artmasına sebep olmuştur (Sheehan ve Himmel., 1999; Zaldivar vd., 2001, Jorgensen vd., 2003). Fakat enzim üretimi selüloz hidrolizinin en pahalı faktörü olduğu için ekonomik olarak cazip yöntemler geliştirmek adına yeni ve daha etkin enzimlerin keşfi ya da kullanılan enzimlerin geliştirilmesi gerekmektedir (Sheehan ve Himmel., 1999). Ayrıca farklı uygulamalar için daha spesifik ve kararlı enzimlere ihtiyaç vardır. Sonuç olarak yeni selüloz ve hemiselüloz enzimlerinin keşfedilmesine daimi bir ilgi vardır (Jorgensen vd., 2003).

Oluşan zirai, endüstriyel ve şehirselle selülozik atıkların işleme proseslerinin oldukça pahalı olmasından dolayı da bu atıklar ya birikmekte ya da etkili olmayan bir biçimde kullanılmaktadırlar (Kim vd., 2003).

Selüloolitik enzimlerin üretim ve kullanım maliyetlerinin oldukça yüksek olmasına rağmen, bu enzimler önemli bir ticari ve endüstriyel kullanım potansiyellerine sahiptirler. Özellikle son yıllarda selüloz enzimlerine duyulan ilgi bu enzimlerin biyoenerji ve biyoyakıt üretimi, tekstil ve kağıt endüstrisi gibi birçok alanda kullanımlarından dolayı oldukça artmıştır (Zhou vd., 2008; Sun ve Cheng., 2002).

Selülozların geniş bir uygulama alanları vardır. Başlıca potansiyel uygulama alanları gıda, hayvan yemi, tekstil, yakıt ve kimyasal endüstrisidir. Diğer uygulama alanları ise kağıt ve kütpe endüstrisi, atık giderilmesi, medikal/ilaç endüstrisi, protoplast üretimi, genetik mühendisliği ve kirliliğin giderilmesini içermektedir (Bhat ve Bhat, 1997).

Gıda endüstrisinde selülazlar;

- Tohumlardan yağın ve meyve sularının ekstraksiyonunda,
- Meyve sularının berraklaştırılmasında,
- Hububatların homojen su absorpsiyonunun ve su emme etkinliğinin artırılmasında,
- Soya sosu ve miso gibi fermante edilmiş soya fasülyesi gıdalarının üretiminde soya fasülyesinin dışının uzaklaştırılmasında,
- Hindistan cevizi ve soya fasülyesindeki proteinlerin izolasyonunda,
- Mısır ve tatlı patatesten nişastanın etkili bir şekilde izolasyonunda,
- Sindirimini artırmak için deniz yosununun artırılmasında,
- Deniz yosunundan agar ekstraksiyonunda,
- Gıda katkı maddesi olarak kullanılan ezilmiş lignoselülozun parçalanmasında
- Fermente gıdaların besin değerinin geliştirilmesinde,
- Çorba karışımları ve kuru yiyeceklerin rehidrasyonunun artırılmasında,
- Selülozik atıklardan selooligosakkaritlerin, glukozun ve diğer çözünen şekerlerin üretiminde,
- Çeşnilerin, enzimlerin, polisakkarit ve proteinlerin açığa çıkmasını sağlamak için hücre duvarının uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır (Beguin ve Aubert, 1993; Coughlan, 1985; Coughlan, 1985; Mandels, 1985).

Bira ve şarap endüstrisinde selülazlar;

- Düşük kalitedeki arpada mevcut olan β -1,3 ve β -1,4 glukozların hidrolizinde
- Biranın filtrasyonunda,
- Şarapların aromalarının artırılmasında kullanılır.
- β -1,3 ve β -1,4 glukozazları üreten rekombinant mayalar uzun zamandır bira endüstrisinde kullanılmaktadırlar (Beguin ve Aubert, 1993).

Hayvan yemi endüstrisinde selülazlar;

- Geviş getiren ve tek mideli hayvanların yiyeceklerinin zenginleştirilmesinde,
- Hububat tanelerinin kabuklarının çıkarılmada lignoselülozik materyalin ön muamelesinde kullanılır. Böylece geviş getiren ve tek mideli hayvanlar bu yiyecekleri kolaylıkla sindirebilirler (Mandels, 1985).
- Başka bir ilginç uygulama da hayvanların sindirim bölgelerine gerekli selülazı yayabilen transgenik hayvanların üretimi ve lifli gıdaların etkili bir biçimde

sindirime yardım etmek için selüloz genlerinin klonlanmasında kullanılır (Beguin ve Aubert, 1993).

Tekstil endüstrisinde selülozlar;

- Kot fabrikalarındaki kotların renklerinin ön soldurma işlemlerinde boyanın fazlasının uzaklaştırılmasında (biyotaylama),
- Pamuklu ürünlerde birçok yıkama döngüsünden sonra açığa çıkan mikrofibrillerin uzaklaştırılmasında,
- Pamuklu ürünlerin renk parlaklığının ve yumuşaklığının geri kazanılmasında kullanılır (Beguin ve Aubert, 1993; Mandels, 1985).

İlave olarak ya selülozlar ya da glukanaaz karışımları bitki ve mantar protoplastlarının üretiminde de kullanılır (hibrit suş üretimi) (Bhat vd., 1990). Ayrıca selülozlar bitkideki karbohidrat polimerlerinin enzimatik hidroliz mekanizmasını aydınlatılması için de oldukça önemlidir (Baht ve Bhat, 1997). Kısacası selülozların geniş bir kullanım potansiyeli vardır. Ancak gelecek çalışmalar selülozun ticari potansiyelinin ve özelliklerinin geliştirilmesi yönünde olacaktır.

1.10. *Lepista flaccida* Makromantarının Özellikleri

Yenilebilir bir mantar olan *Lepista flaccida* (Sowerby : Fr.) Pat. (*Clitocybe flaccida* (Sowerby : Fr.) P. Kumm.), orta boyda, etli ve sarımtırak kahverenginde ve huni şeklinde bir şapkaya sahiptir. Tek veya küçük takımlar halinde kozalaklı ağaç diplerinde ya da daha nadiren geniş yapraklı ağaç diplerinde yetişir. Genellikle yaz ile sonbahar aylarında yetişir. Mantarın şapkası 5-9 cm çapındadır ve gençken gri renkte, pürüzsüz ve yassılaştırmış haldedir. Olgunlaştığında ise sarımtırak kahverengine döner ve konveks bir şekil alır. Şapkanın iç kısmında bulunan lameller ise soluk sarı renkte, geniş ve sık bir şekilde bulunmaktadır.

Sap kısmı 2-5 cm boyunda ve 0,5-1 cm genişliğindedir. Şapka ile aynı renkte olan sap kısmı ince ve lifli iken yukarıya doğru pürüzsüzleşmektedir. Sap etli soluk sarı renkte ve içi boştur (Kränzlin, 2005).



Şekil 4. *Lepista flaccida* mantarının frükifikasyon organları

1.11. Çalışmanın Amacı

Enzim teknolojisinin günümüzde giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerlerinin çok yüksek olması nedeniyle biyoteknolojinin endüstriyel enzimlerle ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar daha da önem kazanmaktadır. Endüstriyel enzimler çok çeşitli proseslerde uygulanabilmelerinden dolayı özellikle mikrobiyal kökenli olanlar için gelen talep sürekli artmaktadır. Enzim katalizli reaksiyonlar, alternatifleri olan yorucu ve pahalı kimyasal reaksiyonlardan daha caziptir. Enzimler, gıda, süt ürünleri, ilaç sanayisi, deterjan, tekstil ve kozmetik endüstrileri gibi birçok alanda kullanılmaktadır.

Selülozlar üzerine yapılan çalışmalar son yüz yılda büyük bir hız kazanmıştır. Önemli ilerlemeler selülazın üretiminin, selüloz yıkımının biyokimyasının anlaşılması, selülaz geninin ekspresyonu ve klonlanması ve bazı selülazların üç boyutlu yapısının belirlenmesi yönündedir. Ayrıca selülazların potansiyel endüstriyel uygulamaları da belirlenmiştir. Selülazların ticari potansiyelinin geliştirilmesi önündeki önemli engel selülaz üretiminin verimliliği, kararlılığı, özgünlüğü ve maliyetidir. Bu yüzden gelecek çalışmalar bu sorunları giderebilecek çalışmalara odaklanmalıdır. Çalışmalar ayrıca mevcut ve yeni selülazların ticari potansiyellerinden yararlanmayı amaçlamalıdır (Bhat ve Bhat, 1997).

Bu çalışmanın amacı, Trabzon'un Hıdırnebi Yaylasından toplanan *Lepista flaccida* mantar türünden selüloz sistemi enzimleri olan β -glukozidaz ve endoglukanazın amonyum sülfat çöktürmesi ile kısmi saflaştırılması ve kısmen saflaştırılan enzimlerin biyokimyasal olarak karakterizasyonudur. Enzimler gradiyentli amonyum sülfat çöktürmesi ile kısmen saflaştırılmıştır. Enzimlerin karakterizasyon çalışması kapsamında optimum pH, optimum sıcaklık, ısı ve pH kararlılığı, metal iyonların ve çeşitli kimyasal maddelerin etkisi, substrat konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisi incelenerek bazı kinetik sonuçlara ulaşılmıştır. Böylece kısmen saflaştırılan enzimlerin biyokimyasal özellikleri ortaya konulmuştur.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Materyaller

2.1.1. Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 5’de verilmiştir.

Tablo 5. Kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Firma	Model
Spektrofotometre	Perkin Elmer	Lambda 25
Protein Elektroforezi	Owl Separation Systems	P8DS
Santrifüj	Hettich Zentrifugen	Rotina 35 R
Mikrosantrifüj	Sigma	1-14
Jel Görüntüleme Sistemi	Kodak	Gel Logic 200 Imaging System
Kuru Hava Banyolu İnkübatör	Nüve	EN400
Mikrotüpler İçin Termal Sallayıcı	Boeco	TS-100 Thermo Shaker
Saf Su Cihazı	Sartorius	Arium 611UV
Ligasyon Fırını	Nüve	ES110
Hava Banyolu Çalkalayıcı	Barnstead/Lab-Line	MaxQ Mini 4450 Shaker
pH Metre	InoLab	WTW pH 720
Buz Makinesi	Hoshizaki	FM-80EE
Vorteks	Thermolyne	Type 37600 Mixer
Buzdolabı	Profilo	BD4303ANFE
Terazi	Ohaus	Pioneer
Mikrodalga Fırın	Regal	RMD-17
Derin Dondurucu	Regal	RDD-1280

2.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasal madde ve malzemeler Tablo 6’de verilmiştir.

Tablo 6. Kullanılan kimyasal madde ve malzemeler

Kimyasal Madde/Malzeme	Firma
4-Nitrofenil- β -D-glukopranozit	Sigma
4-Metilbelliferilum- β -D-glukopiranozit	Sigma
Diğer kimyasal maddeler ve çözücüler	Fluka, Sigma, Merck

2.1.3. Çözeltiler ve Tamponlar

Deneysel çalışmalar esnasında kullanılan bütün çözeltiler saf su ile hazırlanmıştır.

2.1.3.1. Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler

- Lowry A Çözeltisi (0,1 N NaOH içinde %2 (a/h) Na_2CO_3): 0,4 g NaOH ve 2,0 g Na_2CO_3 saf su ile çözülüp hacmi 100 mL’ye tamamlandı ve 4 °C’de saklandı.
- Lowry B Çözeltisi (%1 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi): 1,0 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ saf su ile çözülüp hacmi 100 mL’ye tamamlandı ve 4 °C’de saklandı.
- Lowry C Çözeltisi (%2 Na-K tartarat çözeltisi): 2,0 g Na-K tartarat saf su ile çözülüp hacmi 100 mL’ye tamamlandı ve 4 °C’de saklandı.
- Lowry D Çözeltisi: 1 kısım Lowry B ve 1 kısım Lowry C karıştırılarak hazırlandı.
- Lowry E Çözeltisi: 0,5 mL Lowry D ile 25 mL Lowry A karıştırılarak hazırlandı.
- Sığır Serum Albümin (BSA) Çözeltisi (1 mg/mL): 5,0 mg BSA saf su ile çözülüp hacmi 5 mL’ye tamamlandı ve 4 °C’de saklandı.
- 0,1 N NaOH içinde %0,1 (a/h) SDS Çözeltisi: 0,4 g NaOH ve 0,1 g SDS saf su ile çözülüp hacmi 100 mL’ye tamamlandı ve 4 °C’de saklandı.

2.1.3.2. Protein Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler

- Ayırma Jeli Tamponu (1,5 M Tris-HCl): 45,42 g Tris 200 mL saf suda çözüldü, pH'sı 8,8'e ayarlandı, hacmi 250 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- Yığma Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl): 30,28 g Tris 200 mL saf suda çözüldü, pH'sı 6,8'e ayarlandı, hacmi 250 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- SDS Çözeltisi (%10): 10 g SDS saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- Amonyum Persülfat (APS) Çözeltisi (%10): 1 g APS saf suda çözülüp hacmi 10 mL'ye tamamlandı ve hazırlanan çözelti -20 °C'de saklandı.
- N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamin (TEMED): Orijinal şişesinden kullanıldı.
- Akrilamid/Bisakrilamid Çözeltisi (%30): 29,2 g akrilamid ve 0,8 g N,N'-metilen bisakrilamid saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- Gliserol Çözeltisi (%80): 80 mL gliserolün hacminin saf su ile 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Bromofenol Mavisi (%0,1): 10 mg bromofenol mavisi saf suda çözüldü ve hacmi 10 mL'ye tamamlandı.
- SDS-PAGE Yükleme Çözeltisi: 150 µL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 400 µL %10 SDS, 100 µL %0,1 bromofenol mavisi, 250 µL %80 gliserol ve 60 µL β-merkaptolanol'ün karıştırılması ile hazırlandı ve küçük kısımlara ayrılarak -20 °C'de saklandı.
- SDS-PAGE Yürütme Tamponu: 7,2 g Tris ve 1,5 g glisin yaklaşık 480 mL saf suda çözüldükten sonra üzerine 10 mL SDS (%10) çözeltisi ilave edildi. pH 8,3'e ayarlandı ve çözeltinin hacmi 500 mL'ye tamamlandı.
- Doğal PAGE Yükleme Çözeltisi: 150 µL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 100 µL %0,1 bromofenol mavisi, 250 µL %80 gliserol ve 460 µL saf suyun karıştırılması ile hazırlandı ve küçük kısımlara ayrılarak -20 °C'de saklandı.
- Doğal PAGE Yürütme Tamponu: 7,2 g Tris ve 1,5 g glisin yaklaşık 490 mL saf suda çözüldükten sonra pH 8,3'e ayarlandı ve çözeltinin hacmi 500 mL'ye tamamlandı.
- Jel Boyama Çözeltisi: 1 g Coomassie Brilliant Blue-R250'nin 62,5 mL glasiyal asetik asit ve 93,5 mL metanol içinde çözülmesi ile hazırlandı.

- Boya Uzaklaştırma Çözeltisi: 100 mL glasiyal asetik asit, 400 mL metanol ve 600 mL saf suyun karıştırılmasıyla hazırlandı.

2.1.3.3. Tampon Çözeltiler

- A Çözeltisi (0,1 M sitrik asit monohidrat): 5,253 g sitrik asit monohidratın saf su ile çözülüp hacminin 250 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- B Çözeltisi (0,2 M disodyum hidrojen fosfat dihidrat): 8,90 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 'nun saf su ile çözülüp hacminin 250 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Mcilvaine Tamponu (50 mM, pH 3,0): 80,3 mL A çözeltisi ile 19,7 mL B çözeltisi karışımından 20,8 mL alınıp saf su ile hacminin 50 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Mcilvaine Tamponu (50 mM, pH 4,0): 62 mL A çözeltisi ile 38 mL B çözeltisi karışımından 18,1 mL alınıp saf su ile hacminin 50 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Mcilvaine Tamponu (50 mM, pH 5,0): 49 mL A çözeltisi ile 51 mL B çözeltisi karışımından 16,6 mL alınıp saf su ile hacminin 50 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Mcilvaine Tamponu (50 mM, pH 6,0): 37,4 mL A çözeltisi ile 62,6 mL B çözeltisi karışımından 15,3 mL alınıp saf su ile hacminin 50 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Mcilvaine Tamponu (50 mM, pH 7,0): 19 mL A çözeltisi ile 81 mL B çözeltisi karışımından 13,8 mL alınıp saf su ile hacminin 50 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Mcilvaine Tamponu (50 mM, pH 8,0): 2,8 mL A çözeltisi ile 97,2 mL B çözeltisi karışımından 12,69 mL alınıp saf su ile hacminin 50 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 8,0): 0,3028 g Tris yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N HCl ile 8,0'e ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

- Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 9,0): 0,3028 g Tris yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N HCl ile 9,0'a ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- Fosfat Tamponu (20 mM, pH 7,0): 0,1670 g KH_2PO_4 ve 0,1346 g K_2HPO_4 yaklaşık 90 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 7,0'a ayarlandı ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- Glisin-HCl tamponu (50 mM, pH 2,0): 0,375 g glisin saf suda çözüldükten sonra pH'sı 2,0'a ayarlandıktan sonra hacmi 100 mL'ye tamamlandı
- Glisin-HCl tamponu (50 mM, pH 3,0): 0,375 g glisin saf suda çözüldükten sonra pH'sı 3,0'a ayarlandıktan sonra hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

2.1.3.4. Substrat Çözeltileri ve Enzim Aktivitesi Tayininde Kullanılan Diğer Çözeltiler

- *p*-nitrofenil- β -D-glukopiranozit (4 mM stok): 0,060 g *p*-nitrofenil- β -D-glukopiranozit 50 mM, pH 5,0 Mcilvaine tamponunda çözülüp hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- *p*-nitrofenil- β -D-glukopiranozit (10 mM stok): 0,075 g *p*-nitrofenil- β -D-glukopiranozit saf suda çözülerek hacmi 25 mL'ye tamamlandı.
- 4-Metilbelliferilum- β -D-glukopiranozit (%0,1): 0,1 g 4-Metilbelliferilum- β -D-glukopiranozit 50 mM, pH 5,0 Mcilvaine tamponunda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- Sodyum karbonat çözeltisi (0,1 M): 2,65 g sodyum karbonat saf suda çözülerek hacmi 250 mL'ye tamamlandı.
- Karboksi metil selüloz (CMS) çözeltisi (%1): 1 g CMC 50 mM, pH 5,0 Mcilvaine tamponunda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- Karboksi metil selüloz (CMS) çözeltisi (25 mg/mL): 2,5 g CMC saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- Çözelti A: 22 mL, %10'luk NaOH çözeltisi üzerine, az miktarda saf suda çözülmüş olan 10 g fenol ilave edildi ve çözeltinin hacmi saf suyla 100 mL'ye tamamlandı.
- Çözelti B: 6,9 g sodyumbisülfid 69 mL Çözelti A'da çözüldü.

- Çözelti C: 300 mL %4,5 NaOH, 225 g Na-K tartarat ve 880 mL %1'lik 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS) karıştırıldı.
- DNS Çözeltisi: Çözelti B ve Çözelti C karıştırılarak DNS çözeltisi hazır hale getirildi.

2.2. Deneysel Çalışmalar

2.2.1. Ham Enzim Özütünün Hazırlanması

Lepista flaccida mantarından 3 farklı pH'da ekstraksiyon tamponu kullanılarak (5,0, 7,0 ve 9,0) ham enzim özütleri hazırlandı (Çakmak., 2008). Bunun için aşağıdaki işlemler yapıldı.

- Mantar numunesinden 50'şer g örnekler alınarak sıvı azot içerisinde 15 dakika bekletildi.
- Her örnek ayrı ayrı havanda dövüldü ve her birine 2 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, 1 mM PMSF içeren asetat (pH 5,0), fosfat (pH 7,0) ve Tris-HCl (pH 9,0) tamponlarından 50'şer mL ilave edildi.
- Her bir karışım 4 katlı tülbentten süzüldü ve elde edilen süzüntüler, 4 °C'de, 20.000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant ham enzim özütü olarak kullanıldı.

2.2.2. Enzim Aktivitesinin Tayini

L. flaccida özütündeki β -glukozidaz ve endoglukanaz aktiviteleri, sırasıyla *p*-nitrofenil- β -D-glukopiranozid (*p*NPG) ve karboksimetil selüloz (CMS) kullanılarak spektrofotometrik olarak tayin edildi.

β -glukozidaz aktivitesinin tayini için, 200 μ L substrat çözeltisi (4 mM stok) üzerine 200 μ L enzim çözeltisi ilave edildi ve elde edilen karışım 37 °C'de 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, 1,2 mL Na₂CO₃ (0,1 M) çözeltisi eklenerek reaksiyon durduruldu ve 410 nm'de absorbans ölçüldü (Günata ve Vallier., 1999). 1 U enzim aktivitesi, 1 dakikada 1 nmol *p*-nitrofenol oluşturan enzim miktarı, spesifik aktivite ise mg protein başına enzim ünitesi olarak tanımlandı.

Endoglukanaz aktivitesinin tayini için, 400 µL substrat çözeltisi (%1 stok) üzerine 400 µL enzim çözeltisi ilave edilerek elde edilen karışım 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. 400 µL DNS çözeltisi eklendikten sonra elde edilen karışım, kaynar su banyosunda 5 dakika ve buz içinde 10 dakika bekletildi ve 540 nm'de absorbanslar ölçüldü (Miller, 1959). 1 U enzim aktivitesi, 1 dakikada 1 µmol ürün oluşturan enzim miktarı, spesifik aktivite ise mg protein başına enzim ünitesi olarak tanımlandı.

2.2.3. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

L. flaccida mantarından β-glukozidaz ve endoglukanaz aktiviteleri için belirlenen uygun pH değerlerinde hazırlanan ham enzim özütlerine, %10–80 (a/h) arasında gradientli amonyum sülfat çöktürmesi uygulandı ve her bir enzim için belirlenen konsantrasyon aralıklarında spesifik aktiviteleri hesaplandı (Rashid ve Siddiqui, 1997). Bunun için ham enzim özütleri öncelikle nihai konsantrasyonu %10 (a/h) olacak şekilde katı amonyum sülfatla 4 °C'de yavaşça karıştırılarak muamele edildi ve karıştırma işlemine 2 saat daha devam edildi. Karışımlar, 4 °C'de 20.000 rpm'de 30 dakika santifüj edildikten sonra elde edilen çökelekler, β-glukozidaz için fosfat (50 mM, pH 7,0) ve endoglukanaz için asetat (50 mM, pH 5,0) tamponlarında çözüldü. Süpernatana ise, %20'lik (a/h) çöktürme yapmak için uygun miktarda katı amonyum sülfat eklendi ve magnetik karıştırıcıda yaklaşık 2 saat karıştırıldı. Karışım 4 °C'de 20.000 rpm'de 30 dakika santifüj edildi ve elde edilen çökelekler uygun tamponlarda çözüldü. Sonraki basamaklarda, %80'lik çöktürmeye kadar aynı işlemler tekrarlandı ve her seferinde elde edilen çökelekler uygun tamponlarda çözümlenerek gerektiğinde aktivite tayinlerinde kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

2.2.4. Amonyum Sülfat ile Kısmi Saflaştırma ve Diyaliz

Uygun konsantrasyonlardaki amonyum sülfat ile çöktürme aralıkları belirlendikten sonra bu aralıklarda elde edilen çökelekler uygun tamponlarda çözüldü. Hazırlanan enzim çözeltileri bir gece boyunca aynı tampona karşı diyaliz edilerek çözeltilerden tuzun uzaklaşması sağlandı (Zhang vd., 2007).

2.2.5. Protein Tayini

Protein tayini Lowry metoduna göre gerçekleştirildi (Lowry vd., 1951). Protein standardı olarak sığır serum albümin (BSA) kullanıldı.

- Kalibrasyon grafiği çizmek için hazırlanan BSA çözeltisinden (1 mg/mL) deney tüplerine sırasıyla 10, 20, 30, 40 ve 50 µL ilave edildi. Bu şekilde BSA'nın son konsantrasyonu 20, 40, 60, 80 ve 100 µg/mL olmaktadır.
- Başka bir deney tüpüne enzim çözeltisinden 10 µL ilave edildi.
- Standartlara ve örneğe hacimlerini 500 µL'ye tamamlayacak şekilde 0,1 N NaOH içindeki %0,1 (a/h) SDS çözeltisinden ilave edilip vortekslendi.
- Her bir tüpe 1 mL Lowry E çözeltisi ilave edilip vortekslendikten sonra oda sıcaklığında 5–10 dakika bekletildi.
- Standartlara ve numuneye saf su ile 1:1 oranında seyreltilmiş olan Folin Reaktifi'nden 100 µL ilave edildi ve karanlık bir ortamda 30 dakika bekletildi.
- 650 nm'de absorbanslar okundu ve kalibrasyon grafiği çizilerek enzim çözeltisinin proteinin konsantrasyonu hesaplandı.

2.2.6. Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez (PAGE) ile β-Glukozidaz Aktivitesinin Ortaya Konulması

Doğal PAGE, SDS içermeyecek şekilde hazırlanan %5'lik yığma jeli ve %8'lik ayırma jeli kullanılarak gerçekleştirildi. Ayırma jeli %0,1 MUG içerecek şekilde hazırlandı (Tablo 7).

Jel hazırlandıktan sonra tanka yerleştirildi ve tank doğal PAGE yürütme tamponu ile dolduruldu. Yaklaşık 35 µg protein doğal PAGE yükleme çözeltisi ile karıştırılıp Hamilton şırıngası yardımı ile kuyucuklara yüklendi. Elektrofrez ünitesi buz dolu bir kabın içine yerleştirilerek, boya, yığma jelinden çıkana kadar yaklaşık olarak 20 dakika 20 mA'de, daha sonra da ayırma jelinin alt kısmına gelene kadar 1–1,5 saat 25 mA'de yürütüldü.

Tablo 7. Doğal PAGE bileşenleri

	%5'lik Yığıma Jeli Bileşenleri (mL)	%8'lik Ayırma Jeli Bileşenleri (mL)
Saf su	2,7	2,7
%30'luk akrilamid/bisakrilamid	0,67	2,7
% 0,1 MUG	---	2,0
1,0 M Tris (pH 6,8)	0,5	---
1,5 M Tris (pH 8,8)	---	2,5
%10'luk APS	0,04	0,1
TEMED	0,004	0,006

Elektroforez işlemi gerçekleştirildikten sonra jel, 15 mL, 100 mM pH 5,0 Mcilvaine tamponu ile üç kez yıkandı. Yıkanan jel, %0,1'lik MUG çözeltisi içinde 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi ve Kodak Gel Logic 200 Imaging System kullanılarak UV ışık altında incelendi (Hu vd., 2006).

2.2.7. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi

L. flaccida β -glukozidaz ve endoglukanaz aktiviteleri üzerine pH'ın etkisini incelemek amacıyla 50 mM'lık Glisin-HCl (pH 2,0, 3,0), Mcilvaine (pH 3,0–8,0) ve Tris-HCl (pH 8,0, 9,0) tampon sistemleri kullanılarak ayrı ayrı aktivite tayinleri yapıldı. Sonuçların değerlendirilmesi ile optimum pH değerleri belirlendi (Hu vd., 2006; Lee vd., 2007).

2.2.8. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

L. flaccida β -glukozidaz ve endoglukanaz aktiviteleri üzerine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla 10–80 °C sıcaklık aralığında 10 derecelik artışlarla aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Hazırlanan reaksiyon karışımları su banyosunda belirlenen sıcaklık değerlerinde β -glukozidaz için 20 dakika, endoglukanaz için 30 dakika inkübe edilerek aktivite tayinleri yapıldı. Sıcaklığa karşı %Bağıl aktiviteler grafiğe geçirilerek optimum sıcaklık değerleri belirlendi (Hu vd., 2006; Lee vd., 2007).

2.2.9. pH Kararlılığının İncelenmesi

β -glukozidaz ve endoglukanaz enzimlerinin pH kararlılığını incelemek amacıyla, enzim çözeltileri ayrı ayrı 50 mM glisin-HCl (pH 2,0), Mcilvaine (pH 3,0–8,0) ve Tris-HCl (9,0) tamponları ile 1:1 oranında karıştırıldı. Enzim-tampon karışımları 4 °C'de 24 saat inkübe edildikten sonra optimum şartlar altında aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Aynı şekilde hazırlanmış fakat inkübe edilmemiş enzim-tampon karışımlarının optimum şartlar altında aktiviteleri %100 olarak kabul edildi ve bu değerlerden faydalanarak inkübe edilen enzimlerin %kalan aktiviteleri hesaplandı (Hu vd., 2006; Nazir vd., 2009).

2.2.10. Isıl Kararlılığın İncelenmesi

Enzimlerin ısıl kararlılığını incelemek amacıyla, enzim çözeltileri 10 °C'lik artışlarla birlikte 10–70 °C aralığında su banyolarında ayrı ayrı 30 dakika, 6, 12, 24 ve 48 saat süreyle inkübe edildi. Bu sürenin sonunda enzim çözeltisi buz içine alınarak 5 dakika bekletildi ve buzdan çıkartılıp oda sıcaklığına kadar ısınması beklendi. Daha sonra optimum şartlar altında aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Isı ile hiç muamele edilmemiş enzimin aktivitesi %100 olarak kabul edilerek, inkübe edilen enzimlerin %kalan aktiviteleri hesaplandı (Hu vd. 2006; Nazir vd.2009).

2.2.11. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

L. flaccida β -glukozidaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini incelemek amacıyla değişen *p*NPG konsantrasyonlarında (0,1–2,5 mM) ve optimum şartlar altında enzim aktiviteleri tayin edildi (Turan ve Zheng, 2005). Elde edilen sonuçlara göre hız değerleri hesaplandı ve Lineweaver-Burk grafiği çizilerek K_m ve V_{maks} değerleri belirlendi.

Endoglukanaz aktivitesinin substrat konsantrasyonu ile değişimini incelemek amacıyla ise değişen CMS konsantrasyonlarında (5–15 mg/mL) ve optimum şartlar altında enzim aktiviteleri tayin edildi (Oyekola vd., 2006). Elde edilen sonuçlara göre hız değerleri hesaplandı ve Lineweaver-Burk grafiği çizilerek K_m ve V_{maks} değerleri belirlendi.

2.2.12. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi

L. flaccida β -glukozidaz ve endoglukanaz aktiviteleri üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek amacıyla Hg^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Na^+ ve Li^+ iyonlarının klorür tuzlarının 100 mM'lık stok çözeltileri hazırlandı. Metal iyonlarının reaksiyon karışımındaki son konsantrasyonları 1 mM olacak şekilde ve optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Metal iyonu içermeyen karışımın aktivitesi %100 olarak kabul edilip metal iyonu ilavesi durumunda %kalan aktiviteler hesaplandı (Kim vd., 2006; Li vd., 2005).

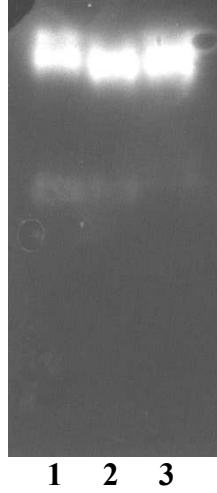
2.2.13. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasalların Etkisinin İncelenmesi

L. flaccida β -glukozidaz ve endoglukanaz aktiviteleri üzerine bazı kimyasalların etkisini incelemek amacıyla, 100 mM'lık etilendiamintetraasetik asit (EDTA), fenilmetansülfonil florür (PMSF) ve β -merkaptto etanol; 50 mM'lık DL-ditiyotritol (DTT) ve %30'luk sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltileri hazırlandı. Kimyasalların reaksiyon karışımındaki son konsantrasyonları 1 mM ve 10 mM veya %1 ve %10 olacak şekilde optimum şartlar altında aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Kimyasal içermeyen karışımın aktivitesi %100 olarak kabul edilip, kimyasalların ilavesi durumunda %kalan aktiviteler hesaplandı (Hayashi vd., 1999; Ding vd., 2002).

3. BULGULAR

3.1. Ham Enzim Özütünün Hazırlanması

β -glukozidaz ve endoglukanaz aktivitelerinin belirlenmesi için, *Lepista flaccida*'dan uygun miktarda alınarak 3 farklı pH'da (5,0, 7,0 ve 9,0) ham enzim özütü hazırlandı. Hazırlanan her enzim özütünde β -glukozidaz aktivitesi hem spektrofotometrik hem de elektroforetik olarak, endoglukanaz aktivitesi ise spektrofotometrik olarak belirlendi. Buna göre, β -glukozidaz için ham enzim özütünün hazırlanma pH'sı 7,0 ve endoglukanaz için 5,0 olarak belirlendi (Şekil 5 ve Tablo 10). Doğal jel elektroforez görüntüsü incelendiğinde pH 5,0 ve pH 7,0'de 3 bandın ve pH 9,0'da ise 2 bandın varlığı gözlenmiştir. Bu bantların varlığı, 4-Metilbelliferilum- β -D-glukopiranozit hidrolizinden sorumlu bir enzimin izomerleri halinde bulunduğunu veya benzer aktiviteye sahip enzimlerin varlığını göstermektedir.



Şekil 5. Farklı pH'larda hazırlanmış *Lepista flaccida* ham özütlerindeki β -glukozidaz enziminin doğal jel elektroforezi 1) pH 5,0, 2) pH 7,0, 3) pH 9,0.

Tablo 8. *Lepista flaccida*'dan hazırlanan ham enzim özütlerinde β -glukozidaz ve endoglukanaz enzimlerinin farklı pH'lardaki ekstraksiyonlarının % bağıl aktivite sonuçları

pH	β -glukozidaz Bağıl Aktivite (%)	Endoglukanaz Bağıl Aktivite (%)
5,0	42	100
7,0	100	60
9,0	98	27

3.2. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

β -glukozidaz ve endoglukanaz için belirlenen uygun pH'larda hazırlanan ham enzim özütlerine %10–80 arasında gradientli amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Her çöktürmeden sonra elde edilen çökelekler uygun tamponlarda çözüldü ve bu örneklerde aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen sonuçlardan spesifik aktivite değerleri hesaplandı. Bulunan değerler Tablo 9'de verilmektedir. Buna göre; β -glukozidaz için %20, 30 ve 40'lık (a/v) amonyum sülfat çöktürmeleri ve endoglukanaz için %70 ve %80'lik (a/v) amonyum sülfat çöktürmeleri uygun çöktürme miktarları olarak belirlendi. Bu çöktürmelerden elde edilen çökelekler her bir enzim için uygun tamponlarda çözülerek enzim özütü olarak kullanıldı.

Tablo 9. *Lepista flaccida* β -glukozidazı ve endoglukanazı için amonyum sülfat çöktürmeleri

Amonyum sülfat miktarı (% a/v)	β -glukozidaz Spesifik aktivite (U/mg protein)	Saflaştırma Katsayısı	Endoglukanaz Spesifik aktivite (U/mg protein)	Saflaştırma Katsayısı
Ham özüt	3,4	1,0	155,7	1,0
%10	2,1	0,6	31,8	0,2
%20	10,1	3,0	130,4	0,8
%30	16,4	5,0	74,2	0,4
%40	10,4	3,0	90,9	1,2
%50	—	—	72,1	0,5
%60	6,4	1,9	86,4	0,6
%70	5,5	1,6	2202,1	14,2
%80	8,9	2,6	1035,3	6,6
%90	—	—	506,2	3,2

3.3. Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez (PAGE)

Amonyum sülfat çöktürmesi sonrası elde edilen enzim özütündeki β -glukozidaz varlığı ayrıca doğal poliakrilamid jel elektrofrez ve substrat boyama ile ortaya konuldu. Elektrofrez sonrasında jel %0,1'lik MUG ile boyandı ve UV ışık altında görüntülenen jelde ham enzim özütünde üç bant ve çöktürmeden sonraki enzim özütünde ise tek bantın varlığı gözlemlendi (Şekil 6).



Şekil 6. Amonyum sülfat çöktürmesi sonrası elde edilen enzim özütündeki β -glukozidaz aktivitesinin doğal jel elektrofrez görüntüsü. 1) Ham enzim özütü, 2) Amonyum sülfat çöktürmesi sonrası elde edilen enzim çözeltisi

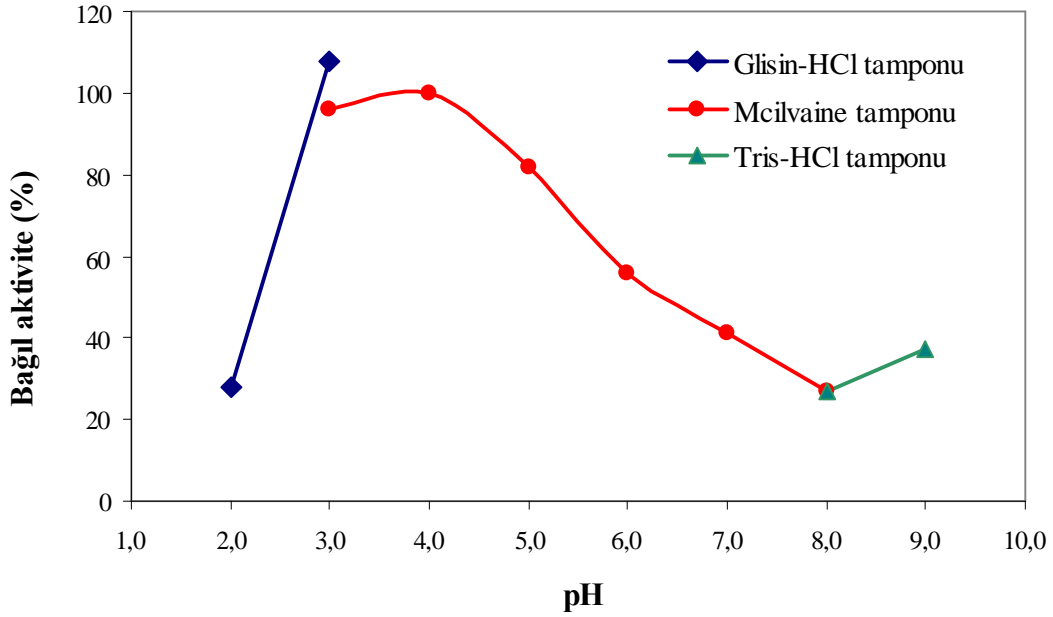
3.4. Kısmi Olarak Saflaştırılan β -Glukozidaz ve Endoglukanaz Enzimlerinin Biyokimyasal Olarak Karakterizasyonu

L. flacida ham enzim özütünden amonyum sülfat çöktürmesi sonucu kısmi olarak saflaştırılan β -glukozidaz ve endoglukanaz enzimlerinin biyokimyasal olarak karakterizasyonu aşağıda başlıklar halinde verilen parametrelerin incelenmesiyle gerçekleştirilmiştir.

3.4.1. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisinin İncelenmesi

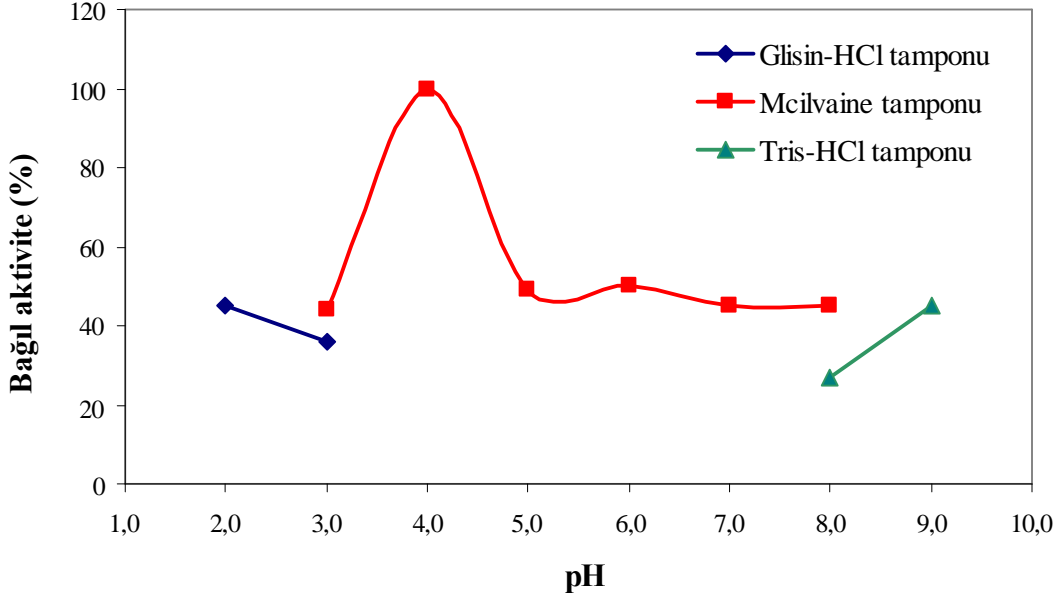
Kısmen saflaştırılan β -glukozidaz ve endoglukanaz enzimlerinin optimum pH değerlerini belirlemek için, farklı pH değerlerinde (2,0–9,0) tamponların kullanılmasıyla ayrı ayrı aktivite tayinleri yapıldı ve spesifik aktivite-pH grafikleri çizildi.

Şekil 7’de verilen grafikten yararlanarak kısmen saflaştırılan β -glukozidazın Glisin-HCl tamponunun kullanıldığı pH 3,0 ve Mcilvaine tamponunun kullanıldığı pH 4,0 değerlerinde en yüksek aktiviteleri gösterdiği ve değerlerinin birbirine oldukça yakın olduğu tespit edildi. Bu sonuçlardan yola çıkarak enzim için pH 3,0 ve 4,0 değerlerinin optimum pH değerleri olduğu söylenebilir. Değerlerin birbirine oldukça yakın olduğu göz önüne alındı ve gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmalarında pH’sı 4,0 olan Mcilvaine tamponunu kullanıldı.



Şekil 7. *Lepista flaccida*'dan kısmen saflaştırılan β -glukozidaz enzimine ait %bağıl aktivite-pH ilişkisi

Şekil 8’den yararlanarak kısmen saflaştırılan endoglukanaz enziminin Mcilvaine tamponunun kullanıldığı pH 4,0 değerinde en yüksek aktiviteyi gösterdiği tespit edildi. Bu sonuçtan yola çıkarak enzimin optimum pH değerinin 4,0 olduğu söylenebilir. Gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmalarında pH’sı 4,0 olan Mcilvaine tamponunu kullanıldı.



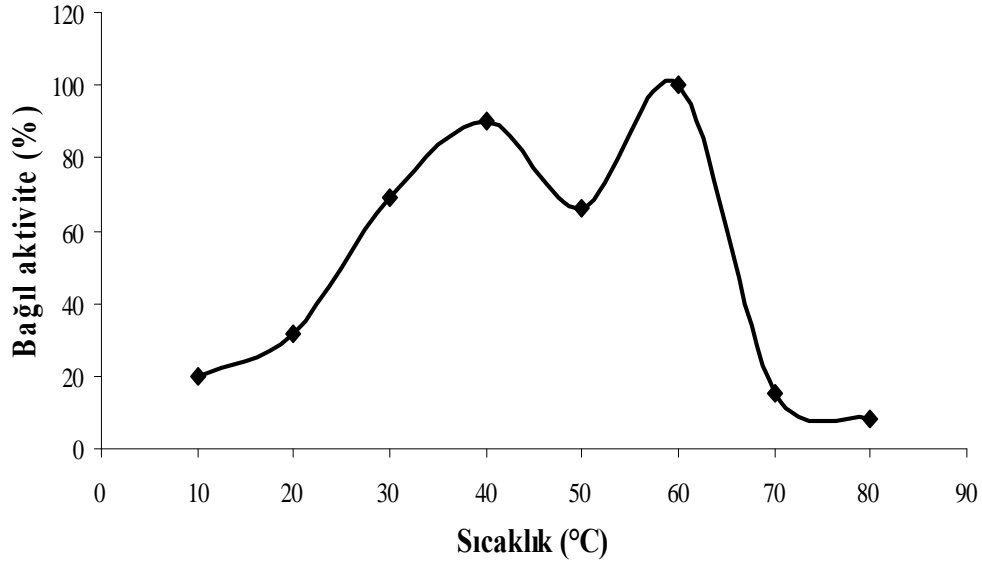
Şekil 8. *Lepista flaccida*'dan kısmen saflaştırılan endoglukanaz enzimine ait %bağlı aktivite- pH ilişkisi

3.4.2. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi

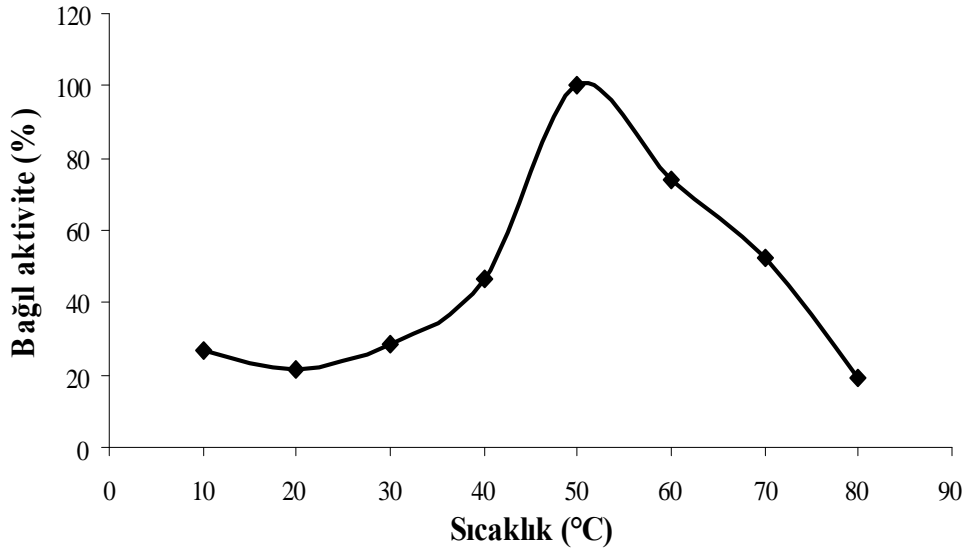
Kısmen saflaştırılan ve endoglukanaz enzimlerinin optimum sıcaklık değerlerini belirlemek için 10–80 °C sıcaklık aralığında 10'ar derece aralıklarla aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlara göre % bağıl aktiviteye karşı sıcaklık değerleri grafiğe geçirildi.

Şekil 9'te kısmen saflaştırılan β -glukozidaz enziminin 40 ve 60 °C'de yüksek aktivite gösterdiği tespit edildi ve aktivitenin en yüksek olduğu sıcaklık değeri olan 60 °C β -glukozidaz enzimi için optimum sıcaklık olarak belirlendi.

Şekil 10'da kısmen saflaştırılan endoglukanaz enziminin 50 ve 60 °C'de yüksek aktivite gösterdiği tespit edildi ve aktivitenin en yüksek olduğu sıcaklık değeri olan 50 °C endoglukanaz enzimi için optimum sıcaklık olarak belirlendi.



Şekil 9. *Lepista flaccida*'dan kısmen saflaştırılan β -glukozidaz enzimine ait %bağlı aktivite-sıcaklık grafiği



Şekil 10. *Lepista flaccida*'dan kısmen saflaştırılan endoglukanaz enzimine ait %bağlı aktivite-sıcaklık grafiği

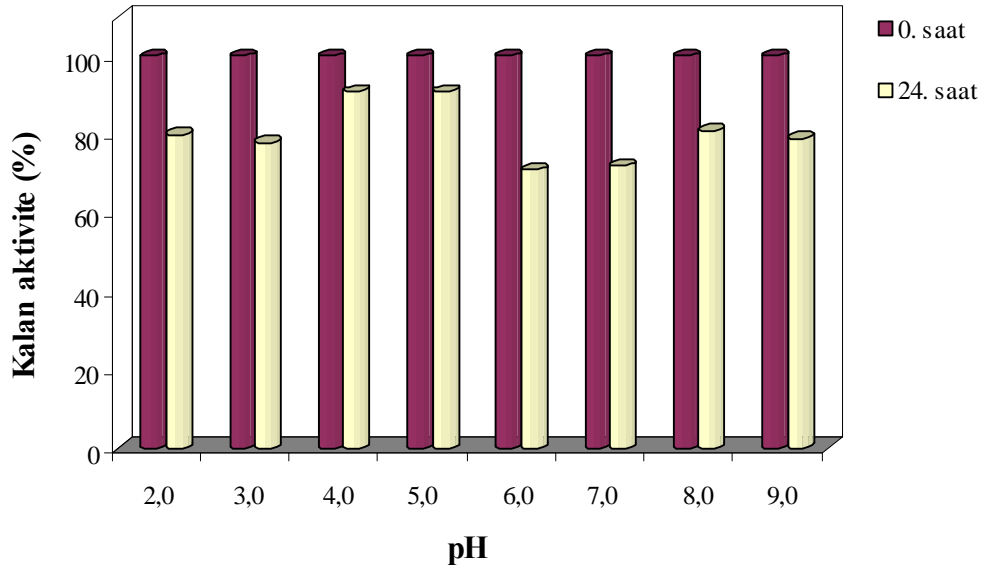
3.4.3. pH Kararlılığının İncelenmesi

Kısmen saflaştırılan β -glukozidaz ve endoglukanaz enzim çözeltileri 1:1 oranlarında farklı pH'lardaki tamponlarla karıştırıldı. Elde edilen özüt-tampon karışımlarından uygun miktarlarda alınarak reaksiyon karışımları hazırlandı ve aktivite tayinler gerçekleştirildi. 4

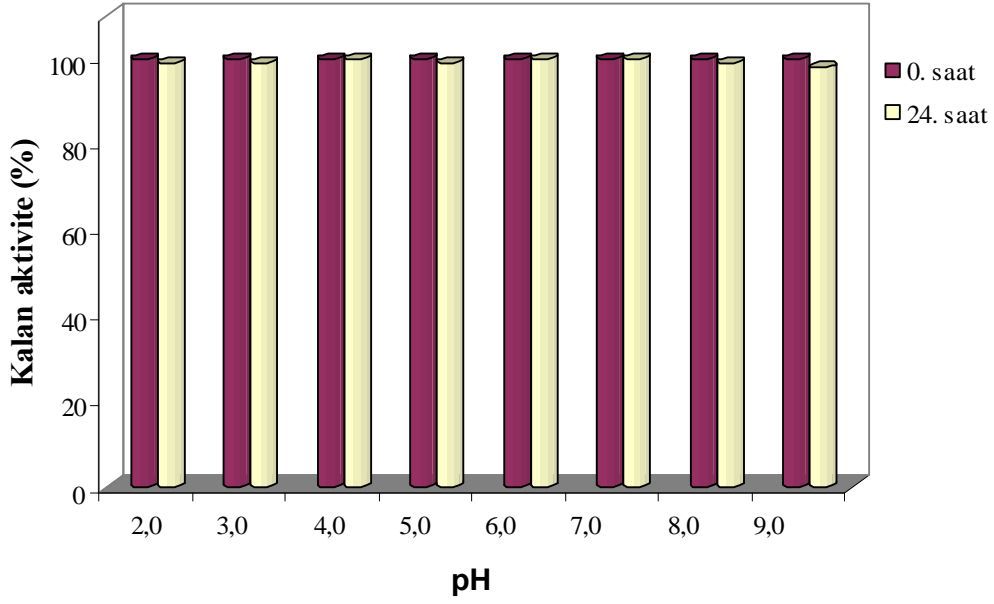
°C’de 24 saat inkübe edilen özüt-tampon karışımlarından da uygun miktarlarda alınarak reaksiyon karışımları hazırlandı ve aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Başlangıç ve 24 saat inkübasyon sonucu elde edilen aktiviteler karşılaştırılarak %kalan aktivite-pH grafikleri çizildi.

Şekil 11’de kısmen saflaştırılan β -glukozidaz enziminin denenen tüm pH değerlerinde aktivitesini hemen hemen hiç kaybetmediği yani oldukça kararlı bir profil sergilediği görülmektedir.

Şekil 12’de kısmen saflaştırılan endoglukanaz enziminin denenen pH değerlerinde aktivitesinin önemli ölçüde değişmediği, özellikle optimum pH değeri olan pH 4,0 ve pH 5,0 değerlerinde aktivitenin %90 oranında, diğer pH değerlerinde ise yaklaşık %70–80 oranında korunduğu görülmektedir.



Şekil 11. *Lepista flaccida*’dan kısmen saflaştırılan endoglukanaz enzimine ait %kalan aktivite-pH ilişkisi



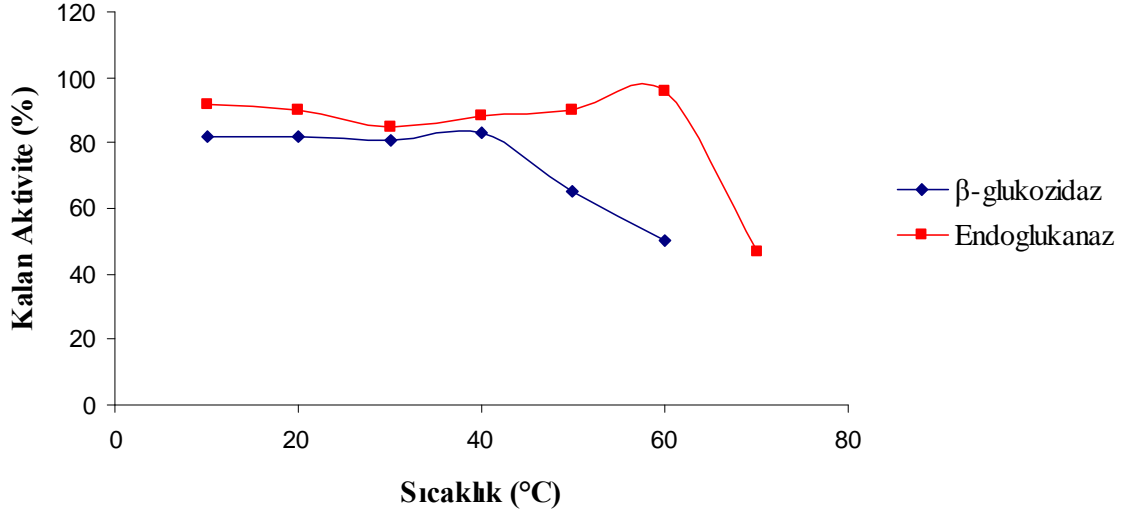
Şekil 12. *Lepista flaccida*'dan kısmen saflaştırılan β -glukozidaz enzimine ait %kalan aktivite-pH ilişkisi

3.4.4. Isıl Kararlılık

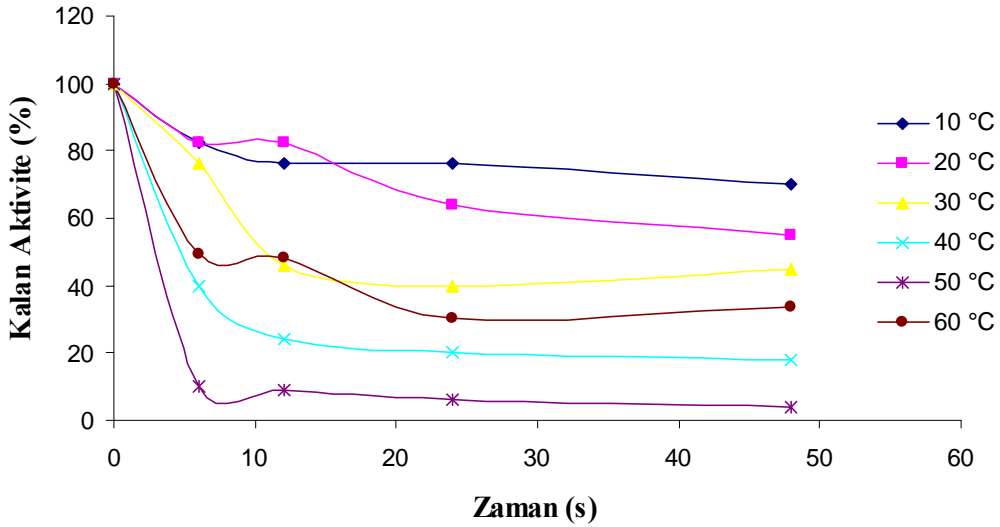
Kısmen saflaştırılan β -glukozidaz ve endoglukanaz enzimlerine ait ısıl kararlılık profillerini belirlemek amacıyla özütler 30 dakika, 6, 12, 24, 48 saat zaman dilimleri ve 10-70 °C'lik (10 derecelik artışlarla) sıcaklık aralıklarında su banyosunda ayrı ayrı inkübe edildi. Bu özütler oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra aktivite tayinleri gerçekleştirildi. % Kalan aktiviteler herhangi bir ön işlem uygulanmamış enzim özütünün optimum şartlarda belirlenen aktivite değerleriyle karşılaştırılarak hesaplandı ve grafikler çizildi.

Şekil 13'den β -glukozidaz ve endoglukanaz enzimlerinin 30 dakika sonunda farklı sıcaklıklardaki kalan aktiviteleri verilmiştir. β -Glukozidaz enzimi için aktivite 40 °C'ye kadar yaklaşık %80 korunurken, enzimin optimum sıcaklığı olan 60 °C'de ise %50 oranında korunmuştur. Endoglukanaz için ise aktivite 50 °C'ye kadar %85–90 oranında korunurken, enzimin optimum sıcaklığı olan 50 °C'de ise %95 oranında korunmuştur.

Şekil 14'den β -glukozidaz enziminin 48 saat sonunda aktivitesini 10 °C'de yaklaşık %80 oranında, 20 ve 30 °C'de ise yaklaşık %50 oranında koruduğu görülmüştür. 48 saat sonunda 40 °C'de β -glukozidaz aktivitesi %20'ye düşerken, 50 °C'de neredeyse tamamen kaybolmaktadır. β -glukozidaz enziminin optimum sıcaklığı olan 60 °C'de ise 48 saat sonundaki aktivitenin %40 oranında korunduğu görülmektedir.



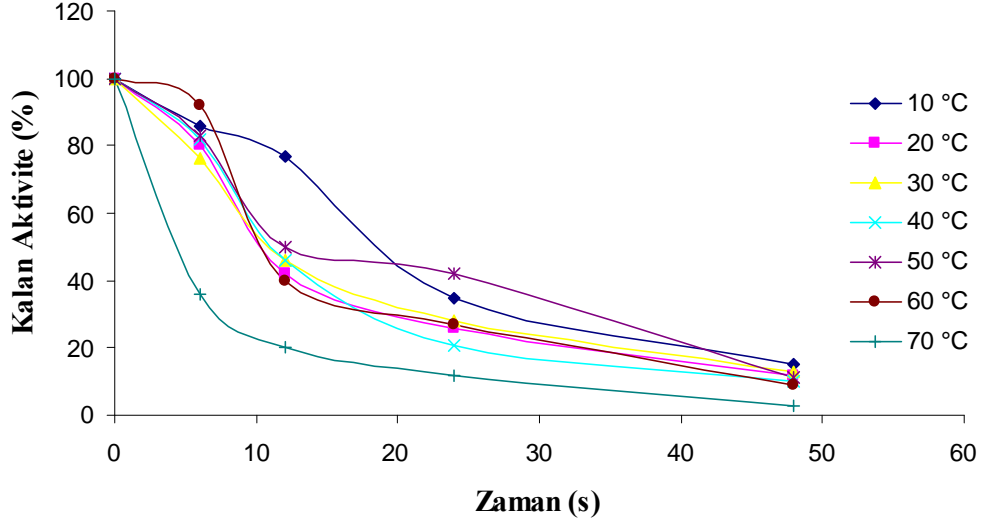
Şekil 13. *Lepista flaccida*'dan kısmen saflaştırılan β -glukozidaz ve endoglukanaz enzimlerine ait 30 dakika sonunda elde edilen %kalan aktivite-sıcaklık grafiği



Şekil 14. *Lepista flaccida*'dan kısmen saflaştırılan β -glukozidaz enzimine ait %kalan aktivite-sıcaklık grafiği

Şekil 15'den endoglukanaz enziminin aktivitesini 48 saat sonunda 10–40 ve 60 °C aralıklarında %90 oranında, 70 °C'de ise neredeyse tamamen kaybettiği görülmektedir. Ayrıca enzim aktivitesinin 70 °C'de 6 saat sonunda hızlı bir şekilde düştüğü, 48 saat sonunda ise neredeyse tamamen kaybolduğu görülmektedir. Endoglukanazın optimum sıcaklığı olan 50 °C'de ise enzim aktivitesi 48 saatin sonunda %90 oranında azalmaktadır.

Ayrıca 10–60 °C aralığında enzim aktivitesinin 6 saat sonunda %80 oranında, 12 saat sonunda ise %50 oranında korunduğu görülmektedir.

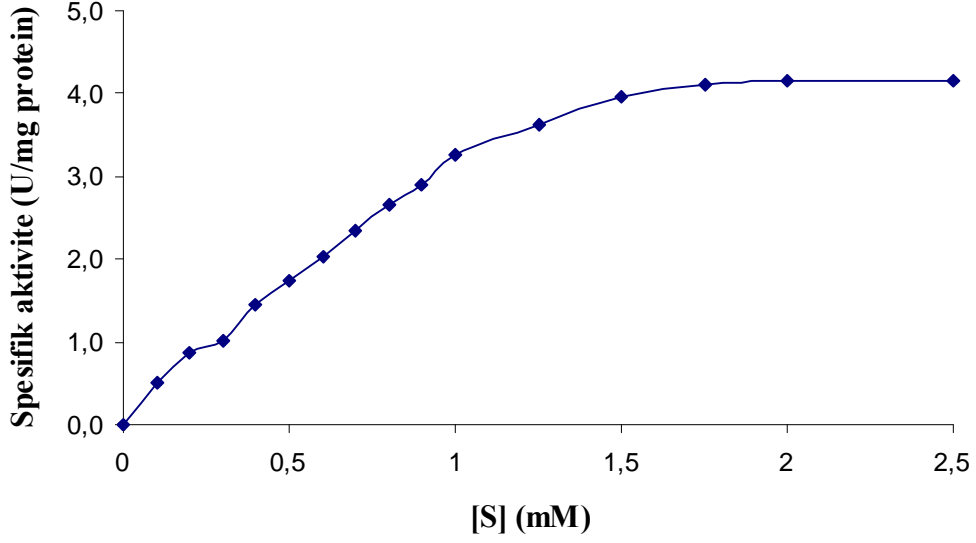


Şekil 15. *Lepista flaccida*'dan kısmen saflaştırılan endoglukanaz enzimine ait %kalan aktivite-sıcaklık grafiği

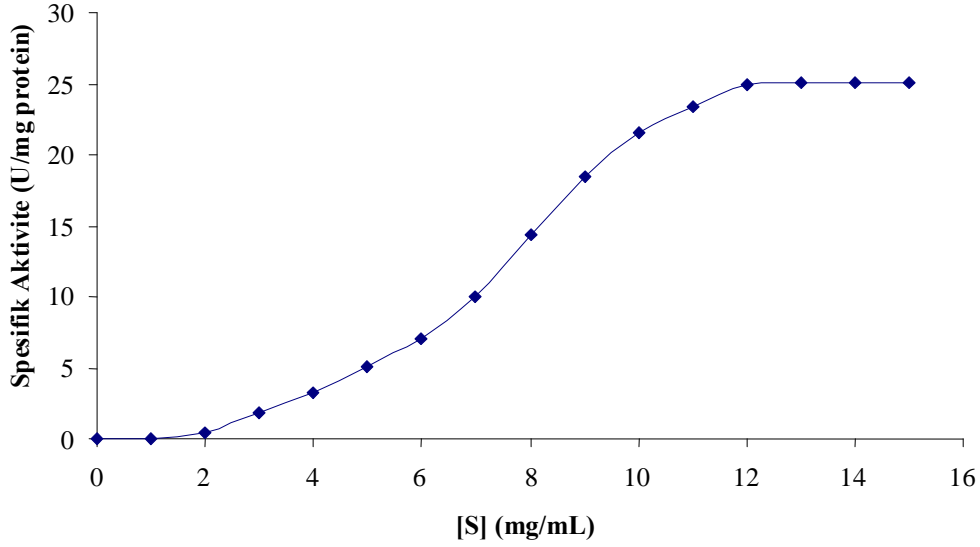
3.4.5. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisinin İncelenmesi

Kısmen saflaştırılan β -glukozidaz ve endoglukanaz enzim aktiviteleri üzerine substrat konsantrasyonlarının etkisini incelemek amacıyla daha önceden belirlenen optimum şartlarda, farklı substrat konsantrasyonları kullanılarak aktivite tayinleri gerçekleştirildi. β -glukozidaz için 0,1–2,5 mM aralığında *p*NPG ve endoglukanaz için 5–16 mg/mL aralığında CMS substratları kullanıldı.

Elde edilen aktivite sonuçları kullanılarak substrat doygunluk eğrileri çizilmiştir. β -glukozidaz aktivitesi için optimum substrat konsantrasyonu 2 mM (Şekil 16), endoglukanaz için ise 12 mg/ml (Şekil 17) olarak belirlenmiştir.



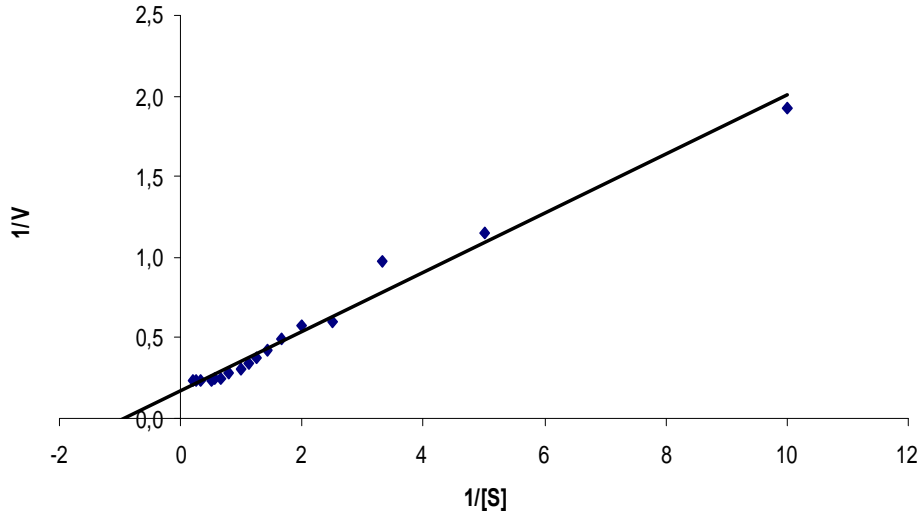
Şekil 16. *p*NPG varlığında β -glukozidazın substrat doygunluk eğrisi



Şekil 17. CMS varlığında endoglukanazın substrat doygunluk eğrisi

Kinetik verilerin belirlenmesi için ise Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. β -glukozidaz aktivitesi için *p*NPG substratı varlığında V_{maks} ve K_m değerleri sırası ile 5,78 $\text{nmol.dak}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ protein ve 1,06 mM olarak hesaplandı (Şekil 18). Endoglukanaz aktivitesi için ise CMS substratı varlığında Michaelis-Menten grafiğinin (Şekil 17) sigmoidal bir eğri çıkmasından dolayı Lineweaver-Burk grafiği çizilemedi. Her ne kadar sigmoidal doygunluk eğrisinden V_0 'ın yarı maksimum olduğu bir substrat değeri bulunsa

da, enzim hiperbolik Michaelis-Menten ilişkisini izlemediği için bu eğri, K_m 'nin belirlenmesinde kullanılmamaktadır. Bunun yerine çoğunlukla $[S]_{0,5}$ veya $K_{0,5}$ sembolü, allosterik bir enzim tarafından katalizlenen tepkimenin yarı en yüksek hızındaki substrat derişiminin gösteriminde kullanılmaktadır (Nelson ve Cox, 2004). Bu bilgiler ışığında, substrat doygunluk eğrileri (Şekil 17) CMS substratı varlığında, endoglukanaz enzimi için $[S]_{0,5}$ veya $K_{0,5}$ değeri 7,7 mg/ml, V_{maks} değeri ise 25 $\mu\text{mol.dak}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ protein olarak bulundu.



Şekil 18. *p*NPG varlığında β -glukozidaz aktivitesi için Lineweaver-Burk eğrisi

3.4.6. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisinin İncelenmesi

Kısmen saflaştırılan β -glukozidaz ve endoglukanaz enzim aktiviteleri üzerine metal iyonlarının etkisini incelemek amacıyla Hg^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Na^+ ve Li^+ iyonlarının klorür tuzlarının 100 mM'lık stok çözeltileri kullanıldı. Her iki enzim için optimum şartlarda ve reaksiyon karışımında metal iyonlarının son konsantrasyonları 1 mM olacak şekilde, metal iyonlarının aktiviteler üzerine etkileri incelendi (Tablo 8).

Tablo 10. *Lepista flacida*'dan kısmen saflaştırılan β -glukozidaz ve endoglukanaz enzim aktiviteleri üzerine bazı metal iyonlarının etkisi

Metal İyonu (1mM)	β -glukozidaz (% Kalan Aktivite)	Endoglukanaz (% Kalan Aktivite)
Li ⁺	97	92
Na ⁺	98	138
Mn ²⁺	103	234
Co ²⁺	98	131
Cu ²⁺	103	44
Zn ²⁺	95	33
Hg ²⁺	100	93

Kontrol olarak metal iyonu içermeyen reaksiyon karışımları kullanıldı ve bu karışımlar için gözlenen aktivite değerleri % 100 olarak kabul edildi. β -glukozidaz varlığında genel olarak metal iyonlarının aktiviteyi önemli derecede etkilemediği görülmüştür.

Endoglukanaz varlığında ise; Li⁺ ve Hg²⁺ zayıf inhibisyona neden olurken, Zn²⁺ ve Cu²⁺ enzimi güçlü bir şekilde inhibe etmektedirler. Co²⁺, Na⁺ ve özellikle Mn²⁺ ise değişik oranlarda enzim aktivitesini artırmaktadırlar.

3.4.7. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasalların Etkisinin İncelenmesi

Enzim özütündeki β -glukozidaz ve endoglukanaz aktiviteleri üzerine bazı kimyasalların etkisini incelemek amacıyla 100 mM EDTA, PMSF, β -merkaptto etanol, 50 mM DTT ve %30'luk SDS stok çözeltileri kullanıldı. β -glukozidaz ve endoglukanaz enzimlerinin optimum şartlarında son konsantrasyonları 1 mM ve 10 mM olacak şekilde yukarıdaki kimyasalların etkisi incelendi (Tablo 11).

Kontrol olarak yukarıdaki kimyasalları içermeyen reaksiyon karışımları kullanıldı ve bu karışımlar için gözlenen aktivite değerleri % 100 olarak kabul edildi. β -glukozidaz aktivitesi 1 mM ve 10 mM'lık kimyasallar mevcudiyetinde önemli derecede değişmemiş fakat SDS mevcudiyetinde hemen hemen tamamen inhibe olmuştur.

Tablo 11. *Lepista flacida*'dan kısmen saflaştırılan β -glukozidaz ve endoglukanaz enzim aktiviteleri üzerine bazı kimyasalların etkisi

Kimyasallar	β -glukozidaz % Kalan Aktivite		Endoglukanaz % Kalan Aktivite	
	(1 mM)	(10 mM)	(1 mM)	(10 mM)
DTT	96	97	91	69
PMSF	96	96	97	45
EDTA	102	98	55	40
β -Merkaptoetanol	96	96	52	24
SDS	3	1	Belirlenemedi	Belirlenemedi

Endoglukanaz aktivitesi ise 1m M DTT ve PMSF varlığında pek değişmezken, EDTA ve β -Merkaptoetanol varlığında yarı yarıya azalmıştır. 10 mM'lık konsantrasyonlarda ise denenen kimyasalların farklı oranlarda enzim aktivitesini düşürdüğü görülmüştür. Reaksiyon karışımına SDS eklendiğinde çökme gerçekleştiği için SDS varlığında aktivite belirlenememiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Selüloz, bitki hücre duvarının temel bileşenidir ve doğada en bol bulunan yenilenebilir enerji kaynağıdır. Ayrıca bitki hücrelerine şekil ve yapısal dayanıklılık kazandırmasının yanında, özellikle bakteri ve mantar olmak üzere birçok organizma için de enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. Selüloz biyopolimerinin uygun şekilde kullanılabilmesi için birçok bakteri, mantar, maya, bitki ve hayvanlarda yaygın olarak bulunan β -glukozidaz ve endoglukanaz gibi selülaz enzimleri tarafından uygun ürünlere hidrolizlenmesi gerekir (Watchalee vd., 2008). Bu enzim sisteminin üretim maliyeti ve reaksiyon şartları kullanıldığı enzim bazlı biyodönüşüm teknolojilerine uygulanmasını önemli ölçüde etkilemektedir. Bu yüzden yüksek spesifik aktiviteye ve yüksek etkinliğe sahip olan yeni selüloolitik enzimlerin keşfedilmesi ve üretilmesi için gerçekleştirilecek olan çalışmalar oldukça önemlidir (Sun ve Cheng, 2002).

Bu çalışmada *Lepista flaccida* mantarından hazırlanan özütlerden amonyum sülfat çöktürmesi ile kısmen saflaştırılan β -glukozidaz ve endoglukanaz enzimleri karakterize edilmiş ve kinetik verileri elde edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar Tablo 3 ve 4'te verilen organizmalardan elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Selülazlar uzun yıllardan beri birçok farklı organizmada çalışılmış ve karakterize edilmiştir. Fakat bu çalışmada bir mantar türü enzim kaynağı olarak kullanıldığı için daha çok önemli bazı mantarlar bu tabloda yer almaktadır.

L. flaccida'dan farklı pH'larda ham enzim özütleri hazırlanmış ve enzim aktiviteleri incelenmiştir. β -glukozidaz ve endoglukanaz için gerçekleştirilen aktivite testleri sonucu elde edilen sonuçlar %bağıl aktivite cinsinden hesaplanmıştır (Tablo 8). Bu değerler incelendiğinde β -glukozidaz enzimi için pH 7,0'nin, endoglukanaz enzimi için pH 5,0'in uygun ekstraksiyon tamponları olduğu tespit edilmiştir.

L. flaccida'dan hazırlanan ham enzim özütünde ve amonyum sülfat çöktürmesinden sonra elde edilen enzim çözeltilisinde β -glukozidaz aktivitesini ortaya koymak amacı ile doğal poliakrilamid jel elektroforezi yapılmıştır (Şekil 5 ve Şekil 6). Elektroforez sonucunda ham enzim özütünde üç bandın görülmesi *L. flaccida*'da β -glukozidaz enzimin izoenzimlerinin olduğu sonucunu ortaya koymaktadır. Amonyum sülfat çöktürmesinden sonra ise tek bandın olması büyük bir olasılıkla izoenzimlerden sadece birinin çöktürüldüğü ve dolayısı ile elde edilen verilerin sadece bir β -glukozidaz enzimine ait

olduğu sonucunu göstermektedir. Ayrıca enzimin kısmen saflaştırıldığı sonucuna da ulaşılabilir.

Hazırlanan ham enzim özütü %10–90 (a/h) aralığında gradiyentli olarak amonyum sülfat ile çöktürülmüş ve aktivite tayinleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilerden enzim saflaştırmanın bir göstergesi olan spesifik aktivite ve saflaştırma katsayıları hesaplanmıştır (Tablo 9). Bu tablodaki spesifik aktivite ve saflaştırma katsayıları incelendiğinde β -glukozidaz ve endoglukanaz enzimlerinin kısmen saflaştırıldığı görülmektedir.

β -Glukozidaz enzimi durumunda ham ekstraktaki spesifik aktivite 3,4 U/mg protein iken %20, 30 ve 40'lık amonyum sülfat çöktürmelerinden sonra bu değer sırası ile 10,1, 16,4 ve 10,4 U/mg proteine yükselmiştir. Diğer çöktürme yüzdelerinde ise elde edilen spesifik aktivite değerleri ve saflaştırma katsayıları daha düşük olduğu için enzim %20–40 konsantrasyon aralığındaki amonyum sülfatla çöktürülerek denemeler gerçekleştirilmiştir.

Endoglukanaz enzimi durumunda ham ekstraktaki spesifik aktivite 155,7 U/mg protein iken %70 ve 80'lik amonyum sülfat çöktürmelerinden sonra bu değer sırası ile 2202,1 ve 1035,3 U/mg proteine yükselmiştir. Diğer çöktürme yüzdelerinde ise elde edilen spesifik aktivite değerleri ve saflaştırma katsayıları daha düşük olduğu için endoglukanaz enzimi %70–80 konsantrasyon aralığındaki amonyum sülfatla çöktürülerek denemeler gerçekleştirilmiştir.

Enzimlerin optimum pH değerleri, ekstraksiyon metodu, sıcaklık, substratın yapısı, kullanılan tampon sistemi gibi birçok deneysel değişiklikten etkilenir (Whitaker vd., 1994). β -glukozidaz aktivitesinin *p*NPG substratı kullanılarak pH'ya bağımlılığı incelendiğinde optimum pH değerinin 4,0 olduğu tespit edildi (Şekil 7). pH 4,0–5,0 arasındaki pH değerleri birçok β -glukozidaz için benzerdir (Tablo 3). Örneğin, mısırdan saflaştırılan β -glukozidazın, substratı varlığında 4,8'de optimum aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Han ve Chen, 2008). Kan portakalından saflaştırılan β -glukozidazın *p*NPG substratı varlığında optimum pH değeri 4,5 olarak belirlenmiştir (Balbagallo vd., 2007). Ayrıca beyaz toprak solucanından (*Achatina fulica*) saflaştırılan β -glukozidazın *p*NPG substratı varlığındaki optimum pH değeri 5,0 olarak belirlenmiştir (Hu vd., 2006). Bunun yanında *Pleurotus ostreatus* mantarından karakterize edilen enzimin optimum pH değeri 4,0 olarak tespit edilmiştir (Morais vd., 2002).

Endoglukanaz aktivitesinin CMS substratı kullanılarak pH'ya bağımlılığı incelendiğinde optimum pH değerinin 4,0 olduğu tespit edildi (Şekil 8). Genellikle selüloz parçalayıcı enzimler asidik pH değerlerinde daha aktiftirler. Farklı kaynaklardan

saflaştırılan endoglukanaz enzimleri için optimum pH 4,0–7,5 arasında değişmektedir (Tablo 4).

Enzimlerin pH kararlılığını incelemek amacıyla enzim özütleri farklı pH'larda 4 °C'de 24 saat inkübe edildi. Gerçekleştirilen aktivite denemeleri sonrasında her iki enzim için %kalan aktivite-pH profilleri oluşturuldu. β -glukozidaz enzimi pNPG substratı varlığında aktivitesini hemen hemen hiç kaybetmemektedir (Şekil 11). Enzimin pH 2,0-9,0 aralığında aktivitesini hiç kaybetmediği yani oldukça yüksek pH kararlılığına sahip olduğu görülmektedir. Benzer bir durum *Aureobasidium* sp ATCC 20524'ten saflaştırılan β -glukozidaz enziminde de elde edilmiştir. Saf enzim pH 2,2-9,8 aralığında kararlılık göstermiştir (Hayashi vd., 1999). *Metschnikowia pulcherrima*'dan saflaştırılan enzimin ise pH 4,0'ün altında kararsız olduğu tespit edilmiştir (Pombo vd., 2008). *Aspergillus phoenicis*, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus oryzae* mantarlarından saflaştırılan β -glukozidaz enzimlerinin pH kararlılıkları incelenmiş ve sırası ile pH 4,0-8,0, 4,0-8,0 ve 4,0-5,0 aralığında enzimlerin kararlı olduğu tespit edilmiştir (Zhang vd., 2007). *Lepista flaccida*'dan kısmen saflaştırılan β -glukozidaz enziminin önemli ölçüde değişmeyen pH kararlılık profili ve bu literatür bilgileri ve göz önüne alındığında enzimin önemli bir pH kararlılık profiline sahip olduğu ortaya çıkmaktadır.

Endoglukanaz enziminin pH kararlılık profili incelendiğinde, pH 4,0 ve 5,0 değerlerinde aktivitesini hemen hemen hiç kaybetmediği, bunun dışındaki pH değerlerinde ise %20–30 oranında kaybettiği görülmektedir. Genel olarak bakıldığında endoglukanazın pH 2,0–9,0 aralığında aktivitesini büyük oranda koruduğu ve dolayısıyla enzim özütünün, içerdiği endoglukanaz aktivitesi açısından yüksek pH kararlılığına sahip olduğu gözlenmiştir. Enzimin bu özelliği özellikle endüstriyel uygulamalar açısından önemlidir. Farklı kaynaklardan izole edilen endoglukanaz enzimlerinin pH kararlılık profilleri incelendiğinde bu kadar yüksek bir pH kararlılığına rastlanmamıştır. Patojenik bir mantar olan *Mucor circinelloides*'den saflaştırılan enzimin pH 4,0–7,0 arasında kararlı olduğu (Saha, 2004), *Volvariella volvacea* mantarından klonlanan ve saflaştırılan rekombinant endoglukanaz enziminin 24 saat sonunda pH 9,0 ve 10 değerlerinde aktivitesini önemli ölçüde korurken diğer pH değerlerinde ise aktivitesini %40'a kadar kaybettiği görülmektedir (Ding vd., 2002), *Bacillus* sp.AC-1 bakterisinden karakterize edilen enzimin ise 2 saat sonunda pH 7,5 ve 10,5 değerleri arasında kararlı olduğu (Li vd., 2006) tespit edilmiştir.

Enzimlerin optimum sıcaklıklarının belirlenmesi amacıyla enzim özütleri farklı sıcaklık değerlerinde aktivite testleri gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen aktivite denemeleri sonrasında her iki enzim için %bağıl aktivite-sıcaklık profilleri oluşturuldu. β -Glukozidaz enzimi durumunda aktivitenin 60 °C’de en yüksek olduğu tespit edildi (Şekil 9). İlginç olarak aktivite 40 °C’de de oldukça yüksekken 50 °C’de ise bu değerlerden daha düşüktür. Bu sonuçlar en az üç kere gerçekleştirilen denemeler sonunda elde edilmiştir. Ayrıca β -glukozidaz enzimi için 30 dakikalık ön inkübasyon süresi sonunda gerçekleştirilen ısıl kararlılık sonuçlarına bakıldığında, enzimin aktivitesini 40 °C’ye kadar %20, 50 ve 60 °C’de ise sırası ile %40 ve 50 oranlarında kaybettiği belirlenmiştir (Şekil 13). Kısacası β -glukozidaz enzimi 60 °C’de ısıl kararlılığını 30 dakika sonunda yarı yarıya kaybetse de bu sıcaklık değerinin enzimin optimum sıcaklığı olduğu görülmektedir. Farklı organizmalar özellikle mantar türlerinin optimum sıcaklıkları incelendiğinde 40 °C ile 70 °C arasında farklı sıcaklık değerlerinde optimum sıcaklığa sahip oldukları görülmektedir (Tablo 3). *Lepista flaccida*’dan kısmen saflaştırılan β -glukozidaz enziminin optimum sıcaklığı bu verilerle karşılaştırıldığında yüksek bir değere sahip olduğu söylenebilir.

Literatürde verilen bazı organizmalardan saflaştırılan β -glukozidaz enzimlerinin kısa süreli ön inkübasyon şartlarındaki ısıl kararlılık profilleri belirlenmiştir. Buna göre bir mantar türü olan *Aureobasidium* sp ATCC 20524’teki enzimin 15 dakika ön inkübasyondan sonra 70 °C’ye kadar kararlı olduğu (Hayashi vd., 1999), vanilya fasüyesindeki enzimin 30 dakika ön inkübasyondan sonra 40 °C’ye kadar kararlılığını sürdürdüğü (Odoux vd., 2003), bir mantar türü olan *Aspergillus niger* 322’deki enzimin 30 dakikalık ön inkübasyon sonucunda 50 °C’ye kadar kararlı olduğu (Peshin ve Mathur, 1999), yenilebilen bir mantar olan *Volvariella volvacea*’daki enzimin ise 30 dakikalık ön inkübasyon sonrasında 45 °C’ye kadar kararlı olduğu (Li vd., 2005), bir mantar türü olan *Aspergillus oryzae*’deki enzimin ise 1 saatlik ön inkübasyon süresinin sonunda 60 °C’ye kadar kararlı olduğu (Zhang vd., 2007), bir maya türü olan *Pichia pastoris*’teki enzimin 30 dakikalık ön inkübasyon sonucunda 40 °C’ye kadar kararlılığını koruduğu (Turan ve Zheng, 2005), bir bakteri türü olan *Flavobacterium johnsonae*’deki enzimin ise 35 °C’ye kadar kararlılığını koruduğu (Okamoto vd., 1999) tespit edilmiştir. Bu veriler ışığında *Lepista flaccida*’dan kısmen saflaştırılan β -glukozidaz enziminin de 40 °C’ye kadar kararlılığını önemli ölçüde kaybetmediği, 50 ve 60 °C’de ise kararlılığını yarı yarıya koruduğu göz önüne alındığında enzimin 30 dakika pekte kötü olmayan bir ısıl kararlılık profili sergilediği söylenebilir.

Endoglukanaz enzimi durumunda aktivitenin 50 °C’de en yüksek olduğu tespit edildi (Şekil 10). Ayrıca enzim aktivitesinin 60 °C’de de yüksek olduğu, fakat diğer sıcaklık değerlerinde ise %50’nin altına indiği görülmektedir. Bununla paralel olarak enzimin ısı kararlılık profiline bakıldığında aktivitenin 60 °C’de 30 dak ön inkübasyondan sonra hemen hemen hiç azalmadığı, optimum sıcaklık değeri olan 50 °C’de ise çok az azaldığı tespit edilmiştir. Aktivite 40 °C ve aşağısındaki sıcaklık değerlerinde ise yaklaşık %10 oranında kaybolurken, 70 °C’de ise yarı yarıya azalmıştır (Şekil 13). Farklı kaynaklardan izole edilen endoglukanaz enzimlerinin ısı kararlılık profilleri incelendiğinde, *Aspergillus terreus* mantarındaki enzimin 4 saatlik ön inkübasyon süresi sonunda 40 ve 50 °C’lik sıcaklıklarda aktivitesini hemen hemen korurken 60 °C’de ise yaklaşık %80 oranında kaybettiği rapor edilmiştir (Nazir vd., 2009), *Bipolaris sorokiniana* mantarından karakterize edilen enzimin 2 saatlik ön inkübasyon süresi sonunda 28 ve 37 °C’de aktivitesini koruduğu, fakat 55 °C’de ise aktivitesini %55 oranında kaybettiği görülmektedir (Geimba vd., 1999), *Bacillus* sp.AC-1 bakterisinden karakterize edilen enzimin ise 1 saatlik ön inkübasyon sonunda sadece 30 °C’de aktivitesini koruduğu (Li vd., 2006), *Aspergillus aculeatus* mantarından saflaştırılan enzimin 30 dakikalık ön inkübasyon süresi sonunda sadece 40 °C’de aktivitesini koruduğu (Naika vd., 2007) olarak tespit edilmiştir. Ayrıca *Fusarium oxysporum* mantarından karakterize edilen endoglukanaz enziminin optimum sıcaklık değeri 75 °C olarak bulunmuş fakat enzimin ısı kararlılık profili incelendiğinde ise 20 dakika sonra 70 °C’de aktivitesini %50 oranında kaybettiği de tespit edilmiştir (Shuyan vd., 2006).

Enzimlerin uzun süreli ön inkübasyon sürelerindeki ısı kararlılıkları da incelendi. β -glukozidaz enziminin 48 saat sonundaki ısı kararlılık profiline bakıldığında düşük sıcaklık değerlerinde aktivitenin daha yüksek, yüksek sıcaklık değerlerinde ise nispeten daha düşük olduğu tespit edildi. Ayrıca bütün sıcaklık değerlerinde 24 saatten sonra aktivitede önemli derecede değişiklikler olmadığı gözlemlendi. β -Glukozidaz enziminin ısı kararlılık profilindeki önemli bir nokta enzimin 60 °C’de 6 ve 12 saatlik ön inkübasyonları sonucu aktivitesini %50 oranında korumasıdır. Oysaki 40 ve 50 °C’de 6 ve 12 saat sonunda aktivite değerleri %50’nin altına inmektedir (Şekil 14). Literatür bilgileri incelendiğinde selülaz enzimlerinin ısı kararlılık profillerinin çoğunlukla kısa süreli ön inkübasyon şartlarında tespit edildiği görülmüştür. Yine de yapılan bazı çalışmalarda uzun süreli inkübasyon şartları da tercih edilmiştir. Yenilebilir bir mantar olan *Volvariella volvacea*’daki β -glukozidaz enzimi 2 saatlik ön inkübasyon sonucunda 42 °C’ye kadar

kararlılığını %40-50 oranında korurken, 45 °C’de ise bu oran nerdeyse sıfıra inmektedir (Li vd., 2005). Yine bir mantar türü olan *Fomitopsis palustris*’deki β -glukozidaz enzimi 48 saatlik ön inkübasyon sonucu 45 °C’de aktivitesini tamamen korurken, 55 °C’de %20 oranında ve 65 °C’de ise tamamen kaybetmiştir (Yoon vd., 2008). *Lepista flaccida*’dan kısmen saflaştırılan β -glukozidaz enziminin 6 ve 12 saatlik ön inkübasyon süreleri sonunda 60 °C’de aktivitesini %50 oranında koruması enzimin ısı kararlılığı açısından önemli sayılabilecek bir özelliktir.

Fakat endoglukanaz enziminin aktivitesini artan ön inkübasyon süreleri boyunca sürekli kaybettiği, 48 saatin sonunda ise tüm sıcaklık değerlerinde büyük oranda kaybettiği görülmektedir (Şekil 15). Endoglukanaz enziminin ısı kararlılık profilindeki önemli bir nokta enzimin 60 °C’de 6 saatlik ön inkübasyon sonucu aktivitesinin nerdeyse tamamen korunmasıdır. Ayrıca 70 °C haricindeki tüm sıcaklık değerlerinde 6 saatlik ön inkübasyon sonunda enzimin aktivitesi pek fazla değişmemiştir. Hemen hemen tüm sıcaklık değerlerinde 12 saatlik ön inkübasyon süresi sonunda ise enzim aktivitesi %40–50 oranında korunmuştur (Şekil 15). Farklı organizmalarda çalışılan endoglukanaz enzimlerinin ısı kararlılıkları incelendiğinde 48 saat gibi uzun bir zaman dilimine rastlanamamıştır. Zaten bu sürenin sonunda enzim aktivitesini oldukça kaybetmiştir. Belki de diğer enzimler de aynı profili sergilediğinden uzun süreli ön inkübasyon çalışmaları pek fazla yapılmamıştır.

Kısmen saflaştırılan β -glukozidaz ve endoglukanaz enzimleri için kinetik çalışmalar da gerçekleştirilmiştir. Her iki enzim için belirli substrat konsantrasyonu aralıklarında gerçekleştirilen aktivite tayinleri sonucu substrat doygunluk eğrileri (Michaelis-Menten grafikleri) çizilmiştir. Elde edilen aktivite sonuçları kullanılarak substrat doygunluk eğrileri çizilmiştir. β -glukozidaz enzimi hiperbolik bir Michaelis-Menten grafiği ortaya çıkarırken, endoglukanaz enzimi sigmoidal bir grafik ortaya çıkarmıştır. β -glukozidaz aktivitesi için optimum substrat konsantrasyonu 2 mM (Şekil 16), endoglukanaz için ise 12 mg/ml (Şekil 17) olarak belirlenmiştir.

β -Glukozidaz enziminin *p*NPG substratı varlığında çizilen Lineweaver-Burk grafiğinden ise V_{maks} ve K_m değerleri sırası ile 5,78 nmol.dak⁻¹.mg⁻¹ protein ve 1,06 mM olarak hesaplandı (Şekil 18). Bu değerler literatürdeki bazı değerlerle karşılaştırıldığında V_{maks} değerinin düşük olduğu tespit edilmiştir. Fakat K_m değerinin de birçok değerden daha düşük olması ise enzimin *p*NPG substratına ilgisinin birçok organizmadaki enzimlerden daha fazla olduğu sonucunu ortaya koymaktadır (Tablo 3).

Endoglukanaz aktivitesi için ise CMS substratı varlığında Michaelis-Menten grafiğinin sigmoidal bir eğri çıkmasından dolayı Lineweaver-Burk grafiği çizilemedi. Her ne kadar sigmoidal doygunluk eğrisinden V_0 'ın yarı maksimum olduğu bir substrat değeri bulunsa da, enzim hiperbolik Michaelis-Menten ilişkisini izlemediği için bu K_m 'nin belirlenmesinde kullanılmaz. Bunun yerine çoğunlukla $[S]_{0,5}$ veya $K_{0,5}$ sembolü allosterik bir enzim tarafından katalizlenen tepkimenin yarı en yüksek hızındaki substrat derişiminin gösteriminde kullanılır (Lehninger, 2004). Bu bilgiler ışığında Michaelis-Menten grafiğinden (Şekil 17) CMS substratı varlığında endoglukanaz enzimi için $[S]_{0,5}$ veya $K_{0,5}$ değeri 7,7 mg/ml, V_{maks} değeri ise 25 $\mu\text{mol.dak}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ protein olarak bulundu. Literatür bilgileri tarandığında endoglukanaz enzimi ile ilgili pek fazla kinetik veriye rastlanamamıştır (Tablo 4).

Nihai olarak enzim aktiviteleri üzerine bazı metal iyonlarının ve kimyasalların etkisi incelendi. 10 mM final konsantrasyonlarında metal iyonları enzimlerle inkübe edilerek aktivitelerindeki değişimler belirlendi (Tablo 10). Buna göre çalışılan konsantrasyonda metal iyonlarının β -glukozidaz aktivitesini önemli ölçüde etkilemediği görüldü. Aynı konsantrasyondaki metal iyonları ise endoglukanaz aktivitesini farklı şekillerde etkilemektedir. Aktivite Li^+ ve Hg^{+2} iyonlarından önemli ölçüde etkilenmezken, Cu^{+2} ve Zn^{+2} iyonlarından etkilenmiş ve %60–70 oranında inhibe olmuştur. Bunun yanında Na^+ , Co^{2+} iyonları enzim aktivitesini yaklaşık %30 oranında artırırken, Mn^{2+} iyonu ise %134 gibi büyük bir oranda aktiviteyi artırmaktadır. Farklı organizmalardaki enzimler metal iyonlarına karşı değişik davranışlar sergilemektedir (Hayashi vd., 1999; Odoux vd., 2003; Pombo vd., 2008; Li vd., 2006). β -glukozidaz enzim aktivitesinin denenen metal iyonlarından ve EDTA'dan etkilenmemesi bu enzimin metal bağımlı olmadığını ya da metal aktivatör veya inhibitörlere sahip olmadığını ortaya koyabilir. Oysaki daha önceden yapılan bazı çalışmalarda β -glukozidaz enzimlerinin özellikle Hg^{2+} dan etkilendiği ve aktivitelerinin inhibe olduğu rapor edilmiştir (Peshin ve Mathur, 1999). Ayrıca enzimin Hg^{2+} gibi bir ağır metalden etkilenmemesi aktiviteden sorumlu bir sistein biriminin olmadığı sonucunu ortaya çıkarabilir.

β -glukozidaz aktivitesi 1 mM ve 10 mM'lık kimyasallar mevcudiyetinde önemli ölçüde değişmediği, fakat SDS mevcudiyetinde ise neredeyse tamamen inhibe olduğu görülmüştür. Disülfür köprülerini indirgeyen DTT ve β -merkaptolanolün 1 ve 10 mM'lık konsantrasyonlarda enzim aktivitesini değiştirmemesi aktiviteyi etkileyen disülfür köprülerinin olmadığı sonucunu ortaya koyabilir. Ayrıca bir serin proteaz inhibitörü olan

PMSF'nin aktiviteyi önemli ölçüde değiştirmemesi enzim aktivitesini etkileyen serin biriminin olmadığı sonucunu ortaya çıkarabilir. Anyonik bir deterjan olan SDS'in aktiviteyi tamamen inhibe etmesi ile enzimin kovalent olmayan etkileşimlerle bir arada tutulan alt birimlerden oluştuğu sonucuna ulaşılabilir.

Endoglukanaz aktivitesi ise 1m M DTT ve PMSF varlığında pek değişmezken, EDTA ve β -merkaptolanol varlığında yarı yarıya azalmıştır. 10mM'lık konsantrasyonlarda ise denenen kimyasalların farklı oranlarda enzim aktivitesini dūřürdüęü gürülmüştür. SDS varlığında ise reaksiyon karışımına SDS eklendiğinde çökme gerçekleştiği için aktivite belirlenememiştir. Endoglukanaz enzimi metal iyonları ve EDTA'dan farklı şekillerde etkilenmiştir. Bu durumda enzimin metal bağımlı bir enzim olduğu ya da metal aktivatör veya inhibitörlere sahip olduğu sonucu ortaya konulabilir. DTT ve β -merkaptolanolün 1 ve 10 mM'lık konsantrasyonlarda enzim aktivitesini farklı oranlarda inhibe etmesi aktiviteyi etkileyen disülfür köprülerinin varlığını işaret edebilir. PMSF'nin özellikle 10 mM'lık konsantrasyonda aktiviteyi önemli ölçüde inhibe etmesi enzim aktivitesini etkileyen bir serin biriminin olduğu sonucunu ortaya çıkarabilir.

Sonuç olarak *Lepista flaccida* mantarından amonyum sülfat ile kısmi olarak saflaştırılan β -glukozidaz ve endoglukanaz enziminin asidik pH'larda ve sırası ile 50 ve 60 °C'de daha yüksek aktivite gosterdikleri tespit edilmiştir. Ayrıca her iki enzimde pH 2,0–9,0 aralığında oldukça iyi kararlılık göstermişlerdir. Her iki enzimin ısı kararlılıklarına bakıldığında özellikle 6 saat sonunda 60 °C'de yüksek kararlılıklara sahip oldukları gürülmüştür. Enzimlerin bu özellikleri literatürdeki farklı endoglukanaz enzimleri ile karşılaştırıldığında çoğunlukla daha iyi sonuçlara ulaşıldığı gözlenmiştir.

5. ÖNERİLER

Enzimler, canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve yan ürün oluşturmadan yüksek ürün verimi sağlayan biyokatalizörlerdir. Bu nedenle enzimler birçok araştırmacının ilgi odağıdır. Ayrıca endüstriyel uygulamalarda kimyasal katalizörlere göre birçok üstünlüğü olan enzimlerin kullanımının artması, değişik kaynaklardan yeni enzimlerin keşfine olan ilgiyi de artırmıştır.

Selüloz, bitki hücre duvarının temel bileşenidir ve doğada en bol bulunan yenilenebilir enerji kaynağıdır. Selülozun enerji kaynağı olarak kullanılabilmesi için hidrolizlenmesi gerekmektedir. Endüstriyel uygulamalarda selülozun parçalanması için asit hidrolizi kullanılmaktadır. Ancak bu uygulama istenmeyen yan ürün oluşumu, yüksek viskoziteli ürün oluşması gibi birçok olumsuz etkiye neden olmaktadır. Bu nedenle selülozun hidrolizinde selülaz enzimlerinin kullanılması daha avantajlıdır. Selüloz parçalayıcı enzim sistemi temelde üç bileşenden oluşmaktadır. Bunlar endoglukanaz, β -glukozidaz ve ekzoglukanaz enzimleridir. Bu enzim sistemi tekstil endüstrisi, fabrikaların biyokirliliğinin giderilmesi, deterjan, gıda, farmakoloji ve kozmetik sanayileri gibi birçok alanda sıkça kullanılmaktadır.

Gerçekleştirilen bu çalışmada *Lepista flaccida* mantarından hazırlanan ham özütlerden amonyum sülfat çöktürmesi ile kısmen saflaştırılan β -glukozidaz ve endoglukanaz enzimleri karakterize edilmiş ve kinetik verileri elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar literatürdeki değerlerle benzerlik göstermekle beraber her iki enzimin de pH ve ısı kararlılıkları dikkat çekicidir.

Bundan sonra yapılabilecek olan çalışmalar, ham özütten kısmi olarak saflaştırılıp karakterize edilmiş olan β -glukozidaz ve endoglukanaz enzimlerinin tam saflaştırılması ve ileri derecede karakterize edilmesi, çeşitli kimyasal maddeler mevcudiyetinde davranışının incelenmesi ve inhibisyon mekanizmalarının ayrıntılı bir şekilde ortaya konması şeklinde sıralanabilir. Ayrıca enzimleri kodlayan genlerin moleküler biyolojisi çalışılarak rekombinant enzim üretimi gerçekleştirilebilir ve mutasyon çalışmaları ile enzimlerin bazı özellikleri geliştirilebilir.

Enzimlerin sürekli kullanılabilirliklerini ve kararlılıklarını arttırmanın diğer bir yolu da immobilizasyon yöntemidir. Bu yöntem sayesinde, immobilize enzimin özelliklerinin ve dolayısıyla kararlılıklarının nasıl değiştiği araştırılabilir. Böylece enzimler

reaksiyonlarda defalarca kullanılabilecek hale getirileceğinden, endüstriyel açıdan da oldukça cazip hale geleceklerdir. Bu nedenle, daha ileri çalışmalarda *L. flaccida* mantarındaki β -glukozidaz ve endoglukanaz enzimlerinin immobilizasyonu da incelenebilir.

6. KAYNAKLAR

- Amouri, B. ve Gargouri, A., 2006 Characterization of novel β -glucosidase from a stacybotys strain, Biochem. Eng. J., 32, 191-197.
- Baraznenok, V.A., Ankudimova, N.V., Sinitsyn, A.P., Popava, N.N., Gutyerres, B., Okunev, O.N. ve Zorov, I.N., 1997. Comparison of cellulase activity assays with stained and unstained cellulose derivatives, Biochemistry., 62, 760-766.
- Barbagallo, R.N., Palmeri, R., Fabiano, S., Rapisarda, P. ve Spagna G., 2007. Characteristic of β -glucosidase from Sicilian blood oranges in relation to anthocyanin degradation, DOFATA.,98.
- Beguın P. ve Aubert, J.P., 1994. The biological degradation of cellulose, FEMS Microbiol. Lett., 13, 25-58.
- Beguın, P. ve Aubert, J.P., 1993. The biological degradation of cellulose. FEMS Microbiol. Rev., 13, 25-58.
- Bhat, K.M., Hay, A.J., Claeysens, M. ve Wood, T.M. 1990. Study of the mode of action and site specificity of the endo-(1-4)- β -D-glucanases of the fungus *Penicillium pinophilum* with normal, 3H labelled, reduced and chromogenic cello-oligosaccharides. Biochem. J., 266, 371-378.
- Bhat, M.K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology, Biotechnol. Adv., 18, 355-383.
- Bhat, M.K. ve Bhat, S. 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications, Biotechnol. Adv.,15, 583-620.
- Bischoff, K., Rooney, A., Li, X., Liu, S. ve Hughes, S., 2006. Purification and characterization of a family 5 endoglucanase from a moderately thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*, Biotechnol Lett., 28,1761-1765.
- Canevascini, G., Coudray, M.R., Rey, J.P., Southgate, R.J.G. ve Meier, H. 1979. Induction and catabolite repression of cellulase synthesis in the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*, J. Gen. Microbiol., 110, 291-303.
- Chapin III, F.S., Matson, P.A., Money, H.A., 2002. Principles of Terrestrial Ecosystem Ecology, Springer-Verlag, New York.
- Coughlan, M.P., 1985. Cellulases: Production properties and applications. Biochem. Soc. Trans., 13, 405-406.

- Coughlan, M.P., 1985. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. In: G.E. Russell, Editor, Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, Newcastle-upon-Tyne, Interscience, 3, 39–109.
- Çakmak, Ü., 2008. *Amanita vaginata* var. *vaginata* ve *Tricholama terreum* mantarlarındaki esterolitik aktiviteden sorumlu enzimlerin karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Ding, S., Ge, W. ve Buswell, J.A., 2001. Endoglucanase I from the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea* Purification, characterization, cloning and expression, Eur. J. Biochem., 268, 5687–5695.
- Ding, S., Ge, W. ve Buswell, J.A., 2002. Secretion, purification and characterization of a recombinant *Volvariella volvacea* endoglucanase expressed in the yeast *Pichia pastoris*, Enzyme Microb. Technol., 31, 621-626.
- Durand, H., Clanet, M. ve Tiraby, G., 1988. Genetic improvement of *Trichoderma reesei* for large scale cellulase production, Enzyme Microb. Technol., 10, 341–346.
- Eberhart, B.M., Beck, R.S., ve Goolsby, K.M., 1977. Cellulase of *Neurospora crassa*, J. Bacteriol., 130, 181–186.
- Endo, K., Hakamada, Y., Takizawa, S., Kubota, H., Sumitomo, N. ve Kobayashi T., 2001. A novel alkaline endoglucanase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate: enzymatic properties, and nucleotide and deduced amino acid sequences, Appl. Microbiol. Biotechnol., 57, 109–116.
- Ertunga, N.S., 2006. Termofilik *Anoxybacillus gonemsis* G2 suşunun fruktoz-1,6-bisfosfat aldolaz geninin klonlanması, ekspresyonu ve karakterizasyonu, Doktora Tezi, KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Fernando, O.H., Pérola O.M., André L.F. ve Adriane M.F.M., 2006. Characterization of hemicellulases and cellulases produced by *Ceriporiopsis subvermisporea* grown on wood under biopulping conditions. Enzyme Microb. Tech., 29, 642-647.
- Geimba, P.M., Riffel, A., Agostini, V. ve Brandelli, A., 1999. Characterisation of cellulose-hydrolysing enzymes from the fungus *Bipolaris sorokiniana*, J. Sci. Food Agric., 79,1849-1854.
- Gilbert, H.J., Hazelwood, G.P., Laurie, J.I., Orpin, C.G. ve Xue, G.P., 1992. Homologous catalytic domains in a rumen fungal xylanase: evidence for gene duplication and prokaryotic origin, Mol. Microbiol., 6, 2065.
- Gong, C.S. ve Tsao, G.T., 1979. Cellulase and biosynthesis regulation, Annu. Rep. Ferment. Processes., 3, 111–140.
- Günata, Z., ve Vallier, M.J., 1999. Production of a highly glucose tolerant extracellular β -glucosidase by three *Aspergillus* strain, Biotechnology Letters, 21, 219-223.

- Han, J. ve Chen, H., 2008. Characterization of β -glucosidase from corn stover and its application in simultaneous saccharification and fermentation, Bioresource Biotechnol., 99, 6081-6087.
- Han, Y. ve Chen, H., 2008. Characterization of β -glucosidase from corn stover and its application in simultaneous saccharification and fermentation, Bioresource Technol., 99, 6081-6087.
- Hayashi, S., Sako, S., Yokoi, H., Takasaki, Y. ve Imada, K., 1999. Purification and characterization of the intracellular β -glucosidase from *Aureobasidium sp* ATCC 20524, J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 22, 160-163.
- Henrissat, B., Claeysens, M., Tomme, P., Lemesle, L. ve Momon, J.P., 1989. Cellulase families revealed by hydrophobic cluster analysis, Gene., 81, 83-95.
- Hu, Y., Luan, H., Hao, D., Xiao, H., Yang, S. ve Yang, L. 2006. Purification and characterization of a novel ginsenosidase-hydrolyzing β -D-glucosidase from China white jade snail (*Achatina fulica*), Enzyme Microb Technol., 40, 1358-1366.
- Idogaki, H. ve Kitamoto Y., 1992. Purification and some properties of a carboxymethyl cellulase from *Coriolus versicolor*, Biosci Biotech Biochem., 56, 1-970.
- Joo, A.H., Jeya, M., Lee, K.M., Sim, W., Kim, J.F., Kim, I.W., Kim, Y.S., Oh, D.K., Gunasekaran, P. ve Lee, J.K., 2008. Purification and characterization of a β -1,4-glucosidase from a newly isolated strain of *Fomitopsis pinicola*, Appl Microbiol Biotechnol., 83, 285-94.
- Jorgensen, H., Eriksson, T., Börjesson, J., Tjerneld, F. ve Olsson, L., 2003. Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888, Enzyme Microb. Technol., 32, 851-861.
- Karita, S., Kimura, T., Saka, K. ve Ohmiya K. 1997. Purification of the *Ruminococcus albus* endoglucanase IV using a cellulose-binding domain as an affinity tag, J Ferment. Bioeng., 84, 354-357.
- Karnchanatat, A., Petsom, A., Sangvanich, P., Piaphukiew, J., Whalley, A.J.S., Reynolds, C.D. ve Sihanonth, P., 2007. Purification and biochemical characterization of an extracellular β -glucosidase from the wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb:Fr) Rehm, FEMS Microbiol Lett., 270, 162-170.
- Kaur J., Bhupinder S.C., Badhan, A.K. ve Ghatora K.S., 2007. Purification and characterization of β -glucosidase from *Melanocarpus sp* MTCC 3922, Electron J. Biotechnol., 10, 261-270.
- Kim, B., Singh, S.P. ve Hayashi, K., 2006. Characteristics of chimeric enzymes constructed between *Thermotoga maritima* and *Agrobacterium tumefaciens* beta-glucosidases: role of C-terminal domain in catalytic activity, Enzyme Microb. Technol., 38, 952-959.

- Kim, K.C., Yoo, S.S., Oh, Y.A. ve Kim, S.J. 2003. Isolation and characteristics of *Trichoderma harzianum* FJ1 producing cellulases and xylanase, J. Microbiol. Biotechnol., 13, 1-8.
- Kränzlin, F., 2005. Fungi of Switzerland : a contribution to the knowledge of the fungal flora of Switzerland, Verlag Mykologia, Lucerne, Switzerland.
- Kusuda, M., Ueda, M., Konishi, Y., Araki, Y., Yamanaka, K., Nakazawa, M., Miyatake, K. ve Terashita, M., 2006. Detection of β -glucosidase as saprotrophic ability from an ectomycorrhizal mushroom, *Tricholoma matsutaka*, Mycoscience., 47, 184-189.
- Ledger, T.N., Jaubert, S., Bosseluta, N., Abada, P. ve 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.
- Lee, Y.J., Kim, B.K., Lee, B.H., Jo, K.I., Lee, N.K., Chung, C.H., Lee, Y.C. ve Lee, J.W., 2007. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull, Bioresource Technol., 99, 378-386.
- Li, X., Pei, J., Wu, G. ve Shao, W., 2005. Expression, purification and characterization of a recombinant β -glucosidase from *Volvariella volvacea*, Biotechnol.Lett., 27, 1369-1373.
- Li, Y.H., Ding, M., Wang, J., Xu, G. ve Zhao, F., 2006. A novel thermoacidophilic endoglucanase, Ba-EGA, from a new cellulose-degrading bacterium, *Bacillus* sp.AC-1, Appl. Microb. Biotechnol., 70, 430-436
- Lowry, O., H., Rosebrough, N., J., Farr, A., L. ve Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent, J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- Luan, H., Liu, X., Qi, X., Hu, Y., Hao, D., Cui, Y. ve Yang, L., Purification and characterization of a novel stable ginsenoside Rb₁-hydrolyzing β -d-glucosidase from China white jade snail, Process Biochem., 41, 1974-1980.
- Lymar, E.S., Li, B. ve Renganathan, V., 1995. Purification and characterization of a cellulose-binding β -glucosidase from cellulose degrading culture of *Phanerochaete chrysosporium*, Appl. Environ. Microbiol., 61, 2976-2980.
- Magalhaes, P.O. ve Ferraz, A.F.M., 1995. Purification and characterization of β -glucosidase from *Ceriporiopsis subvermispora* produced in biopulping condition, J. Appl. Microbiol., 101, 480-486.
- Mandels, M., 1985. Applications of cellulases. Biochem. Soc. Trans., 13, 414-415.
- Mandels, M., Andreotti, R. ve Roche, C., 1976. Measurement of saccharifying cellulase. Biotechnol. Bioeng. Symp., 6, 21-33.

- Mawadza, C., Hatti-Kaul, R., Zvauya, R. ve Mattiasson, B., 2000. Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains, Journal of Biotechnology, 83, 177-187.
- Miller GL., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determined of reducing sugar, Anal.Chem. 31, 426-8
- Morais, H., Ramos, C., Matos, N., Forgacs, E., Cserhati, T., Almeida, V., Oliveira, J., Darwish, Y. ve Illes, Z., 2002. Liquid chromatographic and electrophoretic characterisation of extracellular β -glucosidase of *Pleurotus ostreatus* grown in organic waste. J. Chromatogr.B., 770, 111-119.
- Murashima, K., Nishimura, T., Nakamura, Y., Koga, J., Moriya, T., Sumida, N., Yaguchi, T. ve Kono, T., 2002. Purification and characterization of new endo-1,4- β -d-glucanases from *Rhizopus oryzae*, Enzyme Microb. Technol., 30, 319-326.
- Murao, S., Sakamoto, R. ve Arai, M., 1988. Cellulases of *Aspergillus aculeatus*. Methods Enzymol., 160, 274-99.
- Naika, G.S., Kaul, O ve Prakash, V., 2007. Purification and characterization of a new endoglucanase from *Aspergillus aculeatus*, J. Agric.Food Chem., 55, 7566-7572.
- Nazir, A., Soni, R., Saini H. S., Manhas, R. K. ve Chadha, B. S., 2009. Purification and characterization of an endoglucanase from *Aspergillus terreus* highly active against barley glucan and xyloglucan, World J Microbiol Biotechnol., 2, 191-197.
- Nelson, N.D. ve Cox, M.M., 2004. Lehninger, Principles of Biochemistry. W.H Freeman ve Company, Newyork, NY. USA. 280-306.
- Odoux, E., Chauwin, A. ve Brillouet, J.M., 2003. Purification and characterization of Vanilla Bean (*Vanilla Planifolia* Andrews) β -glucosidase, J.Agr.Food Chem., 51, 3168-3173.
- Okada G., 1988. Cellulase of *Aspergillus niger*, Method Enzymol., 160, 64-259.
- Okamoto, K., Nakano, H., Yatake, T., Kiso, T. ve Kitahata, S., 1999. Purification and some properties of β -glucosidase from *Flavobacterium johnsonae*, Biosci. Biotechnol. Biochem., 64, 333-340.
- Okamoto, K., Nakato, H., Yatake, T., Kiso, T. ve Kitahata, S., 2000, Purification and some properties of a beta-glucosidase from *Flavobacterium johnsonae*, Biosci. Biotechnol. Biochem., 64, 2, 333-340.
- Oyekola, O.O., Ngesi, N. ve Whiteley, C.G., 2006. Isolation. Purification and characterization of an endoglucanase and β -glucosidase from an anaerobic sulfhidogenic bioreactor, Enzyme Mocrb. Technol., 40, 637-644.

- Percival, Y.H., Michael, Z., Himmelb, E. ve Mielenzc, J.R., 2006. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies, Biotechnology Advances., 452-481.
- Peshin, A. ve Mathur, J.M.S., 1999. Purification and characterization of β -glucosidase from *Aspergillus niger* strain 322, Lett Apply Microbiol., 28, 401-404.
- Pitson, S.M., Seviour, R.J. ve McDougall, B.M., 1996. Purification and caharacterization of an extracellular β -glucosidase from the filamentous fungus *Acremonium persicinum* and its probable role in β -glucan degradation, Enzyme Microb. Tecno., 21, 182-190.
- Pombo, G.P., Perez G., Carrau F., Guisan M.S., Viera B.F. ve Brena M.B., 2008. One step purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from *Metschnikowia pulcherrima*, Biotechnol Lett., 30, 1469-1475.
- Pontoh, J. ve Low, N.H., 2008, Purification and characterization of β -glucosidase from honey bees (*Apis mellifera*), Insect Biochem. Molec., 32, 679-690.
- Qin, Y., Wei, X., Liu, X., Wang, T. ve Qu, Y., 2007. Purification and characterization of recombinant endoglucanase of *Trichoderma reesei* expressed in *Saccharomyces cerevisiae* with higher glycosylation and stability, Protein Expres Purif., 58, 162-167.
- Rashid, M.H. ve Siddiqui, K.S., 1997. Purification and characterization of a β -glucosidase from *Aspergillus niger*, Fola Microbiol., 42, 544-550.
- Rho, D., Desrochers, M. Jurasek, L., Driguez, H. ve Defaye, J., 1982. Induction of cellulase in *Schizophyllum commune*: thiocellobiose as a new inducer, J. Bacteriol., 149, 47-53.
- Ryu, D.D.Y. ve Mandels, M., 1980. Cellulases: biosynthesis and applications Enzyme Microb. Technol., 2, 91-102.
- Saha, B.C., 2004. Production, purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of *Mucor circinelloides*, Process Biochemistry., 39, 1871-1876.
- Saito, K., Kawamura, Y. ve Oda, Y., 2003. Role of the pectinolytic enzyme in the lactic acid fermentation of potato pulp by *Rhizopus oryzae*, J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 30, 440-444.
- Sánchez-Torres, J., Pérez, P. ve Santamaría, I., 1996. A cellulase gene from a new alkaliphilic *Bacillus* sp. (strain N186-1). Its cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli*, Appl Microbiol Biotechnol., 46, 149-155.
- Sanwal, S.G.G., 1999. Purification and characterization of a cellulase from *Catharanthus roseus* stems, Phytochemistry, 52, 7-13.

- Schreier, J.H. ve Schreier, P., 1986. Purification and partial characterization of β -glucosidase from papaya fruit, Phytochemistry, 25, 2271-2274.
- Sheehan, J. ve Himmel, M.E., 1999. Enzymes, energy, and the environment: a strategic perspective on the U.S. Department of Energy's research and Development activities for ethanol, Biotechnol. Prog., 15, 817-827.
- Shuyan, L., Xinyuan, D., Xuemei, L ve Peiji, G., 2006. A novel thermophilic endoglucanase from a mesophilic fungus *Fusarium oxysporum*, Chinese Sci. Bull., 51, 191-197
- Sun, Y. ve Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production, Bioresource Technol., 83, 1-11.
- Suto, M. ve Tomita, F., 2001. Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi, J Bios Bioeng., 92, 305-311.
- Thongekkaew J., Ikeda H., Masaki K. ve Iefuji H., 2008. An acidic and thermostable carboxymethyl cellulase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: Purification, characterization and improvement of its recombinant enzyme production by high cell-density fermentation of *Pichia pastoris*, Protein Expres. Purif., 60, 140-146.
- Trinci, A.P.J., Davies, D.R., Gull, K., Lawrence, M.I., Nielsen, B.B., Richers, A. ve Theodorou, M.A., 1994. Anaerobic fungi in herbivorous animals, Mycol. Res., 98, 129-152.
- Turan, Y. ve Zheng, M., 2005. Purification and characterization of an intracellular beta glucosidase from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, Biochemistry, 70, 1363-1368.
- URL-1. [http:// www.lsb.ac.uk/water/hycel.html](http://www.lsb.ac.uk/water/hycel.html), water structure and science, 08.06.2009.
- URL-2. <http://www.worthington-biochem.com/CEL/default.html>, Worthington Biochemical corporation, 08.06.2009.
- URL-3. <http://www.fao.org/docrep/w7241e/w7241e08.htm> 08.06.2009.
- Valaskova, V. ve Baldrian, P., 2006. Degradation of cellulose and hemicellulose by the brown rot fungus *Piptorus betulinus*- production of extracellular enzymes and characterization of the major cellulases, Microbiology, 152, 3613-3622.
- 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. ve 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.

- Watchalee, C., Pengthaisong, S., Robinson, R.C., Yuvaniyama, J., Oonanant, W., Bevan, D.R., Esen, A., Chen, C.J., Opassiri, R., Svasti, J., ve Cairns, J.R.K., 2008. Structural Insights into Rice BGlu1 β -Glucosidase Oligosaccharide Hydrolysis and Transglycosylation, J.Mol. Biol., 377, 1200-1215.
- Wei, D.L., Kirimura, K., Usami, S. ve Lin, T.H., 1996. Purification and caharcterization of extracellular β -glucosidase from the wood-grown fungus *Xylaria regalis*, Current Microbiology, 33, 297-301.
- Whitaker, J.R., 1994. Principles of Enzymology for the Food Sciences, Second Ed. Marcel Dekker, New York.
- Wood, T.M. ve McCrae, S.L., 1977. Ceilulase from *Fusarium solani*: purification and properties of the C1 component, Carbohydr. Res., 57, 117-133.
- Wood, T.M., 1985. Properties of cellulolytic enzyme systems, Biochem. Soc. Trans., 13, 407-410.
- Xue, G.P., Orpin, C.G., Gobius, K.S., Aylward J.H. ve Simpson ,G.D., 1992. Cloning and expression of multiple cellulase cDNAs from the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix patriciarum* in *Escherichia coli*, J. Gen. Microbiol., 138, 1413-1420.
- Yan, T.S. ve Lin C.L., 1996. Purification and caharcterization of a glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus niger* CCRC31494, Biosci. Biotechol. Biochem., 61, 965-970.
- Ye, X.Y., Ng, T.B., ve Cheng, K.J., 2001. Purification and characterization of a cellulase from the ruminal fungus *Orpinomyces joyonii* cloned in *Escherichia coli*, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology., 33, 87-94.
- Yi, J.C., Sandra, J.C., John, A.B. ve Shu, T.C., 1999. Production and distribution of endoglucanase, cellobiohydrolase, and β -glucosidase components of the cellulolytic system of *Volvariella volvacea*, the edible straw mushroom, Appl. Environ. Microbiol., 65, 553-559.
- Yoon, J., Kim, K.Y. ve Cha, C.J., 2008. Purification and characterization of thermostable β -glucosidase from the brown-rot basidiomycete *Fomitopsis palustris* grown on microcrystalline cellulose, J. Microbiol., 46, 51-55.
- Zaldivar, J., Nielsen, J. ve Olsson, L., 2001. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration, Appl. Microbiol. Biotechnol., 56, 17-34.
- Zhang, C., Li, D., Yu, H., Zhang, B. ve Jin, F., 2007. Purification and characterization of piceid- β -glucosidase from *Aspergillus oryza*, Process Biochem., 42, 83-88.

Zhou J., Wang Y.H., Chu J., Zhuang P.Y., Zhang S.L. ve Yin P., 2008. Identification and purification of the main components of cellulases from a mutant strain of *Trichoderma viride* T 100-14, Bioresource Technol., 99, 6826-6833.

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Tonya’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Akçaabat’ta tamamladı. 2002–2007 yılları arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü’nde Lisans öğrenimini tamamladı. 2007 yılında KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Programına girdi. İyi derecede İngilizce bilmektedir.