

FEN BİLİMLERİ VE MATEMATİK

ALANINDA ARAŞTIRMALAR VE DEĞERLENDİRMELER



EDİTÖR

Prof. Dr. Günay ÖZTÜRK

ARALIK 2025

YAYLIK 3032

gece
kitaplığı

İmtiyaz Sahibi / Yaşar Hız
Yayına Hazırlayan / Gece Kitaplığı

Birinci Basım / Aralık 2025 - Ankara
ISBN / 978-625-388-940-1

© copyright

Bu kitabın tüm yayın hakları Gece Kitaplığı'na aittir.
Kaynak gösterilmeden alıntı yapılamaz, izin almadan hiçbir yolla çoğaltılamaz.

Gece Kitaplığı

Kızılay Mah. Fevzi Çakmak 1. Sokak
Ümit Apt No: 22/A Çankaya/ANKARA
0312 384 80 40
www.gecekitapligi.com / gecekitapligi@gmail.com

Baskı & Cilt

Bizim Büro
Sertifika No: 42488

**FEN BİLİMLERİ VE MATEMATİK
ALANINDA ARAŞTIRMALAR VE
DEĞERLENDİRMELER**

ARALIK 2025

EDİTÖR

Prof. Dr. Günay ÖZTÜRK

gece
kitaplığı

İÇİNDEKİLER

BÖLÜM 1

MİKROORGANİZMALARDA HİYALÜRONİDAZ ENZİMLERİ

Dudu DEMİR , Cafer EKEN 7

BÖLÜM 2

TRICHODERMA TÜRLERİNİN LİTİK ENZİM ÜRETİMİ ÜZERİNE GENEL BİR İNCELEME

Kardelen ÇAĞLAYAN , Dudu DEMİR, Cafer EKEN 25

BÖLÜM 3

BAZI İLAÇLARIN KOYUN DALAK DOKUSUNDAN SAFLAŞTIRILAN GLUTATYON REDÜKTAZ ENZİMİ ÜZERİNE *İN VİTRO* ETKİLERİ

Çiğdem ÇOBAN 35

BÖLÜM 1

MİKROORGANİZMALARDA HİYALÜRONİDAZ ENZİMLERİ

Dudu DEMİR¹ , Cafer EKEN²

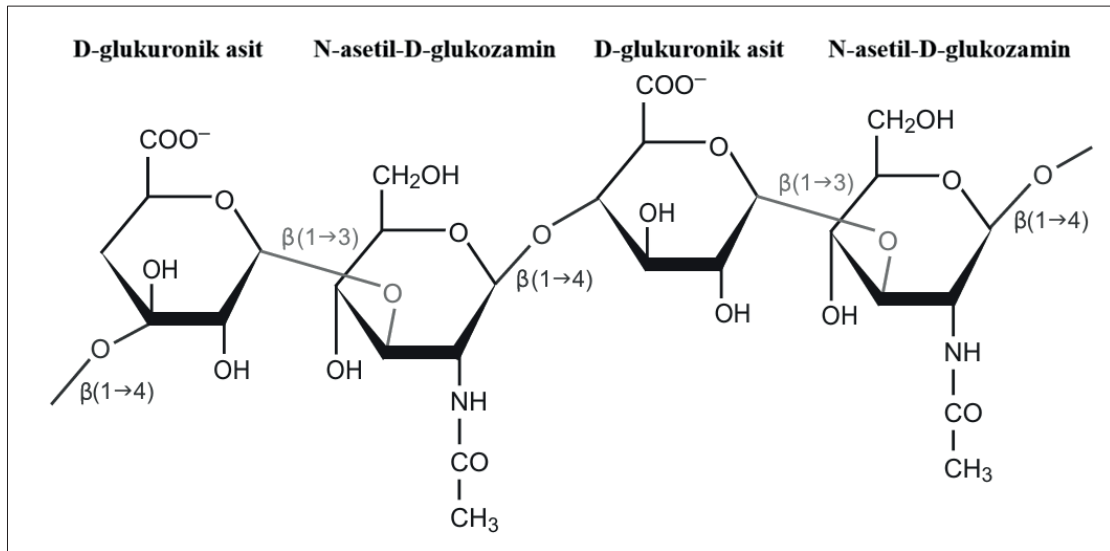
¹ Prof. Dr., Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Isparta. E-mail: dududemir@isparta.edu.tr

² Prof. Dr., Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Isparta. E-mail: cafereken@isparta.edu.tr

Giriş

Hyaluronik asit (HA), doğada yaygın olarak bulunan doğal bir biyopolimerdir. HA, hiyalüronan olarak da bilinir (Sze vd., 2016) ve ilk kez 1934 yılında sığır göz içi sıvısından (vitreus humor) izole edilerek tanımlanmıştır (Meyer ve Palmer, 1934). İlk izolasyonundan bu yana bu molekül, farklı araştırma alanlarında yoğun ilgi görmüş ve kapsamlı biçimde incelenmiştir (Fallacara vd., 2018). HA, memelilerde kalp kapakçıkları, deri, iskelet sistemi, göz vitröz sıvısı, göbek kordonu ve sinovyal sıvı gibi birçok dokuda yüksek miktarda bulunur (Fraser vd., 1997). Bununla birlikte HA yalnızca memeli dokularında değil, bazı bakterilerin hücre duvarlarında da tespit edilmiştir. *Streptococcus A* ve *C* grupları (Lowther ve Rogers, 1955; MacLennan, 1956) ile *Pasteurella multocida* (Carter, 1972) bu bakterilere örnek olarak verilebilir.

HA, doğrusal ve sülfat içermeyen bir glikosaminoglikandır. Yapısı, N-asetilglukozamin ile glukuronik asidin β -(1-4) ve β -(1-3) glikozidik bağlarla birbirine bağlandığı tekrar eden disakkarit birimlerinden oluşur (Şekil 1). Bu bağlanma biçimi, HA'nın yapısal olarak son derece stabil ve enerjik açıdan kararlı olmasını sağlar (Zhai vd., 2020). Her bir disakkarit biriminin moleküler ağırlığı yaklaşık 400 Da'dır. Bir hiyaluronik asit zinciri 10.000'e kadar disakkarit içerebilir; bu da yaklaşık $4,0 \times 10^3$ kDa'lık bir moleküler ağırlığa karşılık gelmektedir (Necas vd., 2008; Fallacara vd., 2018).



Şekil 1. Hiyalüronik asidin kimyasal yapısı (Jiang vd., 2007).

HA, canlı organizmalarda kritik işlevlere sahip olup yüksek nem tutma kapasitesi, viskoelastik yapısı, mekanik hasara karşı direnci ve immünojenik ya da toksik olmaması gibi özellikleri sayesinde geniş bir kullanım alanına sahip önemli bir biyomalzemedir. Eklemlerde kayganlaştırıcı, yapılarda stabilizatör, deride boşluk doldurucu ve kıkırdakta darbe emici olarak görev yapar (Liu vd., 2011; Salwowska vd., 2016; Gallo vd., 2019). HA polimeri insan vücudunun büyük kısmında yaygın olarak bulunur; bağ dokularının hücre dışı matrisi içerisinde hücrelerin çevresini sararak doku mimarisinin organizasyonunda temel bir rol üstlenir (Sindelar vd., 2021). HA yalnızca memeli bağ dokularında değil, gelişmekte olan ve tümör dokularının kritik ekstraselüler matrisinde de bol miktarda yer alır. Ekstraselüler alanın korunmasına, osmotik basıncın düzenlenmesine ve doku hidrasyonunun sürdürülmesine önemli katkılar sağlar (Fraser vd., 1997; Wang vd., 2022). Su tutma kapasitesi sayesinde kendi ağırlığının 1000 katına kadar su bağlayabilir; bu özelliği, eklemlerde hareket sırasında sürtünmeyi azaltarak biyolojik bir kayganlaştırıcı, statik koşullarda ise direnç sağlayan bir yapı oluşturur (Engström-

Laurent, 1997). Ayrıca proteinlerle etkileşerek büyüme, gelişme, inflamasyon ve immün yanıt gibi biyolojik süreçlerde rol oynar (Jiang vd., 2007). Benzersiz moleküler yapısı ve fizikokimyasal özellikleri, hücre proliferasyonu ve migrasyonu, yara iyileşmesi, inflamasyon ve anjiyogenez gibi temel biyolojik fonksiyonlarda görev almasını sağlar (Weber vd., 2019; Wang vd., 2022). Bu kritik özellikleri nedeniyle HA, son yıllarda klinik tanı, sürekli salım sistemleri için ilaç taşıyıcılığı, plastik cerrahi uygulamaları ve yeni doku mühendisliği malzemelerinin geliştirilmesi gibi birçok alanda kapsamlı biçimde araştırılmaktadır (Gaughan vd., 1991; Tezel ve Fredrickson, 2008; Wang vd., 2022).

HA'nın biyolojik ve klinik öneminin giderek artması, onu parçalayan enzimlere yönelik ilgiyi de belirgin biçimde artırmıştır. Bu doğrultuda hiyalüronidazlar ve hiyalüronat liyazlar, HA'nın depolimerizasyonundan sorumlu, yüksek özgülüğe sahip temel biyokatalizörler olarak öne çıkmaktadır. Daha önce nispeten göz ardı edilen bu enzimler, günümüzde HA'ya dayalı uygulamalarla bağlantılı çok sayıda araştırmanın odağında yer alarak önemli bir çalışma alanı hâline gelmiştir (Sindelar vd., 2021).

Hiyalüronidaz, HA'nın dinamik dengesinin düzenlenmesinde önemli rol oynayan bir enzimdir (Zhao vd., 2024; Lu vd., 2025). HA polimerlerindeki glikozidik bağları parçalayabilen bir glikozidaz olan hiyalüronidazlar, biyokimyasal özellikleri ve ortaya çıkan son ürünler esas alınarak Meyer (1971) tarafından üç farklı grupta sınıflandırılmıştır.

(1) Memeli hiyalüronidazları (testis tipi) (E.C. 3.2.1.35): Bu grup, endo- β -N-asetilheksosaminidazlardan oluşur ve HA, kondroitin ile kondroitin sülfatların (A ve C) β -1,4 glikozidik bağlarını rastgele hidrolize eder. Başlıca son ürünler, indirgen uçta N-asetilglukozamin bulunan çift sayılı oligosakkaritlerdir (tetra- ve hekzasakkaritler). Bu sınıftaki enzimler hem hidrolitik hem de transglikozidaz aktivite gösterir (örneğin testiküler hiyalüronidaz). Memeli spermatozoalarında, lizozomlarda ve yılanlar, sürüngenler ile Hymenoptera türlerinin zehirlerinde bulunurlar (Cramer vd., 1994).

(2) Hyaluronat-3-glikanohidrolazlar (E.C. 3.2.1.36) (sülük hiyalüronidazları): Bunlar endo- β -D-glukuronidazlar olup HA'nın β -1,3 glikozidik bağlarını parçalar ve diğer glikozaminoglikanlara (GAG) karşı etkisizdir. Başlıca son ürünler, indirgen uçta glukuronik asit bulunan tetra- ve hekzasakkaritlerdir. Bu sınıf, sülüklerin ve kancalı kurtların tükürük bezlerinde bulunan enzimleri kapsar (Hotez vd., 1992).

(3) Mikrobiyal hiyalüronidazlar (E.C. 4.2.99.1): Bu grup, hiyalüronat liyazları olarak sınıflandırılır ve diğer hiyalüronidazlardan farklı olarak hidroliz reaksiyonu katalize etmez. Bunun yerine HA'yı β -1,4 glikozidik bağlarında β -eliminasyon mekanizması ile parçalayarak doymamış disakkaritler oluşturur. Bu enzimler; *Clostridium*, *Micrococcus*, *Streptococcus* ve *Streptomyces* türleri de dâhil olmak üzere çeşitli mikroorganizmalardan izole edilmiştir (Kreil, 1995).

Mikrobiyal Hiyalüronidazlar

Hiyalüronidaz, mikroorganizmalar arasında geniş bir dağılım göstermekte olup mikrobiyal hiyalüronidazlar funguslarda, bakterilerde ve fajlarda bulunabilmektedir (Tablo 1). Bu enzimler, Mn^{2+} ve Ni^{2+} iyonlarına duyarlı, 37–45 °C sıcaklık aralığında ve pH 5,5–7,0 değerleri arasında optimum aktivite gösteren proteinler olarak tanımlanmaktadır (Lu vd., 2025).

Böcek, sürüngen ve patojenik bakteri toksinleri; hayvan bağ dokusunun temel bileşenleri olan hiyalüronik asit ve kondroitin sülfat üzerinde etkili hiyalüronidazlar içermektedir (Tung vd., 1994).

Mikrobiyal hiyalüronidazlar, hastalık patogeneğinde önemli bir virülans faktörü olarak kabul edilir. Bu enzimler, bir yayılma faktörü gibi davranarak bakterilerin ve toksinlerin konukçu dokular içerisinde daha geniş alanlara yayılmasını kolaylaştırmakta ve böylece enfeksiyonun ilerlemesini hızlandırmaktadır (Grenier ve Michaud, 1993).

Tablo 1. Hiyalüronidaz üreten mikroorganizmalar

Mikroorganizma grubu	Tür
Gram-negatif bakteri	<i>Aeromonas</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Beneckea</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Bacteroides fragilis</i> , <i>B. vulgatus</i> , <i>B. ovatus</i> , <i>B. melaninogenicus</i> , <i>B. asaccharolyticus</i> , <i>B. tgetaiotaomicron</i> , <i>Fusobacterium mortiferum</i> , <i>Treponema pallidum</i> , <i>T. pertenue</i>
Gram-pozitif bakteri	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. constellatus</i> , <i>S. dysgalactiae</i> , <i>S. uberis</i> , <i>S. suis</i> , <i>Staphylococcus hyicus subsp. hyicus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Clostridium difficile</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. chauvoei</i> , <i>Mycoplasma alligatoris</i> , <i>M. crocodyli</i> , <i>Propionibacterium acnes</i> , <i>P. granulosum</i> , <i>Streptomyces coelicolor</i> , <i>S. hyalurolyticus</i> , <i>S. Griseus</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Bacillus</i> sp.
Bakteriyofaj	<i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>S. equi</i>
Fungus	<i>Candida albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. krusei</i> , <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> , <i>Pygocelis adeliae</i> , <i>Dasypus novemcinctus</i>

Funguslar tarafından üretilen hiyalüronidazlar

Funguslar tarafından üretilen hiyalüronidazlar, hakkında en sınırlı bilgiye sahip enzim gruplarından biri olup bu alandaki çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Bugüne kadar bu enzimlerin yalnızca çok az sayıda olanı biyokimyasal ve yapısal açıdan ayrıntılı biçimde karakterize edilebilmiştir (Bakke vd., 2011; Lombard vd., 2014). *Candida* ve *Paracoccidioides* cinslerine ait türler, insanlarda görülen en yaygın istiacı fungal patojenler arasında yer almaktadır. Bu fungus enfeksiyonları öncelikle akciğerleri etkiler; ancak zamanla diğer organ ve dokulara yayılabilmekte ve mukozal membranlar, deri, lenf düğümleri ve adrenal bezlerde sekonder lezyonların oluşumuna neden olabilmektedir. Bu izolatlar, hiyalüronidazlar dâhil olmak üzere çeşitli hidrolitik enzimler üretmektedir. Yapılan çalışmalar, hiyalüronidazlar ve kondroitinazların, özellikle *Candida* ve *Paracoccidioides* cinslerine ait türlerde, fungusların patojenitesinde ve dokuların istilasında önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur (Shimizu vd., 1995; de Assis vd., 2003). Ancak, bu fungal türlerden elde edilen enzimlerin henüz hiçbirini ayrıntılı biyokimyasal ve yapısal açıdan kapsamlı biçimde karakterize edilmemiştir. Shimizu vd. (1995) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *Candida* cinsine ait farklı türlerde — *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* ve *C. krusei* dâhil olmak üzere — hiyalüronidaz üretimi rapor edilmiştir. Enzim aktivitesi, kolonilerin çevresinde oluşan berrak zonların gözlenmesiyle görselleştirilmiş ve aktivite düzeyi, koloni çapının, koloni ile birlikte berrak zonu içeren toplam çapa oranı esas alınarak nicel olarak değerlendirilmiştir. Hiyalüronidaz aktivite değerinin 1,00'ın altında olması, izolatın enzimi ortama salgıladığını göstermektedir. İncelenen beş *Candida* türünde bu değerlerin 0,49–0,95 aralığında değiştiği bildirilmiştir. Hiyalüronidaz üretim düzeyleri ile izolatların elde edildikleri kaynaklar arasında anlamlı bir ilişki saptanmamış; asemptomatik taşıyıcılardan ve hastalardan izole edilen suşların benzer enzimatik aktivite sergilediği görülmüştür. Asemptomatik taşıyıcıların tükürüğünden izole edilen 27 *C. albicans* izolatının büyük çoğunluğu (%96) hiyalüronidaz üretirken, yalnızca bir izolatın (FO 153) bu enzimi üretmediği belirlenmiştir. Benzer şekilde, kandidozlu hastaların ağız boşluğundan izole edilen 36 *C. albicans* izolatının 35'i (%97) hiyalüronidaz üretmiş, yalnızca bir izolatın (ICB 11) negatif olduğu rapor edilmiştir. Test edilen 10 *C. tropicalis* izolatının yarısının hiyalüronidaz ürettiği, diğer yarısının ise bu enzimi üretmediği saptanmıştır. Buna karşılık, incelenen altı *C. parapsilosis* izolatı arasında yalnızca birinin (FO 21C) hem

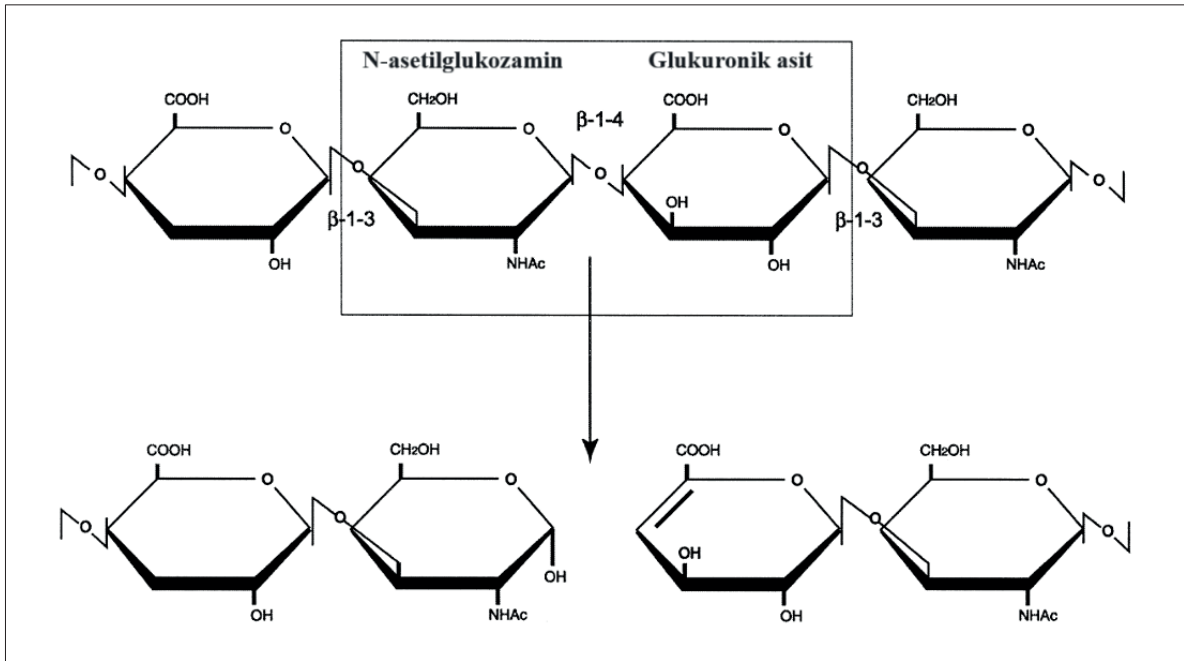
hiyalüronidaz hem de kondroitin sülfataz ürettiği; diğer izolatların ise yalnızca hiyalüronidaz veya yalnızca kondroitin sülfataz aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir. Test edilen 10 *C. guilliermondii* izolatından yalnızca ikisinin (FCF 198 ve 405) her iki enzimi birlikte ürettiği, üçünün hiçbir enzimatik aktivite sergilemediği ve geri kalan izolatların ise hiyalüronidaz veya kondroitin sülfataz ürettiği rapor edilmiştir. Ayrıca, altı *C. krusei* izolatı arasında yalnızca birinin (IM 90) hiyalüronidaz ürettiği, diğer beş izolatın ise bu enzimi üretmediği belirtilmiştir (Shimizu vd., 1995). Çeşitli filamentöz fungusların kültür süpernatantları, HA parçalama kapasiteleri açısından taranmış ve *Talaromyces stipitatus*'un pH 3'te en yüksek aktiviteyi gösterdiği, *Schizophyllum commune*'un pH 3–4 aralığında ve *Fistulina hepatica*'nın ise pH 5–6 aralığında belirgin hiyalüronidaz aktivitesi sergilediği ortaya konmuştur (Bobkova vd., 2018). *Talaromyces purpureogenus* IAM13753, *T. purpureogenus* IAM13754 ve *T. funiculosus* IAM13752 izolatlarının, asidik koşullarda (pH 4) HA'yı etkili biçimde parçaladığı gösterilmiştir. Ayrıca, *T. purpureogenus* IAM13753'ten izole edilen hiyalüronidazın 43 °C'de maksimum aktivite sergilediği rapor edilmiştir (Bakke vd., 2011). Funguslar tarafından üretilen hiyalüronidazlara ilişkin deneysel bulgular, bu enzimlerin β -glukanaz aktivitesine sahip olmadığını göstermektedir. Nitekim, *Talaromyces stipitatus* kaynaklı hiyalüronidazın, β -1,3-1,6 glukan yapısındaki şizofillanı parçalayamaması, fungal hiyalüronidazlarda β -glukanaz aktivitesinin bulunmadığına dair ek ve güçlü bir kanıt sunmaktadır (Bobkova vd., 2018; Sindelar vd., 2021). Yapılan bir çalışmada, sığır serum albümininin proteolizinden kaynaklanabilecek yanlış pozitif reaksiyonları en aza indirmek amacıyla, Grenier ve Michaud (1993) tarafından geliştirilen plak testinin modifiye edilmiş bir versiyonu, funguslarda hiyalüronidaz varlığını değerlendirmek için uygulanmıştır. Bu yöntemle gerçekleştirilen analizlerde, *Aspergillus fumigatus*, *Metarhizium anisopliae* ve *Haematonectria haematococca* olmak üzere incelenen üç farklı fungus türünde hiyalüronidaz aktivitesine ilişkin herhangi bir kanıt elde edilememiştir. Buna ek olarak, hiyalüronik asidin *A. fumigatus*'un büyümesini teşvik etmediği rapor edilmiştir. Bu bulgu, söz konusu fungusun hiyalüronidaz üretmediğini destekleyen ek bir kanıt olarak değerlendirilmektedir (St Leger ve Steven, 2000).

Bakteriyel hiyalüronidazlar

Hiyalüronidazlar, birçok farklı bakteri cinsi tarafından üretilmektedir (Tablo 1). Hiyalüronidaz üretebilen gram-pozitif bakteriler arasında *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Streptomyces* ve *Clostridium* cinslerine ait çeşitli türler yer almaktadır (Fitzgerald ve Gannon, 1983; Berry vd., 1994; Günther vd., 1996). Hiyalüronidaz üretimi; A, B, C ve G grubu streptokoklarda (Günther vd., 1996), ayrıca *Streptococcus pneumoniae*'de (Berry vd., 1994), *Streptococcus intermedius* ve *Streptococcus constellatus*'ta (Homer vd., 1993), *Streptococcus dysgalactiae*'de (Calvinho vd., 1998) ve *Streptococcus uberis*'te (Schaufuss vd., 1989) bildirilmiştir. Stafilokoklar arasında hiyalüronidaz üretimi *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus* subsp. *hyicus* türlerinde saptanmıştır (Skalka, 1985). *Clostridium perfringens* (Canard vd., 1994), *Clostridium difficile* (Hafiz ve Oakley, 1976), *Clostridium septicum* ve *Clostridium chauvoei* (Princewell ve Oakley, 1976) gibi potansiyel patojenlerin de hiyalüronidaz ürettiği bilinmektedir. Deri florasında bulunan iki *Propionibacterium* türü olan *Propionibacterium acnes* ve *Propionibacterium granulosum*'un hiyalüronidaz ürettiği bildirilmiştir (Cummings ve Johnson, 1986). Buna ek olarak, *Streptomyces hyalurolyticus*, *Streptomyces coelicolor* ve *Streptomyces griseus* türlerinde hiyalüronidaz enzimi üretimi rapor edilmiştir (Ohya ve Kaneko, 1970). Ayrıca *Peptostreptococcus* türünden saflaştırılıp karakterize edilen bir hiyalüronidazın ise kondroitin sülfata karşı da aktivite gösterdiği saptanmıştır (Tam ve Chan, 1985). Hiyalüronidazlar ayrıca gram-negatif bakteriler tarafından da üretilmektedir, ancak patojenite sürecinde rol oynama olasılığı daha düşüktür. *Aeromonas*, *Vibrio*, *Beneckea* ve *Proteus* cinslerinde hiyalüronidaz ve kondroitin liyaz aktiviteleri rapor edilmiştir. *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides vulgatus*, *B.*

ovatus, *B. melaninogenicus* ve *Fusobacterium mortiferum* türlerinin de hiyalüronidaz ürettiği bildirilmektedir. Patojen olan *Treponema pallidum* ve *T. pertenue*, yüzeye bağlı hiyalüronidazları üretirken; patojen olmayan *T. denticola* ve *T. vincentii* ise bu tür bir enzim üretmemektedir (Linhardt vd., 1986; Sting vd., 1990).

Bakteriyel hiyalüronidazlar, substratlardaki β -1,4 glikozidik bağları β -eliminasyon mekanizmasıyla parçalayarak (Şekil 2), üronik asit kalıntısının C4 ve C5 atomları arasında doymamış bir çift bağ içeren oligosakkaritlerin oluşumuna yol açar (Garron ve Cygler, 2010; Stern vd., 2007). Bununla birlikte, *Streptomyces hyalurolyticus* kaynaklı hiyalüronidazın β -1,4 hem de β -1,3 glikozidik bağlarını kesebildiği ve bu nedenle hem çift hem de tek sayıda birim içeren oligosakkaritler ürettiği bildirilmiştir (Tao vd., 2017). *Streptomyces hyalurolyticus*'un öncelikli olarak β -1,4 bağlarını hedef aldığı ve majör ürünler olarak çift sayılı oligosakkaritler oluşturduğu daha önce rapor edilmiş olmakla birlikte (Park vd., 1997; Takazono ve Tanaka, 1984), tek sayılı birimlerden oluşan oligosakkaritlerin de düşük miktarlarda oluştuğu gösterilmiştir (Price vd., 1997).



Şekil 2. Hiyalüronidazın yapısı ve bakteriyel bir hiyalüronidaz tarafından gerçekleştirilen eliminasyonla parçalanması sonrası oluşan ürünler. Kutucukla gösterilen bölge, hiyalüronidazı oluşturan, β -1-4 bağlarıyla birbirine bağlı N-asetilglukozamin ve glukuronik asitten oluşan tekrar eden birimi göstermektedir. Tekrarlayan disakkarit, bitişik disakkarite β -1-3 bağı ile bağlanmıştır (Hynes ve Walton, 2000).

Genel olarak, bakteriyel kaynaklı hiyalüronidazlar, basit ve ölçeklenebilir fermentasyon süreçleriyle üretilibilmeleri, yüksek saflıkta elde edilebilmeleri ve hayvansal kaynaklı hiyalüronidazlara kıyasla daha düşük çevresel kirlilik oluşturmaları nedeniyle araştırmaların odak noktasında yer almaktadır. Buna karşılık, hayvansal kaynaklı hiyalüronidazlar genellikle düşük verimle üretilmekte ve viral kontaminasyon riski taşımaktadır (Zhu vd., 2017; Li vd., 2020).

Ayrıca, bazı hiyalüronidazlar — özellikle *Streptomyces hyalurolyticus* kaynaklı enzim — HA'yı diğer glikozaminoglikanlardan ayırt edebilme yeteneği sayesinde HA'ya özgü enzimler olarak araştırmalarda yaygın biçimde kullanılmaktadır (Park vd., 1997; Furukawa vd., 2013; Luu vd., 2013). Bunun yanı sıra, kozmetik ve farmasötik uygulamalarda kullanılan HA

preparatları sıklıkla, memeli testiküler hiyalüronidazı inhibe eden düşük miktarda dermatan sülfat içermektedir. Bu nedenle, memeli testiküler hiyalüronidaz yerine *Streptomyces hyalurolyticus* veya *Streptococcus agalactiae* kaynaklı bakteriyel hiyalüronidazlar tercih edilmektedir (Matsuno vd., 2008).

Kromatografik ve kütle spektrometrik analizlerde ise, HA içeren örneklerin hazırlanmasında *Streptococcus pneumoniae* veya *S. agalactiae* tarafından üretilen hiyalüronidazlar yaygın olarak kullanılmaktadır (Osago vd., 2014; Sedláček vd., 2019; Şimek vd., 2020; 2021).

Biyokimyasal açıdan değerlendirildiğinde, bakteriyel hiyalüronidazlar geniş bir sıcaklık ve pH aralığında kararlılık göstermekte olup bu özellikler büyük ölçüde enzimi üreten bakteriyel straine bağlıdır. Çoğu bakteriyel hiyalüronidaz için optimum sıcaklık 37–50 °C, optimum pH ise 6,0–8,0 aralığında bildirilmektedir (Guo vd., 2014; Kurata vd., 2015; Sun vd., 2015; Zhu vd., 2017). Bununla birlikte bazı istisnalar da mevcuttur; örneğin *Vibrio* türleri yaklaşık 30 °C optimum sıcaklığa sahip hiyalüronidazlar üretirken (Han vd., 2014; Wang vd., 2021), *Thermasporomyces composti*'ye ait rekombinant hiyalüronidazın optimum sıcaklığının 70 °C olduğu rapor edilmiştir (Li vd., 2020).

Gram-pozitif bakterilere ait hiyalüronidazlar genellikle hücre dışına sentezlenen enzimlerdir ve transpeptidasyon mekanizması aracılığıyla, peptidoglikana bağlanan bir sistem kullanılarak hücre duvarına salgılanabilir veya hücre duvarına tutunabilir. Bu süreç, C-terminal bölgede yer alan ve korunmuş bir LPxTG motifini içeren bir sıralama sinyalinin gerektirir; bu özellik özellikle *Streptococcus* türlerinde yaygın olarak gözlenmektedir (Wang vd., 2016; Oiki vd., 2017; 2019a; UniProt, 2021). Gram-negatif bakteriler tarafından üretilen hiyalüronidazlar da hücre dışına salınan ekstraselüler enzimler olabilir ve/veya dış zarın yüzeyine bağlı şekilde bulunabilir (Oiki vd., 2017; Ndeh vd., 2020; Wang vd., 2021). Bununla birlikte, bu enzimlerin önemli bir kısmı periplazmik lokalizasyona sahiptir ve HA parçalarını periplazmik boşlukta doymamış oligosakkaritlere dönüştürerek parçalama işlevini yerine getirir (Wang vd., 2016; Ndeh vd., 2018; 2020). Genel olarak, ekstraselüler ve/veya hücre yüzeyine bağlı hiyalüronidazlar, uzun HA zincirlerinin depolimerizasyonunda ilk basamağı oluşturur. Bunu takiben, örneğin gram-negatif bakteri *Bacteroides thetaiotaomicron*'da, oluşan HA fragmanları dış membran proteinleri aracılığıyla periplazmik bölgeye taşınır; burada parçalanma süreci devam eder ve doymamış oligosakkaritler meydana gelir (Ndeh vd., 2020). Alternatif bir yolak olarak, gram-pozitif *Streptococcus* türlerinde (Oiki vd., 2019a) ve gram-negatif bakteri *Vibrio alginolyticus*'ta (Wang vd., 2021), ekstraselüler hiyalüronidazlar HA'yı hücre dışında doymamış disakkaritlere kadar parçalar; oluşan ürünler daha sonra fosfotransferaz sistemi (PTS) aracılığıyla sitoplazmaya taşınır. Buna karşılık, gram-negatif bakteri *Streptobacillus moniliformis*'te, parçalanma ürünlerinin periplazmik çözücü-bağlayıcı proteinlere bağımlı bir ATP-bağlayan taşıyıcı sistem aracılığıyla taşındığı bildirilmiştir (Oiki vd., 2017; 2019b). Çoğu hiyalüronidaz, substratları tamamen doymamış disakkarit birimlerine kadar parçalamak üzere, başlangıçta rastlantısal bir endolitik yarılma ve bunu izleyen eksolitik, süreçsel bir parçalanma mekanizması kullanır; bu durum, *Streptococcus* türleri ve *V. alginolyticus* tarafından üretilen hiyalüronidazlar için tipiktir (Kelly vd., 2001; Jedrzejewski vd., 2002; Marion vd., 2012; Mai vd., 2018; Wang vd., 2021). Buna karşılık, bazı hiyalüronidazlar substratlarını süreçsel olmayan endolitik bir mekanizma ile parçalayarak doymamış oligosakkaritlerden oluşan bir ürün karışımı oluşturur. Bu mekanizma, *Streptomyces hyalurolyticus* ve *Bacteroides thetaiotaomicron* kaynaklı hiyalüronidazlarda rapor edilmiştir (Shimada ve Matsumura, 1980; Park vd., 1997; Tao vd., 2017; Ndeh vd., 2018).

Genel olarak, gram-pozitif ve gram-negatif bakterilerden elde edilen hiyalüronidazlar, faj ilişkili hiyalüronidazlarla karşılaştırıldığında daha yüksek molekül ağırlıklı proteinlerdir. Bugüne kadar iyi karakterize edilmiş hiyalüronidazların molekül ağırlıklarının geniş bir aralıkta değiştiği bildirilmiştir.

Bu kapsamda yapılan bir çalışmada, dış ortama hiyalüronidaz salgılayan patojen olmayan yeni bir toprak bakterisi *Paenibacillus residui*'nin izolasyonu ve karakterizasyonu rapor edilmiştir. Saflaştırılan *Paenibacillus residui* hiyalüronidazının yaklaşık 170 kDa moleküler ağırlığa sahip olduğu, pH 8,0–9,0 aralığında ve 50 °C'de optimum aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Enzimin HA, kondroitin sülfat ve alginat dâhil olmak üzere geniş bir substrat özgüllüğü sergilediği, depolimerizasyon aktivitesinin ise jel permeasyon kromatografisi ile doğrulandığı belirtilmiştir (Park vd., 2025). Başka bir çalışmada, metagenomik tarama yoluyla insan bağırsak mikrobiyotasından iki yeni polisakkarit liyaz ailesi 33 (PL33) hiyalüronidazı (BxHly33 ve BiHly33) tanımlanmıştır. Bu enzimlerin hiyalüronik asidi parçalama konusunda yüksek özgüllük ve stabilite gösterdiği; pH 6,6–7,6 ve 35–40 °C aralığında optimum aktivite sergilediği bildirilmiştir. Yapısal ve biyokimyasal analizler, katalitik mekanizmalardan sorumlu temel amino asit kalıntılarını ortaya koymuş; özellikle bazı alanin substitüsyonlarının enzimatik aktiviteyi anlamlı düzeyde artırdığı gösterilmiştir (Yin vd., 2025). Bir diğer çalışmada, horoz ibiğinden izole edilen 12 bakteriyel strain hiyalüronidaz üretimi açısından taranmış; yedi strain hiyalüronidaz pozitif bulunmuştur. En güçlü strain, oluşturduğu şeffaf zon çapına göre seçilmiştir. Morfolojik, fizyolojik ve 16S rRNA gen dizisi analizlerine dayanarak bu strain *Brucella intermedia* olarak tanımlanmıştır. Hiyalüronidaz üretimini en fazla destekleyen koşulların 30 °C'de 48 saat inkübasyon ve pH 7 olduğu belirlenmiş; bu koşullar altında enzim aktivitesinin 84 U/mL'ye ulaştığı ve 1,17 kat artış gösterdiği rapor edilmiştir. Hiyalüronidaz, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE anyon değişim kromatografisi ve Sephacryl S100 ile boyut dışlama kromatografisini içeren standart bir protokolle saflaştırılmış; ham enzimle karşılaştırıldığında 9,3 kat daha yüksek özgül aktivite elde edilmiştir. Saflaştırılmış enzimin 65 kDa moleküler ağırlığa sahip olduğu ve pH 7,0 ile 37 °C'de, 30 dakikalık inkübasyon süresinde optimum aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Saflaştırılmış hiyalüronidaz; kolon, akciğer, deri ve meme kanseri hücre hatlarına karşı güçlü antikanser aktivite sergilerken, normal somatik hücrelere karşı düşük toksisite göstermiştir. Kanser hücrelerinin canlılığının hiyalüronidaz uygulamasıyla doz bağımlı olarak azaldığı; ayrıca büyüme faktörü ile indüklenen meme kanseri hücrelerinde hücre döngüsü progresyonunun baskılandığı, anjiyogenezle ilişkili genlerin ekspresyonunda belirgin değişiklikler meydana geldiği ve 5-fluorourasil ile karşılaştırıldığında MDA hücrelerinde çok sayıda proinflamatuvar proteinin baskılandığı gösterilmiştir. Bu bulgular, hiyalüronidazın potansiyel bir antikanser ajan olabileceğine işaret etmektedir. Ayrıca hiyalüronidazın 200 µg/mL konsantrasyonda %65,49 DPPH giderme aktivitesi ve %71,84 toplam antioksidan aktivite sergilediği bildirilmiştir (Ebraheem vd., 2024).

Streptococcus dysgalactiae, *S. zooepidemicus* ve *S. equi* strainlerinde hiyalüronidaz üretiminin incelendiği bir çalışmada, *S. dysgalactiae* ve *S. zooepidemicus* strainlerinin tamamında (10/10), *S. equi* strainlerinin ise 10 kültürden 6'sında enzim üretimi tespit edilmiştir. Hiyalüronidaz, hücre içermeyen kültür süpernatantından amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilmiş; ardından DEAE-selüloz kromatografisi, izoelektrik odaklama ve hazırlayıcı poliakrilamid jel elektroforezi kullanılarak saflaştırılmıştır. *Streptococcus dysgalactiae* ve *S. equi* kaynaklı enzimlerin izoelektrik noktalarının yaklaşık pH 5, *S. zooepidemicus* kaynaklı enzimin ise pH 6 civarında olduğu saptanmıştır. Üç türden elde edilen hiyalüronidazların moleküler ağırlıkları yaklaşık 55 kDa olarak belirlenmiş; en yüksek enzim aktivitesi 40–45 °C sıcaklık aralığında ve pH 5,6–5,8 değerlerinde gözlenmiştir. Michaelis–Menten sabitlerinin $7,5 \times 10^{-2}$ – $8,8 \times 10^{-2}$ mg/mL aralığında değiştiği bildirilmiştir (Sting vd., 1990). *Streptococcus equi* kullanılarak daldırma fermentasyon yöntemiyle üretilen hücre dışı hiyalüronidaz enziminin optimum üretim koşulları da ayrıntılı olarak incelenmiştir (Sahoo vd., 2007). Başlangıç pH'sı, inkübasyon sıcaklığı ve süresi, inokulum düzeyi ve inokulum yaşı gibi parametrelerin etkileri değerlendirilmiş; en yüksek enzim aktivitesinin başlangıç pH 5,5, 37 °C inkübasyon sıcaklığı, 48 saat inkübasyon süresi, %10 inokulum düzeyi ve 48 saatlik inokulum yaşı koşullarında elde edildiği belirlenmiştir. Ayrıca karbon ve inorganik azot kaynakları ile vitamin, amino asit ve

büyüme hormonlarının etkileri araştırılmış; dekstroza, amonyum sülfat, nikotinik asit, L-sistein ve kinetin varlığında en yüksek enzimatif aktivitenin sağlandığı rapor edilmiştir (Sahoo vd., 2007). Benzer şekilde, *Streptomyces roseofulvus* tarafından üretilen hiyalüronidazın maksimum veriminin, sürdürülebilir fermantasyon koşullarında pH 5 ve 40 °C’de 6 günlük inkübasyon sonunda elde edildiği bildirilmiştir. SDS-PAGE analizine göre enzimin moleküler ağırlığı 97 kDa olarak belirlenmiş ve 9,2 kat homojenliğe kadar saflaştırılmıştır. Optimum reaksiyon pH’sının pH 9 olduğu, enzimin pH stabilitesinin ise 35 °C’de pH 9–10 aralığında korunduğu gösterilmiştir. Enzimin doğal aktivitesini ve yarı ömrünü artırmak amacıyla immobilizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş; immobilize edilen enzimin serbest enzime kıyasla daha yüksek ısı stabilite sergilediği ve denatürasyon sıcaklıklarının sırasıyla 46,1 °C (immobilize) ve 24,7 °C (serbest) olduğu belirlenmiştir. Serbest ve immobilize enzimlerin en yüksek afinitesinin hiyalüronik aside karşı olduğu, serbest enzimin katalitik afinitesinin immobilize enzime göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu bulgular, *S. roseofulvus* kaynaklı hiyalüronidazın yüksek pH ve sıcaklık koşullarına karşı dayanıklı olduğunu ve uzun süreli stabilitesinin geniş bir uygulama alanı için potansiyel sunduğunu göstermektedir (Reda ve El-Shanawany, 2020). Ayrıca, hiyalüronidaz üreten *Bacillus* sp. CQMU-D straini toprak örneklerinden izole edilmiş ve hiyalüronidaz aktivitesi 3,5-dinitrosalisilik asit (DNSA) ve *p*-dimetilaminobenzaldehit (DMAB) yöntemleri kullanılarak ölçülmüştür. Enzimin, 37 °C’de sıvı kültür koşullarında 48. saatte en yüksek aktiviteye ulaştığı belirlenmiştir. Bu bulgular, topraktan izole edilen yeni bir hiyalüronidaz üreten *Bacillus* straininin başarıyla karakterize edildiğini ortaya koymakta olup, *Bacillus* sp. CQMU-D’nin potansiyel uygulama alanlarının belirlenmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir (Wang vd., 2022).

Bakteriyofaj hiyalüronidazları

Bakteriyofaj hiyalüronidazları, faj partikülünün yapısal bir bileşeni olup sinyal peptidi içermedikleri için doğrudan ekstraselüler ortama salınmazlar (Hynes vd., 1995; Smith vd., 2005; Pires vd., 2016). Bu enzimlerin temel işlevinin, *Streptococcus pyogenes* ve *Streptococcus equi* strainlerinin HA kapsülünü parçalayarak bakterinin hücre yüzeyine erişimi sağlamak ve böylece lizojenizasyon sürecini kolaylaştırmak olduğu bildirilmektedir (Baker vd., 2002; Smith vd., 2005; Lindsay vd., 2009; Singh vd., 2014). Bununla birlikte, streptokok enfeksiyonları sırasında bakteriyofaj hiyalüronidazlarına karşı antikör yanıtının rapor edilmiş olması (Halperin vd., 1987), bu enzimlerin streptokok hücrelerinin konukçuya penetrasyonuna da katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir (Singh vd., 2014). Ayrıca bakteriyofaj hiyalüronidazlarının, streptokokal hastalıklarda dolaylı bir rol üstlenebileceği; örneğin faj tarafından kodlanan eritrojenik toksinlerin yayılımına olanak tanıyarak başlangıçta virülans göstermeyen bir strainin virülans kazanmasına katkıda bulunabileceği öne sürülmektedir (Broudy vd., 2001). Bakteriyel hiyalüronidazlarda amino asit dizilerinin uzunluğu 802–1066 amino asit (aa) arasında değişirken, bakteriyofaj hiyalüronidazlarının daha kısa olduğu ve 337–371 aa uzunluğa sahip bulunduğu bildirilmiştir (UniProt, 2021). Bakteriyel hiyalüronidazların aksine, bakteriyofaj hiyalüronidazlarının yalnızca HA’yı özgül olarak parçaladığı belirtilmiştir (Baker vd., 2002; Smith vd., 2005; Mishra vd., 2006). Bununla birlikte, bakteriyofaj hiyalüronidazı SEQ2045’in kondroitin-6-sülfat ve dermatan sülfata karşı zayıf düzeyde aktivite sergilediği de rapor edilmiştir (Singh vd., 2014). Genel olarak bakteriyofaj hiyalüronidazlarının pH 6,0–6,5 aralığında optimum aktivite gösterdiği ve genişlemiş bir substrat bağlanma bölgesiyle birlikte rastlantısal iç kesim (random internal cut) mekanizmasını kullanarak HA’yı doymamış tetra-, hekza-, okta- ve dikasakkaritlere kadar parçaladığı belirtilmektedir (Baker vd., 2002; Smith vd., 2005; Mishra vd., 2006). İlginç bir şekilde, bakteriyel ve bakteriyofaj hiyalüronidazları HA’nın parçalanmasında aynı β -eliminasyon mekanizmasını paylaştıklarına rağmen, bakteriyofaj hiyalüronidazlarının bakteriyel hiyalüronidazlara kıyasla oldukça düşük dizi homolojisi sergilediği ve filogenetik analizlerde ayrı bir küme oluşturduğu gösterilmiştir.

Ayrıca bakteriyofaj hiyalüronidazlarının, bakteriyel hiyalüronidazlara göre daha geniş bir substrat bağlanma bölgesine sahip olduğu da ortaya konmuştur (Smith vd., 2005).

Mikrobiyal Hiyalüronidazların Güvenliği ve Endüstriyel ile Terapötik Uygulamalardaki Potansiyeli

Hiyalüronidaz, yüksek molekül ağırlıklı HA'yı hidrolize ederek biyolojik açıdan daha aktif oligosakkaritlere dönüştüren bir enzimdir. Bu düşük molekül ağırlıklı ürünler; bağışıklık düzenleme, antioksidan aktivite ve doku yenilenmesi gibi işlevleri nedeniyle gıda, biyomedikal ve farmasötik endüstrilerde önemli bir değer taşımaktadır. Ancak günümüzde ticari olarak kullanılan hiyalüronidazların büyük bir kısmının patojen mikroorganizmalardan elde edilmesi veya rekombinant sistemlerde üretilmesi, özellikle gıda ve klinik uygulamalar açısından güvenlik ve düzenleyici kaygıları beraberinde getirmektedir. Bu bağlamda gerçekleştirilen bir çalışmada, patojenite ve antibiyotik direnç genleri taşımadığı belirlenen *Paenibacillus residui* BSSK58 straini izole edilmiş ve bu bakterinin hücre dışına hiyalüronidaz salgıladığı gösterilmiştir. BSSK58 kaynaklı enzimin hemolitik aktivite göstermemesi, biyojen amin üretmemesi ve insan bağırsak epitel hücre hatlarında sitotoksik etki oluşturmaması güvenlik açısından önemli bulgular sunmaktadır. Ayrıca, 13 hafta süreyle yürütülen İyi Laboratuvar Uygulamaları (GLP) uyumlu toksisite çalışmalarında herhangi bir advers etkinin gözlenmemesi, bu hiyalüronidazın güvenli bir biyokatalizör olduğunu güçlü biçimde desteklemektedir. Elde edilen sonuçlar, BSSK58 kökenli hiyalüronidazın düzenleyici açıdan uygun, güvenilir ve endüstriyel kullanıma elverişli bir alternatif olduğunu ortaya koymaktadır (Park vd., 2025).

Öte yandan, polisakkarit liyaz ailesi 33 (PL33) üyesi hiyalüronidazlar olan BxHly33 ve BiHly33'ün, yüksek maliyet ve immünojenisite gibi dezavantajlar taşıyabilen geleneksel hiyalüronidazlara alternatif olarak özellikle ilaç taşıma sistemleri ve doku mühendisliği uygulamalarında umut vadettiği bildirilmiştir. Bu enzimlerin HA bozunmasına dayalı terapötik yaklaşımların gelecekteki geliştirilmesine önemli katkılar sağlayabileceği öngörülmektedir (Yin vd., 2025). Literatürde ayrıca, antimikrobiyal dirençli *Staphylococcus aureus* enfeksiyonlarında hiyalüronidazın "akıllı" ilaç taşıma sistemlerinde tetikleyici bir enzim olarak kullanıldığı rapor edilmiştir. Hiyalüronidaz ile parçalanabilen HA temelli nanotaşıyıcılar, enfeksiyon bölgesinde kontrollü ilaç salımı sağlayarak antibakteriyel etkinliği artırmakta; biyofilmleri hedefleyerek yara iyileşmesini desteklemektedir (Konwar ve Kim, 2025). Mikrobiyal hiyalüronidazlar, HA'yı parçalayarak ekstrasellüler matriksin (ECM) sertliğini ve yoğunluğunu azaltmakta; böylece fiziksel bariyerlerin aşılmasını kolaylaştırarak dokularla doğrudan temas ve penetrasyonu mümkün kılmaktadır (Zamboni vd., 2023; Lu vd., 2025). Bu özellikleri nedeniyle mikrobiyal hiyalüronidazlar, bakteriyel invazyonu, doku penetrasyonunu ve yayılımı kolaylaştıran önemli virülans faktörleri olarak kabul edilmektedir (Coleman vd., 2023; Dokoshi vd., 2020; Lu vd., 2025). Bunun yanı sıra, bazı mikroorganizmalar hayatta kalmak ve çoğalmak için polisakkarit kullanım lokuslarını (PUL) kullanarak HA'yı bir besin kaynağına dönüştürebilmekte (Feng vd., 2022; Lu vd., 2025) ve bağışıklık–inflamasyon yanıtını modüle ederek kendi büyümeleri için elverişli bir mikroortam oluşturabilmektedir (Wang vd., 2014; Osman vd., 2023; Hajam vd., 2023; Lu vd., 2025). Bağırsak mikrobiyotasına ait mikrobiyal hiyalüronidazların, kısa zincirli yağ asidi (SCFA) üreten bakterilerin (örneğin *Bifidobacterium* türleri) zenginleşmesini teşvik ederek mikrobiyota kompozisyonunu yeniden şekillendirdiği gösterilmiştir. Bu etki, bakteriyel kolit gibi inflamatuvar bağırsak hastalıklarında potansiyel bir terapötik yaklaşım sunduğunu düşündürmektedir (Ndeh vd., 2020; Mao vd., 2021; Pan vd., 2021; Zhao vd., 2023; Zheng vd., 2023; Lu vd., 2025). Ek olarak, mikrobiyal hiyalüronidazların meme kanseri büyümesini inhibe etmede rol oynadığı (Lee vd., 2010; Thirumurthy vd., 2023) ve tümör dokularında ilaç geçirgenliğini ve hedeflenmesini artırarak

antikanser tedavilerin etkinliğini güçlendirdiği bildirilmiştir (Ebelt vd., 2020; Thomas vd., 2022; Lu vd., 2025).

Sonuç

Hiyalüronidazlar, kaynaklarına bağlı olarak farklı katalitik mekanizmalarla işlev gösterebilir ve ortak olarak hiyalüronik asidi parçalama yeteneğine sahip enzimlerdir. Mevcut literatür, hiyalüronidazların; bakterilerden funguslara ve bakteriyofajlara uzanan geniş bir biyolojik yelpazede hem virölans faktörü olarak doku bariyerlerinin aşılmasında hem de terapötik ve endüstriyel süreçlerde kontrollü HA parçalanmasında kritik roller üstlendiğini ortaya koymaktadır. Özellikle bağırsak mikrobiyotası, funguslar ve patojen olmayan çevresel bakterilerden elde edilen hiyalüronidazların; güvenli, seçici ve düzenleyici açıdan daha kabul edilebilir biyokatalizörler olarak ilaç taşıma sistemleri, doku mühendisliği, kanser tedavisi ve yüksek verimli HA üretim proseslerinde önemli fırsatlar sunduğu görölmektedir.

Fungus ve bakteriyofaj kökenli hiyalüronidazların yapısal-katalitik özellikleri, substrat özgüllükleri ve *in vivo* etkileri henüz yeterince aydınlatılamamış olup, bu durum söz konusu enzimlerin daha kapsamlı biçimde karakterize edilmesine yönelik çalışmalara duyulan ihtiyacı açıkça ortaya koymaktadır. Mevcut bulgular, mikrobiyal hiyalüronidazların hâlen tam olarak çözümlenmediğini; özellikle optimum pH ve sıcaklık aralıkları, stabiliteleri, substrat tercihleri ve oluşturdukları ürün profillerinin tür ve strain düzeyinde karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi bağlamında önemli bilgi boşlukları bulunduğunu göstermektedir. Bu kapsamda yürütölecek ileri çalışmaların, bir yandan patojenite mekanizmalarının daha derinlemesine anlaşılmasına katkı sağlarken, diğer yandan gıda ve ilaç güvenliği açısından düzenleyici gerekliliklerle uyumlu, yenilikçi, güvenilir ve endüstriyel ile tıbbi uygulamalara uygun yeni hiyalüronidaz adaylarının geliştirilmesine güçlü bir bilimsel zemin oluşturması beklenmektedir.

Kaynaklar

- Baker, J. R., Dong, S., & Pritchard, D. G. (2002). The hyaluronan lyase of *Streptococcus pyogenes* bacteriophage H4489A. *Biochemical Journal*, 365(1), 317-322.
- Bakke, M., Kamei, J. I., & Obata, A. (2011). Identification, characterization, and molecular cloning of a novel hyaluronidase, a member of glycosyl hydrolase family 16, from *Penicillium* spp. *FEBS letters*, 585(1), 115-120.
- Berry, A. M., Lock, R. A., Thomas, S. M., Rajan, D. P., Hansman, D., & Paton, J. C. (1994). Cloning and nucleotide sequence of the *Streptococcus pneumoniae* hyaluronidase gene and purification of the enzyme from recombinant *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 62(3), 1101-1108.
- Bobkova, L., Smirnou, D., Krcmar, M., Kulhanek, J., Hermannova, M., Franke, L., & Velebny, V. (2018). Discovery and characteristic of hyaluronidases from filamentous fungi. *Current Biotechnology*, 7(1), 2-9.
- Broudy, T. B., Pancholi, V., & Fischetti, V. A. (2001). Induction of lysogenic bacteriophage and phage-associated toxin from group A streptococci during coculture with human pharyngeal cells. *Infection and Immunity*, 69(3), 1440-1443.
- Calvinho, L. F., Almeida, R. A., & Oliver, S. P. (1998). Potential virulence factors of *Streptococcus dysgalactiae* associated with bovine mastitis. *Veterinary microbiology*, 61(1-2), 93-110.
- Canard, B., Garnier, T., Saint-Joanis, B., & Cole, S. T. (1994). Molecular genetic analysis of the *nagH* gene encoding a hyaluronidase of *Clostridium perfringens*. *Molecular and General Genetics*, 243(2), 215-224.
- Carter, G. R. (1972). Improved hemagglutination test for identifying type A strains of *Pasteurella multocida*. *Applied Microbiology*, 24(1), 162-163.
- Coleman, M., Orvis, A., Brokaw, A., Furuta, A., Sharma, K., Quach, P., Bhullar, A., Sanghavi, R., Nguyen, S., Sweeney, E., Seepersaud, R., Armistead, B., Waldorf, K.M.A., & Rajagopal, L. (2023). GBS hyaluronidase mediates immune suppression in a TLR2/4- and IL-10-dependent manner during pregnancy-associated infection. *Mbio*, 14(5), e02049-23.
- Cramer, J. A., Bailey, L. C., Bailey, C. A., & Miller, R. T. (1994). Kinetic and mechanistic studies with bovine testicular hyaluronidase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1200, 315-321.
- Cummings, C. S., & Johnson, J. L. (1986). Genus I. Propionibacterium Orla-Jensen 1909. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2, 1346-1353.
- de Assis, C. M., Gandra, R. F., Gambale, W., Shimizu, M. T., & Paula, C. R. (2003). Biosynthesis of chondroitinase and hyaluronidase by different strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Medical Microbiology*, 52, 479-481.
- Dokoshi, T., Zhang, L. J., Li, F., Nakatsuji, T., Butcher, A., Yoshida, H., Shimoda, M., Okada, Y., & Gallo, R. L. (2020). Hyaluronan degradation by Cemip regulates host defense against *Staphylococcus aureus* skin infection. *Cell Reports*, 30(1), 61-68.
- Ebelt, N. D., Zuniga, E., Passi, K. B., Sobocinski, L. J., & Manuel, E. R. (2020). Hyaluronidase-expressing *Salmonella* effectively targets tumor-associated hyaluronic acid in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Molecular Cancer Therapeutics*, 19(2), 706-716.
- Ebraheem, M. A., El-Fakharany, E. M., Hussein, S. M., & Mohammed, F. A. (2024). Purification and characterization of the produced hyaluronidase by *Brucella intermedia* MEFS for antioxidant and anticancer applications. *Microbial Cell Factories*, 23(1), 200.
- Engström-Laurent, A. (1997). Hyaluronan in joint disease. *Journal of Internal Medicine*, 242(1), 57-60.
- Fallacara, A., Baldini, E., Manfredini, S., & Vertuani, S. (2018). Hyaluronic acid in the third millennium. *Polymers*, 10(7), 701.

- Feng, J., Qian, Y., Zhou, Z., Ertmer, S., Vivas, E. I., Lan, F., Hamilton, J. J., Rey, F. E., Anantharaman, K., & Venturelli, O. S. (2022). Polysaccharide utilization loci in *Bacteroides* determine population fitness and community-level interactions. *Cell Host Microbe*, 30(2), 200-215.
- Fitzgerald, T. J., & Gannon, E. M. (1983). Further evidence for hyaluronidase activity of *Treponema pallidum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 29(11), 1507-1513.
- Fraser, J. R. E., Laurent, T. C., & Laurent, U. B. G. (1997). Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine*, 242(1), 27-33.
- Furukawa, T., Arai, M., Garcia-Martin, F., Amano, M., Hinou, H., & Nishimura, S. I. (2013). Glycoblotting-based high throughput protocol for the structural characterization of hyaluronan degradation products during enzymatic fragmentation. *Glycoconjugate Journal*, 30(2), 171-182.
- Gallo, N., Nasser, H., Salvatore, L., Natali, M.L., Campa, L., Mahmoud, M., Capobianco, L., Sannino, A., & Madaghiele, M. (2019). Hyaluronic acid for advanced therapies: Promises and challenges. *Eur. Polym. J.*, 117, 134-147.
- Garron, M. L., & Cygler, M. (2010). Structural and mechanistic classification of uronic acid-containing polysaccharide lyases. *Glycobiology*, 20(12), 1547-1573.
- Gaughan, E. M., Nixon, A. J., Krook, L. P., Yeager, A. E., Mann, K. A., Mohammed, H., & Bartel, D. L. (1991). Effects of sodium hyaluronate on tendon healing and adhesion formation in horses. *American Journal of Veterinary Research*, 52(5), 764-773.
- Grenier, D., & Michaud, J. (1993). Evidence for the absence of hyaluronidase activity in *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(7), 1913-1915.
- Guo, X., Shi, Y., Sheng, J., & Wang, F. (2014). A novel hyaluronidase produced by *Bacillus* sp. A50. *PLoS One*, 9(4), e94156.
- Günther, E., Ozegowski, J. H., & Köhler, W. (1996). Occurrence of extracellular hyaluronic acid and hyaluronatlyase in streptococci of groups a, B, C, and G. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 285(1), 64-73.
- Hafiz, S., & Oakley, C. L. (1976). *Clostridium difficile*: isolation and characteristics. *Journal of Medical Microbiology*, 9(2), 129-136.
- Hajam, I. A., Katiki, M., McNally, R., Lázaro-Díez, M., Kolar, S., Chatterjee, A., Gonzalez, C., Paulchakrabarti, M., Choudhury, B., Caldera, J.R., Desmond, T., Tsai, C.M., Du, X., Li, H., Murali, R., & Liu, G. Y. (2023). Functional divergence of a bacterial enzyme promotes healthy or acneic skin. *Nature Communications*, 14(1), 8061.
- Halperin, S. A., Ferrieri, P., Gray, E. D., Kaplan, E. L., & Wannamaker, L. W. (1987). Antibody response to bacteriophage hyaluronidase in acute glomerulonephritis after group A streptococcal infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 155(2), 253-261.
- Han, W., Wang, W., Zhao, M., Sugahara, K., & Li, F. (2014). A novel eliminase from a marine bacterium that degrades hyaluronan and chondroitin sulfate. *Journal of Biological Chemistry*, 289(40), 27886-27898.
- Homer, K. A., Denbow, L., Whiley, R. A., & Beighton, D. (1993). Chondroitin sulfate depolymerase and hyaluronidase activities of viridans streptococci determined by a sensitive spectrophotometric assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(6), 1648-1651.
- Hotez, P.J., Narasimhan, S., Haggerty, J., Milstone, L., Bhopale, V., Schad, G. A., & Richards, F. F. (1992). Hyaluronidase from infective *Ancylostoma* hookworm larva and its possible function as a virulence factor in tissue invasion and in cutaneous larva migrans. *Infection and Immunity*, 60(3), 1018-1023.
- Hynes, W. L., & Walton, S. L. (2000). Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 183(2), 201-207.

- Hynes, W. L., Hancock, L., & Ferretti, J. J. (1995). Analysis of a second bacteriophage hyaluronidase gene from *Streptococcus pyogenes*: evidence for a third hyaluronidase involved in extracellular enzymatic activity. *Infection and Immunity*, 63(8), 3015-3020.
- Jedrzejewski, M. J., Mello, L. V., de Groot, B. L., & Li, S. (2002). Mechanism of hyaluronan degradation by *Streptococcus pneumoniae* hyaluronate lyase: Structures of complexes with the substrate. *Journal of Biological Chemistry*, 277(31), 28287-28297.
- Jiang, D., Liang, J., & Noble, P. W. (2007). Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 23(1), 435-461.
- Kelly, S. J., Taylor, K. B., Li, S., & Jedrzejewski, M. J. (2001). Kinetic properties of *Streptococcus pneumoniae* hyaluronate lyase. *Glycobiology*, 11(4), 297-304.
- Konwar, B., & Kim, K. S. (2025). Recent advances in bacterial hyaluronidase-responsive nano-drug delivery systems for targeting antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. *Chemical Engineering Journal*, 165827.
- Kreil, G. (1995). Hyaluronidases—a group of neglected enzymes. *Protein science*, 4(9), 1666-1669.
- Kurata, A., Matsumoto, M., Kobayashi, T., Deguchi, S., & Kishimoto, N. (2015). Hyaluronate lyase of a deep-sea *Bacillus niacini*. *Marine Biotechnology*, 17(3), 277-284.
- Lee, J. H., Moore, L. D., Kumar, S., Pritchard, D. G., Ponnazhagan, S., & Deivanayagam, C. (2010). Bacteriophage hyaluronidase effectively inhibits growth, migration and invasion by disrupting hyaluronan-mediated Erk1/2 activation and RhoA expression in human breast carcinoma cells. *Cancer Letters*, 298(2), 238-249.
- Li, Y., Zhang, S., Wu, H., Wang, X., Yu, W., & Han, F. (2020). Biochemical characterization of a thermophilic hyaluronate lyase TcHly8C from *Thermasporomyces composti* DSM22891. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 1211-1218.
- Lindsay, A. M., Zhang, M., Mitchell, Z., Holden, M. T., Waller, A. S., Sutcliffe, I. C., & Black, G. W. (2009). The *Streptococcus equi* prophage-encoded protein SEQ2045 is a hyaluronan-specific hyaluronate lyase that is produced during equine infection. *Microbiology*, 155(2), 443-449.
- Linhardt, R. J., Galliher, P. M., & Cooney, C. L. (1986). Polysaccharide lyases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 12, 135-176.
- Liu, L., Liu, Y., Li, J., Du, G., & Chen, J. (2011). Microbial production of hyaluronic acid: Current state, challenges, and perspectives. *Microb. Cell Fact.*, 10, 99.
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 42, 490-495.
- Lowther, D. A., & Rogers, H. J. (1955). Biosynthesis of hyaluronate. *Nature*, 175(4453), 435-435.
- Lu, J., Zhao, Z., Pan, L., Wu, H., Wang, S., Tong, X., & Wu, S. (2025). Hyaluronidase: structure, mechanism of action, diseases and therapeutic targets. *Molecular Biomedicine*, 6(1), 50.
- Luu, H. M. D., Chen, A., & Isayeva, I. S. (2013). Comparative stability of the bioresorbable ferric crosslinked hyaluronic acid adhesion prevention solutions. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 101(6), 1006-1013.
- MacLennan, A. P. (1956). The production of capsules, hyaluronic acid and hyaluronidase by 25 strains of group C streptococci. *Microbiology*, 15(3), 485-491.
- Mai, V. Q., Vo, T. T., & Meere, M. (2018). Modelling hyaluronan degradation by *Streptococcus pneumoniae* hyaluronate lyase. *Mathematical Biosciences*, 303, 126-138.
- Mao, T., Su, C. W., Ji, Q., Chen, C. Y., Wang, R., Vijaya Kumar, D., Lan, J., Jiao, L., & Shi, H. N. (2021). Hyaluronan-induced alterations of the gut microbiome protects mice

- against *Citrobacter rodentium* infection and intestinal inflammation. *Gut Microbes*, 13(1), 1972757.
- Marion, C., Stewart, J. M., Tazi, M. F., Burnaugh, A. M., Linke, C. M., Woodiga, S. A., & King, S. J. (2012). *Streptococcus pneumoniae* can utilize multiple sources of hyaluronic acid for growth. *Infection and Immunity*, 80(4), 1390-1398.
- Matsuno, Y. K., Kakoi, N., Kinoshita, M., Matsuzaki, Y., Kumada, J. I., & Takehi, K. (2008). Electrophoresis studies on the contaminating glycosaminoglycans in commercially available hyaluronic acid products. *Electrophoresis*, 29(17), 3628-3635.
- Meyer, K. (1971). Hyaluronidases. In: Boyer, P.D. (Ed.), *The Enzymes*. Academic press, New York, pp. 307-320.
- Meyer, K., & Palmer, J. W. (1934). The polysaccharide of the vitreous humor. *Journal of Biological Chemistry*, 107(3), 629-634.
- Mishra, P., Akhtar, M. S., & Bhakuni, V. (2006). Unusual structural features of the bacteriophage-associated hyaluronate lyase (hylp2). *Journal of Biological Chemistry*, 281(11), 7143-7150.
- Ndeh, D., Baslé, A., Strahl, H., Yates, E. A., McClurg, U. L., Henrissat, B., Terrapon, N., & Cartmell, A. (2020). Metabolism of multiple glycosaminoglycans by *Bacteroides thetaiotaomicron* is orchestrated by a versatile core genetic locus. *Nature Communications*, 11(1), 646.
- Ndeh, D., Munoz, J. M., Cartmell, A., Bulmer, D., Wills, C., Henrissat, B., & Gray, J. (2018). The human gut microbe *Bacteroides thetaiotaomicron* encodes the founding member of a novel glycosaminoglycan-degrading polysaccharide lyase family PL29. *Journal of Biological Chemistry*, 293(46), 17906-17916.
- Necas, J., Bartosikova, L., Brauner, P., & Kolar, J. (2008). Hyaluronic acid (hyaluronan): A review. *Vet. Med.*, 53, 397-411.
- Ohya, T., & Kaneko, Y. (1970). Novel hyaluronidase from streptomyces. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 198(3), 607-609.
- Oiki, S., Mikami, B., Maruyama, Y., Murata, K., & Hashimoto, W. (2017). A bacterial ABC transporter enables import of mammalian host glycosaminoglycans. *Scientific Reports*, 7(1), 1069.
- Oiki, S., Nakamichi, Y., Maruyama, Y., Mikami, B., Murata, K., & Hashimoto, W. (2019a). Streptococcal phosphotransferase system imports unsaturated hyaluronan disaccharide derived from host extracellular matrices. *PLoS One*, 14(11), e0224753.
- Oiki, S., Sato, M., Mikami, B., Murata, K., & Hashimoto, W. (2019b). Substrate recognition by bacterial solute-binding protein is responsible for import of extracellular hyaluronan and chondroitin sulfate from the animal host. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 83(10), 1946-1954.
- Osago, H., Shibata, T., Hara, N., Kuwata, S., Kono, M., Uchio, Y., & Tsuchiya, M. (2014). Quantitative analysis of glycosaminoglycans, chondroitin/dermatan sulfate, hyaluronic acid, heparan sulfate, and keratan sulfate by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 467, 62-74.
- Osman, N., Mohammed, M., Omolo, C. A., Ibrahim, U. H., Gafar, M. A., Rambharose, S., Devnarain, N., Kiruri, L.W., Nwabufife, J., & Govender, T. (2023). Hyaluronidase inhibitor surface-modified niosomes: An efficient strategy for antibacterial and anti-biofilm drug delivery. *Materialia*, 30, 101826.
- Pan, L., Ai, X., Fu, T., Ren, L., Shang, Q., Li, G., & Yu, G. (2021). *In vitro* fermentation of hyaluronan by human gut microbiota: Changes in microbiota community and potential degradation mechanism. *Carbohydrate Polymers*, 269, 118313.

- Park, J. S., Choe, H., Kim, J. S., Lee, H. H., Lee, S., Park, J. W., & Ree, J. (2025). Characterization of a Hyaluronidase from *Paenibacillus residui* BSSK58 and Evaluation of Its Industrial Applicability. *Fermentation*, 11(9), 519.
- Park, Y., Cho, S., & Linhardt, R. J. (1997). Exploration of the action pattern of *Streptomyces* hyaluronate lyase using high-resolution capillary electrophoresis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1337(2), 217-226.
- Pires, D. P., Oliveira, H., Melo, L. D., Sillankorva, S., & Azeredo, J. (2016). Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(5), 2141-2151.
- Price, K. N., Tuinman, A., Baker, D. C., Chisena, C., & Cysyk, R. L. (1997). Isolation and characterization by electrospray-ionization mass spectrometry and high-performance anion-exchange chromatography of oligosaccharides derived from hyaluronic acid by hyaluronate lyase digestion: observation of some heretofore unobserved oligosaccharides that contain an odd number of units. *Carbohydrate Research*, 303(3), 303-311.
- Princewell, T.J. and Oakley, C.L. (1976) Deoxyribonucleases and hyaluronidases of *Clostridium septicum* and *Clostridium chauvoei*. III. Relationship between the two organisms. *Med. Lab. Sci.* 33, 105-118.
- Reda, F., & El-Shanawany, S. (2020). Characterization and immobilization of a novel hyaluronidase produced by *Streptomyces roseofulvus*. *Egyptian Journal of Botany*, 60(1), 213-224.
- Sahoo, S., Panda, P. K., Mishra, S. R., Nayak, A., Ellaiah, P., & Dash, S. K. (2007). Optimization of some physical and nutritional parameters for the production of hyaluronidase by *Streptococcus equi* SED 9. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 64(6), 517-522.
- Salwowska, N. M., Bebenek, K. A., Zadło, D.A., & Wcisło-Dziadecka, D.L. (2016). Physiochemical properties and application of hyaluronic acid: A systematic review. *J. Cosmet. Dermatol.*, 15, 520-526.
- Schaufuss, P., Sting, R., Schaeg, W., & Blobel, H. (1989). Isolation and characterization of hyaluronidase from *Streptococcus uberis*. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 271(1), 46-53.
- Sedláček, J., Hermannová, M., Mrázek, J., Buffa, R., Lišková, P., Šatínský, D., & Velebný, V. (2019). Insight into the distribution of amino groups along the chain of chemically deacetylated hyaluronan. *Carbohydrate Polymers*, 225, 115156.
- Shimada, E., & Matsumura, G. (1980). Degradation process of hyaluronic acid by *Streptomyces hyaluronidase*. *The Journal of Biochemistry*, 88(4), 1015-1023.
- Shimizu, M. T., Jorge, A. O. C., Unterkircher, C. S., Fantinato, V., & Paula, C. R. (1995). Hyaluronidase and chondroitin sulphatase production by different species of *Candida*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 33(1), 27-31.
- Shimizu, M. T., Jorge, A. O. C., Unterkircher, C. S., Fantinato, V., & Paula, C.R. (1995). Hyaluronidase and chondroitin sulphatase production by different species of *Candida*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 33, 27-31.
- Šimek, M., Lemr, K., Hermannová, M., & Havlíček, V. (2020). Analysis of hyaluronan and its derivatives using chromatographic and mass spectrometric techniques. *Carbohydrate Polymers*, 250, 117014.
- Šimek, M., Nešporová, K., Kocurková, A., Foglová, T., Ambrožová, G., Velebný, V., Kubala, L., & Hermannová, M. (2021). How the molecular weight affects the in vivo fate of exogenous hyaluronan delivered intravenously: A stable-isotope labelling strategy. *Carbohydrate Polymers*, 263, 117927.

- Sindelar, M., Jilkova, J., Kubala, L., Velebny, V., & Turkova, K. (2021). Hyaluronidases and hyaluronate lyases: From humans to bacteriophages. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 208, 112095.
- Singh, S. K., Bharati, A. P., Singh, N., Pandey, P., Joshi, P., Singh, K., Mitra, K., Gayen, J. R., Sarkar, J., & Akhtar, M. S. (2014). The prophage-encoded hyaluronate lyase has broad substrate specificity and is regulated by the N-terminal domain. *Journal of Biological Chemistry*, 289(51), 35225-35236.
- Skalka, B. (1985). Hyaluronidase test in the diagnosis of staphylococci. *Veterinarni Medicina*, 30(6), 373-378.
- Smith, N. L., Taylor, E. J., Lindsay, A. M., Charnock, S. J., Turkenburg, J. P., Dodson, E. J., Davies, G. J., & Black, G. W. (2005). Structure of a group A streptococcal phage-encoded virulence factor reveals a catalytically active triple-stranded β -helix. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(49), 17652-17657.
- St Leger, R. J., & Steven, E. (2000). *In vitro* utilization of mucin, lung polymers, plant cell walls and insect cuticle by *Aspergillus fumigatus*, *Metarhizium anisopliae* and *Haematonectria haematococca*. *Mycological Research*, 104(4), 463-471.
- Stern, R., Kogan, G., Jedrzejewski, M. J., & Šoltés, L. (2007). The many ways to cleave hyaluronan. *Biotechnology Advances*, 25(6), 537-557.
- Sting, R., Schaufuss, P., & Blobel, H. (1990). Isolation and characterization of hyaluronidases from *Streptococcus dysgalactiae*, *S. zooepidemicus* and *S. equi*. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 272(3), 276-282.
- Sun, X., Wang, Z., Bi, Y., Wang, Y., & Liu, H. (2015). Genetic and functional characterization of the hyaluronate lyase HylB and the beta-N-acetylglucosaminidase HylZ in *Streptococcus zooepidemicus*. *Current Microbiology*, 70(1), 35-42.
- Sze, J. H., Brownlie, J. C., & Love, C. A. (2016). Biotechnological production of hyaluronic acid: a mini review. *3 Biotech*, 6(1), 67.
- Takazono, I., & Tanaka, Y. (1984). Quantitative analysis of hyaluronic acid by high-performance liquid chromatography of *Streptomyces* hyaluronidase digests. *Journal of Chromatography A*, 288, 167-176.
- Tam, Y. C., & Chan, E. C. (1985). Purification and characterization of hyaluronidase from oral *Peptostreptococcus* species. *Infection and Immunity*, 47(2), 508-513.
- Tao, L., Song, F., Xu, N., Li, D., Linhardt, R. J., & Zhang, Z. (2017). New insights into the action of bacterial chondroitinase AC I and hyaluronidase on hyaluronic acid. *Carbohydrate Polymers*, 158, 85-92.
- Tezel, A., & Fredrickson, G. H. (2008). The science of hyaluronic acid dermal fillers. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*, 10(1), 35-42.
- Thirumurthy, K., Kaliyamoorthy, K., Kandasamy, K., Ponnuvel, M., Viyakarn, V., Chavanich, S., & Dufosse, L. (2023). Antioxidant and anti-breast cancer properties of hyaluronidase from marine *Staphylococcus aureus* (CASMTK1). *Journal of Marine Science and Engineering*, 11(4), 778.
- Thomas, S. C., Madaan, T., Kamble, N. S., Siddiqui, N. A., Pauletti, G. M., & Kotagiri, N. (2022). Engineered bacteria enhance immunotherapy and targeted therapy through stromal remodeling of tumors. *Advanced Healthcare Materials*, 11(2), 2101487.
- Tung, J. S., Mark, G. E., & Hollis, G. F. (1994). A microplate assay for hyaluronidase and hyaluronidase inhibitors. *Analytical Biochemistry*, 223(1), 149-152.
- UniProt (2021). The UniProt Consortium: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D480-D489. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1100>
- Wang, L., Liu, Q., Hao, R., Xiong, J., Li, J., Guo, Y., He, L., & Tu, Z. (2022). Characterization of a hyaluronidase-producing *Bacillus* sp. CQMU-D isolated from soil. *Current Microbiology*, 79(11), 328.

- Wang, W., Wang, J., & Li, F. (2016). Hyaluronidase and chondroitinase. *Protein Reviews*, 17, 75-87.
- Wang, X., Wei, Z., Wu, H., Li, Y., Han, F., & Yu, W. (2021). Characterization of a hyaluronic acid utilization locus and identification of two hyaluronate lyases in a marine bacterium *Vibrio alginolyticus* LWW-9. *Frontiers in Microbiology*, 12, 696096.
- Wang, Z., Guo, C., Xu, Y., Liu, G., Lu, C., & Liu, Y. (2014). Two novel functions of hyaluronidase from *Streptococcus agalactiae* are enhanced intracellular survival and inhibition of proinflammatory cytokine expression. *Infection and Immunity*, 82(6), 2615-2625.
- Weber, G.C., Buhren, B.A., Schruppf, H., Wohlrab, J., Gerber, P.A. (2019). Clinical Applications of Hyaluronidase. In: Labrou, N. (eds) Therapeutic Enzymes: Function and Clinical Implications. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 1148, 255-277. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7709-9_12
- Yin, C. Y., Sadiq, H., Liao, W. H., Wang, H. N., Fu, Z., Yu, W. G., & Han, F. (2025). Identification and functional characterization of two novel hyaluronate lyases BxHly33 and BiHly33, from the human gut microbiome. *International Journal of Biological Macromolecules*, 144153.
- Zamboni, F., Wong, C. K., & Collins, M. N. (2022). Hyaluronic acid association with bacterial, fungal and viral infections: Can hyaluronic acid be used as an antimicrobial polymer for biomedical and pharmaceutical applications? *Bioactive Materials*, 19, 458.
- Zhai, P., Peng, X., Li, B., Liu, Y., Sun, H., & Li, X. (2020). The application of hyaluronic acid in bone regeneration. *Int. J. Biol. Macromol.*, 151, 1224-1239.
- Zhao, J., Chen, J., Li, C., Xiang, H., & Miao, X. (2024). Hyaluronidase overcomes the extracellular matrix barrier to enhance local drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 203, 114474.
- Zhao, R., Zhang, C., Yu, L., Zhang, C., Zhao, J., Narbad, A., Zhai, Q., & Tian, F. (2023). *In vitro* fermentation of hyaluronan with different molecular weights by human gut microbiota: Differential effects on gut microbiota structure and metabolic function. *Polymers*, 15(9), 2103.
- Zheng, X., Wang, B., Tang, X., Mao, B., Zhang, Q., Zhang, T., Zhao, J., Cui, S., & Chen, W. (2023). Absorption, metabolism, and functions of hyaluronic acid and its therapeutic prospects in combination with microorganisms: A review. *Carbohydrate Polymers*, 299, 120153.
- Zhu, C., Zhang, J., Li, L., Zhang, J., Jiang, Y., Shen, Z., Guan, H., & Jiang, X. (2017). Purification and characterization of hyaluronate lyase from *Arthrobacter globiformis* A152. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 182(1), 216-228.

BÖLÜM 2

TRICHODERMA TÜRLERİNİN LİTİK ENZİM ÜRETİMİ ÜZERİNE GENEL BİR İNCELEME

Kardelen ÇAĞLAYAN¹, Dudu DEMİR², Cafer EKEN³

¹ Arş. Gör., Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Isparta, 0000-0001-9344-3879
E-mail: kardelencaglayan@isparta.edu.tr

² Prof. Dr., Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Isparta, 0000-0001-7710-384X
E-mail: dududemir@isparta.edu.tr

³ Prof. Dr., Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Isparta, 0000-0002-0454-8124 E-mail: cafereken@isparta.edu.tr

Giriş

Dünya nüfusunun artmasıyla birlikte, artan ihtiyaçları karşılayabilmek için endüstrileşme giderek daha fazla önem kazanmıştır. Endüstriyel uygulamalarda mikrobiyal kaynaklardan yararlanılması özellikle fungal enzimlerin kullanılması, daha düşük-maliyetli ve çevre-dostu bir alternatif oluşturmaktadır. Bu bağlamda funguslardan elde edilen enzimler, ilaç ve tarım sektörleri de dahil olmak üzere birçok endüstriyel alanda kullanılmaktadır. Biyoteknoloji endüstrisinde fungus kaynaklı litik enzimler olan selülozik, proteolitik ve kitinolitik enzimlerin gıda ve dericilik endüstrilerinin yanı sıra biyolojik kontrol işlemlerinde ve tıbbi peptid üretiminde kullanılması yaygın bir uygulamadır (Haliskaranfil, 2012; Naeem vd., 2022). Uygulama alanlarındaki bu çeşitlilik baz alındığında yeni enzim kaynaklarının keşfi önemli hale gelmiştir. Bu bağlamda mikrobiyal kökenli enzimlerin taranması, tanılanması, saflaştırılması ve karakterizasyonu oldukça önem taşımaktadır (Naeem vd., 2022).

Litik enzimleri üretme yetenekleri ile ön plana çıkan mikrobiyal popülasyonlar arasında *Trichoderma*, *Penicillium* ve *Aspergillus* gibi fungus cinsleri (El-Ghwas vd., 2023) ile *Azospirillum*, *Bacillus* ve *Pseudomonas* gibi bakteri cinsleri yer almaktadır (Morrison vd., 2017; Etesami ve Maheshwari, 2018; Mekonnen ve Kibret, 2021). Bunlar arasında özellikle fungal enzimler, üretimleri ve bulundukları ortamdan ayrıştırılmalarının daha kolay olması sebebiyle daha çok tercih edilmektedir. Bu funguslar arasında da *Trichoderma* türlerinin, ticari değeri olan hücre duvarını parçalayıcı enzimlerin üretimi açısından yüksek kapasiteye sahip olduğu yapılan çalışmalar ile bildirilmiştir (Markovich ve Kononova, 2003; Menezes vd., 2019; Jamil, 2021; Gunjal, 2023).

Bu çalışmada, *Trichoderma* türleri, bu türlerin önemli litik enzimleri ve konu ile ilgili yapılan çalışmalar derlenmiştir.

***Trichoderma* Türlerinin Özellikleri**

Trichoderma ilk kez Persoon tarafından 1794'de tanımlanmıştır (Schuster ve Schmoll, 2010). *Trichoderma* cinsi (teleomorph: Hypocrea); funguslar alemi, Ascomycota şubesi; Pezizomycotina alt şubesi; Sordariomycetes sınıfı; Hypocreales takımı; Hypocreaceae familyasında yer almakta ve 500'den fazla türü kapsamaktadır (Index Fungorum, 2025).

Trichoderma türleri selüloz, protein ve nişasta gibi farklı substratları kullanabilme özelliğine sahiptirler. Bu yeteneklerinden dolayı hücre duvarı parçalayıcı enzimleri (CWDEs: selüloz, proteaz ve glukana vb.) yüksek kapasitede üretebilmektedirler. Ayrıca, biyotik ve abiyotik stres yönetimi, ürün verimini artırıcı uygulamalar, antibiyotik üretimi, moleküler biyoloji çalışmaları, transgenik bitkiler ve ticari biyofungisitler gibi birçok alanda kapsamlı olarak incelenmiş ve kullanılmaktadır (Guruk ve Karaaslan, 2020; Pandey vd., 2021).

Trichoderma türleri ılıman ve tropik bölgeler, Antarktika ve tundra da dahil olmak üzere tüm iklim kuşaklarında geniş bir yayılım gösteren hemen hemen her türlü toprakta, çürümüş bitki parçalarında, bitkilerde ve okyanusta bulunabilen, kozmopolit ve saprotrofik funguslar olarak sınıflandırılır ve genellikle odunsu bitkilerin endofiti olarak yaşarlar (Kamala vd., 2015; Chen vd., 2021).

Trichoderma hızlı büyüyen ve bol spor üreten bir fungus cinsidir; bu sporlar, hiyalin ve septalı hiflerden oluşan iyi gelişmiş, dallanmış bir miselyum oluşturur. Spor oluşumu bakımından benzersiz bir yapıya sahiptir; çoğunlukla yeşil renkteki eşeysiz sporlar, çok dallı konidioforların uçlarında gelişir. Bazı türler klamidiosporlar da oluşturur. Kültür koşullarında hızlı büyüyen, pamuksu, kabarık veya granüllü koloniler oluşturur ve renkleri beyazdan yeşilin farklı tonlarına kadar değişir. Mikroskobik olarak, konidilerin ve fiyalidlerin şekli ile düzeni ve konidioforların dallanma düzeni temel tanı özellikleridir. Buna ek olarak, büyüme hızlarındaki farklılıklar türler arasındaki ayrımı ortaya koymada faydalı olabilmektedir (Kara, 2013). Bu türlerin en iyi gelişim gösterdikleri sıcaklık 25-30°C olan ılıman nemli topraklar ve pH 5,5-7,5

aralığındadır (Korkom, 2016; 2022). Bununla birlikte, cins içindeki yüksek genetik çeşitlilik, kesin tanı için sıklıkla moleküler yöntemlerin kullanılmasını gerektirir (Thangaraj vd., 2025).

Trichoderma cinsi, çeşitli özellikleri ve kullanım alanlarıyla öne çıkan birçok önemli tür içermektedir. Bu türler arasında *Trichoderma harzianum*, *T. atroviride*, *T. asperellum*, *T. hamatum*, *T. koningii*, *T. longibrachiatum*, *T. polysporum*, *T. pseudokoningii*, *T. reesei* ve *T. viride* yer almaktadır (Markovich ve Kononova, 2003; Qualhato vd., 2013; Mukhopadhyay ve Kumar, 2020). *Trichoderma* spp.'nin çok yönlü etki mekanizmalarının varlığı ve çeşitli ortamlara olan adaptasyon kabiliyeti ile endüstriyel uygulamalarda yüksek kullanım potansiyeline sahiptir (Korkom, 2022). Bu özellikleri sayesinde *Trichoderma* türleri, dünya çapında en çok ticari biyopreparat haline getirilen funguslar arasındadır (Kredics vd., 2005; Bayrak vd., 2021; Gezgini vd., 2023). Endüstriyel uygulamalar açısından bu türlerin sahip oldukları litik enzimleri kodlayan genlerin klonlanması ve eksprese edilmesi önem arz etmektedir (Deng vd., 2018). Ayrıca *Trichoderma*'ların sahip olduğu hücre duvarını parçalayan enzimlerin kullanımı, ürünlerin raf ömrünün uzatılması için umut verici alternatif olarak değerlendirilmektedir (Naeem vd., 2022). Bu bağlamda biyoteknolojinin farklı uygulama alanlarında, enzim üretimi ve biyolojisi üzerine yoğun olarak çalışmaları yapılan bir türdür (Kredics vd., 2005; Bayrak vd., 2021; Gezgini vd., 2023).

***Trichoderma* Türlerindeki Bazı Litik Enzimler**

Hidrolitik enzimler, funguslar gibi mikrobiyal kaynaklar tarafından üretilen ve polisakkarit, protein ile lipid gibi molekülleri daha küçük bileşenlere ayıran, hücre duvarını parçalayabilen ekstraselüler enzimlerdir (Nauom vd., 2019). En çok çalışılan hidrolitik enzimler sırasıyla kitinolitik, glukanolitik ve proteolitik enzimlerdir (Qualhato vd., 2013; Mukhopadhyay ve Kumar, 2020). *Trichoderma* türlerinin, hücre duvarı parçalanmasında görevli olan litik enzimlerin üreticileri olduğu bilinmektedir (Nauom vd., 2019; Ribeiro vd., 2019). Bu türler tarafından üretildiği bilinen bazı litik enzimler, amilaz, selüloz, proteaz ve kitinaz enzimleridir (Jamil, 2021; Gunjal, 2023). Bu bağlamda, çalışmamızda *Trichoderma* türleri tarafından sentezlenebilen selüloz, proteaz, kitinaz ve amilaz litik enzimlerinin önemi ve özelliklerine değinilmiştir.

Selüloz, selülozun yapısındaki β -1,4 glikozidik bağlarını parçalayabilen, 500 milyon dolar pazar payı ile dünya genelinde üçüncü en büyük endüstriyel enzimdir (Haliskaranfil, 2012; Aissaoui vd., 2017; Hamdan ve Jasim, 2018; Elibol İleri, 2019). Selüloz enzimi üç ana sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar; endoglukanaz, ekzoglukanaz, β -glukosidazdır. Selülozun hidroliz işlemi, bu üç sınıfın sinerjistik aktivitesi ile gerçekleşmektedir (Yasmin vd., 2013; Juturu ve Wu, 2014; Abe vd., 2015). Bu enzim, çeşitli biyolojik aktivitelerin düzenlenmesinde, bağışıklık yanıtının oluşmasında, büyüme ve gelişimde önemli rol oynamaktadır (Sharma vd., 2016; Mukhopadhyay ve Kumar, 2020). Ayrıca selüloz enzimleri, lignoselülozik atıkların biyogaza dönüşümünde görevli olmasıyla ön plana çıkmaktadır. Enzim sisteminin kompleksliği ve endüstriyel kullanım alanlarının varlığı gibi pek çok özelliği ile selüloz enzimleri, akademik ve endüstriyel çalışmalar açısından oldukça önemli kaynak teşkil etmektedirler (Alpınar, 2017). Çoğu fungus ve bakterilerin selüloz sentezleyebildiği çalışmalarla kanıtlanmıştır. (Pirzadah vd., 2014; Yan vd., 2021). Ticari selüloz enzimlerinin çoğu, *Trichoderma* ve *Aspergillus* türlerinden elde edilmiştir (Abe vd., 2015). *Trichoderma* cinsinden özellikle *T. reesei*'nin diğer türlere kıyasla hem daha yüksek enzim aktivitesine sahip olduğu hem de daha yüksek miktarda selüloz enzimini ürettiği bildirilmiştir (Pirzadah vd., 2014; Yan vd., 2021). Yapılan bir çalışmada *T. atroviride*'nin β -glukosidaz enzimi, SDS-PAGE ile saflaştırılmış ve kinetik verileri belirlenmiştir. Enzim 6,7117 kat saflaştırılmış ve yaklaşık olarak 70 kDa ve 60 kDa moleküler ağırlığında iki alt birime sahip olduğu saptanmıştır. En yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık ve pH değerleri sırasıyla 65°C ve pH=3 olarak bulunmuştur (Aydın, 2024). Gunjal (2023) tarafından yürütülen çalışmada, *Trichoderma* türlerinin izolasyonu ve karakterizasyonu

gerçekleştirilmiştir. Mikroskopik olarak tanımlanan izolatların selüloz üretim kapasiteleri değerlendirilmiştir. İncelenen üç *Trichoderma* izolatının semikantitatif olarak selüloz üretebildiği ve sırasıyla 1,4 cm, 1,3 cm ve 0,9 cm genişliğinde şeffaf zonlar oluşturduğu belirlenmiştir. Yapılan bir başka çalışma incelendiğinde Harran ovası topraklarından *Trichoderma* izolatları elde edilmiş ve bu izolatlar tarafından salgılanan selülozün protein büyüklüğü SDS-PAGE analizi ile 32 kDa, optimum sıcaklığı 40°C, optimum pH'ı 5,0 olarak bulunmuştur. *Trichoderma* T1 izolatından elde edilen selülozün katı besiyerinde ($0,35 \pm 0,02$ EU) ve sıvı kültürde (0,008 U/mL) en yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. *Trichoderma* spp.'dan elde edilen selülozün enzim aktivitesi ticari selüloz enzimi ile kıyaslanmış ve fungal enzimin kayda değer seviyede aktivite gösterdiği gözlenmiştir (Guruk, 2018). Hamdan ve Jasim (2018) tarafından yapılan çalışmada *T. longibrachiatum*'un ürettiği selüloz enzimi, art arda uygulanan dört farklı saflaştırma tekniği (amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon) kullanılarak 9,69 kat saflaştırılmıştır. Bu enzimin spesifik aktivitesi 6680,8 U/mg, moleküler ağırlığı 17782 kDa, optimum pH'ı 4 ve sıcaklığı 40°C olarak bulunmuştur. Yapılan bir çalışmada, *T. harzianum* NRRL 13019 izolatından selüloz (β -glukosidaz) enzimi saflaştırılmış ve SDS-PAGE analizi sonucunda yaklaşık 110 kDa büyüklüğünde tek bir bant elde edilmiştir. Enzimin optimum pH değeri 4,0 ve optimum sıcaklığı ise 65°C olarak belirlenmiştir (Alpınar, 2017). Saravanakumar vd. (2016) yaptıkları çalışmada *T. harzianum*'un selüloz enzimi ürettiği belirlenmiştir (Sharma vd., 2022). Yapılan bir çalışmada da *Trichoderma* izolatlarının selüloz üretebilme yetenekleri, hem agar-plak hem de sıvı kültür yöntemleri ile incelenmiştir. Bu izolatların karboksimetil selüloz (CMC) agar ortamında 9. günde 40-72 mm'lik gelişme zon çapları ile iyi gelişim gösterdiği tespit edilmiştir. Sıvı kültürde ise 7. günde selüloz aktivitesinin optimum olduğu ve en düşük aktivitenin ID4A izolatında ve en yüksek aktivitenin 0,017 U/mL ile ID11D izolatında olduğu belirlenmiştir (Bozdeveci, 2014). Pirzadah vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada *T. viride*'den selüloz enzimi elde edilmiş ve SDS-PAGE analizi yapılarak moleküler ağırlığı 31,2 kDa olarak belirlenmiştir. Ayrıca, enzimin 4,8-5,5 pH aralığında aktif olduğu ve aktiflik gösterdiği sıcaklığın 50°C ve 70°C olarak değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir. Bir diğer çalışmada, *T. harzianum* Rifai T3 izolatının selüloz enzim aktivitesi belirlenmiş ve kısmi karakterizasyonu yapılmıştır. Saflaştırılan iki adet selüloz enziminin 40 kDa ve 45 kDa moleküler ağırlığa sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu enzimlerin optimum pH değerleri 4,0-5,0 ve sıcaklıkları 37-40°C olarak bulunmuştur (Thrane vd., 1997).

Proteolitik aktivite hücre duvarının tamamen yıkımı için öncü bir rol oynar (Markovich ve Kononova, 2003). Proteolitik aktiviteye sahip olan proteaz enzimi, bir protein ya da peptid içerisinde bulunan iki aminoasit arasındaki peptid bağlarını parçalayabilen kompleks bir enzimdir (Daranagama vd., 2019; Mukhopadhyay ve Kumar, 2020; Sun vd., 2021; Sharma vd., 2022). Proteaz enzimlerinin; serin proteazlar, alkalın proteazlar, metalloproteazlar ve aspartil proteazlar olarak çeşitli tipleri bulunmaktadır. Bu enzimler optimum pH'larına göre alkali (bazik), nötr ve asidik proteazlar olarak da sınıflara ayrılabilir (Kredics vd., 2005; Abe vd., 2015; Sharma vd., 2016; Sharma vd., 2022). Proteaz enzimi, tüm enzim pazarının yaklaşık %60'ını oluşturmaktadır ve sağlık, ilaç, gıda ve biyoteknoloji endüstrilerinde oldukça önem arz etmektedir (Daranagama vd., 2019). *Trichoderma* türleri, selüloz üreticileri olarak kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır. Bununla birlikte *Trichoderma*'lardan proteazların salgılanması, endüstriyel olarak proteaz üretebilme özellikleri veya proteaz üretme yetenekleri veya üretildikleri takdirde bu tür proteazların doğası hakkında yeterince çalışma bulunmamaktadır (Manonmani ve Joseph, 1993; Kredics vd., 2005; Šimkovič vd., 2012; Şahin, 2013). Xue vd. (2024) tarafından yapılan çalışmada *T. asperellum*'un sentezlediği aspartik proteaz enziminin aktivitesi ve karakteristik özellikleri araştırılmıştır. En yüksek proteaz aktivitesi 4092 U/mL, optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 3,0 ve 50°C olarak belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada *T. harzianum*'un proteaz aktivitesi incelenmiştir. Proteaz için elde edilen spesifik

aktiviteler sırasıyla $361,73 \pm 16,60$ U/mg protein ve $192,41 \pm 1,93$ U/mg protein olarak belirlenmiştir (Nauom vd., 2019). Yapılan bir diğer çalışmada *T. atroviride* tarafından üretilen proteazın, farklı substratlar kullanılarak aktivitesi incelenmiş ve karakterize edilmiştir. Elde edilen proteazların yaklaşık 200 kDa ve 36 kDa olduğu bulunmuştur. Substrat olarak azokazein kullanılarak ölçüm yapıldığında optimum aktivite 37°C 'de gözlenirken, sığır serum albümin kullanılarak ölçüm yapıldığında optimum aktivite 20°C 'de aktivite gözlenmiştir (Šimkovič vd., 2012). Viterbo vd. (2002)'nin yaptıkları çalışmada *Trichoderma* izolatının 5°C 'de dahi çok yüksek proteaz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir (Maral, 2012). Tchameni vd. (2020) tarafından *Trichoderma* türlerinin salgıladığı litik enzimler ve sekonder metabolitlerin incelenmesi üzerine bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmadaki *T. erinaceum* (IT-58), *T. gamsii* (IT-62), *T. afroharzianum* (P8) ve *T. harzianum* (P11)'in selüloz ve proteaz üretebildiği belirlenmiştir.

Kitinaz, bakteri, fungus, böcek, bitki ve omurgalıların bulunan, kitin polisakkaritinin hidrolizinde görev alan bir enzimdir. Yapılan bir çalışmada deniz kökenli *T. bissettii* izolatları tarafından salgılanan kitinolitik enzim aktivitesi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda ham enzimin optimum kitinolitik aktivitesi 50°C ve pH 5,0'da gözlenmiştir (Chung vd., 2022). Gezgin vd. (2020) tarafından yapılan çalışmada *Trichoderma* türlerindeki farklı litik enzimlerin aktiviteleri incelenmiştir. *Trichoderma atroviride* ve *T. citrinoviride* izolatları 0,05-0,29 U/mL aralığında kitinaz, 0,16-0,40 U/mL aralığında β -1,3 glukanaz, 0,56-2,99 U/mL aralığında proteaz enzim aktiviteleri tespit edilmiştir. Jamil (2021) tarafından yapılan çalışmada *T. harzianum* ve *T. viride* izolatlarının yüksek seviyede selüloz, proteaz, ligninaz ve kitinaz enzimlerini ürettiği belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada *T. harzianum*, *T. tomentosum*, *T. asperellum* ve *T. ghanense*'nin *in vitro* koşullarda hücre duvarını parçalayan enzimleri (proteaz, glukanaz, kitinaz) ölçülmüştür. *T. harzianum* ve *T. asperellum*'un hücre duvarı enzimlerini salgıladığı belirlenmiştir (Qualhato vd., 2013). Lima vd. (1997) tarafından yapılan çalışmada altı *Trichoderma* izolatının kitinolitik enzimleri ve β -1,3-glukanaz üretim miktarları incelenmiştir. Çalışma sonucunda maksimum kitinaz, kitobiaz ve β -1,3-glukanaz aktiviteleri sırasıyla 171 U/mL, 0,189 U/mL ve 197 U/mL olarak belirlenmiştir.

Karbohidrat içerikli endüstriyel uygulamaların çoğu, biyoteknolojik olarak dönüşüme uygundur. Bitkisel karbohidratlar arasında nişasta, selülozdan sonra ikinci sırada yer alan önemli bir karbon ve enerji kaynağıdır. Amilaz enzimi, nişastanın hidrolizinde görev alan, dünya enzim piyasasında yaklaşık %25-33'lük pazar payı ile önemli bir endüstriyel enzimdir. Amilaz enziminin iki tipi bulunmaktadır. Bunlar endoamilazlar ve ekzoamilazlardır. Bu enzim, kolay ve düşük maliyetli şekilde üretilibilmelerinden dolayı deterjan, tekstil ve gıda endüstrilerinde tercih edilmektedir (Haliskaranfil, 2012). Menezes vd. (2019) yaptıkları çalışmada Antarktika'dan izole edilen fungusun patojenik aktivitesinin karakterizasyonu, fizyolojik ve enzimatik özellikleri incelenmiştir. Çalışmadaki izolat *Trichoderma* olarak tanımlanmış, bu türün amilaz ve proteaz enzim üretiminin 10°C ve 30°C 'de optimum olduğu, selüloz enzimi üretimininse sadece 10°C 'de optimum olduğu tespit edilmiştir. Mısır bitkisinden izole edilen farklı fungus türlerindeki amilaz, proteaz, selüloz gibi bazı litik enzimlerin incelendiği çalışmada, *T. harzianum*'un proteaz enzimini üretebildiği, diğer enzimleri üretemediği belirlenmiştir (Abe vd., 2015).

Sonuç

Derlemede, endüstriyel açıdan öneme sahip *Trichoderma* türleri, bu türlerin sahip oldukları bazı litik enzimler ve bu konu ile ilgili yapılan çalışmalar hakkında bilgi verilmiştir. Hızlı nüfus artışı sonucunda ülkemizde ve dünya çapında endüstrileşme oldukça önem kazanmıştır. Bu durum dikkate alındığında ilaç, gıda, tekstil ve tarım başta olmak üzere pek çok endüstriyel alanda mikrobiyal kaynaklardan elde edilen enzimler, düşük maliyetli ve çevre dostu olmaları ile ön plana çıkmıştır. Özellikle fungal kaynaklı enzimler, genetik modifikasyonlarının kolaylığı ve bulundukları ortamdan daha kolay ayrıştırılmaları ile daha çok tercih edilmektedir. Funguslar arasında *Trichoderma* türleri, hücre duvarının parçalanmasında önemli rol oynayan litik enzimlerin önemli üreticileri olarak başı çekmektedir. Endüstriyel açıdan değerli bu enzimlerin mikrobiyal kaynaklarının taranması, bu enzimlerin saflaştırılması, karakterizasyonu, protein yapısı ve parçalayıcı mekanizmalarının anlaşılması üzerine yapılacak çalışmaların sayısının artırılmasının uygulamalar açısından önemli olacağı düşünülmektedir. *Trichoderma* türleri selüloz, kitinaz, proteaz ve amilaz üreticileri olarak kapsamlı biçimde araştırılmış olsa da konuya ilişkin daha spesifik ve ileri düzey çalışmalar yapılmasına hâlâ ihtiyaç duyulmaktadır.

Teşekkür

Bu çalışma, TUBITAK-KBAG tarafından 125Z258 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Abe, C. A. L., Faria, C. B., Castro, F. F., et al. (2015). Fungi isolated from maize (*Zea mays* L.) grains and production of associated enzyme activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7), 15328–15346. <https://doi.org/10.3390/ijms160715328>
- Aissaoui, N., Chobert, J. M., Haertle, T., et al. (2017). Purification and biochemical characterization of a neutral serine protease from *Trichoderma harzianum*: Use in antibacterial peptide production from a fish by-product hydrolysate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 182, 831–845. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2365-4>
- Alpınar, Y. (2017). *Katı substrat fermentasyonu ile Trichoderma harzianum 'da selüloz üretimi, saflaştırılması ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi* (Yüksek lisans tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Aydın, H. (2024). *Trichoderma atroviride'den β -glukosidaz eldesi, saflaştırılması ve biyokimyasal karakterizasyonunun belirlenmesi* (Yüksek lisans tezi). Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı.
- Bayrak, U., Korkom, Y., & Yıldız, A. (2021). Effects of some *Trichoderma* isolates against charcoal rot disease of melon and plant growth. *The Journal of Turkish Phytopathology*, 50(1), 17–22.
- Bozdeveci, A. (2014). *Toprak kökenli Trichoderma spp. izolatlarının moleküler karakterizasyonu ve biyolojik mücadele etkinliklerinin belirlenmesi* (Yüksek lisans tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi).
- Chen, J., Zhou, L., Din, I. U., et al. (2021). Antagonistic activity of *Trichoderma* spp. against *Fusarium oxysporum* triggers defense genes in *Radix pseudostellariae* under monoculture. *Frontiers in Microbiology*, 12, 579920. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.579920>
- Chung, D., Kwon, Y. M., Lim, J. Y., et al. (2022). Characterization of chitinolytic and antifungal activities in marine-derived *Trichoderma bissettii*. *Mycobiology*, 50(4), 244–253. <https://doi.org/10.1080/12298093.2022.2105509>
- Daranagama, N. D., Shioya, K., Yuki, M., et al. (2019). Proteolytic analysis of *Trichoderma reesei* under cellulase-inducing conditions. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 46, 831–842. <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02155-9>
- Deng, J. J., Huang, W. Q., Li, Z. W., et al. (2018). Biocontrol activity of recombinant aspartic protease from *Trichoderma harzianum* against pathogenic fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 112, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.02.002>
- El-Ghwas, D. E., Elkhateeb, W.A., & Daba, G.M. (2023). Fungi: The Next Generation of Biofertilizers. *Environmental Science Archives*, 2(1), 34–41. <https://doi.org/10.5281/zenodo.7500741>
- Elibol İleri, C. (2019). *Trichoderma türlerinin Rhizoctonia solani üzerindeki bazı litik enzim aktiviteleri* (Yüksek lisans tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi).
- Etesami, H. & Maheshwari, D.K. (2018). Use of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPRs) with Multiple Plant Growth Promoting Traits in Stress Agriculture: Action Mechanisms and Future Prospects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 156, 225–246. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.013>
- Gezgin, Y., Guralp, G., Barlas, A. B., et al. (2023). Morphological and molecular identification of *Trichoderma* isolates used as biocontrol agents by DNA barcoding. *European Journal of Biology*, 82(1), 59–69. <https://doi.org/10.26650/EurJBiol.2023.1279151>

- Gezgin, Y., Maral Gul, D., Şenşatar, et al. (2020). Evaluation of *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma citrinoviride* growth profiles and their potentials as biocontrol agent and biofertilizer. *Turkish Journal of Biochemistry*, 45(2), 51-63.
- Gunjal, A. (2023). *Trichoderma* sp. for cellulase enzyme production. *Nepal Journal of Environmental Science*, 11(1), 11–17. <https://doi.org/10.3126/njes.v11i1.49166>
- Guruk, M. (2018). *Harran Ovası topraklarından izole edilen Trichoderma spp. suşlarının selüloz üretme yeteneklerinin araştırılması* (Yüksek lisans tezi, Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Guruk, M., & Karaaslan, M. (2020). Production and biochemical characterization of cellulase enzyme by *Trichoderma* strains from Harran Plain. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 3(3), 258–274. <https://doi.org/10.38001/ijlsb.756818>
- Haliskaranfil, S. (2012). *Termoalkalifilik amilaz ve selüloz enzim (multi enzim) üreticisi Bacillus sp. izolasyonu, enzimlerin karakterizasyonu ve biyoteknolojik uygulanabilirliği* (Yüksek lisans tezi). Çukurova Üniversitesi.
- Hamdan, N., & Jasim, H. M. (2018). Purification and characterization of cellulase enzyme from *Trichoderma longibrachiatum* isolated in Iraqi soil. *Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 4(1), 32–41. <https://doi.org/10.9790/264X-04013241>
- Index Fungorum. (2025). *Names – Index Fungorum*.
Erişim tarihi (24 Kasım 2025). <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>
- Jamil, A. (2021). Antifungal and plant growth promoting activity of *Trichoderma* spp. against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* colonizing tomato. *Journal of Plant Protection Research*, 61(3), 243–253. <https://doi.org/10.24425/jppr.2021.137950>
- Juturu, V., & Wu, J. C. (2014). Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 33, 188–203. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.01.077>
- Kamala, T., Devi, S. I., Sharma, K. C., et al. (2015). Phylogeny and taxonomical investigation of *Trichoderma* spp. from Indian region of Indo-Burma biodiversity hotspot region with special reference to Manipur. *BioMed Research International*, 2015, Article 285261. <https://doi.org/10.1155/2015/285261>
- Kara, Ç. U. (2013). *Mikrobiyal gübre olarak Trichoderma citrinoviride (P18) mikropagüllerinin üretim ve kurutma optimizasyonu* (Yüksek lisans tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Korkom, Y. (2022). *Aydın ili tarım alanlarından elde edilen Trichoderma spp. 'nin tanımlanması ile çilekte kömür çürüklüğü hastalığına ve bitki gelişimine etkilerinin belirlenmesi* (Doktora tezi, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Korkom, Y. (2016). *Aydın ili çilek üretim alanlarında Trichoderma türlerinin belirlenmesi ve Macrophomina phaseolina'ya karşı etkinliklerinin saptanması* (Yüksek lisans tezi, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Kredics, L., Antal, Z., Szekers, A., et al. (2005). Extracellular proteases of *Trichoderma*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 52(2), 169–184. <https://doi.org/10.1556/AMicr.52.2005.2.3>
- Lima, L. H. C., Ulhoa, C. J., Fernandes, A. P., et al. (1997). Purification of a chitinase from *Trichoderma* sp. and its action on *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* cell walls. *Journal of General and Applied Microbiology*, 43, 31–37.
- Manonmani, H. K., & Joseph, R. (1993). Purification and properties of an extracellular proteinase of *Trichoderma koningii*. *Microbiology and Sanitation Discipline, Central Food Technological Research Institute, Mysore, India*.

- Maral, D. (2012). *Biyokontrol ajanı olarak Trichoderma mikropagüllerinin sıvı kültür fermentasyonu ile üretim optimizasyonu* (Yüksek lisans tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Markovich, N. A., & Kononova, G. L. (2003). Lytic enzymes of *Trichoderma* and their role in plant defense from fungal diseases: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 39(4), 341–351. <https://doi.org/10.1023/A:1024502431592>
- Mekonnen, H. & Kibret, M. (2021). The roles of plant growth promoting rhizobacteria in sustainable vegetable production in Ethiopia. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 8(15). <https://doi.org/10.1186/s40538-021-00213-y>
- Menezes, G. C. A., Alves, R. P., Victoria, F. C., et al. (2019). Study of physiological and enzymatic properties and pathogenic activity of a fungus isolated from moss *Sonionia uncinata* in Antarctica. *Polar Biology*, 42, 783–792. <https://doi.org/10.1007/s00300-019-02473-9>
- Morrison, C.K., Arseneault, T., Novinscak, A., et al. (2017). Phenazine-1-Carboxylic Acid Production by *Pseudomonas fluorescens* LBUM636 Alters *Phytophthora infestans* Growth and Late Blight Development. *Phytopathology*, 107(3):273-279. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-16-0247-R>
- Mukhopadhyay, R., & Kumar, D. (2020). *Trichoderma*: A beneficial antifungal agent and insights into its mechanism of biocontrol potential. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30, 133. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00333-x>
- Naeem, M., Manzoor, S., Abid, M. U. H., et al. (2022). Fungal proteases as emerging biocatalysts for biomedical therapies: An updated review. *Journal of Fungi*, 8(2), 109. <https://doi.org/10.3390/jof8020109>
- Nauom, S., da Silva Neto, B. R., Suriani Ribeiro, M., et al. (2019). Biochemical and molecular study of *Trichoderma harzianum* enriched secretome protein profiles using lectin affinity chromatography. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 187(1), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2795-2>
- Pandey, R. N., Jaisani, P., & Yadav, D. L. (2021). *Trichoderma* spp. in the management of stresses in plants and rural prosperity. *Indian Phytopathology*, 74, 453–467. <https://doi.org/10.1007/s42360-021-00373-9>
- Pirzadah, T., Garg, S., Singh, J., et al. (2014). Characterization of actinomycetes and *Trichoderma* spp. for cellulase production utilizing crude substrates by response surface methodology. *SpringerPlus*, 3, 62.
- Qualhato, T. F., Lopes, F. A. C., Steindorff, A. S., et al. (2013). Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against phytopathogenic fungi: Evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters*, 35, 1461–1468. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1225-3>
- Ribeiro, M. S., de Paula, R. G., Voltan, A. R., et al. (2019). Endo- β -1,3-glucanase (GH16 family) from *Trichoderma harzianum* participates in cell wall biogenesis but is not essential for antagonism against plant pathogens. *Biomolecules*, 9(781). <https://doi.org/10.3390/biom10091215>
- Saravanakumar, K., Fan, L., Fu, K., et al. (2016). Cellulase from *Trichoderma harzianum* interacts with roots and triggers induced systemic resistance to foliar disease in maize. *Scientific Reports*, 6, 35543.
- Schuster, A., & Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 787–799. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2632-1>

- Sharma, A., Salwan, R., & Sharma, V. (2022). Extracellular proteins of *Trichoderma* and their role in plant health. *South African Journal of Botany*, 147, 359–369.
- Sharma, V., Salwan, R., & Sharma, P. N. (2016). Differential response of extracellular proteases of *Trichoderma harzianum* against fungal phytopathogens. *Current Microbiology*, 73, 419–425. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1072-2>
- Šimkovič, M., Gdovinová, A., Zemková, Z., et al. (2012). Properties of secreted protease from vegetative *Trichoderma atroviride* mycelia cultivated with protein inducer reveal a complex protein-recognition mechanism. *Antonie van Leeuwenhoek*, 101, 253–265. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9629-3>
- Sun, Y., Qian, Y., Zhang, J., et al. (2021). Extracellular protease production regulated by nitrogen and carbon sources in *Trichoderma reesei*. *Journal of Basic Microbiology*, 61, 122–132.
- Şahin, S. (2013). *Trichoderma atroviride*'dan selüloz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu (Yüksek lisans tezi). Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Tchameni, S. N., Cotârlet, M., Ghinea, I. O., et al. (2020). Involvement of lytic enzymes and secondary metabolites produced by *Trichoderma* spp. in the biological control of *Pythium myriotylum*. *International Microbiology*, 22(2), 179–188. <https://doi.org/10.1007/s10123-019-00089-x>
- Thangaraj, P., Balamurali, A. S., & Muthusamy, N. (2025). Biological control of *Trichoderma* spp.: Mechanisms of action against phytopathogens, insect pests, and its multifaceted roles in agro-ecosystems. *Environment Conservation Journal*, 26(1), 302–314.
- Thrane, C., Tronsmo, A., & Jensen, F. (1997). Endo-1,3- β -glucanase and cellulase from *Trichoderma harzianum*: Purification and biological activity against *Pythium* spp. *European Journal of Plant Pathology*, 103, 331–344.
- Viterbo, A., Ramot, O., Chernin, L., et al. (2002). Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81, 549–556.
- Xue, Y., Yan, Q., Li, X., et al. (2024). Characterization of a novel aspartic protease from *Trichoderma asperellum* for the preparation of duck blood peptides. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12884-y>
- Yan, S., Xu, Y., & Yu, X.-W. (2021). From induction to secretion: A complicated route for cellulase production in *Trichoderma reesei*. *Bioresources and Bioprocessing*, 8, 107.
- Yasmin, S., Mattoo, R. L., & Nehvi, F. A. (2013). Isolation, characterization and molecular weight determination of cellulase from *Trichoderma viride*. *African Journal of Biotechnology*, 12(28), 4512–4518.

BÖLÜM 3

BAZI İLAÇLARIN KOYUN DALAK DOKUSUNDAN SAFLAŞTIRILAN GLUTATYON REDÜKTAZ ENZİMİ ÜZERİNE *İN VİTRO* ETKİLERİ

Çiğdem ÇOBAN¹

¹ Dr.Öğr.Üyesi, Bingöl Üniversitesi, Solhan Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Bingöl/Türkiye ORCID: 0000-0003-1141-544X

Giriş

Antioksidan savunma sistemleri genel olarak enzimatik ve enzimatik olmayan bileşenlerden oluşur. Enzimatik antioksidanlar arasında süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon redüktaz (GR) en önemli koruyucu enzimler arasında yer alır. Bu enzimler, hücre içi redoks dengesinin korunmasında koordineli bir şekilde görev yapar. Enzimatik olmayan antioksidanlar ise C vitamini, E vitamini, karotenoidler ve glutatyon gibi düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir (Birben ve ark., 2012).

Canlı organizmalarda enerji üretimi ve metabolik faaliyetler sonucunda reaktif oksijen türleri (ROS) ve serbest radikaller sürekli olarak oluşur. Bu bileşiklerin artışı, hücrede oksidatif stres olarak bilinen duruma yol açarak lipid, protein ve DNA gibi biyomoleküllerde hasar meydana getirir (Halliwell ve Gutteridge, 2015). Oksidatif stresin dengelenmesi, hücre içi antioksidan sistemlerin etkinliği ile doğrudan ilişkilidir. Bu sistemlerin önemli bir bileşeni olan GR enzimi, okside glutatyonu (GSSG) indirgenmiş formuna (GSH) dönüştürerek hücrel redoks dengesinin sürdürülmesini sağlar (Keha EE ve Küfrevioğlu Ö.,2010).GR enzimi, NADPH bağımlı bir flavoprotein olup, özellikle karaciğer, dalak ve eritrositlerde yüksek düzeyde bulunur ve hücreleri oksidatif hasara karşı korumada kilit rol oynar (Mannervik, 2014).

Glutatyon redüktaz aktivitesindeki değişimler; diyabet, nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler bozukluklar ve kanser gibi çeşitli patolojik durumlarla ilişkilendirilmiştir (Pastor ve ark., 2019). Bu nedenle, GR'nin aktivitesi ve düzenlenme mekanizmalarının anlaşılması, hem biyokimyasal araştırmalar hem de terapötik yaklaşımlar açısından büyük önem taşımaktadır.

İlaçların bu tür enzimler üzerindeki etkilerinin incelenmesi, hem farmakolojik etkinliklerinin hem de olası toksik etkilerinin anlaşılması açısından önem taşımaktadır (Çoban Ç, 2022; Çoban Ç vd., 2022). Özellikle antiinflamatuvar ve analjezik ilaçların oksidatif stresle ilişkili metabolik yolları etkileyebildiği bilinmektedir(Coban, C vd., 2024). Bu bağlamda polietilen glikol (PEG) farmasötik formülasyonlarda taşıyıcı ve stabilizatör olarak kullanılan bir polimerdir ve bazı çalışmalarda hücrel düzeyde koruyucu veya nötr etkiler gösterebildiği bildirilmiştir (Caliceti ve Veronese, 2003). Benzidamin hidroklorür (HCl) ise lokal antiinflamatuvar ve analjezik özellikleriyle bilinen bir ilaç olup, oksidatif stres parametreleri üzerindeki etkileri henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır (Köksal vd., 2016).

Bu çalışmada, polietilen glikol ve benzidamin HCl'nin koyun dalak dokusundan saflaştırılan glutatyon redüktaz enzimi üzerindeki in vitro etkileri araştırılmıştır. Dalak dokusu, yüksek metabolik aktiviteye sahip bir organ olduğundan, redoks sistemleri bakımından zengin bir kaynak oluşturur. Bu kapsamda, ilaçların GR enzimi üzerindeki aktivasyon veya inhibisyon etkilerinin belirlenmesi, oksidatif stresle ilişkili hücrel süreçlerdeki olası rollerinin anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

Materyal ve Metot

Materyaller

Bu çalışmada kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta olup, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) ve Merck (Darmstadt, Germany) firmalarından temin edilmiştir. Glutatyon redüktazın saflaştırılmasında kullanılan 2',5'-ADP-Sepharose 4B afinite jeli Sigma-Aldrich

firmasından alınmıştır. Amonyum sülfat, Tris-HCl, EDTA, NADPH, okside glutatyon (GSSG) ve diğer tampon bileşenleri standart laboratuvar reaktifleridir. İlaç çözeltileri (Polietilen glikol ve Benzidamin HCl) distile suda çözülerek deney öncesinde taze olarak hazırlanmıştır.

Homojenatın Hazırlanması, Amonyum Sülfat Çöktürülmesi ve Diyaliz

Taze koyun dalak dokusu, yerel mezbahadan temin edilip buz banyosunda laboratuvara taşınmıştır. Doku, soğuk 45 mL'lik 50 mM KH_2PO_4 (pH= 8,0) içinde homojenizatörde parçalanmıştır. Elde edilen homojenat 4 °C'de, 1 saat (10.000xg)santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı enzim kaynağı olarak kullanılmıştır (Şentürk et al., 2009). Süpernatant fraksiyonu, kademeli olarak %20–70 amonyum sülfat doygunluğuna ulaştırılmıştır. Her basamakta çöken proteinler santrifüj edilip, çökeltiler 10 mM K-fosfat, 1 mM EDTA diyaliz tamponunda 4 °C'de diyalize edildi (Çoban, 2022; Çoban ve Çiftci, 2022; Çoban et al., 2022).

2', 5' ADP Sepharose-4B Afinité Kromatografisi

Dializ sonrası elde edilen enzim çözeltisi, 2',5'-ADP-Sepharose 4B afinité kolonu üzerine yüklenmiştir. Kolon, 2',5'-ADP-Sepharose-4B jeli 0.1 M KH_2PO_4 + 0.1 M K-asetat tamponu ile dengelenmiş ve adsorbe olmayan proteinler uzaklaştırılmıştır. Enzim, NADPH içeren elüsyon tamponu ile elüe edilmiştir. Fraksiyonlarda 340 nm'de absorbans takibi yapılmış ve enzim içeren kısımlar birleştirilmiştir (Çoban, 2022; Çoban ve Çiftci, 2022; Çoban et al., 2022).

Protein Tayini

Saflaştırma işleminin her basamağında enzim aktivitesi ile birlikte toplam protein miktarı belirlenmiş ve spesifik aktivite değerleri bu verilere göre hesaplanmıştır. Protein miktarının tayininde, Bradford (1976) tarafından geliştirilen kolorimetrik yöntem kullanılmıştır. Bu yöntem, proteinlerin Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası ile oluşturduğu kompleksin absorbans değişimine dayanır. Bradford yöntemi, hızlı, hassas ve düşük protein konsantrasyonlarında dahi güvenilir sonuçlar vermesi nedeniyle tercih edilmiştir. Ölçümler, 595 nm dalga boyunda UV-Vis spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir. Standart eğrinin oluşturulmasında, referans protein olarak sığır serum albümini (BSA) kullanılmıştır.

Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Glutatyon redüktaz aktivitesi, NADPH'nin GSSG'ye indirgenmesi sırasında 340 nm'de absorbans azalmasının izlenmesi esasına göre spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Reaksiyon karışımı; 100 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0), 0.5 mM GSSG, 0.1 mM NADPH içermektedir. Ölçümler 25 °C'de gerçekleştirilmiştir. Bir enzim birimi, dakikada 1 μmol NADPH'nin oksidasyonuna yol açan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Carlberg ve Mannervik, 1985).

İnhibisyon ve Aktivasyon Çalışmaları

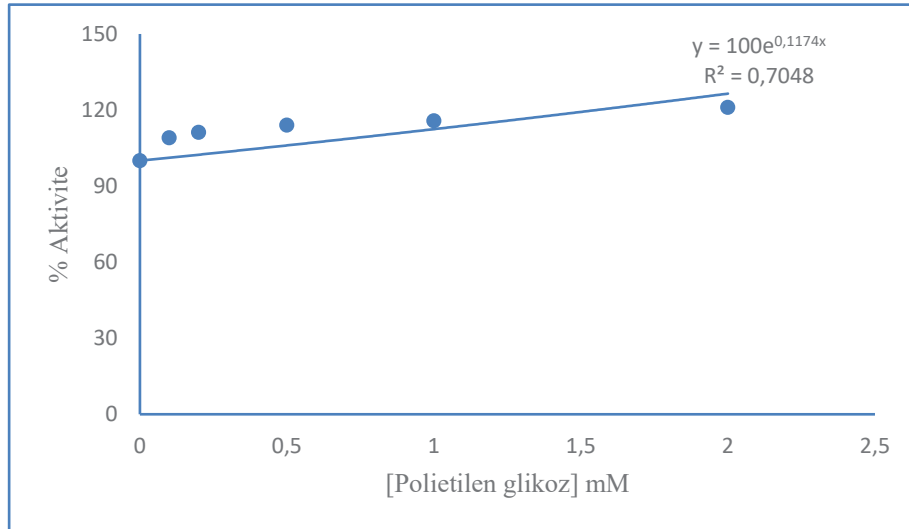
Saflaştırılan enzim çözeltisine, Polietilen glikol (PEG) ve Benzidamin HCl ilaçlarının farklı konsantrasyonları uygulanmıştır. Ölçüm yapılırken mümkün olan en yüksek inhibitör konsantrasyonuna kadar denemeler yapıldı Her bir ilaç için en az beş farklı derişim aralığı hazırlanmış ve deneyler üç paralel olarak yürütülmüştür. Elde edilen aktiviteler kontrol değerine oranla % Aktivite olarak hesaplanmış ve % Aktivite-[I] grafikleri çizilmiştir (Lineweaver ve Burk, 1934).

Sonuçlar

Polietilen glikozun koyun dalak dokusundan saflaştırılan glutatyon redüktaz enzimi üzerindeki etkilerinin araştırılmasında elde edilen aktivite verileri Tablo1’de ve grafiği de Şekil 1’de verildi.

Tablo 1. Polietilen glikozun enzim üzerindeki etkilerinin verileri

Polietilen glikoz derişimi (mM)	% Aktivite
0	100
0,1	107,8
0,2	111,15
0,5	114
1	115,7
2	121

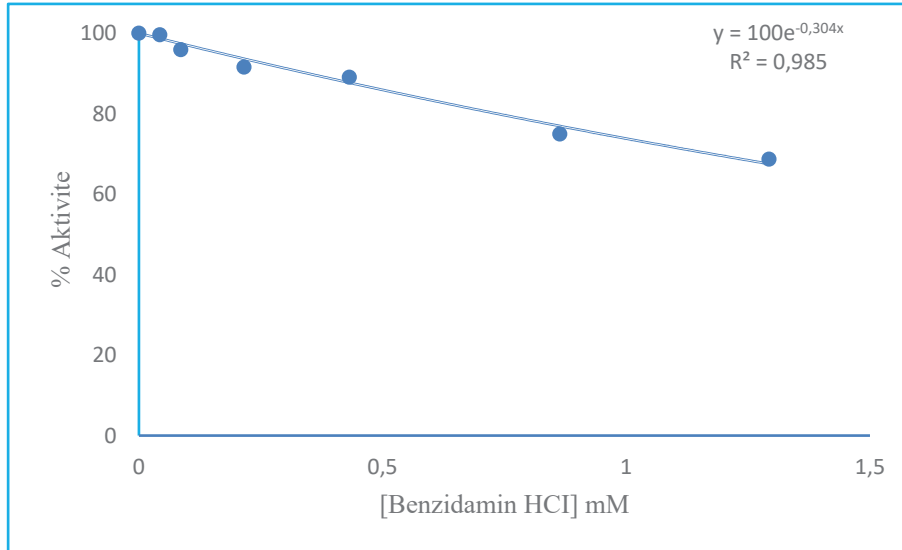


Şekil 1. Polietilen glikoz için elde edilen [I]-%Aktivite grafiği

Benzidamin HCl'in koyun dalak dokusundan saflaştırılan glutatyon redüktaz enzimi üzerindeki etkilerinin araştırılmasında elde edilen aktivite verileri Tablo2'de ve grafiği de Şekil 2'de verildi.

Tablo 2. Benzidamin HCl'in enzim aktivitesi üzerindeki etkilerinin verileri

Benzidamin HC derişimi (mM)	% Aktivite
0,0	100
0,043	99,60
0,086	95,89
0,216	91,58
0,432	89,04
0,864	74,95
1,293	68,69



Şekil 2. Benzidamin HCl için elde edilen [I]-%Aktivite grafiği

TARTIŞMA

Bu çalışmada, koyun dalak dokusundan saflaştırılan glutatyon redüktaz (GR) enzimi üzerine polietilen glikol (PEG) ve benzydamin HCl'nin *in vitro* etkileri araştırılmıştır. Elde edilen bulgular, her iki ilacın da GR enzimi üzerinde farklı etki mekanizmalarına sahip olduğunu göstermiştir.

GR enziminin biyokimyasal özelliklerinin doğru şekilde incelenebilmesi için, yüksek saflıkta elde edilmesi büyük önem taşır. Bu nedenle çalışma kapsamında enzim çeşitli saflaştırma basamaklarından geçirilmiştir. İlk olarak, ham dalak homojenatı belirli doygunluk aralıklarında amonyum sülfat çöktürmesi ile fraksiyonlara ayrılmıştır. Bu yöntem, proteinlerin çözünürlük farklılıklarından yararlanarak hedef enzimin kaba saflaştırmasını sağlar. Bu basamakta, GR enzimi yaklaşık %20–70 doygunluk aralığında çökelmiş ve bu fraksiyondan yüksek enzim aktivitesi elde edilmiştir. Amonyum sülfat çöktürmesi, enzim stabilitesini koruyarak denatürasyonu önlemesi bakımından tercih edilmiştir (Scopes, 2013). Takiben, GR enzimi iyon değişim kromatografisi yöntemiyle saflaştırılmıştır. Saflaştırma işlemleri sonunda elde edilen spesifik aktivite değerlerindeki artış, enzim safiyetinin başarılı bir şekilde sağlandığını ortaya koymaktadır.

Saf GR enzim aktivitesinde, polietilen glikolün artan konsantrasyonlarıyla (0.1 mM - 2 mM) hafif bir artış gözlemlenmiştir (Tablo 1, Şekil 1). Bu durum, PEG'in GR enzimi üzerinde zayıf bir aktivatör olarak davrandığını düşündürmektedir. PEG'in farmasötik formülasyonlarda yaygın olarak kullanılan bir polimer olduğu ve biyolojik sistemlerde genellikle inert veya stabilize edici bir ajan olarak kabul edildiği bilinmektedir (Caliceti ve Veronese.,2003). Enzimatik aktivitedeki bu hafif aktivasyon, PEG'in enzimin konformasyonel yapısında suyu uzaklaştırarak veya enzim-substrat etkileşimini dolaylı olarak kolaylaştırarak hafif bir stabilize edici etki göstermesine bağlanabilir.

Buna karşılık, benzydamin HCl uygulamasının ise GR enzim aktivitesini konsantrasyona bağlı olarak inhibe ettiği tespit edilmiştir (Tablo 2, Şekil 2). Özellikle 1.293 mM konsantrasyonda enzim aktivitesi yaklaşık %31 oranında azalmıştır. Bu bulgu, benzydamin HCl'in GR enzimi üzerinde orta düzeyde bir inhibitör etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Benzydamin HCl, lokal anti-inflamatuvar ve analjezik özelliklere sahip bir ilaçtır. İnhibisyon mekanizması tam olarak aydınlatılmamakla birlikte, bu bileşiğin enzimin aktif bölgesi veya allosterik bir bölgeye bağlanarak katalitik aktiviteyi engelliyor olması muhtemeldir. Köksal vd. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada da benzydaminin çeşitli enzim sistemleri üzerinde inhibitör etkileri rapor edilmiştir. GR enziminin inhibisyonu, hücrel GSH/GSSG oranının azalmasına ve dolayısıyla oksidatif strese yatkınlığın artmasına neden olabilir. Bu durum, ilacın uzun süreli veya yüksek doz kullanımlarında oksidatif stres kaynaklı yan etkilerin potansiyel bir göstergesi olarak değerlendirilebilir.

Benzer şekilde, bazı çalışmalarda antiinflamatuvar ilaçların glutatyon metabolizması üzerinde baskılayıcı etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Pastor et al., 2019). Bu etkiler, uzun süreli ilaç kullanımıyla hücrel GSH düzeylerinde azalma ve oksidatif dengenin bozulmasıyla sonuçlanabilmektedir. Bu bağlamda, benzydamin HCl'nin GR aktivitesini düşürmesi, ilacın yüksek dozlarda oksidatif stresin artmasına dolaylı katkıda bulunabileceğini göstermektedir.

GR, hücrel redoks homeostazının sürdürülmesinde ve antioksidan savunmada merkezi bir role sahiptir (Mannervik, 2014). Enzimin inhibisyonu, indirgenmiş glutatyon (GSH) seviyelerinin azalmasına ve hücrel oksidatif hasar riskinin artmasına yol açabilir (Halliwell ve Gutteridge, 2015). Dolayısıyla, benzydamin HCl'in GR üzerindeki bu inhibitör etkisi,

farmakolojik profilinde dikkate alınması gereken bir özellik olarak öne çıkmaktadır. Öte yandan, PEG'in hafif aktivatör etkisi, ilaç formülasyonlarında taşıyıcı olarak kullanıldığı durumlarda, birlikte uygulandığı diğer ilaçların neden olabileceği oksidatif stresi hafifletmede dolaylı ve olumlu bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışma, yaygın kullanılan iki farklı ilacın (PEG ve benzidamin HCl) GR enzim aktivitesi üzerinde zıt etkilere sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bu bulgular, farmasötik ajanların ve formülasyon bileşenlerinin, hedef etkilerinin yanı sıra hücresel antioksidan savunma sistemleri üzerinde de doğrudan veya dolaylı modülatör etkileri olabileceğini vurgulamaktadır. İlaçların redoks dengesi ve oksidatif stres parametreleri üzerindeki bu tür etkilerinin araştırılması, güvenlik profillerinin ve potansiyel etkileşimlerinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacaktır. İleride yapılacak çalışmalarda, bu etkilerin kinetik mekanizmalarının (inhibisyon tipi, K_i değeri vb.) aydınlatılması ve hücre kültürü veya *in vivo* modellerde doğrulanması faydalı olacaktır.

KAYNAKÇA

- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World allergy organization journal*, 5(1), 9-19.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Carlberg, I., Mannervik, B. (1985) Reduction of 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonate by glutathione reductase and effect of NADP⁺ on the electron transfer. *The Journal of Biological Chemistry*, 261(4), 1629-1635.
- Caliceti, P., & Veronese, F. M. (2003). Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(10), 1261-1277.
- Coban, C., Temel, Y., & Çiftci, M. (2024). In Vitro Effects of Some Chemotherapeutics on Human Erythrocyte Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Enzyme. *Acs Omega*, 9(49), 48292-48298.
- Çoban Ç, 2022. Glutatyon Redüktaz Enziminin Koyun Dalak Dokusundan Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Bazı Antibiyotiklerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin Araştırılması Doktora Tezi, Bingöl Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, s. 88
- Çoban Ç., Temel Y., Çiftci M. (2022). Koyun Dalak Dokusundan Saflaştırılan Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz ve Glutatyon Redüktaz Enzimi Üzerine Diklofenak Sodyumun *İn Vitro* Etkileri. *Journal of the Institute of Science and Technology*. 12:3, 1624 – 1634.
- Çoban Ç, Çiftci M, Bazı Bileşiklerin Koyun Dalak Dokusundan Saflaştırılan Glutatyon Redüktaz Enzimi Üzerine *İn Vitro* Etkileri, 2022 Konya/Türkiye. 1st International Conference on Scientific and Academic Research <https://www.icsarconf.com/> December 10-13, 2022,
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine* (5th ed.). Oxford University Press.
- Keha EE., Küfrevioğlu Öİ. (2010). *Biyokimya*, Aktif Yayınevi, 6. Baskı, İstanbul.
- Köksal, E., Gülçin, İ., & Beydemir, Ş. (2016). Evaluation of in vitro antioxidant, cytotoxic and enzyme inhibition properties of benzidamine HCl. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(6), 1394-1400.
- Lineweaver, H., & Burk, D. (1934). *The determination of enzyme dissociation constants*. *Journal of the American Chemical Society*, 56, 658-666.
- Mannervik, B. (2014). The enzymes of glutathione metabolism: an overview. *Biochemical Society Transactions*, 42(1), 10-14.

- Pastor, R. F., Restani, P., Di Lorenzo, C., Orgiu, F., Teissedre, P. L., Stockley, C., ... & Iermoli, R. H. (2019). Resveratrol, human health and winemaking perspectives. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(8), 1237-1255.
- Scopes, R. K. (1993). *Protein purification: principles and practice*. Springer Science & Business Media.