T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HARRAN OVASI TOPRAKLARINDAN İZOLE EDİLEN *TRICHODERMA* SPP. SUŞLARININ SELÜLAZ ÜRETME YETENEKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Mümine GURUK

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2018

Doç. Dr. Mehmet KARAASLAN danışmanlığında Mümine GURUK'un hazırladığı **''Harran Ovası Topraklarından İzole Edilen *Trichoderma* Spp. Suşlarının Selülaz Üretme Yeteneklerinin Araştırılması''** konulu bu çalışma 12/03/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

İmza

Danışman : Doç.Dr.Mehmet KARAASLAN .....

Üye : Doç.Dr. Hasan VARDIN .....

Üye : Yrd.Doç.Dr. Hidayet SAĞLAM .....

Bu Tezin Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım.

Prof. Dr. Halil Murat ALĞIN
Enstitü Müdürü

Bu çalışma HÜBAK Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: 17079

Not:Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
ŞEKİLLER DİZİNİ iv
ÇİZELGELER DİZİNİ v
SİMGELER DİZİNİ vi
1.GİRİŞ 1
1.1.Enzim 1
1.1.1.Enzimlerin numaralandırılması ve sınıflandırılması 2
1.1.2.Enzimlerin endüstride kullanımı 4
1.1.3. Selülazların çalışma mekanizmaları ve türleri 6
1.1.4. Selülazın endüstride kullanımı 7
1.1.5. Mikrobiyal enzimler 9
1.2. *Trichoderma* spp. 11
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 18
3. MATERYAL ve YÖNTEM 25
3.1. Toprak Örneklerinin Toplanması 25
3.2. Toprak Örneklerinin Laboratuvar Koşullarında Depolanması 25
3.3. *Trichoderma* spp. İzolasyonu 25
3.4. *Trichoderma* spp.'in Morfolojik Tanımlanması 26
3.5. *Trichoderma* spp.'in Mikroskobik Tanımlanması 26
3.6. *Trichoderma* spp.'in Selülaz Üretme Yeteneklerinin CMC Katı Besiyerinde Tanımlanması 26
3.7. *Trichoderma* spp.'in Genetik Tanımlanması 27
3.7.1. *Trichoderma* spp.'in çoğaltılması 27
3.7.2. DNA saflaştırması 27
3.7.3. Polimeraz zincir reaksiyonları ve agaroz jel elektroforezi 28
3.7.4. PZR ürünlerinin saflaştırılması 29
3.7.5. Bioinformatik analizler 30
3.8. *Trichoderma* spp.'den Fermentasyon Ortamında Selülaz Üretimi 30
3.9. SDS-PAGE Elektroforezi 31
3.9.1. SDS-PAGE jellerinin hazırlanması 31
3.9.2. Örneklerin hazırlanması ve SDS-PAGE elektroforezi 31
3.10. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi 32
3.10.1. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklık etkisinin belirlenmesi 33
3.10.2. Enzim aktivitesi üzerine pH etkisinin belirlenmesi 33
3.10.3. Enzim aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi 33
3.10.4. Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonu etkisinin belirlenmesi 33
3.11. İzole Edilen Enzimin Aktivitesinin Ticari Enzimle Karşılaştırılması 34
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 35
4.1. Toprak Örneklerinin Toplanması 35
4.2. *Trichoderma* spp.'in İzolasyonu ve Tanımlanması 35
4.2.1. *Trichoderma* spp.'in morfolojik tanımlanması 36
4.2.2. *Trichoderma* spp.'in mikroskobik tanımlanması 37
4.2.3. CMC agarda *Trichoderma* spp.'in selülaz aktivitesinin tanımlanması 38
4.2.4. *Trichoderma* spp.'in genetik tanımlanması 39
4.3. *Trichoderma* spp.'den Selülaz Üretimi 44
4.4. SDS-PAGE Elektroforezi 46
4.5. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi 47
4.5.1. Enzim aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi 47
4.5.2. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklık etkisinin belirlenmesi 48
4.5.3. Enzim aktivitesi üzerine pH etkisinin belirlenmesi 49
4.5.4. Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonun etkisi 51
4.6. *Trichoderma* spp.'den Üretilen Selülaz Enziminin Aktivitesinin Ticari Enzim Aktivitesi ile Karşılaştırılması 53
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 55

KAYNAKLAR 58
ÖZGEÇMİŞ 65
EKLER 66

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

HARRAN OVASI TOPRAKLARINDAN İZOLE EDİLEN *TRICHODERMA* SPP. SUŞLARININ SELÜLAZ ÜRETME YETENEKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Mümine GURUK

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mehmet KARAASLAN
Yıl: 2018, Sayfa: 73

Bu çalışmada başlıca selülaz üreticilerinden olan *Trichoderma* spp. fungusu Harran Ovası tarım arazilerinde araştırılmıştır. Topraktan izole edilen altı fungusun morfolojik, mikroskobik ve genetik tanımlamaları yapılmış ve funguslardan selülaz üretimi gerçekleştirilmiştir. İzolatlardan 4'ü %90 seviyelerinin üzerinde olacak şekilde ITS bölgeleri bakımından *Trichoderma* spp.'ları ile genetik benzerlik göstermiştir. Üretilen fungal selülazın protein büyüklüğü SDS-PAGE analizi ile 32 kDa olarak tespit edilmiştir. Selülazın optimum çalışma şartları belirlenmiştir. Selülaz enziminin optimum çalışma sıcaklığı 40ºC, optimum aktivite gösterdiği pH 5.0, en iyi çalıştığı süre 60 dk ve ideal substrat konsantrasyonu %2'lik CMC olarak belirlenmiştir. Fungal selülazın aktivitesi ticari selülaz enziminin aktivitesi ile karşılaştırılmış olup üretilen enzimin kayda değer aktivite gösterdiği görülmüştür.

ANAHTAR KELİMELER: *Trichoderma*, enzim, izolasyon, selülaz, PZR

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF CELLULASE PRODUCING ABILITY OF *TRICHODERMA* SPP. STRAINS ISOLATED FROM HARRAN PLAIN

Mümine GURUK

Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet KARAASLAN
Year: 2018, Page: 73

In this research, *Trichoderma* spp. fungus, a major producer of cellulase, that was isolated from Harran plain had been investigated. Morphological, microscopic and genetic identification of the six fungi isolates were carried out and their cellulase production abilities were determined. The ITS region of four of the isolates were displayed over 90% similarity with the DNA sequences of *Trichoderma* spp. currently deposited into the databases. The molecular size of fungal cellulase was found as to be 32 kDa by SDS-PAGE analysis. Optimum working conditions of cellulase had also been studied. The optimal temperature for cellulase enzyme activity was 40 ° C, optimum pH 5.0, best reacting time 60 min and ideal substrate concentration was determined as 2% CMC. The fungal cellulase activity was compared with the activity of the commercial cellulase enzyme. The fermentation produced enzyme by using *Trichoderma* spp. isolated from Harran plain displayed remarkable activity.

KEY WORDS: *Trichoderma*, enzyme, isolation, cellulase, PCR

TEŞEKKÜR

Tez çalışmasının planlanması ve devam ettirilmesi aşamalarında bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen danışmanım Doç. Dr. Mehmet KARAASLAN'A ve deneyimlerinden faydalandığım Doç. Dr.Hasan VARDİN'e teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmaları esnasında bana yardımcı olan Arif BOZDEVECİ ve Demet EKTİREN arkadaşlarıma teşekkür ederim. Ayrıca yüksek lisans eğitimim süresince bana her konuda yardımlarını esirgemeyen ve sabır gösteren aileme teşekkür ederim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Enzimlerin endüstriyel kullanım alanlarına göre dağılımı 5
Şekil 1.2. Selülazların çalışma mekanizması 6
Şekil 1.3. *Trichoderma* spp. doğadaki koloni görüntüsü..... 12
Şekil 1.4. *Trichoderma* spp. fungusunun petride geliştirilmiş tek kolonisinin morfolojik görüntüsü 13
Şekil 1.5. *Trichoderma* spp. konidioforlarının mikroskobik görüntüsü 14
Şekil 1.6. Selülaz üretme yeteneğine sahip bazı *trichoderma* spp. türleri..... 16
Şekil 4.1. Harran Ovası, Göktepe mevkisi mısır, pamuk ve buğday tarlalarının hasat sonrası görüntüsü..... 35
Şekil 4.2. PDA besiyerinde tek koloni halinde büyütülen *Trichoderma* T1, T2, T3, T4, T5, T6 izolatlarının morfolojik görüntüsü..... 36
Şekil 4.3. PDA besiyerinde tek koloni halinde büyütülen *Trichoderma* T1, T2, T3, T4, T5, T6 izolatlarının mikroskobik görüntüsü..... 37
Şekil 4.4. PDA besiyerinde tek koloni halinde büyütülen *Trichoderma* T1, T2, T3, T4, T5, T6 izolatlarının CMC besiyeri üzerinde gelişimi ve kolonilerin kongo red'e boyanmasından sonra selülaz hidroliz zonu görüntüsü 38
Şekil 4.5. *Trichoderma* spp. T1, T2, T4, T5, T6 izolatlarından elde edilen DNA'ların ITS1 ve ITS4 primer çifti kullanılarak çoğaltılması sonucu elde edilen %1.2 agaroz jel görüntüsü..... 40
Şekil 4.6. Harran Ovası topraklarında izole edilen *Trichoderma* suşlarından ITS bölge dilimlerinin DNA bilgi bankalarında bulunan dizilimlere gösterdikleri benzerliklere bağlı olarak çizilen filogenetik ağacı..... 43
Şekil 4.7. CMC sıvı fermantasyon ortamında gerçekleştirilen enzim üretiminde güne bağlı olarak ölçülen selülaz aktivitesi değerleri 45
Şekil 4.8. Selülaz enziminin SDS-PAGE jel görüntüsü. 46
Şekil 4.9. *Trichoderma* spp. izolatlarından elde edilen selülazın enzim aktivitesi-zaman grafiği 47
Şekil 4.10. *Trichoderma* spp. izolatlarından elde edilen selülazın sıcaklığa bağlı aktivite grafiği 49
Şekil 4.11. *Trichoderma* spp. izolatlarından elde edilen selülazın pH'a bağlı aktivite grafiği..... 50
Şekil 4.12. *Trichoderma* spp. izolatlarından elde edilen selülazın substrat konsantrasyonuna bağlı aktivite grafiği 52
Şekil 4.13. *Trichoderma* spp. izolatlarından elde edilen selülaz enzimi aktivitesi. 53
Şekil 4.14. *Trichoderma* spp. izolatlarından üretilen selülaz ve ticari selülaz enziminin karşılaştırılması. 53

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 1.1. Enzimlerin sınıflandırması....3
Çizelge 1.2. Bazı mikrobiyal enzimler ve uygulama alanları....10
Çizelge 3.1. CMC (Carboxymethylcellulose) agar besiyeri bileşimi....27
Çizelge 3.2. Dizileme analizi için kullanılan primerler....28
Çizelge 3.3. DNA bölgesinin çoğaltılması için kullanılan PZR karışımı....29
Çizelge 3.4. DNA bölgesinin çoğaltılması için kullanılan PZR şartları....29
Çizelge 3.5. Fermantasyon sıvı besiyerinin bileşimi.....30
Çizelge 3.6. SDS-PAGE jellerinin içeriği....31
Çizelge 4.1. *Trichoderma* spp. suşlarının CMC üzerindeki selülaz aktivitesi....39
Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan fungus suşlarının GenBank'a göre tür tayinleri....42
Çizelge 4.3. Bazı mikroorganizmalardan elde edilen selülazlara ait optimum pH ve sıcaklık değerleri....51

SİMGELER DİZİNİ

A	Adenin
G	Guanin
C	Sitozin
T	Timin
DNA	Deoksiriboz Nükleik Asit
rDNA	Ribozomal Deoksiriboz Nükleik Asit
bç	Baz çifti
EDTA	Ethylendinitrilotetrasetat
dH2O	Distile Su
dNTP	Deosinükleotid Trifosfat
dk	Dakika
kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
µl	Mikrolitre
M	Molar
U	Ünite
EU	Enzim Ünitesi
ITS	Internal transcribed spacer
EC	Enzim Komisyonu
spp	Species Plural
µm	Mikrometre
Mmol	Milimolar
mg	Miligram
mm	Milimetre
cm	Santimetre
L	Litre
mL	Mililitre
NaCl	Sodyum Klorür
HCl	Hidroklorik Asit
DNS	Dinitrosalisilik Asit
PDA	Potato Dextrose Agar
DRBC	Dichloran Rose-Bengal Agar
CMC	Karboksi Metil Selülaz
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TE	Tris EDTA
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonları
Tm	Erime Sıcaklığı
nm	Nanometre
V	Volt

1.GİRİŞ

1.1. Enzim

Enzimler, canlılar tarafından doğal olarak sentezlenen; protein yapısında ya da bir kısmı protein olan biyo-katalizörlerdir. Enzimler canlı hücrelerde kimyasal reaksiyonların gerçekleşmesi için gereken aktivasyon enerjisini düşürerek tepkimelerin daha hızlı ve doğru evrelerde oluşumunu sağlarlar. Reaksiyona giren enzimler reaksiyon esnasında herhangi bir değişime uğramazlar; reaksiyon sonunda reaksiyona girdikleri şekilleriyle çıkarlar ve defalarca kullanılabilirler. Enzimin üzerine etki ettiği maddelere substrat ismi verilir. Her enzimin üzerine etki ettiği belirli bir grup substrat vardır. Bazı enzimler tek bir substrata etki ederken bazıları ise bir substrat grubu üzerinde etki gösterebilirler ve dolayısıyla spesifik bir aktiviteye sahiptirler. Dolayısıyla enzimlerin kendilerine has karakteristik özellikleri mevcuttur. Enzimlerin çok büyük bir kısımları protein yapısında olmalarına rağmen ribozim adı verilen ve RNA yapısında olan enzimler de mevcuttur. Ancak bunların haricindeki enzimlerin tamamı protein yapısı sergilerler ve bazı enzimler sadece proteinlerden oluşurken bazıları da koenzim ya da kofaktör gibi protein olmayan kısımları da yapılarında bulundururlar. Enzimlerin proteinden oluşan kısmına apoenzim denir. Protein olmayan kısımları ise vitaminden oluşmuşsa koenzim, mineralden oluşmuşsa da kofaktör adını alır (Phalmer ve Bonner, 2011). Apoenzim ve protein olmayan kısmın birleşmesiyle aktif formdaki haloenzim oluşur.

Enzim terimi Yunanca'da maya olarak kullanılmış olup tarihte ilk kez Alman fizyolog Kühne tarafından 1878 yılında kullanılmıştır. İnsanlar çok eski tarihlerden beri enzimatik reaksiyonlardan katalitik etkileri hakkında bilgi sahibi olmadan yararlanmışlardır. Şarap, ekmek, yoğurt, kımız, boza gibi ürünler üretmişlerdir. İlk kez 1833'lerde Payen ve Persoz alkol kullanarak malt ekstraktından nişastayı sindiren enzimi çöktürme yoluyla elde etmişler buna Diyastaz adını vermişlerdir. Schwan 1836'da mide suyundan Pepsin enzimini elde etmiştir. Kristal halde bulunan ilk enzim olan Üreaz 1926 yılında Summer tarafından izole edilmiştir. Northrop

1930-1936 yılları arasında pepsin ve tripsin enzimini kristal halde elde etmiştir. Enzimlerin çalışma mekanizması ve kinetiği hakkında Fischer, Koshland ve Menten günümüzde de geçerliliğini koruyan önemli adımlar atmışlardır. 1960'da NOVO, ticari bir ölçekte *Bacillus lichnformis* kullanarak proteaz üretmeye başlamıştır. Daha sonraki yıllara bakıldığında 1980'den sonra birçok bilim adamı enzim üretimini iyileştirmek ve enzimlerin özelliklerini protein mühendisliği ile değiştirmek için genetik mühendisliği tekniklerini uygulamaya başlamıştır (Gurung ve ark., 2013). Enzim veya gen mühendisliği de kullanılarak DNA düzeyinde mutasyonlarla ve kimyasal modifikasyonlarla enzimlerin bir takım özellikleri değiştirilerek daha verimli hale getirilebilmektedir; böylece endüstriyel düzeyde enzim ihtiyacı karşılanabilmektedir (Akkaya ve Pazarlıoğlu, 2003).

1.1.1.Enzimlerin numaralandırılması ve sınıflandırılması

Enzimler ilk olarak tepkimeyi ve substratı tanımlayan enzimler olarak ikiye ayrılmıştır. İsimlendirilirken de substrata veya tepkimeye "–az" eki getirilerek isimlendirilmişlerdir. Bu isimlendirmeye substratı protein olan Proteaz veya DNA iplikçiğini ayırma görevini üstlenen DNA polimeraz enzimi örnek verilebilir. Fakat bu isimlendirme zamanla birden fazla enzim sistemini açıklamaya yetmemiştir. Bazen aynı enzime birden farklı isim verilirken; bazen de farklı enzimler için aynı isim kullanılmıştır. Bu durum belirsizliklere yol açmıştır. Aynı zamanda yeni bulunan enzimlerin artmasıyla yeni isimlendirme sistemine ihtiyaç duyulmuştur. Bu sorunu gidermek için Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB), 1984 yılında enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılmasına yeni bir boyut kazandırmıştır. Günümüzde kullanımına devam edilen bu sınıflandırmaya göre enzimler, katalizledikleri tepkimeye göre altı ana grup içerisinde sınıflandırılmıştır. Enzim komisyonunun yaptığı bu sınıflamaya göre her bir enzime kendine ait özel bir kod (E.C.) verilerek dört diziden oluşan sayılar kullanılmıştır. Dört sayıdan oluşan dizide birinci sayı enzimin hangi sınıfa dahil olduğunu göstermektedir. İkinci ve üçüncü sayılar enzimin alt ve daha alt sınıflarını gösterirken dördüncü sayı ise

enzimin seri numarasını göstermektedir. Çizelge 1.1'de bazı enzimler ve ait oldukları gruplar verilmiştir.

Çizelge 1.1. Enzimlerin sınıflandırması

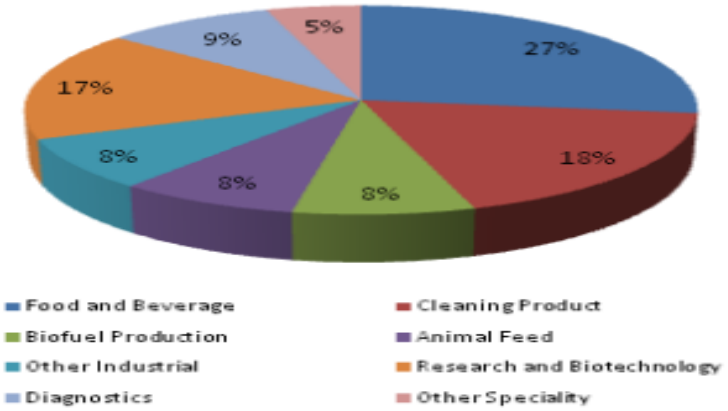
Oksidoredüktazlar	Oksidasyonla ilgili enzimlerdir.	Dehidrojenazlar Oksidazlar
Transferazlar	Gruplar arası transferleri katalize ederler.	1C'lu grupların transferini sağlayanlar. Aldehit veya keton gruplarının transferini sağlayanlar. Şeker gruplarının transferini sağlayanlar.
Hidrolazlar	Substrata su ekleyerek hidrolizi gerçekleştirirler.	Basit esterazlar Lipazlar Fosfatazlar Kolinesterazlar. Peptit hidrolazlar Nükleazlar Karbonhidratları etkileyen enzimler: Amilaz, Selülaz, İnülaz, Glikozidaz Karbon azot bağını koparan, amino içeren grupları ayıran enzimler: Üreaz,Asparajinaz, Glutaminaz, Nüklein deaminaz, Arjinaz
Liyazlar	Bağları koparark veya tersine ekleyerek substrattan grupları ayırır.	Dekarboksilazlar Karbonik anhidraz Aspartat amonyak liyaz Sistein desülfhiraz
İzomerazlar	Molekül içinde yeniden yapılanmayı katalize ederler.	Rasemazlar ve epimerazlar Cis-trans izomerazlar
Ligazlar	C-0, C-S, C-N ve C-C bağlarını kırarlar.	Süksinat KoA ligaz, DNA ligaz

1.1.2.Enzimlerin endüstride kullanımı

Tarihsel süreç içerisinde enzimler bitkiler, hayvanlar, mikroorganizmalar gibi farklı kaynaklardan izole edilmiştir ve kullanılmışlardır.

Endüstriyel enzimlere yönelik global piyasa 2014 yılında yaklaşık 4.2 milyar dolar olarak tahmin edilmiştir ve 2015'ten 2020'ye kadar bileşik yıllık büyüme hızında (CAGR) yaklaşık %6 artışla yaklaşık 6.2 milyar $'a ulaşması beklenmektedir (Singh ve ark., 2016). Enzimler kullanılarak 500' den fazla endüstriyel ürün üretilebilmektedir. Günümüzde enzimler, gıda, yem, deterjan, deri tabaklama, tekstil, ilaç, kozmetik ve ince kimyasal sanayi gibi birçok alanda düzenli olarak kullanılmakta ve belirli uygulamalara dayalı olarak kategorize edilmektedir. Amaca bağlı olarak; endüstriyel enzimler, (i) teknik enzimler; (ii) gıda enzimleri ve (iii) yem enzimleri olarak üç kategoriye ayrılır. Teknik enzimler arasında deterjan endüstrisi, nişasta, tekstil, biyoyakıt, ilaç ve çeşitli küçük sanayi için ürünler bulunmaktadır. Endüstriyel enzimlerin; %27'si gıda ve alkollü içecek sanayisinde, %18'i deterjan sanyisinde, %17'si biyoteknolojik ürünlerde, %8 biyoyakıt üretiminde, %8'i hayvanyemi sanayisinde kullanılmaktadır. Avusturya Federal Çevre Ajansı tarafından yapılan bir araştırmaya göre, gıda sanayisinde 158 enzim, çeşitli teknik uygulamalarda 64 enzim ve hayvancılık endüstrisinde 57 enzim kullanılmaktadır (Kumar ve ark., 2014). Endüstriyel enzimlerin kullanımına ait veriler şekil 1.1'de gösterilmiştir.

Gıda enzimleri, süt endüstrisi, yağ endüstrisi, fırıncılık, alkollü içecek, meyve suyu ve diğer gıda endüstrileri için yaygın olarak kullanılır.



Şekil 1.1. Enzimlerin endüstriyel kullanım alanlarına göre dağılımı (URL-**1**)

Gıda endüstrisinde enzimler, gıda kalitesini arttırmak ve gıda çeşitliliğini sağlamak için kullanılmaktadır. Bu enzimler bitkisel, hayvansal veya mikrobiyolojik yolla üretilmektedirler (Shinde ve ark., 2015). Gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan bazı enzimler;

Amilaz: Bakteriyel veya fungal yolla üretilirler; içecek ve fırıncılık endüstrisinde nişastayı parçalama amaçlı yaygın olarak kullanılırlar.

Katalaz: Hayvansal veya mikrobiyal yola üretilen bir enzimdir. Özellikle süt endüstrisinde hidrojen peroksiti parçalama amaçlı kullanılır.

Laktaz: Bitkisel, hayvansal ve mikrobiyolojik yolla üretilir. Laktaz enzimi sütte bulunan laktoz şekerini parçalamakla görevlidir.

Lipaz: Mikrobiyal yolla üretilirler. Yağları, yağ asitlerine ve esterlere parçalarlar.

Proteazlar: Özellikle laktik asit bakterilerinin üretiği enzim proteinleri parçalayarak lezzet gelişiminde katkıda bulunur.

Rennin: Hayvansal ve mikrobiyal kaynaklıdır. Peynir yapımında kullanılır.

1.1.3. Selülazların çalışma mekanizmaları ve türleri

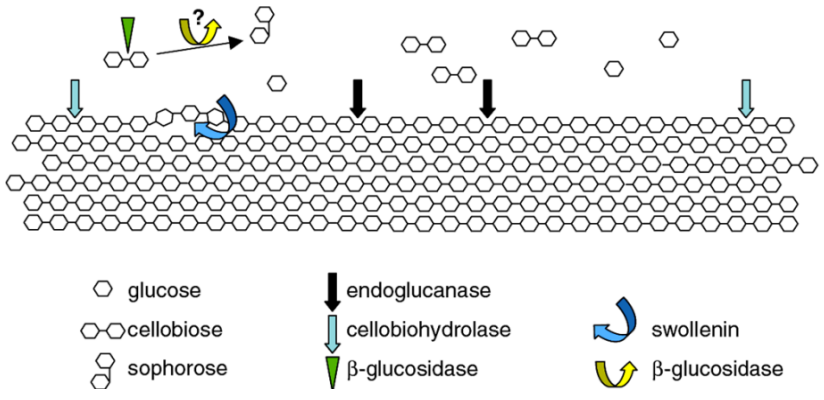
Selülozik materyal kimyasal veya enzimatik çevrim ile substrat olarak kullanılan ve doğada yaygın olarak bulunan geri dönüşümlü biyokütledir (Amin, 2016). Selüloz, biyolojik degradasyona dayanıklı bir materyaldir. Oluşturduğu mikrofibriler yapı nedeniyle sağlam ve çözünmez yapıya sahip olarak diğer polisakkaritlerden farklılık gösterir (Yang ve ark., 2010). Selüloz, bitkilerde hücre duvarının yapısında bulunur biyokütlenin yaklaşık %40'ını oluşturmaktadır. Selüloz yaklaşık 10000 glikoz biriminin ß-1,4- glikozidik bağlar ile bağlanmasıyla oluşan düz zincirli bir polimerdir. Asit ile hidrolizi sonucu ara ürün olan sellobiyozlara ve temel yapı taşı olan glikoza parçalanır. Selülozun suya karşı yüksek bir çekiciliği olmasına rağmen, suda çözünmez. Selüloz polimeri üç farklı enzimin ortak aktivitesi ve oluşturdukları sinerjistik etki ile hidrolize edilebilir (Kıran ve ark., 2006).

Selülazlar; selülozlardaki β-1,4- glikozidik bağlarını kırarak temel yapı taşı olan glikoza kadar parçalayan enzimlerdir (Sukumaran ve ark., 2005). Selülazlar üç gruba ayrılırlar;

1.Endoglukanazlar (EC 3.2.14); selülozları zincirin rastgele yerinden parçalayarak oligosakkaritleri, sellobiyozları ve glukozları oluşturur,

2.Ekzoglukanazlar (EC 3.2.1.91); selülozdaki β-1,4-D-glukozidik bağlarını yıkıma uğratarak indirgenmemiş uçlardan sellobiyozların serbest kalmasını sağlarlar.

3. β-glikozidazlar (EC 3.2.1.21) ise sellobiyozları glikoza hidrolize ederler (Haki ve Rakshit, 2003). Selülazların çalışması mekanizması Şekil 1.2'de verilmiştir.



Şekil 1.2. Selülazların çalışma mekanizması (Castaneda, 2011)

Mikroorganizmalar özellikle de funguslar bu üç selülotik enzimin bir karışımını sentezlerler. Selülolitik sistemi oluşturan bu enzimler sinerjistik bir şekilde çalışarak selülozu hidrolizlerler (Singh ve Hayashi, 1995). *Trichoderma humicola* ve *Penicillium* türleri gibi selülotik funguslar selülozu tamamen parçalayabilme yeteneğine sahiptirler. Genellikle bir ya da iki ekzoglukanaz, birkaç endoglukanaz ve en az bir β-glukozidaz sentezlerler. Bu sentez ürünlerini kültür ortamına salgılarlar (Goyal ve ark., 1991).

Son yıllarda organik maddelerin enzimler yoluyla parçalanması, hidroliz için kullanılan toksik etkili maddelerin ve aşındırıcı asitlerin kullanımına ihtiyacı azalttığından oldukça avantajlıdır. Bu nedenle doğada yaygın olarak bulunan selülozik materyallerin, selülaz enzimleri ile hidrolizi son yıllarda sıkça çalışılan bir konudur. Selülazın, selülozun yüzeyine bağlandığı ve substrat boyunca hareket ederek bir takım hidroliz reaksiyonları gerçekleştirdiği bulunmuştur. Enzim, yer yer substrattan ayrılarak ve sonrasında substratın başka bir bölgesine yapışarak katalitik aktivitesini göstermektedir (Kıran ve ark., 2006).

1.1.4. Selülazın endüstride kullanımı

Hayvan yemi endüstrisinde selülazların kullanımı: Selülazların ve hemiselülazların yem endüstrisindeki uygulamaları, hayvanların yem kalitesini iyileştirme potansiyelleri nedeniyle büyük ilgi görmüştür. Selülazlar veya ksilanazlar ile tarımsal silaj ve tahıl yemlerinin ön işleme tabi tutulması, yemlerin besleyici değerini arttırmaktadır.

Tekstil endüstrisinde selülazların kullanımı: Selülotik enzimler tekstil endüstrisinde pamuklu giysilerin yüzeyinde yıpranmayı önlemek ve yeni tekstil ürünlerini geliştirmek için kullanılır. Özellikle kotların taşlanma işleminde yaygın olarak kullanılan selülazlar ponza tozunun oluşumunu engellediğinde çevre kirliliğini de azaltmaktadır (Miettinen, 2004).

Kağıt endüstrisinde selülazların kullanımı: Selülazların kâğıt endüstrisinde kağıt hamurunun dövülmesini kolaylaştırmak, suyun ve mürekkebin uzaklaştırılmasını sağlamak gibi önemli işlevleri vardır (Bhardwaj,1996). Ayrıca selülaz, hemiselülaz ve ksilanazdan oluşan enzim preparatları kağıtların geri dönüşüm işlemlerinde önemli yere sahiptirler (Kuhad ve ark., 2011).

Gıda Sanayinde Selülazların Kullanımı: Selülazlar meyve suyu endüstrisi başta olmak üzere alkollü içeceklerin üretiminde, fırıncılıkta, yağ endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Selülazlar meyve suyu endüstrisinde kullanılan enzim preparatının (selülaz, hemiselülaz, ksilanaz ve pektinaz) önemli bir parçasıdır. Enzim preparatları meyve ve sebze sularının ekstraksiyonunda, berraklaştırılmasında ve stabilizasyonunda kullanılır. Bu enzimler viskoziteyi azaltarak proses verimini arttırırlar (Grassin, 1993). Meyve ve sebzelerin parçalama işleminden sonra selülaz içeren enzim preparatları pulpa eklenir. Böylece meyve ve sebzeden alınacak ürünün verimi artar ve proses süresi azalır. Selülaz içeren enzim prepatları meyve ve sebzelerin ekstraksiyon basamağı sonrasında berraklaştırma ve stabilizasyon amacıyla kullanılır. Böylece meyve suyunun viskositesi azaltılarak filtrasyon süresi kısaltılır ve son ürün stabilitesi arttırılır. Bu enzimler ayrıca ürünün aromatik özelliklerinin geliştirilmesine de yardımcı olurlar (Kuhad ve ark., 2011).

Selülaz ve hemiselülaz içeren enzim preparatları şarap üretiminde pres verimini arttırmada, filtrasyon süresini kısaltmada, renk kalitesini iyileştirmede, aroma özelliklerinin kazandırılmasında ve şarabın stabilizasyonunda önemli rol oynarlar (Kuhad ve ark., 2011).

Selülazlar ekmek yapımında, hamurun yapısındaki macunumsu kıvamın azaltılması amacıyla kullanılır. Ancak selülazın yüksek aktivitesi hamurun yapısına zarar verebileceğinden daha düşük aktiviteye sahip selülaz enzimleri kullanılmalıdır. *Trichoderma* fungusundan elde edilen selülazların aktiviteleri oldukça yüksektir bu

yüzden fırıncılıkta daha çok *Aspergillus* fungusundan elde edilen selülazlar kullanılmaktadır (Godfrey, 1996).

Selülaz, hemiselülaz ve pektinaz içeren enzim preparatları yağ endüstrisinde presleme veya ekstraksiyon gibi basamaklarda kullanılarak tohumdan yağın alınmasına yardımcı olurlar. Özellikle zeytin yağı ekstraksiyonunda hücre duvarının hızlı bir şekilde parçalanmasını sağlayarak süreden tasarruf sağlar. Ayrıca bu enzimlerin kullanımıyla elde edilen yağlarda antioksidan, polifenol ve aroma maddesi miktarının arttığı görülmüştür (Kuhad ve ark., 2011).

1.1.5. Mikrobiyal enzimler

Bitkisel ve hayvansal kaynaklı enzimlerin endüstriyel ihtiyacı yeterince karşılayamaması ve ayrıca bu kaynaklardan elde edilen enzimlerin izolasyonu ve saflaştırılmasında karşılaşılan zorluklar nedeniyle mikrobiyal enzim üretimi çalışmaları giderek artmaktadır (Rao ve ark., 1998). Ticari açıdan önemli hayvan ve bitki enzimleri genellikle sadece bir organ veya dokuda bulunur, bu yüzden geri kalan dokular enzim eldesi açısından değer taşımadığı için atık ürün olarak sınıflandırılmaktadır. Bitki ve hayvan kaynaklı enzimler farklı spesifiklik derecelerine ve ürün dönüştürme yeteneklerine sahip oldukları için standardizasyon problemleri oluşturabilmekte ve dönemsel limitasyonlara tabi olabilmektedirler. Bu gibi sorunlar insanları yeni enzim kaynakları aramaya yönlendirmiştir. Mikroorganizmalar enzim üretimi için ideal görülmüş ve zamanla enzimlerin başlıca kaynağı haline gelmiştir. Mikroorganizmalar kısa sürede kültüre alınabilmeleri genetik manipülasyonlara yatkın olmaları sayesinde mükemmel enzim kaynakları olarak değerlendirilmişlerdir. Mikrobiyal enzimler kolay ekstrakte edilir ve daha stabildirler. Mikroorganizmalar kısa sürelerde çoğalırlar ve çevre şartlarına dayanıklı olmaları olmaları nedeniyle daha verimli üretim sağlarlar (Kubicek, 2005).

Dünya genelinde mikrobiyal enzimlerin kullanım frekansına bakıldığında karbonhidrazlar %45.5 ile ilk sırada yer almaktadır. Bunu takiben proteazlar %27'lik bir paya sahiptir. Kalan payı ise amilaz, lipaz, rennin, tripsin gibi enzimler almaktadır (Baweja ve ark., 2016).

Endüstride çeşitli alanlarda kullanılan enzimler farklı mikroorganizmalardan elde edilebilmektedirler. Bazı mikrobiyal enzimler ve uygulama alanları Çizelge 1.2'de belirtilmiştir.

Çizelge 1.2. Bazı mikrobiyal enzimler ve uygulama alanları

ENZİM	MİKROORGANİZMA	UYGULAMA ALANI	REF.
Amilaz	*Bacillus subtilis* KCC103	Fırıncılık, içecek sanayi, hayvan yemi, biyoyakıt üretimi, deterjan sanayi.	Rajagopalan, Krishnan, 2008
β-glukanaz	*Rhizomucor miehei* CAU432 *Tricoderma viride* MBL	Alkollü içecek sanayi ve biyoetanol üretimi	Zampieri ve ark., 2013 Irshad ve ark., 2012
Selülaz	*Aspergillus niger* NRRL-567 *Trichoderma viride* GIM 3.0010	İçecek sanayi, biyoetanol üretimi	Dhillon ve ark., 2012 Sun ve ark., 2011
İnvertaz	*Saccharomyces cerevisiae* NRRLY-12632 *Aspergillus niger* GH1, *Cladosporium cladosporioides*	Sakkaroz hidrolizinde	Rashad, Nooman, 2009 Veana ve ark., 2014
Laktaz	*Lactobacillus acidophilus*	Süt sanayi	Akolkar ve ark., 2005
Mannaz	*Aspergillus niger* SN-09 Paper *Aspergillus terreus* SUK1 *Penicillium verruculosum*	Kağıt, tekstil ve ilaç sanayi	Yin ve ark., 2013
Pektinaz	*Pencillium oxalicum* PJ02 *Aspergillus niger*	Şarap ve meyve suyu sanayi	Li ve ark., 2015 Patil ve ark., 2006
Ksilanaz	*Penicillium* sp. CFR 303	Kağıt ağartma, yem sanayi	Murthy ve ark., 2012
Proteaz	*Streptomyces malaysiensis* AMT-3,	Gıda, ilaç, yem sanayi, atıkların degradasyonu	Nascimento ve ark., 2011
Lipaz	*Aspergillus niger*	Et ürünleri, deterjan sanayi	Gerber ve ark., 2013
Fitaz	*Klebsiella* sp. DB-3FJ711774.1	Hayvan yemi sanayi	Mittal ve ark., 2012
β-glukozidaz	*Trichoderma asperellum* KIF125	Hayvan yemi sanayi ve fırıncılık	Inoue ve ark., 2016

Endüstriyel enzimler üretilirken bazı özellikler göz önünde bulundurulmalıdır. Üretilen enzim ekonomik ve tekrar kullanılabilir nitelikte olmalı, özellikle mikroorganizma seçilirken üretim şartları ve maliyeti göz önünde bulundurulmalıdır. *Trichoderma* ve *Aspergillus* gibi funguslar selülotik maddelerin degredasyonunu sağlayan en iyi enzim üreticileridir (Rao ve ark., 1998).

Selülaz, katı faz veya batık fermantasyonla üretilmesine rağmen dünyadaki enzim üreticileri düşük maliyet açısından batık fed-back fermantasyon yöntemini kullanmaktadırlar. Novozymes, Genencor, Logen gibi enzim devleri selülaz üretimi için *Trichoderma* ve *Aspergillus* funguslarını tercih etmektedir (Zhou ve ark., 2013).

1.2. *Trichoderma* spp.

Trichoderma küfleri ile ilgili çalışmalar 1700'lü yıllara kadar dayanmaktadır. İlk defa 1974 yılında bu küfler Persoon tarafından ayrı bir cins olarak önerilmiş ve bu şekliyle literatüre girmiştir. *Trichoderma* cinsinde yer alan türler birbirlerine morfolojik ve diğer özellikleri bakımından önemli derecede benzerlik göstermektedirler ve bu nedenle birbirlerinden ayrılmaları ve sınıflandırılmaları kolay olmamaktadır. Dolayısıyla ilk defa 1969 yılında Rifai tarafından gerçek anlamda bir sınıflandırma yapılabilmiştir (Rifai, 1969). Rifai yaptığı sınıflandırmada *Trichoderma* küflerini üç altı grupta incelemiş ve bunları *Trichoderma viride, Trichoderma virens, Trichoderma harzianum* olarak isimlendirmiştir. Aradan geçen zaman sonrasında 1991 yılında *Trichoderma* cinsinin sınıflandırması tekrar ele alınmış ve 4 alt grupta toplanmıştır. Morfolojik özellikleri bakımından *Trichoderma*, *Pachybasium, Longibrachiatum* ve *Hypocreanum* olmak üzere 4 gruba ayrılmıstır (Bissett, 1991a; 1991b; 1991c;).

Webster ve Weber (2007) yaptıkları çalışmaya göre *Trichoderma* spp. aşağıdaki gibi sınıflandırılmıştır ve sınıflama günümüzde de kullanılmaktadır.

Alem: Fungi

Şube: Ascomycota

Sınıf: Pezizomycotina

Altsınıf: Sordariomyces

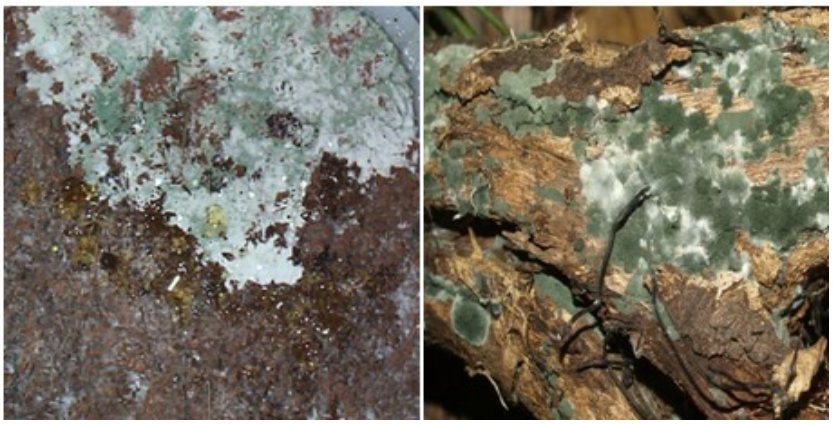
Aile: *Hypocreaceae*

Cins: *Trichoderma*

İsminden oldukça söz ettiren *Hypocreaceae* türleri isimlendirilemeyen *Trichoderma* türleri ile ilişkilendirilmiştir. Filogenetik analizlerde *Trichoderma* ve *Hypocreaceae* aynı anlamlı olarak kullanılmaktadır (Samuels, 2006).

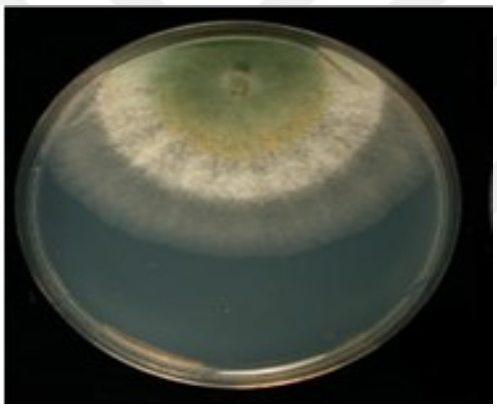
Trichoderma spp.'nin kültür ortamında uygun gelişim şartlarını araştıran çalışmalar yürütülmüştür. Elde edilen verilere göre bu canlıların en uygun olarak yulaf ezmesi, mısır unu veya malt özü bulunan agarlarda gelişim gösterdikleri tespit edilmiştir. Optimum gelişim sıcaklıkları 25 °C olduğu belirlenmiş ve ortalama 3-5 gün arasında gelişim gösterdikleri tespit edilmiştir (Kubicek ve Harman,2002).

Trichoderma spp. doğada özellikle toprak mikroflorasında yaygın olarak bulunan filamentli bir fungustur (Samuels, 1996). Ayrıca çürüyen ağaç kök gövdelerinde, sebzelerde çeşitli suşlarıyla yaygın olarak görülür (Domsch ve ark., 1980; Gams ve Bissett; 1998; Klein ve Eveleigh, 1998). *Trichoderma* fungusunun doğadaki koloni görüntüsü Şekil 1.3'de verilmiştir.



Şekil 1.3. *Trichoderma* spp. doğadaki koloni görüntüsü; solda *Trichoderma harzianum, Trichoderma koningii* suşlarının toprak üzerindeki koloni gelişimi, sağda *Trichoderma viride* suşunun ağaç gövdesi üzerindeki koloni gelişimi (URL-2)

Trichoderma fungusu hızlı gelişen bir türdür. Genel olarak türleri dört günde olgunlaşır. Üremenin başlangıcında besiyeri üzerinde beyaz hifli bir görüntü oluşturur ve bu miseller birkaç gün içinde tüm besiyeri yüzeyini kaplar. Beyaz hifli yapısı türe göre farklı renkler gösterebilir. Bir süre sonra miseller sıkılaşıp yüne benzer bir görünüm kazanır ve konidyumların (conidium) oluşması ile yüzeyde yer yer yeşil lekeler belirir. Koloniler renksiz, yeşil veya sarımsıdır (Rifai, 1969). Yeşilimsi görünüm çoğu suş için belirgin karakter olsa da ayırt edici bir özellik değildir (Kubicek ve Harman, 2002). Olgunlaşma döneminde birçok suşta belirgin konsentrik halkalar ve hava hifleri gözlenir (Gams ve Bisset, 1998). *Trichoderma* spp.'nin bazı suşlarında karakteristik hindistan cevizi kokusu bulunabilir (Papavizas, 1985). *Trichoderma* fungusunun morfolojik görüntüsü Şekil 1.4'de gösterilmiştir.

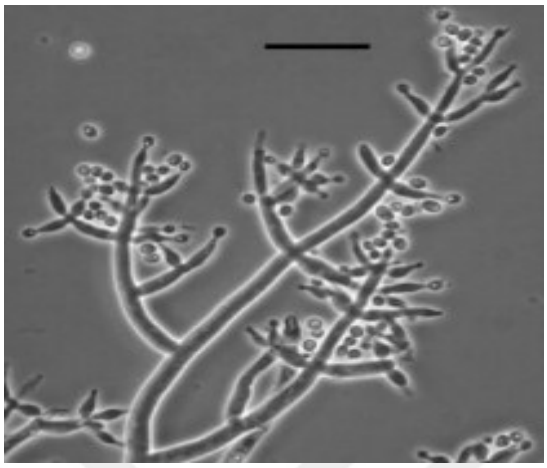


Şekil 1.4. *Trichoderma* spp. fungusunun petride geliştirilmiş tek kolonisinin morfolojik görüntüsü (*Trichoderma harzianum*) (Samuels ve ark., 2006)

Trichoderma fungusu mikroskop altında incelendiğinde uzun dallanmış hifler (ana dal) ve hiflerin dallanmasıyla oluşan kısa gövdeli konidioforların (conidiophore) bulunduğu görülür. Konidioforların ana dalları lateral yan dallar üretir. Konidioforların uç kısmında ise yuvarlak, tek hücreli, küçük konidyum kümeleri dizilmiştir (Rifai, 1969). *Trichoderma* fungusunun mikroskop altındaki görüntüsü Şekil 1.5'de gösterildiği gibidir. Dallanmaların fazla düzeyde olması tanımlamayı ve ölçümü zorlaştırmaktadır.

Trichoderma türleri mikroskop altında sarı ve yeşil renkte görünürler. Konidiyum kümeleri konidioforlardan kolayca ayrılabilmektedir. Böylece mikroskop

altında dağınık bir görüntü gösterebilirler. Bu yüzden örnek alırken sert devinimlerden kaçınılmalıdır (Samuel, 1996).



Şekil 1.5. *Trichoderma* spp. konidioforlarının mikroskobik görüntüsü (Samuels ve ark., 2006)

Trichoderma türleri, Dünya üzerinde geniş bir habitata sahip olup, hemen hemen tüm toprak ve doğada bulunan organik materyallerin üzerinde yaşam alanı bulabilmektedir. Bu fungus topraktan, bitkilerin kök yüzeylerinden, çürüyen kabuk ve lignoselülozik maddelerden izole edilebilmektedir (Papavizas, 1985).

Trichoderma spp. çoğunlukla toprakta serbest yaşayabilen bir fungus olarak bilinmektedir. Fakat *Trichoderma* türlerinin, diğer patojen funguslar gibi fırsatçı veya bitki ile ortak yaşayabilen (symbionts) bir mikroorganizma olabileceğini yapılan çalışmalar göstermektedir (Evans ve ark., 2003).

Bitki fungal hastalıklarıyla biyolojik mücadelede *Trichoderma* fungusunun bitki patojenlerine karşı iyi bir antigonistik yeteneğe sahip olduğu görülmüştür. Dolayısıyla tarım açısından önemi artmıştır. Ayrıca antibiyotik üretimi ile bitkilerin gelişimine yardımcı olduğu ortaya konulmuştur (Aydın, 2015).
Trichoderma spp.'in bazı kullanım alanları;

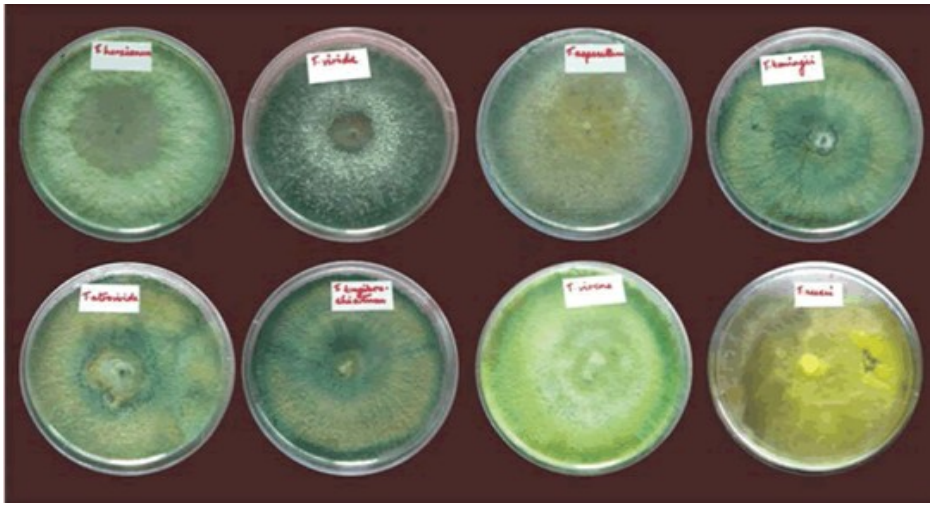
Hiperparazitisizm: *Trichoderma* genusunda bulunan bir çok türün karakteristik özelliklerinin arasında diğer fungusları parazitleme yeteneğinde olması

sayılabilir. Parazit etkiyi enzimatik faaliyetleri sonucunda hücre duvarlarını delerek gerçekleştirirler.

Antibiyoz: Bir canlının başka bir canlının gelişimini metabolitleriyle engellemesi veya canlılığına son vermesidir. Bu metabolitlere antibiyotik denilmektedir. *Trichoderma* spp.'nin ürettiği antibiyotik maddeler patojenlerin istenmeyen aktivitelerini durdurabilir. *Trichoderma* türleri antibiyotik üretiminde oldukça önemli bir fungus olarak görülür (Aydın, 2015).

Rekabet: İki veya daha fazla mikroorganizma aynı maddeye gereksinim duyduğunda bunu yalnızca birinin kullanıp diğerlerini engellemesi durumudur. Rekabet *Trichoderma* türleri için önemlidir. *Trichoderma* türleri toprağa ya da tohuma uygulandığı zaman hızlıca gelişir ve rekabet ortamını yaratarak patojenlere üstünlük sağlar (Harman, 2000).

Enzim üretimi: *Trichoderma* spp.'nın en önemli özelliği selülotik ve hemiselülotik enzimler üretebilmesidir. Bu enzimler atıkların geri dönüşümünde kullanıldığı için son derece önemlidir. *Trichoderma* fungusu ayrıca önemli bir ksilanaz üreticisidir. Ksilanaz uygulaması gıda, hamur ve kağıt endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Kubicek ve ark., 1993). *Trichoderma* türlerinin selülaz üretimi üzerindeki çalışmaları tüm dünyada yaygındır. Mikroorganizmanın enzim üretme yeteneği türe ve çevre şartlarına bağlı olarak değişebilmektedir. *Trichoderma* spp.'den enzim üretimi üzerine yapılan çalışmalarda enzim üretim potansiyeli en fazla bulunan türler; *Trichoderma viride, Trichoderma reseei, Trichoderma harzianum'*dur (Shafique ve ark., 2009). Şekil 1.6 'da selülaz üretme yeteneğine sahip bazı *Trichoderma* türleri verilmiştir (Pandey ve ark., 2015).



Şekil 1.6. Selülaz üretme yeteneğine sahip bazı *trichoderma* spp. türleri (Soldan sağa birinci sıra; *Trichoderma harzianum, Trichoderma viride, Trichoderma asperellum, Trichoderma koningii*; ikinci sıra *Trichoderma atroviride, Trichoderma longibrachiatium, Trichoderma virens, Trichoderma reseei*) (Pandey ve ark., 2015)

Selülaz enzimi, doğada yaygın olarak bulunan selüloz materyalinin degredasyonun sağladığından son derece önemlidir. Dolayısıyla selülaz üretme yeteneği bulunan mikroorganizmalar günümüze değin araştırma konusu olmuştur. Özellikte toprakta hasat sonrası kalan selülotik maddelerin degradasyonundan sorumlu olduğu düşünülen mikroorganizmalar (bakteri ve funguslar) yapılan araştırmalar sonucu iyi bir endüstriyel enzim kaynağı olarak görülmüş ve kullanılmıştır. Bu mikroorganizmaların başında *Bacillus, Aspergillus*, *Trichoderma* gelmektedir.

Trichoderma suşlarının tespiti ve izolasyonu enzim üretimi açısından ekonomik değer taşımaktadır. Doğada yaygın olarak bulunabilmesi, uygun koşullar altında yüksek verimde enzim üretebilmesi ve genetik manipülasyonlara yatkınlığından dolayı *Trichoderma* fungusu enzim üretiminde yaygın olarak tercih edilmektedir.

Bu çalışma ile Şanlıurfa Harran Ovası'nda bulunan tarım alanlarının hasat sonrası selülotik degradasyondan sorumlu mikroorganizmalarca zengin olabileceği düşünülmüştür. Dolayısıyla selülaz enzimi üretme yeteneğinde olan *Trichoderma*

fungusunun izole edilmesi, selülaz üretme yeteneğinde olan suşlarının moleküler, biyokimyasal tanımlamalarının yapılması ve üretilen enzimin karakterizasyonunu ortaya konulması amaçlanmıştır.

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Berghem ve Pettersson (1973), *Trichoderma viride*'nin kültür filtratından selülaz enzimi üretmişlerdir. Yapılan çalışmada 100 g ticari selülaz ile 144 mg'lık mikrobiyal enzimin aktivitesi eş değer görülmüştür. Kromatografik yollarla saflaştırılan enzimin karboksimetilselüloz üzerinde bir aktivitesine rastlanılamamıştır. Üretilen enzimin bir glikoprotein olduğu görülmüş ve kromatografik ölçümle molekül ağırlığı 46 kDa olarak ölçülmüştür. Saflaştırılan enzimin β-1,4-glukan sellobiyohidrolaz enzimi olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca Berghem ve ark. (1975), tarafından bu enzimin karakterizasyonu ortaya konulmuştur. Fungusların selülaz enzimi üretme yetenekleri üzerine Hurst ve ark.'nın (1977), yaptığı bir diğer çalışmada *Aspergillus niger*'den elde edilen ticari bir selülaz preparatından bir selülozik enzim izole edilmiştir. Elde edilen enzimin aktivitesine bakılınca 50 mg mikrobiyal enzimin 100 mg ticari selülaza eş değer olduğu gözlemlenmiştir. İzole edilen enzim poliakrilamid-jel elektroforezinde incelenmiş yalnızca disk jel elektroforezinde bir ana ve iki küçük bant görülmüştür. Protein ile hiçbir karbonhidrat ilişkilendirilmeyip, amino asit analizi ile enzimin asidik ve aromatik amino asitler bakımından zengin olduğu ortaya konulmuştur. Amino asit bileşimi ve poliakrilamid-jel elektroforezinden gelen veriler, enzimin 26 kDa bir molekül ağırlığına sahip olduğunu göstermiştir. Saflaştırılmış enzim, CM-selüloza karşı aktif, fakat aynı koşullar altında sellobiyoz ya da p-nitrofenil 6-D-glukozid'e karşı hiçbir etkinlik göstermemiştir. Enzimin optimum çalışma pH değerinin 3.8-4.0 ve optimum çalışma sıcaklık değerinin 45°C olduğu görülmüştür.

Deschamps ve ark. (1985), lignoselülozik materyalden selülaz üretimini nonaseptik koşullar altında statik ve karıştırma teknikleri ile denemişlerdir. Çalışmada buğday samanı (%80) ve kepek (%20) kullanarak *Trichoderma harzianum* ile fermentasyon yapılmış ve fermentasyon sırasında sıcaklık, pH, nem içeriği, oksijenin fermantasyon üzerindeki etkileri çalışılmıştır. Altmış altı saat reaksiyon süresinde % 74 nem içeriği ve 5.8 pH koşullarında 18 IU filtre kağıdı aktivitesi ve 198 IU endoglukanaz aktivitesi/g ölçülmüştür. Buna benzer olarak Farid

ve Shad (1993), *Trichoderma reesei*'nin geliştirilmiş bazı selülaz mutantlarını kullanarak sulandırılmış mısır ve mikrokristalin gibi selüloz destekleyicileri ile selülaz üretmişlerdir. Bu çalışmada %6 selüloz ve %3.6 mısır sıvısı kullanılarak, 28-30°C'de 10 gün optimum fermantasyon koşulları altında fermantasyon yapılmıştır. Çalışma sonunda *Trichoderma reesei* RutC30 suşunun yüksek seviyelerde selülaz enzimi ürettiği görülmüş, üretilen enzimin Carboxymethyl cellulose (CMC) aktivitesi 54 IU / ml, filtre kağıdı aktivitesi 3.2 IU / ml olarak ölçülmüştür.

Mrudula ve Murugammal (2011), selülaz üretimi ve karakterizayonu üzerinde çalışmışlardır. Yaptıkları çalışmada *Aspergillus niger*'den selülaz üretmek amacıyla fermentasyon için batık (SMF) ve katı hal fermantasyonu (SSF) yöntemlerini kullanmışlardır. Selülazın maksimum üretimi, SSF'de 72 saat ve SMF'de 96 saat inkübasyondan sonra elde edilmiştir. SSF'de kaydedilen CMC ve filtre kağıdı aktiviteleri sırasıyla 8.89U ve 3.56U olduğu görülmüştür. SMF'de olduğu gibi CMC ve filtre kağıdı aktiviteleri, sırasıyla, 3,29U ve 3,2U olarak bulunmuştur. *Aspergillus niger* tarafından selülazın maksimum biyosentezi için en uygun koşulların; pH 6, sıcaklık 30ºC olduğu görülmüştür. Laktoz, pepton gibi katı substratların hem SMF hem de SSF verimliliğini arttırdığı gözlemlenmiştir.

Pirzadah ve ark. (2014), *Actinomycetes ve Trichoderma* spp.'dan Response Surface Methodology (RSM) yöntemiyle selülaz üreterek enzimin karakterizasyonunu yapmışlardır. Selülaz enziminin aktivitesini farklı substratlarda denemişlerdir. Buğday kepeğinin substrat olarak kullanımının CMC substratına oranla daha yüksek aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Belirli bir seviyeden sonra substrat artışının, selülaz üretimi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. Proteinin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile belirlenmiş olup, protein ağırlığı bakımından *Trichoderma viride*'den elde edilen selülazın (31.2kDa) *Trichoderma reesei*'den elde edilen endoglukanaz'a (23-42kDa) benzer olduğu görülmüştür. Selülazın pH 4.8-5.5, 50°C ile 70°C sıcaklık aralığında aktif olduğu bulunmuştur. Buna benzer olarak Maurya ve ark. (2012), *Trichoderma reesei* ile çeşitli lignoselulozik materyaller kullanarak katı faz fermantasyonuyla çalışmalar yapmışlardır. Çalışmada *Trichoderma reesei* NCIM 992 suşu kullanılarak SSF

yöntemiyle üç farklı lignoselülozik materyal substrat olarak kullanılmıştır. Temel fermantasyon parametrelerinin (pH, sıcaklık, nem içeriği, substrat partikül boyutu ve nemlendirme ajanının) enzim üretimi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Maksimum selülaz üretimi (2.63 U ml), substrat olarak buğday kepeği kullanıldığında görülmüştür. Selülaz üretimi için uygun koşulları belirlemek amacıyla yapılan çalışmada başlangıç optimum nem içeriği % 70, optimum çalışma pH'sı 5.0, optimum çalışma sıcaklığı 30 °C, ve en uygun inkübasyon süresi 6 gün olarak belirlenmiştir.

Olsson ve ark. (2003), farklı lignoselülozik karbon kaynağı kullanarak *Trichoderma reesei* Rut C-30'un büyüme ve enzim üretim yeteneğini araştırmışlardır. Çalışmada selüloz, şeker pancarı posası ve alkalinle ekstrakte edilen şeker pancarı küspesi (hemiselüloz, lignin ve pektin kısmen uzaklaştırılmasıyla) veya bunların karışımları karbon kaynakları olarak kullanılmıştır. Fermentasyon ortamından alınan örneklerde endoglukanaz ve endoksilanaz aktivitelerine rastlanırken, buna karşın α-arabinosidazın fermantasyon sırasında geç üretildiği tespit edilmiştir. En yüksek miktarda endoglukanaz, *Trichoderma reesei* Rut C-30 selüloz veya selüloz içeren karışımlar üzerinde yetiştirildiğinde ölçülmüştür. Tüm substratlarda endoksilanaz üretildiği, ancak en yüksek endoksilanaz üretim miktarının selüloz bulunan ortamda olduğu gözlenmiştir. Selülazın farklı substratlarda denenmesi üzerine yapılan bir diğer çalışmada Wen ve ark. (2005), tarafından *Trichoderma reesei* ve *Aspergillus phoenicis* mikroorganizmaların süt gübresi üzerinde büyütülmesi ile bir selülaz üretim süreci gerçekleştirilmiştir. *Trichoderma reesei'*nin β-glukozidaz aktivitesinin çok düşük olduğu görülmüş; daha sonra, *Trichoderma reseei*'nin, beta-glukozidaz seviyesini arttırmak için *Aspergillus phoenicis* ile birlikte fermentasyon ortamına bırakılmıştır. Karışık kültür nispeten daha yüksek düzeyde selülaz (1.54 FPU / mL) ve beta-glukozidaz (0.64 IU / mL) aktivitesi göstermiştir.

Castro ve ark. (2010), *Trichoderma harzianum* IOC-3844 suşunu kullanarak ön muamele uygulanmış şeker kamışı melası kullanarak ortamdaki selülaz aktivitesini incelemişlerdir. Bu çalışmada 72 saatlik işlem sonrasında yüksek endoglukanaz aktivitesi (6,358 $U \cdot L^{-1}$) ve daha sonra β-glukozidaz ve filtre kağıdı aktivitesi 742 ve

445 $U \cdot L^{-1}$ tespit edilmiştir. Ham enzim ekstraktı, selüloz hidrolizinde, 50°C' ye kadar yüksek termal kararlılık göstermiştir. Ayrıca ksilanaz aktivitesi olduğu görülmüş olmasının yanısıra azokazine karşı proteolitik aktivite bulunmadığı sonucuna varılmıştır. Çalışma sonucunda *Trichoderma harzianum*'un lignoselülozik materyallerin sakkarifikasyonu için uygun olduğu görülmüştür. Selülaz enzimiyle farklı substratların denendiği çalışmaları takiben Sateesh ve ark. da (2012), pirinç samanlarını kullanarak *Trichoderma reesei* NCIM 992'den selülaz enzimi üretimi ve bunun da biyoetanol üretimi için kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Mangalanayaki ve Madhavan **(**2015), *Trichoderma harzianum ve Fusarium oxysporum*'dan elde edilen enzimlerin aktivitelerini pamuk çekirdeği, mısır koçanı ve pirinç kabuğu gibi çeşitli selülotik substrat varlığında ölçmüşlerdir. Bu çalışmada en yüksek selülotik enzim aktivitesi *Trichoderma harzianum* ve *Fusarium oxysporum* tarafından 144 saat sonra pamuk tohumu üzerinde (0.40 mg / dak / ml ve 0.030 mg / dak / ml) gözlemlenmiştir. Mısır koçanında enzim aktivitesini 120 saatte 0,32 mg / dak / ml ve 96 saatte 0.0232 mg / dak / ml, pirinç kepeğinde ise 120 saatte 0,024 mg / dak / ml ve 0.0242 mg / dak / ml olarak ölçülmüştür.

Kumar ve arkadaşları (2011), birçok bitki patojenine karşı parazit etkisi olan *Trichoderma* spp. araştırmışlardır. Yapılan çalışmada Güney Andaman'ın farklı yerlerinden *Trichoderma* spp.'dan 12 örnek izole edilmiştir. Suşların patojenlere karşı kültürel, morfolojik ve antagonistik faaliyetleri karakterize edilmiştir. Bu izolatların sekans analizleri sonucunda 7 farklı tür tespit edilmiştir. İzolatlar test patojenlerine karşı diferansiyel reaksiyon modelleri ortaya koymuştur ve birçoğunun patojenlerin misel büyümesinin yüzde inhibisyonunda etkili olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca büyüme ortamında tüm *Trichoderma* izolatlarının önemli miktarda kitinaz ve β-l,3-glukanaz aktiviteleri kaydedilmiştir. *Trichoderma viride*'nin fermentasyon ortamından alınan kültürde yüksek kitinaz aktivitesi görülürken , *Trichoderma harzianum*'dan alınan kültürde yüksek β-l,3-glukanaz aktivitesi tespit edilmiştir.

Son yıllarda selülaz enzimi üzerine yapılan çalışmalar daha çok lignoselulozik maddelerden (atıklardan) etanol (biyoyakıt) üretimi üzerinedir.

Saravanakumar ve Kathiresan (2013), lignoselülozik talaştan fermentasyon yoluyla biyoetanol üretmeyi amaçlamışlardır. Lignoselülozik atık maddeler asit hidroliz yoluyla monoşekere dönüştürülmüş ve *Trichoderma* spp.'dan üretilen selülaz enzimi ile muamele edilmiştir. Glikozun dönüşümünü arttırmak için, deneysel koşullar istatistiksel olarak optimize edilmiştir. Substrat fermentasyon ortamında 36.5°C'lik sıcaklık, 102 saatlik inkübasyon süresi ve 45.14 ml'lik enzimle muamele edilmiş 330 dev / dakikalık karıştırma altında % 85.6'lık biyoetanol üretimi sağlanmıştır. Bu çalışma ile *Trichoderma* spp. ve *Saccharomyces cerevisiae* fermantasyonunu kullanarak maksimum biyoetanol üretimi sağlanmıştır.

Norsalwani (2016), lignoselülozik materyalden *Trichoderma* spp. ile selülaz üretimi amaçlamıştır. Çalışmada selülaz üretimi için koşullar optimize edilmiş ve en yüksek selülaz aktivitesi için optimum koşullar pH 5.0, inkübasyon sıcaklığı 30°C, inokülasyon konsantrasyonu 2 x 10^8 kob/ml^{-1} ve substrat partikül boyutu 500 μm altında belirlenmiştir. Ham palmiye çekirdeği pastası (PÇP), yağdan arındırılmış PÇP ve bitkisel atık (BA) ile fermantasyon yapılmış ve maksimum aktivite sırasıyla 6.9 FPU g^{-1}, 16.1 FPU g^{-1} ve 50.1 FPU g^{-1} olarak elde edilmiştir. Yağsız PÇP'nın substrat olarak bulunduğu fermentasyon ortamında üretilen selülaz aktivitesinin ham PÇP'nın substrat olarak kullanıldığı selülaz aktivitesine göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Katı hal fermantasyonu yoluyla enzim üretimine bakıldığında, *Trichoderma* spp. tarafından üretilen selülaz etkinliğinin PÇP'sında yaklaşık bir kat yüksek olduğu ortaya koyulmuştur. Bu çalışma ile endüstriyel bir atık olan palm yağı küspesinin selülaz üretimi için mikroorganizmalar tarafından kullanılabilecek zengin bir selülotik materyal olduğu görülmüştür. Böylece çevre kirliliği yaratma ihtimali olan atıkların katma değerli ürün eldesi amacıyla kullanılabilir olduğu belirlenmiştir.

Wuczkowski ve ark. (2003), Viyana'nın güneydoğusundaki Tuna Nehri kıyısındaki bir ormanlık alanda *Trichoderma* spp.'nın bulunabilirliğini ve genetik çeşitliliğini araştırmışlardır. Bu bölgeden toprak örnekleri alınmıştır ve 46 suş izole edilmiştir. Elde edilen izolatlar rDNA üzerinde bulunan ITS1-ITS2 (Internal Transcribed) gen bölgesine göre moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. Sonuçta 21 suş *Trichoderma harzianum*, 3 suş *Trichoderma rossicum*, 4 suş *Trichoderma*

cerinum, 2 suş *Trichoderma hamatum* ve 1'er suş da *Trichoderma atrovirid* ve *Trichoderma koningii* olarak tanımlanmıştır. Dört suş ITS1 ve ITS2'ye göre bilinen türlerle uyumlu olmayan tef1 geninin sekans türlerini vermiştir. Bu suşlar *Trichoderma* spp.'nın iki yeni taksonunu temsil ettiği kanısına varılmıştır. Hassan ve ark. (2014) *Trichoderma* spp.'nın tanımlaması üzerine çalışmışlardır. Bu çalışmada bitki kök bölgesinden alınan topraktan 12 *Trichoderma* spp. izole edilmiştir. Bu izolatlar morfolojik ve moleküler karakterizasyon ile karakterize edilmiş ve tanımlanmışlardır. Moleküler yaklaşımda, PCR ile rDNA bölgeleri çoğaltılmış tüm *Trichoderma* izolatlarının ITS 1 ve ITS 2 bölgesi dizileri BLAST'lanarak, NBCI gen bankasındaki benzer türler bakılmıştır. Suşların *Trichoderma harzianum* dizilerine % 98 ile % 100 benzerlik gösterdiği görülmüştür. Genetik tanımlama ile ilgili başka bir çalışmada da Gherbawy ve ark. **(**2014) Taif topraklarında bulunan *Trichoderma* spp. suşlarını tanımlamak üzere çalışmışlardır. Bu çalışmada Taif topraklarının farklı bölgelerinden toprak örnekleri alınmıştır. Toplanan örneklerden 90 izolat *Trichoderma* (Teleomorph: *Hypocrea*) ve 1 izolat *Gliocladium viride* (Tel. *Hypocrea lutea*) olarak tanımlanmıştır. Tanımlama için 18S ribozomal RNA(ITS1), 5.8S ribozomal RNA, ITS2 ve 28S ribozomal RNA genini içeren nükleer rDNA bölgeleri kullanılarak DNA çoğaltılmıştır. Sonuçta 78 izolat *Trichoderma harzianum* (Tel. *Hypocrea lixii*), iki izolat *Trichoderma longibrachiatum* (Tel. *orientalis*) ve bir izolat da *Gliocladium viride* (Tel. *Hypocrea lutea*) olarak tanımlanmıştır. Kalan 10 izolat filogenetik ağaca göre üç yeni tür olarak kabul edilmiştir. Bu çalışma sırasında *Trichoderma* spp. türlerinin yüksek derecede değişkenlik gösterdiği görülmüştür.

Zeng ve ark. (2016), hasat sonrası toprakta bulunan selülotik atıkları parçalayabilen yeni bir *Trichoderma* suşunun izolasyonu ve tanımlanması üzerine çalışmışlardır. Bu çalışmada *Trichoderma virens* ZY-01 adlı yeni bir suş, samanın zengin olduğu ve ayrıştığı bir tarla bölgesinden izole edilmiştir ve selülaz aktivitesi selüloz içeren kongo red plaka yöntemiyle test etmiştir. Suş, ZL 201210295819.6 numaralı patentle lisanslanmıştır. Optimize edilmemiş fermantasyon koşullarında *Trichoderma virens* ZY-01'in selülaz aktivitesinin 7.4 IU / ml'ye kadar ulaştığı görülmüştür. Selülaz *Trichoderma virens* kültür besiyerinden ayrılmış, $(NH_4)_2SO_4$

ile fraksiyonel çökeltme, anyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırma işleminden sonra selülazın CMC üzerindeki spesifik aktivitesinin 0.88 IU / mg'dan 31.5 IU / mg'a yükseldiği görülmüştür. Ayrıca, selülazın enzimatik özellikleri araştırılmıştır. Enzimin 50°C sıcaklıkta ve 5.0 pH değerinde iyi bir termal kararlılığa sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca Zn^{2+}, Ca^{2+} ve Mn^{2+}'nin enzim aktivitesini önemli ölçüde yükselttiğini, Cu^{2+} ve Co^{2+} enzimatik aktiviteyi engellediği gözlemlenmiştir. Bu çalışma ile selülaz üretimi için yeni ve verimli bir *Trichoderma virens* suşu tanımlanmıştır.

Thomas ve Zeikus (1981) yapmış oldukları çalışmada *Clostridium thermocellum* LQRI ve *Trichoderma reesei* QM9414'den selülaz enzimi üretimi üzerine çalışmışlardır. Enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisini araştırmışlardır. Ag, Hg iyonlarının 20 μM'dan fazlasının *Clostridium thermocellum* için inhibitör etkiye sahipken *Trichoderma reesei* için bu etkiye sahip olmadığı, Ca, Mg, Mn iyonlarının ise 10mM'dan fazlasının *Trichoderma reesei* için inhibitör etkiye sahipken C*lostridium thermocellum* için etkili olmadığı ortaya koyulmuştur. Metal iyonlarından Cu ve Zn'nin ise 1mM'dan fazlasının her iki mikroorganizma için olumsuz yönde etki uyguladığı görülmüştür.

Libardi ve ark. (2017) büyük ölçüde ve sürekli olarak üretilen evsel atıksuyunun değerlendirilmesi üzerine çalışmışlardır. Bu çalışmada evsel atıksuyunun selülaz üretimi için bir kültür temel aracı olarak kullanılmasını amaçlamışlardır. *Trichoderma harzianum* HBA03 suşunun fermantasyonu sonucu FPase (5.4 U / mL) ve CMCase (8.2 U / mL) gibi yüksek aktiviteler görülmüştür. Selülaz üretimi için mikrokristalin selüloz azot kaynağı olarak ise pepton seçilmiştir. Evsel atık suyunun kültür ortamı olarak kullanılması, FPase'in 1.41 ve CMCase 1.14 kat artmasına neden olmuştur. Sonuçlar, evsel atık suyun selülaz üretimi için kullanılmasının fizibilitesini ortaya koymakta ve böylece atık suyun çevreye olan etkisini önemli ölçüde azaltmak için sürdürülebilir bir sürecin geliştirilmesine katkı sağlamaktadır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Toprak Örneklerinin Toplanması

Şanlıurfa Harran Ovası mevkisinden 37° 0' 0" enlem, 38° 0' 0" boylam konumlu hasat sonrası mısır tarlasından Ocak ayında, hasat sonrası pamuk tarlasından Ocak ayında, hasat sonrası buğday tarlasından Haziran ayında toprak örnekleri alınmıştır. Toprak örnekleri alınırken mikroorganizmanın yaşam koşulları göz önünde bulundurulmuş olup toprağın nemli olmasına dikkat edilerek bitki kalıntılarının bol bulunduğu kısımdan ve bitkinin kök civarından olmak üzere üçer yerden toprak örnekleri alınmıştır.

3.2. Toprak Örneklerinin Laboratuvar Koşullarında Depolanması

Toprak örnekleri mikroorganizmaların izolasyonu ve tanımlaması çalışmalarında kullanılmak üzere analizler yapılıncaya kadar -20 ºC'de bekletilmişlerdir.

3.3. *Trichoderma* spp. İzolasyonu

Toprak örneklerinden 10'ar gr tartılıp üzerine 90 ml dilüsyon sıvısı eklenerek homojenize hale getirilmiştir. Hazırlanan dilüsyondan 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3},10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} oranlarında seyreltmeler yapılmıştır. Hazırlanan dilüsyonlar yayma ekim yöntemiyle Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) besiyeri içeren petrilere paralelli olarak ekilmiştir. Petriler 28 ºC'de 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. Üretilen mikrorganizmalardan *Trichoderma* spp. olma ihtimali olanlar tek koloni düşürmek amacıyla Potato Dextrose Agar (PDA) besiyerine saf koloni elde edilene kadar seri pasajlar yapılmıştır. Üretilen tek koloniler daha sonra kullanılmak üzere PDA yatık agarda +4 ºC'de muhafaza edilmiştir (Zeng ve ark., 2016).

3.4. *Trichoderma* spp.'in Morfolojik Tanımlanması

Trichoderma spp. suşlarının morfolojik tanımlanması: PDA besiyerinde oluşan kolonilerin zamana bağımlı değişimleri, koloninin yapısı, rengi, mikroorganizmanın oluşturduğu spor yapısına göre yapılmıştır (Kumar ve ark., 2012).

3.5. *Trichoderma* spp.'in Mikroskobik Tanımlanması

Trichoderma spp. suşlarının mikroskobik tanımlanması amacıyla kolonilerden küf sporları farklı bölgelerinden özeyle alınıp lamel üzerine yayılmıştır. Örnekler ışık mikroskobu (Motic B series, Japan) altında incelenerek spor yapılarına göre tanımlamaları yapılmıştır (Kumar ve ark., 2012).

3.6. *Trichoderma* spp.'in Selülaz Üretme Yeteneklerinin CMC Katı Besiyerinde Tanımlanması

Elde edilen tek koloniler %1'lik CMC agar katı besiyerine ekilmiş ve 30 ºC'de 3 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda koloniler % 0.1'lik 5 ml kongo red ile boyanıp 30 dk bekletilmiştir. Koloniler distile suyla yıkandıktan sonra 5 dk boyunca 5 ml NaCl'de bekletilmiş ve tekrar distile suyla yıkanmıştır. Daha sonra koloni %5'lik asetik asitte 5 dk bekletilmiş ve kolonilerin dış çeperinde renk açılması durumu gözlemlenmiştir. Bu işlemler sonucunda zon oluşturan koloniler selülaz pozitif, zon oluşturmayanlar ise selülaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Zeng ve ark., 2016). CMC agar besiyerinin bileşimi Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. CMC (Carboxymethylcellulose) agar besiyeri bileşimi

Bileşimi	g/L
KH_2PO_4	1
$NaNO_3$	3
KCl	0.5
$MgSO_4.7H_2O$	0.5
$FeSO_4.7H_2O$	0.01
CMCNa	15
Agar	15

3.7. *Trichoderma* spp.'in Genetik Tanımlanması

Trichoderma fungusunun genetik tanımlaması için öncelikle DNA çoğaltılımıştır ve saflaştırılmıştır. Daha sonra Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PZR) gerçekleştirilmiştir ve biyoinformatik analizler yapılmıştır.

3.7.1. *Trichoderma* spp.'in çoğaltılması

Trichoderma spp.'den DNA saflaştırılması amacıyla mikroorganizmalar arzu ettikleri uygun üreme ve gelişme koşullarında çoğaltılmışlardır. Bu amaçla PDA besiyerinde tek koloni olarak büyütülen *Trichoderma* spp. suşları özeyle PD broth besiyerine ekilmiştir. Kültürler 30 ºC'de 3 gün boyunca 150 rpm'de çalkalamalı inkübatörde geliştirilmişlerdir.

3.7.2. DNA saflaştırması

İnkübasyon sonrasında *Trichoderma* spp. sporları kaba filtreyle süzülerek oda koşullarında 5 dk kurumaya bırakılmıştır. Elde edilen hücreler 3'er defa tekrarlanmak üzere sıvı azotla havanda dövülerek parçalanmışlardır. Sıvı azottan geçirilen kültürler 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine 2'şer g olacak şekilde konulmuştur. Sıvı azotla parçalanmış hücrelere 500 µl TE tamponu eklenmiştir. Tüplerdeki sıvı kısım boşaltılarak üzerine 300 µl TNE eklenmiştir. Miseller steril kürdan yardımıyla parçalanmıştır ve üzerine 150 µl 3M pH 5.2 sodyum asetat tamponu eklenerek -20 ºC'de 30 dk süresince bekletilmiştir. Tüpler 10000 rpm'de 10

dk boyunca santrifüj edilmişlerdir. Santrifüj sonrasında süpernatant başka bir steril mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Süpernatant ile eşit hacimde isopropanol eklenerek 10 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. DNA 12000 rpm'de 10 dk süresince santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Pelet %70 etanolle yıkandıktan sonra 5 dk oda sıcaklığında kurutulmuştur. Daha sonra pelet 50 µl TE buffer ile yeniden sulandırılmıştır. Saflaştırılan DNA'lar -20 ºC'de depolanmıştır (Kanangara, 2016). DNA saflaştırmada kullanılan çözeltiler EK7'de verilmiştir.

3.7.3. Polimeraz zincir reaksiyonları ve agaroz jel elektroforezi

Ribozomal DNA'nın internal gen bölgeleri olan ITS DNA sekansının ITS1-5.8-ITS2 dizilimi ITS1-ITS4 primerleri kullanılarak amplifiye edilmiştir. Kullanılan primerler Çizelge 3.2'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.2. Dizileme analizi için kullanılan primerler

Primer	Dizilim(5'-3')	Uzunluk(bç)	Tm(ºC)
ITS1	TCTGTAGGTGAACCTGCGG	19	53
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	20	50
Tr_RIF	AGTCACCCAACGTCATCAACGC	22	70.4
Tr_RIR	GCTCACGCTCGGCCTTGAGCTTGT	24	76.8
NS3	GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC	21	73.6
NS4	CTTCCGTCAATTCCTTTAAG	20	57.9

Trichoderma izolatlarından elde edilen DNA'lardan 1 µl'si 24 µl Çizelge 3.3'de belirtilen PZR reaksiyon karışımına ilave edilerek Çizelge 3.4'de verilen PZR koşullarında çoğaltılmıştır.

Çizelge 3.3. DNA bölgesinin çoğaltılması için kullanılan PZR karışımı

PZR karışımı	Miktar (µL)
PCR Buffer	2.5
$MgCl_2$	1.5
dNTP mix	1.25
Primer1 (20 pmol/ µL)	1
Primer2 (20 pmol/ µL)	1
DNA Taq polimeraz	0.25
DNA	1
ddH_2O	16.5
Toplam	25

Çizelge 3.4. DNA bölgesinin çoğaltılması için kullanılan PZR şartları

PZR basamağı	Sıcaklık(ºC)	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyonu	94	2dk	1
Denatürasyon	94	1dk	
Bağlanma	55	1dk	30
Uzama	72	1dk	
Son uzama	72	5dk	-
Bekleme	4	∞	

Polimeraz Zincir Reaksiyonu tamamlanan DNA örnekleri ve 2-log DNA Ladder 1kb Quick-Load DNA markırı ile beraber %1.2 lik agaroz jel kuyucuklarına yüklenmiştir. Agaroz jeli 50V, 50dk 1X TBE buffer kullanılarak yürütülmüştür. Yürütülmesi tamamlanan jel görüntüleme cihazında (Bioimagine System, mibnibis pro; Israel) analiz edilmiş ve fotoğraflanmıştır.

3.7.4. PZR ürünlerinin saflaştırılması

PZR ürünleri illustra^{TM} GFX^{TM} PCR DNA and Band Purification Kit (GE Healtcare, USA) kullanılarak saflaştırılmış ve örnekler dizileme analizi için İontek firmasına gönderilmiştir.

3.7.5. Bioinformatik analizler

Gen dizilimleri SnapGene Viewer programıyla düzenlenmiştir ve National Center for Biotechonology Information (NCBI) Genbank'ta benzer genler araştırılmıştır. BLAST dizilim algoritması sonucunda bulunan yüzde benzerliklerine bakılmıştır. Suşların akrabalık ilişkisi MEGA7.0.26 programı kullanılarak belirlenmiş ve akabinde filogenetik ağaç çizilmiştir.

3.8. *Trichoderma* spp.'den Fermentasyon Ortamında Selülaz Üretimi

PDA besiyerinde büyütülen tek koloniler 10^6 kob/ml olacak şekilde fermentasyon sıvı besiyerine ekilmiş olup 28ºC'de 8 gün süresince 150 rpm'de çalkalamalı inkübasyona bırakılmıştır. Fermantasyon esnasında inokülantlardan 5.gün, 6.gün, 7.gün ve 8. günde örnek alınarak santrifüjlenmiş, zamana göre mikrorganizmanın selülaz üretim yeteneğini saptamak amacıyla selülaz aktivitesi tayini yapılmıştır.

Üretim yeteneği için en verimli gün belirlendikten sonra yeniden fermantasyon tekrarlanmıştır. Kültürler santrifüj yoluyla çöktürülmüş, enzim içeren süpernatant daha sonra kullanılmak üzere +4ºC'de saklanmıştır (Bozdeveci, 2014).
Fermentasyon Broth besiyerinin bileşimi Çizelge 3.5'de verilmiştir.

Çizelge 3.5. Fermantasyon sıvı besiyerinin bileşimi

Bileşimi	g/L
Yeast extract	1
CMCNa	5
NaCl	20
K_2HPO_4	0.5
$MgSO_4.7H_2O$	0.5

3.9. SDS-PAGE Elektroforezi

Fermentasyon ortamından elde edilen süpernatantların protein profillerinin incelenmesi SDS-PAGE kullanılarak yapılmıştır (Laemmli, 1976). Proteinlerin büyüklükleri moleküler ağırlıkları bilinen standartlar vasıtasıyla belirlenmiştir. Elektroforez sonrasında jeller Coomassie Brilliant Blue boyasıyla boyanarak görüntülenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir (Maniatis ve Sambrook, 1989). SDS-PAGE analizi için kullanılan çözeltiler EK7'de verilmiştir.

3.9.1. SDS-PAGE jellerinin hazırlanması

Hazırlanan SDS- PAGE jellerinin içeriği Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.6. SDS-PAGE jellerinin içeriği

	%12 ayırma (resolving) jeli	%5 Yükleme (stacking) jeli
Su	6.6	4.1
%30 akrilamid çözeltisi	8.0	1.0
Tris-Cl (1.5M, pH; 8.8)	5.0	0.75
SDS (%10)	0.2	0.06
Amonyum persülfat (%10)	0.2	0.06
TEMED	0.008	0.006
Toplam	20mL	6mL

Yukarıdaki protokole göre ilk olarak ayırma jeli hazırlanmış, cam plaka arasına dökülmüş ve jelin katılaşması beklenmiştir. Daha sonra yükleme jeli hazırlanmış, ayırma jelinin üzerine dökülmüş ve taraklar yerleştirilmiştir.

3.9.2. Örneklerin hazırlanması ve SDS-PAGE elektroforezi

Eşit miktardaki (20 µg) protein örneği ile 2X örnek uygulama tamponu mikrosantrifüj tüp içerisinde karıştırılmışlardır. Hazırlanan tüpler 3 dk. kaynar su banyosunda bekletilmişlerdir. Örnek su banyosundan alındıktan sonra buz içine konulmuştur. Tarak yavaşça kaldırıldıktan sonra kuyucuklar saf su ile yıkanmıştır. Örnekler birinci kuyucuğa protein standardı (Biolabs P7706S; 11-190kDa) olmak

üzere sırayla kuyucuklara yüklenmiştir. Protein jelleri Tris-glisin tamponu (1X) içerisinde 125V'da yürütülmüştür.

Yürütülmesi tamamlanan jeller cam plakalardan çıkartılmış ve boyama çözeltisine bırakılmıştır. Jeller bir gece boya çözeltisinde bekletilmiştir. Daha sonra yıkama çözeltisi içinde bantlar görününceye kadar bekletilmiştir. Jelin fotoğrafı jel görüntüleme cihazı kullanılarak (Bioimagine System, minibis pro; Israel) çekilmiştir.

3.10. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Trichoderma spp.'den elde edilen selülaz enzimi aktivitesini belirlemek amacıyla DNS (Dinitrosalisilik asit) metodu kullanılmıştır (Ghose, 1987). Sitrat tamponu ile hazırlanmış %2'lik 500 µl CMC sıvı substrata 500 µl enzim eklenmiştir. Enzim ve substrat 40°C'de 1 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra enzim-substrata karışımına 500 µl DNS reaktifi eklenmiş ve 5 dk kaynatılmıştır. Renk değişimini ölçmek amacıyla spektrofotometrede 560 nm dalga boyunda optik yoğunlukları okunmuştur. Enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler EK7'de verilmiştir.

Selülaz enzimi CMC 'ı parçalayarak glukoz açığa çıkarır. Bu nedenle glukozun farklı konsantrasyonlarına karşı absorbans değerleri ölçülmüştür (Ghose T.K, 1987). Oluşturulan absorbans glukoz konsantrasyonu grafiğine göre doğrunun eğimi hesaplanmış ve lineer doğrunun denklemi oluşturulmuştur. Doğrunun denklemi y=0,0015x-0,0259, regrasyon katsayısı R^2=0,9793 olarak hesaplanmıştır. Glukoz standart grafiği EK6'da verilmiştir. Oluşan denklem kullanılarak selülaz aktivitesi hesaplanmıştır (Ijaz ve ark., 2011).

Selülaz aktivitesi için kullanılan denklem;

Enzim Aktivitesi = (Absorbans x Regrasyon denklemi) / İnkübasyon süresi (3.1).

3.10.1. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklık etkisinin belirlenmesi

Selülaz enziminin optimum çalışma sıcaklığını belirlemek için enzim 30ºC, 40ºC, 50ºC, 60°C sıcaklıklarda 1 saat inkübasyona bırakılmış olup arkasından DNS reaktifi 500 µl eklenerek kaynatılmıştır. Daha sonra spektrofotometrede 560 nm dalga boyunda okunmuş ve selülaz aktiviteleri hesaplanmıştır.

3.10.2. Enzim aktivitesi üzerine pH etkisinin belirlenmesi

Selülaz enziminin optimum çalışma pH'sını belirlemek için enzim çözeltisi 3, 5, 7, 9, 11 pH değerlerinde 1 saat süresince inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında örneklerin üzerine 500 µl DNS reaktifi eklenerek kaynamaya alınmıştır. Örnekler spektrofotometrede 560 nm dalga boyunda okunarak selülaz aktiviteleri hesaplanmıştır.

3.10.3. Enzim aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi

Selülaz enziminin optimum çalışma süresini belirlemek için enzim çözeltisi 30 dk, 1 saat, 2 saat ve 4 saat sürelerinde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda substrat enzim karışımına 500 µl DNS reaktifi eklenerek 5 dk kaynatılmıştır. Örnekler spektrofotometrede 560 nm dalga boyunda okunmuş ve selülaz aktiviteleri hesaplanmıştır.

3.10.4. Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonu etkisinin belirlenmesi

Selülaz enziminin en iyi etki gösterebileceği substrat konsantrasyonunu belirlemek için %1'lik, %1.5'lik, %2'lik, %2.5'lik CMC substratı hazırlanmıştır. Enzim hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki substratlarda 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası enzim karışımına 500 µl DNS reaktifi eklenerek 5 dk kaynatılmıştır. Örnekler spektrofotometrede 560 nm dalga boyunda okunmuş ve selülaz aktiviteleri hesaplanmıştır.

3.11. İzole Edilen Enzimin Aktivitesinin Ticari Enzimle Karşılaştırılması

Trichoderma spp.'den fermentasyon ortamında üretilen selülaz enziminin aktivitesi ERBSLÖH firmasından (Germany) temin edilen Vegazym HC ticari enzimi ile karşılaştırılmıştır. Enzim örnekleri ve ticari enzim aynı koşullarda %2 CMC besiyeri ile 40°C 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Örneklere DNS reaktifi eklenerek 5 dk kaynatılmış ve sonrasında 560 nm'de optik yoğunlukları ölçülmüştür.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Toprak Örneklerinin Toplanması

Bu çalışmada kullanılan toprak örnekleri Harran Ovası Göktepe mevkisinde bulunan mısır, pamuk, buğday tarlalarından hasat sonrası dönemlerde toplanmıştır. Sözü edilen bölgelerin koordinatları bölüm 3.1'de belirtilmiştir. Toprak örnekleri alınırken mikrobiyolojik analizler için numune alım kurallarına dikkat edilmiştir. Ayrıca aranılan fungusun habitatı göz önünde bulundurularak toprağın özelliğine, nem oranına, mikroorganizmanın bulunabileceği derinliğe dikkat edilerek numuneler toplanmıştır. Örnekler uygun şartlar altında hassasiyet gösterilerek laboratuvara getirilmiş ve daha sonra kullanılmak üzere -20°C'de depolanmıştır. Örneklerin alındığı toprak alanları Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. Harran Ovası, Göktepe mevkisi mısır, pamuk ve buğday tarlalarının hasat sonrası görüntüsü (Soldan sağa mısır, pamuk, buğday tarlası)

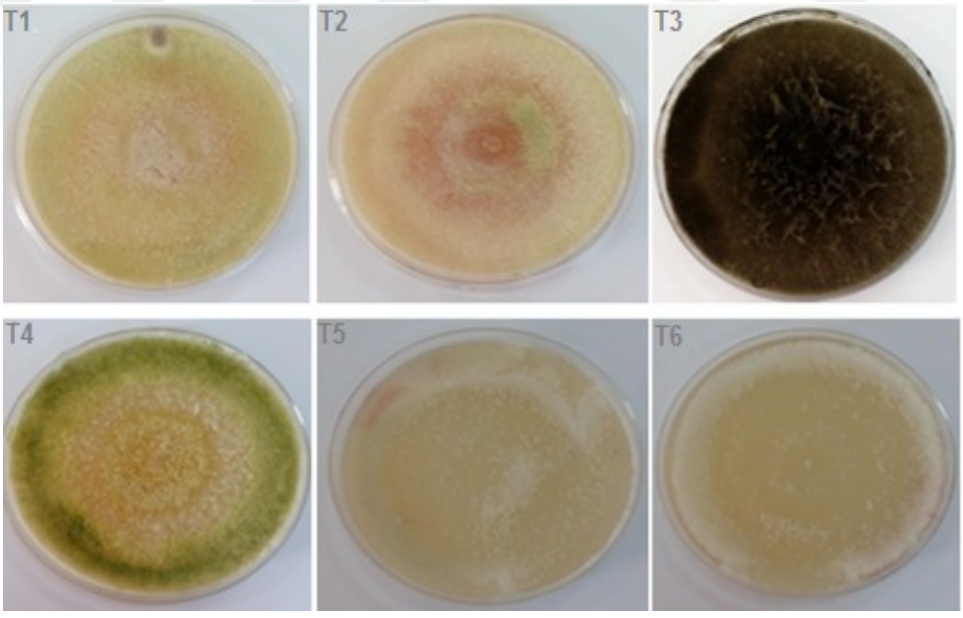
4.2. *Trichoderma* spp.'in İzolasyonu ve Tanımlanması

Trichoderma küflerinin izolasyonunun yapılabilmesi için toprak örnekleri 10^{-1} - 10^{-6} oranlarında seyreltilerek DBRC agara yayma ekim yöntemiyle ekilmiştir. Petriler 30°C'de 5 gün süresince inkübe edilmiş ve küf ve maya kolonilerinin gelişimleri gözlemlenmiştir. Kolonilerin ilk gelişimleri morfolojik olarak incelenmiş

ve *Trichoderma* spp. benzeyen koloniler seçilmiştir. Seçilen koloniler tek koloni üretmek üzere steril öze yardımıyla PDA besiyerine aktarılmıştır. PDA'da aynı inkübasyon koşulları uygulanarak tek koloniler üretilmiştir.

4.2.1. *Trichoderma* spp.'in morfolojik tanımlanması

Trichoderma spp. kolonilerinin üçüncü günden sonra gelişmeye başladığı gözlemlenmiştir ve koloniler beşinci günde hifli yapılarını kazanmıştır. Kolonilerde üçüncü günde beyaz misel görüntüsü oluşmuş daha sonraki günlerde ise miseller sıkılaşarak yer yer yeşil renk gözlemlenmiştir. *Trichoderma* spp. kolonileri halka şeklinde gelişim göstermiştir, beşinci günde ise koloniler besiyeri yüzeyini tamamen kaplamıştır. Gelişim gösteren mikroorganizmalar mısır ve buğday tarlalarından alınan toprak örneklerine aittir. Örnekler T1 (mısır), T2 (mısır), T3 (mısır), T4 (buğday), T5 (mısır) ve T6 (mısır) olarak isimlendirilmiştir. Morfolojik olarak tanımlanan *Trichoderma* izolatlarına ait PDA üzerindeki gelişim Şekil 4.2'de verilmiştir.



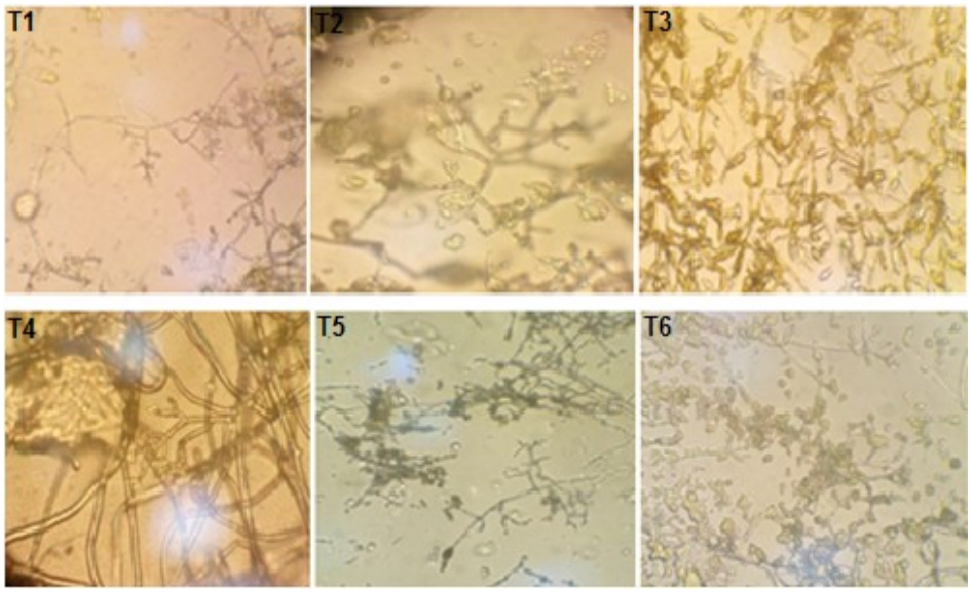
Şekil 4.2. PDA besiyerinde tek koloni halinde büyütülen *Trichoderma* T1, T2, T3, T4, T5, T6 izolatlarının morfolojik görüntüsü

Şekil 4.2'de *Trichoderma* izolatlarının PDA üzerinde beşinci gün sonundaki görünümleri verilmiştir. T1, T2, T3, T5, T6 izolatları mısır tarlasından alınan, T4 izolatı ise buğday tarlasından alınan toprak örneğine aittir. T1, T2, T4, T5, T6 kolonilerinin gelişim özellikleri ve morfolojik görüntüsünden *Trichoderma* suşlarına benzerlik gösterdiği, T3'ün ise gelişim özelliklerinin benzediği fakat hiflenme sürecinin *Trichoderma* spp. suşlarına göre daha hızlı olduğu, morfolojik görüntüsünde halkalar oluşturmadığı renginin ise daha koyu yeşil renkte olduğu gözlemlenmiştir.

4.2.2. *Trichoderma* spp.'in mikroskobik tanımlanması

Tek koloni olarak izole edilen *Trichoderma* spp. izolatlarının petrilerinden (Şekil 4.2) steril öze yardımıyla küf sporları alınmıştır ve bir damla su yardımıyla lamelde yayılması sağlanmıştır. Lamın üzeri lamelle kapatılarak ışık mikroskobunda 40X objektif altında sporlar incelenmiştir.

Şekil 4.3'de *Trichoderma* spp izolatlarının beşinci gün sonundaki mikroskobik görüntüleri verilmiştir.

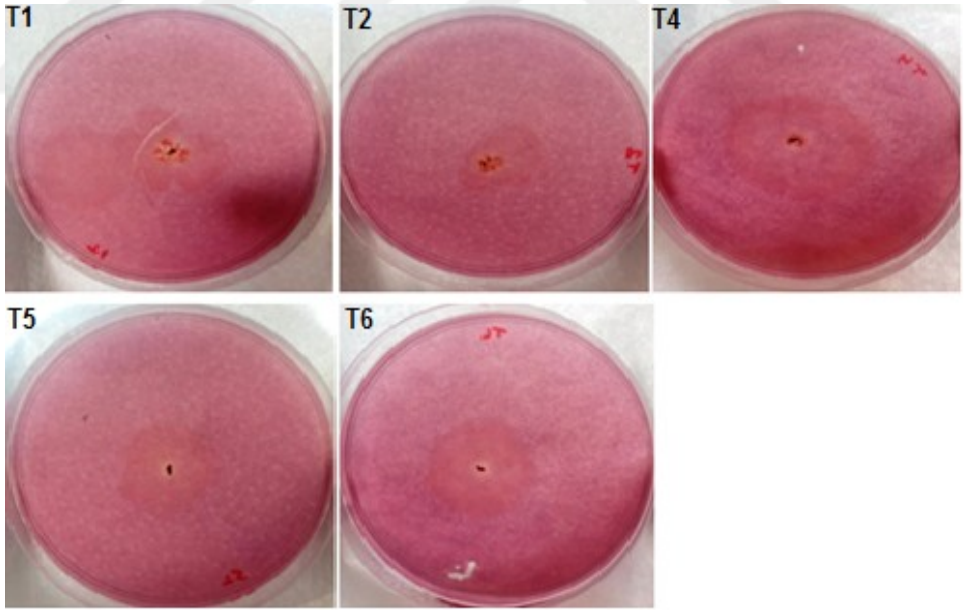


Şekil 4.3. PDA besiyerinde tek koloni halinde büyütülen *Trichoderma* T1, T2, T3, T4, T5, T6 izolatlarının mikroskobik görüntüsü

T1, T2, T4, T5, T6 kolonilerinden alınan örneklerin mikroskobik görüntüsüne bakıldığında konidoforların ana dalları yan dal oluşturmuş dalların ucunda ise sporlar gözlemlenmiştir. Kaydedilen görüntünün *Trichoderma* spp.'nin tipik mikroskoskobik görüntüsü olduğu gözlemlenmiştir. T3 izolatının spor yapısının *Trichoderma* spp.'dan tamamen farklı olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmanın daha sonraki kısmında T3 izolatıyla devam edilmemiştir.

4.2.3. CMC agarda *Trichoderma* spp.'in selülaz aktivitesinin tanımlanması

PDA'da büyütülen *Trichoderma* spp. kolonilerinden %1'lik CMC agar besiyerine öze yardımıyla aktarma yapılmıştır. Petriler 30°C 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. Koloniler %0,1'lik Congo Red'e boyanmıştır. Boya giderildikten sonra kolonilerin çeperinde zonların oluşumu gözlemlenmiş, zonların çapları ölçülmüştür. Oluşan zonlar Şekil 4.4'de ve zonlara göre aktivite Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.4. PDA besiyerinde tek koloni halinde büyütülen *Trichoderma* T1, T2, T3, T4, T5, T6 izolatlarının CMC besiyeri üzerinde gelişimi ve kolonilerin kongo red'e boyanmasından sonra selülaz hidroliz zonu görüntüsü

Florencio ve ark., tarafından 2012'de yapılan bir çalışmada *Trichoderma reseei* suşundan CMC agar besiyerinde selülaz aktivitesi kongo rede boyama

yöntemi kullanılarak incelenmiş hidroliz zonu çapının koloni çapına bölünerek enzim aktivitesi hesaplanmıştır. PDA besiyerinde kolonilerin yavaş büyümesi koloni gelişimini izlemeyi kolaylaştırırken CMC katı fermentasyon besiyerinde koloniler üç gün içinde gelişerek besiyeri yüzeyini tamamen kaplamıştır. Hiflerin dış çeperde şeffaf görünmesinden dolayı koloni etrafında zon oluşumunu gözlemlemekte zorluk çekilmiştir.

Çizelge 4.1. *Trichoderma* spp. suşlarının CMC üzerindeki selülaz aktivitesi

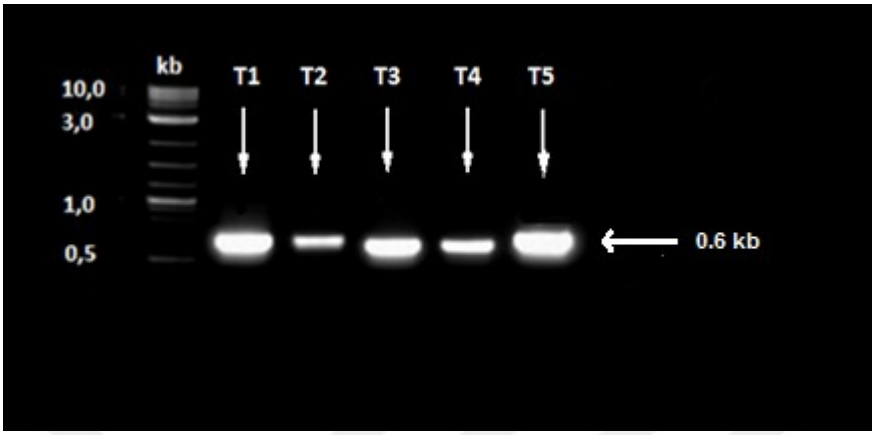
Örnek	Koloni çapı (cm)	Selülaz aktivitesi
T1	4.0±0.37	0.35±0.02
T2	2.7±0.25	0.29±0.01
T4	4.2±0.35	0.23±0.02
T5	2.6±0.20	0.15±0.01
T6	3.0±0.26	0.13±0.01

4.2.4. *Trichoderma* spp.'in genetik tanımlanması

Mikroorganizmalardan DNA izole etmek amacıyla örnekler PD sıvı besiyerinde çoğaltılmıştır. Çoğaltma işlemi 3 ile 5 gün arasında 30°C'de 150 rpm'de çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda kültür ortamı süzülmüştür. Süzülen kültür beş dakika kadar oda şartlarında kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra kültürlere sıvı azot ilave edilmiş ve havanda dövme işlemi gerçekleştirilmiştir.

Trichoderma spp. izolatlarından saflaştırılan DNA örnekleri kullanılarak PZR analizleri yürütülmüş ve küflerin genetik tanımlamalarına olanak sağlayacak ITS1-5.8S-ITS2 gen bölgelerinin çoğaltılması hedeflenmiştir. Elde edilen PZR ürünleri %1.2 agaroz jel üzerinde yürütülmüş ve boyutları uygun DNA markörleri kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 4.6). PZR analizi sonucunda *Trichoderma* suşlarının ilgili DNA bölgelerine karşılık gelen 0.6 kB büyüklüğünde bantlar elde edilmiştir. Çalışmanın bu aşamasında morfolojik olarak *Trichoderma* spp.'e benzeyen T1, T2, T4, T5 ve T6 izolatları kullanılmış ve daha sonraki aşamalarda bu izolatlarla devam edilmiştir. PZR analiz sonuçlarına göre sözü edilen tüm 5 örnekten

de benzer büyüklükte olan bantlar elde edilmiş ve bu bantların beklenen boyutlara yakın oldukları tespit edilmiştir.



Şekil 4.5. *Trichoderma* spp. T1, T2, T4, T5, T6 izolatlarından elde edilen DNA'ların ITS1 ve ITS4 primer çifti kullanılarak çoğaltılması sonucu elde edilen %1.2 agaroz jel görüntüsü. Şekilde ITS1-5.8S-ITS2 gen bölgesine karşılık gelen yaklaşık 600 bç'lik bantlar görülmektedir

Trichoderma suşlarının genetik tanımlamalarının yapılabilmesi için farklı primer çiftleri kullanılabilmektedir. Saroj ve ark. (2015) *Trichoderma citrinoviride* ve *Trichoderma reseei* suşlarının moleküler karakterizasyonu üzerinde çalışmışlardır. Çalışmada Tr_RIF: AGTCACCCAACGTCATCAACGC ve Tr_RIR GCTCACGCTCGGCCTTGAGCTTGT primerlerini kullanılmıştır. Bu çalışma sonucunda elde edilen verilere göre *Trichoderma reseei* için 139 bç büyüklüğünde bant kaydedilmiştir. Bu çalışmanın ön denemeleri içerisinde çalışmada bahsedilen primer çifti kullanılmış, benzer PZR koşulları ve ayrıca farklı bağlanma sıcaklıkları da denenmiştir. Elde edilen sonuçlar içerisinde refere edilen çalışmadakine benzer büyüklükte bantlar gözlemlenememiştir.

White, 1990'da fungusların moleküler karakterizasyonu üzerinde çalışmıştır. Fungusların rDNA'sının ITS bölgelerini kullanarak yaptığı çalışmada NS3 ve NS4 primerlerini kullanmıştır. Çalışmada 365-425bç büyüklüğünde bantlar gözlemlenmiştir. *Trichoderma* spp. 'nin bir fungus olmasına dayanarak aynı primerlerle deneme yapılmıştır; fakat refere edilen çalışmadakine benzer büyüklükte bantlar gözlemlenememiştir.

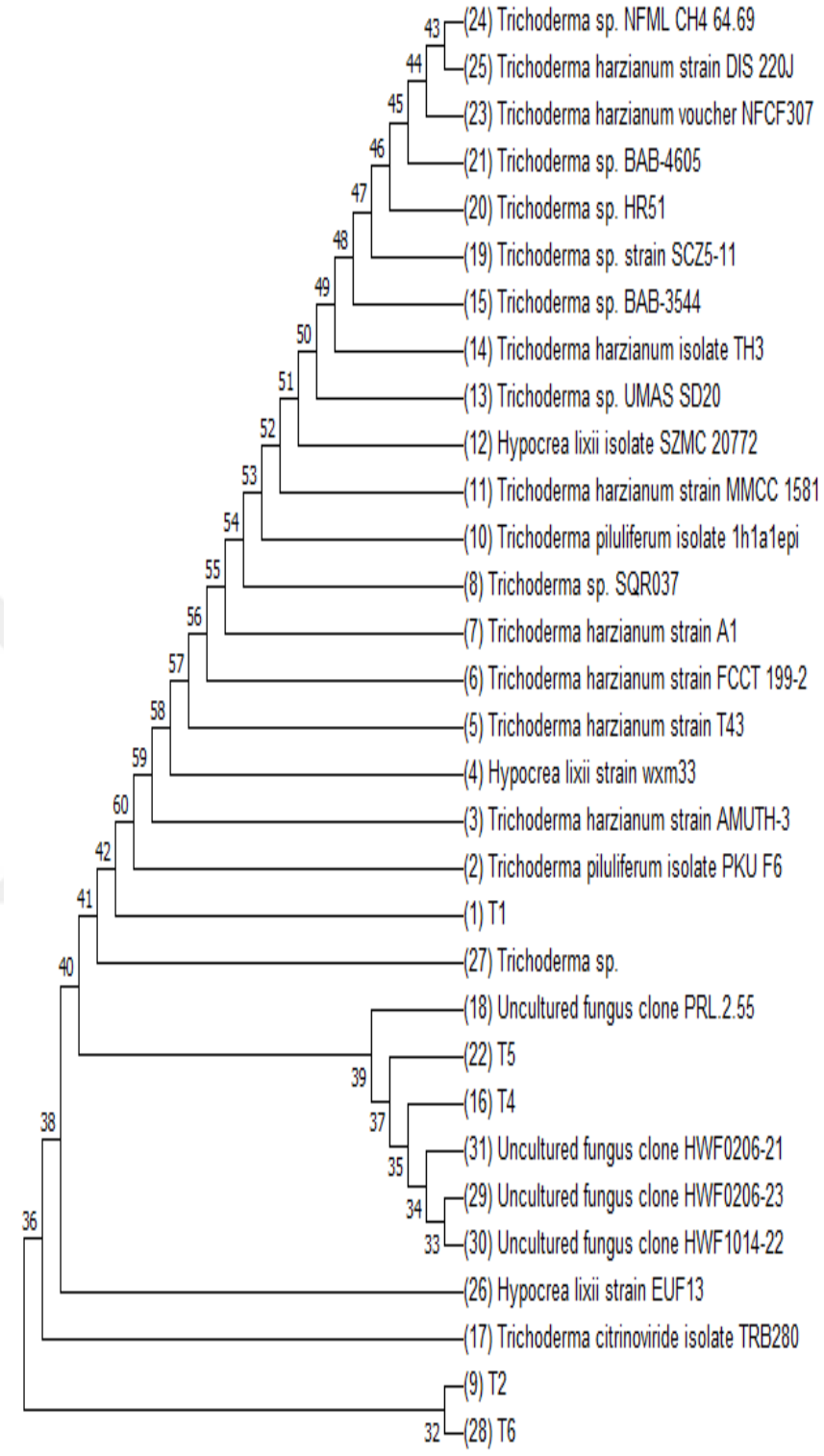
Shahid ve ark., 2013'de yaptığı bir çalışmada topraktan izole ettikleri *Trichoderma longibrachiatum* 21PP suşunun moleküler karakterizasyonu üzerinde çalışmışlardır. ITS1 ve ITS4 primer çifti kullanılarak yürütülen çalışmalar neticesinde agaroz jel üzerinde yaklaşık 660 bç büyüklüğünde DNA bantları tespit edilmiştir. Dolayısıyla bu çalışma kapsamında elde edilen *Trichoderma* spp. izolatlarının moleküler karakterizasyonunu ortaya koymak amacıyla ITS1 VE ITS4 primer çifti kullanılmıştır. İzolatlardan ekstrakte edilen DNA kullanılarak yapılan PZR analizi sonucunda; ITS1 VE ITS4 primerleri kullanılmasıyla literatürdeki çalışmalara benzer olarak agaroz jel üzerinde yaklaşık 600 bç'lik DNA bantları tespit edilmiştir. Biyoinformatik analizler sonucunda elde edilen izolatlara ait DNA dizilimleri EK1, EK2, EK3, EK4, EK5'de verilmiştir.

DNA dizilimi sonuçları NCBI BLAST algoritması yardımıyla bilgi bankalarında bulunan dizilimlerle karşılaştırılmış ve yüksek oranda benzerlik gösteren DNA dizilimleri belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen funguslara ait DNA dizilemerine en yakın, Gen bankasında tanımlı olan suşlar Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Yapılan bioinformatik analiz sonucunda tespit edilen en yüksek oranda benzerlik taşıyan DNA dizilimleri ile bu çalışma kapsamında izole edilen *Trichoderma* suşlarının akrabalık dereceleri filogenetik ağaç çizim yoluyla ortaya konulmuştur. Filogenetik ağaç Şekil 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan fungus suşlarının GenBank'a göre tür tayinleri

İzolat	Suşun Adı	Benzerlik Oranı (%)	GenBank No
T1	*Trichoderma piluliferum* PKU F6	95	KC113287.1
	Trichoderma harzianum AMUTH-3	95	KY062569.1
	Hypocrea lixii wxm33	95	HM037973.1
	Trichoderma harzianum T43	94	KX364212.1
	Trichoderma harzianum FCCT 199-2	95	KY381961.1
	Trichoderma harzianum A1	95	KR708630.1
	Trichoderma sp. SQR037	94	GQ497168.1
T2	*Trichoderma piluliferum* 1h1a1epi	95	KP714305.1
	Trichoderma harzianum MMCC 1581.2	95	KU507623.1
	Hypocrea lixii SZMC 20772	95	JX173859.1
	Trichoderma sp. UMAS SD20	95	KF201296.1
	Trichoderma harzianum TH3	95	JN039047.1
	Trichoderma sp. BAB-3544	95	KM066576.1
T4	*Trichoderma citrinoviride* TRB280	91	KT357710.1
	Uncultured fungus clone PRL.2.55	100	KX147811.1
	Trichoderma sp. strain SCZ5-11	73	KY445792.1
	Trichoderma sp. HR51	73	KU238148.1
	*Trichoderma*_sp._BAB-4605	73	KU571490.1
T5	*Trichoderma harzianum* isolate TH3	91	KT852827.1
	Trichoderma harzianum voucher NFCF307	90	KM458782.1
	Trichoderma sp. NFML CH4 64.69	91	FJ442255.1
	Trichoderma harzianum DIS 220J	91	FJ442254.1
	Hypocrea lixii EUF13	91	HQ340001.1
	*Trichoderma*_sp.	89	MG255277.1
T6	*Uncultured fungus* HWF0206-23	93	JF734804.1
	Uncultured fungus HWF1014-22	93	JF734801.1
	Uncultured fungus HWF0206-21	93	JF734797.1

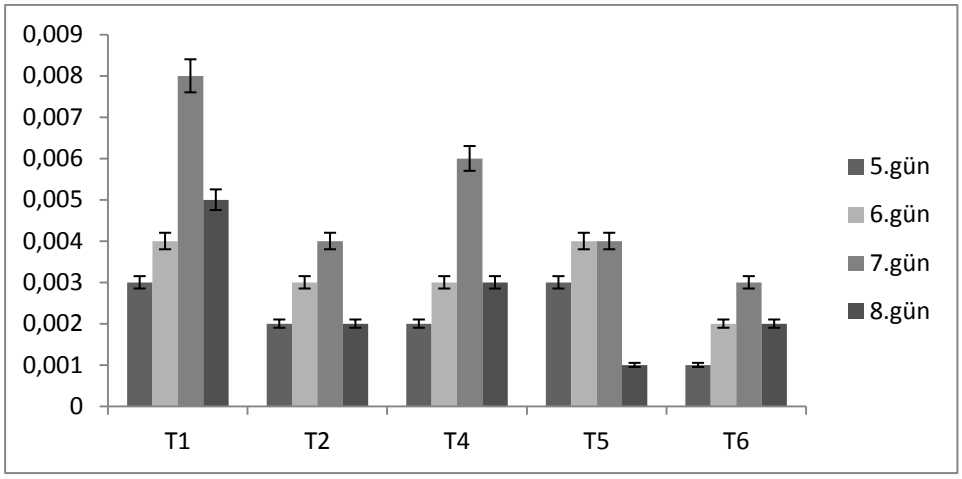


Şekil 4.6. Harran Ovası topraklarında izole edilen *Trichoderma* suşlarından ITS bölge dilimlerinin DNA bilgi bankalarında bulunan dizilimlere gösterdikleri benzerliklere bağlı olarak çizilen filogenetik ağaç

Çalışmada MEGA programı kullanılarak 18S rRNA intragenik **(**ITS1-5.8S-ITS2) gen bölgesinin çoğaltılarak yapılan sekans analizine göre tür tanımlamasında; T1 izolatının %90 üzerinde *Trichoderma harzianum*'a benzerlik gösterdiği; ayrıca *Trichoderma piluliferum*, *Hypocrea lixii* suşlarına da %90 üzerinde benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. T2 izolatının %90 üzerinde *Trichoderma harzianum*'a benzerlik gösterdiği, benzerlik gösterdiği bazı suşların ise henüz tanımlanamayan fungusa ait olduğu görülmüştür. T4 izolatının %100 benzer dizilimi tespit edilmiş fakat tespit edilen dizilimin henüz tanımlanmamış fungusa ait ait olduğu, ayrıca %70 üzerinde *Trichoderma* spp. benzerlik gösterdiği görülmüştür. T5 izolatının %90 üzerinde *Trichoderma harzianum*'a benzerlik gösterdiği görülmüştür. T6 izolatının %90 üzerinde benzerlik gösterdiği suşların tanımlanamayan fungus türlerine ait olduğu; dolayısıyla *Trichoderma* olarak tanımlanamadığı görülmüştür. Ancak T6 izolatına ait selülaz aktivitesi gözlemlendiğinden çalışmaya bu örnekle de devam edilmiştir.

4.3. *Trichoderma* spp.'den Selülaz Üretimi

PDA besiyerinde geliştirilen T1, T2, T4, T5, T6 izolatlarını temsil eden tek kolonilerden CMC sıvı besiyerine ekim yapılmıştır ve 28ºC'de 8 gün 150 rpm'de çalkalamalı inkübasyona bırakılmıştır. Fermantasyon süresince inokülantlardan 5.gün, 6.gün, 7.gün ve 8. günde örnek alınarak DNS metoduyla selülaz aktivitesi tayini yapılmıştır. Aktivitenin belirlenmesi için gerekli denklem Bölüm 3.10'da verilmiştir. Günlere göre ölçülen selülaz aktivite değerleri Şekil 4.7'deki gibidir.



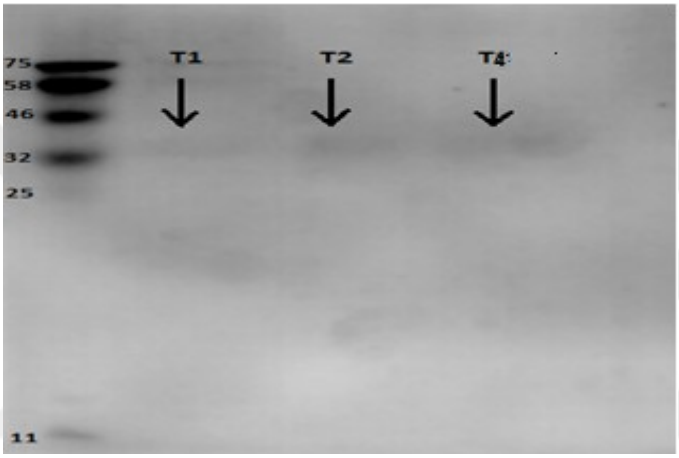
Şekil 4.7. CMC sıvı fermantasyon ortamında gerçekleştirilen enzim üretiminde güne bağlı olarak ölçülen selülaz aktivitesi değerleri

Selülaz aktivitesinin fermantasyon süresince arttığı gözlemlenmiştir. Aktivite tüm izolatlar için beşinci günden itibaren başlamıştır ve fermantasyonun altıncı ve yedinci gününde artmıştır, sekizinci günde ise aktivitede azalmanın olduğu görülmüştür. *Trichoderma* spp.'nın en iyi enzim ürettiği gün (aktivitenin en yüksek ölçüldüğü gün) yedinci gün olarak gözlemlenmiştir. Elde edilen aktivite verilerine göre en yüksek aktiviteyi 0,008U/mL ile T1 izolatı gerçekleştirmiştir. Daha sonra 0,006U/mL aktivite ile T4 izolatı gelmiştir. T2 ve T5 0,004U/mL aktivite göstermiştir. En düşük aktiviteyi ise 0,003U/mL ile T6 göstermiştir. Literatürde yapılan çalışmalara göre enzim üretimi için mikroorganizma en az 5 gün fermentasyona tabi tutulmuştur. Ayrıca denenen substrat çeşidine göre de fermentasyon süresi değişiklik göstermektedir. Mangalanayaki ve Madhavan (2015) *Trichoderma harzianum* ve *Fusarium oxyporum* mikroorganizmlarını pamuk çekirdeği, mısır koçanı ve pirinç kepeği gibi farklı substratlarda katı hal fermentasyona tabi tutmuşlardır. Fermentasyon boyunca ortamdan kültür alınarak aktivite tayini yapılmıştır. Sonuç olarak pamuk çekirdeğinde en yüksek aktivite 144 saatte, mısır koçanı ve pirinç kepeğinde ise en yüksek aktivite 120 saatte görülmüştür. Kim ve ark. (2002) *Trichoderma harzianum* FJ1 suşundan selülaz üretimi gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada karbon kaynağının artışına bağlı olarak fermentasyonun günlük takibi yapılmıştır. Selülaz üretimi için karbon kaynağı CMC seçilmiştir. Sonuç olarak en yüksek aktivite 5. günde tespit edilmiştir. Yaptığımız bu çalışmada da güne bağlı olarak aktivite tayini yapılmıştır. Fakat fermentasyon için

literatürde genellikle çalışılan süre (5gün) mikroorganizma ve substrat farkına bağlı olarak değişiklik göstermiştir.

4.4. SDS-PAGE Elektroforezi

Trichoderma spp.'dan saflaştırılan selülaz enziminin molekül ağırlığı tayini Bölüm 3.9'da belirtildiği gibi SDS-PAGE ile yapılmıştır. Elde edilen protein jel görüntüsü şekil 4.8'de gösterilmektedir.



Şekil 4.8. Selülaz enziminin SDS-PAGE jel görüntüsü

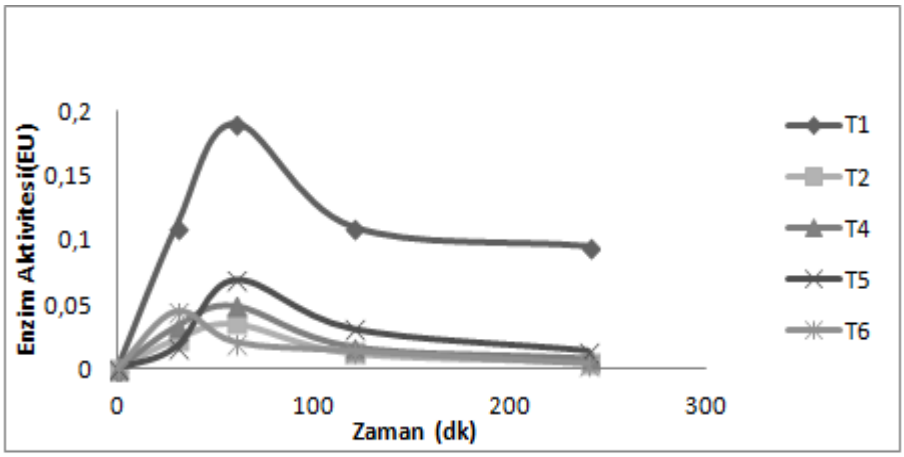
İzole edilen *Trichoderma* spp.'leri uygun fermentasyon koşulları altında selülaz üretilmeleri açısından inkübe edilmişlerdir. Fermentasyon ortamında üretilen proteinler ve selülazlar SDS-PAGE kullanılarak protein profilleri açısından değerlendirilmişlerdir. Protein jelinde T1, T2, T4 olarak isimlendirilmiş *Trichoderma* spp. suşlarından elde edilen protein ve enzim örneklerine ait bantlar görülebilmektedir. Elde edilen sonuçlara göre her üç örnekte de 32 kDa büyüklüğünde protein bantlarının varolduğu görülmektedir. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde de *Trichoderma* suşlarından elde edilen selülaz enzimlerinin SDS-PAGE bantları üzerinde benzer büyüklükte bantlar oluşturdukları görülmektedir. Dolayısıyla uygun protein markırları kullanılarak elde eilen selülaz enzimlerinin boyutlarının incelenmesi sonucunda literatürdeki bilgiye benzer sonuçlar elde edilmiş ve bu çalışmada T1, T2 ve T4 kültürlerinin SDS-PAGE analizine göre fermentasyon ortamında 32 kDa büyüklüğünde selülaz enzimi ürettikleri ortaya

konulmuştur. *Trichoderma reseei*'den selülaz üretimi ile ilgili yapılan bir çalışmada mikrobiyal yolla üretilen selülazın SDS-PAGE analizinde ham selülazın 32kDa büyüklüğünde band verdiği görülmüştür (Pirzadah ve ark., 2014). *Bacillus* spp. ile yapılan başka bir çalışmada ise üretilen selülazın 32.5 kDa büyüklüğünde bant verdiği görülmüştür (Shanmugapriya ve ark., 2012). Noronha ve Ulhoa (1999) yaptığı bir çalışmada *Trichoderma harzianum*'dan β-1,3-glukanaz üretmişlerdir. Çalışmada selülazın büyüklüğünü ölçmek için SDS-PAGE analizi yapılmıştır. Jel filtrasyon ve iyon değişim kromotografisiyle saflaştırılan enzim 29kDa büyüküğünde band göstermiştir. Saravanakumar ve ark. (2016) biyolojik mücadelede *Trichoderma* ile çalışmışlardır. Bu çalışmada *Trichoderma harzianum*'dan selülaz üretimi gerçekleştirmişlerdir. Üretilen ham selülaz SDS-PAGE'de 25-66kDa arası iki band göstermiştir. Iqbal ve ark. (2011) *Trichoderma viride*'den üretilen selülaz enzimin moleküler büyüklüğünü belirlemek amacıyla SDS-PAGE analizi sonucunde 58 kDa büyüklüğünde bant tespit etmişlerdir.

4.5. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

4.5.1. Enzim aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi

Selülaz enziminin en iyi çalıştığı süreyi belirlemek için 30 dk, 1 saat, 2 saat ve 4 saat zaman dilimlerinde enzim ve substrat inkübasyona bırakılmıştır. Süreye göre enzim aktivitesi Şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.9. *Trichoderma* spp. izolatlarından elde edilen selülazın enzim aktivitesi-zaman grafiği

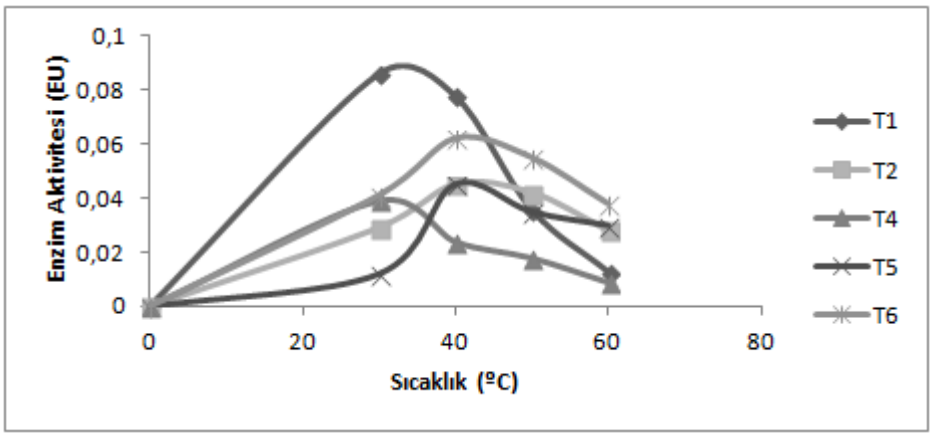
Şekil 4.11'de T1, T2, T4, T5, T6 *Trichoderma* izolatlarından elde edilen selülolitik enzimlerin zamana bağlı aktiviteleri verilmiştir. Şekildeki veriler incelendiğinde tüm örnekler için selülaz aktivitesinin 30. dakikada başladığı görülmektedir. T6 örneğindeki aktivite 30. dakikada maksimum seviyeye ulaşırken diğer örneklerdeki aktivite ilerleyen zamanla beraber artışa devam etmiştir. T1, T2, T4, T5 örnekleri için maksimum aktivite düzeyleri 60. Dakikada ölçülmüştür. Aktivite tayininde; 30.dk'da T1; 0,11, T2; 0,023, T4;0,033, T5; 0,017, T6; 0,045 U/mL, 60.dk'da T1; 0,19, T2; 0,035, T4; 0,049, T5; 0,069, T6;0,021 U/mL, 120.dk'da T1; 0,11, T2; 0,012, T4; 0,017, T5; 0,031, T6; 0,014, 240.dk'da T1; 0,095, T2; 0,005, T4;0,008, T5;0,014, T6; 0,004 U/mL ölçülmüştür.

Literatürde mikrobiyal selülazın substratı parçalamak için 30-60 dk yeterli gelmiştir. Behera ve ark. (2016), mikrobiyal selülazın karakterizasyonu belirlemek amacıyla enzim-substratı 30 dk inkübasyona tabi tutmuşlardır. Olsson ve ark. (2003), *Trichoderma reesei*'den üretiği selülazın aktivitesini belirlemek için enzim-substratı 30 dk inkübasyona bırakmışlardır. Gautam ve ark. 'nın (2010), yaptıkları başka bir çalışmada ise *Trichoderma viride*'den elde dilen selülazın aktivitesini belirlemek için inkübasyon süresini 60 dk olarak belirlemişlerdir.

Enzimin optimum süresi; inkübasyon sıcaklığına, pH'ına, substrat yüzeyine ve enzim miktarına bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Optimum süre belirlendikten sonra bu süre ile optimum sıcaklık, pH ve substrat konsantrasyonu belirlenmiştir.

4.5.2. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklık etkisinin belirlenmesi

Selülaz enziminin en iyi çalıştığı sıcaklığı belirlemek amacıyla enzim-substrat 30°C, 40°C, 50°C ve 60°C sıcaklıklarda bir saat inkübasyona bırakılmıştır. Enzim aktivitesi sıcaklık grafiği Şekil 4.10'da verilmiştir.

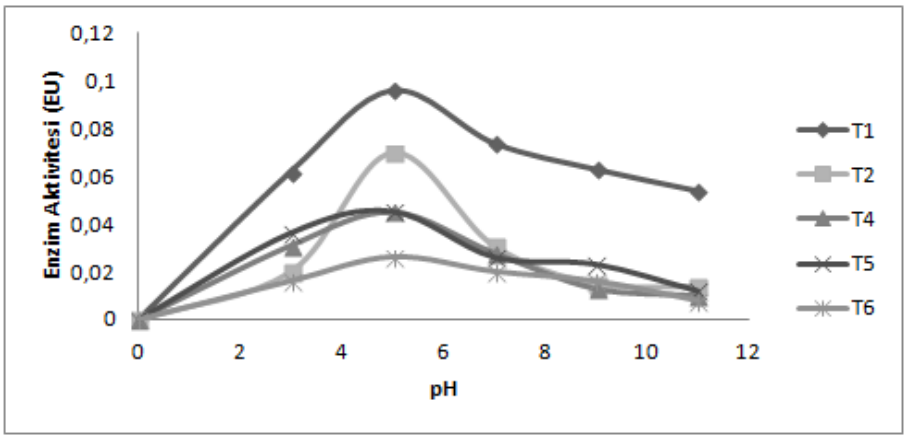


Şekil 4.10. *Trichoderma* spp. izolatlarından elde edilen selülazın sıcaklığa bağlı aktivite grafiği

Şekil 4.10'da T1, T2, T4, T5, T6 *Trichoderma* izolatlarından elde edilen selülolitik enzimlerin sıcaklığa bağlı aktiviteleri verilmiştir. Veriler incelendiğinde tüm örneklerden elde edilen enzimler için sıcaklığa bağlı aktivite 30 ºC 'de başlamıştır. Optimum sıcaklık tümünde 30-40 ºC olarak belirlenmiştir. T1, T5, T6 başta olmak üzere 40 ºC'den sonra enzim aktivitesinin azaldığı görülmüştür. Enzim üzerine sıcaklığın etkisine bakıldığında, enzim aktivitesi 30ºC'de T1; 0,086, T2; 0,029, T4;0,039, T5; 0,012, T6; 0,041 U/mL, 40 ºC'de T1; 0,078, T2; 0,045, T4; 0,024, T5;0,045, T6; 0,062 U/mL, 50 ºC'de T1; 0,036, T2;0,042, T4; 0,018, T5; 0,035, T6; 0,055 U/mL, 60 ºC'de T1; 0,013, T2; 0,028, T4;0,009, T5; 0,030, T6; 0,038 U/mL ölçülmüştür. Tüm enzim örnekleri için en düşük selülaz aktivitesi 60 ºC'de görülmüştür.

4.5.3. Enzim aktivitesi üzerine pH etkisinin belirlenmesi

Selülaz enziminin en iyi aktivite gösterdiği pH değerini belirlemek amacıyla, enzim-substrat pH 3, 5, 7, 9, 11 değerlerinde bir saat inkübasyona bırakılmıştır. Enzim aktivitesi pH grafiği Şekil 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.11. *Trichoderma* spp. izolatlarından elde edilen selülazın pH'a bağlı aktivite grafiği

Şekil 4.11'de *Trichoderma* spp. izolatlarından elde edilen enzimlerin pH değişimine bağlı selülaz aktivitesi sonuçları verilmiştir. Selülaz aktivitesi tüm örnekler için pH 3.0'da başlamaktadır ve daha sonra artış göstermektedir.Tüm izolatlardan elde edilen enzimler için en yüksek aktivite 5.0'da görülmüştür. pH değeri arttırıldıkça aktivitede azalma görülmüştür. Enzim aktivitesi pH 3,0'da T1; 0,062, T2; 0,020, T4; 0,031, T5; 0,036, T6; 0,016 U/mL, 5,0'da T1; 0,096, T2; 0,070, T4; 0,045, T5; 0,045, T6; 0,026 U/mL, 7,0'da T1; 0,074, T2; 0,031, T4; 0,028, T5; 0,026, T6; 0,020 U/mL, 9,0'da T1; 0,063, T2; 0,015, T4; 0,013, T5;0,023, T6; 0,016 U/mL, 11,0'da T1; 0,054, T2; 0,014, T4; 0,010, T5;0,012, T6; 0,008 U/mL olarak hesaplanmıştır. En düşük aktivite tüm örnekler için pH 11.0'da görülmüştür.

Selülazlar genellikle etkin oldukları pH değerine göre asidik (pH 4,5-5,5), nötral (6,6-7,0) ve alkali (pH 9,0-10,0) selülazlar olarak gruplandırılırlar.(Araujo ve ark.,2008). *Trichoderma* spp.'den elde edilen enzim pH 5,0'te optimum aktivite gösterdiğinden dolayı asidik selülazlar grubuna girmektedir.

Gautam ve ark. (2010), *Trichoderma* spp.'dan üretilen selülaz aktivitesi üzerine optimum şartların belirlendiği bir çalışmada enzimin optimum sıcaklığı 45 ºC, optimum pH ise 6,5 olduğunu belirtmiş ve bu şartlarda enzim aktivitesini 1,95 U/mL ölçmüşlerdir. Ayrıca *Trichoderma viride*'den üretilen selülazda 40-50ºC arası sıcaklıkta ekzoglukanaz 1.95 U/mL, endoglukanaz 1.88 U/mL ve β-glukozidaz 1.88 U/mL aktivite gözlemlemişlerdir. *Trichoderma harzianum* ile enzim üretimi üzerine

yapılan başka bir çalışmada enzimin optimum sıcaklığı 50ºC ve optimum pH'sı 4,4 olarak belirlenmiştir (Noronha, 1999). Benzer çalışmalar Çizelge 4.3'de verilmiştir.

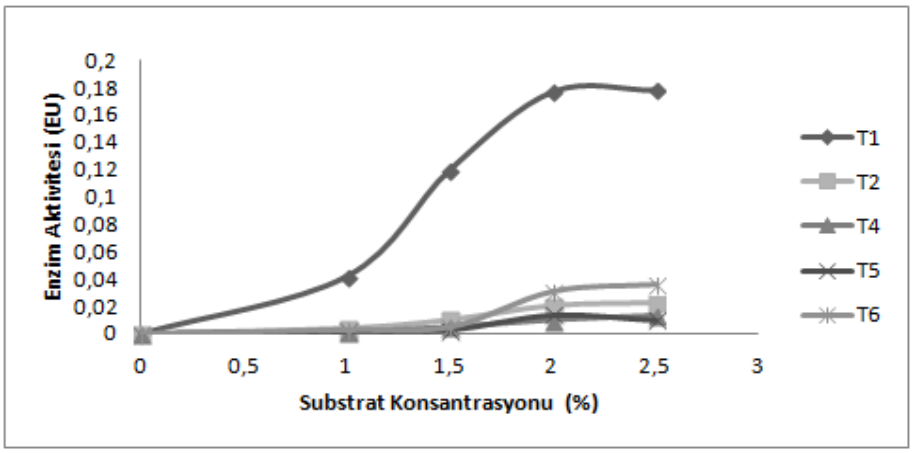
Çizelge 4.3. Bazı mikroorganizmalardan elde edilen selülazlara ait optimum pH ve sıcaklık değerleri

Kaynak	Sıcaklık (ºC)	pH	Referans
Bacillus spp.	42	8,5	Topuz ve ark., 2007
Bacillus licheniformis	65	6,0	Bischoff ve ark., 2006
Bacillus cereus	55	8,0	Yan ve ark., 2011
Aspergillus niger	45	3,8-4,0	Hurst ve ark., 1977
Trichoderma reseei QM-9414	50	4,5	Krishna ve ark., 2000
Trichoderma virens	60	5,0	Yan ve ark., 2016
Trichoderma reseei	30	5,0	Maurya P., 2012
Trichoderma harzianum	50	5,0	Castro ve ark., 2010
Trichoderma harzianum	28	5,5	Sıbtain ve ark., 2009

Literatüre bakılacak olursa mikrobiyal olarak üretilen selülazların optimum sıcaklık değerleri 25-60°C gibi geniş aralık göstermekteyken pH değeri genelde 5.0 olarak tespit edilmiştir. Dolayısıyla bu çalışmada kullanılan funguslardan elde edilen selülazın sıcaklık ve pH değerleri mikrobiyal selülazların optimum değerleri arasına girmektedir.

4.5.4. Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonun etkisi

Selülaz enziminin en iyi çalıştığı substrat konsantrasyonu belirlemek amacıyla enzim %1'lik, %1.5'lik ve %2'lik, %2.5'lik CMC substratıyla bir saat inkübasyona bırakılmıştır. Enzim aktivitesi konsantrayon grafiği Şekil 4.12'de verilmiştir.



Şekil 4.12. *Trichoderma* spp. izolatlarından elde edilen selülazın substrat konsantrasyonuna bağlı aktivite grafiği

T1, T2, T4, T5, T6 *Trichoderma* izolatlarından elde edilen enzimlerin substrat konsantrasyonlarına bağlı değişimi verilmiştir. Tüm örnekler için substrat konsantrasyonu arttıkça enzim aktivitesinin de arttığı gözlemlenmiştir.

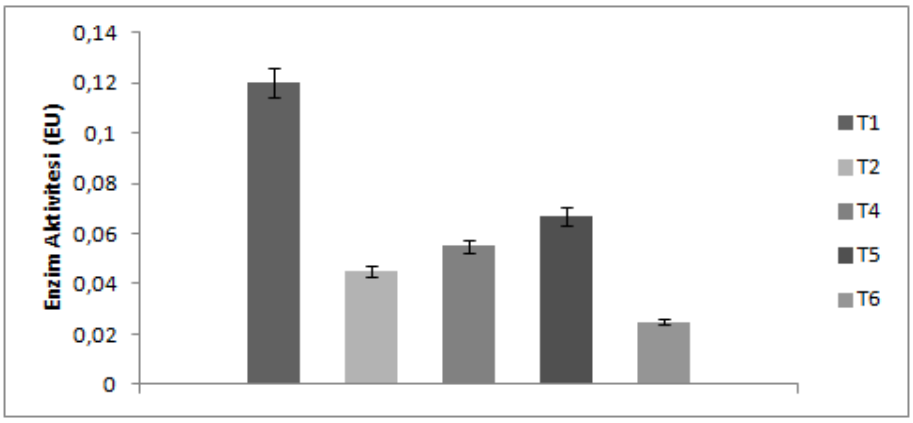
Konsantrasyonun artması T1 izolatından elde edilen enzim için büyük farklar gösterirken diğer örnekler için yüksek derecede artış gözlemlenmemiştir. Substrat konsantrasyonunun artışıyla yükselen enzim aktivitesi %2'lik CMC konsantrasyonunda maksimum aktivite değerini göstermiştir. CMC konsantrasyonunun artışı %2'lik substrattan sonra enzim aktivitesi üzerinde etkili olmamıştır dolayısıyla enzim substrata doymuştur. Enzim aktivitesi %1'lik CMC substratında T1; 0,042, T2; 0,004, T4; 0,002, T5; 0,002, T6; 0,003 U/mL, %1,5'lik CMC substratında T1; 0,12, T2;0,010, T4; 0,005, T5; 0,003, T6; 0,005 U/mL, %2'lik CMC substratında T1; 0,177, T2; 0,020, T4; 0,010, T5;0,014, T6;0,031 U/mL, %2,5'lik CMC substratında T1; 0,178, T2; 0,022, T4; 0,013, T5; 0,010, T6;0,036 U/mL olarak hesaplanmıştır.

Kim ve ark. (2002), *Trichoderma harzianum*'dan üretilen selülazla ilgili yaptıkları enzim karakterizasyonunda substrat konsantrasyonunu belirlemek amacıyla %1.0, CMC, %2.5 CMC ve % 5.0 CMC substrat konsantrasyonlarını denemişlerdir. Çalışma sonucunda en iyi substrat konsantrasyonu %2.5 CMC olarak

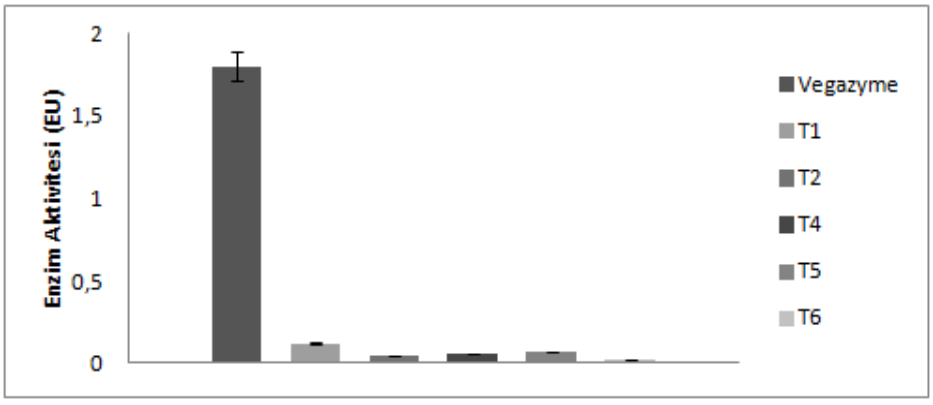
belirlenmiştir. Çalışmamızda selülazın maksimum parçalayabildiği CMC konsantrasyonu %2 olduğundan literatüre yakın sonuç kaydedilmiştir.

4.6. *Trichoderma* spp.'den Üretilen Selülaz Enziminin Aktivitesinin Ticari Enzim Aktivitesi ile Karşılaştırılması

Trichoderma spp.'den elde edilen selülaz enzimi ERBSLÖH firmasından Vegazym HC (selülotik) ticari enzimi ile %2'lik CMC kullanılarak 40°C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır ve aktivite hesaplanmıştır. *Trichoderma* spp. izolatlarından elde edilen selülaz aktivitesi Şekil 4.13'de ve enzimin ticari Vegazym HC enzimi ile karşılaştırması Şekil 4.14'de verilmiştir.



Şekil 4.13. *Trichoderma* spp. izolatlarından elde edilen selülaz enzimi aktivitesi



Şekil 4.14. *Trichoderma* spp. izolatlarından üretilen selülaz ve ticari selülaz enziminin karşılaştırılması

Şekil 4.14‘de selülaz enzimi ile ticari Vegazym HC enziminin karşılaştırma grafiği verilmiştir. En yüksek aktivite değerini 1,8 U/mL ile ticari Vegazyme enzimi göstermiştir. Daha sonra sırayı T1 izolatından elde edilen ham enzim aktivite değeri takip etmiştir. T1’den elde edilen aktivite 0, 120 U/mL, T2’den 0,045 U/mL, T4’den 0,055 U/mL, T5’den 0,067 U/mL ve T6’dan 0,025 U/mL olarak hesaplanmıştır. En düşük değer ise T6 izolatından elde edilen selülaz enziminin aktivite değeri göstermiştir.

Çalışmada kullanılan ticari enzim yüksek derece saflığa sahip olduğundan ve ticari enzimler genel olarak selülaz hemiselülaz, ksilanaz gibi enzimleri içeren praparatlar halinde endüstriye hizmet ettiğinden ticari enzim yüksek aktivite değeri göstermiştir. Çalışmada mikrobiyal olarak üretilen enzim ise saf halde bulunmadığından ticari enzimde görülen aktivite gibi yüksek bir aktiviteye rastlanamıştır.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Biyoteknoloji geniş bir araştırma alanına sahip olan ve çok çeşitli alanlarda gelişme gösteren; günümüzde fermantasyon mikrobiyoloji, moleküler biyoloji, biyoinformatik disiplinleriyle de ortak çalışma alanları bulan bir alandır.

Biyoteknoloji alanında mikroorganizmaların kullanımıyla son zamanlarda en çok çalışılan alanlarından biri de enzim teknolojisidir. Günümüzde artan enzim ihtiyacı enzimleri daha önemli bir konu haline getirmiş ve çalışmalar bu alanda yoğunlaşmaya başlamıştır. Bu nedenle yeni enzim üretim kaynakları araştırılmaktadır.

Mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkilerden ve hayvanlardan elde edilen enzimlere göre katalitik etkilerinin yüksek olması, kontrollü şartlar altında kolayca üretilebilmeleri, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, büyük ölçekte ve düşük maliyetle üretilebilmeleri ve daha stabil ürün eldesi gibi üstünlüklerinden ötürü günümüzde üretilen endüstriyel enzimlerin çoğu mikrobiyal kaynaklıdır. Ayrıca mikrobiyal kaynakların kolay bulunabilmeleri ve genetik modifikasyonlara açık olması da mikroorganizmaları tercih edilebilir kılmaktadır. Mikrobiyal kaynaklı enzimler gıda, kağıt, tekstil ve deterjan endüstrilerinde geniş bir kullanım potansiyeline sahiptir. Endüstriyel enzimleri üreten yeni bakteriyel ve fungal suşların tanımlanmasına ve izolasyonuna olan ilgi artarak devam etmektedir.

Selülaz birçok endüstride sıkça kullanılan bir enzim olmasından dolayı uzun yıllardır üzerinde çalışılan enzim çeşitlerinden bir tanesidir. Doğada selülotik maddelerin degradasyonundan esinlenilerek mikroorganizmaların ideal selülaz üreticileri olabileceği varsayılmış; böylece yeni mikrobiyal enzim kaynakları araştırılmıştır. Mikrobiyal selülazlar bakterilerden ve funguslardan üretilmektedir. *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Humicola, Talamyces, Acrophialophora, Thermoascus, Bacillus*, *Penicillum* gibi bakteri ve funguslar mikrobiyal selülaz kaynaklarının başında gelmektedir.

Trichoderma spp. toprak mikroflorasında yaygın olarak bulunan ve lignoselülozik maddelerin degradasyonunu sağlayan başlıca mikroorganizmalardan biridir. Doğada yaygın olarak bulunması izolasyonun kolay olması ve enzim üretiminin yanı sıra zirai mücadele alanında da başvurulan bir mikroorganizma olmasından dolayı *Trichoderma* spp. türleri ilgi çekmiştir.

Harran Ovası toprakları Türkiye'nin en verimli tarım alanlarından biridir. Harran ovası topraklarında yetiştirilen pamuk, mısır, buğday gibi selülotik madde bakımından zengin tarımsal ürünlerin yetiştirilmesi ve hasat sonrası selülotik materyalin doğada kolayca parçalanması bu toprakların selülaz üreten mikroorganizmalarca zengin olabileceğini düşündürmüştür.

Bu çalışma Harran Ovası tarım alanlarında var olabilecek selülaz üreticisi *Trichoderma* spp. türlerinden selülaz üretimini ele almaktadır. Topraktan mikroorganizma izole edilmiş, genetik tanımlaması yapılmış ve fermentasyon ortamında izole edilen mikroorganizmalar vasıtasıyla enzim üretilmiştir.

Çalışma sonucunda mısır, pamuk ve buğday tarım arazilerinden alınan örneklerden hasat sonrası mısır ve buğday toprak örneklerinden *Trichoderma* spp. fungusu izole edilmiştir. Morfolojik ve mikroskobik olarak tanımlanan izolatlar genetik olarak da tanımlanmış dört fungus izolatı %90 bir izolat %70 üzerinde *Trichoderma harzianum'*a benzerlik göstermiştir.

Fermentasyon ortamında *Trichoderma* spp.'lerin en ideal olarak 7. günde enzim ürettiği belirlenmiştir. Fermentasyon ortamında elde edilen enzimin büyüklüğü SDS-PAGE analizi ile 32 kDa olarak tespit edilmiştir. Selülaz aktivitesi DNS metoduyla ölçülmüş ve 7. Gün sonunda enzimin optimum çalışma koşulları inelenmiştir. Enzimin optimum çalışma sıcaklığı 40ºC, optimum çalışma pH'sı 5.0, en uygun çalışma süresi 60 dk ve ideal substrat konsantrasyonu %2'lik CMC olarak belirlenmiştir.

Üretilen enzimin aktivitesi ticari Vegazym HC (selülotik) enziminin aktivitesi ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen bulgulara göre üretilen izolatların ümitvar birer selülaz üreticisi oldukları görülmüştür.

İzole edilen suşların fermentasyon koşullarının iyileştirilmesi ve bu izolatlardan elde edilen enzimlerin daha yüksek düzeylerde saflaştırması ile endüstride kullanım potansiyeli bulması ihtimali olan selülolitik enzimlerin üretilebileceği düşünülmektedir. Bu amaçla daha sonraki dönemlerde bu enzimin endüstriyel ürünlerde ve çeşitli gıda işleme basamaklarında denenmesine yönelik araştırmaların yapılması düşünülmektedir. Özellikle meyve suyu ve şarap sanayiinde kullanımı ile meyve şırası verimini arttırılabileceği ve filtrasyon basamağında kullanımı ile filtrasyon süresini kısaltabileceği düşünülmektedir. Bu alanda yapılacak çalışmalar ile gıda bilimi alanında önemli gelişmeler katedilebilecektir.

KAYNAKLAR

AKKAYA, A. ve PAZARLIOĞLU, N., 2005. 21. Yüzyılın Anahtar Teknolojisi: Beyaz Biyoteknoloji. Kırıkkale Üniversitesi Bilimde Gelişmeler Dergisi, 1(1):22-33.

AKOLKAR, S., SAJGURE, A., LELE, S., 2005. Lactase Production from *Lactobacillus Acidophilus*. World J. Microb. Biot., 21:1119–1122.

AMİN, K. N. M., 2016. Cellulose Nanocrystals Reinforced Thermoplastic Polyurethane Nanocomposites. The University of Queensland, Polymer Tecnology, s:1-6.

ARAUJO, R., CASAL, M., PAULO, A., 2008. Application of Enzymes for Textile Fibres Processing. Biocatalysis and Biotransformation, 26(5):332-349.

AYDIN, M. H., 2015 .Bitki Fungal Hastalıklarıyla Biyolojik Savaşta *Trichoderma*'lar. Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi, 2:135-148.

BAWEJA, M., NAIN, L., KAWARABAYASI, Y., SHUKLA, P., 2016. Current Technological Improvements in Enzymes Toward Their Biotechnological Applications. Fronties in Microbiology, 965(7):1-13.

BERGHEM, L. E. R. and PETTERSSON, L. G., 1973. The Mechanism of Enzymatic Cellulose Degradation Purification of a Cellulolytic Enzyme from *Trichoderma viride* Active on Highly Ordered Cellulose. Em. J. Biochem., 37:21-30.

BERGHEM, L. E. R., PETTERSSON, L. G., FREDRIKSSON, U.B., 1975. The Mechanism of Enzymatic Cellulose Degradation Characterization and Enzymatic Properties of a p-1,4-Glucan Cellobiohydrolase from *Trichoderma viride***.** Eur. J. Biochem., 53:55-62.

BHARDWAJ, N. K. and BAİPAİ, P. K., 1996. Use of Enzymes in Modification of Fibres for Improved Beatability. Journal of Biotechnology, 51 (1): 21-26.

BINOD, P., PALKHIWALA, P., GAIKAIWARI, R., NAMPOOTHIRI, K. M., DUGGAL, A., DEY., K., PANDEY, A., 2013. Industrial Enzymes Present Status and Future Perspectives for India. Journal of Scientific., 72:271-286.

BISCHOFF, K. M., ROONEY, A.P., LI, X., LIU, S., HUGHES, S. R., 2006. Purification and Characterization of a Family 5 Endoglucanase from a Moderately Thermophilic Strain Of *Bacillus Licheniformis*. Biotechnol Lett., 28:1761–1765.

BISSETT, J., 1991a. A revision of the Genus Trichoderma. II. Infrageneric classification. Canadian Journal of Botany, 69:2357-2372.

BISSETT, J., 1991b. A revision of the Genus Trichoderma. III.Section Pachybasium.Canadian Journal of Botany, 69:2373-2417.

BISSETT, J., 1991c. A revision of the Genus Trichoderma. IV. Additional notes on section Longibrachiatum. Canadian Journal of Botany, 69:2418-2420.

BOZDEVECİ, A., 2014. Toprak Kökenli *Trichoderma spp*. İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu ve Biyolojik Mücadele Etkinliklerinin Belirlenmesi. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Rize, 120s.

CASTANEDA, R. E.Q. and MALLOL, J. L. F., 2011. Plant Cell Wall Degrading and Remodeling Proteins: Current Perspectives. Biotecnologia Aplicada, 28:204-214.

CASTRO, A. M., FERREİRA, M. C., CRUZ, J. C., PEDRO, K. C. N. R., CARVALHO, D. F., FERREİRA, S. G., LEİTE, S. G. F., PEREIRAN., 2010. High-Yield Endoglucanase Production by *Trichoderma harzianum* IOC-3844 Cultivated in Pretreated Sugarcane Mill Byproduct. Enzyme Research, 10:1-8.

DESCHAMPS, F., GIULIANO, C., ASTHER, M., HUET, M. C., ROUSSOST, S., 1985. Cellulase Production by *Trichoderma harzianum* in Static and Mixed Solid-state Fermentation Reactors Under Nonaseptic Conditions. Biotechnology And Bioengineering, 27:1385-1388.

DHILLON, G. S., KAUR, S., BRAR, S. K., VERMA, M., 2012. Potential of Apple Pomace as a Solid Substrate for Fungal Cellulase and Hemicellulase Bioproduction Through Solid-State Fermentation. Ind. Crops. Prod., 38: 6–13.

DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T. H., 1980. Compendium of Soil Fungi. Academic Pres., 59(5):1007.

EVANS, H. C., HOLMES, K. A., THOMAS, S. E., 2003. Mycobiota of an Indigenous *Thricoderma* species (Sterculiaceae) in Ecuador: Assessing Its Potential for Biological Control of Cocoa Diseases. Mycological Progress, 2: 149-160.

FARID, M. A. and SHAD, K. Y., 1993. Cellulase Production on High Levels of Cellulose and Corn Steep Liquor. Zentralbi Microbiology, 148(4):277-83.

FLORENCIO, C., COURİ, S., AND FARİNAS, C. S., 2012 . Correlation Between Agar Plate Screening and Solid-State Fermentation for the Prediction of Cellulase Production by *Trichoderma* Strains. Enzyme Research. Article ID 793708: 7.

GAMS, W. and BISSET, J., 1998. Morphology and Identification of *Trichoderma*. Trichoderma and Gliocladium, 3-31.

GERBER, C.B., KAUFMANN, F., NICOLETTI, G., DALLA COSTA, M., KEMPKA, A. P., 2013. Production of Lipase Using Cassava Peel and Sunflower Oil in Solid-State Fermentation: Preliminary Study. J. Agr. Sci. Technol., 3:948.

GHERBAWY, Y. A., HUSSEIN, N. A., AL-QURASHI, A. A., 2014. Molecular Characterization of *Trichoderma* Populations Isolated from Soil of Taif City, Saudi Arabia. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci., 3(9):1059-1071.

GHOSE, T. K., 1987. Measurement Of Cellulase Activities. Biochemical Engineering Research Centre, Indian Institute of Technology, Pure Appl. Chem., 59(2):257-268.

GRASSIN C., 1993. Enzymic Liquefaction of Apples. Fruit Process, 7:242-245.

GODFREY, T. and WEST, S., 1996. Industrial Enzymology. Macmillan Press Ltd., s:609.

GOYAL, A., GHOSH, B., EVELEIGH, D., 1991. Characteristics of Fungal Cellulases. Bioresource Technology, 1:37-50.

GURUNG, N., RAY, S., BOSE, S., RAI, V., 2013. A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. Biomed. Res. Ind., 329121:18.

HAKI G. D., and RAKSHIT S. K., 2003. Developments in Industrially Important Thermostable Enzymes: A Review. Bioresource Technology, 89:17–34.

HARMAN, G. E., 2000. Myths and Dogmas of Biocontrol: Changes in Perceptions Derived from Research on *T. harzianum* T-22. Plant Diseases, 84: 377-393.

HASSAN, M., GABER, A. and HALLOUS, E.,2014. Molecular and Morphological Characterization of *Trichoderma harzianum* from different Egyptian. Wulfenia Journal, 20(20): 1-17.

HURST, P. L., NIELSEN, J., SULLIVAN, P. A., SHEPHERD, M. G., 1977. Purification and Properties of a Cellulase from *Aspergillus niger*. Biochem. J., 165.33-41.

ILAN, 2002; "ARSLAN,A., *Seülaz-Dekstran Konjugatlarinin Sentezi Ve Karakterizasyonu" YL, ARSLAN, A., 2007.*

IJAZ, A., ANWAR, Z., ZAFAR, Y., HUSSAIN, I., MOHAMMED, A., IRSHAD, M., MEHMOOD, S., 2011. Optimization of Cellulase Enzyme Production From Corn Cobs Using Altarnaria *Alternata* by Solid State Fermentation. Journal of Cell and Molecular Biology, 9:2.

INOUE, H., KITAO, C., YANO, S., SAWAYAMA, S., 2016. Production of β-xylosidase from *Trichoderma asperellum* KIF125 and Its Application in Efficient Hydrolysis of Pretreated Rice Straw with Fungal Cellulase. World J. Microb. Biotechnol., 32:170-186.

IQBAL, H. M. N., AHMED, I., ZIA, M. A., IRFAN, M., 2011. Prufication and Characterization of the kinetic Parameters of Cellulase Produced from Wheat Straw by *Trichoderma viride* Under SSF and Its Detergent Compatibility. Advances in Bioscience and Biotechnology, 2:149-156.

IRSHAD, M., ANWAR, Z., AFROZ, A., 2012. Characterization of Exo 1, 4-β Glucanase Produced from *Tricoderma viride* Through Solid-State Bio-Processing of Orange Peel Waste. Adv. Biosci. Biotechnol., 3: 580–584.

KANNANGARA, S., DHARMARATHNA, R. M. G. C. S., JAYARATHNA, D. L., 2016. Isolation, Identification and Characterization of *Trichoderma* Species as a Potential Biocontrol Agent against *Ceratocystis paradoxa*. The Journal of Agricultural Sciences, 12:51-62.

KIM, S., CHEOL, K., YOO, S. S., OH, Y., 2002. Isolation and Characteristics of *Trichoderma harzianum* FJ1 Producing Cellulases and Xylanase. J. Microbiol. Biotechnol., 13(1):1-8.

KIRAN, Ö. E., ÇÖMELEKÇİOĞLU, U., DOSTBİL, N., 2006. Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen ve Mühendislik Dergisi, 9(1):12-19.

KRISHNA, S. H., SEKHAR RAO, K. C., SURESH BABU, J., SRIRAMI REDDY, D., 2000. Studies on the Production and Application of Cellulase from *Trichoderma reesei* QM-9414. Bioprocess Engineering, 22: 467-470.

KUBICEK, C., DRUZHININA, I., 2005. Species Concepts and Biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from Aggregate Species to Species Clusters. Journal of Zhejiang University Science B., 6(2):100-112.

KUBICEK, C. P., MESSNER, R., GRUBER, F., MACH, R. L., KUBICEK-PRANZ, E.M., 1993. The *Trichoderma* Cellulase Regulatory Puzzle: From the Interior Life of a Secretory Fungus. *Enzyme Microbial Technolgy*, 15: 90-99.

KUBICEK, C., HARMAN, G., 2002. Morphology and Identification of *Trichoderma.* Trichoderma and Gliocladium, 1:3-31.

KUBICEK, C. P., 2015. Enzymes Principles and Biotechnological Applications. Assays in Biochemistry, 59:1-41.

KUHAD, R. C., GUPTA, R., SINGH, A., 2011. Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. Enzyme Research, ID280696:10.

KUMAR, K., AMARESAN, N., BHAGAT, S., MADHURI, K., SRIVASTAVA, R. C., 2012. Isolation and Characterization of *Trichoderma* spp. for Antagonistic Activity Aganist Root Rot and Foliar Pathogens. Indian Journal of Microbiology 52(2):137-144.

KUMAR,V., SANGWAN, P., SİNGH, D., 2014. Global Scenario of Industrial Enzyme Market. Industrial Enzymes., 1:174-193.

KUMAR, V., SANGWAN, P., SINGH, D., GILL, P. K.,2014. Global Scenario of Industrial Enzyme Market. Industrial Enzymes.1:1-15.

KUMAR, V., PATHAK, N., AND RASTOGI, S., 2013. Molecular Characterization of *Trichoderma longibrachiatum 21PP* Isolated from Rhizospheric Soil Based on Universal ITS Primers. African Journal of Microbiology Research, 7(41):4902-4906.

KUMAR, K., AMARESAN, N., BHAGAT, S., MADHURI, K., SRIVASTAVA, C.,2011. Isolation and Characterization of *Trichoderma* spp. for Antagonistic Activity Against Root Rot and Foliar Pathogens. Indian J Microbiol., 52(2):137–144.

LAEMLI, U. K., 1976. Cleave of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Moleküler Cloning: A laboratory Manuel. 227:680-685.

LI, P. J., XIA, J. L., SHAN, Y., NİE, Z. Y., SU, D. L., GAO, Q. R., ZHANG, C., MA, Y. L., 2015. Optimizing Production of Pectinase From Orange Peel by *Penicillium oxalicum* PJ02 Using Response Surface Methodology. Waste Biomass Valoriz., 6:13–22.

LIBARDI, N., SOCCOL, C., NETO, A. G., WANDENBERGHE, L., 2017. Domestic Wastewater as Substrate for Cellulase Production by *Trichoderma harzianum*. Process Biochemistry, 57:190-199.

MANGALANAYAKI, R. and MADHAVAN, S., 2015. Cellulase Productıon By *Trıchoderma Harzıanum* and *Fusarıum Oxysporum* Under Solid State Fermentatıon. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 4(11):1822-1828.

MAURYA, D. P., SINGH, D., PRATAP, D., MAURYA, J., 2012. Optimization of Solid State Fermentation Conditions for the production of Cellulase by *Trichoderma reesei*. Journal of Environmental Biology, 33(1):5-8.

MIETTINEN, A., 2004. *Trichoderma reesei* strains for Production of Cellulases for the Textile Industry. VVT Publications, 550:1-10.

MITTAL, A., SİNGH, G., GOYAL, V., YADAV, A., AGGARWAL, N. K., 2012. Production of Phytase by Acido-Thermophilic Strain of *Klebsiella* Sp. DB-3FJ711774. 1 Using Orange Peel Flour Under Submerged Fermentation. Innov. Rom. Food Biotechnol., 10:1-18.

MRUDULA, S. and MURUGAMMAL, R., 2011. Productıon of Cellulase by *Aspergıllus Niger* Under Submerged and Solid State Fermentation Using Coır Waste as a Substrate. Brazilian Journal of Microbiology , 42: 1119-1127.

MURTHY, P. S. and NAIDU, M. M., 2012. Production and Application of Xylanase From Penicillium Sp. Utilizing Coffee By-Products. Food Bioprocess Technol., 5: 657–664.

NASCIMENTO, R. P. D., ALVES JUNIOR, N., COELHO, R. R. R., 2011. Brewer's Spent Grain and Corn Steep Liquor as Alternative Culture Medium Substrates for Proteinase Production by Streptomyces Malaysiensis Amt-3. Braz. J. Microbiol., 42: 1384–1389.

NORONHA, E. F. and ULHOA, C. J., 1999. Characterization of a 29-kDa L-1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. Microbiology Letters,183(1):119-123.

NORSALWANI, T., LAH, T., NORULAINI, R., SHAHADAT, M., NAGAO, H., HOSSAIN, S., OMAR, M., 2016. Utilization Industrial Waste for the

Production of Cellulase by the Cultivation of *Trichoderma* Via Solid State Fermentation. Environmental Processes, 3(4): 803-814.

OLSSON, L., CHRISTENSEN T., HANSEN, K., PALMQVİST, E. A., 2003. Influence of the Carbon Source on Production of Cellulases, Hemicellulases and Pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. Enzyme and Microbial Technology , 33:612–619.

PALMER, T. and BONNER, P. L., 2011. An Introduction to Enzymes. Biochemistry, Biotechnology, Clinical Chemistry, 1:2-13.

PANDEY, S., SRIVASTAVA, M., SHAHID, M., KUMAR, V., SINGH, A., TRIVEDI, S., SRIVASTAVA, Y. K., 2015. *Trichoderma* Species Cellulases Produced by Solid State Fermentation. Journal of Data Mining in Genomics & Proteomics, 6:1-173.

PAPAVIZAS, G. C., 1985. Biology, Ecology, and Potential for Biocontrol. Annual Review Phytopathology, Trichoderma and Giocladium. 23: 23-54.

PATIL, S. R. and DAYANAND, A., 2006. Production of Pectinase from Deseeded Sunflower Head by *Aspergillus niger* in Submerged and Solid-State Conditions. Bioresour. Technol., 97: 2054–2058.

PIRZADAH, T., GARG, S., SINGH, J., VYAS, A., KUMAR, M., GAUR, N., BALA, M., REHMAN, R., VARMA, A., KUMAR, V., KUMAR, M.,2014. Characterization of *Actinomycetes* and *Trichoderma* spp. for Cellulase Production Utilizing Crude Substrates by Response Surface Methodology. Springer Plus, 3:1-622.

RAO, M. B., TANKSALE, A. M., GHATGE, M. S., DESHPANDE, V., 1998. Molecular and Biotechonological Aspects of Microbial Proteases. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62(3):597-635.

RAJAGOPALAN, G. and KRISHNAN, C., 2008. Amylase Production from Catabolite Derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 Utilizing Sugarcane Bagasse Hydrolysate. Bioresour. Technol., 99:3044–3050.

RASHAD, M. M. and NOOMAN, M. U., 2009. Production, Purification and Characterization of Extracellular Invertase from *Saccharomyses cerevisiae* NRRL Y-12632 by Solid State Fermentation of Red Carrot Residue. Aust. J. Basic Appl. Sci., 3:1910–1919.

RIFAI, M.A., 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. Mycological Papers, 116:1-56.

SAMBROOK, J. and RUSSEL, D. W., 2006. SDS-Polyacrylamide Gel Elektrophoresis of Proteins. Molecular Cloning. 3:1-3.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T., 1989. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 61(1):17-18.

SAMUELS, G. J., 1996. *Trichoderma*: A Review of Biology and Systematics of the Genus. Mycological Research, 100: 923-935.

SAMUELS, G. J., 2006. *Trichoderma*: A Review of Biology and Systematics of the Genus. Mycological Research, 100:923-935.

SARAVANAKUMAR, K. and KATHIRESAN, K., 2013. Bioconversion of Lignocellulosic Waste to Bioethanol by *Trichoderma* and Yeast Fermentation. Biotech. Original Article, 4:493–499.

SARAVANAKUMAR, K., FAN, L., FU, K., YU, C., WANG, M., XİA, H., SUN, J., Lİ, Y., CHEN, J., 2016. Cellulase from *Trichoderma harzianum* Interacts with Roots and Triggers Induced Systemic Resistance to Foliar Disease in Maize. Scientific Reports, Scientific Reports, 6(35543):1-18.

SAROJ, D. B., DENGETI, S. N., AHER, S., GUPTA, A. K., 2015. A Rapid, One Step Molecular Identification of *Trichoderma citrinoviride* and *Trichoderma reesei.* World J Microbiol Biotechnol.,31(6):995-9.

SATEESH, L., RODHE, A. V., NASEERUDDIN, S., YADAV, K. S., PRASAD, Y., RAO, L., 2012. Simultaneous Cellulase Production, Saccharification and Detoxification Using Dilute Acid Hydrolysate of *S. spontaneum* with *Trichoderma reesei* NCIM 992 and *Aspergillus niger*. Indian Journal Microbiol., 52(2):258-262.

SHAHID, M., SRIVASTAVA, M., SHARMA, A., SINGH, A., PANDEY, S., PERSOON, C. H., 1794. Disposita Methodica Fungorum. Römer's Neues Mag. Bot., 1(81): 128.

SHADID, M., SINGH, A., SRIVASTAVA, M., RASTOGI, S., PATHAK, N., 2013. Sequencing of 28SrRNA Gene for Identification of *Trichoderma longibrachiatum* 28CP/7444 Species in Soil Sample. International Journal of Biotechnology for Wellness Industries, 2*:* 84-90.

SHAFIQUE, S. and BAJWA, R., 2009. Cellulase Biosynthesıs by Selected *Trichoderma* Species. Pak. J. Bot., 41(2): 907-916.

SHANMUGAPRIYA, K., SARAVANA, P. S., MANOHARAN, M., MYTHILI, A., JOSEPH, S., 2012. Isolation Screening and Partial Purification of Cellulase from Cellulase producing Bacteria. International Journal of Advanced Biotechnology and Research, 3(1):509-514.

SHINDE, V. B., DESKMUKH, S. B., BHOYAR, M. G., 2015. Application of Major Enzymes in Food Industry. Indian Farmer, 2(6):497-502.

SIBTAIN, A., AMMARA, B., HUMA, S., MUBSHARA, S., AMER, J., 2009. Hproductıon And Purıficatıon Of Cellulose Degrading Enzymes From A Filamentous Fungus *Trıchoderma harzıanum.* Pakistan Journal of Botany, 41(3):1411-1419.

SINGH, R., KUMAR, M., MITTAL, A., MEHTA, P. K., 2016. Microbial enzymes: Industrial Progress in 21st century. 3 Biotech., 6:1-174.

SINGH, A. and HAYASHI, K., 1995. Microbial Cellulases: Protein Architecture, Molecular Properties, and Biosynthesis. Appl. Microbiol., 40:1-44

SUKUMURAN R. K., SINGHANIA R. R., and PANDEY A., 2005. Microbial Cellulases Production, Applications and Challenges. Journal of Scientific and Industrial Research, 64:832-844.

SUN, H.-Y., LI, J., ZHAO, P., PENG, M., 2011. Banana peel: A Novel Substrate for Cellulase Production under Solid-state Fermentation. Afr. J. Biotechnol., 10:17887–17890.

THOMAS, K. N., ZEIKUS, J. G., 1981. Comparison of Extracellular Cellulase Activities of *Clostridium thermocellum* LQRI and *Trichoderma reesei* Qm9414. Applied and Environmental Microbiology, 42(2):231-240.

TOPUZ, U., KIRAN, Ö. E., ve ÇÖMELEKÇİOĞLU, U., 2007. Selülaz Üreticisi *Bacillus* Suşlarının Enzimatik Özelliklerinin Araştırılması. KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi. 10(2):13-16.

URL-1,http://themoneyroller.com/2016/07/20/advanced-enzymes-technologies-limited-ipo, 05.01.2018.

URL-2, http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/. World Wide Web material prepared by G. P. Moss School of Biological and Chemical Sciences, Queen Mary, University of London, 10.01.2018.

VEANA, F., MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, J., AGUİLAR, C., RODRÍGUEZ-HERRERA, R., MİCHELENA, G., 2014. Utilization of Molasses and Sugar

Cane Bagasse for Production of Fungal İnvertase in Solid State Fermentation Using *Aspergillus Niger* GH1. Braz. J. Microbiol., 45: 373–377.

WEBSTER, J. and WEBER, R. W. S., 2007. Ascomycota. Introduction to Fungi, 8:226-247.

WEN, Z. and LIAO, W., CHEN, S., 2005. Production of Cellulase β-Glucosidase by the Mix Fungi Culture of *Trichoderma reseei* and *Aspergillus phoenicis* on Dairy Manure. Apply Biochemistry and Biotechnology, 121:93-104.

WHITE, T.J ., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J., 1990. Amplification and Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. Genetics and Evolutaion, 1:315-322.

WUCZKOWSKI M., DRUZHININA, I., GHERBAWY, Y., KLUG, B., PRILLINGER, H., KUBICEK, C., 2003. Species Pattern and Genetic Diversity of *Trichoderma* in a Mid-European, Primeval Floodplain-forest. Microbiol. Res., 158: 125–133.

YAN H., DAI Y., ZHANG Y., YAN L., LIU D., 2011. Purification and Characterization of an Endo-1,4-β-glucanase from *Bacillus cereus*. African Journal of Biotechnology, 10(72):16277-16285.

YANG, D., WENG, H., WANG, M., XU, W., LI, Y., YANG, H., 2010. Cloning and Expression of a Novel Thermostable Cellulase from Newly Isolated *Bacillus subtilis* Strain 15. Mol.Biol.Rep., 37:1923-1929.

YIN, J. S., LIANG, Q. L., LI, D. M., SUN, Z.-T., 2013. Optimization of Production Conditions for Mannanase Using Apple Pomace as Raw Material in Solid-State Fermentation. Ann. Microbiol., 63:101–108.

ZAMPIERİ, D., GUERRA, L., CAMASSOLA, M., DILLON, A.J., 2013. Secretion of Endoglucanases and β-glucosidases by *Penicillium echinulatum* 9A02S1 in Presence of Different Carbon Sources. Ind. Crops Prod., 50:882–886.

ZENG, R., YAN, X., RUAN, T., HU, Q., HOU, L., YU, Z., HUANG, H., YANG, Z., 2016. A Novel Cellulase Produced by a Newly Isolated *Trichoderma virens.* Bioengineering, 3(2):1-13.

ZHANG, X. Z. and ZHANG, Y. H. P., 2013. Cellulases: Characteristics, Sources, Productıon and Applıcatıons. Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers, 1:131-146.

ZHOU, Y., HERNANDEZ, F., KHAN, T. M., LIU, J. C., SHIM, J. W., DINDAR, A., YOUNGBLOOD, J. P., MOON, R. J., KIPPELEN, B., 2013. Recyclable Organic Solar Cells on Cellulose Nanocrystal Substrates Sci. Rep., 3(1536):1-5.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	**:**Mümine GURUK
Uyruğu	**:** T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi	**:**Batman 20.05.1992
Telefon	**:**05413737033
e-mail	**:** mguruk@harran.edu.tr

EĞİTİM

Derece	**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	: Batman Fatih Lisesi, Merkez,Batman	2009
Üniversite	: Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Merkez, Adana	2015
Yüksek Lisans	: Harran Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Merkez, Şanlıurfa	2018

İŞ DENEYİMLERİ

UZMANLIK ALANI : Gıda Mühendisliği

YABANCI DİLLER : İngilizce

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

EKLER

EK1 T1 İzolatının Gen Dizilimi

ATGGATCTACTGATCGAGGAAAATTTGGGAAGTTGGGAGTGTAACGGCT
GTGGTACGCGTCGCGCTCCCGATGCGGGGGTGAAAACTACTGCGCACGA
TAGGTTGCGGGTAGACCGCCACTGTATTTCGGAGACGGGCACCGCCAGA
GGCAGGGCCGATCCCCAACGCCGACCCCCCGGAGGGGATCGAGGGATGA
AATGACGCTCGGACATGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGT
GCGTTCAAAGATTCGAGGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTAT
CGCATTTCGCTGCGGTCTTCCTCGCATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGT
TGAAAGTTTTGATTCATTTTCGAAACGCCTACGAGAGGCGCCGAGAAGGC
TCAGATTATAAAAAAAAAACCCGCGAGGGGGTATACAAAAAGAGTTTTGG
TTGGTCCTCCGGCGGGCGCCTTGGTCCGGGGCTGCGACGCACCCGGGGCA
GAGATCCCGCCGAGGCAACAGTTTGGTAACGTTCACATTGGGTTTGGGAG
TTGTAAACTCGGTAATGATCCCTCCGCAGTTACCCCTACCAAATT

EK2 T2 İzolatının Gen Dizilimi

GGGAAAAAACTTCTGGCGCTAGCACGGAGCGCACTTACACACTGAGTAT
AACTTCTAGGATAATACATATACACAATCAGATTATTTAAATCTCCTCCC
AACGGATCTCTTGGCTCTCGCAACGATGAAGAACGCAACGATCCGCGAT
ACGTCCTGGAAGCCGCCGTGAACCATCAATTTTCCAACGCACATTGCATA
CAGGGAGGGTGGGGTGAGTCTACTCTCACTATCGTGGTTTAAATACAAAG
GATGACTAATAAAACCGTCACCCCCCATTTTTTCCCCCCCCCCCCCTTATA
ATCCCCTGATCTTATGAATATTATTAATACGGAGGAGAAATGGCGGGCAT
GCCTGTCCGATCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTCGGCGT
TAGGGATCGGCCCTGCCTCTGGCGGGGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGTC
GGCTCGCCCCAGCCTCTCCTGCGCAGCAATTCGCACGCTCTCATCGGGAG
CGCGGCGCGTCCACAGCCGTTAAACACCCAACTCCTGAAATGTTGACCTC
GGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGGAG
GAAATGNNNTTTTTTTTTTTTTTTTGGCACGGCGTAGACACATAGTATAT
TTTTCCTTTCAACTTATATTAGAATATGATAGATAATAAAAATCAACTTA
AAATCAGAAGGGACCACATACCGATTTCCGTATTAGTGAATTTTCGTTTT
ATAATTTATTTTAATTTATCAAAACTTCTCTTCTCATTGTAATTCTATTTAT
GTATTTTAATATTTATAGCTAATATAATCTTATACCTTCGAACAATAAATT
TCAGTATAGGGTAACTTCGTGTAATATGCAGAATTCAAGAAACCGCATTG
TTATACCTGCAGGCTATGTTTGATTTCCCGCGTCGGGAAAGAGAGTGTGC
TCATGCGACTGTCTACCCCGAACACTCGGTTTTCTTTATATAGTTGTTATA
TTGTAATATAACTTCGCCCTGCCCTCAAACTGCTTTCTTATTATATCTTCT
GATGTTGTAACTGCGACGAATTTCTATACAGTTTTCCCTACATTTCTTATT
TTTACTCCGTGACCGTACATATATTCGTGCTCAGTTAGTTTGTGAAGTTTG
GGTGTATTTATATTTGTTATATGTTATGGATAAGTCAGTTTTGATTTGGTC
TTTACATAACTCATTTCTTGATTGCCTTCCGTAGGGCTGACGTTTATTTTT
GATATGTTGTTTTTGTGTTTTTGATTTCCTTGTGTTCTGACTGCTTGTGGAT
TCATTTAAGTCCTGGTTAGTTTTTGCTATATCGTAACATATTTTTATAATG
TAGTTGTTTTTTCTACTTCCTTCCGTGTTAGTATGTTTGTGTGTGATG

EK3 T4 İzolatının Gen Dizilimi

GGAACCGGGGTATCTGAGGGGAGCGCGAGGAGACATTGTGGGGAGTGAC
GATTGTATTACTTCTCCTTTGTATTTACCCCACGATAGAGAGAGTACACTC
ACCCCACCCTCTGTGTGTGCTGTGCGCGCTCGAAATTTGATGGCTCACGG
CGTCTTCCGAGACATCTCGCATATCTCTGCTCTCTTCCTCGGCGCGAGAGC
CAAGATATCCGGTGAGAGGAGATTTATAAACTGATATTGGGTATGTGTTA
TCCTCTAAGATATACTCTTCGTGGATTAGCTGTCCTCCGATAGCCGCCTAT
TCTTTTTGATCTTCCTGCAGGCTCTTCTCCAGAAAAATCCAAGAGATCCGT
TGTT**G**ATAGTTTTGATTACTTTTCCAAACGCTTACCAGAGGCTGCTAGAA
CGCTGACATTATCATACCACCCCCGCGACGGAGGTCCGACACGAATTACC
GCTGGCCCTCCGAGCAACACATTGGTCCCGCCTAGGACTGCACCATGGGA
CAGAACCCGCCCACGGCTCAGTATTGGTACGTTCGCATTGTCTCTTGGCA
AAGGAAAACTTCGTAATGATCCCTCCGCAGGTCCCCCCACAAAAAAGCT
GCTTTTTTGTTCCATTTCTTTTGTTTGTCCCCCTTGTGTTTGATTTCCCTGT
ATCTCGTCTTTGTTTTTCTATATGCTTCTATTATTTCTTTCCCTTTAGTTAT
ATTTTTTCCGCCCGTTGTCATTACATTCGTCGACCTCTCTTTTTGCCGCGTT
TGGTTTTTCTGCGTTTTTTTGTTTTGATGATTATTCTCTGATATTCCGATTA
TATCAATCCCGATATGATGCTTCGTCGATTACCCGACTCCACTGAGCCTTT
TATTTTCGTAGTATGTTGGCTCCTTTGGTTTTTGCTTCTTAGGTCAATTTCG
CCTCAAAGCTTGTTTGAGTTGTTTCGGATTTACCCTGCGTTTTGCGTTGTC
GTTTTTCTTCTCCTTCTGTTTTCTGTTGTACTGTCCGTTATCTTGTGTTTTGT
GTGTAATGTGAGCTTGTTTTATGGTTGTCTTCATTATCGTGGTTGTTATTG
CTCGTCTTTATGCTTTCTGTTAGAAGGACGTACCATTCTATGCGTCTCTTA
TTGTCTTGCATTGCATTT

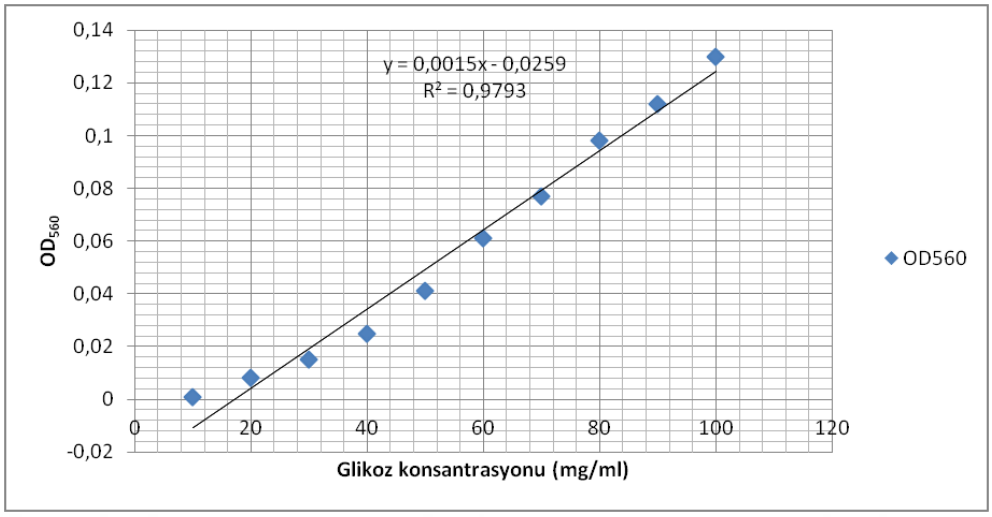
EK4 T5 İzolatının Gen Dizilimi

GCCCTTTCTATTCTTTATACGGGAACGGGAGGAGACATGTTGGGGGGATG
TGATTGTATTAGGTCTTCTCTGTATTTAGCTCCCTATAGTGAGAGGACACT
CACCGCCCCCTCTCTGTATGCAGTGTGCGTTCAAAGTTTTGTGGCTCCCGG
CGTCTTCCGAGGCATCTCCCATCTCTCTGCTCTCTTCCTCTGCGAGAGACC
AGAGATGATCCGGTGAGAGGACATTTATGACCTGCGAGTGGCTGTGTGG
TATCCTCTAAGATCTACTCTCCGAGGATTAGCGGTCTTCCGGCAGCCGCA
TATCTTTTTTGATCTCCCTGCGGGCTCCCTCACAGACAAAACCAAGAGAT
CCGTTGTTGATAGTTTTGATTCATTTTCCAAACGCCTACGACAGGCGCCA
AGAAGGCTCCCATTATATAATACAACCCCCGAGGGGGTATACAAAAACA
GTTTTGGCTGGCCCTCCGGCGGGCGCCTTGGTCCGGTGCTGCGACGCGCC
CGGGGCAGAGATCCCGCCGACGCCTCCGTTTGGGAACCTTCACATTGGGT
TTGGGAGCTGTAAACTCGGTAATGATCTCCTCCGCAGGTTCACCCTACAG
AAAACTATTCTTTCTAAATCTCTCCTCACTTCTTTTACGCGAACCATTTAA
CCCACGCTTACTGTTCCCGTATTCCTATGATTACTCTCACCGTCTTTGTCC
CCACTATGTCTTTTACTCTTTTTTTTCTTTTTTTCCCTTTGTAATCTCCGTCC
CCCTCCTCCCTTCTCCTTTCTCTCCTCTTCTTTCGCCTGTCTTTCTTTGAATC
CTCCTAGTCTTTAGGATGCTGTTTTAAGGTTCAGTATGCGCATGCGTTCCG
GTGATAACATTTCTTCTTTGCTGTTTCCGGTTCGTGTACGCGCTACGAGAG
TTTCCGTCTGATGTCAACTTGCTTACATATAACCGGCGTTATACACAGTA
ACATCATACTAAAGGTGCTGCCCGCCAGGAAACCCTTCTATTAAGGCTAG
TGTGGGTTGAGGACGTTCTGATTTCTCACTGGGGCGGCGCTCCCGTTGTT
ACTTTATCCCTTTTACGTTCCGTTTTTTTTTTCTTGTTTTTTTTGGTTTTGGG
TGTTTTTTGGTTGTGGGTTTTGGAGGTCTGCTGTCTCTCTCGATTGTTTACT
ATAAGTTCGGTCGGGGTGTGTTGTGTATGTTTGCACGGATACATGGAGGT
CGACGTGAAGGATTTAGGGAACTCTCATTTTAGATTTTTGTTATAGTCCTG
CCTGTTGTTCCGAATATAGTTTTATACTTGGAAATTTTAGTGGATCTGTTC
TGGTTGCCCAGGGTACTACTTTTACGGAGTTTTGTCTTCATGCTCACGTGC
TGTCTACCTCATGCTG

EK5 T6 İzolatının Gen Dizilimi

GGGAAATACCTTCTGGCGCTATCCGGAGCGCACTTACACACTGAGTATAA
CTTCTAGGATAATACATATACACAATCAGACCCTTTTAATCTCCTCCCCAC
GGATCTCTTGGCTCTCCCAACGATGAAGAACGCAGCGATCCGCGATACCT
CCTGGAAGCCGCCGAGAACCATCAATTTTCCAACGCACATTGCATACAGG
GAGGGTGGGGGGAGTCTACTCTCACCATCGTGGTTTAAATACAAAGGAT
GACTAATAAAATCGTCAACCCCCATTTTTTCCCCCCCCCCCCCCTATAACC
CCCTGATCTTATTAATATTATTAAAAGGAGGAGAAAAGGCTTAGGTACCT
ATCCCTATCTCTAGTTCTGACCTTCCTATGGATACGGATTGGACGGCACA
GCCGAATAGACCTTGCCTCGAGGCCGGAGCGCGGATAGCATTCCACTATT
TTCTATATCCTGCCCACCTTCTACCATATTCTTTATTTTTTTCTATCTTGTT
GTCAAAAGTTCGTACTTATGACGTCCGGAGAACTTCCACAATTTATTAAA
ACATCTTCCTTATTTTTTGTCTCCAATCACTCACTCTTATTATCCTTCATTA
TCTAATCATCATTCCTAAACTTTCTTCTTAATTTTAACTTTACTAGCTCCA
GCCAACTCTATTATTTCCGCTTATTTCTTCTTTCCTTCTACCACTTCTTTAC
AACTCTACCGCCTTATTCTCTCTAGCCAATCTTAAATTACCCAGACCTCAA
GCCAACAACAGAATACTATTTAAATTTACTCTTATTAATTTACCTCTCCTC
AATTGTGGATATTTATACTCCTCTTCTATTACTTTCTCTTGTTACCCTTTGT
CTTCTCTCCGGTATAATTTTGACCCGCCCCCCCGATTAGCCTGAGTTCCGT
CTAGTTAATACTTCTGTACCTAGACTAGTCGTTTGACACCCAGCATCAGG
GACGCCGAAAGCTCTTGCATAAATATTCTCTGTTGGATGCCAAAATATAA
AGAATAAAAATATCTGTAACTATATCTACCTCCCACAGAAAATACTGTAT
AACACTAATATCCCATCTTTTTGTTTCTTCCATCTGGATTTAATATTGACT
GTTCCTCAGTAACGTATTAAACCCCTCACACCTCCTCTCTCCGTAACGCG
GAATATGTGATCGACCGCGAAAATCATCACAAATCTATAATGCAGAACG
TAGGTATTTGAATTTATTCTATTTTATTTGTCTATGGTTGTTACACCTGATT
TTTATTATTATTTTTTGATTTAGTTTGACGTGTGATAAAAACGCTATGCGT
GTTTCATAGATAAATAATAATCATTAAGACTTGGCATACTTAACAGAGTC
TA

EK6 Glukoz Standart Grafiği



EK7 Kullanılan Çözeltiler

DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

TE (Tris Cl,EDTA) buffer: 2ml EDTA (pH:8) ile 1ml Tris-Cl distile suyla 100 ml tamamlanmıştır.

TNE (Ekstraksiyon) buffer: 20mM TrisHCl (pH:8.5), 250mM NaCl, 2mM EDTA ile hazırlanmıştır.

Sodyum asetat tamponu: 3M sodyum asetat tamponu hazırlanmış, pH:5.2'ye ayarlanmıştır.

SDS-PAGE Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

2X SDS-gel loading buffer: 100mM Tris-Cl (pH:6.8), %4 SDS (g/L), %0.2 (g/L) bromfenol mavisi, %20 (L) gliserol, 200mM dithiothreitol (DTT), 200mM β-mercaptoetanol ile hazırlanmıştır.

%10 Amonyum Persülfat çözeltisi:1g amonyumpersülfat distile suda çözündürülmüştür. Çözelti 4ºC' de muhafaza edilmiştir.

%10 SDS çözeltisi: 10g SDS (Sodyum dodesil sülfat) 80mL suda çözündürülmüş hacim 100mL' ye tamamlanmıştır.

Tris-Cl (pH:6.8): 1M çözelti için 121.1g Tris 800mL distile suda çözündürülmüştür. HCl ile pH: 6.8' e ayarlanmıştır.

Tris-Cl (pH:8.8): 1M çözelti için 121.1g Tris 800mL distile suda çözündürülmüştür. HCl ile pH: 8.8' e ayarlanmıştır.

%30 akrilamid: 29.22 g acrylamide and 0.78 g of bisacrylamide 100mL suda çözündürülmüştür. Çözelti filtre kağıdı ile süzülmüştür ve 4ºC'de muhafaza edilmiştir.

Tris glisin buffer (5X): 15.1g/L Tris, 94g glisin, 50mL %10 SDS ile hazırlanmıştır. Daha sonra kullanılmak üzere 1X seyreltilmiştir.

Boya çözeltisi: 0,06 g Coomassie-brilliant G-250 mavisi, 100 mL asetik asit (glasiyel) ve 900 mL saf sudan oluşan çözeltidir. Oda sıcaklığında aylarca saklanabilir.

Yıkama çözeltisi: 250 mL asetik asit (glasiyel), 2250 mL saf sudan oluşur.

Enzim Aktivitesi Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

0.05M Sodyum sitrat tamponu: 0,17 g Na-sitrat ve 0,49 g sitrik asit kullanılarak 1L hacimde hazırlandı.

%0.2 Glikoz çözeltisi: 2 mg/mL glukoz çözeltisi hazırlandı.

DNS (Dinitrosalisilik asit) reaktifi: 1g DNS 20mL 2M NaOH içerisinde çözündürülmüştür. Karışım kaynar suda üzerine 50mL distile su ilave edilerek çözündürmeye devam edilmiştir. tamamen çözünme gerçekletikten sonra 30 gr K-Na- tartarat ilave edilip hacim 100 ml' ye tamamlanmıştır.

%1 CMC çözeltisi: 1 g CMC'nin 90-95 °C'ye kadar ısıtılmış 100 mL 0,05 M sitrat tamponu (pH 5,0) içine yavaş yavaş ilave edilmesi ile hazırlanmıştır.