



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
FEN BİLİMLERİ BÖLÜMÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

SELÜLAZ ÜRETİCİSİ TERMOFİLİK FUNGUSLARIN
İZOLASYONU VE ENZİMİN KATI KÜLTÜR FERMENTASYONU
İLE ÜRETİMİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Salih TUNÇEL

Danışman: Prof.Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI

TOKAT-2023



Tez çalışması; Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 2022/30 numaralı proje ile desteklenmiştir.

ETİK SÖZLEŞME

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof.Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI danışmanlığında hazırlamış olduğum “Selülaz Üreticisi Termofilik Fungusların İzolasyonu ve Enzimin Katı Kültür Fermentasyonu ile Üretimi” adlı Yüksek Lisans tezinin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

... / ... /2023

SALİH TUNÇEL

ÖNSÖZ

Son yıllarda endüstrinin birçok alanında enzimler kullanılmaktadır ve dünya genelinde endüstriyel enzim pazarı her yıl büyümektedir. Mikrobiyal selülozlar kâğıt, tekstil, deterjan, biyoyakıt üretimi, gıda ve yem sanayi, tarım ve bira gibi çeşitli endüstrilerde uygulama potansiyeline sahiptir. Enzim sisteminin karmaşıklığı ve muazzam endüstriyel potansiyelden dolayı, selülozlar hem akademik hem de endüstriyel araştırma grupları tarafından araştırma için potansiyel bir adaydır. Günümüzde, selüloz üretiminin güncel bilgisine ve özellikle çeşitli endüstrilerin proses ekonomisini geliştirme yönündeki selüloz araştırmalarındaki zorluklara dikkat çekilmektedir.

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübesi ile bana her konuda yardımcı olan ve yol gösteren tez danışmanım Sayın Prof.Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI 'ye ve bu projeyi tamamlamama ve araştırma çalışmaları için gerekli Endüstriyel Mikrobiyoloji ve Biyoteknoloji laboratuvar olanakları için Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Biyomühendislik bölümüne ve projeyi gerçekleştirmek için destek veren Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimine teşekkür ederim.

ÖZET

SELÜLAZ ÜRETİCİSİ TERMOFİLİK FUNGUSLARIN İZOLASYONU VE ENZİMİN KATI KÜLTÜR FERMENTASYONU İLE ÜRETİMİ

Tunçel, Salih

Yüksek Lisans, Biyomühendislik ABD.
Tez Danışman: Prof.Dr. Bilge Hilal Çadırcı
Ağustos 2023, 60 sayfa

Selüloz biyokütle, selülotik enzimlerle hidrolizi ile monomerik şekerlerin üretiminde, potansiyel yenilenebilir kaynaklardır. Endoglukanaz, ekzoglukanaz ve β -glukozidaz enzim karışımlarından oluşan selüloz enzimi, bu enzimlerin sinerjik etkileriyle selülozu glikoza kadar parçalar. Bu enzimler başta mantarlar olmak üzere çok çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilebilmektedir.

Bu çalışmada, Tokat ili sınırları içerisinde bulunan orman topraklarından ve kampüsümüzde bulunan kompost üretim tesisinden alınarak zenginleştirilen örneklerden, karboksimetil selülozu (CMC) en yüksek oranda hidroliz eden selüloz aktivitesine sahip termofilik fungus *Aspergillus fumigatus* izole edilmiştir. 18s rRNA dizi analizi analizi sonucunda *A. fumigatus* BHC05 olarak adlandırılan termofilik fungusun sahip olduğu ekstraselüler selüloz enziminin katı kültür fermentasyonu ile üretim parametreleri optimize edilmiştir. Karbon kaynağı, azot kaynağı, nemlendirme oranı, yüzey sürfektan ektisi ve üretim süresi belirlendikten sonra üretilen enzimin pH (3.0-4.0 – 5.0 – 6.0 – 7.0 – 8.0 – 9.0- 10.0), sıcaklık (30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70 °C, 80°C, 90°C) ve termal stabilitesi (24 h – 96 h – 336 h) gibi özellikleri araştırılmıştır. Selüloz aktivitesi kantitatif olarak CMC substratı kullanılarak DNS yöntemiyle spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

Termofilik fungus %0.1 (v/v) tritonX100 yüzey sürfaktan, 1:1 (w/w) oranda nemlendirme sıvısı, portakal karbon ve NaNO₃ azot kaynağı olan SSF ortamında enzimin optimum aktivite 3. günde üretilen enzimi ile substratı (%v 1w/ CMC) pH 5.0, 50 °C de ve 60 dk inkübasyon sonucunda DNS yöntemiyle bakılan enzim aktivitesi 2870 U/mL göstermiştir. Termofilik fungus SSF ortamında üretilen selülozın enzimatik özellikleri de değerlendirilmiştir. Buna göre enzimin optimum aktivitesi pH 6.0 ve sıcaklık 70 °C’de göstermiştir. 30°C – 40 °C- 50°C- 60°C de 15 gün boyunca aktivitesinin %80’ini korumuştur. Bu çalışmayla termofilik fungusun ürettiği selülozın aktivite verimlilik nedeniyle endüstriyel alanında kullanılması için iyi bir potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Selüloz, Termofilik Fungus, *Aspergillus fumigatus*, Karboksimetil Selüloz

ABSTRACT

CELLULASE MANUFACTURE INSULATION OF THERMOPHILIC FUNGUS AND PRODUCTION OF ENZYME BY SOLID CULTURE FERMENTATION

Tunçel, Salih

Master's Thesis of Bioengineering

Advisor: Prof.Dr. Bilge Hilal Çadırcı Efeli

August 2023, 60 pages

Cellulose biomass is a potential renewable resource for the production of monomeric sugars by hydrolysis with cellulolytic enzymes. Cellulase enzyme, which is composed of endoglucanase, exoglucanase and β -glucosidase enzyme mixtures, breaks down cellulose to glucose with the synergistic effects of these enzymes. These enzymes can be produced by a wide variety of microorganisms, especially fungi.

In this study, thermophilic fungus *Aspergillus fumigatus*, which hydrolyzes carboxymethyl cellulose (CMC) at the highest rate, was isolated from the forest soils in Tokat province and the samples enriched from the compost production facility in our campus. As a result of the 18s rRNA sequencing analysis, the production parameters of the thermophilic fungus named *A. fumigatus* BHC05 were optimized by the solid culture fermentation of the extracellular cellulase enzyme. After determining the carbon source, nitrogen source, moistening ratio, surface surfactant effect and production time, the pH of the enzyme produced (3.0-4.0 - 5.0 - 6.0 - 7.0 - 8.0 - 9.0 - 10.0), temperature (30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C) and thermal stability (24 h – 96 h – 336 h) were investigated. Cellulase activity was quantitatively measured spectrophotometrically by DNS method using CMC substrate.

Optimum activity of the enzyme in SSF medium with thermophilic fungus 0.1% (v/v) tritonX100 surface surfactant, 1:1 (w/w) moistening liquid, orange carbon and NaNO₃ nitrogen source and substrate (1.0% w/v) CMC) at pH 5.0, 50 °C and 60 min incubation, the enzyme activity measured by DNS method showed 2870 U/mL. The enzymatic properties of cellulase produced in thermophilic fungus SSF medium were also evaluated. Accordingly, the optimum activity of the enzyme was shown at pH 6.0 and temperature 70 °C. It preserved 80% of its activity for 15 days at 30°C – 40°C – 50°C – 60°C. In this study, it has been shown that the cellulase produced by the thermophilic fungus has a good potential to be used in the industrial field due to its activity efficiency.

Keywords: Cellulase, Thermophilic Fungus Isolation, Carboxymethyl and Cellulase Activity

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ	xi
ÇİZELGE LİSTESİ	xii
SEMBOL LİSTESİ.....	xiii
1.GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLER.....	3
2.1. Lignoselüloz	3
2.1.1. Selüloz.....	3
2.1.2. Hemiselüloz.....	4
2.1.3 Lignin.....	5
2.2. Selülotik Enzimler.....	6
2.2.1. Selülotik enzimlerin moleküler yapısı.....	6
2.2.2 Selülaz aktivitesinin mekanizmaları.....	10
2.2.3 Selülaz enzimlerin sınıflandırılması.....	11
2.2.4 Kompleks selülotik sistem (çoklu selülazlar)	12
Endoglukanazlar.....	13
Selobiyohidrolazlar.....	14
β -glukosidazlar.....	15
2.3 Selülaz Üreten Mikroorganizmalar	16
2.4 Fermentasyonla Selülotik Enzim Üretimi.....	17
2.5. Selülaz Enzimin Uygulamaları.....	21
2.5.1. Gıda ve Hayvan Yemi.....	21
2.5.2 Selüloz ve Kâğıt Endüstrisi.....	21
2.5.3. Tekstil Endüstrisi.....	22
2.5.4. Biyoyakıt.....	22
2.5.5. Şarap ve Biracılık Endüstrisi.....	23
2.5.6. Tarım Endüstrileri.....	24
3. MATERYAL VE METOD.....	26

3.1 MATERYAL.....	26
3.1.1 Ekipmanlar.....	26
3.1.2. Besiyerleri ve çözeltiler.....	27
3.2 METOD.....	28
3.2.1 Selülaz Enzimi Üreten Küf İzolasyonu	28
3.2.2 Termofilik Fungusların Üretimi ve Spor Eldesi.....	29
3.2.3 En yüksek selülaz aktivitesine sahip olan küfün moleküler tanılanması.....	30
3.2.4 Katı Kültür Fermantasyon (SSF).....	30
3.2.5 CMC-Selülaz Enzim Aktivitesini Spektrofotometrik Olarak Ölçümü.....	30
3.2.6 Katı Kültür Fermantasyonda (SSF) Optimum üretim koşulların Belirlenmesi.....	32
Farklı Karbon Kaynaklarının Enzim Sentezi Üzerine Etkisi.....	32
Farklı Azot Kaynaklarının Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	32
Farklı Oranlarda Nemlendirme Sıvısının Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	32
Farklı Yüzey Sürfektan Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	32
3.2.7. Enzim özelliklerinin değerlendirilmesi.....	33
Optimum sıcaklık değerlerinin belirlenmesi.....	33
Optimum pH değerlerinin belirlenmesi.....	33
Termal (Sıcaklık) stabilitelerinin belirlenmesi.....	33
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	35
4.1.Ekstraselüler Selülaz Enzim Sentezleyen Mikroorganizmaların Belirlenmesi.....	35
4.2 SSF'deki Üretim Koşullarının <i>A. fumigatus</i> BHC05 Selülaz Enzim Sentezi Üzerine Etkisi	37
4.2.1. Üretim süresi	37
4.2.2 Nemlendirme sıvısının etkisi.....	38
4.2.3 Farklı Karbon kaynaklarının enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	38
4.2.4. Uygun azot kaynağı seçimi.....	39
4.2.5 Yüzey süfektan etkisi.....	40
4.3. Termofilik Fungusların SSF Üretilen Selülaz Enzimatik Özellikleri.....	40
4.3.1 Selülaz enzimine ait optimum sıcaklık değerleri.....	40
4.3.2. Selülaz enzimine ait optimum pH değerleri.....	41
4.3.3. Selülaz enzimin termal kararlılıkları.....	42

5. TARTIşMA VE SONUÇLAR.....	43
6. KAYNAKLAR.....	48



ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Selülozun yapısal olarak tekrar eden sellobiyoz birimleri.....	3
Şekil 2.2. Kristalin ve amorf selülozun mikrofibril içinde nasıl dağıldığına dair iki farklı görüş	4
Şekil 2.3 Lignin ana yapısındaki fenil propan monomer üniteleri.....	5
Şekil:2.4 Selülazın üç temel bölgeleri	7
Şekil:2.5 Selüloz kristallerinin I α allomorfundaki (Valonia kristallerinde bulunur) selüloz zincirlerinin organizasyonunun ve oluşan tam kristalin şekli.....	8
Şekil 2.6. (A) Enzimatik glikozidik bağ hidrolizinin ters çevirme ve (B) tutma mekanizmasının şematik gösterimi.....	10
Şekil 2.7: Endoglukanazların yapısı.	14
Şekil 2.8: Selobiyohidrolazın yapısı.	15
Şekil 3.1 Zenginleştirme Besiyeri.....	28
Şekil 3.2 A ve B Spor süspansiyonları elde edilmesi, C Işık mikroskop altında thoma lam ile sayımı.....	29
Şekil 3.3. Maltoz standart grafiği.....	31
Şekil 4.1. Hedef şuşun taranması.....	35
Şekil 4.2 Işık mikroskobu ile fungusun görüntüsü.....	36
Şekil 4.3 16s rRNA dizi analizi sonucu elde edilen nükleotid dizisi.....	36
Şekil 4.4. A. <i>famigatus</i> BHC05 izolatının soy ağacı.....	37
Şekil 4.5. SSF kültürlerinde üretim süresinin selülaz aktivitesine etkisi.....	37
Şekil 4.6. SSF kültürlerinde nemlendirme oranının selülaz aktivitesine etkisi.....	38
Şekil 4.7. SSF kültürlerinde karbon kaynağı selülaz aktivitesine etkisi.....	39
Şekil 4.8. SSF kültürlerinde azot kaynağı selülaz aktivitesine etkisi.....	39
Şekil 4.9. SSF kültürlerinde yüzey sürfaktan kaynağı selülaz aktivitesine etkisi.....	40
Şekil 4.10. Enzim aktivite üzerindeki sıcaklığın etkisi.....	41
Şekil 4.11. Enzim aktivite üzerindeki pH'n etkisi.....	41
Şekil 4.12. Selülaz termal stabilitesi	42

ÇİZELGE LİSTESİ

sayfa

Tablo 2.1: Fosforik asitle şişmiş selüloz (PASC) üzerinde birkaç saflaştırılmış <i>Humicola</i> selülazı için görünen kinetik sabitler.....	9
Tablo 2.2: <i>Trichoderma</i> , <i>Humicola</i> ve <i>Penicillium</i> 'un temsili suşlarından selülaz bileşenlerinin dağılımı.....	12
Tablo 2.3. Selülaz üreten mikoorganizmalar.....	16
Tablo 3. 1 Kullanılan ekipman ve markaları.....	26
Tablo 5.1 <i>Aspergillus famigatus</i> tarafından pH, sıcaklık ve üretim ortamında üretilen selülazın enzim aktivitesi önceki çalışma sonuçları ile karşılaştırılması.	45

SEMBOL LİSTESİ

G	Gram
mM	Milimolar
μL	Mikrolitre (10^{-6} litre)
μm	Mikrometre (10^{-6} metre)
μg	Mikrogram (10^{-6} gram)
rpm	Rotary Per Minute
KSF	Katı Substrat Fermentasyonu
CMC	Karboksimetil Selüloz
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat Derece
EU	Enzim Ünitesi
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat

1.GİRİŞ

Enzimler kimyasal reaksiyonlarda değişikliğe uğramadan reaksiyon hızını arttıran maddelerdir. Enzimler olmaksızın çoğu reaksiyon biyolojik sistemlerde var olandan daha yüksek sıcaklık ve enerji düzeylerine ihtiyaç duyarlar. Enzimler diğer moleküller için özellikli bağlanma bölgelerine sahip proteinlerdir. Zayıf bağlanma reaksiyon hızını arttırmak için enzimlere büyük olanak sağlar. Bugün enzimoloji biyokimyasal çalışmaların merkezini oluşturmaktadır. Enzimler besin üretimi, gen klonlama ve ileri tedavi tekniklerine kadar birçok alanda (özellikle mikrobiyal endüstri ve genetik) yaygın uygulama alanı bulunmaktadır (Lerner ve ark., 2003).

Selüloz, selülozun β -1,4-glikozidik bağlarını parçalayan bakteri, fungus ve bazı protozoa türleri tarafından salgılanan bir enzim türüdür. Selüloz-hidroliz edici enzimler (yani selülozlar) üç ana gruba ayrılır: selobiyohidrolazlar (Ekzoglukanazlar), endoglukanazlar (CMCazlar) ve β -glukozidaz. CMCazlar selüloz zincirinin iç bağlarının rastgele olarak ayrılmasını katalize ederler. Selobiyohidrolazlar zincir uçlarına parçalar ve sellobiyoz bırakır. B-glukosidazlar yalnızca selo-oligosakaritler ve sellobiyoz üzerinde etkindir, sellobiyozdan glikoz monomer birimlerini serbest bırakırlar (Jiang ve ark., 2011).

Anaerobik, aerobik ve mezofilik bakteriler, ipliksi funguslar, termofilik, alkalifilik bakteriler ve aktinomisetler ve bazı protozoalar selüloz kullanan popülasyonu oluşturur (Lekh Ram ve ark., 2014). Selülozlar çoğunlukla *Aspergillus*, *Trichoderma* ve *Penicillium* gibi funguslar tarafından üretilir. Şimdiye kadar, selülozların üreticisi selülozik mikroorganizmalar ile yapılan çalışmaların çoğu ipliksi funguslara, özellikle *Trichoderma* ve *Aspergillus* türleri, örneğin *Trichoderma reesei* ve *Aspergillus niger* üzerine odaklanmıştır (Tang ve ark., 2012).

Lignoselülotik enzimler, lignoselülozik polisakkaritleri parçalama yeteneklerinden dolayı endüstriyel proseslerle ilgi konusu haline gelmiştir (Paramjeet ve ark., 2018). Ticari enzimlerin çoğu mezofilik mikroorganizmalardan elde edilir. Yüksek sıcaklıkların kullanıldığı endüstriyel prosesler giderek daha yaygın hale geldiğinden, endüstriyel kullanım için termostabil enzimlerin tedarikine ihtiyaç duyulmaktadır.

Termofilik mantarlar, yüksek sıcaklıklarda aktivite gösteren enzimler üretirler ve genellikle daha yüksek termostabiliteye, pH değişimine karşı geniş toleransa ve denatüre edici ajanlara karşı daha fazla dirence sahiptirler. Lignoselülozik materyalin hidrolizinin yüksek sıcaklıklarda yürütülmesinin avantajı, mezofil mikroorganizmaları tarafından kontaminasyon riskini azaltmaktır. Ayrıca ortam viskozitesinde artış ve daha iyi substrat çözünürlüğü, daha yüksek kütle transfer oranı artışını sağlamaktadır (Moretti ve ark., 2012).

Selülozlar biyoteknolojik uygulamalarda ve endüstride geniş bir uygulama alanına sahiptirler. Selülitik uygulama alanların bazıları gıda, yem, şarap, deterjan, tekstil, kâğıt ve tarım endüstrisidir. Selüloz enzimi ticari öneme sahip olmasına rağmen üretim maliyetinin yüksek olması, selülozun dönüşümü için endüstride enzimin kullanımını kısıtlamaktadır. Bu nedenle daha stabil ve aktif enzimler için yeni ve farklı mikrobiyal selüloz kaynaklar üzerine yapılan araştırmalar artmaktadır (Karmakar ve Ray, 2011).

Bu çalışmada, Tokat çevresinde bulunan orman toprağı ve Taşlıçiftlik kampüsünde bulunan “Kompost Üretim Tesisi”nde üretilen kompostlardan, yüksek aktiviteli selüloz üretebilen termofilik fungus izolasyonu yapılmıştır. En yüksek enzim aktivitesine sahip olduğu belirlenen izolatin optimum selüloz üretimi için katı kültür fermantasyonu koşulları belirlenmiştir. Bundan başka, üretilen selülozun enzimatik özellikleri değerlendirilmiştir.

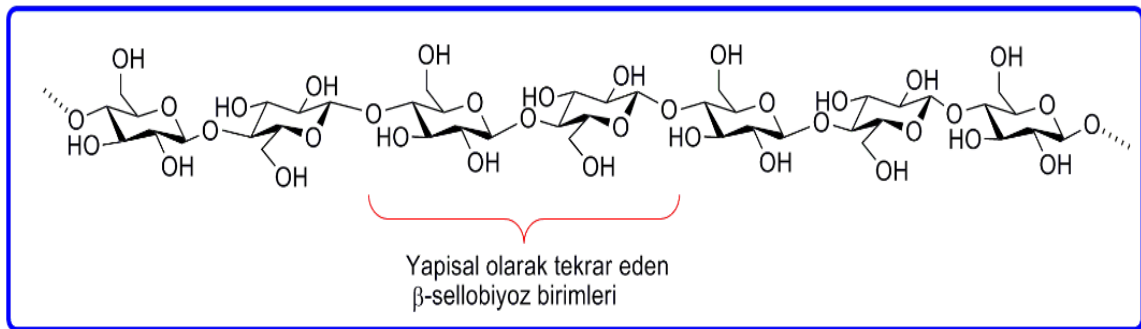
2. KAYNAK ÖZETLER

2.1. Lignoselüloz

Lignoselülozik biyokütle, Dünya'da en bol bulunan malzemedir. Tarımsal artıklar (örneğin mısır koçanı ve buğday samanı), ormancılık kalıntıları (örneğin endüstriyel işlemler) lignoselülozik biyokütleyi oluşturur. Lignoselüloz, bitki materyalinin üç ana bileşeni olan selüloz, hemiselüloz ve ligninin ortak adıdır. Bitkilerde lineer selüloz zincirleri gerilme mukavemetine katkıda bulunurken, hidrofobik amorf lignin kimyasal dirençten, özellikle suya karşı korumadan sorumludur. Hemiselüloz, selüloz ve lignin arasındaki bağı sağlar. Bu nedenle, iki ana engel lingoselülozik malzemede selülozun hidrolizini engeller. Kristalli selülozun kendisi (mikrofibrillere sıkıca bağlı lineer selüloz zincir yapısından ortaya çıkar) ve onu çevreleyen yüksek düzeyde koruyucu lignin ve mikroorganizmalar için fiziksel bir bariyer görevi görür.

2.1.1. Selüloz

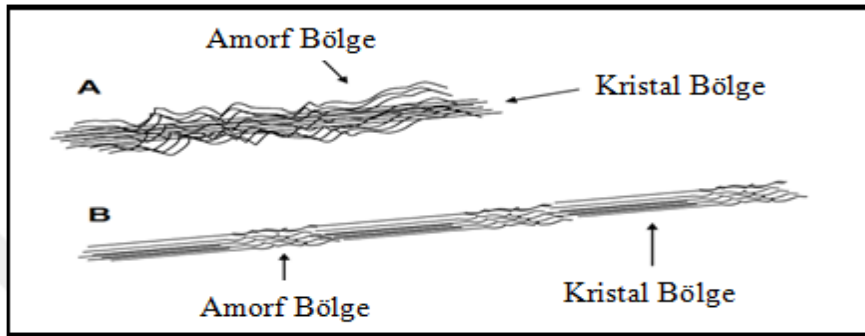
Selüloz, lignoselülozun ana bileşenidir. Kimyasal olarak β -1,4 bağlı D-glukopiranoz zincirleri birleştirilen ve tekrarlayan sellobiyoz birimlerinden oluşan doğrusal bir polimer zinciridir. Selülozda, glikoz zincirleri birbirine van der Waals kuvvetleri tarafından sıkıca bağlanır ve bu da katı, çözünmez bir kristal yapının oluşmasına neden olur (Yamada ve ark., 2013).



Şekil 2.1. Selülozun yapısal olarak tekrar eden sellobiyoz birimleri (Andersen, 2007)

Mikrofibriller içindeki yüksek sıralı bölgelere kristal, daha az sıralı bölgelere amorf denir. Amorf malzeme, biçimsiz veya belirli bir şekli olmayan malzeme olarak tanımlanır, ancak, amorf selüloz muhtemelen hala bir dereceye kadar düzene sahiptir. Şekil 2.2.'de

kristalin ve amorf selülozun farklı bir moleküler mimarisi görülmektedir. Mikrofibril içerisindeki yapıların dağılımı ile ilgili farklı yaklaşımlar bulunmaktadır. Larsson ve ark., (1997)'a göre, amorf bölgelerin çoğunun yüzeyde bulunan zincirlere karşılık gelmekte, oysa kristalli bileşenlerin mikro fibrilin çekirdeğini işgal ettiğini görülmektedir (A). Mosier ve diğerleri (1999) göre ise selülozu amorf şekilsiz bölgelerle ayrılan ortalama yaklaşık 200 glukoz kalıntısı uzunluğundaki kristal bölgeler bulunmaktadır (Şekil 2.2.B).



Şekil 2.2. Kristalin ve amorf selülozun mikro fibril içinde nasıl dağıldığına dair iki farklı görüş. A: Kristalin selüloz, mikro fibrilin çekirdeğindedir ve amorf substrat ile çevrilidir. B: Kristal ve amorf bölgeler yatay boyutta tekrarlanan.

2.1.2. Hemiselüloz

Hemiselüloz, dünya üzerinde selülozdan sonra en bol bulunan ikinci yenilenebilir organik malzemedir. Hemiselülozlar, D-ksiloz, L-arabinoz (pentozlar), D-mannoz, D-glukoz, D-galaktoz, L-ramnoz (heksozlar), 4-O-metil-D-glukuronik asit, D-glukuronik asit ve D-galakturnik asit (üronik asitler) gibi birçok farklı şeker monomerinden oluşan dallanmış heterojen polimerlerdir. Hemiselüloz tipi, monomer bileşimine bağlı olarak değişir. Sert ağaç ve yumuşak ağaç gibi farklı ağaç türlerinden elde edilen hemiselülozlar hem yapı hem de miktar bakımından farklılık gösterir. Sert ağaç hemiselülozları esas olarak ksilandan oluşur ve odunsu malzemenin %20 ila 37'sini oluştururken, yumuşak ağaç hemiselülozları esas olarak galaktoglukomannanlardan oluşur ve yumuşak ahşabın %16 ila 27'sini oluşturur (Hon ve Shiraishi, 1991).

Hemiselülozlar dallı yapıları nedeniyle selüloza göre daha fazla çözünürler ve ekstraksiyon yoluyla ağaçtan izole edilebilirler. Hemiselülozlar, selüloz ve lignini

bozulmamış halde bırakan güçlü asitle (Lloyd ve Wyman, 2005) veya güçlü bazla (Fan ve ark., 1982) kolayca hidrolize edilir. Çoğu durumda, yüksek sıcaklıklarda (140-190 °C) seyreltilmiş asit (%0.5-1.0 H₂SO₄) ön işlemi, hemiselülozun çoğunu çözünür pentoz ve heksoz şekerlerine indirger. Bu işlem özellikle ligninin çözülmesini hedeflemese de, lignin yapısı bozulur ve yeniden dağıtılarak enzimatik hidroliz için çok daha uygun (ön işleme tabi tutulmuş) substratın oluşmasına yol açar (Yang ve Wyman, 2004).

2.1.3 Lignin

Lignin, odun bileşenleri arasında muhtemelen en karmaşık ve en az karakterize edilen moleküler gruptur. Birincil amacı, bitkilere güç ve su geçirgenliği vermek, aynı zamanda bitkileri patojen enfeksiyonlarından korumaktır. Lignin, üç boyutta bağlı p-hidroksifenoil, guayasil ve/veya siringil monomerlerinden oluşur. Bu üç monomer, aromatik halkanın metoksilasyon modelinde farklılık gösterir (Şekil 2.3). Hemiselülozda olduğu gibi odunsu malzemede bulunan ligninin bileşimi ve miktarı türe, hücre tipine ve doku gelişim aşamasına göre değişir. Lignin, odun yapısının yaklaşık %20-35'ini oluşturur (Fan ve ark., 1982).



Şekil 2.3. Lignin ana yapısındaki fenil propan monomer üniteleri (Sjöström, 1993)

2.2 Selülitik Enzimler

Bitki hücre duvarı polisakkaritleri olan doğal selülozik substratlar, lignine gömülmüş selüloz ve hemiselülozdan oluşan heterojen materyallerdir. Lignoselülozik malzemelerin parçalanması, mikroorganizmaların ürettiği ve enzimatik bir sistem olarak adlandırılan çok sayıda enzim tarafından gerçekleştirilmektedir (Warren, 1996). Selüloz üzerinde aktif

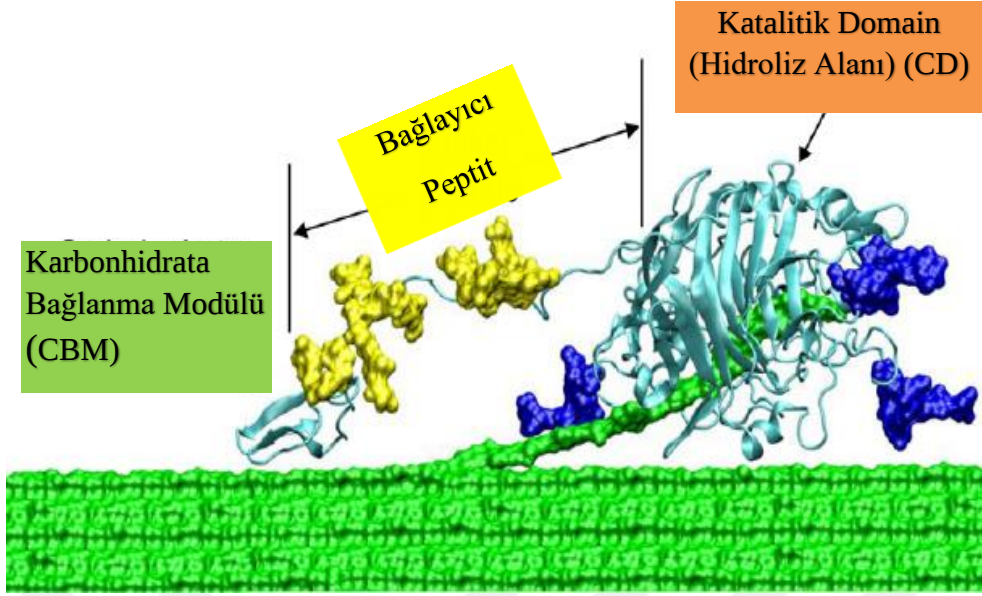
olan enzim sistemlerinin hemiselüloz üzerinde de aktivite gösterdiği ve spesifik olarak hemiselüloz üzerinde aktif olan hemiselülazların da sıklıkla selüloza karşı aktivite gösterdiği anlaşılmaktadır (Lynd ve ark., 2002).

Selülitik enzim sistemleri her biri aynı sınıftan, benzer enzimleri içeren çeşitli enzim sınıflarından (sellobiyohidrolazlar, endoglukanazlar ve β -glukosidaz) oluşmaktadırlar. Bu enzimlerin çoğu modüler proteinlerdir. Ayrıca, genellikle belirli bir substrata spesifik olsalar da, selülitik enzimler genellikle çeşitli benzer substratlar üzerinde reaksiyona girme kabiliyetine sahiptir, dolayısıyla geniş substrat spesifisiteleri gösterir (Warren, 1996).

Doğal selülozu parçalayabilen mikroorganizmaların başında yumuşak köklü bir mantar olan *T. reesei* (*Hypocrea jecorina*) kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır (Reese, 1976). Bu mantara olan ilgi, yüksek düzeyde enzim salgılayabilmesiyle ilgilidir. 0.14-0.38 g'a kadar çözünür protein/g karbon kaynağı üreten suşlar geliştirilmiştir (Esterbauer ve ark., 1991).

2.2.1 Selülitik enzimlerin moleküler yapısı

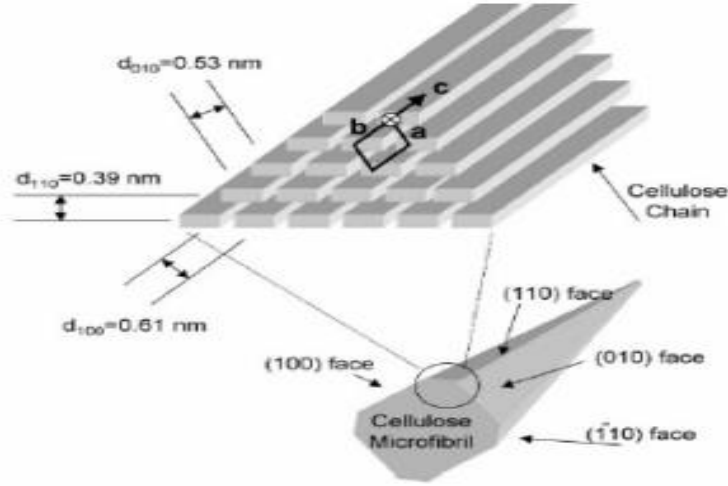
Selülazlar ve hemiselülazlar bir dizi ayrı modülden oluşur. Bu sayede bu enzimler çok büyük ebatlarda olabilirler ve karmaşık etki tarzına sahiptirler. Her modül veya alan, polipeptit zincirinin ardışık bir bölümünü içerir ve bağımsız olarak katlanan, yapısal ve işlevsel olarak farklı bir birim oluşturur (Teeri ve ark., 1992). Her enzim, glikosidik bağ hidrolizini katalize eden tek bir katalitik modül içerir ve bu da enzimlerin sınıflandırılmasında kullanılır. Diğer aksesuar veya "yardımcı" alanlar, enzimin birincil hidrolitik etkisine yardımcı olur veya onu değiştirir, böylece enzimin genel özelliklerini modüle eder (Bayer ve ark., 2013). Selülazlar, bağımsız olarak katlanmış, yapısal ve fonksiyonel olarak ayrı birimlerden oluşan modüler enzimlerdir ve domainler ya da modüller olarak anılırlar (Henrissat ve ark., 1998). Yaygın olarak, selülazlar üç bölümden meydana gelir; 1) bir katalitik domainden (CD) 2) genellikle 30-44 amino asit uzunlunda, genellikle glikosile edilmiş, bağlayıcı peptid ile 3) bağlayıcı peptid ile CD'ye birleştirilen bir karbonhidrat bağlama modülünden (CBM) oluşur (Şekil 2.4). Ayrıca, çok katalitik alanlı ve aynı zamanda birkaç bağlama modülüne sahip birkaç mikroorganizma da tanımlanmıştır (Zverlov ve ark., 1998; Gibbs ve ark., 1992).



Şekil 2.4. Selülazin üç temel bölgeleri (Barcelos ve ark, 2016)

Tanım olarak bir CBM, sınırlandırılmış bir katlama ve bağımsız karbonhidrat bağlama aktivitesi olan bir karbonhidrat aktif enzimi içindeki bitişik bir amino asit dizisidir. Genel olarak CBM'nin birincil rolünün hem enzimin etkili konsantrasyonunu hem de enzimin substratın yakınında geçireceği zamanı aynı anda artırarak enzimin selülozla fiziksel temasını sağlamak olduğu kabul edilir. Tüm mantar CBM'leri aile 1'e aittir. Bu peptitler, öncelikle kristalli selüloz için afinite gösterir. Selüloz bağlama yüzeyinin, üç aromatik amino asit ve birkaç korunmuş polar kalıntı içeren düzlemsel bir yüzey olduğu gösterilmiştir (Mattinen ve ark., 1998; Reinikainen ve ark., 1992).

CBM'lerin aile 1 bağlanma bölgeleri, transmisyon elektron mikroskopisi ile görselleştirilmiştir (Lehtio ve ark., 2003), Şekil 2.5'de gösterildiği gibi selüloz mikrofibrilin (Valonia kristallerinin hidrofobik (110) düzlemin köşesinden bağlanmaların tercih ettiği kanıtı sağlanmıştır. Böyle bir bağlanma özgülüğü, selüloz kristallerinde, CBM'ler için önerilen bağlanma yüzey alanının çok sınırlı olduğu anlamına gelir.



Şekil 2.5. Selüloz kristallerinin Ia allomorfundaki (Valonia kristallerinde bulunur) selüloz zincirlerinin organizasyonunun ve oluşan tam kristalin şeklinin şematik gösterimi. Farklı kristalin düzlemlere d-aralığı karakteristiği belirtilmiştir. Farklı kristalin düzlemlere d-aralığı karakteristiği belirtilmiştir. (110) yüzünü ortaya çıkaran köşe (daire içine alınmış), CBM'ler için önerilen bağlama yeridir (Lehtio ve ark., 2003).

Ek olarak, Lehtio ve ark. (2003) göre kristalli selüloza 4 °C'de CBM 1 ailenin tamamen geri dönüşümlü bağlandığını gözlemlenmiştir. CBM'nin selüloza bağlanmasının tersinirliği önemli bir konudur çünkü hidroliz reaksiyonunun kristal üzerinde başka bir noktadan ilerlemesini teşvik eder, yani verimsiz bağlanma nedeniyle enzim kaybı en aza indirilir. Bununla birlikte, bu sıcaklıkta (4 °C) gerçekleştirilen deneylerin biyolojik önemi, selüloz üreten organizmalar, özellikle *T. reesei* doğal olarak tropikal sıcaklıklarda çalıştığı için daha fazla araştırılmalıdır.

CBM içermeyen, yani yalnızca bir modüle (katalitik alan) sahip olan enzimlerin, hala selülozu absorbe etme yeteneğine sahip olduğu, ancak tam uzunluktaki enzime kıyaslandığında daha düşük afiniteye sahip olduğu gösterilmiştir (Schulein, 1997; Karlsson ve ark., 2002). Schulein (1997), *Humicola insolens* tarafından üretilen ön saflaştırılmış selülozun kinetik özelliklerini ölçmüştür, bunlardan üç enzim iki biçimde mevcuttur; tam uzunlukta enzim (hem CBM hem de CD'ye sahip) ve "çekirdek" enzim (CBM'den yoksun). Enzim bir CBM'ye sahip olduğunda görünür kcat'ta da artış

gözlemlenmiştir (Tablo 2.1). Daha sonra, bu durumun tam uzunluktaki enzimin azaltılmış hareketliliği ile ilgili olduğu öne sürülmüştür.

Tablo 2.1: Fosforik asitle şişmiş selüloz (PASC) üzerinde birkaç saflaştırılmış *Humicola* selülazı için görünen kinetik sabitler

Enzim	k _{cat} (app.) [1/s]	K _m (app.) [g/l]
Cel6A (CBH II)	6	0,9
Cel6A core (CBH II core)	22	3,3
Cel45A (EG V)	58	0,5
Cel45A (EG V core)	82	3,6
Cel6B (EG VI)	54	0,7
Cel6B (EG VI core)	56	3,3
Cel7B (EG I)	16	2,3
Cel5A (EG II)	22	1,1
Cel12A (EG III)	1	6,0

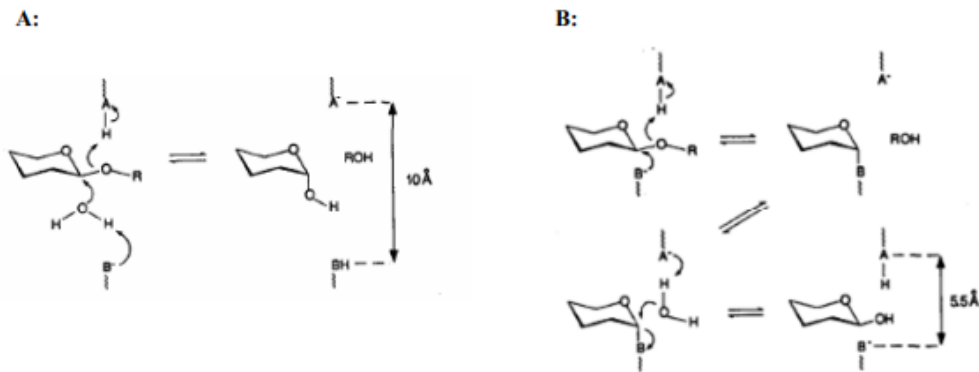
CD ve CBM, bağlayıcı peptit ile bağlanır. Farklı enzimlerden gelen linker dizileri, herhangi bir görünür dizi homolojisini nadiren paylaşır, ancak amino asit bileşimleri tipik olarak prolin ve hidroksil amino asitler açısından zengindir (Gilkes ve ark., 1991). Bağlayıcıların, ikisi arasında uzatılmış, esnek menteşeleri temsil ettiği bağımsız işlevlerini kolaylaştıran alanlar öne sürülmüştür (Burton ve ark., 1989; Bushuev ve ark., 1989).

Bir başka çalışmada, *T. reesei* CBH I'in bağlayıcı peptidinin etkileşim ve bunun sonucunda kristalli selülozun hidrolizi üzerindeki rolü incelenmiştir (Srisodsuk ve ark., 1993). Bağlayıcıya iki internal delesyon mutasyonu işlemi uygulandığında bağlayıcının hemen hemen tamamının çıkarılmasının, kristalin selüloz bozunma hızını önemli ölçüde azalttığı sonucuna varılmıştır (enzim hala substratına bağlansa bile). Bu nedenle, enzimin verimli çalışması için iki alanın (CD ve CBM) yeterli uzamsal ayrımı gerekli olduğu anlaşılmıştır.

2.2.2 Selüloz aktivitesinin mekanizmaları

Glikozil hidrolazlar gibi selüloolitik enzimler, bir proton verici (HA) ve bir nükleofil/baz (B-) içeren iki kritik kalıntı gerektiren genel asit katalizi mekanizması yoluyla glikosidik bağları hidrolize ederler. Katalitik aktivite, iki aspartik veya glutamik asit kalıntısı tarafından sağlanır (Mosier ve ark., 1999). Adından da anlaşılacağı gibi hidroliz, su eklenerek bağların kırılmasını içerir. İki farklı mekanizma ayırt edilebilir: ters çevirme ve tutma mekanizması, (Şekil 2.6). Tersine çevirme mekanizması (Şekil 2.6.A), katalitik bölgenin yüklü ortamının bir su molekülünü bir nükleofil görevi görecektir şekilde "aktif etmek" için kullanıldığı, asidik bir amino asit kalıntısı ise gerekli protonu verdiği tek bir nükleofil yer değiştirme mekanizmasıdır. İsim, yani ters çevirme mekanizması, şekerin C1 karbonunun hidroliz üzerine β 'dan α konfigürasyonuna bağda ters çevrilmesi gerçeğiyle ilgilidir.

Tutma mekanizması (Şekil 2.6.B) iki adımda ilerler. İlk olarak, yüklü amino asidin glikosil bağı üzerindeki nükleofilik saldırısı yoluyla kovalent olarak bağlı bir ara ürün oluşturulur. İkinci adımda, su molekülü hidroliz ürününü enzimden serbest bırakır ve proton vericiyi yeniden yükler (Mosier ve ark., 1999). Son zamanlarda, kofaktör olarak NAD^+ kullanan bir glikosidaz ailesi için tamamen ilgisiz bir mekanizma gösterilmiştir (Rajan ve ark., 2004).



Şekil 2.6. (A) Enzimatik glikosidik bağ hidrolizinin ters çevirme ve (B) tutma mekanizmasının şematik gösterimi (Davies ve Henrissat'tan, 1995).

Tutma mekanizmasını kullanan enzimler genellikle transglükosilasyon yapabilirken, ters çeviren enzimler yapamaz (Wilson ve Irwin, 1999). Glukosidazların ters çevrilmesi ve tutulması arasındaki diğer bir önemli fark, iki asidik kalıntı arasındaki mesafedir. Ters çeviren enzimler için mesafe $\sim 10 \text{ \AA}$ iken tutucu glukozidazlar için katalitik kalıntılar arasındaki ortalama fark $\sim 5.5 \text{ \AA}$ 'dir (McCarter ve Withers, 1994; Mosier ve ark., 1999).

2.2.3 Selüloz enzimlerin sınıflandırılması

Selülozlar farklı yollarla sınıflandırılabilir, ancak ağırlıklı olarak kullanılan iki sınıflandırma modu, substrat özgüllüklerine dayananlar ve enzimlerin yapısal benzerliklerine dayananlardır. Daha sonra ile ilgili olarak, reaksiyon mekanizmasına göre sınıflandırma da yapılabilir.

Genel olarak, tüm selüloolitik enzimler, iki veya daha fazla karbonhidrat arasındaki veya bir karbonhidrat ile bir karbonhidrat olmayan arasındaki glikosidik bağı hidrolize eden yaygın bir enzim grubu olan O-glikosil hidrolazlara (EC3.2.1.-) aittir. Substratlarına göre ekzo-1,4- β -D-glukanazlar (EC 3.2.1.91), endo-1,4- β -D-glukanazlar (EC 3.2.1.4) ve β -glukosidaz (EC 3.2.1.21) dahil olmak üzere üç spesifik enzim, selülozu glikoza indirgemek için sinerjik olarak hareket eder.

Çözünür selooligosakkaritlerin ve selobiyozun glikosidik bağlarını birincil olarak hidrolize ettikleri ve dolayısıyla selülozun kendisine etki etmedikleri için genellikle "gerçek" selülozlar olarak anılmazlar.

Enzimler genellikle örtüşen özelliklere sahip olduğundan, substrat özgüllüklerine göre bu tür bir sınıflandırma zordur. Bu nedenle, 1990'ların başında Henrissat ve ark. (1998) glikosil hidrolazların, katalitik alanın amino asit sekansı benzerliklerine dayanan ailelere göre yeni bir sınıflandırmasını önermişlerdir. Bir enzim için yeni atama, ailesini belirler ve bir ailenin tüm üyeleri ortak amino asit dizisine sahip olduğundan, üç boyutlu katlanması ve hidrolizin stereo-özgüllüğü (tutma veya tersine çevirme) bu şekilde tahmin edilebilir (Henrissat ve ark., 1998). Sonuç olarak, bir ailenin tüm üyelerinde tamamen korunan tek özellik, bölünme stereokimyasıdır; örneğin, 5 ailesinin tüm üyeleri enzimleri tutar ve 6 ailesinin tüm üyeleri enzimleri ters çevirir.

2.2.4 Kompleks selüloolitik sistemler

Doğal selülozun başarılı bir şekilde bozunması, birkaç endo- ve ekzo-etkili enzimden (Henrissat ve ark., 1998) ve β -glukosidazdan (Bhikhabhai ve ark., 1984) oluşan *Trichoderma* cinsinden olanlar gibi çok bileşenli enzim sisteminin işbirlikçi eylemini gerektirir (Chen ve ark., 1992). Üretilen enzim kombinasyonu türler arasında farklılık gösterir ve onları üreten mikroorganizmaya bağlıdır. *T. longibrachiatum* Rut 30, *H. insolens* DSM 1800 ve *Penicillium brasilianum* IBT 20888 tarafından üretilen üç ham ekstrakttaki tek tek selüloz parçalayıcı enzimlerin dağılımı Tablo 2.2'de özetlenmiştir.

Tablo 2.2: *Trichoderma*, *Humicola* ve *Penicillium*'un temsili suşlarından selülaz bileşenlerinin dağılımı.

Bileşen	<i>T. longibrachiatum</i> Rut C30 (%)	<i>H. insolens</i> DSM 1800 (%)	<i>P. brasilianum</i> IBT 20888 (%)
CBH I (Cel7A)	50	20	18
CBH II (Cel6A)	20	5	25
EG I (Cel7B)	10	50	4
EG II (Cel5A)	5	5	10
EG III (Cel12A)	5	5	21
EG V (Cel45A)	5	10	n.d
BG (Cel3A)	1-2	1-2	n.d
Diğer selülazlar	10	10	n.d

CBH: Cellobiohydrolase; EG: Endoglucanase; BG: β -glucosidase; n.d.: not determined (Jorgensen et al., 2003).

Selüloz araştırmalarındaki iki ana soru, selülozda yalnızca bir tür bağ (β 1-4 bağı) mevcutken neden çoklu selülazların üretildiği ve özellikle *Trichoderma* suşunda neden CBH'nin bu kadar baskın olduğudur (Tablo 2.2). Birkaç endoglukanazın (EG) varlığı, farklı enzimlerin farklı çevresel koşullar (pH ve sıcaklık) altında optimum performans sergilemesinden veya farklı düzenleyici özelliklere ve kinetik parametrelere sahip olmasından ve dolayısıyla mantarın hayatta kalmasını sağlamak için bunları evrimsel olarak geliştirmesinden kaynaklanabileceği öngörülmektedir. Ek olarak, yalnızca CD'den oluşan birkaç EG izole edilmiştir. Bu nedenle, CBM'den yoksun ve dolayısıyla daha küçük boyutlu olan enzimlerin, diğer EG'lere kıyasla lifli malzemeye daha kolay nüfuz

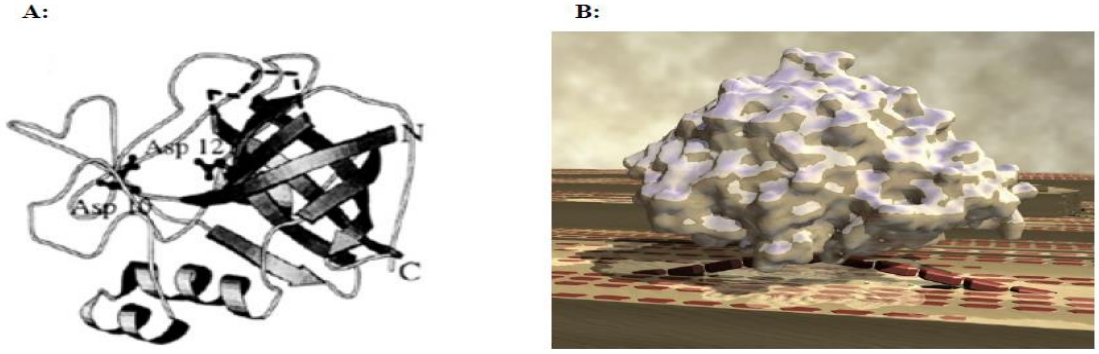
edebileceği ve böylece malzemenin yapısının açılmasına yardımcı olacağı da tahmin edilmektedir (Soloheimo ve ark., 1994).

Endoglukanazlar

Endo-glukanazlar, selüloz zincirinin iç amorf bölgelerinde rastgele kesimler gerçekleştirir. Örneğin çeşitli uzunluklarda oligosakkaritler üreten, bükülmüş, esnek ve hidratlı düzensiz bölgeler içeren alanlar amorf bölgedir (Boisset ve ark., 2000). Bu nedenle, selülozik substratların polimerizasyon derecesinin düşürülmesinden birincil derecede sorumludurlar. Sonuç olarak, selobiyohidrolaz etkisine duyarlı yeni selüloz zincir uçları üretir (Lynd ve ark., 2002).

Hem EG'ler hem de CBH'ler, ürün (sellobiyoz ve glikoz) inhibisyonuna tabidir. Sellobiyozun enzimler üzerinde glikozdan daha güçlü inhibitör etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Holtzaple ve ark., 1990). Yapılan çalışmaların sayısına bakılmaksızın, selülazlar tarafından sergilenen inhibisyon tipi hala yeterince karakterize edilememiştir. Bununla birlikte, bu değer inhibisyon paternlerinin (rekabetçi, rekabetçi olmayan veya karışık tip) selülaz bağlanma sabitine, enzim konsantrasyonuna, enzimlerin erişebildiği selüloz yüzey alanına, örneğin enzim/substrat oranı, substratın doğası, substrat konsantrasyonunun değiştiği aralık ve β -glucosidase (BG) aktivitesinin varlığına bağlıdır. (Gusakov ve Sinitsyn, 1992; Gruno ve ark., 2004).

Birkaç EG'nin yapısı, bir oluk oluşturan kısa ilmeklerin varlığını ortaya çıkaracak şekilde çözümlenmiştir (Davies ve ark., 1996; Kleywegt ve ark., 1997; Sandgren ve ark., 2000). Tahminen oluk, sonraki bölünme için selüloz zincirinin girişine izin verir. *H. insolens* Cel45A katalitik çekirdeğinin yapısı, enzimin kabaca 42 x 42 x 22 Å boyutlarında düzleştirilmiş küresel bir şekle sahip olduğunu gösteren X-ışını analizi ile Şekil 2.7 gibi belirlenmiştir (Davies ve ark., 1995).



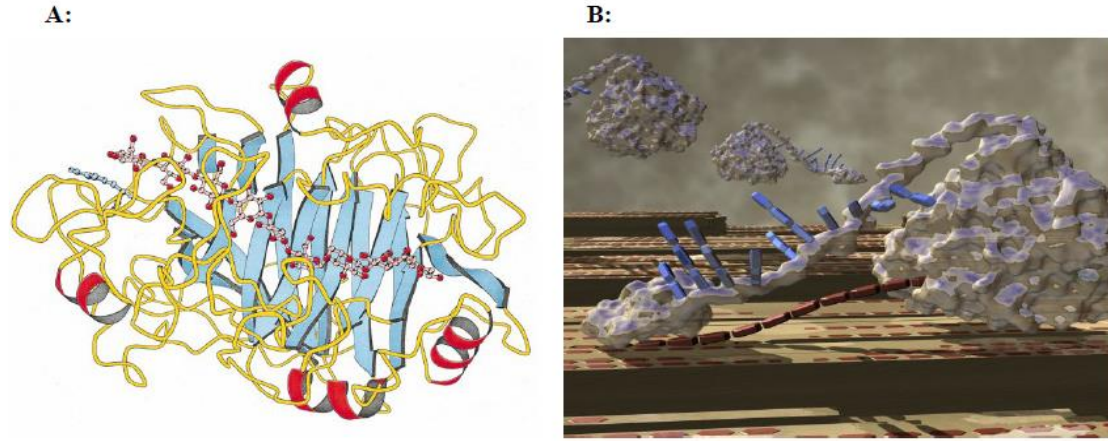
Şekil 2.7: Endoglukanazların yapısı. A: *H. insolens*'ten endoglukanaz V'nin (Cel45A) yapısı. Katalitik çekirdek, uzun birbirine bağlı döngülere sahip altı sarmallı β -varil alanına dağıtılan 210 amino asitten oluşur. Enzimin yüzeyi boyunca 40 Å'lık bir oluk bulunur ve bu, katalitik kalıntıları Asp 10 ve Asp 121. İki katalitik aspartat, alt-tabaka bağlama oluğunun her iki yanında, ideal bir konformasyonla ters çevirme yoluyla parçalanmayı kolaylaştırır. B: Selüloz zincirinin yüzeyindeki endoglukanazın bilgisayar animasyonu şeklinde görünümü (Andersen, 2007).

Selobiyohidrolazlar

Ekzo-glukanazlar (veya CBH'ler), selüloz polisakarit zincirlerinin uçlarından işleyici bir şekilde hareket eder (Davies ve Henrissat, 1995; Henrissat 1998; Rouvinen ve ark., 1990), polimer zinciri boyunca işlenirken ana ürün olarak sellobiyozu serbest bırakır. Nadiren, glikoz ve sellotrioz da hidrolizin ilk aşamalarında küçük miktarlarda üretilir (Divne ve ark., 1994). Tüm selobiyohidrolazların önemli özelliklerinden biri de mikrokristalin selüloz üzerinde etki gösterebilmeleridir (Terri, 1997).

Bu enzimlerin işlenebilirliği, üç boyutlu yapılarının ince ayrıntılarıyla ilişkili görünmektedir (Şekil 2.5). EG'lerde bulunan açık oluğun aksine, CBH'lerin aktif bölgesi tünelin içinde bulunur. *T. reesei*'den CBH I'de (Cel7A) bu tünel 50 Å uzunluğundadır (Divne ve ark., 1994), CBH II'de (Cel6A) ise tünel çok daha kısadır, sadece 20 Å uzunluğundadır (Rouvinen ve ark., 1990). Daha kısa aktif bölge tünellerine sahip olan CBH II'ye benzer selobiyohidrolazlar, artan derecelerde endo glukanaz aktivitesi sergileyebilir. Yani, *T. reesei* Cel6A'nın (CBH II) oligosakkaritler ile kompleks halindeki yapısı, halkalardan birinin önemli ölçüde hareketliliğe sahip olduğunu ve ortaya çıkan tünelin ya daha sıkı bir şekilde kapatılabileceğini ya da neredeyse tamamen açık

olabileceğini ve bu nedenle EG'ler aktif bölgeye benzediğini göstermiştir. (Zou ve ark., 1997).



Şekil 2.8: Selobiyohidrolazın yapısı. A: *T. reesei*'den alınan CBH I (Cel7A) katalitik alanının şematik gösterimi. Katalitik alan, yaklaşık 50 Å uzunluğundaki selüloz bağlama tüneline (β iplikçikleri) oluşur. Ek olarak, α-heliks sarmalları ve uzun döngü bölgeleri bir arada bulunur. Tünelin içine bağlı olan cellooligomer, bir top ve çubuk modeli olarak gösterilmiştir (Divne ve ark., 1998). B: Selüloz yüzeyinde selobiyohidrolazın bilgisayar animasyonu şeklinde görünümü. Enzim, esnek bağlayıcı ile katalitik alana (CD) bağlı karbonhidrat bağlama modülünden (CBM) oluşur. Bir selüloz zincirinin enzimin tünel şeklindeki aktif bölgesine girdiği gösterilmiştir.

Biyokimyasal çalışmalardan, CBH I'in selüloz zincirini, zincirin indirgeyici ucundan indirgeyici olmayan ucuna doğru hidrolize ettiği ileri sürülmüştür (Barr ve ark., 1996; Boisset ve ark., 2000), hidroliz ise CBH II tarafından enzimatik bozunma sırasında indirgeyici olmayan uçtan indirgeyici uca doğru ilerler (Mosier ve ark., 1999).

β-glukosidazlar

β-glukosidazlar selobiozu ve kısa (çözünür) selooligosakkaritleri glikoza hidrolize eder; örneğin hidroliz reaksiyonu, "gerçek" selülazlar, EG'ler ve CBH'ler için geçerli olan çözünmez selüloz parçacıklarının yüzeyinden ziyade sıvı fazda gerçekleştirilir. Sellobiyozun EG ve CBH üzerindeki inhibitör etkisinin azaltılmasına yardımcı olduğundan, sellobiyozun uzaklaştırılması enzimatik hidroliz işleminin önemli bir adımıdır. BG aktivitesinin genellikle selülozun enzimatik hidrolizi sırasında hız

sınırlayıcı olduğu bulunmuştur (Duff ve Murray, 1996; Tolan ve Foody, 1999) ve bu nedenle ticari selüloz enzim preparasyonları genellikle BG aktivitesi ile desteklenir.

T. reesei'nin kültür süpernatantlarından iki BG izole edilmiştir (Chen ve ark., 1992), bununla birlikte, birkaç *Trichoderma* türü üzerinde yapılan çalışmalar, bu enzimlerin büyük bir bölümünün hücre duvarına bağlı kaldığını göstermiştir (Messner ve ark., 1990; Usami ve ark., 1990). Mantar hücre duvarının yakınında yüksek glikoz konsantrasyonlarını korumanın evrimsel avantajı açıktır. *T. reesei*'nin BG'leri ürün (glikoz) inhibisyonuna tabidir (Chen ve ark., 1992), oysa *Aspergillus*'unkiler daha fazla glikoz toleranslıdır (Watanabe 1992; Gunata ve Vallier, 1999; Decker ve ark., 2000). Örneğin, *T. reesei*'den alınan BG I, substrat olarak p-nitrofenil-β-glukozit üzerinde Km=182 uM'ye sahipken, hidroliz sıvı besiyerinde 5 mM glikoz bulunduğunda inhibisyon sabiti KI 624 uM'ye yükselir (Chen ve diğ., 1992).

2.3 Selüloz Üreten Mikroorganizmalar

Selüloolitik enzimler doğada yaygın olarak bulunur ve bitkilerde, böceklerde ve mikroorganizmalarda bulunur. Aerobik ve anaerobik bakterilerin, tek enzim olarak veya bir iskele proteinine bağlı birkaç selüloolitik enzimi içeren selülozomlar, çoklu enzim kompleksleri şeklinde selüloolitik enzimler ürettiği bilinmektedir. Ticari olarak temin edilebilen en yaygın selülozlar, mantarlardan, özellikle *Trichoderma* veya *Aspergillus* türlerinden türetilen kompleks olmayan doğal enzim karışımlarıdır. Enzim üreticileri olarak kullanım için selüloolitik mantarlar hem salgı yollarını kullanma hem de yüksek protein verimleri üretme konusunda büyük avantaja sahiptir (Phitsuwan ve ark., 2013).

Tablo 2.3 Selüloz üreten mikroorganizmalar

Fungi	<i>Aspergillus</i>	<i>A. niger</i>
		<i>A. nidulans</i>
		<i>A. Aryzae</i>
	<i>Fusarium</i>	<i>F. solani</i>
		<i>F. oxysporum</i>
	<i>Humicola</i>	<i>H. insolens</i>
		<i>H. grisea</i>
	<i>Melanocarpus</i>	<i>M. albomyces</i>
		<i>P. brasilianum</i>

	<i>Pennicillium</i>	<i>P. occitanis</i>
		<i>P. decumbans</i>
	<i>Trichoderma</i>	<i>T. reesi</i>
		<i>T. longibrachiatum</i>
		<i>T. harzianum</i>
Bacteria	<i>Acidothermus</i>	<i>A. cellulolyticum</i>
	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus sp</i>
		<i>B. subtilis</i>
	<i>Clostridium</i>	<i>C. acetobutylicum</i>
		<i>C. thermocellum</i>
	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. cellulose</i>
Actinomycetes	<i>Rhodothermus</i>	<i>R. marinus</i>
	<i>Cellulomonas</i>	<i>C. fimi</i>
		<i>C. bioazotea</i>
		<i>C. uda</i>
	<i>Streptomyces</i>	<i>S. drozdawiczii</i>
		<i>S. sp</i>
		<i>S. lividans</i>

2.4 Fermentasyonla Selüloolitik Enzim Üretimi

Katı Kültür fermentasyon aerobik mikroorganizmaların büyümesi için sıvının olmadığı ve nemli katı substrat üzerinde çoğalmasını sağlayan bir tekniktir. Selülozların mikrobiyal üretimine ilişkin raporların çoğunda batık fermentasyon teknolojisi (SmF) kullanılır ve selüloz üretiminde kullanılan yaygın olarak incelenen organizma, yine çoğunlukla sıvı ortamda test edilmiş olan *T. reesei*'dir. Bununla birlikte, doğada, selülozları oluşturan aerobik mikroorganizmaların büyümesi ve selüloz kullanımı, muhtemelen sıvı bir kültürden çok katı substrat fermentasyonuna benzer.

Yıllar boyunca, katı kültür fermentasyonu (SSF) sistemlerinde selüloz üretimi dahil olmak üzere çeşitli amaçlar için farklı tipte fermenterler (biyoreaktörler) kullanılmıştır. Laboratuvar çalışmaları genellikle Erlenmeyer şişelerinde, Roux şişelerinde, beherlerde, kavanozlarda ve cam tüplerde (kolon biyoreaktör olarak) yapılmaktadır. Büyük ölçekli fermentasyonlar tepsili, tamburlu veya derin tank tipi fermenterlerde gerçekleştirilmiştir. Selüloz üretimi için SSF prosesleri, kesikli prosesler en yaygın olmasına rağmen, kesikli, beslemeli-partili veya sürekli modlarda çalıştırılabilir (Behera vd. 2016).

SSF, mantar kültürlerini kullanan yüksek enzim üretim nedeniyle son yıllarda hızla ilgi görmektedir. SSF'nin genellikle SmF'ye kıyasla daha fazla ham enzim üretimine izin verdiği bildirilmektedir. SSF ile hem karbon hem de enerji kaynağı olarak buğday samanı gibi lignoselülozik biyokütleyi sakarifiye edebilen enzim üretilebildiğini bildirmişlerdir (Kumar ve ark., 2013). Tepki yüzey modellemesi (response surface resonans) kullanarak SmF ve SSF sistemlerinde hem pektinaz hem de selüloz üretimini karşılaştırmış ve optimize etmiştir. Her iki tekniğin de substrat olarak tarımsal endüstriyel atıkları kullanarak eşit maliyet-etkin olduğunu belirtmişlerdir. *A. niger* selülozünün şeker kamışı küspesini SmF ile üretiminde kullanarak sıvılaştırılmasını sağlanmış ve endoglukanaz üretiminin SSF'den 12 kat daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (Behera vd. 2016).

Kültürlerde selüloz üretimi, büyüme ile ilişkilidir ve çeşitli faktörlerden etkilenir ve bunların etkileşimleri selüloz üretkenliğini etkileyebilir. Selüloz genlerinin bilinen indükleyicileri arasında laktoz, endüstriyel olarak ekonomik olarak uygulanabilir tek katkı maddesidir. Fermantasyon ortamı. *T. reesei*'de, Mandels & Reese'den sonraki bir bazal besiyeri, en sık modifikasyonlarla veya modifikasyonlar olmaksızın kullanılmıştır. Ticari selüloz fermantasyonlarının çoğundaki karbon kaynakları, saman, tahıl ve baklagillerin kabukları, pirinç veya buğday kepeği, küspe, kâğıt endüstrisi atıkları ve çeşitli diğer lignoselülozik kalıntılar dahil olmak üzere selülozik biyokütle kullanılmış.

Selülozların üretimi için katı hal fermantasyonu (SSF), yalnızca enzim üretimi için değil, aynı zamanda selülitik mikroorganizmalar kullanan lignoselülozik biyokütlenin biyodönüşümünde de uygun maliyetli bir teknoloji olarak hızla ilgi kazanmaktadır. SSF'de üretim maliyetinde SmF'ye göre yaklaşık 10 kat azalma olduğunu belirtilmiştir (Sukumaran, 2005).

Proseslerin çoğu kesikli prosesler olsa da, indirgen şeker birikiminin neden olduğu baskıyı geçersiz kılmaya yardımcı olduğu varsayılan beslemeli parti veya sürekli modunda selüloz üretme girişimleri olmuştur. Selülozların fermantatif üretimindeki en büyük teknik sınırlama, düşük üretkenlik ile artan fermantasyon süreleri olmaya devam etmektedir.

A. niger'den ticari bir selülag preparasyonundan bir selüolitik enzim izole elde edilmiş ve 100 g ticari selülag başına yaklaşık 50 mg enzim verimi elde edilmiştir. İzole edilen selülag enzim, ultrasantrifüjde pH 4.0 ve 8.0'da ve sodyum dodesil sülfat/poliakrilamid-jel elektroforezinde homojen göstermiştir (Hurst ve ark., 1977).

T. viride'den elde edilen kültür filtratları, Sephadex G-75 üzerinde jel filtrasyonu ve ardından DEAE- ve SE-Sephadex üzerinde iyon değıştirme kromatografisi ile fraksiyonlara ayrılmıştır. Elde edilen enzimlerin pamuğa etki eden karboksimetilselülag ve selobiaz bileşenleri bulunmuştur (Selby ve Maitland, 1967).

Bacillus subtilis AU-1'in ana karbon kaynağı olarak çeşitli karbonhidratlar üzerinde büyütüldüğünde kültür süpernatantında karboksimetilselülag (CMCase) ve Avicelaz aktiviteleri ürettiği bulunmuştur. Maksimum CMCase üretimi, indükleyici olarak %0.2 D (+) rafinoz, %0.5 her bir maya ekstresi, kazamino asit ve proteoz pepton içeren bir sıvı ortamda 50°C'de ve 6.0 pH'ında elde edilmiştir. CMCase aktivitesi için en uygun sıcaklık 65°C idi, fakat enzim 60°C'ye kadar oldukça kararlıdır (Chan ve Au, 1987).

Termofilik anaerob *Clostridium thermocellum*'dan bir endoglukanazı, denatüran kullanılmadan görünür homojenliğe saflaştırmışlardır. SDS/PAGE ile 76.000 Da'lık bir moleküler kütle belirlenmiştir. Enzim optimum pH'sı 7.0 ve sıcaklığı 70 °C belirlenmiştir. Enzim sıcaklık stabilitesi 60 °C 'de 48 saat sonra aktivitesinin %50'si geri kalmıştır (Romaniec ve ark., 1992).

A. fumigatus NITDGPKA3 selüolitik mantar suşu, saman çürütme zemininden izole edilmiştir. Pirinç samanı fermantasyonunda *A. fumigatus* tarafından selülag ve ksilanaz üretimi yapmıştır. Maksimum enzim üretimi için kültür koşullarının başlangıç pH'sı 4, %1 substrat konsantrasyonu, sıcaklık 30°C, inkübasyon süresi 5 gün, azot kaynağı %0,2 tripton olarak bulunmuştur. Tween 80'in fermantasyon sıvısına eklenmesi ile ksilanaz üretimini (193.58 IU/mL) selülag üretimine (6.53 IU/mL) enzim üretimi artığını ifade etmiştir (Nibedita ve ark.,2014).

Elde edilen sonuçlar, farklı pH ve sıcaklık koşulları altında endoglukanaz, β -glukosidaz ve ksilanaz aktivitelerini tahmin etmek için kullanılan matematiksel modellerin

oluşturulmasına izin verilmiş, her üç enzim için de optimum sıcaklık değerleri 35°C ile 60°C arasında, optimum pH aralığı ise 4 ile 5.5 arasında bulunmuştur. Burada kullanılan metodoloji, farklı işlem koşulları altında enzim davranışını tahmin etmede çok etkili olduğunu ortaya koymuşlar (Farinas ve ark., 2010).

Sıvı fermantasyon tekniği kullanılarak *T. viride* tarafından selülozların üretimi için proses parametrelerinin optimizasyonunu yapılmıştır. Selülozların maksimum üretimi (CMCase 1.57 U/mL/dak, FPase 0.921 U/mL/dak) 30°C inkübasyon sıcaklığında 72 saatlik bir fermantasyon süresinden sonra gözlenmiştir. Kültür ortamının başlangıç pH'ı da optimize edildi ve 5.5'lik bir pH'ın *T. viride* tarafından maksimum büyümeyi ve enzim üretimini (CMCase 1.66 U/mL/dak ve FPase 0.932 U/mL/dak) desteklediği bulunmuştur (Malik ve ark., 2010).

Odun atığı çöplüğünden izole edilen *A. niger*, *P. chrysogenum* ve *T. harzianum* suşlarında atık selülozik malzemeler (mısır koçanı, talaş ve şeker kamışı hamuru) ve kristalli selüloz kaynaklı selüloz üretimi yapılmıştır. *A. niger*, *P. chrysogenum* ve *T. harzianum* için sırasıyla 0.54, 0.67 ve 0.39 ünite / mg maksimum selüloz aktivitesi elde edilmiştir. *A. niger* için maksimum enzim aktivitesi, yetiştirmenin 36. saatinde elde edilirken, *P. chrysogenum* ve *T. harzianum* optimal enzim aktivitelerini sırasıyla 12 ve 60 saatte vermiştir. Üç selülozik atıktan en iyi enzim aktivitesi talaşta elde edilmiştir (Chinedu ve ark., 2011).

Yapılan çalışmalarda yerel topraktan izole edilen *B. cereus* tarafından üretilen selülozu homojen olarak saflaştırmışlardır. Enzim molekül kütlesi 53 kDa, pH 8,0 ve 55 °C sıcaklıkta optimum aktivitesi olduğunu göstermişlerdir. Enzim pH 0-9.0 arasında 50 °C'de stabildir (Yang ve ark., 2010).

A. heteromorphus'tan selüloz üretimini araştırmak için, substrat olarak buğday samanı kullanılarak yapılan sıvı fermantasyon çalışmasında, pH, sıcaklık ve süre gibi sakarifikasyon koşullarının optimizasyonu incelenmiştir. En yüksek aktivite olan 3.2 IU/mL filtre kâğıdı ve 83 IU/mL CMCase enzim aktivitesi pH 5.0'te, 30°C'de ve fermantasyonun 5. gününde üretilmiştir (Singh ve ark., 2009).

A. fumigatus AA001'den ısıya dayanıklı ham selüloz, elde edilmiş, 65°C'de 10 saate kadar termal kararlılık göstermiş ve pH 10.5'te %53 nispi aktivitesini korumuştur. Bu bulgular biyoyakıt üretimi alanında umut verici olabileceğini ifade etmiştir (Neha ve ark., 2016).

A. fumigatus optimum fiziksel ve beslenme koşulları altında buğday samanının katı hal fermentasyonu sırasında yüksek enzimatik aktiviteye (83 U/gds) sahip ekzogluksanaz üretmiştir. Maksimum üretim, 55 °C sıcaklıkta, pH 5.5, %80 nem seviyesinde ve 2 mL mantar inokulumunda 72 saatlik fermentasyondan sonra elde edilmiştir (Mahmud ve ark., 2013)

2.5 Selüloz Enzimin Uygulamaları

Selülozlar başlangıçta birkaç on yıl önce biyokütlenin biyodönüşümü için araştırılmış ve bu enzimin hayvan yemi, gıda, tekstil ve deterjanlardaki endüstriyel uygulamalarında ve kâğıt endüstrisinde araştırmalara yol açmıştır. Fosil yakıtların kıtlığı ve yenilenebilir enerji ve yakıtlar için alternatif kaynak bulma ihtiyacının artmasıyla birlikte, selülozlar ve diğer enzimler kullanılarak lignoselülozik biyokütlenin biyodönüşümüne olan ilgi yeniden canlanmıştır. Diğer alanlarda ise selüloz kullanan teknolojiler ve ürünler bu enzimleri vazgeçilmez hale getirecek bir aşamaya gelmiştir.

2.5.1 Gıda ve Hayvan Yemi

Selülozlar gıda endüstrisinde meyve ve sebze sularının ekstraksiyonu ve durultulmasında, meyve nektarı ve pürelerinin üretiminde ve zeytinyağı ekstraksiyonunda kullanılmaktadır. Bira üretiminde arpanın maltlanmasını iyileştirmek için glukozazlar eklenir ve şarap endüstrisinde, ekzojen hemiselülozlar ve glukozazlar kullanılarak daha iyi maserasyon ve renk ekstraksiyonu sağlanır. Selülozlar ayrıca gıda boyası maddelerinin üretiminde karotenoid ekstraksiyonunda da kullanılmaktadır. Selülozlara ek olarak hemiselüloz ve pektinaz içeren enzim preparatları kaba yemlerin besin kalitesini artırmak için kullanılmaktadır. Yem işlemede selülozların kullanılmasıyla yem sindirilebilirliği ve hayvan performansındaki gelişmeler rapor edilmiştir (Bedford ve ark.,2003)

2.5.2 Selüloz ve Kâğıt Endüstrisi

Selülaazlar ve hemiselülaazlar, kâğıt hamuru ve kâğıt endüstrisinde, geri dönüştürülmüş liflerin mürekkebinin giderilmesi ve kâğıt fabrikalarının drenajının ve çalıştırılabilirliğinin iyileştirilmesi için kaba mekanik kâğıt hamuru ve el tabakası mukavemet özelliklerinin modifikasyonu için biyomekanik hamurlaştırma için kullanılmıştır. Selülaazlar, kâğıttan mürekkep, kaplama ve tonerlerin çıkarılmasında kullanılır. Hamur liflerinin biyokarakterizasyonu, mikrobiyal selülaazların kullanıldığı başka bir uygulamadır. Selülaazlar ayrıca biyolojik olarak kolayca parçalanabilen kartonların hazırlanmasında da kullanılır. Enzim, kâğıt havlu ve hijyenik kâğıt dahil olmak üzere yumuşak kâğıt imalatında kullanılır ve yapışan kâğıdı çıkarmak için selülaaz içeren müstahzarlar kullanılır.

2.5.3 Tekstil Endüstrisi

Selülaazlar, yalnızca on yıldan beri piyasaya sürülmelerinden bu yana endüstride kullanılan üçüncü en büyük enzim grubu haline geldi. Kot giysilerin biyotaşlanmasında, yumuşaklık ve soluk görünüm elde etmek için, endüstride anılan indigo boyasını serbest bırakmak için selüloz elyafı üzerinde hareket ederek, kotun solmuş görünümünü üretirler. *H. insolens* selülaazı en yaygın olarak biyotaşlamada kullanılır, ancak proteazlarla birlikte *Trichoderma*'dan elde edilen asidik selülaazın kullanımının eşit derecede iyi olduğu bulunmuştur. Selülaazlar, kumaştan çıkıntı yapan küçük lif uçlarını sindirerek daha iyi bir yüzey elde etmek için kullanılır. Selülaazlar ayrıca yumuşatma, defibrilasyon ve liflerin renk yoğunluğunda lokalize varyasyon sağlama işlemlerinde de kullanılmıştır.

2.5.4 Biyoyakıt

Lignoselülozik kalıntılar, insanlık için mevcut olan en bol yenilenebilir kaynağı temsil eder, ancak kullanımları yalnızca uygun maliyetli teknolojilerin bulunmaması nedeniyle sınırlıdır. Selülaazın potansiyel bir uygulaması, selülozik malzemelerin, tek hücreli proteinlerin veya etanol gibi çeşitli fermantasyon ürünlerinin üretimi için mikrobiyal substratlar olarak kullanılabilen glikoza ve diğer fermente edilebilir şekerlere dönüştürülmesidir. Biyokütleyi doğrudan alkole dönüştürebilen selülaaz sistemlerine sahip organizmalar zaten rapor edilmiştir. Ancak açıklanan bu sistemlerin hiçbiri tek başına ticari olarak uygulanabilir bir süreç sağlamak için etkili değildir. Şu anda

lignoselülozik kalıntılardan biyoetanol üretiminde kullanılan strateji, lignin ve hemiselülaz fraksiyonunu gidermek için kalıntının ön işleminden geçirilmesini, fermente edilebilir şekerler üretmek üzere selülozik kalıntıyı hidrolize etmek için 50°C'de selülaz işlemini ve son olarak hidrolize selülozik malzemeden alkol üretmek için fermentatif bir mikroorganizmanın kullanılmasını içeren çok adımlı bir süreçtir. Biyoetanol tesisi için gerekli olan selülaz preparasyonu, substrat olarak aynı lignoselülozik kalıntı kullanılarak tesiste hazırlanır ve kullanılan organizma hemen hemen her zaman *T. Ressei*'dir. Biyoyakıt üretimi için verimli teknolojiler geliştirmek için, proste kullanılan mevcut organizmaların biyokimyasal ve genetik ıslahına yönelik çalışmaların yanı sıra, verimli selülaz sistemlerinin ve proses koşullarının belirlenmesine yönelik önemli araştırmalar yönlendirilmiştir. Biyokütlenin etanole veya fermantasyon ürünlerine dönüştürülmesinde saf enzimlerin kullanımı, ticari selülazların yüksek maliyeti nedeniyle şu anda ekonomik değildir. Etkili stratejiler henüz çözülmemiştir ve bu yönde aktif araştırmalar yapılmalıdır. Genel olarak, selülozik biyokütle, katma değerli metabolitlerin ve selülazların üretimi için substrat görevi görebilen çekici bir kaynaktır.

2.5.5 Şarap ve Biracılık Endüstrisi

Mikrobiyal glukanazlar ve ilgili polisakaritler fermantasyon süreçlerinde bira ve şaraplar gibi alkollü içecek üretmek için önemli rol oynamaktadır (Sukumaran ve ark., 2005 ve Bamforth, 2009). Bu enzimler fermantasyon ürünlerinin kalitesini ve verimini artırabilir (Bamforth, 2009). Glukanazlar ya maserasyon sırasında ya da birincil fermantasyon esnasında, glukanın hidrolize edilmesi, kerevizin viskozitesinin düşürülmesi ve filtrelenebilirliği arttırmak için eklenir (Bamforth, 2009, Canales ve ark., 1988).

Şarap üretiminde, pektinazlar, glukanazlar ve hemiselülaz gibi enzimler, renk ekstraksiyonunu, cilt maserasyonunu iyileştirerek, açıklığa kavuşturmayı, filtrelemeyi ve nihayetinde şarap kalitesini ve stabilitesini geliştirerek önemli bir rol oynamaktadır (Galante ve ark., 1998). B -Glukosidazlar, glikosile edilmiş öncülleri değiştirerek şarapların aromasını artırabilir. Maserasyon enzimleri, şarap fermantasyonu için kullanılan üzümün preslenebilirlik, yerleşim ve meyve suyu verimlerini de geliştirir. Şarap endüstrisi için bir dizi ticari enzim preparatı mevcuttur. Şarap yapımında bu

enzimleri kullanmanın temel faydaları daha iyi macerasyon, gelişmiş renk ekstraksiyonu, kolay temizleme, kolay filtreleme, geliştirilmiş şarap kalitesi ve geliştirilmiş kararlılıktır (Galante ve ark., 1998). Bira demleme, malt ve fermantasyon sırasında aktive edilen enzimlerin etkisine dayalıdır. Arpa maltasyonu, tohumun çimlenmesine bağlıdır ve tohumun rezervlerini hidroliz eden α -ve β -amilazlar, karboksipeptidaz ve β -glukanaz'ın biyosentezini ve aktivasyonunu başlatır (Bamforth, 2009). Daha önceki bir çalışmada (Oksanen ve ark., 1985), *Trichoderma* selüloz sisteminin endoglukanaz II ve ekzoglukanaz II'nin, polimerizasyon derecesi ve kahverengi viskozitede maksimum bir azalmadan sorumlu olduğunu gözlemlemiştir.

Üzüm preslenebilirliği, çökelme hızı ve toplam meyve suyu verimi bakımından belirgin ve tekrarlanabilir gelişmeler, yumuşatma enzimlerin bir kombinasyonu kullanılarak elde edildi. Bu iyileştirmeler sadece doğru bir denge pektinazlar, selülozlar ve hemiselülozlarla dikkati çekti (Galante ve ark., 1998), beyaz üzümlerden üç çeşidi (Soave, Chardonnay ve Sauvignon) kullanarak; , şarap üretiminde Cytolase 219'un (selüloz, pektinaz ve ksilanaz karışımı) performansını değerlendirdi ve ilk şarabın ekstraksiyonunda% 10-35'lik bir artış, must filtreleme hızında% 70-80'lik bir artış bildirdi, presleme süresinde 50-120 dakika azalma, viskozitede% 30-70 azalma, fermentörün soğutulması esnasında enerjinin% 20-40 tasarruf edilmesi ve şarap istikrarında belirgin bir iyileşme göstermiştir. Prosese ekzojen olarak eklenen selüloz ve pektinaz gibi gelişmiş enzimlerin gelecekte mevcut olan bira üretim süreçlerinin verimliliğini artırması beklenmektedir (Bamforth, 2009).

2.5.6 Tarım Endüstrileri

Farklı selülozlar, hemiselülozlar ve pektinaz kombinasyonlarından oluşan çeşitli enzim preparatları, bitki hastalıklarında potansiyel uygulamalara sahiptir (Bhat, 2000). Mikrobiyal hidrolazlar kullanılarak üretilen bitki veya fungal protoplastlar, arzu edilen özelliklere sahip melez soyları üretmek için kullanılabilir. Bazı mantarlardan elde edilen selülozlar ve ilgili enzimler, bitki hastalıklarını kontrol etmek için bitki patojenlerinin hücre duvarını parçalayabilir (Bhat, 2000). Fungal β -glukanazlar, bitki patojenlerinin hücre duvarlarını parçalayarak hastalıkları kontrol edebilmektedir. *Trichoderma* sp.,

Geocladium sp., *Chaetomium sp.* ve *Penicillium sp.* dahil birçok selülozik fungus. geliştirilmiş tohum çimlenmesi, hızlı bitki büyümesi ve çiçek açma, geliştirilmiş kök sistemi ve artan mahsul verimi kolaylaştırarak tarıma önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Bailey ve Lumsden 1998, Harman ve Kubicek 1998). Bu mantarların doğrudan doğruya (muhtemelen büyümeyi teşvik eden yayılabilir faktör aracılığıyla) ve dolaylı olarak (bitki hastalıklarını ve patojenleri kontrol ederek) bitkiler üzerindeki etkilerini (Bailey ve Lumsden 1998, Harman ve Bjorkman 1998), bu mantarların, geliştirilmiş bitki performansını nasıl kolaylaştırdığı henüz belli değildir.



3.MATERYAL VE METOD

3.1 MATERYAL

3.1.1 Ekipmanlar

Bu çalışmada aşağıdaki alet ve cihazlardan yararlanılmıştır.

Tablo 3. 1 Kullanılan ekipman ve markaları

CİHAZLAR	MARKA
Soğutmalı Santrifüj	HETTICH ROTAXA/RP
Soğutmalı Ultrasantrifüj	HERAEUS LABOFUGE 400R
pH metre	İNOLAB
UV-Spektrofotometre	PG T60
Derin Dondurucu (-80 oC)	CFC Free
Buzdolabı (-20 oC)	VESTEL BZP-L3302W
Vorteks	SCILOGEX MX-S
Otoklav	HICLAVE HV-50L
Manyetik Karıştırıcı	MTOPS MS300HS
Etüv	GEMO DT104
Mikroskop	OLYMPUS CX21
Çalkalayıcı İnkübatör	NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC
Terazi	RADWAG AS220.R2
Kar Makinesi	VISION
Dondurucu	HETTICH
Masa Üstü Çalkalamalı İnkübatör	LAB. COMPANION SI-600
10-100 µl Otomatik Pipe	CAPP
1-5 mL Otomatik Pipet	CAPP
Vakum Konsantratör	BACHOFER

3.1.2 Besiyerleri ve çözeltiler

Zenginleştirme besiyeri: 250 mL erlenlere yulaf ezmesi özü (3.5 g yulaf ezmesine 30 mL su ekleyerek 20-30 dk kaynatılır ve filtreden geçirilerek filtratın tamamı kullanılır), kristal viyole 0.5 g, deiyonize su 100 mL'ye tamamlanır ve steril için 121°C'de 15 dakika otoklavlanır (Zeng ve ark., 2016).

Kongo kırmızısı besiyeri: (g / L): Hedef suşun taranması için 1 litre distile su içerisine KH_2PO_4 1.0, NaNO_3 3.0, KCl 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, CMC Na 15, Agar 15-20 ve Kongo kırmızı 0.2 g tartılıp ilave edilir. Ardından manyetik karıştırıcı ile homojen karışımı sağlanır ve erlenlere aktarıldıktan sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlanır. Otoklavdan sonra yayma yöntemi ile petri kaplarına döküm yapılır (Assareh ve ark., 2012).

Fermantasyon besiyeri (g / L cinsinden): Sıvı ortamında selüloz üretimi için 1 litre distile su içerisine maya ekstraktı 1, CMC Na 5, NaCl 20, KH_2PO_4 0.5 ve $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g tartılıp ilave edilir. Ardından manyetik karıştırıcı ile homojen karışımı sağlanır ve erlenlere aktarıldıktan sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlanır.

Katı kültür fermantasyon (SSF) nemlendirme sıvısı (g / L): Katı besiyeri nemlendirilmesi kullanılması üzere 1 litre distile su içerisine $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.5, KH_2PO_4 3.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, CaCl_2 0.5 g ve Tween 80 (%1.0 h/h) oranında mL tartılıp ilave edilir ve ardından manyetik karıştırıcı ile karışımı sağlanır ve 121°C'de 25 dakika otoklavada steril edildikten sonra kullanılmak üzere saklanır.

Fosfat tamponu hazırlanması (0.1 M pH 5,0): KH_2PO_4 13.6 g, distile su 1000ml) Hassas terazide KH_2PO_4 13.6 g tartıldı ve beherdeki distile su içerisine eklenerek manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 1000 mL balon jöleye aktarıldı ve ardından distile su ile 1000 mL tamamlanarak hazırlandı.

Karboksimetil selüloz substratı çözeltisi: 1 g CMC'nin 90-95 °C'ye kadar ısıtılmış 100 mL 0,5 M fosfat tamponun (pH 5,0) içine yavaş yavaş ilave edilmesi ile hazırlanır (Huang ve ark., 2013).

2M NaOH çözeltisi: Hassas terazide 80 g NaOH tartıldı ve bir miktar distile su içinde çözülerek 1000 mL' ye tamamlanır (1.6 g NaOH/ 20 mL) (Aira ve ark., 1983).

Dinitrosalisilik asit (DNS) çözeltisi (100 mL): Hassas terazide 1 g DNS tartılıp 20 mL 2 M NaOH içinde çözöldüröldü. Daha sonra üzerine 50 mL distile su ilave edilerek karıştırıldı. Karışım 30 g Na-K tartarat ilave edilerek toplam hacim 100 mL'ye tamamlanır. Reaktif, oda sıcaklığında koyu renkli şişede saklanır (Huang ve ark., 2013)

3.2 METOD

3.2.1 Selöfaz enzimi üreten küf izolasyonu

Tokat ili sınırları içerisinde Pazar içesine bağı Taşlık Köyü orman topraklarından 10 cm derinlikten ve üniversitemiz içerisinde bulunan kompost üretim tesisinden yaklaşık 50'şer gr toprak ve kompost numunesi, aseptik koşullarda alınarak steril tüpler içerisinde en kısa zamanda laboratuvara getirilmiştir.

10 g toprak örneğı, 90 mL zenginleştirme besiyeri içine inoköle edilerek 100 rpm ve 42 °C de 10 gün boyunca inköbe edilerek selöfaz üreten mikroorganizmanın üremesi sağlanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Zenginleştirme Besiyeri

Daha sonra zenginleştirme besiyerinden desimal seyreltmeler yapılarak örnekler dökme plaka yöntemiyle, hazırlanmış olan Kongo kırmızı besiyerlerine aktarılmıştır. Ardından 42 °C de 10 gün boyunca selöfaz üreten mikroorganizmanın üremesi için inköbe edilmiştir. Her gün kongo kırmızı besiyeri içeren petri kabının üzerinde büyüyen koloniler kontrol edilerek, inkübasyon sonunda en büyük hidroliz zonu

oluşturan koloniler, selüloz üreticisi olarak seçilmiş ve daha sonra aynı besiyeri ve inkübasyon koşulları kullanılarak saflaştırılmıştır. Kültürlerin saflığı mikroskopik olarak kontrol edilmiştir. Saflaştırılan koloni %20 gliserol içerisinde -80°C’de stoklanmıştır.

3.2.2 Termofilik funguslardan spor eldesi

En yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenen termofilik funguslar ile katı kültür fermentasyonu ortamında çalışırken, çalışmanın standardizasyonu için küf sporları ile çalışılmıştır. Küf sporu elde etmek için stoktan termofilik fungus PDA (Potato Dextrose Agar) içeren 250 mL erlenlere yayma tekniği ile inokule edilmiş ve 42°C de 7 gün inkübe edilmiştir (Şekil 3.2 A). Süre sonunda gözlemlenen sporlar % 0.1’ lik Tween 80 içeren steril 10 mL su ilave ederek çalkalama ile elde edilmiştir (Ijaz ve ark, 2011). Süspansiyon haldeki termofilik fungus sporları, steril 10 mL kapalı tüplere alınmış ve her defasında uygun seyreltmeler yapıldıktan sonra ışık mikroskop altında thoma lam ile sayım yapılmıştır (Şekil 3.2 C).

$$\text{Spor sayısı (adet/mL)} = A \times SF \times 10000$$

formülü ile hesaplanmıştır. A;16 karede sayılan mikroorganizma sayısı, SF: Seyretme Faktörü ve 10000 mm³ ün mL’ye çevrilmesinde kullanılan sabit sayıdır.



A

B

C

Şekil 3.2 A ve B Spor süspansiyonları elde edilmesi, C Işık mikroskop altında thoma lam ile sayımı

Üretim ortamlarına küf sporlarından 1×10^7 spor olacak şekilde inokülasyon yapılmıştır.

3.2.3 En yüksek selülaaz aktivitesine sahip olan küfün moleküler tanılanması

En yüksek selülaaz aktivitesine sahip termofilik fungusun PDA besiyer petri kapta 3 nokta yöntemi ile ekim yapıldı ve üreme sonrasında moleküler tanılanması için 18S rRNA ve/veya DNA'larının ITS1 bölgelerinin dizi analizi için özel laboratuvara gönderilmiştir.

3.2.4 Katı kültür fermantasyon (SSF)

Katı besiyer olarak kullanılacak olan buğday kepeği parçalara ayırmak için küçük parçalara ayrılıp elekten elenerek toz haline getirilmiştir. Ardından 80°C de 24 saat pastör fırınında kuruması sağlandıktan sonra SSF'de havalandırma koşullarını sağlayabilmek amacı ile 250 mL'lik erlenlere 5'er gram buğday kepeği tartılıp yerleştirilmiştir. Bu işlemin ardından nemlendirme sıvısı [(g/ L): (NH₄)₂SO₄ 3.5, KH₂PO₄ 3.0, MgSO₄ 7H₂O 0.5, CaCl₂ 0.5 ve Tween 80 (% 1.0 h/h) (Moretti ve ark, 2012).] ile 1:1 w/w oranında buğday kepeği nemlendirildikten sonra 121°C'de 25 dakika süreyle otoklavlanarak steril edilmiştir.

Sterilasyon işleminden sonra substratın gramı başına 1x10⁷ spora eşdeğer bir hacim fungal spor inoküle edildikten sonra fermantasyon 42 °C'de 6 gün boyunca gerçekleşmiştir. Süre sonunda üretilen ekstraselüler enzimleri ortamdan ekstrakte etmek için, beş gram kepek içeren erlenlere 20 mL distile su eklenip 30 dakika boyunca karıştırılmış ve ardından steril gazlı bezden süzülerek kaba filtrasyon sağlanmıştır. Daha sonra SSF ortamında termofilik fungus tarafından üretilen selülaaz enzimi olarak 10000 rpm'de 4°C'de 5 dakika santrifüj ile elde edilen katı partiküllerin uzaklaştırılmıştır. Santrifüjle elde edilen bu hücresiz süpernatant, ham enzim ekstraktı olarak kullanılmış ve tüm kantitatif ölçümlerde enzim karışımı olarak kullanılmıştır.

3.2.5 CMC-Selülaaz enzim aktivitesini spektrofotometrik olarak ölçümü

Mikroorganizmaların üretmiş olduğu ekstraselüler selülaaz enzim varlığı kantitatif olarak, CMC-Na'in substrat olarak kullanıldığında 1 saat 50°C'de gerçekleşen reaksiyon sonucu elde edilen indirgen şekerlerin DNS ile ölçümü sonucunda belirlenmiştir

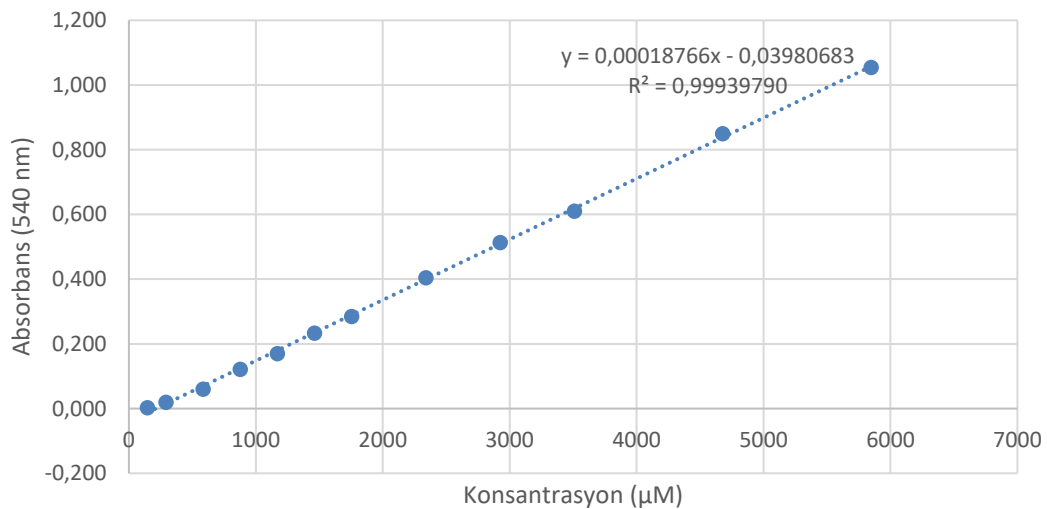
(Dashtban ve ark. 2012). Çalışmada 0.5 mL enzim 1.5 mL substrat ile reaksiyona sokulmuştur. Kör olarak tampon kullanılmıştır. Süre sonunda selülozun hidrolizi sonucu oluşan indirgen şekerleri ölçmek için kör ve örnek tüplere 2 mL DNS eklenmiş ve tüpler 10 dakika kaynatılarak serbestleşen indirgen şekerlerin DNS ile reaksiyona girmesi sağlanmıştır. Daha sonra hızlı bir şekilde soğutulan tüplere 6 mL distile su eklenmiş ve vortex ile karışımı sağlandıktan sonra 540 nm’de oluşan absorbans kaydedilmiştir.

CMC enzim aktivitesinin bir birimi (U), bir dakikada 1 μmol CMC-Na substratı indirgenmiş şeker üretmek için katalize edilen enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

Buna göre selülaz aktivite ölçümü yapılırken aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\text{Selülaz aktivitesi (U)} = \text{absorbans} / \text{Standart grafik eğimi} * 60 \text{dk.} * \text{enzim (mL)}$$

Standart grafik hazırlanırken 146- 5848 μM arası konsantrasyonlarda hazırlanan maltoz şekeri kullanılmış ve DNS ile yukarıda bahsedildiği gibi muamele edilerek 540 nm dalga boyundaki verdiği absorbanslar (0.003-1.054) kaydedilmiştir. Sonuçta Şekil 3.3’de verilen grafik elde edilmiştir. Buna göre Standart grafiğin eğimi 1.877×10^{-4} olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.3. Maltoz standart grafiği

3.2.6 Katı kültür fermentasyonda (SSF) optimum üretim koşulların belirlenmesi

Farklı karbon kaynaklarının enzim sentezi üzerine etkisi

Karbon kaynağı olarak kurutulmuş ve parçalanmış elma kabuğu, portakal kabuğu ve nar kabuğu, talaş ve kompost malzemesi buğday kepeği ortamına %1.0 oranında ilave edilmiştir. Yine nemlendirme sıvısı ile 1:1 (w/w) oranında nemlendirdikten sonra, 250 mL'lik erlenlerde 121 °C' de 25 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Sterilizasyondan sonra substratın gramı başına 10^7 spora eşdeğer bir hacim ile ekim yapılarak 42 °C' de inkübasyona bırakılmış ve 24 saat aralıkla alınan erlen örneklerinde enzim aktivitesine bakılmıştır. Termofilik fungusun en yüksek enzim aktivitesini gösterdiği karbon kaynağı belirlenmiştir.

Farklı azot kaynaklarının enzim aktivitesi üzerine etkisi

Nemlendirme sıvısında bulunan inorganik azot kaynağı olan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yerine %1.0 üre, pepton, maya ekstraktı, NH_4NO_3 , NaNO_3 gibi organik ve inorganik azot kaynakları kullanılmıştır. Rutin hazırlık ve inokülasyon işlemlerinden sonra, en yüksek enzim aktivitesinin gösterildiği azot kaynağı belirlenmiştir.

Farklı oranlarda nemlendirme ısvısının enzim aktivitesi üzerine etkisi

250 mL' lik erlen içerisindeki 5 g buğday kepeği, 1:0,5, 1:1, 1:2, 1:2,5 farklı oranlarda nemlendirildikten sonra yine 121° C' de 25 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Substratın gramı başına 10^7 spora eşdeğer bir hacim ile ekim yapılarak 42 °C' de inkübasyona bırakılan örneklerden 24 saat aralıkla bir erlen örneğinin enzim aktivitesine bakılmıştır. Termofilik fungusun en yüksek enzim aktivite gösterdiği nemlendirme oranı belirlenmiştir.

Farklı yüzey sürfektanlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi

Farklı yüzey sürfektanlarının enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla uygun nemlendirme oranında, % 0.05 tween 80, tritonX100, SDS ve EDTA ortama ilave

edilmiştir. Termofilik fungusun en yüksek enzim aktivitesi gösterdiği surfektan belirlenmiştir.

3.2.7 Enzim özelliklerinin değerlendirilmesi

Optimum sıcaklık değerlerinin belirlenmesi

Selüloz enzim optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerlerinin belirlenmesi amacıyla enzim ile substratı tüp içerisine eklenip vortex ile karıştırıldıktan sonra reaksiyon sıcaklıkları sırasıyla 30, 40, 50, 60, 70, 80 ve 90 °C’de 60 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir. Süre bitiminde DNS reaktifi eklenerek oluşan indirgen şekerler OD₅₄₀ nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmüştür. En yüksek absorbansın elde edildiği sıcaklık değeri baz alınarak yüzde (%) olarak relatif aktivite değerleri belirlenmiştir.

Optimum pH değerlerinin belirlenmesi

Enzimlerin optimum aktivite gösterdikleri pH değerlerinin belirlenmesi amacıyla Na-asetat (pH 4.0-6.0), Na-fosfat (pH 6.0-7.0), Tris (pH 7.0-10.0) tampon hazırlanmıştır. Her bir (3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 ve 10.0) pH değerinin substratı hazırlanması için ilgili pH’daki tamponları kullanılarak %1.0 w/v olacak şekilde hazırlanmıştır (Burhan vd., 2003). Her bir pH değeri için ayrı ayrı olacak şekilde substrat ile enzim karışımı hazırlanıp reaksiyon koşulları sağlanmıştır. OD₅₄₀ nm dalga boyunda en yüksek absorbansın elde edildiği sıcaklık değeri baz alınarak yüzde (%) olarak relatif aktivite değerleri belirlenmiştir.

Termal stabilitenin belirlenmesi

Termal stabilitelerinin belirlenmesi için enzimler reaksiyon öncesinde 4, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ve 90 °C sıcaklık değerlerinde ön inkübasyona bırakılmışlardır. Ön inkübasyonda +4, 30, 40 ve 50 °C sıcaklık değerlerinde 60 dakika aralıklarla ve 60,70, 80 ve 90 °C sıcaklık değerlerinde 30 dakikada bir 0.5 mL enzim ekstraktı alınarak 1.5 mL substrat ile pH 5.0 ve optimum sıcaklık koşullarında 60 dakika reaksiyona bırakılmıştır. Sonrasında

DNS ile indirgen şekerler OD₅₄₀ nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülmüş ve enzimlerin relatif olarak termal kararlılık grafikleri oluşturulmuştur.

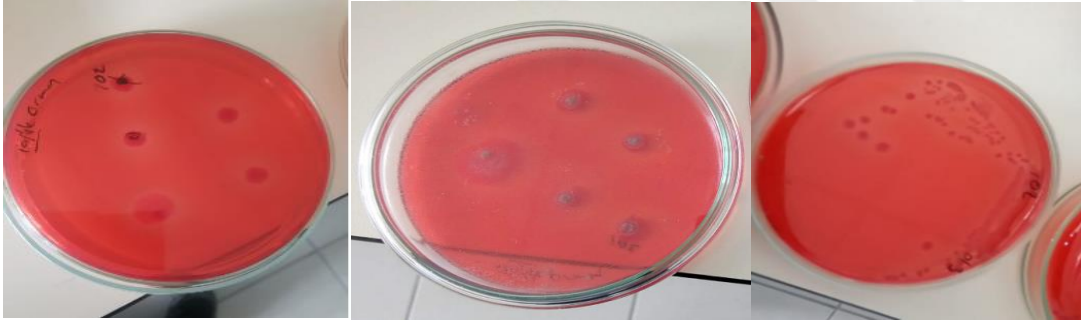


4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Ekstraselüler Selüloz Enzim Sentezleyen Mikroorganizmaların Belirlenmesi

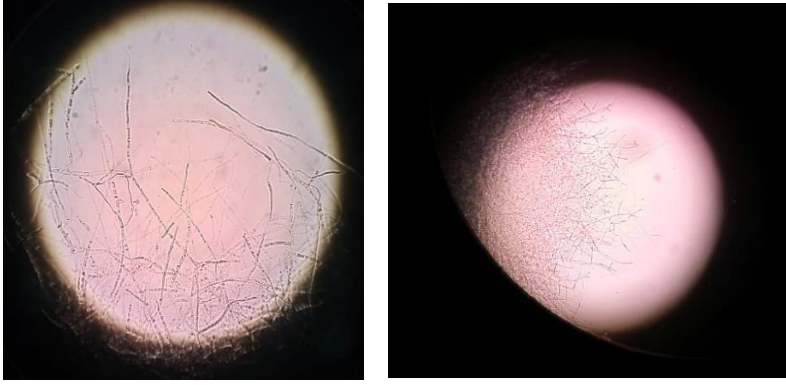
Selülozlar; farklı endüstrilerdeki uygulamalarda kullanılan, yüksek biyoteknolojik potansiyele sahip enzimlerdir. Fakat enzimin maliyeti ve stabilitesi kullanım açısından büyük önem taşımaktadır. Daha iyi proses uygunluğu, yüksek spesifik aktivite ve stabiliteye sahip selülozlar elde edebilmek için yeni selülozik suşlara ihtiyaç vardır.

Tokat ili sınırları içerisinde farklı orman bölgelerdeki orman topraklarından toplanan numuneler aseptik koşullar altında ve en kısa sürede laboratuvara getirilmiştir. Her bölgede alınan toprak numuneler ayrı ayrı zenginleştirilmiş besiyer ortamına 10' ar gram alınmıştır ve ardından 42 °C de 7 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra karbon kaynağı olarak CMC-Na içeren kongo kırmızı besiyer petrilere alınmıştır. Ekilen funguslar selülozu sindiren ekstraselüler selüloz enzim sentezliyorsa ham selüloz parçalanacaktır. Kongo kırmızı besiyerinde selüloz enzim üreten fungusun şeffaf zon oluşturup oluşturmadığına bakılmıştır (Şekil 4.1)



Şekil 4.1. Hedef Şuşun Taranması

15 adet termofilik fungus izolatların içerisinde üreyen ve kongo red besiyerinde en büyük şeffaf zon oluşturan 3 adet izolatların saflık kontrolleri ışık mikroskobu yardımıyla yapılmıştır. Buna göre elde edilen görüntüler aşağıdaki gibidir.



1

2

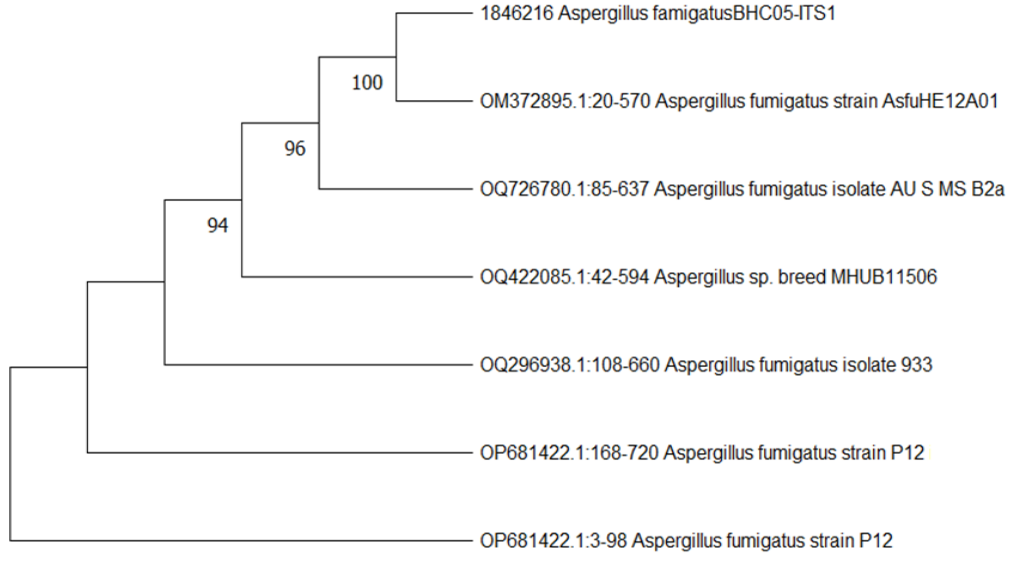
Şekil 4.2 Işık mikroskobu ile fungus görüntüsü

Koloni morfolojisi ve ışık mikroskobu ile misel morfolojik özellikleri her ikisi taramasında bir fungus olduğunu göstermektedir.

Çalışılacak mikroorganizmanın tanılanması amacıyla izole edilen termofilik fungusun 18S rRNA dizi analizi yapılmıştır. Selüloz üretiminde yüksek aktivite gösteren izolatın ITS1, ITS2 ve 5.8s rRNA analizlerinin sonucu (Şekil 4.3) *A. fumigatus* türü ile %100 doğrulukla örtüştüğü belirlenmiştir ve *A. fumigatus* BHC05 şeklinde isimlendirilmiştir (Şekil 4.4)

```
CTGGGTCCACCTCCCACCCGTGTCTATCGTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGT
TTCGACGGCCGCGGGGAGGCCTTGCGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACCCC
AACATGAACGCTGTTCTGAAAGTATGCAGTCTGAGTTGATTATCGTAATCAGTTAA
AACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC
GATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATT
GCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAG
CACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCCGTCCCCCTCTCCCGGGGGACGGGCCCCGAAAGGC
AGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCTGCTCTGTA
GGCCCGGCCGCGCCAGCCGACACCAACTTTATTTTCTAAGGTTGACCTCGGATC
AGGTAGGGATAACCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGGCGGAGGAA
```

Şekil 4. 3 18S rRNA dizi analizi sonucu elde edilen nükleotid dizisi

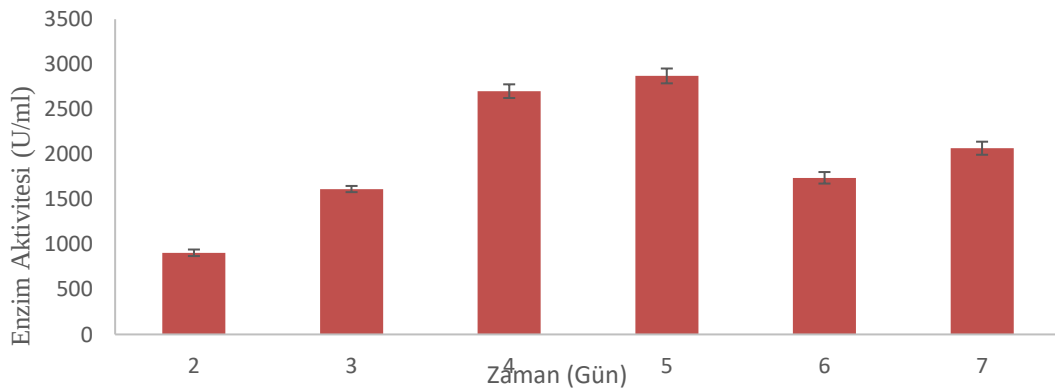


Şekil 4. 4. *A. fumigatus* BHC05 izolatının soy ağacı

4.2 SSF'deki Üretim Koşullarının *A. fumigatus* BHC05 Selüloz Enzim Sentezi Üzerine Etkisi

4.2.1 Üretim zamanı

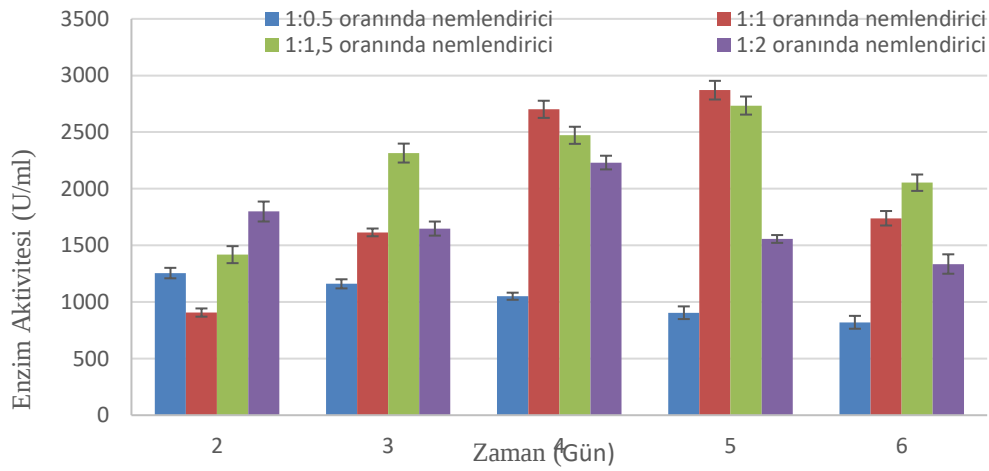
SSF kültüründe üretim süresinin optimizasyonu çalışmasında maksimum enzim sentezinin 2. günden 7. güne kadar hergün yapılan enzim aktivite ölçümü yapılmış elde edilen sonuçlar Şekil 4.5'de gösterilmiştir. Maksimum enzim aktivitesi üremenin 5.gününde 2870 ± 82 U/mL.dk olarak belirlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.5. SSF kültürlerinde üretim süresinin selüloz aktivitesine etkisi

4.2.2 Nemlendirme sıvısının etkisi

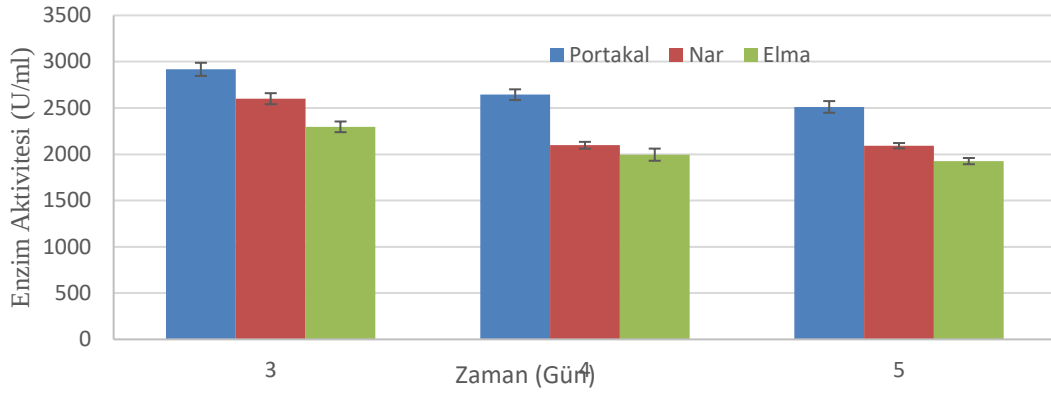
SSF kültüründe 1:0,5,1:1, 1:2, 1:2,5 oranlarında nemlendirme derecelerine sahip olan katı besiyerlerinde üretimi yapılan selüloz enzimi 2. günden 7. güne kadar günlük yapılan enzim aktivitesi ölçüm sonuçları değerleri nemlendirme oran grafiğinin veri tablosuna yazılmış ve en iyi nemlendirme oranı belirlenmiştir. Maksimum enzim aktivitesi 4.ve 5. günlerde 1:1 nemlendirme oranı ile 2701 ± 76 U/mL.dk ve 2870 ± 82 U/mL.dk olarak belirlenmiştir (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. SSF kültürlerinde nemlendirme oranının selüloz aktivitesine etkisi

4.2.3 Farklı karbon kaynaklarının enzim aktivitesi üzerine etkisi

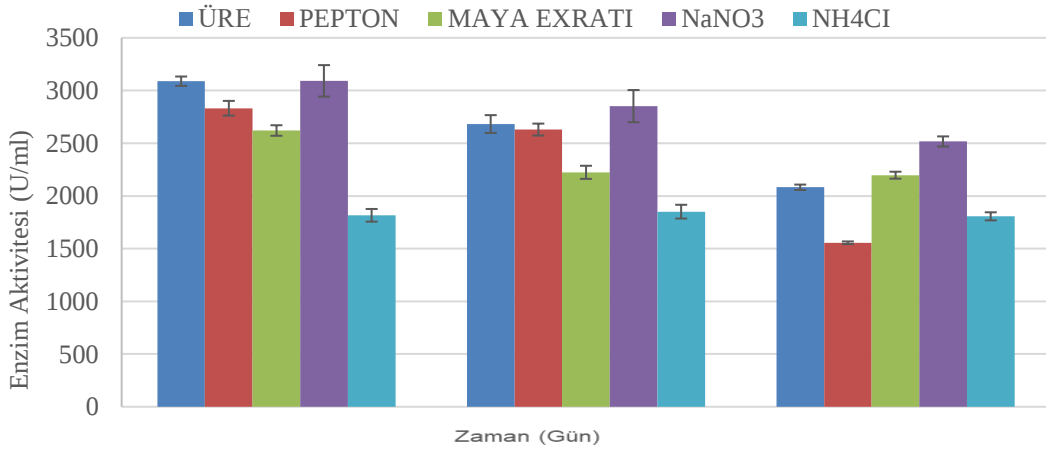
SSF kültüründe üretim süresinin optimizasyonu çalışmasında maksimum enzim sentezinin 3.,4. ve 5. günlerinde enzim aktivite ölçümü yapılmıştır. Günlük yapılan enzim aktivite sonuçları (Şekil 4.7.) grafiğinin veri tablosunda gösterilmiştir. Maksimum enzim aktivitesi üremenin 3.gününde 2918 ± 71 U/mL.dk olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.7 SSF kültürlerinde karbon kaynağı selülaaz aktivitesine etkisi

4.2.4 Uygun azot kaynağı seçimi

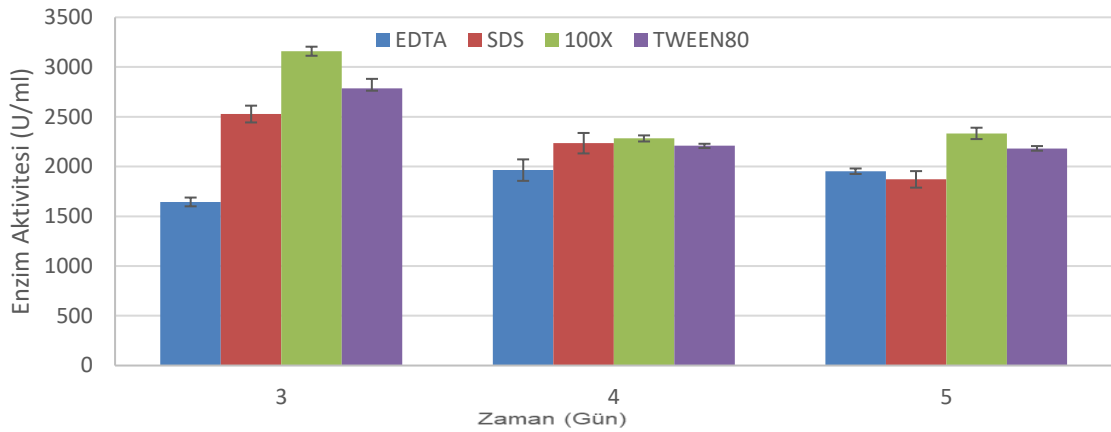
SFF kültürde azot kaynağı nemlendirme sıvısında bulunan inorganik azot kaynağı olan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yerine %1, üre, pepton, maya ekstraktı, NH_4Cl , NaNO_3 gibi organik ve inorganik azot kaynak optimizasyonu çalışmasında maksimum enzim sentezinin 3,4 ve 5. günde SFF kültüründe üretilen selülaaz enzim aktivite ölçümü yapıldı ve sonuçları azot kaynak grafiğın veri tablosuna enzim aktivite değeri yazıldı. Maksimum enzim aktivitesi 3.gününde azot kaynağı NaNO_3 3092 ± 149 U/mL.dk olarak belirlendi (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. SSF kültürlerinde azot kaynağı selülaaz aktivitesine etkisi

4.2.5 Yüzey sürfektan etkisi

SSF kültüründe uygun nemlendirme oranlarında, %0.05 tween 80, tritonX100, SDS ve EDTA sahip olan katı besiyerlerinde üretimi yapılan selüloz enzimi 3, 4 ve 5. günlerinde yapılan enzim aktivitesi ölçüm sonuçları değerleri yüzey sürfektan grafiğın veri tablosuna yazıldı ve en iyi yüzey sürfektan belirlendi. Maksimum enzim aktivitesi 3. gün tritonX100 3159 ± 46 U/mL.dk olarak belirlendi (Şekil 4.9.).



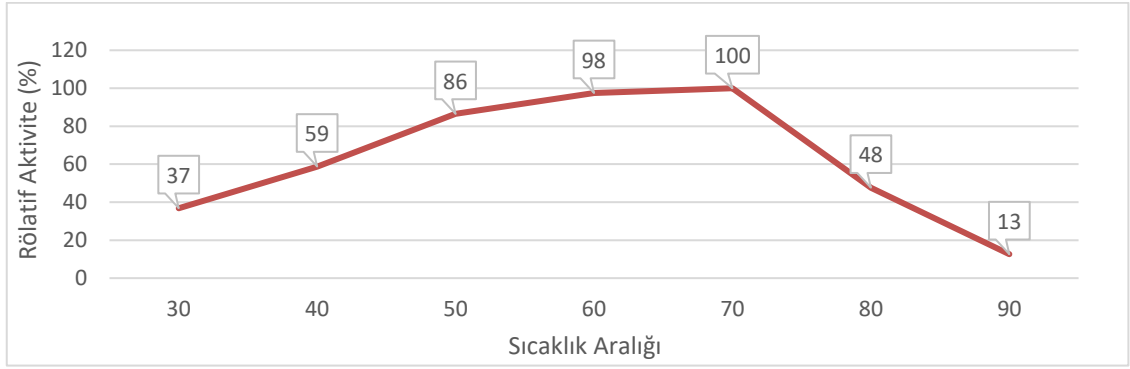
Şekil 4.9. SSF kültürlerinde yüzey sürfektan kaynağı selüloz aktivitesine etkisi

4.3 Termofilik Fungusların SSF Üretilen Selüloz Enzimatik Özellikleri

Termofilik fungus tarafından 3. günün sonunda maksimum üretildiği gözlemlenen selülozın optimum sıcaklık, optimum pH ve termal stabilite gibi enzimatik özellikleri değerlendirilmiştir.

4.3.1 Selüloz enzimine ait optimum sıcaklık değerleri

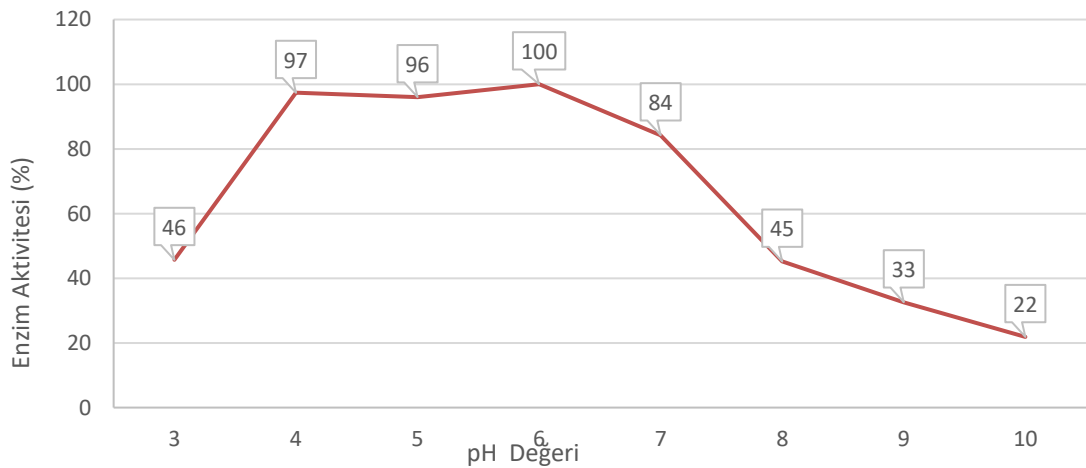
Termofilik fungus tarafından üretilen selüloz enzimin optimum sıcaklığını belirlenmesi için 30, 40, 50, 60, 70, 80 ve 90°C sıcaklıkta enzim aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre aktivite-sıcaklık grafiği oluşturuldu. Maksimum enzim aktivitesi optimum 70 °C de olarak belirlendi (Şekil 4.10.). Üretilen selüloz enzimleri optimum aktivitelerini 70 °C’de gösterirken 60 °C de enzim aktivitesi %98 ve 50 °C de enzim aktivitesi % 86 olarak gerçekleşmiştir.



Şekil 4.10. Enzim aktivite üzerindeki sıcaklığın etkisi

4.3.2 Selüloz enzimine ait optimum pH değerleri

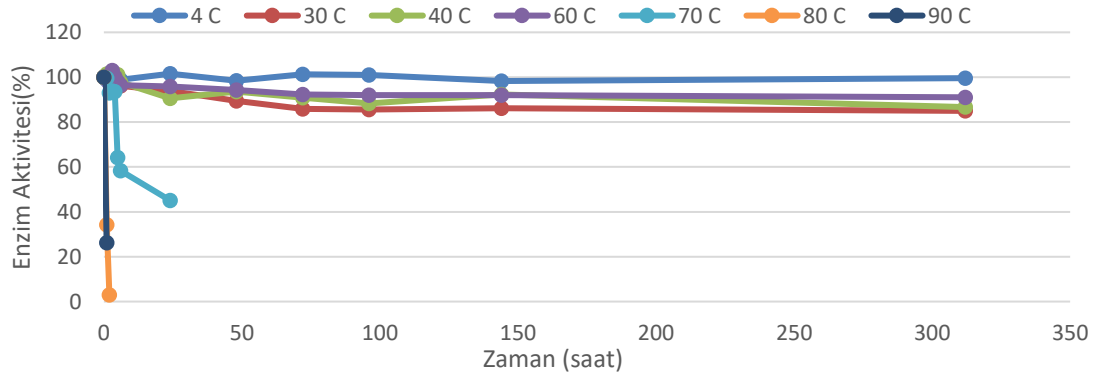
Termofilik fungus tarafından üretilen selüloz enzimin optimum pH' nı belirlenmesi amacıyla 3.0 ile 10.0 aralığında değişen pH değerlerinde Na-asetat (pH 4.0-6.0), Na-fosfat (pH 6.0-7.0), Tris (pH 7.0-10.0) tamponları kullanılarak selüloz enzim aktivite ölçümü yapıldı ve sonuçları enzim aktivite pH grafiğinin veri tablosuna yazılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre aktivite-pH grafiği çizilmiştir. Maksimum enzim aktivitesi optimum pH 6.0 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.11.). Selüloz enzimi 4.0 ve 5.0 pH enzim aktivitesi sırasıyla %97 ve 96 oranında gerçekleşirken, 8.0, 9.0 ve 10.0 pH enzim aktivitesi sırasıyla % 45, 33 ve 22 olarak gerçekleşmiştir.



Şekil 4.11. Enzim aktivite üzerindeki pH'ın etkisi

4.3.3 Selüloz enzimin termal kararlılıkları

Selüloz enzimlerinin termal kararlılıkları 4-70°C arasında değişen sıcaklık değerlerinde 1'er saat ve 80°C ve 90°C sıcaklık değerlerinde ise 30 dakika arayla enzim aktivitesi ölçülmesi sonucu belirlenmiştir. Elde edilen enzim aktivite sonuçlarıyla selüloz enzimlerinin termal kararlılık grafikleri çizilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 4, 30, 40 ve 60 °C'sıcaklıkta ön inkübe olan enzimlerden her 24 saat aralıkla 15 gün boyunca enzim aktivitesine bakıldı. Enzim aktivitesi % 80 kadar korurken, bu sıcaklık değerinden sonra yani 70 °C sıcaklıkta 4 saat boyunca koruduğunu ve 72. Saatte enzim aktivitesi % 45 koruduğunu göstermiştir. 80 °C ve 90 °C 30 dk sonra sırasıyla enzm aktiviteleri % 34 ve +-% 24 koruduğu görülmüştür (Şekil 4.12.). Enzimin saklama koşulları ve kullanım alanları hakkında fikir sahibi olmak için yapılan sıcaklık stabilite testine göre, enzimin 0 ve 60 °C'de 15 gün boyunca aktivitesinin koruduğunu gösterilmiştir.



Şekil 4.12. Enzim aktivite termal stabilitesi

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Bu çalışmada, biyoteknolojik değeri olan selüloz enzimi orman toprağında termofilik fungusundan kısmı saflaştırma yapıp ve enzimatik özellikleri incelenmiştir. Literatüre bakıldığında funguslarla ilgili yapılan çoğu çalışmaların ticari olarak satılan suşlarla yapıldığı gözlemlenmiştir. Biz çalışmamızda termofilik fungusun ürettiği enzimin selülozu diğer ticari suşlarına göre daha fazla hidrolize edebileceği olasılığı nedeniyle orman toprağından izole ettik. İzole edilen termofilik fungus tarafından SSF’ da üretilen selüloz enzimi kısmı saflaştırma yapıp, enzimin CMC-Na ile enzim aktivitesi üzerine etkileri belirlenmiştir.

Katı kültür fermentasyon sürecini etkileyen birçok faktör vardır. Bunlar, substrat seçimi, başlangıç nem düzeyi ve üretim süresidir. Bu tez çalışması kapsamında yukarıda sayılan parametreler araştırılarak SSF’de fermentasyon şartları optimize edildi. Bu çalışma kısımları için enzim üretimi optimum şartlarda gerçekleştirildi.

Çalışmalarımıza araştırma süresince orman toprağından yüksek aktiviteli selüloz üretebilen termofilik fungus izolasyonu ve Katı Kültür Fermentasyonunda optimum selüloz enzim üretim koşulların belirlemeye başlanmıştır. Orman toprak örneği zengileştirme besiyerine ekim yapıldıktan sonra 42 °C ve 7 gün boyunca inkübasyona bırakılarak çoğalması sağlanmıştır. Zengileştirme besiyerinde çoğalan mikroorganizmaların seyretme yapılarak petri kaplarına kırmızı kongo besiyerine dökme yöntemi kullanılarak ekim yapılmıştır ve 42 °C 7 gün inkübasyon süresinin sonunda hidroliz zonları belirlenmiştir. İnkübasyon süresi bitiminde hidroliz sonucunda en büyük zon çapına sahip oldukları belirlendiğinden bu suşlar selüloz enzim pozitif olarak değerlendirilmiş ve diğer basamaklarda selüloz enzim üretici mikroorganizma olarak kullanıma karar verilmiştir. Çalışmamızda, SSF ortamı olarak tarımsal yan ürün olan buğday kepeği selülozik substrat olarak kullanılmıştır. SSF ortamında nemlendirme sıvısı, pH’sı, inkübasyon sıcaklığı ve inkübasyon süresini optimizasyon çalışması yapılarak, optimum şartlarında selüloz enzimi elde edilmesi sağlanmıştır.

Üretim süresinin optimizasyonu için üremenin 1., 2., 3., 4., 5. ve 6. gün sürelerinde enzim aktiviteleri ölçümü yapıldı. Optimum enzim aktivitesi üretimin 4. günü olarak belirlendi.

Üretimin 4. gününden sonra enzim aktivitesinde düşüş olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.1.). Mikrobiyal büyümesi besiyer tükendiği için durgunluk evresine girer ve sekonder metabolitlerin üretimi başladığından, enzim sentezi ve aktivitesi azalması gösterir Ayrıca besiyerinde bulunan diğer bileşiklerle etkileşimden dolayı meydana gelen enzim denatürasyonu yüzünden enzim sentezi ve aktivitesi azalmaktadır (Ramesh ve Lonsane, 1987).

Portakal, elma ve nar kabuğu karbon kaynağı olarak kullanıldığında elde edilen selülozda maksimum aktiviteye pH' 5 de 3.gün inkübasyon sonunda portakal kabuğu maksimum enzim aktivitesine 2918 ± 71 U/mL.dk ulaşılmıştır (şekil 4.5).

Termofilik fungusun büyümesi için ve buğday kepek substratın nem içeriği kullanımı için optimum nem içeriği 1:0.5,1:1.5 ve 1:2 (w/w) oranları arasındadır. Bu durumda enzim üretim için kullanılan substrat nem içeriğine göre değişikliklik göstermektedir. Buğday kepeği kullanılarak hazırlanan SSF kültürlerinde başlangıç nem içeriklerinin 1:0.5 ve 1:2 arasında olduğu belirtilmiştir. SSF da nemlendirme sıvısının büyüme ve substrat kullanımından sonra maksimum enzim aktivitesi (1:1 w/w) 5.gününde enzim aktivitesi 2870 ± 82 U/mL.dk olarak belirlenmiştir (Şekil 4.4).

Termofilik Fungus tarafından maksimum üretildiği gözlemlenen selülozın optimum sıcaklık, optimum pH ve termal stabilite parametreleri ile optimizasyon gerçekleştirilmiştir. Bu parametrelerin etkisi incelendiğinde sıcaklık 70°C ' ye kadar arttıkça aktivitenin arttığı fakat sıcaklığın 70°C 'den sonra artmasıyla aktivitenin azaldığı gözlenmiştir. Üretilen selüloz enzimleri optimum aktivitelerini 70°C ' göstermiştir (Şekil 4.6). Bu da sıcaklık arttıkça enzimlerin protein yapısının bozulması ve inaktive olması ile açıklanabilmektedir

Selülozın pH parametresine bakıldığında pH ın artması ile de selüloz aktivitesi artarken maksimumu bulduğu noktadan sonra aktivitenin azalmaya başladığı görülmüştür. Selülozın pH ın çok yüksek veya çok düşük olması aktiviteyi olumsuz etkilemektedir. Maksimum enzim aktivitesi optimum pH 6.0 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.9.)

SSF ortamında elde edilip kısmı saflaştırılan selüloz enzimin termal kararlılıklarına bakılmıştır. 4, 30, 40, 60 °C’de tutulan ortamda 15 gün boyunca bekletildi, 24 saat arayla enzim aktivite ölçümü sonucunda 15 gün aktivite korunduğu gözlenmiştir. 70 °C sıcaklıkta ise 4 saat aktivitesini korumuştur.

Termofilik fungusların, lignoselülozik biyokütlenin, kentsel katı atıkların ve diğer organik atıkların bozunma süreçlerinde önemli bir rol oynayan endüstriyel olarak önemli lignoselülotik enzimler ürettiği bilinmektedir.

SSF, enzimlerin üretimi için çekici bir prostestir. SSF’de mikrobiyal selüloz üretimi dahil olmak üzere enzimlerin üretimi, SmF’ye göre avantajlıdır. SSF’nin çeşitli avantajlarına rağmen, farklı süreç parametrelerinin izlenmesi ve kontrol edilmesindeki zorluklar ve mikrobiyal büyümeyi ve metabolit üretimini etkileyen çeşitli işletme değişkenleri nedeniyle endüstriyel süreçlerdeki uygulamaları sınırlıdır. Mikrobiyal selülozın ticarileştirilmesidir, yani ürün geri kazanımı ve enerji harcaması açısından düşük maliyetli biyoreaktörlerin yeni tasarımı ve büyütülmesidir.

Son zamanlarda enzimleri çoğunlukla endüstriyel uygulamalarda kullanılmaktadır. Endüstriyel alanlarda kullanılan enzimleri spesifik olmaları, yüksek aktiviteye sahip olmaları ve stabil olmaları arzu edilmektedir.

Tablo 5.1 *Aspergillus fumigatus* tarafından pH, sıcaklık ve üretim ortamında üretilen selüloz enzim aktivitesi önceki çalışma sonuçları ile karşılaştırılması.

Mikroorganizma	Metod	Substrat	pH	°C	CMCase	Referans
<i>A. fumigatus</i> BHC05	SSF	Buğday kepeği	5.0	70	2870 U/mL 8610 U/gds	Bu tez çalışması
<i>A. fumigatus</i> SKF2	SSF	Şeker kamışı, buğday kepeği, portakal kabuğu	7.0	40	1447,89 U/gds	Subhadeep ve ark., 2020.
<i>A. fumigatus</i>	SSF	Şeker kamışı ve buğday kepeği	5.0	65	47 U/g	Aline ve ark., 2021.
<i>A. fumigatus</i> SCBM6	SSF	Buğday kepeği	4.8	40	41.47 U/g	Dias ve ark., 2017.
<i>A. fumigatus</i> ON226990	SSF	Prinç ve buğday kepeği	6.0	35	50 U/gds	Gares ve ark., 2023.

<i>A. fumigatus</i> JCM 10253	SSF	Buğday keğpeği	5.0	60	26.2 U/mL	Saroj ve ark., 2018.
<i>A. fumigatus</i> CCT7873	SSF	Şeker kamışı	4.8	50	10.89 U/mL	Oliveira Júnior ve ark., 2020.
<i>A. fumigatus</i> Z5	SSF	Mısır sapı	5.0	50	526.3 U/g	Liu ve ark., 2011.
<i>A. fumigatus</i>	SSF	Şeker kamışı	4.5	30	4.18	Oliveira ve ark., 2018.
<i>A. fumigatus</i> M7.1	SSF	Prinç ve buğday kepeği	5.0	45	42 U/g	Moretti ve ark., 2012.

A. niger NRRL3 tarafından substratı buğday kepeği ile SSF' da 40 °C 5. günün sonunda yapılan CMCase aktivitesi 1.9 U/mL olarak belirlenmiştir (Ong ve ark., 2004). Çin Bilim ve Teknoloji Üniversitesinden, Yuan ve arkadaşları (2011) tarafından izole edilen *Fusarium oxysporum* H57-1 olarak suştan en yüksek CMCase aktivitesi 1.43 IU /mL belirlenmiştir.

Matgar ve arkadaşları *A. sydowii* türünün salgıladığı selüloz araştırdıklarında, fermantasyon koşullarının %0.1 Tween-20 ile optimize edildiğinde, 40 ° C ve 120 rpm karıştırma koşullarında 6.gününde en yüksek 1.33 IU / mL CMCase aktivitesi elde edildiği belirtilmiştir (Ketna ve ark., 2013).

Hindistan Pencap Üniversitesi Biyoteknoloji Bölümün Yogita Lugani ve Rajesh Singla tarafından izole edilen *Bacillus sp* Y3 in CMCase aktivitesi 6.84 IU / mL olarak belirlenmiştir (Yogita ve ark., 2015).

Çin Wuhan Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Kimya Mühendisliği ve Teknolojisi Fakültesi, Zeng ve arkadaşları tarafından izole edilen *Tricoderma virens* ZY-01 suşundan en yüksek CMCase aktivitesi 7.4 IU/mL belirlenmiştir (Zeng ve ark., 2016).

Aspergillus. Fumigatus BHC05 substratı buğday kepeği ile SSF ortamında 4.günde üretilen enzimi ile substratı (%1 w/v CMC) pH 5.0 50 °C de ve 60 dk inkübasyon sonucunda DNS yöntemiyle bakılan enzim aktivitesi 2870 U/mL göstermiştir. Bu bulgulara dayanarak, bu yeni elde edilen termofilik fungusun selüloz enzim üretimi için iyi bir uygulama olduğu sonucuna varılabilir.

Sonuç olarak çalışmamızda termofilik fungus kökenli yeni enzim kaynaklarının belirlenmesi, tarımsal yan ürünleri kullanılarak ucuz maliyette enzimlerin elde edilmesi ve bu enzimlerin saflaştırılması ile bilime ve ekonomiye yapacağı katkıların yanında çevreye olumlu etkileriyle büyük önem taşıdığı düşünülmektedir. Çalışmamız doğrultusunda elde edilen veriler ile termofilik fungus kökenli ile selülaz enziminin yüksek sıcaklık ve asidik pH' larda aktivitesini korumasıyla başta gıda, kâğıt, tekstil, deterjan gibi alanlar olmak üzere birçok endüstriyel alanda kullanılmak üzere geliştirilebilir.



KAYNAKLAR

- Andersen, N., 2007. Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. Technical University of Denmark, pH.D. Thesis, 154.
- Aline, R. and Adriana K., 2021. A new and unusual β -glucosidase from *Aspergillus fumigatus*: Catalytic activity at high temperatures and glucose tolerance. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Volume 35, 102064.
- Assareh, R., Shahbani H.Z., Akbari K.N., Aminzadeh, S., Bakhshi G.K., 2012. Characterization of the newly isolated *Geobacillus* sp. T1, the efficient cellulase-producer on untreated barley and wheat straws. *Bioresour. Technol.* 120, 99–105.
- Bailey, B. A. And Lumsden R. D., 1998. Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to pathogens in *Trichoderma* & *Gliocladium* Enzymes. Volume 26, Issue 5, Pages 782-787
- Bamforth, C. W., 2009. Current perspectives on the role of enzymes in brewing. *Journal of Cereal Science*. Vol. 50, no. 3, pp. 353–357.
- Barcelos, C.A., Rocha, V.A., Groposo, C., de Castro, A.M., Pereira, N.P., 2016. Jr. Enzymes and accessory proteins involved in the hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production. *Mycol. Curr. Future Dev.* 1, 23–56.
- Barr, BK., Hsieh Y-L., Ganem B., Wilson DB., 1996. Identification of two functionally distinct classes of exocellulases. *Biochem.* 35: 586-592.
- Bayer, E.A, Shoham Y, Lamed R., 2013. Lignocellulose-decomposing bacteria and their enzyme systems. In: *The Prokaryotes*, Fourth Edition. Edited by Rosenberg E. Berlin: Springer-Verlag: 216-266.
- Bedford, M. R., Morgan A. J, Fowler T., Clarkson K. A., Ward M. A. Collier K. D. & Larenas E. A., 2003. Enzyme feed additive and animal feed including it. US Pat 6562340.

Behera, S. S., Ray Ramesh C., 2016. Solid state fermentation for production of microbial cellulases: Recent advances and improvement strategies. *International Journal of Biological Macromolecules*. Volume 86, Pages 656-669.

Bhat, M.K., 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18, 355–383.

Bhikhabhai, R, Johansson G, Pettersson G., 1984. Isolation of cellulolytic enzymes from *Trichoderma reesei* QM 9414. *J. Appl. Biochem.* 6:336-345.

Boisset, C, Fraschini C, Schulein M, Henrissat B, Chanzy H., 2000. Imaging the enzymatic digestion of bacterial cellulose ribbons reveals endo character of the cellobiohydrolase Cel6A from *Humicola insolens* and its mode of synergy with cellobiohydrolase Cel7A. *Appl. Environ. Microbio.* 66: 1444-1452.

Brown, RF, Holtzapple MT., 1990. A comparison of the Michaelis-Menten and HCH-1 models. *Biotechnol. Bioeng.* 36: 1151-1154.

Burton, J, Wood SG, Pedyczak A, Siemieon IZ., 1989. Conformational preferences of sequential fragments of the hinge region of human IgA1 immunoglobulin molecule: II. *Biophys. Chem.* 33: 39-45.

Bushuev, VN, Gudkov AT, Liljas A, Sepetov NF., 1989. The flexible region of protein L12 from bacterial ribosomes studied by proton nuclear magnetic resonance. *J. Biol. Chem.* 264: 4498-4505.

Canales, A. M., Garza R., Sierra J. A. and Arnold R., 1988. The application of beta-glucanase with additional side activities in brewing. *MBAA Technical Quarterly*. Vol. 25, pp. 27–31.

Chan, K., AU K. S., 1987. Studies on cellulase production by a *Bacillus subtilis*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 53, 125-136.

Chen, H, Hayn M, Esterbauer H., 1992. Purification and characterization of two extracellular beta glucosidases from *Trichoderma reesei*. *Biochem. Biophys. Acta* 1121: 54-60
oduction. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(1), 205-210.

Chinedu, S.N., Okochi V. I., Omidiji O., 2011. Cellulase Production By Wild Strains of *Aspergillus Niger*, *Pencillium Chrysogenum* And *Trichoderma Harzianum* Grown on Waste Cellulosic Materials. *Ife Journal of Science*, 13(1), 57-63.

Dashtban M., Maki M., Tin Leung K., Mao C. and Qin W. (2010). Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. *Critical Reviews in Biotechnology*. Vol. 30(4), 302–309.

Davies, GJ, Dadson GG, Hubbart RE, Tolley SP, Dauter Z, Wilson KS, Hjort C, Mikkelsen JM, Rasmussen G, Schulein M., 1996. Structure and function of endoglucanase V. *Nature*. 365: 362-364.

Decker, C.H., Visser J., Schreier P., 2000. β -glucosidases from five black *Aspergillus* species: study of their physico-chemical and biocatalytic properties. *J. Agric. Food Chem.* 48: 4929-4936.

Dias, L.M., dos Santos B.V., Albuquerque C.J.B., Baeta B.E.L., 2017. Biomass sorghum as a novel substrate in solid-state fermentation for the production of hemicellulases and cellulases by *Aspergillus niger* and *A. Fumigatus*. *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072.

Divne, C, Stahlberg J, Reinikainen T, Ruohonen L, Pettersson G, Knowles JKC, Teeri TT, Jones TA., 1994. The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *Science* 265: 524-528.

Divne, C, Stahlberg J, Teeri TT, Jones TA. ,1998. High-resolution crystal structures reveal how a cellulose chain is bound in the 50 Å long tunnel of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *J. Mol. Biol.* 275: 309-325.

Duff SJB, Marray WD., 1996. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. *Bioresour. Technol.* 55: 1-33

Esterbauer, H, Steiner W, Labudova I, Hermann A, Hayn M., 1991. Production of *Trichoderma* cellulase in laboratory and pilot scale. *Biores. Technol.* 36: 51-65.

Fan, L. T, Lee Y. H, Gharpuray M. M., 1982. Lignoselüloziklerin doğası ve ön işlemleri enzimatik hidroliz. *Av. Bichem. Müh/Biyoteknoloji* 23: 158-187.

Farinas, C. S., Loyo M. M., Junior A. B., Tardioli P. W., Neto V. B., Couri S., 2010. Finding stable cellulase and xylanase: evaluation of the synergistic effect of pH and temperature. *New Biotechnology*, 27(6), 810-815.

Galante Y. M., DeConti A. and Monteverdi R., 1998. Application of *Trichoderma* enzymes in food and feed industries, in *Trichoderma and Gliocladium Enzymes*, G. F. Harman and C. P. Kubicek, Eds., vol. 2 of *Biological Control and Commercial Applications*, pp. 311–326.

Gares, M., Benaissa A., Hiligsmann S., Cherfia R, Flahaut S., Alloun W., Djelid H., Chaoua S. and Chaouche N.K., 2023. Box Behnken design optimization of xylanase and cellulase production by *Aspergillus fumigatus* on *Stipa tenacissima* biomass. *Mycologia*, 115:4, 437-455.

Gunata, Z. ve Vallier MJ., 1999. Production of a highly glucose-tolerant extracellular β -glucosidase from three *Aspergillus* strains. *Biotechnol. Lett.* 21: 219-223.

Gusakov, A.V. and Sinitsyn, A.P., 1992. A theoretical analysis of cellulase product inhibition: effect of cellulase binding constant, enzyme/substrate ratio, and β -glucosidase activity on the inhibition pattern. *Biotechnol. Bioeng.* 40: 663-671.

Gibbs, M.D., Saul D.J., Luthi E., Bergquist P.L., 1992. The β -mannanase from “*Caldocellum saccharolyticum*” is part of a multidomain enzyme. *App. Environ. Microbiol.* 58: 3864-3

Gilkes, NR, Henrissat B, Kilburn DG, Miller RC, Warren RAJ., 1991. Domains in microbial beta-1, 4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. Microbiol. Rev. 55: 303-315. 867.

Gruno, M., Valjamae P., Pettersen G. and Johansson G., 2004. Inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulases by cellobiose is strongly dependent on the nature of the substrate. Biotechnol. Bioeng. 86, 503-511.

Harman G. E. and Bjorkman T., 1998. Potential and existing uses of *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement in *Trichoderma* and *Gliocladium*. Kubicek C. P. and Harman G. E., Eds., vol. 2, pp. 229–265.

Henrissat, B. 1998. Enzymatic cellulose degradation. Cellulose Commun. 5: 84-90.

Hon D. N.S, Shiraishi N., 1991. Wood and cellulosic chemistry. New York: Marcel Dekker, inc. 1032 p.

Huang, Y., Bai H., Wang H., Sun J., İrfan, M., Han M., Han X. ve Yang Q., 2013. *Penicillium simplicissimum* H-11'den beta 1,4-glukanazların saflaştırılması ve karakterizasyonu. BioRes. 8(3), 3657-3671.

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.

Ijaz A., Anwar Z., Zafar Y., Hussain I., Muhammad A., Irshad M. and Memood S., 2011. Optimization of Cellulase Enzyme Production from Corn Cobs Using *Alternaria alternata* by Solid State Fermentation. Journal of Cell and Molecular Biology, 9(2), 51-56.

Jiang X., Geng A., He N. And Li Q., 2011. New isolate of *Trichoderma viride* strain for enhanced cellulolytic enzyme complex production. Journal of Bioscience and Bioengineering. vol. 111 (2), 121–127.

Jorgensen H, Eriksson T, Borjesson J, Tjerneld F, Olsson L., 2003. Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888. *Enz. Microb. Technol.* 32: 851-861.

Karmakar, M., Rav R.R., 2011. Current Trends in Research and Application of Microbial Cellulase. *Research Journal of Microbiology*, 6(1), 41-53.

Karlsson, J, Siika-aho M, Tenkanen M, Tjerneld F., 2002. Enzymatic properties of low molecular mass endoglucanases Cel12A (EG III) and Cel45A (EG V) of *Trichoderma reesei*. *J Biotechnol* 99:63-78.

Ketna, M., Digantkumar C., Jyoti D., Anand N., 2013. Datta, M. Production of cellulase by a newly isolated strain of *Aspergillus sydowii* and its optimization under submerged fermentation. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 78, 24–33.

Kleywegt, GJ, Zou JY, Divne C, Davies GJ, Sinning I, Stahlberg J, Reinikainen T, Srisodsuk M. Teeri TT, Jones TA., 1997. The crystal structure of the catalytic core domain of endoglucanase I from *Trichoderma reesei* at 3.6 Å resolution, and a comparison with related enzymes. *J. Mol. Biol.* 272: 383-397.

Ko C., Tsai, C., Lin P., Chang K., Tu J., Wang Y., Yang C., 2010. Characterization and pulp refining activity of a *Paenibacillus campinasensis* cellulase expressed in *Escherichia coli*. *Bioresource Technology*. 101, 7882– 7888.

Kumar, A., Hori K. ve Dutt, D., 2012. Optimization of Cellulase Production Under Solid-State Fermentation by *Aspergillus flavus* (AT-2) and *Aspergillus niger* (AT-3) and Its Impact on Stickies and Ink Particle Size of Sorted Office Paper. *Cellulose Chemistry and Technology*. 247001, 287-298.

Larsson, P.T., Wickholm K., Iversen T., 1997. A CP/MAS C NMR investigation of molecular ordering in celluloses. *Carbohydr. Res.* 302: 19-25

Lehtio, J, Sugiyama J., Gustavsson M., Fransson L., Linder M., Teeri T.T., 2003. The binding specificity and affinity determinants of family 1 and family 3 cellulose binding modules. PNAS. 100: 484-489.

Lekh, R., Kuldeep K. and Sandeep S., 2014. Screening Isolation and Characterization of Cellulase Producing Micro-Organisms from Soil. International Journal of Pharmaceutical Science Invention. Volume 3, PP.12-18

Lerner, K. L., and Lerner. W., 2002. World of microbiology and immunology. America, 1-359.

Lloyd, T.A., Wyman C.E., 2005. Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids. Bioresour. Tech. 96: 1967-1977. Reviews, 66(3), 506-577.

Liu, D., Zhang R., Yang X., Wu H., Xu D., Tang Z., Shen Q., 2011. Thermostable cellulase production of *Aspergillus fumigatus* Z5 under solid-state fermentation and its application in degradation of agricultural wastes. International Biodeterioration & Biodegradation. 65, 717-725.

Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., Pretorius I. S., 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. Microbiology and Molecular Biology. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 66, 506-577.

Mahmud, R. T. , Esad M. J. , Mehboob N. , Mushtaq M., 2013. Production, Purification, and Characterization of Exoglucanase by *Aspergillus fumigatus*. Applied Biochemistry and Biotechnology volume 170, pages895–908.

Malik, S. K., Farooqi H. M. A. A., Haq I., 2010. Optimization of Process Parameters for The Biosynthesis of Cellulases by *Trichoderma Viride*. Pak. J. Bot., 42(6): 4243-4251.

Manish, S., Mishra Pramod P. K. and Ramteke W., 2016. Application of ZnO Nanoparticles for Improving the Thermal and pH Stability of Crude Cellulase Obtained from *Aspergillus fumigatus* AA001. Sec. Microbiotechnology Volume 7 – 2016.

Mattinen, ML, Linder M, Drakenberg T, Annila A., 1998. Solution structure of the cellulose binding domain of endoglucanase I from *Trichoderma reesei* and its interaction with çello oligosaccharides. *Eur. J. Biochem.* 256: 279-286.

McCarter, JD, Withers SG., 1994. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4: 885-892

Moretti, S., Bocchini-Martins D. A., Sette Lara D., 2012. Selection Of Thermophilic And Thermotolerant Fungi For The Production Of Cellulases And Xylanases Under Solid-State Fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology.* 1062-1071 ISSN 1517-8382

Mosier, N.S., Hall P., Ladisch C.M., Ladisch MR.,1999. Reaction kinetics, molecular action and mechanisms of cellulosic proteins. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 65: 23-40.

Naika, G. S., Kaul, P., Prakash, V., 2007. Purification and Characterization of a New Endoglucanase from *Aspergillus aculeatus*. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 7566- 7572.

Narasimha, G., Sridevi, A., Buddolla, V., Subhosh, C., Rajasekhar, R., 2006. Nutrient effects on production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger*. *African Journal of Biotechnology*, 5 (5), 472-476.

Neha, S., Manish S., Mishra P. K., Pramod W.R.,2016. Application of ZnO Nanoparticles for Improving the Thermal and pH Stability of Crude Cellulase Obtained from *Aspergillus fumigatus* AA001. PMID: 27148203.

Nibedita, S. and Kaustav A., 2014. *Aspergillus fumigatus* NITDGPKA3 Provides for Increased Cellulase Production. Article ID 959845.

Oksanen, J., Ahvenainen and Home S., 1985. Microbial cellulase for improving filterability of wort and beer. In *Proceedings of the 20th European Brewery Chemistry Congress*, pp. 419–425, Helsinki, Finland.

Oliveira Júnior, S.D., Araújo Padilha C.E., Asevedo E.A., Macedo G.R., 2020. Recovery and purification of cellulolytic enzymes from *Aspergillus fumigatus* CCT 7873 using an aqueous two-phase micellar system. *Annals of Microbiology*. 70-23.

Ong, L. G., Abd-Aziz S, Noraini S, Karim M. I. & Hassan M. A., 2004. Enzyme production and profile by *Aspergillus niger* during solid substrate fermentation using palm kernel cake as substrat. *Appl Biochem Biotechnol*,.118. 73-79

Phitsuwan, P. N. Laohakunjit O., Kerdchoechuen K.L., Ratanakhanokchai K. K., 2013. Present and potential applications of cellulases in agriculture, biotechnology and bioenergy. *Folia Microbiol*. 58.163–176.

Rajan, S.S., Yang X., Collart F., Yip V.L., Withers S.G., Varrot A., Thompson J., Davies G.J., Anderson W.F., 2004. Novel catalytic mechanism of glycoside hydrolysis based on the structure of an $\text{NAD}^+/\text{Mn}^{2+}$ dependent phospho-alpha-glucosidase from *Bacillus subtilis*. *Structure*. 12:1619-1629.

Ramesh, M.V., Lonsane B.K., 1987. Solid state fermentation for production of α amylase by *Bacillus megaterium* 16M. *Biotechnology Letters*. 5, 323-328.

Reese, ET., 1976. History of the cellulase program at the U.S. Army Natick development center. *Biotechnol Bioeng Symp*. 6:9-20.

Romaniec, M. P. M., Fauth U., Kobayashi, T., Huskisson, N., S., Patrick J., Demain Arnold L., 1992. Purification and characterization of a new endoglucanase from *Clostridium thermocellum*. *Biochem. J.*, 283, 69-73.

Reinikainen, T., Teeri TT., Ruohonen L, Nevanen T, Laakosonen L, Kraulis P, Jones TA, Knowles JK., 1992. Investigation of the function of mutated cellulose-binding domain of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I. *Proteins*. 14: 475-482.

Rouvinen, J, Bergfors T, Teeri T, Knowles JKC, Jones TA., 1990. Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Science* 249: 380-386.

Sandgren, M, Shaw A, Ropp TH, Wu S, Bott R, Cameron AD, Ståhlberg J, Mitchinson C, Jones TA., 2000. The X-ray crystal structure of the *Trichoderma reesei* family 12 endoglucanase 3, Cel12A. at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 308: 295-310.

Saroj, P., Manasa P. and Korrapati N., 2018. Characterization of thermophilic fungi producing extracellular lignocellulolytic enzymes for lignocellulosic hydrolysis under solid-state fermentation. *Bioresour. Bioprocess.* 5:31.

Schulein, M., 1997. Enzymatic properties of cellulases from *Humicola insolens*. *J Biotechnol* 57:71-81.

Selby, K., Maitland C. C., 1967. Separation of the Components Involved in the Solubilization of Cotton. *Biochem. J.* 104, 716-724.

Sjöström, E ., 1993. *Wood Chemistry: Fundamentals and Applications*. Second Edition, Academic Press, San Diego-California 92101-4495 USA, 293 p.

Singh, A., Singh N., Bishnoi N. R., 2009. Production of Cellulases by *Aspergillus Heteromorphus* from Wheat Straw under Submerged Fermentation. *International Journal of Civil and Environmental Engineering*. 1(1), 23-26.

Soloheimo, A., Henrissat B., Hoffén A.M., Teleman O., Penttilä M., 1994. A novel small endoglucanase gene, *egl5*, from *Trichoderma reesei* isolated by expression in yeast. *Mol Microbiol* 13(2): 219–228.

Srisodsuk, M, Rainikainen T, Panttilä M, Teeri TT., 1993. Role of the interdomain linker peptide of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I in its interaction with crystalline cellulose. *J. Biol. Chem.* 268: 20756-20761.

Sukumaran, R., Singhanian, P. R., Pandey, A., 2005. Microbial cellulase- Production, Applications and Challenges. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 64, 832-844.

Subhadeep, M., Jyoti P. S., Joy M., Subham R., Suman K. H., Keshab C. M., 2020. Contemporaneous synthesis of multiple carbohydrate debranching enzymes from newly

isolated *Aspergillus fumigatus* SKF-2 under solid state fermentation: A unique enzyme mixture for proficient saccharification of plant bioresources. *Industrial Crops and Products*. Volume 150, 112409.

Tang, B., Pan H., Tang W., Zang Q., Ding L. and Zhang F., 2012. Fermentation and purification of cellulase from a novel strain *Rhizopus stolonifer* var. *Reflexus* TP-02. *Biomass and Bioenergy*. vol.3 6, 366-372.

Terri, T.T., 1997. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends Biotechnol.* 15, 160-167.

Tolan, J.S., Foody B., 1999. Cellulases from submerged fermentation. *Adv. Biochem. Eng. /Biotechnol.* 65: 41-67

Watanabe, T., Sata T., Yoshioka S., Koshijima T., Kuwahara M., 1992. Purification and properties of *Aspergillus niger* β -glucosidase. *Eur. J. Biochem.* 209: 651-659

Warren, RAJ., 1996. Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annu. Rev. Microbial.* 50: 183-212.

Wilson, D.B., Irwin D.C., 1999. Genetics and properties of cellulases. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 65:1-21.

Varrot, A, Frandsen T.P., Ossowski I., Boyer V., Cottaz S., Driguez H., Sculein M., Davies G.J., 2003. Structural basis for ligand binding and processivity in cellobiohydrolase Cel6A from *Humicola insolens*. *Structure*. 11: 855-864.

Yamada, R., Hasunuma T., Kondo A., 2013. Endowing non-cellulolytic microorganisms with cellulolytic activity aiming for consolidated bioprocessing. *Biotechnol Adv* 31:7.

Yang, B, Wyman CE. 2004. Ksılan ve lignin gideriminin parti ve sürekli akış yoluyla etkisi mısır koçanı selülozunun enzimatik sindirilebilirliği üzerine ön işlem. *Biyoteknoloji Biyomüh.* 86: 88-95.

Yogita, L., Rajesh S. and Balwinder S.S., 2015. Optimization of Cellulase Production from Newly Isolated *Bacillus* sp. Y3. *Bioprocessing and biotechniques and J Bioprocess Biotech* 5:11.

Zeng, R, Yin X.Y., Ruan T., Hu Q., Hou Y.L., Zuo Z.Y., Huang H. and Zhong-Hua Yang H.Z., 2016. A Novel Cellulase Produced by a Newly Isolated *Trichoderma virens*. *Bioengineering*. College of Chemistry and Chemical Engineering, Hubei University.54–763.

Zverlov, V, Mahr S, Riedel K., 1998. Properties and gene structure of a bifunctional cellulolytic enzyme (CelA) from extreme thermophile ‘*Anaerocellum thermophilum*’ with separate glucosyl hydrolases family 9 and 48 catalytic domains. *Microbiology* 144: 457-465.