

**T.C.
KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KAYIN MANTARI (*PLEUROTUS OSTREATUS*)'NİN SELÜLAZ
AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Seval KARADEMİR

**Danışman
Jüri Üyesi
Jüri Üyesi**

**Doç. Dr. Ergin Murat ALTUNER
Doç. Dr. Talip ÇETER
Yrd. Doç. Dr. Serhat URSAVAŞ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

KASTAMONU - 2017

TEZ ONAYI

Seval KARADEMİR tarafından hazırlanan "Kayın Mantarı (*Pleurotus ostreatus*)'nın Selüloz Aktivitesinin Araştırılması" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde savunulmuş ve oy birliği ile Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

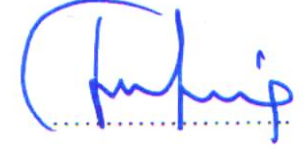
Danışman

Doç. Dr. Ergin Murat ALTUNER
Kastamonu Üniversitesi



Jüri Üyesi

Doç. Dr. Talip ÇETER
Kastamonu Üniversitesi



Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Serhat URSAVAŞ
Çankırı Karatekin Üniversitesi



22/05/2017

Enstitü Müdür V.

Prof. Dr. Temel SARIYILDIZ



TAAHHÜTNAME

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yaptığımı bildirir ve taahhüt ederim.



Seval KARADEMİR

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KAYIN MANTARI (*PLEUROTUS OSTREATUS*)'NİN SELÜLAZ AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

Seval KARADEMİR
Kastamonu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ergin Murat ALTUNER

Günümüzde gittikçe ilerleyen bir endüstriyel enzim kullanımı söz konusudur. Pek çok alanda artan ihtiyaçları karşılamada enzimlerden faydalanmak; enzim teknolojisi olarak isimlendirilir. Enzim teknolojisi gıda, tıp, tekstil gibi çok çeşitli alanlarda hayatı kolaylaştıran pek çok üründe karşımıza çıkmaktadır. Enzimlerin elde edilme aşamalarında çeşitli mikroorganizmaların kullanılması; maliyeti azaltma ve fazla miktarda üretimi sağlama gibi büyük avantajlara sahiptir.

Tezin amacı, insan sağlığına ve çevreye saygılı, geri dönüşüm uygulamaları ile azalan doğal kaynakları geri kazandırmayı sağlayacak bir yöntemin keşfedilmesidir. Ayrıca ülke ekonomisine, yerel üretimi geliştirmeye ve yeni yatırımlara temel olma hedefi taşımaktadır. Konunun seçilmesinin nedeni ise; kâğıt geri dönüşümünde enzimlerin kullanımı ile ithalatı azaltan çözümlere katkı sağlamanın gerekliliğidir. Mikroorganizma kaynaklı olarak üretilen enzimlerin kullanım alanı ve avantajlarının giderek artması ayrıca endüstriyel ihtiyaca yönelik talepleri karşılamaya ve aynı zamanda da geliştirmeye uygun olması giderek önem kazanmasını sağlayan önemli bir etkidir.

Günümüzde artan imkânlar sayesinde çeşitli mikroorganizma suşlarından birçok enzim elde edilebilmektedir. Bu çalışmada da sıkça kullanılan ve yenilebilme özelliğine sahip bir mantar türü olan *Pleurotus ostreatus*'tan selüloz sindirimi yapan selüloz aktivitesi gözlenmiş ve ticari olarak satılan selüloz enzimi (Cellulase Onozuka R-10 Ürün kodu: 1023210005) ile absorbansı karşılaştırılarak, yüksek etkinlik durumu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Enzim, selüloz, selüloz, *Pleurotus ostreatus*, Kayın mantarı

2017, 42 sayfa

Bilim Kodu: 203

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

INVESTIGATION OF CELLULASE ACTIVITY OF (*PLEUROTUS OSTREATUS*) OYSTER MUSHROOM

Seval KARADEMİR
Kastamonu University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ergin Murat ALTUNER

Today, there is a growing use of industrial enzymes. To benefit from enzymes to meet the increasing needs of many areas is called enzyme technology. Enzyme technology is confronted in many ways that facilitate life in a wide range of fields, such as food, medicine, and textiles. The use of various microorganisms during the production of enzymes has great advantages such as reducing costs and production of high amounts.

The aim of the thesis is to discover a method that has respect to human health and the environment, to recycle the declining natural resources by recycling practices. It also aims to be a base for the country's economy, local production development and new investments. The reason for the selection of this topic is the need to contribute to the use of enzymes in paper recycling and to solutions that reduce imports. Increasing use of enzymes produced by microorganisms and their advantages are also an important influence, which makes it increasingly important to meet the demands for industrial needs and at the same time to develop them.

Today, many enzymes can be obtained from various microorganism strains as a result of increasing opportunities. In this study, a cellulase activity was observed from a cellulose digesting fungus, *Pleurotus ostreatus*, which is a commonly used and consumed as food, and high activity was detected by comparing the absorbance with a commercially available cellulase enzyme (Cellulase Onozuka R-10 Product Code: 1023210005).

Key Words: Enzyme, cellulose, cellulase, *Pleurotus ostreatus*, Oyster mushroom

2017, 42 pages

Science Code: 203

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşaması ve her anında desteğini hissettiğim, bana yardımını hiç esirgemeyen, bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren, ayrıca; tüm aksiliklere rağmen beni yüreklendiren sayesinde başarılı sonuç aldığım danışman Hocam Sayın Doç. Dr. Ergin Murat ALTUNER'e yürekten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca yardım ve desteğini her an hissettiğim Hocam Sayın Doç. Dr. Talip ÇETER'e çok teşekkür ederim.

Çalışmama kendi çalışması kadar özveri ve destek veren, benim her daim yanımda olup beni yüreklendiren Kardeşim Fatma ULUSOY'a çok teşekkür ederim.

Desteğiyle ilerleme gayreti bulduğum, ısrarları ve muazzam çabasıyla bu başarıya ulaşmamı sağlayan eşim Sayın Uğur KARADEMİR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini her daim hissettiren Babam Erdiç EREN, Annem Gülşen EREN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Seval KARADEMİR
Kastamonu, Mayıs, 2017

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ	xi
FOTOĞRAFLAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Enzimler	1
1.1.1. Enzimlerin Yapısı.....	1
1.1.2. Enzim Yapısına Etki Eden Faktörler	2
1.1.2.1. Sıcaklık.....	2
1.1.2.2. pH.....	2
1.1.2.3. Enzim yoğunluğu.....	2
1.1.2.4. Substrat yoğunluğu	3
1.1.2.5. Substrat yüzeyi	3
1.1.2.6. Su	3
1.1.2.7. Aktivatör - inhibitör madde.....	3
1.1.3. Enzimlerin Genel Özellikleri	3
1.1.4. Enzimlerin Endüstride Kullanımı	3
1.1.5. Enzimlerin Endüstride Üretim Yöntemleri.....	4
1.1.5.1. Koji prosesi (Solid-state fermentasyon).....	4
1.1.5.2. Fermentör	5
1.1.6. Endüstride Kullanılan Mikroorganizma Kaynaklı Enzimler	5
1.1.6.1. Proteazlar	6
1.1.6.2. Amilazlar.....	6
1.1.6.3. Ksilenzimler.....	6
1.1.6.4. Lipazlar	6
1.1.6.5. Selülozlar	7
1.2. Selüloz	7
1.3. Selüloz Enzimi.....	8
1.3.1. Selüloz Enzimi Yapısı ve Hidroliz Mekanizması	9
1.3.2. Selüloz Enzimi Kaynağı Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar	10
1.3.3. Selüloz Enziminin Endüstriyel Kullanım Alanları	11
1.3.3.1. Selüloz enziminin yiyecek ve içecek endüstrisinde kullanımı	11
1.3.3.2. Selüloz enziminin kâğıt endüstrisinde kullanımı	11
1.3.3.3. Selüloz enziminin yem endüstrisinde kullanımı	11

1.3.3.4. Selülaz enziminin deterjan endüstrisinde kullanımı	11
1.3.3.5. Selülaz enziminin tekstil endüstrisinde kullanımı	11
1.3.3.6. Selülaz enziminin diğer endüstriyel alanlarda kullanımı	12
1.4. <i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm.	12
1.4.1. <i>Pleurotus ostreatus</i> 'un Genel Özellikleri	12
1.4.2. <i>Pleurotus ostreatus</i> 'un Hayat Döngüsü.....	13
1.4.3. <i>Pleurotus ostreatus</i> 'un Üretim kapasitesi.....	14
1.4.4. <i>Pleurotus ostreatus</i> 'un Önemi	14
1.5. Yapılan Çalışmalar	15
2. YÖNTEM.....	18
2.1. Kullanılan Besiyerleri.....	18
2.1.1. Malt Extract Agar Besiyeri	18
2.1.2. Karboksimetilselüloz - Agar Katı Besiyeri (CAKB).....	18
2.1.3. Sıvı Selülaz Aktivitesi Besiyeri (SSAB)	18
2.2. Kullanılan Çözeltiler	19
2.2.1. % 0,1'lik Kongo Kırmızısı Çözeltisi	19
2.2.2. 1M NaCl Çözeltisi	19
2.2.3. Fosfat-Sitrat Tamponu pH 2,2-8,0, PKA= 7,20/6,40	19
2.2.4. CMC (Karboksimetilselüloz)'li Fosfat-Sitrat Tamponu.....	19
2.2.5. Amonyum Sülfat Presipitasyonu	19
2.2.6. Dinitro Salisilik Asit (DNS)	20
2.3. <i>Pleurotus ostreatus</i> 'un Kültür Koşullarının Sağlanması.....	20
2.4. <i>Pleurotus ostreatus</i> 'un Selülaz Enzimi Pozitif Olma Durumu	20
2.5. <i>Pleurotus ostreatus</i> 'tan Selülaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması	20
2.6. <i>Pleurotus ostreatus</i> 'un Selülaz Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi....	21
2.7. İstatistiksel Hesaplama	21
3. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	22
3.1. <i>Pleurotus ostreatus</i> 'un Kültür Koşullarının Uygunluğu	22
3.2. <i>Pleurotus ostreatus</i> 'un Selülaz Pozitif Olma Durumu.....	23
3.3. Selülaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması.....	24
3.4. <i>Pleurotus ostreatus</i> 'tan Elde Edilen Selülaz Enziminin Aktivitesi.....	25
4. SONUÇLAR	29
5. ÖNERİLER.....	30
KAYNAKLAR	31
EKLER.....	37
EK 1- MALT EXTRACT AGAR KOMPOZİSYONU	38
EK 2- FOSFAT-SİTRAT TAMPONU PH 2,2 - 8,0 KOMPOZİSYONU.....	39
EK 3- DETAYLI İSTATİSTİKSEL ANALİZ SONUÇLARI	40
EK 3' ün devamı.....	41
ÖZGEÇMİŞ	42

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

CAKB	Karboksimetilselüloz Agar Katı Besiyeri
CaCl ₂ .H ₂ O	Kalsiyum Klorid
CMC	Karboksimetilselüloz
DNS	Dinitro Salisilik Asit
FeSO ₄ .7H ₂ O	Demir Sülfat Heptahidrat
K	Potasyum
KH ₂ PO ₄	Potasyum Dihidrojen Fosfat
K ₂ HPO ₄	Dipotasyum Fosfat
M	Molar
MgSO ₄ .7H ₂ O	Magnezyum Sülfat Heptahidrat
mL	Mililitre
MnSO ₄ .4H ₂ O	Mangan Sülfat Tetrahidrat
Na	Sodyum
NaCl	Sodyum Klorür
Na ₂ CO ₃	Sodyum Karbonat
Na ₂ HPO ₄	Sodyum Hidrojen Fosfat
NaOH	Sodyum Hidroksit
rpm	Bir Dakikadaki Devir Sayısı
SSAB	Sıvı Selülaz Aktivitesi Besiyeri
β	Beta

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Enzimlerin yapısı (anahtar-kilit modeli).....	1
Şekil 1.2. Aktif enzimi oluşturan kısımlar	2
Şekil 1.3. Karıştırıcılı tank tipi fermentör	5
Şekil 1.4. Selüloz yapısı	8
Şekil 1.5. Selülozun selülaz etkisiyle glikoza hidrolizi.....	9
Şekil 1.6. <i>Pleurotus ostreatus</i> 'un hayat döngüsü.....	14



TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 1.1. <i>Pleurotus ostreatus</i> 'un bilimsel sınıflandırılması.....	12
Tablo 2.1. Fosfat-Sitrat tamponu	19
Tablo 4.1. İlk pelet absorbanası.....	27
Tablo 4.2. İkinci pelet absorbanası.....	27
Tablo 4.3. Üçüncü pelet absorbanası	27
Tablo 4.4. Dördüncü pelet absorbanası.....	28



FOTOĞRAFLAR DİZİNİ

	Sayfa
Fotoğraf 1.1. Koji prosesi	5
Fotoğraf 1.2. <i>Pleurotus ostreatus</i> 'un genel görünüşü	13
Fotoğraf 3.1. Kontaminasyon olmayan ekime hazır CAKB	22
Fotoğraf 3.2. Uygun <i>Pleurotus ostreatus</i> gelişimi gösteren CAKB	22
Fotoğraf 3.3. <i>Pleurotus ostreatus</i> 'un selüloz enzimi pozitif suşları.....	23
Fotoğraf 3.4. SSAB	24
Fotoğraf 3.5. Farklı pH'larda ki SSAB'de gelişen <i>Pleurotus ostreatus</i>	24
Fotoğraf 3.6. +4 °C de 6000 rpm'de 20 dakika santrifüjleme sonucu elde edilen ilk peletler	25
Fotoğraf 3.7. Kör tüp ve ticari olarak satılan selüloz enzimi substrat solüsyonu	26
Fotoğraf 3.8. Her pH'a özgü absorbansı okunmaya hazırlanan peletler.....	26

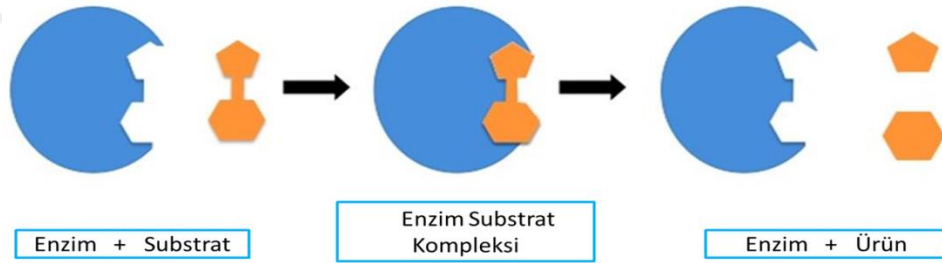
1. GİRİŞ

1.1. Enzimler

Enzimler, canlı hücrelerde genetik materyal tarafından sentezlenen ve reaksiyonlarda hızlandırma ile reaksiyonu kolaylaştırma özelliklerine sahip organik moleküllerdir.

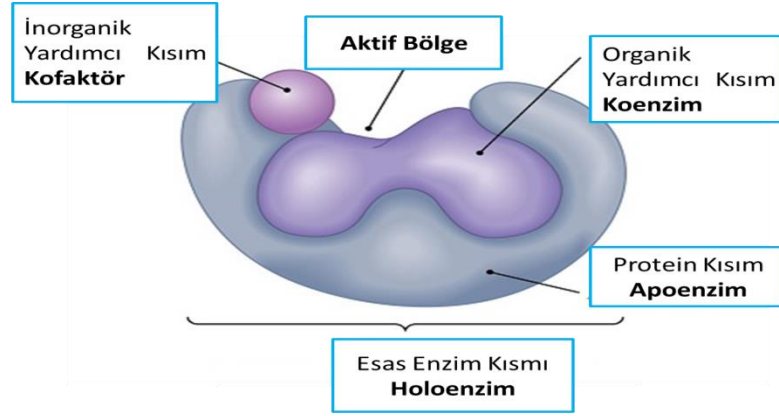
1.1.1. Enzimlerin Yapısı

Enzimler % 99 protein temelli bir yapıya sahiptir. Proteinlerin yapı taşı olan amino asitler, enzimlerin aktif bölgelerinde bulunarak substratın enzime yaklaşmasını sağlarlar. Bu özellik sayesinde protein kısım enzimin etki bölgesini belirler. Enzimler anahtar-kilit veya indüklenmiş uyum gibi çeşitli modellerle kendisine özgü substrata bağlanarak, reaksiyon sonucunda enzimin serbest hale geçişi ile birlikte bir ürünün oluşumunu sağlarlar.



Şekil 1.1. Enzimlerin yapısı (anahtar-kilit modeli) [URL-1]

Enzim, etkilediği maddeye aktif merkezi aracılığıyla bağlanır. Enzimin hangi substratla uyumlu olduğunu belirleyen, protein yapısı apoenzim kısmıdır. Apoenzim kısmı substrat ile bağlanmayı sağlar. Koenzim ve kofaktör enzimin aktifliğini arttıran yardımcı kısımları oluşturur. Koenzim kısmı daha çok kimyasal bağ ile parçalamada görevlidir. Sonuçta oluşan aktif enzim yapısı ise holoenzimdir [URL-2].



Şekil 1.2. Aktif enzimi oluşturan kısımlar [URL-3]

1.1.2. Enzim Yapısına Etki Eden Faktörler

Enzimler optimum ortam koşullarında aktivite gösterebilirler. Bu koşulların sağlanmadığı durumlarda enzimatik tepkimeler olumsuz yönde etkilenir.

1.1.2.1. Sıcaklık

Enzimlerin çalıştığı en uygun sıcaklık koşuluna **optimum sıcaklık** denir. İnsanda enzimlerin optimum sıcaklığı 37 °C'dir. Yüksek sıcaklık enzimlerin yapısını olumsuz etkiler [URL-2].

1.1.2.2. pH

Kuvvetli asit ve bazlar enzim yapısını olumsuz etkilemekle birlikte, her enzimin pH aralığı farklıdır. Bazı enzimler nötr ortamda çalışabilirken, bazıları ise bazik ortamda çalışabilmektedirler [URL-2].

1.1.2.3. Enzim yoğunluğu

Enzim için normal koşullar sağlanırsa enzim yoğunluğunda bir artış ile birlikte reaksiyon hızında da artış görülmelidir [URL-2].

1.1.2.4. Substrat yoğunluğu

Substrat yoğunluğunu arttırıp, enzim miktarı sabit tutulursa, reaksiyon önce hızlanır sonrasında ise enzimler substrata doğduğundan reaksiyon hızının sabit kalması beklenir [URL-2].

1.1.2.5. Substrat yüzeyi

Enzimlerin etkileşime gireceği toplam alan, doğru orantılı olarak substrat yüzeyinin büyümesiyle artış göstererek reaksiyonun hızlanmasını sağlar [URL-2].

1.1.2.6. Su

Enzimlerin uygun olarak çalışabilmesi için en az % 15 su bulunması gereklidir [URL-2].

1.1.2.7. Aktivatör - inhibitör madde

Enzimlerin çalışmasını olumlu etkileyerek arttıran maddeler **aktivatör**, enzim çalışmasını olumsuz etkileyen maddelere ise **inhibitör** denir [URL-2].

1.1.3. Enzimlerin Genel Özellikleri

Uzun yıllardır ekmek, peynir, sirke, şarap yapımında kullanılan ve biyolojik katalizörler olan enzimler, uygun koşulların oluşturulması durumunda sentezlendiği doğal ortamının dışında da kullanılabilme özelliği taşıır.

Enzimler, giderek artan ihtiyaçları karşılayabilmek için endüstriyel alanda ihtiyaca yönelik uygun çözümler sunmaktadır. Çeşitli mikroorganizmalardan ihtiyaca yönelik enzim eldesi üzerine yapılan çalışmalar giderek yaygınlaşmaktadır. Mikroorganizma kaynaklı enzim üretimi sayesinde sorunlara doğal kaynaklı çevreci bir çözüm yolu sunulmaktadır.

1.1.4. Enzimlerin Endüstride Kullanımı

Endüstride enzim kullanımı sağladığı avantajlar ile giderek yaygınlaşan bir durumdur. Endüstride kullanılan enzimlerin çoğu mikroorganizma kökenlidir. Bu durumun

sebebi olarak çeşitli avantajlar gösterilmektedir. Örneğin, mikroorganizmalardan elde edilen enzimler hem yüksek miktarlarda üretilmekte, hem de hayvanlar ve bitkiler gibi diğer enzim üretilen kaynaklar ile karşılaştırıldığında stabil ve yüksek katalitik aktiviteye sahip olabilmektedir. [1].

Mikroorganizmalardan elde edilen enzimler kendilerine deterjan endüstrisinden kâğıt üretimine; gıdadan teksile oldukça geniş yelpazede bir kullanım alanı bulabilmektedir. Bu sebeple, enzimlerin önemi oldukça ön plana çıkmış, dolayısıyla bu enzimlerin üretiminde kullanılacak mikroorganizmalara olan ilgi de katlanarak artmıştır [2].

Enzimlerin bu yaygın kullanımlarının bütün dünya çapında 1995 yılı için yaklaşık 100 000 000 Amerikan Doları iken bu rakamın sadece beş yıl sonra 150 000 000 Amerikan Doları'na yükseldiği görülmektedir [3].

Enzimlerin endüstriyel uygulamalarda kullanılma işlemleri enzim teknolojisi olarak adlandırılır. Enzim teknolojisi, enzimin üretimi, izolasyonu, saflaştırılması ve uygun formlarda kullanımını içermektedir. Ticari olarak ihtiyaca yönelik mikroorganizmalar ile enzim üretimi gerçekleştirilerek karşılaştığımız birçok önemli soruna çözüm sağlamak mümkündür. Bunlar arasında çevre kirliliğinin önlenmesi, gıda endüstrisi, enerji üretimi, deterjan üretimi ve tekstil endüstrisi sayılabilir.

1.1.5. Enzimlerin Endüstride Üretilme Yöntemleri

1.1.5.1. Koji prosesi (Solid-state fermentasyon)

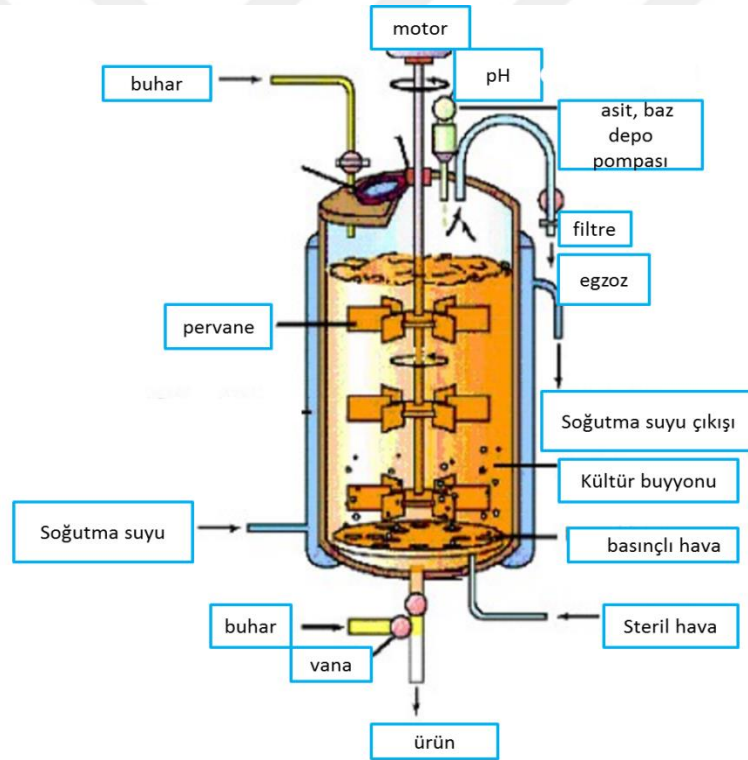
Katı substrat olarak arpa, buğday sapı gibi maddeler ya da yarı katı substratlar kullanılarak besiyerlerde mikroorganizmalar üretilir. Genellikle lipaz ve selülaz enzimi üretimi için kullanılır. Kontaminasyondan koruma, havalandırma ve nemlendirme gibi özel koşullara dikkat edilmesi gerekmektedir [URL-4].



Fotoğraf 1.1. Koji prosesi [URL-4]

1.1.5.2. Fermentör

Tercih edilen bir yöntem olup olumsuz koşul oluşumunu azaltıcı özelliğindedir. Karıştırıcı tank tipi, air lift gibi çeşitleri bulunur [URL-4].



Şekil 1.3. Karıştırıcı tank tipi fermentör [URL-5]

1.1.6. Endüstride Kullanılan Mikroorganizma Kaynaklı Enzimler

Kullanım alanı açısından gıdadan tekstile ve hatta temizlik ürünlerine kadar geniş bir kullanım ağına sahip olan enzimler, çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir. Ticari olarak kullanılan bu enzimlerin büyük çoğunluğu olan

%59'unu proteazlar oluştururken, %3'ünü lipazlar, %10'unu çeşitli enzim türleri ve %28'ini ise karbohidrazlar oluşturur ki bu grupta %13'lük üretimi ile α -amilaz önemli bir yere sahiptir [4].

1.1.6.1. Proteazlar

Proteaz enzimleri, tabiatta özellikle canlılardan arta kalan kalıntıları parçalayıp bitkilerin besinleri alabilmelerini sağlayarak besin döngüsünde yer almaktadır [5].

Proteazlar, temizlik malzemeleri, et ve süt ürünleri, deri sanayisi, ilaç endüstrisinde, içeceklerde ve atıkların giderilmesinde kendilerine kullanım alanı bulmaktadır. Her ne kadar proteazlar, çok değişik mikroorganizmalardan üretilseler de, biyoteknolojik üretimlerde alkalifilik özellik taşıyan bazı *Bacillus* türleri en fazla tercih edilen, izolasyonu kolay olması sebebiyle kullanımı en fazla olan mikroorganizmadır [6-8].

1.1.6.2. Amilazlar

Tekstilden, içecek endüstrisine kadar kullanım alanı bulunan özellikle *Aspergillus*'a ait türler ile *Bacillus*'a ait türler tarafından üretilebilen enzimlerdir [6,9]. Özellikle tekstil üretiminde ipliklerin işlenmesi sırasında dayanıklı ve düzgün bir yapıda bulunması ve kopmaların engellenmesi amacıyla, ipler içinde amilaz bulunan kazanlara daldırılmaktadır [6,10].

1.1.6.3. Ksilenzimler

Ksilenzimler özellikle ekmek ve hamur kalitesinde su emilimi ve kabarmayı sağladığı için yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir [6,11]. Ayrıca ksilenaz, sebzelerin ve meyvelerin sularını çıkarmak amacıyla kullanılan bir enzimdir [6,12].

1.1.6.4. Lipazlar

Lipazlar bakteri, maya ve küflerin yapılarından oldukça yüksek oranlarda elde edilmektedir. Bu enzimlerin oldukça geniş bir kullanım amaçları bulunmaktadır. Örneğin, parfümeriden çevre uygulamalarına; biosensörlerden çeşitli pestisitlere

kadar kullanılmaktadırlar. Lipaz enzimi üretiminde en çok kullanılan canlılar *Rhizopus* sp., *Pseudomonas* sp. ve *Candida* sp.'dir [6].

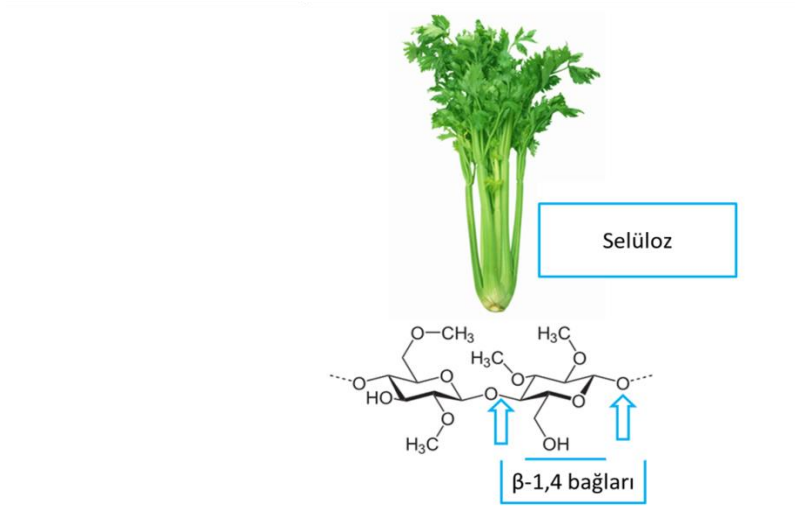
1.1.6.5. Selülozlar

Selülozun hidrolizinde kullanılmakta olan selülozlar ağırlıklı olarak bakteri ve mantarlardan üretilmektedir. Selüloz enzimi gıdadan, içeceğe, tekstilden temizlik ürünlerine kadar pek çok alanda işleve sahiptir. Piyasada en yaygın bulunan selüloz enzimi özellikle *Trichoderma* sp. kullanılarak üretilmiş olan selülozlardır [6,13]. Öte yandan, selüloz üretiminde *Bacillus*, *Basidiomycetes*, *Penicillium* ve *Aspergillus* türlerinin de kullanıldığı görülmektedir. [6,14].

1.2. Selüloz

Bitkilerde en fazla bulunan ve yapı itibariyle de oldukça basit bir yapıda bulunan, öte yandan bitki hücrelerinin duvarında bulunan karbonhidratların en önemlisi selüloz olarak karşımıza çıkar [15]. Selüloz, bitkilerin tamamının yapısında bulunur. Oldukça önemli görevlerde rol oynar. Örneğin, bitkilerin yapısının desteklenmesi, sağlam ve dik durmalarının sağlanması selüloz aracılığıyla olur. Selüloza tabiatta saf halde rastlanmaz. Odun ağırlığının yaklaşık olarak %40'nda, pamuğun liflerinde yaklaşık olarak %85 ila %90 oranında ve ketede ise yaklaşık %60 ila %85 oranında selüloz bulunmaktadır [16].

Selüloz, yaklaşık olarak 15 000 glikoz monomerlerinin $\beta(1,4)$ tipi glikozit bağları ile birbirlerine düz bir durumda bağlanması sonucunda üretilir. Selülozları parçalama yeteneğine sahip selüloz enzimleri ise glukoz monomerleri arasında bulunan $\beta(1,4)$ glikozit bağlarını tanır ve parçalar. Parçalanma sonucunda sellobiyoz, sellobiyoz türevleri ve glikoz açığa çıkar [17].



Şekil 1.4. Selüloz yapısı [URL-6]

Selülozun enzimatik olarak parçalanması için genellikle ortama doğrudan selüloz salgılayan mikroorganizmalar verilen çalışmalar yapılmıştır. Fakat bu çalışmalar sonucunda hedeflenen verimin alınmadığı görülmüştür. Selüloza direkt selüloz ile uygulama yapıldığında daha uygun verim sağlandığı görülmüştür. İşlem sıralaması ise; selüloz üretimi, kısmi olarak saflaştırılması ve elde edilen selülozun hedeflenen amaca hizmet edecek şekilde kullanılmasıdır [17].

Bu tezde amaç, özellikle kâğıt geri dönüşümünde önemli rol oynayan selülozun parçalanmasına doğal yollarla çözüm önerisi sunarak, çevreye, ekonomiye ve ülke endüstrisine katkı sağlamaktır. Ayrıca selülozun yeni ürünlere dönüşümü özelliği ile etanole dönüştüğünde sera gazı etkisinin de azalabileceği ve çevresel bir soruna doğal yollu bir çözüm sağlanabileceği de unutulmamalıdır.

1.3. Selüloz Enzimi

Pek çok mikroorganizmanın selüloz ürettiği yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Selülozlar tekstil, deterjan ve kâğıt endüstrisinde kendine kullanım alanı bulduğu için tüm dünyada ticari olarak en çok kullanılan enzimlerden biridir. Mikroorganizmaları kullanmak suretiyle selüloz üretimi yaygın bir çeşitlilikte elde edilebilir. Farklı alanlarda kullanılmaya uygunluğu olmaları sebebiyle selüloz enzimlerine ihtiyaç her geçen gün artış göstermektedir [17].

1.3.1. Selüloz Enzimi Yapısı ve Hidroliz Mekanizması

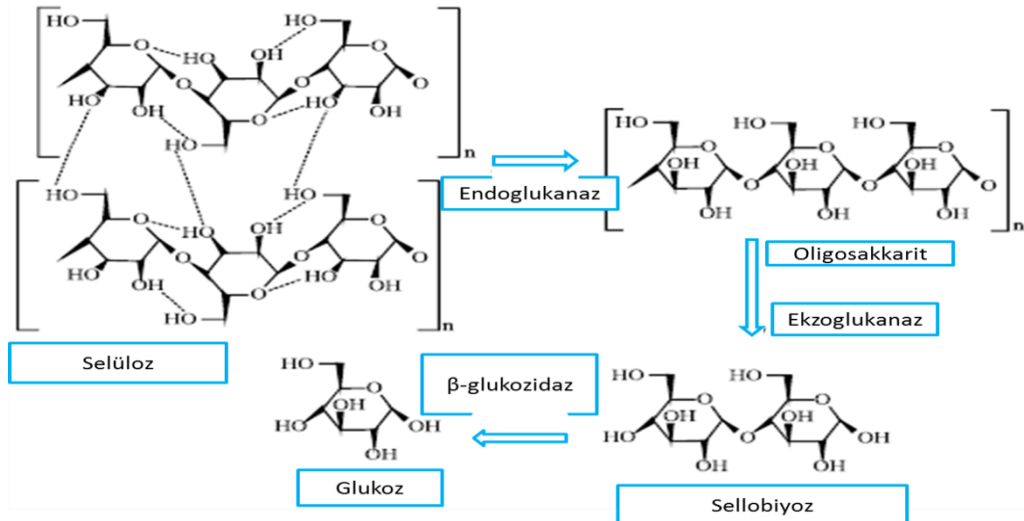
Selülozlar etki mekanizmalarına göre 3 grupta incelenirler:

1. Ekzoglukanazlar (Sellobiyohidrolazlar),
2. Endoglukanazlar (endo- β -1,4 glukanaz),
3. β -glukozidazlar [18,19].

Ekzoglukanazlar, selüloz polimerini bütün olarak ya da endo- β -1,4 glukanaz yardımıyla parçalanmış kısımların uç kısımlarından parçalama işlemini yürütür. Parçalanma sonrasında sellobiyoz ortaya çıkar [18,19].

Endoglukanazlar selüloz polimerinin genelde amorf bölgesinden parçalarlar. Oligosakkaritler parçalama işlemi sonucunda açığa çıkan en son üründür. β -glukozidaz enzimleri ise ortaya çıkan sellobiyoz parçalarını glukoz birimlerine bölerler [18,19].

Selüloz molekülü çok kararlı bir yapıya sahiptir. β -glukozidik bağın 25°C'de yarılanma ömrü 5-8 milyon yıl kadardır. Fakat enzim aracılığıyla selülozun hidrolizi oldukça çabuk gerçekleşmektedir. Karbon atomunun atmosfere geri kazandırılmasında bu işlem oldukça büyük önem taşır [19,20].



Şekil 1.5. Selülozun selüloz etkisiyle glikoza hidrolizi [URL-7]

Selülazlar, bağımsız katlanmaların olduğu farklı yapı ve fonksiyona sahip alt birimlerin bir araya gelmesi ile oluşurlar. Bu karmaşık enzim sistemi genellikle bir katalitik birim, bir veya daha fazla substrat bağlayıcı ya da kompleksi oluşturmada görevli yardımcı birimlerden oluşmaktadır. Bağlayıcı birimler genellikle glisin, prolin, serin ve treonince zengin peptidlerdir [21].

Selülozun hidrolizinde selülaz enziminin kullanılması ile uygun enerji kullanılmış olup aynı zamanda toksik maddelerin veya aşındırıcı asitlerin kullanılmasına gerek kalmamıştır. Bu nedenle selülozun, selülaz ile hidrolizi yaygın şekilde araştırılan bir konudur. Selülazın, selülozun yüzeyine yapıştığı ve substrat boyunca hareket ederek bir takım katalitik reaksiyonları gerçekleştirdiği bulunmuştur. Enzim, substrattan ayrılarak ve substrat'ın başka bir bölgesine yapışarak katalitik aktivitesini göstermektedir [6].

Selülaz enziminin kullanıldığı optimum sıcaklık, endüstriyel amaca uygun olarak değişiklik göstermektedir. Örneğin; tekstil endüstrisinde pamukların biyo parlatılması işlemlerinde 100°C'ye yakın sıcaklıkta stabil selülazlara gereksinim duyulmaktadır [22].

Selülazın yüksek spesifikliğı, toksik etkisinin olmaması ve optimum pH, sıcaklık, basınç gibi özelliklerinin ılımlı aralıklarda olması selülazın inorganik katalizörlere göre daha avantajlı olmasını sağlamaktadır [23].

1.3.2. Selülaz Enzimi Kaynağı Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar

Selülazlar, birçok alandaki kullanımlarından dolayı dünya genelinde en büyük endüstriyel potansiyele sahip enzimlerdir. Elde edilen mikroorganizmalar arasında aerobik, anaerobik bakteriler, beyaz çürükçül ve yumuşak çürükçül mantarlara kadar selülaz üretimi yaygınlığı söz konusudur [17].

Selülaz enzimi elde etmede kullanılan aerobik bakteriler *Bacillus*, *Cytophaga*, *Herpetosiphon*, *Pseudomonas*, *Cerratia*, *Streptomyces*, *Sporocytophaga*, *Thermoactinomyces* ve *Thermomonospora*'dır [24]. Endüstriyel ihtiyaca göre çeşitli

mikroorganizmalar olan *Trichoderma* sp, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Basidiomycetes*'ten selülaz enzimi elde edilebilmesi mümkündür.

1.3.3. Selülaz Enziminin Endüstriyel Kullanım Alanları

1.3.3.1. Selülaz enziminin yiyecek ve içecek endüstrisinde kullanımı

Selülaz enzimi kurutulmuş sebze ve çorbaların tekrar sulandırılmasını sağlamada, meyve ve sebzelerin suyunun çıkarılması, ayrıca pürelerinin hazırlanmasında kullanılmaktadır. İçecek sektöründe özellikle şarap yapımında aromanın artırılmasında kullanıldığı gibi meyve ve sebze sularının berraklaştırma işlemleri için de tercih edilir. Ayrıca zeytinyağı üretiminde ekstraksiyonun artırılmasında etkili olarak kullanılmaktadır [25].

1.3.3.2. Selülaz enziminin kâğıt endüstrisinde kullanımı

Kâğıdın ağartılması ve işlenmesinin yanında mürekkepleri uzaklaştırılması gibi görevlerde selülaz enzimi kullanılır [26].

1.3.3.3. Selülaz enziminin yem endüstrisinde kullanımı

Tahılların kabuk kısmının uzaklaştırılmasını sağlayarak, β -glukanların hidrolizi barsak vizkozitesini düşürür, yem materyallerin daha iyi çözünmesini sağlamaya yardımcı olur [27].

1.3.3.4. Selülaz enziminin deterjan endüstrisinde kullanımı

Özellikle pamuklu kumaşta, leke partiküllerinin serbest kalmasını sağlayarak temizlemenin yanında kumaşın rengi ve yumuşaklığını korumaya yardımcı olur [27].

1.3.3.5. Selülaz enziminin tekstil endüstrisinde kullanımı

Kumaşlara ve hatta kotlara yumuşak ve parlak görünüm kazandırma, canlı renkler oluşturma ve rengin tonunu her yer için eşit olmasını sağlama özelliğinin yanında, yüksek hidrofilik özellik kazandırması gibi avantajlara sahiptir [25].

1.3.3.6. Selüloz enziminin diğer endüstriyel alanlarda kullanımı

Selülozik materyaller doğada en bol bulunan glukoz kaynağı olmalarından dolayı biyo-etanol ve hidrokarbon üretimi için de önemli yer teşkil etmektedir. Selüloz enzimi selülozik maddelerden glukoz ve glukoz polimerleri oluşturarak alkol fermentasyonuna uygunluğunu sağlar. Alkol üretiminde sıvı veriminin artması ve ürünün iyi bir renk alması için de selüloz enziminden yararlanmak mümkündür. Selüloz enzimleri zirai ve endüstriyel atıkların biyolojik olarak giderilmesi içinde kullanıldığı çalışmalar mevcuttur [6].

1.4. *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.

Pleurotus ostreatus (Jacq.) P. Kumm. meşe ağaçlarının (*Quercus* sp.) birincil ayrışımında görevli önemli bir mantardır. Yaygın bir yayılışa sahiptirler. Çeşitli iklimlere ve substrat materyallerine oldukça iyi adapte olmaları sebebiyle, *Agaricus bisporus* (J. E. Lange) Imbach.'tan sonra dünya genelinde en çok üretilen mantar türünü oluştururlar [28].

1.4.1. *Pleurotus ostreatus*'un Genel Özellikleri

Genel olarak kullanılan isimleri; istiridye mantarı, kayın mantarı, kavak mantarı, ağaç istiridyesi ve saman mantarıdır. Dünyada bilinen isimleri; İngilizce- oyster mushroom, Japonca- hiratake'dir [29].

Tablo 1.1. *Pleurotus ostreatus*'un bilimsel sınıflandırılması [29]

Alem	Fungi
Şube	Basidiomycota
Sınıf	Agaricomycetes
Takım	Agaricales
Aile	Pleurotaceae
Cins	<i>Pleurotus</i>
Tür	<i>Pleurotus ostreatus</i>

Pleurotus ostreatus, zengin besleyici özelliği ve yetiştirme koşullarının uygunluğu ile dünya genelinde çokça tüketimi sağlanan lezzetli bir mantar türüdür.

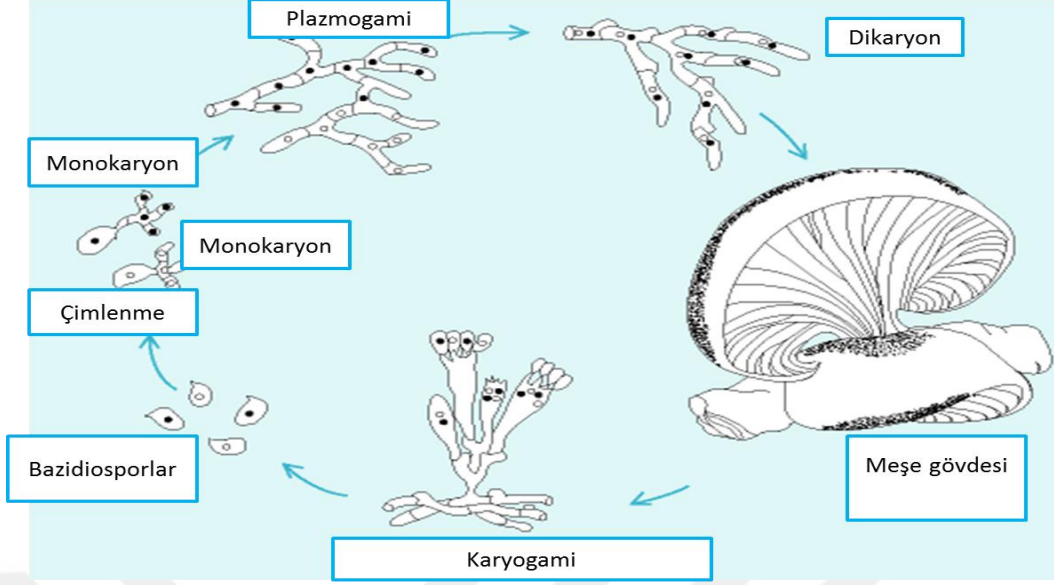


Fotoğraf 1.2. *Pleurotus ostreatus* 'un genel görünüşü

1.4.2. *Pleurotus ostreatus*'un Hayat Döngüsü

Yaşam döngüsünün önemli bir kısmını vejetatif olarak yani; misel gelişimi ile gerçekleştirir. Üç ana evrede olan plazmogami, karyogami ve mayoz görülür. Plazmogami, protoplast füzyonu şeklinde gerçekleşir ve farklı nukleusların aynı hücrede bir arada bulunmasıdır. Karyogami ise nukleusların füzyonudur. Mayoz, karyogami sonucu oluşan, diploid hücrelerde gerçekleşen redüksiyon bölünmesidir. Mayoz sonucu dört tane haploid nukleus meydana gelir [30].

Birkaç gramlık bir mantar bir milyondan fazla spor oluşturabilme özelliğine sahiptir. Spordan çimlenen tüpçüklere hif denir. Hifler mitoz bölünme ile sürekli olarak büyüyüp gelişirler. Hiflerin dallanıp budaklanmasıyla misel adı verilen yapılar oluşur. Tek çekirdekli haploid sporun çimlenmesi sonucu meydana gelen misel monokaryon miseldir. Birbirleriyle genetik olarak uyumlu iki hifin füzyonu sonucu iki farklı nukleusa sahip misel ise dikaryondur. Bu yapılar tekrar uygun bir evrede bazidiokarp ve spor oluşturarak döngünün tekrar etmesini sağlamaktadır [31].



Şekil 1.6. *Pleurotus ostreatus*'un hayat döngüsü [URL-8]

1.4.3. *Pleurotus ostreatus*'un Üretim kapasitesi

İstiridye mantarı günümüzde giderek artan bir kullanım potansiyeline sahiptir. Sadece yiyecek olarak değil, yapısı bakımından uygun enzimlerin elde edilebileceği bir kaynak olarak değerlendirilmesi de endüstriyel kullanımını arttıran sebeptir. 1970'li yılların başında çok az sayıda kişi mantar üretimiyle uğraşırken ve yıllık mantar üretimi 80 ton civarındayken, günümüzde üretimin 25-30 bin ton civarında olduğu tahmin edilmektedir [32,33].

1.4.4. *Pleurotus ostreatus*'un Önemi

Pleurotus cinsi farklı sıcaklık aralığında yetişebilmelerinden dolayı tüm yıl boyunca üretiminin yapılabilmesi mümkündür. Ayrıca kompost hazırlama işleminin gerektirmemesinden dolayı zamandan ve işçilikten tasarruf sağlaması yetiştiriciliğinde maddi olarak büyük bir avantaj sağlamaktadır.

Pleurotus ostreatus, dünyada gıda olarak tüketimi yaygın olan lezzeti ve zengin mineral içeriği ile değerli bir protein kaynağı olarak sevilen bir mantar türüdür. Yaşam döngüsünün kısa oluşu talepleri karşılamada önemli bir etken olduğundan kullanımını arttırmaktadır. En büyük avantajı, kolay üretim koşullarıyla çeşitli tarımsal ve

endüstriyel atıklardan üretilerek dünyanın farklı bölgelerinde kültürünün yapılmaya uygun olmasıdır.

Bu tezde *Pleurotus ostreatus* seçilmesinin asıl nedeni; lignoselülozik atıkları kullanabilme özelliklerine sahip olmalarıdır. Atık kâğıtlardan kültür mantarı üretimi için faydalanılarak, en önemli sorunlarımızdan bir tanesi olan katı atıkları uzaklaştırma problemine de çözüm sağlayabilmektedir. Sağladığı ekonomik kazancın yanında, besleyici protein kaynağı olan mantarların üretimiyle çevrenin korunması da sağlanacaktır. Yani doğal yollarla geri dönüşümün sağlanabilmesi için kullanımı en uygun kaynaklardan birisidir [34].

Yapılan çalışmalarda pamuk sapı üzerinde *Pleurotus ostreatus*'un selüloz aktivitesinin gelişmenin sekizinci gününe kadar artış gösterdiğini ve daha sonra gelişme döneminde sabit kaldığı görülmüştür. Bir başka çalışmada ise, çeltik sapı üzerine aşılı *Pleurotus ostreatus*'un selüloz aktivitelerinin gelişmenin sekizinci gününde en yüksek değerde olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca selüloz içeren artıklar üzerinde *Pleurotus* mantar türlerinin aşılardan sonra bir hafta içerisinde CMC (Karboksimetilselüloz) aktivitesinde önemli artışlara neden olduğu gözlenmiştir [35-37].

Pleurotus ostreatus'un miselinin kullanabileceği formdaki şekerler doğal olarak kullanılan ortamda bulunmakta olup mantar miselinin gelişimiyle birlikte ortamdaki azalan suda çözünebilir şekerler, hemiselüloz ve selüloz enzim aktiviteleri ile hemiselüloz ve selülozun parçalanması sonucu yeniden ortama kazandırılabilmesi tezin temel hedefini oluşturur [38].

1.5. Yapılan çalışmalar

Pleurotus ostreatus' un kültür koşulları, gelişim süreci, içerdiği enzim verim miktarı ile ilgili olarak farklı araştırmalar sonucu aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

1981 yılında yapılan bir çalışmada, çeltik sapı üzerinde geliştirilen *Pleurotus ostreatus*'un gelişimi sırasında salgıladığı selüloz enzimi araştırılmıştır. Sonuç olarak; optimum selüloz enzimi aktivitesi sıcaklığa ve pH değerine bağlanarak, ortam konsantrasyonuna göre oranları % 0,6 ve % 0,8 olarak tespit edilmiştir [39].

1991 yılında yapılan bir çalışmada, zeytinyağı fabrika atık suyunda farklı *Pleurotus* sp. türlerinin gelişimi incelenerek, gelişim gösterdiği yerdeki fenolik ve diğer toksik maddelerin konsantrasyonunda önemli miktarda azalma sağladığı tespit edilmiştir [40].

1992 yılında yapılan bir araştırmada, pamuk sapının katı ortam fermantasyonunda *Pleurotus ostreatus*'un selüloz aktivitesi incelenerek, sekiz güne kadar artış gösterdiği daha sonra ise gelişme döneminin sonuna kadar sabit kaldığı tespit edilmiştir [35].

1993 yılında yapılan bir araştırmada, şeker kamışı sapı üzerinde gelişen *Pleurotus ostreatus*'un selüloz aktivitesi incelenerek, kuru madde ağırlığını azalttığı tespit edilmiştir [41].

1994 yılında yapılan bir araştırmada, *Pleurotus* sp. türlerinin gelişimi incelenerek, ortamda bulunan yüksek selüloz içeriğinin selüloz enzim içeriğini ve enzim üretimi verimini arttırdığı; yüksek lignin ve fenolik madde içerikli ortamların ise selüloz enzimi aktivitesini azalttığı tespit edilmiştir [42].

1997 yılında yapılan bir araştırmada, *Pleurotus ostreatus*'un selüloz aktivitesi su sümbülünün (*Eichhornia crassipes*) parçalanmasında incelenerek, endoglukanaz ve β -glukozidaz aktiviteleri gelişmenin sekizinci, onaltıncı ve kırkıncı günlerinde en yüksek olarak tespit edilmiştir [43].

1999 yılında yapılan bir araştırmada, çeltik sapı üzerine aşılı *Pleurotus* sp. türlerinin selüloz aktiviteleri incelenerek, % 170 yüksek etkinliğe *Pleurotus ostreatus*'un sahip olduğu tespit edilmiştir [36].

2000 yılında yapılan bir araştırmada, farklı sıcaklık uygulamaları yapılarak buğday samanına aşılana *Pleurotus ostreatus*'un ligninolitik enzim aktiviteleri olduğu tespit edilmiştir [44].

2002 yılında yapılan bir araştırmada, kahve atığı üzerinde *Pleurotus ostreatus*'un lignolitik enzimlerin değişimleri incelenerek, mantar oluşum döneminde CMC yönünden en yüksek değere ulaştığı tespit edilmiştir [37].

2003 yılında yapılan bir araştırmada, *Pleurotus ostreatus*'un gelişimi sırasında kadmiyumlu ve kadmiyumsuz buğday sapı üzerinde selülotik, hemiselülotik ve lignolitik enzim aktivitelerinin varlığı tespit edilmiştir [45].

2003 yılında yapılan bir araştırmada, *Pleurotus ostreatus*'un gelişimi sırasında muzun yaprak ve yalancı gövdesi artıkları üzerinde selülaaz enzim aktiviteleri araştırılarak, en yüksek enzim aktivitesinin gelişme döneminin onuncu ve yirminci günlerinde görüldüğü tespit edilmiştir [46].

2005 yılında yapılan bir araştırmada, *Pleurotus ostreatus*'un seçici olarak çeltik sapının holoselüloz (hemiselüloz + selüloz) miktarından daha çok lignin bölümünü parçaladığı tespit edilmiştir [47].

2006 yılında yapılan bir araştırmada, *Pleurotus* sp. türlerinde sıvı kültürde, ağaç yaprakları üzerinde selülaaz enzimi aktivitesi tespit edilmiştir [48].

2007 yılında yapılan bir araştırmada, *Pleurotus ostreatus*'un lakkaz, mangan peroksidaz, ksilanaz ve endo-1,4 glukanaz gibi lignoselülotik enzim üretiminde portakal artıklarından yararlanıldığı tespit edilmiştir [49].

2008 yılında yapılan bir araştırmada, *Pleurotus ostreatus*'un selüloz, hemiselüloz ve lignin degradasyonu yaparak selülaaz enzimi varlığı tespit edilmiştir [38].

2. YÖNTEM

2.1. Kullanılan Besiyerleri

2.1.1. Malt Extract Agar Besiyeri

Malt Extract Agar (Merck, Almanya) besiyeri *Pleurotus ostreatus*'un fungal gelişmesinin sağlanması amacıyla kullanılmıştır. 48,0 g/L olacak şekilde damıtılmış su içinde ısıtılıp eritilerek, otoklavda 121°C' de 10 dakika sterilize edilerek hazırlanmıştır.

2.1.2. Karboksimetilselüloz - Agar Katı Besiyeri (CAKB)

Karboksimetilselüloz - Agar Katı Besiyeri (CAKB), mantar türünün selüloz aktivitesinin saptanması amacıyla kullanılmıştır.

CAKB hazırlanması sırasında Karboksimetilselüloz (CMC) (Zag, Türkiye) 10 g/L, Pepton (Merck, Almanya) 5 g/L, Maya özütü (Merck, Almanya) 5 g/L, KH₂PO₄ (Tekkim, Türkiye) 1 g/L, MgSO₄.7H₂O (Merck, Almanya) 0,2 g/L, NaCl (Merck, Almanya) 10 g/L [17], Agar-agar (Merck, Almanya) 15 g/L kullanılarak hazırlanmıştır [50].

2.1.3. Sıvı Selüloz Aktivitesi Besiyeri (SSAB)

Sıvı Selüloz Aktivitesi Besiyeri (SSAB), selüloz enziminin pH 4,0; 5,0; 6,0 ve 7,0 (pH'lar \pm 0,1) değerlerinde aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır [51].

SSAB hazırlanması sırasında % 0,1 Karboksimetilselüloz CMC (Zag, Türkiye), % 1 Et özütü (Merck, Almanya), % 2 Pepton (Merck, Almanya), % 0,15 K₂HPO₄ (Merck, Almanya), % 0,02 MgSO₄.7H₂O (Merck, Almanya), % 0,001 FeSO₄.7H₂O (Zag, Türkiye), % 0,0001 MnSO₄.4H₂O (Zag, Türkiye), % 0,01 CaCl₂.H₂O (Zag, Türkiye), % 0,5 Na₂CO₃ (Merck, Almanya) kullanılarak hazırlanmıştır [51].

2.2. Kullanılan Çözeltiler

2.2.1. % 0,1'lik Kongo Kırmızısı Çözeltisi

Karboksimetilselüloz - Agar Katı Besiyeri (CAKB)'nde selüloz aktivitesi tespiti için % 0,1'lik kongo kırmızısı (ChemBio, Türkiye) 100 mL distile suda çözülerek hazırlanmıştır [52].

2.2.2. 1 M NaCl Çözeltisi

Karboksimetilselüloz - Agar Katı Besiyeri (CAKB)'nde selüloz aktivitesi sonucu oluşan zonları belirgin hale getirerek, Kongo kırmızısının besiyerdeki fazlasının alınması amacıyla kullanılmıştır [52].

2.2.3. Fosfat-Sitrat Tamponu pH 2,2-8,0, PKA= 7,20/6,40

pH 4,0; 5,0; 6,0 ve 7,0'da (pH'lar $\pm 0,1$) enzim aktivitelerinin tespiti için aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır:

Tablo 2.1. Fosfat-Sitrat tamponu [53]

0,2 M Na ₂ HPO ₄ (mL)	0,1 M sitrat (mL)	pH
19,03	30,7	4,0
25,7	24,3	5,0
32,1	17,9	6,0
43,6	6,5	7,0

2.2.4. CMC (Karboksimetilselüloz)'li Fosfat-Sitrat Tamponu

Fosfat-Sitrat tamponu hazırlanarak enzim aktivitesi tespiti için 4,0; 5,0; 6,0 ve 7,0 pH'larına (pH'lar $\pm 0,1$) %1 olacak şekilde her pH'a özgü tampona CMC (karboksimetilselüloz) eklenerek hazırlanmıştır.

2.2.5. Amonyum Sülfat Presipitasyonu

Ham özüte artan konsantrasyonlarda amonyum sülfat (Zag, Türkiye) (% 50, % 60, % 70, % 80 ve % 90'luk doygunlukta) eklenerek proteinleri çöktürmek amacıyla kullanılmıştır.

2.2.6. Dinitro Salisilik Asit (DNS)

Enzim aktivitesiyle açığa çıkan indirgen şeker miktarının tespiti için kullanılmıştır. 1 gr DNS (Sigma, USA) 50 mL distile su içerisinde çözülüp, üzerine 30 gr K-Na-Tartarat (Merck, Almanya) ve 20 mL 2N NaOH (Emir, Türkiye) ilave edilerek son hacim 100 mL ye tamamlanmıştır [54].

2.3. *Pleurotus ostreatus*'un Kültür Koşullarının Sağlanması

Uygun fungal gelişimin sağlanabilmesi için 48 saat 25 °C'de Malt Extract Agar besiyerinde inkübasyona bırakılmıştır. Gelişme gösteren mantarlarda, selüloz aktivitesinin saptanması amacıyla Karboksimetilselüloz - Agar Katı Besiyeri (CAKB) 4 farklı pH'ta 4,0; 5,0; 6,0 ve 7,0 (pH'lar $\pm 0,1$) olacak şekilde hazırlanmıştır. 27 °C de 24 saat inkübasyona bırakılmış, süre sonunda kontaminasyon olmayan her bir pH'a özgü besiyerlere *Pleurotus ostreatus* ekimi yapılarak 25 °C de 48 saat inkübe edilmiştir.

2.4. *Pleurotus ostreatus*'un Selüloz Enzimi Pozitif Olma Durumu

İnkübasyon sonunda hazırlanan her bir petriye % 0,1'lik kongo kırmızısı çözeltilisinden dökülerek örnekler 15 dakika süreyle boyanmıştır. Bu sürenin sonunda boya petriden dışarıya dökülerek boyanın geri alınması amacıyla besiyerine 1M NaCl çözeltilisi ilave edilmiş ve 15 dakika inkübasyona bırakılarak; boyama işlemi sonunda etrafında sarı hidroliz zonu gözlenen *Pleurotus ostreatus* suşları selüloz pozitif olarak değerlendirilmiştir.

2.5. *Pleurotus ostreatus*'tan Selüloz Enziminin Kısmi Saflaştırılması

Selüloz pozitif olarak değerlendirilen suşlarda pH değerleri arası bağlantılı aktivitelerinin belirlenmesi için Sıvı Selüloz Aktivitesi Besiyeri (SSAB) kullanılmıştır [51]. 27 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılan ve süre sonunda kontaminasyon olmayan SSAB besiyerlerine, sarı hidroliz zonu varlığı sonucu optimum olarak seçilen pH'lar için ayrı ayrı öze ile selüloz pozitif olarak değerlendirilen *Pleurotus ostreatus* ekimi yapılmıştır.

Ekim yapıp hazırlanan 4,0; 5,0; 6,0 ve 7,0 pH (pH'lar $\pm 0,1$) değerli besiyerleri, 25°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

SSAB ile inkübasyon sonunda tüpler 0 °C 6000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatanta %70 oranında soğuk etanol (Merck, Almanya) eklenerek 24 saat -33 °C'de bekletilmiştir. Süre sonunda, çözelti +4 °C de 6000 rpm'de 20 dakika tekrar santrifüj edilerek elde edilen çökelti Fosfat-Sitrat tamponunda çözülmüştür [51].

Bu aşamadan itibaren örnekler ikiye ayrılmıştır; pelet, üzerine Karboksimetilselülozlu (CMC'li) tampon eklenmek üzere bekletilmiştir. Süpernatant kısmı ise % 50, % 60, % 70, % 80 ve % 90'luk doygunlukta amonyum sülfat (Zag, Türkiye) çözeltileri sırasıyla eklenip çökeltiler elde edilerek presipitasyon uygulanmış ve bu işlemlerin her biri ayrı ayrı pH'lar için tekrarlanmıştır.

2.6. *Pleurotus ostreatus*'un Selülaz Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi

Her tampona özgü hazırlanan peletlerden 1mL alınarak üzerlerine 1'er mL pH'ına özgü CMC'li tampon eklenmiştir.

Ticari olarak satılan selülaz enzimi substrat solüsyonu (Cellulase Onozuka R-10 Ürün kodu: 1023210005); pH 6,0'luk CMC'li Fosfat-Sitrat Tamponunda hazırlanarak 42 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

Reaksiyonu durdurmak için; 2 mL DNS (Dinitrosalisilik asit solüsyonu) ilave edilerek 5 dakika kaynatılmış ve soğuduktan sonrada renk değişimi 550 nanometrede okunarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

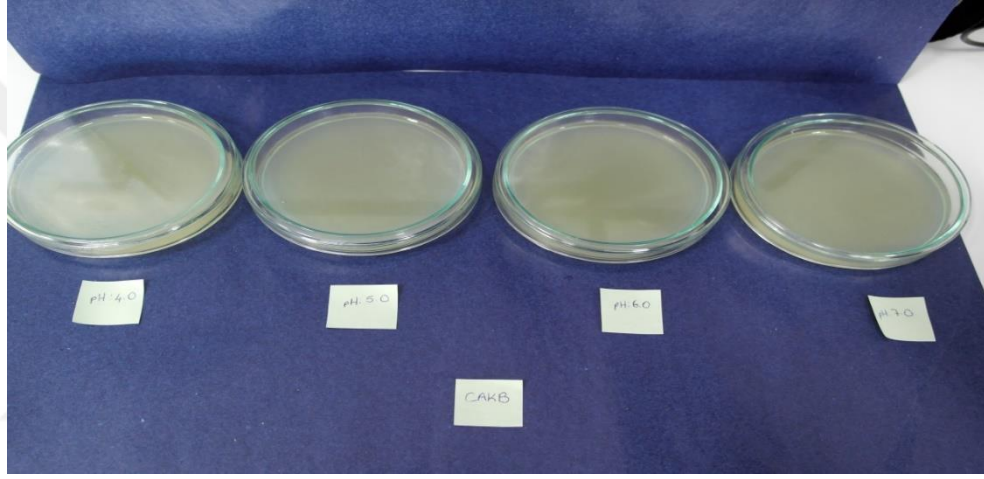
2.7. İstatistiksel Hesaplama

Bu çalışmada, paralel çalışmalar arasındaki farklılıkları kıyaslamak için tek yönlü ANOVA testi kullanılmıştır ve p -değeri ($p>0,05$) olarak kabul edilmiştir.

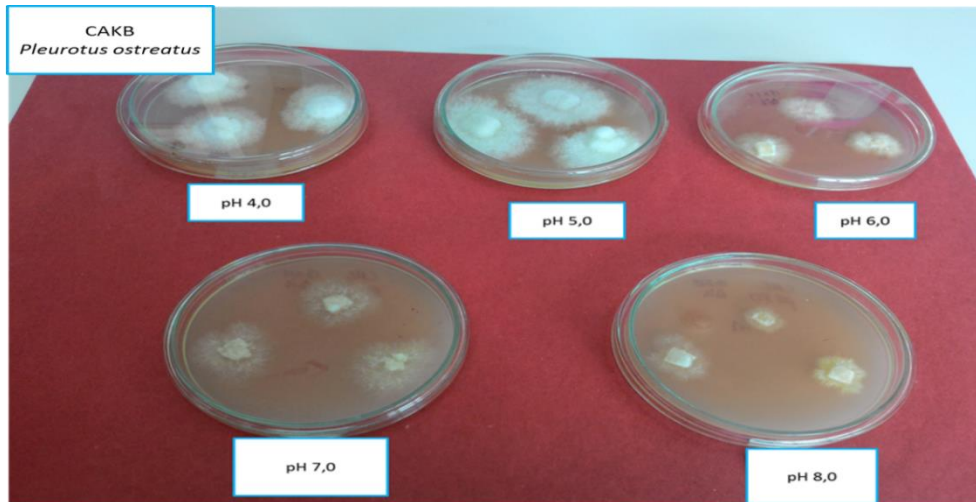
3. BULGULAR ve TARTIŞMA

3.1. *Pleurotus ostreatus*'un Kùltür Koşullarının Uygunluğu

Pleurotus ostreatus fungal gelişimini Malt Extract Agar besiyerinde sağladıktan sonra, Karboksimetilselüloz - Agar Katı Besiyerinde (CAKB) 4 farklı pH'ta 4,0; 5,0; 6,0 ve 7,0 (pH'lar $\pm 0,1$) olacak şekilde uygun gelişimleri tamamlanarak, selüloz enzimi pozitiflik durumuna bakılmıştır.



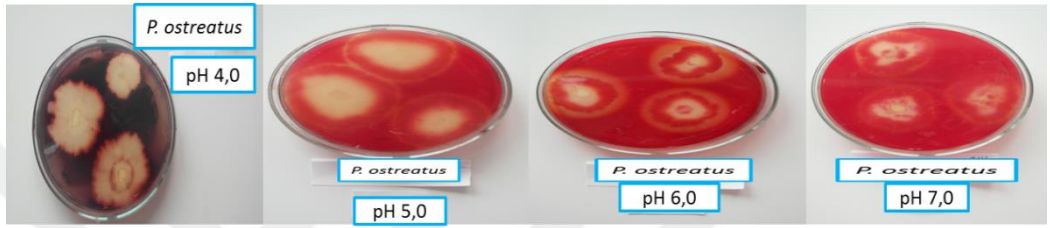
Fotoğraf 3.1. Kontaminasyon olmayan ekime hazır CAKB



Fotoğraf 3.2. Uygun *Pleurotus ostreatus* gelişimi gösteren CAKB

3.2. *Pleurotus ostreatus*'un Selülaz Pozitif Olma Durumu

25 °C de 48 saat inkübasyona bırakılan, CAKB'ye inkübasyon sonucu % 0,1'lik kongo kırmızısı çözeltisinden dökülerek örnekler 15 dakika süreyle boyanmıştır. Sürenin sonunda boya dökülerek boyanın geri alınması amacıyla besiyerine 1M NaCl çözeltisi ilave edilmiş ve 15 dakika inkübasyona bırakılarak; boyama işlemi sonunda etrafında sarı hidroliz zonu gözlenen aşağıdaki suşlar selülaz pozitif olarak değerlendirilmiştir [52].

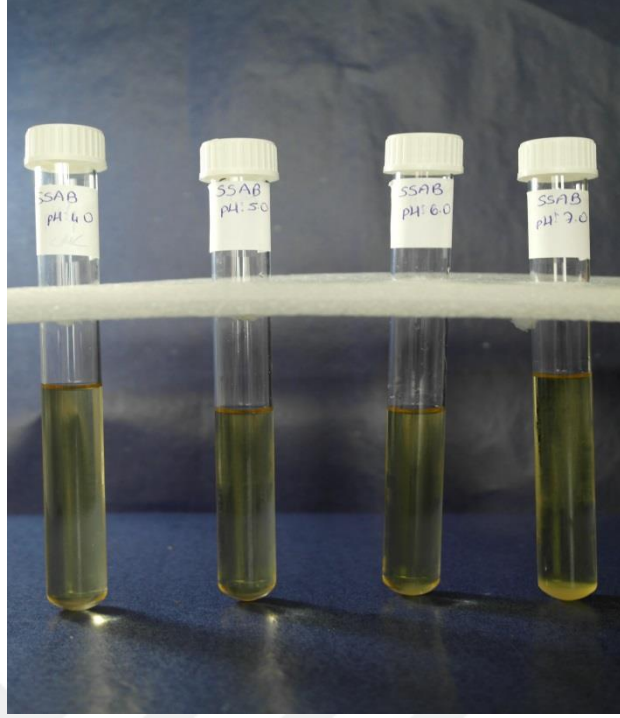


Fotoğraf 3.3. *Pleurotus ostreatus*'un selülaz enzimi pozitif suşları

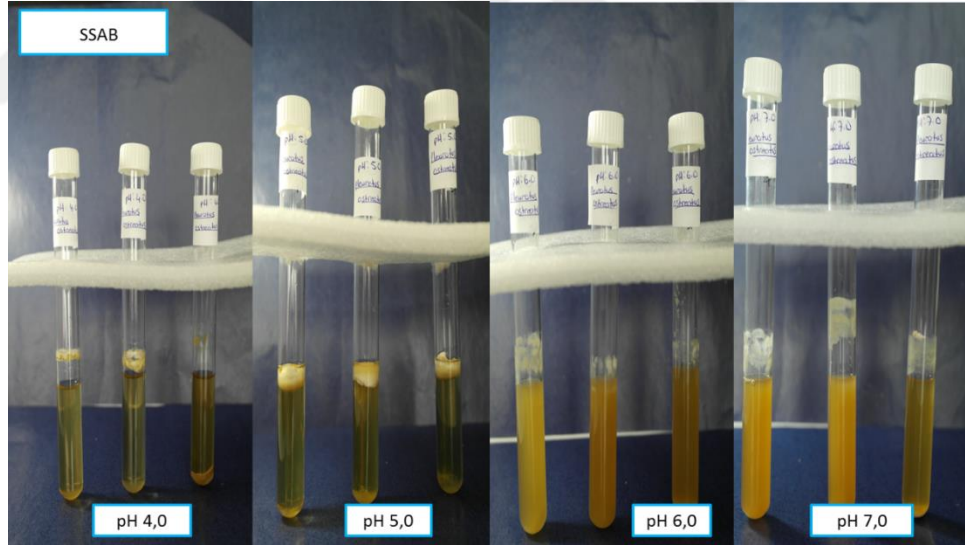
Oluşan sarı hidroliz zonları ile optimum pH'lar 5,0; 6,0 ve 7,0 olarak belirlenmiştir.

Selülaz enziminin pH 4,0; 5,0; 6,0 ve 7,0 (pH'lar $\pm 0,1$) değerlerinde aktivitelerinin belirlenmesi için SSAB kullanılmıştır [51]. Aynı besiyerinden 4 farklı pH olacak şekilde (4,0; 5,0; 6,0 ve 7,0) hazırlanmıştır.

27 °C de 24 saat inkübasyona bırakılan SSAB, süre sonunda kontaminasyon olmayan besiyerlerine her bir pH için ayrı olarak öze ile *Pleurotus ostreatus* ekimi yapılmıştır. Ekim yapılan pH 4,0; 5,0; 6,0 ve 7,0 (pH'lar $\pm 0,1$) değerli besiyerleri, 25 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda uygun üremeler elde edilerek, selülaz enziminin kısmi saflaştırılması aşamasına geçilmiştir.



Fotoğraf 3.4. SSAB

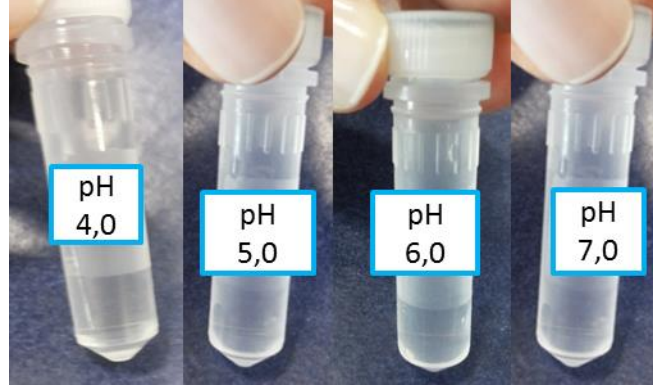


Fotoğraf 3.5. Farklı pH'larda ki SSAB'de gelişen *Pleurotus ostreatus*

3.3. Selüloz Enziminin Kısmi Saflaştırılması

SSAB ile inkübasyon sonunda tüpler 0 °C 6000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatanta % 70 oranında soğuk etanol eklenerek 24 saat -33 °C'de

bekletilmiştir. Süre sonunda, çözelti +4 °C de 6000 rpm’de 20 dakika tekrar santrifüj edilerek elde edilen çökelti Fosfat-Sitrat tamponunda çözülmüştür [51].



Fotoğraf 3.6. +4 °C de 6000 rpm’de 20 dakika santrifüleme sonucu elde edilen ilk peletler

Her bir pH değeri için uygulanan saflaştırma işleminde santrifüjden sonra kalan peletler 2 mL Fosfat-Sitrat tamponunda çözümlenerek 2 kısma ayrılmıştır:

- Pelet, üzerine Karboksimetilselülozlu (CMC’li) tampon eklemek üzere ayrılmıştır.
- Süpernatant kısmı ise % 50, % 60, % 70, % 80 ve % 90’lık amonyum sülfat çözeltileri eklenerek çökeltiler elde edilmiştir.

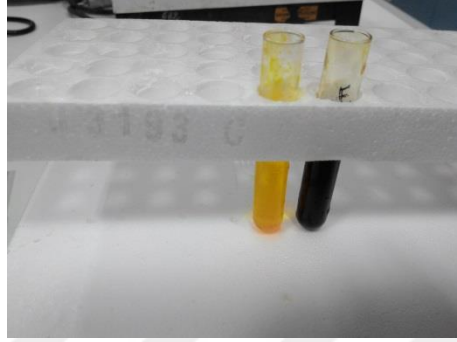
3.4. *Pleurotus ostreatus*’tan Elde Edilen Selülaz Enziminin Aktivitesi

Her tampona özgü hazırlanan peletlerden 1mL alınarak üzerlerine 1’er mL pH’ına özgü CMC’li tampon eklenmiştir.

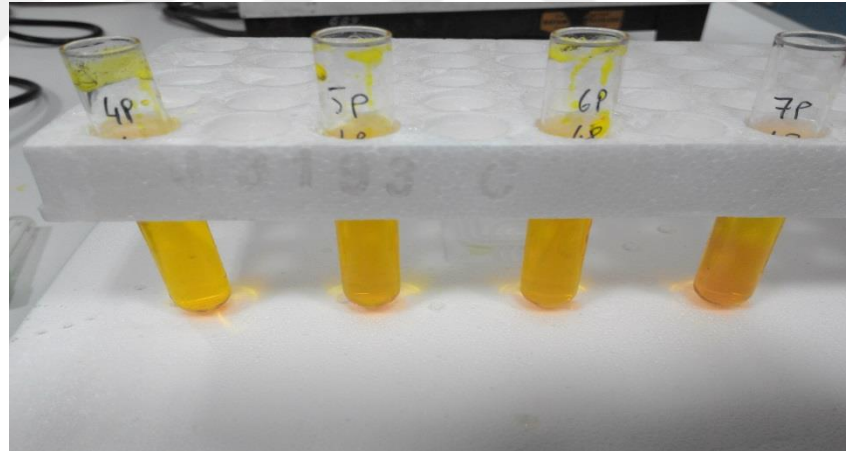
Ticari olarak satılan selülaz enzimi substrat solüsyonu (Cellulase Onozuka R-10 Ürün kodu: 1023210005); pH 6,0’lık CMC’li Fosfat–Sitrat Tamponunda hazırlanarak 42 °C’de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

Reaksiyonu durdurmak için; 2 mL DNS (Dinitrosalisilik asit solüsyonu) ilave edilerek 5 dakika kaynatılmış ve soğuduktan sonrada renk değişimi 550 nanometrede okunmuştur.

İçinde selüloz olmayan sarı renkli tüp kör tüp olarak kullanılmıştır. Sarı renkli çözeltilerde; pH 6,0 CMC'den 1mL ve 1mL DNS 1/10 oranında seyreltilmiştir. Buna karşı ise koyu renkli olarak görülen ticari olarak satılan selüloz enzimi substrat solüsyonu (Cellulase Onozuka R-10 Ürün kodu: 1023210005) 550 nanometrede 1/10 seyreltme ile absorbans değerleri okunmuştur.



Fotoğraf 3.7. Kör tüp ve ticari olarak satılan selüloz enzimi substrat solüsyonu



Fotoğraf 3.8. Her pH'a özgü absorbansı okunmaya hazırlanan peletler

Spektrofotometrede okunan absorbans değerleri aşağıdaki gibidir:

Tablo 4.1. İlk pelet absorbanası

İlk Pelet	İlk Okunan Absorbans Değeri	İkinci Okunan Absorbans Değeri	Üçüncü Okunan Absorbans Değeri
pH 4,0	0,021	0,020	0,020
pH 5,0	0,007	0,007	0,007
pH 6,0	0,002	0,001	0,001
pH 7,0	1,500	1,501	1,502

Yapılan üç ayrı okumada elde edilen veriler, istatistiksel hesaplama sonucunda p -değeri $>0,05$ olarak bulunmuş, bu sebeple aralarındaki fark istatistiksel olarak önemsiz kabul edilmiştir. Hesaplamaların detayı ekler bölümünde verilmiştir.

Tablo 4.2. İkinci pelet absorbanası

İkinci Pelet	İlk Okunan Absorbans Değeri	İkinci Okunan Absorbans Değeri	Üçüncü Okunan Absorbans Değeri
pH 4,0	0,008	0,008	0,008
pH 5,0	0,021	0,021	0,021
pH 6,0	0,004	0,005	0,005
pH 7,0	0,014	0,014	0,014

Yapılan üç ayrı okumada elde edilen veriler, istatistiksel hesaplama sonucunda p -değeri $>0,05$ olarak bulunmuş, bu sebeple aralarındaki fark istatistiksel olarak önemsiz kabul edilmiştir. Hesaplamaların detayı ekler bölümünde verilmiştir.

Tablo 4.3. Üçüncü pelet absorbanası

Üçüncü Pelet	İlk Okunan Absorbans Değeri	İkinci Okunan Absorbans Değeri	Üçüncü Okunan Absorbans Değeri
pH 4,0	0,000	0,001	0,000
pH 5,0	0,006	0,006	0,006
pH 6,0	0,039	0,039	0,039
pH 7,0	0,022	0,022	0,023

Yapılan üç ayrı okumada elde edilen veriler, istatistiksel hesaplama sonucunda p -değeri $>0,05$ olarak bulunmuş, bu sebeple aralarındaki fark istatistiksel olarak önemsiz kabul edilmiştir. Hesaplamaların detayı ekler bölümünde verilmiştir.

Tablo 4.4. Dördüncü pelet absorbanası

Dördüncü Pelet	İlk Okunan Absorbans Değeri	İkinci Okunan Absorbans Değeri	Üçüncü Okunan Absorbans Değeri
pH 4,0	0,005	0,005	0,005
pH 5,0	0,017	0,017	0,017
pH 6,0	0,001	0,001	0,001
pH 7,0	0,018	0,018	0,018

Yapılan üç ayrı okumada elde edilen veriler, istatistiksel hesaplama sonucunda *p*-değeri >0,05 olarak bulunmuş, bu sebeple aralarındaki fark istatistiksel olarak önemsiz kabul edilmiştir. Hesaplamaların detayı ekler bölümünde verilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre ticari olarak satılan selülaz enzimi substrat solüsyonu (Cellulase Onozuka R-10 Ürün kodu: 1023210005) selülaz absorpsiyonu: 1,992'dir. İlk pelet pH 7,0 sonucu selülaz absorpsiyonu ise, 1,500 'dür. Yaklaşık değerler elde edildiğinden optimum pH 7,0 olarak değerlendirilmiştir.

İkinci pelet oluşumu yani; % 50 amonyum sülfat presipitasyonu uygulanan örneğin en yüksek aktivite gösterdiği değerin pH 5,0'da 0,021 olduğu bulunmuştur.

Üçüncü pelet oluşumu yani; % 60 amonyum sülfat presipitasyonu uygulanan örneğin en yüksek aktivite gösterdiği değerin pH 6,0'da 0,039 olduğu bulunmuştur.

Dördüncü pelet oluşumu yani; % 70 amonyum sülfat presipitasyonu uygulanan örneğin en yüksek aktivite gösterdiği değerin pH 7,0'da 0,018 olduğu bulunmuştur.

Önceki yapılan çalışmalarda lignoselülozik artıklar üzerinde mantar misellerinin ürettiği yüksek CMC seviyelerinin, alınan yüksek biyolojik etkinlik oranına uyum sağladığı bulunmuştur, ayrıca yüksek biyolojik etkinliğe ve uygun maliyette üretim özelliğine sahip olan *Pleurotus ostreatus*'un selülaz aktivitesinin yüksek olduğu tespit edilmiştir [36, 37, 42].

Sonuç olarak, *Pleurotus ostreatus*'ta daha önce yapılmış olan çalışmaların ortaya koyduğu gibi aktivite gösteren bir sellülaz enzimi bulunduğu ve bu enzimin % 50 amonyum sülfat uygulamasıyla çöktürebileceği ticari selülaz aktivitesi ile karşılaştırılarak ortaya çıkartılmıştır.

4. SONUÇLAR

Endüstriyel olarak kullanımı çokça tercih edilen, ticari selüloz enzimi substrat solüsyonu (Cellulase Onozuka R-10 Ürün kodu: 1023210005) selüloz absorpsiyonu ile ilk pelet pH 7,0'nin selüloz absorpsiyonunun yaklaşık değerlerde elde edilmesi *Pleurotus ostreatus*'un selüloz enzimi elde edebilmek için ne kadar uygun olduğunu göstermektedir. İleri araştırmalarla desteklenerek geliştirilmesi ve yeni çalışmaların yapılması uygundur.



5. ÖNERİLER

Pleurotus ostreatus'tan elde edilen selüloz enzimi ile en önemli sorunlarımızdan biri ve aynı zamanda tek kurtarıcı seçeneğimiz olan geri dönüşümün gerçekleştirilmesi için biyolojik bir yol sunulmaktadır. Ayrıca; yapılacak çalışmalarla ve yeni yöntemlerin geliştirilmesiyle endüstride kullanım alanını arttırmak ve geliştirmek de mümkündür.

Bu çalışmanın geliştirilmesi amacıyla; yeni bir deney tasarlanarak *Pleurotus ostreatus* suşundan kısmen saflaştırılan selüloz enziminin enzim kinetiği çalışılmalıdır.

Gelişen teknoloji ve geri dönüşüm ile azalan kaynakların desteklenmesi, genelde ithal veya eski üretim metotlarından elde edilen ürünler yerine; yeni teknolojiye uygun, ithalatı düşürerek ülke ekonomisine katkı sağlamak amacı ile müşteri ihtiyaçları doğrultusunda geri dönüşüm amaçlı enzimlerin üretimi ve kullanımı ile ilgili olarak yapılacak bir diğer çalışma ise; *Pleurotus ostreatus*' a uygun fermentör tasarlanarak, daha fazla üretim sağlayarak endüstriyel kullanım amaçlı uygunluğun daha da artacağı sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Zeman, N.W., & Mccrea, J.M., (1985). Alpha-Amylase production using a recombinant DNA organism. *Cereal Foods World*. 30(1), 777-780.
2. Ghorbel, R. E., Maktouf, S., Massoud, E. B., Bejar, S., & Chaabouni, S. E., (2009). New thermostable amylase from *Bacillus cohnii* US147 with a broad pH applicability. *Appl Biochem Biotechnol*, 157, 50-60.
3. Kirk O., Borchert T. V., & Fuglsang C. C., (2002). Industrial enzyme applications. *Current opinion in biotechnology*, 13, 345-351.
4. Wiseman, A., (1987). *Handbook of Enzymes Biotechnology*. Second Edition. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry p. 274-373.
5. Aoki, K., Miyamoto, K., Murakami, S., & Shinke, R., (1995). Anaerobic synthesis of extracellular proteases by the soil bacterium *Bacillus* sp. AM-23: Putrification and characterization of the enzymes. *Soil Biol. Biochem*. Vol. 27. No.11. 1377-1382.
6. Kıran, Ö.E., Çömlekçioğlu, U., & Dostbil, N., (2006). Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları. *KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9(1), 12-19.
7. Banerjee, U.C., Sani, R.K., Azmi, W., & Soni, R., (1999). Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Process Biochemistry* 35, 213-219.
8. Singh, J., Batra, N., & Sobti, R.C., (2000). Serine Alkaline Protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1. *Process Biochemistry* . 36, 781-785.
9. Demain, A.L., & Solomon, N.A., (1981). In industrial microbiology and the advent of genetic engineering, pp. 3-14. Scientific American, Freeman&Comp., San Francisco.
10. Tarakçioğlu, Y., (1979). An Amylase producing maltotiose from *Bacillus subtilis*. *Agric. Biol. Chem*. 49(4), 1901-1907.
11. Jeffries, T.W., Yang, V.W., & Davis, M.W., (1998). Comparative study of xylanase kinetics using dinitrosalicylic, Arsenomolybdate, and Ion Chromatographic Assays. All rights of any Nature Whatsoever Reserved 0273-2289/98/70-72.
12. Wong, K.K.Y., Richardson, J.D., & Mansfield, S.D., (2000). Enzymatic treatment of mechanical pulp fibers for improving papermaking properties. *Biotechnol. Prg*. 16, 1025-1029.

13. Teeri, T.T., Lehtovaara, P., Kauppinen, S., Salovuori, I., & Knowles, J., (1990). Homologous domains in *Trichoderma reesei* cellulolytic enzymes: Gene Sequence and Expression of Cellobiohydrolase II. *Genes*. 51, 43-52.
14. Tomme, P., Warren, R.A., & Gilkes, N.R., (1995). Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv Microb Physiol*. 37, 1-81.
15. Eriksson, K.E., Blanchette, R.A., & Ander, P., (1990). Biodegradation of lignin. In *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*. Springer-Verlag KG, Berlin, 225-233.
16. Johansson, E., Krantz-Rülcker, C., Zhang, B.X., & Öberg, G., (1999). Chlorination and biodegradation of lignin. *Soil Biology and Biochemistry*, 32, 1029-1032.
17. Haliskaranfil, S., (2012). Termoalkalifilik Amilaz ve Selülaz Enzim (Multi Enzim) üreticisi *Bacillus* sp. İzolasyonu, Enzimlerin Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulanabilirliği. Yüksek Lisans Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. Adana.
18. Lynd, L.R., Cushman, J.H., Nichols, R.J., & Wyman, C.E., (1991). Fuel ethanol from cellulosic biomass. *Science*, 251, 1318- 1323.
19. Kuduğ, H., (2013). Mikrobiyal Kaynaklı Selülaz Enziminin *E. Coli*'de Rekombinant Olarak Üretilmesi. Yüksek Lisans Tezi, *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. Tokat.
20. Wolfenden, R., & Snider, M.J., (2001). The depth of chemical time and the powder of enzyme as catalysts. *Accounts of Chemical Research*, 34(12), 938-945.
21. Williamson, G., Belshaw, N.J., & Williamson, M.P., (1992). O-glycosylation in *Aspergillus* glucoamylase. Conformation and role in binding. *Biochemical Journal*, 287(2), 423-428.
22. Haki G.D., & Rakshit S.K., (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*, 89, 17–34.
23. Taylor R.E., (1991). Protein Immobilization. Fundamentals and applications. Marcel Dekker Inc., 377 , New York.
24. Humphrey, A.E., Moreire, A., Armiger, W., & Zabriske, D., (1977). Production of single cell protein from cellulose wastes, Biotechnology Bioengineering Symp, Symposium on single cell protein substrates presented at the First Chemical Congress of the North American Continent, Mexico, 19(7), 45-64.
25. Bhat, M. K., (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances* 18, 355-383.

26. Karademir, A., Akgül, M., & Tutuş, A., (2002). Kağıt endüstrisinde enzim kullanımına genel bir bakış. *K.S.Ü. Fen ve Mühendislik Dergisi* 5(1), 61-67.
27. Tatlı, İ.S.H., (2013). Termohalofil *Bacillus* sp.'den (Asidik, Alkali ve Nötral) Selüloz Enzimi Üretimi ve Karakterizasyonu. Doktora Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. Adana.
28. Kong W., (2004), Descriptions of commercially important *Pleurotus* species, Mushroom Growers' Handbook 1, Oyster Mushroom Cultivation, Part II, Chapter 4, 54-55.
29. Zazaoğlu, C., (2015). Ham Petrolle Kirlenmiş Topraklarda İstiridye Mantarı (*Pleurotus ostreatus*)'nın Mikoremediasyon Kapasitesinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. İstanbul.
30. Chang, S., Buswell J.A., & Miles P.G., (1999). Genetics and breeding of edible mushrooms. *Malaysia*, 2, 324.
31. Stamets, P., (2000). Growing gourmet and medicinal mushrooms. *Canada*, 3, 572.
32. Aksu, Ş., & Günay, A., (2000). Yemelik mantar raporu. Sekizinci beş yıllık kalkınma planı bitkisel üretim özel ihtisas komisyonu, Sebzeçilik Alt Komisyonu, Yalova.
33. Atmaca, M. & İlbay, M.E., (2004). *Pleurotus* spp. Yetiştiriciliğinde yetiştirme ortamının değişik miktar ve şekillerde paketlenmesinin verime etkisi üzerine bir araştırma. Türkiye VII. Yemelik Mantar Kongresi, Antalya, 73- 76.
34. Yıldız, S., Yıldız, Ü.C., Gezer, E.D., & Temiz, A., (2002). Some lignocellulosic wastes used as raw material in cultivation of the *Pleurotus ostreatus* culture mushroom. *Process Biochemistry*, 38, 301-306.
35. Kerem, Z., Friesem, D., & Hadar, Y., (1992). Lignocellulose degradation during solid-state fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(4), 1121-1127.
36. Sharma, S.G., & Singh, J.V.K., (1999). Biological efficiency and cellulase activities of early and late fruiting *Pleurotus* spp., *Mushroom Research*, 8, 23-26.
37. Velazquez-Cedeno, M.A., Mata, G., & Savoie, J.M., (2002). Wastereducing cultivation of *Pleurotus ostreatus* ve *Pleurotus pulmonarius* on coffee pulp: Changes in the Produsion of Some Lignocelleloytic Enzymes. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 18, 201-207.
38. Kurt, Ş., (2008). Değişik Tarımsal Atıkların Kayın Mantarı (*Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sajor-caju*) Yetiştiriciliğinde Kullanım Olanakları. Doktora Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. Adana.

39. Hong, J.S., & Kwon, Y.J., (1981). Studies on the enzymes produced by *Basidiomycetes*, 2: Proportions of Cellulase and Xylanase. *Journal of the Korean Agricultural Chemical Society*, 24(4), 260-266.
40. Sanjust, E., Pompei, R., Rescigno, A., Rinaldi, A., & Ballero, M., (1991). Olive milling wastewater as a medium for growth of four *Pleurotus* Species. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 31, 223- 234.
41. Ortega, G.M., Martinez, E.O., Gonzalez, P.C., Betancourt, D., & Otero, M.A., (1993). Enzyme activities and substrate degradation during white rot fungi growth on sugar - cane straw in a solid state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9, 210- 212.
42. Sivaprakasam, K.S. Doraisamy, M., & Seetharaman, K., (1994). Factors influencing the sporophore production in *oyster* mushroom with special reference to *Pleurotus sajor-caju*. *Advances in Mushroom Biotechnology, India*, 134-138.
43. Malaya, G., & Nandi, B., (1997). Dynamics of extracellular enzymes during lignocellulose of water hyacinth biomass by *Pleurotus* spp. *Horticultural Abstracts.*, 67(2), 1422.
44. Wiesche, C., Wolter, M., Zadrazil, F., & Aksu, S., (2000). Activities of ligninolytic enzymes as a means for monitoring the colonization of straw substrate pretreated at a different temperatures by *Pleurotus ostreatus*. *Proceedings of the 15 th International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi, Netherlands*, 391- 398.
45. Baldrian, P., & Gabriel, J., (2003). Lignocellulose degradation by *Pleurotus ostreatus* in the presence of cadmium. *FEMS Microbiology Letters*, 220, 235- 240.
46. Reddy, G.V., Babu, P.R., Komaraiah, P., Roy, K.R.M., & Kothari, I.L., (2003). Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). *Process Biochemistry*, 38, 1457-1462.
47. Taniguchi, M., Suzuki, H., Watanabe, D., Sakai, K., Hoshino, K., & Tanaka, T., (2005). Evaluation of pretreatment with *Pleurotus ostreatus* for enzymatic hydrolysis of rice straw. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(6), 637-643.
48. Elisashvili, V., Pennickx, M., E., Asatiani, M., & Kvesitadze, G., (2006). Use of *Pleurotus dryinus* for lignocellulolytic enzymes production in submerged fermentation of mandarin peels and tree leaves. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 998-1004.
49. Alexandrino, A.M., Faria, H.G., Souza, C.G.M., & Peralta, R.M., (2007). Reutilisation of orange waste for production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus*, 27(2), 364-368.

50. Kim, J-Y., Hur, S-H., & Hong, J-H., (2005). Purification and characterization of an alkaline cellulase from a newly isolated alkalophilic *Bacillus* sp. HSH-810. *Biotechnol. Lett.*, 27, 313-316.
51. Hakamada, Y., Koike, K., Yoshimatsu, T., Mori, H., Kobayashi, T., & Ito, S. (1997). Thermostable alkaline cellulase from an alkaliphilic isolate, *Bacillus* sp. KSM-S237. *Extremophiles*, 1, 151-156.
52. Voget, S., Steele, H.L., & Streit, W.R., (2006). Characterization of metagenome-derived halotolerant cellulase. *J Biotechnol* 126, 26-36.
53. Pearse A., (1980). Histochemistry theoretical and applied. 4th edn. Vol. II. London: Longman Press
54. Miller, G.L., (1951). Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 426-428.
55. URL-1. Enzyme structure, 07/05/2017 tarihinde www.google.com.tr/search?q=enzyme+structure&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwih5pTl8d3TAhWDiSwKHdMfD7YQ_AUICigB&biw=1366&bih=672#imgrc=z9HFh0rXTr8PPM: adresinden alınmıştır.
56. URL-2. Dağdelen A. Canlıların Temel Bileşenleri 6 Enzimler Ders Notu, 07/05/2017 tarihinde <https://www.slideshare.net/AlidaDELEN/7enzimler> adresinden alınmıştır.
57. URL-3. Aktif enzim, 07/05/2017 tarihinde https://www.google.com.tr/search?q=aktif+enzim&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjGh7CnN3TAhUEhywKHQAYCzoQ_AUICygC&biw=1366&bih=672#imgrc=rIqAfhKH9dHKoM: adresinden alınmıştır.
58. URL-4. Sarıkaya A.T. Biyoteknoloji I Enzim Teknolojisi, 07/05/2017 tarihinde <http://slideplayer.biz.tr/slide/2478519/> adresinden alınmıştır.
59. URL-5. Karıştırıcılı tank tipi fermentör, 07/05/2017 tarihinde https://www.google.com.tr/search?q=ferment%C3%B6r&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiekNP_ON7TAhWGkywKHcYxBmAQ_AUICigB&biw=1366&bih=672#tbm=isch&q=kar%C4%B1%C5%9Ft%C4%B1r%C4%B1c%C4%B1%C4%B1+tank+tipiferment%C3%B6r&imgrc=xG64gUmFxpwyM: adresinden alınmıştır.
60. URL-6. Cellulose, 08/05/2017 tarihinde https://www.google.com.tr/search?q=cellulose&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjbx_y5_N_TAhVhM5oKHU_KCl4Q_AUICigB&biw=1366&bih=672#imgrc=9ohElRFRtbnQM: adresinden alınmıştır.

61. URL-7. Cellulase enzyme structure, 08/05/2017 tarihinde https://www.google.com.tr/search?q=Cellulase+enzyme+structure&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwj5kcq8kuDTAhUF1ywKHYMoDyQQ_AUI CigB&biw=1366&bih=672#imgdii=Di7vrpuIPjFFOM:&imgrc=2FnHEtRYu8px2M: adresinden alınmıştır.
62. URL-8. *Pleurotus ostreatus* life cycle, 08/05/2017 tarihinde https://www.google.com.tr/search?q=pleurotus+ostreatus+life+cycle&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiXtJfqmHTAhWPa5oKHTh6CJ8Q_AUI CigB&bw=1366&bih=672#imgrc=sWk5rqEcDrAmaM: adresinden alınmıştır.



EKLER

- EK 1** MALT EXTRACT AGAR KOMPOZİSYONU
EK 2 FOSFAT-SİTRAT TAMPONU PH 2,2 - 8,0 KOMPOZİSYONU
EK 3 DETAYLI İSTATİSTİKSEL ANALİZ SONUÇLARI

EK 1- (Malt Extract Agar Kompozisyonu)

Çalışmada kullanılan Malt Extract Agar'ın (Merck 1.05398) kompozisyonu aşağıda verildiği gibidir:

- 30,0 g/L Malt Extract
- 3,0 g/L; Peptone from Soymeal
- 15,0 g/L; Agar-Agar

Hazırlanması sırasında dehidre besiyeri 48,0 g/L olacak şekilde distile su da eritilir ve sterilize edilerek kullanılır.

EK 2- (Fosfat-Sitrat Tamponu pH=2,2 - 8,0 Kompozisyonu)

Çalışmada kullanılan Fosfat-Sitrat tamponu (pH 2,2-8,0; pKa = 7,20/6,40) kompozisyonu aşağıda verildiği gibidir:

- 0,2 M Dibazik Sodyum Fosfat
- 0,1 M Sitrik Asit



EK 3- (Detaylı İstatistiksel Analiz Sonuçları)

İlk pellet okuması için paralel sonuçların karşılaştırılması

Varyans Analizi Tablosu

H₀: Üç paralelin sonucu istatistiksel olarak benzerdir.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
3-Paralel	2	0,0000	0,00000	0	1
Artıklar	9	5,0055	0,55617		

p-değeri= > 0.05 olduğundan dolayı, H₀ hipotezi kabul edilmiştir.

İkinci pellet okuması için paralel sonuçların karşılaştırılması

Varyans Analizi Tablosu

H₀: Üç paralelin sonucu istatistiksel olarak benzerdir.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
3-Paralel	2	0,0000002	0,00000008	1e-04	0,9999
Artıklar	9	0,0104368	0,00115964		

p-değeri= > 0.05 olduğundan dolayı, H₀ hipotezi kabul edilmiştir.

Üçüncü pellet okuması için paralel sonuçların karşılaştırılması

Varyans Analizi Tablosu

H₀: Üç paralelin sonucu istatistiksel olarak benzerdir.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
3-Paralel	2	0,00000017	8,3000e-08	3e-04	0,9997
Artıklar	9	0,00273475	3,0386e-04		

p-değeri= > 0.05 olduğundan dolayı, H₀ hipotezi kabul edilmiştir.

EK 3'ün devamı

Dördüncü pellet okuması için paralel sonuçların karşılaştırılması

Varyans Analizi Tablosu

H₀: Üç paralelin sonucu istatistiksel olarak benzerdir.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
3-Paralel	2	0,000000	0,00000000	0	1
Artıklar	9	0,003795	0,00042167		

p-değeri = > 0.05 olduğundan dolayı, H₀ hipotezi kabul edilmiştir.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Seval KARADEMİR

Doğum Yeri ve Yılı : Dobriç (BG), 1989

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili :İngilizce, Tatarca

E-posta :ssevaleren@gmail.com

Tel :506 836 27 56

Adres : Fatih Hatun Mah. 224.Sok. No:5 D:3Esenler / İSTANBUL



Eğitim Durumu

Lise : İstanbul İbrahim Turhan Lisesi - Fen Bilimleri (2003-2006)

Lisans : Kastamonu Üniversitesi – Biyoloji Bölümü (2010-2014)

Mesleki Deneyim

İş Yeri : İstanbul Bağcılar Eğitim ve Araştırma Hastanesi - Stajyer
Biyolog (17.06.2013 – 12.09.2013)

İş Yeri : Acıbadem Fulya Hastanesi - Laboratuvar Teknisyeni
(18.09.2014 – 30.01.2015)