

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**FARKLI SICAKLIK DEĞERLERİNİN *Penicillium expansum* FUNGUSUNUN
PROTEİN İÇERİĞİ VE PROTEAZ ENZİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Gülbahar KILIÇ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**ŞANLIURFA
2019**

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**FARKLI SICAKLIK DEĞERLERİNİN *Penicillium expansum* FUNGUSUNUN
PROTEİN İÇERİĞİ VE PROTEAZ ENZİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Gülbahar KILIÇ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**ŞANLIURFA
2019**

Doç. Dr. Murat DİKİLİTAŞ danışmanlığında, Gülbahar KILIÇ'ın hazırladığı “**Farklı Sıcaklık Değerlerinin *Penicillium expansum* Fungusunun Protein içeriği ve Proteaz Enzimi Üzerine Etkileri** ” konulu bu çalışma 12/03/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

İmza

Danışman: Doç. Dr. Murat DİKİLİTAŞ

Üye: Prof. Dr. Mehmet Ertuğrul GÜLDÜR

Üye: Prof. Dr. Sibel DERVİŞ

Bu Tezin Bitki Koruma Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım.

Prof. Dr. İrfan ÖZBERK
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma HÜBAK Tarafından Desteklenmiştir.
Proje no:17029

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

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	v
SİMGELER ve KISALTMALAR	vi
1.GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	13
3.MATERYAL ve YÖNTEM.....	21
3.1.Materyal.....	21
3.1.1.Fungusların morfolojisi	21
3.1.2.Fungusların yetiştirilmesi	21
3.1.3.Çalışmada kullanılan kimyasallar	30
3.2. Yöntem	31
3.2.1. Misel ağırlığı	32
3.2.2. Funguslarda pH ölçümü.....	33
3.2.3. Funguslarda elektriksel iletkenlik (EC)değerlerinin belirlenmesi	34
3.2.4. Funguslarda canlılık testi.....	34
3.2.5. Spor sayımı.....	34
3.2.6. Pigment sayımı	34
3.2.7. Protein ölçümü.....	35
3.2.8. Proteaz enzim ölçümü	35
3.2.9. Lakkaz enzim ölçümü.....	36
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	38
4.1. Fungusun Miselyal Ağırlığı	38
4.2. Fungusun EC ve pH değerleri.....	39
4.3. Spor sayısı ve pigment sayısı.....	41
4.4. Fungusun protein içeriğinin belirlenmesi	43
4.5. Fungusun proteaz aktivitesinin belirlenmesi	44
4.6. Fungusun lakkaz aktivitesinin belirlenmesi	46
4.7. <i>P. expansum</i> fungusunda canlılık testi.....	47
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	49
5.1. Sonuçlar	49
KAYNAKLAR	53
ÖZGEÇMİŞ	62

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FARKLI SICAKLIK DEĞERLERİNİN *Penicillium expansum* FUNGUSUNUN PROTEİN İÇERİĞİ VE PROTEAZ ENZİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Gülbahar KILIÇ

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Murat Dikilitaş
Yıl: 2019, Sayfa: 62

Fungal etmenler patojenisitesini penetrasyon kabiliyetine, salgıladıkları hücre dışı enzimlere ve toksinlere borçludurlar. Özellikle proteinlerin yapısını bozan proteaz enziminin fungal etmenler tarafından salgılanmaları onların karakterleri hakkında bilgi verir. *Penicillium expansum* fungusunun biyokimyasal olarak patojenik karakterini ortaya çıkarmak için farklı sıcaklıklardaki sporulasyonu ve proteaz ve lakkaz enzimlerinin durumu incelenmiştir. Fungal etmen, hem düşük (4-8 °C) hem de yüksek sıcaklık olarak kabul edilen 35 °C ve üstü sıcaklıklarda biyokimyasal faaliyetlerine devam etmiş, 55 °C'de ise enzimsel ve diğer fizyolojik faaliyetleri son bulmuştur. Bu etmenin hasat sonrası meyve ve sebzelere kontaminasyonu durumunda sıcaklık ayarlaması ile kontrol edilemeyeceği, ilave tedbirlere gereksinim duyulduğu anlaşılmıştır. Pestisit kullanımının sınırlandırıldığı bir dönemde alternatif olarak öne sürülen yöntemlerin etkinliğinin belirlenmesinde bu çalışmada kullanılan parametrelerin önemli kriterler arasında sayılabileceği belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELE: Sıcaklık, *penicillium expansum*, protein, proteaz enzimi, lakkaz enzimi.

ABSTRACT

MSc Thesis

THE EFFECTS OF DIFFERENT TEMPERATURES ON THE PROTEIN CONTENT AND PROTEASE ENZYME OF THE *Penicillium expansum* FUNGUS

Gülbahar KILIÇ

**Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Plant Protection**

**Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Murat DİKİLİTAŞ
Year: 2019, Page: 62**

Pathogenicity of fungal agents depends on the penetration ability, production of extracellular enzymes and toxins. Secretion of protease enzymes, degrading of protein structures, by fungal agents would inform us about the pathogenic characteristics of the pathogens. Production levels of protease and laccase enzymes and sporulations of *Penicillium expansum* fungus at different temperatures were elucidated. The fungal agent carried out its physiological and biochemical functions both at low (4-8 °C) and high (35 °C and above) temperatures, enzymatic and other physiological functions were ended at 55 °C. It was established that this fungal agent could not be controlled via adjustment of temperature at storage conditions in case of contamination of fruits and vegetables, in fact, further control measures are needed to control the pathogen. In the era of pesticide restriction, these parameters used in this study could be counted as important criteria and proposed to test the efficacy of methods alternatively suggested.

KEY WORDS: Temperature, *penicillium expansum*, protein, protease enzyme, laccase enzyme

TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında değerli zamanını ayırıp ilgisini esirgemeyen danışman hocam saygıdeğer Doç. Dr. Murat DİKİLİTAŞ'a çok teşekkür ederim. Tez yapım süresi boyunca yardımlarını gördüğüm Arş. Gör. Dr. Sema KARAKAŞ DİKİLİTAŞ, yüksek lisans öğrencisi Mine KURT, arkadaşım Fatma AYDIN MİSKAR'a ve her zaman maddi ve manevi olarak yanımda olup bana destek veren aileme teşekkürü borç bilirim. Ayrıca tezimi maddi olarak destekleyen HÜBAK'a teşekkür ederim.



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Fungus hücresinin yapısı.....	2
Şekil 1.2. Fungusların üreme döngüsü	3
Şekil 1.3. Elma meyvesinde <i>Penicillium</i> spp. (mavi-yeşil küf) enfeksiyonu	5
Şekil 1.4. <i>Penicillium</i> 'un elektron mikroskopundaki ve besi yerindeki görünüşü	6
Şekil 1.5. Peptid bağlarının proteazlar tarafından katalizi (proteoliz)	8
Şekil 3.1. PDB ortamının hazırlanması	31
Şekil 3.2. <i>Penicillium expansum</i> fungusundan alınan fungal disklerin kaplara konulma aşaması ...	32
Şekil 3.3. <i>P. expansum</i> fungusunun yaş ve kuru ağırlığının hassas terazide belirlenmesi	33
Şekil 3.4. <i>P.expansum</i> fungusunun PDB ortamında pH metre ile ölçümü.....	33
Şekil 3.5. <i>P. expansum</i> fungusunun EC değerinin belirlenmesi.....	34
Şekil 3.6. Protein, proteaz ve lakkaz enzimlerinin ölçümü sırasındaki aşamalar	37
Şekil 4.1. <i>P. expansum</i> fungusunun miselyal ağırlıkları	38
Şekil 4.2. <i>Penicillium</i> 'un farklı sıcaklık koşullarında EC ve pH değerleri.....	40
Şekil 4.3. <i>P. expansum</i> fungusunun spor ve pigment sayısı	42
Şekil 4.4. Farklı sıcaklıklara maruz kalan <i>P. expansum</i> fungusunun protein değerleri.....	43
Şekil 4.5. Farklı sıcaklıklara maruz kalan <i>P. expansum</i> fungusunun proteaz değerleri	45
Şekil 4.6. Farklı sıcaklıklara maruz kalan <i>P. expansum</i> fungusunun lakkaz değerleri.....	46

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 1.1. <i>Penicillium expansum</i> fungusunun sınıflandırılması.....	4
Çizelge 3.1. Patates Dekstroz Agar (PDA)	30
Çizelge 4.1. Farklı sıcaklıklara maruz kalan <i>P. expansum</i> fungusunun canlılık testi sonuçları	47

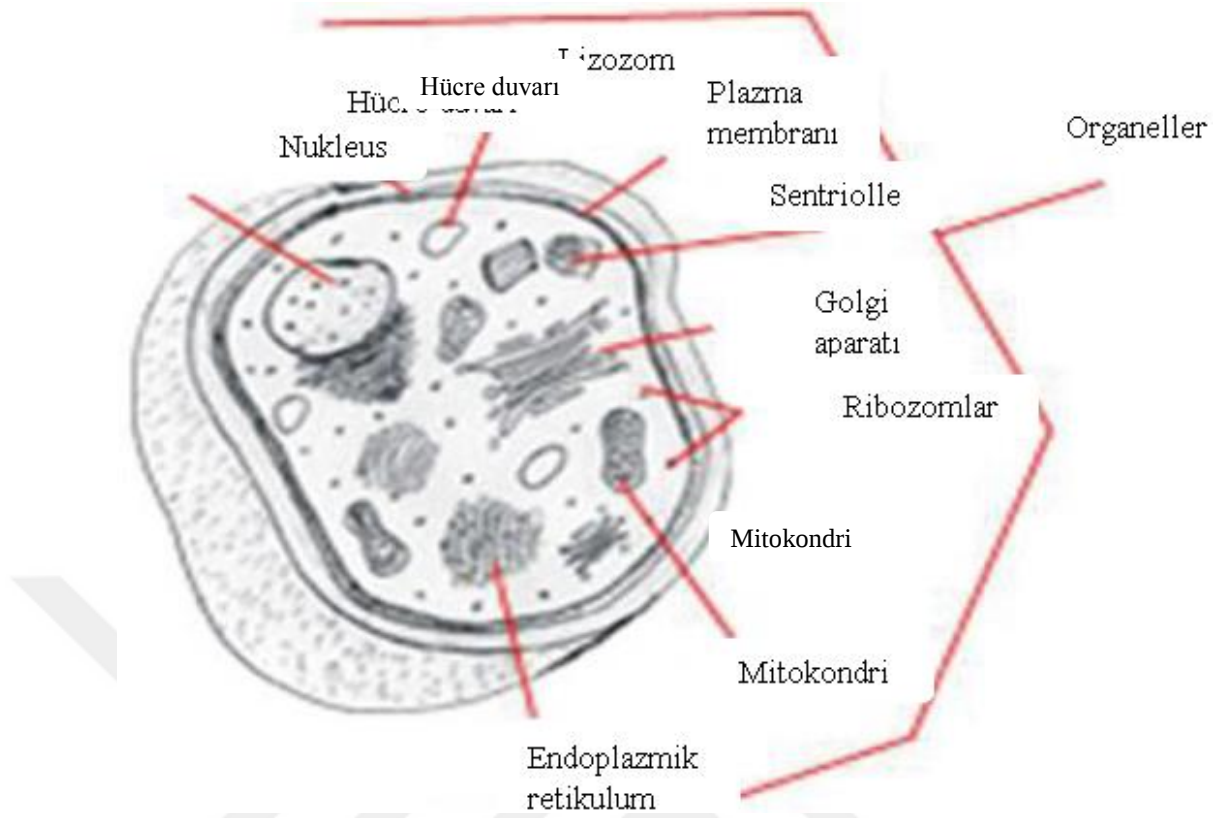


SİMGELER ve KISALTMALAR

sp.	Tür
spp.	Türler
⁰ C	Santigrat Derece
EC	Elektriksel İletkenlik
pH	Power of Hydrogen
PDA	Patates Dekstroz Agar
PDB	Patates Dekstroz Broth
µm	Mikrometre
µl	Mikrolitre
mM	Milimolar
ml	Mililitre
nm	Nanometre
NaOH	Sodyum Hidroksit
TCA	Trichloro Acetic Acid
TTC	2,3,5- Triphenyl tetrazolium chloride
BSA	Bovine Serum Albumin
ABTS	2, 2'-Azino-Bis-3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic asit

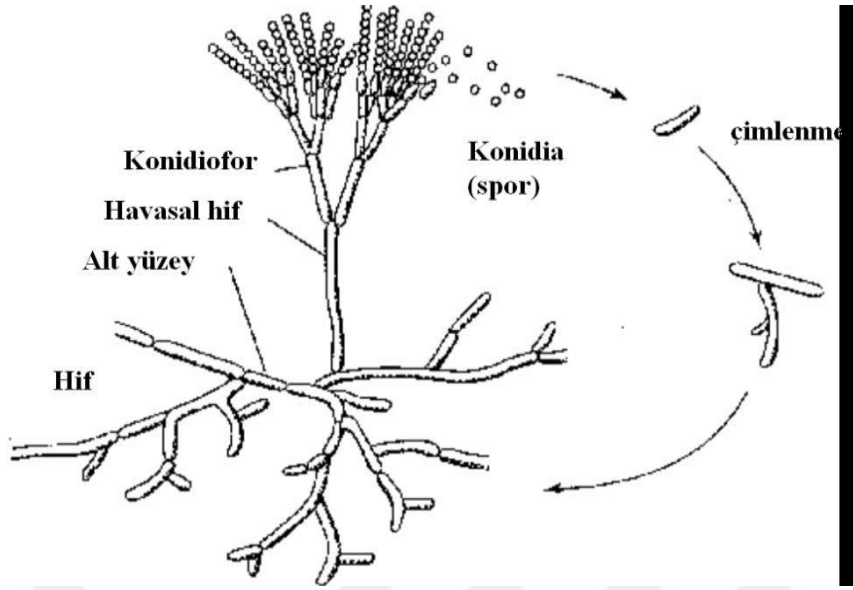
1.GİRİŞ

Hasat sonrası meyve ve sebzelerde ciddi kalite ve kantite kayıplarına neden olan *Penicillium expansum* ürettiği olduğu enzimler ile de yıkıcı etkisini arttırmaktadır. Fungal etmenler, saprofit ve patojen olarak gruplandırılabilirler. Şartlar değiştiğinde saprofit olarak kaydedilen fungal etmenler patojen karakterine dönüşmekte olup son yıllarda fakültatif patojenler gibi saprofit patojenler yeni gruplandırmalar adı ile anılmaktadır. Fungal etmenler, ökaryotik mikroorganizmalardan olup gelişmiş formları bitki hücresi ile kıyaslandığında, hücre duvarı ve klorofil hariç, bitki hücresine benzerlikler göstermektedirler. Dolayısı ile onların da çevre koşullarından etkilenmeleri mümkün olup bu istekleri dış koşullara göre değişiklik göstererek hayat çemberini devam ettirmektedirler. Fungal etmenlerin hormon veya enzim gibi metabolitleri üretmeleri sanayi, açısından önemli bulunabilir. Örneğin kâğıtsanayinde selülozun parçalanmasında fungal etmenlerin çıkardığı selülaz enziminin rolü oldukça büyüktür. Çevresel isteklere göre farklı seviyelerde salgılanan enzim, toksin ve hormonlar, saprofit veya patojenlerin virulens durumunu ortaya koyarken mücadelesi hakkında da bilgi verebilirler. Çünkü zor ya da aşırı stresli koşullarda metabolit sentezleme kapasitesine sahip fungal veya bakteriyel etmenler, kontrolü zor etmenlerdir. Funguslar, genel itibari ile dayanıklı hücre duvarına sahip, iplikli yapıda bölmeli veya bölmesiz yapıdadırlar. Fungusların habitatları çok farklılık göstermektedir. Bazıları kaynak suları ve deniz gibi su ortamlarında bulunurken çoğunluğu ise karasal habitatlarda, ölü bitki materyalleri üzerinde ve toprakta bulunmaktadır. Fungusların büyük bir kısmı karasal bitkiler için parazit olup özellikle tahıl ürünlerinde önemli hastalıklara sebep olarak büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bazıları ise insanlar ve hayvanlar için parazitiktirler (Madigan ve ark., 1997; Mutlu ve ark., 1999; Lin ve Li, 2000). Bir fungal hücrenin genel yapısı Şekil 1.1’de izah edilmiştir.



Şekil 1.1. Fungus hücresinin yapısı (Madigan ve ark., 1997)

Funguslar, heterotrof canlılardır, yani kendi besinlerini sentezleyemezler. Aerobik gelişim gösterdiklerinden dolayı enerjiyi organik maddelerin oksidasyonundan temin ederler. Funguslarda vejetatif yapıtallusadını alır. Tallus, yaklaşık 5 mm çapındaki iplikçiklerin dallanarak çoğalmasından oluşur ve tüm alana yayılır. Hif adı verilen iplikçikler aslında enfeksiyon başlatan yapılardır. Bu yapıların ucunda bazen bir kese bazen de kılıf içinde fungal konidileri taşıyan yapılar mevcuttur. Bunlar hem inokulasyonu başlatırlar hem de üreme için tohum görevi görürler. Funguslar eşeyli ve eşeysiz olmak üzere iki şekilde ürerler ve üreme biçimlerine göre sınıflandırılırlar. Sporlar aracılığı ile çoğalan funguslar aynı anda hem eşeyli hem eşeysiz konidiyumlar oluşturabilirler (Mutlu ve ark., 1999; Troutt ve Levetin, 2001). Bu yapı ile ilgili şekil, Şekil 1.2’de izah edilmiştir.



Şekil 1.2. Fungusların üreme döngüsü (Madigan ve ark., 1997)

Fungusların üremesini etkileyen birçok faktör vardır. Bunların başlıcaları pH, kuraklık, sıcaklık, ağır metal, düşük oksijen, hava kirliliği gibi etkenler en başta gelenleridir. Funguslar geniş sıcaklık ve pH aralarına sahip olup, hatta bitkilerin vegetatif gelişimini tamamlamakta zorlandığı kuraklık koşullarında sporulasyon yapabilirler (Asan ve ark., 2002). Saprofit funguslar için bu sınırlar çok daha geniş bir aralığa sahip olabilir. Dolayısı ile funguslar için çevresel koşulları değiştirerek yani zehirli kimyasallar kullanmadan kontrol almak oldukça yorucu bir süreci gerektirmektedir. Pestisit gibi zehirli kimyasal kullanımının sınırlandırıldığı bir dönemde ise konukçu dokuyu güçlendirmekten başka çarenin kalmadığı görülmektedir. Bunun için ya bitkinin genetik kodunu patojen için uygun olmayan hale getirmek ya da dışarıdan konukçu dokuyu uyaracak ve savunma mekanizmasını hızlandıracak kimyasal kullanmak zorunlu hale gelecektir. Bütün bu çalışmalar farklı patojen ya da bitki grupları ile yapılırken, çok az çalışma patojenin potansiyel virulens sınırlarını konu almıştır. Eğer potansiyel sınırlar her bir patojen için belirlenirse kullanılacak olan uyarıcı kimyasalların etkinliği ve konukçu dokunun daha ilk aşamada bu tehdidi karşılayıp karşılayamayacağı belirlenmiş olacaktır. Örneğin, *Penicillium expansum*, *P. italicum*, *P. digitatum* ve *Alternaria alternata* gibi bazı fungus türleri domates, elma, turunçgil vb. ürünler üzerinde olumsuz etkilere yol açmaktadır. Özellikle *Penicillium* türü fungal etmenler, elma, turunçgil ve domates bitkileri üzerinde önemli ciddi kayıplara neden olmaktadır (Boubaker ve

ark., 2009; Houbraken ve Samson, 2011). Çok geniş konukçu kitlesine sahip olan *P. expansum* depolanmış ürünlerde yüksek oranlarda kayıplara sebep olan önemli bir küf hastalığı etmenidir. Birçok saprofit *Penicillium* türü ya yaralanmış dokulardan ya da tam olgunluğa erişmiş ve dış kabuğu incelmış meyve dokularından penetrasyon yaparak depolanmış ürünler üzerinde çürüklüğe neden olabilmektedirler(Miedes ve Lorences, 2006; Sugar ve Basile, 2008). *Penicillium* türlerine ait son sınıflandırma şekli, Çizelge 1.1.'de sunulmuştur.

Çizelge 1.1.*Penicillium expansum* fungusunun sınıflandırılması (Dhakar ve ark., 2014)

Alem	Funguslar
Şube	Ascomycota
Dizi	Eurotiales
Sınıf	Eurotiomycetes
Aile	Trichocomaeate
Cins	Penicillium
Alt cins	Penicillium
Grup	expansa
Tür	expansum

İki yüzden fazla *Penicillium* türü belirlenmiştir ve bu tür altında 1000'e yakın isim verilmiştir. Pitt ve ark. (2000) tarafından 225 tür tescil edilmiştir. *Penicillium* spp.'nden *P.expansum* elma, armut ve domates gibi meyvelerde yaygın olarak görülen ve çürümelere neden olan fungal bir hastalık etmenidir (Karadaşlı, 2015). Hastalık etmeni elma ve armutlarda hasat sonrası ortaya çıkmakta ve yumuşak ya da ıslak çürüklük olarak da adlandırılmaktadır. Bu fungal etmen ısıya dayanıklı toksinler(patulin) üretir ve bu nedenle hastalanan meyveler, meyve işleme yöntemlerinde kullanılmazlar (Houbraken ve ark., 2011). Fungal etmen her türlü meyvenin, yumrunun ve köklerin kesik ya da yaralanmış yüzeylerinden giriş yapabilir. Ayrıca sarımsak, havuç, şeker pancarı, yenilebilir mantar, kabak ve diğer birçok tohumlu bitkide de hastalık ortaya çıkmaktadır. Zayıflık paraziti olarak bilinse de olgunlaşmış meyvelerin dış kabuğu incelendiğinde patojenin enzim ve penetrasyonu

ile enfeksiyon başlamış olur. Dolayısı ile saprofit patojen olarak da adlandırılan bu fungal etmen oldukça yıkıcı etkilere sahiptir. Penetrasyon bölgelerinde fungal etmen çok fazla spor üretmekte ve bu sporlar hava akımları ile etrafa yayılabilmektedir. Dolayısı ile sadece konukçu dokunun kendisini değil etrafındaki ortamın da hastalık etmeni için elverişli olmaması gerekmektedir. Özellikle nemli koşullarda *Penicillium* sporları hızlı çimlendiğinden ortamdaki nem ve sıcaklık hastalık etmeni için ideal bir ortam oluşturur (Srivastava ve Dwivedi, 2000). *Penicillium* etmenleri 0-32°C arasındaki sıcaklıklarda gelişebilirler, fakat en ideal gelişme sıcaklığı 20°C'dir, gelişmesi ise -6°C de durur. Fungal konidiler diğer meyveler için inokulum kaynağı olarak kullanılmaktadır (Karaçalı, 2006). *P. expansum*'un gelişen misel ve sporları elma meyvesi üzerinde gösterilmiştir (Şekli 1.3).



Şekil 1.3. Elma meyvesinde *Penicillium* spp. (mavi-yeşil küf) enfeksiyonu (Karaçalı, 2006)

Genel itibari ile misel örtüsü mavi küfte dar, yeşil küfte geniş bir halka oluşturur. Kuru havalarda sporlar toz halinde uçuşur ve bir küf kokusu yayılır (Özgönen, 2009). Etmenin konidi ve konidioforlarının yapısı genellikle el şeklinde çubuk şekilli konidioforların ucunda konidilerin bulunduğu bir yapı şeklindedir (Şekil 1.4.).



Şekil 1.4. *Penicillium*'un elektron mikroskobundaki ve besi yerindeki görünüşü (Özgönen, 2009)

Hasat sonrası hastalıklarından dolayı meydana gelen ürün kayıpları %15-25 civarındadır. Özellikle depolama koşullarının yetersiz olduğu ve ilkel depolama şartlarında ürünler depolandığında ve aynı zamanda hasat esnasında ve nakliye sırasında sebzelerin, meyvelerin zedelenmesi ve bu şekilde depolanması durumunda depo çürüklüğüne neden olan etmenlerden dolayı ürün kayıplarının daha da artmaktadır (Karaca, 1965; Miedes ve Lorences, 2006).

Hasattan sonrası ürünlerde meydana gelen hastalıkların nedenlerini iki grup altında toplayabiliriz. Birincisi; ürünün bulunduğu ortamın nemi ve sıcaklığı, besin elementlerinin eksikliği veya fazlalığı, fiziksel ve kimyasal yaralanmalar gibi hasattan sonra ürünlerin bozulmasına neden olan abiyotik faktörler, diğeri ise biyotik etmenlerdir ve bunların en önemli kısmını funguslar oluşturmaktadır (Temur, 2012). Saprofit funguslar meyve sebzelerin olgunlaşma döneminde hem kitin tabakasını hem de epidermisi penetre ederek veya lentisel ve stoma gibi doğal açıklardan veya çeşitli yaralardan girerek enfeksiyona neden olurlar ve önemli ürün kayıplarına neden olurlar (Benli, 2003).

Hastalık etmenleriyle mücadele etmek için çeşitli mücadele yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin başında kimyasal mücadele gelmektedir. Fungusitler hasat sonrası patojenlerin neden olduğu kayıpları engellemek için kullanılan sentetik koruyuculardır (Singh ve Sharma, 2007). Her yıl dünyada yaklaşık olarak 23 bin ton

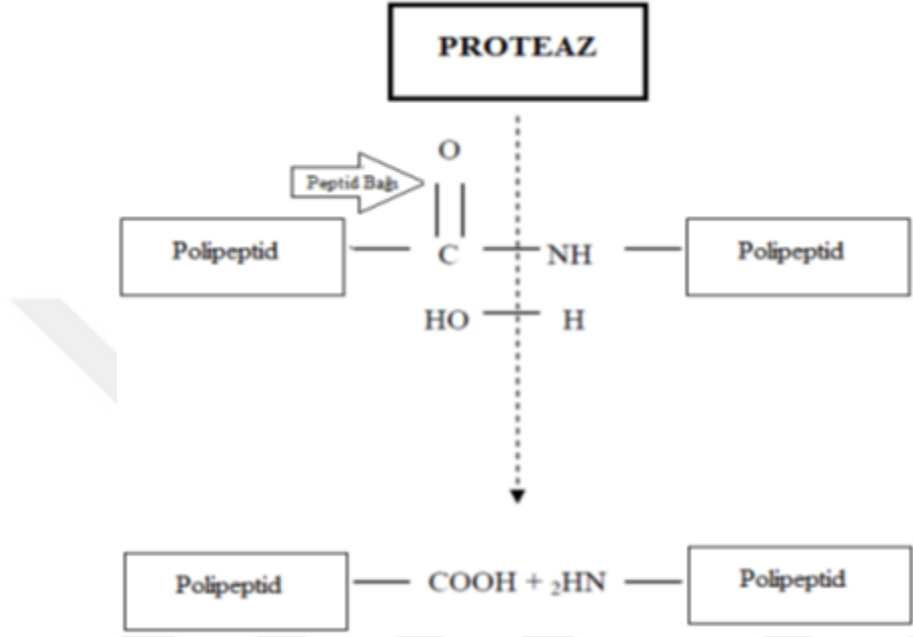
fungusit, sebze ve meyveler üzerine uygulanmaktadır. Ancak sebze ve meyvelerin yüksek oranda sentetik kimyasallarla muamele edilmeleri sonucunda karsinogenik, tetrajenik ya da akut toksijenik etkiler meydana getirmektedir. Ayrıca bu kimyasallardan bazıları uzun süreli kalıntı bıraktığından hem çevre kirliliğine yol açmakta hem de gıdalar üzerindeki etkileri tüketici sağlığını olumsuz etkilemektedir (Unnikrishnan ve Nath, 2002; Zeebroeck ve ark., 2007). Fungusitlerle ilgili diğer bir problem ise bu kimyasalların etkinliklerinin zenginleştirilmesiyle yan etkilerinin de her geçen gün artmasıdır (Sorour ve Larink, 2001; Janisiewicz ve Korsten, 2002). Ayrıca hasat sonrası ürünlerde zarar yapan patojenler fungusitlere karşı direnç gösterdiğinden daha toksik funguslar ile mücadele yoluna gidilmeye çalışılmaktadır. Ancak, bunun da olumsuz etkileri çok ciddi boyutlara ulaşmıştır (Dianz ve ark., 2002; Xiao ve ark., 2011).

Kimyasal mücadelenin bu dezavantajlarından dolayı farklı mücadele yöntemlerine başvurulmaktadır. Son yıllarda sentetik kimyasallara alternatif olarak doğal koruyucu maddelerin kullanımı daha yaygın hale gelmiştir. Bunlar arasında bitkisel uçucu yağlar insan sağlığı ve doğa açısından tehlikeye neden olmadıklarından dolayı kullanımı son yıllarda artış göstermiştir (Szczerbanik ve ark., 2007; Yılmaz, 2012).

Son yıllarda fitopatoloji bilim dalının önemli bir araştırma odağı, patojen saldırısına maruz kalan bitkide hücreler arasındaki sinyal iletimi ve bu olaya karşı hücre içinde moleküler ve biyokimyasal düzeydeki cevap oluşumudur. Bitkilerde patojene karşı oluşan dayanıklılık, jasmonik (JA), salisilik asit (SA) ve etilen olmak üzere üç çeşit sinyal molekülü tarafından sağlanmakta (Schenk ve ark., 2000; Dong, 2001; Cheong ve ark., 2002), ancak patojen saldırısının devam etmesi veya çevresel olarak bitki direncinin zayıflaması, sentezlenen bu kimyasal maddelerin etkinliğini azaltmaktadır.

Funguslar tarafından üretilen enzim, vitamin, alkol, pigment, polisakkarit, lipid gibi maddeler endüstride kullanılmasına rağmen bu maddeler aynı zamanda konukçu dokunun da yapısını bozabilirler. Özellikle, funguslar tarafından üretilen proteaz ve

lakkaz enzimleri konukçu dokunun proteinlerini birbirine bağlayan peptid bağlarını hidrolize ederek onları daha küçük moleküller haline getirerek absorbe edebilir (Salleh, 2006; Moore ve ark., 2001). Proteoliz olarak adlandırılan peptid bağlarının proteazlar tarafından hidrolizi şekil 1.5.'de ifade edilmiştir. Protein, serbest aminoasitler ve peptid fragmentleri proteolizin ürünleridir (Gençkal, 2004).



Şekil 1.5. Peptid bağlarının proteazlar tarafından katalizi (proteoliz) (Gençkal, 2004)

Proteazlar; mantar, prokaryot, bitki ve hayvanları içeren dünyadaki tüm yaşam formlarının gerekli bileşikleridir. Yaşayan tüm organizmalarda bulunan proteolitik enzimler, hücre gelişimi ve farklılaşması için oldukça önemli bir yere sahiptirler (Gupta ve ark., 2002; Gençkal, 2004). Farklı fizikokimyasal ve katalitik özelliklere sahip olan proteazlar enzimlerin oldukça kompleks grubunu oluştururlar. Proteazlar enzim sınıfları içerisinde hem fizyolojik hem de ticari alanda büyük bir uygulama alanına sahiptirler (Mukherjee ve ark., 2008). Proteazlar, doğada çok miktarda bulunan bir enzim türüdür (Polgar, 1989; Rao ve ark., 1998). Hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalarda proteaz enzimleri mevcuttur. Ayrıca mikroorganizmalar, geniş biyokimyasal çeşitliliğinden ve genetik işlemeye yatkınlıklarından dolayı proteazların kaynağı olarak tercih edilirler.

Bakteri, fungus, maya ve aktinomisetler gibi çeşitli mikroorganizmaların proteaz ürettiği bilinmektedir (Manjeet ve ark., 1998; Mitra ve ark., 1996). Funguslar, ürettikleri enzimlerin genellikle ekstrasellüler(hücre dışı) olması ve böylece fermantasyon ortamından daha kolay bir şekilde geri kazanılması göz önünde bulundurulduğunda enzim üretiminde pek çok avantaja sahiptirler (Bidochka ve Khachatourians, 1988).

Proteolitik enzimler hem ekstrasellüler hem de intrasellüler olarak sentezlenirler (Kumar ve ark., 2005). Proteazlar; gıda endüstrisinde, fırınlama, bira yapımı, deri uygulamaları, etlerin yumuşatılması, kumaş ağartma, çamaşır deterjanları, organik sentezlerde, ipek kalitesinin yükseltilmesinde, kozmetik ürünlerde, atık arıtımında, peptid sentezleri ve tıbbi teşhisler olmak üzere endüstriyel uygulamaların geniş bir kısmında önemli rol oynamaktadırlar (Gupta ve ark., 2002; Najafi ve Deobagkar, 2005). Proteazların ticari önemi bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kaynaklardan üretilebilmesidir (Ward, 1991). Proteazları en önemli endüstriyel enzim grubu yapan ve biyoteknolojiyi ilgilendiren bazı özelliklere sahiptirler (Barindra ve ark., 2006). Neredeyse bütün proteazlar ısıya dayanıklıdır (Mehler, 1957). Proteazlar aktivite gösterdikleri pH aralığına göre ise 3 gruba ayrılmıştır. Asidik proteazlar, nötral proteazlar ve alkali proteazlar olarak sınıflandırılmışlardır (Nduvimana ve ark., 1995). Proteazlar bütün yaşayan organizmalar için fizyolojik olarak gerekli olduğundan bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi çok çeşitli kaynaklarda bulunurlar (Rao ve ark., 1998; Sevinç, 2010).

Proteaz biyosentezinin; *Aspergillus* (Fan-Ching ve ark., 1998), *Penicillium* (Farley ve ark., 1992; Pandey ve ark., 2006) ve *Rhizopus* (Rao ve ark., 1998) gibi funguslar tarafından sentezlendiği belirtilmektedir. Proteazlar, bakteriler, virüsler, protozoonlar, mayalar ve funguslar gibi farklı mikroorganizmalarda bulunurlar (Gupta ve ark., 2002; Joo ve Chang, 2005). Bitkisel ve hayvansal proteazlar dünya genelindeki ihtiyaçları karşılamada yetersiz olduğu için mikrobiyal proteazlara olan ilgi artmıştır. Toplam enzim ticaretinin yaklaşık olarak % 40'ından mikrobiyal proteazlar sorumludur (Godfrey, 1996; Gupta ve ark., 2002). Ancak, proteaz

enzimlerinin patojenisitede oynadığı rol bitki koruma açısından da çok önemlidir. Yıkıcı özelliğe sahip bu enzim grupları patojenin penetrasyonunda önemli görevler alırken konukçu dokunun proteinlerini etkisiz hale getirdiğinden savunma mekanizmasını da bozmaktadır.

Lakkaz enzimi de proteaz gibi proteinlerin parçalanmasında görev almakta ve fungal etmenlerin patojenisitesi hakkında önemli bilgiler sunmaktadır. İlk olarak 1883 yılında Yoshida tarafından Japon vernik ağacı *Rhusvernificera*'nın özsuyundan elde edilmiş (Yaropolov ve ark., 1994; Mayer ve Staples, 2002) ve 1985 yılında da Bertrand tarafından metal içeren bir oksidaz olarak karakterize edilmiştir (Mayer ve Staples, 2002). Lakkazlar (benzendiol: oksijen oksidoredüktaz, EC 1.10.3.2) *Azospirillum lipoferum*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces lavendulae*, *Streptomyces cyaneus* gibi bazı bakteri türleri (Revankar ve Lele, 2006; Riva, 2006), yüksek yapılı bitkiler, bazı böcekler ve funguslar tarafından üretilen çok bakırlı mavi oksidazlardır (Mechichi ve ark., 2006; Claus, 2004). Lakkaz enzimi böceklerde kütikulanın sertleştirilmesinde ve *Bacillus* türlerinde ultraviyole ışınlarına karşı dirençli sporların yapısına katılmaktadır. Bitkilerde yaralanmalara karşı koruyucu özellik göstermektedir. Ayrıca hücre duvarı oluşumu ve peroksidazlarla birlikte lignin oluşumunda görev almaktadır (Riva, 2006). En çok çalışılan kaynaklar fungal kaynaklıdır (Mechichi ve ark., 2006; Zhang ve ark., 2006; Minussi ve ark., 2007). Fungal kaynaklı lakkazlar bazı Ascomycetes, Deuteromycetes ve özellikle Basidiomycetes üyelerinde tanımlanmıştır (Revankar ve Lele, 2006; Mayer ve Staples, 2002). Fungal lakkazlar özellikle lignin yıkımından sorumludur, ayrıca pigmentasyon, morfogenez ve sporulasyon gibi fonksiyonlara sahiptir (Zhang ve ark., 2006; Minussi ve ark., 2007). Buna ek olarak bu enzimler fungal patojeni konukçu tarafından sentezlenen antifungal bileşikler olan toksik fitoaleksinlerden ve tanenlerden koruyarak bitkinin savunma sistemini etkisiz hale getirir ve birçok hastalıkta önemli bir virulans faktörü olarak görev alırlar (Mayer ve Staples, 2002; Riva, 2006; Zhang ve ark., 2006).

Örneğin kök patojeni olan *Heterobasidion annosum*'un saldırganlığı lakkazın varlığına bağlıdır. Pekçok fungal türde hem yapısal hem de sonradan kazandırılan lakkaz enzim varlığı saptanmış, bu enzimlerin genellikle sitoplâzmadan hücre dışına salgılandığı ifade edilmektedir (Mayer ve Staples, 2002).

Lakkaz enzimleri 60 ve 80 kDa arasında moleküler ağırlığa sahip olan monomerik, dimerik ve tetramerik enzimlerdir. Lakkaz enzimlerinin moleküler ağırlıkları elde edildiği kaynağa göre yüksek oranda değişiklik gösterir. Örneğin, *Rhizoctonia solani* ve *Fusarium proliferatum* 'da 4, *Botrytis cinerea* 'da ise en az 3 farklı lakkaz enzimi saptanmıştır (Yaropolov ve ark., 1994; Mayer ve Staples, 2002).

Lakkaz enzimleri, oksidatif enzimlerin bir grubu olup, son yıllarda büyük oranda parçalanmayan çevresel kirliliklerin yanı sıra hem fenolik hem de fenolik olmayan lignin esaslı bileşenleri yükseltgeyebilme yetenekleri nedeniyle oldukça ilgi çekmektedir. Bu avantajları sayesinde pek çok biyoteknolojik alanda kullanılmaktadır. Bu uygulamaların başlıcaları kağıt, tekstil, selüloz ve petrokimya sanayilerinin neden olduğu atıkların detoksifikasyonu, nanobiyoteknoloji, medikal teşhisler ve topraktaki herbisit, pestisit ve bazı maddelerin temizlenmesidir (Arık ve ark., 2008; Gavrilescu ve ark., 2005; Balan ve ark., 2001).

Kâğıt hamurundan lignin gideriminde lakkazlar lignin içerisinde reaktif radikaller oluşturarak odun lifinde değişiklikler oluşturmak amacıyla kullanılmaktadır (Couto ve Herrera, 2006). Lakkaz enziminin kâğıt yapımında kullanılması sayesinde %30 enerji tasarrufu sağlanarak üretimde kimyasal kullanımı %50 oranında azalmaktadır ve yırtılmaya karşı daha dayanıklı kâğıtlar elde edilmektedir (Seidl, 2006). Lakkaz enzimi herbisitleri de yapısal değişikliğe uğratarak inaktif analoglarına dönüştürebilmektedir. Reaksiyon ortamına substrat (mediatör) olarak ABTS eklenmesiyle biyolojik yıkım daha fazla gerçekleşebilmektedir (Birhanlı, 2003).

Lakkazlar besin veya içeceklerin rengini değiştirmek için de kullanılır. Örneğin, bulanıklıktan sorumlu istenmeyen fenoliklerin ortadan kaldırılmasında lakkaz enzimi kullanılabilir (Couto ve Herrera, 2006). Bu yapısı dikkate alındığında bu enzimi sentezleyen fungal etmenin konukçu dokusunda fenol bileşiklerini engelleyerek savunma sistemini olumsuz etkilediği kanaatine varabiliriz.

Penicillium expansum fungusunun geniş konukçu kitlesinin olması, kısa sürede çok hızlı ve etkili bir şekilde konidiai ve misel olarak çoğalması patojenin kontrolünü zorlaştırmaktadır. Çok çeşitli kontrol mekanizmaları ne sürülerek patojenin kontrol edilmesi amaçlanmıştır. Ancak patojenin farklı sıcaklık değerlerinde geliştiği bilinmesine rağmen bu sıcaklıklarda patojenisite durumu yalnızca *in situ* testlerde ölçülmüş, patojene ait farklı sıcaklıklarda virulensliği sağlayan enzim ve metabolit ölçümleri yapılmamıştır. Bu alışma ile farklı sıcaklıklarda gelişimi planlanan patojenin virulenslik durumu da ölçülecek metabolitler ile tespit edilmiş olacaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Penicillium expansum, *P. italicum*, *P. digitatum* ve *Alternaria alternata* gibi bazı fungus türleri domates, elma, turunçgil vb. ürünler üzerinde olumsuz etkilere yol açmaktadır. Özellikle, *Penicillium* türü fungal etmenler, elma, turunçgil ve domates bitkileri üzerinde önemli derecede kayıplara neden olmaktadır (Houbraken ve Samson, 2011). Snowdon (1991), *Penicillium* türlerinin oluşturduğu hastalıkların, ürünün depolanması sırasında düşük depolama sıcaklığına maruz kalarak bundan zarar görmesi veya herhangi bir mekaniksel hasar sonucunda ortaya çıktığını rapor etmiştir. Rosenberger (1997), elma ve armutların hasattan sonra 6-10 aylık depolama süresi içerisinde hasat sonrası patojenlerin saldırısına maruz kaldıklarını, modern depolama imkânlarına rağmen 1960'lı yıllarda ve 1970'li yılların başında hasat sonrası hastalıklardan dolayı kayıpların %15-25 olduğunu bildirmiştir. Bu kayıpların pek çoğundan *Penicillium*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Nectria*, *Monillia* ve *Gloeosporium* funguslarının sorumlu olduğunu bildirmiştir. Bu durum maalesef bu gün de değişmiş değildir. Özellikle, pestisite dayanıklılık gösteren fungal ırkların ortaya çıkması hasat sonrası meyvelerin güvenle depolanmasındaki en önemli engeldir. Çünkü fungal etmenlerin düşük veya yüksek sıcaklıklarda enfeksiyon kapasitesine sahip olması ve uç noktalardaki sıcaklık ve çevre koşullarında enfeksiyon yapabilecek enzimleri sentezleyebilmesi bu fungal etmenlerin kontrolünü oldukça zorlaştırmaktadır.

Jones ve Aldwinckle (1990), yumuşak çekirdekli meyvelerde “Maviküf” belirtisi gösteren meyvelerden yapılan izolasyonlarda en sık görülen patojenlerin; *P. expansum*, *P. commune* Thom ve *P. solitum* Westling olduğunu belirlemişlerdir. Bu türler içinde en yaygın olanı ve en geniş yara çapına sahip olanı ise *P. expansum* olarak kaydedilmiştir. Bu patojen enfeksiyon için çoğunlukla yaraya ihtiyaç duymaktadır. Fakat etmen meyve üzerinde sağlıklı dokudaki lentiseller aracılığıyla da enfeksiyonu gerçekleştirebilmektedir.

Kim ve Xiao (2008), Amerika’da Red Delicious, Fuji ve Golden Delicious çeşitlerinde hasat sonrası elma hastalıkları üzerine yaptıkları çalışmada çürümelerin %31.7’sinin *P.expansum*, %28.1’inin *B.cinerea* ve %16.9’unun ise *Sphaeropsis* çürüklüğü olduğunu tespit etmişlerdir. Janisiewicz (1998), bu patojenlerden *P.expansum* ve *B. cinerea*’nın düşük sıcaklıklarda gelişebilme özelliklerinden dolayı en fazla zarar yapan türler olduğunu bildirmiştir. *P. expansum* elmalarda meydana getirdiği kayıpların yanı sıra patulin adı verilen kanserojen olduğu bilinen bir mikotoksin üretmektedir. Çürümüş elmalar meyve suyu üretiminde kullanıldığında bu mikotoksinin insan hayatını tehdit ettiği saptanmıştır.

Rosenberger (1997), kontrollü atmosfer koşullarına sahip depolar ve hasat sonrası kullanılan fungusitler geliştirilmeden önce hasat sonrası toplam kaybın %90’ından mavi küf etmeninin sorumlu olduğunu ve modern depolarda mavi küfün çıkışı %1’in altına inmesine rağmen hala yumuşak çekirdekli meyvelerde hasat sonrası çürüklüklere yaygın olarak rastlandığını bildirmiştir.

Tiryaki (1990), armutlarda önemli çürüklük etmenleri olan *P. expansum*, *Alternaria tenuissima*, *B. cinerea* ve *Rhizopus stolonifer*’e karşı gamma radyasyonunun 4 farklı dozunun etkisi PDA ortamı üzerinde incelemiştir. Bu araştırmaya göre patojenlerin 3-4°C’ de gamma ışınlarına duyarlılık derecelerine göre bakıldığında; en dayanıklı *B. cinerea* olmuş, bunu *A. tenuissima* ve *P. expansum* izlemiş, *Rhizopus stolonifer* ise en duyarlı patojen olarak bulunmuştur

Tiryaki ve ark. (1994), elma, nektarin, soğan ve şeftalide hasat sonu çürüklük etmeni olan funguslardan sırasıyla *P. expansum*, *Monilia fructigena*, *Botrytis aclada* ve *R. stolonifer* üzerinde gamma radyasyonunun etkisini incelediği çalışmada; 1, 2, 3 ve 3.5 kGy’lik dozların çürümeyi tamamen engellemediğini fakat belirli bir süre geciktirdiğini rapor etmişlerdir. Janisiewicz ve Bors (1995), yaptıkları çalışmalarında hasat sonrası hastalıklarla biyolojik mücadelede bakteri ve mayaların birlikte uygulamalarının daha etkili olabileceğini düşünmüşlerdir. Elmalar üzerinde yaptıkları çalışmalarında *Pseudomonas syringae* ve *Sporobolomyces roseus* birlikte kullanarak *P. expansum*’ un zararının %100 engellediğini rapor etmişlerdir.

Conway ve ark. (2004), sıcaklık uygulamasının elmalarda meyve yüzeylerindeki *P.expansum*'un yok edilmesinde etkili olduğunu fakat herhangi bir kalıcı etki sergilemediğini bildirmişlerdir.

Daferera ve ark. (2000), kekik, Girit kekiği ve güvey otu uçucu yağlarının hasat sonrasında önemli kayıplara neden olan *P. digitatum* Sacc.'un konidi çimlenmesi ve koloni gelişiminin etkisi üzerine yaptıkları çalışmada, uçucu yağların 250-400 µg/ml gibi düşük konsantrasyonda *P. digitatum* konidi çimlenmesi ve koloni gelişimini tamamen engellediği saptanmıştır.

Daferera ve ark. (2000), miselyal fungusların salgıladığı proteazların fungusların patojenitesini başlatma süreci üzerindeki etkinliğini araştırmışlardır. Bu araştırmaya göre saprofit funguslarda olmayan fakat fitopatojenik funguslarda söz konusu olan tripsin aktivitesi dikkate alınarak fitopatojenik olan *Fusarium*'un farklı türü olan *F. sporotrichioides* ve *F.heterosporum* üzerinde durmuşlardır. Bu her iki türün patojenitesi ve tripsin benzeri proteaz aktivitesinde açık bir protein korelasyon ortaya çıkmıştır. Patojenitesi yüksek olan *F. sporotrichioides* diğer etmene göre daha yüksek miktarda hücre dışı tripsin aktivitesi göstermiştir. Bu durum tripsin aktivitesinin saprofit ve patojen arasında fungusun patojenitesi açısından bir gösterge olabileceğini bildirip, tripsin benzeri proteazlar fitopatojenlerin patojenite süreci ile direkt ilgili olup fungusların dayanıklılık geni tarafından sentezleniyor olabileceğini bildirmişlerdir.

Ball ve ark. (1991), *Pyrenopeziza brassicae*'nın patojenik ve patojenik olmayan izolatları üzerine yaptıkları çalışmalarında hücre dışı proteaz aktivitesinin patojenisite derecesi üzerinde belirleyici olduğunu belirlemişlerdir. Yine, Maccheroni ve ark. (2004), *Colletotrichum*'un farklı izolatlarını içeren endofitik fitopatojenik ve entomopatojenik fungusların farklı pH değerlerinde proteaz, lipaz, amilaz, pektinaz ve selüloz salgılanması üzerindeki değişimleri incelemişlerdir. Bu araştırma sonucundabütün enzimlerin tüm izolatları bir pH değerine bağımlı bir şekilde enzim aktivitesi sağlandığında, endofit ve fitopatojenlerin alkali ortamda diğer enzimlere göre proteaz deseninde farklılık gözlemlendiğini belirtmişlerdir.

Chellappan ve ark. (2006), *Engyodontium album* BTMFS, deniz tortullarından izole edilmiş ekstrasellüler proteaz üretimini pH:11'de tespit etmişlerdir. Partikül büyüklüğünü 425 µm, başlangıç nem içeriğini ise %60 bulmuşlardır. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık ise 60°C'dir. Enzimin yüksek pH ve sıcaklıkta maksimum aktivite göstermesi deterjan endüstrisinde kullanılabilirliğini göstermektedir.

Shankar ve ark. (2011), hayvan gübresinden izole ettikleri *Beauveria* sp. MTCC 5184 fungal izolattan alkalın proteaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Enzimin pH 9.0 ve 50°C'de aktif olan alkalın proteaz salgıladığını belirtmişlerdir. Enzimin 40°C'ye kadar ve pH 3-11 aralığında stabil olduğunu belirlemişlerdir. Proteaz enziminin Cd^{+2} , Hg^{+2} ve Mn^{+2} iyonları tarafından inhibe edildiğini ve 1 mM PMSF'nin varlığında enzim aktivitesinin tamamen kaybolduğunu rapor etmişlerdir. Enzimin maksimum aktiviteyi kazeinden sonra hemoglobin ve Bovine Serum Albumin (BSA)'da gösterdiğini belirtmişlerdir. Dolayısı ile enzimin her türlü protein yapısını parçalayacak yapıda olduğu anlaşılmaktadır. Örneğin, Klingenberg ve ark. (1995), *Thermococcus stetteri*'den elde edilen alkalın proteaz enziminin çok geniş bir sıcaklık (50-100°C) ve pH aralığında (pH 5-11) sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Bu enzimin 85°C ve pH 8.5-9.0 arasında kazeine karşı optimum aktivite gösterdiğini saptamışlardır.

Kaya (2011), katı faz fermentasyonu (SSF) yöntemiyle *Bacillus licheniformis* ATCC 14580'den proteaz üretimi üzerine çeşitli parametrelerin etkisini incelemiştir. Katı substrat olarak mısır küspesini kullanmıştır. Bu çalışma sonucunda proteaz için en iyi inkübasyon süresinin 24 saat olduğunu, maksimum proteaz aktivitesinin sırasıyla pH 8.0'da ve 37°C'de olduğunu belirlemiştir. Mehrotra ve ark. (1999) ise *Bacillus* sp.'den elde edilen alkalın proteaz enziminin maksimum aktivitenin 20. saatte olduğunu rapor etmişlerdir.

Ahmetoğlu (2011), *B. cereus* KG5'in proteaz enziminin aktivitesinin 24. saatte en yüksek düzeyde olduğunu ve enzimin optimum pH'sının 7.0 ve optimum sıcaklık değerinin ise 40-45°C olduğunu rapor etmişlerdir. Yine, Rifaat ve ark. (2005), *Streotomyces microflavus*'ta, Vijayanand ve ark. (2010), haloalkalifilik *Halobacterium* sp.'de, Zambare ve ark. (2010), *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327'de ve Wu ve ark. (2011), *Lepista nuda*'da proteaz enziminin optimum pH değerinin 7.0 olduğunu belirtmişlerdir.

Korcan ve ark. (2007), Afyonkarahisar ilinin fungus faunasını yansıtan küf cinsi mantarlar üzerinde endüstriyel öneme sahip olan bazı enzim (proteaz, amilaz ve lipaz) aktivitelerinin belirlenmesi sırasında *Penicillium* cinsinde her 3 enziminde aktifliğinin en fazla olduğunu bildirmişlerdir.

Farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılan *Zymoseptoria tritici* fungusunun izolatları sıcaklık değişiminden etkilenmiştir. Yüksek sıcaklıkta (30 ve 35 °C) patojene ait protein miktarı azalmış, proteaz, melanin, prolin ve malonadialdehit (MDA) değerlerinde ise artma gözlemlenmiştir. Bu sonuca bağlı olarak fungus izolatları arasında gelişme farklılıkları olduğu saptanmıştır. Patojenin CU100StA4 nolu izolatının ürettiği proteaz miktarı diğer izolatlardan daha yüksek çıktığı gözlemlenmiştir (Kılınç, 2018).

Ball ve ark. (1991), *Pyrenopeziza brassicae*'nin patojenik ve patojenik olmayan izolatları üzerinde yaptıkları çalışmalarında hücre dışı proteaz aktivitesinin patojenisite derecesi üzerinde belirleyici etkisinin olduğunu saptamışlardır.

Bitkilerde antraknoza neden olan *Colletotrichum*'un türlerine ait izolatlarını içeren fitopatojenik, endofitik ve entomopatojenik izolatlarını farklı pH değerlerinde lipaz, amilaz, pektinaz, selüloz ve proteaz salgılanması üzerindeki değişimler incelenmiştir. Endofit ve fitopatojenlerin sırasıyla asit ve alkali ortamlarda diğer enzimlere göre proteaz deseni daha fazla artış olduğunu saptamışlardır. Funguslarda genetik bir sistemin konukçu-patojen ilişkisinde ortamdaki pH'sı

kontrol edilerek ortam pH derecesine göre optimum proteaz salgılaması yapabildiğini bildirmişlerdir (Maccheroni ve ark., 2004).

Birçok sebze bitkisinde beyaz çürüklüğüne neden olan *Sclerotinia sclerotiorum* kültürlerinde proteaz aktivitesi üzerine çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmada proteaz üretiminde hücre duvarı, glukoz ve pektinin farklı karbon kaynaklarının etkisi araştırılmıştır. *In vivo* koşullarda bu proteazları, enfekte edilmiş *Phaseolus vulgaris* bitkisi üzerinde de denemişlerdir. Bütün karbon kaynaklarında proteaz seviyesinde artış meydana gelmesiyle birlikte en çok pektin ilavesi ile kültürlerdeki proteaz aktivitesinin arttığını saptamışlardır. Ayrıca PCR analizleri ile proteaz aktivitesini başlatma sürecinde genlerin kilit rol oynadığı bildirilmiştir (Bueno ve ark., 2012). Patojen tarafından enfekte edilmiş *P. vulgaris* bitkilerinde asit fosfataz-1 ve aspartil proteazın patojenin konukçu istilası sürecindeki rolünü desteklediği belirtilmiştir (Bueno ve ark., 2012).

Lakkaz enzimi de proteaz gibi geniş substrat özelliğinden dolayı birçok endüstriyel alanda farklı amaçlarla kullanılabilir (Birhanli ve Yesilada, 2006). Zhang ve ark. (2006), yeni bir ekstraselüler lakkaz kaynağı olarak kullanılan *Panusrudis*'in herhangi bir indükleyici kullanmadan önemli oranda lakkaz ürettiğini saptamışlardır. Aynı çalışmada *Panus rudis*'ten elde edilen enzim saflaştırılmış ve kısmen de karakterize edilmiş ve çok küçük miktarda lakkazın sentetik boyaların rengini giderdiğini belirlemişlerdir. Bu enzimin yüksek renk giderim yeteneği, tekstil atık sularının arıtımında kullanılabileceğini göstermektedir.

Minussi ve ark. (2002), *Trametes villosa*'dan elde ettikleri lakkazı dilimlenmiş zeytin-su karışımına ilave ederek karışımda bulunan acı tadın yüksek oranda azaldığını saptamışlardır. *Coriolus versicolor*'dan elde ettikleri ham lakkaz enzimini ise kakao içeren çözeltilere ilave ederek kakaonun lezzetini arttırdığını bildirmişlerdir. Dolayısı ile çikolata üretiminde kullanılan kakaonun acılığını ortadan kaldırmak için önemli bir gelişme kaydedilmiştir.

Martins ve ark. (2002), yaptıkları çalışmalarında *Bacillus subtilis*'in lakkaz aktivitesini 75°C'de ölçmüşlerdir. Birhanlı (2008), yaptığı çalışmada bakır'ın, inkübasyon sıcaklığının, ortam pH'sının ve ABTS'in *Funalia trogii* ve *Trametes versicolor* peletlerinin lakkaz üretimi üzerine etkisini araştırmıştır. Her iki fungusun lakkaz üretimini arttırmak için kültür ortamına ilave edilecek en uygun bakır konsantrasyonunu tespit etmek için çeşitli konsantrasyonlarda CuSO₄.5H₂O (bakır sülfat) eklemiş ve her iki fungus için de en uygun bakır konsantrasyonunun 0.5 mM, en uygun inkübasyon sıcaklığının ise 30°C olduğunu belirlemiştir. *F. trogii* için en uygun ortam pH'sının pH 4.0, *T. versicolor* için ise pH 5.0 olduğunu tespit etmiştir.

Yine, Wang ve ark. (2006), *Monotropa* sp.'nin en uygun inkübasyon sıcaklığını 30°C olarak tespit etmişlerdir. Yapılan bir çalışmaya göre *Pleurotus ostreatus*'tansafırlatırılmış lakkaz ile zeytinyağı fabrikası atık suyunun fenolik içeriğinin büyük oranda (%90'a kadar) azaltıldığı fakat toksisitede ise azalma gerçekleşmediği rapor edilmiştir. Ayrıca zeytinyağı fabrikası atık suyunun lakkaz ve beyaz çürükçül funguslarla yıkıldığı bildirilmiştir. Bu atık suların funguslar tarafından lakkaz üretiminde kullanılabileceği bildirilmiştir (Minussi ve ark., 2002).

Palmieri ve ark. (2001), *Pleurotus ostreatus* ile yaptığı çalışmalarında kültür ortamına ilave edilen bakırın ekstraselüler proteaz aktivitesini azalttığı fakat buna bağlı olarak kültür sıvılarındaki enzimin kararlılığının arttığını saptamışlardır.

Birhanlı ve Yeşilada (2017), yaptıkları çalışmalarında enzim üreticisi olarak yüksek lakkaz üretim potansiyeline sahip olan *Funalia trogii* ATCC 200800 ve *Trametes versicolor* ATCC 200801 kullanmışlardır. Enzim üretim ortamları olarak ise bakır içeren ve bakır içermeyen distile su, Sabouraud Dekstroz Broth, Malt Ekstrakt Broth ve peynir altı suyu ortamlarını kullanmışlardır. Lakkaz üretim yöntemi olarak da tekrarlı kesikli işlemi kullanmışlardır. En yüksek lakkaz aktiviteleri bakır ilave edilmiş Malt Ekstrakt Broth ortamlarında *F. trogii* ve *T.versicolor* için sırasıyla 17.68 ve 6.27 U mL⁻¹ olarak elde etmişlerdir. Lakkaz üretimi açısından bakır ilave edilmiş ortamların etkinlik sıralaması her iki fungus için de; Malt Ekstrakt Broth > Sabouraud Dekstroz Broth > distile su şeklinde

gerçekleşmiştir. Bakırsız ortamlardaki etkinlik sıralaması *F. trogii* için Malt Ekstrakt Broth > Sabouraud Dekstroz Broth > %25 peynir altı suyu > distile su > %50 peynir altı suyu iken, *T. versicolor* için; Malt Ekstrakt Broth > %25 peynir altı suyu > Sabouraud Dekstroz Broth > %50 peynir altı suyu > distile su şeklinde olmuştur. Sonuç olarak her iki fungus da tüm ortamlarda lakkaz üretebilmiş ve bakırlı ortamlarda lakkaz üretimi artış göstermiştir.



3.MATERYAL ve YÖNTEM

3.1.Materyal

Bu tez çalışması, Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Laboratuvarında yapılmıştır. Çalışma, *Penicillium expansum* fungusunun farklı sıcaklık seviyelerinde (4-, 8-, 16-, 22-, 25-, 35-, 45-, 55°C) proteaz enzim sentezini konu almıştır. Bunun için 8 farklı sıcaklık değerleri (muamele) 5 tekerrürlü olacak şekilde 100 ml Patates Dekstroz Broth (PDB, pH 5.6) içeren ortamlarda inkube edildikten sonra enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Fungal materyal olarak daha önce enfekte edilmiş elma meyvelerinden izole edilen *Penicillium expansum* fungusu kullanılmıştır.

3.1.1.Fungusların morfolojisi

Fungusları morfolojilerini tanımlamak için ışık mikroskopunda görüntüleri elde edilmiştir. Patates Dekstroz Agar (PDA) ortamında gelişmeye bırakılan fungus miselleri sterilize edilmiş bir bisturi ile 1 cm² genişliğinde bir parça alınarak gözlem yapılmıştır. Agar ortamında gelişen konidioforlar mikroskop altında incelenerek misel ve spor yapıları görülmüştür.

3.1.2.Fungusların yetiştirilmesi

Denemede kullanılan fungal materyal PDA besi ortamında 10 gün süre ile geliştirilerek, inokulasyon için uygun yoğunluk ve sporulasyona hazır hale getirilmiştir.

Çizelge 3.1.Patates Dekstroz Agar (PDA)

İçerik	Konsantrasyon(g/l)
Kabuğu soyulmuş doğranmış patates	200
Glukoz	20
Oxoid Agar No:3	25

200 g soyulmuş patates küçük dilimlere ayrılarak 1000 ml’lik saf su ile 1 saat kaynatılmıştır ve püre haline getirilmiştir. Daha sonra elde edilen püre mira bezinden (Calbiochem) geçirildikten sonra 20 g glukoz ilave edilerek (Çizelge 3.1.), 250 ml hacime sahip 6.25 g agar içeren (% 2.5 w/v) 4 adet 500 ml’lik konikal flasklara aktarılmıştır. Ortam 121 °C’de 20 dakika 15 atm basınçta otoklav edildikten sonra Petri kaplarına 12 ml olacak şekilde boşaltılmıştır. Petri kaplarına aktarılan ortamların katılaşması için yaklaşık yarım saat kadar inkubatörde oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra bu Petri kaplarının (90 mm çapında) tam ortasına daha önceki stok kültürlerden alınan *P. expansum* konidisi içeren 3 mm çapında fungal miselyal disk yerleştirilmiş ve petri kapları bir inkubatörde 7-10 gün süre ile oda sıcaklığında (23±2 °C) karanlıkta inkube edilmiştir.

Funguslar, ayrıca agar içermeyen PDB besi ortamında, yani yukarıda belirlenen ortamın agar içermeyen sıvı içeriğinde de gelişime bırakılmışlardır.

3.1.3.Çalışmada kullanılan kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Laboratuvarından temin edilmiştir. Bunlar; Fosfat buffer (pH 7.0), Coomassie Brilliant Blue G-250, %95’lik ethanol, Bovine Serum Albumin (BSA) Fraction V standart protein, Coomassie Brilliant Blue Reagent, Fosforik asit, Tris-HCl (pH 8.8), Azocasein, trichloro acetic acid (TCA), NaOH.

3.2. Yöntem

Fungal gelişim için hazırlanan sıvı besiy ortamı farklı sıcaklıklarda inkube edilerek fungal gelişim için hazır hale getirilmiştir. Fungal materyal daha önce enfekte edilmiş elma meyvelerinden izole edilen *Penicillium expansum* fungusu olup, PDA ortamında gelişen fungustan 3 mm çapında bir fungal disk alınarak, 100 ml ortam içeren kaplara konularak karanlıkta daha önce belirtilen sıcaklıklarda 1 hafta süre ile gelişmeye bırakılmışlardır. Deney hazırlık aşaması Şekil 3.1. ve 3.2’de izah edilmiştir.



Şekil 3.1. PDB ortamının hazırlanması



Şekil 3.2. *Penicillium expansum* fungusundan alınan fungal disklerin kaplara konulma aşaması

3.2.1. Misel ağırlığı

Farklı sıcaklık koşullarında geliştirilen fungal etmenin sıvı kültür ortamı içerisindeki enzimatik değerleri elde edilmiştir. Sıvı kültürden filtrasyon sonucu elde edilen misel yumağının yaş ağırlığı filtre kâğıdında fazla su drene edildikten sonra hassas terazide tartılarak belirlenmiştir. Miselin kuru ağırlığını ölçmek için ise filtre kâğıdındaki miseli 25°C'deki inkübatörde bir gece bekletildikten sonra kuru misel ağırlığı hassas terazide belirlenmiştir. Ayrıca fungusun yüzde kayıp oranı aşağıdaki formüle göre tespit edilmiştir.

$$\% \text{ Kayıp} = \frac{(\text{Miselin Yaş Ortalaması} - \text{Miselin Kuru Ortalaması})}{\text{Miselin Yaş Ortalaması}} \times 100$$



Şekil 3.3. *P. expansum* fungusunun yaş ve kuru ağırlığının hassas terazide belirlenmesi

3.2.2. Funguslarda pH ölçümü

Sıvı ortamda (PDB ortamında) farklı sıcaklık koşullarında gelişime bırakılan fungusun geliştiğı ortamın pH değeri pH metre ile ölçülmüştür.



Şekil 3.4. *P. expansum* fungusunun PDB ortamında pH metre ile pH değeri ölçümü

3.2.3. Funguslarda elektriksel iletkenlik (EC)değerlerinin belirlenmesi

Sıvı ortamda (PDB ortamında) farklı sıcaklık koşullarında gelişime bırakılan fungusun geliştiği ortamın EC değerleri EC metre ile ölçülmüştür.



Şekil 3.5. *P. expansum* fungusunun EC değerinin belirlenmesi

3.2.4. Funguslarda canlılık testi

Fungusların canlılığını test etmek için, farklı sıcaklıklarda PDB ortamında geliştirilen funguslardan elde edilen yaş misellerden 0.50 g alınmış, önceden hazırlanmış olan 100 ml'lik PDB ortamına aktarılmıştır. Burada fungal gelişimin sağlanıp sağlanmadığı 3 gün süre ile oda sıcaklığında inkubasyon sonunda yapılan değerlendirme ile belirlenmiştir.

3.2.5. Spor sayımı

Spor sayımı için, yaptığımız çalışmalardan elde edilen solusyonların her birinden 3 ml alınıp spektrofotometre küvetine yerleştirilerek 400 nm'de spektrofotometre aracılığıyla okuması yapılmıştır.

3.2.6. Pigment sayımı

Pigment sayımı için, yaptığımız çalışmalardan elde edilen solusyonların her birinden 3 ml alınıp spektrofotometre küvetine yerleştirilerek 405 nm’de spektrofotometre aracılığıyla okuması yapılmıştır.

3.2.7. Protein ölçümü

PDA ortamında yetiştirilen fungus misellerinin protein içeriği Bradford (1976) yöntemine göre belirlenmiştir. Petri ortamında gelişmeye bırakılan fungal kültürlerden Petri kaplarına dökülen 10 ml steril su ile miseller yüzeyden kazılarak yaklaşık 0.1g ağırlığında misel elde edilmiş, bu kütle fosfat buffer çözeltisinde (pH 7.0) mortar ve pestel ile homojenize edilerek, 10000 g de 10 dakika süre ile 4 °C’de santrifüj edilmiştir (Dikilitaş ve ark.,2010). Elde edilen süpernatant 595 nm mikrolaka okuyucuda okunarak daha önceden belirlenen standart grafiğe göre protein değerleri mg protein g⁻¹ misel ağırlık olarak ifade edilmiştir.

3.2.8. Proteaz enzim ölçümü

Misellerin üretmiş olduğu protease enzimi ise azocasein tabanlı amino asit ölçümü Girard ve Michaud (2002) yöntemine göre yapılmıştır. Buna göre; PDA üzerinde yetiştirilen fungus misellerinden alınan misel parçaları (3 mm çapında), 1.5 ml hacmindeki Eppendorf tüplerine konarak ve üzerlerine 50 mM Tris-HCl ve pH 8.8 içinde hazırlanan 120 µl hacminde %1’lik (w/v) azocasein solusyonu ilave edilerek karanlıkta oda sıcaklığında 2 saat süre ile inkube edilmiştir. Protelolysis yani protein parçalanması 300 µl, %10’ luk (w/v) trichloro acetic acid (TCA) ilavesi ile sonlandırılmış, karışım 10000g de 10 dakika santrifuj edilerek, elde edilen yaklaşık 350 µl supernatant 300 µl 1 M NaOH ile karıştırılmış ve hidroliz sonucu proteaz aktivitesi 440 nm mikrolaka okuyucuda (SpectraMax M5, Molecular Devices, USA) okunmuştur. Sonuçlar, A₄₄₀ dak⁻¹ mg protein⁻¹ olarak ifade edilmiştir (Girard ve Michaud, 2002; Dikilitaş ve ark., 2018).

3.2.9. Lakkaz enzim ölçümü

Lakkaz aktivitesi ABTS (2, 2'-Azino-Bis-3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic asit) molekülünün okside olması esasına dayanarak belirlenmektedir (More ve ark.,2011). Nonfenolik boya olan ABTS, lakkaz enzimi tarafından okside edilerek daha stabil bir hale getirilmektedir. Lakkaz enziminin belirlenmesi için hazırlanan karışım, 0.5 mM ABTS, 0.1 M sodium acetate (pH 5.0) ve uygun enzim miktarından oluşmaktadır. Bunun için, 5 mM'lık bir ABTS stok solüsyonundan 100 µl alınmış ve üzerine 1 ml 0.1 M'lık sodyum asetat buffer (pH 5.0) solüsyonu ilave edilmiştir. Bu karışımın üzerine 3 mm çapında farklı sıcaklıklarda inkube edilmiş, fungal diskler yerleştirilerek 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra karışım 10000 g'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatantaki absorbans artışı 420 nm'de örnek içermeyen karışıma karşı okunmuştur. Sonuçlar, $A_{420} \text{ dak}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ olarak ifade edilmiştir.

Protein, proteaz ve lakkaz aktiviteleri sadece miselyal disklerden değil aynı zamanda ortam içinde bulunan sıvı kültürlerden de belirlenerek böylece fungusun stres altında sentezlemiş olduğu extracellular yani hücre dışı metabolit sentezi de belirlenmiştir.

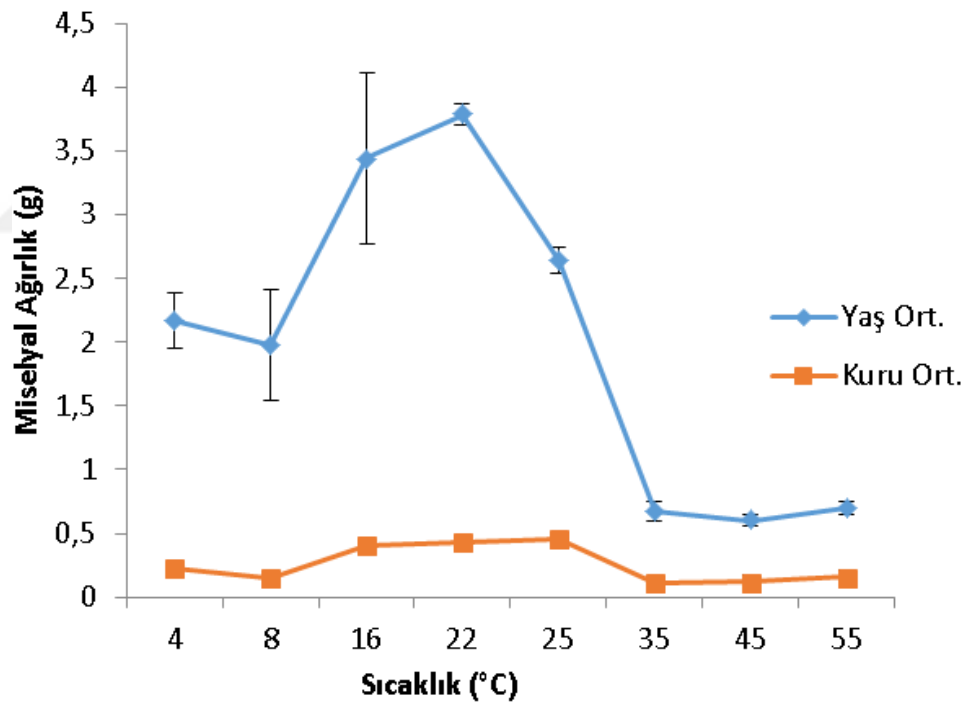


Şekil 3.6. Protein, proteaz ve lakkaz enzimlerinin ölçümü sırasındaki aşamalar

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Fungusun Miselyal Ağırlığı

Farklı sıcaklık koşullarında geliştirilen fungal etmenin sıvı kültür ortamı içerisindeki enzimatik değerleri elde edilmiştir. Sıvı kültürden filtrasyon sonucu elde edilen misel yumağının yaş ağırlığı filtre kâğıdında fazla su drene edildikten sonra hassas terazide tartılarak belirlenmiştir. Ayrıca miselin kuru ağırlığını ölçmek için ise filtre kâğıdındaki miseli 25°C'deki inkübatörde bir gece bekletildikten sonra kuru misel ağırlığı hassas terazide belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar (Şekil 4.1.)'de verilmiştir.



Şekil 4.1. *P. expansum* fungusunun miselyal ağırlıkları

Bu sonuçlara göre, sıvı kültürden filtrasyon sonucu elde edilen misel yumağının filtre kâğıdında fazla su drene edildikten sonraki yaş ağırlığı 16-25°C arasında değişen sıcaklıklarda daha yüksek değere ulaşmıştır. 35-55 °C arasında değişen sıcaklıklarda ise yaş ağırlık en düşük değerlere ulaşmıştır.

Filtre kâğıdındaki miselin 25°C'deki inkübatörde bir gece bekletildikten sonraki kuru ağırlığı ise yaş ağırlığında olduğu gibi 16-25°C arasındaki sıcaklıklarda yüksek değere, 35-55°C arasında değişen sıcaklıklarda ise en düşük değere ulaşmıştır.

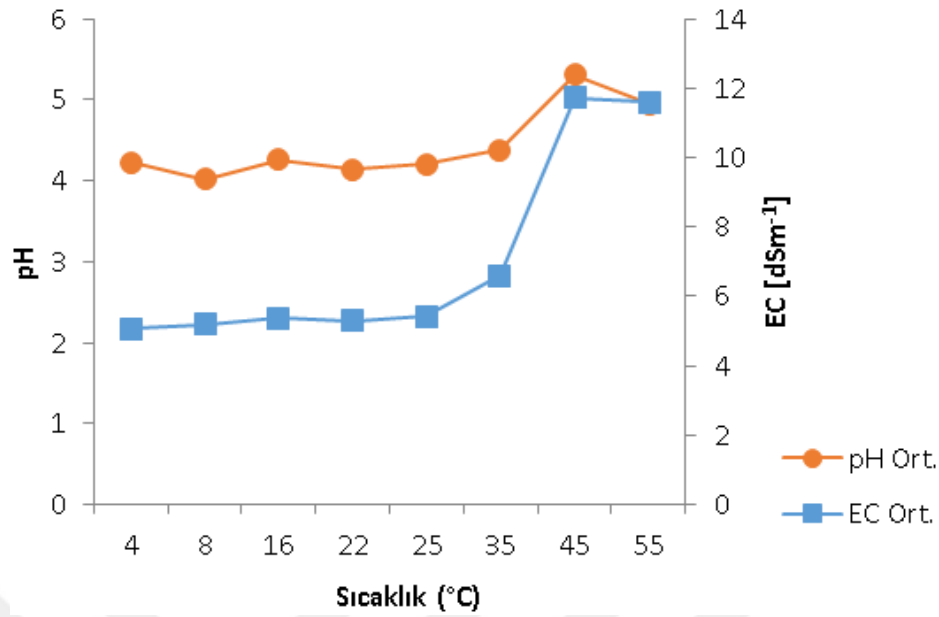
Bu sonuçlara göre, sıcaklık değerleri arttıkça patojenin hem yaş ağırlığında hemde kuru ağırlığında azalma meydana geldiği görülmüştür.

Abubakar ve ark. (2013), *Aspergillus parasiticus*'u Patates Dekstrozu Broth ortamında 4.0 ila 10.0 arasında değişen pH değerinde aşılayarak 7 gün oda sıcaklığında inkübe etmişlerdir, 4.0 ila 10.0 pH aralığında üretilen ortalama kuru misel ağırlığını 355.67 mg ila 302.73 mg arasında değiştiğini tespit etmişlerdir. En düşük misel ağırlığı pH 10.0'da tespit edilmiştir. Bu da daha yüksek alkali ortamın *A. parasiticus* gelişimi için uygun olmadığını göstermiştir.

Kılıç (2017), *P. expansum*'un miselyal yaş ağırlığı artan tuz konsantrasyonu ile beraber kayba uğramasına rağmen 250 mM NaCl konsantrasyonunda misel ağırlığının yaklaşık %30 kayba uğradığını, 1000 ve 1250 mM NaCl konsantrasyonlarında ise %60 ve 65 kayba uğradığını tespit etmiştir. Bu durum fungal etmenin yüksek tuz konsantrasyonlarında da yeteri kadar organik madde üretebildiği ve enfeksiyon yapabileceğini göstermiştir.

4.2. Fungusun EC ve pH değerleri

Sıvı ortamda (PDB) farklı sıcaklık koşullarında gelişime bırakılan fungusun geliştiği ortamın pH ve EC değerleri (şekil 4.2.)'de verilmiştir.



Şekil 4.2. *P. expansum*'un farklı sıcaklık koşullarında EC ve pH değerleri

Bu sonuçlara göre, sıcaklık arttıkça EC değerinin de arttığını göstermiştir. Artan sıcaklık değeri ile birlikte ortamın EC değerinin artması fungusun yüksek sıcaklık ve EC değerlerinde gelişebileceğini teyit etmiştir. Yüksek sıcaklıklarda fungusun hücre duvarının parçalandığı ve ortama OH⁻ iyonları vererek ortamı alkali hale getirdiği, bu iyonların da aynı zamanda ortamdaki elektriksel iletkenliği arttırdığı görülmüştür. Bu durumda fungus misellerinin EC ve pH değerlerine bakılarak gelişim ve tolerans durumlarının belirlenebileceği anlaşılmıştır.

Artan sıcaklık değeri ile birlikte ortamın pH değerinin yükselmesi, *P. expansum*'un gelişme koşulları olarak kabul edilen hafif asidik koşullardan kısmen uzaklaştığı anlamına gelse de fungusun geniş bir pH aralığına sahip olduğu değerlendirilmiştir.

Kılıç (2017), *P. expansum* fungusunu sıvı PDB ortamında yetiştirerek fungusun farklı tuz konsantrasyonlarında EC ve pH değerlerinin arttığını ve bu durumu fungusun tuzu metabolize ettiği şeklinde değil de, fungusun tuzlu koşulları tolere ettiği şeklinde değerlendirilmiştir. Dolayısı ile fungal etmenin geniş bir stres aralığı olduğu görülmüştür.

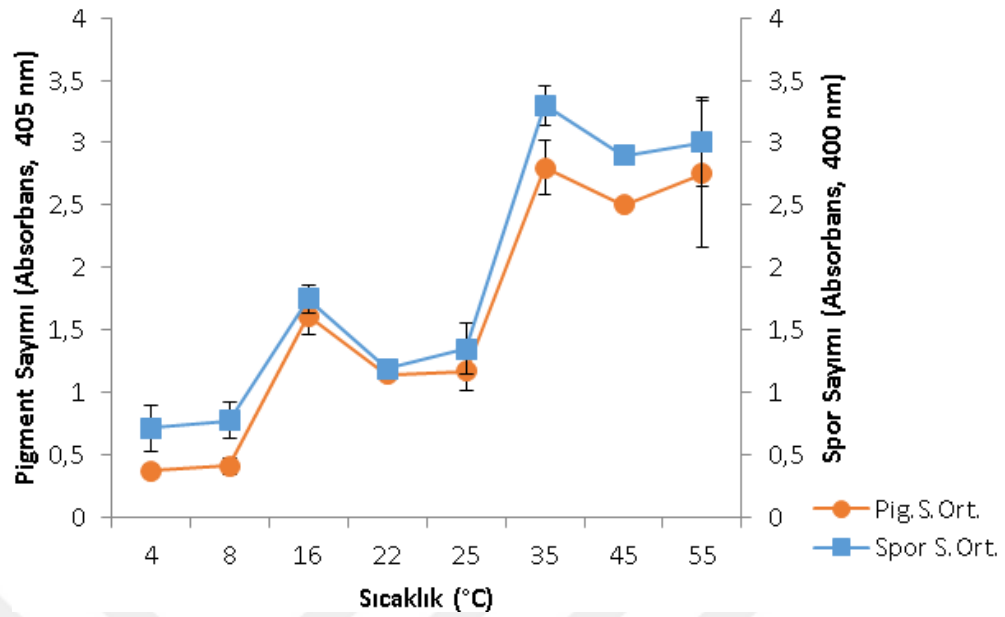
Abubakar ve ark. (2013), Patates Dekstroz Broth ortamında 4.0 ila 10.0 arasında değişen pH aralıklarında *Aspergillus parasiticus*'un 7 gün oda sıcaklığında inkubasyon sonucunda pH 5.0 ve 7.0 aralığında oluşan sporların diğer pH gruplarına göre daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. En yüksek spor sayısını pH 5.0'da ve en düşük spor sayısını ise pH 10.0'da belirlemişlerdir. En düşük spor oluşumunun pH 10.0'da olması; daha yüksek alkali ortamın *A. parasiticus* gelişimi için uygun olmadığını göstermiştir.

Tannous ve ark. (2016), *Penicillium expansum* fungusunun günde 0.92 cm/gün optimal büyüme hızına ve 5.1 pH düzeyinde 24°C'de geliştiğini belirlemişlerdir. Yaptığımız alışmada, *Penicillium expansum* fungusunun 24°C'de iyi gelişmesi bu çalışma ile uyumlu bulunmuştur.

Türkkan (2013), *F. oxysporum* f.sp. *cepae*'nın hem asidik hem bazik ortamda gelişebildiğini, fungusun pH 6 ile 9 arası değerlerinde gelişim gösterdiği fakat daha yüksek ve daha düşük pH değerlerinde fungal gelişimin azaldığını ($P \leq 0.05$), pH 12 seviyesinde ise gelişimin tamamen durduğunu rapor etmiştir.

4.3. Spor sayısı ve pigment sayısı

Yapılan alışma sonucunda elde edilen solüsyonların her birinden 3 ml alınarak spektrofotometre de yoğunluk değişimine göre fungal sporulasyon ve pigment durumu belirlenerek ölçüm yapılmış ve (şekil 4.3.)'de değerleri verilmiştir.

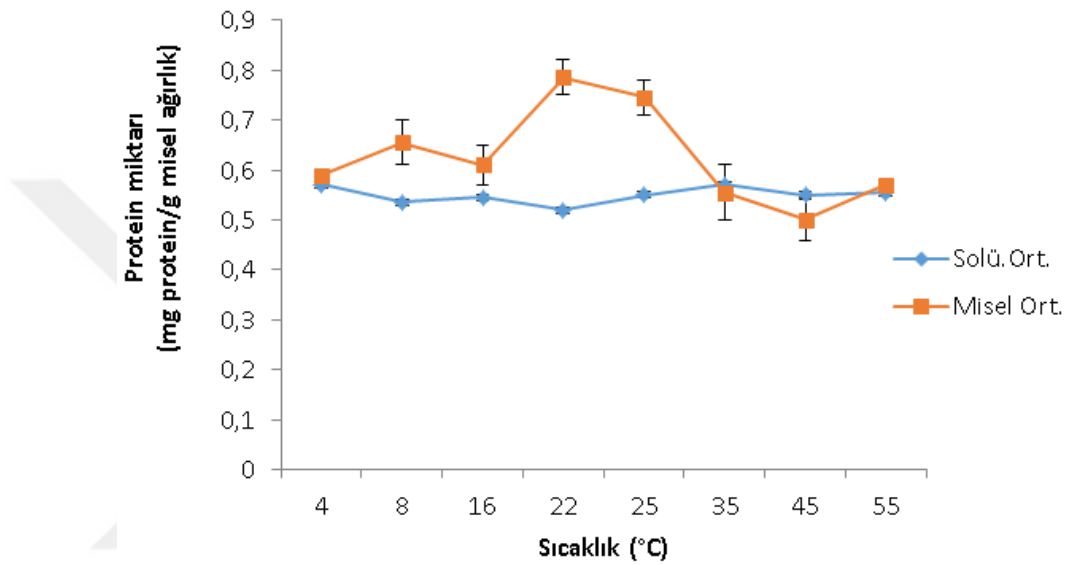


Şekil 4.3. *Penicillium expansum* fungusunun spor ve pigment sayısı

Bu sonuçlara göre, sıcaklık değeri arttıkça hem spor sayısında hemde pigment sayısında artış görülmüştür. Spor sayısında ve pigment sayısındaki artış, 25°C’den sonra artmış ancak 35°C’den sonra düşmüştür. En düşük sporulasyon ve fungal değışim ise 4°C de tespit edilmiştir. Fungus bu derecelerden sonra renk ve sporulasyon açısından gelişim göstermiş, dolayısı ile bu sıcaklıklarda ilave bir önlem alınmadıkça gelişim sergileyebileceğini göstermiştir. Hem sporulasyon hem de renk değışiminin yani pigment oluşumunun değeriendirilmesi yapıldığında çoğalan fungal partiküllerin aynı zamanda olgunlaşarak gelişim gösterdiği ve dolayısı ile bu durumun enfeksiyon kapasitesine de yansıyacağı ortaya konmuştur. En düşük sıcaklık olarak, yani en düşük yaş sebze ve meyveleri koruma sıcaklığı olarak belirlenen sıcaklıkta (4°C) bile fungal etmen bulaşmasının olması durumunda hastalığın inkubasyon süresine bağlı olarak artış göstereceğı belirlenmiştir. Meyve ve sebzelerin kalite değeriilerinin bozulmaması yani renk ve aromatik kayıplarının muhafaza sırasında en az olması için öne srlen sıcaklığın 8 °C olması gerektiğı son yıllarda yaygınlık kazanmış ancak hastalık etmenin herhangi bir bulaşma durumunda artış göstereceğı teyit edilmiştir.

4.4. Fungusun protein içeriğinin belirlenmesi

PDA ortamında yetiştirilen fungus misellerinin ve solüsyonların protein içeriği Bradford (1976) yöntemine göre belirlenmiştir. Elde edilen süpernatantlar 595 nm’de mikropkaya okuyucuda okunarak, fungusun protein içerikleri mg proteing⁻¹ misel ağırlık olarak ifade edilmiştir (şekil 4.4.).



şekil 4.4. Farklı sıcaklıklara maruz kalan *P. expansum* fungusunun protein değerleri

Patojenin hem solüsyon ortamındaki (PDB) hemde miselyal yapıdan ekstrakt edilen protein miktarları karşılaştırıldığında, optimum sıcaklık olarak değerlendirilen oda sıcaklığında artış göstermiş, miselyal yapıdan elde edilen proteinlerin daha yüksek olması fungusun sıvı ortama çok fazla protein bırakmadığı yani hücresel yapıyı muhafaza ederek sıcaklık artışından çok da fazla etkilenmediğini ortaya koymuştur. Protein miktarı en yüksek 22 ve 25°C’de en düşük ise 45°C de tespit edilmiştir. Solüsyon ortamındaki protein miktarı ise bahsedildiği gibi sıcaklık artışına göre fazla değişkenlik göstermemiştir.

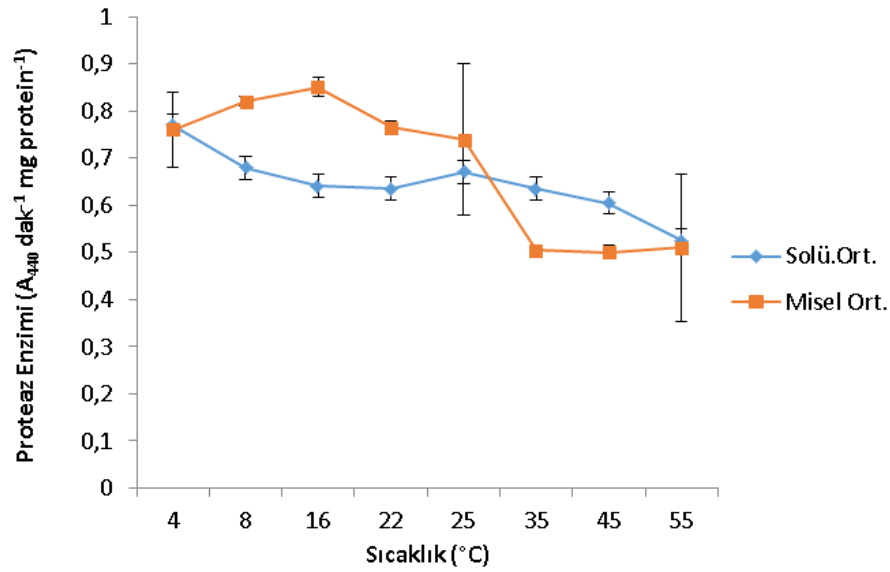
Kılınç (2018), *Zymoseptoria tiritici* (buğday yaprak leke hastalığı) fungusunu farklı sıcaklık değerlerine (4-, 15-, 25-, 30-, 35°C) maruz bırakarak protein içeriğini incelemiştir. Sıcaklıkların yükselmesi patojenin protein içeriğinde azalmaya neden olmuştur. Fungusun en yüksek protein içeriği 15°C, en düşük protein içeriği ise

30°C’de sentezlenmiştir. Serin iklim tahıllarında hastalık etmeni olarak bilinen fungusun düşük sıcaklık derecelerinde daha fazla protein sentezleme kabiliyetinin bulunması patojenin enfeksiyon kabiliyeti ile doğru orantılı bulunmuştur.

Çetin (2014), *Erwinia amylovora*’nın bitkilerde meydana getirdiği biyotik stresin ayva, elma ve armut çeşitlerinde zamana bağlı olarak bitki savunma mekanizmasında bulunan toplam protein miktarları üzerine etkilerini araştırmıştır. Bu çalışma sonucunda elma çeşitlerinde *E. amylovora* enfeksiyonu sonrası kontrole kıyasla 24. saatte toplam protein miktarının arttığı, 36. ve 72. saatte ise toplam protein miktarının azaldığını belirlemiştir. Ayva çeşitlerinde ise kontrole kıyasla 24. ve 36. saatlerde toplam protein miktarının azaldığı, 72. saatte toplam protein miktarının arttığını belirlemiştir. Armut çeşitlerinde ise kontrole kıyasla 24. ve 36. saatlerde toplam protein miktarının arttığı, 72. saatte ise toplam protein miktarının azaldığını belirlemiştir. Patojen enfeksiyonu ile meyvelerin protein sentezi arasında ilişki kurulmuş, konukçu dokunun protein sentezinin patojen enfeksiyonu ile ilişkisi ortaya konmuştur.

4.5. Fungusun proteaz aktivitesinin belirlenmesi

Fungal misellerin üretmiş olduğu proteaz enzimi azocasein tabanlı amino asit ölçümü Girard ve Michaud (2002) yöntemine göre belirlenmiştir. Elde edilen süpernatantlar 440nm mikropilaya okuyucuda okunarak sonuçlar $A_{440} \text{ dak}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ olarak elde edilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Farklı sıcaklıklara maruz kalan *P. expansum* fungusunun proteaz değeri

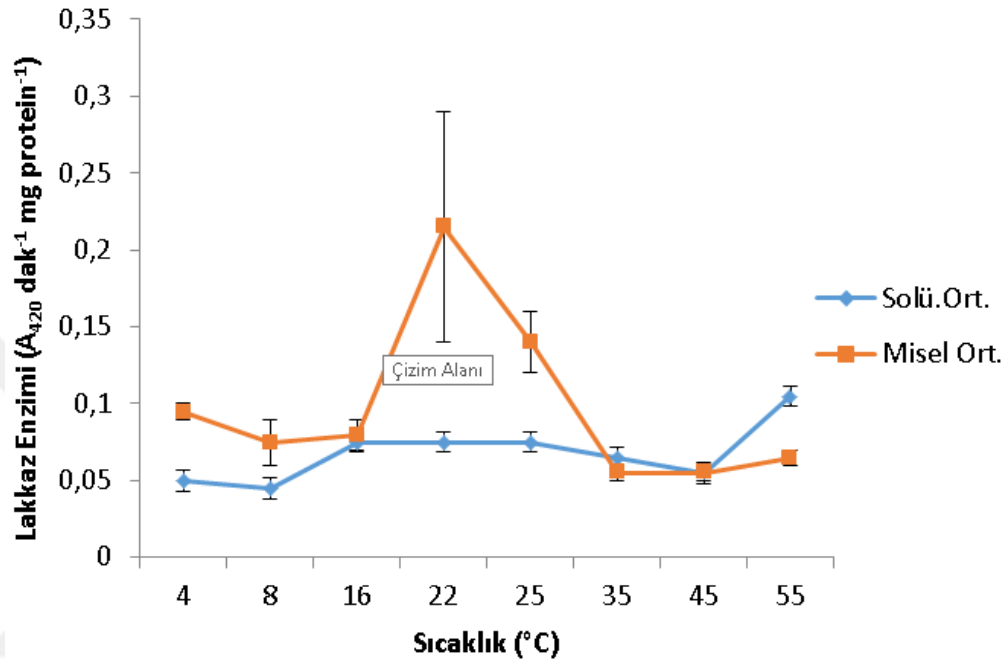
Patojenin hem solüsyon ortamına (PDB) bıraktığı hemde miselyal yapıdan sentezlediği proteaz enzim değeri sıcaklık değışiminden etkilenmiştir. Solüsyon ortamındaki proteaz enzimi göreceli olarak değışim gösterse bile standart hata hesaplaması yapıldığında çok fazla bir değışimin olmadığı görülmüştür. Bu durum protein sentezi ile de uyumlu bulunmuştur. Yine, miselyal enzim konsantrasyonu solüsyonda bulunan enzim konsantrasyonundan fazla bulunmuştur. Yaklaşık olarak 30°C ve üstünde enzim sentezlemesi ciddi oranda inhibe edilmiştir.

Kılınç (2018), *Zymoseptoria tiritici* (buğday yaprak leke hastalığı) fungusunu farklı sıcaklık değeriğine (4-, 15-, 25-, 30-, 35°C) maruz bırakarak proteaz aktivitesini incelemiştir. Patojenin proteaz enzim konsantrasyonun sıcaklık değışimlerinden genel olarak etkilendiğini 15 °C’de yüksek proteaz ürettiğini tespit etmiştir. Bu durum, patojenin virulensi ile de uyumlu bulunmuştur.

Patojenlerden salgılanan proteaz enziminin *in vitro* koşullarda ortam içeriğine, pH ve sıcaklık değeriğine göre değışiklik gösterdiği Zhan ve ark. (2013) tarafından da ifade edilmiştir.

4.6. Fungusun lakkaz aktivitesinin belirlenmesi

Lakkaz aktivitesi ABTS molekülünün okside olması esasına dayanarak belirlenmiştir. Elde edilen süpernatantlar 420 nm’de okuması yapılmış, sonuçlar şekil (4.6.) ifade edilmiştir.



şekil 4.6. Farklı sıcaklıklara maruz kalan *P. expansum* fungusunun lakkaz değerleri

Patojenin hem solüsyon ortamındaki (PDB) hemde miselyal yapıdan elde edilen lakkaz enzim değerleri sıcaklık ile değişiklik göstermiştir. Yine, nceki parametrelerde olduğu gibi solüsyon içinden elde edilen enzim çok büyük değişiklik göstermezken misel yapıdan elde edilen enzim ise 22-25°C arasında en üst seviyede üretilmiş, sıcaklık artışı ile enzim aktivitesi düşüş göstermiştir. Yine, etmenin artan sıcaklıkta enzim seviyesinde değişim ya da azalma göstermemesi etmenin hücresel bütünlüğünü koruduğu şeklinde değerlendirilmiştir. Lakkaz enziminin de patojenisite ile ilgili enzim olduğu kabul edildiğinden etmenin oda sıcaklığı ve hatta serin koşullarda çok ciddi kayıplara yol açacağı grlmştir.

4.7. *P. expansum* fungusunda canlılık testi

Fungusların canlılığını test etmek için, daha önce farklı sıcaklıklarda gelişime bırakılan funguslardan elde edilen misellerden 0.50 g alınarak, daha önceden hazırlanmış olan 100ml'lik PDB ortamına oda sıcaklığında aktarılmıştır. Patojen 3 gün süre ile oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Bu canlılık testi sonucunda fungal gelişme incelenmiştir. En çok gelişme, 22°C ve 25°C'den elde edilen misellerde görülmüştür.

Çizelge 4.1. Farklı sıcaklıklara maruz kalan *P. expansum* fungusunun canlılık testi sonuçları

SICAKLIKLAR (°C)	1.TEKERRÜR	2.TEKERRÜR	3.TEKERRÜR	
4	+	+	+	Canlı
8	+	+	+	Canlı
16	+	+	+	Canlı
22	+	+	+	Canlı
25	+	+	+	Canlı
35	+	+	+	Canlı
45	+	+	+	Canlı
55	–	–	–	Canlı

Elde edilen canlılık testine göre, farklı sıcaklıklarda yetiştirilen fungusların normal oda sıcaklığında yeniden canlandırması yapıldığında fungal etmenin yeniden canlılık kazandığı belirlenmiştir. Hess ve Shaner (1987), dört nemli peryot ve üç sıcaklık derecesi (11-, 18-, 25°C) ile yaptıkları çalışmalarında sıcaklık değerleri arttıkça penetrasyon, çimlenme ve miselyal gelişimin devam etmesi ve enfeksiyon yapabilmesi için uzun ve yüksek nemli peryotların olması gerektiğini belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda kullanılan sıcaklık değerleri ve sonuçları ile diğer çalışmalarda kullanılan sıcaklık değerleri ve sonuçları paralellik göstermektedir. Yapılan çalışmanın sonucunda; 4-25°C arasında değişen sıcaklıklarda fungus hızlı bir gelişme göstermiş ve canlılığını korumuştur. Yüksek sıcaklıktan dolayı fungusun çeşitli enzim reaksiyonlarını gerçekleştiremediği ya da daha az protein sentezlediği görülmüş olmasına rağmen bu sıcaklıklarda da fungal etmenin sporulasyon ya da miselyal gelişim için ortamda yeteri kadar misel oluşumuna rastlanmış, bu durum 45 °C için canlı olarak değerlendirilmiştir. Ancak 55°C'de canlılık testi, ortamda

bulunan miselyal gelişime bakılarak değerlendirilmiş, fungal gelişim net olarak görülmemiştir. Bu durumun daha önce ortama bırakılan yani 55°C'lik gelişme ortamından alınan fungusun miselyal parçacığı mı yoksa oda sıcaklığında 3 gün süre ile gelişme gösteren fungal parçacık mı olduğu netlik kazanmamıştır. Üç gün süre ile inkubasyonun 55°C'lik ortamdan alınan fungus gelişimi için yeterli olmadığı değerlendirilmiştir. Biyokimyasal testlerden elde edilen sonuçlara göre bu sıcaklıkta fungal etmenin gelişemediği belirlenmiş ancak yine de bu ortamda gelişme göstermeyen fungal yapının 3 gün süre ile oda sıcaklığında inkube edildiğinde cansız olarak değerlendirilip değerlendirilmeyeceği tam olarak netlik kazanmamıştır. Bundan dolayı bu kısım teyit edilecek şeklinde bir işaretleme ile noktalanmıştır. Çünkü fungal etmenin agresif olmasında dolayı bu süre sonunda yani 3 günlük süre sonunda yeniden canlılık kazanmasının mümkün olabileceği de göz ardı edilmediğinden bu kısım kesin yargıya varılamayacak şekilde tamamlanmıştır. Bu durumun teyidi için kullanılan triphenyl tetrazolium chloride test (TTC) negatif sonuç vermesine rağmen daha ileri bir test ile bu durumun sonraki çalışmalar için değerlendirileceği ifade edilmiştir. Çünkü fungal etmenin en üst ve alt dayanım sınırının belirlenmesi kontrol mekanizması açısından büyük önem taşımaktadır. Örneğin, Kılıç (2017), *P.expansum* fungusunu sıvı PDB ortamında yetiştirerek fungusun beş farklı tuz (0.25-, 0.50-, 0.75-, 1.0-, 1.25 M) konsantrasyonlarında TTC testini ölçmüştür. Yapılan bu canlılık testi (TTC) sonucunda fungal etmenin canlılığını koruduğunu belirtmiştir. Yine, Yiğit (2011), *F. oxysporum* ile yaptığı çalışma sonucunda ortamın pH'sını yükselterek fungusun miselyal gelişiminde % 2.35'lik bir azalma olduğunu tespit etmiştir. Yani, ortam fungal gelişim için uygun olmayan koşullara getirilse bile fungal etmenlerin gelişim sağlayabildikleri anlaşılmıştır

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Doğadaki organik maddeleri parçalamaları, organik asit, protein, enzim, antibiyotik ve vitamin oluşturmaları hayvan, insan ve bitkilerde hastalıklara neden olmaları ayrıca çeşitli yiyeceklerin bozulmalarına neden olmaları fungusların ne kadar önemli fonksiyonlara sahip olduklarını ortaya koymuştur (Asan, 1990).

Funguslar hayatta kalabilmek için; selüloz, proteaz, pektinaz, amilaz, lipaz ve ksilinaz gibi enzimleri üretebilirler (Gonzalez ve ark., 2012).

Topal ve ark. (2000), yaptıkları çalışmalarında toplam 1558 küf kültürü kullanarak lipaz, amilaz ve proteaz taraması yapmışlardır. Bu çalışma sonucunda pozitif sonuç verenler; proteaz için 1078 (%69), lipaz için 591 (%46) ve amilaz için 645 (%41) olduğunu tespit etmişlerdir.

Fungal patojenlerin yapısında bulunan proteinler, genetik yapının içinde yer alarak veya hücre duvarı ve enzimlerin yapısında yer alarak birçok görev üstlenmektedir. Proteinler stres altında kalan patojenlerin savunma mekanizması ve virülenslik derecesi üzerinde de etkisinin olduğu bilinmektedir (Paper ve ark., 2007). Patojen funguslarda bulunan proteinler, konukçu-patojen ilişkisinin kurulması, farklı gelişim ve enfeksiyon süreçlerinin başlatılması, hastalık şiddetinin belirlenmesinde ve oluşan birçok reaksiyonlarda rol almaktadır (Wawra ve ark., 2013).

Patojen funguslar enfeksiyon stratejisi olarak bitkinin hücre duvarını tahrip edebilen enzimler salgılamaktadır. Protein yapısında bulunan enzimler yalnızca canlılar tarafından sentezlenebilmektedir. Bunlar hücre içerisinde meydana gelen tepkimeleri düzenleyen biyolojik katalizörlerdir (Dikilitaş ve ark., 2018). Bu enzimler endopolygalakturonazlar, kitinaz, selülozlar, pektin liyaz ve proteazlardır. Patojen salgıladığı bu enzimler sayesinde bitki dokuları arasında gelişimini kolaylaştırır (Hegedus ve Rimmer, 2005).

Fenolik bileşikler, mikroorganizma hücrelerindeki enzim ve membran proteinlerine etki ederek, bunları etkisiz hale getirebilirler (Holyoak ve ark., 1996). Ayrıca bu bileşikler mikroorganizmaların hücre zarlarının geçirgenliğini bozdukları ve stoplazmadan potasyum (K^+) kaybına sebep olup hücrenin hayatsal fonksiyonlarını engellerler. Protein üretiminde kullanılan mekanizmaları devre dışı bırakarak adenosin trifosfat (ATP) seviyesini düşürdüğü ve bunun sonucunda ise hücrenin ölümüne neden oldukları belirlenmiştir (Venturini ve ark., 2002).

Proteazların bitki-patojen etkileşiminde önemli bir yeri vardır. Birçok enfekteli bitki dokularında proteaz enzimleri tespit edilmiştir. Proteazların önemli virülens faktörleri arasında yer aldığı bilinmektedir (Rollins, 2003). Proteazların başka bir yönü ise bitkilerdeki savunma mekanizmasını harekete geçiren bir sinyal görevi gördüğü düşünülmektedir. Bu yüzden normal değerlerinin üstünde veya altında çıkan sonuçlar fungusun savunma ve virülenslik mekanizması hakkında önemli bir değere sahiptir (Dikilitaş ve ark., 2010).

Patojenlerden salgılanan proteaz miktarı *in vitro* koşullarda ortam içeriğine pH ve sıcaklık değerlerine göre değişiklik göstermektedir (Cotton ve ark., 2002).

Sıcaklık maksimum enzim aktivitesi için önemli bir faktördür ve endüstriyel enzimlerin yüksek sıcaklıklarda aktif ve stabil olması gereklidir (Devi ve ark., 2008). *T. roseum* proteazının bazı kimyasal özellikleri araştırıldığında 30-50 °C arasındaki sıcaklıklarda optimum aktiviteye sahip olduğu ve 40 °C’de maksimum aktivite gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca 60 °C’de enzimin aktivitesinin tamamını yitirmediği ve %49.35’lik bağıl aktiviteye sahip olduğunu bildirmiştir (Özkan, 2010).

Özkan (2010), üretim sıcaklığının proteaz sentezi üzerindeki etkisini araştırmak için SSF kültürlerini farklı sıcaklıklarda üretime bırakarak maksimum proteaz aktivitesini 30 °C olarak tespit etmiştir. Agraval ve ark. (2004), buğday kepeğini substrat olarak kullanarak topraktan izole ettikleri *Penicillium* sp.’den proteaz üretmişler ve optimum üretim sıcaklığını ise 45°C olarak tespit etmişlerdir.

Fungal proteazlar için rapor edilmiş olan bazı optimum inkübasyon sıcaklıkları; *Aspergillus niger* alkalen proteazı için 45°C (Devi ve ark., 2008), *A. nidulans* alkalen proteazı için 35°C (Charles ve ark., 2008) ve *P. expansum* için (Dahot, 1993) 35°C olduğu bildirilmiştir.

Özkan (2010), *Trichoderma roseum* proteazına inkübasyon pH'sının etkisini araştırdığında optimum inkübasyon pH'sını 6.5 olarak bulmuştur. Ayrıca pH 7.0 ve 7.5'te sırasıyla %87.04 ve %77.78 değerinde bağıl aktiviteler olduğunu bulmuştur.

Farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda ise proteaz enziminin optimum inkübasyon pH'ları; *A. flavus* için 8.0 (Hossain ve ark., 2006), *A. niger* için 8.5 (Devi ve ark., 2008), *P. expansum* için 10.5 (Dahot, 1993) olarak tespit edilmiştir.

Streptomyces cyaneus tarafından üretilen lakkaz enziminin optimal sıcaklığı 70 °C olarak belirlenmiştir. Bu enzim, ortam pH'sının 5-8 olduğu şartlarda ve 40 °C'de, 120 dakikainkübe edildiğinde aktivitenin %100'ünü korurken; aynı sıcaklıkta ama ortam pH'sının 3-4 olduğu koşullarda ise %50'sini koruduğu belirlenmiştir. Aynı lakkaz enzimi, ortam pH'sının 4.5 olduğu şartlarda ise 50°C'de 120 dakika sonra %75; 60°C'de 60 dakika sonra ise %60 aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir (Arias ve ark., 2003).

Bizim çalışmamızda, fungal etmenin geniş bir sıcaklık aralığına sahip olduğu belirlenmiş, bu sıcaklıklarda (hem düşük hem de yüksek sıcaklıklar) fungal gelişim, sporulasyon, yeniden canlılık kazandırma ve biyokimyasal olarak enzim ve protein ölçümleri yapıldığında, etmenin normal sıcaklık tedbirleri ile kontrol edilemeyeceği görülmüştür. Bunun yanında ortamın pH değişmesinin çok fazla bir anlam ifade etmeyeceği anlaşılmıştır. Bu çalışma etmenin farklı sıcaklıklarda sporulasyon ve patojenisite ile ilgili olan enzimlerin karakterizasyonu ortaya konduğunda etmenin patojenisitesini normal sıcaklıklarda arttırabileceğini ancak uç sıcaklıklarda da etmenin etkili olabileceğini ortaya koymuştur.

Bu etmenin hasat sonrası sebze ve meyvelere kontaminasyonu durumunda sıcaklık ayarlaması ile kontrol edilemeyeceği, ilave tedbirlere gereksinim duyulduğu anlaşılmıştır. Pestisit kullanımının sınırlandırıldığı bir dönemde alternatif olarak öne sürölen yöntemlerin etkinliğinin belirlenmesinde bu çalışmada kullanılan parametrelerin önemli kriterler arasında sayılabileceği belirlenmiştir.



KAYNAKLAR

- ABUBAKAR, A., SUBERU, H.A., BELLO, I.M., ABDULKADİR, R., DAUDU, O.A. and LATEEF, A.A., 2013. Effect of pH on mycelial growth and sporulation of *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Plant Sciences*, 1(4): 64-67.
- AGRAVAL, D., PATIDAR, P., BANERJEE, T. and PATIL, S., 2004. Production of alkaline protease by *Penicillium* sp. under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis. *Proces Biochemistry*, 39-977p.
- AHMETOĞLU, N., 2011. *Bacillus cereus* KG5'in Proteaz Enzimi Üzerine Çalışmalar. Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Diyarbakır, 100s.
- ARIK, B., EKMEKÇİ K.A. ve DURAN, K., 2008. Lakkaz Enzimlerinin Tekstilde Kullanım Alanları. *Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 28 (2):17-22.
- ARIAS, M.E., ARENAS, M., RODRÍGUEZ, J., SOLIVERI, J., BALL, A.S. and HERNANDEZ, M., 2003. Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Apple Environ Microbial*, 69:1953-58.
- ASAN, A., 1990. Fungus (Mantar)'ların Yaşamımızdaki Yeri, *Bilim ve Teknik (TÜBİTAK)*, 23 227:46-47.
- ASAN, A. , KIRGIZ, T., SEN, B., ELİPEK, B.C., GÜNER, U. and GUHER, H., 2002. Isolation, Identification and seasonal distribution of airborne and waterborne fungi in Terkos Lake. *İstanbul-Turkey*, 2: 83-95.
- ASAN, A., ŞEN, B. and SARICA, S., 2002. Airborne fungi in urban air of Edirne city (Turkey). *Biologia, Bratislava*, 57(1): 59-68.
- BALAN, D.S.L. and MONTEIRO, R.T.R., 2001. Decolorization of textile indigo dye by ligninolytic fungi, *J. Biotech.* 89:141-145.
- BALL, A.M., ASHBY, A.M., DANIELS, M.J., INGRAM, D.S. and JOHNSTONE, K., 1991. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 38(2):147-161.
- BARINDRA, S., DEBASHISH, G., MALAY, S. and JOYDEEP, M., 2006. Purification and characterization of a salt, solvent, detergent and bleach tolerant protease from a new gamma Proteobacterium isolated from the marine environment of the Sundarbans. *Process Biochem*, 41: 208-105.
- BENLİ, M., 2003. Hasat Sonrası Fungal Hastalıklarla Kimyasal ve Biyolojik Mücadele. *Orlab On Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 01(08):1-25.
- BİDOCHKA, M.J. and KHACHATOURIAN, G.G., 1988. Regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Exp Mycol Orlando*, 12: 161-8.
- BİRHANLI, E., 2003. Mikroorganizmaların Lakkaz Üretimine Çeşitli Faktörlerin Etkisi. İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Malatya, 70s.
- BİRHANLI, E., 2008. Tekrarlı Kesikli İşlemle Lakkaz Üretimi. İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Malatya, 125s.
- BİRHANLI, E. and YEŞİLADA, Ö., 2017. Tekrarlı Kesikli Süreçte *Funalia trogii* ve *Trametes versicolor* ile Lakkaz Enziminin Çeşitli Ortamlarda Üretimi. *Fen Fakültesi Fen Dergisi Araştırma Makalesi*, 43(1): 27-40.

- BİRHANLI, E. and YESİLADA, O., 2006. Increased production of laccase by pellets of *Funalia trogii* ATCC 200800 and *Trametes versicolor* 200801 in repeated-batch mode. *Enzyme Microbial Technol*, 39:1286-1293.
- BOUBAKER, H., SAADI, B., BOUDYACH, E.H. and AIT BENAOUMAR, A., 2009. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to Imazalil and Thianbendazole in Morocco. *Plant Pathol. J.*, 8:152-158.
- BRADFORD, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- BUENO, E.A., OLIVEIRA, M.B., ANDRADE, R.V., LOBO JUNIOR, M. and PETROFEZA, S., 2012. Effect of different carbon sources on proteases secreted by the fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* during *Phaseolus vulgaris* infection. *Genetics and Molecular Research*, 11(3): 2171-2181.
- CHARLES, P., DEVANATHAN, V., ANBU, P., PONNUSWAMY, M.N., KALAICHELVAN, P.T. and HUR, B.K., 2008. Purification, characterization and crystallization of an extracellular alkaline protease from *Aspergillus nidulans* HA-10 J *Basic Microbial*. 48(5): 347-52.
- CHELLAPPAN, S., JASMIN, C., BASHEER, S.M., ELYAS, K.K., BHAT, G.S. and CHANDRASEKARAN, M., 2006. Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine *Engyodontium album* BTMFS10 under solid state fermentation, *Process Biochemistry*, 41: 956-961.
- CHEONG, Y.H., CHANG, H.S., GUPTA, R., WANG, X., ZHU, X. and LUAN, S., 2002. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress and hormonal responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 129:661-677.
- CLAUS, H., 2004. Laccases: structure, reactions, distribution, *Micron*, 35: 93-96.
- CONWAY, W.S., LEVERENTZ, B., JANIŚIEWICZ, W.F., BLODGETT, A.B., SAFTNER, R.A., CAMP, M.J., 2004. Integrating Heat Treatment, Biocontrol and Sodium Bicarbonate to Reduce Postharvest Decay of Apple Caused by *Colletotrichum Acutatum* and *P. expansum*. *Postharvest Biology and Technology*, 34:11-20.
- COTTON, P., RASCLE, C. and FEVRE, M., 2002. Characterization of PG₂, an early endoPG produced by *Sclerotinia sclerotiorum*, expressed in yeast. *FEMS Microbiology Letters*, 213(2): 239-244.
- COUTO, S.R. and HERRERA, J.L.T., 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review, *Biotechnology Advances*, 24:500-513.
- ÇETİN, Ş., 2014. *Erwinia amylovora* Enfeksiyonu Sonucu Farklı Elma, Armut ve Ayva Çeşitlerindeki Konukçu Protein Miktarlarının Belirlenmesi. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Konya, 71s.
- DAFERERA, D.J., ZIOGAS, B.N. and POLISSIOU, M.G., 2000. The Effectiveness of Plant Essential Oils on the Growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*. *Crop Protection*, 22:39-44.
- DAHOT, M.U., 1993. Cultivation of *Penicillium expansum* on rice husk powder for protease production. *J Islamic Acad Sci*, 6:193-196.
- DEVÍ, M.K., RASHEEDHA, A.B., GNANAPRABHAL, G.R., PRADEEP, B.V. and PALANISWAMY, M., 2008. Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian Journal of Science and Technology*, 1(7):1-6.

- DHAKAR, K., SHARMA and PANDEY, A., 2014. Cold, pH and salt tolerant *Penicillium* spp. Inhabit the high altitude soils in Himalaya, India. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36s.
- DÍANZ, F., SANTOS, M., BLANCO, R. and TELLO, J.C., 2002. Fungicide Resistance in *Botrytis cinerea* Isolate From Strawberry Crops in Huelva Southwestern Spain. *Phytoparasitica*, 30:529-534.
- DİKİLİTAŞ, M. and KARAKAŞ, S., 2010. Salt as Potential Environmental Pollutants, Their Types, Effects on Plants and Approaches for Their Phytoremediation. *Plant Adaptation and Phytoremediation* (Edited by M. Ashraf, M. Öztürk, M.S.A. Ahmad). Springer Dordrecht, Heidelberg, London, New York, 357-383p.
- DİKİLİTAŞ, M., OĞUZ, A.Ç. and KARAKAYA, A., 2018. Extracellular protease activity and glucose production in isolates of net blotch pathogens differing in virulence. *Zemdirbysite-Agriculture*, 105(1):89-94.
- DONG, X., 2001. Genetic dissection of systemic acquired resisrance, *Current Opinion PlantBiology*, 4:309-314.
- FAN-CHING Y, LIN IH. 1998. Production of acid protease using thin stillage from a rice spirit distillery by *Aspergillus niger*. *Enzyme Microbiology Technology*, 23:397-402.
- FARLEY, P.C. IKASARA L., 1992. Regulation of secretion of *Rhizopus oligosporus* extra cellular carboxyl proteinases. *Journal Gen Microbiology*, 138:2539-2544.
- GAVRILESCU, M. and CHISTÎ, Y., 2005. Biotechnology-a sustainable alternative for chemical industry, *Biotech. Adv.*, 23:471-499.
- GENÇKAL, H., 2004. Studies On Alkaline Protease Production from *Bacillus* sp. Yüksek Lisans Tezi, İzmir Teknoloji Enstitüsü, Biyomühendislik ve Biyoteknoloji Bölümü, İzmir, 115.
- GIRARD, C. and MICHAUD, D., 2002. Departement de Phytologie, Centre de Recherche en Horticulture, UniversitéLaval, Quebec, Canada GIK 7P4. *Analytical Biochemistry*, 308:388-391.
- GODFREY, T., 1996. Protease in waste treatment, In T. Godfrey and S. West (eds.) *Industrial Enzymology*. Macmillan Press, London. 315-316p.
- GONZALEZ, J.A., GALLARDO, C.S., POMBAR, A., REGO, P. and RODRÍGUEZ, L.A., 2012. Determination of Enzimatic Activities In Ecotypic *Saccharomyces* and Non-*Saccharomyces* Yeasts, *Electronic Journal of Enviromental, Agricultural and Food Chemistry*, ISSN 1579-4377.
- GUPTA, R., BEG, Q.K. and LORENZ, P., 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Apply Microbiology Biotechnology*, 59:15-32.
- HEGEDUS, D.D. and RIMMER, S.R., 2005. *Sclerotinia sclerotiorum*: When to be or not to be a pathogen? *FEMS Microbiology Letters*, 251 (2-1):177-184.
- HESS, D.E. and SHANER, G., 1987. Effect of moisture and temperature on devolepment of *Septoria tritici* blotch in wheat. *Phytopatalogy*, 77:215-219.

- HOLYOAK, C.D., STRATFORD, M., MCMULLIN, Z., COLE, M.B., BROWN, A.J.P. and COOTR, P.J., 1996. Activity of the Plasma Membrane and Optimal Glucolytic Flux are Required for Rapid Adaptation and Growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the Presence of the Weak-Acid Preservative Sorbic Acid. *Applied Environmental Microbiology*, 62:3158-3164.
- HOSSAIN, T., DAS, F., MARZAN, L.W., RAHMAN, S. and ANWAR M.N., 2006. Some properties of protease of the fungal strain *Aspergillus flavus*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 8:162-164.
- HOUBRAKEN, J. and SAMSON, R.A., 2011. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. *Stud. Mycol.*, 70:1-51.
- JANISIEWICZ, W.J. and KORSTEN, L., 2002. Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 40:411-441.
- JANISIEWICZ, W.J., 1998. Biocontrol of Postharvest Diseases of Temperate Fruits: Challenges and Opportunities. In: *Plant-Microbe Interactions and Biological Control*. Eds.: J. Boland and L.D. Kaykendall, Marcel-Dekker, Inc, New York, 171-189p.
- JANISIEWICZ, W.J. and BORS, B., 1995. Development of A Microbial Community of Bacterial and Yeast Antagonists to Control Wound-Invasive Postharvest Pathogens of Fruits. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(9):3261-3267.
- JONES, A.L. and ALDWICKLE, H.S., 1990. *Compendium of Apple and Pear Diseases*. American Phytopathological Society Press. USA, 100p.
- JOO, H.S. and CHANG, C.S., 2005. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: Optimization and some properties. *Process Biochem.* 40:1263-1270.
- KARACA, İ., 1965. *Sistematik Bitki Hastalıkları*, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Fitopatoloji ve Ziraat Botanik Kürsüsü. Ege Üniv. Zir. Fak. Yayınları Bornova Ege Üni. Matbaası, 179s.
- KARAÇALI, İ., 2006. *Bahçe Ürünlerinin Muhafaza ve Pazarlanması*. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları. İzmir, 469s.
- KARADAŞLI, A., 2015, Hasat Sonrası Döşetes Meyvelerinde *Penicillium expansum* Fungusunun Yol Açtığı Fizyolojik ve Biyokimyasal Değişikliklerin İncelenmesi. Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Şanlıurfa, 70s.
- KAYA, S., 2011. Katı Faz Fermantasyon Yöntemi ile *Bacillus Licheniformis* ATCC 14580'den Proteaz Üretimi Üzerine Bazı Parametrelerin Araştırılması. Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Diyarbakır, 88s.
- KILIÇ, N., 2017. *Penicillium expansum* Fungusunun farklı NaCl Ortamlarında Fizyolojik ve Biyokimyasal Parametrelerinin İncelenmesi. Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Şanlıurfa, 52s.
- KILINÇ, N., 2018. Buğday Yaprak Leke Hastalığı *Zymoseptoria tritici* Desm. Quaedvlieg ve Crous Patojeninin Farklı İzolatlarının Biyokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi. Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Şanlıurfa, 68s.
- KİM, Y.K. and XIAO, C.L., 2008. Distribution and Incidence of Sphaeropsis Rot in Apple in Washington State. *Plant Diseases*, 92:940-946.

- KLINGEBERG, M., GALUNSKY, B., SJOHOLM, C., KASCHE, V. and ANTRANIKIAN, G., 1995. Purification and properties of a highly thermostable, sodium dodecyl sulfateresistant and stereospecific proteinase from the extremely thermophilic archaeon *Thermococcus stetteri*. *Apply Environment Microbiology*, 61:3098-3104.
- KORCAN, S.E., ÖZKARA, A., AKYIL, D., CİĞERCİ, İ.H. and KONUK, M., 2007. Farklı Fungus Cinslerinde Endüstriyel Öneme Sahip Bazı Enzim Aktivitelerinin İncelenmesi. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 7(1): 279-286.
- KUMAR, S., SHARMA, N.S., SAHARAN, M.R. and SINGH, R., 2005. Extracellular Acid Protease From *Rhizopus oryzae*: Purification and Characterization. *Process Biochemistry*, 40:1701-1705.
- LIN, W.H. and LI, C.S., 2000. Associations of fungal aerosols, air pollutants and meteorological factors. *Aerosol Sci. Technol*, 32:359-368.
- MACCHERONI, W., ARAUJO, W.L. and AZEVEDO, J.L., 2004. Ambient pH-regulated Enzyme Secretion in Endophytic and Pathogenic Isolates of the Fungal Genus *Colletotrichum*. *Scientia Agricola*, 61(3): 298-302.
- MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M. and PARKER, J., 1997. *Brock Biology of Microorganisms*. Eight Edition. Prentice Hall, International, Inc.
- MANJEET, K., DHILLON, S., CHAUDHARY, S. and SINGH R., 1998. Production, purification and characterization of a thermostable alkaline protease from *Bacillus polymyxa*. *Indian. J. Microbiol*, 38: 63-67.
- MARTINS, L.O., SOARES, C.M., PEREIRA, M.M., TEIXEIRA, M., COSTA, T. and JONES, G.H., 2002. Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *J. Biol Chem*, 277(21):18849-59.
- MAYER, A.M. and STAPLES, R.C., 2002. Laccase: New functions for and old enzyme, *Phytochemistry*, 60:551-565.
- MECHICHİ, T., MHİRİ, N. and SAYADI, S., 2006. Remazol Brilliant Blue R decolourization by the laccase from *Trametes trogii*, *Chemosphere*, 64:998-1005.
- MEHLER, H.A., 1957. *Introduction to Enzymology*, Academic Press Inc. New York.
- MEHROTRA, S., PANDEY, P.K., GUAR, R. and DARMWAL, N.S., 1999. The production of alkaline protease by a *Bacillus* species isolate. *Bioresource Technology*, 67:201-203.
- MIEDES, E. and LORENCES, E.P., 2006. Changes in cell wall pectin and pectinase activity in apple and tomato fruits during *Penicillium expansum* infection. *J. Sci. Food Agric*, 86:1359-1364.
- MINUSSI, R.C., MIRANDA, M.A., SILVA, J.A., FERREIRA, HIROSHI, AOYAMA, C.V., MARANGONI, S., ROTILIO, D., PASTORE, G.M. and DURAN, N., 2007. Purification, characterization and application of laccase from *Trametes versicolor* for colour and phenolic removal of olive mill wastewater in the presence of 1-hydroxybenzotriazole, *Afr. J. Biotechnol*, 6: 1248-1254.
- MINUSSI, R.C., PASTORE, M.N. and DURAN, N., 2002. Potential applications of laccase in the food industry. *Trends Food Sci. Technol*, 13:205-216.

- MİTRA, P., CHAKRAVERTY, R. and CHANDRA, A., 1996. Production of proteolytic enzymes by solid state fermentation. *J Sci Ind Res* 1996:55: 439-42.
- MOORE, D. and CHIU, S.W., 2001. Fungal products as food. *Fungal Diversity Press: Hong Kong*, 233-251p.
- MORE, E.E., RENUKA, P.S., PRUTHI, K., SWETHA, M., MALINI, S. and VEENA, S.M., 2011. Isolation, Purification and Characterization of Fungal Laccase from *Pleurotus* sp. *SAGE-Hindawi Access to Research Enzyme Research, Artivle*. 31p.
- MUCHERJEE, A.K., ADHIKARI, H., RAI, S.K., 2008. Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid state fermentation (SSF) condition using imperate *Cylindrica* gres and potato peel as low-cost medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulation, *Journal Biochemical Engineering*, 39: 353-361.
- MUTLU, G., İMİR, T., CENGİZ, T.A., USTAÇELEBİ, Ş., TÜMBAY, E. ve METE, Ö., 1999. Mantarların yapıları, üreme özellikleri ve sınıflandırılması (Ş. USTAÇELEBİ editör). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, 1. baskı, Güneş Kitabevi, Ankara, 1015-1021s.
- NAJAFİ, M.F. and DEOBAGKAR, D., 2005. Purification and characterization of an extracellular α -amylase from *Bacillus subtilis* AX20. *Electronic Journal Biotechnology*, 8:197-203.
- NDUWIMANA, J., GUENET, L., DORVAL, I., BLAYAU, M., LE GALL, J.Y. and LE TREUT, A., 1995. Proteases. *Annual Biology Clinec*, 53:251-264.
- ÖZGÖNEN, H., 2009. *Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi*, Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü 32260, Isparta, Türkiye.
- ÖZKAN, E., 2010. Fungal Kaynaklı Proteaz Üretimi. *Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Edirne*, 64s.
- PALMIERİ, G., BIANCO, C., CENNAMO, G., GIARDINA, P., MARINO, G., MONTI, M. and SANNA, G., 2001. Purification, characterization and functional role of a novel extracellular protease from *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbial*, 67:2754-2759.
- PANDEY, A., SEKARAN, M. and RENUVATHANI, M., 2006. Productivity of laccase in solid substrate fermentation of selected agro-residues by *Pycnoporus sanguineus*. *Bioresource Technology*, 97(1):171-177.
- PAPER, J.M., SCOTT CRAIG, J.S., ADHIKARI, N.D., CUOMO, C.A. and WALTON, J.D., 2007. 'Comparative proteomics of extracellular proteins in vitro and in planta from the pathogenic fungus *Fusarium graminearum*', *Proteomics*, 7(17):3171-3183.
- PITT, J.I. and HOCKING, A.D., 2000. *Fungi and Food Spoilage Vol. II*, ed. Pitt, J.I. and Hocking, A.D. Blackie Academic and Professional, London. 15-45p.
- POLGAR, L., 1989. Mechanisms of protease action. *CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida*. Pgs. 43-76.
- RAO, M.B., TANKSALE, A.M., GHATGE, M.S. and DESHPANDE, V.V., 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology*, 62:597-635.
- REVANKAR, M.S. and LALE, S.S., 2006. Enhanced production of laccase using a new isolate of white rot fungus WR-1, *Process. Biochem*, 41:581-588.

- RİFAAT, H.M., HASSANEİN, S.M., EL-SAİD, O.H., SALEH, S.A. and SELİM, M.S.M., 2005. Purification and Characterization of Extracellular Neutral Protease From *Streptomyces microflavus*. *Arap Journal Biotechnology*, 9(1): 51-60.
- RİVA, S., 2006. Laccases, blue enzymes for green chemistry, *Trends Biotechnol*, 24: 219-226.
- ROLLİNS, J.A., 2003. The *Sclerotinia sclerotiorum* pac1 Gene Is Required for Sclerotial Development and Virulence. *The American Phytopathological*, 16(9):785-795.
- ROSENBERGER, D.A., 1997. Compendium of Apple and Pear Diseases. Pages 53-56 in: *Postharvest Diseases*. A.L., Jones and H.S., Aldwinele, eds. APS Pres, Minnesota, 100p.
- SALLEH, A.B., 2006. Protease: Introduction. Editörler: Salleh, A.B., Rahman, R.N.Z.R.A., BASRI, M. *New Lipases and Proteases*. Nova Bimedical. New York, 23-39p.
- SCHENK, P.M., KAZAN, K., WILSON, I., ANDERSON, J.P., RICHMOND, T., SOMERVILLE, S.C. and MANNERS, J.M., 2000. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 97:11655-11660.
- SEİDL, M., 2006. Industrial uses of fungi. *The Enviromental Reporter*, 4-9p.
- SEVİNÇ, N., 2010. Türkiye Topraklarından İzole Edilen *Bacillus* Suşlarından Proteaz Üretimi, Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. Bursa, 116s.
- SHANKAR, S., RAO, M. and LAXMAN, R., 2011. Purification and Characterization of an Alkaline Protease by a New Strain of *Beauveria* sp. *Process Biochemistry*, 46:579-585.
- SİNGH, D., SHARMA, R.R., 2007. *Postharvest Diseases of Fruit and Vegetables and Their Management* In: Prasad, D. (Ed). *Sustainable Pest Management*, Daya Publishing House, New Delhi. India, 87-98p.
- SNOWDAN, A.L., 1991. *A Colour Atlas of Postharvest Diseases and Disorders of Fruit and Vegetables*. General Introction and Furits. Wolfe Scientific Ltd, 11-53p.
- SOROUR, J. and LARİNK, O., 2001. Toxic Effects of Benomyl on the Ultrastructure During Spermatogenesis of the Earthworms *Eisenia fetida*. *Exotoxicology and Environmental Safety*, 50:180-188.
- SRIVASTAVA, M. K. and DWIVEDI, U. N., 2000. Delayed ripening of banana fruit by salicylic acid. *Plant Sci.*, 158:87-96.
- SUGAR, D. ve BASİLE, S.R., 2008. Timing and sequence of postharvest fungicide and biocontrol agent applications for control of pear decay. *Postharvest Biology and Technology* 49:107-112.
- SZCZERBANİK, M., JOBLİNG, J., MORRİS, S., HOLFORD, P., 2007. Essential Oil Vapours Control Some Common Postharvest Fungal Pathogens. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 47: 103-109.
- TANNOUS, J., ATOUİ, A., KHOURY, A.E., FRANCİS, Z., OSWALD, I.P., PUEL, O. and LTEİF, R., 2016. A study on the physicochemical parameters for *Penicillium expansum* growth and patulin production: effect of temperature, pH, and water activity. *Food Science and Nutrition*, 4(4):611–622

- TEMUR, C., 2012. Elmalarda Hasat Sonu Çürüklüğü Oluşturan *Penicillium expansum*'un Işınlama ve Işınlama Sodyum Karbonat Kombine Uygulamasıyla Engellenmesi Üzerine Araştırmalar. Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Kayseri, 85s.
- TİRYAKİ, O., 1990. Inhibition of *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerae*, *Rhizopus stolonifer* and *Alternaria tenuissima*, Which were Isolated from Ankara Pears, by Gamma Irradiation. *Journal of Turkish Phytopatology*, 19(3): 133-140.
- TİRYAKİ, O., AYDIN, G., GÜRER, M., 1994. Postharvest Disease Control of Apple, Quince and Peach, with Radiation Treatment. *Journal of Turkish Phytopatology*, 23(3):143-152.
- TOPAL, Ş., PEMBEÇİ, C. and BORCAKLI, M., 2000. Türkiye'nin Tarımsal Mikoflorasının Endüstriyel Öne Sahip Bazı Enzimatik Aktivitelerinin İncelenmesi-I: Amilaz, Proteaz, Lipaz, *Türk J. Biol*, 24:79-93.
- TROUTT, C., LEVETIN, E., 2001. Correlation of spring spore concentrations and meteorological conditions in Tulsa, Oklahoma. *Int J. Biometeorol* 45:64-74.
- TÜRKKAN, M., 2013. Antifungal Effect of Various Salts Against *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*, the Causal Agent of *Fusarium* Basal Rot of Onion. *Journal of Agricultural Sciences*, 19:178-187.
- UNNİKRIŞNAN, V. and NATH, B.S., 2002. Hazardous Chemical in Foods. *Indian Journal of Dairy Biosciences*, 11:155-158.
- VENTURUNİ, M.I., BLANCO, D. and ORÍA, R., 2002. In vitro Antifungal Activity of Several Antimicrobial Compounds Against *Penicillium expansum*. *Journal of Food Protection*, 65:834-839.
- VİJAYANAND, S., HEMAPRIYA, J., SELVIN, J. and KİRAN, S., 2010. Production and Optimization of Haloalkaliphilic Protease by an Extramophile *Halobacterium* Sp. Js1, Isolated From Thalassohaline Environment. *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 5(1): 44-49.
- WANG, J.W., WU, J.H., HUANG, W.Y. and TAN, R.X., 2006. Laccase production by *Monotropa* sp., an endophytic fungus in *Cynodon dactylon*. *Bioresour Technol*, 97:786-789.
- WARD, O.P., 1991. Enzyme Bioprocessing Applications. In *Bioprocessing*, edited by O.P. WARD, (Open University Press, Buckingham, 151-170p.
- WAWRA, S., DJAMEİ, A., ALBERT I, N.U., RNBERGER, T. and KAHRAMAN, R., 2013. In vitro translocation experiments with RxLR-reporter fusion proteins of Avr1b from *Phytophthora sojae* and AVR3a from *Phytophthora infestans* fail to demonstrate specific autonomous uptake in plant and animal cells. *Mol Plant Microbe Interact* 26:528-536.
- WU, Y.Y., WANG, H.X. and Ng, T.B., 2011. A Novel Metalloprotease from The Wild Basidiomycete Mushroom *Lepista nuda*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(3):256-262.
- XIAO, J.F., DAVIS, K.J., URBAN, N.M., KELLER, K. and SALIENDRA, N.Z., 2011. Upscaling carbon fluxes from towers to the regional scale influence of parameter variability and land cover representation on regional flux estimates. *Agricultural and Forest Meteorology*, 197:142-157.

- YAROLOV, A.I., SKOROBGATKO, O.V., VARTANOV, S.S. and VARFOLOMEYEV, S.D., 1994. Laccase properties, catalytic mechanism and applicability, *Appl. Biochem. Biotechnol*, 49:257-280.
- YILMAZ, A., 2012. Bazı Bitki Uçucu Yağlarının Hasat Sonrası Fungal Meyve Çürüklüğü Etmenlerine Karşı In vitro ve In vivo Etkilerinin Araştırılması. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Konya, 171s.
- YİĞİT, F., 2011. *Trichoderma harzianum* T22 Irkının Farklı pH ve Tuz Konsantrasyonlarına Adaptasyonu ve Domateste *Fusarium oxysporum* f.sp. *Radicis lycopersici*'in Biyolojik Kontrolünde Kullanılması. Selçuk Üniversitesi, Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 25(4): 6-10.
- ZAMBAREİ V., NİLEGAONKAR, S. and KANEKAR, P., 2010. A Novel Extracellular Protease From *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: Enzyme Production and Its Partial Characterization. *New Biotechnology*, 00: 00.
- ZEEBROECK, M.V., LİNDEN, V.V., RAMON, H., BAERDEMAEKER, J.D., NİCOLAI, B.M. and TİJSKENS, E., 2007. Impact damage of apples during transport and handling, *Review, Postharvest Biology and Technology* 45:157-167.
- ZHAN, J. and MCDONALD, B.A., 2013. Experimental measures of pathogen competition and relative fitness. *Annu. Rev. Phytopathol*, 51:131-153.
- ZHANG, M., WU, F., WEİ, Z., XİAO, Y. and GONG, W., 2006. Characterization and decolorization ability of a laccase from *Panus rudis*, *Enzyme Microbial Technol*, 39:92-97.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Gülbahar KILIÇ
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Şanlıurfa 06.04.1992
Telefon : 0541 733 86 97
e-mail : gulbahar199263@hotmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: H. Sebiha Özlek Lisesi, Merkez-Şanlıurfa	2010
Üniversite	: Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Merkez-Şanlıurfa	2015
Yüksek Lisans	: Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Merkez-Şanlıurfa	2019

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2018	BELTUR Sos. Hiz. Kül. Tur. San. ve Tic. Anonim	İnsan Kaynakları Yönetimi Meslek Elemanı

UZMANLIK ALANI

Bitki Koruma Fitopatoloji

YABANCI DİLLER

İngilizce