

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Trichoderma reesei 1A MUTANT SUŞUNDA
PEKTİNAZ İNDÜKSİYONUNUN İNCELENMESİ

Biyolog Burçin ALEV

**FBE Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programında
Hazırlanan**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı : Prof. Dr. İnci ARISAN (YTÜ)

İSTANBUL, 2011

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	v
KISALTMA LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
ÇİZELGE LİSTESİ	viii
ÖNSÖZ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
2. PEKTİN	3
3. PEKTİNAZ	8
3.1 Protopektinaz	11
3.2 Poligalakturonaz	11
3.3 Liyaz	11
3.4 Pektinesteraz	12
4. <i>Trichoderma reesei</i>	14
4.1 <i>Trichoderma</i> 'nın Keşfi	14
4.2 Taksonomisi	14
4.3 Misel Morfolojisi	15
4.4 Mikroskobisi	16
5. <i>Trichoderma reesei</i> ' DE D-GALAKTURONİK ASİTİN KATABOLİZMASI ...	17
6. <i>Trichoderma reesei</i> 'nin ENDÜSTRİYEL SUŞLARI ve BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALARI	20
7. PEKTİNAZIN ENDÜSTRİYEL KULLANIM ALANLARI	21
7.1 Meyve Suyu Üretimi	21
7.2 Tekstil İşlemleri ve Pamuk Liflerinin Biyolojik Olarak Pişirilmesi	21
7.3 Atık Su Arıtımı	22
7.4 Kahve ve Çay Fermentasyonu	22
7.5 Kağıt ve Kağıt Hamuru Sanayi	22
7.6 Hayvan Yemi	22

7.7	Bitki Virüslerinin Saflaştırılması.....	23
7.8	Yağ Ekstraksiyonu.....	23
7.9	Kırmızı Şarabın Dayanıklılığı ve Renginin Düzeltilmesi.....	23
7.10	Protoplast İzolasyonu.....	23
8.	MATERYAL VE METOD.....	25
8.1	Çalışmada Kullanılan Küf Suşları	25
8.2	Kullanılan Cihazlar	25
8.3	Kullanılan Kimyasal Maddeler	26
8.4	Kullanılan Çözeltiler.....	27
8.4.1	50xİz Elementi Çözeltisi.....	27
8.4.2	Bradford Reaktifi	27
8.4.3	DNS Reaktifi	27
8.4.4	Sodyum Asetat Tamponu	28
8.4.5	2,5M NaOH Çözeltisi	28
8.5	Kültür Ortamı.....	28
8.5.1	Patates Dekstroz Agar (PDA).....	28
8.5.2	MA sıvı besiyeri (Mandels ve Andreotti,1978).....	29
8.6	İnokulumun Spor Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	29
8.7	İnokulumun Hazırlanması	30
8.8	Kuru Misel Ağırlığının Belirlenmesi.....	31
8.9	Hücre Dışı Spesifik Enzim Aktivitesinin Belirleneceği Numunelerin Eldesi	31
8.10	Bradford Metoduna Göre Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	31
8.11	Protein Standart Eğri Grafiğinin Çizilmesi.....	32
8.12	Hücre Dışı Spesifik Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	33
8.13	D-Galakturonik Asit Standart Eğri Grafiğinin Çizilmesi	34
8.14	Pektinin Farklı Konsantrasyonlarının <i>Trichoderma reesei</i> QM9414'de Pektinaz Üretimine Etkisinin Saptanması	35
8.15	Glukozun Farklı Konsantrasyonlarının <i>Trichoderma reesei</i> QM9414'de Pektinaz Üretimine Etkisinin Saptanması	35
8.16	Gliserolün Farklı Konsantrasyonlarının <i>Trichoderma reesei</i> QM9414'de Pektinaz Üretimine Etkisinin Saptanması	36
8.17	Pektinin Farklı Konsantrasyonlarının <i>Trichoderma reesei</i> 1A mutantında Pektinaz Üretimine Etkisinin Saptanması	36
8.18	Glukozun Farklı Konsantrasyonlarının <i>Trichoderma reesei</i> 1A mutantında Pektinaz Üretimine Etkisinin Saptanması	36
8.19	Gliserolün Farklı Konsantrasyonlarının <i>Trichoderma reesei</i> 1A mutantında Pektinaz Üretimine Etkisinin Saptanması	36
8.20	Protein Miktarının Hesaplanması	37
8.21	Enzim Aktivitesinin Hesaplanması.....	37
8.22	Spesifik Aktivitenin Hesaplanması.....	37
8.23	Pektinazın Kısmi Saflaştırılması	37
8.23.1	<i>Trichoderma reesei</i> 1A Mutant Suşunda Pektinaz Eldesi	37
8.23.2	Amonyum Sülfat Çöktürmesi	38
8.23.3	<i>Trichoderma reesei</i> 1A Mutant Pektinazını Çöktüren Uygun Amonyum Sülfat Konsantrasyonunun Saptanması.....	38
8.23.4	Aseton ve Etanol Çöktürmesi	39
8.23.5	<i>Trichoderma reesei</i> 1A Mutant Pektinazını Çöktüren Uygun Aseton ve Etanol Konsantrasyonunun Saptanması.....	39

8.24	Ekspresyon Vektörünün Oluşturulması ve <i>Trichoderma reesei</i> suşuna Transformasyonu	39
9.	SONUÇ ve TARTIŞMA	40
9.1	Sonuçlar	40
9.1.1	Suşların Karbon Kaynağı Olarak Glukoz İçeren MA Sıvı Besiyerindeki Üreme Davranışları.....	40
9.1.2	Suşların Karbon Kaynağı Olarak Gliserol İçeren MA Sıvı Besiyerindeki Üreme Davranışları.....	40
9.1.3	Pektinin Farklı Konsantrasyonlarının <i>Trichoderma reesei</i> 1A mutantında Pektinaz Üretimine Etkisi.....	41
9.1.4	Glukozun Farklı Konsantrasyonlarının <i>Trichoderma reesei</i> 1A Mutantında Pektinaz Üretimine Etkisi	42
9.1.5	Gliserolün Farklı Konsantrasyonlarının <i>Trichoderma reesei</i> 1A Mutantında Pektinaz Üretimine Etkisi	44
9.1.6	<i>Trichoderma reesei</i> 1A Mutant Pektinazının Kısmi Saflaştırılması.....	45
9.2	Tartışma	48
	KAYNAKLAR.....	50
	ÖZGEÇMİŞ.....	57

SİMGE LİSTESİ

Δ	Delta
μm	Mikrometre
μmol	Mikromol
A	Absorbans
C	Konsantrasyon
g	Gram
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mm^3	Milimetreküp
nm	Nanometre
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
ppm	Milyonda bir birim
v/v	Hacimce yüzde
w/v	Kütle/hacimce yüzde
α	Alfa
β	Beta

KISALTMA LİSTESİ

ATP	Adenozin trifosfat
DAC	Asetilasyon derecesi
DHA	Dihidroksi aseton
DM	Metilasyon derecesi
DNS	Dinitrosalisilik asit
E.C.	Enzim komisyonu
GAR1	D-galakturonat redüktaz
GLD1	Gliseraldehit redüktaz
HG	Homogalakturnik asit zinciri
LGA1	L-treo-3-deoksi-heksuloseonat aldolaz
LGD1	L-galaktonat dehidrataz
MA	Mandels ve Andreotti sıvı besiyeri
Mbp	Mega baz çifti
M _A	Molekül kütlesi
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotit
NADP	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
PDA	Patates dekstroza agar
PE	Pektinesteraz
PG	Poligalakturnaz
PGL	Poligalakturnat liyaz
PL	Pektin liyaz
PMGL	Polimetilgalakturnat liyaz
RG-I	Ramnogalakturnik asit zinciri-I
RG-II	Ramnogalakturnik asit zinciri-II
rpm	Dakikadaki devir sayısı
sp.	Tür
spp.	Türler
t	Zaman
U	Enzim ünitesi

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1.1	Pektik maddelerin birbirleri arasındaki ilişki ve yıkımı.....1
Şekil 2.1	Bitki hücre duvarının şematik görüntüsü..... 3
Şekil 2.2	Pektinin yapısında yer alan polisakkaritlerin şematik görüntüsü 7
Şekil 3.1	Pektinazların etki mekanizması 8
Şekil 4.1	<i>Trichoderma reesei</i> sporlarının mikroskop görüntüsü 16
Şekil 5.1	<i>T. reesei</i> 'de D-galakturonat metabolizmasının şematik gösterimi 17
Şekil 5.2	<i>T. reesei</i> 'deki D-galakturonat ve olası gliserol metabolizmasının glikoliz ile ilişkisinin şematik gösterimi 19
Şekil 8.1	Spor sayımında kullanılan thoma lamı 30
Şekil 8.2	Bovın serum albumin (BSA) standart grafiği 32
Şekil 8.3	D-galakturonik asit standart grafiği 35
Şekil 9.1	<i>Trichoderma reesei</i> 1A mutantının %1 (w/v)'lik pektin içeren ortamdaki spesifik pektinaz aktivitesi..... 41
Şekil 9.2	<i>Trichoderma reesei</i> 1A mutantının %10 (w/v)'luk pektin içeren ortamdaki spesifik pektinaz aktivitesi..... 42
Şekil 9.3	<i>Trichoderma reesei</i> 1A mutantının %1 (w/v)'lik glukoz içeren ortamdaki spesifik pektinaz aktivitesi..... 43
Şekil 9.4	<i>Trichoderma reesei</i> 1A mutantının %10 (w/v)'luk glukoz içeren ortamdaki spesifik pektinaz aktivitesi..... 43
Şekil 9.5	<i>Trichoderma reesei</i> 1A mutantının %1 (w/v)'lik gliserol içeren ortamdaki spesifik pektinaz aktivitesi..... 44
Şekil 9.6	<i>Trichoderma reesei</i> 1A mutantının %10 (w/v)'luk gliserol içeren ortamdaki spesifik pektinaz aktivitesi..... 45
Şekil 9.7	Glukozlu ortamda farklı çöktürme yöntemleriyle elde edilen spesifik pektinaz aktivitesinin karşılaştırılması 47
Şekil 9.8	Gliserollü ortamda farklı çöktürme yöntemleriyle elde edilen spesifik pektinaz aktivitesinin karşılaştırılması 47

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2.1 Bazı sebze ve meyvelerin pektin içeriği	4
Çizelge 2.2 Bitki hücre duvarında bulunan pektik maddelerin kimyasal özellikleri	5
Çizelge 3.1 Pektinolitik enzimlerin yaygın sınıflandırılması.....	10
Çizelge 8.1 DNS yöntemi ile pektinaz aktivitesi ölçümü	34
Çizelge 9.1 %10'luk glukoz içeren besiyerinde QM9414 ve 1A mutant suşunun üreme davranışı.....	40
Çizelge 9.2 %10'luk gliserol içeren besiyerinde QM9414 ve 1A mutant suşunun üreme davranışı	41
Çizelge 9.3 %10 glukoz içeren besiyerinde 1A mutant suşundan elde edilen pektinazın kısmi saflaştırılması.....	46
Çizelge 9.4 %10 gliserol içeren besiyerinde 1A mutant suşundan elde edilen pektinazın kısmi saflaştırılması.....	46

ÖNSÖZ

Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı başkanı ve yüksek lisans eğitimim süresince danışmanlığımı üstlenen, her konuda bana destek olan saygı değer hocam Prof. Dr. İnci Arısan'a,

Tez çalışmam süresince yardımları ve destekleri için Doç. Dr. Ayşegül Peksel'e, Arş. Gör. Nilay Altaş Kıymaz'a, Uzm. Dr. Neşe Atacı'ya, M.Sc. öğrencisi Ayşe Akan'a,

Çalışmalarım boyunca görüşlerinden yararlandığım, güvenini ve yardımlarını esirgemeyen Ph.D. öğrencisi Mete Bora Tüzüner'e

Hiçbir zaman desteğini ve sevgisini benden esirgemeyen değerli aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

Viyana Teknik Üniversitesi'nden temin edilen *Trichoderma reesei* 1A mutantının pektinaz üretimine, farklı karbon kaynaklarının ve bunların farklı konsantrasyonlarının etkisi araştırıldı. Modifiye edilmiş Mandel's ve Andreotti (1978) sıvı besiyerine karbon kaynağı olarak %1 (w/v) ve %10 (w/v) konsantrasyonlarında pektin, glukoz ve gliserol ilave edildi. İndüksiyon seviyesini karşılaştırmak için kontrol olarak *Trichoderma reesei* QM9414 suşu kullanıldı. İnkübasyon sırasında besiyerlerinden belirli zaman aralıklarında alınan numunelerde pektinaz aktivitesi ve protein miktarları ölçüldü. Yapılan çalışmalar sonunda en yüksek aktivite 96. saatte konsantrasyonu %10 (w/v) olan glukoz ve gliserol içeren ortamda görüldü. %10 (w/v) glukoz içeren ortamda spesifik aktivite 0,50 U/mg ve %10 (w/v) gliserol içeren ortamda spesifik aktivite 0,49 U/mg olarak bulundu. Bu besiyerlerinde üretilen pektinaz amonyum sülfat, aseton ve etanol ile kısmi olarak saflaştırıldı. En yüksek saflık düzeyi gliserollü ortamda %80 etanol ile yapılan çöktürmeyle elde edildi. Pektinaz ham enzime göre 33.43 kat saflaştırıldı. Elde edilen sonuçlar 1A mutantının pektinaz üretim kapasitesinin kontrole göre yüksek olduğunu ve kısmi olarak daha yüksek seviyelerde saflaştırılabildiğini göstermiştir. Ancak *Trichoderma reesei*'nin 1A suşunun endüstriyel mutant suşu olarak kabul görebilmesi için ileri düzey çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: *Trichoderma reesei*, pektinaz, rekombinant, indüksiyon

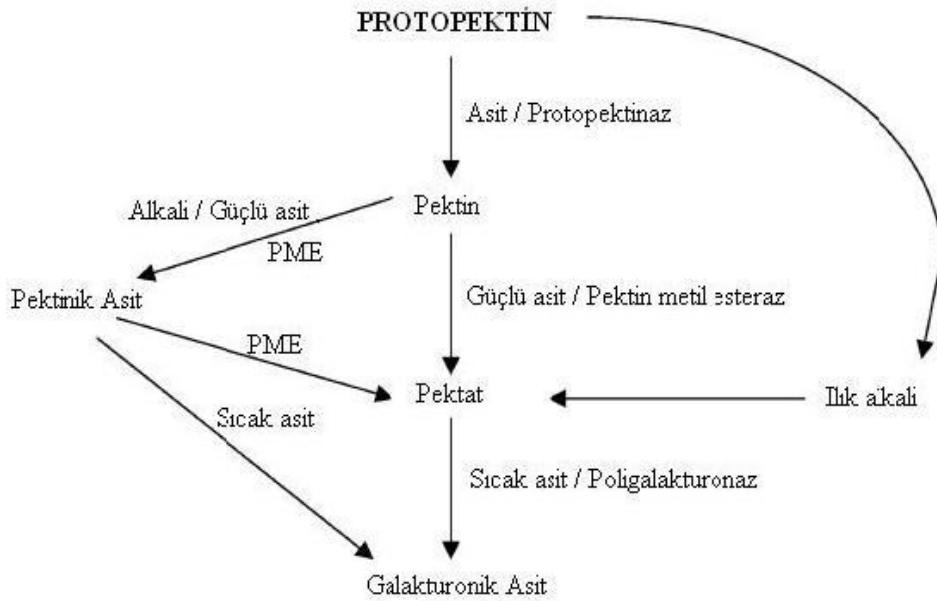
ABSTRACT

Effects of different carbon sources and concentrations on pectinase production of mutant *Trichoderma reesei* 1A, which were obtained from The Vienna University of Technology, were investigated. Pectine, glucose and glycerol at 1% (w/v) and 10% (w/v) concentrations were added to the modified Mandel's and Andreotti (1978) medium as carbon sources. *Trichoderma reesei* QM9414 strains were used as a control for comparing induction levels. During the incubation, samples were taken from medium at specific time intervals for measurement of protein amounts and pectinase activity. As a result, highest activities were determined at 96. h where glucose and glycerol containing mediums' concentrations were 10% (w/v). Specific activities in 10% (w/v) glucose medium and 10% (w/v) glycerol medium were measured 0,50 U/mg and 0,49 U/mg, respectively. Pectinase, which was produced in these mediums, was partially purified with ammonium sulfate, acetone and ethanol. The highest purification rate was achieved from precipitation with 80% ethanol in glycerol medium. 33,43 fold purified pectinase was obtained, compared to crude enzyme. Results show us, pectinase production capacity of mutant 1A is higher than control and mutant 1A pectinase can be partially purified at higher rates. However, further studies needed for *Trichoderma reesei* 1A strain to be accepted as an industrial mutant strain.

Key words: *Trichoderma reesei*, pectinase, recombinant, induction

1. GİRİŞ

Pektin, bitkilerin primer hücre duvarında ve orta lamelinde bulunan yapısal bir polisakkarittir. Bu maddeler büyük oranda galakturonik asit birimlerinden oluşan karmaşık, kolloidal karbonhidrat türevlerinden meydana gelmektedir. Yüksek su tutma kapasitesine sahiptirler. Pektik maddeler düz bir zincir yapmak üzere birbirleriyle α -(1-4) bağı yapan galakturonik asit birimlerinden oluşmaktadır. Pektin; protopektin, pektik asit, pektinik asit ve bunların tuzlarından oluşan pektik maddelere verilen genel bir isimdir. Bu sınıflandırma ana zincir üzerindeki modifikasyonların tipine göre yapılmaktadır. Protopektin, pektik maddelerin temeli olup hidrolizi sonucu pektin ve pektinik asite dönüşmektedir. Pektik asit, metil ester grupları içermezken pektinik asit metil gruplarıyla esterleşmiş pektik maddelerdir. Pektin, ise pektinik asite benzer olup farklı kompozisyonunda olan bir grup maddedir. Pektik maddeler ‘pektik enzimler’ tarafından doğal olarak parçalanmaktadır. Bunların birbirlerine dönüşümü Şekil 1.1’de gösterilmiştir.



Şekil 1.1 Pektik maddelerin birbirleri arasındaki ilişki ve yıkımı

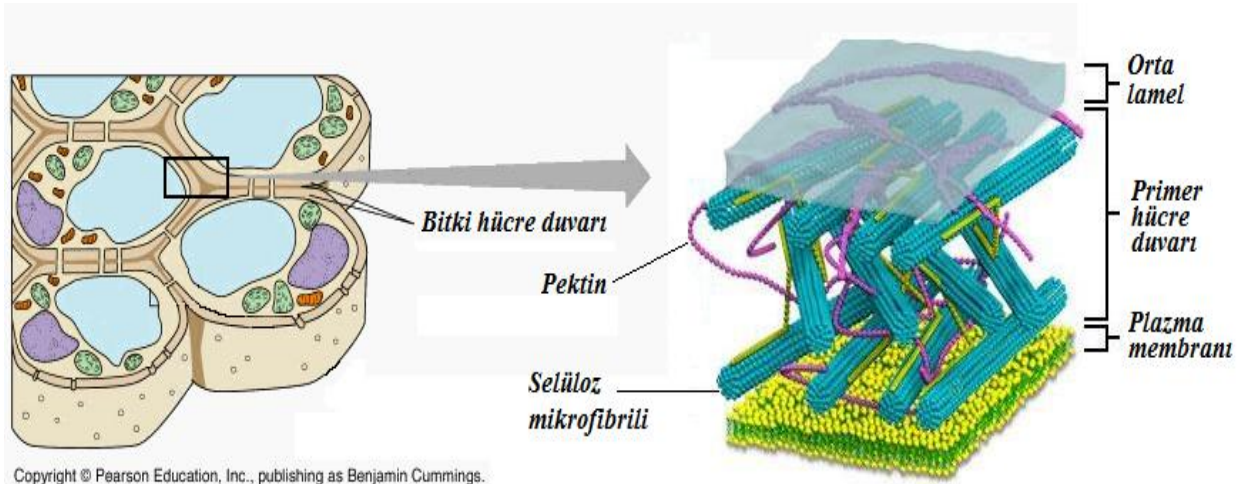
Pektinazlar, pektik maddeleri depolimerizasyon ve esterifikasyon reaksiyonlarıyla parçalayan enzim grubudur. Bu enzimler etki ettikleri substratlara ve etki mekanizmalarına göre sınıflandırılır. Protopektinazlar, poligalakturonazlar, liyazlar ve pektinesterazlar bu gruba dahil enzimleri oluşturur. Pektik enzimler bakteri, mantar, böcek, nematod ve protozoada bulunmaktadır. Mikrobiyal olarak pektinin yıkımı bitki patojenitesinde, simbiyotik yaşamda, bitkisel dokuların çürümesinde, bitkisel besinlerin sindiriminde önemli rol oynamaktadır. Endüstriyel düzeyde mikrobiyal kaynaklı üretilen pektinaz gıda, tekstil, kağıt, hayvan yemi, atıksu bertarafı gibi proseslerde başarıyla kullanılmaktadır. Endüstride bu denli kullanım alanına sahip olmasından dolayı kaynak arayışları devam etmektedir. *Trichoderma reesei* toprakda yaygın olarak bulunan filamentöz bir mantardır. Çok gelişmiş bir protein üretim ve salgılama mekanizmasına sahiptir. Günümüzde gelişen moleküler biyoloji teknikleri sayesinde genetik modifikasyonlar yapılarak istenilen proteinin sentezlenmesi sağlanmaktadır.

Bu çalışmada Viyana Teknik Üniversitesi, Uygulamalı Biyokimya ve Gen Teknolojisi Araştırma Merkezi'nden temin edilen *Trichoderma reesei* 1A mutantının pektinaz üretim seviyeleri araştırıldı. 1A mutant suşu 4 pektinaz geni ve güçlü bir promotör içermektedir. Farklı karbon kaynaklarının ve farklı konsantrasyonlarının pektinaz genlerinin indüksiyonunu etkileyip etkilemediğini gözlemlemek için 1A mutant suşunda üretilen enzim seviyeleri, kontrol suşu olarak kullandığımız *Trichoderma reesei* QM9414 ile karşılaştırılmıştır.

2. PEKTİN

Bitki hücre duvarı polisakkaritleri olan pektin, selüloz, hemiselüloz; depo polisakkaritleri olan nişasta ve galaktomannan; hücrede jelleştirici ajan olan reçine ve müsilağ ile fizyolojik bilgileri ileten antijen gibi yapısı farklı biyopolimer grupları hücrenin önemli bileşenlerindendir (Tharanathan, v.d., 1987). Bitki polisakkaritleri yapısal özelliklerinden kaynaklanan su bağlama kapasiteleri nedeniyle hücrede depolamada, enerji transferinde ve hücre-doku bütünlüğünün sağlanmasında görev alırlar. Yapısal farklılıklar gösteren hücre duvarı polisakkaritlerinin insan beslenmesi üzerine de çeşitli etkileri vardır (Aman ve Westerlund, 1996). Bu polisakkaritler yiyeceklerle alınan diğer diyet bileşenlerinin kullanımını düzenlemektedir. Son zamanlarda bitki polisakkaritlerinin biyoaktif özellik gösteren doğal ürünler olduğu ortaya çıkmıştır. Biyoaktif hücre duvarı komponentleri gen ekspresyonunu ve konak savunma mekanizmasını düzenleyebilmektedir (Ridley vd., 2001).

Mezokarp denilen meyvenin yenilebilir etli kısmı ince çeperli depo parenkima hücrelerinden oluşmaktadır (50 -500 μm). Bu hücrelerin polisakkarit ve proteinlerin oluşturduğu kompleks bir yapıdan oluşan hücre duvarları vardır. Bu hücre duvarı dokuya mekanik bir direnç sağlamaktadır. Bitki hücre duvarında pektin molekülünün yan zincirleri protein, hemiselüloz ve selüloza bağlanmıştır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Bitki hücre duvarının şematik görüntüsü
(Carpita ve McCann, 2000'den modifiye edilmiştir)

Primer hücre duvarı %35 pektin, %25 selüloz, %20 hemiselüloz ve %10 yapısal proteinlerden oluşmaktadır (Brownleader vd., 1999). Buna göre bitkilerin taze ağırlığının % 0,5 - 4,0'ünü pektik maddeler oluşturur (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1 Bazı sebze ve meyvelerin pektin içeriği (Jayani vd.,2005)

Sebze/Meyve	Doku	Pektik madde (%)
Elma	Taze	0,5 – 1,6
Muz	Taze	0,7 – 1,2
Şeftali	Taze	0,1 – 0,9
Çilek	Taze	0,6 – 0,7
Kiraz	Taze	0,2 – 0,5
Bezelye	Taze	0,9 – 1,4
Havuç	Kuru madde	6,9 – 18,6
Portakal posası	Kuru madde	12,4 – 28,0
Patates	Kuru madde	1,8 – 3,3
Domates	Kuru madde	2,4 – 4,6
Şeker pancarı posası	Kuru madde	10,0 – 30,0

Pektinler bitkilerin hücre duvarı matriksinde bulunduğundan ticari olarak bitkilerden elde edilen yapısal olarak asidik, homo-/heteropolisakkaritlerdir. Pektik maddeler α -(1–4) bağlarıyla bağlanmış galakturonik asit kalıntılarından oluşan bir iskeletten meydana gelmektedir. Galakturonik asit karboksilinin metanol veya asetik asit ile esterifikasyonu pektinin karakteristik yapısını oluşturmakta çok önemlidir. Metanol ile esterleşmiş karboksilik asit gruplarının yüzdesi metilasyon derecesi (DM) olarak tanımlanmaktadır. Asetil grubuyla esterleşmiş galakturonik asit kalıntılarının yüzdesi de asetilasyon derecesi (DAc) olarak tanımlanmaktadır (Schols vd., 1995).

Ana zincir üzerindeki modifikasyonların tipine göre pektik maddeler; protopektin, pektik asit, pektinik asit ve pektin şeklinde sınıflandırılmıştır (BeMiller, 1986). Bu pektik maddeler Çizelge 2.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2 Bitki hücre duvarında bulunan pektik maddelerin kimyasal özellikleri

Pektik Maddeler	Kimyasal Doğası
Pektik Maddeler	Kolloidal, galakturonik asitten oluşan kompleks polisakkarit grubu
Protopektin	Suda çözünmeyen temel pektik maddeler
Pektik Asit	Metil ester grupları içermeyen pektik maddeler
Pektat	Pektik asitin normal veya asit tuzları
Pektinik Asit	Kısmen metil gruplarıyla esterleşmiş pektik maddeler
Yüksek Metoksilli Pektin	Yüksek miktarda (>%50’si esterleşmiş) pektinik asit
Düşük Metoksilli Pektin	Az miktarda (<%50’si esterleşmiş) pektinik asit
Pektinat	Pektinik asitin normal veya asit tuzları

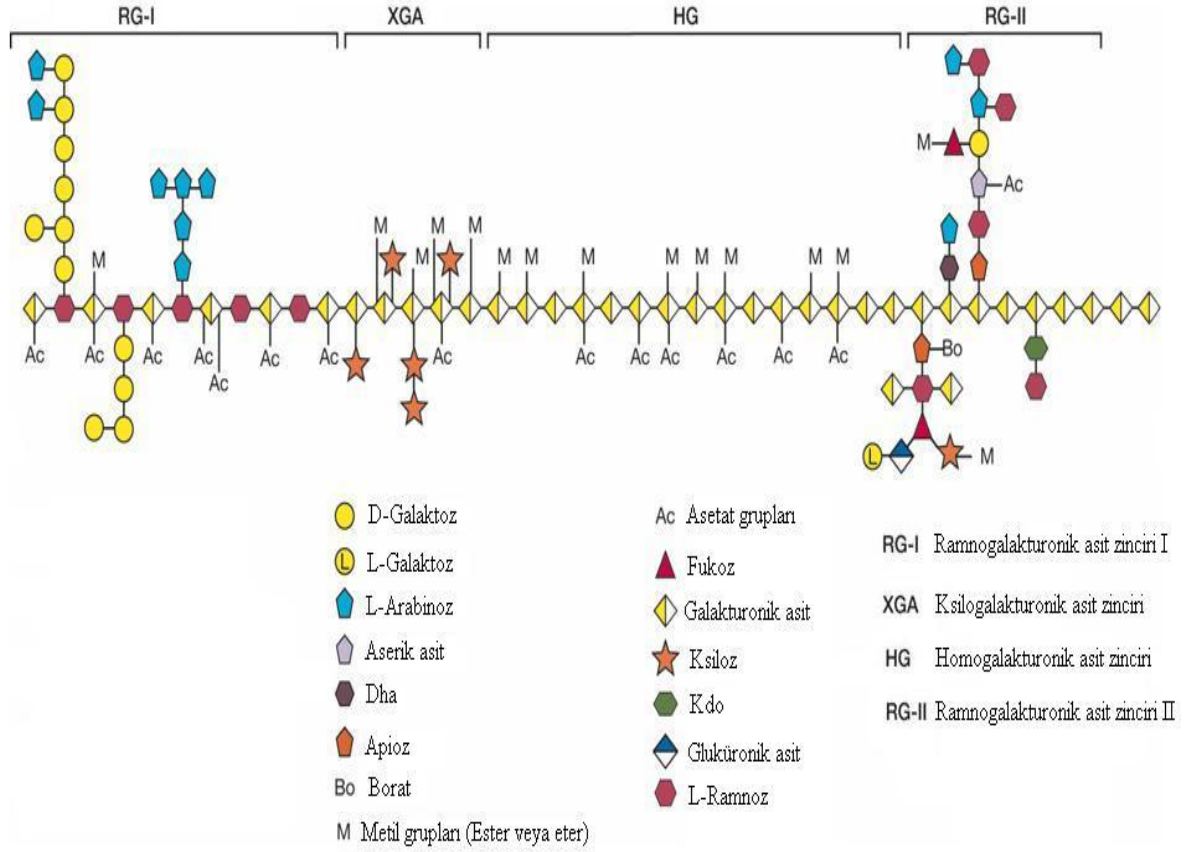
Pektini oluşturan yapısal olarak karakterize edilmiş 3 tip pektik polisakkarit vardır. Homogalakturonik asit zinciri (HG) sadece α -(1-4) bağlı α -D-galakturonik asit birimlerinden oluşmaktadır. Bu birimlerin ikinci ya da üçüncü pozisyonundaki oksijenine bir asetil grubu ya da altıncı pozisyonundaki oksijenine bir metil grubu bağlanabilir. Uzunlukları ~100 nm yi bulmaktadır.

Ramnogalakturonik asit zinciri-I (RG-I) öncelikle pektinlerin kimyasal ve yapısal çeşitliliğinden sorumludur. Çift çenekli bitkilerin primer hücre duvarı ve orta lamelinin en önemli bileşenidir (McNeil vd., 1980). (1-2)- α -L-ramnoz-(1-4)- α -D-galakturonik asit

şeklinde tekrarlayan disakkarit ünitelerinden oluşmaktadır. Ana zincire ramnozun girmesiyle poligalakturonik asit zincirinde komşu polimer zincirleriyle girişimi en aza indiren ‘T’ şeklinde bir kıvrılma olmaktadır (Grant vd., 1973). Ramnoz kalıntıları nötral şekerlerin bağlanarak dallanma yaptığı noktalardır (McNeil vd., 1980; Mac Dougall vd., 2001). α -(1-2) glikozidik bağı ile bağlı ramnoz ünitelerinin yaklaşık %50’si C₄ üzerinden bağlanan D-galaktoz ve/ya L-arabinoz içeren yan zincirler içermektedir. Ayrıca az miktarda da olsa fukoz, gluküronik asit ve 4-O-metil β -D-gluküronik asit ünitelerinin ramnoz ünitelerine bağlandığı bulunmuştur (McNeil vd., 1980; O’Neill vd., 1990).

Ramnogalakturonik asit zinciri-II (RG-II) ise hücre duvarının yapısında bulunan küçük bileşendir. RG-I ile yapısal olarak ilgisi yoktur (Şekil 2.2). Homogalakturonik asit zinciri üzerinde yapısal olarak birbirinden farklı, birçok oligosakkarit yan zincirleri içermektedir. Son zamanlarda, RG-II nin daha çok dimer olarak bulunduğu gösterilmiştir. Bu dimerler apioz kalıntıları üzerinden borat-diol esterleri ile çapraz bağlanarak pektinlerin fonksiyonlarında ve yapılarında önemli rol oynar (O’Neill vd., 1996). RG-II ağır metal bağlamakta ve immun sistemi aktive etmektedir. Bu özelliğinden dolayı insan sağlığı üzerine etkileri hakkındaki çalışmalar önem kazanmıştır.

Ksilogalakturonik asit zincirleri, β -D-ksiloz kalıntılarının α -(1-4) bağı ile bağlı galakturonik asit ana zincirine C₃ üzerinden bağlanmasıyla oluşmaktadır. Asidik ve nötral pektinler şeker olmayan metanol, asetik asit, amid grubu ve fenolik asit gibi yan gruplar taşıyarak yapısal olarak birbirlerinden ayrılmaktadır (Mac Dougall vd., 2001).

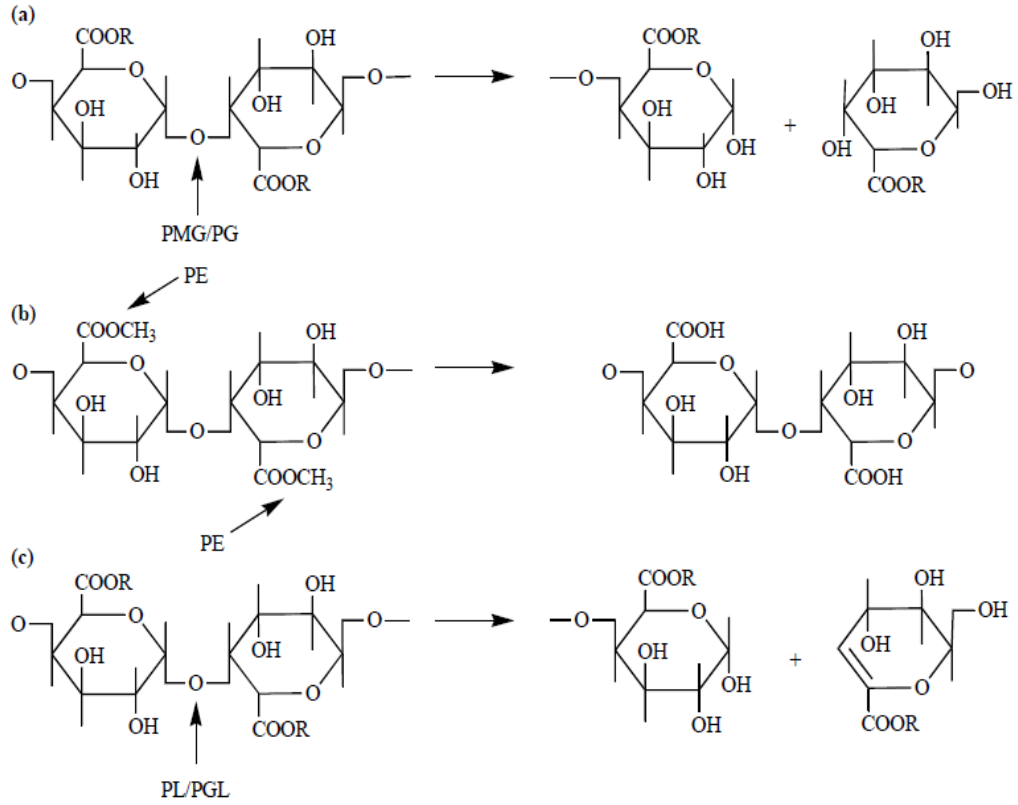


Şekil 2.2 Pektinin yapısında yer alan polisakkaritlerin şematik görüntüsü
(Essentials of Glycobiology, 2009)

Primer hücre duvarındaki pektik polisakkaritlerin ana zincirleri üzerinde nispeten daha fazla miktarda nötral oligosakkarit zincirleri vardır. Bu yan zincirler orta lameldeki pektik polisakkaritlerin yan zincirlerinden daha uzundur (Selvendran, 1985; Sakai vd., 1993). Yan zincirler düzenli olarak dağılmamış, bazı bölgelerde yoğunlaşmıştır. ‘Tüylü bölge’ denilen bu çok dallanmış rhamnogalakturonik asit zincirleri primer hücre duvarında bulunurken ‘düz bölge’ denilen yüksek miktarda esterifiye olmuş ve az miktarda dallanmış rhamnogalakturonik asit zincirleri de orta lamelde bulunur (Selvendran, 1985).

3. PEKTİNAZ

Pektinazlar pektik maddeleri depolimerizasyon (hidrolaz ve liyaz) ve esterifikasyon (esteraz) reaksiyonlarıyla parçalayan enzim grubudur. Bilinen pektinolitik enzimler homogalakturnik asit zincirlerini parçalayan enzimlerdir. Etki mekanizmaları Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1 Pektinazların etki mekanizması (a) PG için R=H ve PMG için R=CH₃; (b) PE; (c) PGL için R=H ve PL için R=CH₃. Oklar enzimlerin etki ettiği yeri göstermektedir. PMG, polimetilgalakturonaz; PG, poligalakturnaz (E.C. 3.2.1.15); PE, pektinesteraz (E.C. 3.1.1.11); PL, pektin liyaz (E.C. 4.2.2.10) (Pedrolli vd., 2009)

3 ana gruba ayrılan pektinolitik enzimler;

- (I) Protopektinaz: Çözünmeyen protopektini parçalayarak yüksek derecede polimerize olmuş çözünür pektini verir.
- (II) Esteraz: Metoksil gruplarını uzaklaştırarak pektinin deesterifiye edilmesini katalizler.
- (III) Depolimerazlar: Pektik maddelerin D-galakturnik asit kısımlarındaki α-(1-4) glikozidik bağlarının kırılmasını katalizler (Sakai, 1992; Palomäki ve Saarilahti, 1997).

Depolimerazlar pektik maddelere 2 farklı mekanizmayla etki eder:

Hidroliz reaksiyonu, oksijen köprüsü üzerinden suyun katılımıyla hidrolitik olarak glikozidik bağları kırar. Trans eliminasyon reaksiyonu, su katılması olmaksızın trans eliminasyon reaksiyonu ile glikozidik bağları kırar (Albersheim vd., 1960; Codner, 2001). Depolimerazlar enzimin etki ettiği substrata ve glikozidik bağı kıran etki mekanizmasına göre 4 farklı alt grupta sınıflandırılabilir (Rexová-Benková ve Marković, 1976). Poligalakturonaz ve polimetilgalakturonaz sırasıyla pektat ve pektini hidrolize ederek parçalar. Poligalakturonat liyaz ve polimetilgalakturonat liyaz ise sırasıyla pektat ve pektini β -eliminasyon yolu ile parçalar. Etki ettiği yere bağlı olarak, örneğin rastgele veya terminal, bu enzimler sırasıyla endo- veya ekzo- olarak adlandırılmaktadır. Son yıllarda yürütülen inceleme ve araştırmalar doğrultusunda, pektinolitik enzimlerin bu sınıflandırması artık çok kullanılmamaktadır. Bu enzimlerin daha yeni ve ayrıntılı sınıflandırılması Çizelge 3.1’de gösterilmiştir (Rexová-Benková ve Marković, 1976; Ward ve Moo-Young, 1989; Whitaker, 1990; Kashyap vd., 2001).

Çizelge 3.1 Pektinolitik enzimlerin yaygın sınıflandırılması (Jayani vd. 2005)

Enzim	Etki mekanizması	Primer substratı	Ürün
<i>Esteraz</i>			
1. Pektin metil esteraz	Hidroliz	Pektin	Peptik asit + metanol
<i>Depolimerize edici enzimler</i>			
a. Hidrolazlar			
1. Protopektinazlar	Hidroliz	Protopektin	Pektin
2. Endopoligalakturonaz	Hidroliz	Pektik asit	Oligogalakturonatlar
3. Ekzopoligalakturonaz	Hidroliz	Pektik asit	Monogalakturonatlar
4. Ekzopoligalakturonan-digalakturonohidrolaz	Hidroliz	Pektik asit	Digalakturonatlar
5. Oligogalakturonat hidrolaz	Hidroliz	Trigalakturonat	Monogalakturonatlar
6. $\Delta 4:5$ Doymamış oligogalakturonat hidrolaz	Hidroliz	$\Delta 4:5(\text{galakturonat})_n$	Doymamış&doymuş (n-1) monogalakturonatlar
7. Endopolimetil-D-galakturonaz	Hidroliz	Yüksek metoksilli pektin	Oligometilgalakturonatlar
8. Endopolimetil-D-galakturonaz	Hidroliz	Yüksek metoksilli pektin	Oligogalakturonatlar
b. Liyazlar			
1. Endopoligalakturonaz liyaz	Trans-eliminasyon	Pektik asit	Doymamış oligogalakturonatlar
2. Ekzopoligalakturonaz liyaz	Trans-eliminasyon	Pektik asit	Doymamış digalakturonatlar
3. Oligo-D-galaktoziduronat liyaz	Trans-eliminasyon	Doymamış digalakturonatlar	Doymamış monogalakturonatlar
4. Endopolimetil-D-galaktoziduronat liyaz	Trans-eliminasyon	Doymamış poli-(metil-D-digalakturonatlar)	Doymamış metiloligogalakturonatlar
5. Ekzopolimetil-D-galaktoziduronat liyaz	Trans-eliminasyon	Doymamış poli-(metil-D-digalakturonatlar)	Doymamış metilmonogalakturonatlar

3.1 Protopektinaz

İlk kez Brinton ve arkadaşları tarafından protopektinaz olarak adlandırılan enzim protopektinin çözünür hale gelmesini katalizler (Brinton vd., 1927). Protopektinazlar reaksiyon mekanizmasına göre iki şekilde sınıflandırılmıştır (Sakai ve Okushima, 1982; Sakai ve Yoshitake, 1984a; Sakai vd., 1984b; Sakamoto vd., 1994). A tipi protopektinaz, protopektinin poligalakturonik asit bölgesi gibi içte kalan kısmıyla reaksiyona girer. B tipi protopektinaz da poligalakturonik asit zinciri ve hücre duvarı bileşenlerini bağlayan polisakkarit zincirleri ile reaksiyona girer. A tipi protopektinazlar maya ve maya mantarlarında bulunurken B tipi protopektinazlar *Bacillus* türlerinde bulunmaktadır.

3.2 Poligalakturonaz

Oksijen köprüsü üzerinden su katılımıyla poligalakturonik asit zincirinin hidrolitik olarak kırılmasını katalizler. Pektinolitik enzim ailesi içinde en çok çalışılan gruptur. Poligalakturonazlar pektik maddeleri hidrolizleyen endo-poligalakturonaz (E.C. 3.2.1.15) ve ekzo-poligalakturonazdan (E.C. 3.2.1.67) oluşmaktadır. Poligalakturonazların bitki-patojen ilişkileri ile gıda proseslerinde biyolojik, fonksiyonel ve teknik uygulamaları vardır.

Endo-poligalakturonazlar mantarlar, bakteriler ve birçok maya türünde yaygın olarak bulunmaktadır. Ayrıca yüksek bitkiler ve bazı bitki paraziti nematodlarda da mevcuttur. Buna karşılık ekzo-poligalakturonazlara bakteri ve mantarlarda daha az rastlanmaktadır. Ekzo-poligalakturonazlar iki tipe ayrılabilir: Fungal kaynaklı ekzo-poligalakturonazlar son ürün olarak monogalakturonik asit açığa çıkartırken bakteriyel ekzo-poligalakturonazlar son ürün olarak digalakturonik asit açığa çıkarırlar (Sakai vd., 1993). Bitkilerde de poligalakturonaz varlığı rapor edilmiştir (Pressey ve Avants, 1973, 1975; Pressey ve Puri, 1984; Alonso vd., 2003).

3.3 Liyaz

Liyazlar (veya transeliminazlar) pektatların veya pektinatların trans-eliminatif bölünme ile hidrolitik olmayan yıkılımını gerçekleştirir. Liyazlar 4. karbondaki glikozidik bağı kırar ve

aynı anda 5. karbondaki hidrojeni uzaklaştırarak $\Delta 4,5$ doymamış ürünler açığa çıkarır. Liyazlar etki mekanizmasına ve etki ettiği substrata göre sınıflandırılmaktadır.

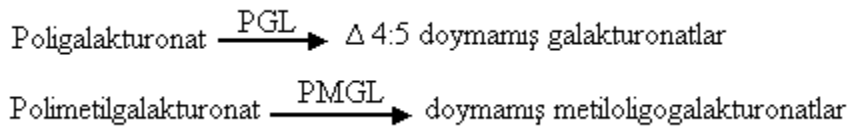
(I) Endo-poligalakturonat liyaz (Endo-PGL, E.C. 4.2.2.2)

(II) Ekzo-poligalakturonat liyaz (Ekzo-PGL, E.C. 4.2.2.9)

(III) Endo-polimetilgalakturonat liyaz (Endo-PMGL, E.C. 4.2.10)

(IV) Ekzo-polimetilgalakturonat liyaz (Ekzo-PMGL)

Liyazların katalizlediği reaksiyonlar şu şekilde gösterilmiştir:

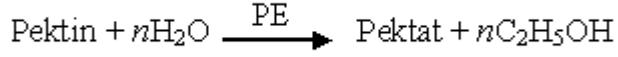


Poligalakturonat liyazlar (Pektat liyaz veya PGLs) birçok bakteri ve bazı patojenik mantarlar tarafından endo-poligalakturonat liyazla birlikte az miktarda ekzo-poligalakturonat liyaz şeklinde üretilmektedir. Bakteri ve mantarlardan izole edilen poligalakturonat liyazlar gıdaların bozulmasına ve ‘yumuşak çürüklük’ denen hastalığa sebep olmaktadır. Polimetilgalakturonat liyazların (pektin liyaz veya PMGL) üretimiyle ilgili olarak literatürde birkaç yayın bulunmaktadır. *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri tarafından üretildiği rapor edilmiştir. Pektin liyazların çoğu mikroorganizmalardan izole edilmiştir. Bitki ve hayvanlarda ki varlığına dair yayımlanan çalışma sayısı azdır (Whitaker, 1990). Liyazlar bakterilerdeki pektinolitik enzimlerin en büyük grubunu oluşturur ve direkt olarak bitki patojenitesiyle ilişkilidir (Dixit vd., 2004).

3.4 Pektinesteraz

Pektinesteraz (PE, Pektin pektinhidrolaz, E.C. 3.1.1.11), sıklıkla pektinmetilesteraz, pektaz, pektin metoksilaz, pektin demetoksilaz ve pektolipaz olarak anılan hidrolaz enzim grubuna ait karboksilik asit esterazdır (Whitaker, 1984). Pektik substratların galakturonan omurgasındaki metil ester bağlarının deesterifikasyonunu katalizleyerek asidik pektinleri ve metanolü açığa çıkarmaktadır (Cosgrove, 1997). Açığa çıkan pektin üzerine poligalakturonazlar ve liyazlar

etkili olmaktadır. Pektinesterazların etki mekanizması kaynağına göre çeşitlilik göstermektedir (Micheli, 2001). Fungal pektinesterazlar metil gruplarını rastgele uzaklaştırarak çoklu zincir mekanizması ile etki eder. Buna karşılık bitki pektinesterazları ya indirgen olmayan uca ya da yanındaki serbest karboksil grubuna etki etme eğiliminde olup molekül boyunca tek zincir mekanizması ile ilerlemektedir. Pektinesterazın katalizlediği reaksiyon:



Pektinesteraz aktivitesi hücre büyümesi, meyve olgunlaşması, dökülme, yaşlanma ve patogenezi içeren hücre duvarı metabolizması ile ilişkilidir. Ticari pektinesterazlar meyve sularının berraklaştırılması ve ekstraksiyonunun yanı sıra işlenmiş meyve ve sebzelerin tekstürünü ve dayanıklılığını korumak ve iyileştirmek için kullanılmaktadır (Fayyaz, 1993). Pektinesterazlar bitkilerde, bitki patojeni bakteri ve mantarlarda bulunmaktadır.

4. *Trichoderma reesei*

4.1 *Trichoderma*'nın Keşfi

Trichoderma spp. toprak kökenli mantarlardır. Bu mantarlar topraktaki değişik organik maddeleri, salgıladıkları enzimler ve sekonder metabolitler aracılığıyla parçalayabilmektedir. Bu mikroorganizma bitki biyokütlesini oluşturan oligosakkaritlerden melezitoz, rafinoz ve sukrozu, polisakkarit olarak da selüloz, kitin, inulin, laminaran, pektin, nişasta ve ksilanı farklı metabolik yollarla parçalayabilmektedir.

Trichoderma türleri ilk olarak İkinci Dünya Savaşı sırasında Solomon adalarında keşfedildi. ABD ordusu askerlerinin üniformaları ve pamuklu çadır bezlerinin çürümesinden sorumlu tutuldu (Reese, 1976). Natick Amerikan Ordu Laboratuvarlarında E. T. Reese ve M. Mandels'in yaptığı çalışmalarda, yüksek miktarda ürettiği kompleks enzimlerle selülozu parçalayan *Trichoderma* suşları bulundu. Diğerlerinden farklı olarak bir suş, sonraları Elwyn Reese onuruna *T. reesei* olarak tanımlanan *Trichoderma* sp. QM6a, %0,5 ekstraselüler selülaz üretti. Amerikan Biyoenerji Programında, selülozik atıkların glukoz ve mayalar tarafından fermentasyonu ile etanole dönüşümü planlandığından selülozun hidrolizini kolaylaştırmak için hiperselülitik mutantlar üretildi. *T. reesei* QM9414 ve Rut C-30 gibi suşlardan yapılan ilk denemelerde 20 g/L ekstrasellüler protein elde edildi.

4.2 Taksonomisi

Üst alem: Eukaryota

Alem : Fungi

Alt alem: Dikarya

Şube : Ascomycota

Alt şube : Pezizomycotina

Sınıf : Sordariomycetes

Alt sınıf : Hypocreomycetidae

Takım : Hypocreales

Aile : Hypocreaceae

Cins : Hypocrea

Tür : *Hypocrea jecorina* / *Trichoderma reesei*

Trichoderma cinsi 19. yüzyılın başından beri bilinmektedir. *Trichoderma*'nın *Hypocrea* Fr. telemorfuyla ilişkisi 1865 yılında Tulasne kardeşler tarafından tanımlanmıştır. Ancak *Trichoderma*'nın taksonomisi son yıllara kadar belirsiz kalmıştır. Bisby (1939) tek bir tür üzerinde, *T. viride*, morfolojik varyasyonu tanımlamıştır. Türler yığınının aksine morfolojik olarak türleri ayırmak için ilk ciddi girişim Rifai (1969) tarafından yapılmıştır. Rifai ayrımını yaptığı dokuz taksonun tek telemorf türüyle ilişkili olmadığını rapor etmiştir. Sonradan Domsch ve arkadaşları (1980) tarafından birkaç tür daha tanımlanarak buna ilave yapılmıştır. Telemorf ilişkisi Dingley (1957) ile Webster ve arkadaşları (Rifai ve Webster, 1966; Webster ve Rifai, 1968) tarafından izole edilen askosporlar sayesinde kurulmuştur. Japonya'da telemorfların varlığı en ince ayrıntısına kadar çalışılmış, kültürel ve anamorf karakterleri Doi (1969,1972) tarafından tanımlanmıştır. Ancak ne yazık ki bu çalışmada kullanılan hiçbir kültür korunamamıştır. Daha başka anamorfaların morfolojik ayrımı yine Doi (1979, 1986) tarafından çalışılmıştır. Kültür çalışmalarıyla birlikte telemorf taksonomisi hakkında yoğun araştırmalar Samuels ve arkadaşları (Samuels vd., 1994; Samuels, 1996) tarafından başlatılmıştır. Türlerin yalnız morfolojik özelliklerine dayanarak sistematığının yapılmasının zor ve yetersiz olduğunu, yapılan bu çalışmalar ortaya koymuştur. Günümüzde morfolojik özelliklerin tanımlanmasını destekleyen diğer modern biyoteknolojik yöntemlerin de kullanılmaya başlanmasıyla daha hassas sonuçlar elde edilmektedir.

4.3 Misel Morfolojisi

Rifai'ye (1969) göre ilk kez 1794 yılında Persoon tarafından tanımlanmıştır. Hızlı üreyip kolonisi 4 günde olgunlaşır. Başlangıçta birkaç gün içinde tüm besiyeri yüzeyini kaplayan beyaz gevşek bir misel görülür. Bir süre sonra misel daha da sıkılaşır yünüksü bir örgü görünümü kazanır ve konidyumların oluşması ile yüzeyde yeşil lekeler belirir, koloni tabanı renksiz, portakalımsı, ten rengi veya sarımsıdır (Rifai, 1969). Belirgin konsentrik halkalar ve hava hifleri gözlenir. Bazı türlere özgül olarak tatlı bir hindistan cevizi kokusu üretilir.

4.4 Mikroskobisi

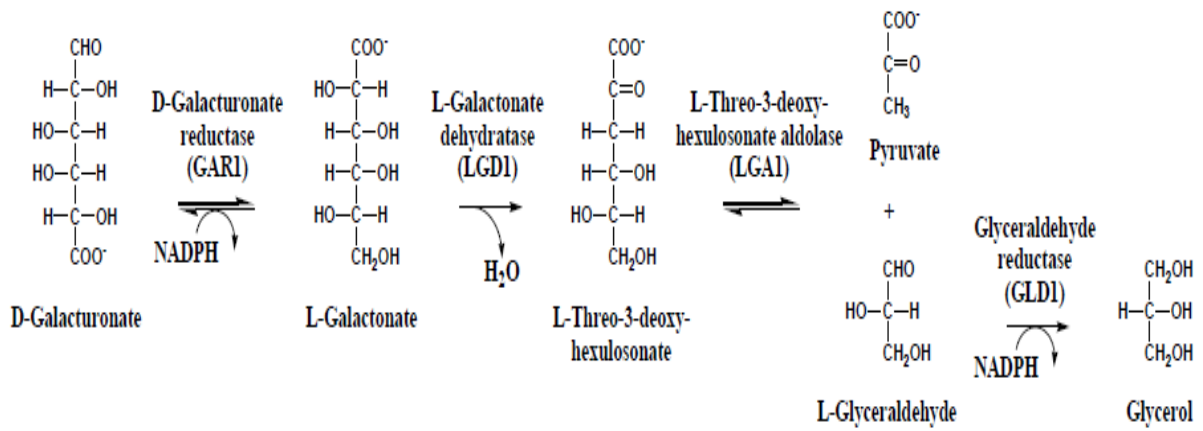
Mikroskopta kısa, septalı çok dallanmış hifler ve şişme biçiminde konidyoforlar görülür (Şekil 4.1). Her konidyoforun ucunda yuvarlak, tek hücreli, küçük konidyum kümeleri bulunur (Rifai, 1969). Hiflerin uç veya orta kısımlarındaki hücrelerin çeperleri kalınlaşıp, yuvarlaklaşarak hifden ayrılmasıyla oluşan klamidosporlar birçok *Trichoderma* türleri tarafından üretilir. Bunlar genellikle fungusların olumsuz koşulları geçirmek için oluşturdukları sporlardır. Kısa hif sonunda bulunan klamidosporlar genellikle tek hücreli olmakla birlikte bazı türleri (Örneğin: *Trichoderma stromaticum*) çok hücrelidir.



Şekil 4.1 *Trichoderma reesei* sporlarının mikroskop görüntüsü

5. *Trichoderma reesei*' DE D-GALAKTURONİK ASİTİN KATABOLİZMASI

Filamentöz mantar *Trichoderma reesei*'de D-galakturonat metabolik yolu tanımlanmıştır. Bu yol dört ayrı yayında tanımlanan dört enzimden oluşmaktadır. Bu enzimler NADH bağımlı D-galakturonat redüktaz (GAR1), L-galaktonat dehidrataz (LGD1), L-treo-3-deoksi-heksulonat aldolaz (LGA1) ve NADPH bağımlı gliseraldehit redüktaz (GLD1). Bu metabolik yol sonunda D-galakturonat, piruvat ve gliserole dönüştürmektedir (Şekil 5.1).



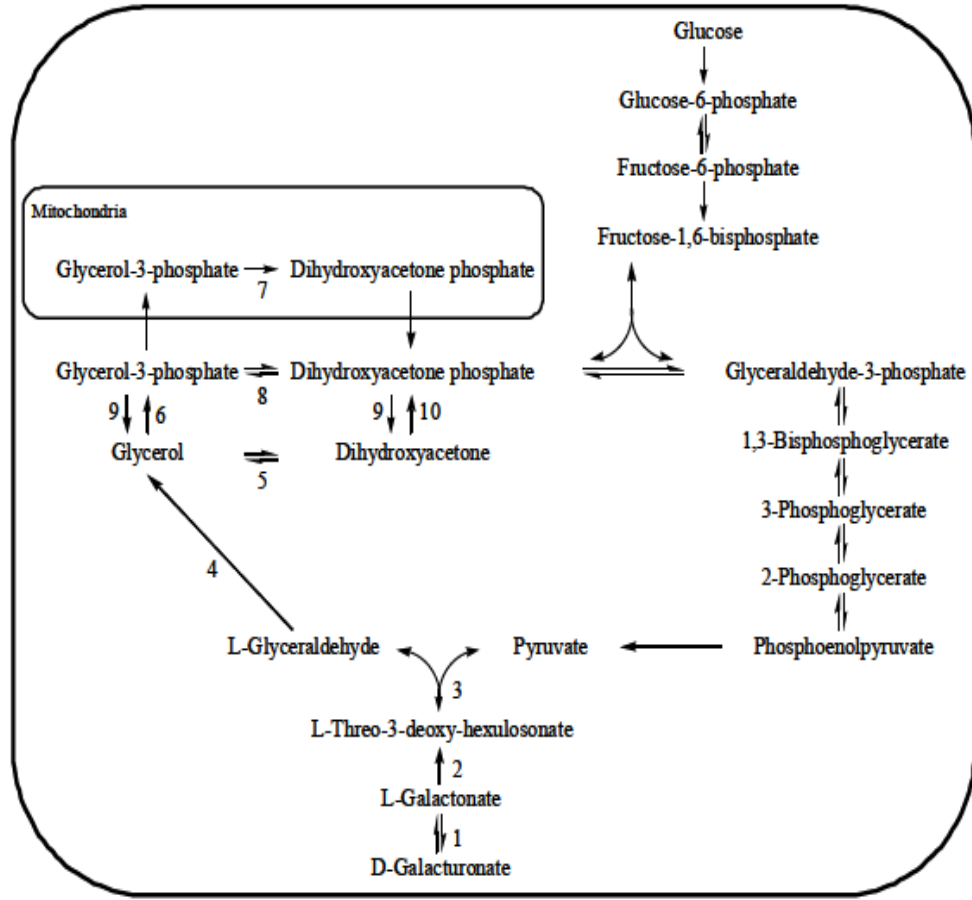
Şekil 5.1 *T. reesei*'de D-galakturonat metabolizmasının şematik gösterimi

Metabolik yoldaki bir veya iki tek yönlü reaksiyon ortaktır (Nielsen, 1997). Tek yönlü reaksiyonlar metabolik yol boyunca metabolitlerin tek bir yönde kullanımını sağlar ve organizma için kontrol basamağını oluşturur. Fungal D-galakturonat metabolizmasında ikinci ve dördüncü enzim, L-galaktonat dehidrataz ve gliseraldehit redüktaz, tek yönlü reaksiyonları katalizler. Diğer iki reaksiyon D-galakturonat redüktaz ve L-treo-3-deoksi-heksulonat aldolaz tarafından katalizlenir. Reaksiyon çift yönlüdür.

D-galakturonat metabolizmasında görev aldığı düşünülen 4 gen bulunmuştur. *T. reesei* için bu dört gen D-galakturonat redüktazı (GAAA), L-galaktonat dehidratazı (GAAB), 2-keto-3-deoksi-L-galaktonat aldolazı (GAAC) ve gliseraldehit redüktaz (GAAD)'ı kodlamaktadır. Pezizomycotina altşubesine ait pektin parçalayan diğer filamentöz mantarların D-galakturonat matabolik yolunun aynı olduğunu ve bu genlerin genomlarında tam olarak korunduğunu rapor edilmiştir (Martens-Uzunova ve Schaap, 2008).

Genel olarak *T. reesei* ve *A. niger*'de D-galakturonat metabolik yolu birbirine çok benzemekle beraber bazı önemli farklılıklar vardır. *A. niger*'in yapılan transkriptom analizlerinde metabolik yoldaki 4 gen de D-galakturonat ile güçlü bir şekilde indüklenmektedir (Martens-Uzunova ve Schaap, 2008). Ancak *T. reesei*'de metabolik yoldaki ilk üç enzimin aktivitesi (GAR1, LGD1 ve LGA1) D-galakturonata bağlı olup başka karbon kaynaklarında aktivite göstermemektedir. Dördüncü enzim (GLD1) ise D-galakturonata bağlı olmadan aktivite göstermektedir (Hilditch, 2010).

Trichoderma reesei D-galakturonatı gliserol ve piruvata dönüştürmektedir. Bir çok merkezi metabolik yolda ara ürün olarak piruvat oluşmaktadır. Metabolizmada karbonhidratlara, yağ asitlerine, alanin aminoasidine ve enerjiye dönüşebilmektedir. *T. reesei* ayrıca gliserolü de metabolize edebilmektedir. Gliserol katabolizması *A. nidulans* ve diğer bir çok ökaryotik organizmada olduğu gibi gliserol içeren ortamda *T. reesei* de gliserol kinaz ve mitokondriyal FAD-bağımlı gliserol-3-fosfat dehidrogenaz üzerinden ilerlemektedir (Hondmann vd., 1991). Olası bir başka yol ise gliserol NADPH-bağımlı DHA redüktaz enziminin çift yönlü reaksiyonu ile DHA'ya dönüşmekte ardından DHA kinaz ile DHAP'ye dönüşmektedir. *A. oryzae*'de bu metabolik yolun kullanıldığı bildirilmiştir (Salazar vd., 2009). Bu yolda NADH ve ATP harcanarak NADPH üretilmektedir (Norbeck ve Blomberg, 1997). Bu yol D-galakturonat içeren ortamda büyüyen *T. reesei* için de kazançlı olabileceği düşünülmektedir. Çünkü D-galakturonat metabolik yolunda her bir D-galakturonat molekülü için iki molekül NADPH harcanmaktadır (Hilditch, 2010). Bu metabolik yollar Şekil 5.2' de gösterilmiştir.



Şekil 5.2 *T. reesei*'deki D-galakturonat ve olası gliserol metabolizmasının glikoliz ile ilişkisinin şematik gösterimi (1) NADPH-bağımlı D-galakturonat redüktaz; (2) L-galaktonat dehidrataz; (3) L-treo-3-deoksi-heksulose-5-fosfat aldolaz; (4) NADPH-bağımlı gliserolaldehit redüktaz; (5) NADPH-bağımlı DHA redüktaz; (6) gliserol kinaz; (7)FAD-bağımlı gliserol-3-fosfat dehidrogenaz; (8) NAD⁺-bağımlı gliserol-3-fosfat dehidrogenaz; (9) Gliserol-3-fosfat fosfataz; (10) DHA kinaz

6. *Trichoderma reesei*'nin ENDÜSTRİYEL SUŞLARI ve BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALARI

Filamentöz mantarlardan üretilen enzimler gıdalarda ve gıda üretim proseslerinde uzun zamandır kullanılmaktadır. Büyük ölçekli fermantasyonun endüstride çokça uygulama alanı bulması, proses mühendisliği ve genetik olarak modifiye edilmiş suşların gelişimi, bugün endüstri üretiminde filamentöz mantarların kullanımının artmasına sebep olmuştur. Genellikle, doğada bulunan suşlar ihtiyacımız olandan çok daha düşük miktarlarda protein ürettiğinden ticari olarak kullanılamamaktadır. Bu yüzden istenilen hedef proteini üretebilmek için doğadaki suşlara genetik transformasyon yapılmaktadır. Moleküler genetik teknikleri ve mantarlarda gen transfer sistemlerinin gelişimiyle filamentöz mantarlara genetik transformasyon mümkün hale gelmiştir.

Trichoderma üstün protein üretimine ve protein salgılama kapasitesine sahiptir. Ökaryotik salgılama mekanizması ile tıpkı memeli sistemlerdeki gibi modifiye proteinler sentezleyebilmektedir. Bu mantarın endüstriyel suşları farklı bitki materyallerini parçalayabilecek selüloz, hemiselüloz, proteaz, amilaz, pektinaz gibi enzimler üretebilmektedir. Bu enzimler endüstride eczacılık, tarım, hayvancılık, çevre, gıda, kağıt, tekstil, deterjan gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Bazı suşlarının ürettiği sekonder metabolitler de ticari olarak kullanılmaktadır. Örneğin Hindistan cevizi aroması, 6-pentil- α -piron, *H. atroviridis* / *T. atroviride* tarafından üretilmektedir(Dodd vd., 2003).

Trichoderma reesei ticari ölçekli fermantasyon koşullarının optimizasyonu ile birlikte çok daha üstün bir performansa sahip olmuştur. Optimizasyon koşullarının sağlanması ve *Trichoderma reesei*'ye yapılan genetik transformasyon sonucunda homolog ve heterolog proteinler üretilmektedir. *Trichoderma reesei* yalnızca protein üretimindeki avantajlarından dolayı değil aynı zamanda insanlar için toksik olmamasından dolayı da endüstride sıkça karşımıza çıkmaktadır. *T. reesei* enzim üretim koşullarında insanlar için toksik olabilecek mikotoksinleri ve antibiyotikleri üretmemektedir. Son yıllardaki uygulamalar genetik olarak modifiye edilmiş *Trichoderma reesei* suşlarının güvenle kullanılabileceğini göstermiştir.

7. PEKTİNAZIN ENDÜSTRİYEL KULLANIM ALANLARI

7.1 Meyve Suyu Üretimi

Meyve ve sebze sularına iki farklı amaçla pektinaz enzimi ilave edilmektedir. Berrak tip meyve sularında amaç presleme ve filtrasyon sırasında verimi arttırmak ve askıdaki maddeleri uzaklaştırmaktır. Bulanık tip meyve sularında kullanılan pektik enzimler ise yüksek oranda poligalakturonaz aktivitesine sahip olduğundan eklendiği meyve suyunda stabil bir bulanıklık sağlamaktadır.

Pektinazlar meyve suyu endüstrisinde ekstraksiyon ve berraklaştırma işlemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Pektinler meyve sularında viskoziteyi arttırmakta ve bulanıklığa sebep olmaktadır. Pektinaz ve amilaz karışımı meyve sularının berraklaştırılmasında kullanılmaktadır. Enzim uygulaması filtrasyon süresini %50 azaltmaktadır (Blanco ve Villa, 1999). Meyve püresinin pektinazlarla muamelesiyle muz, üzüm ve elmadan elde edilen meyve suyu hacminin arttığı görülmüştür (Kaur vd., 2004). Pektinazlar, selüloz, arabinaz ve ksilanaz gibi enzimlerle kombine edilerek meyve suyu prosesinde presleme niteliğini arttırmak için kullanılmaktadır (Gailing vd., 2000). Endüstride turuncgil kabuklarının soyulmasında da pektinazlar kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda pektinmetilesteraz ve kalsiyum ile muamele edilmiş çekirdeksiz şeftalilerin 4 kat daha dayanıklı hale geldiği ortaya konulmuştur. Bu özelliği nedeni ile pektinazlar fermentasyon ve depolama sırasında yumuşamanın fazla olduğu turşu proseslerinde de uygulama alanı bulabilmektedir (Baker ve Wicker, 1996).

7.2 Tekstil İşlemleri ve Pamuk Liflerinin Biyolojik Olarak Pişirilmesi

Daha önceleri kullanılan toksik kostik sodanın yerine geçen pektinazlar amilaz, lipaz, selüloz ve hemiselülozlarla birlikte pamuk liflerine şeklini kazandıran ajanları güvenle ve çevre dostu işlemlerle uzaklaştırmaktadır. Biyokaynatma belirli enzimlerle ipliklerden selülozik olmayan safsızlıkların uzaklaştırılmasında yeni bir uygulamadır. Pektinazlar selüloza zarar vermeden bu amaçla kullanılmaktadır (Hoondal vd., 2000). Sak lifleri ksilem, floem veya perisikl tabakası dışında kalan yumuşak liflerden oluşmaktadır. Örneğin rami ve kenevir gibi. Zamk

içeren lifler, tekstil işlerinde kullanılmadan önce zambak giderme işlemine tabi tutulmaktadır (Hoondal vd., 2000). Kimyasal maddelerle yapılan zambak giderme işlemleri toksik olup çevreye zarar vermektedir. Ancak pektinazlarla birlikte ksilanazların kullanımıyla biyoteknolojik olarak gerçekleşen proses çevre dostu ve ekonomik olmasıyla alternatif oluşturmaktadır (Kapoor vd., 2001). Bitki liflerinin havuzlama işleminin amacı, selüloz liflerini, onları çevreleyen dokulardan ayrılarak, serbest kalmasını sağlamaktır. Bu işlem lifleri birbirine bağlayan pektinin suda çözülebilen basit bileşiklere dönüşmesiyle gerçekleşmektedir (Hoondal vd., 2000).

7.3 Atık Su Arıtımı

Gıda fabrikalarında endüstriyel prosesler sonucunda yan ürün olarak pektin içeren atıksu açığa çıkmaktadır. Bu atıksuların pektinolitik enzimlerle ön işleminden geçmesi pektik materyallerin uzaklaştırılmasını kolaylaştırmakta ve aktif çamur prosesiyle ayrışmaya uygun hale getirmektedir (Hoondal vd., 2000).

7.4 Kahve ve Çay Fermentasyonu

Pektinaz uygulaması çay fermentasyonunu hızlandırmakta ve pektini parçalayarak hazır çayların köpürmesini engellemektedir (Carr, 1985). Ayrıca kahve fermentasyonunda kahve çekirdeklerinden musilaj kılıfın uzaklaştırılması için kullanılmaktadır.

7.5 Kağıt ve Kağıt Hamuru Sanayi

Kağıt yapımı sırasında, pektinaz pektinleri depolimerize etmekte ve sonrasında peroksit ağartmasından süzülen sıvının ve pektin solüsyonlarının katyonik ihtiyacını düşürmektedir.

7.6 Hayvan Yemi

Hayvan yemi üretiminde kullanılan enzim karışımlarında pektinazlar da vardır. Bunlar yemin

viskozitesini azaltarak yem maddelerinde bulunan besin maddelerini açığa çıkarmaktadır. Bunu sindirimi zor maddelere etki ederek ve bu maddeler tarafından bloke olmuş besin maddelerini serbest bırakarak yapmaktadır. Dışkı miktarını azalarak besin maddelerinin emilimini artmaktadır (Hoondal vd., 2000).

7.7 Bitki Virüslerinin Safılaştırılması

Virüs partikülünün floemde bulunması durumunda alkalın pektinazlar ve selülozlar kullanılarak virüs dokudan uzaklaştırıp saf bir preparat halinde elde edilebilmektedir.

7.8 Yağ Ekstraksiyonu

Limon yağı gibi turuncğil yağları pektinazlar kullanılarak ekstrakte edilebilmektedir. Pektinin emülgatör özelliğini ortadan kaldırarak narenciye kabuğu ekstraktlarından elde edilen yağın topaklanmasını engellemektedir (Scott, 1978).

7.9 Kırmızı Şarabın Dayanıklılığı ve Renginin Düzeltilmesi

Kırmızı şarap üretiminde şarap mayaları eklenmeden önce pektinolitik enzimler masere edilmiş meyvelere uygulanır. Böylece şarabın renk ve bulanıklık gibi görsel karakterleri düzeltilmiş olur. Enzim uygulanmış kırmızı şaraplarda renk özellikleri enzim uygulanmamış kontrol şaraplara göre daha gelişmiştir. Bu şaraplar kontrol grubuna kıyasla daha çok dayanıklılık göstermiştir (Revilla ve Ganzalez-san jose, 2003).

7.10 Protoplast İzolasyonu

Bitki ıslah programlarında istenilen karakterlerin kombinasyonları geleneksel genetik manipulasyonlarla yapılamamaktadır. Bu proses eşeysel döngüye gerek kalmadan yüksek yapılı bitkilerde kullanılabilmekte ve genetik rekombinasyon meydana getirebilmektedir. Bu yenilikçi genetik uygulama ile in vitro koşullarda izole edilmiş yapılara protoplast fuzyonu

yapılmaktadır. Fuzyon sonucu olusan yapılar fuzyon urunleri veya heterokaryon denir. Genetik varyabilitenin genişletilmesi ve yeni türlerin elde edilmesi için alternatif bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır (Gleba, 1978).

Bitkilerden protoplast izolasyon metodları 3 ana gruba ayrılır:

- (a) Mekanik (Enzimatik olmayan)
- (b) Ardışık Enzimatik (2 basamak)
- (c) Karışık Enzimatik (Eş zamanlı) prosedürleri.

Mekanik olarak izolasyon plazmoliz olmuş dokunun keskin bir bıçakla kesilmesi ve deplazmoliz ile protoplastın serbest kalması şeklindedir. Ancak bu yöntemle düşük verim elde edildiğinden kullanılmamaktadır. Bu nedenle bu amaç için denenmiş pektinaz ve selülozları içeren bir enzim karışımı kullanılmaktadır. Takebe ve arkadaşları(1968) protoplast izolasyonu için ardışık olarak 2 adımda uygulanan ticari bir enzim preparatı kullanmışlardır. Bu uygulama ilk olarak masere edilmiş bitki dokularının pektinazla inkübasyonunu içerir. Dokular daha sonra selülozla muamele edilerek protoplastlara dönüştürülür. Ancak Power ve Cocking (1969) iki enzimi eş zamanlı olarak uygulayarak tek bir adımda protoplastları izole etmeyi başarmıştır. Ticari olarak yaygın olan fungal enzimlerin yanında bakteriyel orjinli enzimlerde lignifikasyonun tam olmadığı hücrelerde protoplast izolasyonu sağlamaktadır.

8. MATERYAL VE METOD

8.1 Çalışmada Kullanılan Küf Suşları

Bu çalışma sırasında *Trichoderma reesei*'ye ait kontrol suşu olarak QM9414 (ATCC26921) kullanıldı. Kullanılan mutant suş ise, 1A olarak isimlendirilen 4 pektinaz geni ve güçlü bir promotör içeren suştur. *Trichoderma reesei* QM9414 ve 1A mutant suşu Viyana Teknik Üniversitesi, Uygulamalı Biyokimya ve Gen Teknolojisi Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir.

8.2 Kullanılan Cihazlar

1. Buzdolabı (Arçelik)
2. Çalkalamalı inkübatör (Sartorius)
3. Etüv (Mettler)
4. Hassas terazi (Sartorius)
5. Isıtıcı manto (Termal)
6. Isıtıcılı manyetik karıştırıcı (Chiltern)
7. Mikroskop (Olympus)
8. Otoklav (Cetoclav)
9. Otomatik pipet (Eppendorf)
10. pH metre (Sartorius)
11. Saf Su Cihazı (GFL)
12. Santrifüj (Hettich)
13. Soğutmalı santrifüj
14. Su banyosu (GFL)
15. UV spektrofotometresi (Agilent Technologies)
16. Vorteks karıştırıcı (IKA)

8.3 Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. 3,5-dinitrosalisilik asit (Sigma-Aldrich)
2. Amonyum sülfat (Merck)
3. Asetik asit (Tekkim)
4. Aseton (Tekkim)
5. Bovin serum albümin (BSA) (Fluka)
6. Coomassie Brilliant Blue G-250 (Merck)
7. Çinko sülfat heptahidrat (Sigma)
8. Demir sülfat heptahidrat (Merck)
9. D-galakturonik asit monohidrat (Sigma-Aldrich)
10. D-glukoz (Merck)
11. Disodyum hidrojen fosfat dihidrat (Merck)
12. Etanol (Tekkim)
13. Fenol (Sigma-Aldrich)
14. Fosforik asit (Tekkim)
15. Gliserol (Riedel-de Haen)
16. Hidroklorik asit (Tekkim)
17. Kalsiyum klorür dihidrat (Merck)
18. Kobalt klorür dihidrat (Sigma-Aldrich)
19. Magnezyum sülfat heptahidrat (Riedel-de Haen)
20. Mangan sülfat monohidrat (Sigma-Aldrich)
21. Patates dekstroza agar (PDA) (Merck)
22. Pektin (Sigma-Aldrich)
23. Pepton (Sigma-Aldrich)
24. Potasyum dihidrojen fosfat (Merck)

25. Sodyum asetat (Sigma-Aldrich)
26. Sodyum hidroksit (Merck)
27. Sodyum potasyum tartarat (Sigma-Aldrich)
28. Sülfirik asit (Tekkim)
29. Üre (Merck)

8.4 Kullanılan Çözeltiler

8.4.1 50xİz Elementi Çözeltisi

250 mg/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

80 mg/l $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

70 mg/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

100 mg/l $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Çözelti hacmine tamamlandıktan sonra çözeltinin pH'sı H_2SO_4 ile 2.0'ye ayarlandı.

8.4.2 Bradford Reaktifi

50 ml/l %95'lik etanol

100 mg/l Coomassie Brilliant Blue G-250

850 ml/l Distile su

100 ml/l %85'lik fosforik asit

8.4.3 DNS Reaktifi

10 g/l 3,5-dinitrosalisilik asit

10 g/l NaOH

2 g/l Fenol

200 g/l Sodyum potasyum tartarat

8.4.4 Sodyum Asetat Tamponu

214 ml/l 0,1M Asetik asit

286 ml/l 0,1M Sodyum asetat

8.4.5 2,5M NaOH Çözeltisi

100 g/l NaOH

1 l Distile su

8.5 Kültür Ortamı

8.5.1 Patates Dekstroz Agar (PDA)

Saf kültür olarak seçilmiş olan *Trichoderma reesei* QM9414 ve 1A mutant suşlarının üremesi ve canlılığını devam ettirebilmesi amacıyla kullanıldı.

39 g/l Patates dekstroz agar

1 l Distile su

Hazırlanan çözelti otoklavda 121°C’de 20 dakika sterilizasyon işlemine tabi tutuldu. Steril çözelti petri kutularına 20 ml çözelti denk gelecek şekilde döküldü ve soğumaya bırakıldı. Katılaşılan besiyerlerini içeren petri kutuları kullanılıncaya kadar +4°C’de depolandı. Petrilere saf kültürden zık zak ekim yöntemiyle ekim yapıldı. 28°C’de 7 gün boyunca etüvde inkübe edildi. Saf kültürden bu yol ile çoğaltılan mikroorganizma, stok (eğik) kültürlerin hazırlanması için kullanıldı. Etüvden çıkan petri kutularının ağzı parafilm ile kapatıldı ve +4°C’de saklandı. Bu işlem taze sporlara ihtiyaç duyuldukça tekrarlandı.

Stok kültürlerin hazırlanması için de PDA besiyerinden her bir tüp için 15 ml hazırlandı. Besiyerleri cam tüplere aktarıldıktan sonra tüplerin kapakları yarı açık konumda otoklava konuldu. Otoklavda 121°C’de 20 dakika sterilizasyonu yapıldı. Sterilizasyon işleminden sonra tüpler otoklavdan çıkarılarak kapakları tam kapatılarak eğik konumda soğumaya ve katılaşmaya bırakıldı. Daha sonra 7 gün boyunca petride üretilmiş olan sporlar steril öze yardımıyla eğik katı besiyerlerine aşılandı. Aşılanan sporlar etüvde 28°C’de 7 gün boyunca

üremeye bırakıldı. Bu kültürler, inokulum hazırlamak ve enzim üretimi ortamına aşı yapmak amacıyla kullanıldı. Bu işlem taze sporlara ihtiyaç duyuldukça tekrarlandı. +4°C’de saklanan küf suşları 2 ayda bir taze besiyerlerine aktarılarak küf suşlarının canlılığını sürdürmesi sağlandı.

8.5.2 MA sıvı besiyeri (Mandels ve Andreotti,1978)

Çalışmada kullanılan enzim üretim ortamı Mandels ve Andreotti (1978) tarafından önerilen fermantasyon ortamının modifiye edilmiş şeklidir. Bu besiyeri pektinaz enzimini üretmek amacıyla kullanıldı. Karbon kaynağı miktarı, istenen karbon kaynağı konsantrasyonuna göre hesaplanarak belirlendi.

17.799 g/l Na₂HPO₄.2H₂O

1.4 g/l (NH₄)₂SO₄

2.0 g/l KH₂PO₄

0.3 g/l MgSO₄.7H₂O

0.4 g/l CaCl₂.2H₂O

20 ml/l 50xİz elementi çözeltisi

1.0 g/l Pepton

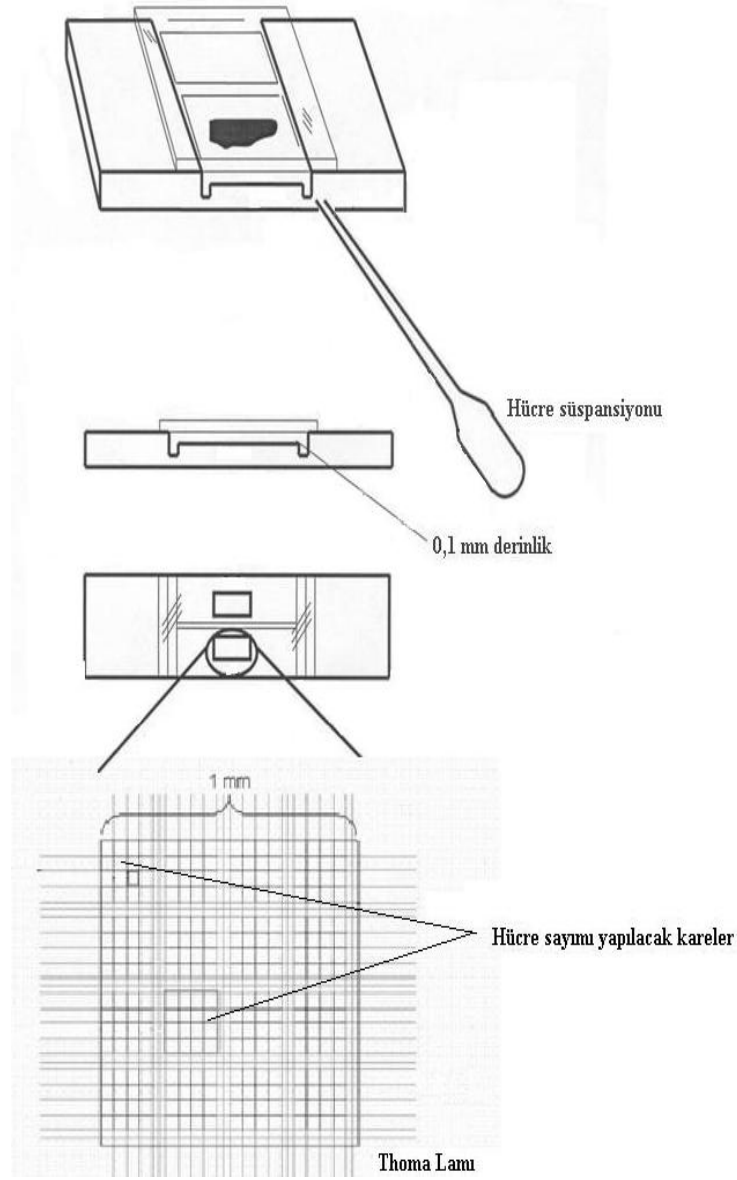
0.3 g/l Üre

10 g/l Karbon kaynağı

Besiyeri bileşenleri distile suda çözülüp pH’sı HCl ile 5.0’e ayarlandı. Hazırlanan çözelti otoklavda 121°C’de 20 dakika sterilizasyon işlemine tabi tutuldu. Steril çözelti oda sıcaklığında saklandı.

8.6 İnokulumun Spor Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Süspansiyondaki spor sayısının saptanması için Thoma lamında sayım yöntemiyle ışık mikroskobu kullanılarak belirlendi. Thoma lamının esası 0,1mm³ hacimde sayım yapılmasıdır (Şekil 8.1). 40x büyütmede 2 tekrarlı olarak spor sayımı yapıldı ve spor konsantrasyonu 10⁶ spor/ml olacak şekilde ayarlandı.



Şekil 8.1 Spor sayımında kullanılan thoma lamı

8.7 İnokulumun Hazırlanması

Sporları çözeltiye alınacak her bir eğik besiyerine, steril edilen distile sudan 10 ml ilave edildi. Sporlar steril yuvarlak uçlu öze yardımıyla agardan hafifçe kazınarak ayrıldı. Süspansiyon pipetlenerek sporların iyice karışması sağlandı. Bu şekilde elde edilen inokulumdan 0,5 ml alınarak sıvı besiyerinin ekiminde kullanıldı.

8.8 Kuru Misel Ağırlığının Belirlenmesi

Kuru misel ağırlığı belirlenecek numuneler, önceden darası alınmış kaba filtre kağıdından süzüldü, ağırlık sabitleninceye kadar kurutuldu. Sabit ağırlığa gelen numunelerden kağıt darası çıkarılarak sonuçlar elde edildi.

8.9 Hücre Dışı Spesifik Enzim Aktivitesinin Belirleneceği Numunelerin Eldesi

Karbon kaynağı olarak farklı konsantrasyonlarda pektin, glukoz ve gliserol içeren MA besiyerlerinde yapılan enzim üretim deneyleri sırasında 24., 30., 48., 72. ve 96. saatlerde her bir erlenden numune alındı. Her deney ortamı kontrol için çift çalışıldı Alınan numuneler santrifüj edilerek kalan hücrelerden arındırıldı. Bu şekilde elde edilen numuneler hücre dışı enzim aktivitesi ve protein miktarını saptamak için kullanıldı.

8.10 Bradford Metoduna Göre Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Protein konsantrasyonunun hesaplanması için kullanılan yöntemlerden biri olan Bradford yöntemi (boya bağlama yöntemi), proteinlerdeki pozitif yüklere bağlanan negatif yüklü Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının, farklı konsantrasyonlardaki proteinlerle farklı renklerde çözeltiler ortaya koyması esasına dayanmaktadır. Ucuz ve hızlı olan bu yöntemde, asidik boya çözeltideki proteine bağlanır ve 595 nm’de maksimum absorpsiyon değeri elde edilir. Protein çözeltisi Bradford reaktifi ile muamele edildiğinde reaktif ile proteinlerin anyonik kısımlarının hidrofobik ve iyonik etkileşimi, kahverengiden maviye doğru bir renk değişimi ile sonuçlanır. Örneklere ait değerler standart eğriyle karşılaştırılarak protein konsantrasyonu belirlenir (Bradford, 1976).

Bu çalışma esnasında elde edilen numunelere ait protein konsantrasyonları Bradford yöntemi kullanılarak belirlendi.

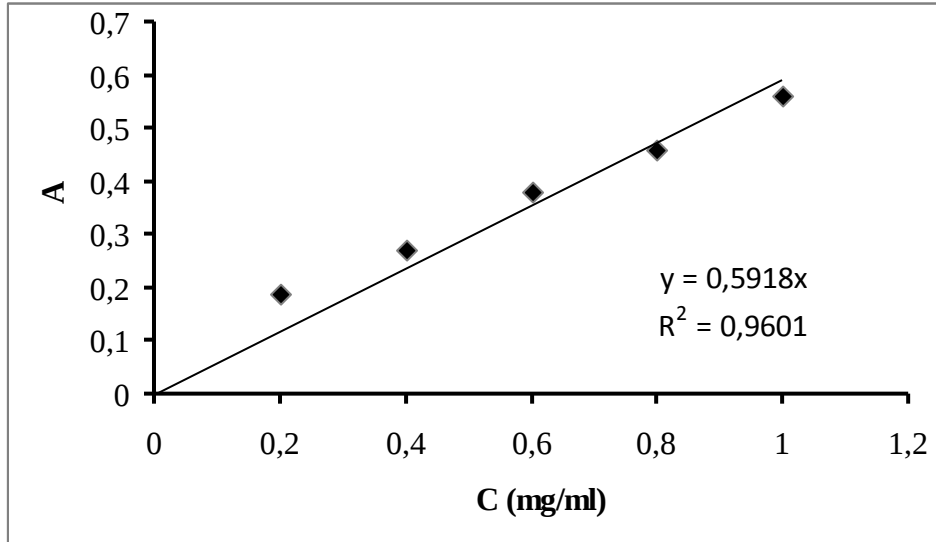
200 µl Bradford reaktifi

800 µl Konsantrasyonu belirlenecek protein numunesi

Bu miktarlar pipetlenerek reaksiyonun gerçekleşmesi için 5 dakika beklendi. Oluşan rengin absorbansı 595 nm dalga boyuna ayarlanmış ve 200 µl Bradford reaktifi:800 µl distile su karışımından oluşan köre karşı sıfırlanmış spektrofotometrede ölçüldü. Her bir numune için deney üç kere tekrarlandı.

8.11 Protein Standart Eğri Grafiğinin Çizilmesi

Protein standart eğri grafiğinin çizilmesi için önce BSA'nın 100mg/100ml konsantrasyonundaki stok çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltinin distile su ile seyreltilmesi sonucu konsantrasyonları 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm, 500 ppm, 600 ppm, 700 ppm, 800 ppm, 900 ppm ve 1000 ppm olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere, ayrı ayrı, Bradford metodu uygulandıktan sonra oluşan renklerin absorbansları 595 nm dalga boyuna ayarlanmış ve 200 µl Bradford reaktifi:800 µl distile su karışımından oluşan köre karşı sıfırlanmış spektrofotometrede ölçüldü. Deney beş kere tekrarlandı ve değişik konsantrasyondaki çözeltilerin absorbans değerinden 0 ppm boş örnek çözeltisinin absorbans değerinin çıkartılması ile bulunan değerlere en küçük kareler yöntemi uygulanarak protein regresyon denklemi elde edildi ve protein standart eğrisi çizildi. (Şekil 8.2)



Şekil 8.2 Bovin serum albumin (BSA) standart grafiği

8.12 Hücre Dışı Spesifik Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Hücre dışı spesifik enzim aktivitesi Miller (1959) tarafından tanımlanmış metoda göre belirlendi. Miller'a göre karbonhidrataz etkisi gösteren enzimlerin aktivite analizlerinde indirgen şeker miktarının saptanması için dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemi kullanılabilmektedir. Bu metod ile 3,5-dinitrosalisilik asit, 3-amino-5-nitrosalisilik asite indirgenmekte ve aldehit grupları karboksilik gruplara okside olarak gelişen renk reaksiyonunu oluşturmaktadır.

Çalışmamızda pektinaz aktivitesi ortama enzimin substratı olan pektinin eklenmesi ile ölçülmektedir. pH 4.8, 50 mM sodyum asetat tamponunda çözülerek hazırlanan %1(w/v)'lik pektin, pektinaz tarafından D-galakturonik asite parçalanmaktadır. Reaksiyon sonucunda oluşan rengin absorbansı 540 nm dalga boyuna ayarlanmış spektrofotometrede ölçülerek numunede ki pektinaz miktarı belirlenmektedir.

Aktivite ölçümü Çizelge 8.1' de gösterildiği gibi yapıldı. Her bileşen, deney tüpüne belirtilen miktarlarda pipetlendi ve protokol uygulandı. Elde edilen absorpsiyon değerinin D-galakturonik asit regresyon denkleminde uygulanmasıyla enzim tarafından bir dakikada açığa çıkarılan D-galakturonik asit miktarı $\mu\text{mol/dakika}$ olarak belirlendi. Bir ünite (U) pektinaz aktivitesi; dakikada 1 μmol galakturonik asit oluşturan enzim miktarı olarak tanımlandı.

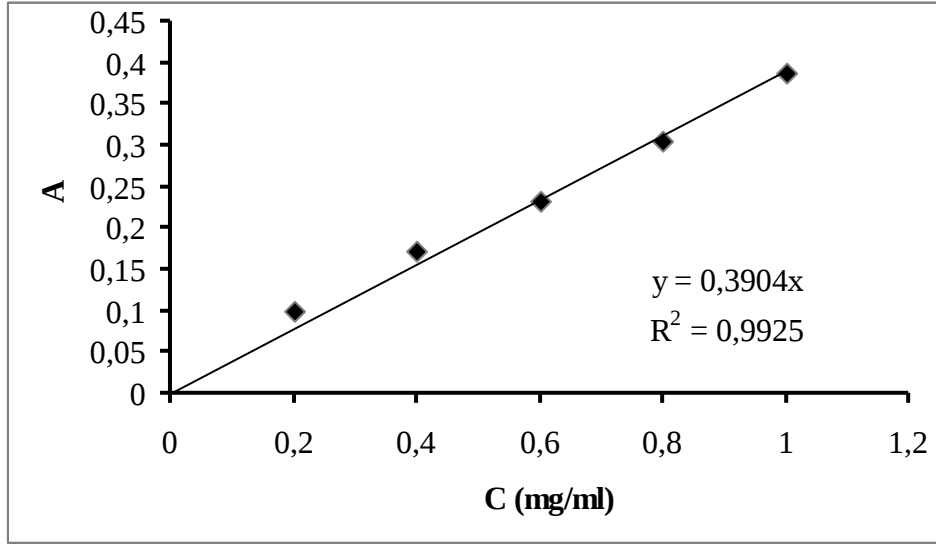
Çizelge 8.1 DNS yöntemi ile pektinaz aktivitesi ölçümü

Kör	Boş Örnek Çözeltisi	Numune Çözeltisi
375 µl sodyum asetat tamponu	250 µl %1(w/v)'lik pektin çözeltisi	250 µl %1(w/v)'lik pektin çözeltisi
-----	125 µl numune çözeltisi	125 µl numune çözeltisi
-----	250 µl 2,5M NaOH	-----
50°C su banyosunda 30 dakika inkübasyon	50°C su banyosunda 30 dakika inkübasyon	50°C su banyosunda 30 dakika inkübasyon
250 µl 2,5M NaOH	-----	250 µl 2,5M NaOH
750 µl DNS	750 µl DNS	750 µl DNS
5 dakika kaynar suda bekletilir	5 dakika kaynar suda bekletilir	5 dakika kaynar suda bekletilir
3,75 ml distile su	3,75 ml distile su	3,75 ml distile su

8.13 D-Galakturonik Asit Standart Eğri Grafiğinin Çizilmesi

D-galakturonik asit standart eğri grafiğinin çizilmesi için önce D-galakturonik asit'in 100mg/100ml konsantrasyonundaki stok çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltinin distile su ile seyreltilmesi sonucu konsantrasyonları 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm, 500 ppm, 600 ppm, 700 ppm, 800 ppm, 900 ppm ve 1000 ppm olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere, ayrı ayrı, DNS enzim aktivite ölçüm yöntemi uygulandıktan sonra oluşan renklerin absorbansları 540 nm dalga boyuna ayarlanmış ve hazırlanan köre karşı sıfırlanmış spektrofotometrede ölçüldü. Deney beş kere tekrarlandı ve değişik konsantrasyondaki çözeltilerin absorbans

değerinden 0 ppm boş örnek çözeltisinin absorbans değerinin çıkartılması ile bulunan değerlere en küçük kareler yöntemi uygulanarak D-galakturonik asit regresyon denklemi elde edildi ve D-galakturonik asit standart eğrisi çizildi (Şekil 8.3).



Şekil 8.3 D-galakturonik asit standart grafiği

8.14 Pektinin Farklı Konsantrasyonlarının *Trichoderma reesei* QM9414'de Pektinaz Üretimine Etkisinin Saptanması

Çalışmada kullanılan enzim indüksiyon ortamına, karbon kaynağı olarak konsantrasyonu %1 ve %10 (w/v) olacak şekilde pektin ilave edildi. Pektinin, pektinaz üretimine etkisini araştırmak için çalkalamalı inkübatörde 200 rpm hızında, 30°C'de 24, 30, 48, 72 ve 96 saat süresince inkübe edildi.

8.15 Glukozun Farklı Konsantrasyonlarının *Trichoderma reesei* QM9414'de Pektinaz Üretimine Etkisinin Saptanması

Çalışmada kullanılan enzim indüksiyon ortamına, karbon kaynağı olarak konsantrasyonu %1 ve %10 (w/v) olacak şekilde glukoz ilave edildi. Glukozun, pektinaz üretimine etkisini araştırmak için çalkalamalı inkübatörde 200 rpm hızında, 30°C'de 24, 30, 48, 72 ve 96 saat süresince inkübe edildi.

8.16 Gliserolün Farklı Konsantrasyonlarının *Trichoderma reesei* QM9414’de Pektinaz Üretimine Etkisinin Saptanması

Çalışmada kullanılan enzim indüksiyon ortamına, karbon kaynağı olarak konsantrasyonu %1 ve %10 (w/v) olacak şekilde gliserol ilave edildi. Gliserolün, pektinaz üretimine etkisini araştırmak için çalkalamalı inkübatörde 200 rpm hızında, 30°C’de 24, 30, 48, 72 ve 96 saat süresince inkübe edildi.

8.17 Pektinin Farklı Konsantrasyonlarının *Trichoderma reesei* 1A mutantında Pektinaz Üretimine Etkisinin Saptanması

Çalışmada kullanılan enzim indüksiyon ortamına, karbon kaynağı olarak konsantrasyonu %1 ve %10 (w/v) olacak şekilde pektin ilave edildi. Pektinin, pektinaz üretimine etkisini araştırmak için çalkalamalı inkübatörde 200 rpm hızında, 30°C’de 24, 30, 48, 72 ve 96 saat süresince inkübe edildi.

8.18 Glukozun Farklı Konsantrasyonlarının *Trichoderma reesei* 1A mutantında Pektinaz Üretimine Etkisinin Saptanması

Çalışmada kullanılan enzim indüksiyon ortamına, karbon kaynağı olarak konsantrasyonu %1 ve %10 (w/v) olacak şekilde glukoz ilave edildi. Glukozun, pektinaz üretimine etkisini araştırmak için çalkalamalı inkübatörde 200 rpm hızında, 30°C’de 24, 30, 48, 72 ve 96 saat süresince inkübe edildi.

8.19 Gliserolün Farklı Konsantrasyonlarının *Trichoderma reesei* 1A mutantında Pektinaz Üretimine Etkisinin Saptanması

Çalışmada kullanılan enzim indüksiyon ortamına, karbon kaynağı olarak konsantrasyonu %1 ve %10 (w/v) olacak şekilde gliserol ilave edildi. Gliserolün, pektinaz üretimine etkisini araştırmak için çalkalamalı inkübatörde 200 rpm hızında, 30°C’de 24, 30, 48, 72 ve 96 saat süresince inkübe edildi.

8.20 Protein Miktarının Hesaplanması

Şekil 8.2' de ki BSA standart eğrisi kullanılarak mL'deki protein miktarları hesaplandı.

8.21 Enzim Aktivitesinin Hesaplanması

Bir ünite (U) pektinaz aktivitesi; standart koşullar altında bir dakikada pektinden 1 μ mol galakturonik asit açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlandı ve enzim aktivitesi total ünite olarak U/mL cinsinden ifade edildi.

Şekil 8.3' de ki standart D-galakturonik asit eğrisi kullanılarak bulunan D-galakturonik asit konsantrasyonları aşağıdaki denklemde yerine yazılarak total ünite (U/mL) hesaplandı.

$$\text{Total Ünite (U/mL)} = [(\text{mg D-galakturonik asit/mL} \times 1000) / (t \times M_A)]$$

mg D-galakturonik asit/mL: Numunelerin absorbanlarına karşılık gelen

D-galakturonik asit miktarı

t : İnkübasyon zamanı (30 dakika)

M_A : Açığa çıkan D-galakturonik asitin molekül kütlesi (212,15 g/mol)

8.22 Spesifik Aktivitenin Hesaplanması

Total ünite değerleri mL'deki protein miktarına bölünerek spesifik aktivite hesaplandı. Spesifik aktivite U/mg protein olarak verildi.

8.23 Pektinazın Kısmi Saflaştırılması

8.23.1 *Trichoderma reesei* 1A Mutant Suşunda Pektinaz Eldesi

Yapılan ön çalışmalar sonucunda pektinaz aktivitesinin yüksek bulunduğu ortam ve suş kullanıldı. Aktivitenin yüksek olduğu saatte numune alındı. Buna göre karbon kaynağı olarak konsantrasyonu %10 (w/v) olacak şekilde glukoz ve gliserol içeren MA besiyerleri bölüm

8.5.2’de belirtildiği şekilde hazırlanarak 200 rpm hızda 28°C’de 96 saat süreyle inkübe edildi. Her deney ortamı kontrol için çift çalışıldı. İnkübasyon süresinin sonunda kültür örnekleri kaba filtre kağıdında süzülerek hücrelerden ayrıldı. Bu şekilde elde edilen numuneler 0°C’de 10000 rpm’de 30 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantta enzim aktivitesi ve protein miktarı tayini yapıldı.

8.23.2 Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Amonyum sülfat gibi nötral tuzlar konsantrasyona bağlı olarak proteinler arasında elektrostatik ve nonpolar (hidrofobik) etkileşimle etkilerini gösterirler. Amonyum sülfat suda yüksek düzeyde çözünebilir, çözelti sıcaklığı düşüktür, ucuz ve saf halde bulunur. Bu nedenle proteinlerin presipitasyonunda sıklıkla kullanılır. Ayrıca genellikle denatürasyona neden olmadan proteinlerin agregasyonunu sağlar. Presipite olmuş protein santrifüj yapılarak elde edilir.

8.23.3 *Trichoderma reesei* 1A Mutant Pektinazını Çöktüren Uygun Amonyum Sülfat Konsantrasyonunun Saptanması

Trichoderma reesei 1A Mutant pektinazını çöktürecek uygun amonyum sülfat konsantrasyonunu veren tuz miktarları tablodan yararlanılarak hesaplandı (Green ve Hughes, 1955).

Gerekli amonyum sülfat miktarlarının tespitinden sonra 25 mL’lik behere 5 mL süpernatant konuldu. İlk behere ortamdaki konsantrasyonu %10(w/v) olacak şekilde toz amonyum sülfat yavaş yavaş ilave edilerek karıştırıldı. Sonraki her beherde konsantrasyon %10 arttırılarak, %100’e kadar değişen oranlarda toz amonyum sülfat yavaş yavaş ilave edilerek karıştırıldı. Süpernatant içindeki amonyum sülfat tamamen çözüldükten sonra 30 dakika daha manyetik karıştırıcıda nazikçe karıştırılarak, ağızları kapatıldı ve +4°C’de bir gece bekletildi. Bir gece boyunca +4°C’de bekletilen her beherdeki süpernatant 0°C’de 10000 rpm’de 30 dakika santrifüj edildi. Oluşan yeni süpernatant dökülerek çökelti ayrıldı. En uygun konsantrasyonun belirlenmesi amacıyla oluşan çökeltiler 1 mL pH 4.8, 50mM sodyum asetat tamponu içerisine alındı. Enzim aktivite ve protein miktarı tayini yapıldı.

8.23.4 Aseton ve Etanol Çöktürmesi

Etanol ve aseton gibi organik çözücülerin hedef proteinlerin bulunduğu çözeltiye eklenmesi, protein presipitasyonuna sebep olur. Ana etki su aktivitesini düşürme şeklindedir. Elektrik yüküne sahip hidrofil enzim molekülü için suyun çözücü gücü, organik çözücünün ortamdaki konsantrasyonu arttıkça azalacaktır. Bu durum, çözücünün dielektrik sabitesinin indirgenmesi veya basitçe suyun kütsel yer değişimi ile açıklanabilir.

8.23.5 *Trichoderma reesei* 1A Mutant Pektinazını Çöktüren Uygun Aseton ve Etanol Konsantrasyonunun Saptanması

25 mL'lik behere elde edilen süpernatanttan 5 mL alındı. İlk behere ortamdaki konsantrasyonu %10(v/v) olacak şekilde -20°C'de bekletilmiş asetondan yavaş yavaş ilave edilerek karıştırıldı. Sonraki her beherde konsantrasyon %10 arttırılarak, %100'e kadar değişen oranlarda soğuk asetondan yavaş yavaş ilave edilerek karıştırıldı. Süpernatant içine uygun hacmin tamamı eklendikten sonra 30 dakika daha manyetik karıştırıcıda nazikçe karıştırılarak, ağızları kapatıldı ve +4°C'de bir gece bekletildi. Bir gece boyunca +4°C'de bekletilen her beherdeki süpernatant 0°C'de 10000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Oluşan yeni süpernatant dökülerek çökelti ayrıldı. En uygun konsantrasyonun belirlenmesi amacıyla oluşan çökeltiler 1 mL pH 4.8, 50mM sodyum asetat tamponu içerisine alındı. Enzim aktivite ve protein miktarı tayini yapıldı.

8.24 Ekspresyon Vektörünün Oluşturulması ve *Trichoderma reesei* suşuna Transformasyonu

pRLMex30 klonlama vektöründeki *H. jecorina* pkil (piruvat kinaz) promotör bölgesi SacII/XbaI restriksiyon enzimleri ile kesilen pBlueScript SK(+) içine klonlandı. SalI enzimi ile kesilerek *H. jecorina* pyr4 (orotidin-5'-monofosfat dekarboksilazı kodlar) geni genetik marker olarak pBS-Ppki-pyr4 kasetine yerleştirildi. Dört adet *H. jecorina* pektinaz genini içeren kodlayıcı bölgenin tamamı ve 500 bazçiftlik terminatör bölgesi *H. jecorina* QM9414'ün genomik DNA sı kullanılarak sentezlenen primerler kullanılarak amplifiye edildi, XbaI/BamHI restriksiyon enzimleri yardımıyla pBS-Ppki-pyr4 kasetine yerleştirildi. Ekspresyon plazmidi *H. jecorina* TU-6 ya protoplast metodu kullanılarak klonlandı.

9. SONUÇ ve TARTIŞMA

9.1 Sonuçlar

9.1.1 Suşların Karbon Kaynağı Olarak Glukoz İçeren MA Sıvı Besiyerindeki Üreme Davranışları

T. reesei'nin kontrol suşu QM9414 ve mutant suşu 1A'nın karbon kaynağı olarak konsantrasyonu %10(w/v) olacak şekilde glukoz içeren MA sıvı besiyerindeki üreme davranışı gözlemlendi. Bu gözlemin sonunda 1A mutant suşunun 96 saat sonunda 30.65 g/l biyokütleyle ulaşarak 96 saat sonunda 9.73 g/l biyokütleyle ulaşan kontrol suşundan daha iyi bir üreme gösterdikleri belirlendi. (Çizelge 9.1)

Çizelge 9.1 %10'luk glukoz içeren besiyerinde QM9414 ve 1A mutant suşunun üreme davranışı

Küf Suşu	Karbon Kaynağı	Numunenin Alındığı Saat	Ortalama Kuru Misel Ağırlığı (g/l)
QM9414	Glukoz	96	9.73
1A Mutant	Glukoz	96	30.65

9.1.2 Suşların Karbon Kaynağı Olarak Gliserol İçeren MA Sıvı Besiyerindeki Üreme Davranışları

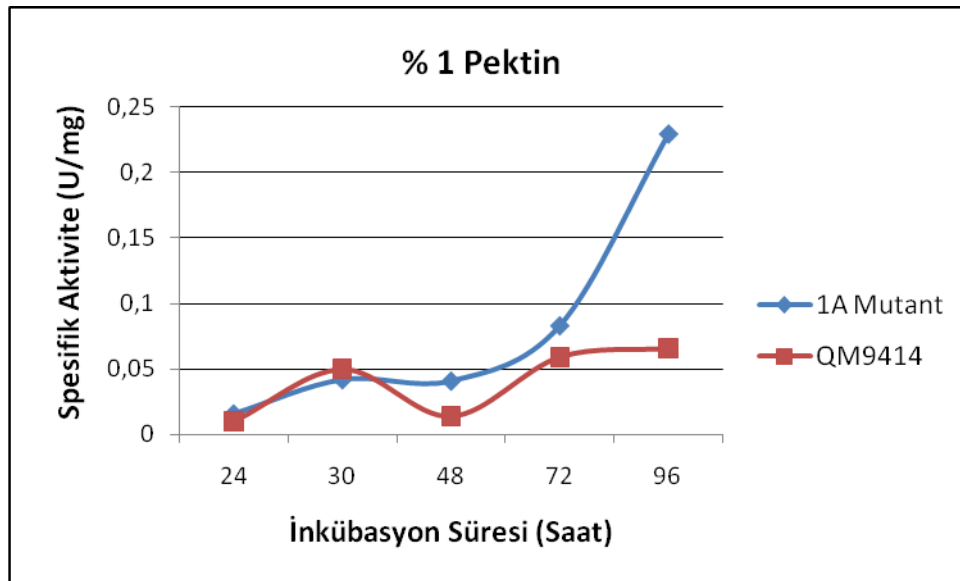
T. reesei'nin kontrol suşu QM9414 ve mutant suşu 1A'nın karbon kaynağı olarak konsantrasyonu %10(w/v) olacak şekilde gliserol içeren MA sıvı besiyerindeki üreme davranışı gözlemlendi. Bu gözlemin sonunda 1A mutant suşunun 96 saat sonunda 14.85 g/l biyokütleyle ulaşarak 96 saat sonunda 8.6 g/l biyokütleyle ulaşan kontrol suşundan daha iyi bir üreme gösterdikleri belirlendi. (Çizelge 9.2)

Çizelge 9.2 %10'luk gliserol içeren besiyerinde QM9414 ve 1A mutant suşunun üreme davranışı

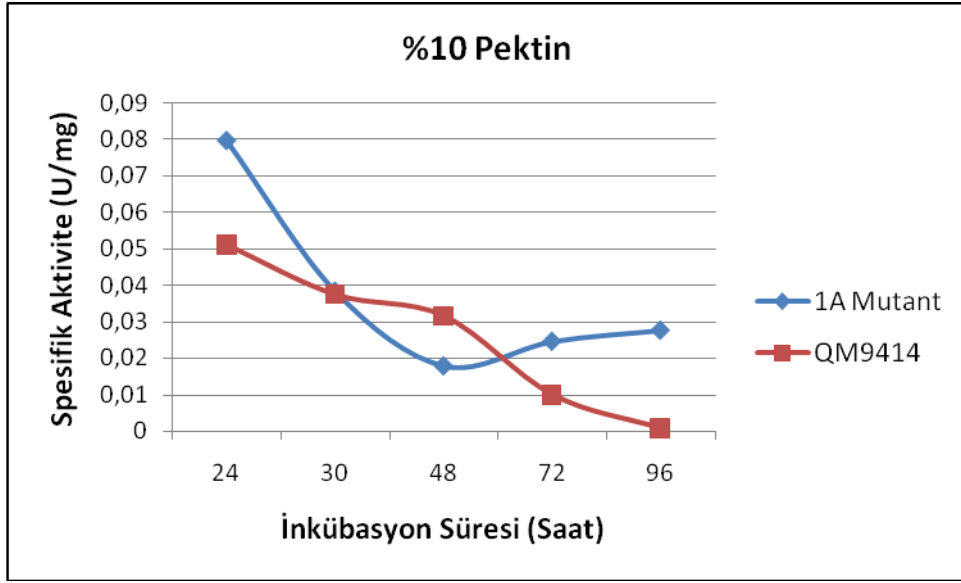
Küf Suşu	Karbon Kaynağı	Numunenin Alındığı Saat	Ortalama Kuru Misel Ağırlığı (g/l)
QM9414	Gliserol	96	8.6
1A Mutant	Gliserol	96	14.85

9.1.3 Pektinin Farklı Konsantrasyonlarının *Trichoderma reesei* 1A mutantında Pektinaz Üretimine Etkisi

Karbon kaynağı pektinin farklı konsantrasyonlarının *Trichoderma reesei* 1A mutantındaki pektinaz üretimine etkisini saptamak için enzim indüksiyon ortamlarına %1 ve %10 (w/v) olmak üzere 2 farklı konsantrasyonda pektin ilave edildi. Kontrol olarak *Trichoderma reesei* QM9414 kullanıldı. 24., 30., 48., 72. ve 96. saatlerde alınan örneklerde total ünite ve protein miktarı tayini yapılarak spesifik aktivite hesaplandı (Şekil 9.1, Şekil 9.2). Konsantrasyonu %1 (w/v)'lik olacak şekilde pektin ile desteklenen ortamda ki pektinaz aktivitesinin daha yüksek olduğu belirlendi.



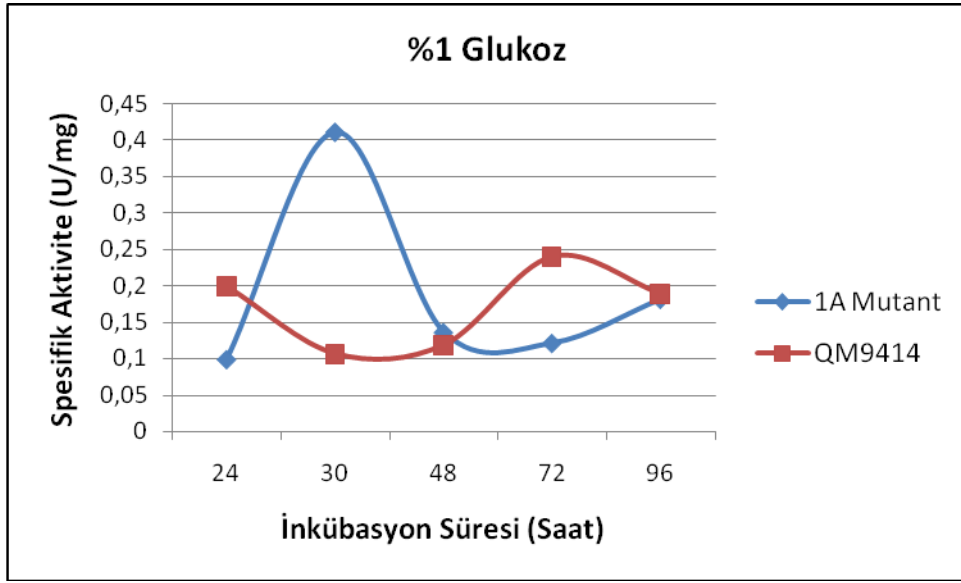
Şekil 9.1 *Trichoderma reesei* 1A mutantının %1 (w/v)'lik pektin içeren ortamdaki spesifik pektinaz aktivitesi



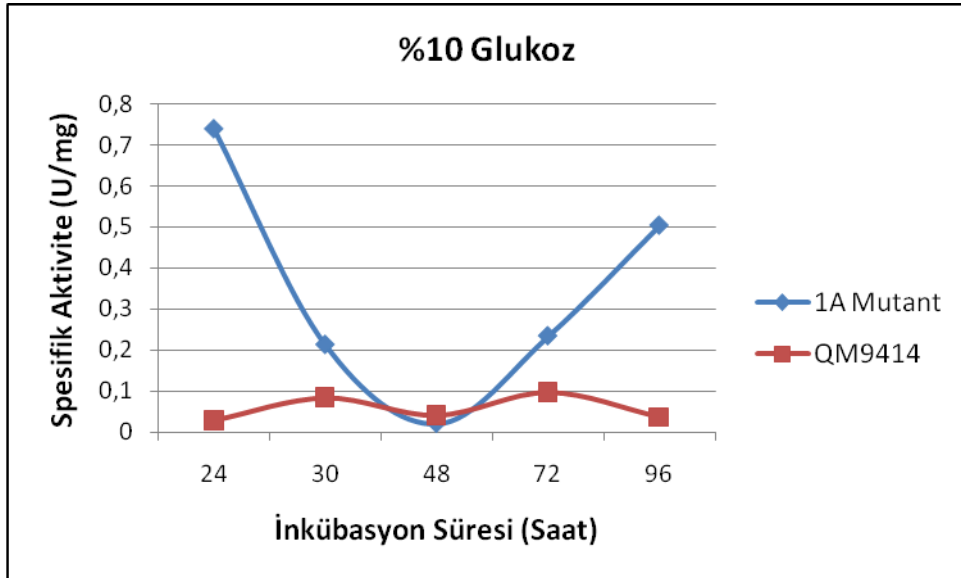
Şekil 9.2 *Trichoderma reesei* 1A mutantının %10 (w/v)'luk pektin içeren ortamdaki spesifik pektinaz aktivitesi

9.1.4 Glukozun Farklı Konsantrasyonlarının *Trichoderma reesei* 1A Mutantında Pektinaz Üretimine Etkisi

Karbon kaynağı glukozun farklı konsantrasyonlarının *Trichoderma reesei* 1A mutantında pektinaz üretimine etkisini saptamak için enzim indüksiyon ortamlarına %1 ve %10 (w/v) olmak üzere 2 farklı konsantrasyonda glukoz ilave edildi. Kontrol olarak *Trichoderma reesei* QM9414 kullanıldı. 24., 30., 48., 72. ve 96. saatlerde alınan örneklerde total ünite ve protein miktarı tayini yapılarak spesifik aktivite hesaplandı (Şekil 9.3, Şekil 9.4). Konsantrasyonu %10 (w/v)'luk olacak şekilde glukoz ile desteklenen ortamda ki pektinaz aktivitesinin daha yüksek olduğu belirlendi.



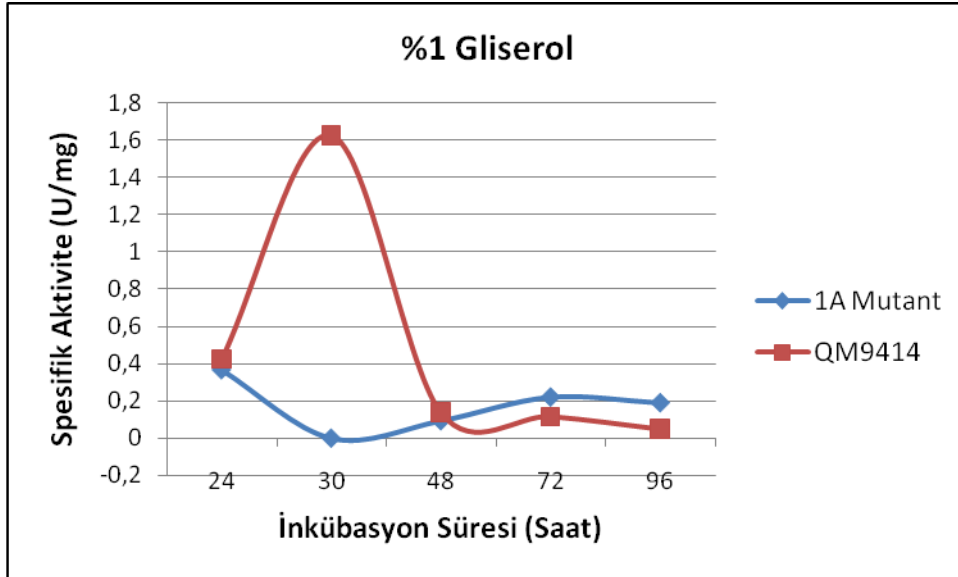
Şekil 9.3 *Trichoderma reesei* 1A mutantının %1 (w/v)'lik glukoz içeren ortamdaki spesifik pektinaz aktivitesi



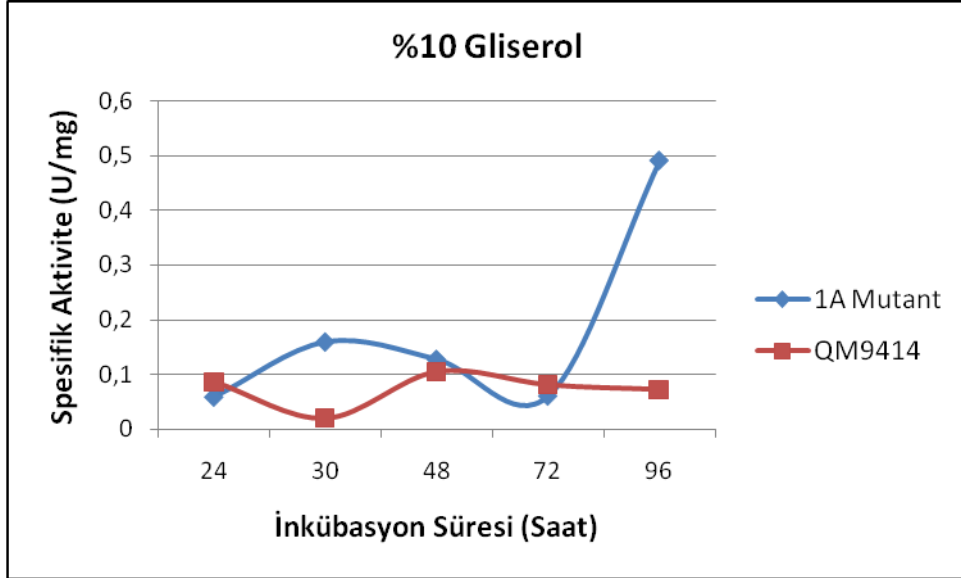
Şekil 9.4 *Trichoderma reesei* 1A mutantının %10 (w/v)'luk glukoz içeren ortamdaki spesifik pektinaz aktivitesi

9.1.5 Gliserolün Farklı Konsantrasyonlarının *Trichoderma reesei* 1A Mutantında Pektinaz Üretimine Etkisi

Karbon kaynağı gliserolün farklı konsantrasyonlarının *Trichoderma reesei* 1A mutantında pektinaz üretimine etkisini saptamak için enzim indüksiyon ortamlarına %1 ve %10 (w/v) olmak üzere 2 farklı konsantrasyonda gliserol ilave edildi. Kontrol olarak *Trichoderma reesei* QM9414 kullanıldı. 24., 30., 48., 72. ve 96. saatlerde alınan örneklerde total ünite ve protein miktarı tayini yapılarak spesifik aktivite hesaplandı (Şekil 9.5, Şekil 9.6). Konsantrasyonu %10 (w/v)'luk olacak şekilde gliserol ile desteklenen ortamdaki pektinaz aktivitesinin daha yüksek olduğu belirlendi.



Şekil 9.5 *Trichoderma reesei* 1A mutantının %1 (w/v)'lik gliserol içeren ortamdaki spesifik pektinaz aktivitesi



Şekil 9.6 *Trichoderma reesei* 1A mutantının %10 (w/v)'luk gliserol içeren ortamdaki spesifik pektinaz aktivitesi

9.1.6 *Trichoderma reesei* 1A Mutant Pektinazının Kısmi Saflaştırılması

Çalışmada elde edilen verilerin değerlendirilmesiyle 1A mutant suşunun ürettiği pektinazın en yüksek spesifik aktivite gösterdiği karbon kaynakları, konsantrasyonu %10 (w/v) olacak şekilde glukoz ve gliserol olduğu tespit edildi. Yüksek spesifik aktivite değerine sahip pektinaz 96 saatlik inkübasyon süresi sonunda elde edildi. Bundan sonraki aşamalarda enzim üretimi için bu değerler baz alındı.

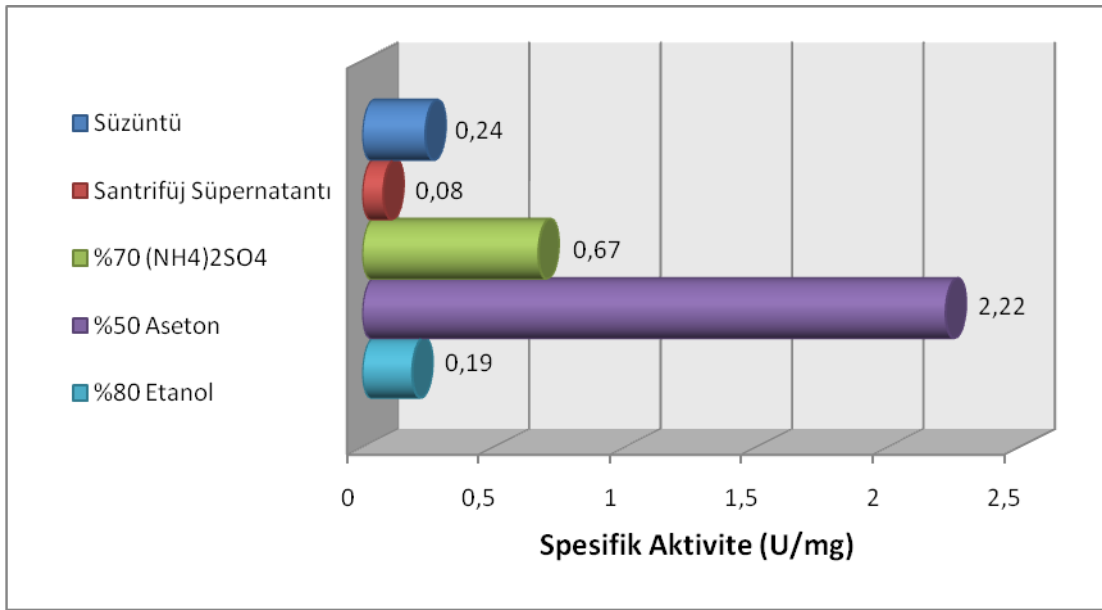
Trichoderma reesei 1A mutantının konsantrasyonu %10 (w/v) olacak şekilde glukoz ve gliserol içeren besiyerlerinde ürettiği pektinazın saflaştırılması amacıyla, amonyum sülfat, aseton ve etanol çöktürmesi yapıldı. Bölüm 8.23' de anlatıldığı gibi yapılan çöktürme sonunda elde edilen protein ve aktivite değerleri Çizelge 9.3 ve Çizelge 9.4'te gösterilmiştir. Farklı yöntemlerin kullanılmasıyla kısmi olarak saflaştırılan pektinazın spesifik aktivite sonuçları Şekil 9.7 ve Şekil 9.8'de karşılaştırılmıştır.

Çizelge 9.3 %10 glukoz içeren besiyerinde 1A mutant suşundan elde edilen pektinazın kısmi saflaştırılması

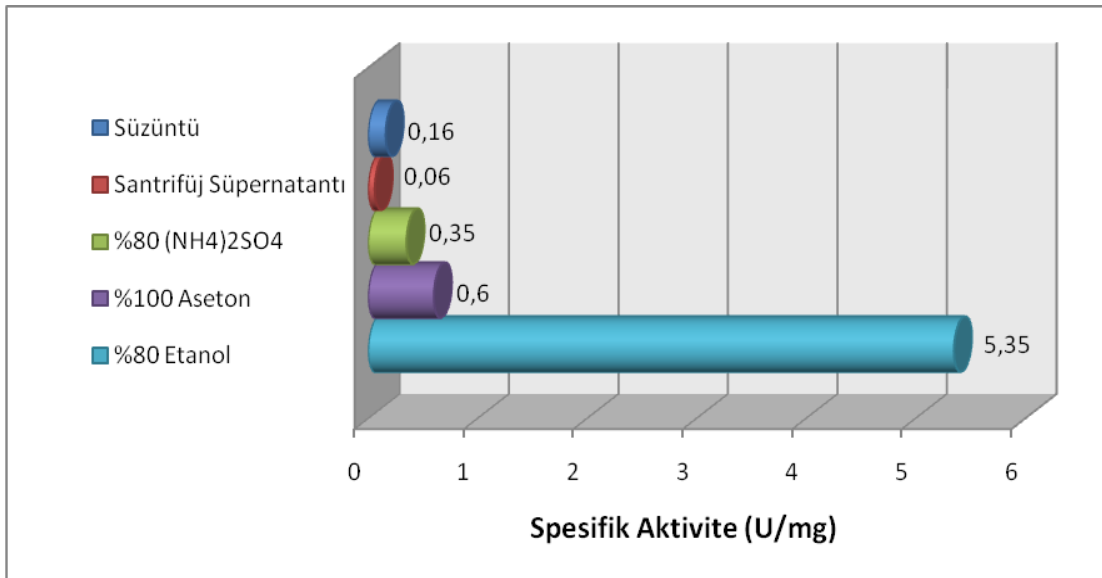
Prosedür	Total Ünite (U/mL)	Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma
Süzüntü	0,04	0,19	0,24	1
Santrifüj Süpernatantı	0,02	0,32	0,08	0,3
%70 (NH ₄) ₂ SO ₄	0,28	0,42	0,67	2,79
%50 Aseton	0,11	0,05	2,22	9,25
%80 Etanol	0,08	0,44	0,19	0,7

Çizelge 9.4 %10 gliserol içeren besiyerinde 1A mutant suşundan elde edilen pektinazın kısmi saflaştırılması

Prosedür	Total Ünite (U/mL)	Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma
Süzüntü	0,06	0,31	0,16	1
Santrifüj Süpernatantı	0,01	0,45	0,06	0,38
%80 (NH ₄) ₂ SO ₄	0,13	0,37	0,35	2,19
%100 Aseton	0,11	0,19	0,60	3,75
%80 Etanol	0,18	0,03	5,35	33,43



Şekil 9.7 Glukozlu ortamda farklı çöktürme yöntemleriyle elde edilen spesifik pektinaz aktivitesinin karşılaştırılması



Şekil 9.8 Gliserollü ortamda farklı çöktürme yöntemleriyle elde edilen spesifik pektinaz aktivitesinin karşılaştırılması

%10 (w/v) glukoz içeren besiyerlerinde üretilen pektinazın kısmi saflaştırma analiz sonuçlarına göre %50 aseton ile yapılan çöktürme sonucunda total üitedeki artışa rağmen protein miktarındaki azalma enzim proteininin yabancı proteinlerden önemli ölçüde temizlendiğinin işareti olarak kabul edildi. %10 (w/v) gliserol içeren besiyerlerinde üretilen pektinazın kısmi saflaştırma analiz sonuçlarına göre ise %80 etanol ile yapılan çöktürme sonucunda da benzer sonuçlar elde edildi.

9.2 Tartışma

Yıllar boyunca filamentöz mantarlardan üretilen enzimler gıda üretim proseslerinde kullanılmıştır. Büyük ölçekli fermantasyonun endüstride yaygın bir şekilde kullanılması, proses mühendisliğinde ki ilerlemeler ve genetik olarak modifiye edilmiş suşların gelişimi bugün endüstri üretiminde filamentöz mantarların kullanımının artmasına sebep olmuştur. Genellikle, doğada bulunan suşlar ihtiyacımız olandan çok daha düşük miktarlarda protein ürettiğinden ticari olarak kullanılamamaktadır. Bu yüzden istenilen hedef proteini alabilmek için doğadaki suşlara genetik transformasyon yapılmaktadır. Moleküler genetik teknikleri ve mantarlarda gen transfer sistemlerinin gelişimiyle filamentöz mantarlarda genetik mühendisliği metodları kullanılarak genetik transformasyon mümkün hale gelmiştir.

Trichoderma reesei çok hücreli ökaryotik filamentöz bir mantardır. Mükemmel bir protein üretimine ve protein salgılama kapasitesine sahiptir. Ökaryotik salgılama mekanizması ile tıpkı memeli sistemlerdeki gibi modifiye proteinler sentezleyebilmektedir. *Trichoderma reesei* ticari ölçekli fermantasyon koşullarının optimizasyonu ile birlikte çok daha üstün bir performansa sahip olmuştur. Endüstriyel suşları farklı bitki materyallerini parçalayabilecek selüloz, hemiselüloz, proteaz, amilaz, pektinaz gibi enzimler üretebilmektedir. Tüm bu özellikleri sebebiyle *Trichoderma reesei*, yapılan genetik modifikasyonlarla homolog veya heterolog protein üretimi için etkili bir kaynak haline gelmiştir. *Trichoderma reesei* yalnızca protein üretimindeki avantajlarından dolayı değil aynı zamanda insanlar için toksik olmamasından dolayı uygun bir mikroorganizma olarak karşımıza çıkmaktadır. *T. reesei* enzim üretim koşullarında insanlar için toksik olabilecek mikotoksinleri ve antibiyotikleri üretmemektedir. Son yıllardaki uygulamalar genetik olarak modifiye edilmiş *Trichoderma reesei* suşlarının endüstriyel kullanımının güvenilir olduğunu göstermiştir.

Trichoderma reesei genom dizi analizi tamamlanmış ilk mantar olma özelliği taşır. 7 kromozomdan oluşan genomu 34 Mbp büyüklüğündedir. Dizi analizi yapılmış bütün bitki hücre duvarını parçalayan mantarlar arasında *T. reesei* en az sayıda selüloz ve hemiselüloz geni içermesine rağmen, selülozu ve hemiselülozu etkin bir şekilde parçalamaktadır. Ayrıca genomunda birkaç pektinaz geni bulunmaktadır. Bu nedenle topraktaki diğer bakteri ve mantarlarla birlikte pektini parçalayabilen organizma olarak kabul edilmektedir (Martinez vd., 2008).

Farklı karbon kaynaklarının ve farklı konsantrasyonlarının pektinaz genlerinin indüksiyonunu etkileyip etkilemediğini gözlemlemek için 1A mutant suşunda bu genlerin indüksiyon seviyeleri karşılaştırıldı. İndüksiyonu sağlamak için karbon kaynağı olarak pektin kullanıldığında 1A mutant suşunda, kontrol suşu QM9414'e göre daha yüksek pektinaz aktivitesine rastlandı. %1'lik (w/v) pektin kullanıldığında bu genlerin transkripsiyonunun %10'luk (w/v) pektine göre daha yüksek olduğu görüldü. Karbon kaynağı olarak glukoz kullanıldığında kullanıldığında 1A mutant suşunda, kontrol suşu QM9414'e göre daha yüksek pektinaz aktivitesine rastlandı. %10'luk (w/v) glukoz kullanıldığında bu genlerin transkripsiyonunun %1'lik (w/v) glukozla göre daha yüksek olduğu görüldü. Karbon kaynağı olarak gliserol kullanıldığında kullanıldığında 1A mutant suşunda, kontrol suşu QM9414'e göre daha yüksek pektinaz aktivitesine rastlandı. %10'luk (w/v) gliserol kullanıldığında bu genlerin transkripsiyonunun %1'lik (w/v) gliserole göre daha yüksek olduğu görüldü. Pektinaz indüksiyonu için %1 (w/v) pektin, %10'luk (w/v) glukoz, %10'luk (w/v) gliserol kullanılması sonucunda sırasıyla 0,23 U/mg, 0,50 U/mg ve 0,49 U/mg değerleri elde edildi.

Kuru misel ağırlıklarına bakarak glukozlu ve gliserollü besiyerini karşılaştırdığımızda 1A mutant suşun, kontrol QM9414'e göre daha iyi üreme gösterdiği görüldü. Bu veri enzim aktivitesi sonuçlarıyla da paralellik göstermektedir. Maksimum enzim aktivitesini sağlayan koşullarda, orta büyüklükte miseller oluşmakta ve biyokütle minimum olmaktadır. Çalışmamızda gliserollü ortamda üreyen mikroorganizma morfolojisinin glukozlu ortama göre daha düzgün olduğu tespit edilmiştir. Bu da enzim üretiminde downstream proseslerini kolaylaştırmaktadır. Ayrıca kısmi saflaştırma işlemlerinde organik çözücülerle yapılan çöktürmenin daha verimli olduğu gözlemlenmiştir. Elde ettiğimiz bu bulgular güncel literatürü desteklemektedir. Yapılan kısmi saflaştırma çalışmalarında gliserollü besiyerinden elde edilen ham ekstratın %80 etanol kullanılarak çöktürülmesiyle 33,43 kat saflaştırılması sağlanmıştır.

KAYNAKLAR

Albersheim, P., Neukom, H. ve Deuel, H., (1960), "Splitting of pectin chain molecules in neutral solution", Arch Biochem Biophys, 90:46-51.

Alonso, J., Canet, W., Hawell, N. ve Alique, R., (2003), "Purification and characterization of carrot (*Daucas carota L*) pectinesterase", J Sci Food Agric, 83:1600-1606.

Aman, P. ve Westerlund, E., (1996), Cellwall polysaccharides: Structural, chemical, and analytical aspects, Marcel Dekker Inc., New York.

Baker, R. A. ve Wicker, L., (1996), "Current and potential application of enzyme infusion in the food industry", Trends Food Sci Technol, 7:279-284.

BeMiller, J. N., (1986), An introduction to pectins: Structure and properties , Amer. Chem. Soc., Washington D.C.

Bisby, G. R., (1939), "*Trichoderma viride Pers. ex Fr.* and notes on *Hypocrea*", Trans. Br. Mycol. Soc., 23:149-168.

Blanco, P. ve Sieiro, C., Villa, T. G., (1999), "Production of pectic enzymes in yeasts", FEMS Microbiol Lett, 175:1-9.

Bradford, M. M., (1976), "Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", Anal. Biochem. 72: 248-254

Brinton, C. S., Dore, W. H., Wichmann, H. J., Willaman, J. J. ve Wilson C. P., (1927), "Definitions written by the committee on nomenclature of pectin of the agriculture-food division", J Am Chem Soc, 49:38-40.

Brownleader, M. D., Jackson, P., Mobasheri, A., Pantelides, A. T., Sumar, S., Trevan, M. ve Dey, P. M., (1999), "Molecular aspects of cell wall modifications during fruit ripening. Critical Reviews in Food science and Nutrition", 39:149-164.

Carpita, N. ve McCann, M., (2000), The cell wall. In Biochemistry and Molecular Biology of Plants, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD.

Carr, J. G., (1985), "Tea, coffee and cocoa", 2:133-54, Microbiology of fermented foods, B.J.B. Wood (Der.), Elsevier Science Ltd, London.

Codner, R. C., (2001), "Pectinolytic and cellulolytic enzymes in the microbial modification of plant tissues", J Appl Bacteriol, 84:147-60

Cosgrove, D. J., (1997), "Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants", Annu Rev Cell Dev Biol, 13:171-201.

Dingley, J. M., (1957), "Life history studies in the genus *Hypocrea*", Fr. Trans. R. Soc. N. Z., 84:689-693.

Dixit, V. S., Kumar, A. R., Pant, A. ve Khan, M. I., (2004), "Low molecular mass pectate lyase from *Fusarium moniliforme*: similar modes of chemical and thermal denaturation", Biochem Biophys Res Commun, 315:477-84.

Dodd, S. L., Lieckfeldt, E. ve Samuels, G. J., (2003), "*Hypocrea atroviridis* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*", Mycologia, 95(1):27-40.

Doi, N. ve Doi, Y., (1979), "Notes on *Trichoderma* and its allies. I. A list of teleomorphic species with *Trichoderma* or its allied anamorphs hitherto known", Bull. Natn. Sci. Mus. Tokyo, 5:117-123.

Doi, N. ve Doi, Y., (1986), "Notes on *Trichoderma* and its allies. IV. A list of specific names proposed for the genus *Trichoderma*", Bull. Natn. Sci. Mus. Tokyo, 12:1-16.

Doi, Y., (1969), "The genus *Hypocrea* and its allies in Japan", Bull. Natn. Sci. Mus. Tokyo, 12: 693-724.

Doi, Y., (1972), "Revision of the Hypocreales with cultural observations. IV. The genus *Hypocrea* and its allies in Japan. Enumeration of the species", Bull. Natn. Sci. Mus. Tokyo, 15:649-751.

Domsch, K. H., Gams, W., ve Anderson, T. H. (1980), Compendium of Soil Fungi, Academic Press, London, (1, 2).

Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J.D., Freeze, H. H., Stanley, P., Bertozzi, C. R., Hart, G. W. ve Etzler, M. E., (2009), Essentials of Glycobiology, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY).

Fayyaz, A., Asbi, B. A., Ghazali, H. M., Che Man, T. B. ve Jinap, S., (1993), "Pectinesterase extraction from papaya", *Food Chem*, 47:183-5.

Gailing, M. F., Guibert, A. ve Combes, D., (2000), "Fractional factorial designs applied to enzymatic sugar beet pulps pressing improvement", *Bioprocess Eng*, 22:69-74.

Gams, W., Bissett, J., (1998), "Morphology and identification of *Trichoderma* and *Gliocladium*", 1:3-34, *Basic Biology, Taxonomy and Genetics*, C.P Kubicek ve G.E. Harman (Derl.), Taylor & Francis Ltd, London.

Gleba, Y., (1978), "Microdroplet culture: Tobacco plants from single mesophyll protoplasts", *Naturwissenschaften*, 65:158-159.

Grant, G. T., Morris, E. R., Rees, D. A., Smith, P. J. C., ve Tom, D., (1973), "Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The Egg-Box model", *FEBS Letters*, 32:195-198.

Green, A.A. ve Hughes, W. L., (1955), "Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents", 1:67-90, *Methods in Enzymology*, S.P. Colowick ve N.O. Kaplan (Derl.), Academic Press, New York.

Hilditch, S., (2010), Identification of the fungal catabolic D-galacturonate pathway, Doctoral thesis, VTT Publications, 739, Helsinki.

Hondmann, D. H. A., Busink, R., Witteveen, C. F. B. ve Visser, J., (1991), "Glycerol catabolism in *Aspergillus nidulans*", *J. Gen. Microbiol*, 137:629-636

Hoondal, G. S., Tiwari, R. P., Tewari, R., Dahiya, N. ve Beg, Q. K., (2002), "Microbial alkaline pectinases and their applications: a review", *Appl Microbiol Biotechnol*, 59:409-18.

Jayani R. S., Saxena S. ve Gupta R., (2005), "Microbial pectinolytic enzymes: A review", *Process Biochem*, 40:2931-2944.

Kapoor, M., Beg, Q. K., Bhushan, B., Singh, K., Dadich, K.S. ve Hoondal, G.S., (2001), "Application of alkaline and thermostable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MG-cp-2 in degumming of ramie (*Boehmeria nivea*) and sunn hemp (*Crotolaria juncia*) bast fibers", *Process Biochem*, 36:803-7.

Kashyap, D.R., Vohra, P. K., Chopra, S. ve Tewari, R., (2001), "Applications of pectinases in commercial sector: a review", *Bioresour Technol*, 77:215-27.

Kaur, G., Kumar, S. ve Satyanarayana, T., (2004), "Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile apinis*", Bioresour Technol, 94:239-43.

Kuorelahti, S., Jouhten, P., Maaheimo, H., Penttilä, M. ve Richard P., (2006), "L-galactonate dehydratase is part of the fungal path for D-galacturonic acid catabolism", Mol Microbiol, 61(4):1060-1068

Mac Dougall, A. J., Brett, G. M., Morris, V.J., Rigby, N. M., Ridout, M. J., ve Ring, S. G., (2001), "The effect of peptide-pectin interactions on the gelation behaviour of a plant cell wall pectin", Carbohydrate Research, 335:115-126.

Mandels, M. ve Andreotti, R. E., (1978), "Problems and challenges in the cellulose to cellulose fermentation", Process Biochemistry, 13:6-13.

Martens-Uzunova, E.S. ve Schaap, P.J., (2008), "An evolutionary conserved D-galacturonic acid metabolic pathway operates across filamentous fungi capable of pectin degradation", Fungal Genet. Biol, 45:1449-1457.

Martinez, D., Berka R. M., Henrissat B., Saloheimo M., Arvas M., Baker S. E., Chapman J., Chertkov O., Coutinho P. M., Cullen D., Danchin E. G. J., Grigoriev I. V., Harris P., Jackson M., Kubicek C. P., Han C. S., Ho I., Larrondo L. F., de Leon A. L., Magnuson J. K., Merino S., Misra M., Nelson B., Putnam N., Robbertse B., Salamov A. A., Schmoll M., Terry A., Thayer N., Westerholm-Parvinen A., Schoch C.L., Yao J., Barabote R., Nelson M. A., Detter C., Bruce D., Kuske C. R., Xie G., Richardson P., Rokhsar D. S., Lucas S. M., Rubin E. M., Dunn Coleman N., Ward M. ve Brettin T. S., (2008), "Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*) ", Nat. Biotechnol, 26:553–560.

McNeil, M., Darvill, A. G. ve Albersheim, P., (1980), "The structure of plant cell walls. X. Rhamnogalacturonan I, a structurally complex pectic polysaccharide in the walls of suspension-cultured sycamore cells", Plant Physiology, 66:1128-1134.

Micheli, F., (2001), "Pectin methylesterase: cell wall enzymes with important roles in plant physiology", Trends Plant Sci, 6:414-419.

Miller, G. L., (1959), "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar", Anal Chem, 31:426-428.

Nielsen, J., (1997), "Metabolic control analysis of biochemical pathways based on a thermokinetic description of reaction rates", *Biochem J*, 321:133-138

Norbeck, J. ve Blomberg, A., (1997), "Metabolic and regulatory changes associated with growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 1.4 M NaCl - Evidence for osmotic induction of glycerol dissimilation via the dihydroxyacetone pathway", *J Biol Chem*, 272:5544-5554.

O'Neill, M. A., Albersheim, P., and Darvill, A. G., (1990), "The pectic polysaccharides of primary cell walls", 2:415-441, *Methods in Plant Biochemistry*, P.M. Dey (Der.), Academic Press, London.

O'Neill, M. A., Warrenfeltz, D., Kates, K., Pellerin, P., Doco, T., Darvill, A. G. ve Albersheim, P., (1996), "Rhamnogalacturonan-II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cell, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester. In vitro conditions for the formation and hydrolysis of the dimer", *Journal of Biological Chemistry*, 271:22923-22930.

Palomäki, T. ve Saarilahti, H. T., (1997), "Isolation and characterization of new C-terminal substitution mutation affecting secretion of polygalacturonases in *Erwinia carotovora ssp. carotovora*", *FEBS Lett*, 400:122-126.

Pedrolli, D. B., Monteiro, A. C., Gomes, E. ve Carmona, E. C., (2009), "Pectin and Pectinases: Production, Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes", *The Open Biotechnology Journal*, 3: 9-18

Power, J. B. ve Cocking, E. C., (1969), "A simple method for the isolation of very large number of leaf protoplasts by using mixture of cellulose and pectinase", *Biochem. J.*, 111:33.

Prasanna, V., Prabha, T. N. ve Tharanathan, R. N., (2007), "Fruit Ripening Phenomena-An Overview", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(1):1-19.

Pressey, R. ve Avants, J. K., (1973), "Two forms of polygalacturonase in tomatoes", *Biochim Biophys Acta*, 309:363-369.

Pressey, R. ve Avants, J. K., (1975), "Modes of action of carrot and peach exopolygalacturonases", *Phytochemistry*, 14:957-961.

Pressey, R. ve Puri, T., (1984), "Characterization of tomato polygalacturonase converter", *Euro J Biochem*, 144:217-221.

Reese, E. T., (1976), "History of the cellulase program at the U.S. army Natick Development Center", *Biotechnol Bioeng Symp*, 6:9-20.

Revilla, I. ve Ganzalez-San Jose, M. L., (2003), "Addition of pectolytic enzymes: an enological practice which improves the chromaticity and stability of red wines", *Int J Food Sci Technol*, 38:29-36.

Rexová-Benková, L. ve Marković, O., (1976), "Pectic enzymes", *Adv Carbohydrate Chem*, 33:323-85.

Richard, P. ve Hilditch, S., (2009), "D-Galacturonic acid catabolism in microorganisms and its biotechnological relevance", *Appl Microbiol Biotechnol*, 82:597-604.

Ridley, B. L., O'Neill, M. A. ve Mohnen, D., (2001), "Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling", *Phytochemistry*, 57:929- 967.

Rifai, M. A., (1969), "A revision of the genus *Trichoderma*", *Mycol Pap*, 116:1-56.

Rifai, M. A. ve Webster, J., (1966), "Culture studies on *Hypocrea* and *Trichoderma*. III. *H. lactea* (= *H. citrina*) and *H. pulvinata*", *Trans Br Mycol Soc*, 49:297-310.

Sakai, T., Okushima, M. ve Yoshitake, S., (1984), "Purification, crystallization and some properties of an endopolygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*", *Agric Biol Chem*, 48:1951-1961.

Sakai, T. ve Okushima, M., (1982), "Purification and crystallisation of a protopectin-solubilizing enzyme from *Trichosporon penicillatum*", *Agric Biol Chem*, 46:667-776.

Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J., ve Vandamme, E.J., (1993), "Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications", *Adv Appl Microbiol*, 39:231-94.

Sakai, T. ve Yoshitake, S., (1984), "Purification and some properties of a protopectin-solubilizing enzyme from *Galactomyces reesii* strain L.", *Agric Biol Chem*, 48:1941-1950.

Sakai, T., (1992), "Degradation of pectins", 57-81, *Microbial degradation of natural products*, G. Winkelmann (Der.), Weinheim, VCH.

Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J., ve Vandamme, E.J., (1993), "Pectin, pectinase and protopectinase: Production, properties and application", *Advances in Applied Microbiology*, 39:213-294.

Sakamoto, T., Hours, R. A. ve Sakai, T., (1994), "Purification, characterization and production of two pectic-transeliminases with protopectinase activity from *Bacillus subtilis*", *Biosci Biotechnol Biochem*, 58:353-358.

Salazar, M., Vongsangnak, W., Panagiotou, G., Andersen, M. R. ve Nielsen, J., (2009), "Uncovering transcriptional regulation of glycerol metabolism in *Aspergilli* through genome-wide gene expression data analysis", *Mol Genet Genomics*, 282:571-586.

Samuels, G. J., (1996), "Trichoderma: a review of biology and systematics of the genus", *Mycol Res*, 100:923-935.

Samuels, G. J., Petrini, O., ve Manguin, S., (1994), "Morphological and macromolecular characterization of *Hypocrea schweinitzii* and its *Trichoderma* anamorph", *Mycologia*, 86:421-435.

Schols, H. A., Bakx, E. J., Schipper, D., ve Voragen, A. G. J., (1995), "A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin", *Carbohydrate Research*, 279:265-279.

Scott, D., (1978), "Enzymes, industrial", 173-224, *Encyclopedia of chemical technology*, M. Grayson, D. Ekarth ve K. Othmer (Derl.), Wiley, New York.

Selvendran, R. R., (1985), "Developments in the chemistry and biochemistry of pectic and hemicellulosic polymers", *Journal of Cell Science*, 2(Suppl.):51- 88.

Takebe, I., Otsuki, Y. ve Aoki, S., (1968), "Isolation of tobacco mesophyll cells in intact and active state", *Plant Cell Physiol*, 9:115.

Tharanathan, R. N., Muralikrishna, G., Salimath, P. V., ve Raghavendra Rao, M. R., (1987), "Plant carbohydrates- an overview", *Proceedings of Indian Academy of Sciences (Plant Sci.)*, 97:81-155.

Ward, O. P., Moo-Young, M., (1989), "Enzymatic degradation of cell wall and related plant polysaccharides", *CRC Crit Rev Biotechnol*, 8: 237-274.

Webster, J. ve Rifai, M. A., (1968), "Culture studies on *Hypocrea* and *Trichoderma*. IV. *Hypocrea pilulifera* sp. nov.", *Trans Br Mycol Soc*, 51:511-514.

Whitaker, J. R., (1990), "Microbial pectinolytic enzymes", 133-176, *Microbial enzymes and biotechnology*, W.M. Fogarty ve C.T. Kelly (Derl.), Elsevier Science Ltd, London.

Whitaker, J. R., (1984), "Pectic substances, pectic enzymes and haze formation in fruit juices", *Enzyme Microbial Technol*, 6:341-347 .

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi 14.08.1985

Doğum yeri İstanbul

Lise 1999-2003 Haydarpaşa Anadolu Lisesi

Lisans 2003-2007 Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans 2009-2010 Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı