

TEKSTİL ENDÜSTRİSİNDE KULLANILAN SELULAZ,
LAKKAZ VE PEROKSİDAZ ENZİMLERİNİN *Phanerochaete*
chrysosporium ME 446 VE *Funalia trogii* FUNGUSLARINDA
ÜRETİMİNİN ARAŞTIRILMASI

NELİSA TÜRKOĞLU

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

ME. Ü.
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

F5756

HAZİRAN - 1999

Prof. Dr. Hüsnü KIZMAZ

MERSEN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

ÖZ

Bu çalışmada, tekstil terbiyesinde kullanılmakta olan selulaz, lakkaz, katalaz ve peroksidaz enzimlerinin tarımsal atıklar üzerinde pilot ölçekte üretimleri için gerekli laboratuvar koşulları belirlenmeye çalışılmıştır. *Phanerochaete chrysosporium ME446* ve *Funalia trogii* beyaz-çürükçül fungusları ile uygulanan yarı-katı fermentasyonda, değişen pH ve sıcaklıklara bağlı olarak her enzim için maksimum aktivitenin elde edildiği koşullar saptanmaya çalışılmıştır. *Funalia trogii* ile yürütülen çalışmada maksimum katalaz aktivitesi ve spesifik aktivitesi pH'sı 5.0 olan besiyerinde 35° C'de, 9320 IU ve 328 IU/ mg olarak 5 günlük inkübasyon süresi sonunda elde edilmiştir. Maksimum lakkaz ve peroksidaz aktiviteleri ise 3.37 CU ve 4.27 CU olarak aynı koşullar altında elde edilmiştir. Maksimum selulaz aktivitesi pH'si 6.0 olan besiyerinde , 37° C'de 10 günlük inkübasyon süresi sonunda 745 FPU olarak saptanmıştır. *Phanerochaete chrysosporium ME446* ile yürütülen çalışmalarda maksimum katalaz aktivitesi ve spesifik katalaz aktivitesi 6240 IU ve 129 IU/ mg olarak pH'si 6.0 olan besiyerinde 35° C'de 5 günlük inkübasyon süresi sonunda elde edilirken, maksimum selulaz aktivitesi 507 FPU olarak pH'si 6.0 ancak inkübasyon sıcaklığı 37° C olan ortamda , 10 günlük süre sonunda elde edilmiştir.

ABSTRACT

In this study, to produce the enzymes laccase ,cellulase ,catalase and peroxidase with *Funalia trogii* and *Phanerochaete chrysosporium ME446* and to scale up to the pilot scale required physiological conditions were being tried to determine. we used agricultural waste as an alternative source for these enzymes which are used nowadays in textile industry . To maintain the maximum activity for each enzyme that are produced by using *Funalia trogii* and *Phanerochaete chrysosporium ME446* at semi-solid fermentation. *Funalia trogii*' s maximum activity of catalase and the specific catalase activity at the medium with a pH 5.0 and the temprature of 35°C is determined as 9320 IU and 328 IU/mg after 5 days incubation. Under the same conditions maximum avtivities of laccase and peroxidase are determined as 3.37 CU and 4.27 CU. The maximum cellulase activity is determined at the medium with pH 6.0 and temperature 37° C, after 10 days incubation period as 745 FPU. The studies which are carried on with *Phanerochaete chrysosporium ME446*, maximum catalase activity and specific catalase activity are determined respectively as 6240 IU and 129 IU/mg in a medium with pH 6.0 and 35° C after 5 days incubition time .On the other hand, maximum cellulase activity is determined at the medium with pH 6.0 and 37° C, after 10 days incubation as 507 FPU.

TEŞEKKÜR

Araştırmanın başlamasından sonuna kadar desteğini esirgemeyen tez yöneticim Yrd. Doç. Dr. Ali ÜNYAYAR'a ve çalışmalarımın belirli aşamasında bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. İbrahim EKİZ'e, Araştırma laboratuvarını bizlere açarak, çalışmalarımızın ilerlemesine katkıda bulunan Dr. Mehmet BATUM'a teşekkür ederim. Ayrıca çalışmalarım sırasında bana yardımlarını esirgemeyen Mehmet Ali MAZMANCI ve Meltem URGUN'a teşekkür ederim. Çalışmalarım süresince büyük özverilerinden, anlayışlarından, maddi ve manevi destelerinden dolayı AİLEME ve Gökhan LAÇIN'e teşekkürü borç bilirim.



Dedem Kemalettin SÖNMEZ'e



İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÇİZELGE LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
KISALTMA LİSTESİ	xi
1. GİRİŞ VE ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	1
1. 1. Giriş	1
1. 2. Önceki Çalışmalar	10
1. 2. 1. Biyokütlenin Doğası	10
1. 2. 2. Bitki Hücre Duvarı Polimerleri	11
1. 2. 2. 1. Seluloz	11
1. 2. 2. 2. Hemiseluloz	12
1. 2. 2. 3. Lignin	14
1. 2. 3. Enzim Üretiminde Lignoselulozların Kullanımı	14
1. 2. 4. Lignoselulolitik Enzimlerin Üretiminde	
Fermentasyon Tipi Seçimi	16
1. 2. 5. Lignoselulozik Substratlardan Enzim Üretiminde	
Fungusların tercih edilmesi	17
1. 2. 5. 1. Beyaz-çürükçül Fungusların Ligninoselulolitik	
Mekanizması	18
1. 2. 5. 1. 1. Seluloz Yıkımında Rol oynayan Enzimler	19
1. 2. 5. 1. 2. Hemiseluloz Yıkımında Rol Oynayan	
Enzimler	19
1. 2. 5. 1. 3. Lignin Yıkımında Rol Oynayan Enzimler	19
1. 2. 5. 1. 3. 1. Fenoloksidazlar	21
1. 2. 5. 1. 3. 1. 1. Horseradish Peroksidaz	21
1. 2. 5. 1. 3. 1. 2. Lakkaz	22
1. 2. 5. 1. 4. Lignin Peroksidaz	22

1. 2. 5. 1. 5. Kloroperoksidaz	23
1. 2. 5. 1. 6. Mn- Bağımlı Peroksidazlar	23
1. 2. 5. 1. 7. Hidrojen Peroksit Üreten Enzimler	23
1. 2. 6. Katalaz	26
1. 2. 7. Lignoselulozik Yıkımda Beyaz-Çürükçül	
Funguslardan <i>Phanerocheate chrysosporium</i> 'un Yeri	27
1. 2. 8. Mikroorganizmaların Ekolojik Gereksinimleri ve Yarı-Katı	
Fermentasyon ile Fungal Delignifikasyon	27
1. 2. 8. 1. Nem İçeriği	28
1. 2. 8. 2. Sıcaklık	28
1. 2. 8. 3. pH	29
1. 2. 8. 4. Havalandırma	29
1. 2. 8. 5. Partikül Büyüklüğü	30
1. 2. 8. 6. Besin İlaveleri	30
1. 2. 8. 7. İnokülasyon	30
1. 2. 8. 8. Karıştırma	31
2. MATERYAL VE METOD	32
2. 1. Çalışmalarda Kullanılan Mikroorganizmalar ve	
Kültürlerin Devamlılığı	32
2. 2. Çalışmalarda Kullanılan Lignoselulozik İçerikli	
Besiyerinin Hazırlanışı	32
2. 3. Besiyerinin Hazırlanması	32
2. 3. 1. Besiyerinin İçeriği	32
2. 3. 2. Besiyerlerinin Sterilizasyonu	33
2. 3. 3. Besiyerine Fungus Ekimi	33
2. 3. 4. Ortam Sıcaklığı	34
2. 3. 5. Ortamın pH'sı	34
2. 3. 6. İnkübasyon Süresi	34
2. 4. Kültürlerde Enzim Aktivitelerinin Ölçümü İçin	
Yapılan Hazırlıklar	34

2. 5. Kültürlerde Enzim Aktivitelerinin Ölçümü	34
2. 5. 1. Kültürlerde Selulolitik Aktivitenin Ölçülmesi	34
2. 5. 2. Kültürlerde Fenoloksidaz Aktivitelerinin Ölçümü	35
2. 5. 2. 1. Kültürlerde Lakkaz Aktivitesinin Ölçümü	35
2. 5. 2. 2. Kültürlerde Peroksidaz Aktivitesinin Ölçümü	35
2. 5. 3. Kültürlerde Katalaz Aktivitesinin Ölçümü	36
2. 5. 3. 1. Kültürlerde Katalaz Aktivitesinin Hans Lück Yöntemi ile Ölçümü	36
2. 5. 3. 2. Kültürlerde Katalaz Aktivitesinin Titrimetrik Yöntem ile Ölçümü	36
2. 5. 4. Toplam Protein Miktarının Ölçümü	36
2. 6. Örneklerin Amino Asit İçeriklerinin Belirlenmesi	37
2. 7. Yarı-Katı Kültür Prosesinin Akım Şeması	38
3. BULGULAR	39
3. 1. Yarı-katı Fermentasyonla Üretilen <i>Phanerochaete</i> <i>chrysosporium</i> ME446 ve <i>Funalia trogii</i> Funguslarının Enzimatik Aktiviteleri	39
3. 1. 1. Yarı-katı Fermentasyonla Üretilen <i>Phanerochaete</i> <i>chrysosporium</i> ME446 ve <i>Funalia trogii</i> Funguslarının Selulaz Aktivitesi	39
3. 1. 2. Yarı-katı Fermentasyonla Üretilen <i>Phanerochaete</i> <i>chrysosporium</i> ME446 ve <i>Funalia trogii</i> Funguslarının Katalaz Aktivitesi	41
3. 1. 3. <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ME446 ve <i>Funalia trogii</i> ' nin Fenoloksidaz Aktivitesi	42
3. 1. 3. 1 <i>Funalia trogii</i> 'nin Peroksidaz Aktivitesi	42
3. 1. 3. 2. <i>Funalia trogii</i> 'nin Lakkaz Aktivitesi	42

3. 2. Yarı-katı Fermentasyonla Üretilen <i>Funalia trogii</i> 'nin İnkübasyon Sıcaklığı 35°C iken Değişen pH Değerlerine Bağlı Olarak Selulaz, Katalaz, Lakkaz ve Peroksidaz Enzimlerinin Aktiviteleri	44
3. 2. 1. pH Değerlerine Bağlı Selulaz Aktivitesindeki Değişim	44
3. 2. 2. pH Değerlerine Bağlı Katalaz Aktivitesindeki Değişim	45
3. 2. 3. pH Değerlerine Bağlı Peroksidaz Aktivitesindeki Değişim	46
3. 2. 4. pH Değerlerine Bağlı Lakkaz Aktivitesindeki Değişim	47
3. 3. Yarı-katı Fermentasyonla Üretilen <i>Funalia trogii</i> 'nin İnkübasyon Sıcaklığı 37°C iken Değişen pH Değerlerine Bağlı Olarak Selulaz, Katalaz, Lakkaz ve Peroksidaz Enzimlerinin Aktivitesi	48
3. 3. 1. pH Değerlerine Bağlı Selulaz Aktivitesindeki Değişim	48
3. 3. 2. pH Değerlerine Bağlı Katalaz Aktivitesindeki Değişim	49
3. 3. 3. pH Değerlerine Bağlı Peroksidaz Aktivitesindeki Değişim	50
3. 3. 4. pH Değerlerine Bağlı Lakkaz Aktivitesindeki Değişim	51
3. 4. Yarı-katı Fermentasyonla Üretilen <i>Phanerochaete chrysosporium ME446</i> 'nın İnkübasyon Sıcaklığı 35°C iken Değişen pH Değerlerine Bağlı Olarak Selulaz ve Katalaz Enzimlerinin Aktiviteleri	52
3. 4. 1. pH Değerlerine Bağlı Selulaz Aktivitesindeki Değişim	52
3. 4. 2. pH Değerlerine Bağlı Katalaz Aktivitesindeki Değişim	53

3. 5. Yarı-katı Fermentasyonla Üretilen <u><i>Phanerochaete chrysosporium</i> ME446</u> 'nın İnkübasyon Sıcaklığı 37°C iken Değişen pH Değerlerine Bağlı Olarak Selulaz ve Katalaz Enzimlerinin Aktiviteleri	54
3. 5. 1. pH Değerlerine Bağlı Selulaz Aktivitesindeki Değişim	54
3. 5. 2. pH Değerlerine Bağlı Katalaz Aktivitesindeki Değişim	55
3. 6. Yarı-katı Fermentasyonla Üretilen <u><i>Funalia trogii</i></u> 'nin ve <u><i>Phanerochaete chrysosporium</i> ME446</u> 'nın Selulaz, Katalaz, Lakkaz ve Peroksidaz Enzimlerinin Sentezine Sıcaklığın Etkisi	56
3. 6. 1. Sıcaklığın <u><i>Funalia trogii</i></u> 'nin Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisi	56
3. 6. 1. 1. Sıcaklığın <u><i>Funalia trogii</i></u> 'nin Selulaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	56
3. 6. 1. 2. Sıcaklığın <u><i>Funalia trogii</i></u> 'nin Katalaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	58
3. 6. 1. 3. Sıcaklığın <u><i>Funalia trogii</i></u> 'nin Peroksidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	60
3. 6. 1. 4. Sıcaklığın <u><i>Funalia trogii</i></u> 'nin Lakkaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	62
3. 6. 2. Sıcaklığın <u><i>Phanerochaete chrysosporium</i> ME446</u> 'nın Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisi	64
3. 6. 2. 1. Sıcaklığın <u><i>Phanerochaete chrysosporium</i> ME446</u> 'nın Selulaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	64
3. 6. 2. 2. Sıcaklığın <u><i>Phanerochaete chrysosporium</i> ME446</u> 'nın Katalaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	66

3. 7. Yarı-katı Fermentasyonla Üretilen <i>Phanerochaete</i>	
<i>chrysosporium ME446</i>'nın Katalaz Aktivitesinin	
 Titrimetrik Yöntemle Saptanan Aktivitesi	68
3. 8. Hans Lück Yönteminde Substrat İnhibisyon Deneyi	70
3. 9. Kültür ile Besiyerinde Elde Edilen Amino	
 Asitler ve Dağılımları	72
4. TARTIŞMA	73
5. SONUÇLAR	81
6. KAYNAKLAR	83
7. ÖZGEÇMİŞ	92
8. ÖZET	93
9. SUMMARY	94



ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No:

Sayfa No:

Çizelge 2.1. Stok Basal Ortam (SBM)'ın İçeriği	33
Çizelge 2. 2. Katı Besiyerinin İçeriği	33
Çizelge 3.1. <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ME446 ve <i>Funalia trogii</i> 'nin Günlere Bağlı Selulaz Aktivitesi.	40
Çizelge 3. 2. <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ME446 ve <i>Funalia trogii</i> 'nin Günlere Bağlı Katalaz Aktivitesi.	41
Çizelge 3. 3. <i>Funalia trogii</i> 'nin Günlere Bağlı Peroksidaz Enzim Aktivitesi.	43
Çizelge 3.4. <i>Funalia trogii</i> 'nin Günlere Bağlı Lakkaz Enzim Aktivitesi.	43
Çizelge 3. 5. Katalaz Enzim Örneğinin Yarı-Ömrü	69
Çizelge 3. 6. Katalaz Enzim Örneklerinin Yarı- Ömrü	69
Çizelge 3. 7. <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ME446 ve <i>Funalia trogii</i> 'nin Amino Asit Dağılımları	72
Çizelge 4. 1. <i>Candida lipolytica</i> , <i>Funalia trogii</i> ve <i>Phanerochaete</i> <i>chrysosporium</i> ME446 ile Elde Edilen Amino Asitlerin cins ve Miktarları	80

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No:

Sayfa No:

Şekil 1. 1. Enzim Satışlarının Dağılımı (1994)	3
Şekil 1.2. Mavi İndigonun, Beyaz İndigoya İndirgenmesi	7
Şekil 1. 3. İndigo Boyasının Lakkaz Enzimi İle Oksidasyonu	9
Şekil 1. 4. Selulozun β -D-glukopiranoz Birimi	12
Şekil 1. 5. 4-o-metil-D-glukoronoksilan (Haun, 1970)	13
Şekil 1. 6. Ligninin Yapısı	15
Şekil 3. 1. <i>Funalia trogii</i> 'nin 35°C İnkübasyon Sıcaklığında Farklı pH Değerlerindeki Günlere Bağlı Olarak Selulaz Aktivitesi	44
Şekil 3. 2. <i>Funalia trogii</i> 'nin 35°C İnkübasyon Sıcaklığında Farklı pH Değerlerindeki Günlere Bağlı Olarak Katalaz Aktivitesi	45
Şekil 3. 3. <i>Funalia trogii</i> 'nin 35°C İnkübasyon Sıcaklığında Farklı pH Değerlerindeki Günlere Bağlı Olarak Peroksidaz Aktivitesi	46
Şekil 3. 4. <i>Funalia trogii</i> 'nin 35°C İnkübasyon Sıcaklığında Farklı pH Değerlerindeki Günlere Bağlı Olarak Lakkaz Aktivitesi	47
Şekil 3. 5. <i>Funalia trogii</i> 'nin 37°C İnkübasyon Sıcaklığında Farklı pH Değerlerindeki Günlere Bağlı Olarak Selulaz Aktivitesi	48

Şekil 3. 6. <i>Funalia trogii</i> 'nin 37°C İnkübasyon Sıcaklığında Farklı pH Değerlerindeki Günlere Bağlı Olarak Katalaz Aktivitesi	49
Şekil 3. 7. <i>Funalia trogii</i> 'nin 37°C İnkübasyon Sıcaklığında Farklı pH Değerlerindeki Günlere Bağlı Olarak Peroksidaz Aktivitesi	50
Şekil 3. 8. <i>Funalia trogii</i> 'nin 37°C İnkübasyon Sıcaklığında Farklı pH Değerlerindeki Günlere Bağlı Olarak Lakkaz Aktivitesi	51
Şekil 3. 9. <i>Phanerochaete chrysosporium ME446</i> 'nın 35°C İnkübasyon Sıcaklığında, Farklı pH Değerlerindeki Günlere Bağlı Olarak Selulaz Aktivitesi	52
Şekil 3. 10. <i>Phanerochaete chrysosporium ME446</i> 'nın 35°C İnkübasyon Sıcaklığında, Farklı pH Değerlerindeki Günlere Bağlı Olarak Katalaz Aktivitesi	53
Şekil 3. 11. <i>Phanerochaete chrysosporium ME446</i> 'nın 37°C İnkübasyon Sıcaklığında, Farklı pH Değerlerindeki Günlere Bağlı Olarak Selulaz Aktivitesi	54
Şekil 3. 12. <i>Phanerochaete chrysosporium ME446</i> 'nın 37°C İnkübasyon Sıcaklığında, Farklı pH Değerlerindeki Günlere Bağlı Olarak Katalaz Aktivitesi	55
Şekil 3. 13. <i>Funalia trogii</i> 'nin Selulaz Aktivitesine Günlere Bağlı Olarak Sıcaklığın Etkisi	57
Şekil 3. 14. <i>Funalia trogii</i> 'nin Selulaz Aktivitesine Günlere Bağlı Olarak Sıcaklığın Etkisi	57
Şekil 3. 15. <i>Funalia trogii</i> 'nin Selulaz Aktivitesine Günlere Bağlı Olarak Sıcaklığın Etkisi	58
Şekil 3. 16. <i>Funalia trogii</i> 'nin Katalaz Aktivitesine Günlere Bağlı Olarak Sıcaklığın Etkisi	59
Şekil 3. 17. <i>Funalia trogii</i> 'nin Katalaz Aktivitesine Günlere Bağlı Olarak Sıcaklığın Etkisi	59
Şekil 3. 18. <i>Funalia trogii</i> 'nin Katalaz Aktivitesine Günlere Bağlı Olarak Sıcaklığın Etkisi	60

Şekil 3. 19. <i>Funalia trogii</i> 'nin Peroksidaz Aktivitesine Günlere Bağlı Olarak Sıcaklığın Etkisi	61
Şekil 3. 20. <i>Funalia trogii</i> 'nin Peroksidaz Aktivitesine Günlere Bağlı Olarak Sıcaklığın Etkisi	61
Şekil 3. 21. <i>Funalia trogii</i> 'nin Peroksidaz Aktivitesine Günlere Bağlı Olarak Sıcaklığın Etkisi	62
Şekil 3. 22. <i>Funalia trogii</i> 'nin Lakkaz Aktivitesine Günlere Bağlı Olarak Sıcaklığın Etkisi	63
Şekil 3. 23. <i>Funalia trogii</i> 'nin Lakkaz Aktivitesine Günlere Bağlı Olarak Sıcaklığın Etkisi	63
Şekil 3. 24. <i>Funalia trogii</i> 'nin Lakkaz Aktivitesine Günlere Bağlı Olarak Sıcaklığın Etkisi	64
Şekil 3. 25. <i>Phanerochaete chrysosporium ME446</i> 'nın Selulaz Aktivitesine Günlere Bağlı Olarak Sıcaklığın Etkisi	65
Şekil 3. 26. <i>Phanerochaete chrysosporium ME446</i> 'nın Selulaz Aktivitesine Günlere Bağlı Olarak Sıcaklığın Etkisi	65
Şekil 3. 27. <i>Phanerochaete chrysosporium ME446</i> 'nın Selulaz Aktivitesine Günlere Bağlı Olarak Sıcaklığın Etkisi	66
Şekil 3. 28. <i>Phanerochaete chrysosporium ME446</i> 'nın Katalaz Aktivitesine Günlere Bağlı Olarak Sıcaklığın Etkisi	67
Şekil 3. 29. <i>Phanerochaete chrysosporium ME446</i> 'nın Katalaz Aktivitesine Günlere Bağlı Olarak Sıcaklığın Etkisi	67
Şekil 3. 30. <i>Phanerochaete chrysosporium ME446</i> 'nın Katalaz Aktivitesine Günlere Bağlı Olarak Sıcaklığın Etkisi	68
Şekil 3. 31. Kullanılan Katalaz Enzimi Kaynağına Karşılık Substrat Absorbansındaki Azalış	70

KISALTMALAR LİSTESİ

HRP	Horseradish Peroksidaz
LİP	Lignin Peroksidaz
MnP	Mangan-Bağımlı Peroksidaz
SOD	Süperoksit Dismutaz
SBM	Stok Bazal Ortam
aa	Amino Asit
CU	Colorimetrik Unit
IU	International Unit
FPU	Filter Paper Unit

1.GİRİŞ VE ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

1.1. GİRİŞ

Çevre kirliliğinin başlıca nedeni 19. yüzyılda başlayan ve hızla gelişen endüstrileşmedir. Son yıllarda çevre kirliliği olgusu araştırmacıları çevre kirliliğini giderme çalışmalarına sevk etmiştir. Endüstrileşmenin pahalı oluşu ve çevre faktörlerinin göz ardı edilmesi doğal kaynakların hızla kirlenmesine neden olmaktadır. Dünya üzerinde yükselmekte olan insan kültür düzeyi çevreyi olumsuz yönde etkilemektedir [71].

İnsan kültür düzeyinin yükselmesi daha kaliteli ürünlerin üretilmesini zorunlu hale getirmektedir. Bunun sonucunda çevreye verilen atıkların nitel ve niceliği değiştirmektedir. Doğanın ekolojik dengesi bu kirliliği bir sınıra kadar tolere edebilmektedir ancak kirlilik için kesin önlemlerin alınmaması ve kirlenmenin hızla artması sonucu ekolojik denge geri dönüşü olanaksız şekilde bozulmaktadır.

Türkiye Çevre Sorunları Vakfı 1989'da endüstrileşmenin oluşturduğu kirlilikleri fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak sınıflandırmıştır. Bunun yanında pestisit, herbisit ve sentetik gübre kullanımı ile ortaya çıkan kirlenmede doğal dengeyi bozmaktadır. Endüstri kuruluşları üretim yapılarına göre birden fazla kaynağı kirlitebilmektedir. Örneğin demir- çelik, şeker, tekstil, çimento, petrokimya ve gıda endüstrileri hava, su ve toprak kirliliğine neden olmaktadır Bu kirliliğin ortadan kaldırılması için gereken maddi güç ekonomiye önemli bir yük getirmektedir. Bu nedenle, çevre kirliliğine yol açan bazı zararlı maddelerin giderilmesinde düşük maliyetli ve etkin metotların kullanılması zorunlu hale gelmektedir. Bunun yolu ise her madde için özgün giderim yönteminin saptanmasıdır.

Avrupa Komisyonunun 1991'de kabul ettiği öncelikler arasında, "Biyoteknoloji", topluluğun gelecekte gelişmesi için gerekli anahtar teknoloji olarak belirlenmiştir. Günümüzde gelişmiş ülkelerinin ekonomilerinin %40' ından fazlası ya biyolojik kökenli ya da biyolojik materyalin dönüşümü ile ilgilidir. Bu oran gelişmekte olan ülkelerde daha da yüksektir [61].

Biyoteknolojiyi organizmaların, biyolojik sistemlerin ve süreçlerinin pratik veya ticari amaçlar için kullanılması olarak tanımlayabiliriz. Biyoteknoloji oldukça çeşitli aktiviteleri - fermentasyon, enzim teknolojisi, hücre ve doku kültürü tekniklerini; monoklonal antikor teknikleri vb.- içermektedir [66].

Günümüzde kullanım alanı oldukça yaygın olan biyoteknolojik süreçler, organizma ve bileşenlerin tarım, besin ve diğer endüstriyel alanlarda kullanım esasına göre çalışılmaktadır. Endüstriyel mikrobiyoloji ve biyoteknolojinin en önemli uygulama alanlarından biri olan yenilenebilir kaynak teknolojisi, özellikle tarım ve ormancılıktan gelen atık lignoselulozik maddelerin kimyasal hammadde ve enerji üretimi için kullanımını amaçlar. Çevre kirliliği açısından atık lignoselulozik maddeler oldukça önemli bir yere sahiptir. Çünkü bu maddelerin yapısında bulunan lignin polimeri biyolojik ayrışmaya dirençli, dirençli bir maddedir [63].

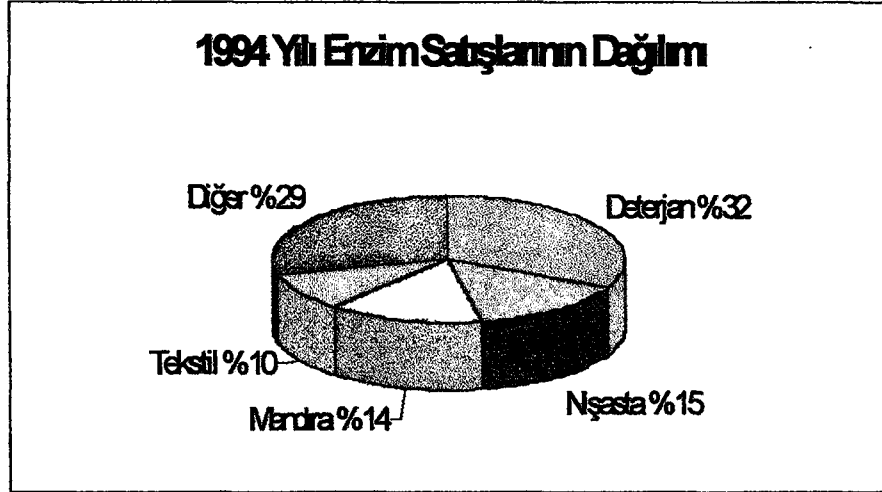
Çevreye sürekli olarak atıkların şarj edilmesi, alternatif iyileştirme süreçlerinin geliştirilmesini gerektirmiştir. Değişik bitkilerden ve mikroorganizmalardan elde edilen çok sayıda enzimin, atık iyileştirmesi süreçlerinde önemli rol oynadığı rapor edilmiştir [30].

Enzimatik yöntemler, geleneksel yöntemlerle kıyaslandığı zaman aşağıda belirtilen özelliklerinden dolayı potansiyel olarak avantajlı gözükmemektedir. Enzimler çok seçicidir ve kontaminant konsantrasyonu çok seyreltik olan sularda bile başarıyla bu kontaminantlara etki edebilmektedir. Enzimler, canlı organizmalara toksik olabilecek maddeler tarafından çok daha zor inhibe olurlar ve kullanıldıkları süreçlerde işlemler; geniş pH, sıcaklık ve tuz konsantrasyonları aralıklarında gerçekleştirilir ve kontrolleri çok basit yöntemlerle kolaylıkla sağlanabilir [30].

Enzimler, canlı hücrelerde gerçekleşen binlerce kimyasal reaksiyonu yürüten biyolojik katalizörlerdir. Enzim katalizli bir reaksiyonda, substrat enzimin aktif kısmına hidrofobik bağlarla, hidrojen bağlarıyla ve iyonik bağlarla bağlanır ve daha sonra substratı reaksiyon ürünlerine çevrilir. Bir enzim molekülü, her dakikada binlerce kez reaksiyon döngüsüne girip, döngüyü yürütebilir [63].

Dünyadaki tüm endüstriyel enzimlerin tahmini satış değeri, 1983'de 400 milyon dolar, 1995'deki 1 milyar dolar olarak verilmiştir ve de 2005 yılı için bu değerin 1.7 ve 2 milyar dolar arasında olabileceği tahmin edilmektedir. Dünyadaki

toplam enzim ihtiyacının yaklaşık % 60'ı Avrupa'dan, % 15'i ise Kuzey Amerika'dan, % 12-15'i ise Japonya'dan karşılanmaktadır. Rusya ve Çin'in ise bu pazara katkısı oldukça azdır [24].



Şekil 1. 1. Enzim Satışlarının Dağılımı (1994) [24].

Endüstriyel enzimlerin % 75'i hidrolitik aktiviteye sahiptir ve doğal maddelerin depolimerizasyonu için kullanılırlar. Proteinazlar deterjan endüstrisinde ve süt endüstrisinde en yaygın kullanım alanı olan enzimler olarak tüm enzim satışlarını yaklaşık % 40'ını oluştururlar. Karbohidrazlar, fırıncılık, bira sanayi, damıtma, nişasta ve tekstil sanayiinde kullanılan ikinci en geniş grubu temsil ederler. 'Diğerleri' kategorisi altındaki sektörler şunlardır: Alkol, hayvan yemi, fırıncılık, katı ve sıvı yağlar, protein (un, süt kuagülasyonu, deterjan hariç), meyve ve şarap, deri, kağıt ve kağıt hamuru ve kirleticilerdir [24].

Endüstriyel enzimler günümüzde çok farklı uygulamalarla farklı alanlarda oldukça fazla kullanılmaktadırlar. Endüstriyel bir enzim için en önde gelen özelliklerden biri kararlılığıdır, çok değişik koşullarda dahi aktivitesini koruyabilmesidir. Genelde, daha kararlı enzimlerin üretimi için değişik yöntemler uygulanmaktadır: Kimyasal modifikasyonlar, protein mühendisliği, immobilizasyon veya stabilizasyon için desteklerin kullanımıdır. Endüstriyel enzimler için protein mühendisliği ve destek maddelerin kullanımı oldukça yaygın olarak

endüstriyel enzim pazarına bir kaç tane mutant enzim şimdiden girmiştir. Enzimlerin endüstriyel amaçlı üretimi için mutant enzim üretimi önemlidir. Ancak saflaştırma işlemleri oldukça karmaşık ve pahalıdır [8].

Endüstriyel enzimlerin geneli hidrolitik aktivite gösteren enzimlerdir ve bu nedenle biyolojik makromoleküllerin (proteinler, nişasta, deksrinler, selüloz ve pektinler gibi karbonhidratlar veya lipidler ve diğerleri) daha küçük alt moleküllerine parçalandığı hidrolitik reaksiyonlar bu enzimlerin kullanım alanlarını temsil etmektedir. Ancak glukozun, fruktoza dönüştürülmesinde kullanılan glukoz izomeraz enziminde olduğu gibi veya laktozun, glukoz ve galaktoza dönüştürülmesinde kullanılan laktaz enziminde olduğu gibi hidrolitik özellik taşımayan endüstriyel enzimlerde mevcuttur. Birçok durumda endüstriyel enzim ürünleri sadece bir tek enzim aktivitesi içermezler, farklı hidrolitik aktiviteleri bir arada içerirler. Bu bazı durumlarda avantaj olmakla birlikte bazı durumlarda da avantaj olmayabilmektedir [41].

Son 20 yılda endüstriyel enzimlerin kullanımı hızla yayılmıştır. Deterjan sanayinde kullanılan enzimler proteazlar, lipazlar, amilazlar ve selülazlardır. Proteazlar, protein içerikli (kan, ot ve yiyecek maddeleri gibi) lekelerin giderilmesinde kullanılmaktadırlar. Bugün marketlerde bulunan bütün deterjan proteazları, *Bacillus* türlerinden elde edilen serin proteazlardır. Deterjanlarda kullanılan proteazlar, yüksek pH değerlerinde ve yüksek sıcaklarda çalışabilmektedir. Sıvı ve katı yağ içerikli yiyeceklerin oluşturduğu lekelerin uzaklaştırılmasında lipazlar kullanılmaktadır . Bu enzimler yağ lekelerini daha hidrofilik maddelere parçalayarak, bu lekelerin kolayca uzaklaştırılmasını sağlarlar [24].

Lipazlar, trigliseritleri serbest yağ asitlerini, digliseridlere, monogliseridlere ve gliserole parçalayarak bunların alkali şartlarda çok daha kolayca uzaklaştırılmasını sağlamaktadırlar. Deterjanlarda kullanılan ilk lipaz 1988 yılında Novo Nordisk Şirketi tarafından piyasaya sürülmüştür. Büyük ölçekli üretimlerde lipaz enziminin üretimi için bir ascomycete olan *Aspergillus oryzae* kullanılmaktadır. Nişasta içerikli yiyeceklerden (pasta, meyve, çikolata gibi) oluşan lekeleri gidermek amacıyla amilaz enzimi içeren deterjanlar kullanılmaktadır. Deterjanlarda kullanılan amilazlar, *Bacillus licheniformis* ve *Bacillus*

Deterjanlarda kullanılan amilazlar, *Bacillus licheniformis* ve *Bacillus amyloliquefaciens* ile katı fermentasyonla üretilen α -amilazlardır. Selulaz, multifonksiyonel bir enzimdir. Selulaz enzimini diğer deterjan enzimlerinden farkı doğrudan doğruya lekeye temas etmemesidir. Selulaz enziminin substratı, giysilerdeki pamuklu iplikleri oluşturan selulozdur. Pamuklu kumaşların giyilmesi esnasında oluşan pamuklanma selulaz enzimiyle önlenir; bununla birlikte kumaşın renginin parlaklığı korunmaktadır. Kumaştaki hasar görmüş olan fibriller kumaşa sert bir yapı kazandırır ve kumaşın renginin donuk gözükmeye neden olur. Bu fibriller selulaz enzimi aracılığıyla yok edilmesiyle kumaşın yumuşaklığı ve parlaklığı korunmaktadır. Lekelerin uzaklaştırılması da bu prensibe dayanır. Fibrillerin uzaklaştırılmasıyla beraber leke de uzaklaştırılmaktadır [24].

Selulolitik enzimler bakteri ve fungusların her ikisi tarafından üretilmektedir. Ancak fungusla karşılaştırınca selulolitik bakterilerin verimi daha düşüktür [50].

Fungal enzimlerin üretimi için, katı substratların kullanımı, özellikle Japonya ve diğer Uzak Doğu ülkelerinde oldukça eskiye dayanmaktadır. Pratik olarak bu metot nemlendirilmiş arpa ve pirincin substrat olarak besin tuzlarının ilave edilmesi ile uygulanmaktadır. Bu şekilde üretilen ticari öneme sahip enzimler fungal amilazları, pektinazları ve selulazları içermektedir [60].

Enzimlerin üretimi sırasında patates nişastası soya unu, tuz ve şeker gibi doğal ürünler kullanılmaktadır ve bu maddeler istenilen enzimi oluşturmak üzere patojenik olmayan spesifik mikroorganizmalarla muamele edilmektedir. Mikroorganizmaların fermentasyon işlemini yapmak üzere hazırladığı bu işlem, "aşılama" olarak adlandırılır. Sürecin aerobik olmasından dolayı, sistemdeki oksijen gereksinimi, sisteme sterilize havanın verilmesi yoluyla yapılmaktadır. Fermentasyon süreci sırasında enzimler oluşmaya başlar ve bunlar besin ortamını parçalayarak işlemin devamını sağlar [43].

Son birkaç yıl içerisinde, tekstil terbiye süreçlerinde enzimlere verilen önemde ve bu maddelerin kullanımında, hem üretim ve hem de kullanımlar sırasında "çevre dostu" bilinmelerinden dolayı artış görülmektedir. Finlandiya'nın Tampere şehrinde 1996 yılında 21-24 Mayıs tarihlerinde düzenlenen 77. Dünya Tekstil konferansında bu konu detaylı bir şekilde ele alınmış ve enzimlerin tekstil terbiye endüstrisinde kullanımına ait teknolojik gelişmeler çok sayıdaki tebliğin konusunu oluşturmuştur

Tekstil terbiye proseslerinde enzimlerin başlıca kullanım alanları şunlardır:

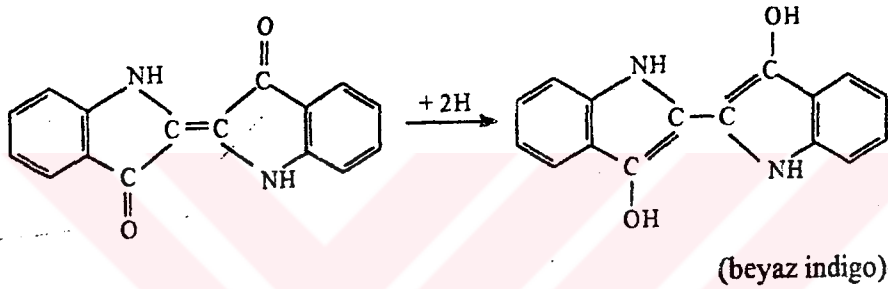
- 1) Haşıl sökme işlemi
- 2) Bio-parlatma
- 3) Bio-yıkama
- 4) Peroksit giderme
- 5) İpek elyafının terbiye işlemleri
- 6) Yün elyafının terbiye işlemleri

Selulaz enzimi ile yapılan biyolojik parlatma (bio-polishing), işlemi selulozik elyaf ve selulozik elyafın sentetik elyaf ile karışımlarında; özellikle örgü kumaşlarda boncuklanmayı önlemek, dokuma kumaşlarda tüylenmeyi önlemek, viskoz elyafa yumuşak bir tutum vermek, pamuğun ve viskozun yüzeyini modifiye etmek için kullanılmaktadır. Satışa sunulan denim kumaşların yaklaşık % 90'ı "beyazlanmışlık" (taş yıkama) etkisini elde edebilmek için enzimler (selulaz) ile muamele edilmektedir. Pomza taşı ve selulazın beraberce kullanıldığı "kombine" proseslerde yaygındır. Enzim proseslerinin pomza taşı kullanarak yapılan işlemlerine karşılık pek çok avantajları mevcuttur. Taş yıkama işleminde de selulazın faaliyeti, biyolojik parlatma işleminekinin aynıdır. Ağartma işlemi sonrasında, kumaş üzerinde kalan fazla miktardaki hidrojen peroksitin bir sonraki boyama işleminde istenmeyen bir etkiyi yaratmaması için uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu işlem genellikle birbirini takip eden durulamalar ile yapılmaktadır, bu da ek bir maliyet getirmektedir. Bu problem, hidrojen peroksitin, oksijen ve suya bozunumunu katalize eden bir katalaz enziminin kullanımı ile kolaylıkla çözülebilmektedir. Katalaz enzimlerini içeren süreçlerde, 15-30°C sıcaklık ve pH 7.8-8.0 aralığında oldukça yeterli bir verim sağlanmaktadır. Boyar maddeler üzerinde istenmeyen bir etkiye sahip olmamaları ve boyama işlemlerinin de yaklaşık 20°C' de başlaması da ayrı bir avantajdır [46].

Tekstil terbiye süreçlerinde enzimlerin kullanımı son on yıl içerisinde gelişmiş, bu gelişme ürün özelliklerinin iyileşmesi ve işlem zamanlarının kısılması ile sonuçlanmıştır. Biyolojik olarak parçalanabilen "çevre dostu" enzimler, günümüzün modern tekstil terbiye teknolojisinde kullanılan pek çok sayıdaki kimyasal

maddenin yerini almaktadır. Araştırma faaliyetleri, tekstil proseslerinde "enzim-destekli" yeni uygulamaların geliştirilmesi için yürütülmektedir [46].

Daha önce bahsedildiği üzere biyolojik parlatma (ağartma) tekstil terbiye süreçlerinde önemli bir yere sahiptir. İndigo boyasının tarihçesi ve bunun boyama için kullanılması binlerce yıl önceye dayanmaktadır ve muhtemelen yaklaşık 6000 yıldır hiç durmadan kullanılan tek boyadır. Ancak 1865'lere kadar indigonun yapısı açığa çıkarılamamıştır. Daha sonra indigo mavi renginin kuvvetliliğinin sebebi iki karboksil grubu arasındaki çift bağ sisteminin dolayı olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 1.2. Mavi İndigonun Beyaz İndigoya İndirgenmesi [36].

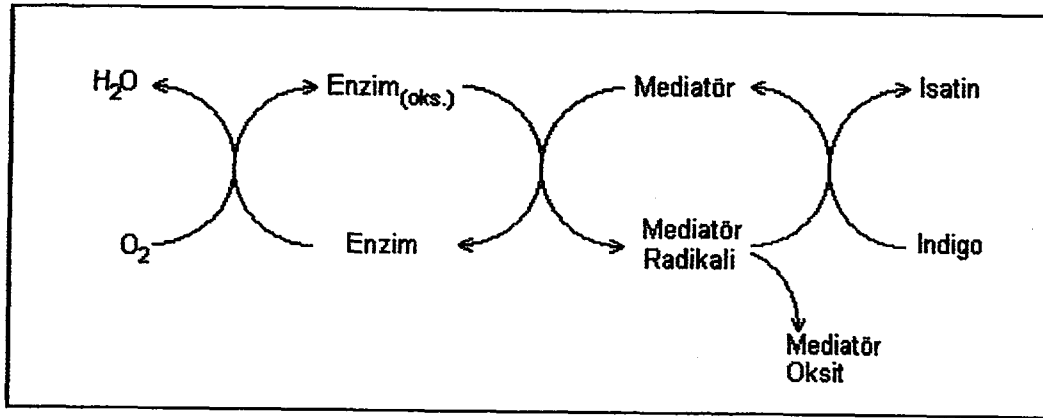
Mavi rengin giderilebilmesi için bu bağlantının koparılması gerekmektedir. Bu ya karboksil grupları tekrar hidroksil gruplarına indirgenerek, leuco indigo formunda sağlamaktadır veya iki indol halkası arasındaki çift bağın oksidatif bir sistemle koparılarak iki molekül isatin oluşturması ile sağlanmaktadır. Şekil 1. 2.'de görüldüğü üzere leuco indigo (beyaz indigo), mavi indigonun reduksiyonundan elde edilir [24].

Bugün indigonun en önemli kullanım alanı denimlerin boyanmasıdır. İndigo normal hidrolitik enzimlerle ağartılamamaktadır, indigonun ağartılması için redoks enzimleri gereklidir. Ancak pamuk ipliklerinin yüzeyine tutunan indigo çok sıkı bir şekilde iplikle paketlenerek oldukça hidrofobik bir ortam oluşturur ki bu da

enzimlerin etkilemesini zorlaştırır. Genel anlamda bir redoks enzimi, okside olmuş bir türden (elektron vericisi), indirgenecek türe (elektron alıcısı) elektron transferi yapmaktadır. Bu olayda indirgen tür oksitlenir ve oksitlenmiş türler arka arkaya indirgenerek sistem devam eder [33].

Lakkaz (EC 1. 10. 3. 2) redoks enzimlerinin bir alt sınıfıdır. Karbohidraz ve proteazlar gibi hidrolitik enzimlerinin substrat özgüllüğünün aksine redoks enzimlerinin substrat özgüllüğü oldukça azdır. Lakkazlar, aromatik hidroksi- veya amino grupları içeren bileşikler, yada indigo karmin de dahil olmak üzere birçok heterosiklik aromatik bileşiği oksitleyebilmektedir. Eğer indigo, lakkazın aktif bölgesi için uygun duruma getirilirse lakkaz indigoyu oksitleyebilecektir ve dolayısı ile ağartabilecektir. Bu sebeple indigonun enzimlerle ağartılması için enzimin yardıma ihtiyacı vardır. Enzimlerle denim ağartma teknolojisi Novo Nordisk Şirketi tarafından geliştirilmiştir. Bu teknoloji bir enzim ve enzim mediatöründen ibarettir. Denim ağartılmasında Novo Nordisk Şirketinin kullandığı enzim lakkazdır ve mediatör olarak düşük molekül ağırlıklı bir organik bileşik olan PPT kullanılmaktadır. Mediatörlerde enzimler gibi bir çeşit katalist olarak rol oynamaktadır. Şekil 1. 3. 'de görüldüğü üzere enzimle gerçekleşmekte olan bir katalitik döngü dışında sisteme bir başka katalitik döngü eklenmektedir. Mediatör ile gerçekleşen katalitik döngü esnasında, mediatör bir katyon radikaline oksitlenir ve denim yüzeyinde bağlı olan indigoyu oksitleyerek, doğal formuna döner. Ancak bir yan reaksiyon olarak mediatör radikali, PPTO olarak adlandırılan mediatör okside oksitlenir [33].

Lakkaz enziminin bütün substratları mediatör olmak için uygun değildir. Bunun nedeni, redoks enzimleri tarafından oksitlenen bileşiklerin çoğu geri doğal formuna geçememektedir ve bu nedenle bir katalitik döngüde mediatör olarak rol almak için uygun olmamaktadır. Bir başka sebep de mediatörün redoks potansiyelidir. İndigonun oksitlenebilmesi için mediatörün redoks potansiyelinin, indigonun redoks potansiyelinden yüksek olması gerekmektedir [33].



Şekil 1. 3. İndigo Boyasının Lakkaz Enzimi ile Oksidasyonu

Ksinalaz enzimleri (endo-1,4-β-D-ksilanaz ;EC 3. 2. 1. 8, β-ksilosidaz ;EC 3. 2. 1. 37) , kraft kağıt hamurunun ağartılmasında kullanılmaktadır. Bu enzimler kağıt hamurunu oksitleyerek beyazlatan kimyasalların hamur üzerinde daha etkili olabilmesi için hamurun yapısında değişiklikler meydana getirerek bu kimyasalların kullanımında %15-20 civarında azalma sağlarlar. 1994 yılında, Kanada'daki kraft kağıt hamurunun %10'u ,Finlandiya'da %4'ü, İsviçre'de %3'ü, Amerika'da ise %2'si ksilanaz enzimi kullanılarak ağartılmıştır [24].

Laktaz enzimi (β-D-galaktozide galakto-hidrolaz; (EC 3. 2. 1. 23) laktozu glikoz ve galaktoza parçalar. Laktoz, memelilerin sütünde bulunan bir disakkarittir ve süt şekeri olarak da adlandırılmaktadır. Laktoz tatlandırma etkisi biraz düşük bir şekerdir. Ancak laktozun bileşenleri olan glikoz ve galaktoz, sükrozdan %80 daha fazla tatlandırıcıdır ve laktozdan 3 veya 4 defa daha fazla çözünürdür. Laktazlar, genç memelilerin bağırsaklarında, bitkilerde, funguslarda, mayalarda ve bakterilerde bulunur. Mikroorganizmalardan laktaz izole etme çalışmaları ilk defa 1950'de Van Dam tarafından süt endüstrisinde kullanılmak amacıyla başlatılmıştır. Endüstriyel açıdan önemli laktaz enzimleri mayalardan, funguslardan ve bakterilerden elde edilmektedirler [24].

Gıda endüstrisinde kullanılan diğer bir ticari enzim katalaz (EC 1. 11. 1. 6) enzimidir. Kosikowski (1992) sütün pastörizasyon yerine hidrojen peroksit ve katalaz sistemi kullanılarak steril edildiğinde peynir kalitesinde önemli derecede ilerleme kaydedildiğini öne sürmüştür. Bu sistemde kullanılan katalaz enzimi sıvı formda hazırlanmaktadır ve *Aspergillus niger* veya *Micrococcus lysodeikticus* tan elde edilmektedir [24].

Hayvan besiciliğinde yem olarak kullanılan tarım ve orman atığı otsu bitkiler lignoseluloz yapısındadır. Geviş getiren hayvanların beslenmesinde kullanılan lignoselulozlu materyaldeki seluloz bu hayvanların rumen sisteminde yaşayan mikroorganizmalarca sınırlı miktarda sindirime uğratılmaktadır. Çünkü bitki hücre duvarı bileşeni olan lignin, karmaşık ve büyük bir molekül yapısına sahip olması ve hemiseluloz-seluloz gibi diğer bileşenler ile kovalent şekilde bağlı bulunması nedeniyle rumen içi sindirimi engellemektedir. Bitki materyalini rumen içi sindirebilirliğini arttırmak için bitki duvarından lignini uzaklaştırmak amacıyla çeşitli biyolojik yöntemler geliştirilmiştir. Bu konuda ilk çalışmalar odun örnekleri üzerinde odun çürütücü fungusların üretimiyle başlamıştır. Yapılan çalışmalarda inkübasyon süresi, fungus türü ve üretim tekniğine bağlı olarak çeşitli hasat artıklarında lignin miktarının azalmasıyla bunların rumen sindirimini de arttığı gösterilmiştir. Lignin miktarının, funguslar ile azaltılmasının bu fungusların fenoloksidazlar olarak adlandırılan ligninolitik enzim sistemiyle başarılmaktadır. Böylece hayvanların et ve süt verimi arttırılmaktadır [25].

1. 2. Önceki Çalışmalar

1. 2. 1. Biyokütlenin Doğası

Bitki biyokütlesi ve hayvan biyokütlesi, biyoteknolojik süreçlerde kullanılabilir karbon kaynaklarını temsil ederler. Tarihimizde bu kaynaklara dayanan üzümünden alkol elde edilmesi ve sütten peynir üretimi gibi çok bilinen örnekler vardır. Doğal hammaddeler tarım ve ormanlardan kaynaklanmaktadır. Bunlar genel olarak kimyasal yapıları açısından farklılık gösteren karbonhidratlardır. Bu

karbonhidratlardan yaygın olanlar şeker, nişasta, seluloz, hemiselulozdur [60].

Birçok bitki de şeker bulunmasına rağmen dünyada ekonomik anlamda şeker üretimi şeker pancarından sağlanmaktadır. Ülkemizin iklim koşulları şeker kamışı yetiştirilmesine müsait olmadığı için Avrupa ülkeleri gibi ülkemizde de şeker gereksinimi şeker pancarından karşılanmaktadır [17].

Şeker pancarı hemiselulozları, ksilan ve glukomannan gibi polimerik bileşikler açısından zengindir. Bu maddeler mikrobial proteinlerin üretimi için substrat olarak kullanılmaktadır [57].

Arpa, dünyadaki ilk on ana tahıl arasında dördüncüsüdür. Arpa, insanların besin ihtiyacına direkt olarak katkıda bulunmamakla beraber maltlaştırılarak ve bira yapımında da kullanılarak tüketime sunulmaktadır [38].

Soya bitkisel protein ve mineral maddeler bakımından insan besininin başında gelmektedir. Bileşiminde % 17-24 yağ, ortalama % 38 oranında protein vardır. Soyanın yağı, küspesi, taneleri, vejetatif yapısı çeşitli yerlerde kullanılmaktadır. Soyanın küspesinin bileşiminde % 40-46 ham protein, % 1-6 yağ, % 30-31 karbonhidrat, % 5-6 seluloz vardır ve insan gıdası ve hayvan yemi olarak kullanılmaktadır. Soyanın unu çok az karbonhidrat içerdiğinden, bu un kullanılarak yapılan ekmeği şeker hastaları kullanmaktadır. Soya unu gerekli olan aminoasit çeşitlerinden yeterince içerdiğinden biyolojik değeri %70-80 arasındadır [17].

1. 2. 2. Bitki Hücre Duvarı Polimerleri

Yeryüzünde her yıl yenilenen bitkilerin hücre duvarında üç önemli yapı birimi bulunmaktadır. Bunlar; seluloz, hemiseluloz ve lignin olarak adlandırılır ve hücre duvarı yapısında sırasıyla 4:3:3 oranında yer alırlar [21].

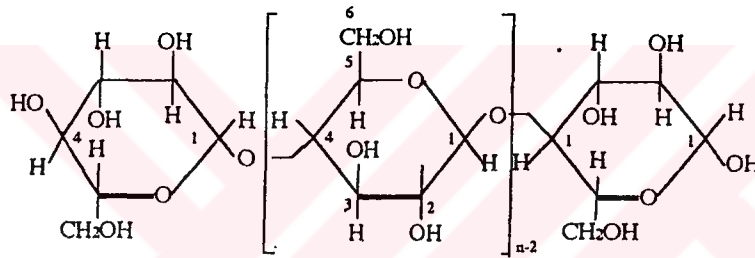
1. 2. 2. 1. Seluloz

Seluloz en çok bulunan, yenilenebilir bir karbonhidrat maddesidir. Yüksek yapılı bitkilerin hücre duvarının temel yapı birimidir ve kuru odun ağırlığının yaklaşık % 45'ini teşkil etmektedir [16].

Seluloz, β -D-glukopiranoz birimlerinin β -(1,4) glikozidik bağları ile bağlanması sonucu meydana gelmiş doğrusal bir polimerdir. Glikozidik bağların

beta düzeninde olması ve hidrojen bağlarının molekül içi ve moleküller arası olması seluloz molekülünü dayamlı ve doğrusal olmaya yönlendirmiştir. Her moleküldeki glukoz birimlerinin sayısı (polimerizasyon derecesi) en az 15 ile en çok 10.000 - 14.000 arasında değişebilmektedir. Genel kanı olarak, seluloz moleküllerinin antiparalel bir düzende ve komşu moleküllerle ortak bir yapı şeklinde bulunduğu kabul edilmektedir [12].

Selulozik maddeler kimyasalların üretimi ve yakıtların üretimi için de önemli kaynaklardır ve selulozdan yarı-katı fermentasyon ile etanol üretiminde başarılı olunmuştur [64].

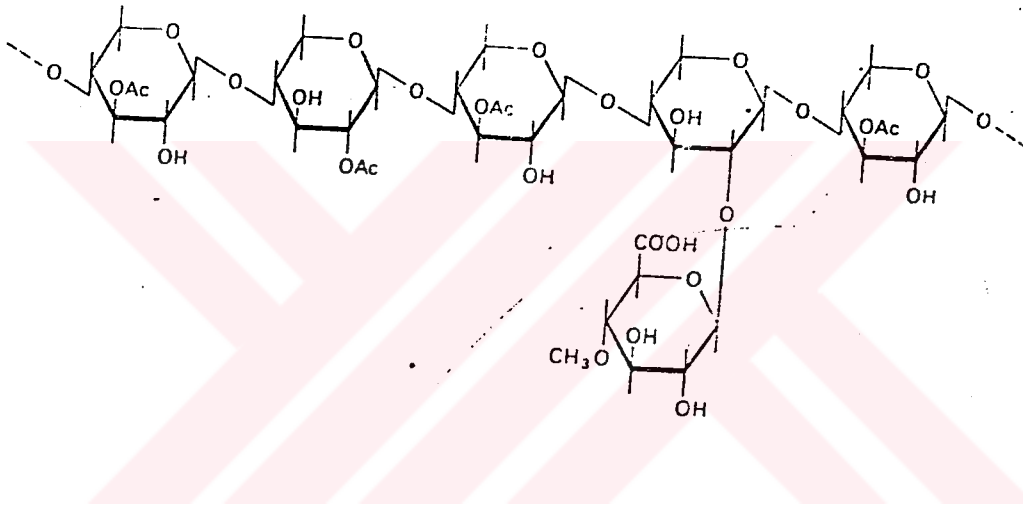


Şekil 1. 4. Selulozun β -D-glukopiranoz Birimi [12].

1. 2. 2. 2. Hemiseluloz

Hemiselulozlar, seluloza nazaran daha kısa olan, dallanmış polisakkaritlerdir. Bununla birlikte hemiselulozlar seluloz ile beraber bulunurlar. Hemiselulozlar genellikle suda çözünmezler, alkali ortamlarda çözünürler, asitle muamelede ise selulozun hidroliz olmasından çok daha kolayca hidroliz olurlar [23].

Hemiseluloz, selulozdan sonra en çok bulunan yenilenebilir bir kaynaktır ve kuru odunun % 20-30'unu meydana getirir. Hemiseluloz üç temel yapıdadır: 1,4- β -D- ksilanlar, 1,3 ve 1,4- β -D-galaktanlar, 1,4- β -D-mannanlar. Oldukça kısa zincirli dirler ve genellikle dallıdır lar. Ayrıca şeker rezidüleri genellikle asit lenmiş veya metillenmiştir [59].



Şekil 1. 5. 4-o-metil-D-glukoronoksilan [27].

1. 2. 2. 3. Lignin

Lignin bitki hücrelerini sıkıca birbirine bağlayan bir polimerdir ve bitkilere dayanıklılık kazandırır; Bitki hücre duvarının ksilem dokularında bulunarak su ve besin geçişinde bariyer görevi görmektedir [13].

Lignin mikrobiyal parçalanmaya dirençli bir rekalsitran polimer olarak lignoselulozların , selulozik bileşenlerinin biyolojik parçalanmasını engelleyen fiziksel bariyer görevini üstlenmektedir [13].

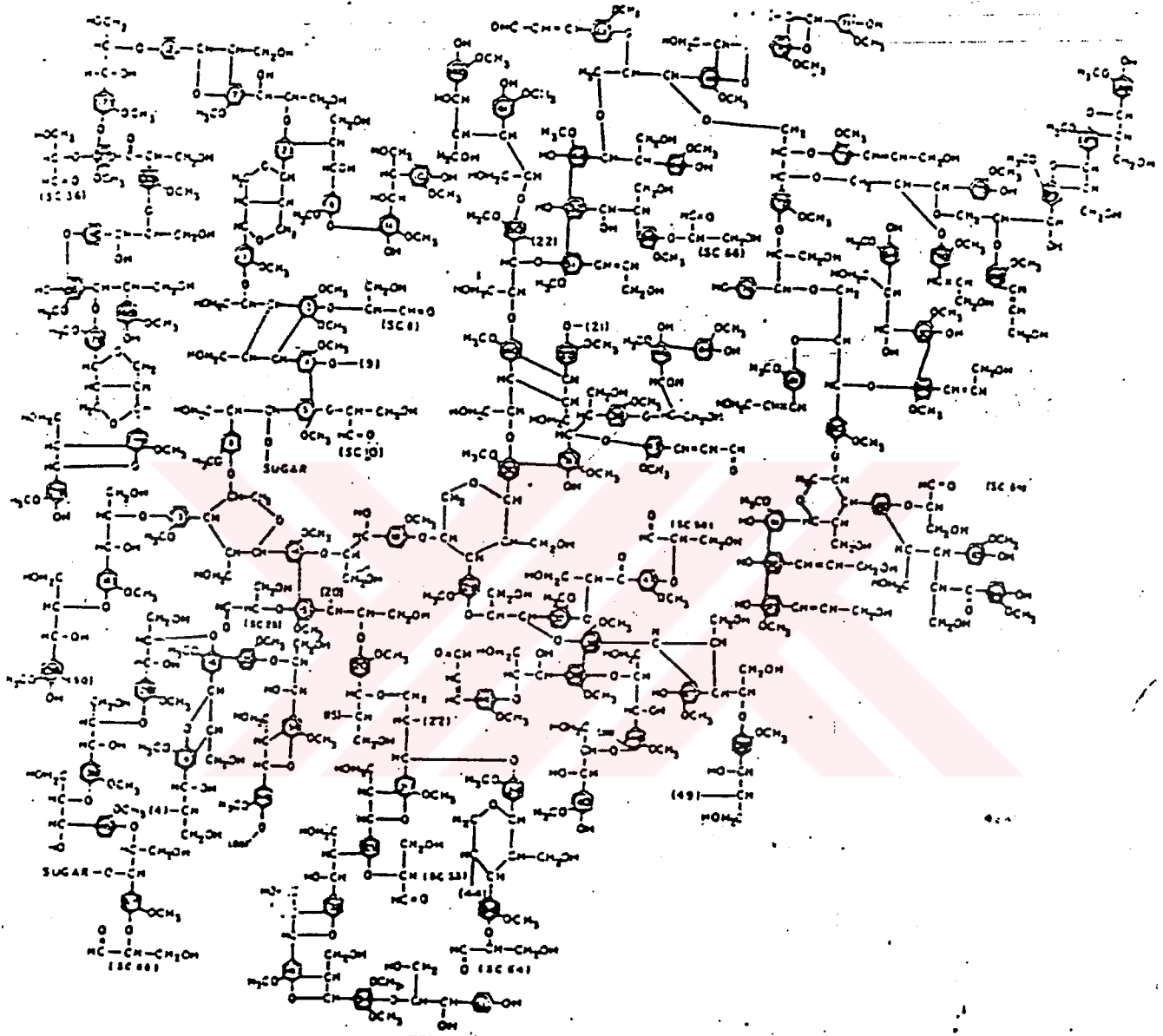
Lignin üç boyutlu, oldukça kompleks, stereoregüler olmayan aromatik bir polimerdir. Bu polimer karbon-karbon ve eter bağlarından oluşmuş fenil propan birimlerinin düzensiz oksidasyonu sonucunda meydana gelmektedir [14].

Yüksek bitkiler tarafından sentezlenen lignin doğada en çok bulunan ikinci biyopolimerdir ve bitki dokularında bulunup kuru ağırlığın yaklaşık %20-30'unu teşkil eder. Lignoselulozun kompleks yapısı, bitki polisakkaritlerinin ve lignin türevlerinin, geniş getirenlerin besinleri veya kimyasal besin deposu olarak kullanılmalarına ekonomik olarak hizmet etmektedir [56].

1. 2. 3. Enzim Üretiminde Lignoselulozların Kullanımı

Orman artıkları ve tarımsal atıkların çoğu yaklaşık % 20-50 seluloz içermektedir, kalan % 50-80 'i ise hemiseluloz ve lignin oluşturmaktadır. Odunsu kapalı tohumluların odunları % 40-55 seluloz, % 24-40 hemiseluloz ve % 18-25 lignin içermektedir. Odunsu açık tohumluların odunları ise % 45-50 seluloz, % 25-35 hemiseluloz ve %25-35 lignin içermektedir. Bir çeneklilerin sapları (ot, palmiye, bambu, buğday, pirinç, şekerkamışı gibi) % 25-40 seluloz, %25-50 hemiseluloz, %10-30 lignin içermektedir [12].

Selulolitik enzimlerin üretiminde değişik katı seluloz kaynakları kullanılmaktadır. Ancak enzim üretimi için saflaştırılmış selulolitik substratların kullanımı büyük ölçekli süreçlere oldukça yüklü bir maliyet getirmektedir ve işlemlerin yürütülebilmesi açısından engelleyici olmaktadır [50].



Şekil 1. 6. Ligninin Yapısı [56].

Enzim ağırlıklı bir prosesin başarılı olarak yürütülmesinde, enzimin maliyetinin de büyük önem taşımasından ötürü, tarımsal atıkların besiyerinde selüloz kaynağı olarak kullanılmasıyla enzimin maliyeti düşük tutulmaktadır [53].

Nişasta üretimi sırasında oldukça fazla miktarlarda atılan patates hamuru; nişasta, selüloz, hemiselüloz ve serbest amino asitler ile mşineral tuzlar içermesi nedeniyle, mikroorganizmalar için besiyeri olarak kullanılabilir [39].

Son yıllarda, çevre kirliliğinin hızla artması nedeniyle atık maddeler çalışılması gereken konular arasında büyük önem kazanmıştır. Endüstriyel atıkların çevre kirlenmesine neden olması, nasıl bunların ya yok edilmelerini yada bunların kirlilik yüklerinin azaltılmasını zorunlu kılıyor ise aynı şekilde sınırlı tarım alanlarının da verimliliğinin artırılması gerekmektedir. Ancak atık maddelerin ekonomik yönden değerlendirilmesi öncelikli olarak düşünülmelidir. Bu nedenle de, atık maddelerin çeşitli şekillerde değerlendirilmesi çalışmalarının da yapılmasını zorunlu kılmaktadır [67].

1. 2. 4. Lignoselulolitik Enzimlerin Üretiminde Fermentasyon Tipi Seçimi

Piyasada bulunan enzimlerin üretimleri, izolasyonları ve saflaştırılmalarından dolayı tutarları yüksek olmaktadır. Lignosellülozik maddeler çözünebilir değildir ve yarı-katı fermentasyon bunları muamele etmek için en uygun yöntemdir. Yarı-katı fermentasyonun ana maliyet gideri ve işletme gideri düşük tutulmaktadır. Lignoselulolitik substrat, delignifikasyon ürününün maliyetinde önemli yer teşkil etmektedir. Biyolojik delignifikasyon için yarı-katı fermentasyonun diğer fermentasyon yöntemlerine göre bir takım avantajları vardır. Yarı-katı fermentasyonda fermentörlerin hacimleri, batık fermentasyona nazaran daha küçüktür, çünkü fermentörde fazladan yer kaplayan su yoktur. Ayrıca sterilizasyon için daha az suyun ısıtılması gerektiğinden daha az enerji harcanacak ve fermentasyonun maliyeti düşecektir. Lignin parçalayan funguslar için yarı-katı fermentasyon ile daha doğal bir ortam sağlanmaktadır ve bu fungusların birçoğu,

diğer fermentasyon yöntemlerine nazaran yarı-katı fermentasyonda daha iyi üremektedir. Hava, substrat partikülleri arasından kolayca sirküle edebildiği için havalandırmada da kolaylık sağlanmaktadır. Bu avantajlarından dolayı delignifikasyonla ilgili hemen tüm çalışmalarda yarı-katı fermentasyon kullanılmıştır [53].

1. 2. 5. Lignoselulozik Substratlardan Enzim Üretiminde Fungusların tercih edilmesi

Phanerochaete chrysosporium ve diğer fungal türler, bütün tip boyaları peroksidasyon yolu ile oldukça hızlı bir şekilde mineralize edebilmektedir. Van der Waarde ve arkadaşları, fungal parçalama ve fungal aktivite için gerekli bir substrat olan in situ elektrokimyasal H_2O_2 'in birleştirilmesi ile yeni bir dekolorizasyon tekniği geliştirmişlerdir ve reaktif ve dispers boyaların birçoğunun atık sularının, alttan havalandırılmalı sürekli bir reaktörle, tamamen bir dekolorizasyon sağlanabilmektedir [69].

Beyaz-çürükçül funguslar, odunun lignin, seluloz ve hemiseluloz dahil bütün bileşenlerini parçalayabilmektedir. Netice olarak, bu funguslar ve bu fungusların hücre dışı lignolitik enzimleri, çevre biyoteknolojisinde farklı uygulamalarda kullanılmak üzere çalışılmaktadır. Bir basidiomycete olan *Phanerochaete chrysosporium* ME446 en iyi karakterize edilen beyaz-çürükçül funguslardan biridir [63].

Phanerochaete chrysosporium ME446, seluloz ve lignin yıkım mekanizması araştırılmış bir beyaz-çürükçül fungustur. Bu enzimlerin üretimi, saflaştırılması ve tanımlanması ile ilgili oldukça fazla çalışma vardır [26].

1. 2. 5. 1. Beyaz-çürükçül Fungusların Ligninoselulolitik Mekanizması

Beyaz-çürükçül fungusların odun bileşenleri olan seluloz, hemiseluloz ve ligninini, hücre dışı enzimleri vasıtasıyla parçalayan mikroorganizmalardan olduğu bilinmektedir. Selulazlar, ksilanazlar ve mannazlar gibi hidrolitik enzimler karbonhidratların parçalanmasında rol almaktadırlar [58].

Ligninin biyolojik dönüşümü, biyosferde gerçekleşen karbon döngüsündeki en önemli olaylardan biridir. Buna rağmen, ligninin parçalanmasının yolu, henüz tamamiyle açıklanmamıştır [54].

Son yıllarda, lignin ve selulozun kullanımı ve parçalanmasında görev alan enzim sistemlerinin mekanizmaları önemli ölçüde açıklanmıştır. Lignin parçalanmasında, enzimatik sistemin sorumlu olduğunu savunanlar, dört oksidatif enzimin bu süreçte görev aldığını öne sürmüşlerdir. Bu enzimlerden fenoloksidazlar olarak tanımlanan lakkaz ve peroksidazın lignin parçalanmasında rol aldığı açıklanmıştır [20].

Ligninin parçalanması oksidatif bir prosestir ve tahıl saplarında veya odunda üreyen birçok beyaz-çürükçül fungusun lignini yıkımını hava ile yer değiştiren oksijen stimule eder [53].

Lignini parçalayan beyaz-çürükçül funguslar genellikle, *Basidiomycetes* grubuna aittir. Biyoteknolojik uygulamalarda kullanmak üzere bu fungusların ligninolitik enzimleri oldukça iyi çalışılmıştır [70].

Trametes (Coriolus, Polyporus) versicolor, *Phanerochaete chrysosporium* ve *Phlebia radiata* beyaz çürükçül fungusları en etkili lignin parçalayıcı mikroorganizmalardır. Ancak parçalama sürecinde rol alan enzimlerin fonksiyonu ve mekanizması hakkında çok az şey bilinmektedir. Ligninin enzimatik yıkımını kapsayan hemen tüm çalışmalar, makromolekül lignini kullanmak yerine düşük molekül ağırlıklı model bileşikleri kullanmaktadır [54].

Beyaz-çürükçül basidiomycetelerde ligninin parçalanmasında, hücre dışı lakkaz üretimi, bu fungusların büyük bir çoğunluğunun ortak özelliğidir, ancak bu enzimin lignin yıkımındaki kesin rolü araştırılmış olmasına rağmen henüz kesin olarak tespit edilememiştir.

Bununla birlikte lignin dekompozisyonu için anahtar olan lignin demetilizasyonunun bu enzim tarafından gerçekleştirildiği rapor edilmiştir [55].

Seluloz düz zincirli ve suda çözünmeyen bir polimerdir ve zincirler hidrojen bağlarıyla birbirine bağlıdır. Bu nedenle ne su nede enzimler “ kristal ” komplekse kolaylıkla penetre olabilir. Ancak bazı funguslar kolaylıkla penetere olabilmektedir. Bu organizmalar, hifal uçlarda enzim üreterek dışarı salgılayabilir ve bu noktadan selulozu çözerek oluşan delikte büyüyerek ilerler [52].

Lignoselulozik yapının beyaz-çürükçül funguslarla parçalanması oldukça karmaşık bir enzim sistemi ile gerçekleştirilmektedir. Ancak bu sistemde yer almakta olan enzimleri etki ettikleri substratlara göre sınıflandırmak olasıdır .

1. 2. 5. 1. 1. Seluloz Yıkımında Rol oynayan Enzimler

Birçok mikroorganizmanın seluloz yıkım mekanizmasının çalışması sonucunda selulazın tek bir enzim değil bir enzimler kompleksi olduğu görülmüştür [52].

Enari ve arkadaşları tarafından farklı enzim aktiviteleri arasındaki sinerjistik hareketle ilgili ortaya atılmış oldukları hipotez, daha sonra Persson ve arkadaşlarının (1991) yapmış olduğu çalışma ile şu şekilde rapor edilerek desteklenmiştir : Selulaz enzim sisteminde ana olarak üç enzimin sinerjik olarak rol almaktadır. Bu enzimler şunlardır: β - 1,4- endoglukonaz (EC 3. 2. 1. 4), β - 1,4 bağlarını içten kıran enzim; Selulobiohidrolaz (EC 3. 2. 1. 91), selulozun indirgen olmayan uçlarından hidrolizleyerek selulobioz açığa çıkarır; β -glukosidaz (EC 3. 2. 1. 21), selulobiozu glukozu hidroliz eder [50].

Seluloz kimyasal olarak homojen olmasına rağmen zincirler kendi içerisinde ve aralarında hidrojen bağları ile bağlanmış kristal alanları içeren belirli bir düzene sahip seluloz mikrofibrillerinden oluşmaktadır. Polisakkaritlerin bu formu özellikle enzimatik ataklara oldukça dirençlidir. Bu enzimlerin seluloz yıkım mekanizmasında sinerjik olarak rol almasının gerekçesi de bu sebebe dayanmaktadır [22].

1. 2. 5. 1. 2. Hemiseluloz Yıkımında Rol Oynayan Enzimler

Hemiselulozların monosakkaritlere tamamen hidrolizi çeşitli enzimlerin bir arada çalışıyor olmasını gerektirmektedir. Bu enzimler β -D-ksilanazlar, β -D-galaktonazlar, β -D-mannazlar, glikosidazlar, β -D-ksilosidaz, α - ve β -D-galaktosidaz ve β -D-mannosidazdır. Esterazlar da asetil karbonhidratların hidrolizinde yer almaktadırlar [16].

1. 2. 5. 1. 3. Lignin Yıkımında Rol Oynayan Enzimler

Ligninin biyolojik parçalanması yeryüzündeki karbon döngüsünde anahtar rolü oynamaktadır ve doğadaki en etkin biyolojik lignin parçalayıcılar beyaz-çürükçül funguslardır [9].

Lignin parçalayan beyaz-çürükçül funguslar *Corticaceae* ve *Polyporaceae* familyasına aittir ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanılmak üzere etkili ligninolitik enzimlerin elde edilebilmesi için son zamanlarda oldukça fazla çalışılmıştır [70].

Beyaz- çürükçül fungusların ligninolitik sistemlerinden, atık suların biyolojik dekolorizasyonu amacıyla da yararlanılmaktadır. Mou ve ark., (1991) yaptıkları çalışmada, kağıt ve kağıt hamuru atık sularının dekolorizasyonunda *Phanerochaete chrysosporium* ve *Tinctporia* türlerinin kullanımının mümkün olduğunu rapor etmişlerdir. Yeni izole edilmiş bir beyaz-çürükçül fungus olan *Geotrichum candidum* Decl'inde antrokinon boyalarının dekolorizasyonunu başardığı rapor edilmiştir [34].

Beyaz çürükçül funguslar üzerinde yapılan çalışmalar, bu funguslar tarafından lignin parçalanmasının aerobik şartlarda gerçekleştiğini ve oksidatif bir süreç olduğunu göstermektedir. Onbeş yıl öncesine kadar, lignin parçalanması üzerine yapılan çalışmalarda ligninolitik aktivitenin gösterilmesindeki güçlükler, bu konuda ilerlemenin az olmasına neden olmuştur. Ancak son yıllarda lignin parçalanması çalışmalarında radyoaktif etiketli (^{14}C lignin) perparatların kullanılmasıyla, bu alanda hızla bilgi edinilmesini sağlamıştır [25].

Beyaz çürükçül fungusların lignin parçalama sistemlerinin mekanizması serbest radikallere dayanmaktadır. Bitkilerdeki lignin sentezi göz önüne alındığında, bu mekanizmanın yer alması oldukça akılcı olmaktadır [15].

Serbest radikal reaksiyonları genellikle “zincir reaksiyonları” şeklinde oluşmaktadır. Bu nedenle bir lignin radikalinin oluşumu diğer radikallerin oluşumuna neden olmakta ve sonuç olarak orjinal polimer yıkılmaktadır. Ligninin bu funguslar tarafından yıkımı bir grup enzimin üretimine ve salgılanmasına bağlıdır. Funguslar tarafından üretilen bu enzimler amonyum, karbonhidrat, veya kükürt gibi anahtar besinlerin sınırlı olduğu ortamlarda üretilmektedir. Besin sınırlı

koşullarda üretilen enzimler “ligninolitik enzimler” olarak adlandırılmaktadır. Bu enzim sistemi, H_2O_2 - gerektiren peroksidazlar kadar H_2O_2 üreten oksidazları da içermektedir [3, 65].

Ayrıca bu şartlar altında belirli bazı enzimlerinde funguslar tarafında üretildiği rapor edilmiştir. Bu enzimlerden bazıları şunlardır: Lakkazlar, reduktazlar ve metilazlar [4,72, 11].

Bu enzimlerin hepsi birlikte beyaz-çürükçül funguslarda lignin-yıkım sistemini oluşturmaktadır.

1. 2. 5. 1. 3. 1. Fenoloksidazlar

Fenoloksidazlar olarak adlandırılan bu enzim sistemi lakkaz ve peroksidazlar olmak üzere başlıca iki ayrı enzimden oluşmaktadır. Peroksidazlar hayvanlarda, bitkilerde, funguslarda ve bakterilerde bulunur.

Peroksidazlar, çok sayıda mikroorganizma tarafından üretilen oksidoredüktazlardır. Bunlar birçok farklı reaksiyonu katalizler fakat reaksiyonu gerçekleştirebilmek için hidrojen peroksit gibi peroksitler tarafından aktive edilmeleri gerekir. Hidrojen peroksit öncelikle enzimdeki Fe (III) iyonunu oksitler, daha sonra enzim substratı oksitler. Lakkaz (EC 1. 10. 3. 2) birçok fungus tarafından üretilen bir enzimdir ve fenolik bileşiklerin toksitesini düşürmeye elverişli gözükmemektedir. Fenolik bileşikleri, bu bileşiklerin serbest anyonik radikallerine oksitler ki bunlar oldukça reaktiftir [30].

Hangi enzim yada enzim kompleksinin lignini parçalayabildiği hala kesin olarak bilinmemesine rağmen, *in vivo* koşullarda lignin peroksidazlar (LİP) ve Mn-bağımlı peroksidazlar (MnP) olmak üzere iki grup peroksidazın lignin parçalama aktivitesiyle ilgili olduğu gözlenmektedir. Heriki enzimde demir içeren glikoproteinlerdir ve değişik formları vardır. LİP ve MnP’nin ilk izole edildiği organizma *Phanerocheate chrysosporium*’da 15 farklı LİP ve 6 farklı MnP izoenzimi saptanmıştır [70].

1. 2. 5. 1. 3. 1. 1. Horseradish Peroksidaz

Horseradish peroksidaz (EC 1. 11. 1. 7), 40.000 dalton molekül ağırlığında glikoproteinden oluşan ve heme grubu ihtiva eden bir enzimdir. Horseradish peroksidaz enzimatik atık iyileştirilmesi proseslerinde en çok kullanılan enzimlerden biridir. HRP, H_2O_2 tarafından aktive edildiği zaman birçok aromatik bileşiği ve heteroaromatik bileşikler okside edebilir. Bu aromatik bileşikler arasında fenoller, bifenoller, anilenler ve benzidinler bulunmaktadır. Horseradish peroksidaz aktivitesinin inhibitörleri azid, florid, siyanid ve sülfid iyonlarıdır [30].

Aynı zamanda Horseradish peroksidaz immuno testlerde ve bazı endüstriyel proseslerde de kullanılmaktadır. Bu nedenle endüstriyel olarak da değerlidir [6].

1. 2. 5. 1. 3. 1. 2. Lakkaz

Lakkaz enzimi, her molekülü dört bakır iyonu taşıyan, 70 000 molekül ağırlığında bir oksidazdır [7].

Lakkaz enzimi aromatik substratını oksitlerken, bir dioksijen molekülünün suya indirgenmesini katalizler. Lakkaz enzimi bitkiler ve birçok diğer funguslar tarafından üretilmesine rağmen en çok beyaz- çürükçül funguslarda gen grupları tarafından kodlanmış birçok izoenzimler olarak üretilmektedir. Birçok ligninolitik fungusun lakkaz genleri daha önceden klonlanmış ve tanımlanmıştır. Genlerin kodladığı enzimlerin bir kısmının konstitif, bir kısmının indüklenabilen enzimler olarak farklı regüle edildiği ileri sürülmektedir [30].

1. 2. 5. 1. 4. Lignin Peroksidaz

Lignin peroksidaz (EC bilinmiyor) aynı zamanda ligninaz veya diarylopropane oksigenaz olarak da bilinmektedir. Bu enzim ilk kez 1983’de rapor edilmiştir. LİP, beyaz-çürükçül fungus *Phanerocheate chrysosporium*’un

hücre dışı enzim sisteminin bir parçasıdır. LİP'in birçok aromatik bileşiklerini mineralize ettiği ve polisiklik aromatik ve fenolik bileşiklerin birçoğunu okside ettiği rapor edilmiştir. LİP'in lignin depolimerizasyonu mekanizması HRP'inkine oldukça benzemektedir [30].

1. 2. 5. 1. 5. Kloroperoksidaz

Caldariomyces fumago fungusundan elde edilen Kloroperoksidaz (EC 1. 11. 1. 10)'ın birçok fenolik bileşiği okside ettiği rapor edilmiştir. Buna ilaveten, bu enzim etanolün asetaldehite oksidasyonu esnasında oksijen transferini gerçekleştirmektedir ve klorid iyonlarının oksidasyonunu katalizlemektedir [30].

1. 2. 5. 1. 6. Mn- Bağımlı Peroksidazlar

Phanerocheate chrysosporium tarafından üretilen MnP (EC bilinmiyor)'ın birçok monoaromatik fenoller ve aromatik boyaların oksidasyonunu katalizlediği gösterilmiştir. Ancak bu reaksiyonların gerçekleşmesi için ortamda divalent manganın ve bazı tamponların bulunması gerekmektedir. Bundan başka MnP, Mn (II)'nin Mn (III)'e oksidasyonunu katalizler. Oluşan Mn(III)'ler de daha sonraki reaksiyonlarda organik substratların oksidasyonunu sağlar [30].

1. 2. 5. 1. 7. Hidrojen Peroksit Üreten Enzimler

Son yıllarda *Phanerocheate chrysosporium* ile yapılan çalışmalarda ligninolitik enzimlerin peroksidazlar ile beraber oksijenazları içerdiği de gözlenmiştir. Bu enzimler, peroksidatik, oksijenatif ve dehidrogenatif olmak üzere ligninin yan zincirlerinin C α - C β bağlarının koparılması gibi farklı aktiviteler gösterirler. Bu enzimlerin ortak aktiviteleri ile suda çözünabilir modifiye lignin parçaları polimerleri oluşturmaktadır.

Birçok araştırmacı 1980'e kadar ligninin parçalanmasının mikrobiyal enzimler aracılığı ile olduğunu ileri sürüyordu. 1980'lerden sonra araştırmacılar "ligninaz"

hipotezine alternatifler aramaya başladı. Daha sonra da lignin parçalanmasının enzimatik değil aktiflenmiş oksijen türleri ile olabileceği ortaya atılmıştır.

Mikroorganizmaların kompleks, aromatik ve makromoleküler lignini nasıl parçaladığına dair iki farklı teori vardır. Bu hipotezlerden biri klasik mikrobiyal enzimlerle parçalanmasıdır, diğeri de singlet oksijen ($O_2^{\cdot}$) ve hidrojenperoksit (H_2O_2) gibi “aktif oksijen” türleri ile parçalanmasıdır. *Phanerocheate chrysosporium* ve *Streptomyces viridosporus* ile yapılan çalışmalarla lignin parçalanmasının enzimatik olmaması ve hidroksi radikal ($\cdot OH$), süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) veya singlet oksijen (1O_2) gibi indirgenmiş oksijen türleri aracılığıyla olabileme ihtimali araştırılmıştır. *Phanerocheate chrysosporium*’un lignini parçalamasının indirgenmiş oksijen türleri ile ilgili olup olmadığı etraflıca araştırılmıştır ve H_2O_2 ’nin ligninin parçalanmasında rol oynadığı kesin olarak tespit edilmiştir. Birçok düşük molekül ağırlıklı aromatik molekülleri substrat olarak kullanan katabolizmadaki enzimler NAD(P)H gibi kofaktörlere gereksinim duymaktadırlar. Bu sitoplazmik enzimler için normal gözükmemektedir çünkü bu enzimler hücre içinde bir döngüsü olan kofaktörleri kullanmaktadır. Ancak bir mikroorganizmanın, lignini parçalamak üzere kendi üreme ortamına kofaktörleri salgılaması anlamsız gözükabilir. Actinomycete *Streptomyces viridosporus* ve beyaz-çürükçül fungus *Phanerocheate chrysosporium* tarafından mikrobiyal atağa uğramış lignin parçalarının analizleri, lignin parçalanmasının oldukça oksidatif bir süreç olduğunu göstermiştir. *Phanerocheate chrysosporium* dahil olmak üzere odun parçalayan fungusların birçoğunun indirgenmiş oksijen türlerinden biri olan H_2O_2 ’i oldukça fazla miktarlarda salgıladığı gözlenmiştir. *Phanerocheate chrysosporium*’un ligninolitik sistemi, organizmanın sekonder metabolik fazının bir parçasıdır. Lignin parçalayıcı sistemler, sadece primer üreme fazından sonra aktiftir. *Phanerocheate chrysosporium*’un ligninolitik sistemini çalıştırmak için en uygun yöntem düşük nitrojen içerikli üreme ortamı kullanıp, nitrojen açlığına neden olup sekonder üremenin indüklenmesidir [14].

Hidroksil radikaller, indirgenmiş oksijenin diğer formlarından çok daha reaktiftir. Bu nedenle araştırmacılar, $\cdot OH$ ’ın ligninolitik bir katalist olarak rolü olup olmadığını incelemişlerdir.

Hidrojen peroksit, $\cdot OH$ için potansiyel bir kaynak olduğundan ötürü Forney ve arkadaşları, hidrojen peroksitin hidroksil radikali üretebileceği ve ligninin

parçalanmasında rol oynayabileceği hipotezini *Phanerocheate chrysosporium* ile çalışmıştır [14].

Kutsuki ve Gold, *Phanerocheate chrysosporium* ile lignin parçalanmasında hidroksil radikalının rol oynayabileceğini birçok kontrollü deney ile çalışmıştır ve bu çalışmalar sonunda fungusun 2- keto- 4- thiometilbütrik asit (KTBA) 'den ve metional 'dan etilen ürettiğini saptamışlardır. Bu çalışmalar fungusun hidroksil radikali ürettiğinin ispatıdır. Etilen fungus [^{14}C] işaretli lignini CO_2 ' e parçaladığı sırada üretilmiştir [14].

Nakatsubo ve arkadaşları singlet oksijenin ligninin biyolojik parçalanmasında tamamlayıcı bir rol oynadığını öne sürmüştür. Fakat yapılan çalışmalar singlet oksijenin lignin model bileşiklerinin parçalanmasında yer almadığını göstermiştir. Aynı zamanda da, glikoz oksidaz'ın H_2O_2 'in üretiminde ana kaynak olduğu gösterilmiştir [14].

İki önemli enzim, glukoz ve glioksal oksidazın , H_2O_2 üretiminde rol oynadığı düşünülmektedir. Bu enzimler beyaz-çürükçül funguslardan izole edilmişlerdir Bu enzimlerin her ikisi de kendileriyle ilgili substratlarını kullanarak, moleküler O_2 'ni H_2O_2 'e indirgemektedirler. Ayrıca bu enzimlerin aktiviteleri de besin sınırlamasıyla indüklenmektedirler [4].

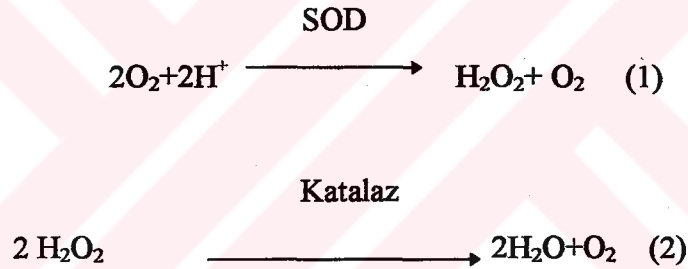
Kelly ve Reddy (1986), *Phanerocheate chrysosporium*'dan bir hücre içi enzimi, glukoz-1 oksidaz'ı izole ederek, bu enzim tarafından üretilen H_2O_2 'in hücre dışı ortama difüzlendiğini ileri sürmektedirler. Bununla birlikte son zamanlarda, iki karbonlu aldehytleri, α - hidroksil karbonil ve α -dikarbonil bileşikleri, H_2O_2 üretimi için substrat olarak kullanan bir hücre dışı oksidaz, glioksil oksidaz, keşfedilmiştir [4].

Bu enzimin hücre dışı ortamda bulunması ve substratlarının lignin yıkım ürünlerinden olması oldukça ilgi çekicidir. Glioksal oksidaz, glioksal, formaldehit, glikoaldehit ve metil glioksal gibi oldukça çeşitli substratları kullanabilmektedir. Ayrıca, bu enzim için en fazla aktiviteyi metil glioksal ve glioksal sağlamaktadır. *Phanerocheate chrysosporium* kültürünün hücre dışı sıvısında metil glioksal ve glioksalın bulunması, fungusun besin sınırlı ortamlarda bile glukozdan bu enzim için gerekli olan substratları ürettiğini ortaya çıkarmaktadır [14].

Kersten ve ark. (1996) gliksal oksidazın, peroksit üretiminin regülasyonunda ligninolitik peroksidazlara peroksit sağlamada ve küçük karbonhidrat moleküllerini okside ederek çeşitli metabolitlerin üretiminde fizyolojik rol oynadığını belirlemişlerdir [32].

1. 2. 6. Katalaz

Katalaz enzim (E.C. 1.11.1.6), birçok organizmanın superoksit radikal anyonuna karşı gösterdiği savunmanın bir parçasını temsil eder. Superoksit radikal anyonu O_2^- , karbonhidratların ve yağların metabolik oksidasyonu sırasında meydana gelen bir yan üründür. Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ise, süperoksit radikal anyonuna karşı gösterilen savunmanın ilk basamağında rol oynamaktadır. Süperoksit dismutaz enzimi, süperoksit iyonunu hidrojen peroksit'e çevirir. Ancak H_2O_2 'de hücrelere toksik bir bileşiktir. Katalaz enzimi de bu toksik bileşiği suya ve oksijene dönüştür



Yukarıdaki iki numaralı reaksiyonda hidrojen peroksit hem oksitlenir hem de indirgenir. İki numaralı reaksiyonun iki basamaklı bir reaksiyon olduğu düşünülmektedir. Katalaz bu iki basamaklı reaksiyonunun, her iki basamağında da görev almaktadır. İlk basamakta katalaz kompleks I'e oksitlenirken bir molekül hidrojen peroksit suya indirgenir. İkinci basamakta ise, diğer hidrojen peroksit molekülü oksitlenirken Kompleks I tekrardan katalaza indirgenir. Katalaz enzimi en iyi pH 7'de fonksiyon göstermektedir ve pH 10'u üzerindeki ortamlarda denatüre olur ve pH 7'den 3'e düşürüldüğü zaman katalaz aktivitesi yarı yarıya düşmektedir. Katalazın yapısı ayrıntılı olarak incelendiği zaman, her organizmada enzimin yapısının farklı olduğu görülür. Katalazın dördüncül yapısı hemoglobinin dördüncül yapısı ile analogtur. Katalaz tetrameriktir ve her 500 alt birimi ortasında demirin bulunduğu porfirin halkasını içermektedir. Ancak hemoglobinin kullandığı Fe

(II)'dir, katalazın kullandığı ise Fe(III)'dür. Bu demir oksidasyon-redüksiyon çeviriminde Fe(V)'e oksitlenir. Ancak spektrofotometrik bulgular, Kompleks I'in daha çok Fe(IV) porfirin katyonuna benzediğini öne sürmektedir. Katalaz enziminin inhibitörleri asetat, askorbat, etanol, format, metanol ve nitrattır [35].

1. 2. 7. Lignoselulozik Yıkımda Beyaz-Çürükçül Funguslardan *Phanerocheate chrysosporium*'un Yeri

Phanerocheate chrysosporium spor yapan, termotolerant bir fungustur ve lignini tamamiyle parçalayarak CO₂ ve H₂O 'ya mineralize etmektedir. *Phanerocheate chrysosporium* 'un ligninolitik sisteminin, bu organizmanın sekonder metabolik fazının bir bileşeni olduğu bilinmektedir. *Phanerocheate chrysosporium*'un ligninolitik sistemi düşük nitrojen içerikli bir besiyeri hazırlayarak aktif hale getirilmektedir. Nitrojen açlığı bir çok beyaz-çürükçül fungusta sekonder üremeyi indüklemektedir [14].

Phanerocheate chrysosporium kültürü ikincil metabolizmaya, ortamdaki karbon ve azot konsantrasyonları gelişimi-sınırlayıcı düzeye düştüğünde geçmektedir. Lignin yıkımında optimum azot konsantrasyonu 2-3 mM'dır. Azot konsantrasyonu 20-30 mM olduğunda fungusun gelişimi hızlanırken, lignin yıkımı baskılanmaktadır.

Lignin yıkımında optimum pH değerleri kullanılan fungus türüne göre değişmektedir. Beyaz-çürükçül fungusların pH'a olan duyarlılıkları kültür ortamında uygun tamponların kullanılmasını zorunlu kılmaktadır. *Phanerocheate chrysosporium*'un gelişmesi için optimum pH' ın 4.5, delignifikasyon aktivitesi için ise optimum pH' ın 3.5 olduğunu bildirmişlerdir [44].

1. 2. 8. Mikroorganizmaların Ekolojik Gereksinimleri ve Yarı-Katı Fermentasyon ile Fungal Delignifikasyon

Doğada bulunan yüz binlerce mikroorganizma türü yaşamlarını farklı yerlerde sürdürürler. Buna sebep ise her mikroorganizma türünün kendine özgü bir çevresel isteği olmasıdır. Her mikroorganizma yer yüzünde normal faaliyetlerini sürdürmek

ve gelecekteki kendi kuşaklarının sürekliliğini garanti altına almak için büyük bir dinamizm gösterirler. Mikroorganizmaların fiziksel istekleri birbirlerine nazaran oldukça farklı durumlar gösterirler. Nitekim bunlardan bir kısmı oldukça düşük sıcaklık derecelerinde ve bir kısmı da 70°C gibi oldukça yüksek bir sıcaklık derecesinde yaşamlarını normal olarak sürdürmektedirler. Sıcaklık bakımından böyle farklılıklara paralel olarak, bir kısmı asit ortamları bir kısmı alkali ortamları severler. Bir kısmı solunumları için oksijene gereksinim gösterirlerken, bir kısmı anaerobik olduğundan oksijene gereksinim duymazlar [47].

1. 2. 8. 1. Nem İçeriği

Yarı-katı fermentasyonda nem içeriği önemli bir parametredir. Çok az miktardaki nem dahi fungal büyümeyi sağlayabilmektedir ancak partikül içerisindeki boşluklardaki tıkanmalar gaz sirkülasyonunu inhibe eder ve bakteriyel kontaminasyona yol açar. Bu nedenle yarı-katı fermentasyonda kullanılan nem miktarları genellikle substratın liflerinin doyma kapasitesinden fazladır. Tahıl saplarının beyaz-çürükçül funguslar tarafından yıkımı için optimum nemlendirme oranı 1 gram tahıl sapına, 3 gram su şeklindedir. Bununla birlikte türler arasında farklılıklar gözlenmektedir. Bu farklılıklar ise 1:1 ve 1:10 arasında değişebilmektedir. Fungal metabolizma sırasında da su oluşmaktadır. Bu nedenle hızlı büyüyen fungus türlerinin fermentasyonu sırasında nem içeriğinin belirgin bir şekilde arttığı gözlenmiştir [53].

1. 2. 8. 2. Sıcaklık

Mikroorganizmaların büyümelerine en önemli faktörlerden birisi sıcaklıktır. Sıcaklık mikroorganizmaların enzimatik faaliyetlerine etki eder. Enzimatik faaliyetler hızlandığında büyüme hızlanır, durduğunda büyüme durur. Bu nedenle her mikroorganizma yaşamsal faaliyetlerini belirli sıcaklık dereceleri arasında sürdürebilir [47].

Delignifikasyonun miktarı sıcaklığın fungusa olan etkisine göre değişmektedir. Beyaz-çürükçül fungusların çoğu için optimum sıcaklık 15°C ile 35°C arasındadır ve mezofiliklerdir. *Phanerocheate chrysosporium* gibi çok az bir kısmı ise termofiliktir. Bir çok beyaz-çürükçül fungus türünde sıcaklığın 22°C'den

30°C'a çıkarılmasıyla tahıl saplarındaki delignifikasyonun arttığı tespit edilmiştir. Fermentasyon sırasında delignifikasyon yapan fungusun metabolizması ve kontaminasyona neden olan mikroorganizmalar ortamdaki sıcaklığın artmasına neden olur. Bu sıcaklık kontrol altına alınmadığı takdirde fermentasyon maddelerinin sıcaklığı artarak fungusu inhibe edebilir yada öldürebilir. Ancak submerged fermentasyonlarda kullanılan su soğutmalı sistemler katı-fermentasyonda fazla etkili değildir. Katı-fermentasyonda, sirküle eden hava ısınarak ve buharlaşarak su ile uzaklaşmaktadır [53].

1. 2. 8. 3. pH

Fungusların optimum istekleri genellikle pH 5.0 ve 6.0 arasında değişir. Fakat doğada 3.5 gibi bir pH değerine hoşgörü gösterebilen değişik bir çok fungus türleri bulunmaktadır [47].

Beyaz-çürükçül funguslar, en iyi genellikle 4.0 ile 5.0 arasındaki pH'larda üremektedirler. Yarı-katı fermentasyon sırasında pH'ı etkili bir şekilde kontrol edebilecek mekanizma henüz yoktur [53].

1. 2. 8. 4. Havalandırma

Ligninin parçalanması oksidatif bir süreçtir ve beyaz-çürükçül fungusların tahıl sapındaki lignini parçalamasını artan oksijen stimule etmektedir. Oksijen basıncı 100kPa' dan fazla iken *Phanerocheate chrysosporium*' un lignini parçalamasını stimule etmektedir. 200 veya 300 kPa oksijen basıncı ise inhibitör etkisi yapmaktadır.

Atmosferin oksijenle zenginleştirilmesi genellikle ligninin olduğu kadar lignin yapısında olmayan bileşiklerin yıkımını da stimule etmektedir. Böylece delignifikasyon artarken seçicilik azalmaktadır.

Fermente olacak substrata havanın homojen dağılması önemlidir. Bunun sağlanması ise substratın paketlenme tipine ve fungusun üreme karakterine bağlıdır [53].

1. 2. 8. 5. Partikül Büyüklüğü

Katı substratların partikül büyüklüğünün azaltılması, partiküllerin yüzey alanını arttırmaktadır ve böylece hiflerin ve havanın partiküllerin merkezine penetrasyonunu kolaylaşmaktadır. Aynı zamanda da partiküllerin paketlenme yoğunluğu arttığı için, fermentör alabileceği hacimden daha fazlasını almaktadır. Ancak gazın, partiküller içerisindeki sirküle edeceği boşlukların büyüklüğü azalacaktır [53].

1. 2. 8. 6. Besin İlaveleri

Doğal lignoselulozik maddeler, lignin parçalayan funguslar için çok iyi bir besiyeri sağlamaktadır ve destekleyici nutrientler genellikle gereksizdir. Ancak özel durumlarda nutrient ilavesi fayda sağlayabilmektedir [53].

Lignoselulozik maddeler özellikle de odun az nitrojen içerir ve bu substratlardaki azot mikrobiyal üreme için sınırlayıcı nutrient olabilir. Ancak beyaz-çürükçül fungusların düşük azotlu ortamlarda üremeye iyi adapte olduğu görülmektedir. Çam ve ladin odununun *Phanerocheate chrysosporium* ile parçalanması için optimum karbon ve azot oranları 160:1 ve 400:1 olarak belirlenmiştir. Bir çok beyaz-çürükçül fungusun lignini parçalaması nitrojen ile baskılanmaktadır. Katı fermentasyon sırasında eklenen nitrojenin *Phanerocheate chrysosporium* üzerindeki inhibitör etkisi tespit edilmiştir. Lignoselulozik substratlara eklenen nitrojen genellikle ortamdaki karbonhidratların kullanımını hızlandırır. Nitrojen dışında diğer bazı esansiyel inorganik besin miktarlarının odunda az olmasına rağmen beyaz-çürükçül fungusların bu miktarlara iyi adapte olduğu görülmektedir. Kavak odununa ilave edilen fosfat, sülfat ve eser elementlerin *Phanerocheate chrysosporium*'un kavak odununu parçalamasını hızlandırdığı ancak lignin yıkımını arttırmadığı gözlenmiştir [53].

1. 2. 8. 7. İnokülasyon

İnokülasyon tipinin ve miktarının biyolojik delignifikasyona etkileri sistematik olarak henüz çalışılmamıştır. Çok farklı inokülasyon teknikleri mevcuttur: Sıvı

ortamda yetiştirilmiş miselyumlarla, agar üzerinden kazıma yöntemiyle, tahıl taneleri üzerinde yetiştirilerek tutuklanmış misellerle, lignoseluloz üzerinde yetiştirilmiş prekültürler inoküle edilerek gerçekleştirilmektedir. Sporlarla da elverişli inokulasyon sağlanmaktadır. Artan inokulasyon miktarı, substrat kolonizasyonu için gerekli zamanı kısaltacaktır ve böylece de ortamda yer alabilecek diğer mikroorganizmaların üremesini engelleyecektir. *Phanerochaete chrysosporium*'un 10^7 sporu, 8 gram steril edilmemiş huş ağacı odununun inokulasyonu için yeterli gelmektedir [53].

1. 2. 8. 8. Karıştırma

Katı fermentasyonda karıştırma sayesinde, substrata eklene su, nutrient ve inokulasyonların homojen bir şekilde dağılması sağlanabilmektedir ve ısının uzaklaştırılması kolaylaşmaktadır. Ancak herhangi bir çalkalama yada karıştırma sistemi fermentörün mekanik yapısını komplekşleştirmekte ve enerji gerksinimi artarak maliyet artmaktadır. Halbuki fungusların karıştırması olmayan yarı-katı fermentasyon sistemlerinde en iyi şekilde geliştiği görülmektedir. Bu durumda da bu sistemler en iyi seçim olarak gözükmektedir [53].

Tekstil terbiyesinde kullanılmakta olan selulaz, lakkaz, katalaz ve peroksidaz enzimlerinin üretiminin araştırdığımız bu çalışmamızda, *Funali trogii* ve *Phanerochaete chrysosporium ME446* beyaz-çürükçül fungusları tarımsal atık içerikli besiyerinde yarı-katı fermentasyon uygulanarak üretilmiştir. Pilot ölçekte üretim için, değişen pH ve sıcaklıklara bağlı maksimum enzim aktivitesinin elde edildiği koşullar belirlenmeye çalışılmıştır. Tarımsal atık içerikli besiyeri kullanılarak, enzimin maliyetini düşük tutmaya çalışırken, bir taraftan da tarımsal atıklara fazladan bir değer kazandırmak amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE METOD

2. 1. Çalışmalarda Kullanılan Mikroorganizmalar ve Kùltürlerin Devamlılığı

Birer beyaz-çürükçül fungus olan *Funalia trogii* ve *Phanerochaete chrysosporium* ME 446 kùltürleri Mersin Üniversitesi, Çevre Mühendisliği Bölümünden temin edilmiştir. Stok kùltürlerin devamlılığını sağlamak için her 20 günde bir yatık Sabouroud Dextrose Agar (SDA) (Oxoid) plaklarına kùltürler transfer edilmiştir. Funguslar inkübatörde (Sanyo 500 B) 30°C' de, 5 günlük inkübasyon süresince üretilmiştir. Üretilen kùltürler çalışmalarda kullanılmak üzere + 4°C' de buzdolabında saklanmıştır.

2. 2. Çalışmalarda Kullanılan Lignoselulozik İçerikli Besiyerinin Hazırlanışı

Çiğit,arpa kırığı,soya unu ve kepek olmak üzere çalışmamızda kullanılan besiyeri 4 farklı lignoselulozik materyalden oluşmaktadır. Çiğit ve arpa kırığı değirmende (Coffe Grander) öğütülerek 0.180 mm parça büyüklüğünde toz haline getirilerek kullanılmıştır.

2. 3. Besiyerinin Hazırlanması

2. 3. 1. Besiyerinin İçeriği

Organizmaların üretiminde yarı-katı üretim tekniği kullanılmıştır. Yarı-katı besiyeri lignoselulozik materyal içerikli besiyerinin Stok Bazal Ortam olarak tanımlanan sıvı besiyeri ile nemlendirilerek hazırlanılmıştır [68]. Bu tip fermentasyonda, substrat partiküllerinin üzeri ince bir su tabakası kaplayacak şekilde nemlendirilir ancak karışımı sıvı hale getirecek kadar su konulmaz. Suyun substrata oranı 1:1 ile 10:1 arasında değişir [53]. Nemlendirme amacıyla kullandığımız Stok Bazal Ortam (SBM) olarak tanımlanan besiyeri hem prekùltür olarak, hemde nemlendirme amacıyla kullanılmıştır. Besiyerinin içeriği Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2. 1. Stok Bazal Ortam (SBM)'in İçeriği

Kullanılan Madde	(g/L)
CaCl ₂	0.01
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.03
MgSO ₄	0.05

Çizelge 2. 2. Katı Besiyerinin İçeriği

Kullanılan Maddenin Adı	Kullanılan Maddenin Miktarı (g/L)
Arpa kırığı	160.0
Soya unu	160.0
Çiğit	160.0
Kepek	880.0

2. 3. 2. Besiyerlerinin Sterilizasyonu

Hazırlanan Stok bazal-mineral besiyeri (120 ° C'de, 1.2 atm basınç, 15 dakika) ve katı besiyeri (120 °C'de, 1.1-1.2 atm basınç, 60 dakika) otoklavda steril edilmiştir.

2. 3. 3. Besiyerine Fungus Ekimi

Çalışmalarda kullanılan fungus türleri, 3mm kalınlığındaki katı agarlı besiyeri içeren petri kaplarında tüm yüzeyi örtecek şekilde üretilmiş stok kültürlerden, Forney ve Reddy'in önerdikleri sıvı besiyerinde bazı değişiklikler yapılarak hazırlanan Stok bazal mineral besiyerine, 5 mL misel süspansiyonu ile ekim yapılarak hazırlanmıştır. Erlenlerdeki (100 mL) 15 mL stok bazal besiyerine ekim yapıp 5 gün süre ile 35°C'de etüv'de (Sanyo 500B) ön inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyondan sonra, besiyeri ve kültür karışımı lignosellülozik kaynakları ihtiva eden katı besiyerine 15mL / 14.5 g olacak şekilde ekim yapılmıştır.

2. 3. 4. Ortam Sıcaklığı

Kültürler, statik olarak, 37 ve 35°C olmak üzere iki farklı sıcaklıkta, % 65 bağıl nemde 10 gün süre ile etüvde inkübe edilmiştir.

2. 3. 5. Ortamın pH'sı

Ortamın pH' ısı 4.0, 5.0 ve 6.0 olarak kullanılmıştır. pH ayarlaması, 0.1 M potasyum fosfat tamponuyla yapılmıştır.

2. 3. 6. İnkübasyon Süresi

pH' ısı 4.0, 5.0 ve 6.0'a ayarlanan *Funalia trogii* ve *Phanerochaete chrysosporium ME 446* kültürleri 35 ve 37°C' de 10 gün süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 5. ve 10. günlerinde örnek alınmıştır.

2. 4. Kültürlerde Enzim Aktivitelerinin Ölçümü İçin Yapılan Hazırlıklar

İnkübasyon sonunda petrilere üretilmiş besiyerlerinin kapağı açılarak 40°C'de etüvde 24 saat bekletilerek besiyerinin nemini kaybederek kurutulması sağlanmıştır. Petri kabındaki bileşenler 30 saniye süresince değirmende (Coffe Grander) öğütülerek toz haline getirilmiştir [29]

2. 5. Kültürlerde Enzim Aktivitelerinin Ölçümü

Kültürlerde enzim aktivitelerinin sonucu aynı deneyin üç tekrarının Aritmetik ortalaması ortalaması alınarak verilmiştir.

Selulaz enzim aktivitesi birim Filter Paper Unit (FPU) enzim aktivitesi olarak ifade edilmiştir. Birim FPU aktivitesi 1g katı örnekten elde edilen enzimin 1 saatte oluşturduğu şeker miktarı (μ mol) olarak tanımlanmıştır.

Bağıl lakkaz ve peroksidaz enzim aktiviteleri Colorimetrik Unit (CU) olarak ifade edilmiştir. Bir Colorimetrik Unit, inkübasyon karışımının optik yoğunluğunda 0.1 birim artışa neden olan enzim aktivitesi olarak tanımlanmıştır.

Katalaz enzim aktivitesi International Unit (IU) olarak ifade edilmiştir. Bir unit enzim aktivitesi, pH 7.0'de, 25°C'de, 1 mikromol H_2O_2 'in parçalanmasını katalizleyen enzim miktarı olarak ifade edilmiştir

2. 5. 1. Kùltùrlerde Selulolitik Aktivitenin Òlçùlmesi

Sellulolitik enzimlerin òlçümü için katı kùltürden 0.1g alınarak 5 mL Na-asetat tamponu ilave edilerek santrifüjlenmiş ve supernatandan alınan 1 ml enzim örneği ile hazırlanan reaksiyon karışımı eğer çok yoğun bir renk oluştuyorsa, gerekli oranlarda sulandırılmıştır.

Selulaz için substrat olarak kullanılan Whatman No.1 filtre kağıdı ile inkübe edilir [51]. Selulaz aktivitesi, oluşan indirgen şeker miktarının Dinitrosalisilik asit yöntemiyle òlçülmesiyle saptanmıştır [40].

Dinitrosalisilik asit yönteminde, 0.5 mL örnek üzerinde 1.5mL DNS reaktifi (g/100 mL olarak; 1.0 dinitrosalisilik asit (Sigma), 0.2 fenol, 0.05 sodyum sülfid, 1.0 sodyum hidroksit, 20.0 sodyum-potasyum tartarat) eklenerek 10 dakika kaynar su banyosunda bekletilmiş ve 5-10 dakika oda sıcaklığında soğutulan örneklerde oluşan renk 550 nm dalga boyuna ayarlanmış spektrofotometrede tampon ile hazırlanmış kontrole karşılık optikyoğunluk (OD) olarak òlçülmüştür. Elde edilen optik yoğunlukların indirgen şeker miktarının glukoz eşdeğerleri, glikoz ile çizilmiş standart eğriden hesaplanmıştır.

2. 5. 2. Kùltùrlerde Fenoloksidaz Aktivitelerinin Òlçümü

2. 5. 2. 1. Kùltùrlerde Lakkaz Aktivitesinin Òlçümü

Lakkaz (02:p-difenol oksido- redùktaz, EC.1.10.32) aktivitesinin òlçümünde; Guaikol (Sigma) substrat olarak kullanılmış ve bunun oksidasyonu sonucu ortaya çıkan kinonlara bağlı olarak oluşan rengin 465 nm. dalga boyuna ayarlanmış spektrofotometrede (Shimadzu 160A) òlçümü ile bağlı lakkaz aktivitesi hesaplanmıştır. Lakkaz aktivitesi òlçümünde reaksiyon karışımı Sodyum-fosfat tamponu (0.1M, pH 6.0) ile 5 mL' sinde 10 mikro mol guaikol bulunacak şekilde hazırlanmış ve bunu için 0.1 mL enzim kaynağı üzerine 4.9 mL guaikol çözeltisi eklenerek karışım 30°C'de 60 dakika inkübe edilmiştir [25].

2. 5. 2. 2. Kùltùrlerde Peroksidaz Aktivitesinin Òlçümü

Peroksidaz (verici H_2O_2 : oksido redùktaz, E.C. 1.11.1.7) aktivitesi, lakkaz aktivitesi tayininde kullanılan yöntem ile òlçùlmüştür. Ancak bu yöntemden farklı olarak reaksiyon karışımı 1.5 mikrolitre H_2O_2 içerecek şekilde hazırlanmıştır. Bağlı peroksidaz aktivitesi, inkübasyon karışımının optik yoğunluğunda 0.1 birim artışa neden olan enzim aktivitesi olarak tanımlanmıştır [25]

2. 5. 3. Kùltùrlerde Katalaz Aktivitesinin Òlçümü

2. 5. 3. 1. Kùltùrlerde Katalaz Aktivitesinin Hans Lùck Yöntemi ile Òlçümü

Katalaz (EC.1.11.1.6) aktivitesi òlçümünde Hans Lùck (1963)'ün yönteminde bazı modifikasyonlar yaparak òlçùlmüştür. 0.1M K-fosfat tamponunun (pH 7.0) 1mL'sine 1.6 mL H_2O_2 (%35 w/v) ilave edilerek A çözeltisi hazırlanmıştır. Çözeltiden 2.4 mL substrat alınarak, 0.6 mL enzim kaynağı eklenilerek oda sıcaklığında 240 nm'de 2 dakika süresince optik yoğunluktaki azalış izlenilmiştir [37].

2. 5. 3. 2. Kùltùrlerde Katalaz Aktivitesinin Titrimetrik Yöntem ile Òlçümü

İstanbul'da OR-BA Biyokimya Sanayii A.Ş'nin yardımları ile yaptığımız enzimlerin yarı-ömür tespiti çalışmalarında 0.02 M K-fosfat tamponu (pH 7.0) içinde 0.05 M'lık H_2O_2 çözeltisi hazırlanmıştır. K-fosfat tamponundan 10 mL alınarak; 2 mL, H_2O_2 içeren çözeltiden ilave edilen karışım ile 0.5 mL enzim kaynağı 50°C'de 20 dak. İnkübasyona bırakılmıştır. Enzimin aktivitesi 6N'lik H_2SO_4 ile durdurulduktan sonra 0.005 M $KMnO_4$ ile titre edilmiştir.

2. 5. 4. Toplam Protein Miktarının Òlçümü

Yarı-katı besiyerindeki toplam protein miktarı modifiye Lowry metodu ile saptanmıştır [28].

0.9 mL A çözeltisi (0.2 % (w/v) potasyum sodyum tartarat ve %10 (w/v) Na_2CO_3 çözeltisi) 1 mL seyreltilmiş örneğe ilave edilmiştir. Tüpleri 50°C 10 dakika su banyosunda bekletilmiştir ve oda sıcaklığında soğutulduktan sonra 0.1 mL B

  zeltisi (%2 (w/v) potasyum sodyum tartarat, % 1 (w/v) Cu.SO₄. 5H₂O ve % 0.4 (w/v) NaOH) ilave edilmiştir. Çözelti 10 dakika oda sıcaklığında bırakılmıştır ve daha sonra 3 mL. C reagent (1:15 sulandırılmış Folin-Ciocalteu) ilave edilerek 1 saniye karıştırılıp, 50 C'de 10 dakika su banyosunda bekletilmiştir. Tüpler oda sıcaklığında soğutulduktan sonra 650nm'de absorbansları okunmuştur.

Bovine serum albumin standart olarak kullanılmıştır.

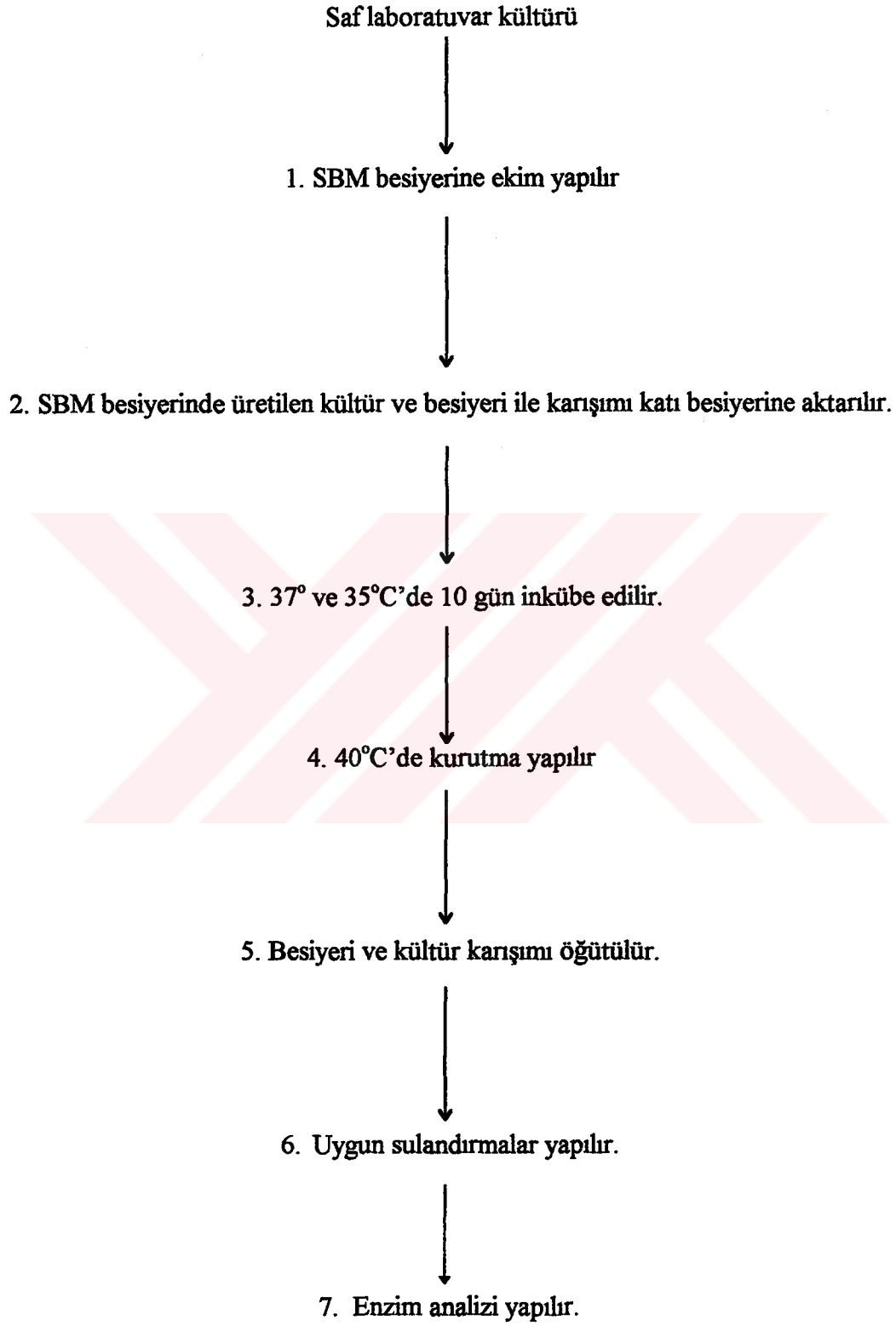
2. 6. Örneklerin Amino Asit  ceriklerinin Belirlenmesi

10 mg örnek tartılarak ve hidroliz tüplerine konularak, 1 mL 6 N HCl eklenilerek tüplerin ağzı eritilip kapatılmıştır. Daha sonraki örnekler 110  C'de 24 saat hidrolizlenerek açılan tüplerdeki örneklerde bulunan çözünmeyen bileşenler santrifüjlenerek uzaklaştırılmıştır. Daha sonra rotary evaporatörde 40 C'de HCl tamamen uzaklaştırılmıştır.  zerine  rnek seyreltme tamponundan 1 mL eklenilerek analize hazır hale getirilmiştir.

 rnek miktarı yoğun geldiğinden dolayı tüm ön işlemden geçen örnekler gerekli oranlarda seyreltilerek amino asit analyser'a (EUROPA G105 SED SHIMADZU) verilerek sonuçlar okunmuştur.

Cihaz analizleri 20  L örnek içerisinde yapılmıştır. Sonuçlar  g cinsinden bulunmuştur.

2. 7. YARI-KATI KÜLTÜR PROSESİNİN AKIM ŞEMASI



3. BULGULAR

3. 1. Yarı-katı Fermentasyonla Üretilen *Phanerochaete chrysosporium* ME446 ve *Funalia trogii* Funguslarının Enzimatik Aktiviteleri

Yarı-katı fermentasyon ortamında sıcaklığın ve pH'nın bahsedilen beyaz-çürükçül fungusların enzimatik aktiviteleri üzerine etkileri belirlenmeye çalışılmıştır.

3. 1. 1. Yarı-katı Fermentasyonla Üretilen *Phanerochaete chrysosporium* ME446 ve *Funalia trogii* Funguslarının Selulaz Aktivitesi

35°C ve 37°C olmak üzere iki farklı sıcaklık ve 4.0, 5.0 ve 6.0 olmak üzere üç farklı pH uygulanarak çalışılan yarı-katı fermentasyon tekniği ile üretilen *Phanerochaete chrysosporium* ME446 ve *Funalia trogii* funguslarının hücre dışına salgıladığı selulaz enziminin 5. ve 10. günlerdeki aktiviteleri filter paper yöntemi ile tespit edilmiş ve sonuçlar Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Phanerochaete chrysosporium ME 446 fungusunun daha önce Bölüm 2. 3. 1'de anlatılan yöntemlere göre hazırlanan ve kültür ortamına aşılmasından sonra, araştırılan selulaz enzim aktivitesi pH=6.0 ve sıcaklığın 37°C olduğu ortamda, inkübasyonun 10. Gününde 507 FPU'lık bir aktivite ile maksimum olarak tespit edilmiştir. Bununla birlikte aynı fungusun pH'sı 5.0 olan besiyerine aşıl原因arak üretildiği yarı-katı fermentasyon ortamında 35°C'de 10.gündeki selulaz aktivitesi 497 FPU olarak maksimum aktiviteye oldukça yakın bir değer vermiştir.

Çalışmalarda kullanılan diğer beyaz-çürükçül fungus *Funalia trogii*'nin maksimum selulaz aktivitesinin de pH=6.0 ve 37°C'de 10 günlük inkübasyon periyodu sonunda 745 FPU olarak elde edilmiştir. Ancak aynı fungusun pH'sı 4.0 olan besiyerine aşıl原因arak üretildiği yarı-katı fermentasyonda ortam sıcaklığı 35°C'da tutulduğu zaman, çalışmanın 5. gününde de yine 611 FPU olmak üzere maksimuma yakın bir enzim aktivitesi elde edilmiştir.

Çizelge 3.1. *Phanerochaete chrysosporium* ME446 ve *Funalia trogii*'nin Günlere Bağlı Selulaz Aktivitesi.

Fungus	Sıcaklık	pH	Gün	Selulaz Aktivitesi (FPU)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	35	4.0	5	212
			10	358
		5.0	5	334
			10	497
		6.0	5	474
			10	425
	37	4.0	5	474
			10	52
		5.0	5	321
			10	196
		6.0	5	165
			10	507
<i>Funalia trogii</i>	35	4.0	5	611
			10	280
		5.0	5	572
			10	690
		6.0	5	390
			10	200
	37	4.0	5	294
			10	320
		5.0	5	90
			10	427
		6.0	5	457
			10	745

3. 1. 2. Yarı-katı Fermentasyonla Üretilen *Phanerochaete chrysosporium* ME446 ve *Funalia trogii* Funguslarının Katalaz Aktivitesi

35°C ve 37°C olmak üzere iki farklı sıcaklık ve 4.0, 5.0 ve 6.0 olmak üzere üç farklı pH uygulanarak çalışılan yarı-katı fermentasyon tekniği ile üretilen *Phanerochaete chrysosporium* ME446 ve *Funalia trogii* funguslarının hücre içi katalaz enziminin 5. ve 10. günlerdeki aktiviteleri tespit edilmiş ve sonuçlar Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3. 2. *Phanerochaete chrysosporium* ME446 ve *Funalia trogii*'nin Günlere Bağlı Katalaz Aktivitesi.

Fungus	Sıcaklık	pH	Gün	Katalaz Aktivitesi (IU)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	35	4.0	5	480
			10	2835
		5.0	5	1065
			10	135
		6.0	5	6240
			10	60
	37	4.0	5	2865
			10	820
		5.0	5	115
			10	595
		6.0	5	485
			10	440
<i>Funalia trogii</i>	35	4.0	5	8410
			10	1770
		5.0	5	9320
			10	8220
		6.0	5	8440
			10	125
	37	4.0	5	135
			10	135
		5.0	5	240
			10	885
		6.0	5	975
			10	510

Phanerochaete chrysosporium ME446 fungusu aşlanarak yapılan çalışmalarda en yüksek katalaz aktivitesi pH= 6.0 ve 35°C 'deki ortamda 5 günlük inkübasyon periyodu sonunda elde edilmiştir. Bu koşullarda elde edilen katalaz enziminin aktivitesi 6240 IU, spesifik aktivitesi 128 IU/mg olarak tespit edilmiştir.

Çalışmalarda kullanılan diğer beyaz-çürükçül fungus *Funalia trogii*'nin maksimum katalaz aktivitesinin de pH=5.0 ve 35°C'de 5 günlük inkübasyon periyodu sonunda 9320 IU, spesifik aktivitesi 328 IU/mg olarak elde edilmiştir. Ancak aynı fungusun aynı fermentasyon şartları altındaki inkübasyon periyodunun 10. gününde de 8220 IU enzim aktivitesiyle maksimuma yakın bir aktivite gözlenmiştir.

3. 1. 3. *Phanerochaete chrysosporium* ME446 ve *Funalia trogii*'nin Fenoloksidaz Aktivitesi

Phanerochaete chrysosporium ME446 ile yürütülen çalışmaların hiç birinde lakkaz ve peroksidaz enzim aktivitelerine rastlanılamamıştır. Enzim aktivitesi gözlenilen deneylerde dahi değerler sıfıra yakın olduğu için dikkate alınmamıştır.

3. 1. 3. 1 *Funalia trogii*'nin Peroksidaz Aktivitesi

35°C ve 37°C olmak üzere iki farklı sıcaklık ve 4.0, 5.0 ve 6.0 olmak üzere üç farklı pH uygulanarak çalışılan yarı-katı fermentasyon tekniği ile üretilen *Funalia trogii*'nin hücre dışına salgıladığı peroksidaz enziminin 5. ve 10. günlerdeki aktiviteleri tespit edilmiş ve sonuçlar Çizelge 3.3.'de verilmiştir. Çalışmalarda kullanılan *Funalia trogii*'nin maksimum peroksidaz aktivitesinin pH=5.0 ve 35°C'de 10 günlük inkübasyon periyodu sonunda 4.27 CU olarak elde edilmiştir.

3. 1. 3. 2. *Funalia trogii*'nin Lakkaz Aktivitesi

35°C ve 37°C olmak üzere iki farklı sıcaklık ve 4.0, 5.0 ve 6.0 olmak üzere üç farklı pH uygulanarak çalışılan yarı-katı fermentasyon tekniği ile üretilen *Funalia trogii*'nin hücre dışına salgıladığı lakkaz enziminin 5. ve 10. günlerdeki aktiviteleri tespit edilmiş ve sonuçlar Çizelge 3.4.'de verilmiştir. *Funalia trogii*'nin maksimum lakkaz aktivitesinin de pH=5.0 ve 35°C'de 10 günlük inkübasyon periyodu sonunda 3.37 CU olarak elde edilmiştir.

Çizelge 3. 3. *Funalia trogii*'nin Günlere Bağlı Peroksidaz Enzim Aktivitesi.

Fungus	Sıcaklık	pH	Gün	Peroksidaz Aktivitesi (CU)
<i>Funalia trogii</i>	35	4.0	5	2.63
			10	3.41
		5.0	5	3.33
			10	4.27
		6.0	5	0.63
			10	0.21
	37	4.0	5	0.28
			10	0.09
		5.0	5	0.27
			10	0.27
		6.0	5	0.35
			10	0.47

Çizelge 3.4. *Funalia trogii*'nin Günlere Bağlı Lakkaz Enzim Aktivitesi.

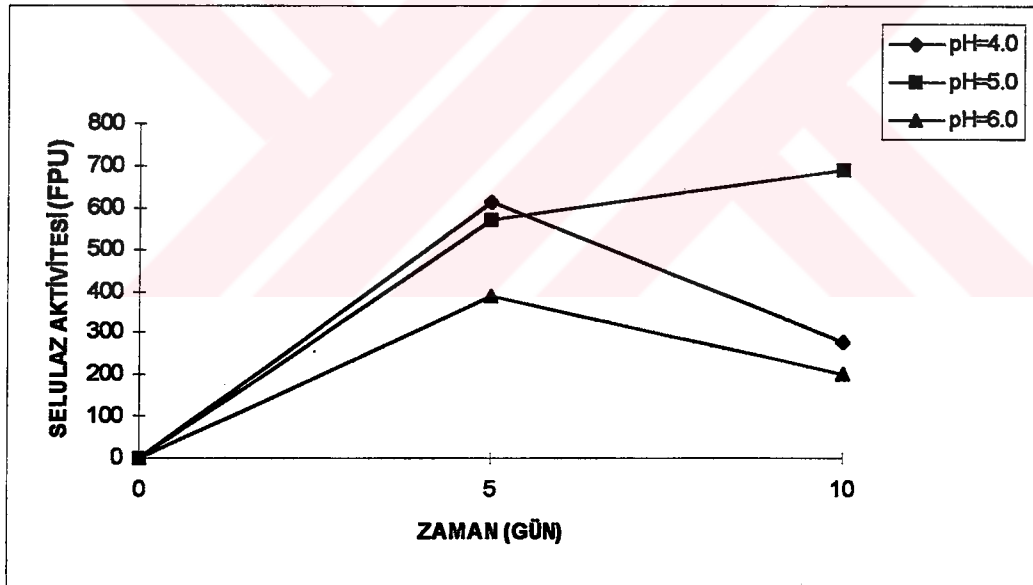
Fungus	Sıcaklık	pH	Gün	Lakkaz Aktivitesi (CU)
<i>Funalia trogii</i>	35	4.0	5	2.34
			10	2.81
		5.0	5	3.34
			10	3.37
		6.0	5	0.60
			10	0.23
	37	4.0	5	0.12
			10	0.00
		5.0	5	0.42
			10	0.15
		6.0	5	0.52
			10	0.39

3. 2. Yarı-katı Fermentasyonla Üretilen *Funalia trogii*'nin İnkübasyon Sıcaklığı 35°C iken Değişen pH Değerlerine Bağlı Olarak Selulaz, Katalaz, Lakkaz ve Peroksidaz Enzimlerinin Aktiviteleri

3. 2. 1. pH Değerlerine Bağlı Selulaz Aktivitesindeki Değişim

pH 4.0, 5.0 ve 6.0 olmak üzere üç farklı pH uygulanarak çalışılan fermentasyonda ortam sıcaklığı 35°C'ye ayarlandığı zamanki selulaz enzim aktivitelerinin karşılaştırılması Şekil 3.1-4'de görülmektedir.

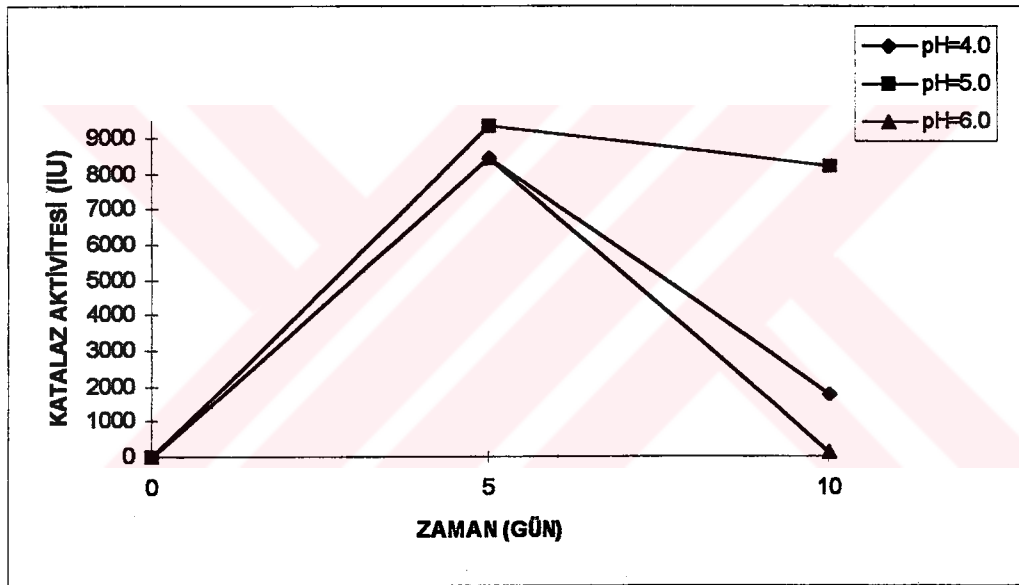
Funalia trogii ile 35°C'de yapılan çalışmalarda, 5. günde elde edilen sonuçlar pH=4.0'de 611, pH=5.0'de 572 ve pH=6.0'da 390 FPU şeklindedir. İnkübasyonun 10. gününde elde edilen sonuçlar ise; pH=4.0'de 280, pH=5.0'de 690 ve pH=6.0'da 200 FPU olarak bulunmuştur.



Şekil 3. 1. *Funalia trogii*'nin 35°C İnkübasyon Sıcaklığında Farklı pH Değerlerindeki Günlere Bağlı Olarak Selulaz Aktivitesi

3. 2. 2. pH Değerlerine Bağlı Katalaz Aktivitesindeki Değişim

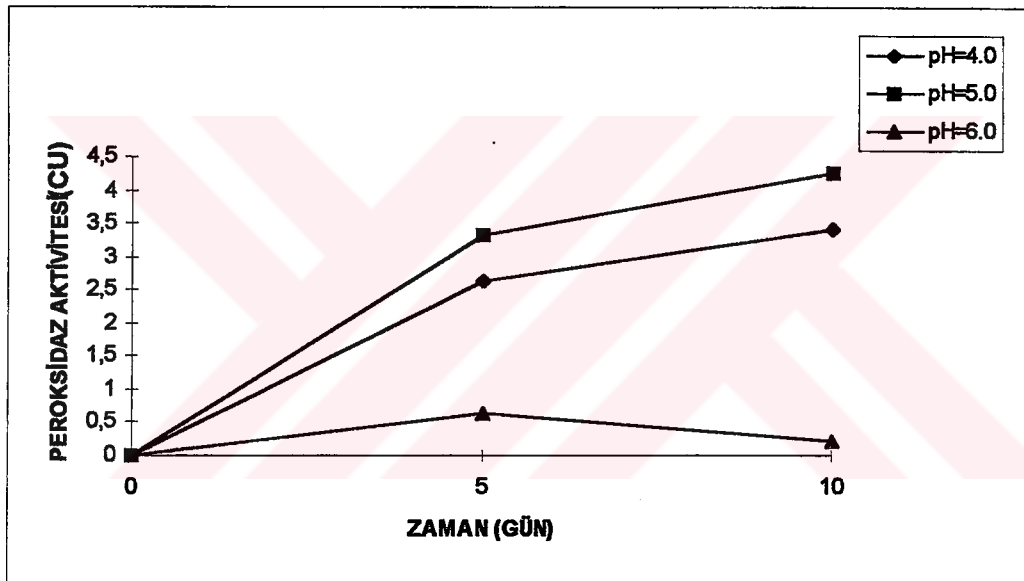
Şekil 3. 2.'de görüldüğü üzere *Funalia trogii* ile 35°C'de yapılan çalışmalarda, 5. günde elde edilen sonuçlar pH=4.0'de 8410, pH=5.0'de 9320 ve pH=6.0'da 8440 IU şeklindedir. İnkübasyonun 10. gününde elde edilen sonuçlar ise; pH=4.0'de 1770, pH=5.0'de 8220 ve pH=6.0'da 125 IU olarak bulunmuştur.



Şekil 3. 2. *Funalia trogii*'nin 35°C İnkübasyon Sıcaklığında Farklı pH Değerlerindeki Günlere Bağlı Olarak Katalaz Aktivitesi

3. 2. 3. pH Değerlerine Bağlı Peroksidaz Aktivitesindeki Değişim

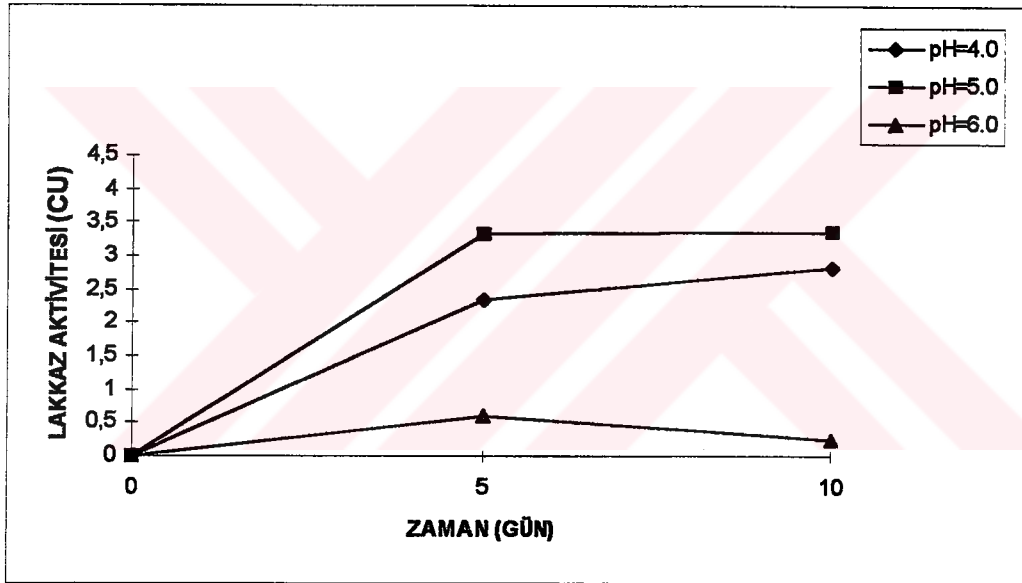
Funalia trogii ile 35°C'de yapılan çalışmalarda, 5. günde elde edilen sonuçlar pH=4.0'de 2.63, pH=5.0'de 3.33 ve pH=6'da 0.63 CU peroksidaz aktivitesi şeklindedir. İnkübasyonun 10. gününde elde edilen sonuçlar ise; pH=4.0'de 3.41, pH=5.0'de 4.27 ve pH=6.0'da 0.21 CU olarak bulunmuştur.



Şekil 3. 3. *Funalia trogii*'nin 35°C İnkübasyon Sıcaklığında Farklı pH Değerlerindeki Günlere Bağlı Olarak Peroksidaz Aktivitesi

3. 2. 4. pH Değerlerine Bağlı Lakkaz Aktivitesindeki Değişim

Funalia trogii ile 35°C’de yapılan çalışmalarda, 5. günde elde edilen lakkaz aktivitesi sonuçları pH=4.0’de 2.34, pH=5.0’de 3.34 ve pH=6.0’da 0.60 CU şeklindedir. İnkübasyonun 10. gününde elde edilen sonuçlar ise; pH=4.0 ‘de 2.81, pH=5.0’de 3.37 ve pH=6.0’da 0.23 CU olarak bulunmuştur.

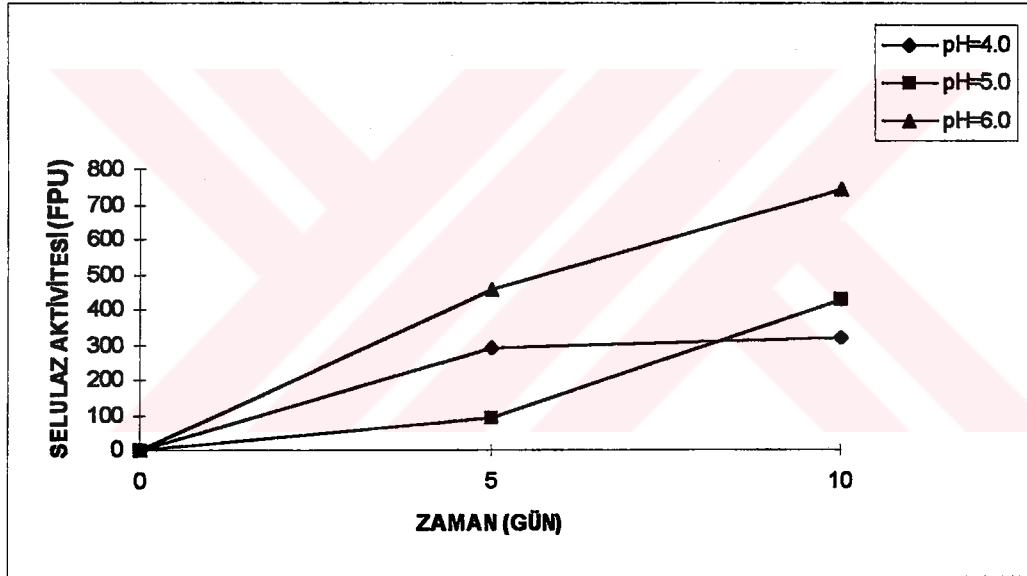


Şekil 3. 4. *Funalia trogii*’nin 35°C İnkübasyon Sıcaklığında Farklı pH Değerlerindeki Günlere Bağlı Olarak Lakkaz Aktivitesi

3. 3. Yarı-katı Fermentasyonla Üretilen *Funalia trogii*'nin İnkübasyon Sıcaklığı 37°C iken Değişen pH Değerlerine Bağlı Olarak Selulaz, Katalaz, Lakkaz ve Peroksidaz Enzimlerinin Aktivitesi

3. 3. 1. pH Değerlerine Bağlı Selulaz Aktivitesindeki Değişim

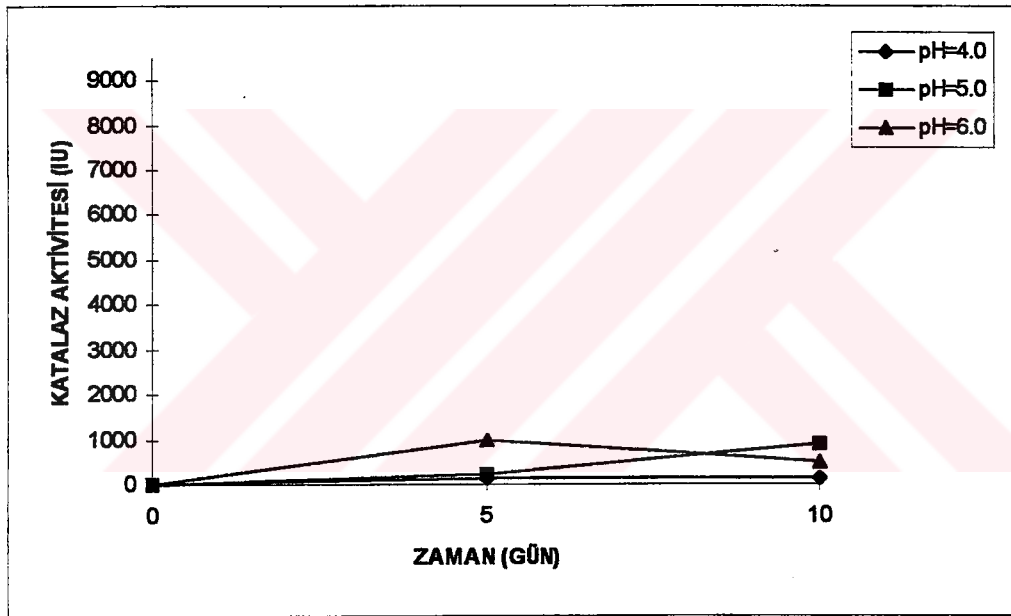
İnkübasyon sıcaklığı 37°C olarak seçilen çalışmalarda ise, 5 günlük peryod sonucunda pH=4'de 294, pH=5'de 90 ve pH=6'da 457 FPU selulaz aktivitesi sonuçlarına ulaşılmıştır. İnkübasyonun 10. gününde elde edilen sonuçlar ise; pH=4.0' de 320, pH=5.0'de 427 ve pH=6.0'da 745 FPU şeklindedir.



Şekil 3. 5. *Funalia trogii*'nin 37°C İnkübasyon Sıcaklığında Farklı pH Değerlerindeki Günlere Bağlı Olarak Selulaz Aktivitesi

3. 3. 2. pH Değerlerine Bağlı Katalaz Aktivitesindeki Değişim

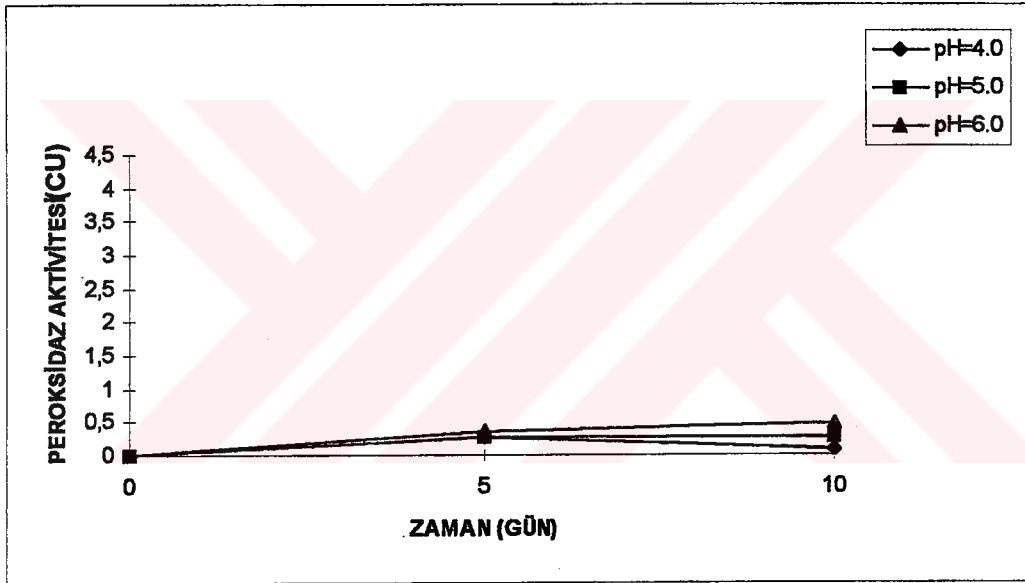
İnkübasyon sıcaklığı 37°C olarak seçilen çalışmalarda ise, 5 günlük peryod sonucunda pH=4'de 135, pH=5'de 240 ve pH=6'da 995 IU sonuçlarına ulaşılmıştır. İnkübasyonun 10. gününde elde edilen sonuçlar ise; pH=4.0'de 135, pH=5.0'de 885 ve pH=6.0'da 510 IU şeklindedir.



Şekil 3. 6. *Funalia trogii*'nin 37°C İnkübasyon Sıcaklığında Farklı pH Değerlerindeki Günlere Bağlı Olarak Katalaz Aktivitesi

3. 3. 3. pH Değerlerine Bağlı Peroksidaz Aktivitesindeki Değişim

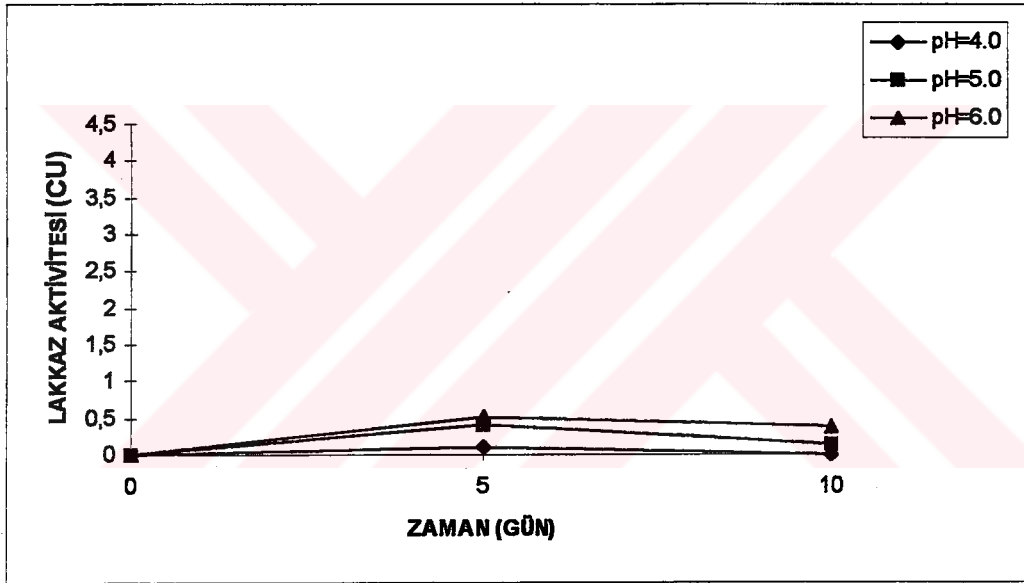
İnkübasyonun 5. gününde pH=4.0'de 0.27, pH=5.0'de 0.28 ve pH=6.0'da 0.35 CU peroksidaz aktivitesi sonuçlarına ulaşılmıştır. İnkübasyonun 10. gününde elde edilen sonuçlar ise; pH=4.0 'de 0.09, pH=5.0'de 0.27 ve pH=6.0'da 0.47 CU şeklindedir.



Şekil 3. 7. *Funalia trogii*'nin 37°C İnkübasyon Sıcaklığında Farklı pH Değerlerindeki Günlere Bağlı Olarak Peroksidaz Aktivitesi

3. 3. 4. pH Değerlerine Bağlı Lakkaz Aktivitesindeki Değişim

İnkübasyon sıcaklığı 37°C olarak seçilen çalışmalarda ise, 5 günlük peryod sonucunda pH=4.0'de 0.12, pH=5.0'de 0.42 ve pH=6.0'da 0.52 CU lakkaz aktivitesi sonuçlarına ulaşılmıştır. İnkübasyonun 10. gününde elde edilen sonuçlar ise; pH=4.0'de enzim aktivitesi saptanamamıştır, pH=5.0'de 0.15 ve pH=6.0'da 0.39 CU şeklindedir.

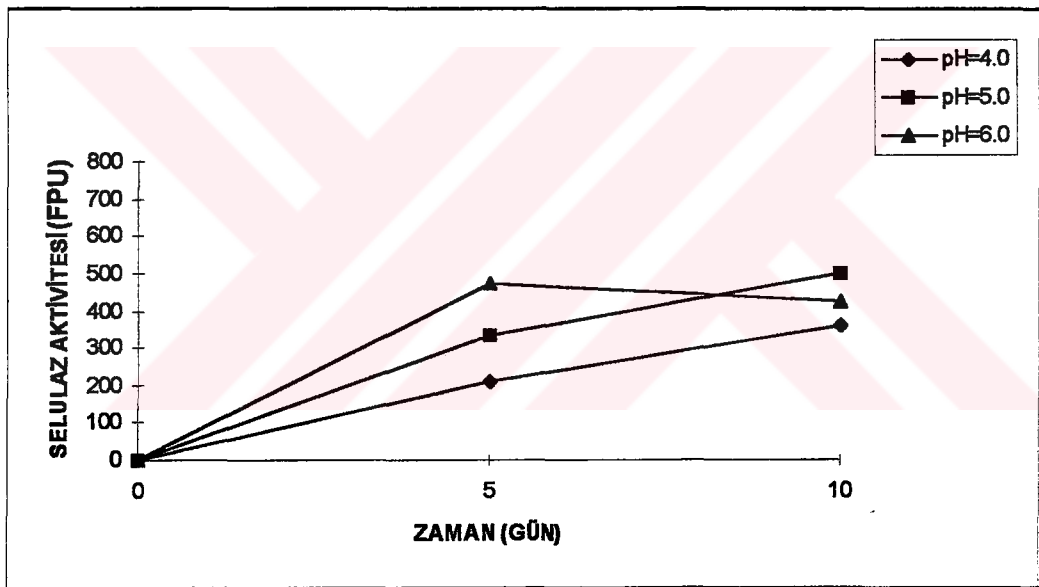


Şekil 3. 8. *Funalia trogii*'nin 37°C İnkübasyon Sıcaklığında Farklı pH Değerlerindeki Günlere Bağlı Olarak Lakkaz Aktivitesi

3. 4. Yarı-katı Fermentasyonla Üretilen *Phanerochaete chrysosporium* ME446'nın İnkübasyon Sıcaklığı 35°C iken Değişen pH Değerlerine Bağlı Olarak Selulaz veKatalaz Enzimlerinin Aktiviteleri

3. 4. 1. pH Değerlerine Bağlı Selulaz Aktivitesindeki Değişim

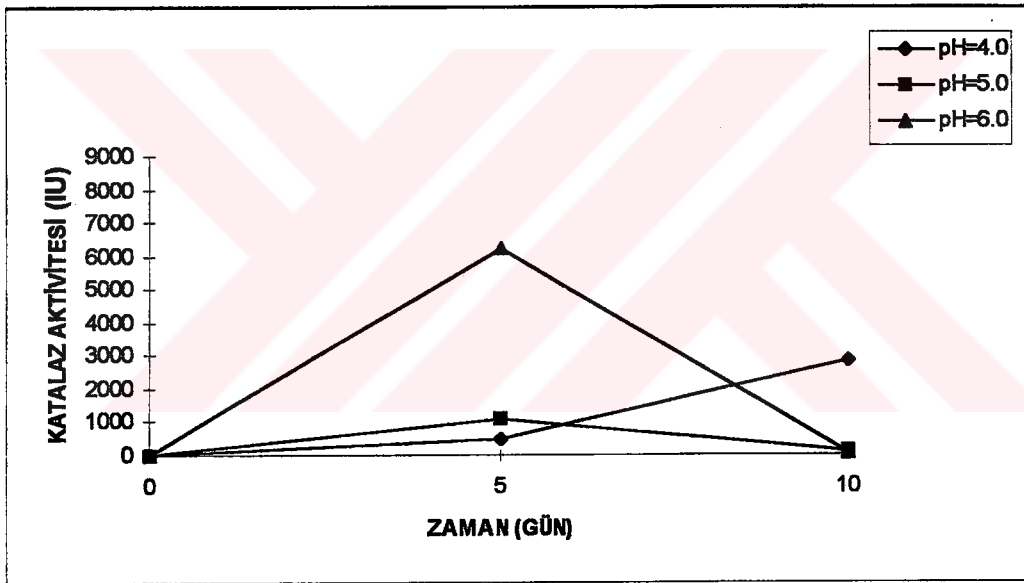
Phanerochaete chrysosporium ME446 ile 35°C'de yapılan çalışmalarda, 5. günde elde edilen sonuçlar pH=4.0'de 212, pH=5.0'de 334 ve pH=6.0'da 474 FPU şeklindedir. İnkübasyonun 10. gününde elde edilen sonuçlar ise; pH=4.0 'de 358, pH=5.0'de 497 ve pH=6.0'da 425 FPU olarak bulunmuştur.



Şekil 3. 9. *Phanerochaete chrysosporium* ME446' nın 35°C İnkübasyon Sıcaklığında Farklı pH Değerlerindeki Günlere Bağlı Olarak Selulaz Aktivitesi

3. 4. 2. pH Değerlerine Bağlı Katalaz Aktivitesindeki Değişim

Phanerochaete chrysosporium ME446 ile 35°C’de yapılan çalışmalarda, 5. günde elde edilen sonuçlar pH=4.0’de 480, pH=5.0’de 1065 ve pH=6.0’da 6240 IU şeklindedir. İnkübasyonun 10. gününde elde edilen sonuçlar ise; pH=4.0’de 2835, pH=5.0’de 135 ve pH=6.0’da 60 IU olarak bulunmuştur.

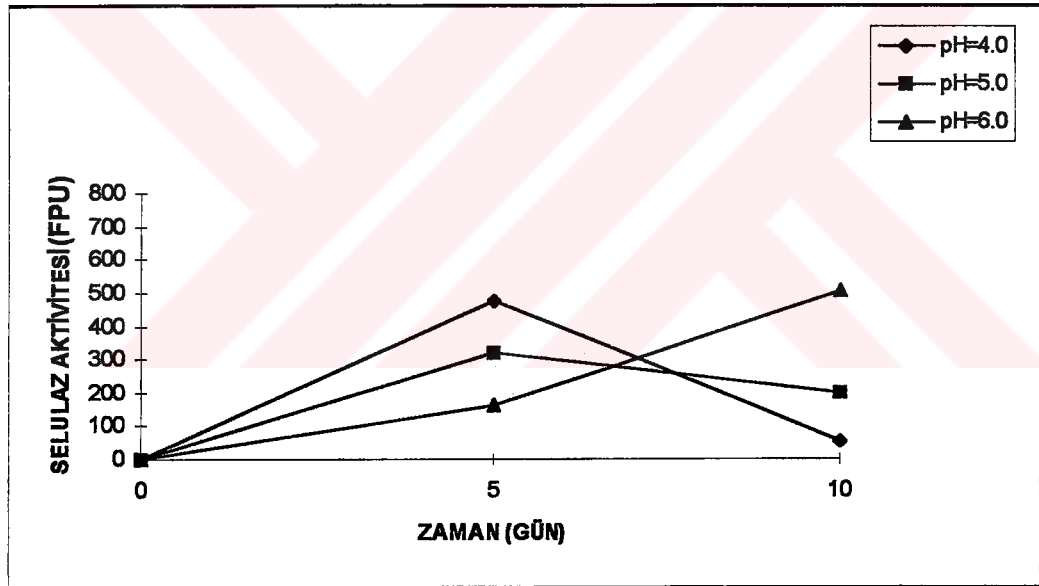


Şekil 3. 10. *Phanerochaete chrysosporium ME446*’nın 35°C İnkübasyon Sıcaklığında, Farklı pH Değerlerindeki Günlere Bağlı Olarak Katalaz Aktivitesi

3. 5. Yarı-katı Fermentasyonla Üretilen *Phanerochaete chrysosporium* ME446'nın İnkübasyon Sıcaklığı 37°C iken Değişen pH Değerlerine Bağlı Olarak Selulaz veKatalaz Enzimlerinin Aktiviteleri

3. 5. 1. pH Değerlerine Bağlı Selulaz Aktivitesindeki Değişim

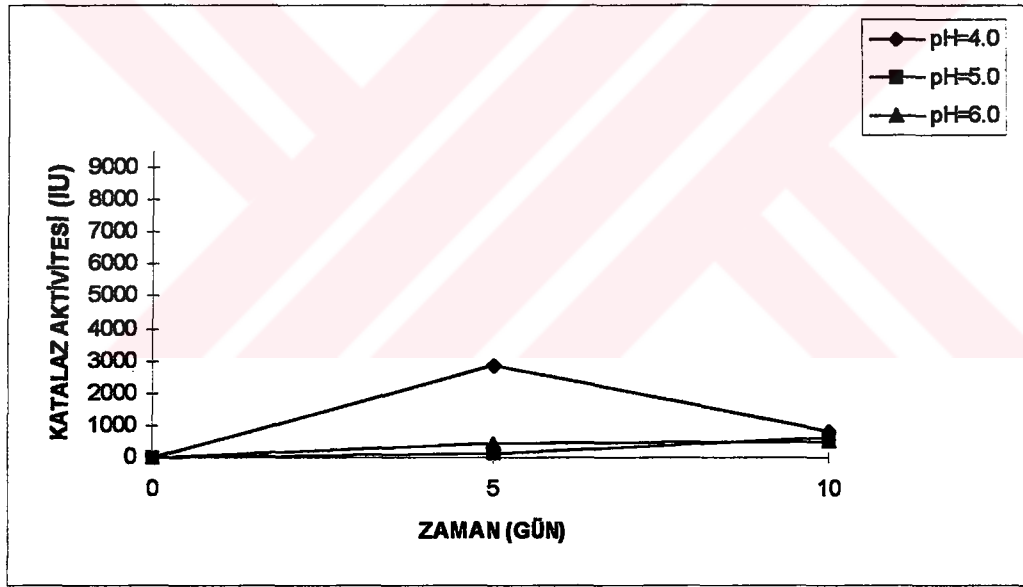
İnkübasyon sıcaklığı 37°C olarak seçilen çalışmalarda ise, 5 günlük peryod sonucunda pH=4.0'de 474, pH=5.0'de 321 ve pH=6.0'da 165 FPU sonuçlarına ulaşılmıştır. İnkübasyonun 10. gününde elde edilen sonuçlar ise; pH=4.0 'de 52, pH=5.0'de 196 ve pH=6.0'da 507 FPU şeklindedir.



Şekil 3. 11. *Phanerochaete chrysosporium* ME446'nın 37°C İnkübasyon Sıcaklığında, Farklı pH Değerlerindeki Günlere Bağlı Olarak Selulaz Aktivitesi

3. 5. 2. pH Değerlerine Bağlı Katalaz Aktivitesindeki Değişim

İnkübasyon sıcaklığı 37°C olarak seçilen çalışmalarda ise, *Phanerochaete chrysosporium ME446*'nın 5 günlük periyod sonucunda pH=4.0'de 2865, pH=5.0'de 115 ve pH=6.0'da 485 IU katalaz aktivitesi sonuçlarına ulaşılmıştır. İnkübasyonun 10. gününde elde edilen sonuçlar ise; pH=4.0 'de 820, pH=5.0'de 595 ve pH=6.0'da 440 IU şeklindedir.



Şekil 3. 12. *Phanerochaete chrysosporium ME446*'nın 37°C İnkübasyon Sıcaklığında, Farklı pH Değerlerindeki Günlere Bağlı Olarak Katalaz Aktivitesi

3. 6. Yarı-katı Fermentasyonla Üretilen *Funalia trogii*'nin ve *Phanerochaete chrysosporium* ME446'nın Selulaz, Katalaz, Lakkaz ve Peroksidaz Enzimlerinin Sentezine Sıcaklığın Etkisi

35°C ve 37°C olmak üzere iki farklı sıcaklık ve 4.0, 5.0 ve 6.0 olmak üzere üç farklı pH uygulanarak çalışılan yarı-katı fermentasyon ortamında *Phanerochaete chrysosporium* ME446 ve *Funalia trogii* beyaz-çürükçül funguslarının ürettikleri enzimlerin sıcaklığa göre değişimi Şekil 3. 13-29'da verilmektedir.

Biyolojik parçalanmaya sıcaklığın etkisi ve etki oranı fungustan fungusa değişmektedir [53].

3. 6. 1. Sıcaklığın *Funalia trogii*'nin Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisi

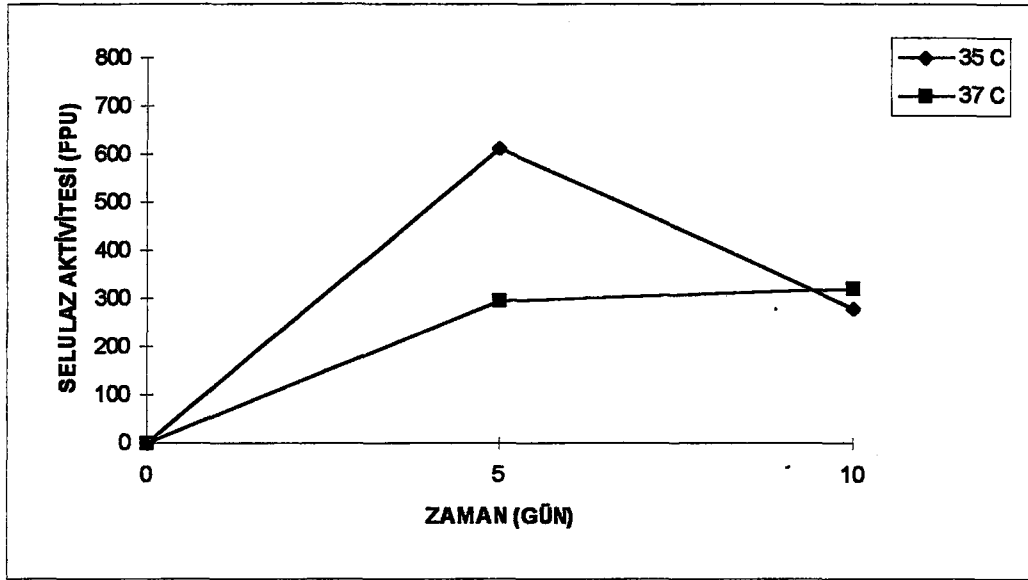
3. 6. 1. 1. Sıcaklığın *Funalia trogii*'nin Selulaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Üç farklı pH değerinde çalışılan fungusun günlere bağlı olarak selulaz enzim aktivitelerine sıcaklığın etkisi Şekil 3. 13' de (pH=4.0 için), Şekil 3. 14' de (pH=5.0 için), Şekil 3. 15' da (pH=6.0 için) verilmiştir.

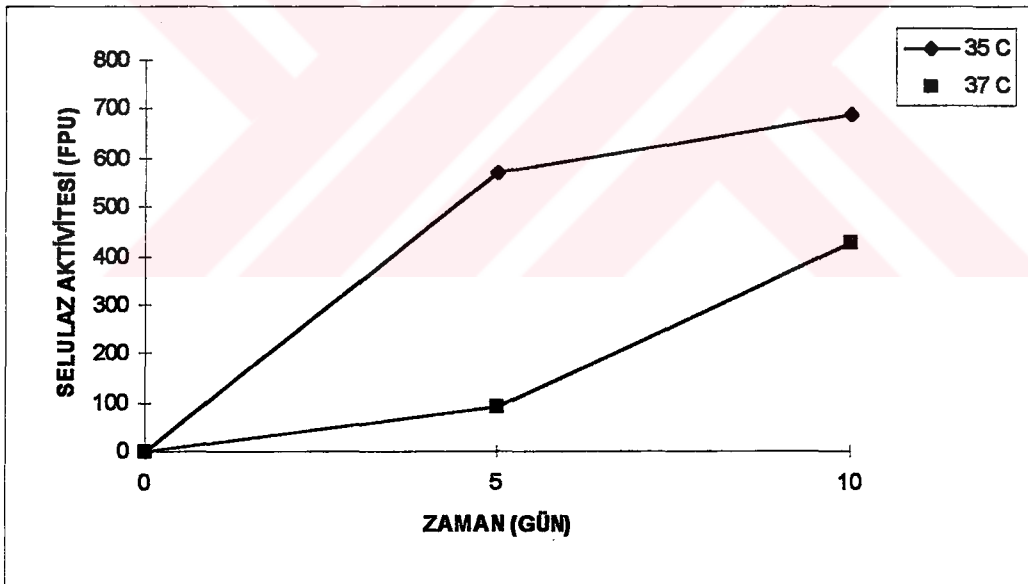
pH=4.0 ve sıcaklık 35°C iken inkübasyonun 5. gününde *Funalia trogii*'nin selulaz aktivitesi 611 FPU olarak bulunmuştur. Aynı zaman periyodunda 37°C'de selulaz aktivitesi 294 FPU'e düşmüştür. İnkübasyonun 10. gününde ise 35°C'de enzim aktivitesi 280 FPU olarak tespit edilmişken, Şekil 3.13'de belirtildiği üzere 37°C'de ise 320 FPU'e yükseldiği görülmektedir.

Şekil 3.14'de görüldüğü üzere pH=5.0'de, 35°C ve 37°C sıcaklıkta yapılan çalışmalarda 5 günlük inkübasyon sonunda enzim aktiviteleri sırasıyla 572 ve 90 FPU olarak bulunmuştur. Aynı pH ve sıcaklıklarda, 10 günlük inkübasyon sonunda selulaz aktiviteleri sırasıyla 690 ve 427 FPU olarak tespit edilmiştir.

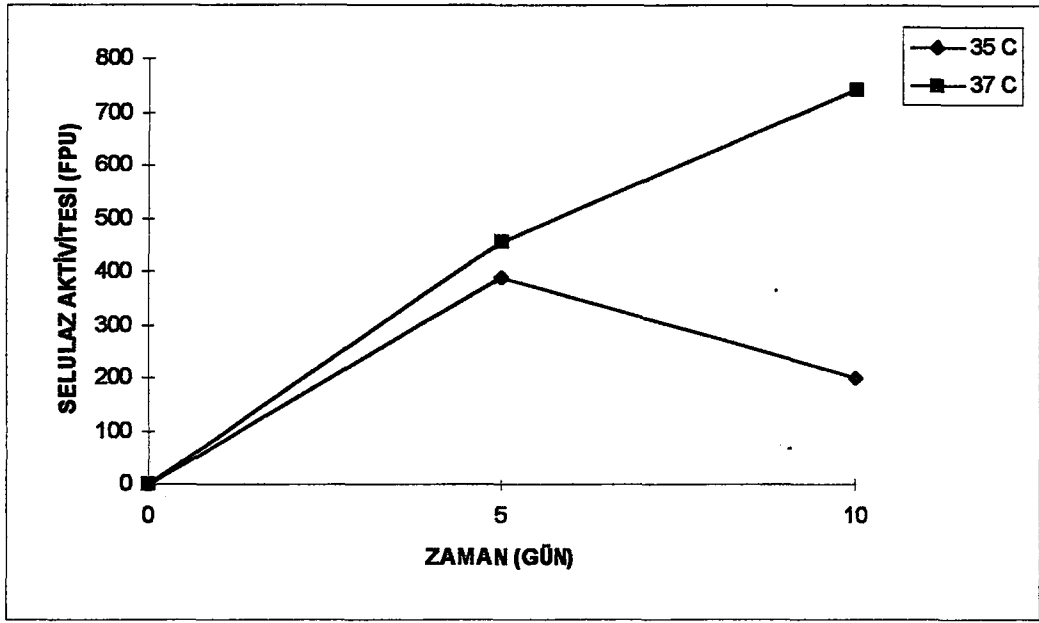
Funalia trogii ile pH=6.0'da, 35°C ve 37°C yapılan çalışmalarda 5 günlük inkübasyon sonunda enzim aktiviteleri sırasıyla 390 ve 457 FPU olarak bulunmuştur. Aynı pH ve sıcaklıklarda, 10 günlük inkübasyon sonunda selulaz aktiviteleri sırasıyla 200 ve 745 FPU olarak tespit edilmiştir ve Şekil 3.15'da gösterilmiştir.



Şekil 3. 13. *Funalia troglia*'nin Selulaz Aktivitesine Günlere Bağlı Olarak Sıcaklığın Etkisi (pH=4.0)



Şekil 3. 14. *Funalia troglia*'nin Selulaz Aktivitesine Günlere Bağlı Olarak Sıcaklığın Etkisi (pH=5.0)

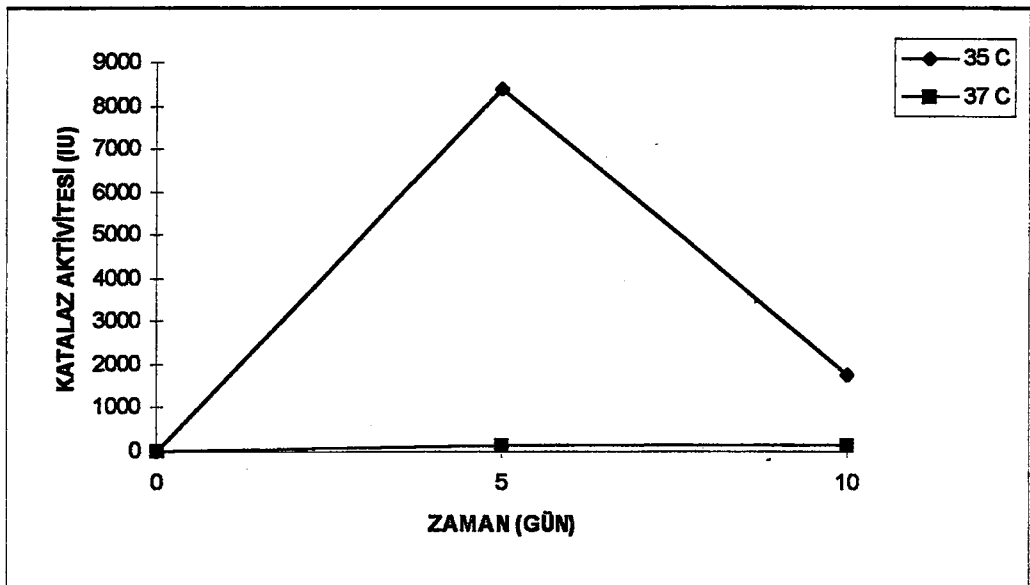


Şekil 3. 15. *Funalia trogii*'nin Selulaz Aktivitesine Günlere Bağlı Olarak Sıcaklığın Etkisi (pH=6.0)

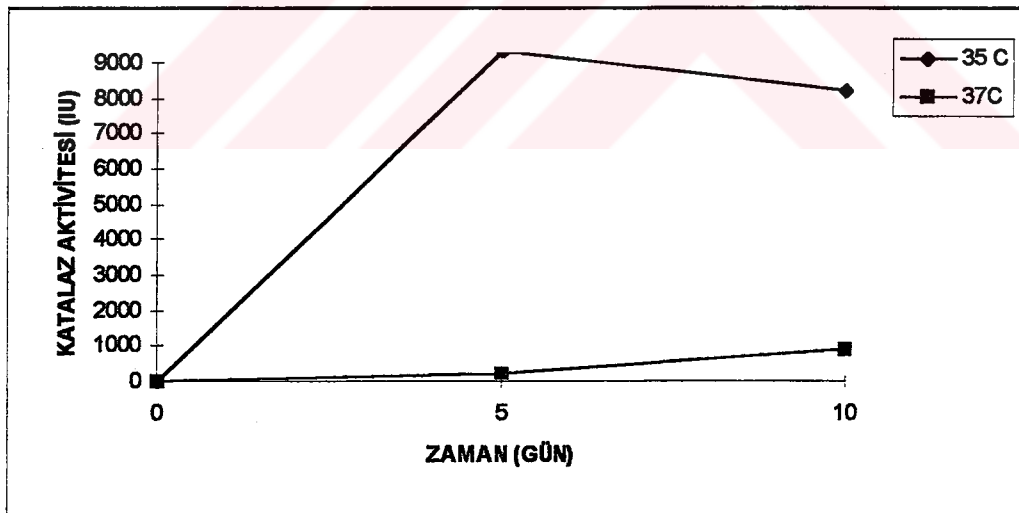
3. 6. 1. 2. Sıcaklığın *Funalia trogii*'nin Katalaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Üç farklı pH değerinde çalışılan fungusun günlere bağlı olarak katalaz enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi Şekil 3. 16' de (pH=4.0 için), Şekil 3. 17' de (pH=5.0 için), Şekil 3. 18' de (pH=6.0 için) verilmiştir.

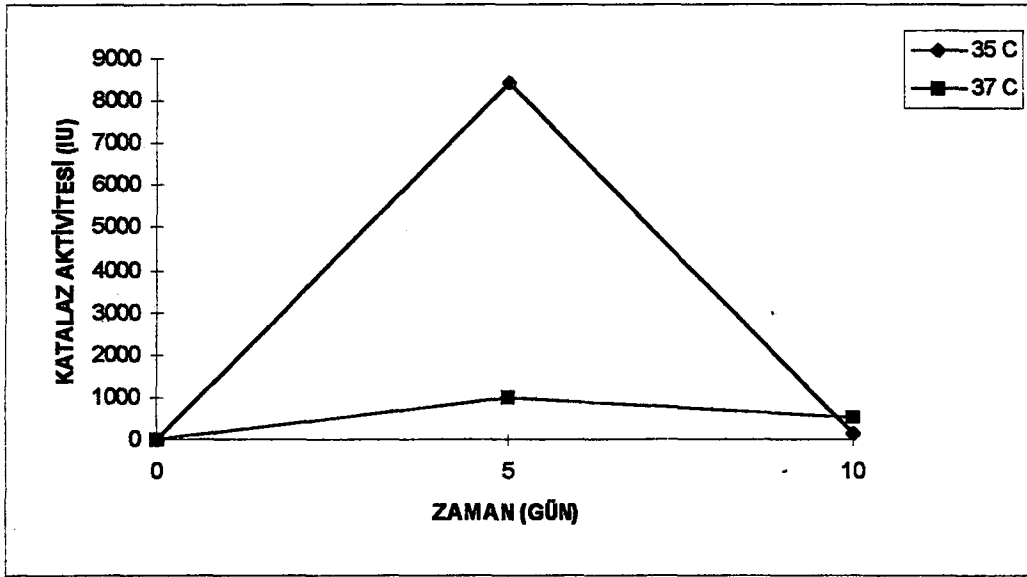
pH=4.0 ve sıcaklık 35°C iken inkübasyonun 5. gününde *Funalia trogii*'nin katalaz aktivitesi 8410 IU olarak bulunmuştur. Aynı zaman periyodunda 37°C'de katalaz aktivitesi 135 IU'e düşmüştür. İnkübasyonun 10. gününde ise 35°C'de enzim aktivitesi 1770 IU olarak tespit edilmişken, Şekil 3.16'da belirtildiği üzere 37°C'de ise 135IU'e düştüğü görülmektedir. Şekil 3.17'de pH=5.0'de, 35°C ve 37°C sıcaklıkta yapılan çalışmalarda 5 günlük inkübasyon sonunda enzim aktiviteleri sırasıyla 9320 ve 240 IU olarak bulunmuştur. Aynı pH ve sıcaklıklarda, 10 günlük inkübasyon sonunda katalaz aktiviteleri sırasıyla 8220 ve 885 IU olarak tespit edilmiştir. *Funalia trogii* ile pH=6.0'da, 35°C ve 37°C yapılan çalışmalarda 5 günlük inkübasyon sonunda enzim aktiviteleri sırasıyla 8440 ve 995 IU olarak bulunmuştur. Aynı pH ve sıcaklıklarda, 10 günlük inkübasyon sonunda katalaz aktiviteleri sırasıyla 125 ve 510 IU olarak tespit edilmiştir ve Şekil 3.18'de verilmiştir.



Şekil 3. 16. *Funalia trogii*'nin Katalaz Aktivitesine Günlere Bağlı Olarak Sıcaklığın Etkisi (pH=4.0)



Şekil 3. 17. *Funalia trogii*'nin Katalaz Aktivitesine Günlere Bağlı Olarak Sıcaklığın Etkisi (pH=5.0)

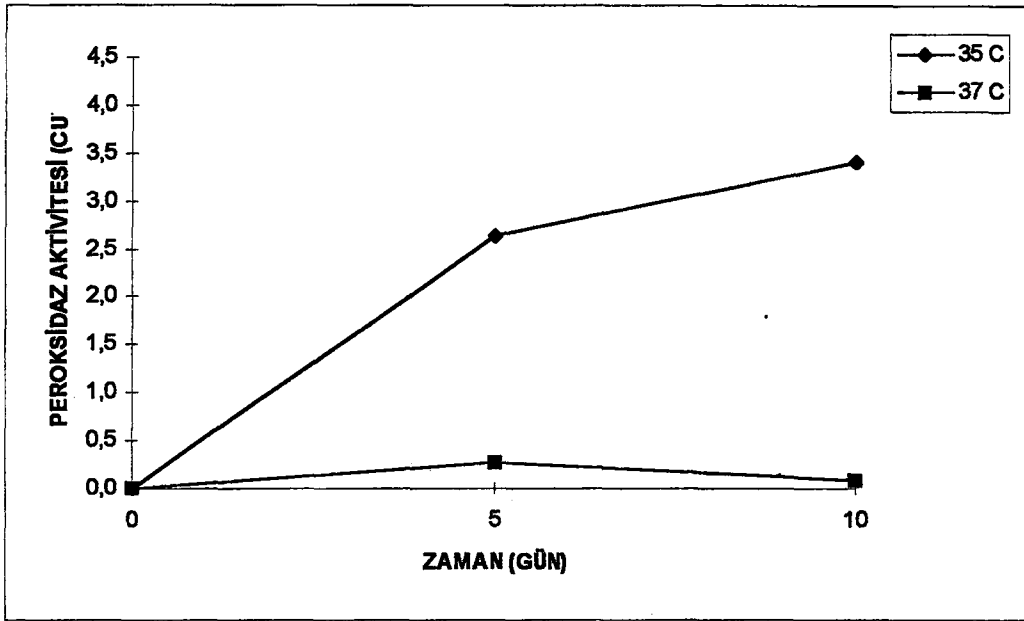


Şekil 3. 18. *Funalia trogii*'nin Katalaz Aktivitesine Günlere Bağlı Olarak Sıcaklığın Etkisi (pH=6.0)

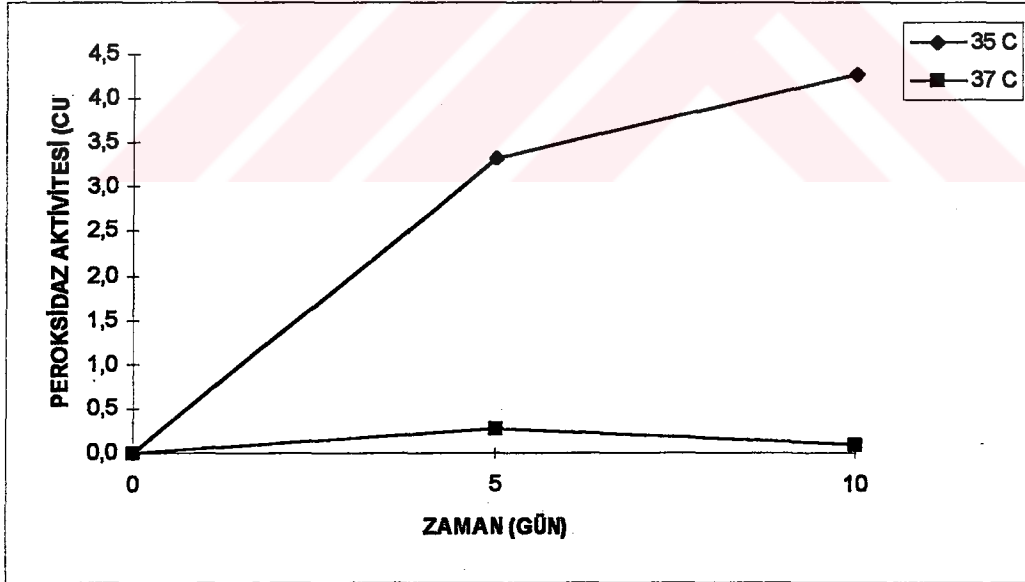
3. 6. 1. 3. Sıcaklığın *Funalia trogii*'nin Peroksidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Üç farklı pH değerinde çalışılan fungusun günlere bağlı olarak peroksidaz enzim aktivitelere sıcaklığın etkisi Şekil 3. 19' da (pH=4.0 için), Şekil 3. 20' de (pH=5.0 için), Şekil 3. 21' de (pH=6.0 için) verilmiştir.

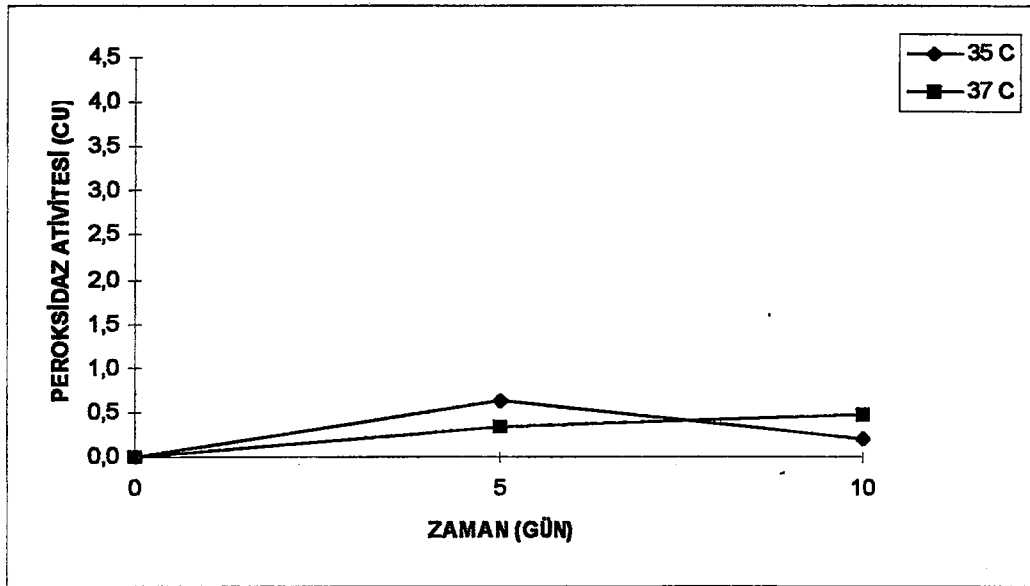
pH=4.0 ve sıcaklık 35°C iken inkübasyonun 5. gününde *Funalia trogii*'nin peroksidaz aktivitesi 2.63 CU olarak bulunmuştur. Aynı zaman periyodunda 37°C'de selulaz aktivitesi 0.28 CU'e düşmüştür. Inkübasyonun 10. gününde ise 35°C'de enzim aktivitesi 3.41 CU olarak tespit edilmişken, 37°C'de ise 0.09 CU'e düştüğü Şekil 3. 19' de görülmektedir. pH=5'de, 35°C ve 37°C sıcaklıkta yapılan çalışmalarda 5 günlük inkübasyon sonunda enzim aktiviteyi sırasıyla 3.33 ve 0.27 CU olarak bulunmuştur. Aynı pH ve sıcaklıklarda, 10 günlük inkübasyon sonunda peroksidaz aktiviteyi sırasıyla 4.27 ve 0.27 CU olarak tespit edilmiştir ve Şekil 3. 20' de verilmiştir. *Funalia trogii* ile pH=6.0'da, 35°C ve 37°C yapılan çalışmalarda 5 günlük inkübasyon sonunda enzim aktiviteyi sırasıyla 0.63 ve 0.35 CU olarak bulunmuştur. Aynı pH ve sıcaklıklarda, 10 günlük inkübasyon sonunda peroksidaz aktiviteyi 0.21 ve 0.47 CU olarak tespit edilmiştir.



Şekil 3. 19. *Funalia trogii*'nin Peroksidaz Aktivitesine Günlere Bağlı Olarak Sıcaklığın Etkisi (pH=4.0)



Şekil 3. 20. *Funalia trogii*'nin Peroksidaz Aktivitesine Günlere Bağlı Olarak Sıcaklığın Etkisi (pH=5.0)

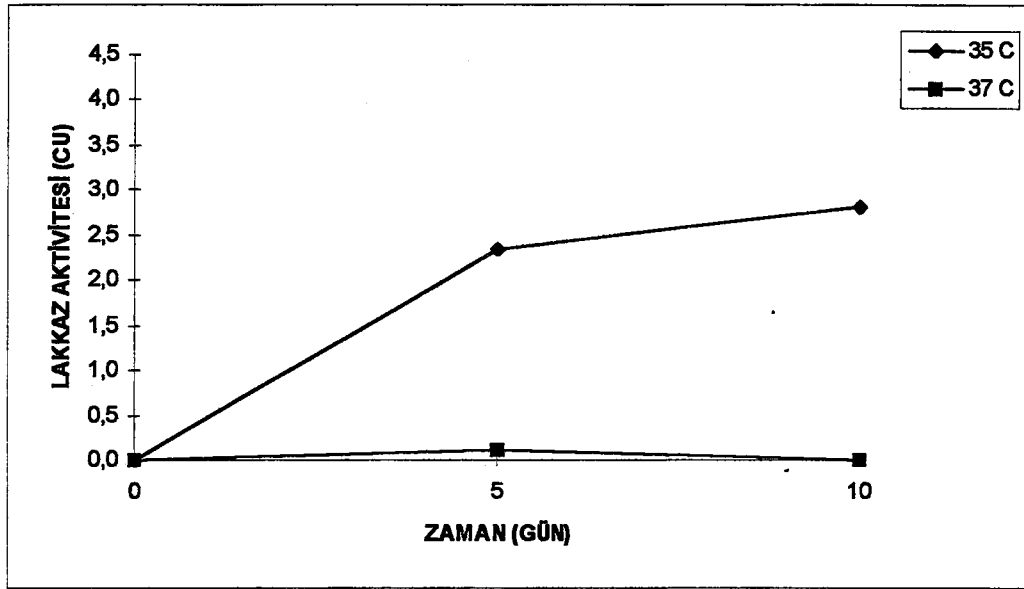


Şekil 3. 21. *Funalia trogii*'nin Peroksidaz Aktivitesine Günlere Bağlı Olarak Sıcaklığın Etkisi (pH=6.0)

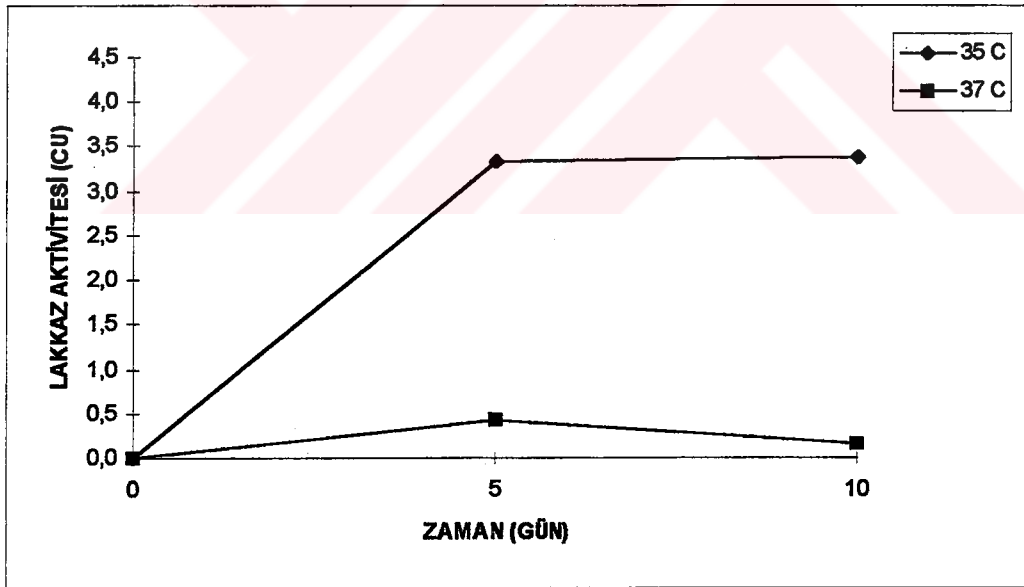
3. 6. 1. 4. Sıcaklığın *Funalia trogii*'nin Lakkaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Üç farklı pH değerinde çalışılan fungusun günlere bağlı olarak lakkaz enzim aktivitelerine sıcaklığın etkisi Şekil 3. 22' de (pH=4.0 için), Şekil 3. 23' de (pH=5.0 için), Şekil 3. 24' de (pH=6.0 için) verilmiştir.

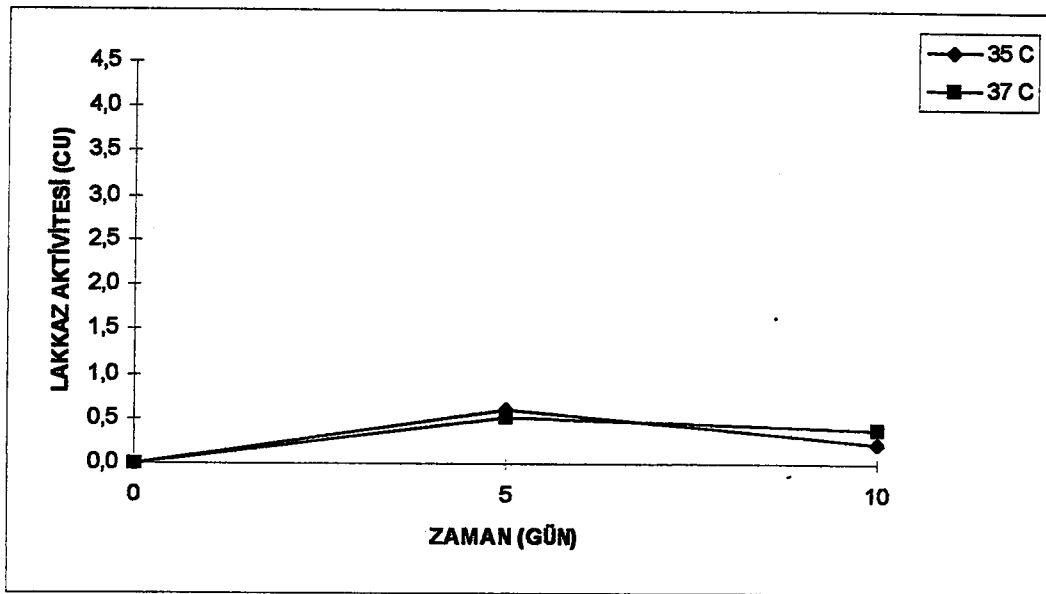
pH=4.0 ve sıcaklık 35°C iken inkübasyonun 5. gününde *Funalia trogii*'nin lakkaz aktivitesi 2.34 CU olarak bulunmuştur. Aynı zaman periyodunda 37°C'de selulaz aktivitesi 0.12 CU'e düşmüştür. Inkübasyonun 10. gününde ise 35°C'de enzim aktivitesi 2.81 CU olarak tespit edilmişken, Şekil 3. 22' de belirtildiği üzere 37°C'de ise tamamen düştüğü görülmektedir. Şekil 3. 23' de görüldüğü üzere pH=5.0'de, 35°C ve 37°C sıcaklıkta yapılan çalışmalarda 5 günlük inkübasyon sonunda enzim aktiviteleri sırasıyla 3.34 ve 0.42 CU olarak bulunmuştur. Aynı pH ve sıcaklıklarda, 10 günlük inkübasyon sonunda lakkaz aktiviteleri sırasıyla 3.37 ve 0.15 CU olarak tespit edilmiştir. *Funalia trogii* ile pH=6.0'da, 35°C ve 37°C yapılan çalışmalarda 5 günlük inkübasyon sonunda enzim aktiviteleri Şekil 3. 24'de görüldüğü gibi sırasıyla 0.60 ve 0.52 CU olarak bulunmuştur. Aynı pH ve sıcaklıklarda, 10 günlük inkübasyon sonunda katalaz aktiviteleri sırasıyla 0.23 ve 0.39 CU olarak tespit edilmiştir.



Şekil 3. 22. *Funalia trogii*'nin Lakkaz Aktivitesine Günlere Bağlı Olarak Sıcaklığın Etkisi (pH=4.0)



Şekil 3. 23. *Funalia trogii*'nin Lakkaz Aktivitesine Günlere Bağlı Olarak Sıcaklığın Etkisi (pH=5.0)



Şekil 3. 24. *Funalia trogii*'nin Lakkaz Aktivitesine Günlere Bağlı Olarak Sıcaklığın Etkisi (pH=6.0)

3. 6. 2. Sıcaklığın *Phanerochaete chrysosporium* ME446'nın Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisi

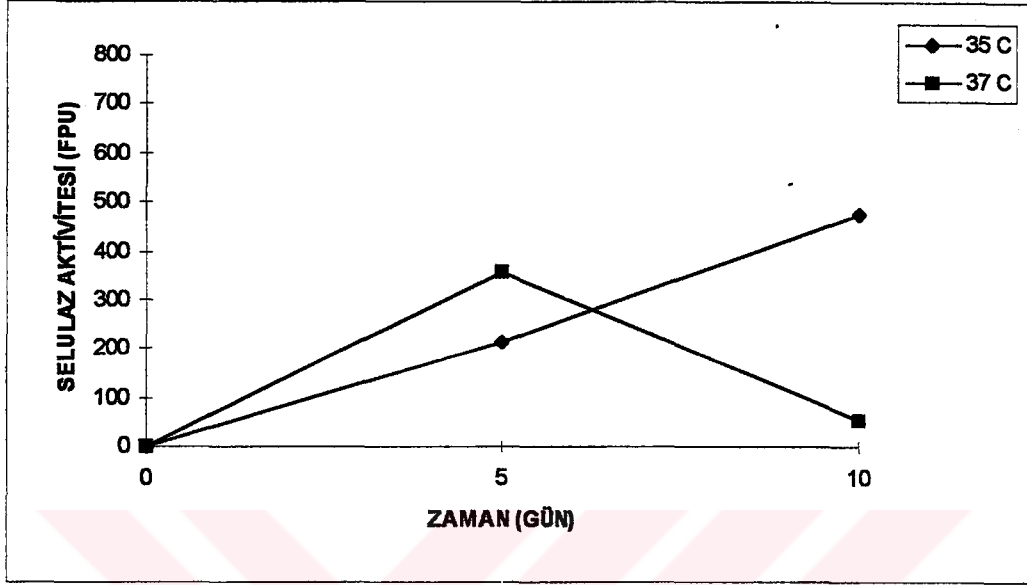
3. 6. 2. 1. Sıcaklığın *Phanerochaete chrysosporium* ME446'nın Selulaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Üç farklı pH değerinde çalışılan fungusun günlere bağlı olarak selulaz enzim aktivitelerine sıcaklığın etkisi Şekil 3. 25' de (pH=4.0 için), Şekil 3. 26' da (pH=5.0 için), Şekil 3. 27' de (pH=6.0 için) verilmiştir.

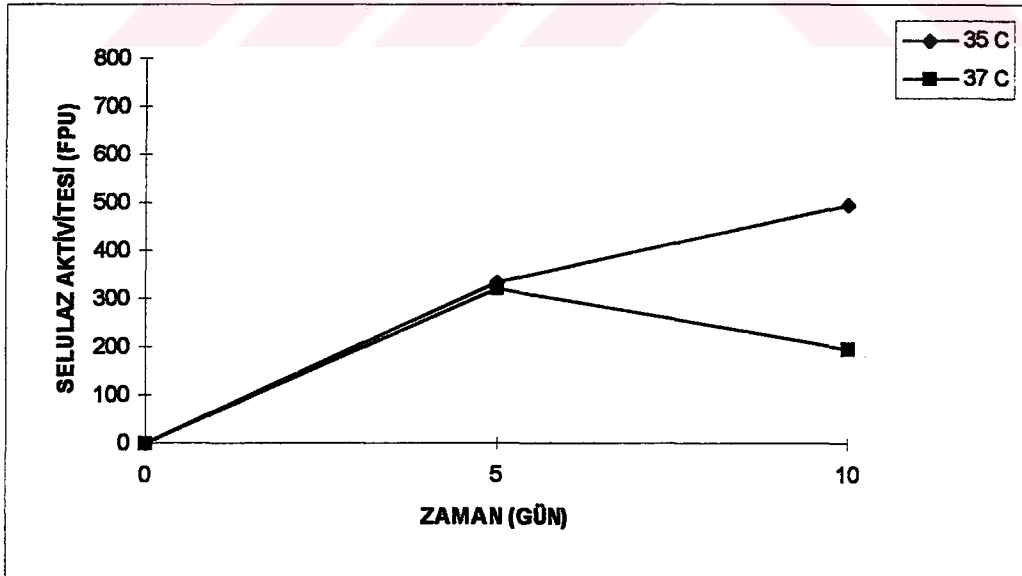
Şekil 3. 25'de görüldüğü gibi inkübasyonun 5. gününde pH=4.0'de ve 35°C'de *Phanerochaete chrysosporium* ME446'nın selulaz aktivitesi 212 FPU iken, aynı zaman peryodunda ve pH değerinde, 37°C'de selulaz aktivitesi 474 FPU'e yükselmiştir. İnkübasyonun 10. gününde ise 35°C'de enzim aktivitesi 358 FPU olarak tespit edilmişken, 37°C'de ise 52 FPU'e düştüğü gözlenmiştir.

pH=5.0'de, 35°C ve 37°C sıcaklıkta yapılan çalışmalarda 5 günlük inkübasyon sonunda enzim aktiviteleri sırasıyla 334 ve 321 FPU olarak bulunduğu Şekil 3. 26' de görülmektedir. Aynı pH ve sıcaklıklarda, 10 günlük inkübasyon sonunda selulaz aktiviteleri sırasıyla 497 ve 196 FPU olarak tespit edilmiştir.

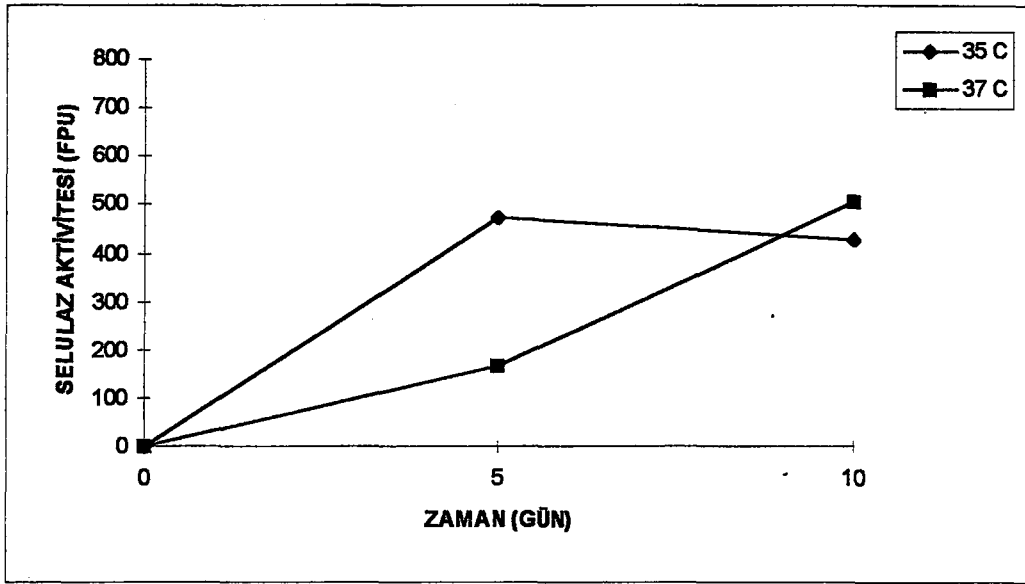
Phanerochaete chrysosporium ME446 ile pH=6.0'da, 35°C ve 37°C yapılan çalışmalarda 5 günlük inkübasyon sonunda enzim aktiviteleri sırasıyla 474 ve 165 FPU olarak bulunmuştur. Aynı pH ve sıcaklıklarda, 10 günlük inkübasyon sonunda selulaz aktiviteleri sırasıyla 425 ve 507 FPU olarak Şekil 3. 27' de verilmiştir.



Şekil 3. 25. *Phanerochaete chrysosporium* ME446'nın Selulaz Aktivitesine Günlere Bağlı Olarak Sıcaklığın Etkisi (pH=4.0)



Şekil 3. 26. *Phanerochaete chrysosporium* ME446'nın Selulaz Aktivitesine Günlere Bağlı Olarak Sıcaklığın Etkisi (pH=5.0)



Şekil 3. 27. *Phanerochaete chrysosporium ME446*'nın Selulaz Aktivitesine Günlere Bağlı Olarak Sıcaklığın Etkisi (pH=6.0)

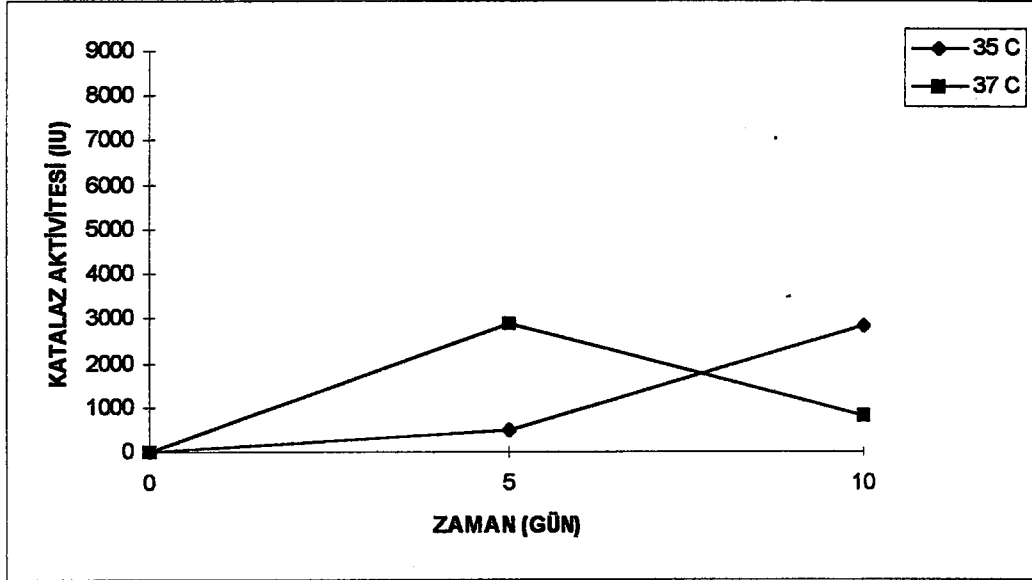
3. 6. 2. 2. Sıcaklığın *Phanerochaete chrysosporium ME446*'nın Katalaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Üç farklı pH değerinde çalışılan fungusun günlere bağlı olarak katalaz enzim aktivitelerine sıcaklığın etkisi Şekil 3. 28'de (pH=4.0 için), Şekil 3. 29' da (pH=5.0 için), Şekil 3. 30' da (pH=6.0 için) verilmiştir.

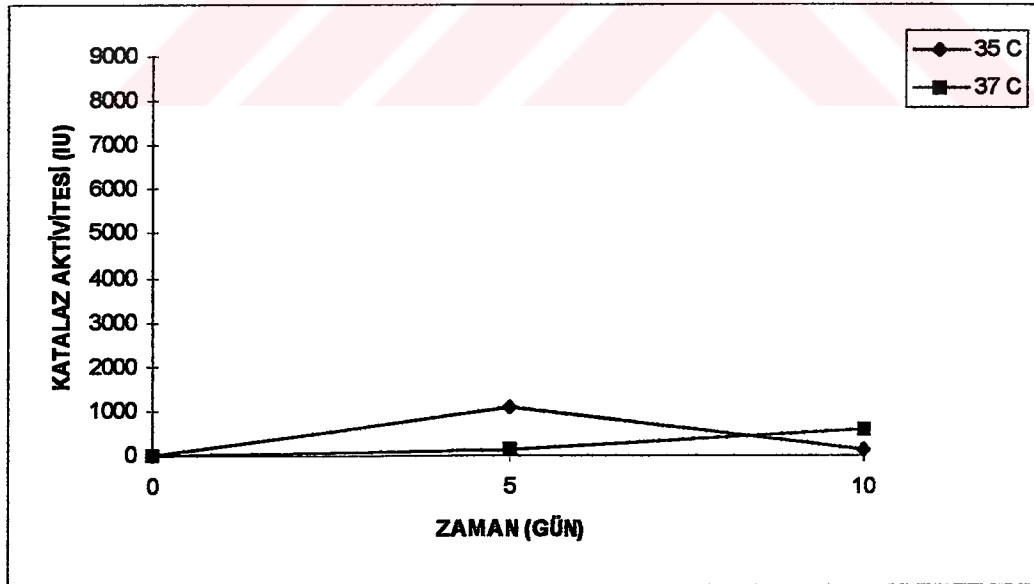
İnkübasyonun 5. gününde pH=4.0'de ve 35°C'de inkübe edilen *Phanerochaete chrysosporium ME446*'nın katalaz aktivitesi 480 IU iken, aynı zaman periyodunda ve pH değerinde, 37°C'de katalaz aktivitesi 2865 IU'e yükseldiği Şekil 3. 28'de görülmektedir. İnkübasyonun 10. gününde ise 35°C'de enzim aktivitesi 2835 IU olarak tespit edilmişken, 37°C'de ise 820 IU'e düştüğü gözlenmiştir.

pH=5.0'de, 35°C ve 37°C sıcaklıkta *Phanerochaete chrysosporium ME446* ile yapılan çalışmalarda 5 günlük inkübasyon sonunda enzim aktiviteyi sırasıyla 1065 ve 115 IU olarak Şekil 3. 29' da görülmektedir. Aynı pH ve sıcaklıklarda, 10 günlük inkübasyon sonunda katalaz aktiviteyi sırasıyla 135 ve 595 IU olarak tespit edilmiştir. *Phanerochaete chrysosporium ME446* ile pH=6.0'da, 35°C ve 37°C yapılan çalışmalarda 5 günlük inkübasyon sonunda enzim aktiviteyi sırasıyla

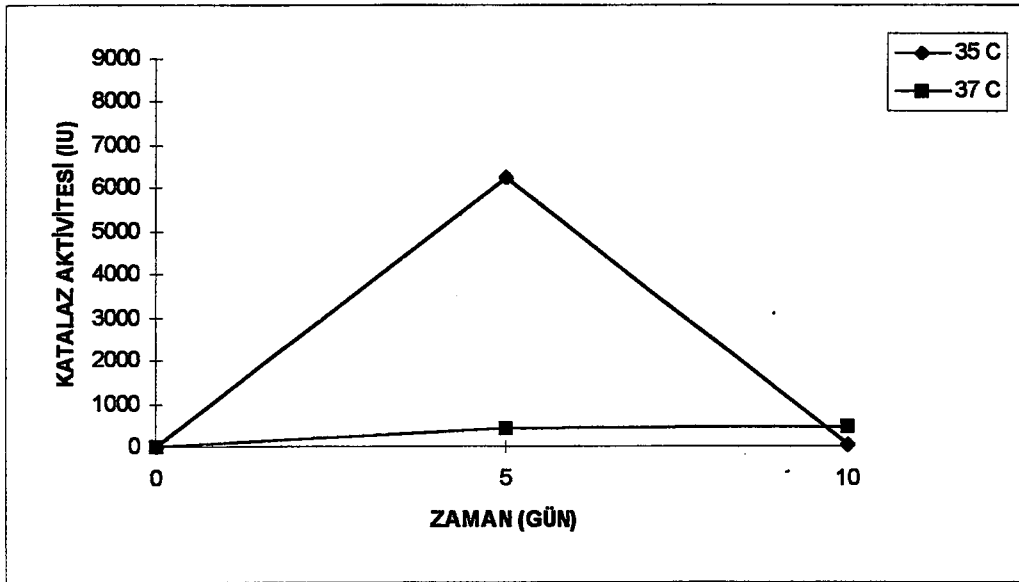
6240 ve 485 IU olarak bulunmuştur. Aynı pH ve sıcaklıklarda, 10 günlük inkübasyon sonunda katalaz aktiviteleri 60 ve 440 IU olarak tespit edilmiştir ve Şekil 3. 30' da verilmiştir.



Şekil 3. 28. *Phanerochaete chrysosporium* ME644'nin Katalaz Aktivitesine Günlere Bağlı Olarak Sıcaklığın Etkisi (pH=4.0)



Şekil 3. 29. *Phanerochaete chrysosporium* ME446'nin Katalaz Aktivitesine Günlere Bağlı Olarak Sıcaklığın Etkisi (pH=5.0)



Şekil 3. 30. *Phanerochaete chrysosporium ME446*'nın Katalaz Aktivitesine Günlere Bağlı Olarak Sıcaklığın Etkisi (pH=6.0)

3. 7. Yarı-katı Fermentasyonla Üretilen *Phanerochaete chrysosporium ME446*'nın Katalaz Aktivitesinin Titrimetrik Yöntemle Saptanan Aktivitesi

OR-BA Biyokimya Sanayii Şirketinin Araştırma ve Geliştirme Laboratuvarlarında sunduğu imkanlarla yaptığımız çalışmada *Phanerochaete chrysosporium ME446*'nın katalaz üretimi inkübasyon sıcaklığının 39°C ve pH'nın 5 olduğu koşullardagerçekleştirilmiştir.Elde edilen enzim örneğini Bactosol ve Lyven adlı iki ticari enzimle karşılaştırılmıştır. Enzim örneğimizi 1000 kez seyrelttiğimiz takdirde yarı-ömrü yakalayabildiğimizi saptadık. Bactosol adlı ticari enzimi 1000 kez seyrelttiğimiz takdirde yarı-ömrü yakalarken, Lyven adlı ticari enzimin, *Phanerochaete chrysosporium ME446*'dan elde ettiğimiz enzim örneğinden 5 kat daha aktif olduğunu saptandı.

Çizelge 3. 5. Katalaz Enzim Örneğinin Yarı-Ömrü

ENZİMİN SEYRELTME ORANI (mL)	KÖR İÇİN HARCANAN KMnO ₄ MİKTARI	ENZİMLE MUAMELE EDİLDİĞİNDE HARCANAN KMnO ₄ MİKTARI	ENZİMİN UZAKLAŞTIRDIĞI H ₂ O ₂ MİKTARI (mg)
1/100	13.3 mL	0.30 mL	5.52 mg
1/500	12.7 mL	1.60 mL	4.71 mg
1/1000	12.6 mL	5.60 mL	2.97 mg
1/2000	12.9 mL	8.60 mL	1.82 mg

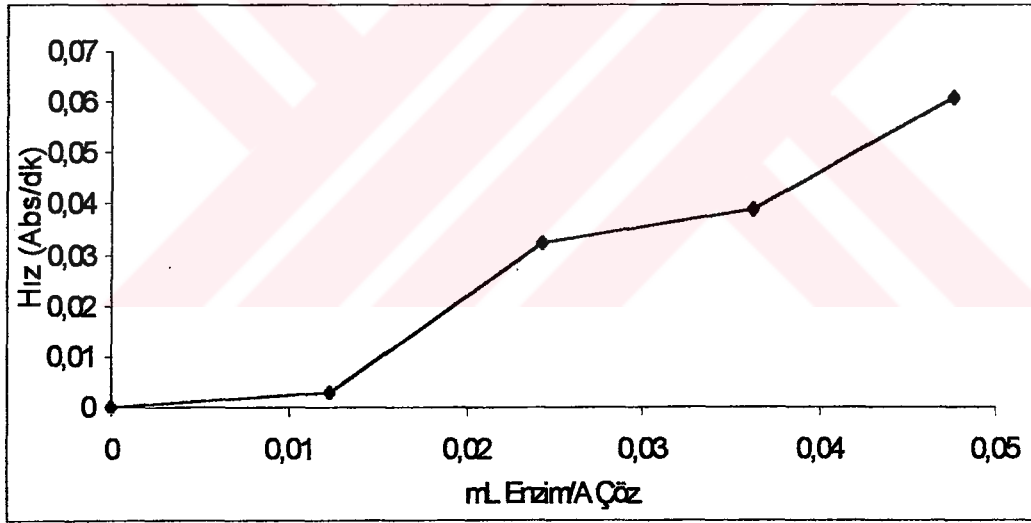
Çizelge 3. 5. ve 3. 6'da görülen değerlere bakılarak elde ettiğimiz enziminin aktivitesinin, Bactosol isimli ticari enzime yakın olduğu söylenebilmektedir. Ancak Kenzim isimli ticari enzim yaklaşıklık olarak en az 7 misli fazla aktivite göstermektedir.

Çizelge 3. 6. Katalaz Enzim Örneklerinin Yarı- Ömrü

Enzimin Adı	ENZİMİN SEYRELTME ORANI (mL)	KÖR İÇİN HARCANAN KMnO ₄ MİKTARI	ENZİMLE MUAMELE EDİLDİĞİNDE HARCANAN KMnO ₄ MİKTARI	ENZİMİN UZAKLAŞTIRD IĞI H ₂ O ₂ MİKTARI (mg)
Bactosol	1/1000	11.8	7.7	1.74 mg
Kenzim	1/7000	25.1	12.4	5.39 mg

3. 8. Hans Lück Yönteminde Substrat İnhibisyon Deneyi

Hans Lück yöntemi kullanırken, enzim örneklerimizin substrat inhibisyonuna maruz kalıp kalmadığını saptamak amacıyla, analiz esnasında normal ölçüm şartlarında kullandığımız 60 μ L 'lik enzim kaynağı yerine 30, 60, 90 ve 120 μ L'lik enzim kaynakları kullanarak spektrofotometrik ölçümü gerçekleştirdik. *Phanerochaete chrysosporium* ME 446 ile (35 ° C ve pH= 5.0) yaptığımız çalışmanın 5. gününde elde ettiğimiz enzim kaynağını kullandığımızda sırasıyla 0.006, 0.065, 0.078 ve 0.122 absorbans azalışları elde ettik. Bu absorbans azalışları 18, 20, 234 ve 365 IU katalaz aktivitesine karşılık gelmektedir. Kullanılan enzim kaynağı miktarına karşılık optik yoğunlukaki azalış Şekil 3. 31' de verilmektedir.



Şekil 3. 31. Kullanılan Katalaz Enzimi Kaynağına Karşılık Substrat Absorbansındaki Azalış

3. 9. Kültür ile Besiyerinde Elde Edilen Amino Asitler ve Dağılımları

pH'sı 6.0 ve sıcaklığı 35° C olan besiyerinde 5 günlük inkübasyon sonunda üretilen *Phanerochaete chrysosporium ME446*'nın ve pH'sı 5.0 ve sıcaklığı 35° C olan besiyerinde 5 günlük inkübasyon sonunda üretilen *Funalia trogii*'nin amino asit dağıılımı **Çizelge 3. 7**'de grlmektedir.

Phanerochaete chrysosporium ME446 ve *Funalia trogii* beyaz-çürükçül fungusları ile tarımsal atık içerikli besiyerinin **Çizelge 3. 7**'de görüldüğü üzere amino asit içeriği açısından zenginleştirildiği grlmektedir. *Funalia trogii* ile yapılan çalışmada zenginleştirilmenin daha fazla olduğu grlmektedir.

Çizelge 3. 7. *Phanerochaete chrysosporium* ME446 ve *Funalia trogii*'nin Tarımsal Atık İçerikli Besiyeri ile Beraber İçerdikleri Amino Asit Çeşitleri ve Miktarları

AMİNO ASİTLER	BESİYERİ (mg aa/mg örnek)	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> ME446 + BESİYERİ (mg aa/mg örnek)	<i>Funalia trogii</i> + BESİYERİ (mg aa/mg örnek)
Aspartik asit	0.006	0.010	0.009
Tirozin	0.003	0.004	0.004
Serin	0.003	0.007	0.004
Glutamik asit	0.018	0.013	0.015
Glisin	0.003	0.005	0.004
Alanin	0.003	0.007	0.004
Sistin	0.0008	0.0006	0.0008
Valin	0.003	0.003	0.003
Metyonin	0.0006	0.0009	0.0008
İsolosin	0.002	0.003	0.003
Lösin	0.005	0.005	0.007
Treonin	0.340	0.245	0.200
Fenil-Alanin	0.003	0.003	0.003
Histidin	0.002	0.003	0.003
Lizin	0.003	0.003	0.004
NH ₄	0.011	0.025	0.017
Prolin	—	—	0.0006
Arjinin	0.007	0.005	0.006
Toplam	0.0850	0.0897	0.0922

4. TARTIŞMA

Phanerochaete chrysosporium ME446 ve *Funalia trogii* funguslarının, lignoselulotik hücre dışı enzim sistemleri nedeniyle kullanıldığı bu çalışmada, yarı-katı fermentasyon tekniği kullanılarak endüstriyel değeri olan katalaz, selulaz, peroksidaz ve lakkaz enzimlerinin üretimi araştırılmıştır. Besiyeri olarak kullanılan lignoseluloz içerikli tarımsal atıkların da enzim üretiminde kullanılarak ise ticari meta olarak değerlendirilmesi sağlanmıştır. Çalışmalarda kullanılan besiyerleri daha önce Bölüm 2. 3. 1’de belirtildiği üzere lignoseluloz içerikli tarımsal artıklar ile hazırlanmıştır. Besiyerinin içeriğini oluşturan çığit, arpa kırığı, kaba kepek ve soya unu beyaz-çürükçül fungusların yaşamını sürdürebilmeleri için gerekli olan karbonhidratları ve proteinleri sağlarken, nemlendirme amacıyla Stok Basal Besiyeri kullanılmıştır. SBM’nin içeriğini oluşturan maddeler ise fungusların canlılığını koruyabilmesi için gerekli mineralleri sağlamıştır.

35°C ve 37°C olmak üzere iki farklı sıcaklık ve 4.0, 5.0 ve 6.0 olmak üzere üç farklı pH uygulanarak çalışılan yarı-katı fermentasyon ile tekstil sanayiinde son yıllarda yaygın olarak kullanılan enzimlerin laboratuvar ölçeğinde üretimi ve pilot ölçekte üretim için gerekli optimum ortam koşulları saptanmaya çalışılmıştır. Diğer pH değerlerinin denenmemesinin nedeni çalışılacak olan enzimlerin bu pH sınırları içinde çalıştıklarının bilinmesindendir [66, 44]. Kullanmış olduğumuz 4.0 ve 5.0 olan pH değerlerinde beyaz-çürükçül fungusların iyi üreme gösterdikleri Reid (1989)’da tarafından daha önce rapor edilmiştir [53]. Öner, (1986)’da ise fungusların genellikle asidik ortamları sevdiğini ve optimum isteklerinin pH 5.0 ve 6.0 arasında değiştiğini rapor etmiştir [47]. Bizim çalışmamızda kullanmak üzere seçtiğimiz pH değerleri Reid (1989) ve Öner (1986) ile uyum içerisindedir.

Faison ve Kirk (1984), Ünyayar ve ark. (1990), *Phanerochaete chrysosporium* ME446 ile yaptıkları çalışmada inkübasyon sıcaklığı 39°C’e olarak seçerlerken, Kay-Shoemake ve Watwood (1996) ve Habu ve ark. (1997) aynı fungus ile yaptıkları çalışmada, bizim çalışmamızda olduğu gibi inkübasyon sıcaklığını 37°C olarak belirlemişlerdir, Şık ve Ünyayar (1998)’de, *Phanerochaete chrysosporium* ME446 ve *Funalia trogii* beyaz çürükçül fungusları ile lignin yıkımına bağlı olarak lignoseluloz parçalama aktivitelerini yarı-katı fermentasyon

tekniklerini kullanarak ile araştırdıkları çalışmada inkübasyon sıcaklığını 30° C olarak almışlardır [19, 67, 31, 26, 63].

Reid, (1989)'da biyolojik parçalanmaya sıcaklığının etkisi ve etki oranının fungustan fungusa değiştiğini rapor etmiştir. Beyaz-çürükçül fungusların çoğu için optimum sıcaklık 15 ve 35°C arasında olduğu rapor edilirken sadece çok az bir kısmının termofilik olduğu ve *Phanerochaete chrysosporium* ME446 'nın da termofilik gruba dahil olduğu rapor edilmiştir [53].

Şık ve Ünyayar'ın (1998)'deki çalışmasında substrat olarak pamuk sapı kullanılmış ve 30° C inkübasyon sıcaklığında *Phanerochaete chrysosporium* ME446 'un maksimum selulaz aktivitesi 12. günde, besiyerine glukoz ilave edildiği takdirde 11.5 FPU olarak elde edilmiştir, glukoz içermeyen ortamda ise 4. günde 5.6 FPU olarak tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda kullandığımız besiyerinin içeriği enzim üretimi açısından çok daha avantajlı gözükmemektedir. Kullandığımız besiyeri ile elde ettiğimiz maksimum selulaz aktivitesi Çizelge 3.1. 'de görüldüğü üzere, 37° C, pH 6.0'da 10. günde 745 FPU olarak saptanmıştır. *Phanerochaete chrysosporium* ME446 termofilik funguslar grubuna dahil olduğu için selulaz enzim aktivitesinin üzerinde sıcaklığında etkisi olabileceğini söyleyebiliriz.

Phanerochaete chrysosporium ME 446 fungusu aşılansarak yapılan çalışmada en yüksek selulaz aktivitesi pH= 6.0 ve 37°C 'deki ortamda 10. günlük inkübasyon periyodu sonunda 507 FPU olarak tespit edilmiştir. Ancak aynı inkübasyon sıcaklığında pH=4.0 iken 474 FPU enzim aktivitesi elde edilmiştir, bu aktivite *Phanerochaete chrysosporium* ME 446 ile elde edilen maksimum enzim aktivitesine oldukça yakındır. pH=6.0'da, 35°C'de 5. günde 474 FPU'lik aynı aktivite sağlanabildiğinden ötürü selulaz enzimi üretimi için *Phanerochaete chrysosporium* ME 446'nın kullanılması durumunda pH'nın 6.0 ve sıcaklığın 35°C olduğu koşullarda üretimi seçilmelidir çünkü sıcaklık ve zaman açısından avantaj sağlamaktadır.

Persson ve ark. (1991)'de, yarı-katı fermentasyon ile değişik fungusların kullanıldığı selulolitik enzim üretiminde lignoselulozik maddeler substrat olarak kullanıldığı takdirde adsorbsiyon olasılığı nedeniyle tespit edilen enzim aktivitelerinin aslında varolan enzim aktivitesinden daha az olacağına dikkat çekmiştir. Ayrıca Natick Laboratuvarlarında, Mass, USA yapılan deneylerde fermentör kullanıldığı takdirde FPU enzim aktivitelerinin iki katına çıktığı rapor

edilmiştir. Besiyesinde üretim yöntemi gözönüne alındığında *Trichoderma reesei* QM 6a ile yapılan bir çalışmada 15 FPU enzim aktivitesinin aslında 30 FPU'lik bir enzim aktivitesini ifade ettiği bildirilmiştir [50].

Correa ve Tengerdy'nin (1998)'de yaptıkları çalışmada, bizim çalışmamızda kullandığımız besiyerinde olduğu gibi lignoselulozik maddeleri substrat olarak kullanmışlardır. Besiyesinde substrat olarak şeker kamışı kullanılırken , bunun yanı sıra nitrojen kaynağı olarak soya unu kullanılmıştır. *Trichoderma reesei* ve *Aspergillus niger*' in ekildiği besiyerleri 72 saat, 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra da yarı-katı fermentasyon ile üretilen selulaz enzim aktiviteleri filter paper yöntemi ile saptanmıştır. Üç günlük inkübasyon periyodu sonunda *Trichoderma reesei*'den 540 FPU'lik selulaz aktivitesi elde edildiği saptanırken, *Aspergillus niger*'den 360 FPU selulaz aktivitesi saptanmıştır [10]. Correa ve Tengerdy'nin yaptıkları çalışma, bizim çalışmamız ile besiyeri içeriği ve inkübasyon sıcaklığı açısından benzerlik göstermektedir ve elde ettikleri selulaz enzim aktiviteleri, Şekil 3.1'de görüldüğü üzere bizim çalışmamızda, 35°C ve pH'nın 5.0 olduğu koşullarda 5. günde elde edilen 572 FPU'lik enzim aktivitesi ile benzerlik göstermektedir.

En çok kullanılan çözünebilir karbon kaynakları laktoz ve glukoz substrat olarak kullanıldığı zaman elde edilen selulaz aktivitesinin düşük olduğu saptanmıştır [50]. Bir beyaz-çürükçül fungus olan *Trichoderma reesei* CL-847 ile yapılan deneylerde bu karbon kaynakları substrat olarak kullanıldığı zaman en fazla elde edilen enzim aktivitesi 0.25-6.4 FPU mL⁻¹ iken, saf selulozdan çok az miktarlarda dahi besiyerine ilave edilmesi durumunda enzim aktivitesinin 10.5 mL⁻¹ FPU çıkmakta olduğu rapor edilmiştir

Ancak bunun yanında Bollok ve ark. (1997), *Trichoderma reesei* ve *Tichoderma viride* fungusları ile yaptıkları çalışmada söğüt odununu buharla ön muameleden geçirip, lignoselulozik kaynak olarak kullanmıştır. pH'sı 5.8-6.0 olan besiyeri, 30°C'de 7 gün süre ile inkübe edilmiş ve oldukça düşük 46.3 FPU, 21.6 FPU sonuçlarına ulaşabildiklerini rapor etmişlerdir [5].

Rajoka ve Malik, (1997)'de yürüttükleri çalışmada karbon kaynağı olarak, çalışmamızdaki besiyerinde olduğu gibi lignoselulozik maddeleri kullanmışlardır. Pamuk sapı, buğday samanı ve ot samanı içeren besiyerine kaynak mikroorganizma

olarak Cellulomonas biazotea aşılmiştir. Substrat olarak pamuk sapı kullanıldığı zaman 0.82 FPU, ot samanı kullanıldığı zaman 0.88 FPU ve buğday samanı kullanıldığı zaman 0.89 FPU selulaz enzim aktivitesine ulaşabilmiştir [51].

Persson ve ark., (1991), 60g/L arpa samanının substrat olarak kullanıldığı besiyerine ekilen Penicillium pinophilum'dan 5.8 FPU mL⁻¹'lik enzim aktivitesi saptandığı rapor etmişlerdir. Yukarıda bahsedilen örneklere de dayanarak selulolitik enzimlerin üretimi için beyaz-çürükçül fungusların, bakterilere göre daha avantajlı olduğu söylenebilir [50].

Phanerochaete chrysosporium ME 446 ve Funalia trogii ile yapılan çalışmalarda, katalaz enzimi üretimi için uygun koşulların; Phanerochaete chrysosporium ME 446 için pH'nın 6.0 ve sıcaklığın 35°C olması gerektiği; Funalia trogii için pH'nın 5.0 ve sıcaklığın 35°C olması gerektiği Çizelge 3. 2'de gösterildiği bulunmuş ve 5 günlük inkübasyon süresinin yeterli olabildiği saptanmıştır.

Bu koşullar altında Phanerochaete chrysosporium ME 446'un katalaz aktivitesinin 6240 IU olarak bulunduğu Şekil 3. 30'da görülmekte iken spesifik aktivitesi 129 IU/mg olarak hesaplanmıştır. Funalia trogii'nin katalaz aktivitesinin 9320 IU olduğu Şekil 3. 17'de görülmektedir ve spesifik aktivitesi 328 IU/mg olarak saptanmıştır.

Worthing biyokimya şirketi sığır ciğerinden elde ettikleri, katalaz enzimini filtre etme yöntemi ile yoğunlaştırarak ticari amaçla piyasaya sunmuşlardır. Katalaz enziminin elde ettikleri minimum aktiviteyi 180.000 IU olarak vermiştir. Bizim çalışmalarımızda elde ettiğimiz maksimum aktivite ile bu ticari enzim karşılaştırıldığı takdirde enzimatik aktivite çok düşük gibi görünse de, bu enzimin bir yoğunlaşma işleminden geçirildiğini göz ardı etmemek gerekmektedir. Yoğunlaştırma işlemi ise enerji yönünden hayli pahalı olan bir yöntemdir ve günümüzde bu yöntem hemen hiç kullanılmamaktadır. Günümüzde çağdaş olarak uygulanan yöntem ultrafiltrasyon yöntemidir [62].

OR-BA Biyokimya Sanayii Şirketinin Araştırma ve Geliştirme Labotatuvarlarında sunduğu imkanlarla yaptığımız çalışmada Funalia trogii'nin katalaz üretimi için optimum koşulları sağladıktan sonra elde ettiğimiz enzim örneğinin, Çizelge 3. 5. ve 3. 6'da görülen değerlere bakılarak katalaz aktivitesinin

Bactosol isimli ticari enzime yakın olduğu söylenebilmektedir. Ancak Kenzim isimli ticari enzim yakalşık olarak en az 7 misli fazla aktivite göstermektedir.

Phanerochaete chrysosporium ME 446 ile *Funalia trogii*'nin maksimum katalaz aktivitesi karşılaştırıldığında *Funalia trogii*'nin enzim aktivitesinin daha yüksek olduğu Çizelge 3. 2'den görölmektedir.

Bu iki fungusun selulaz enzimi ve katalaz enzimi için vardığımız sonuçlara bakılacak olursa, sonuçların birbiri ile paralel yürüdüğünü görmek mümkündür. *Funalia trogii* ile yarı-katı fermentasyon kullanılarak selulaz ve katalaz enzimlerinin her ikisinin de üretimi için pH'nın 5.0 ve sıcaklığın 35°C olduğu zaman optimum koşulların sağlandığı görölmektedir. *Phanerochaete chrysosporium* ME 446 'den üretilecek selulaz ve katalaz enzimlerinin herikisi içinde pH= 6.0 ve 35°C 'deki ortam 5 günlük inkübasyon periyodu koşullarının optimum olduğu görölmektedir.

Bu araştırmada, *Phanerochaete chrysosporium* ME446 ve *Funalia trogii*'nin fenoloksidaz enzimlerinin üretimide aynı koşullar altında çalışılmıştır. Ancak *Phanerochaete chrysosporium* ME446 ile yürütölen çalışmaların hiç birinde lakkaz ve peroksidaz enzim aktiviteleri ya ölçölememiş ya da değörlörlö sifıra yakın olduğu için dikkate alınmamıştır.

Lakkaz enziminin üretimi beyaz-çürökçöl funguslarda ortak bir özellik olmasına rağmen, lakkaz enziminden ziyade ligninolitik peroksidazlar çok daha fazla çalışmanın konusu olmaktadır. Buna neden olarak en çok çalışılan beyaz-çürökçöl funguslardan biri olan *Phanerochaete chrysosporium* ME446'nın ölçölebilir düzeyde lakkaz enzimi üretmemesine bağlanmaktadır [43].

Ander 1981 ve Eriksson 1978'de yaptıkları çalışmada *Phanerochaete chrysosporium* ME446 da fenoloksidaz (Lakkaz-peroksidaz) enzim aktivitesi gözlenemediğini rapor etmişlerdir. Bunun nedenini de fenoloksidaz aktivitesinin maskelenmesi ile açıklamışlardır [1].

Şık ve Ünyayar (1998)'de *Funalia trogii* ile yaptıkları çalışmada, lakkaz ve peroksidaz enzimlerinin sentezinin primer fazda başladığı, sekonder fazda sentezinin devam ettiğini rapor etmişlerdir [63].

Crawford ve Carwford, (1984)'de buna neden olarak lignin parçalayıcı sistemlerin, sadece primer üreme fazından sonra aktif olduğunu göstermişlerdir [14].

Çalışmamızda kullandığımız diğer beyaz-çürükçül fungus *Funalia trogii*'nin maksimum peroksidaz aktivitesinin pH=5.0 ve 35°C'de 10 günlük inkübasyon periyodu sonunda 4.27 CU olarak elde edilmiştir. *Funalia trogii* fungusunda maksimum enzim aktivitesinin elde edildiği koşullar altında ki inkübasyonun 10. gününün peroksidaz aktivitesi 5. günden daha yüksektir. Aynı şekilde, *Funalia trogii* fungusunun kullanıldığı diğer bir çalışmada pH=4 ve ortam sıcaklığının 35°C olduğu inkübasyon koşullarında 5. gün 2.63 CU enzim aktivitesi tespit edilmişken, 10. günde enzim aktivitesi 3.41 olarak saptandığı Çizelge 3. 3.'de görülmektedir.

Funalia trogii'nin maksimum lakkaz aktivitesinin de pH=5.0 ve 35°C'de 10 günlük inkübasyon periyodu sonunda 3.37 CU olarak elde edilirken aynı koşullar altında 5. günde 3.34 CU enzim aktivitesi saptanmıştır. Büyük ölçek üretimler için 5 günlük kısa üretim periyodunun tercihi daha avantajlı olacaktır. Aynı şekilde, *Funalia trogii* fungusunun kullanıldığı diğer bir çalışmada, Çizelge 3. 4.'de görüldüğü üzere, pH=4.0 ve ortam sıcaklığının 35°C olduğu inkübasyon koşullarında 5. gün 2.34 CU enzim aktivitesi tespit edilmişken, 10. günde enzim aktivitesi 2.81 olarak tarafımızdan saptanmıştır. Burada da 10. gündeki lakkaz aktivitelerinin 5. günden daha yüksek olarak bulunması, ligninolitik sistemin beyaz-çürükçül fungusların sekonder metabolik fazının bir faaliyeti olması ile uyumlu gözükmektedir.

Arora ve Sandhu (1985), bizim kullandığımız stok basal besiyerine oldukça benzeyen MgSO₄.7 H₂O, 0.2 g; NaNO₃, 0.1 g; KCl, 0.1g; Fe₂SO₄, 0.02g; CaNO₃, 0.05 g ve KH₂PO₄, 0.5 g ve 1litre distile su kullanarak hazırladıkları stok bazal besiyerine 10g İndülin AT ilave ederek kullanmışlardır. *Daedalea flavidia* beyaz-çürükçül fungus kültüründen ekim yaparak 10 günlük inkübasyon sonunda lakkaz aktivitesini 0.20 CU olarak tespit etmişlerdir. Ancak buldukları lakkaz aktivitesi, bizim çalışmamızda elde edilen maksimum aktiviteden oldukça düşük gözükmektedir. Bunun nedeni kullanılan fungus kültüründen kaynaklanabileceği gibi besiyerinden de kaynaklanabileceği de ileri sürülmektedir [2].

Lignoseluloz içerikli besiyerinde *Phanerochaete chrysosporium* ME446 ve *Funalia trogii* beyaz-çürükçül funguslarından, yarı-katı fermentasyon tekniği

kullanılarak katalaz, selulaz, lakkaz ve peroksidaz enzimlerinin üretiminin araştırıldığı bu çalışmada, enzim fiyatlarının ucuz tutulabilmesi amacıyla kullanılan besiyerinde üretilen enzimin stabilizasyon işlemlerinin oldukça basit olmasını sağlayacak koşullar oluşturulmaya çalışılmıştır. Selulaz enziminin üretimi için yapılan çalışmalarda *Funalia trogii* beyaz-çürükçül fungusunda 745 FPU maksimum enzim aktivitesi, 37°C, 10 günlük inkübasyon sonunda maksimum enzim aktivitesi elde edilirken, 35°C ile 5 günlük bir inkübasyondan sonra 611 FPU'luk enzim aktivitesinin eldesi oldukça ekonomiktir ve büyük ölçekli üretimler için büyük enerji tasarrufu sağlayacaktır.

Son yüzyılın istatiki değerlerinin dünya'da bir açlık probleminin olduğu ortaya çıkması ile, bilim çevreleri, araştırma ortamları bu problemi çözmek için birçok yeni yöntemler ortaya atmışlardır. Ömeroğlu (1978), yaptıkları çalışmada, çok az beslenme değeri olan tarımsal atıkları, ve peynir altı suyu ile zeytin kara suyunda, mikroorganizmalar üreterek mikrobiyal protein ile bu maddelerin besin değerlerini arttırmak ve besin değeri sağlamak amacıyla bir çalışma yürütmüşlerdir [45].

Çeşitli tarımsal ve endüstriyel kaynaklı artık maddelerden yararlanılarak gerçekleştirilen tek hücre proteini üretimi bugün bir çok ülkede uygulama alanına konmuştur. Geleceğin gıda sorununa yönelik olarak yürütülen bu çalışmalar öncelikle hayvan yemi amacıyla değerlendirilmektedir [48].

Çizelge 4. 1. 'de görüldüğü üzere elde ettiğimiz değerlerde, kullandığımız besiyerinde temel amino asitlerde artış olduğu gözlenmektedir.

Çizelge 3. 7'ye bakıldığı takdirde toplam amino asit açısından değerlendirme yapılacak olunursa *Funalia trogii* ile yapılan çalışmada zenginleştirilmenin daha fazla olduğu gözlenmektedir. Bu noktadan yola çıkarak, ileride yapılacak olan bir çalışmada kullandığımız besiyerinde *Funalia trogii*'nin mikropsal protein amacıyla kullanımının daha uygun olacağını söyleyebiliriz.

Çizelge 4. 1. Ekim Yapılmamış Besiyeri ile *Funalia trogii* ve *Phanerochaete chrysosporium ME446*'nın Ekim Yapıldığı Besiyerlerinin Amino Asitlerin Cins ve Miktarları

AMİNO ASİTLER	BESİYERİ (mg aa/mg örnek)	<i>Phanerochaete chrysosporium ME446</i> + BESİYERİ (mg aa/mg örnek)	<i>Funalia trogii</i> + BESİYERİ (mg aa/mg örnek)
Sistin	0.0008	0.0006	0.0008
Valin	0.003	0.003	0.003
Metyonin	0.0006	0.0009	0.0008
İsolosin	0.002	0.003	0.003
Lösin	0.005	0.005	0.007
Treonin	0.340	0.245	0.200
Fenil-Alanin	0.003	0.003	0.003
Histidin	0.002	0.003	0.003
Lizin	0.003	0.003	0.004

5. SONUÇLAR

Ülkemizde bulunan tekstil fabrikaları bu enzimleri yurt dışından ithal etmek durumunda kalmaktadır. İthal edilen enzimlerin maliyetinin yüksek oluşundan dolayı, bu enzimlerin proste kullanımı fabrikanın ürününe ek maliyet olarak yansımaktadır. Ürün fiyatının artışı ise piyasa rekabetini zorlaştırdığı ve ürünlerde talep azalışına neden olduğundan dolayı istenmeyen bir durum ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle de tekstil süreçlerinde enzimlerin kullanımından olabildiğince uzak durulmaktadır.

Tarımsal atıklar içeren besiyerinde *Phanerochaete chrysosporium* ME446 ve *Funalia trogii* beyaz-çürükçül funguslarından, yarı-katı fermentasyon tekniği kullanılarak katalaz, selulaz, lakkaz ve peroksidaz enzimlerinin üretiminin araştırıldığı bu çalışmada, kullanılan besiyerinin maliyetinin oldukça ucuz ve üretilen enzimin stabilizasyon işlemlerinin oldukça basit olmasından dolayı enzimlerin fiyatı ucuz tutulabilmektedir.

Phanerochaete chrysosporium ME 446 ile *Funalia trogii*'nin selulaz üretimi için gerekli optimum koşullar karşılaştırıldığında, bu koşullar altında *Funalia trogii* ile çalışıldığı takdirde daha yüksek enzim aktivitesinin elde edildiği görülmektedir. Bunun yanı sıra tespit edilen enzim aktivitelerinin, saptanan aktiviteden daha yüksek olabilmesi mümkündür.

Funalia trogii'nin maksimum selulaz aktivitesinin de pH=6.0 ve 37°C'de 10 günlük inkübasyon periyodu sonunda 745 FPU olarak el de edilmiştir. Ancak aynı fungusun pH'sı 4.0 olan besiyerine aşlanarak üretildiği yarı-katı fermentasyonda ortam sıcaklığı 35°C'da tutulduğu zaman, çalışmanın 5. gününde de yine 611 FPU olmak üzere maksimuma yakın bir enzim aktivitesi elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre, *Funalia trogii* ile selulaz enzimi üretiminde pH'nın 4.0 ve sıcaklığın 35°C olduğu koşullarda üretimini avantajlı gözükmeaktadır.

Phanerochaete chrysosporium ME 446 ile *Funalia trogii*'nin maksimum katalaz aktivitesi karşılaştırıldığında, aynı şekilde *Funalia trogii*'nin katalaz enzim aktivitesinin daha yüksek olduğu görülmektedir ve *Funalia trogii*'nin katalaz aktivitesi 9320 IU, spesifik aktivitesi 328 IU/mg olarak saptanmıştır.

Günümüzde tekstil sanayiinde kullanılan H₂O₂'nin arıtılması için kimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Ancak arıtmadan istenilen sonuç alınamaması ile

birlikte, proses içinde de fazla miktarda enerji kullanımına gidilme durumunda kalınmaktadır. H_2O_2 'in katalaz enzimi ile biyolojik olarak parçalanması hem prosese enerji ve su tasarrufu sağlayacaktır, hem de H_2O_2 'in arıtılmasında istenilen verim kolaylıkla sağlanabilmektedir. Enzimin ülkemizde bulunan tarımsal atıkların kullanılarak üretilmesi enzimin maliyetini oldukça düşürecek, enzimin proses esnasında kullanımı da oldukça basit ve herkes tarafından uygulanabilir olduğunda dolayı da kullanıcılar için kimyasal yöntemlerden daha avantajlı gözükecektir.

Çalışmamızda üretiminin araştırıldığı katalaz enzimi, kimyasal peroksit giderme işlemlerine alternatif olacaktır.

Tüm dünyada, endüstriyel alanlarda biyoteknolojik yöntemler kullanılarak maliyetin düşürülmesi prensibine göre yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. Türkiye'de bu ve benzeri çalışmaların maddi ve manevi yönden daha fazla desteklenmesi ile ülke ekonomisine büyük kazançlar sağlanabileceği gibi aynı zamanda da doğal kaynaklarımızın korunması ve çevre kirliliği açısından da büyük yararlar sağlayacaktır.

6. KAYNAKLAR

- [1] **Ander, P., Erikson, K. E. :** Degredation of Lignin and Lignin Relater Substance by *Sporotrichum pulverulenrum* (*Phanerochaete chrysosporium*) Lignin Biodegradation. Microbiology Chemistry and Potential Applications, T. K. Kirk, T. Higuchi and H. Chang (eds), CRC, Press Inc. Boca Raton, Florida, II, 1, 2-14, (1981).
- [2] **Arora, D. S., Sandhu, D. K. :** Laccase Production and Wood Degradation by a White-Rot Fungus *Daedalea flavida*. Enzyme Microb. And Technol, 7, 405-408, (1985).
- [3] **Barr, D. P., Aust, S. D.** Effect of Superoxide and Superoxide Dismutase on Lignin Peroxidase. Arch. Biochem. Biophys., 311, 378-382, (1994).
- [4] **Barr, D. P., Aust, S. D. :** Pollutant Degradation by White Rot Fungi. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 138, 49-71, (1994).
- [5] **Bollok, M., Leppamak, S. and Reczey, K.** Cellulase Enzyme Production by Various Fungal Strain in Different Carbon Sources, European Congress on Biotechnology 8th, 18-22 August, Hungary, (1997).
- [6] **Bonnafe, D., Therisod, M., Seris, J. L., and Lubineau, A. :** Chemical Deglycosylation of Horseradish Peroxidase and Surglycosylation Using a New Glycosylating Reagent: Effects on Catalytic Activity and Stability, Stability and Stabilization of Enzymes Proceedings of an International Symposium Held in Maastrich, Elsevier Science Publishers B. V., Netherlands, 223-229, (1992).
- [7] **Bourbonnais, R., Paice, M. G., Freiermuth, B., Bodie, E. and Bornemen, S. :** Reactivities of Various Mediators and Laccases With Kraft Pulp and Lignin Model Compounds, Applied and Environmental Microbiology, Dec, 4627-4632, (1997).

- [8] Busquets, M., Franco, R. : A Laboratory Experiment on the Purification of Catalase, *Biochemical Education*, 14, 2, 84-86, (1986).
- [9] Carnicero, A., Trojanowski, J., Falcon, M. A., Fuente, G., Kharazipour, A., and Hüttermann, A. : Lignin Degrading Capacities of Several Fungi Imperfecti Isolated From Soils Tested by the Radiorespirometric Method. *Microbios*, 72, 17-25, (1992) .
- [10] Correa, G. M., Tengerdy, R. P. : Xylanase Production by Fungal Mixed Culture Solid Substrate Fermentation on Sugar Cane Baggase, *Biotechnology Letter*, 20, 45-47, (1998) .
- [11] Coulter, C., Kennedy, J. T., McRoberts, W. C., Harper, D. B. : Purification and Properties of an S-adenosylmethionine 2,4-disubstituted Phenol o-methyl Transferase From *Phanerochaete chrysosporium* . *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 706-711, (1993).
- [12] Cowling, B. E., Kirk, T. K. : Properties of Cellulose and Lignocellulosic Materials as Substrates for Enzymatic Conversion Processes. *Biotechnol. & Bioeng. Symp.*, 6, 95-123, (1976).
- [13] Crawford, D. L., Crawford, R. L. : Microbial Degredation of Lignocellulose: The Lignin Component. *Applied and Environmental Microbiology.*, 31, 5, 714-717, (1976).
- [14] Crawford, D. L., Crawford, R. L. : Recent Advances in Studies of the Mechanisims of Microbial Degradation of Lignins. *Enzyme Microb. Technol.*, 6, 434-442, (1984).

- [15] Crawford, R. : "In : Lignin Biodegradation and Transformation". Wiley, New York, (1981).
- [16] Cullen, P. and Kersten, P. : Fungal Enzymes for Lignocellulose Degradation. Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi (ed. Kinghorn, J. R. and Turner, G.). 1 st ed. Blackie Academic & Professional, Cambridge, (1992).
- [17] Elçi, Ş., Kolsarıcı, Ö. ve Geçit, H. H. : " Tarla Bitkileri". 2. Baskı. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi. 119,155-156, (1994).
- [18] Eriksson, K. E. : Enzyme Mechanism Involved in Cellulose Hydrolysis by the Rot Fungus *Sporotrichum pulverulentum* (*Phanerochaete chrysosporium*), Biotech. And Bioeng., 20, 317-332, (1978).
- [19] Faison, B. D., Kirk, T. K. : Factors Involved in the Regulation of a Ligninase Activity in *Phanerochaete chrysosporium*, Applied and Environmental Microbiology, Feb, 299-304, (1984).
- [20] Fışkın, K., Ünyayar, A., ve Yeşilada, Ö. : Beyaz-Çürükçül Fungusların Lakkaz ve Peroksidaz Aktivitelerini Bağlı Lignin Degredasyonu, Doğa, 13, 3, (1989).
- [21] Forss, K., Rahkila, L. and Savolainen, M. : The Utilization of Sugar and Residue Fraction in Chemicalon Microbial Processes : Conversion of Lignocellulosic Material of Simpel Carbohydrates. Proceedings OECD-COST, Amersfoot the Netherlands, 286-335, (1980).
- [22] Gilbert, H. J., Hazlewood, G. P. : Bacterial Cellulases and Xylanases. Journal of General Microbiology, 139, 187-194, (1976).

- [23] Goldstein, I. S. : Chemicals From Lignocellulose. Biotechnol. & Bioeng. Symp., 6, 293- 301, (1976).
- [24] Godfrey, T., West, S.I. : "Industrial Enzymology", 2nd ed. Stockton Press, New York, (1996).
- [25] Gök, A. S. : Arpa ve Buğday Samanın Sindiriminin Arttırılması Üzerine Araştırmalar. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, Türkiye (1985).
- [26] Habu, N., Igarashi, K., Samejima, M., Petterson, B., and Eriksson, K. L. : Enhanced Production of Cellobiose Dehydrogenase in Cultures of *Phanerochaete chrysosporium* Supplemented with Bovine Calf Albumin. Biotechnol. Appl. Biochem., 26, 97-102, (1997).
- [27] Haun, D. B., Buswell, J. A., Kennedy, J. T. and Hamilton J. T. G. : Hemicellulose. Handbook of Pulp and Paper technology, New york, 25-31, (1970).
- [28] Hartree, E. F. : Determination of Protein. A modification of the Lowry Method that Gives a Linear Photometric Response. Analytical Biochemistry, 48, 422-427, (1972).
- [29] Hiroi, T., Eriksson, K.E. : Mikrobial Degradation of Lignin. Svensk Paperstidding, 5, 157-161, (1976).
- [30] Karam, J., Nicell, J. A. : Potential Applications of Enzymes in Waste Treatment. J. Chem. Tech. Biotechnol., 69, 141-153, (1997).
- [31] Kay-Shoemake, J.L., Watwood, M. E. Limitations of the Lignin Peroxidase System of the White-Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*, Appl. Microbiol Biotechnol., 46, 438-442, (1996).

[32] Kersten, P. J., Kurek, B. and Whittaker, J. : Redox Regulation of Enzyme Activity During Wood Decay. The International Research Group on wood Preservation, 27th annual Meeting, section 1, 1-7, (1996).

[33] Kierulff, J. V. : Bleaching Technology, Enzyme Development and Applications, Enzyme Business, Novo Nordisk A/S, Novo AllE, DK-2880 Bagsverd, Denmark.

[34] Kim, S. J., Shoda, M. : Decolorization of Molasses and a Dye by a Newly Isolated Strain of the Fungus *Geotrichum candidum* *Dec1*, Biotechnology and Bioengineering, 62, 1,114-119, (1999).

[35] Kimbrough, D. R., Magoun, M. A., and Langfour, M. : A laboratory Experiment Investigating Different aspects of Catalase Activity in an Inquiry- Based Approach. J. Chem. Educ., 74, 210, (1997).

[36] Kurbanova, R., Mirzaoglu, R., Ahmedova, G., Şeker, R. ve Özcan, E. : Boya ve Tekstil Kimyası ve Teknolojisi. Selçuk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Yayınları, 34, 264s, (1998).

[37] Lück, H. : "Methods of Enzymatic Analysis" 2nd ed. Weinheim and Academic Press, New York, 885-888, (1963).

[38] MacGregor, A. W., Bhatti, R. S. : "Barley: Chemistry and Technology". 2nd ed. American Association of Cereal Chemists Inc, 1-2, (1996).

[39] Mayer, F., Hillebrandt, J. O. : Potato Pulp: Microbiological Characterization, Physical Modification, and Application of This Agricultural Waste Product. Applied Microbiol. Biotechnol., 48, 435-440, (1997).

- [40] Miller, G.L. : Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Anal. Chem., 31, 426-428, (1959).
- [41] Misset, O. : Stability of Industrial Enzymes . Stability and Stabilization of Enzymes Proceedings of an International Symposium Held in Maastrich, Elsevier Science Publishers B. V., Netherlands, 111-112, (1992).
- [42] Mou, D., Lim, K. K. and Shen, H. P. : Microbial Agents For Decolorization of Dye Wastewater, Biotech. Adv., 9, 613-622, (1991).
- [43] Munoz, C., Guillen, F., Martinez A. T. and Martinez, J. : Laccase Isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: Characterization, Catalytic properties, and Participation in Activation of molecular Oxygen and Mn^{2+} Oxidation, Applied and Environmental Microbiology, June, 2166-2174, (1997).
- [44] Onysko, K. A. : Biological Bleaching of Chemical Pulps: A Review. Biotech. Adv., 11, 178-179, (1993).
- [45] Ömeroğlu, S. : Ünitimizde Biyolojik Yolla Elde Edilen Mikrobiyal Proteinlerin Amino Asitleri Üzerine Bir Araştırma. Marmara Bilimsel Araştırma Enstitüsü, 28, 1-34, (1978).
- [46] Öner, E. : Tekstil Terbiye Proseslerinde Enzimlerin Kullanımı. Kimya Mühendisliği, 150, 19-20, (1996).
- [47] Öner, M. : "Genel Mikrobiyoloji". Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, (1986).
- [48] Özyurt, M. : Tek Hücre Proteinlerinin Amino Asitlerle Zenginleştirilmesi. Kükem Dergisi, 1, 102-103, (1980).

[49] Pessoa, A., Manchilla I. and Sato, S. : Evalution of Sugar Cane Hemicellulose Hydrolizate For Cultivation of Yeasts And Filamentous Fungi, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 18, 360-363, (1997)

[50] Persson, I., Tjerneld, F., and Hahn-Hagerdal, B. : Fungal Cellulolitik Enzyme Production : A Review. *Process Biochemistry*, 26, 65-74, (1991).

[51] Rajoka, M. I., Malik, K. A. : Cellulase Production by *Cellulomonas biazotea* Cultured in Media Containing Different Cellulosic Substrats. *Bioresource Technology*, 59, 21-27, (1997)

[52] Reese, E. T. : History of the Cellulase Program at the U. S. Army Natick Development Center. *Biotechnol. & Bioeng. Symp.*, 6, 9-20, (1976).

[53] Reid, I. D. :Solid-State Fermentations for Biological Delignification. *Enzyme Microb. Technol.*, 11, 786-802, (1989).

[54] Rogalski, J., Lundell, T., Leonowicz, A., and Hatakka, A. : Production of Laccase, Lignin Peroxidase and Manganase-dependent Peroxidase by Various Strains of *Trametes versicolor* Depending on Culture Conditions. *Acta Microbiologica Polonica*, 40, 221-234, (1991).

[55] Sandhu, D. K., Arora, D. S. : Laccase Production by *Polyporus sanguineus* under Different Nutritional and Environmental Conditions. *Experientia*, 41, 355-356, (1985).

[56] Sarkanen, K. V., Ludwig, C. H. : In : Lignins: Occurences, Formation and Structure. Wiley-Interscience, New York, (1971).

- [57] Sato, S., Manchila, I., and Jr, A. : Evaluation of Sugar Cane Hemisellulose Hydrolizate for Cultivation of Yeasts and Filamentous Fungi. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 18, 360-363, (1997).
- [58] Shawn, D. M., Jong, E. and Saddler, J. N. : Cellobiose Dehydrogenase, An Active Agent in Cellulose Depolymerization, *Applied and Environmental Microbiology*, Oct, 3804-3809, (1997).
- [59] Sjöström, E. : Wood Chemistry. Fundamentals and Applications. Academic Press, 4, 66-80, (1981).
- [60] Smith, J. E. : "Biotechnology" 2nd ed. Nature Publishig Co., New York, (1988).
- [61] Sukan, F. V. :Avrupa Birliğinde Biyoteknoloji: Strateji ve Organizasyon. *Kimya Mühendisliği*,150, 7-15,(1996).
- [62] Sukan, S. : Downstream Processes in Biotechnology, Med-Campus Summer School Lecture Notes, June 10-14, Ege University Biotech. Center, (1995).
- [63] Şık, S., Ünyayar, A. : Pamuk Sapı ile *Phanerochaete chrysosporium* ve *Funalia trogii*' nin Yarı-Katı Fermentasyonu Sonucu Oluşan Lakkaz, Peroksidaz, Ligninaz ve Selulaz Aktiviteleri. *Tr. J. of Biology*, 22, 287-298, (1998).
- [64] Takagi, M. : Inhibition of Cellulose by Fermentation Products. *Biotechnology and Bioengineering*, 26, 1506-1507, (1984).
- [65] Tien, M., Kirk, T. K. : Lignin-Degradading Enzyme From *Phanerochaete chrysosporium* Purification, Characterzation and Catalistic Properties of a Unique H₂O₂-Requiring Oxygenase. *Proc. Natl. Aced. Sci., USA*, 81 2280-2284, (1984).

[66] Trotter, P. C. : Biotechnology in the Pulp and Paper Industry: A Review. Tappi Journal, 4 , 198-204, (1990).

[67] Ünyayar, A., Topcuoğlu, Ş. F., Yeşilada, Ö., Ünyayar, S., Fışkın, K., Bozcuk, S. : Çalkalamalı ve Statik İnkübasyon ortamlarında Üretilen *Phanerochaete chrysosporium* ME 446' da Absisik Asit (ABA) Üretimi ve Enzim Sistemi. 10. Ulusal Biyoloji Kongresi, 18-20 Temmuz, (1990).

[68] Ünyayar, A. : Biyoteknolojik Bir Yaklaşımla Beyaz-Çürükçül Funguslarda Lignolitik Enzim Sistemi ve ABA Arasındaki ilişkinin Araştırılması, Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enst, Türkiye, (1992).

[69] Vandevivere, P. C., Bianchi, R. and Verstraete, W. : Treatment and Reuse of Wastewater From the Textile Wet-Processing Industry: Review of Emerging Technologies. Chem. Technol. Biotechnol. ,72, 289-302, (1998).

[70] Vares, T., Lundell, T. K., and Hatakka, A. I. : Production of Multiple Lignin Peroxidases by the White-Rot Fungus *Phlebia ochraceofulva* . Enzyme Microb. Technol., 15, 664-669, (1993).

[71] Vyas, B.R.M., Molitoris H.P. :Involment of an Extracellular H₂O₂-Dependent Ligninolytic Activity of the White Rot Fungi *Pleurotus ostreatus* in the Decolorization of Remazol Brilliant Blue R. App. Environ. Microbiol, 61 , 3919-3927, (1995).

[72] Westermarck, V., Eriksson, K. E. Cellobiose Quinone Oxidoreductase a New Wood Degrading Enzyme From White-Rot Fungi. Acta. Chem. Scan., 28, 209-214, (1974).

7. ÖZGEÇMİŞ

1974 Mersin doğumluyum. İlk ve orta öğrenimimi Mersin’de tamamladım. 1996 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden Mezun oldum. 1996 yılında Mersin Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü’nde Yüksek Lisansa başladım. 1997 yılından beri Çevre Mühendisliği Bölümü’nde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım. Ocak 1998’de başlayan ve Yrd. Doç. Dr. Ali Ünyayar’ın yürütücüsü olduğu "Tekstil atık sularının iyileştirilmesinde yeni biyoteknolojik yaklaşım: Entegre Biyolojik Arıtım" (no: 98K122360, DPT tarafından desteklenmektedir.) adlı projede görev almaktayım.



8. ÖZET

Bu tez çalışmasında, tekstil terbiyesinde kullanılmakta olan selulaz, lakkaz, katalaz ve peroksidaz enzimlerinin tarımsal atıklar üzerinde pilot ölçekte üretimleri için gerekli laboratuvar koşulları belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışmalar sırasında bağıl nem (%65) sabit tutulmuştur.

Phanerochaete chrysosporium ME446 ve *Funalia trogii* beyaz-çürükçül fungusları ile uygulanan yarı-katı fermentasyonda, değişen pH ve sıcaklıklara bağlı olarak her enzim için maksimum aktivitenin elde edildiği koşullar saptanmaya çalışılmıştır. *Funalia trogii* ile maksimum katalaz aktivitesiyle spesifik aktivitesi pH'sı 5.0 olan besiyerinde 35° C'de, 9320 IU ve 328 IU/ mg olarak 5 günlük inkübasyon süresi sonunda elde edilmiştir. Aynı koşullar altında maksimum lakkaz ve peroksidaz aktiviteleri ise 3.37 CU ve 4.27 CU olarak elde edilmiştir. Maksimum selulaz aktivitesi pH'si 6.0 olan besiyerinde , 37° C'de 10 günlük inkübasyon süresi sonunda 745 FPU olarak saptanmıştır.

Phanerochaete chrysosporium ME446 ile yürütülen çalışmalarda maksimum katalaz aktivitesi ve spesifik katalaz aktivitesi , 6240 IU ve 129 IU/ mg olarak pH'si 6.0 olan besiyerinde 35° C'de 5 günlük inkübasyon süresi sonunda elde edilirken, maksimum selulaz aktivitesi 507 FPU olarak pH'si aynı ancak inkübasyon sıcaklığı 37° C olan ortamda , 10 günlük süre sonunda elde edilmiştir.

Tekstil terbiyesi proseslerine biyoteknolojinin uygulanabilirliği açısından selulaz ve katalaz enzimleri ile elde ettiğimiz sonuçlar oldukça ilgi çekici gözükmektedir.

9. SUMMARY

In this study, to produce the enzymes laccase ,cellulase ,catalase and peroxidase with *Funalia trogii* and *Phanerochaete chrysosporium ME446* and to scale up to the pilot scale required phisiological conditions were being tried to determine. we used agricultural waste as an alternative source for these enzymes which are used nowadays in textile industry . During the studies relative moisture (%65) was constant.

To maintain the maximum activity for each enzyme that are produced by using *Funalia trogii* and *Phanerochaete chrysosporium ME446* at semi-solid fermentation. *Funalia trogii*' s maximum activity of catalase and the specific catalase activity at the medium with a pH 5.0 and the temprature of 35°C is determined as 9320 IU and 328 IU/mg after 5 days incubation. Under the same conditions maximum avtivities of laccase and peroxidase are determined as 3.37 CU and 4.27 CU. The maximum cellulase activity is determined at the medium with pH 6.0 and temperature 37° C, after 10 days incubation period as 745 FPU. The studies which are carried on with *Phanerochaete chrysosporium ME446*, maximum catalase activity and specific catalase activity are determined respectively as 6240 IU and 129 IU/mg in a medium with pH 6.0 and 35° C after 5 days incubition time .On the other hand, maximum cellulase activity is determined at the medium with pH 6.0 and 37° C, after 10 days incubation as 507 FPU.

The results which we obtained from the cellulase and catalase enzymes are very impreesive in the view of the applicability of biotechnology to the processes of the textile industry.

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK MERKEZİ