

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KATI SUBSTRAT FERMENTASYONU İLE LAKKAZ ÜRETİMİ

FİLİZ KURU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MALATYA

2007

Tezin Başlığı : Katı Substrat Fermentasyonu ile Lakkaz Üretimi

Tezi Hazırlayan : Filiz KURU

Sınav Tarihi : 20 Temmuz 2007

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jürisi Üyeleri

Prof. Dr. Murat ÖZMEN (Danışman)

Doç. Dr. Hikmet GEÇKİL

Yrd. Doç. Dr. Sibel KAHRAMAN

Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA

Tez ikinci Danışmanı

Prof.Dr.Ali ŞAHİN
Enstitü Müdürü

Onur Sözü

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Katı Substrat Fermentasyonu ile Lakkaz Üretimi” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Filiz KURU

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KATI SUBSTRAT FERMENTASYONU İLE LAKKAZ ÜRETİMİ

FİLİZ KURU

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

56 + ix sayfa

2007

Danışman: Prof. Dr. Murat ÖZMEN

İkinci danışman: Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA

Katı substrat fermentasyonu (KSF), serbest suyun bulunmadığı bir ortam olan nemli-katı substrat üzerinde mikroorganizmaların üretilmesidir. KSF, funguslarla enzim üretimi için uygundur. Çeşitli lignoselülozik atıklar, lakkaz gibi ligninolitik enzim üretimi için katı substrat fermentasyonunda kullanılmaktadırlar. Beyaz çürükçül fungusların ürettiği lakkaz, fenolik ve fenolik olmayan bileşikler oksitleme yeteneklerinden dolayı tercih edilmektedir.

Bu çalışmada, katı substrat üzerinde *Funalia trogii* ve *Trametes versicolor* ile lakkaz üretimi test edilmiştir. Zeytinyağı fabrikası atıksuyu (ZYFA), alkol fabrikası atıksuyu (vinas), peyniraltı suyu ve melas, katı substratı nemlendirmek için kullanılmıştır. Bakır, pepton, glukoz, maya özütü, ksilidin gibi çeşitli indükleyiciler, katı substrat fermentasyonunda lakkaz üretimini arttırmak için denenmiştir. Bu indükleyicilerden özellikle bakır ilavesi, lakkaz aktivitesini arttırmıştır ve bazı atıksuların kullanımı, lakkaz üretimini pozitif yönde etkilemiştir.

Sonuçlar, katı substrat fermentasyonu ile yüksek seviyede lakkaz üretilbileceğini göstermektedir. Ucuz ve bol tarımsal atık kullanımı, bu tekniğin ekonomik olmasını sağlamaktadır ve atıksu kullanımı, kirlilik problemlerini çözmeye yardımcı olabilir.

ANAHTAR KELİMELEER: Katı substrat fermentasyonu, lakkaz, beyaz çürükçül fungus, *Funalia trogii*, *Trametes versicolor*

ABSTRACT

Master Thesis

LACCASE PRODUCTION BY SOLID SUBSTRATE FERMENTATION

FİLİZ KURU

Department of Biology
Institute of Natural Sciences
Inonu University

56 + ix pp.

2007

Supervisor: Prof. Dr. Murat ÖZMEN

Co-supervisor: Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA

Solid substrate fermentation (SSF) is definition for the growth of microorganisms on moist solid substrate in the absence of free water. SSF is suitable for the production of enzymes by fungi since SSF processes. Various lignocellulosic wastes have been used in SSF for ligninolytic enzyme production such as laccase. Laccase which is produced by white rot fungi is preferred due to its ability to oxidize both phenolic and non-phenolic compounds.

In this study, laccase production by *Funalia trogii* and *Trametes versicolor* on solid substrate is tested. Olive oil mill wastewater (OMW), molasses wastewater (vinasse), whey and molasses are utilized for moisturing solid substrate. Various inducers such as copper, peptone, glucose, yeast extract and xylinine have been assayed for their ability to enhance laccase production in solid substrate fermentation. In the presence of inducers, especially, addition of copper increased laccase activity and utilization of some wastewaters positively affected the laccase production.

Results showed that, high level of laccase can be produced by solid substrate fermentation. Utilization of cheap and abundant agricultural wastes makes this technique more economical and using wastewater can help solving pollution problems.

KEYWORDS: Solid substrate fermentation, laccase, white rot fungus, *Funalia trogii*, *Trametes versicolor*

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında yardım, öneri ve sağlamış olduğu destek için danışman hocam Sayın Prof. Dr. Murat ÖZMEN ve çalışmamın her aşamasını planlayarak bana yol gösteren ve desteğini hep üzerimde hissettiğim ikinci danışman hocam Sayın Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA' ya;

Projeyi (2006/25) destekleyen İnönü Üniversitesi, Bilimsel Araştırmalar Fonu'na,

Hayatımın her aşamasında desteğiyle hep yanımda olan hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Emel YİĞİT' e,

Tezin deneysel aşamalarında bana yardımcı olan Arş. Grv. Dr. Elif APOHAN ve Arş. Grv. Dr. Seval Cing YILDIRIM' a,

Benden desteğini ve yardımlarını hiç eksik etmeyen hocam Arş. Grv. Emre BİRHANLI'ya,

Çalışmalarında bana yardımcı olan Uzm. Ufuk Günay DOĞAN' a,

Çalışmalarım boyunca bana destek olan sevgili arkadaşlarım Öğr. Grv. Ertan YOLOĞLU ve Aygöl KILIÇ' a,

Ve...

Tüm hayatım boyunca hep yanımda olan ve desteklerini, bana olan güvenlerini hep üzerimde hissettiğim annem ve babama,

Hep bana destek olan, varlığıyla daha güçlü olmamı sağlayan canım kardeşim Burak' a,

en içten dileklerimle teşekkür ederim...

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Katı Substrat Fermentasyonu.....	1
1.2. Katı Substrat Fermentasyonunun Tarihçesi.....	4
1.3. Katı Substrat Fermentasyonunun Bazı Olası Uygulamaları.....	5
1.4. Katı Substrat Fermentasyonunun Avantajları ve Dezavantajları.....	6
1.5. Katı Substrat Fermentasyonunda Kullanılabilecek Bazı Biyoreaktörler..	7
1.6. Katı Substrat Fermentasyonu ile Enzim Üretimi.....	8
1.7. Beyaz Çürükçül Funguslar ve Biyoteknolojik Önemleri.....	9
1.8. Lakkaz Enzimi ve Önemi.....	9
1.9. Katı Substrat Fermentasyonu Sürecinde Beyaz Çürükçül Funguslarla LakkazEnzimiÜretimi.....	10
2. ÇALIŞMA İLE İLGİLİ KAYNAK ÖZETLERİ.....	12
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	18
3.1. Çalışmada Kullanılan Funguslar.....	18
3.2. Çalışmada Kullanılan Fungusların Üretimi ve Saklanması.....	18
3.3. Çalışmada Kullanılacak Stok Fungus Kültürlerinin Hazırlanması.....	18
3.4. Çalışmada Kullanılan Nemlendirme Sıvılarının Hazırlanması.....	18
3.5. Çalışmada Kullanılan Katı Substrat.....	19
3.6. Katı Substrat Ortamının Hazırlanması, Ekim ve Üretim.....	19
3.7. İndükleyicilerin Lakkaz Üretimine Etkisinin Belirlenmesi.....	19
3.8. Lakkaz Aktivitesinin Saptanması.....	20
3.9. Toplam Protein Tayini.....	20
3.10. pH' nın Ölçümü.....	20
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	21
4.1. Beyaz Çürükçül Funguslarla Katı Substrat Ortamında Lakkaz Üretimi.	21
4.2. <i>F. trogii</i> ile Yürütülen Katı Substrat Fermentasyonu Çalışmaları.....	21
4.2.1. <i>F. trogii</i> ile Distile su ile Nemlendirilmiş Katı Substrat Ortamında Lakkaz Üretimi.....	21
4.2.2. <i>F. trogii</i> ile Stok Temel Ortam ile Nemlendirilmiş Katı Substrat Ortamında Lakkaz Üretimi.....	25
4.2.3. <i>F. trogii</i> ' nin Peyniraltı Suyu (PAS) ile Nemlendirilmiş Ortamlarda Lakkaz Üretimi.....	26
4.2.4. <i>F. trogii</i> ' nin Melasla Nemlendirilmiş Ortamlarda Lakkaz Üretimi	27
4.2.5. <i>F. trogii</i> ' nin Zeytinyağı Fabrikası Atık suyu (ZYFA) ile Nemlendirilmiş Ortamlarda Lakkaz Üretimi.....	29
4.2.6. <i>F. trogii</i> ' nin Vinasla Nemlendirilmiş Ortamlarda Lakkaz Üretimi.....	32
4.2.7. <i>F. trogii</i> ' nin Buğday Kepeği + Saman Ortamında Lakkaz Üretimi.....	35
4.2.8. <i>F. trogii</i> ile Substratın Tekrar Kullanımı Sürecinde Lakkaz Üretimi....	36
4.3. <i>T. versicolor</i> ile Yürütülen Katı Substrat Fermentasyonu Çalışmaları...	37
4.3.1. <i>T. versicolor</i> ' un Distile su ile Nemlendirilmiş Katı Ortamlarda Lakkaz Üretimi.....	37

4.3.2.	<i>T. versicolor</i> ‘ un Peyniraltı Suyu ile Nemlendirilmiş Ortamlarda Lakkaz Üretimi.....	39
4.3.3.	<i>T. versicolor</i> ‘ un Melasla Nemlendirilmiş Ortamlarda Lakkaz Üretimi.	39
4.3.4.	<i>T. versicolor</i> ‘ un Zeytinyağı Fabrikası Atık suyu (ZYFA) ile Nemlendirilmiş Ortamlarda Lakkaz Üretimi.....	40
4.3.5.	<i>T. versicolor</i> ‘ un Vinas ile Nemlendirilmiş Ortamlarda Lakkaz Üretimi.....	42
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	46
6.	KAYNAKLAR	49
7.	ÖZGEÇMİŞ	56

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1.	<i>F. trogii</i> ' nin bakır içeren distile su ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi.....	22
Şekil 4.2.	<i>F. trogii</i> ' nin maya özütü içeren distile su ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi.....	23
Şekil 4.3.	<i>F. trogii</i> ' nin pepton içeren distile su ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi.....	23
Şekil 4.4.	<i>F. trogii</i> ' nin ksilidin içeren distile su ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi.....	24
Şekil 4.5.	<i>F. trogii</i> ' nin glukoz içeren distile su ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi.....	25
Şekil 4.6.	<i>F. trogii</i> ' nin bakır içeren stok temel ortam (STO) ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi.....	25
Şekil 4.7.	<i>F. trogii</i> ' nin farklı konsantrasyonlarda PAS ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi.....	26
Şekil 4.8.	<i>F. trogii</i> ' nin bakır içeren PAS ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi.....	27
Şekil 4.9.	<i>F. trogii</i> ' nin farklı konsantrasyonlarda melas ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi.....	28
Şekil 4.10.	<i>F. trogii</i> ' nin ksilidin içeren melas ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi.....	28
Şekil 4.11.	<i>F. trogii</i> ' nin bakır içeren %1' lik melas ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi.....	29
Şekil 4.12.	<i>F. trogii</i> ' nin farklı konsantrasyonlarda ZYFA ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi.....	30
Şekil 4.13.	<i>F. trogii</i> ' nin %25' lik ZYFA ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesinin günlere bağlı değişimi.....	31
Şekil 4.14.	<i>F. trogii</i> ' nin ksilidin içeren %25' lik ZYFA ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi.....	31
Şekil 4.15.	<i>F. trogii</i> ' nin bakır içeren %25' lik ZYFA ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi.....	32
Şekil 4.16.	<i>F. trogii</i> ' nin farklı konsantrasyonlarda vinas ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi.....	33
Şekil 4.17.	%25' lik vinas ile nemlendirilmiş katı ortamlarda <i>F. trogii</i> üretimi sürecinde lakkaz aktivitesinin günlere bağlı değişimi...	33
Şekil 4.18.	<i>F. trogii</i> ' nin ksilidin içeren %25' lik vinas ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi.....	34
Şekil 4.19.	<i>F. trogii</i> ' nin bakır içeren %25' lik vinas ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi.....	35
Şekil 4.20.	<i>F. trogii</i> ' nin distile su ile nemlendirilmiş substratlarda (5g buğday kepeği ve 3g buğday kepeği + 1g saman) üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi.....	36
Şekil 4.21.	Substratın tekrarlı kullanımında <i>F. trogii</i> ' nin lakkaz aktivitesi.	37

Şekil 4.22.	<i>T. versicolor</i> ' un bakır içeren distile su ile nemlendirilmiş katı ortamda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi.....	38
Şekil 4.23.	<i>T. versicolor</i> ' un ksilidin içeren distile su ile nemlendirilmiş katı ortamda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi.....	38
Şekil 4.24.	<i>T.versicolor</i> ' un farklı konsantrasyonlarda PAS ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi.....	39
Şekil 4.25.	<i>T.versicolor</i> ' un farklı konsantrasyonlarda melas ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi.....	40
Şekil 4.26.	<i>T. versicolor</i> ' un farklı konsantrasyonlarda ZYFA ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi.....	40
Şekil 4.27.	<i>T. versicolor</i> ' un %25' lik ZYFA ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesinin günlere bağlı değişimi.....	41
Şekil 4.28.	<i>T .versicolor</i> ' un bakır içeren %25' lik ZYFA ile nemlendirilmiş katı ortamda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi.....	41
Şekil 4.29.	<i>T. versicolor</i> ' un ksilidin içeren %25' lik ZYFA ile nemlendirilmiş katı ortamda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi.....	42
Şekil 4.30.	<i>T. versicolor</i> ' un farklı konsantrasyonlarda vinas ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi.....	43
Şekil 4.31.	<i>T.versicolor</i> ' un %25' lik vinas ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesinin günlere bağlı değişimi.....	43
Şekil 4.32.	<i>T.versicolor</i> ' un bakır içeren %25' lik vinas ile nemlendirilmiş katı ortamda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi.....	44
Şekil 4.33.	<i>T.versicolor</i> ' un ksilidin içeren vinas ile nemlendirilmiş katı ortamda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi.....	45

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	Çeşitli çalışmalarda kullanılan katı substratlar.....	3
Çizelge 1.2.	Katı substrat fermentasyonu ile lakkaz üretiminde kullanılan bazı tarımsal atıklar ve mikroorganizmalar.....	11
Çizelge 4.1.	<i>F.trogii</i> 'nin bakır içeren distile su ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde ortam protein miktarı değişimi.....	22

1. GİRİŞ

1.1. Katı Substrat Fermentasyonu

Lignin, pektin, lignoselüloz gibi bileşenleri içeren doğal materyalleri kullanan ve esas olarak kesikli bir işlem olan katı substrat fermentasyonu (KSF) serbest su akışının olmadığı ve nemli-katı substrat üzerinde mikroorganizmaların üretildiği bir uygulamadır [1-3]. Bu işlemde kullanılan substrat, mikroorganizmaların üreme ve metabolizması için ihtiyaç duyduğu yeterli nemi sağlamalıdır [4-5]. Katı substrat, hem fiziksel destek hem de besin kaynağı olarak rol oynayacağından uygun substratın seçimi önemlidir [3]. Bu nedenle, substratın parça büyüklüğü, por yapısı ve kimyasal bileşimi uygulama açısından önemlidir. Substratın bol miktarda olması, kolay elde edilmesi ve ayrıca ucuz olması büyük önem taşımaktadır [6].

Katı substrat fermentasyonu serbest suyun olmadığı ya da çok az olduğu durumda gerçekleştiğinden, mikroorganizmaların doğal çevrelerinde bulunduğu koşullara çok benzemektedir [7].

Çeşitli mikroorganizmalar (bakteriler, mayalar ve funguslar) katı substratlar üzerinde üretilbilirler ve bu amaçla kullanılabilecek en uygun mikroorganizmalar funguslardır [1]. Beyaz çürükçül fungusların düşük su aktivitesine karşı iyi tolerans göstermeleri ve misel formunda üremeleri bu açıdan kullanılabilme olasılıklarını arttırmaktadır.

Geleneksel sıvı fermentasyona göre ekonomik avantajlarının olması ve substrat olarak ucuz ve bol bulunan tarım endüstrisi atıklarının kullanılabilmesinden dolayı mikrobiyal ürünlerin üretiminde katı substrat fermentasyonu önem kazanmaktadır [8]. Bu atıkların pek çoğunun ligninolitik aktivitenin indükleyicisi olarak rol oynayan lignin, selüloz ve hemiselülozları içermesi ve ayrıca pek çoğunun yüksek oranda şeker içermesi işlemlerin çok daha ekonomik olmasını sağlamaktadır [6].

Katı substrat olarak kullanılacak tarımsal atıklar bu süreçle değerlendirileceğinden, tarımsal atıklardan dolayı oluşabilecek çevre problemlerinin alternatif bir çözümü olabilecek bir işlemdir. Koşullar birçok mikroorganizma için doğadaki şartlarına benzer olduğundan, üreme için yeterli koşullar sağlanabilir [9]. Çeşitli tarımsal substratlar, beyaz çürükçül funguslarla enzim üretiminde başarılı şekilde kullanılabilir [10].

Yürütülen çalışmalarda katı substrat olarak çok farklı substratlar test edilirken, aynı zamanda işlemde kullanılabilecek farklı mikroorganizmalarda araştırılmaktadır. Mikroorganizmanın üremesini ve aynı zamanda üretilmek istenen metabolitin optimum üretimini sağlayacak uygun substrat sağlanması çok önemlidir. Çizelge 1’de katı substrat fermentasyonlarında kullanılan çeşitli lignoselülozlu substratlar ve üretici mikroorganizmalar verilmiştir.

Çizelge 1.1 Çeşitli çalışmalarda kullanılan katı substratlar

SUBSTRAT	ÜRÜN / UYGULAMA	MİKROORGANİZMA	KAYNAK
Badem kabuğu tozu	Lipaz	<i>Rhizopus oligosporus</i>	[11]
Elma ezmesi	Etanol üretimi	<i>Trichoderma harzianum</i>	[12]
	Sitrik asit üretimi	<i>Aspergillus niger</i>	[13]
Buğday kepeği	Amilaz	<i>Gibberella fujikuroi</i>	[14]
	Proteince zenginleştirme	<i>Neurospora sitophila</i>	[15]
	Pektinaz	<i>Aspergillus niger</i>	[16]
	Aroma	<i>Ceratocystis fimbriata</i>	[17]
	Proteaz	<i>Aspergillus niger</i>	[18]
	Gibberellik asit	<i>Gibberella fujikuroi</i>	[19]
Buğday samanı	Ksilanaz	<i>Paecilomyces thermophila</i>	[20]
	Lignoselülozik enzimler	<i>Lentinus tigrinus</i>	[21]
Muz atığı	Lakkaz	<i>Trametes pubescens</i>	[22]
	Proteince zenginleştirme	<i>Aspergillus niger</i>	[23]
	Ligninolitik enzim üretimi	<i>Pleurotus sp.</i>	[24]
Kassava posası	Aroma, tatlandırıcı ürünler	<i>Rhizopus oryzae</i>	[25-26]
Şeker kamışı posası	Aroma	<i>Rhizopus oryzae</i>	[27]
	Sitrik asit üretimi	<i>Aspergillus niger</i>	[28]
Kahve atıkları	Yenilebilir mantar	<i>P. osteratus</i>	[29]
Portakal posası	Pektinaz üretimi	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	[30]
Ananas, karışık meyve	Sitrik asit üretimi	<i>Aspergillus niger</i>	[31-33]
Soya kabuğu	Proteaz üretimi	<i>Penicillium sp.</i>	[34]
		<i>A. oryzae</i>	[35]
Hindistan cevizi kabuğu	Lipaz üretimi	<i>Penicillium restrictum</i>	[36]
Kahve kabuğu	Sitrik asit üretimi	<i>Aspergillus niger</i>	[37]
	tatlandırıcı üretimi	<i>Ceratocystis fimbriata</i>	[38]
Kahve özü	Pektinaz üretimi	<i>Aspergillus niger</i>	[39]
	Besince zenginleştirme	<i>Aspergillus niger</i>	[40]
Üzüm çekirdeği	Lakkaz	<i>Trametes hirsuta</i>	[41]
Pirinç kepeği	Proteaz	<i>Rhizopus oligosporus</i>	[42]
Soya fasülyesi	Fermente besin üretimi	<i>Rhizopus sp.</i>	[43]
Kivi atığı	Sitrik asit üretimi	<i>Aspergillus niger</i>	[44]

1.2. Katı Substrat Fermentasyonunun Tarihçesi

Katı substrat fermentasyonu işlemleri, Asya ülkelerinde eski zamanlardan beri uygulanmaktadır. Batı ülkelerinde ise 1940'lardan sonra önem kazanmaya başlamıştır. Penisilinin sıvı substrat fermentasyonu sürecinde üretilmesi nedeniyle o dönemde araştırmacılar bütün ilgilerini sıvı ortam fermentasyonuna yönlendirmişler ve bu nedenle batı ülkelerinde katı substrat fermentasyonu 1940' lardan daha sonra önem kazanmaya başlamıştır [4].

Belirttiğimiz gibi katı substrat fermentasyonuna ilgi 1940'lardan sonra artmaya başlamış ve 1950-1960 yılları arasında fungal kültürler kullanılarak steroid transformasyonu gerçekleştirilmiştir. 1960-1970 yılları arasında katı substrat fermentasyonu ile mikotoksinlerin üretimi gerçekleştirilmiştir. Tarım endüstrisi atıklarının besiyeri olarak kullanılmasıyla protein bakımından besin değeri arttırılmış sığır yemi üretimi düşük maliyeti nedeniyle oldukça önem taşımaktadır. Katı substrat fermentasyonuna olan ilgi gün geçtikçe artmaya devam etmektedir [4].

Katı substrat fermentasyonunun tipik örnekleri geleneksel fermentasyonlardır [1]. Bunlara örnek olarak Japonya'da buharla muamele edilmiş pirinç kullanılan "koji", Endonezya'da mikrobiyal kaynak olarak küf ve katı substrat olarak buhar uygulanmış bezelye tohumlarının kullanıldığı "tempeh" veya Hindistan'a ait "ragi" verilebilir. Yine *Penicillium roquefortii* veya *P. camemberti* ile küflü peynir üretimi uzun yıllardan beri uygulanan katı substrat fermentasyonlarına örnek verilebilir [1].

Katı substrat fermentasyonu, özellikle Japonya'da büyük ölçekli endüstriyel işlemlerde uygulanmaktadır. Japonya dışında, Hindistan'da orta ölçekte enzim üretiminin yapıldığı rapor edilmiştir. Koji tipi işlemler Uzak Doğu'da küçük fabrikalarda geniş ölçüde uygulanmaktadır. Fransa'da küflü peynir üretimi, çevresel şartların kontrolü, küf sporlarının üretimi ve peynirin mekanik durumunun geliştirilmesiyle modernize edilmiştir. Benzer olarak fungusların küçük ölçekli üretimi için kullanılan kompost işlemi, modernize edilmiş ve Avrupa ve ABD'de geliştirilmiştir [1].

Son yıllarda katı substrat fermentasyonu bazı avantajlarından dolayı daha da önem kazanmaya başlamıştır.

1.3. Katı Substrat Fermentasyonunun Bazı Olası Uygulamaları

Yukarıda da belirttiğimiz gibi tarihsel bir öneme sahip olan katı substrat fermentasyonu temelde “koji”, “tempeh” ve “ragi” gibi geleneksel olarak fermente edilmiş yiyeceklerin üretimiyle ilgilidir [2].

Bununla birlikte;

- a) antibiyotik [3, 45, 46]
- b) alkaloid [4]
- c) bitki büyüme faktörü [4]
- d) enzim [2, 4, 24, 45, 47]
- e) organik asit [1, 2, 4, 48]
- f) biyopestisit, [1,2, 49]
- g) mikopestisit [50]
- h) biyoherbisit, [4]
- i) biyosüpfektan, [51]
- j) biyoyakıt [2]
- k) aroma veren bileşikler [1, 2, 25, 26, 47] gibi önemli ürünlerin üretiminde kullanım potansiyeli olduğundan artan sayıda araştırma yapılmaktadır.

Son yıllarda çevre koruması amacıyla katı substrat fermentasyonu;

- tehlikeli bileşiklerin biyolojik yıkımı (biyodegradasyonu) [52],
- tehlikeli bileşiklerin biyolojik iyileştirilmesinde (biyoremediasyon) [53],
- tarım ve diğer endüstri atıklarının biyolojik detoksifikasyonunda [54],
- besinsel zenginleştirme için atıklarının biyolojik dönüşümünde (biyotransformasyonu) [55],
- biyolojik kağıt hamuru üretiminde [56],
- ve kağıt hamurunun ağartılmasında [57-58] test edilmektedir.

1.4. Katı Substrat Fermentasyonunun Avantajları ve Dezavantajları

Katı substrat fermentasyonunun çeşitli avantajlarının yanı sıra işlemin doğasından gelen dezavantajları da vardır.

Aşağıda katı substrat fermentasyonunun bazı önemli avantajları sıralanmıştır:

1. Suyun az olmasından dolayı bakteri ve mayalarla kontaminasyon riski azdır. Bu aseptik koşullarda çalışmaya olanak sağlar [2].
2. Uygulamaya bağlı olarak KSF’de derin sıvı fermentasyona (DSF) göre daha yüksek oranda ürün elde edilebilir [2].
3. Substrat genellikle üreme için gerekli bütün besinleri sağladığından kültür ortamı oldukça basittir [2].
4. Enerji gereksinimi düşüktür [2, 10, 31, 59]. Bazı durumlarda otoklavize etme ya da buhar uygulama, mekanik çalkalama ve havalandırmaya gereksinim yoktur.
5. Çok az su kullanıldığından atık su çıkışı oldukça azdır [2].
6. Düşük nem içeriği sayesinde DSF ile üretilemeyen ya da çok az üretilen özgül bileşiklerin üretimi sağlanabilir [2].
7. Substratın konsantre özelliğinden dolayı DSF ile karşılaştırıldığında aynı miktarda substrat için KSF’de daha küçük reaktörler kullanılabilir [2].
8. KSF, fungusların yetiştiği, adapte olduğu doğal çevrelerine benzer. [7].
9. Daha yüksek havalandırma kapasitesine sahiptir [2].
10. Oksijen sirkülasyonu daha iyidir [2].
11. Katabolik baskılama genellikle daha düşüktür [2].
12. Ürün kararlılığı daha yüksektir [2].
13. Kullanılan substratlar, bol ve ucuzdur. Ayrıca bu substratlar, DSF’de uygulanamaz [6].
14. Sporlarla inokulasyon, ortamda düzenli dağılımı kolaylaştırır [2].

Bu avantajlarının yanı sıra katı substrat fermentasyonunun büyük ölçekli uygulamasını zorlaştıran bazı dezavantajlar bulunmaktadır. Bu dezavantajlar da aşağıda verilmiştir:

1. KSF’de yalnızca düşük nem seviyesinde üreyebilen mikroorganizmalar (filamentli funguslar) kullanılabilir [2].

2. Substratlar genellikle ön uygulamaya ihtiyaç duyar (öğütme, parçalama, homojenizasyon, fiziksel, kimyasal ve enzimatik hidroliz, buhar uygulama gibi) [2].
3. Sıvı substrat fermentasyonuna göre biyokütle (üreme) miktarının saptanması zordur [2]. Çünkü, misel ve katı substrat arasındaki sıkı penetrasyon biyokütlenin tamamen elde edilmesini engeller [60].
4. Substratın katı olması, işlem parametrelerinde problem oluşturabilir (pH, nem içeriği ve substrat, oksijen ve kütle konsantrasyonu) [2].
5. Çalkalama, oldukça zor olduğundan statik koşullar veya modifiye sistemler tercih edilir [2].
6. Üreme esnasında oluşan metabolik sıcaklığın uzaklaştırılması oldukça zordur [2].
7. Temel, bilimsel ve mühendislik bilgileri açısından belirsizlikler vardır. Büyük ölçekli reaktörlerin dizaynı ve işlenmesi hakkındaki bilgiler çok azdır [2].
8. Bazı işlemlerde yüksek miktarda katı substrat konsantrasyonu nedeniyle ve oksijen sirkülasyonu zor olabilir [2].
9. Sporla üretime başlanacaksa, çimlenme ihtiyacı nedeniyle uzun lag süresine ihtiyaç duyulabilir [2].
10. Üretim süreci, DSF'ye göre daha uzundur [2].
11. İstenmeyen funguslarla kontaminasyon olasıdır [2].

1.5. Katı Substrat Fermentasyonunda Kullanılabilecek Bazı Biyoreaktörler (Fermentörler)

KSF uygulamalarında çeşitli tipte fermentörler kullanılabilir. Bu fermentörler bazı temel farklılıklar içermektedir.

- a) **İmmersiyon (daldırma) biyoreaktörü:** Yuvarlak tabanlı silindirik cam bir kaptan oluşur. Birkaç tane tel ağ kabı, üzerinde fungus üremiş katı substratla doldurulur ve biyoreaktör küvetinin içine yerleştirilir. Sıkıştırılmış hava ile çalışan bu sistem aşağı yukarı doğru hareket ederken üretim yapılır [3].
- b) **Sabit-yataklı biyoreaktör:** Üzerinde fungus üretilmiş katı substratla doldurulmuş kapalı cam bir kolondan oluşur. Nemli hava sürekli olarak verilir.

Karıştırma işlemi yoktur ve ucuzdur. En önemli dezavantajı, ısı uzaklaştırılmasının zayıf olmasıdır [3].

c) Dönen silindir biyoreaktör: Dönen bir silindir şeklindedir. Merkezi bir eksen etrafında dönen bir sistemle veya kap içerisindeki karıştırıcılarla karıştırma yapılır. En önemli dezavantajı ısı uzaklaştırılmasının zayıf olmasıdır. Katı substrat fermentasyonunda en çok kullanılan biyoreaktördür. Daha fazla materyalin işlenmesi sağlanır. Çeşitli boyutlarda (25-4000 L) modelleri vardır [3].

d) Tava tipi biyoreaktör: Tava tipi bir biyoreaktörde çok ince (1,2-2cm) katı substrat ortamında üretim yapılır. Biyoreaktörler, pasif havalandırma yapılan ve sıcaklığı kontrol edilen odalarda tutulur [3]. Bu tip biyoreaktörlerde, fermente olacak substrat miktarı sınırlıdır. Tava tipi biyoreaktörlerde zamanla pek fazla değişiklik olmamış yalnızca plastik ve alüminyum gibi daha modern materyaller kullanılmaya başlanmıştır. Tahta tablalar yerine plastik veya alüminyum tablaların kullanılması, sterilizasyon ve temizleme işlemlerini kolaylaştırmış bu da kontaminasyon riskini azaltmıştır [61].

e) Akışkan yataklı biyoreaktör: Sürekli hava akışının olduğu, üzerinde fungus tutunmuş katı partiküllerin hava ile sürekli hareket ettiği bir biyoreaktördür. Havalandırmanın iyi olması ve metabolik ısının etkin bir şekilde uzaklaştırılabilmesi bu reaktörün avantajları arasındadır. Fakat, maliyet yüksektir [3].

1.6. Katı Substrat Fermentasyonu ile Enzim Üretimi

Biyolojik katalizör olan enzimlerin hücre dışında veya içinde çalışabilmesi endüstri, çevre ve tıp alanlarında kullanılabilmelerini sağlamıştır. Bu nedenle enzim üretimi, biyoteknolojinin önemli bir uygulama alanıdır [45,62]. Pekçok ticari enzim, sıvı fermentasyon yöntemi ile üretilmektedir. Bununla birlikte son on yılda katı substrat fermentasyonu ile enzim üretimi üzerine ilgi artmıştır [45]. Az sayıda da olsa bazı enzimlerin KSF ile ticari üretimi yapılmaktadır.

Enzim üretiminde, üreteceğimiz enzime göre seçeceğimiz substrat çok önemlidir. Örneğin; lignince zengin organik atıkların kullanımı, lignin peroksidaz üretimini arttırırken yüksek oranda nişasta içeren pirinç kullanımı, amilaz üretimini arttırabilecektir [45]. Lakkaz enzimi, biyoteknolojik uygulama potansiyelinden dolayı

üzerinde yoğun ilgi olan bir enzimdir. En iyi lakkaz üreticileri beyaz çürükçül funguslar olduğundan sıvı veya katı substrat fermentasyonu sürecinde lakkaz üreticisi olarak üzerlerinde araştırma yapılmaktadır.

1.7. Beyaz Çürükçül Funguslar ve Biyoteknolojik Önemleri

Basidiomycetes sınıfına dahil olan beyaz çürükçül funguslar [63], doğadaki en etkin ligninolitik mikroorganizmalardır [64] ve odunda bıraktığı beyaz renkten dolayı beyaz çürükçül fungus olarak tanımlanmaktadır [65].

Odunun selüloz ve hemiselüloz bileşenlerinin yanı sıra, lignini de yıkabilirler. Yıkım yetenekleri sentezledikleri ligninolitik enzimler sayesinde [66]. Bu enzimler arasında en önemlileri lignin peroksidaz, mangan peroksidaz ve lakkazdır [67].

Beyaz çürükçül funguslar biyoteknolojik özelliklerine bağlı olarak çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır. Bunlar arasında;

- a) Ksenobiyotiklerin yıkımı [68]
- b) Atık suların biyolojik iyileştirilmesi [69]
- c) Boyaların renginin giderimi [6, 66, 69-73]
- d) Poliklorlu bifeniller, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, pestisitler ve sentetik polimerler gibi kirleticilerin yıkımı [52, 74-76]
- e) Biyolojik ağartma [69]
- f) Biyolojik kağıt hamuru üretimi [56, 57]
- g) Biyolojik iyileştirme (biyoremediasyon) [78-80]
- h) Mikrobiyal protein üretimi [81]
- i) Enzim üretimi (lakkaz, ligninaz gibi) [6, 10, 41] sayılabilir.

1.8. Lakkaz Enzimi ve Önemi

Fenolik ve fenolik olmayan bileşikleri oksitleme yeteneklerinden dolayı lakkazlar (benzendiol: oksidoredüktaz, E.C. 1.10.3.2) üzerine yoğun ilgi vardır.

Bu enzimler çeşitli organizmalarda geniş olarak yayılmış çoklu bakır oksidazlara dahil olan glikoproteinlerdir [82] ve fungal ligninolitik sistemde rol oynayan enzimlerden birisidir [83]. Yüksek derecede, spesifik olmayan oksidasyon kapasiteleri nedeniyle önemli biyokatalizörlerdir [84] ve çeşitli çevresel uygulamalarda kullanılabildiği için biyoteknolojik açıdan ayrıca önemlidir [41]. Lakkazlar ilk olarak

1883’ de Japon lake ağacı *Rhus venicifera* dan izole edilmiş olup [85] moleküler ağırlıkları 45 ile 110 kD arasında değişmektedir [86]. Lakkaz tipi fenol oksidazlar bakteriler ve böceklerden de izole edilmesine rağmen lakkazlar, bitki ve fungal lakkazlar olmak üzere 2 ana kategoriye ayrılabilir [87]. Bu enzimler beyaz çürükçül funguslar tarafından yüksek miktarda sentezlenebilmektedir [86].

Düşük substrat özgüllüğü sayesinde bu enzimler birçok biyoteknolojik uygulamada kullanılmaktadır. Bunlar arasında;

- a) Odun hamurundan lignin giderimi [88]
- b) Benzopiren, dioksin ve çeşitli ksenobiyotikler gibi toksik çevresel kirleticilerin yıkımı [89]
- c) Çevresel kirleticilerin biyolojik yıkımı [75]
- d) Polisiklik aromatik hidrokarbonların yıkımı [52]
- e) Fenolik kirleticilerin uzaklaştırılması [90]
- f) Pestisit transformasyonu [91]
- g) Boya ve tekstil atık suyunun renginin giderimi [6, 92]
- h) Biyolojik iyileştirme [80, 93]
- i) Besin endüstrisi [94]
- j) Biyosensör gibi uygulamalar sayılabilir [95].

1.9. Katı Substrat Fermentasyonu Sürecinde Beyaz Çürükçül Funguslarla Lakkaz Enzimi Üretimi

Beyaz çürükçül funguslarla lakkaz üretimine yönelik yapılan pek çok çalışma ligninolitik fungusların doğal yaşam şartlarını yansıtmayan sıvı ortamlarda gerçekleştirilmektedir [69]. Biyoteknolojik açıdan oldukça önemli olan bu enzimin üretiminde katı substrat fermentasyonu yöntemi de test edilmektedir. Beyaz çürükçül fungusların doğal çevrelerine benzeyen katı substrat fermentasyonu ortamlarında lakkaz dahil birçok enzim üretilir [67].

Çizelge 1.2’ de katı substrat fermentasyonu ile lakkaz üretiminde kullanılan bazı funguslar ve katı substratlar verilmiştir.

Çizelge 1.2 Katı substrat fermentasyonu ile lakkaz üretiminde kullanılan bazı tarımsal atıklar ve mikroorganizmalar

SUBSTRAT	MİKROORGANİZMA	KAYNAK
Buğday kepeği	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	[96]
	<i>Fomes sclerodermeus</i>	[97]
	<i>Lentinus tigrinus</i>	[21]
	<i>Ganoderma lucidum</i>	[98]
Hindistan cevizi kabuğu	<i>Trametes hirsuta</i>	[69]
Kivi atığı	<i>Trametes hirsuta</i>	[99]
Kestane kabuğu, arpa kepeği	<i>Coriolopsis rigida</i>	[10]
Muz atığı	<i>Trametes pubescens</i>	[6]
Üzüm çekirdeği	<i>Trametes hirsuta</i>	[41]
Arpa kepeği	<i>Trametes versicolor</i>	[100]
	<i>Coriolopsis rigida</i>	[52]
Şeker kamışı	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	[89]
Portakal kabuğu	<i>Trametes hirsuta</i>	[101]
Mısır koçanı	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	[102]
	<i>Lentinus edodes</i>	[103]

Bu çalışmada amacımız, laboratuvarımızda stok kültür olarak muhafaza ettiğimiz ve yüksek düzeyde lakkaz üreticisi olduklarını bildiğimiz 2 beyaz çürükçül fungusun (*Funalia trogii* ve *trametes versicolor*) katı substrat fermentasyonu ile lakkaz üretim yeteneklerini araştırmak ve çeşitli ek kaynaklarla lakkaz üretim yeteneklerini indüklemektir.

2. ÇALIŞMA İLE İLGİLİ KAYNAK ÖZETLERİ

Johann vd. [6] yaptıkları bir çalışmada, *Trametes pubescens* CBS696.94 ile ekstraselüler lakkaz üretimi için destek substrat olarak muz kabuğu kullanmışlardır. Muz kabuğu, yüksek karbohidrat içermesi, organik yapısının mikroorganizmalar ile kolay metabolize edilmesi ve destek materyali olarak fiziksel uyuma sahip olması nedeni ile seçilmiştir. Muz işleme endüstrileri, tarlalar, nehirler, okyanuslar ve boşaltım alanlarına dökülen yüksek miktarda katı atık üretir ve bu nedenle yeniden kullanımları, boşaltımları sonucunda meydana gelen kirlilik problemlerini çözmeye yardımcı olabilir. Yapılan çalışmada lakkaz üretimi 3.gün başlamış (63 U/L) ve kültür üretimin sonlarına doğru 1570 U/L aktivite saptanmıştır.

Rosales vd [104] *Trametes hirsuta*'nın katı ortam şartlarında lakkaz üretimini araştırmışlar ve arpa kepeği, çeşitli yiyecek atıkları, elma, portakal ve patates kabuğunu katı substrat olarak kullanılmışlardır. Katı substratlar ekonomik olmaları ve kolay elde edilebildikleri için seçilmişlerdir. Çalışmada ayrıca katı destek olarak naylon sünger kullanılmıştır. *T.hirsuta*, naylon süngerde üretildiğinde lakkaz aktivitesi 2. günde 217 U/L olarak saptanmışken 8.günde lakkaz aktivitesi 779 U/L'ye yükselmiştir. Arpa kepeği kültürlerinde ise lakkaz üretimi 4. günde başlamış (230 U/L) ve 8.günde en yüksek değerine ulaşmıştır (2247 U/L). Bu değer, destek olarak naylon süngerin kullanıldığı çalışmadan yaklaşık 3 kat daha yüksektir. Elma kabuğu kültürlerinde lakkaz üretimi en yüksek değerine üretimin 5. gününde 3148 U/L olarak ulaşmıştır. Bu değer, naylon sünger kültürleri ile elde edilen değerden 4 kat daha yüksektir. Destek olarak portakal kabuğu kullanıldığında ise lakkaz aktivitesi 6.günde, destek olarak naylon süngerin kullanıldığı kültürlerin lakkaz aktivitesinden 5 kat daha yüksek bulunmuştur (3437 U/L). *T. hirsuta* patates kabuğunda üretildiğinde ise 8.günde naylon sünger ortamındaki kültürlerden yaklaşık 7 kat daha yüksek olan lakkaz aktivite değeri göstermiştir (5372 U/L). Sonuçlar, besin atıklarının katı ortam şartlarında lakkaz aktivitesini arttırdığını göstermektedir. Bu destekler, atık olmaları nedeniyle işlemi daha ekonomik yapmakta ve aynı zamanda mikroorganizmalar için bazı besinleri sağlamaktadır.

Papinutti vd. [105] bir çalışmada temel substrat olarak buğday kepeğine dayalı doğal bir ortam kullanılarak, *Fomes sclerodermeus* ile ligninolitik enzim üretimini

amaçlamışlar ve en yüksek lakkaz aktivitesini 28.günde 9.9 U/mL olarak rapor etmişlerdir. Bu çalışmada, maliyetinin düşük olması nedeniyle doğal kültür ortamı kullanılmış ve ek kaynak olmadan yüksek enzim değerleri elde edilmiştir.

Yapılan bir çalışmada, beyaz çürükçül fungus *Trametes hirsuta*'nın lakkaz üretim yeteneği hindistancevizi kabuğu ortamında araştırılmıştır. Yapılmış olan çalışmada lakkaz üretimi 10.gün başlamış (19.075 nkat/L) ve 24. günde 333.280 nkat/L'ye yükselmiştir. 2mM bakır sülfat eklenmiş kültürlerde de lakkaz üretimi aynı şekilde 10.günde başlamış (13.015 nkat/L), fakat 22.günde lakkaz aktivitesi 920.895 nkat/L gibi yüksek bir aktiviteye ulaşmıştır. Bakır ile desteklenmiş olan kültürdeki değer, kontrol kültüründe elde edilen değerden yaklaşık 3 kat daha yüksek olduğu saptanmıştır. Elde edilen kültür sıvısının endüstriyel boya olan Lissamine Yeşil B' nin rengini giderim yeteneği araştırılmış ve 12 saatte %42 ile %66 arasında renk giderim değerleri elde edilmiştir. Fermentasyon ortamına direkt yeşil B eklendiğinde boyanın desteğe ve fungal misellere bağlanması nedeni ile absorbansın aniden düştüğü gözlenmiştir. Bununla birlikte, kültür ortamında renk gideriminin meydana geldiği ve 2.5 saat içinde koyu maviden açık yeşile dönüşüp rengin %96' dan daha yüksek oranda giderildiği saptanmıştır. Mikroorganizma varlığındaki renk giderimi yüzdesinin ekstraselüler sıvı ile elde edilen renk giderimi yüzdesinden daha yüksek olduğu ve renk gideriminin daha kısa zamanda gerçekleştiği rapor edilmiştir [69].

Yürütülen diğer bir çalışmada, *Corioloropsis rigida*'nın lakkaz üretim yeteneği üzerine kolay erişilebilirlikleri ve düşük maliyetleri nedeniyle seçilen kestane kabuğu ve arpa kepeğinin etkisi araştırılmıştır. Arpa kepeğinin katı substrat olarak kullanıldığı çalışmada en yüksek lakkaz aktivitesi 3.10^5 nkat/L olarak saptanmıştır. Bu değer kestane kabuğunun substrat olarak kullanıldığında elde edilenden yaklaşık olarak 25 kat daha yüksek bir değerdir. 1mM bakır eklenmiş arpa kepeği ortamında üretilen kültürlerden elde edilen ham enzim içeren sıvılar ile üç farklı boyanın (indigo karmin, metil oranj ve metil yeşil) yıkımı araştırılmıştır. Yapısal olarak farklı olan bu üç boyanın lakkaz ile renginin farklı oranda giderildiği gözlenmiştir. İndigo karmin' in, 4 saat uygulamadan sonra renginin yaklaşık %100 giderildiği buna karşın metil yeşil (%90) ve metil oranjın (%80) lakkaz enzimi ile renk giderimine karşı daha dirençli olduğu saptanmıştır [10].

Souza vd. [67] buğday kepeği kullandıkları çalışmada *Pleurotus pulmonarius*' in lakkaz üretim yeteneğini araştırmışlar ve maksimum lakkaz üretimini %75 nem içeriği olan koşullarda 5 günlük kültür filtratında 8600 U/g olarak bulmuşlardır.

Couto vd. [41] yaptıkları diğer bir çalışmada *Trametes hirsuta*' da lakkaz üretiminde substrat olarak üzüm çekirdeklerinin etkisini araştırmışlardır. Şarap endüstrisi atığı olan üzüm çekirdekleri, destek materyali olarak uygun olmaları, karbon kaynağı olmaları, kolay elde edilebilmeleri ve maliyetlerinin düşük olması nedeni ile seçilmiştir. Bu çalışmada laboratuvar ölçekli biyoreaktörler kullanılmıştır (Tava tipi biyoreaktör ve İmmersiyon biyoreaktör). Tava tipi biyoreaktörlerde üzüm çekirdekleri, naylon sünger ve ortam konulup statik olarak 30°C de inkübasyona kaldırılmıştır. İnkübasyonun 4. gününde yaklaşık $3,3 \cdot 10^4$ nkat/L lakkaz aktivitesi saptanmış, kültür oluşumunun son günlerinde $2,5 \cdot 10^5$ - $3 \cdot 10^5$ gibi yüksek lakkaz aktiviteleri elde edilmiştir. İmmersiyon biyoreaktörü ise, silindirik cam küvetten oluşmaktadır. Tel ağ kabı, üzerinde fungus üremiş üzüm çekirdekleri ile doldurulmuş ve biyoreaktör tankının içine yerleştirilmiştir. Sistem 90 saniye dışarıda 10 saniye ortam içinde olacak şekilde aşağı yukarı hareket ettirilmiş ve tava tipi biyoreaktörde elde edilen verilerin immersiyon biyoreaktöründe elde edilen değerlerden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bunun sebebi, immersiyon biyoreaktöründe karıştırmanın fungus üzerinde mekanik strese neden olması ve bununla lakkaz üretimini baskılaması olabilir. Bu nedenle, bu çalışma için en uygun konfigürasyonun tava biyoreaktörü olduğu rapor edilmiştir.

Rodriguez vd. [90] katı ve sıvı ortamlarda *Pleurotus* türleri ile fenolik ve fenolik olmayan aromatik kirleticilerin yıkımını araştırmışlar ve *Pleurotus* türlerinin katı substrat olarak buğday kepeği içeren ortamlarda aromatik kirleticilerin yıkımında kullanılabileceğini rapor etmişlerdir.

Yapılan bir diğer çalışmada ise beyaz çürükçül fungus *Pleurotus pulmonarius* ile in vivo şartlar altında katı ortam sistemlerinde endüstriyel boyaların renginin giderimi amaçlanmıştır. Glukoz/amonyum tartarat eklenmiş mısır koçanı üzerinde *P. pulmonarius* kültüre edilmiş ve yapısal olarak farklı olan boyaların renginin giderimi gözlenmiştir. 6 günlük inkübasyon sonucunda, amido siyah, Kongo kırmızısı, Tripan mavi, Metil yeşil, Remazol brilliant mavi R (RBB), Metil menekşe, Etil menekşe ve Brilliant kresil mavi boyalarının rengi tümüyle giderilirken, Metilen mavi ve Poly R-478 boyalarının rengi kısmen giderilebilmiştir. Fungus kültürlerinin renk giderim kapasitesinin yüksek lakkaz aktiviteleri sonucu olduğu bildirilmiş ve bu çalışmada 6 gün inkübasyon sonucu 480 U/ml lakkaz aktivitesi rapor edilmiştir. *P. pulmonarius*' un katı ortam kültürleri boya içeren endüstriyel atık sularının arıtımında etkin bir uygulama olabilir [71].

Trametes hirsuta'nın lakkaz üretimi için destek-substrat olarak kivi atığının etkisinin araştırıldığı diğer bir çalışmada amonyum konsantrasyonu, kullanılan substratın miktarı, substrata ön-uygulama ve kullanılan kivi atığının farklı kısımlarının kullanılmasının lakkaz üretimine etkisi araştırılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda en yüksek lakkaz aktivitesi, 2.5 g kivi atığı ile 0.150 g/l amonyum konsantrasyonunda yaklaşık 90,000 nkat/L olarak saptanmıştır [99].

Fomes sclerodermeus'un enzim üretim yeteneği, soya ve buğday kepeği kullanılarak test edilmiştir. Çalışmada, soya kepeği ortamında selüloz, ksilanaz ve pektinaz için en yüksek aktivite, fermentasyonun 12. gününde saptanırken, mangan peroksidaz (MnP) aktivitesi 15.günde 14.5 U/g değerine ulaşmış ve lakkaz aktivitesi de uygulamanın 28. gününde 520 U/g olmuştur. Buğday ve soya kepeği 1:1 oranında karıştırıldığında ise soya kepeğinin yalnızca substrat olarak kullanımına göre pektinaz için 3 kat daha yüksek bir değer elde edilmiştir. Bununla beraber, ligninazların değerleri düşmüş ve MnP ve lakkaz aktiviteleri de sırasıyla 4.64 ve 66.7 U/g olarak saptanmıştır. *F. sclerodermeus*'un enzim üretiminin, kullanılan substrata göre farklılık gösterdiği rapor edilmiştir [97].

Lentinus edodes ve farklı *Pleurotus* türlerinin enzim üretim yeteneklerinin test edildiği diğer bir çalışmada, substrat olarak mandalina, elma ve muz kabukları kullanılmıştır. En yüksek lakkaz aktivitesi *Pleurotus* türleri ile katı fermentasyon sürecinde 4103 U/L olarak saptanmıştır [106].

Rosales vd. [101] yaptıkları bir çalışmada lakkaz indükleyici bileşiklerin (syringaldazine ve bakır) etkisini test etmişler ve yapılan çalışmada, *Trametes hirsuta*'nın lakkaz üretimi için destek-substrat olarak portakal kabuğu seçilmiştir. En yüksek lakkaz aktivitesi, 2.5 g portakal kabuğu ve 5 mM bakır sülfat kullanıldığında 31,786 U/L olarak elde edilmiştir. Katı ortam şartları altında *T.hirsuta* ile lakkaz üretimi için yüksek miktarda şeker, selüloz ve pektin içermeleri nedeniyle portakal kabuklarının uygun destek-substrat olduğu bildirilmiştir.

Benzer olarak Souza vd. [107] *Pleurotus pulmonarius*'in buğday kepeği ortamında enzim üretim yeteneğini araştırmışlardır. Buğday kepeğinde etkin lakkaz indükleyicileri olan fenolik bileşiklerden ferulik, vanilik, ve *p*-kumarik asiti gibi bazı maddeler bulunmaktadır. Yani buğday kepeğinin lakkaz indükleme kapasitesi fenolik içeriği ile de ilgili olabilir. Bu çalışmada maksimum lakkaz üretimi, en yüksek nem içeren (%91) kültürlerde elde edilmiştir. Çalışmada, 20 günlük kültür filtratında lakkaz aktivitesi 24,000 U/g substrat olarak saptanmıştır.

Souza vd. [96] yaptıkları bir diğer çalışmada ise, buğday kepeği katı ortamında *Pleurotus pulmonarius* ile üretilen lakkazı saflaştırmışlar ve karakterizasyonunu yapmışlardır. Bu arada, lakkazın iki izoformu tespit edilmiştir. Substrat olarak syringaldazine kullanıldığında spesifik aktivite 19,750 U/mg protein olarak belirlenmiş ve lakkazın moleküler ağırlığı da 46 kDa olarak tespit edilmiştir.

Pleurotus pulmonarius' un lakkaz üretimine bakırın etkisinin araştırıldığı diğer bir çalışmada katı substrat olarak mısır koçanı kullanılmıştır. Çeşitli metallerin lakkaz üretimine etkisini belirlemek için temel ortam (glukoz-amonyum tartarat-mısır koçanı tozu) Cu^{2+} , Ag^+ , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} ve Zn^{2+} ile desteklenmiştir. Ag^+ , Cd^{2+} , Hg^{2+} organizmalar üzerine yüksek oranda toksik olduğundan kültürlerde oldukça düşük oranda üreme gözlenmiştir. Kültür ortamına 15 mM bakır ve mangan eklendiğinde lakkaz aktivitesi gözlenmiştir. Magnezyum ise ne üremede ne de lakkaz aktivitesi üzerine etki yapmamıştır. 25mM CuSO_4 eklenen kültür ortamında 1,420 U/L ve kontrol kültürlerinde 270 U/L lakkaz aktivite değerleri elde edilmiştir. Bakır eklenmesi enzim aktivitesini 8 kat arttırmıştır. Bu çalışmada, 10 mM dan daha yüksek bakır ilavesinin dahi herhangi bir inhibisyona neden olmadığı ve fungusun bakıra karşı yüksek ölçüde direnç gösterdiği bildirilmiştir [102].

Couto vd. [108] *Trametes versicolor* ile yapmış oldukları çalışmada farklı biyoreaktörler kullanarak lakkaz üretimini araştırmışlardır. Bunun için immersiyon, genişletilmiş yatak ve tava tipi olmak üzere 3 laboratuvar ölçekli biyoreaktör seçmişlerdir. Destek olarak ise naylon sünger ve arpa samanı kullanılmıştır. Arpa samanı kullanılan biyoreaktörlerde naylon sünger kullanılanlara göre daha yüksek lakkaz aktiviteleri elde edilmiştir. Kullanılan biyoreaktörler arasında en yüksek lakkaz aktivitesi tava tipi biyoreaktörde elde edilmiştir. Tava tipi biyoreaktörde naylon sünger kullanıldığında kültür oluşumunun 18. gününde 343 U/L lakkaz aktivitesi elde edilirken, arpa samanı substrat olarak kullanıldığında 18. günde 3500 U/L lakkaz aktivitesine ulaşılmıştır. Bu da yaklaşık 10 kat daha yüksek enzim aktivitesi demektir. Lignoselülozik substrat kullanılarak *Trametes versicolor* ile lakkaz üretiminde tava tipi biyoreaktörün uygun olduğu rapor edilmiştir.

Couto vd. [109] yapmış oldukları diğer bir çalışmada ise *Trametes hirsuta* ile katı ortam şartlarında lakkaz üretimini ve renk giderim kapasitelerini araştırmışlardır. Katı substrat olarak yerfıstığı kabuklarını ve yerfıstığı tohum atıklarını kullanılmıştır. Yerfıstığı kabuğunun kullanıldığı kültürlerde lakkaz üretimi 6. günde başlamış (41.2 nkat/L) 12. günde en yüksek değerine ulaşmıştır (177.8 nkat/L). Buna karşın substrat

olarak yerfıstığı tohumları kullanıldığında ise lakkaz üretimi 7. günde başlamış (3.7 nkat /L) 14.günde 700 nkat/L değerine ulaşmıştır. Yerfıstığı kabuklarına göre yaklaşık 10 kat daha yüksek lakkaz aktivite değeri elde edilmiştir. Bunun yanı sıra bu kültürlerden elde edilen süpernatantlar ile 3 farklı boyanın (Nickel (II) fitalosiyenin, Lissamin yeşil B ve Asit siyah 48) renginin giderimi araştırılmıştır. Yerfıstığı kabuklarından elde edilen süpernatantlar sadece Asit siyah 48'in rengini giderirken, yerfıstığı tohumlarından elde edilen süpernatantların her 3 boyanında rengini giderebildiği rapor edilmiştir.

Phlosticta spp. ve *Aspergillus spp.* ile yapılan diğer bir çalışmada muz atığının mikrobiyal yıkımı test edilmiş ve çeşitli lignolitik enzimlerin üretim yetenekleri araştırılmıştır. Test edilen enzimlerden biri olan lakkaz enziminin aktivitesi *Aspergillus spp.* ile 20. günde yüksek değerine ulaşmıştır(2.8309 U/mg). *Phlosticta spp.*' de ise en yüksek lakkaz aktivitesi 20. gün 2.726 U/mg olarak rapor edilmiştir [110].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Funguslar

Çalışmada Basidiomycetes sınıfına dahil olan beyaz çürükçül funguslardan *Funalia trogii* ATCC 200800 ve *Trametes versicolor* ATCC 200801 kullanıldı. Bu funguslar İnönü Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji/Biyoteknoloji laboratuvarında saf kültür olarak muhafaza edilmektedir.

3.2. Çalışmada Kullanılan Fungusların Üretimi ve Saklanması

Çalışmada kullanılan fungusların devamlılığını sağlamak için, funguslar Sabouraud dextrose agar (SDA) plaklarında 30 °C'de 4-6 gün inkübe edildi ve her 4-5 haftada bir taze besiyerine pasajlama yapıldı. Fungus kültürleri 4 °C'de buzdolabında saklandı.

3.3. Çalışmada Kullanılacak Stok Fungus Kültürlerinin Hazırlanması

SDA plaklarında üremiş olan fungus kültürlerinden yatık agara pasajlama yapıldı ve 30 °C'de 4-6 gün inkübe edildi. Yatık agarda üretilen fungus kültürlerine 10 ml steril distile su eklenerek misel süspansiyonu hazırlandı. Misel süspansiyonundan 5 ml alınarak 100 ml Sabouraud dextrose broth (SDB) içeren 250 ml'lik erlenlere ekim yapıldı ve 30°C'de 150 rpm'de çalkalamalı etüvde 5 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kültür, düşük devirde homojenize edilerek çalışmanın amacına uygun olarak ekim yapıldı.

3.4. Çalışmada Kullanılan Nemlendirme Sıvılarının Hazırlanması

Çalışmada nemlendirme sıvısı olarak alkol fabrikası atık suyu (vinas), zeytinyağı fabrikası atık suyu (ZYFA), şeker fabrikası atık suyu olan melas ve peyniraltı suyu gibi doğal besiyerleri %25, %50 ve %100 konsantrasyonlarda kullanıldı. Doğal besiyerlerinin dışında sentetik besiyeri olarak stok temel ortam (STO) kullanıldı. STO, 1000 ml distile suda; 0.2 g KH₂PO₄, 0.1 g CaCl₂.2H₂O, 0.05 g MgSO₄.7H₂O, 0.5 g NH₄H₂PO₄, 0.035 g FeSO₄.7H₂O, 2 g glukoz, 1 g maya özütü olacak şekilde

hazırlandı. Bu besiyerleri 121⁰C’de 1 atm. basınç altında 20 dakikada otoklavda steril edildi.

3.5. Çalışmada kullanılan katı substrat

Çalışmada katı substrat olarak buğday kepeği kullanıldı. Buğday kepeği besin içeriği, kolay erişilebilirliği ve maliyetinin düşük olması nedeniyle tercih edildi.

3.6. Katı substrat ortamının hazırlanması, ekim ve üretim

Öncelikle 5g buğday kepeği/250 mL erlenlerde olacak şekilde hazırlandı ve 15 ml nemlendirme sıvıları her bir erlene eklendi. Daha sonra 121⁰C’de 1 atm. basınç altında 45 dakika süresince otoklavda steril edildi. Her bir erlene 2 ml olacak şekilde fungus ekilmiş ve örnekler 30⁰C’de statik olarak 5 ve 10 gün süresince inkübasyona bırakıldı. Çalışma en az 3 tekrarlı olacak şekilde yürütüldü.

İnkübasyonun 5. ve 10. gününde steril her bir erlene 40 ml distile su eklendi ve buğday kepeği içine tamamen penetre olmuş olan fungus öze ile karıştırılarak parçalandı. Erlenler 30⁰C ve 200 rpm’ de 1 saat süre ile çalkalamalı etüvde çalkalandı ve 1 saat sonunda örnekler etüvden çıkarılıp süzüldü. Süzüntü, 4000 rpm’ de 15 dakika santrifüj edildi ve süpernatant, lakkaz aktivitesi ve protein miktarlarının ölçümünde kullanıldı.

3.7. İndükleyicilerin lakkaz üretimine etkisinin belirlenmesi

Katı substrat fermentasyonunda, indükleyicilerin etkisini test etmek amacıyla farklı konsantrasyonlarda CuSO₄.5H₂O (1, 2, 5 ve 10 mM), 2,5-ksilidin (0.1, 1 ve 2 mM), maya özütü (1g/L, 5g/L ve 10 g/L), glukoz (%1, %5, %10 ve %20) ve pepton (%1, %5 ve %10) kullanıldı. Bu indükleyiciler, bahsettiğimiz konsantrasyonlarda olacak şekilde nemlendirme sıvılarına ekenerek 121⁰C’de 1 atm. basınç altında steril edildikten sonra kullanıldı.

3.8. Lakkaz Aktivitesinin saptanması

Lakkaz aktivitesi 2,2'-azino-bis (3- etilbenz-tiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS)' in oksidasyonuna bağlı olarak izlendi.

Enzim aktivitesi ölçümünde reaksiyon karışımı 833 µL sodyum asetat tamponu (100 mM, pH 5.0), 100 µL ABTS (5mM) ve uygun miktarda süpernatant olacak şekilde hazırlandı ve enzim aktivitesi 420 nm de 1 dakikada okunan absorbanst değişimi (Shimadzu-UV-1601, UV/Visible) olarak belirlendi. 1 µmol substratı 1 dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarı 1 ünite olarak ifade edildi.

3.9. Toplam Protein Tayini

Toplam protein miktarı, mikropilaka okuyucu sistemi (Molecular Devices Corp., Versamax) kullanılarak Bradford yöntemine göre [111] saptandı. Bunun için 5 µL örnek ve 250 µL Bradford ayırıcı eklenen mikropilakalar sistemde 15 saniye çalkalandıktan sonra 15 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi ve renk değişimine bağlı olarak oluşan absorbanst değişimi 595 nm dalga boyunda ölçüldü. Elde edilen değerler, sığır serumu albumini (BSA) kullanılarak çizilmiş standart grafik değerleri ile karşılaştırılarak, örneklerdeki toplam protein değerleri paket program (Slide) kullanılarak hesaplandı. Ölçümler en az üç tekrarlı olarak yürütüldü.

3.10. pH ölçümü

pH ölçümü, pH metre ile yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Beyaz Çürükçül Funguslarla Katı Substrat Ortamında Lakkaz Üretimi

Çalışmada öncelikle beyaz çürükçül fungusların distile su ile nemlendirilmiş katı ortamlarda lakkaz üretim yetenekleri araştırıldı ve en yüksek lakkaz üretim yeteneği olan fungusların *F. trogii* ve *T. versicolor* olduğu gözlemlendi. Üretimin 5. gününde *F.trogii* kültür ortamında 2.78 ± 0.33 U/ml ve *T.versicolor* kültür ortamında 4.03 ± 0.43 U/ml lakkaz aktivitesi saptanırken, 10. günde sırasıyla $3.16 \pm 0,65$ U/ml ve 3.05 ± 0.74 U/ml aktiviteler gözlemlendi.

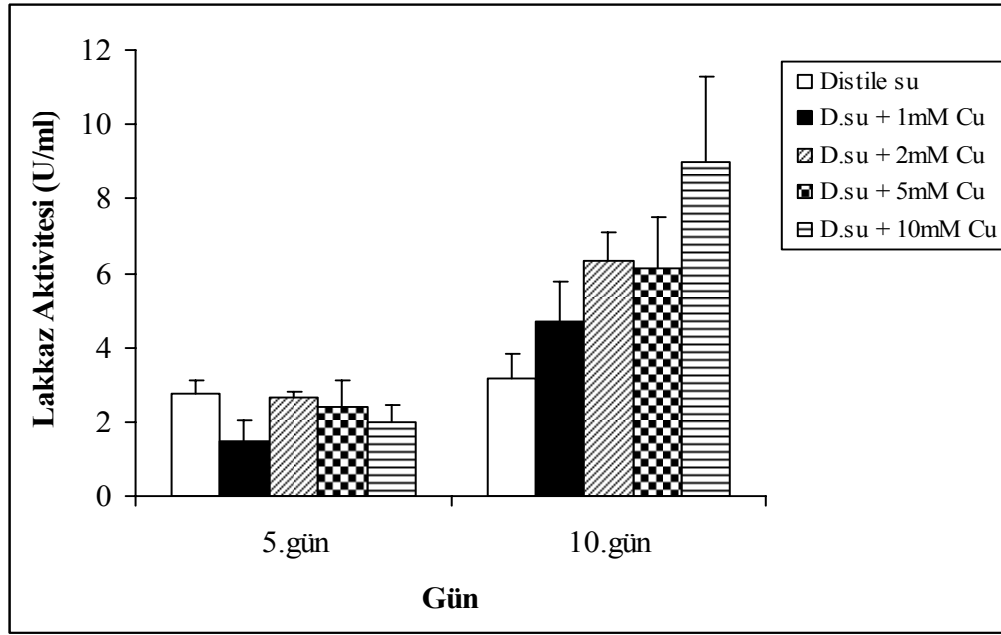
Bu nedenle katı substrat ortamında yüksek oranda lakkaz ürettikleri gözlenen *F. trogii* ve *T. versicolor*, çalışmamızın bundan sonraki tüm aşamalarında kullanıldı.

4.2. *F. trogii* ile Yürütülen Katı Substrat Fermentasyonu Çalışmaları

4.2.1. *F. trogii* ile distile su ile nemlendirilmiş katı substrat ortamında lakkaz üretimi

Distile su ile nemlendirilmiş katı substrat ortamlarında, bakırın *F. trogii*'nin lakkaz üretim yeteneğine etkisi test edildi ve özellikle 10.gün için kullanılan tüm bakır konsantrasyonlarının fungusun lakkaz üretim yeteneğini indüklediği gözlemlendi (Şekil 4.1).

Bu ortamlarda ayrıca protein miktarı da saptandı ve bakır eklenmesinin protein miktarı üzerinde negatif etki yaptığı gözlemlendi (Çizelge 4.1).



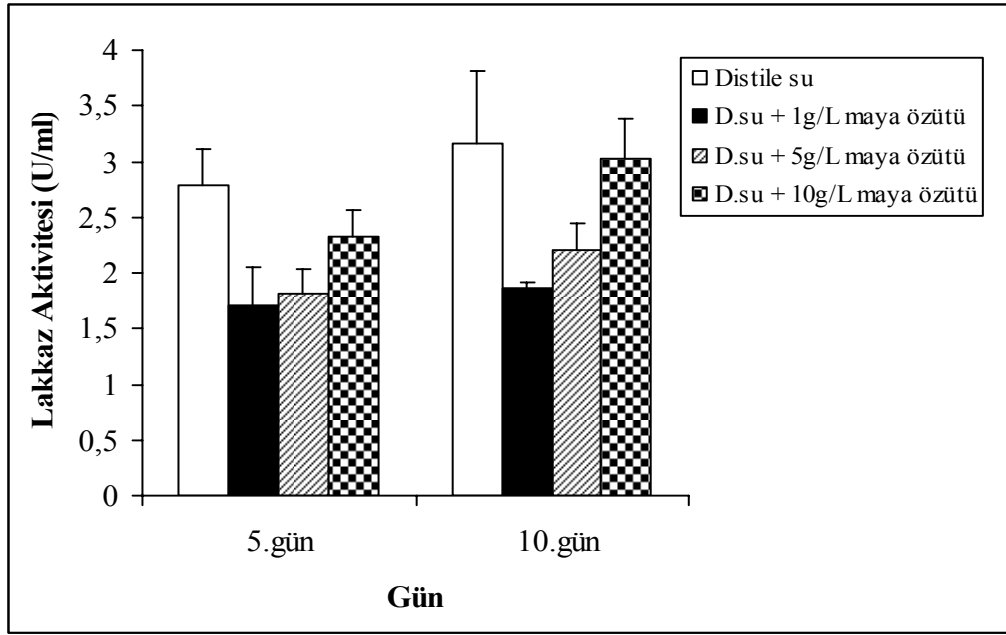
Şekil 4.1. *F. troglia*’nin bakır içeren distile su ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi

Çizelge 4.1. *F. troglia*’nin bakır içeren distile su ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde ortam protein miktarı değişimi

Ortam	Protein miktarı (mg/ml)	
	5.gün	10.gün
Distile su	0.460 ± 0.038	0.427 ± 0.036
D.su + 1mM Cu	0.386 ± 0.052	0.419 ± 0.010
D.su + 2mM Cu	0.403 ± 0.015	0.417 ± 0.043
D.su + 5mM Cu	0.310 ± 0.040	0.344 ± 0.051
D.su + 10mM Cu	0.249 ± 0.015	0.348 ± 0.047

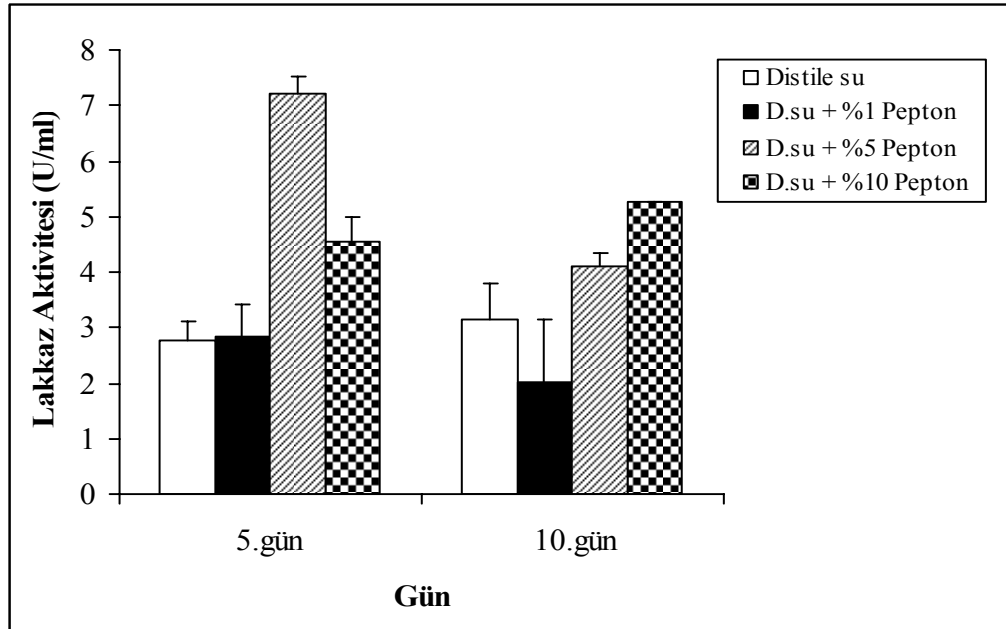
Bakır uygulanmamış kontrolün lakkaz aktivitesi 10. günde 3.16 ± 0.65 U/ml iken 10 mM bakır uygulandığı durumda 8.97 ± 2.34 U/ml’ye ulaştı.

Katı substrat ortamına maya özütü ilave edildiğinde herhangi bir pozitif etki olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.2). En yüksek lakkaz aktivitesi, kontrol grubu olan distile su ortamında üretimin 10. gününde 3.16 ± 0.333 U/ml olarak saptanırken maya özütü ilave edilen örneklerde en yüksek lakkaz aktivitesi 10.günde 3.02 ± 0.238 U/ml olarak saptandı.



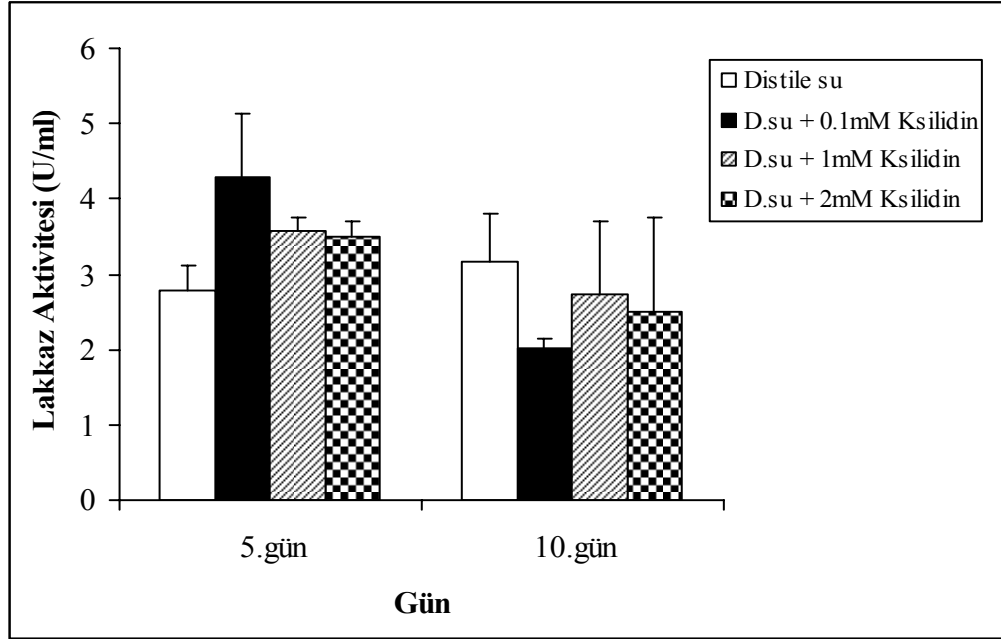
Şekil 4.2. *F. trogii*'nin maya özütü içeren distile su ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi

Azot kaynağı olarak eklenen pepton özellikle % 5 ve %10 olarak eklendiği yüksek konsantrasyonlarda, fungusun lakkaz üretim yeteneği üzerine pozitif etki yaptı ve 5. günde %5 pepton içeren ortamda 7.20 ± 0.32 U/ml enzim aktivitesine ulaştı (Şekil 4.3).



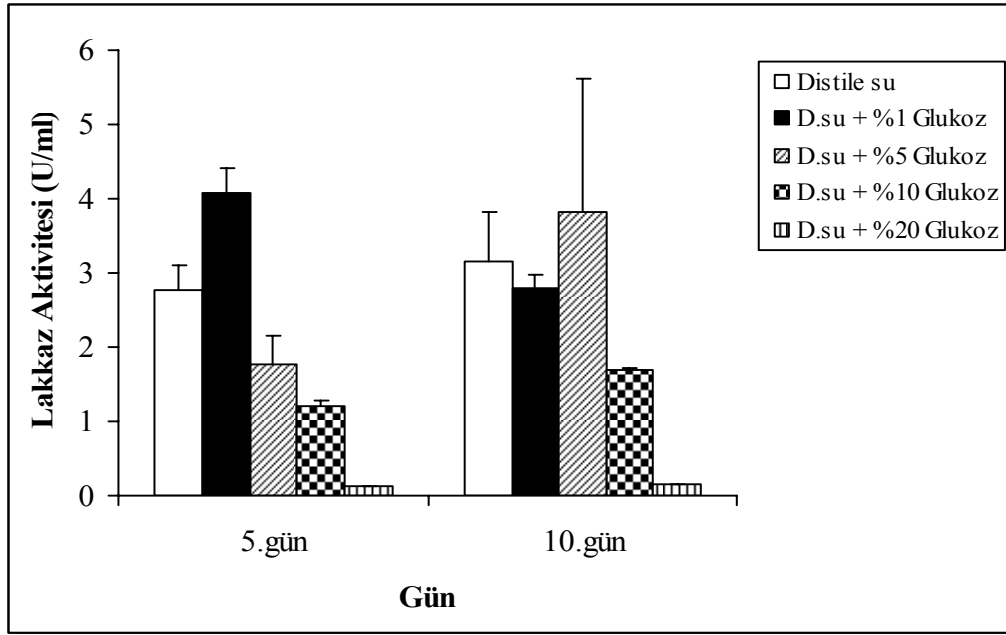
Şekil 4.3. *F. trogii*'nin pepton içeren distile su ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi

Ksilidin, fungusların lakkaz üretim yeteneğini indüklemek için yoğun olarak kullanılan bir bileşiktir. Çalışmada, *F. trogl*i üretim ortamına ksilidin eklenmesi 5. gün için az da olsa pozitif etki yaparken, 10.günde pozitif bir etkisinin olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. *F. trogl*i' nin ksilidin içeren distile su ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi

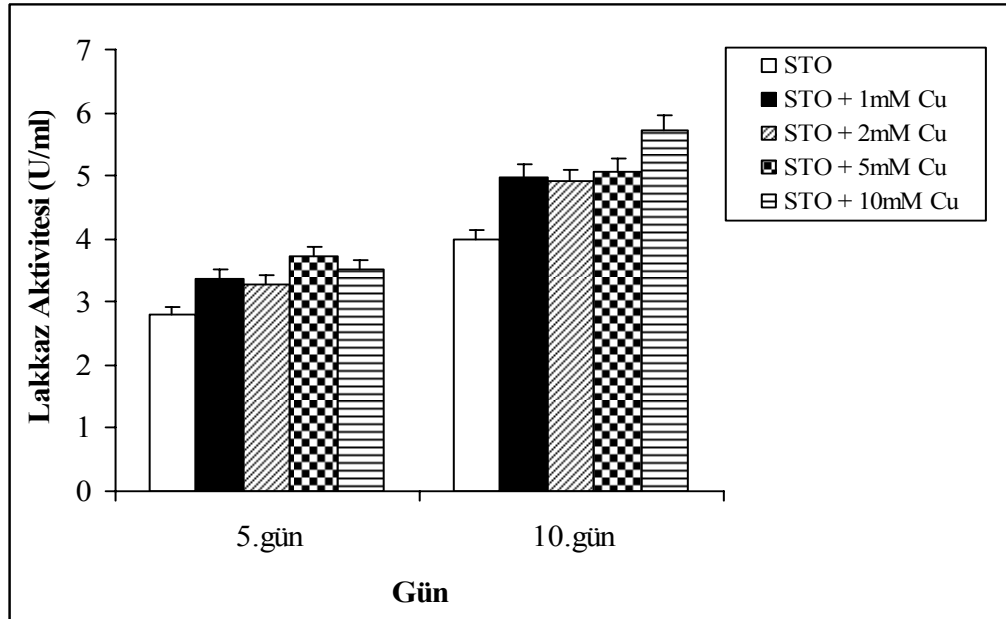
Düşük konsantrasyonlarda glukozun lakkaz üretimini indüklediği gözlenirken özellikle %10 ve %20 konsantrasyonlarda glukoz varlığı lakkaz üretimine negatif bir etki yaptı. Bu da glukozun katabolit baskılama yapabilme olasılığını akla getirmektedir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. *F. trogii*'nin glukoz içeren distile su ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi

4.2.2. *F. trogii* ile stok temel ortam ile nemlendirilmiş katı substrat ortamında lakkaz üretimi

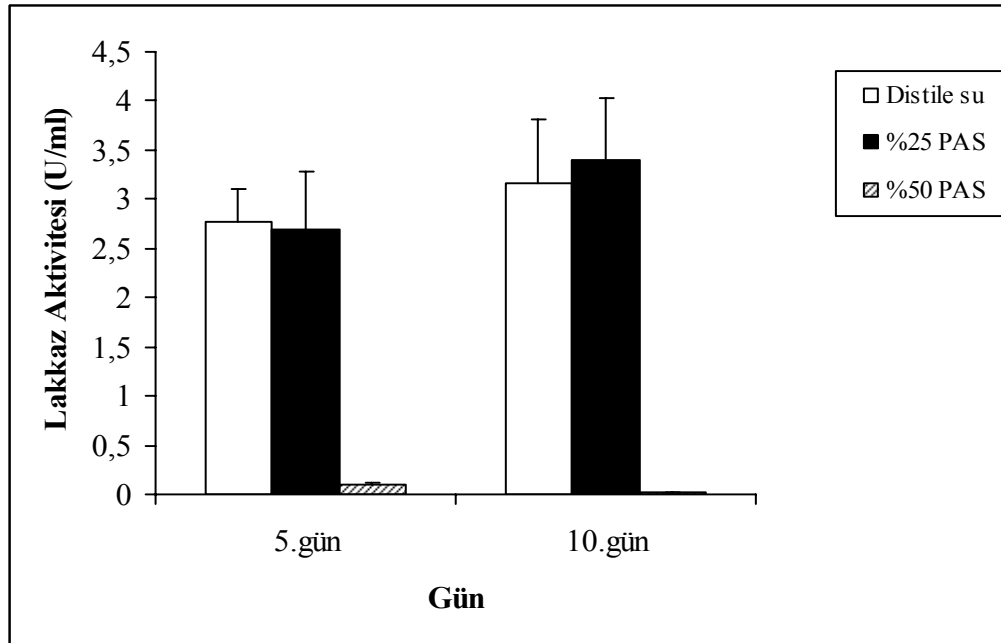
Stok temel ortam (STO) ile nemlendirilmiş katı substrat ortamlarında bakırın *F. trogii*'nin lakkaz üretim yeteneğine etkisi araştırıldığında, kullanılan tüm bakır konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre artış gözlemlendi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. *F. trogii*'nin bakır içeren stok temel ortam (STO) ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi

4.2.3. *F. trogii*' nin peyniraltı suyu (PAS) ile nemlendirilmiş ortamlarda lakkaz üretimi

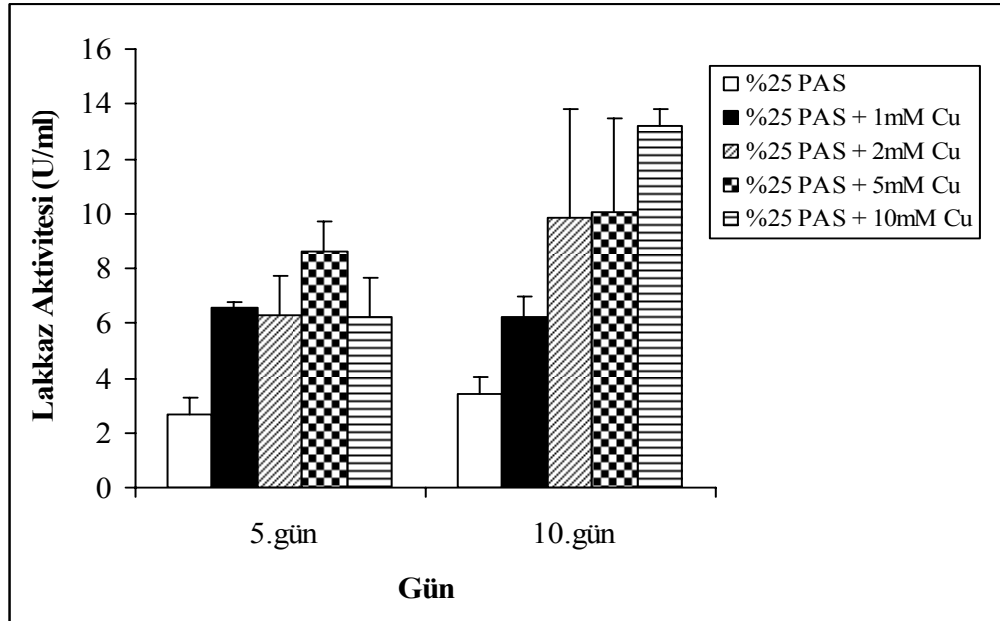
Peynir sütün pıhtılaşmasıyla yapılır. Pıhtılaşmadan sonra oluşan katı kısımdan (lor) ayrılan sıvı peynir altı suyudur [112]. Peynir için işlenen 100 kg sütün yaklaşık 90 kg' ının peynir altı suyu olarak oluştuğu ve ülkemizde yılda 40,000 ton peynir üretildiği ve bu durumda 360,000 ton peynir altı suyu oluştuğu Çevre ve Orman Bakanlığı tarafından bildirilmiştir. Yani peyniraltı sularının doğaya verilmesi hem önemli ölçüde besin kaybına hem de arıtılmadan alıcı ortamlara verildiğinde çevre kirliliğine neden olmaktadır [113]. Aynı zamanda bu atıksu, protein, vitamin ve minerallerin yanısıra yaklaşık olarak süt laktozunun %50 sini de içermektedir [112]. Bu nedenle çalışmamızda zengin içeriğinden dolayı önemli ölçüde çevre kirliliğine neden olan peynir altı suyunun lakkaz üretimine etkisi test edildi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. *F. trogii*' nin farklı konsantrasyonlarda PAS ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi

Peyniraltı suyu düşük konsantrasyonlarda uygulandığı zaman lakkaz üretimini pozitif olarak etkilerken, yüksek konsantrasyonlarda uygulandığında lakkaz üretimini negatif yönde etkilediği gözlemlendi (Şekil 4.7).

Peyniraltı suyu ile nemlendirilmiş katı ortamda bakırın etkisini test ettiğimizde ise hem üretimin 5. gününde hemde 10. gününde bakırın tüm konsantrasyonlarda lakkaz üretimini önemli ölçüde arttırdığı görüldü (Şekil 4.8).



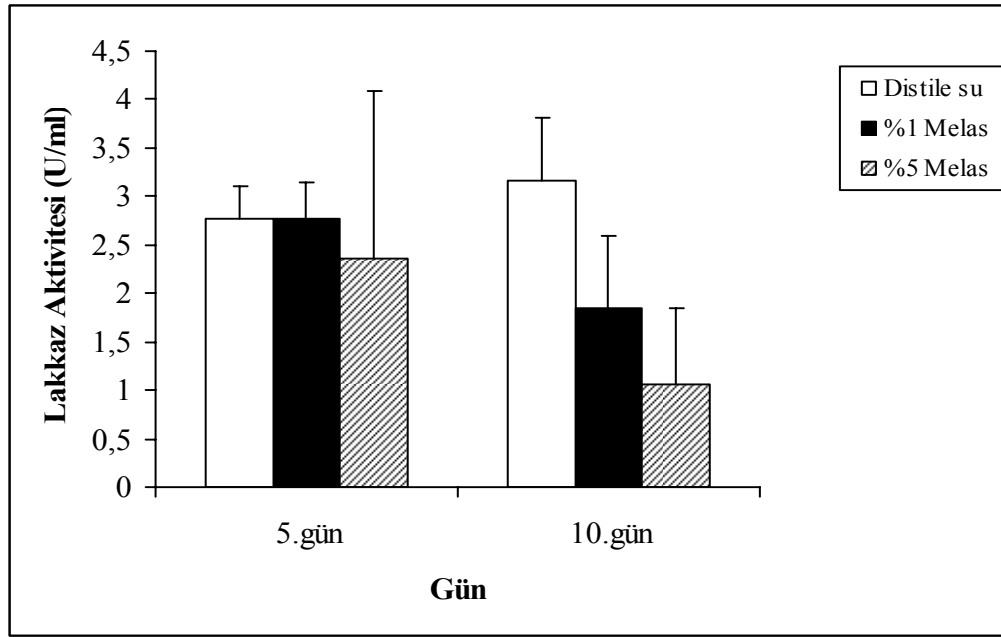
Şekil 4.8. *F. troglitii*'nin bakır içeren PAS ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi

Özellikle üretimin 10.gününde bakır uygulanmamış kontrolde lakkaz aktivitesi 2.70 ± 0.62 U/ml iken, 10mM bakır uygulandığında 13.23 ± 0.58 U/ml'ye ulaştı. Bu da yaklaşık 5 kat daha yüksek lakkaz aktivitesine karşılık gelmektedir.

4.2.4. *F. troglitii*'nin melasla nemlendirilmiş ortamlarda lakkaz üretimi

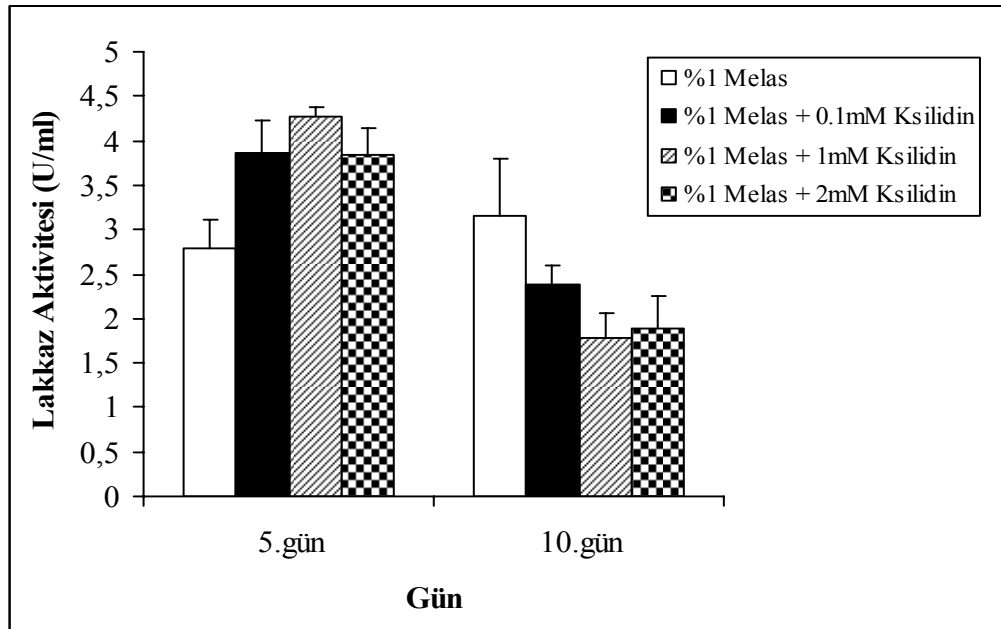
Melas, şeker elde etmek için şeker pancarının işlenmesi sırasında ortaya çıkan koyu kahve renkli koloidal atık bir maddedir. Şeker fabrikasında işlenen her 100 kg şeker pancarında 4 kg kadar melas oluşmaktadır. İçeriğinde kompleks polisakkaritler, invert şekerler, karbonhidrat olmayan bileşikler, koyu kahve renkli azot içeren polimerik bileşikler, inorganik iyonlar, malik asit, laktik asit, formik asit, asetik asit ve propiyonik asit gibi organik asitler bulunmaktadır [114]. Zengin içeriğinden dolayı katı ortamda lakkaz aktivitesini indüklemek amacıyla nemlendirici olarak test edildi (Şekil 4.9).

Şekil 4.9'dan da görüldüğü gibi melas kullanımı, lakkaz üretimine herhangi bir pozitif etki yapmadı.



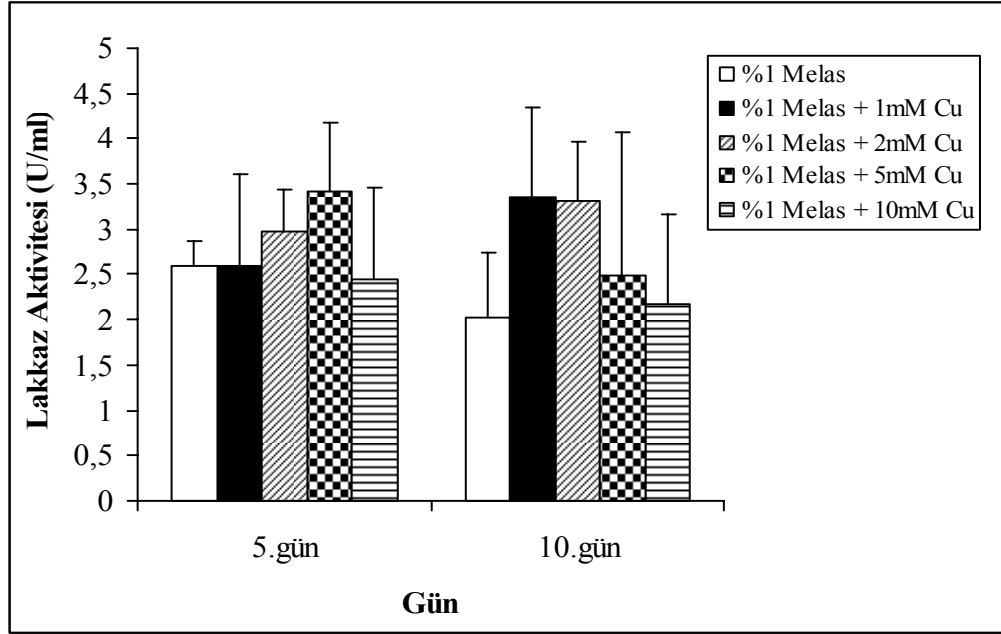
Şekil 4.9. *F. troglit*'nin farklı konsantrasyonlarda melas ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi

Melas ortamına eklenen ksilidinin lakkaz üretimine etkisini test etmek amacıyla ortama farklı konsantrasyonlarda ksilidin ilave edildi. Üretimin 5. gününde tüm ksilidin konsantrasyonları lakkaz üretimini indüklerken, 10. günde ise ksilidin konsantrasyonları lakkaz üretimini negatif etkiledi (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. *F. troglit*'nin ksilidin içeren melas ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi

Melas ile nemlendirilmiş katı ortamda bakırın etkisinin araştırıldığı çalışmalarda, 5. günde en yüksek lakkaz aktivitesi 5mM bakır konsantrasyonunda 3.41 ± 0.76 U/ml iken, 10.günde 1mM bakır ilavesinde 3.35 ± 1.42 U/ml olarak saptandı (Şekil 4.11).

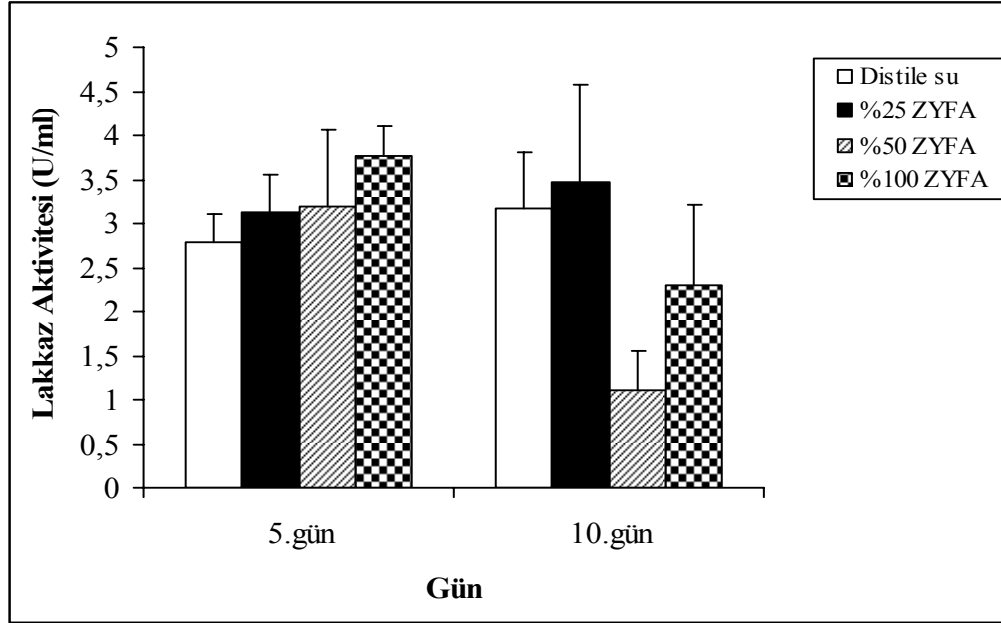


Şekil 4.11. *F. trogii*'nin bakır içeren %1' lik melas ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi

4.2.5. *F. trogii*'nin zeytinyağı fabrikası atık suyu (ZYFA) ile nemlendirilmiş ortamlarda lakkaz üretimi

Zeytinyağı üretimi sırasında yüksek miktarda zeytinyağı fabrikası atığı oluşmaktadır. Bu atıksular önemli kirleticilerdir ve zeytinyağı üretilen ülkelerde önemli çevre sorunları yaratmaktadır. Türkiye' de kara su diye de adlandırılmakta ve ülkemizde yılda 400,000 tondan daha fazla zeytin kara suyu oluşmaktadır [115]. Zeytinyağı fabrikası atığı polifenoller gibi toksik maddeler içerdiği gibi, sekerler, azotlu bileşikler, organik asitler ve atık yağ gibi ticari öneme sahip organik maddeler de içerir [116]. Bu atıksuyun arıtılmadan alıcı ortama verilmesi durumunda organik içeriğinden dolayı ötrofikasyon olabilir, renginin koyu olmasından dolayı alıcı ortamda fotosentez yeteneği azalabilir ve fenolik madde ve yağlardan dolayı canlılar üzerine toksik etkiler oluşabilir [115]. ZYFA'nın zengin içeriği bu atıksuyun değerlendirilebileceğini göstermektedir. Yapmış olduğumuz çalışmada ZYFA' nın lakkaz üretimi üzerine etkileri de test edildi (Şekil 4.12-15).

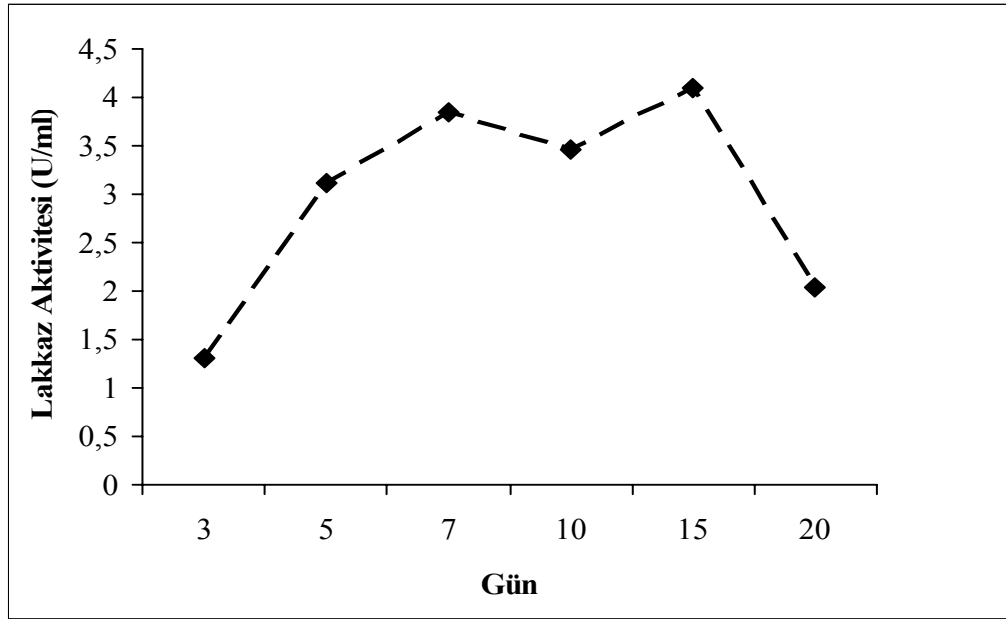
Farklı konsantrasyonlarda ZYFA ile nemlendirilmiş katı ortamlarda yapılan çalışmalarda hem 5. gün hem de 10. gün için en uygun konsantrasyonun %25' lik konsantrasyon olduğu saptandı (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. *F. troglia*' nin farklı konsantrasyonlarda ZYFA ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi

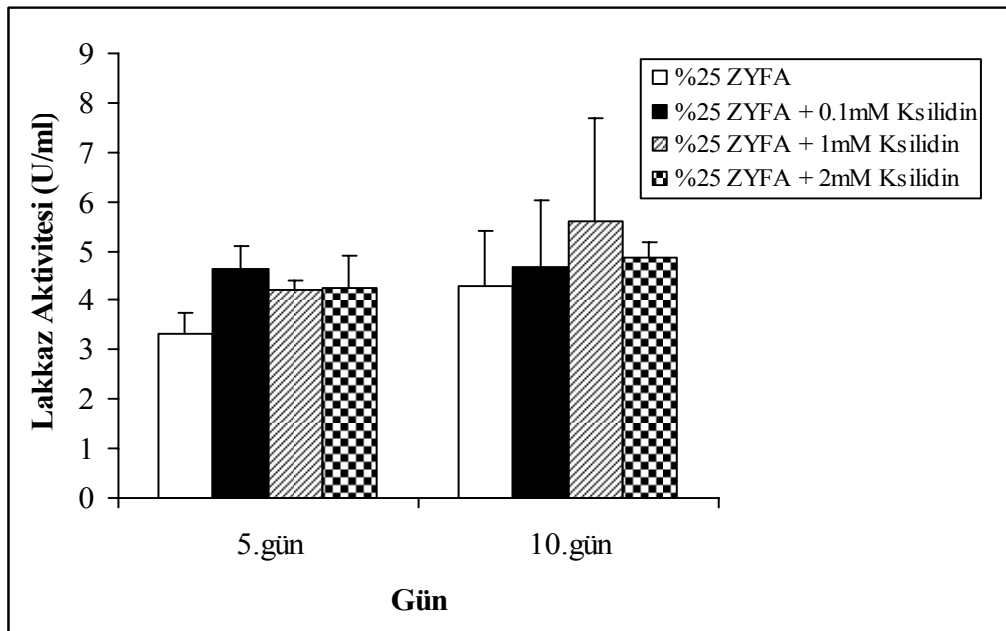
Bu nedenle, çalışmanın devam eden aşamalarında günlere bağlı olarak lakkaz aktivitesindeki değişim ve indükleyicilerin etkilerini saptamak için %25' lik ZYFA konsantrasyonu kullanıldı.

Çalışmanın bu kısmında %25' lik ZYFA ile nemlendirilmiş katı ortamda üretilen *F. troglia*' nin günlere bağlı enzim aktivite değişimi araştırıldı ve en yüksek lakkaz aktivitesi üretimin 15. gününde 4.10 ± 0.34 U/ml olarak bulundu. 15. günden sonra ise lakkaz aktivitesinin azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.13).



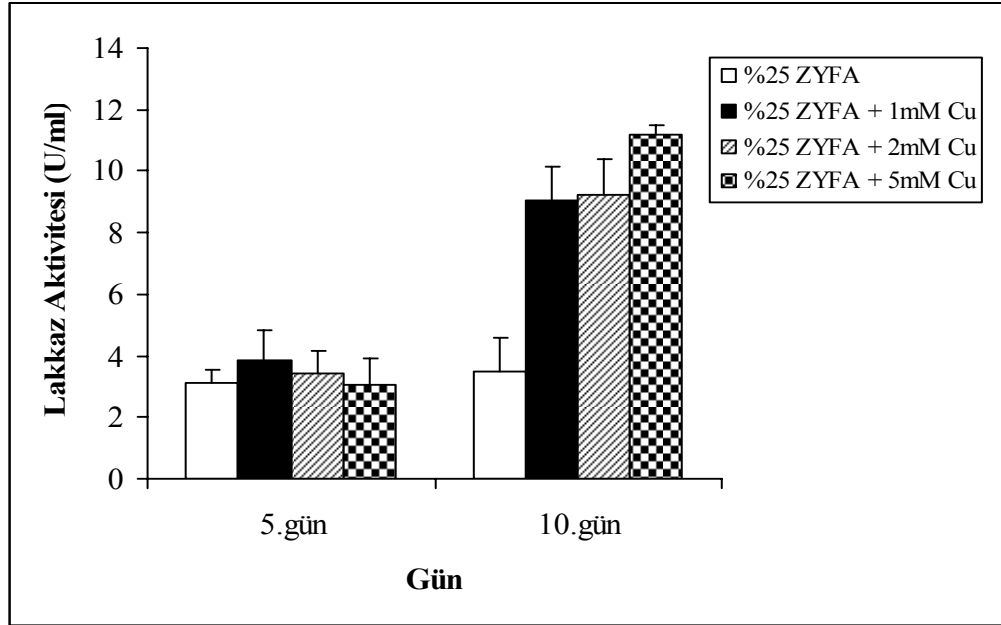
Şekil 4.13. *F. troglia*'nin %25'lik ZYFA ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesinin günlere bağlı değişimi

%25'lik ZYFA ile nemlendirilmiş katı ortamlarda ksilidinin etkisi test edildiği çalışmada 5. gün için en yüksek lakkaz aktivitesi 0.1mM ksilidin eklendiğinde 4.62 ± 0.48 U/ml olarak saptanırken, 10. gün de 1mM ksilidin ilavesi ile 5.59 ± 2.09 U/ml'ye ulaştı (Şekil 15).



Şekil 4.14. *F. troglia*'nin ksilidin içeren %25'lik ZYFA ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi

Bakırın etkisinin test edildiği çalışmada ise, üretimin 10. gününde lakkaz aktivitesinde belirgin bir artış olduğu gözlemlendi. Kontrol grubunda lakkaz aktivitesi 3.40 ± 0.62 U/ml iken, 10mM bakır ilavesinin lakkaz aktivitesini yaklaşık 4 kat arttırdığı saptandı (13.23 ± 0.58 U/ml) (Şekil 4.15).

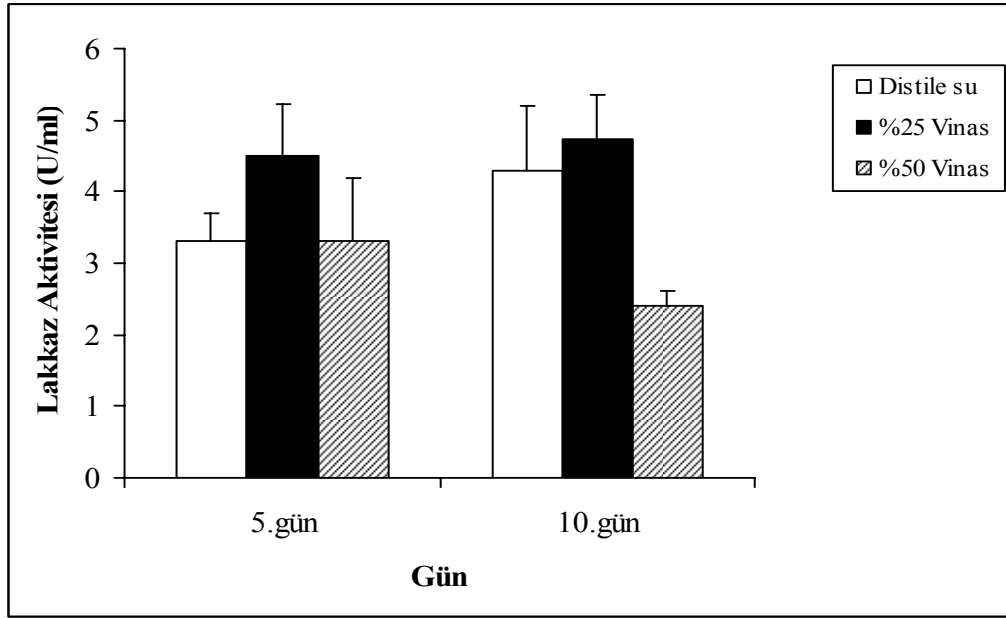


Şekil 4.15. *F. trogii*'nin bakır içeren %25' lik ZYFA ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi

4.2.6. *F. trogii*'nin vinasla nemlendirilmiş ortamlarda lakkaz üretimi

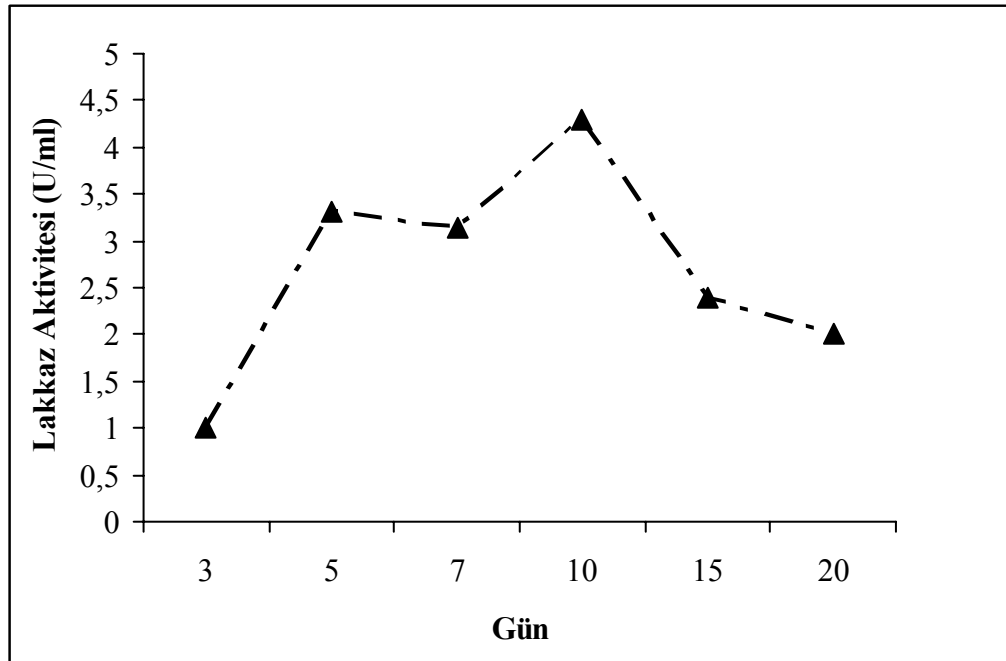
Vinas, alkol fabrikası atık suyudur. Üretilen her 1 litre alkol için yaklaşık 12 litre vinas oluşmaktadır. Yoğun organik yükü nedeniyle doğrudan alıcı ortama verilmesi önemli çevresel problemler oluşturmaktadır [114]. Çalışmada bu atıksuyun nemlendirme sıvısı olarak kullanımı süresince lakkaz aktivitesi üzerine etkisi araştırıldı (Şekil 4.16-19).

Farklı konsantrasyonlarda vinas kullanıldığında 5. ve 10. günler için %25' lik konsantrasyonun daha uygun olduğunu gözlemlendi (Şekil 4.16) ve bundan sonraki aşamalarda bu konsantrasyon kullanıldı.



Şekil 4.16. *F. trogii*’ nin farklı konsantrasyonlarda vinas ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi

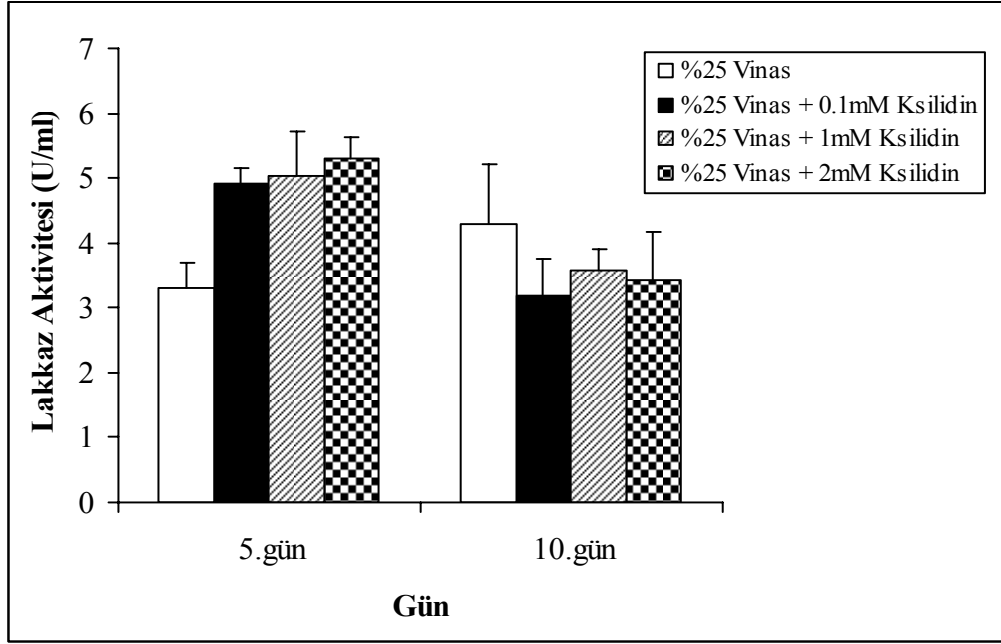
Daha sonra, *F. trogii* %25’ lik vinas ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretildi ve en yüksek aktivite üretimin 10. gününde $4.30 \pm 0,90$ U/ml olarak saptandı (Şekil 4.17). 10. günden sonra ise lakkaz aktivitesinin azaldığı gözlemlendi.



Şekil 4.17. %25’ lik vinas ile nemlendirilmiş katı ortamlarda *F. trogii*’ nin üretimi sürecinde lakkaz aktivitesinin günlere bağlı değişimi

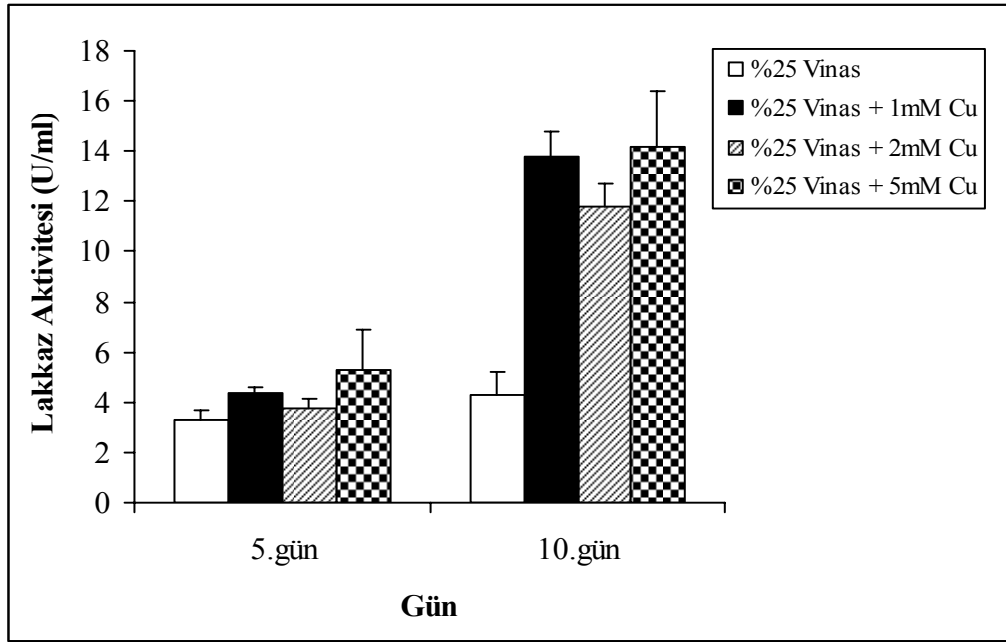
Günlere bağlı etki saptandıktan sonra vinas ortamına ksilidin ve bakır, indükleyici olarak eklendi ve lakkaz üretimine etkisi araştırıldı.

Ksilidin, bütün uygulamalarda 5. günde lakkaz üretimini indüklerken 10. günde lakkaz üretimine pozitif bir etkisi olmadı (Şekil 4.18). 5. günde kontrol grubu olan %25' lik vinas ortamında lakkaz aktivitesi 3.31 ± 0.39 U/ml iken, 2mM ksilidin ilavesinde lakkaz aktivitesi 5.29 ± 0.33 U/ml olarak saptandı.



Şekil 4.18. *F. troglitii*' nin ksilidin içeren %25' lik vinas ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi

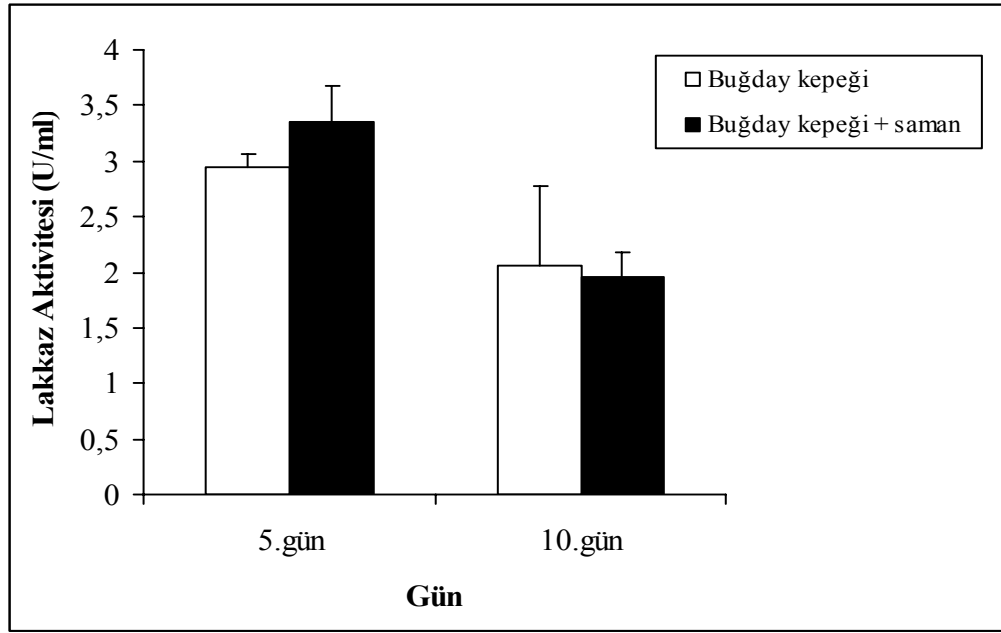
Bakırın lakkaz üretimine etkisini test etmek için ortama bakır eklendi ve özellikle 10. günde tüm bakır konsantrasyonlarının lakkaz üretimini indüklediği gözlemlendi. Bakır eklenmemiş %25' lik vinas ile nemlendirilen ortamlarda lakkaz aktivitesi üretimin 10. gününde 4.30 ± 0.90 U/ml iken, 5mM bakır eklenmesi lakkaz aktivitesini 14.18 ± 2.20 U/ml' ye yükseltti (Şekil 20). Bakır ilavesi lakkaz üretimini yaklaşık 3 kat arttırdı.



Şekil 4.19. *F. trogii*'nin bakır içeren %25'lik vinas ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi

4.2.7. *F. trogii*'nin buğday kepeği + saman ortamında lakkaz üretimi

Yürütülen diğer bir çalışmada buğday kepeği ortamına, saman eklendi ve bu ortamın lakkaz üretimine etkisi saptandı. Distile su ile nemlendirilmiş ortamlarda katı substrat olarak yalnızca buğday kepeği kullanıldığında üretimin 5. gününde lakkaz aktivitesi 2.94 ± 0.12 U/ml, 10. gününde ise 2.06 ± 0.72 U/ml olarak saptanırken, buğday kepeği + saman içeren katı ortamda lakkaz aktivitesi 5.günde 3.36 ± 0.32 U/ml ve 10. günde de 1.96 ± 0.22 U/ml olarak bulundu (Şekil 4.20).

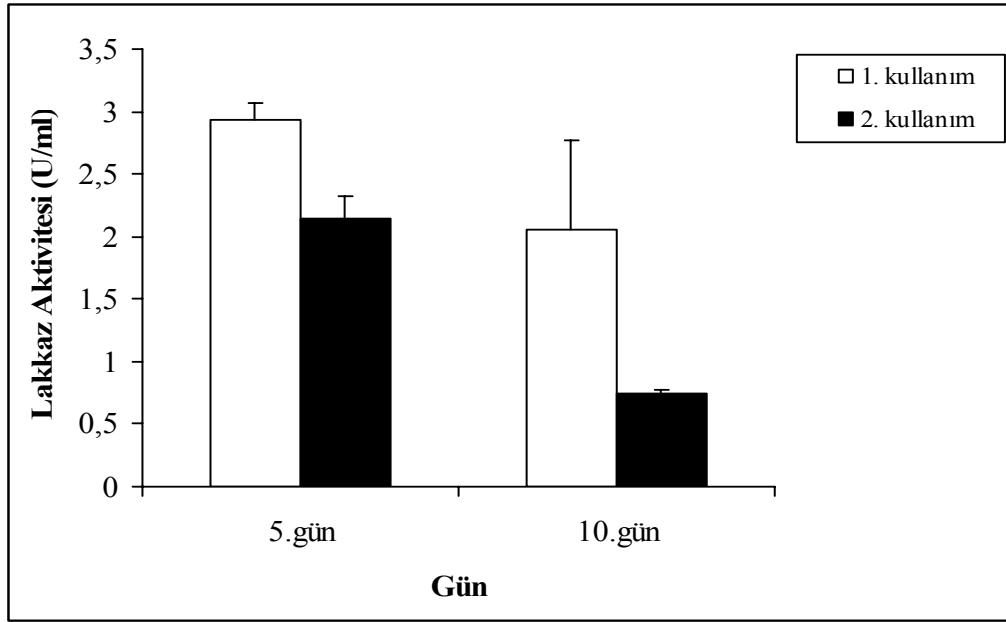


Şekil 4.20. *F. trogii*' nin distile su ile nemlendirilmiş substratlarda (5g buğday kepeği ve 3g buğday kepeği + 1g saman) üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi

4.2.8. *F. trogii* ile substratın tekrarlı kullanımı sürecinde lakkaz üretimi

Çalışmada ayrıca katı substrat olarak kullanılan katı ortamın 1. kullanımından sonra fungus üretimi ve lakkaz verimi açısından tekrar kullanılabilirliği de araştırıldı.

Lakkaz aktivitesi 5. günde 2.94 ± 0.12 U/ml olarak bulundu ve katı substrat tekrar kullanıldığında 5. günde 2.15 ± 0.72 U/ml lakkaz aktivitesi saptandı. İlk üretimin 10. gününde lakkaz aktivitesi 2.06 ± 0.17 U/ml olarak belirlenirken katı substrat tekrar kullanıldığında 10. günde lakkaz aktivitesi düştü ve 0.75 ± 0.03 U/ml olarak saptandı (Şekil 4.21).



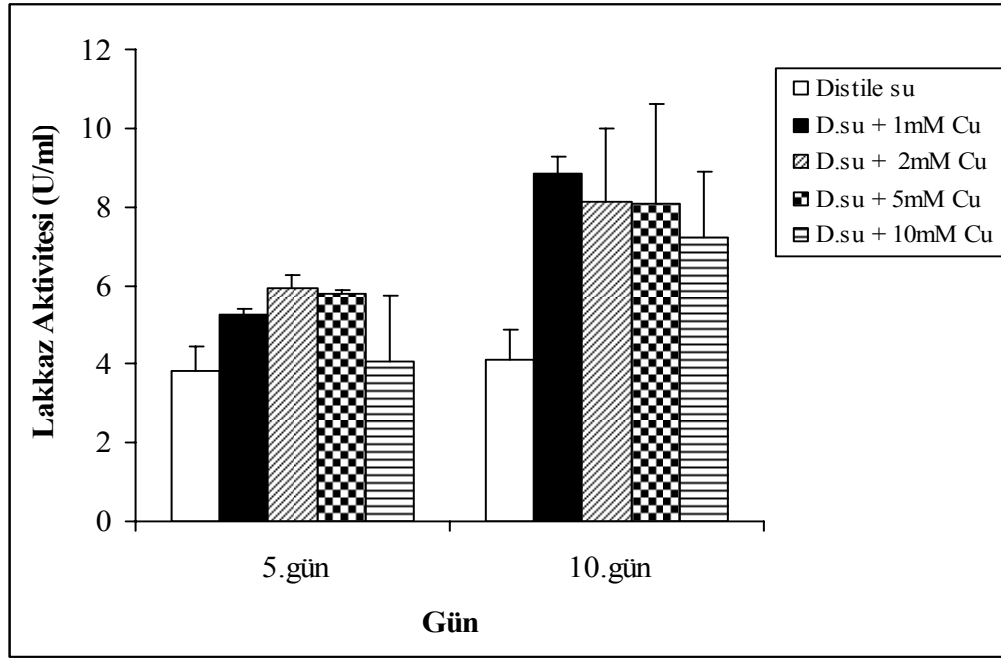
Şekil 4.21. Substratın tekrarlı kullanımında *F. trogii*’nin lakkaz aktivitesi

4.3. *T. versicolor* ile Yürütülen Katı Substrat Fermentasyonu Çalışmaları

Çalışmamızda fungus olarak *F. trogii*’nin yanı sıra *T. versicolor* da kullanılmış ve *T. versicolor*’un lakkaz üretim yeteneği katı ortamda araştırıldı.

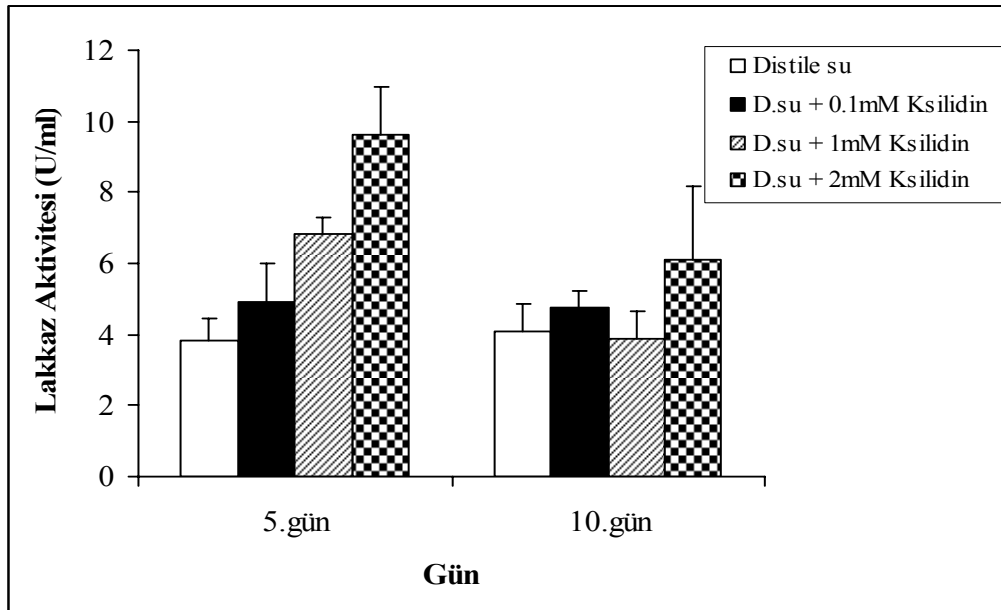
4.3.1. *T. versicolor* ‘un distile su ile nemlendirilmiş katı ortamlarda lakkaz üretimi

Distile su ile nemlendirilmiş katı substrat ortamında bakırın etkisi araştırıldığında kullanılan tüm bakır konsantrasyonlarının özellikle üretimin 10. gününde lakkaz aktivitesini pozitif yönde etkilediği gözlemlendi (Şekil 4.22). Bakır içermeyen distile su ortamında lakkaz aktivitesi 10. günde 4.10 ± 0.78 U/ml iken, en yüksek lakkaz aktivitesi 1mM bakır ilavesiyle 8.84 ± 0.44 U/ml olarak belirlendi.



Şekil 4.22. *T. versicolor*' un bakır içeren distile su ile nemlendirilmiş katı ortamda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi

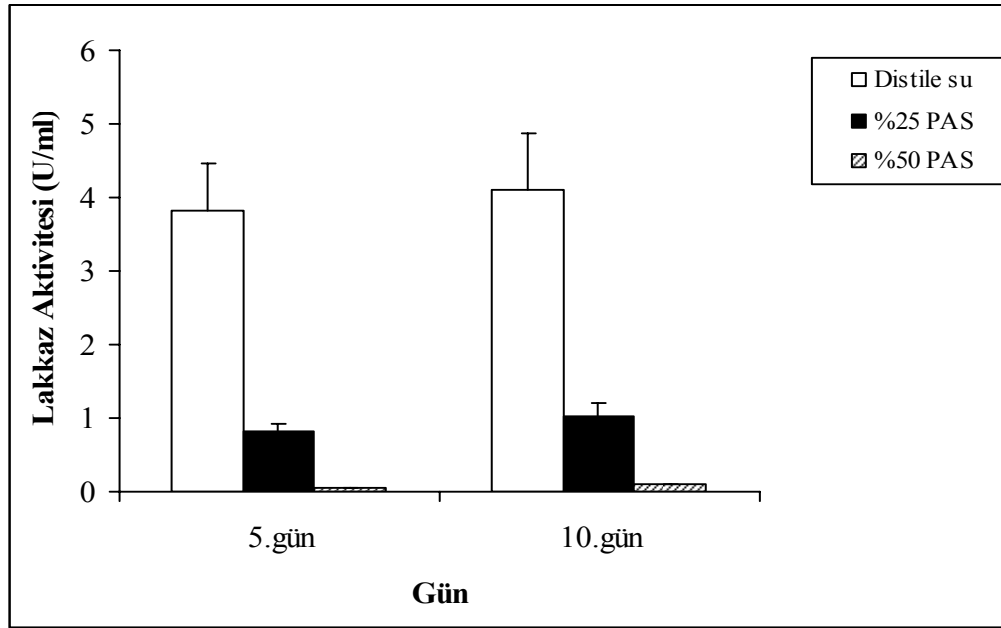
Bu ortama ksilidin eklendiğinde özellikle 5. günde bütün ksilidin konsantrasyonlarının lakkaz üretimini pozitif olarak indüklediği gözlemlendi. 5. günde distile su içeren ortamda lakkaz aktivitesi 3.82 ± 0.63 U/ml iken 2mM ksilidin eklendiğinde 9.60 ± 1.37 U/ml olarak belirlendi. Üretimin 10. gününde ise en yüksek lakkaz aktivitesi 2mM ksilidin eklendiğinde 6.12 ± 2.03 U/ml olarak saptandı (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. *T. versicolor*' un ksilidin içeren distile su ile nemlendirilmiş katı ortamda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi

4.3.2. *T. versicolor*' un peyniraltı suyu (PAS) ile nemlendirilmiş ortamlarda lakkaz üretimi

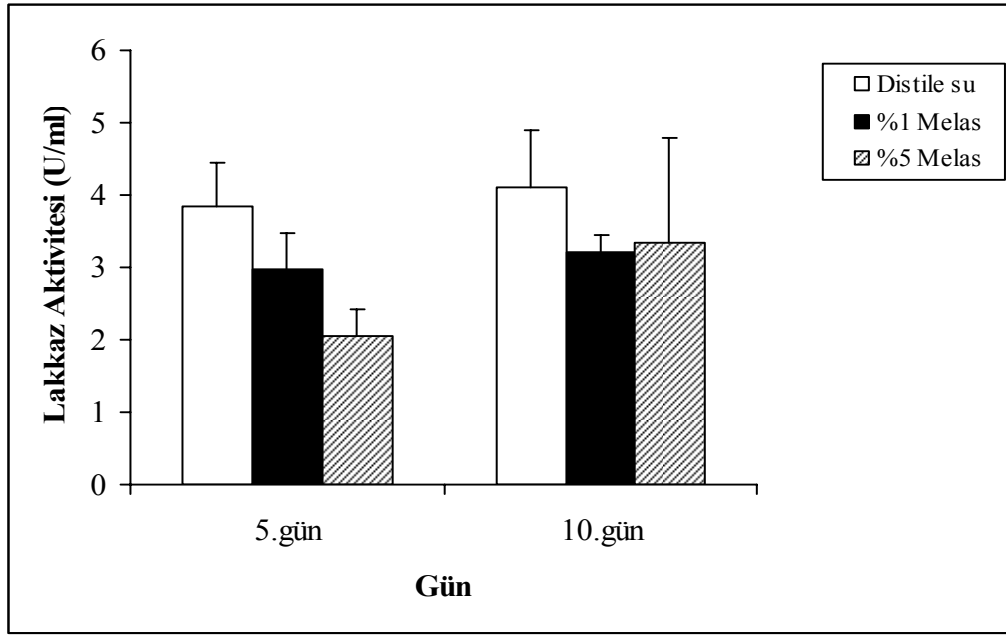
Farklı konsantrasyonlarda PAS kullanımının lakkaz üretimine etkisinin test edildiği çalışmalarda pozitif bir etkisi gözlenmedi (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. *T. versicolor*' un farklı konsantrasyonlarda PAS ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi

4.3.3. *T. versicolor*' un melasla nemlendirilmiş ortamlarda lakkaz üretimi

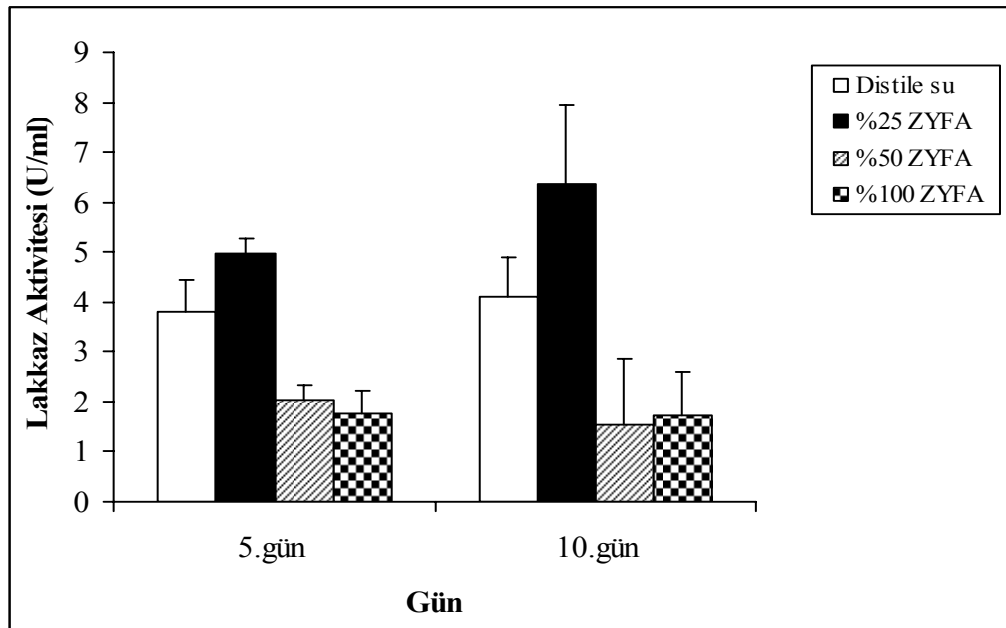
Benzer olarak, *T. versicolor*' un lakkaz üretim yeteneğine melasla nemlendirmenin de pozitif bir etkisi izlenmedi (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. *T. versicolor*' un farklı konsantrasyonlarda melas ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi

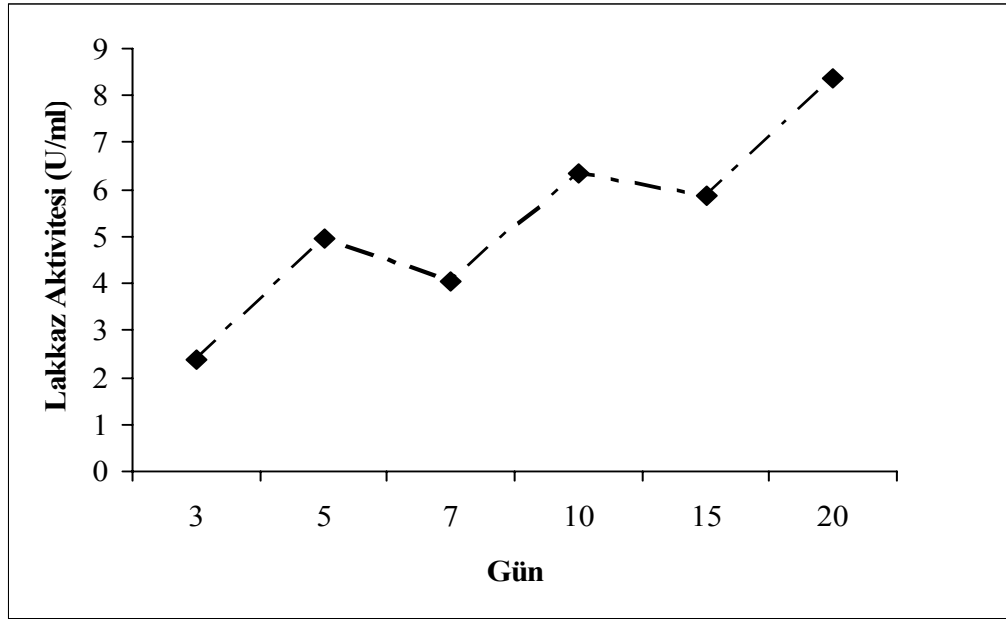
4.3.4. *T. versicolor*' un zeytinyağı fabrikası atık suyu (ZYFA) ile nemlendirilmiş ortamlarda lakkaz üretimi

ZYFA ile nemlendirilmiş ortamlarda %25' lik konsantrasyonun 10. gün için lakkaz üretimini indüklediği gözlemlendi ve en yüksek lakkaz aktivitesi 10. gününde %25' lik ZYFA içeren ortamda 6.36 ± 1.58 U/ml olarak bulundu (Şekil 4.26).



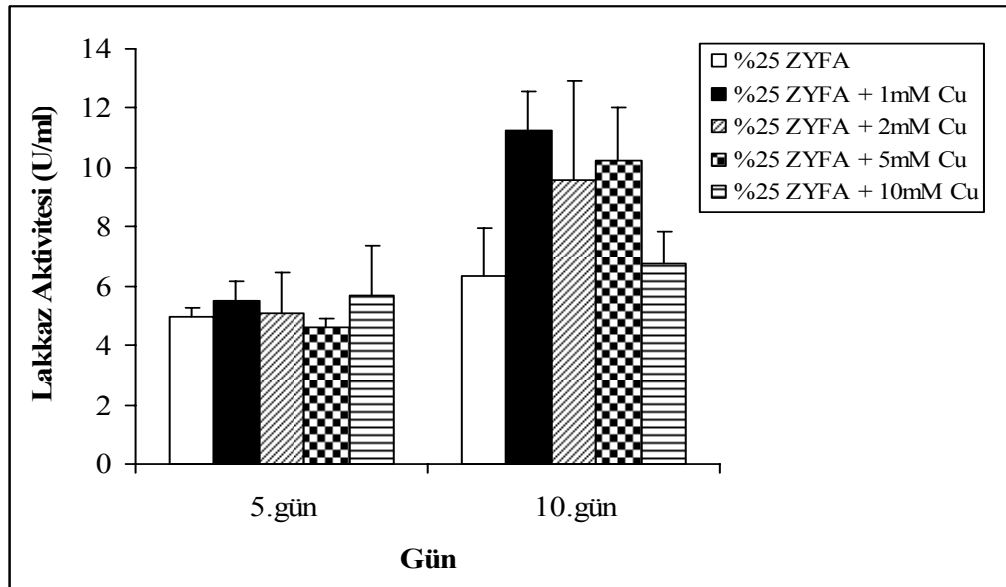
Şekil 4.26. *T. versicolor*' un farklı konsantrasyonlarda ZYFA ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi

Bu konsantrasyonda ZYFA ile nemlendirilmiş katı substrat ortamında *T. versicolor*' un günlere bağlı lakkaz aktivitesi izlendi ve aktivitenin günlere bağlı arttığı gözlemlendi (Şekil 4.27).



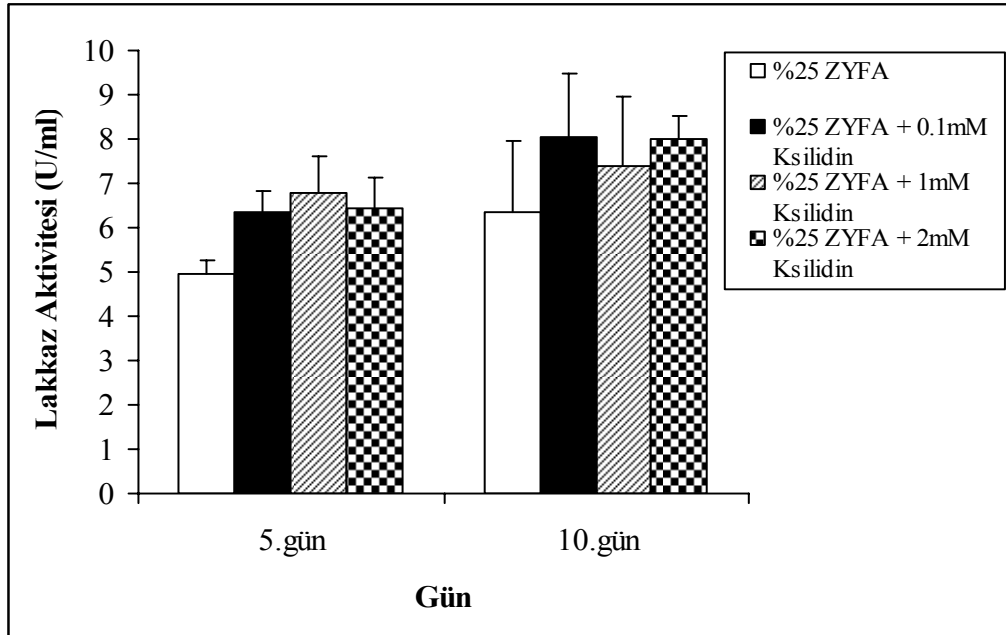
Şekil 4.27. *T. versicolor*' un %25' lik ZYFA ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesinin günlere bağlı değişimi

Bu ortama bakır eklendiğinde özellikle 10. günde lakkaz aktivitesinin indüklendiği gözlemlendi (Şekil 4.28). Üretimin 10.gününde %25' lik ZYFA ortamında 6.36 ± 1.58 U/ml lakkaz aktivitesi saptanırken, 1mM bakır eklendiğinde lakkaz aktivitesi 11.24 ± 1.32 U/ml olarak belirlendi.



Şekil 4.28. *T. versicolor*' un bakır içeren %25' lik ZYFA ile nemlendirilmiş katı ortamda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi

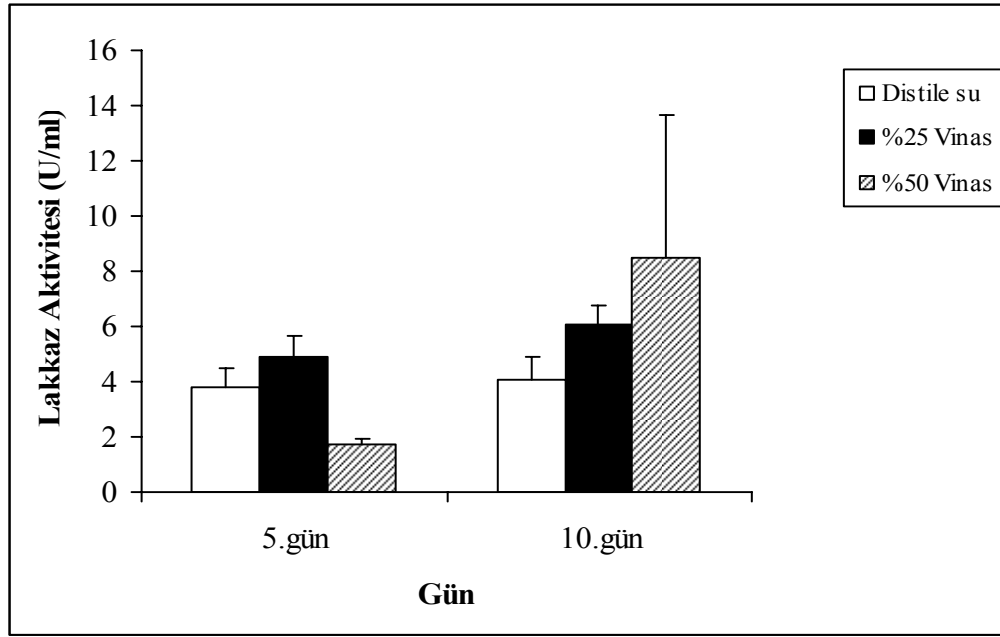
Ortama ksilidin eklendiğinde ise hem 5. gün hem de 10.gün de ksilidin ilavesinin lakkaz aktivitesini az da olsa indüklediği gözlemlendi (Şekil 4.29).



Şekil 4.29. *T. versicolor*' un ksilidin içeren %25' lik ZYFA ile nemlendirilmiş katı ortamda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi

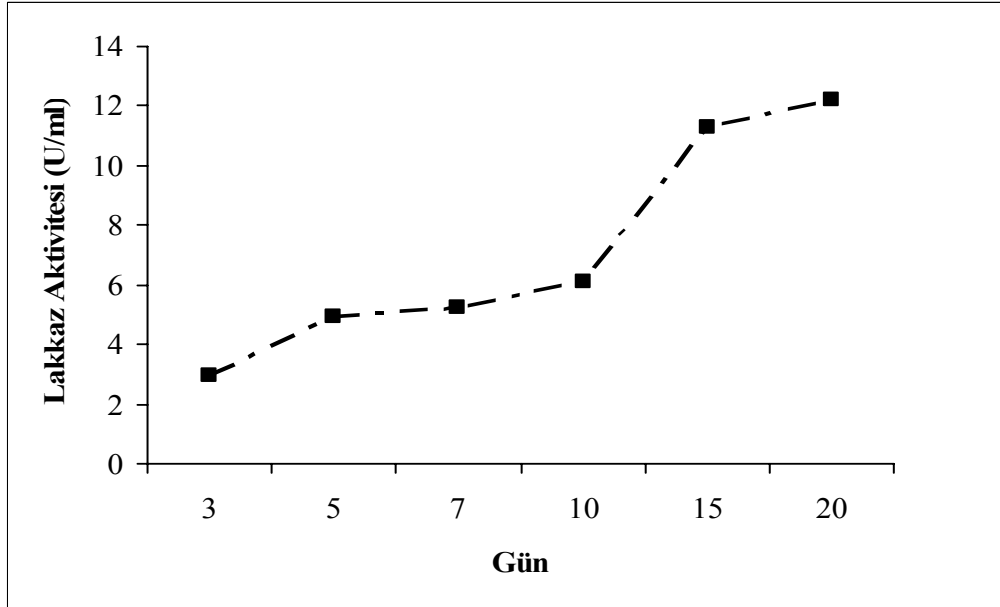
4.3.5. *T. versicolor*' un vinas ile nemlendirilmiş ortamlarda lakkaz üretimi

Vinasla nemlendirilmiş katı ortamlarda *T.versicolor*' un lakkaz üretim yeteneği araştırıldı ve %25 ve %50' lik vinas konsantrasyonlarının 10. günde pozitif etkisi gözlemlendi (Şekil 4.30).



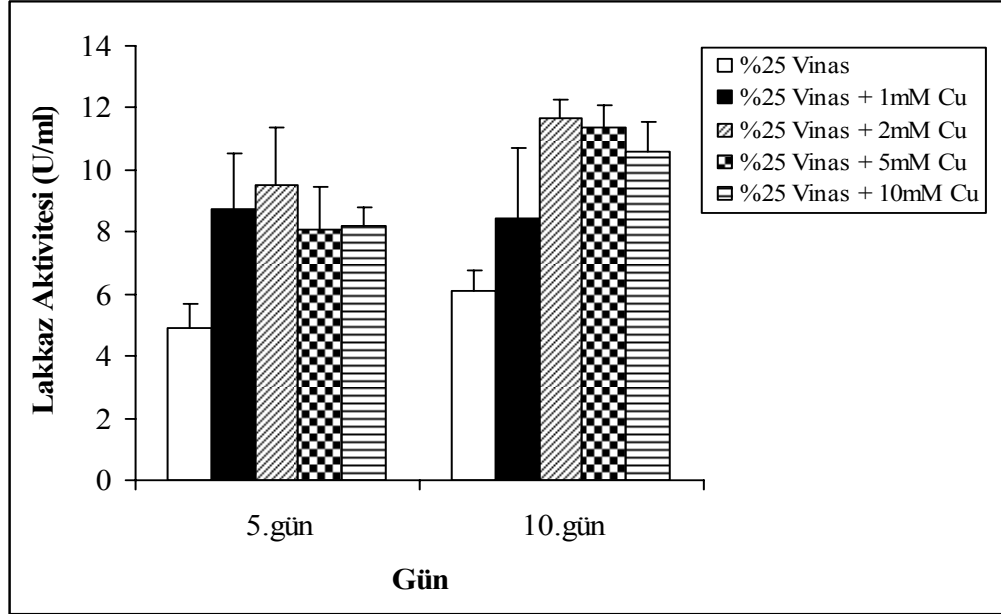
Şekil 4.30. *T. versicolor*' un farklı konsantrasyonlarda vinas ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi

T. versicolor' un günlere bağlı lakkaz üretim yeteneği %25' lik vinasla nemlendirilmiş katı ortamlarda izlendiği zaman özellikle üretimin 10. gününden sonra lakkaz aktivitesinde belirgin bir artış meydana geldi (Şekil 4.31). En yüksek lakkaz aktivitesi 20. günde 12.22 ± 2.14 U/ml olarak bulundu.



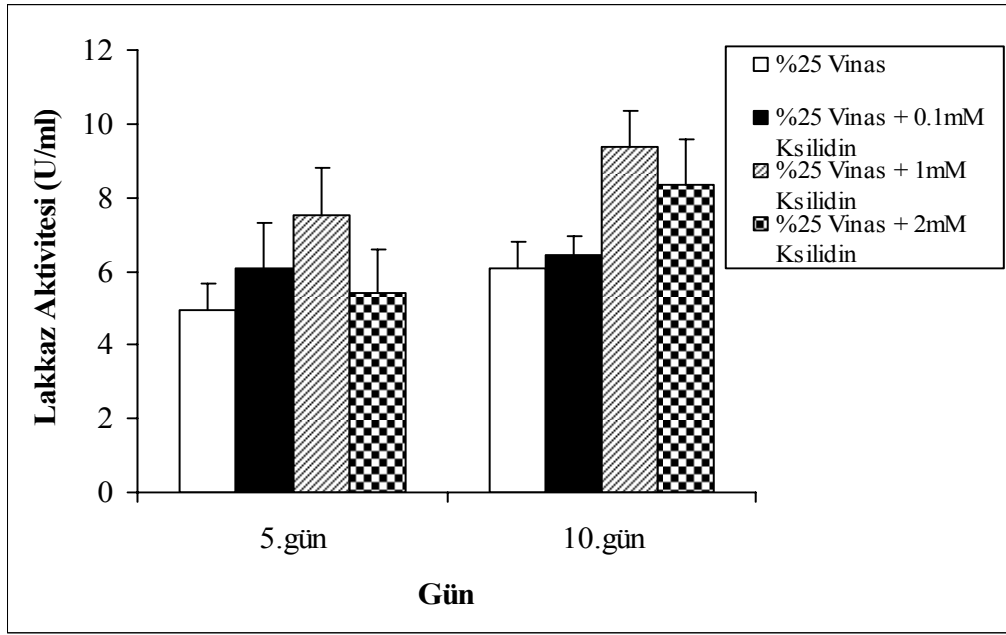
Şekil 4.31. *T. versicolor*' un %25' lik vinas ile nemlendirilmiş katı ortamlarda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesinin günlere bağlı değişimi

Vinasla nemlendirilmiş ortama bakır eklenmesi lakkaz üretimini pozitif etkiledi ve 5. günde lakkaz aktivitesi 4.93 ± 0.74 U/ml iken, 2mM bakır ilavesiyle lakkaz aktivitesi 9.51 ± 1.86 U/ml' ye yükseldi. 10. günde ise %25' lik bakır eklenmiş ortamda 6.08 ± 0.70 U/ml olan lakkaz aktivitesi, 2mM bakır içeren ortamda lakkaz aktivitesi 11.65 ± 0.63 U/m' ye ulaştı (Şekil 4.32).



Şekil 4.32. *T. versicolor*' un bakır içeren %25' lik vinas ile nemlendirilmiş katı ortamda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi

Vinas ortamına ksilidin eklendiğinde ise 5. günde %25' lik vinas ile nemlendirilmiş ortamda lakkaz aktivitesi 4.93 ± 0.74 U/ml ve 1mM ksilidin eklendiğinde 7.50 ± 1.33 U/ml olarak belirlenirken, 10. günde %25' lik vinas içeren ortamda 6.08 ± 0.70 U/ml ve 1mM ksilidin ilavesiyle 9.35 ± 1.02 U/ml olarak belirlendi (Şekil 4.33).



Şekil 4.33. *T. versicolor*' un ksilidin içeren vinas ile nemlendirilmiş katı ortamda üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Katı substrat fermentasyonu yıllardır bilinen bir teknik olmasına rağmen son yıllarda önem kazanmaya başlamıştır [117]. Bu işlem, tarımsal atıklar doğal formlarında kullanılabildiğinden ve atıkların birikimi sonucu oluşan çevresel problemler azaldığından dolayı da avantajlıdır. Bu atıkların çoğu, ligninolitik aktiviteyi indükleyici olarak rol oynayan lignin, selüloz ve hemiselüloz içerir. Ayrıca birçoğunun, yüksek oranda şeker içermesi işlemlerin çok daha ekonomik olmasını sağlamaktadır [6]. Çalışmamızda bol miktarda oluşan ve besin değeri yüksek olan buğday kepeği katı substrat olarak kullanılmış ve çeşitli fungusların lakkaz üretim yetenekleri test edilmiştir. *F. trogii* ve *T. versicolor*' un yüksek oranda lakkaz ürettikleri gözlenmiştir. Daha önce yürütülen sıvı fermentasyon çalışmalarında da bu fungusların iyi lakkaz üreticileri oldukları rapor edilmiştir [118].

Bakırın lakkaz üretimine etkisinin test edildiği çalışmalarda hem *F.trogii*' nin hem de *T. versicolor*' un lakkaz üretim yeteneğinin bakırla indüklendiği gözlenmiştir. Kontrol grubuna göre 3-4 kat daha yüksek lakkaz aktiviteleri saptanmıştır. Aynı şekilde Tychanowicz vd. [102] yapmış oldukları çalışmada, bakır eklenmesinin lakkaz üretimine pozitif etki yaptığını bildirmiştir. Yine katı substrat fermentasyonuna bakırın etkisinin araştırıldığı bir çalışmada bakır eklenmesinin lakkaz aktivitesini arttırdığı rapor edilmiştir [100]. Sıvı substrat ortamında da bakır eklenmesinin lakkaz üretimine pozitif etki yaptığı bilinmektedir [118].

Phlosticta spp. ve *Aspergillus spp.* ile katı substrat olarak muz atığının kullanıldığı bir çalışmada 20 gün üretimden sonra en yüksek lakkaz aktiviteleri *Phlosticta spp.* için 2.73 U/mg iken *Aspergillus spp.* için 2.83 U/mg olarak rapor edilmiştir [108]. Bizim çalışmamızda ise katı substrat olarak buğday kepeği kullanılmış ve yüksek lakkaz aktiviteleri saptanmıştır. Yüksek enzim aktivitesi elde etmemizin nedeni fenolik bileşiklerden ferulik, vanilik, *p*-kumarik asit gibi etkin lakkaz indükleyicilerinin buğday kepeğinde bulunması olabilir [107].

Çalışmamızın daha önce yürütülen çalışmalardan en önemli farkı katı substratı nemlendirmek için çeşitli atık suların kullanılmasıdır. Çevre kirliliği oluşturan atık suların, katı substrat fermentasyonunda kullanılması atık suların değerlendirilmesi açısından önemlidir. Ayrıca bu atıksuların içerisindeki bazı önemli bileşenler de lakkaz üretimini arttırmaya yardımcı olabilmektedir [115].

T. versicolor ile yapılan bir çalışmada katı substrat olarak arpa samanı kullanılmış ve üretimin 18. gününde 3500 U/L lakkaz aktivitesi rapor edilmiştir [108]. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada ise *T. versicolor* ile daha yüksek enzim aktiviteleri gözlenmiştir. Bunun nedeni kullandığımız nemlendirme sıvısının ve katı substratın farklı olması olabilir.

Lakkaz aktivitesini indükleyen bir diğer bileşik olan ksilidin yoğun olarak kullanılmaktadır [119-120]. *F. trogii* ile distile suyla nemlendirilmiş katı ortamda ksilidinin etkisini test ettiğimiz çalışmada, üretimin 5. gününde lakkaz aktivitesi az da olsa indüklenirken 10. günde ksilidinin lakkaz üretimine pozitif bir etkisi gözlenmemiştir. Aynı çalışmayı *T. versicolor* ile yaptığımızda ise, 5. günde *F. trogii*'ye göre lakkaz aktivitesinin daha iyi indüklendiği görülmektedir. 10. günde ise *F. trogii*'de lakkaz aktivitesinde bir artış olmazken, *T. versicolor*'da lakkaz aktivitesinin indüklendiği saptanmıştır.

Yine ksilidinin %25' lik ZYFA ile nemlendirilmiş katı ortamda lakkaz üretimine etkisi araştırıldığında, hem *F. trogii* hem de *T. versicolor*'da üretimin 5. ve 10. gününde kullanılan tüm ksilidin konsantrasyonlarının lakkaz aktivitesini indüklediği belirlenmiştir. Aynı şekilde %25' lik vinas ile nemlendirilmiş ortamlarda lakkaz aktivitesine bakıldığında hem *F. trogii* hem de *T.versicolor*'da 5. günde ksilidin eklenmesinin lakkaz aktivitesi indüklenirken, 10. günde ise ksilidinin lakkaz aktivitesine pozitif bir etkisi olmadığı gözlenmiştir.

Günlere bağlı olarak lakkaz aktivitesine bakıldığında, *F. trogii* ile %25' lik ZYFA ile nemlendirilmiş ortamda üretimin 15. gününden sonra lakkaz aktivitesinin düştüğü gözlenirken, *T. versicolor*'da 20. günde dahi lakkaz aktivitesinin arttığı gözlenmiştir. %25' lik vinas ile nemlendirilen ortamda ise *F. trogii*'de üretimin 10. gününden sonra lakkaz aktivitesinde belirgin bir azalma varken, *T. versicolor*'da lakkaz aktivitesinin 20 günlük üretim süresince sürekli arttığı saptanmıştır.

Fenice vd. [121] yapmış oldukları bir çalışmada *Panus tigrinus*' un ZYFA ile nemlendirilmiş katı ortamda lakkaz üretimini araştırmışlardır. Katı subtrat olarak mısır koçanı kullanılmış ve distile su ile nemlendirilmiş ortamlarda lakkaz aktivitesi 630 ± 47 U/L olarak saptanmıştır. Distile su, sükröz ve maya özütüyle desteklenip kullanıldığında lakkaz aktivitesi 771 ± 40 U/L olarak belirlenmiştir. Nemlendirme sıvısı olarak ZYFA kullanıldığında ise 1267 ± 57 U/L lakkaz aktivitesi saptanmıştır. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada ise daha yüksek lakkaz aktivitesi elde etmemize karşın, distile su ile karşılaştırıldığında maya özütü ilave edilen örneklerde lakkaz aktivitesinde bir artış

gözlenmiştir. ZYFA ile nemlendirdiğimiz ortamda ise lakkaz aktivitesinde aynı şekilde artış gözlenmiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada çok daha yüksek lakkaz aktivitesi elde etmemizin sebebi, kullanmış olduğumuz katı substratın ve fungusun farklı olması olabilir. Çünkü fungusların lakkaz üretim yeteneği fungusun tipinden, kültür yönteminden, fungusun fizyolojisinden ve substrat tipinden etkilenmektedir.

Fomes sclerodermeus ile buğday kepeği ortamında yapılan bir çalışmada lakkaz üretimine indükleyicilerin etkisi test edilmiş ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ortama glukoz, maya özütü ve bakır eklenmesinin lakkaz aktivitesini pozitif olarak etkilemediği bildirilmiştir [105]. Bizim *F. trogii* ile yapmış olduğumuz çalışmada ise maya özütünün ilavesinin lakkaz üretimini indüklemediği, buna karşın bakır ve düşük konsantrasyonlarda glukoz ilavesinin lakkaz üretimini arttırdığı gözlenmiştir. Bu farklılığın sebebi funguslarımızın farklı olması olabilir.

Nemlendirme sıvısı olarak peyniraltı suyu kullanıldığında *T. versicolor*' da lakkaz üretimine negatif etki yaparken, *F. trogii*' de lakkaz aktivitesini indüklemiştir. *F. trogii*' nin PAS ile nemlendirilmiş katı substrat ortamında lakkaz üretimine bakırın etkisi araştırıldığında ise, tüm bakır konsantrasyonlarının lakkaz aktivitesini arttırdığı saptanmıştır.

Bu çalışmada beyaz çürükçül funguslardan *F. trogii* ve *T. versicolor*' un katı substrat ortamında lakkaz üretim yetenekleri araştırılmıştır. Katı substrat ortamında yüksek miktarda enzim üretilebileceği gözlenmiştir. Özellikle bakır ilave edilen ortamlarda yüksek lakkaz aktiviteleri saptanmıştır. Ucuz ve bol olan katı substrat kullanımı işlemin ekonomik olmasını sağlamaktadır. Bununla birlikte önemli çevresel problemlere neden olan atıksuların da bu ortamda değerlendirilebileceği görülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] M. Raimbault, *General and microbiological aspects of solid substrate fermentation*, **EJB Electronic Journal of Biotechnology** 0,717-3458, 1998
- [2] N. Perez-Guerra, A. Tornado-Agrasar, C. Lopez-Macias and L. Pastrana, *Main characteristics and applications of solid substrate fermentation*, **Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.**, 2(3), 2003
- [3] K.S.M.S. Raghavarao, T.V. Ranganathan, N.G. Karanth, *Some engineering aspects of solid-state fermentation*, *Biochemical Engineering Journal*, 13 (2003) 127-135
- [4] A. Pandey, *Solid-state fermentation*, **Biochemical Engineering Journal**, 13 (2003) 81-84
- [5] A. Ganesh Kumar, G. Sekaran, Sarayu Krishnamoorthy, *Solid state fermentation of *Achras zapota* lignocellulose by *Phanerochaete chrysosporium**, **Bioresource Technology**, 2005
- [101] J.F. Osma, J.L.T. Herrera, S.R. Couto, *Banana skin: A novel waste for laccase production by *Trametes pubescens* under solid-state conditions. Application to synthetic dye decolouration*, **Dyes and pigments**, (2006) 1-6
- [7] U. Hölker, M. Höfer, J. Lenz, *Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi*, **Appl. Microbiol. Biotechnol.** (2004) 64: 175-186
- [8] S.K. Shankar, V.H. Mulimani, *α -Galactosidase production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation*, **Bioresource Technology**, 2006
- [9] A.M.F. Milagres, E. Santos, T. Piovan, I.C. Roberto, *Production of xylanase by *Thermoascus aurantiacus* from sugar cane bagasse in an aerated growth fermentor*, **Process Biochemistry**, 39 (2004) 1387-1391
- [10] J. Gomez, M. Pazos, S.R. Couto, M.A. Sanroman, *Chestnut shell and barley bran as potential substrates for laccase production by *Coriolopsis rigida* under solid-state conditions*, **Journal of Food Engineering**, 68 (2005) 315-319
- [11] I. Ul-Haq, S. Idress, M.I. Rajoka, *Production of lipases by *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation*, 5 (2002) 637-641
- [12] M.O. Ngadi, L.R. Correia, *Solid State Ethanol Fermentation of Apple Pomace as Affected by Moisture and Bioreactor Mixing Speed*, **Journal of Food Science**, 57 (3), 667-670, 1997
- [13] S.H. Shojaasadi, V. Babaeipour, *Citric acid production from apple pomace in multi-layer packed bed solid-state bioreactor*, **Process Biochemistry**, 37 (2002) 909-914
- [14] V.H. Mulimani, G.N. Patil, Ramalingam, *α -Amylase production by solid state fermentation: a new practical approach to biotechnology courses*, **Biochemical Education**, 28 (2000) 161-163
- [15] S. A. Shojaasadi, R. Faraidouni, A. Madadi-Nouei, I. Mohamadpour, *Protein enrichment of lignocellulosic substrates by solid state fermentation using *Neurospora sitophila**, **Resources, Conservation and Recycling**, 27 (1999) 73-87
- [16] L.R. Castilho, R.A. Medronho, T.L.M. Alves, *Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger**, **Bioresource Technology**, 71 (2000) 45-50
- [17] P. Christen, J.C. Meza, S. Revah, *Fruity aroma production in solid state fermentation by *Ceratocystis fimbriata*: influence of the substrate type and the presence of precursors*, **Mycological Research**, 101 (1997) 911-919
- [18] E. Villegas, S. Aubaque, L. Alcantara, R. Auria, S. Revah, *Solid state fermentation: acid protease production in controlled CO₂ and O₂ environments*, **Biotechnol. Adv.**, 11 (1993) 387-397

- [19] A. Corona, D. Saez, E. Agosin, *Effect of water activity on gibberellic acid production by Gibberella fujikuroi under solid-state fermentation condition*, **Process Biochemistry**, 40: (2005) 2655–2658
- [20] S.Q. Yang, Q.J. Yan, Z.Q. Jiang, L.T. Li, H.M. Tian, Y.Z. Wang, *High-level of xylanase production by the thermophilic Paecilomyces themophila J18 on wheat straw solid-state fermentation*, **Bioresource Technology**, 97: (2006) 1794–1800
- [21] B.E. Lechner, V.L. Papinutti, *Production of lignocellulosic enzymes during growth and fruiting of the edible fungus Lentinus tigrinus on wheat straw*, **Process Biochemistry**, 41: (2006) 594–598
- [22] J.F. Osma, J.L.T. Herrera, S.R. Couto, *Banana skin: A novel waste for laccase production by Trametes pubescens under solid-state conditions. Application to synthetic dye decolouration*, **Dyes and Pigments**, (2006) 1-6
- [23] J. Baldensperger, J. Le Mer, L. Hannibal, P. J. Quinto, *Solid state fermentation of banana wastes*, *Biotechnology Letters*, (2005) 743-748
- [24] G.V. Reddy, P.B. Ravindra, P. Komaraiah, K.R.R.M. Roy, I.L. Kothari, *Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two Pleurotus species (P. ostreatus and P. sajor-caju)*, **Process Biochemistry**, 6: (2003) 1457-1462
- [25] A. Bramorski, P. Christen, M. Ramirez, C.R. Soccol, and S. Revah, *Production of volatile compounds by the edible fungus Rhizopus oryzae during solid state cultivation on tropical agro-industrial substrates*, **Biotechnol. Lett.**, 20,4 (1998) 359–362
- [26] P. Christen, A. Bramorski, S. Revah, C.R. Soccol, *Characterization of volatile compounds produced by Rhizopus strains grown on agro-industrial solid waste*, **Bioresource Technology**, 71 (2000) 211-215
- [27] C.R. Soccol, B. Marin, M. Raimbault, J.M. Lebeault, *Potential of solid state fermentation for production of L(+)-lactic acid by Rhizopus oryzae II*, **Appl Microbiol Biotechnol**, 41: (1994) 286-290
- [28] D. Kumar, V.K. Jain, G. Shanker, A. Srivastava, *Citric acid production by solid state fermentation using sugarcane bagasse*, **Process Biochemistry**, 38: (2003) 1731-1738
- [29] L. Fan, A. Pandey, R. Mohan, C. R. Soccol, *Use of various coffee industry residues for the cultivation of Pleurotus ostreatus in solid state fermentation*, **Acta Biotechnologica**, 1 (2004) 41-52
- [30] E.S. Martins, D. Silva, R. Da Silva, E. Gomes, *Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic Thermoascus aurantiacus*, **Process Biochemistry**, 6 (2002) 949-954
- [31] D. Kumar, V. K. Jain, G. Shanker, A. Srivastava, *Utilisation of fruits waste for citric acid production by solid state fermentation*, **Process Biochemistry**, 38 (2003) 1725-1729
- [32] L.P.S. Vandenberghe, C.R. Soccol, A. Pandey, J.M. Lebeault, *Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by Aspergillus niger*, **Bioresource Technology**, 74 (2000) 175-178
- [33] T. Roukas, *Citric acid production from carob pod by solid-state fermentation*, **Enzyme Microb. Technol.**, 1999
- [34] S. Germano, A. Pandey, C.A. Osaku, S.N. Rocha, C.R. Soccol, *Characterization and stability of proteases from Penicillium sp. produced by solid state fermentation*, **Enzyme and Microbial Technology**, 32 (2003) 246-251
- [35] C. Sandhya, A. Sumantha, G. Szakacs, A. Pandey, *Comparative evaluation of neutral protease production Aspergillus oryzae in submerged and solid-state fermentation*, **Process Biochemistry**, 40 (2005) 2689-2694

- [36] A.K. Gombert, A.L. Pinto, L.R. Castilho, D.M.G. Freire, *Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate*, **Process Biochemistry**, 35 (1999) 85-90
- [37] V.S. Shankaranand, B.K. Lonsane, *Coffee husk: an inexpensive substrate for production of citric acid by *Aspergillus niger* in a solid-state fermentation system*, **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, (2004) 165-168
- [38] M. Soares, P. Christen, A. Pandey, C.R. Soccol, *Fruity flavour production by *Ceratocystis fimbriata* grown on coffee husk in solid-state fermentation*, **Process Biochemistry**, 35 (2000) 857-861
- [39] F. Boccas, S. Roussos, M. Gutierrez, L. Serrano, G.G. Viniegra, *Production of pectinase from coffee pulp in solid state fermentation system: selection of wild fungal isolate of high potency by a simple three-step screening technique*, **J. Food Sci. Technol.**, (1993) 22-26
- [40] W. Penaloza, M.R. Molina, R.G. Brenes, R. Bressani, *Solid-state fermentation: an alternative to improve the nutritive value of coffee pulp*, **Applied and Environmental Microbiology**, 49 (1985) 388-393
- [41] S.R. Couto, E. Lopez, M.A. Sanroman, *Utilisation of grape seeds for laccase production in solid-state fermentors*, **Journal of Food Engineering**, (2005)
- [42] L. Ikasari, D.A. Mitchell, *Protease production by *Rhizopus oligosporus* in solid-state fermentation*, **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 10 (1994) 320-324
- [43] K.A. Hachmeister, D.Y. Fung, *Tempeh: a mold-modified indigenous fermented food made from soybeans and/or cereal grains*, **Crit. Rev. Microbiol.**, 19 (1993) 137-88
- [44] G. Xie, T.P. West, *Citric acid production by *Aspergillus niger* on wet corn distillers grains*, **Letters in Applied Microbiology**, 43 (2006) 269–273
- [45] S.R. Couto, M.A. Sanroman, *Application of solid-state fermentation to food industry—A review*, **Journal of Food Engineering**, 2005
- [46] K. Adinarayana, T. Prabhakar, V. Srinivasulu, M. Anitha Rao, P. Jhansi Lakshmi, P. Ellaiah, *Optimization of process parameters for cephalosporin C production under solid state fermentation from *Acremonium chrysogenum**, **Process Biochemistry** 39 (2003) 171_177
- [47] C. Botella, I. de Ory, C. Webb, D. Cantero, A. Blandino, *Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace*, **Biochemical Engineering Journal**, 26 (2005) 100–106
- [48] M. Hofrichter, T. Vares, M. Kalsi, S. Galkin, K. Scheibner, W. Fritsche, A. Hatakka, *Production of Manganese Peroxidase and Organic Acids and Mineralization of ¹⁴C-Labelled Lignin (¹⁴C-DHP) during Solid-State Fermentation of Wheat Straw with the White Rot Fungus *Nematoloma frowardii**, **Applied and Environmental Microbiology**, 65 (1999) 1864-1870
- [49] DJ Daigle, WJ Connick JR, AB Pepperman, ET Champagne, CD Boyette, JW Dorner, *The influence of solid-state fermentation inoculum on biopesticides' viability in granules*,
- [50] M. V. Deshpande, *Mycopesticide Production by Fermentation: Potential and Challenges*, 25 (1999) 229-243
- [51] V.G. Martins, S.J. Kalil, T.E. Bertolin, J.A.V. Costa, *Solid state biosurfactant production in a fixed-bed column bioreactor*, 61 (2006), 721-726
- [52] J. Gomez, D.R. Solar, M. Pazos, M.A. Sanroman, *Applicability of *Corioloropsis rigida* for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons*, **Biotechnol. Lett.**, 28: (2006) 1013–1017

- [53] J.V. de Lagemaat, D.L. Pyle, *Solid-state fermentation and bioremediation: development of a continuous process for the production of fungal tannase*, **Chemical Engineering Journal**, 84: (2001) 115–123
- [54] D. Brand, A. Pandey, S. Roussos, C.R. Soccol, *Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system*, *Enzyme and Microbial technology*, (2000) 127-133
- [55] T. Robinson, P. Nigam, *Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation*, **Biochemical Engineering Journal**, 13 (2003) 197–203
- [56] H. Chen, F. Xu, Z. Li, *Solid-state production of biopulp by *Phanerochaete chrysosporium* using steam-exploded wheat straw as substrate*, **Bioresource Technology**, 81: (2002) 261-263
- [57] M.S. Helmy, M. El-Meligi, *Biopulping and biobleaching by white rot fungi*, **Journal of Scientific & Industrial Research**, 61 (2002) 376-381
- [58] J. Szendefy, G. Szakacs, L. Christopher, *Potential of solid-state fermentation enzymes of *Aspergillus oryzae* in biobleaching of paper pulp*, **Enzyme and Microbial Technology**, 39 (2006) 1354–1360
- [59] M. Mazutti, J.P. Bender, H. Treichel, M.D. Luccio, *Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugarcane bagasse as substrate*, **Enzyme and Microbial Technology**, 39: (2006) 56–59
- [60] Y.S.P. Rahardjo, D. Korona, S. Haemers, F.J. Weber, J. Tramper, A. Rinzema, *Limitations of membrane cultures as a model solid-state fermentation system*, **Letters in Applied Microbiology**, 39 (2004) 504–508
- [61] T. Robinson, P. Nigam, *Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation*, **Biochemical Engineering Journal**, 13 (2003) 197–203
- [62] G.V. Gonzales, E.F. Gorres, C.N. Aguilar, S.J.R. Gomez, G.D. Godinez, C. Augur, *Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems*, **Biochemical Engineering Journal**, 13: (2003) 157–167
- [63] <http://www.world-of-fungi.org>
- [64] M. Humar, F. Pohleven, *Influence of a nitrogen supplement on the growth of wood decay fungi and decay of wood*, **International Biodeterioration & Biodegradation**, 56: (2005) 34–39
- [65] <http://www.alsnetbiz.com/homeimprovement/woodrot.html>
- [66] I. Eichlerova, L. Homolka, F. Nerud, *Synthetic dye decolorization capacity of white rot fungus *Dichomitus squalens**, **Bioresource Technology**, 97: (2006) 2153–2159
- [67] S.G.M. de Souza, A. Zilly, R.M. Peralta, *Production of laccase as the sole phenoloxidase by an Brazilian strain of *Pleurotus pulmonarius* in solid state fermentation*, **J. Basic. Microbiol.**, 42: (2002) 2, 83-90
- [68] C. Haglund, *Biodegradation of xenobiotic compounds by the white-rot fungus *Trametes troglia**, **Molecular Biotechnology Programme Uppsala University School of Engineering**, 1999
- [69] S.R. Couto, M.A. Sanroman, *Coconut flesh: a novel raw material for laccase production by *Trametes hirsuta* under solid-state conditions. Application to Lissamine Green B decolourization*, **Journal of Food Engineering**, 71: (2005) 208–213
- [70] O. Yesilada, D. Asma, S. Cing, *Decolorization of textile dyes by fungal pellets*, **Process Biochemistry**, 38 (2003) 933-938
- [71] G.K. Tychanowicz, A. Zilly, C.G.M. de Souza, R.M. Peralta, *Decolourisation of industrial dyes by solid-state cultures of *Pleurotus pulmonarius**, **Process Biochemistry**, 39: (2004) 855–859

- [72] P.M. Sathiya, S.S. Periyar, A. Sasikalaveni, K. Murugesan, P.T. Kalaichelvan, *Decolorization of textile dyes and their effluents using white rot fungi*, **African Journal of Biotechnology**, 6 (2007) 424-429
- [73] P. Nigam, G. Armour, I.M. Banat, D. Singh, R. Marchant, *Physical removal of textile dyes from e. uents and solid-state fermentation of dye-adsorbed agricultural residues*, **Bioresource Technology**, 72 (2000) 219-226
- [74] D. Boyle, *Effects of pH and cyclodextrins on pentachlorophenol degradation (mineralization) by white-rot fungi*, **Journal of Environmental Management**, 2005
- [75] T. Mester, M. Tien, *Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants*, **International Biodeterioration & Biodegradation**, 46: (2000) 51-59
- [76] C. Haglund, *Biodegradation of xenobiotic compounds by the white-rot fungus *Trametes trogii**, **UPTEC**, (1999)
- [77] L. Levin, F. Forchiassin, *Ligninolytic enzymes of the white rot Basidiomycete *Trametes trogii**, **Acta Biotechnol.**, 21 (2001) 179-186
- [78] M. Walter, K. Wilson, L. Boul, C. Ford, D. McFadden, B. Chong, J. Pinfold, *Field-scale bioremediation of pentachlorophenol by *Trametes versicolor**, **International Biodeterioration & Biodegradation**, 56: (2005) 51-57
- [79] S. Hamman, *Bioremediation capabilities of white rot fungi*, 2004
- [80] S. B. Pointing, *Feasibility of bioremediation by white-rot fungi*, **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2001
- [81] Ö. Yeşilada, *Alkol Fabrikası atığı Vinas (Şlempe)'in Beyaz çürükçül funguslar tarafından biyodegradasyonunda renk giderimi-Enzim ilişkisinin araştırılması*, 1992
- [82] M. Jaszek, K. Grzywnowicz, E. Malarczyk, A. Leonowicz, *Enhanced extracellular laccase activity as a part of the response system of white rot fungi: *Trametes versicolor* and *Abortiporus biennis* to paraquat-caused oxidative stress conditions*, **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 2006
- [83] S.S. Kahraman, I.H. Gürdal, *Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi* **Bioresource Technology**, 82 (2002) 215-217
- [84] H. Claus, *Laccases and their occurrence in prokaryotes*, **Archives of Microbiology**, 2003
- [85] <http://www.chem.ox.ac.uk>
- [86] S.R. Couto, J.L. Toca-Herrera, *Lacasses in the textile industry*, **Biotechnology and Molecular Biology**, 1 (2006) 117-122
- [87] K. Ikehata, I.D. Buchanan and D.V. Smith, *Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment*, *J. Environ. Eng. Sci.*, 3: (2004) 1-19
- [88] K. Fackler, C. Gradingner, B. Hinterstoisser, K. Messner, M. Schwanninger, *Lignin degradation by white rot fungi on spruce wood shavings during short-time solid-state fermentations monitored by near infrared spectroscopy*, **Enzyme and Microbial Technology**, 2006
- [89] J.C. Meza, A. Lomascolo, L. Casalot, Jean-Claude Sigoillot, R. Auria, *Laccase production by *Pycnoporus cinnabarinus* grown on sugar-cane bagasse: Influence of ethanol vapours as inducer*, **Process Biochemistry**, 40 (2005) 3365-3371
- [90] E. Rodriguez, O. Nuero, F. Guillen, A.T. Martinez, M.J. Martinez, *Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: the role of laccase and versatile peroxidase*, **Soil Biology & Biochemistry**, 36 (2004) 909-916
- [91] G. Davila-Vazquez, R. Tinoco, M.A. Pickard, R. Vazquez-Duhalt, *Transformation of halogenated pesticides by versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta**, **Enzyme and Microbial Technology**, 36 (2005) 223-231

- [92] E. Rodriguez, M.A. Pickard, R. Vazquez-Duhalt, *Industrial Dye Decolorization by Laccases from Ligninolytic Fungi*, **Current Microbiology**, 38 (1999) 27–32
- [93] M. Ohkuma, Y. Maeda, T. Johjima and T. Kudo, *Lignin degradation and roles of white rot fungi: Study on an efficient symbiotic system in fungus-growing termites and its application to bioremediation*, **Focused on Ecomolecular Science Research**, 42 (2001) 39-42
- [94] R.C. Minussi, G.M. Pastore, N. Duran, *Potential applications of laccase in the food industry*, **Trends in Food Science and Technology**, 13 (2002) 205-216
- [95] S.R. Couto, J.L.T. Herrera, *Industrial and biotechnological applications of laccases: A review*, **Biotechnology Advances**, 24 (2006) 500–513
- [96] C.G.M. de Souza, R.M. Peralta, *Purification and characterization of the main laccase produced by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium*, **J. Basic Microbiol.**, 43 (2003) 278–286
- [97] V.L. Papinutti, F. Forchiassin, *Lignocellulolytic enzymes from *Fomes sclerodermeus* growing in solid-state fermentation*, **Journal of Food Engineering**, (2006)
- [98] K. Murugesan, In-Hyun Nam, Young-Mo Kim, Yoon-Seok Chang, *Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid state culture*, **Enzyme and Microbial Technology**, 40 (2007) 1662–1672
- [99] E. Rosales, S.R. Couto, M.A. Sanroman, *Reutilisation of food processing wastes for production of relevant metabolites: application to laccase production by *Trametes hirsuta**, **Journal of Food Engineering**, 66 (2005) 419–423
- [100] S.R. Couto, E. Rosales, M. Gundin, M.A. Sanroman, *Exploitation of a waste from the brewing industry for laccase production by two *Trametes* species*, **Journal of Food Engineering**, 64 (2004) 423–428
- [101] E. Rosales, S.R. Couto, M.A. Sanroman, *Increased laccase production by *Trametes hirsuta* grown on ground orange peelings*, **Enzyme and Microbial Technology**, 40 (2007) 1286–1290
- [102] G.K. Tychanowicz, D.F. de Souza, C.G.M. Souza, M.K. Kadowaki, R.M. Peralta, *Copper Improves the Production of Laccase by the White- Rot Fungus *Pleurotus pulmonarius* in Solid State Fermentation*, **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 49 (2006) 699-704
- [103] C.G. Boer, L. Obici, C.G.M. de Souza, R.M. Peralta, *Decolorization of synthetic dyes by solid state cultures of *Lentinula (Lentinus) edodes* producing manganese peroxidase as the main ligninolytic enzyme*, **Bioresource Technology**, 94 (2004) 107-112
- [104] E. Rosales, S.R. Couto, A. Sanroman, *New uses of food waste: application to production by *Trametes hirsuta**, **Biotechnology Letters**, 24 (2002) 701-704
- [105] V.L. Papinutti, L.A. Diorio, F. Forchiassin, *Production of laccase and manganese peroxidase by *Fomes sclerodermeus* grown on wheat bran*, **Society for In Industrial Microbiology**, 2003
- [106] V. Elisashvili, M. Penninckx, E. Kachlishvili, N. Tsiklauri, E. Metreveli, T. Kharziani, G. Kvesitadze, **Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition*, **Bioresource Technology**, 2007
- [107] D.F. de Souza, G.K. Tychanowicz, C.G.M. de Souza, R.M. Peralta, *Co-production of ligninolytic enzymes by *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state cultures*, **J. Basic. Microbiol.**, 46 (2006) 126-134

- [108] S.R. Couto, D. Moldes, A. Liebanas, A. Sanroman, *Investigation of several bioreactor configurations for laccase production by Trametes versicolor operating in solid-state conditions*, **Biochemical Engineering Journal**, 15 (2003) 21–26
- [109] S.R. Couto, M.A. Sanroman, *Effect of two wastes from groundnut processing on laccase production and dye decolourisation ability*, **Journal of Food Engineering**, 73 (2006) 388–393
- [110] M.P. Shah, G.V. Reddy, R. Banerjee, P.R. Babu, I.L. Kothari, *Microbial degradation of banana waste under solid state bioprocessing using two lignocellulolytic fungi (Phylosticta spp. MPS-001 and Aspergillus spp. MPS-002)*, **Process Biochemistry**, 40 (2005) 445–451
- [111] M.M. Bradford, *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, **Anal. Biochem.**, 72 (1976) 248–254
- [112] <http://www.food-info.net>
- [113] <http://www.biltek.tubitak.gov.tr>
- [114] M. Kahyaoglu, V. Konar, *Şeker Fabrikası Atık Maddeleri Kullanılarak Pseudomonas aeruginosa'dan Ramnolipit Biyosüpfektanı Elde Edilmesi*, **Fırat Üniv. Fen ve Müh. Bil. Dergisi**, 18 (2006) 493–498
- [115] Ö. Yesilada, *Zeytin yağı Fabrikası Atıksuyunun Değerlendirilmesi ve Arıtımı*, **Biyoteknoloji (Kükem) Dergisi**, 24 (2000) 69–91
- [116] U. Sidal, N. Kolankaya, C. Kurtonur, *Pseudomonas sp. ile Zeytinyağı Fabrikası Atığından Biyosüpfektan Eldesi*, **Türk J Biol.**, 24 (2000) 611–625
- [117] C. Botella, I. de Ory, C. Webb, D. Cantero, A. Blandino, *Hydrolytic enzyme production by Aspergillus awamori on grape pomace*, **Biochemical Engineering Journal**, 26 (2005) 100–106
- [118] E. Birhanli, O. Yesilada, *Increased production of laccase by pellets of Funalia trogii ATTC 200800 and Trametes versicolor ATCC 200801 in repeated-batch mode*, *Enzyme and Microbial Technology* (2006)
- [119] C. Eggert, U. Temp, Karl-Eric L. Eriksson, *The Ligninolytic System of the White Rot Fungus Pycnoporus cinnabarinus: Purification and Characterization of the Laccase*, **Applied and Environmental Microbiology**, 62 (1996) 1151–1158
- [120] Y. Z. Xiao, Q. Chen, J. Hang, Y. Y. Shi, J. Wu, Y. Z. Hong, Y. P. Wang, *Selective induction, purification and characterization of a laccase isozyme from the basidiomycete Trametes sp. AH28-2*, **Mycologia**, 96 (2004) 26–35
- [121] M. Fenice, G.G. Sermanni, F. Federici, A. D'Annibale, *Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by Panus tigrinus on olive mill wastewater-based media*, **Journal of Biotechnology**, 100 (2003) 77– 85

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Filiz KURU
Doğum Yeri ve Tarihi : Malatya- 10.03.1981
Mesleği ve Ünvanı : Biyolog

EĞİTİM DURUMU

İlkokul : İnönü İlköğretim Okulu (Malatya, 1987-1992)
Ortaokul : İnönü İlköğretim Okulu (Malatya, 1992-1995)
Lise : Turgut Özal Süper Lisesi (Malatya, 1995-1999)
Lisans : İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, (Malatya, 2000-2004)
Yüksek Lisans : İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, (Malatya, 2004-2007)

Bilimsel faaliyetler

1. Biyoloji Eğitiminde Evrim Sempozyumu, 3-4 Mayıs 2007, İnönü Üniversitesi, MALATYA
2. *Beyaz Çürükçül Fungusların Biyoteknolojik Önemi*, 18. Ulusal Biyoloji Kongresi, Adnan Menderes Üniversitesi, 26-30 Haziran 2006, Kuşadası/AYDIN (Poster sunumu).
3. *Katı Substrat Fermentasyonu ile Lakkaz Üretimi* , XIV. Biyoteknoloji Kongresi, ESKİŞEHİR (Poster sunumu).
4. XVI. Ulusal Biyoloji Kongresi, 3-7 Eylül 2002, İnönü Üniversitesi, MALATYA (Görevli).