

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BEYAZ-ÇÜRÜKÇÜL FUNGUSLARIN SELÜLAZ VE KSİLANAZ ENZİM
ÜRETİM POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI

DEMET DOĞAN

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MALATYA
ARALIK 2013

Tezin Başlığı: Beyaz-Çürükçül Fungusların Selüloz ve Ksilanaz Enzim Üretim Potansiyellerinin Araştırılması

Tezi Hazırlayan: Demet DOĞAN

Sınav Tarihi: 03.12.2013

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

Sınav Jürisi Üyeleri:

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Sibel KAHRAMAN
İnönü Üniversitesi



Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA
İnönü Üniversitesi



Prof. Dr. Dilek ASMA
İnönü Üniversitesi



Doç. Dr. Birgül ÖZCAN
Mustafa Kemal Üniversitesi



Yrd. Doç. Dr. Seval CİNG YILDIRIM
İnönü Üniversitesi



Prof. Dr. Mehmet ALPASLAN
Enstitü Müdürü

Onur Sözü

Doktora Tezi olarak sunduğum **“Beyaz-Çürükçül Fungusların Selüloz ve Ksilanaz Enzim Üretim Potansiyellerinin Araştırılması”** 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.

Demet DOĞAN

ÖZET

Doktora Tezi

BEYAZ-ÇÜRÜKÇÜL FUNGUSLARIN SELÜLAZ VE KSİLANAZ ENZİM ÜRETİM POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Demet DOĞAN

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

142+ xii sayfa

2013

Danışman: Prof. Dr. Sibel KAHRAMAN

Beyaz çürükçül funguslar; ksilanazlar, selülazlar ve lakkazlar dahil ekstraselüler lignoselülozik enzimleri büyük miktarlarda üretmektedir. Çevrede biriken yüksek miktarda tarımsal atık lignoselülozik enzimlerin üretimi için kullanılabilir. Pamuk sapları Türkiye gibi pamuk yetiştiricisi ülkelerde yerel bir tarımsal atık olarak bol miktarlarda elde edilmektedir ve bu atıklar lignoselülozik enzimlerin üretimini stimüle etmek için kullanılabilir. Bu çalışmanın amacı, ucuz, bol ve kolaylıkla elde edilebilen tarımsal atıklar kullanarak beyaz çürükçül fungusların selülaz ve ksilanaz üretimini arttırmak ve böylece farklı sentetik ve doğal kültür ortamlarında (Zeytin Yağı Fabrikası Atıksuyu-ZYFA) enzim üretim maliyetini düşürmektir.

Bu çalışmada, *Pleurotus ostreatus* ve yeni izole edilmiş *Pleurotus ostreatus* beyaz çürükçül funguslarının pamuk sapı içeren sentetik ve doğal kültür ortamlarında selülaz ve ksilanaz üretim yetenekleri ve optimum enzim üretimi üzerine etkisi olan farklı kültür koşulları araştırılmıştır. Enzim üretiminin optimizasyonu için, inkübasyon süresi (3.-6.-9.-12.-15. günler), sıcaklık (20-30-40-50 °C), pH (3.0-5.0-7.0-9.0), pamuk sapı miktarı (0.1-0.5-1.0 gr), pamuk sapı partikül büyüklüğü (küçük-büyük) gibi parametreler çalışılmıştır.

Sonuçlar, selülaz ve ksilanaz enzim üretiminin sıcaklık, pH, inkübasyon süresi, çalkalama oranı, pamuk sapı miktarı ve pamuk sapı büyüklüğü gibi çeşitli faktörlerden etkilendiğini göstermiştir. Sentetik ve doğal kültür ortamlarında *P. ostreatus* tarafından optimum selülaz ve ksilanaz üretimi 30-40 °C sıcaklıkta ve 3-5 pH aralığında gerçekleşirken, yeni izole edilmiş *P. ostreatus* için 30-40 °C sıcaklıkta ve 5-7 pH aralığında elde edilmiştir. Sonuçlarımız pamuk sapı miktarı ve büyüklüğünün artması ile selülaz ve ksilanaz üretiminin arttığını ve her iki fungus için enzim üretiminin 3. ve 6. günlerde optimal olarak gerçekleştiğini göstermiştir.

Çalışmamızın diğer bir kısmında, pamuk sapı dışındaki farklı tarımsal atıkların enzim aktivitesi üzerine olan etkisini belirlemek amacıyla deneyler yapılmıştır. Bu amaçla, buğday samanı, mısır koçanı, çam kozalağı ve kavak talaşı gibi tarımsal atıkları içeren kültür ortamlarında, her iki beyaz çürükçül fungusun selülaz ve ksilanaz enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Sonuçlar, buğday samanı ve

mısır koçanının çam kozalağı ve kavak talaşına göre daha etkili enzim indüktörleri olduğunu göstermiştir.

Çalışmamızın son kısmında ise, bu funguslar tarafından ZYFA'nın renk giderimi tespit edilmiştir. Sonuçlarımıza göre, optimum koşullarda *P. ostreatus* ile yaklaşık %97.08 renk giderimi olduğunu, yeni izole edilmiş *P. ostreatus* ile ise yaklaşık %97.81 renk giderimine ulaşılmıştır.

Bu çalışmanın sonuçları, *P. ostreatus* izolatları kullanılarak optimum koşullar altında yüksek miktarlarda selüloz ve ksilanaz elde edilebileceğini göstermektedir.

ANAHTAR KELİMELER : Selüloz, ksilanaz, beyaz çürükçül fungus, pamuk sapı, tarımsal atıklar

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

THE INVESTIGATION OF CELLULASE AND XYLANASE PRODUCTION ABILITY OF WHITE-ROT FUNGI

Demet DOĞAN

Inonu University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

142+ xii pages

2013

Supervisor: Prof. Dr. Sibel KAHRAMAN (Ph.D.)

The white rot fungi produce a wide range of extracellular lignocellulosic enzymes including: xylanases, cellulases and laccases. Large quantities of agricultural wastes accumulate in the environment can be used for the production of lignocellulosic enzymes. Cotton stalks are available in vast quantities in all cotton-growing countries such as Turkey as local agricultural waste and these wastes can be used to stimulate lignocellulosic enzyme production. The objective of the present study is to increase the xylanase and cellulase production of white rot fungi using inexpensive and abundantly available agro-residues thereby reducing the cost of enzyme production in different synthetic and natural culture media (Olive Oil Mill Wastewater-OOMW).

In the present study, two white-rot fungal species *P. ostreatus* and newly isolated *P. ostreatus* were examined for their ability to produce cellulase, xylanase on cotton stalk waste at synthetic and natural culture media. Different cultural conditions were investigated to assess their effect in optimizing enzyme production. For optimization of enzyme production, the parameters studied were incubation time (3-6-9-12-15 days), temperature (20-30-40-50 °C), pH (3.0-5.0-7.0-9.0), amount of cotton stalk (0.1-0.5-1.0 gr), particle size of cotton stalk (small-large).

The results indicated that various factors including temperature, pH, incubation time, agitation rate, cotton stalk amount and cotton stalk particle size influence xylanase and cellulase production. Optimum temperature and pH of the synthetic and natural medium for the cellulase and xylanase production by *P. ostreatus* were 30-40 °C and pH 3-5, whereas those for the production of cellulase and xylanase by newly isolated *P. ostreatus* were 30-40 °C and pH 5-7. The results showed that as the amount and size of cotton stalk was increased, cellulase and xylanase production increased accordingly. The optimal incubation time for enzymes production by either fungi was 3-6 days.

In other part of this study, further experiments were conducted in order to determined effect of different agricultural wastes (other than cotton stalk) on enzymatic activity. For this purpose, cellulase and xylanase enzyme activities of two white rot fungi were determined in culture media containing agricultural wastes such

as wheat straw, corn cobs, pine cone and aspen shavings. Experimental results show that, wheat straw and corn cobs were more effective enzyme inductor than pine cone and aspen shaving.

In last part of this study, color removal (%) of OOMW by these fungi were determined. According to the results, under the optimum conditions, *P. ostreatus* removed approximately 97.08 % color and newly isolated *P. ostreatus* removed approximately 97.81 % color of OOMW used.

The results of this study demonstrated that it is possible to obtain high amounts of cellulase and xylanase by using *P. ostreatus* isolates under optimal conditions.

KEYWORDS: Cellulase, xylanase, white rot fungi, cotton stalk, agricultural wastes

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın her aşamasında yardım, öneri ve desteğini benden esirgemeyen, her ihtiyaç duyduğumda yanımda olan çok değerli tez danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sibel KAHRAMAN'a,

Çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım hocam Sayın Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA'ya,

Tez sürecinde yapılan toplantılarda fikirlerini ve önerilerini paylaşan tez izleme komitesi üyesi hocam Sayın Prof. Dr. Dilek ASMA'ya,

Beyaz-çürükçül fungusların selüloz ve ksilanaz enzim üretim potansiyellerinin araştırılması (BAP 2011/134) konulu projemizi destekleyen Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne,

Yardım istediğimde her zaman imdadıma yetişen sevgili eşim Ufuk Günay DOĞAN'a,

Ve biricik oğlum Ömer Berk'e,

sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Genel Bilgiler.....	1
1.2. Biyoteknoloji.....	2
1.2.1. Yeşil biyoteknoloji.....	4
1.2.2. Kırmızı biyoteknoloji.....	5
1.2.3. Gri biyoteknoloji.....	5
1.2.4. Beyaz biyoteknoloji.....	6
1.3. Biyoteknolojide Kullanılan Mikroorganizmalar.....	7
1.3.1. Çürükçül funguslar.....	8
1.3.2. Beyaz çürükçül fungusların biyoteknolojide kullanımı.....	15
1.4. Beyaz Çürükçül Fungusların Lignolitik Enzimleri.....	17
1.4.1. Selülozlar.....	17
1.4.1.1. Selülozların biyoteknolojide kullanım alanları.....	19
1.4.2. Ksilanazlar.....	23
1.4.2.1. Ksilanazların biyoteknolojide kullanım alanları.....	26
1.5. Çalışmada Kullanılan Tarımsal ve Endüstriyel Atıkların Özellikleri....	29
1.5.1. Pamuk sapı.....	29
1.5.2. Zeytinyağı fabrikası atık suyu (ZYFA).....	31
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	35
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	46
3.1. Çalışmalarda Kullanılan Funguslar.....	46
3.2. Çalışmalarda Kullanılan Fungusların Üretimi ve Devamlılığının Sağlanması.....	46
3.3. Çalışmalarda Kullanılan Stok Fungus Kültürlerinin Hazırlanması.....	46
3.4. Çalışmalarda Enzim Üretim Ortamı Olarak Kullanılan Besiyerlerinin İçeriği ve Hazırlanması.....	47
3.5. Çalışmada Kullanılan Lignoselülozik Materyalin Hazırlanması.....	48
3.6. Selüloz ve Ksilanaz Enzim Üretim Yöntemi.....	48
3.7. Optimizasyon Çalışmaları.....	48
3.7.1. İnkübasyon sürelerinin selüloz ve ksilanaz enzim üretimi üzerine etkisinin saptanması.....	48
3.7.2. Pamuk sapı miktarının ve büyüklüğünün, selüloz ve ksilanaz enzim üretimi üzerine etkisinin saptanması.....	49
3.7.3. Çalkalama hızının selüloz ve ksilanaz enzim üretimi üzerine etkisinin saptanması.....	49
3.7.4. İnkübasyon sıcaklığının selüloz ve ksilanaz enzim üretimi üzerine etkisinin saptanması.....	49
3.7.5. Besiyeri pH'sının selüloz ve ksilanaz enzim üretimi üzerine etkisinin saptanması.....	49

3.7.6.	Pamuk sapı dışında farklı indüktörlerin enzim aktiviteleri üzerine etkisinin saptanması.....	50
3.8.	Analizler.....	50
3.8.1.	Kültür ortamındaki enzim aktivitelerinin saptanması.....	50
3.8.1.1.	Kültür ortamındaki selülag (FPA ve CMCaz) aktivitesinin tayini.....	50
3.8.1.2.	Kültür ortamındaki ksilanaz aktivitesinin tayini.....	52
3.8.2.	Zeytin yağı fabrikası atık suyunun kirlilik parametreleri ile ilgili analizler.....	52
3.8.2.1.	ZYFA'nın renk değişiminin ölçümü.....	53
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	54
4.1.	<i>Pleurotus ostreatus</i> 'un Selülag ve Ksilanaz Enzim Üretimi Üzerine Etkili Faktörlerin İncelenmesi	55
4.1.1.	İnkübasyon sürelerinin selülag (FPA ve CMCaz) ve ksilanaz enzim üretimi üzerine etkisi.....	55
4.1.2.	Pamuk sapı miktarının selülag (FPA ve CMCaz) ve ksilanaz enzim üretimi üzerine etkisi.....	67
4.1.3.	Pamuk sapı büyüklüğünün selülag (FPA ve CMCaz) ve ksilanaz enzim üretimi üzerine etkisi.....	71
4.1.4.	Çalkalama hızının selülag (FPA ve CMCaz) ve ksilanaz enzim üretimi üzerine etkisi.....	75
4.1.5.	İnkübasyon sıcaklığının selülag (FPA ve CMCaz) ve ksilanaz enzim üretimi üzerine etkisi.....	79
4.1.6.	Besiyeri pH'sının selülag (FPA ve CMCaz) ve ksilanaz enzim üretimi üzerine etkisinin saptanması.....	84
4.2.	<i>Pleurotus ostreatus</i> (y.i)'un Selülag ve Ksilanaz Enzim Üretimi Üzerine Etkili Faktörlerin İncelenmesi.....	89
4.2.1.	İnkübasyon sürelerinin selülag (FPA ve CMCaz) ve ksilanaz enzim üretimi üzerine etkisi.....	89
4.2.2.	Çalkalama hızının selülag (FPA ve CMCaz) ve ksilanaz enzim üretimi üzerine etkisi.....	94
4.2.3.	İnkübasyon sıcaklığının selülag (FPA ve CMCaz) ve ksilanaz enzim üretimi üzerine etkisi.....	99
4.2.4.	Besiyeri pH'sının selülag (FPA ve CMCaz) ve ksilanaz enzim üretimi üzerine etkisinin saptanması.....	104
4.3.	Pamuk Sapı Dışında Farklı Lignoselülozik İndüktörlerin Selülag (CMCaz) ve Ksilanaz Enzim Üretimi Üzerine Etkisi.....	108
4.3.1.	<i>Pleurotus ostreatus</i> ile farklı indüktörlerin eklendiği ortamlarda elde edilen selülag (CMCaz) ve ksilanaz enzim aktiviteleri.....	108
4.3.2.	<i>Pleurotus ostreatus</i> (y.i) ile farklı indüktörlerin eklendiği ortamlarda elde edilen selülag (CMCaz) ve ksilanaz enzim aktiviteleri.....	112
4.4.	Farklı Konsantrasyonlardaki ZYFA Ortamlarında Elde Edilen Selülag (CMCaz) ve Ksilanaz Enzim Aktiviteleri, Renk Giderimi	116
4.4.1.	Farklı konsantrasyonlardaki ZYFA ortamlarında elde edilen selülag (CMCaz) ve ksilanaz enzim aktiviteleri.....	120
4.4.2.	Farklı konsantrasyonlardaki ZYFA ortamlarında elde edilen % renk giderimi.....	120
5.	SONUÇ ve ÖNERİLER	123
6.	KAYNAKLAR	129
	ÖZGEÇMİŞ	142

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Lignoselülozik maddelerin genel yapısı	10
Şekil 1.2.	Selülozun molekül yapısı	12
Şekil 1.3.	Hemiselülozun yapısı	13
Şekil 1.4.	Selülaz enzim sistemi ve selülozun enzimatik parçalanma biçimleri.....	19
Şekil 1.5.	Ksilanın tam hidrolizinde gerekli enzimler ve etki bölgeleri.....	25
Şekil 3.1.	DNS metodu için glukoz standart eğrisi.....	51
Şekil 3.2.	DNS metodu için ksiloz standart eğrisi.....	52
Şekil 4.1.	<i>P. ostreatus</i> ile pamuk sapı eklenmiş ve eklenmemiş doğal kültür ortamlarında (A, B, C) günlere bağlı olarak elde edilen selülaz (FPA) aktivitesi	57
Şekil 4.2.	<i>P. ostreatus</i> ile pamuk sapı eklenmiş ve eklenmemiş sentetik kültür ortamlarında (A, B, C) günlere bağlı olarak elde edilen selülaz (FPA) aktivitesi	58
Şekil 4.3.	<i>P. ostreatus</i> ile pamuk sapı eklenmiş ve eklenmemiş doğal kültür ortamlarında (A, B, C) günlere bağlı olarak elde edilen selülaz (CMCaz) aktivitesi	61
Şekil 4.4.	<i>P. ostreatus</i> ile pamuk sapı eklenmiş ve eklenmemiş sentetik kültür ortamlarında (A, B, C) günlere bağlı olarak elde edilen selülaz (CMCaz) aktivitesi	62
Şekil 4.5.	<i>P. ostreatus</i> ile pamuk sapı eklenmiş ve eklenmemiş doğal kültür ortamlarında (A, B, C) günlere bağlı olarak elde edilen ksilanaz aktivitesi	64
Şekil 4.6.	<i>P. ostreatus</i> ile pamuk sapı eklenmiş ve eklenmemiş sentetik kültür ortamlarında (A, B, C) günlere bağlı olarak elde edilen ksilanaz aktivitesi	65
Şekil 4.7.	Küçük boy ve büyük boy pamuk saplarının görünümü.....	71
Şekil 4.8.	<i>P. ostreatus</i> ile farklı boyutlarda pamuk sapı içeren doğal ve sentetik kültür ortamlarında elde edilen selülaz (FPA) aktivitesi...	73
Şekil 4.9.	<i>P. ostreatus</i> ile farklı boyutlarda pamuk sapı içeren doğal ve sentetik kültür ortamlarında elde edilen selülaz (CMCaz) aktivitesi	73
Şekil 4.10.	<i>P. ostreatus</i> ile farklı boyutlarda pamuk sapı içeren doğal ve sentetik kültür ortamlarında elde edilen ksilanaz aktivitesi.....	74
Şekil 4.11.	Farklı çalkalama hızlarında A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında üretilen <i>P. ostreatus</i> ile 6. ve 12. günlerde elde edilen selülaz (FPA) aktivitesi.....	76
Şekil 4.12.	Farklı çalkalama hızlarında A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında üretilen <i>P. ostreatus</i> ile 6. ve 12. günlerde elde edilen selülaz (CMCaz) aktivitesi.....	77
Şekil 4.13.	Farklı çalkalama hızlarında A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında üretilen <i>P. ostreatus</i> ile 6. ve 12. günlerde elde edilen ksilanaz aktivitesi.....	78
Şekil 4.14.	<i>P. ostreatus</i> ile farklı inkübasyon sıcaklıklarında A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında 6. ve 12. günlerde elde edilen selülaz (FPA) aktivitesi	81

Şekil 4.15.	<i>P. ostreatus</i> ile farklı inkübasyon sıcaklıklarında A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında 6. ve 12. günlerde elde edilen selülag (CMCaz) aktivitesi	82
Şekil 4.16.	<i>P. ostreatus</i> ile farklı inkübasyon sıcaklıklarında A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında 6. ve 12. günlerde elde edilen ksilanaz aktivitesi	83
Şekil 4.17.	<i>P. ostreatus</i> ile farklı başlangıç pH'larındaki A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında, 6. ve 12. günlerde elde edilen selülag (FPA) aktivitesi.....	86
Şekil 4.18.	<i>P. ostreatus</i> ile farklı başlangıç pH'larındaki A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında 6. ve 12. günlerde elde edilen selülag (CMCaz) aktivitesi.....	87
Şekil 4.19.	<i>P. ostreatus</i> ile farklı başlangıç pH'larındaki A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında 6. ve 12. günlerde elde edilen ksilanaz aktivitesi.....	88
Şekil 4.20.	<i>Pleurotus ostreatus</i> (y.i) ile pamuk sapı eklenmiş ve eklenmemiş A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında günlere bağlı olarak elde edilen selülag (FPA) aktivitesi.....	91
Şekil 4.21.	<i>Pleurotus ostreatus</i> (y.i) ile pamuk sapı eklenmiş ve eklenmemiş A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında günlere bağlı olarak elde edilen selülag (CMCaz) aktivitesi.....	92
Şekil 4.22.	<i>Pleurotus ostreatus</i> (y.i) ile pamuk sapı eklenmiş ve eklenmemiş A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında günlere bağlı olarak elde edilen ksilanaz aktivitesi ...	93
Şekil 4.23.	Farklı çalkalama hızlarında A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında üretilen <i>Pleurotus ostreatus</i> (y.i) ile 3. ve 6. günlerde elde edilen selülag (FPA) aktivitesi.....	96
Şekil 4.24.	Farklı çalkalama hızlarında A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında üretilen <i>Pleurotus ostreatus</i> (y.i) ile 3. ve 6. günlerde elde edilen selülag (CMCaz) aktivitesi.....	97
Şekil 4.25.	Farklı çalkalama hızlarında A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında üretilen <i>Pleurotus ostreatus</i> (y.i) ile 3. ve 6. günlerde elde edilen ksilanaz aktivitesi.....	98
Şekil 4.26.	<i>Pleurotus ostreatus</i> (y.i) ile farklı inkübasyon sıcaklıklarında A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında 3. ve 6. günlerde elde edilen selülag (FPA) aktivitesi.....	101
Şekil 4.27.	<i>Pleurotus ostreatus</i> (y.i) ile farklı inkübasyon sıcaklıklarında A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında 3. ve 6. günlerde elde edilen selülag (CMCaz) aktivitesi.....	102
Şekil 4.28.	<i>Pleurotus ostreatus</i> (y.i) ile farklı inkübasyon sıcaklıklarında A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında 3. ve 6. günlerde elde edilen ksilanaz aktivitesi.....	103
Şekil 4.29.	<i>Pleurotus ostreatus</i> (y.i) ile farklı başlangıç pH'larında A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında 3. ve 6. günlerde elde edilen selülag (FPA) aktivitesi.....	105
Şekil 4.30.	<i>Pleurotus ostreatus</i> (y.i) ile farklı başlangıç pH'larında A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında 3. ve 6. günlerde elde edilen selülag (CMCaz) aktivitesi.....	106

Şekil 4.31.	<i>Pleurotus ostreatus</i> (y.i) ile farklı başlangıç pH'larında A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında 3. ve 6. günlerde elde edilen ksilanaz aktivitesi.....	107
Şekil 4.32.	<i>Pleurotus ostreatus</i> ile farklı indüktörlerin eklendiği A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında 6. ve 12. günlerde elde edilen selüloz (CMCaz) aktivitesi.....	110
Şekil 4.33.	<i>Pleurotus ostreatus</i> ile farklı indüktörlerin eklendiği A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında 6. ve 12. günlerde elde edilen ksilanaz aktivitesi.....	111
Şekil 4.34.	<i>Pleurotus ostreatus</i> (y.i) ile farklı indüktörlerin eklendiği A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında 3. ve 6. günlerde elde edilen selüloz (CMCaz) aktivitesi.....	113
Şekil 4.35.	<i>Pleurotus ostreatus</i> (y.i) ile farklı indüktörlerin eklendiği A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında 3. ve 6. günlerde elde edilen ksilanaz aktivitesi.....	114
Şekil 4.36.	<i>Pleurotus ostreatus</i> ile buğday samanı, mısır koçanı ve pamuk sapı içeren farklı ZYFA konsantrasyonlarında 3. ve 6. günlerde elde edilen selüloz (CMCaz) aktivitesi.....	117
Şekil 4.37.	<i>Pleurotus ostreatus</i> (y.i) ile buğday samanı, mısır koçanı ve pamuk sapı içeren farklı ZYFA konsantrasyonlarında 3. ve 6. günlerde elde edilen selüloz (CMCaz) aktivitesi.....	118
Şekil 4.38.	<i>Pleurotus ostreatus</i> ile buğday samanı, mısır koçanı ve pamuk sapı eklenen farklı ZYFA konsantrasyonlarında 3. ve 6. günlerde elde edilen ksilanaz aktivitesi	119
Şekil 4.39.	<i>Pleurotus ostreatus</i> (y.i) ile buğday samanı, mısır koçanı ve pamuk sapı içeren farklı ZYFA konsantrasyonlarında 3. ve 6. günlerde elde edilen ksilanaz aktivitesi	119
Şekil 4.40.	<i>Pleurotus ostreatus</i> ile buğday samanı, mısır koçanı ve pamuk sapı içeren farklı ZYFA konsantrasyonlarında % renk giderimi	121
Şekil 4.41.	<i>Pleurotus ostreatus</i> (y.i) ile buğday samanı, mısır koçanı ve pamuk sapı içeren farklı ZYFA konsantrasyonlarında % renk giderimi.....	121

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	Biyoteknolojide renk kodları.....	4
Çizelge 1.2.	Lignoselülozik maddeler ve çeşitli kullanım alanları.....	9
Çizelge 1.3.	Bazı lignoselülozik kaynakların selüloz (%), hemiselüloz (%) ve lignin (%) bileşimi.....	11
Çizelge 1.4.	Türkiye’deki tarımsal atıklar ve miktarları.....	30
Çizelge 1.5.	Klasik ve sürekli yöntemle zeytinyağı üretimi yapan tesislerden çıkan zeytin karasuyunun bileşimi.....	33
Çizelge 3.1.	STO ve glukoz içermeyen STO’nun içeriği.....	47
Çizelge 4.1.	<i>P. ostreatus</i> ile farklı miktarlarda pamuk sapı içeren doğal kültür ortamlarında, 6. ve 12. günlerde elde edilen selülaz (FPA) aktivitesi.....	68
Çizelge 4.2.	<i>P. ostreatus</i> ile farklı miktarlarda pamuk sapı içeren sentetik kültür ortamlarında, 6. ve 12. günlerde elde edilen selülaz (FPA) aktivitesi.....	68
Çizelge 4.3.	<i>P. ostreatus</i> ile farklı miktarlarda pamuk sapı içeren doğal kültür ortamlarında, 6. ve 12. günlerde elde edilen selülaz (CMCaz) aktivitesi	69
Çizelge 4.4.	<i>P. ostreatus</i> ile farklı miktarlarda pamuk sapı içeren sentetik kültür ortamlarında, 6. ve 12. günlerde elde edilen selülaz (CMCaz) aktivitesi	69
Çizelge 4.5.	<i>P. ostreatus</i> ile farklı miktarlarda pamuk sapı içeren doğal kültür ortamlarında, 6. ve 12. günlerde elde edilen ksilanaz aktivitesi.....	70
Çizelge 4.6.	<i>P. ostreatus</i> ile farklı miktarlarda pamuk sapı içeren sentetik kültür ortamlarında, 6. ve 12. günlerde elde edilen ksilanaz aktivitesi.....	70

SİMGELER VE KISALTMALAR

BOİ	Biyokimyasal oksijen ihtiyacı
CBM	Selüloz bağlayan modül
CMCaz	Karboksimetil selülaz aktivitesi
DNS	Dinitrosalisilik asit
FPA	Filtre kağıdı aktivitesi
KOİ	Kimyasal oksijen ihtiyacı
Lac	Lakkaz
LiP	Lignin peroksidaz
MnP	Mangan peroksidaz
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
rpm	Dakikada dönme hızı
SDA	Sabouraud dekstroza agar
SDB	Sabouraud dekstroza broth
STO	Stok temel ortam
XO ₅	Ksilooligosakkarit
ZYFA	Zeytinyağı fabrikası atık suyu

1. GİRİŞ

1.1. Genel Bilgiler

Metabolizmanın katalitik temel taşları olan enzimler, canlı hücresinde tüm metabolik olayları yöneten ve yüksek derecede özgül protein katalizörlerdir. Enzimleri biyolojik sistemlerde olduğu kadar günlük ve endüstriyel uygulamalar için de gitgide cazip kılan özellikleri vardır. Organik kimyanın klasik yöntemleri ile gerçekleştirilmesi zor olan bir çok reaksiyonun doğru enzimin varlığında büyük bir özgüllükle ve kolayca başarılabilmesi, enzimlerin canlı hücrelerden izolasyonu ve canlı dışında çeşitli amaçlar için kullanılabilmesi endüstriyel uygulamalarda enzim kullanımını öne çıkarmıştır [1].

Enzimatik süreçlerin daha az çevre kirliliğine yol açması, kimyasal süreçlerden daha ılımlı koşullarda ve ekonomik olarak gerçekleştirilebilmesi nedenleri ile enzimlerin tekstil, deri ve deterjan endüstrileri, gıda ve hayvan yemlerinin işlenmesi, kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi, ilaç yapımı ve atık giderme süreçlerindeki kullanımları büyük oranda artmıştır [2].

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle biyoteknolojinin endüstriyel enzimler ile ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar daha da önem kazanmaktadır [3].

Endüstriyel alanlarda kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Çünkü mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha kararlı ve ucuz olmaları ve fazla miktarda elde edilebilmeleri gibi bazı avantajları bulunmaktadır [4]. Enzimlerin bu mükemmel özellikleri enzim teknolojisinde kullanılmaktadır.

Mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin tüm dünya genelinde yıllık kullanım oranlarına bakıldığında %25 alkalın proteaz, %21 diğer proteazlar, %18 amilaz, %10 renin, %3 tripsin, %3 lipaz, %10 diğer karbonhidrat parçalayan enzimler (selüloz ve ksilanaz gibi) ve %10 kadar ise analitik ve farmasötik enzimler şeklinde bir dağılım göze çarpmaktadır [5].

Büyük bir kısmı lignin, selüloz ve hemiselülozlardan oluşan lignoselülozlar yeryüzünde en fazla bulunan doğal polimerlerdir. Selüloz β -1,4 bağlı glukoz birimlerinden oluşmuş ve doğada en bol bulunan alternatif yenilenebilir enerji kaynağıdır. Hemiselülozun önemli bir bileşeni olan ksilanlar ise ikinci en bol bulunan doğal polisakkarittir [6]. Mikroorganizmalar tarafından fermentasyon işlemi ile selüloz ve ksilan'ın, glukoz ve ksiloz'a tam olarak parçalanması için çeşitli enzimlerin sinerjik aktivitesi gereklidir. Selülazlar ve ksilanazlar hidroliz işleminin ilk basamağında görev alan anahtar enzimlerdir ve bu enzimler pek çok endüstriyel uygulamada önemli rol oynamaktadır [7, 8]. Özellikle tekstil endüstrisinde selülaz enzimi mikrofibril uzaklaştırmada, kağıt endüstrisinde ise kağıt hamurunun ağartılması işleminde ksilanazlar yaygın olarak kullanılmaktadır [6, 9]. Günümüzde selülaz ve ksilanazlar pektinazlar ile birlikte dünya enzim pazarının %20'sini oluşturmaktadır [5].

Tarımsal atıklar, lignoselülozik enzimlerin üretimi için fermentasyon alanında kullanılabilecek ucuz ve yüksek potansiyele sahip kaynaklardır. Çevrede biriken yüksek miktarda tarımsal atık lignoselülozik enzimlerin üretimi için kullanılabilir. Pamuk sapları Türkiye gibi pamuk yetiştiricisi tüm ülkelerde yerel bir tarımsal atık olarak bol miktarda elde edilmektedir ve bu atıklar lignoselülozik enzimlerin üretimini stimule etmek için kullanılabilir.

Beyaz çürükçül funguslar; selülazlar, ksilanazlar ve lakkazların da içerisinde olduğu ekstraselüler lignoselülozik enzimleri büyük miktarda üretmektedir. Çalışmamızda da ucuz, bol ve kolaylıkla elde edilebilen tarımsal atıklar kullanılarak beyaz çürükçül *P. ostreatus* suşlarının (*P. ostreatus* ve yeni izole edilmiş *P. ostreatus* (yeni izole=y.i)) selülaz ve ksilanaz üretimini arttırmak ve böylece farklı sentetik ve doğal kültür ortamlarında (zeytin yağı fabrikası atık suyu) enzim üretim maliyetini düşürmek amaçlanmıştır.

1.2. Biyoteknoloji

Biyoteknoloji; doku, organ ve hücre kültürlerinin, moleküler biyoloji, mikrobiyoloji, genetik, fizyoloji ve biyokimya gibi doğal bilimlere yanında temel mühendislik ve bilgisayar teknolojilerinden yararlanarak, moleküler DNA teknikleriyle bitki, hayvan ve mikroorganizmaları değiştirmek, geliştirmek, yeni ve

az bulunan maddeleri (ürünleri) elde etmek için kullanılan teknolojilerin tümüdür. Kısacası teknolojiyle biyolojinin birleşmesidir [10].

Biyoteknoloji, çok çeşitli alanlarda gelişme gösteren ve günümüzde moleküler biyolojik yöntemlerinde yaygın şekilde kullanımıyla birlikte, giderek moleküler biyoteknoloji şeklinde değişim geçiren, çok yeni ve geleceğe damgasını vuracak bir alandır. Ticari alanda kullanılan ürünlerin üretilmesi ile ilgili çalışmaların giderek hız kazanması sonucu, önemi her geçen gün daha da artmaktadır [11]. Biyoteknoloji, temel bilim buluşlarını kısa sürede yararlı ticari ürünlere dönüştürebilmesiyle bir anlamda kendi talebini de yaratabilir. Bu yönüyle de öteki teknolojilerden ayrılır. Örneğin sıcak su kaynaklarında yaşayan bakteri türlerinin birinden elde edilen yüksek sıcaklığa dayanıklı bir enzim, günümüzde uygulama ve temel bilim çalışmalarının ayrılmaz bir parçası olan PCR'ın önemli bir girdisidir [12].

Genetik mühendisliği ile elde edilen bilgiler sayesinde biyoteknolojik yöntemler kullanılarak daha ucuz, daha kolay veya daha verimli ürünler günlük hayatımıza kazandırılır. İstenilen özellikte olan genin bir başka canlıya aktarılması genetik mühendisliğin alanı iken, istenilen amaca yönelik ürün eldesi ile biyoteknolojinin alanıdır. Örneğin, *E. coli* bakterisine insülin üretecek özelliklerin kazandırılması genetik mühendisliğin alanıdır. İnsülinin saflaştırılması, gerekli kontrollerinin yapılması ve ilaç özelliği kazandırılması ise biyoteknolojinin alanıdır [13, 14].

Biyoteknolojik uygulamalarda çoğu kez çevreye zarar vermeyen teknikler kullanılır. Bu uygulamaların enerji ihtiyacı azdır, oda sıcaklığı veya düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilir. Biyoteknolojinin endüstriye kazandırdığı en önemli iki kazanç; yenilenebilir kaynakların kullanımına olanak sağlaması ve atık miktarının kimya endüstrisi ile karşılaştırıldığında çok daha az olmasıdır [15].

Biyoteknoloji bir yönüyle yatırımcıya para kazandırırken; diğer yönüyle tıpta, ziraatte, hayvancılıkta, ilaç ve gıda endüstrisinde bir çok soruna çözümler bulmaktadır. Dünya ölçeğinde biyoteknolojik olarak üretilen ürünlerin dünya pazarındaki payları; gıda sektörü (%77), antibiyotik (%12), ilaç-kit (%7), tarım (%3) sektörlerine aittir [16].

Görüldüğü gibi biyoteknolojideki gelişmeler, insan sağlığından tarıma, kimya mühendisliğinden çevre korumaya, gıda üretiminden enerji üretimine kadar yaşamın pek çok alanını bu teknolojinin kapsamına dahil etmiştir. Bu doğrultuda

biyoteknoloji de alt dallara ayrılmıştır. Alt dalları ise renk kodlarıyla tanımlanmaktadır.

Geniş kullanım alanına sahip renk kodları ise yeşil, kırmızı, gri, beyaz ve mavi biyoteknolojidir (Çizelge 1.1) [17].

Çizelge 1.1. Biyoteknolojide renk kodları

Renk	Biyotek faaliyet alanı
Kırmızı	Sağlık, medikal, tanı
Mavi	Su, sahil ve deniz biyoteknolojisi
Sarı	Gıda, beslenme
Yeşil	Tarım ve çevre (biyo-benzin ve biyo-gübre)
Kahve	Sulama ve çöl
Karanlık/koyu	Biyo-terör, biyo-suç
Mor	Patentler, yayınlar, fikri mülkiyet hakları
Beyaz	Endüstriyel biyoteknoloji
Altın	Biyo-enformatik, nano-biyoteknoloji
Gri	Çevre ve atık biyoteknolojisi

1.2.1. Yeşil biyoteknoloji

Yeşil biyoteknoloji tarımsal işlemlere uygulanan biyoteknolojidir [18]. Tarımda kalite ve verimi arttırmak, bitkiyi hastalıklara, zararlılara karşı dayanıklı hale getirmek amaçlanmaktadır [18].

Yeşil biyoteknolojinin en önemli alanlarından biri gen teknolojisidir. Tarımsal biyoteknoloji çalışmaları istenilen genlerin bulunması, karakterize edilmesi, izolasyonu ve hedef hücreye aktarılması aşamalarından oluşmaktadır [19]. Bitkilere gen aktarımında temel aşamalar; geni taşıyan DNA parçasının bitki hücresinin kromozomlarına transferi ve sonrasında doku kültürü teknikleri ile transgenik bitkilerin elde edilmesidir [20].

Yüksek miktarda ve kalitede ürün elde etmek amacı ile geleneksel kültür çeşitlerinin veya bunların yabani akrabalarının genetik yapıları biyoteknolojik teknikler kullanılarak çok kısa bir sürede değiştirilebilmektedir. En çok üzerinde

Çalışılan konular, pestisit ve herbisit dayanıklılığı, besin kalitesinin yükseltilmesi, meyve olgunlaşma sürecinin değiştirilmesi, raf ve depolama ömrünün uzatılması ve aromanın arttırılmasıdır [21, 22].

1.2.2. Kırmızı biyoteknoloji

Kırmızı biyoteknoloji (sağlık, medikal, tanı), biyoteknolojinin en önemli uygulama alanı olarak kabul edilmektedir. Biyoteknolojinin tıp dünyasına girişi çeşitli hastalıkların teşhis ve tedavisi için alternatif kit ve ilaçlar sağlayarak olmuştur. Biyoteknoloji, özellikle genetik hastalıklar ve kanserin tedavisinde ve kaynaklarının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Biyoteknolojinin tıp alanındaki en çok kullanıldığı alan aşıların üretimidir. Bu sayede aşı üretiminde yaşanan miktarla ilgili sorunu ortadan kaldırmış ve ikincil kaynakların kullanımına olanak sağlamıştır. Biyoteknoloji mevcut teknolojilerle üretilemeyen aşıların üretimine de olanak sağlamıştır [23].

Biyoteknoloji işlemleri yeni ilaçların geliştirilmesinde (rneğin kanser ilaçları) giderek daha önemli bir rol oynamaktadır. Tanı koyma çalışmalarında da (DNA ipleri, biyosensörler) biyoteknoloji büyük önem taşımaktadır. Kırmızı biyoteknoloji yeni ilaçlar üretebilmek için yeni organizmaların elde edilebilmesi, hasarlı insan dokularının tamir edilebilmesi veya tüm organın yeniden gelişimi için kök hücrelerin kullanımı, antibiyotik üretimi için organizma tasarlanması, genomik manipulasyon aracılığıyla genetik tedavi mühendisliği, insan evrimi ve çeşitli hastalıkların kökenini anlamada ilerleme kaydedilebilmesi için DNA analizi, hastalıkların belirlenmesi için doku kültürü gibi tıbbi işlemleri içermektedir [17, 23].

1.2.3. Gri biyoteknoloji

Gri biyoteknoloji, evre ve atık biyoteknolojisi olarak da adlandırılmaktadır. Doğal kaynaklar üzerindeki baskıların hızla artması, evre sorunlarının çözümüne yönelik teknolojilerin önemini arttırmıştır. evre biyoteknolojisi; sürdürülebilirliğin sağlanması için canlı organizmaların ve onlardan elde edilen ürünlerin, zararlı atıkların arıtımında ve evre kirliliğinin önlenmesinde kullanılmasını kapsar [24].

evre biyoteknolojisi uygulamaları arasında, doğal mikroorganizmalarla atıkların arıtımı bulunduğu gibi parçalaması zor olan bazı atıkları arıtılabilmek için

genetik değişikliğe uğramış mikroorganizmaların kullanımında yer almaktadır. Ayrıca atıkların içindeki toksik maddeleri substrat olarak kullanabilen organizmalardan da çevre biyoteknolojisinde yararlanılmaktadır. Bu organizmalar, zararlı atıkları zararsız yan ürünlere dönüştürdükten sonra ya ölürler ya da sayıları normal popülasyon düzeyine gelir ve ekolojik dengenin bozulması engellenmiş olur [25].

Çevresel biyoteknolojinin önemli uygulamalarından biri de atık sulara yeniden kullanılabilme özelliği kazandırılmasıdır. Tüketicilerin içme suyu kalitesi ile ilgili endişeleri olduğu bilinmektedir. Bu konu, hem doğal kaynakların sürdürülebilirliği hem de tüketici tatmini açısından önemlidir. Çevresel koşulların kontrolü ve kirliliklerin belirlenmesinde kullanılan biyosensörler ise çevresel biyoteknolojinin bir başka uygulama alanıdır [15, 24].

Görüldüğü gibi günümüzde çevre kirliliğine yol açan atıkların arıtılması ve değerlendirilmesi için yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Özellikle biyoteknolojinin ve endüstriyel mikrobiyolojinin attığı dev adımlar bu yöndeki çalışmalara temel teşkil etmektedir.

1.2.4. Beyaz biyoteknoloji

Beyaz biyoteknoloji aynı zamanda endüstriyel biyoteknoloji olarak da bilinir ve organizmaların çeşitli yararlı kimyasallar üretecek yada çeşitli enzimler yolu ile zararlı ve kirlletici kimyasalları yok edecek şekilde tasarlanması ve kullanılmasıdır [26]. Endüstriyel biyoteknolojinin ürünleri biyolojik temelli kimyasallar, malzemeler ve yakıtlardır. Bu ürünler yenilenebilir kaynaklar, yaşayan hücreler ve/veya enzimler kullanılarak üretilir. Geleneksel üretim yöntemleriyle karşılaştırıldığında sözü geçen kaynaklar kullanıldığı zaman minimum atık üretimi ve enerji kullanımıyla daha temiz süreçler ortaya çıkmaktadır [27].

Beyaz biyoteknolojinin görevleri arasında alkol, vitaminler, aminoasitler, antibiyotikler veya enzimleri, kaynakları ve çevreyi koruyarak üretmek bulunmaktadır. Endüstriyel biyoteknoloji modern moleküler biyoloji tekniklerini, tekstil, kâğıt ve kimyasal ürünlerin üretimi gibi endüstriyel süreçlerin, çevreye zararlı etkilerini azaltmak ve verimliliği arttırmak için kullanır [28]. Örneğin endüstriyel biyoteknoloji şirketleri kimyasalları sentezlemek için biyokatalizörleri geliştirir. Özellikle enzimler üzerinde modifikasyonlar yaparak enzimlerin termostabilitesinin artırılması, pH stabilitesinin genişletilmesi, uzun operasyon zamanı kazandırılması,

depolama ömrünün uzatılması gibi çalışmalar yaparak, narin yapılı enzimlerin endüstriyel süreçler için kullanımlarının olanaklı hale getirilmesi çalışmaları yapılmaktadır. Böylece biyoteknoloji sayesinde istenilen enzimler ticari nitelikte üretilebilir. Sanayide kullanılan kimyasallar ve özel kimyasallar biyoteknolojik yöntemlerle üretilebilmektedir. Geleneksel kimyasal sentezler, yüksek enerji sarfiyatı gerektirir ve sıklıkla istenmeyen yan ürünler oluşur. Biyokatalizörlerin kullanılmasıyla benzer kimyasallar daha ekonomik ve çevreye daha az zarar vererek üretilebilmektedir [29].

Beyaz biyoteknoloji ile yırtılmaya ve yıpranmaya karşı daha dayanıklı kumaşlar, yıkandığında daha az kırışan giysiler üretilebilmektedir. Nüfusun hızla artmasının doğal sonucu gıda tüketiminin de artmasıdır. Bu soruna çözüm ise gıda ürünlerinin üretiminin artması olacaktır. Bu noktada beyaz biyoteknoloji insanlığa hizmet ederek, bu alanda kullanılmaktadır ve kullanılmaya da devam edilecektir [26, 28].

Dünyamızda petrol miktarı gün geçtikçe azalmaktadır. Bu kaybın önüne biyoetanol gibi yakıtların mikroorganizmalarla üretimi ve kullanımıyla geçilebilir. Bunun için şeker kamışı ve mısır gibi biyoetanol üretimine uygun bitkiler kullanılmaya başlanmıştır [30]. Beyaz biyoteknoloji, modern biyokimyasal ve moleküler biyoloji teknikleri kullanılarak daha az atık üreten, daha az enerji tüketen, kimyasal proseslere alternatif biyolojik üretim prosesleri olarak da tanımlanabilir. Beyaz biyoteknolojinin kullanıldığı yeni veya iyileştirilmiş proseslerin geliştirileceği açıktır. Böylece yenilenemez kaynaklara olan bağımlılıkta ortadan kalkacak ve hızlı, doğa dostu ve maliyeti düşük prosesler geliştirilebilecektir [31, 32].

21. yüzyılın anahtar teknolojisi olarak tanımlanan beyaz biyoteknolojinin petrole bağımlı ekonomiler için, sürdürülebilir biyokütle bazlı değer zincirleri ve yeni katma değeri yüksek ürünlerin ortaya koyulmasında hayati önem taşıyacağı açıktır [33, 34].

1.3. Biyoteknolojide Kullanılan Mikroorganizmalar

Biyoteknolojinin bütün uygulama alanlarında kullanılan temel biyolojik sistemler mikroorganizmalardır. Funguslar, bakteriler, algler, mayalar ve virüsler mikroorganizmalar içerisinde ele alınmaktadır. Funguslar biyoteknolojinin pek çok

alanında kullanılan son derece önemli organizmalardır. Yaklaşık 120.000 fungus türü bilinmekte ve bunların pek çoğu endüstriyel olarak önemli bulunmaktadır [12].

Bu tez çalışmasında kullanılan mikroorganizmaların beyaz çürükçül fungus olması dolayısıyla bundan sonraki kısımlarda çürükçül funguslar ile ilgili bilgiler verilecektir.

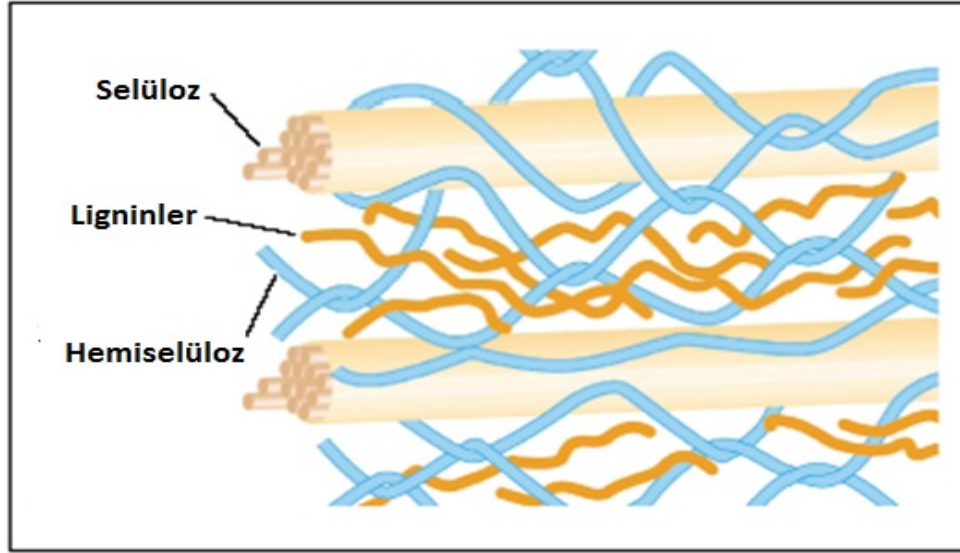
1.3.1. Çürükçül funguslar

Çürükçül funguslar, odunun yapıtaşı olan selüloz, hemiselüloz ve lignin tabakasını yıkararak oluşan ürünleri besin olarak kullanmaktadırlar. Bu fungusların lignoselülozik materyalleri yıkım yetenekleri, son derece etkili enzim sistemlerine bağlıdır. Odun, çimen, tarım, orman atıkları, tarımsal ve evsel katı atıklardan oluşan lignoselülozik atıklar, özellikle doğada bol miktarda bulunmakla beraber biyolojik dönüşüm için potansiyele sahiptirler [35]. Lignoselülozik maddeler ve çeşitli kullanım alanları Çizelge 1.2’de verilmiştir.

Çizelge 1.2. Lignoselülozik maddeler ve çeşitli kullanım alanları [36]

Lignoselülozik maddeler	Atıklar	Kullanım Alanı
Tahıl hasatları (buğday, pirinç, yulaf, arpa, mısır)	Saman, koçan, sap, iç kabukları	Hayvan yemi, yakacak olarak, toprak gübresi
İşlenmiş tahıllar (mısır, buğday, pirinç, soya fasulyesi)	Atık su, kepek	Hayvan yemi
Meyve ve sebze hasatı	Bütün meyve ve suyundan kalan tohumlar, kabuklar, taşlar	Hayvan ve balık yemi, bazı tohumlar yağ çıkarmada
Meyve ve sebze işlenmesi	Bütün meyve ve suyundan kalan tohumlar, kabuklar, taşlar, atık su	Hayvan ve balık yemi, bazı tohumlar yağ çıkarmada
Şeker kamışı diğer şeker ürünleri	Küspe	Yakıt olarak
Yağlar ve yağlı tohum bitkileri (Fındık, pamuk tohumu, zeytin, soya vb.)	Kabuklar, iç kabuklar, pamuk, elyaf, çamur, atık su, pres keki	Hayvan yemi, gübre, yakacak olarak
Hayvansal atıklar	Gübre ve diğer atık	Toprak gübresi
Orman-kağıt ve kağıt hamuru	Odun atıkları, kabukları, yaprakları	Toprak gübresi, yakacak
Testere ve kontraplak atık	Talaş, odun tozu	Kağıt hamuru ve kağıt endüstrisi, yonga ve elyaf levha
Kağıt hamuru ve kağıt fabrikaları	Fiber atık, sülfat likör	Kağıt hamuru ve levha endüstrisinden yakıt olarak yeniden kullanımı
Lignoselülozik atık topluluğu	Eski gazeteler, kağıt, karton, eski panolar, kullanılmayan mobilyalar	Küçük bir yüzdesi geri dönüştürülebilir, diğerleri yakacak olarak
Çim	Kullanılmayan çim	Yakacak olarak

“Lignoselülozik” terimi, yapısında selüloz, lignin ve hemiselüloz içeren yapıları ifade etmekte olup, bitkisel kökenli biyokütlenin temelini oluşturmaktadır. Polimer yapıdaki karbonhidratlar olan selüloz ve hemiselülozun, hidrojen ve kovalent bağlar ile sıkıca lignine bağlanması sonucu lignoselülozik yapılar oluşmaktadır [37]. Lignoselülozik maddelerin genel yapısı Şekil 1.1’de gösterilmiştir.



Şekil 1.1. Lignoselülozik maddelerin genel yapısı [37]

Bitki biyokütlesinin kuru ağırlığının %38-50’sini selüloz, %23-32’sini hemiselüloz, %15-25’ini ise lignin oluşturmaktadır. Ayrıca, daha az oranda olmak üzere (%1-10) inorganik (kül) ve organik bazı renk, koku vb., ekstraktif maddelerde bulunmaktadır [38].

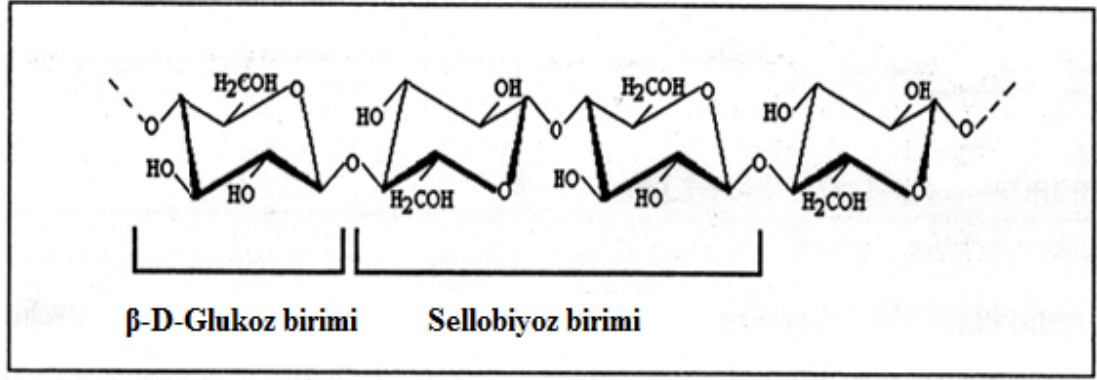
Monomerik şekerlerin belli bir düzenlenme şeklinde bir araya gelerek oluşturduğu selüloz ve hemiselülozların (polisakkarit) oranı kaynağa göre değişmekle birlikte yaklaşık %70-75 civarındadır. Doğada selüloz; nişasta, pektin ve hemiselüloz gibi polisakkaritlere bağlı olarak bulunur. Hemiselülozlar ise galaktoz, mannoz, ksiloz, arabinoz ve diğer şekerlerle; üronik asitlerin polimerleri ve heteropolimerlerini içerirler. Bunlara ek olarak, doğadaki hemen hemen her selüloz, selüloz-lignin karışımı halinde bulunur. Polisakkaritler, enzimler veya kimyasal işlemler yardımıyla yapı taşlarına dönüştürülebilmektedirler [37, 38]. Çizelge 1.3’de doğadaki bazı lignoselülozik maddelerin selüloz, hemiselüloz, lignin içeriği görülmektedir.

Çizelge 1.3. Bazı lignoselülozik kaynakların selüloz (%), hemiselüloz (%), lignin (%) bileşimi [39]

Materyal	%Selüloz	%Hemiselüloz	%Lignin
Sert odunlu ağaç gövdesi	40-50	24-40	18-25
Yumuşak odunlu ağaç gövdesi	45-50	25-35	25-35
Otlar	25-40	25-50	10-30
Yapraklar	15-20	80-85	0
Saman	32	31	10
Pamuk	80-95	5-20	0
Gazete kağıdı	40-55	25-40	18-30
Kağıt hamuru atığı	60-70	10-20	5-10

Selüloz: Selüloz dünyada en bol bulunan ve yenilenebilir biyopolimerdir. Selüloz yüksek yapılı bitkilerin hücre duvarlarının temel yapısal maddesidir. Yeşil bitkilerin hücre duvarını meydana getiren selüloz, bitkiye sertliğini ve katılığını verir. Bitki saplarında, saman ve kamışta önemli oranda selüloz vardır. Selüloz en fazla ve saf halde pamuk bitkisinde bulunmaktadır. Selüloz yaklaşık 15000 glukoz biriminin β -1,4-glikozidik bağlarla bağlanması sonucu glukoz moleküllerinin oluşturduğu doğrusal bir polimerdir [37-40].

Doğal selüloz güçlü, fibrilli ve uzun glukoz zincirlerinden dolayı hidrolize karşı dirençli olup, selülaz enzimleri ile monomerlerine ayrıştırılır. Bu polimerde tekrar eden ana birim sellobiyozdur. Selüloz molekülü suda çözünmez ve yüksek bir gerilme gücüne sahip olup, nispeten nişasta gibi diğer glukoz polimerlerine kıyasla mikrobiyal yıkıma karşı daha dirençlidir [38]. Selülozun yapısı Şekil 1.2’de gösterilmiştir.



Şekil 1.2. Selülozun molekül yapısı [40]

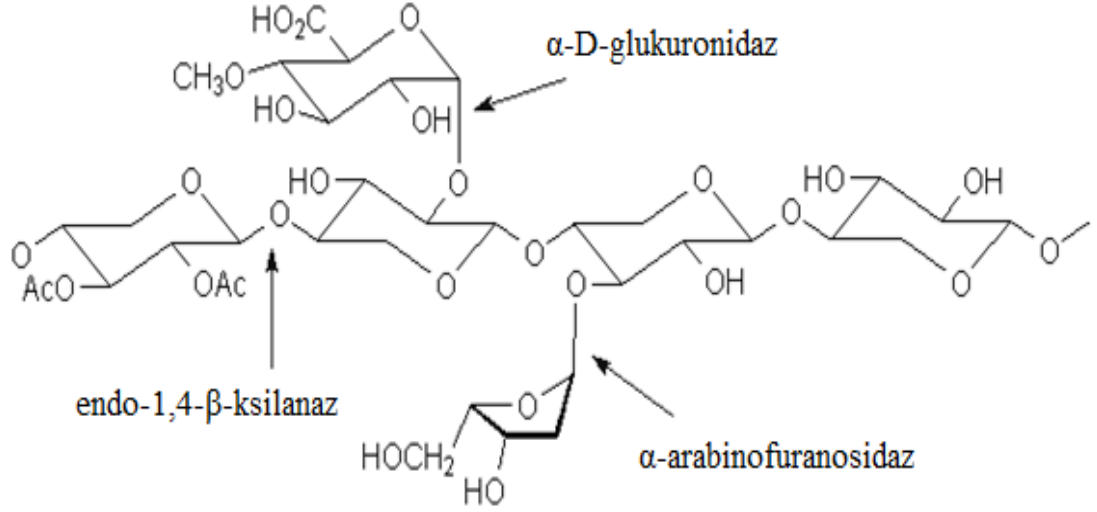
Hemiselüloz: Doğada birkaç çeşit selüloz bulunmaktadır. Bunların hepsi de endüstri açısından önemlidir. Selüloz türleri birbirinden a, b, d harfleriyle ayırt edilir. A-selüloz, pamuktaki selüloz türüdür. “Hemi-selüloz” adını alan b-selüloz ve d-selüloz ise asitler ve bazlara karşı daha az dayanıklı, moleküller dallanmış halde ve daha kolay kopabilme özelliğine sahiptir [41].

Hemiselüloz selülozun aksine bir homopolimer olmayıp, farklı moleküler yapıda monomerik birimlerden oluşan kompleks bir yapıdır. Hemiselüloz ve selüloz odundaki holoselülozu oluşturur. Hemiselülozlar, selülozdan bazı özellikleri ile ayrılır [42]. Odunun diğer elemanlarından ayrıldıktan sonra seyreltik alkali çözeltisinde ve kaynayan suda çözünebilirler. Genellikle 200 şeker uzunluğunda, selülozdan çok daha kısa zincirler oluştururlar. Hemiselüloz ligninle birlikte selülozu çevreleyen şekilsiz bir tabakayı oluşturur [38, 43]. Hemiselülozlar pentozlar (arabinoz ve ksiloz) veya heksozlardan (D-glukoz, D-mannoz ve D-galaktoz) oluşur.

Hemiselülozlar kendilerini oluşturan şeker birimlerine göre; ksilanlar, mannanlar, arabinoksilanlar, glikomannanlar ve glikoksilanlar şeklinde isimlendirilirler. Ksilanlar, hemiselülozik yapı içinde nicelik açısından önemli yer tutarlar. Kara bitkilerinin ligninli dokularındaki hemiselülozların temel bileşenini oluştururlar. Olgunlaşmış odunların %20-25'i, otların %15-20'si ve yumuşak odunların önemli bir kısmı ksilanlar ve glikomannanlardan oluşur. Tahıl sapları ile tohum kabuklarının da, kuru ağırlık olarak %20-30'u ksilanlardır [44]. Ksilanlar, selülozla birleşik halde bulundukları gibi, ligninle de etkileşim içindedirler.

Hemiselülozlar yüksek oranda dallanmış ve kristal olmayan polimerler olduğundan hemiselülozun enzimatik yıkımı kolaydır. Pek çok mikroorganizma

lignoselülozun hemiselüloz katmanını ya doğal yapısıyla ya da hidroliz ettikten sonra kullanabilir (Şekil 1.3) [37, 38].



Şekil 1.3. Hemiselülozun yapısı

Lignin: Bitkide kök ve gövdenin odunsu yapısını oluşturan madde olarak da bilinir. “Odunun özü” de denen su geçirmez bir yapıya sahiptir. Yaşlanmış ölü hücrelerin selüloz çeperleri üzerinde birikerek bitkiyi uygun olmayan çevre şartlarından korur. Lignin tüm yüksek yapılı bitkilerde bulunan ve mikrobiyal saldırıya karşı bir bariyer olarak hizmet eden aromatik bir polimerdir [45]. Odunun en dış katmanını oluşturan lignin 105 Daltona ulaşan moleküler ağırlıkta şekilsiz, heterojen bir fenilpropanoyit polimeri olup, bu tabaka selülozu kimyasal ve enzimatik yıkımdan korumaktadır. Doğrusal ve düzenli tekrar eden ünitelerden oluşan nişasta veya selüloz gibi diğer polimerlerin aksine lignin tekrar etmeyen birimlerden oluşur ve üç boyutlu bir yapıya sahiptir [38, 45].

Selüloz ve hemiselülozdan tamamen farklı bir yapı sergileyen lignin, selüloz ve hemiselüloz ile iç içe yerleşim gösteren bir katmandır. Ligninin kimyasal yapısını incelediğimizde birbirine yakın üç aromatik bileşikten meydana geldiğini görürüz. Bu maddeler koniferil alkol, sinapil alkol ve p-kumaril alkoldür. Lignin asitlerle hidroliz olmaz. Bu alkoller içinde koniferil alkol esas bileşen olup, kozalaklı ağaçların lignininde %90, geniş yapraklı ağaçların lignininde %50 oranında koniferil alkol bulunur [46].

Bitki hücre duvarında bulunan lignin, hücreleri birbirine bağlar. Hücrede sekonder çeper yapısına büyük oranda iştirak eder. Hücre çeperini oluşturan selüloz misellerin arasını amorf lignin doldurur ve böylece dokuda odunlaşma meydana gelir. Ayrıca lignin bitkilerde mekanik ve biyokimyasal strese karşı direnç sağlarken, antioksidan özelliklere de sahiptir. Yangında bitkinin yanmasını geciktirici özelliğe sahip lignin bitkinin ultraviyole ışınlarına karşı korunmasını da sağlar. Bitkide pek çok önemli görevi üstlenen lignin tabakası suyu geçirmeme, neme karşı yanıt, su dengesi ve su taşınımı gibi su ile ilişkili fonksiyonlara da yardımcı olur [35, 46, 47].

Lignin; kağıt üretiminde kükürtdioksit, sodyum sülfite yada sodyum hidroksit gibi maddeler yardımı ile odun hamurundan ayrılır. Ayrılan bu lignin kendisinden yararlanılacak uygun bir kimyasal teknolojinin yokluğu nedeni ile çoğunlukla yakılır. Dayanıklı ve koruyucu lignin tabakası ile bitkinin özünde depolanan fungitoksik bileşikler odunun funguslar tarafından çürütülmesini engelleyen faktörlerdir. Ancak bütün bu engellere rağmen odunsu dokular funguslar tarafından yıkılabilir.

Çürükçül funguslar, lignoselülozik maddelerde çürümeye neden olma şekillerine göre 3'e ayrılırlar. Bunlar;

1) Kahverengi çürükçül funguslar; esas olarak odunun selüloz ve hemiselüloz bileşenlerini tamamen yıkarken, lignin tabakasını ise kısmen parçalamaktadır. Bu funguslar odun üzerinde gelişimleri esnasında odunda kahverengi ve tuğla şeklinde çatlaklar oluşturarak çürümeye neden olurlar. Kahverengi çürükçül terimi bu funguslar tarafından çürütülmüş odunun karakteristik rengi olan kahverengiden gelmektedir. Kahverengi çürükçüllere *Serpula lacrymans*, *Laetiporus portentosus* ve *Fomitopsis lilacino-gilva* örnek olarak verilebilir [35, 42].

2) Yumuşak çürükçül funguslar; odunun selüloz ve hemiselüloz bileşenini tamamen parçalarken, lignin bileşenini tamamen olmasa da kahverengi çürükçül funguslara göre daha ileri basamaklara kadar yıkabilirler. Çünkü ikincil hücre duvarını aşındırırlar ve Angiosperm odununda asitle çözünmeyen madde (Klason lignin) içeriğini azaltırlar. Lignin yıkımına göre polisakkarit yıkımını daha ileriye götüren bir çürümeye neden olur. Bu gruptan bir fungus tarafından etkilenen odun;

ıslak, sünger gibi yumuşak ve çukurlu görünür [48]. Yumuşak çürükçül funguslar genellikle yüksek nem ve düşük lignin içeriğine sahip malzemelere saldırır [49].

3) Beyaz çürükçül funguslar; lignin yıkım yetenekleri son derece gelişmiştir ve odunda beyaz çürümeye neden olurlar. Kahverengi çürükçül funguslar ve yumuşak çürükçül funguslar substrat olarak selüloz ve hemiselülozu tercih ederken sadece beyaz çürükçül funguslar lignini CO₂ ve H₂O'ya kadar tamamen parçalayabilmektedir. Beyaz çürükçül funguslara *Chrysosporium lignorum*, *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Stereum hirsutum*, *Pleurotus ostreatus*, *Hebeloma crustuliniform*, *Armillaria luteobubalina*, *Schizophyllum commune* ve *Daldinia concentrica* örnek olarak verilebilir [50].

1.3.2. Beyaz çürükçül fungusların biyoteknolojide kullanımı

Beyaz çürükçül funguslar, Basidiomycetes sınıfına dahil olan ökaryotik mikroorganizmalardır. Doğal şartlar altında ölü ya da canlı odun üzerinde lignini etkin bir şekilde yıktığı ifade edilen canlıların sadece beyaz çürükçül funguslar olduğu rapor edilmiştir [50, 51].

Lignin yıkım yeteneklerinden dolayı ligninolitik funguslar olarak da adlandırılan beyaz çürükçül funguslar bu yıkımı sekonder metabolizmaları esnasında meydana gelen fenol oksidazlar (lakkaz ve peroksidaz), mangan peroksidaz, ligninaz (lignin peroksidaz) gibi ekstraselüler (hücre dışı) enzimler sayesinde gerçekleştirirler. Lignini parçalayan funguslar ekstraselüler enzimlerini kullanarak lignini depolimerize ve mineralize edebilme yeteneklerine göre karakterize edilir [50-54].

Lignini parçalayan funguslardan *Phanerochaete chrysosporium* ve *Trametes versicolor* en çok çalışılmış olan funguslardır. Ligninolitik Basidiomycetes *Phanerochaete chrysosporium*'un lignini oldukça iyi yıktığı bulunmuştur ve ligninin biyolojik olarak parçalanmasının fizyolojik gereksinimlerinin çalışılması için model organizma olarak kullanılmaktadır. *Phanerochaete chrysosporium*'un ligninolitik enzimleri karbon, azot veya kükürt sınırlamasıyla tetiklenen sıvı kültürlerde sekonder metabolizma sırasında ürettiği bulunmuştur. *Trametes versicolor* oldukça fazla çalışılmış ve önemli miktarda lakkaz salgılayan bir diğer beyaz çürükçül fungustur. *Phanerochaete chrysosporium*'a benzer şekilde *Trametes versicolor*'da lignin peroksidaz ve mangan peroksidaz enzimlerini salgılar [55].

Beyaz çürükçül funguslar çok sayıdaki çevre kirleticisini ve lignini yıkmak için çeşitli mekanizmalar kullanırlar. Lignin ve çevre kirleticilerinin yıkımları için oksitleme ve indirgeme reaksiyonlarının ikisine de gereksinim duyulur. Bu funguslardaki peroksidazlar kimyasalların direkt ve indirekt oksidasyonlarını katalize eder. Genellikle parçalanmaya dayanıklı, çözünmez kimyasallar bu funguslarla mineralize edilirler. Bu funguslar oksitlenmiş bazı kimyasalları da mineralize edebilir [56].

Beyaz çürükçül funguslarla özellikle çevre biyoteknolojisi açısından yoğun araştırmalar yürütülmektedir. Funguslar odundan lignin giderimi, boyar maddelerin yıkımı ve renginin giderimi ve endüstriyel atıkların arıtımı çalışmalarında biyolojik sistem olarak kullanılmaktadır [57].

Bu tez çalışmasında *P. ostreatus* beyaz çürükçül fungusu lignoselülozik enzim üretimi amacıyla kullanılmıştır. *Pleurotus* türlerinin lignini ve lignin parçalanma ürünlerini metabolizma edebilme yeteneğine sahip olmasından dolayı, üzerinde çok sayıda biyoteknolojik çalışma yapılmaktadır [55, 58]. *Pleurotus* türleri en etkili ligninolitik aktiviteye sahip beyaz çürükçül funguslar grubu içerisinde yer almaktadır. İçerisinde tarımsal artıkların da yer aldığı geniş bir substrat grubunu kullanabilirler. *Pleurotus* türlerinin lignoselülozları parçaladıkları ve kolayca kolonize oldukları belirlenmiştir. *Pleurotus* türlerinin tarımsal artıkların lignoselüloz kısımlarını ve organik çevre kirletici maddeleri ksilanaz, endoglukanaz, β -glukosidaz, laminarinaz, lakkaz ve polifenol oksidaz gibi enzimlerini kullanarak parçalayabildikleri bildirilmiştir [59].

Endüstriyel üretimler sonucu oluşan organik kimyasal bileşikler olan ksenobiyotikler, işlenmeden doğrudan doğaya bırakıldıklarında çevreye önemli zararlar vermektedirler. *P. ostreatus* mantarının toksik özellikleri olan poliaromatik hidrokarbonlar (PAH), endüstriyel boyalar ve atrazin gibi diğer toprak kirleticileri parçalayabildiği ve mineralize edebildiği bildirilmiştir [60].

Tarımsal artıkların mikrobiyolojik yolla delignifikasyonunda ve besin değerinin artırılmasında da *Pleurotus* türleri kullanılmaktadır [52, 53].

Bununla birlikte başka türlü değerlendirilmemesi ya da ekonomik bulunmaması nedeniyle atılarak çevre kirliliğine olumsuz yönde katkıda bulunan lignoselülozik materyallerin funguslar tarafından kullanılmasıyla çevrenin korunmasına katkı sağlanmaktadır [58, 60].

Beyaz çürükçül funguslar biyoteknolojide;

- Lignoselülozik atıklardan (saman, odun, sap, kağıt gibi) lignin gideriminde [38, 50],
- Tekstil fabrikası atık sularının arıtımında [61, 62],
- Alkol fabrikası atık sularının arıtımında [57, 63],
- Zeytinyağı fabrikası atık sularının arıtımında [64, 65],
- Ağır metallerin biyolojik adsorpsiyonunda [66-68],
- Boyaların renginin gideriminde [69-72],
- Peyniraltı suyunun değerlendirilmesinde [73],
- Çeşitli enzimlerin üretiminde [63, 74, 75],
- Kağıt hamuru üretiminde [76, 77],
- Kömürün biyolojik olarak sıvılaştırılmasında [78] kullanımı gibi çeşitli kullanım alanları bulunmaktadır.

1.4. Beyaz Çürükçül Fungusların Lignolitik Enzimleri

Beyaz çürükçül fungusların endüstriyel uygulamalarda kullanılmalarına olanak sağlayan çeşitli lignolitik enzimleri bulunmaktadır. Bunlar lignin peroksidaz (LiP), mangan peroksidaz (MnP), lakkaz (Lac), amilaz, selülaz, ksilanaz olarak sıralanabilir [79].

Bu kısımda sadece çalışmamızda aktiviteleri araştırılan selülaz ve ksilanaz enzimleri hakkında bilgi verilecektir.

1.4.1. Selülazlar

Selülazlar, selülozu glukoza parçalayabilme yeteneğinde olan hidrolitik enzim grubu içerisinde yer almaktadırlar [80].

Selülazlar mikroorganizmalar içerisinde fungus, bakteri ve aktinomisetler ile bitkiler ve hayvanlar tarafından üretilirler. Bu mikroorganizmalar aerobik, anaerobik, mezofilik veya termofilik olabilir. Bunlar arasında *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermomonospora*, *Trichoderma* ve *Aspergillus* cinsleri, üzerinde en çok çalışılan selülaz üreticileridir. Funguslar arasında ise beyaz çürükçül funguslardan

Phanerochaete chrysosporium, *Sporotrichum thermophile*, *Trametes versicolor*, *Agaricus arvensis*, *Pleurotus ostreatus*, *Phlebia gigantea* en fazla çalışılan funguslardır. Fungal selüloz sistemleri bakterilerle karşılaştırıldığında yapısal olarak daha basittir [81, 82].

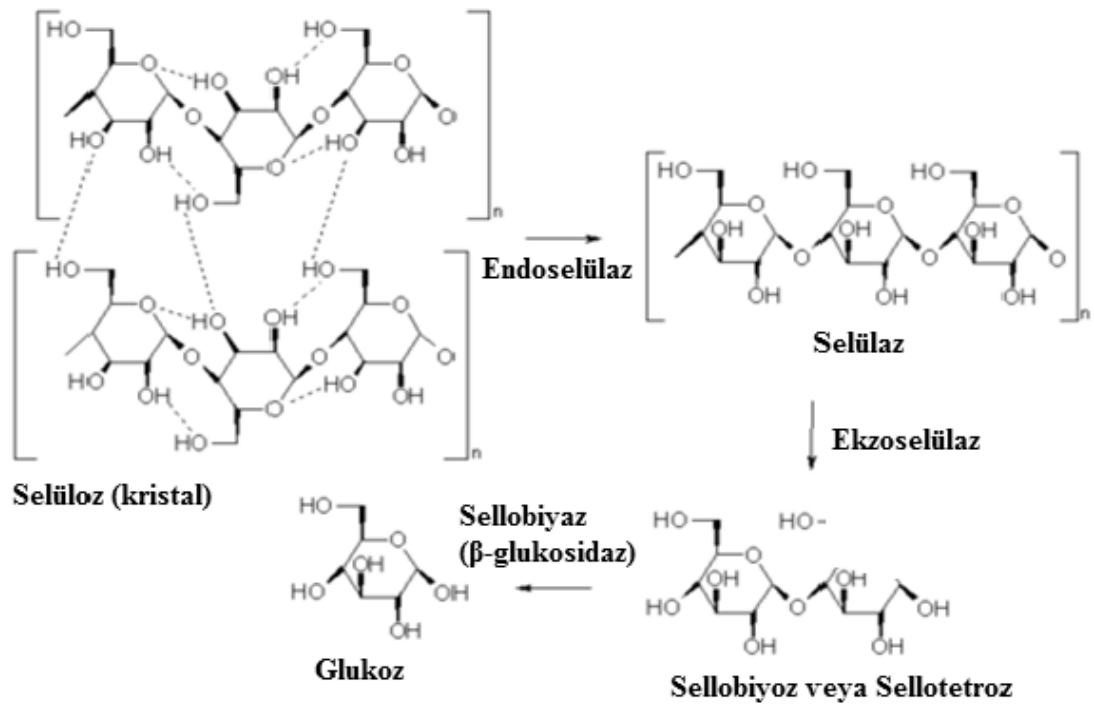
Selüloz sistemi birden fazla farklı enzimden oluşmaktadır. Selülozun glukoza hidrolizi en az üç farklı enzimin sinerjistik çalışması ile gerçekleşmektedir [83, 84]. Bunlar;

- a) Endoglukanazlar** (endo-1,4- β -D-glukanaz, EC 3.2.1.4).
- b) Ekzoglukanazlar** (1,4- β -D-glukan glukanohidrolazlar, EC 3.2.1.74) ve **Sellobiyohidrolazlar** (ekzo-1,4- β -D-glukanaz, EC 3.2.1.91)
- c) β -glukosidazlar** (β -glukosid glukohidrolazlar, EC 3.2.1.21) (Şekil 1.4)

Endoglukanazlar; selüloz polimerini orta kısmından (genelde amorf bölgeden) parçalarlar ve değişik uzunlukta oligosakkaritler meydana getirirler. Bu grup enzimlerin oyukları vasıtasıyla polimeri kavradıkları ve parçaladıkları bildirilmektedir. Bazı endoglukanazlar ise selüloz bağlayıcı modüller (CBM, Cellulose Binding Modül) vasıtasıyla selüloz polimerine bağlandıktan sonra polimeri parçalama işlemini gerçekleştirirler. Bu grubun aktivitesi daha yüksektir [84, 85].

Ekzoglukanazlar; selüloz polimerini bütün şekliyle veya endoglukanazlar tarafından parçalanmış kısımlardaki ara ürünlerin uçlarından parçalamaya başlarlar. Son ürün olarak glukoz ya da sellobiyoz açığa çıkarılır. Bu grup enzimlerin iç kısımlarında tüneli andıran bir boşluk bulunmaktadır ve selüloz polimerinin ucunu bu boşluk içine alarak aktivite gösterirler. Ekzoglukanazlar aynı zamanda mikrokristal selülozu da hidrolize etmektedirler [80, 83, 84].

β -glukosidazlar; ara ürün olan sellobiyozları glukoza parçalarlar [85]. *Aspergillus* türlerinin β -glukosidazları, ortamda oluşan glukozla inhibe olmazken *Trichoderma reesei* β -glukosidazları ortamda oluşan glukoz ile inhibe olurlar [84].



Şekil 1.4. Selülaz enzim sistemi ve selülozun enzimatik parçalanma biçimleri [86]

Selülozu hidrolize eden enzimler geniş çapta beyaz ve yumuşak çürükçül funguslardan [87-90], anaerobik funguslardan [91, 92] ve aerobik ve anaerobik bakterilerden elde edilmektedir [87, 93]. Bu enzimler çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda kullanılmaktadır. Ticari olarak en çok kullanılan selülaz büyük çapta *Trichoderma* sp. tarafından üretilmektedir [90]. Endüstriyel uygulamalar için kullanılan selülazların çoğu *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Phanerochaete*, *Aspergillus* vs. gibi filamentli funguslardan elde edilmiştir [94-96].

1.4.1.1. Selülazların biyoteknolojide kullanım alanları

Selülazlar otuz yılı aşkın bir süredir ticari olarak kullanılmaktadır ve hem endüstriyel hem de akademik araştırmalar için yoğun ilgi görmektedir [81].

Selülotik enzimler hakkındaki temel ve uygulamalı çalışmalar gıda, hayvan yemi üretimi, bira ve şarap yapımı, tarım, biyokütle arıtımı, atıkların giderimi, kağıt hamuru ve kağıt endüstrisi, yakıt ve kimya endüstrisi, tekstil, tıbbi ve farmasötik endüstrisi, protoplast üretimi, genetik mühendisliği, kirlilik giderimi gibi çeşitli

endüstrilerde biyoteknolojik potansiyel göstermiştir [97-99]. Ayrıntılı olarak incelendiğinde çok farklı kullanım alanlarının olduğu görülmektedir.

Selülozların endüstriyel kullanım alanları;

a) Gıda endüstrisi: Selülozlar gıda endüstrisinde pek çok uygulama alanına sahiptir. Selülozik biyokütlenin ve yemlerin besin değerini ve sindirilebilirliğini artırmak, ayrıca selülozik atıklardan çözünür şeker, glukoz ve selooligosakkarit üretiminde kullanılmaktadırlar. Gıda katkı maddesi olarak kullanılan öğütülmüş lignoselülozik materyalin parçalanmasında selülozlardan faydalanılmaktadır. Tohumlardan yağ ve meyve suyu ekstraksiyonunda ve meyve sularının berraklaştırılmasında özellikle kullanım alanı bulmuştur. Ayrıca toprak kalitesini artırarak, tahılların homojen biçimde su çekmesini sağlamak ve yeterince ıslanmasının artırılmasında kullanılmaktadır. Soya sosu gibi fermente soya gıdaların üretiminde ve soyanın dış zarının uzaklaştırılmasında da selüloz enziminin uygulama alanı mevcuttur [6, 97].

Selüloz, hindistan cevizi ve soya fasulyesinden protein izolasyonu haricinde mısır ve tatlı patatesten nişasta üretiminde de kullanılmaktadır. Ayrıca sindirimini arttırmak amacı ile yosunların jelatinize edilmesinde ve su yosunlarından agar ekstraksiyonunda, biyoetanol üretimi için substrat eldesinde, kurutulmuş sebze ve çorba karışımlarının geri sulandırımının artırılmasında, polisakkarit, protein, enzim ve tat verici maddelerin açığa çıkışını kolaylaştırmak amacıyla bitki hücre duvarlarının uzaklaştırılmalarında kullanılmaktadır [100].

Selüloz, ksilanaz ve pektinaz ile birlikte sebze ve meyve sularından sıvı kazancını arttırmak ve iyi bir renk elde etmek için kullanılmaktadır. Ayrıca bu enzimler mango, papaya, şeftali, erik, kayısı, armut gibi meyve nektarlarının ve pürelerinin viskozitesini azaltmak için de birlikte kullanılmaktadır. Sebze ve meyvelerin doku, lezzet ve aroma özellikleri pektinaz ve β -glukosidaz enzimlerinin eklenmesiyle geliştirilmektedir. Pektinaz, selüloz ve hemiselüloz içeren enzim karışımları zeytin yağının ekstraksiyonunda da kullanılmaktadır [1, 81, 97, 100, 101].

b) Bira ve şarap endüstrisi: Mikrobiyal glukanaazlar ve ilgili polisakkaritler bira ve şarap dahil olmak üzere alkollü içeceklerin üretiminde fermantasyon süreçlerinde önemli bir rol oynamaktadırlar [81, 102]. Bu enzimler fermente ürünlerin hem kalitesini hem de verimini arttırabilir. Glukanaazlar ya ezme sırasında ya da birincil

fermentasyonda glukanların hidrolizi sırasında eklenir böylece viskoziteyi azaltarak süzülebilirliği artırır. Şarap üretiminde pektinaz, glukanaz ve hemiselülaz gibi enzimler renk çıkarma, filtrasyon ve son olarak kaliteli şarap üretiminde önemli rol oynamaktadırlar. Rekombinant mayalardan elde edilen β -1,3 ve β -1,4 glukanazlar şaraplarda aroma artışının sağlanması, biranın filtrasyonunun kolaylaştırılması ve düşük kalite arpada bulunan β -1,3 ve β -1,4 glukan hidrolizinde kullanılmaktadırlar [97, 102].

c) Hayvan yemi endüstrisi: Yem sektöründe selülaz ve hemiselülazların potansiyel uygulamaları yem kalitesini ve hayvanların performansını arttırmayı kapsar. Hububatlardaki beslenmeyle ilgili olumsuz faktörlerin elimine edilmesi, besinsel değerlerinin artırılması, proteaz, amilaz ve glukanaz gibi enzimler ile sindirimin düzenlenmesi sağlanmaktadır. Selülazlar yem katkı maddesi olarak tek başına veya proteazlarla birlikte kullanılarak önemli ölçüde et kalitesini arttırabilir. Glukanazlar ve ksilanazlar, kümes hayvanları ve domuzda yüksek lifli arpa ve çavdar temelli beslenmede viskoziteyi azaltmaktadırlar. Lignoselülozik materyallerin kısmi hidrolizinde, hububatların kabuklarından arındırılmasında, ruminant ve monogastrik hayvanların selülozdan yararlanmalarını artırmak için silaj yapımında ve yemlerinde sindirilebilirliği artırmak amacı kullanılırlar. Hayvan beslenmesinde enzimlerin kullanımı, daha önce AB ülkelerinde kullanılan bazı besleyici iyonofor antibiyotiklerinin kullanımının yasaklanmasından sonra daha da önem kazanmıştır [81, 97, 101].

d) Tekstil endüstrisi: Ticari anlamda selülaz enzimleri, genellikle optimal pH değerlerine göre sınıflandırılmaktadır.

Asidik Selülazlar: Optimum selüloz hidroliz aktivitesine asidik ortamda, genellikle pH 4-6 aralığında, 44-55 °C sıcaklıklarda ulaşan enzimlerdir.

Nötral Selülazlar: Optimum selüloz hidroliz aktivitesine pH 6-8 aralığında, 50-60 °C sıcaklıklarda ulaşan enzimlerdir.

Alkali Selülazlar: Optimum selüloz hidroliz aktivitesine alkali ortamda, genellikle pH 8'in üzerinde ulaşan enzimlerdir.

Tekstil sanayindeki uygulamalarda en büyük öneme sahip enzim türü asidik selülazlardır. Asidik selülazlar, substrat üzerinde kısa sürede kimyasal aşınmayla sonuçlanan yüksek agresif davranış gösterirken, nötral selülazlar daha uzun süreye

ihtiyaç gösteren ve asidik selüloza göre daha az aktif olan enzimlerdir. En yüksek derecede enzim etkinliğine ulaşmak amacıyla, reaksiyon esnasında pH değeri ve sıcaklığın optimize edilmesi gerekmektedir. Alkalın selüloz, pamuklulardan toprağın uzaklaştırılmasında etkilidir ve pamuk liflerini parçalamaz [103].

Denim yıkamasında selüloz enzimlerinin kullanımı ile, hem eskimiş havası veren etkiler hem de moda olan yıkama etkileri elde edilebilmektedir. Bu sayede terbiyeciler için daha koruyucu yeni çalışma biçimleri ortaya çıkmış olmaktadır. Denim ürünlerde boya sökme amacıyla (enzim ile taş yıkama ya da sadece enzim ile yıkama prosesinde) kullanılan enzim “selüloz” enzimidir. Bio-parlatma (enzimatik tüy dökme) işleminde daha çok asidik selülozlar tercih edilirken, denim kumaştan mamul ürünlere uygulanan enzimatik taş yıkama prosesinde veya taş kullanılmaksızın sadece enzim ile gerçekleştirilen yıkamalarda nötral selüloz enzimleri tercih edilmektedir [104].

Selülozların bu özellikleri, yıkama sonunda pamuk kumaşlardan çıkan mikrofibrillerin giderilmesinde, pamuk yada pamuklu kumaşların yıkanmasında, renk parlaklığının artırılması ve yumuşaklığının geri kazandırılmasında, kumaşlarda fazla boyanın alınmasında kullanılır [105, 106].

e) Deterjan endüstrisi: Deterjanlarda proteaz ve lipazlarla birlikte selülozların kullanımı bu endüstride bir yeniliktir. Selülozlar amilazlarla beraber renklerin canlanmasına, daha parlak görünmesine, yumuşamasına ve kir kaldırmayı arttırmaya neden olmaktadır [81, 100, 106].

f) Kağıt hamuru ve kağıt endüstrisi: Kağıt atık materyallerinin geriye dönüşümünü arttırmada kağıtlarla muamele edilen farklı selüloz sistemleri kullanılmaktadır. Selüloz karışımları (endoglukanaz I ve II) ve hemiselülozlarla birlikte lif özelliklerinin değiştirilmesinde kullanılırlar. Kağıt hamuru üretimi ve mürekkep giderimi çalışmaları sonucu oluşan çamurun iyileştirilmesinde bu selüloz sistemlerinden faydalanılmaktadır [1, 99, 107]. Böylece çevre kirliliğini azaltmak mümkün olmaktadır.

g) Atık Yönetimi: Ormanlardan, tarım ürünlerinden, tarım sanayinden elde edilen çevre kirliliğine neden olan atıklar büyük miktarda kullanılmayan atık selüloz içerir. Günümüzde bu sözde atıklar mantıklı kullanılarak değerli ürünlerin üretiminde

örneğin enzim, şeker, biyoyakıt, kimyasallar, fermentasyon için ucuz enerji kaynakları, geliştirilmiş hayvan yemi ve insan besini olarak kullanılmaktadır [81].

1.4.2. Ksilanazlar

Ksilanazlar, hemiselülozun temel yapısını oluşturan ksilani parçalayan enzimlerdir. Ksilanaz enzimleri; bakteri, maya, alg, protozoa ve funguslar tarafından sentezlenmektedir. Ksilanaz enzimlerinin eldesi için daha çok funguslar üzerinde durulmaktadır. Funguslar tarafından üretilen ksilanaz enzimleri diğer mikroorganizmalara oranla daha yüksek derişimdedir ve hücre dışına salgılandığından eldesinin daha kolay olduğu belirtilmiştir [108].

Ksilanın kompleks yapısı nedeniyle molekülün tamamen hidrolizi için farklı enzimlere gereksinim duyulmaktadır. Ksilani hidroliz eden enzimlerin tamamına ksilanolitik enzim sistemi adı verilmektedir.

Bu grupta;

- Endo-1,4- β -ksilanaz,
- β -D-Ksilosidaz,
- α -L-Arabinofuranosidaz,
- α -D-Glukuronidaz,
- Asetil ksilan esterase ve Fenolik asit (Ferulik ve p-Kumarik asit)

esteraz yer almaktadır [109, 110, 111].

Endo-1,4- β -ksilanaz (1,4- β -D-ksilan ksilanohidrolaz, EC.3.2.1.8):

Endoksilanaz enzimi, ksilan omurgasını rastgele hidrolize ederek depolimerizasyonu sağlar. Genel olarak endoksilanazlar 40-80 °C arasında ve pH 4-6.5 arasında en yüksek aktivite göstermelerine rağmen bu aralıkların dışında da optimal şartlar tespit edilmiştir [111].

β -D-Ksilosidaz (1,4- β -D-ksilan ksilohidrolaz, EC.3.2.1.37):

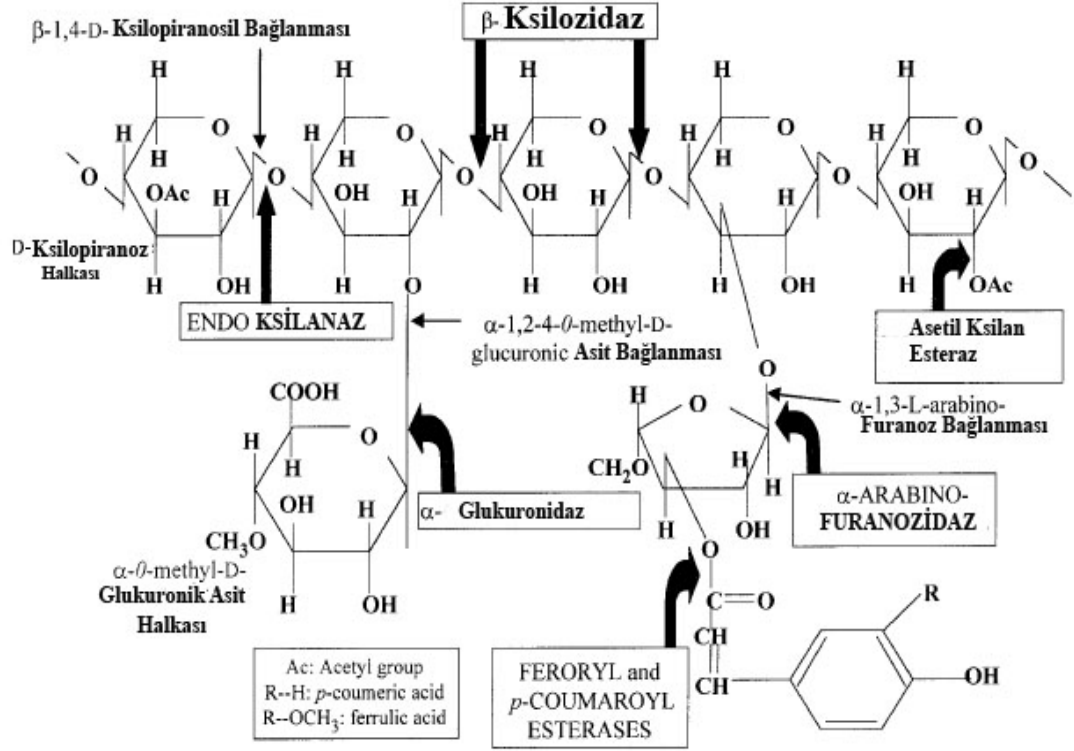
Kısa oligosakkaritleri hidroliz eder. 1,4- β -D-Ksilosidaz enzimi indirgen olmayan uçtan D-ksiloz birimlerini başarılı bir şekilde kopartarak 1,4- β -D-ksilo-oligosakkarit hidrolizini katalizler. Ksilanın hidrolizi sırasında ksilozun koparılmasını sağlayan endoksilanazların, β -ksilosidaz tarafından olayca hidrolize edilebilen ksilobiyoza karşı aktiviteleri yoktur. Fungal β -glukosidazlar genellikle monomerik glukoproteinlerdir fakat bazılarının iki yada üç alt birimden oluştuğu rapor edilmiştir.

Optimum sıcaklık 40-80 °C arasında değişebilir fakat pek çok β -glukosidaz 60 °C’de daha iyi sonuç verir [108, 110, 111].

α -L-Arabinofuranosidaz, α -D-glukuronidaz, galaktosidaz ve asetil ksilan esterazlar tarafından, ksilanda bulunan yan gruplar molekülden kopartılarak serbest kalırlar. Ksilanın hidrolizinde yer alan enzimler Şekil 1.5’de verilmiştir.

α -D-Glukuronidazlar (EC.3.2.1.1) ksiloz ve D-glukuronik asit arasındaki α -1,2-glikozidik bağlarının hidrolizinde görev yapan enzimlerdir. Ksilanın enzimatik hidrolizinde α -1,2 bağları, hidrolizi yavaşlatan bölgelerdir ve α -glukuronidazlar ise farklı substrat ile çalışırlar. Bazı mikroorganizmalar yalnızca kısa glukurono ksilan substratlar varlığında maksimum aktivite gösterirler [110-113].

Doğal glukuronidazların hidrolizasyon işleminde tam etki gösterebilmeleri için esterazlara gereksinim vardır. Bu enzimler, ksilan molekülündeki asetik asit ve fenolik asit birimlerinin koparılmasını sağlarlar. Ferulik asit esteraz ve p-kumarik asit esteraz ksilandaki ester bağlarını koparır, ilk önce arabinoz ve ferulik asit arasındaki yan grupları ayırır ve ikinci olarak arabinozla p-kumarik asiti birbirinden ayırır. Asetil, feruloil ve p-kumoril gruplarının ksilandan koparılması, ligninin uzaklaştırılmasında önemli bir basamaktır. Aynı zamanda hemiselüloz ve lignin arasında ester bağlarının koparılmasıyla ligninin çözülmesine katkıda bulunurlar [110, 111, 114].



Şekil 1.5. Ksilanın tam hidrolizinde gerekli enzimler ve etki bölgeleri [115]

Ksilan hidrolizinde görevli enzimler arasında da sinerjik ve kooperatif etkileşimden söz etmek mümkündür. Hidroliz sırasında 1,4-β-D-ksilan omurgasında etkin olan (β-1,4-Endoksilanaz) ve yan zincirleri koparan enzimlerin aktif olduğu gözlemlenmektedir. Asetil ksilan esteraz ve endoksilanaz arasındaki etkileşim asetil ksilanların yıkımında etkindir [111, 115]. Asetik asitin asetil ksilan esterazla ayrılması, ksilan omurgasını endoksilanaz etkisi için uygun duruma getirecektir. Böylece daha hızlı bir hidroliz meydana gelir. β-ksilosidazlar endoksilanazların inhibisyonuna neden olacak son ürünleri parçalayarak ksilanın hidroliz düzeyini artıracaktır. Benzer şekilde, α-arabinofuranosidazların endoksilanazlara eklenmesi arabinoksilanların şekerleştirilmesini arttırmaktadır [112].

Öte yandan endoksilanazlar tarafından üretilen küçük asetillenmiş polimerler, esterazların tercih ettiği substratlardır. Buğday kepeği gibi büyük oranda arabinoksilan içeren kompleks substratlar, endoksilanazlar tarafından kolayca yıkılamaz, öncelikle α-arabinofuranosidaz ile uygulama yapılması gerekir. Bu

yüzden biyoteknolojik amaçlar için ideal mikroorganizmaların ksilanolitik enzimlerin herbirini yeterli miktarlarda üretebiliyor olması gerekmektedir [111].

1.4.2.1. Ksilanazların biyoteknolojide kullanım alanları

Mikroorganizmalardan elde edilen ksilanolitik enzimler, birçok endüstriyel işlemlerde biyoteknolojik potansiyellerinden dolayı büyük bir ilgi odağı olmuştur. Funguslar büyük oranda ksilanaz üreticisi olarak kullanılırlar ve bakteri ve mayalardan daha güçlü üreticiler olarak kabul edilmektedirler. Özellikle filamentli funguslar elli yılı aşkın bir süredir endüstriyel enzim üretiminde kullanılmaktadır [116]. Özellikle son yıllarda ksilan ve ksilanazların biyoteknolojide kullanımı dikkate değer bir ölçüde artmıştır [99, 113, 115].

Endüstriyel şirketler hemiselüloz içeren maddelere yapılan işlemlerde asit hidrolizi yerine etkili enzimatik süreçlerin geliştirilmesine ilgi göstermektedirler. Ticari ksilanazlar Japonya, Finlandiya, Almanya, İrlanda Cumhuriyeti, Danimarka, Kanada ve ABD'de endüstriyel olarak üretilmektedir. Bu enzimlerin elde etmek için kullanılan mikroorganizmalar *Aspergillus niger*, *Trichoderma* sp. ve *Humicola insolens*'dir. Aynı zamanda ticari ksilanazlar bakterilerden de elde edilmektedir. Ksilanazlar, selüloz ve pektinazlarla birlikte dünya enzim pazarının %20'sini oluşturmaktadırlar [111]. Özellikle kağıt ve kağıt hamuru başta olmak üzere gıda ve hayvan yemi endüstrisi gibi alanlarda temel endüstriyel enzim olma yolunda çok büyük öneme sahiptirler [113, 115].

Ksilanazların endüstriyel kullanım alanları;

a) Kağıt hamuru ve kağıt endüstrisi: Çevresel düzenlemeler kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde ağartma işleminde klor kullanımını sınırlamıştır [117]. Günümüzde çevreyi endüstriyel atıklardan korumak için kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde mikrobiyal enzim sistemlerinin uygulanması önem kazanmıştır [118]. Bu nedenle çevre kirliliğini indirgeme yaklaşımlarından biri, kağıt hamurunun ksilanaz kullanılarak ön işlemlerden geçirilmesidir. Bu yaklaşım, ağartma kimyasallarının özellikle de klor bileşiklerinin önemli derecede indirgenmesine ve kirliliğin azaltılmasına izin vermektedir [119]. Kağıt hamurunun ksilanaz kullanılarak ağartılması işlemi oldukça gelecek vaat etmektedir. Viikari ve arkadaşları ilk defa

1986'da kağıt hamurunu ağartmak için endoksilanazların kullanımının kimyasalları indirgediğini bildirmiştir [120]. Pek çok araştırma ise bu gözlemi doğrulamış, genişletmiş ve bu teknolojiyi ticari bir duruma getirmiştir [121].

Kağıt hamuru ağartma da kullanılan biyolojik metodlarda, ksilanaz, ksilanın %20'sini seçici olarak uzaklaştırmakta ve klor içeren ağartma kimyasallarını %25 azaltmaktadır [122]. Ayrıca enzim uygulaması kağıt hamurunun fibrilasyonunu ve su tutuşunu artırır, işlenmemiş kağıt hamurunda çırpma yada dövme sayısını düşürür, hurda kağıt hamurunda bağları onarır, çözünen hamurdan ksilanın selektif giderimi sağlar. Ksilanazlar ayrıca odun hamurunda biobeyazlatma, sentetik ipek üretiminde ise hamurdan selüloz eldesinde kullanılır [115, 119, 121].

Ksilanazların kullanımı sadece kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi ile sınırlı olmayıp aynı zamanda lignoselülozik materyallerin dönüşümü, tarımsal atıkların fermentatif ürünlere parçalanması, meyve sularının berraklaştırılması, biranın kıvamının gelişimi, hayvan gıdalarının sindiriminin artırılması alanlarında özel bir öneme sahiptir [123, 124]. Ksilanazların ekonomik önemi yüksek birçok faydalı ürünün istenilen düzeyde üretimi için önemli bir potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir [115].

b) Gıda endüstrisi: Ksilanazlar gıda endüstrisinde de geniş bir kullanım alanına sahiptir. Ksilanazların ekmek ve hamur kalitesinde pozitif etkileri olduğu bilinmektedir. Buğday unundaki ksilanaz için substrat olan arabinoksilan (AX) pek çok çalışmaya konu olmuştur [122]. Ksilanazın ekmek kalitesini arttırmadaki etkinliği ekmek hacimindeki artış ile görülmektedir. Bu işlem ksilanazla birlikte amilazında kullanımı ile daha da arttırılmaktadır [125, 126]. Meyve suyu ve şarap sanayisi de enzim pazarının önemli bir bölümünü oluşturmaktadır [111].

Ksilanazlar, meyve ve sebzelerin sıvılaştırılması (eritilmesi) ve meyve sularının berraklaştırılması amacıyla pektinaz ve selülaz ile birlikte aynı anda kullanılır. α -L-Arabinofuranosidaz ve β -D-Glukopiranozidazlar meyve suyu, şarap ve aroma özütleri için gıda işlemede kullanılırlar [108, 115].

c) Hayvan yemi endüstrisi: Ksilanazların diğer önemli bir kullanım alanı ise yem endüstrisidir. Piliçlerin çavdar tabanlı diyetlerine ksilanazın katılması intestinal viskositenin indirgenmesine böylece hem piliçlerin ağırlık kazancında hem de yemlerin dönüştürülmesindeki etkinliği arttırmaktadır [124].

Ksilan tarım ve gıda endüstrisi atıklarında bol miktarda bulunmaktadır. Bu nedenle, ksilanaz atık sudaki ksilan'ın ksiloz'a dönüştürülmesi için kullanılır [127]. Bitki hücrelerinde ise ksilanaz uygulamaları ile fitosterollerin yağ açılması ve glikozilasyonu indüklenir [128].

d) Tekstil endüstrisi: Ksilanolitik kompleksler, kendir ya da keten gibi bitki liflerinin işlenmesi sürecinde tekstil sektöründe kullanılmaktadır. Bu amaç için ksilanazın selüloolitik enzimlerden arındırılmış olması gerekir [111].

e) Ksilooligosakkaritlerin üretimi: Ksilanazların ksilooligosakkaritlerin (XOs) üretiminde potansiyele sahip olmaları sebebiyle giderek artan bir ilgi vardır. XOs ksiloz ünitelerinden oluşan şeker oligomerlerinden oluşurlar ve endüstriyel olarak lignoselülozik biyokütleden üretilirler [129]. XOs, kolesterol ve kolon kanseri riskini azaltması, gastrointestinal sistemi koruması ve tip 2 diyabet üzerinde olumlu etkiye sahip olması nedeniyle sağlığa yararlı değerli ürünlerdir [130, 131]. Buna ek olarak, gıdalarda gıda bileşeni olarak da kullanılmaktadır. Ksilanazlar ksilanı hidroliz yeteneklerinden dolayı, lignoselülozik atıklardan XOs üretiminde anahtar enzimlerdir [129].

Ksilanolitik enzim sistemlerinin pektinolitik enzim sistemleri ile birlikte önemli uygulamalarından biri de, jüt ve kenevir gibi lif bitkilerinin reçine benzeri maddelerden arındırılmasıdır. Ksilanaz-pektinaz kombinasyonu odun işlemede ilk basamak olan kabuktan arındırma işlemlerinde de kullanılabilir. Bazı ksilanazlar bitki hücrelerinden protoplast üretimi için hücre duvarının yumuşatılmasında da kullanılır [110, 115].

f) Biyoetanol üretimi: Mannaz, ligninaz, ksilosidaz, glukanaaz, glukozidaz gibi diğer enzimlerle birlikte ksilanazlar, lignoselülozik materyallerden etanol ve ksilitol gibi biyolojik yakıt üretimi için kullanılabilir. Etanol üretiminde kullanılacak serbest şekerlerin üretimi amacıyla, karbohidrat polimerlerinin depolimerizasyonunu takiben lignin, hemiselüloz ve selülozun ayrıştırılması ile delignifikasyon gerçekleştirilir [108, 115, 131]. Sonuçta etanol üretimi için pentoz ve heksoz şekerlerinden oluşan karışım fermentasyon için kullanılır.

g) İlaç ve kimyasal uygulamaları: Ksilanaz ve ksilanın küçük bir kısmı ilaç endüstrisinde kullanılmaktadır. Ksilanazlar bazen bir besin takviyesi olarak sindirimi düzenlemek için başka bir enzim kompleksi (hemiselüloz, proteaz ve diğerleri) ile birlikte kullanılabilir [111].

1.5. Çalışmada Kullanılan Tarımsal ve Endüstriyel Atıkların Özellikleri

1.5.1. Pamuk sapı

Endüstriyel mikrobiyoloji ve biyoteknolojinin en önemli uygulama alanlarından biri olan yenilenebilir kaynak teknolojisi, özellikle tarım ve ormancılıktan gelen atık lignoselülozik maddelerin kimyasal hammadde ve enerji üretimi için kullanımını amaçlar.

Türkiye'nin coğrafi konumu, yenilenebilir kaynakların yaygın kullanımı için çeşitli avantajlar sağlamaktadır. Ağırlıklı olarak odun ve hayvan atıklarından oluşan biyokütle, Türkiye'deki en temel yenilenebilir kaynaktır [132-134].

Dünya nüfusunun hızla artması, insanları birim alandan daha fazla verim elde etme çabasına yöneltmiştir. Günümüzde, kontrollü şartlar altında her mevsimde bitkisel üretim yapılabilmektedir. Türkiye'deki tarımsal faaliyetler esas olarak zeytin, ayçiçeği, pamuk tohumu yağları gibi endüstriyel ürünler üretmek için kullanılan endüstriyel bitkilerin üretimine yoğunlaşmıştır. Bu üretim sonundaki süreçlerde büyük miktarda tarımsal artıklar üretilmektedir. Tarımda kullanılan girdi miktarları ve üretilen hasat atıkları (sap, saman, sera bitki atıkları vb.) veya tarımsal sanayi atık materyalleri (melas, bira sanayi atıkları, gül işleme atıkları vb.) artış göstermekle birlikte, hasat mevsimi sırasında alanlara bırakılmaktadır [135].

Tarımsal ürünlerin üretimi ve bunların işlenmesi sırasında kullanılabilir ürün miktarından daha fazla miktarda atık ortaya çıkmakta ve bu tarımsal artıkların üretimi süreklilik göstermektedir. Hasat edilen tarımsal ürünlerin çok az bir kısmı değerlendirilebilmekte, önemli bir kısmı ise değerlendirilmemekte ve çevre kirliliği vb. sorunlara yol açmaktadır.

Türkiyede yaklaşık 26.350 hektarlık tarım arazisi vardır. Türkiye’de her yıl 50-65 milyon ton tarımsal artık elde edilmektedir [136]. Türkiye’deki tarımsal atık miktarları Çizelge 1.4’de verilmiştir.

Çizelge 1.4. Türkiye’deki tarımsal atıklar ve miktarları [137]

Tarımsal atık	Yıllık miktarı
Buğday sapı	23 milyon ton
Arpa sapı	8.9 milyon ton
Mısır sapı	4.9 milyon ton
Pamuk sapı	2.5 milyon ton
Ayçiçeği sapı	2.3 milyon ton
Pirinç sapı	209 bin ton
Çavdar sapı	358 bin ton
Tütün sapı	410 bin ton
Yulaf samanı	321 bin ton
Yer fıstığı	28 bin ton
Soya fasulyesi	21 bin ton

Yapısını lignoselülozlu bileşiklerin oluşturduğu tarımsal atıkların potansiyel bir enerji kaynağı olarak çeşitli endüstriyel fermentasyonlarda, tek hücre proteini üretiminde, eczacılık ve kozmetik sanayilerinde vb. kullanımları özellikle kaynakları kıt olan ülkelerde önem kazanmaktadır [135].

Günümüzde tahıl sapları gibi tarımsal atıklar, endüstride kağıt sanayinde hammadde, bitkisel tarımda mantar kompost ana maddesi, hayvancılıkta altlık veya kaba yem olarak da değerlendirilmektedir [138]. Tahıl saplarının kağıt yapımı vb. endüstriyel amaçlarla toplanıp uzak mesafelere taşınması, bunların büyük hacme ve düşük yoğunluğa sahip olmalarından dolayı pek ekonomik değildir. Bu sebeple çiftçilerin çoğu samanı hasat sonrası yakmaktadırlar. Anızların bu şekilde yakılması milli servet kaybı ve toprak mikroflorasını yok etmesi yanında atmosferi de kirleten önemli bir etmendir [139].

Çizelge 1.4’de de görüldüğü gibi pamuk sapı ülkemizde önemli bir miktarda oluşan tarımsal bir atıktır. Pamuk ülkemizde 2008 yılında Türkiye İstatistik Kurumu verilerine göre 1.820.000 ton üretilmiştir [140]. Türkiye, Dünya’da pamuk ekim alanı yönünden 7., pamuk lifi üretimi yönünden 6. sırada yer almaktadır. Pamuk bitkisi, dekara 300-700 kg kuru sap bırakır. Ülkemizde yetişen pamuğun ortalama sap verimi 540 kg/da. olarak verilmektedir. Bir hektar başına toplanabilir pamuk sapı miktarı 2.0-2.8 (ton/ha)’dır. Pamuk üretim alanlarımız dikkate alındığında, yılda

2.5-3 milyon ton pamuk sapı yan ürün olarak (atık bitkisel lif kaynağı) elde edilebilmektedir [141].

Pamuk sapı, fibrilli sert odun yapısında olan ve selüloz içeriği yüksek bir tarımsal atık olmasından dolayı kağıt üretim endüstrisinde ve enzim üretim süreçlerinde hammadde kaynağı olarak kullanılmaktadır. Pamuk sapının selüloz içeriği, pamuğun türüne, iklim koşullarına ve yetiştirme ortamlarına bağlı olarak küçük değişiklikler göstermektedir [79].

Pamuk sapının kimyasal analizi sonucunda %21-25 lignin, %50-55 selüloz, %78 holoselüloz, %1.3-4 kül içerdiği saptanmıştır [142]. Pamuk sapı bu özellikleri bakımından yapraklı ağaçlara benzemektedir.

Pamuk sapının selüloz ve hemiselüloz oranlarının yüksek olmasından dolayı beyaz çürükçül funguslar tarafından lignoselülozik enzimlerin üretiminde indükleyici olarak kullanılabileceği belirlenmiştir [79].

Çalışmamızda da Türkiye’de bol miktarda üretilen pamuk saplarının selülaz ve ksilanaz enzim üretiminde kullanımı amaçlanmıştır. Böylece yakılarak veya açık alanda bırakılarak çürümeye terk edilen atıkların değerlendirilerek ekonomiye kazandırılmasına yardımcı olunabilir.

1.5.2. Zeytinyağı fabrikası atık suyu (ZYFA)

Endüstride hammaddeler belirli bir amaca göre işlenirken bazı maddeler de atık olarak kalır. Bunlar daha sonra verildikleri alıcı ortamların yani havanın, toprağın, suların dolayısı ile çevrenin kirlenmesine neden olduklarından ya yok edilmeleri ya da kirlilik yüklerinin azaltılması gerekmektedir. Ancak ekonomik yönden değerlendirilmeleri ön planda geleceğinden, çeşitli değerlendirme şekilleri son yıllarda büyük önem kazanmıştır [133].

Tüm dünyada sağlık açısından önemli avantajları nedeniyle zeytinyağı tüketimi her geçen gün artmaktadır. Tüketimi sırasında son derece sağlıklı bir imaja sahip olan zeytinyağı ne yazık ki üretimi sırasında önemli çevresel sorunları beraberinde getirmektedir. Bitkisel yağ endüstrisinde sadece fiziksel yöntemler ile üretilen tek yağ olan zeytinyağı özellikle Akdeniz’e kıyısı olan ülkelerin ekonomisinde önemli yer tutan bir ihraç ürünüdür. Dünyadaki önemli zeytinyağı ihracatçısı olan ülkeler İspanya, İtalya, Yunanistan, Tunus ve Türkiye’dir. İspanya ürettiği yaklaşık 500.000 ton zeytinyağının %25’ini ihraç etmektedir. Bu oran

ülkemizde %15'ler civarında olup yıllara göre geniş bir aralıkta değişiklik göstermektedir [143].

Son 35 yılda büyük çaptaki üretimin artması ile zeytinyağı endüstrisi atıksuyu olan zeytin karasuyunun çevreye olan olumsuz etkisi daha çok fark edilir hale gelmiştir. Zeytin karasuyu adından da anlaşıldığı gibi sahip olduğu koyu tonlardaki rengi ile alıcı ortamlarda göz ile görünür renk değişimine yol açmakta ve ışık geçirgenliğini engelleyerek güneş ışığının gerektiği ekolojik dengeyi de bozmaktadır. Ayrıca sahip olduğu yüksek organik madde içeriği ile bu ortamlardaki oksijenin hızla tükenmesine, makro ve mikro canlı yaşamının zarar görmesine sebep olmaktadır. Asidik karakteri, yüksek mineral içeriği ve en önemlisi yapısındaki fenolik bileşikler karasuyun sulama suyu olarak kullanılması halinde toprağın, fitotoksisite ve antimikrobiyal etkilerden dolayı doğal ekosistemini bozmaktadır [143]. ZYFA, evsel nitelikli atıksular ile karşılaştırıldığında çok daha yoğun bir kirliliğe sahiptir.

Zeytinyağı endüstrisinde üretimde klasik (pres, kesikli) veya sürekli (santrifüj, 2 veya 3 fazlı) üretim prosesleri kullanılmaktadır. Her iki üretim sisteminde de ayırma işleminden sonra pirina (zeytin katı atıkları ve zeytin çekirdeği) ve zeytin karasuyu (özsuyu) üretimden oluşan atıklar olarak ortaya çıkmaktadır [144, 145]. Zeytinyağı üretimini sırasında bir yağ fazı (%20), bir katı kalıntı (%30) ve birde sıvı faz (%50) oluşmaktadır [65]. Zeytinyağı üretimi sırasında hiçbir ilave kimyasal madde kullanılmamaktadır. Ancak oluşan atıksular yoğun bir kirletici potansiyele sahip olmaktadır [145].

Zeytinyağı üretim proseslerinde oluşan atıksuyun miktarı ve kirlilik özellikleri, üretimde kullanılan yöntemle bağlı olarak farklılık göstermektedir. Ortalama olarak 1 ton zeytinin zeytinyağına işlenmesi sonucu açığa çıkan zeytinyağı fabrikası atık suyu miktarı; kullanılan yöntemle göre 0.5-1.5 m³ arasında olabilmektedir. Klasik sistem (0.5-1.0 m³/1 ton zeytin), modern sisteme (1.0-1.5 m³/1 ton zeytin) göre daha az, fakat daha konsantre zeytinyağı fabrikası atık suyu oluşturmaktadır [146]. Klasik yöntem ile zeytinyağı üretimi yapan işletmelerden çıkan zeytin karasuyunun kirlilik karakteristiği oldukça yüksek olurken (KOİ: 120 000-130 000 mg/l); sürekli yöntemde oluşan zeytin karasuyunda daha seyreltik halde bulunmaktadır (KOİ: 40 000 mg/l) (Çizelge 1.5).

Ayrıca sürekli sistemin artan üretim, düşük işletme maliyeti, düşük alan gereksinimi, kalite ve gelişmiş otomatik pres kontrolü gibi avantajlarının yanısıra, ilk yatırım maliyetinin yüksek olması gibi dezavantajı da vardır [147].

Çizelge 1.5. Klasik ve sürekli yöntemle zeytinyağı üretimi yapan tesislerden çıkan zeytin karasuyunun bileşimi [148]

Parametre	Klasik Yöntemde	Sürekli Yöntemde
	Atılan Karasu	Atılan Karasu
pH	4.5-5.0	4.7-5.2
Toplam Katı Madde	%12	%3
Toplam Uçucu Katı Madde	%10.5	%2.6
Toplam Mineral Katı Madde	%1.5	%0.4
Askıda Katı Madde	%0.1	%0.9
Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ) (mg/l)	120 000-130 000	40 000
Biyokimyasal Oksijen İhtiyacı (BOİ) (mg/l)	90 000-100 000	33 000
Şeker	%2-8	%1.0
Toplam azot	%5-2	%0.28
Organik Asitler	%0.5-1.0	-
Polialkoller	%1.0-1.5	%1.0
Pektin, tanen vb.	%1	%0.37
Polifenoller	%1.0-2.4	%0.5
Yağ	%0.03-10.00	%0.5-2.3

Zeytinyağı fabrikası atık suyunun değerlendirilmesi için yapılan çalışmaları sıralayacak olursak;

- Atığın bitkilere gübre olarak kullanılması ve tarımda değerlendirilmesi [149, 150],
- Atığın hayvanlara besin olarak kullanılması [151],
- Atığın besiyeri olarak kullanılması sürecinde protein ve enzim üretilmesi [79, 152-154],
- Atıktan antioksidan eldesi [155],
- Biyogaz üretimi [155],
- Biyosüpfektan üretimi [156].

Zeytin yağı fabrikası atık suyunun arıtımına yönelik birçok ülkede önemli araştırmalar yapılmasına rağmen, henüz her yerde uygulanabilecek bir arıtma metodu ortaya konulamamıştır. Türkiye’de de hem Çevre ve Orman Bakanlığı hem de zeytin üreticileri zeytin karasuyunun arıtımına yönelik çalışmalarını sürdürmekte olup, henüz istenen bir sonuca ulaşamamıştır [155].

ZYFA arıtımında aerobik arıtım, anaerobik arıtım, aerobik-anaerobik arıtım, kimyasal arıtım, kimyasal+biyolojik arıtım ve ileri arıtma yöntemleri kullanılmaktadır. Çevre dostu, güvenilir ve uygun maliyetli olan biyolojik arıtmada, organik madde ve inorganik besinlerin giderimi sağlanmaktadır. Mikroorganizmaların atık suya adaptasyonları ve fenolik maddelerin mikroorganizmaları inhibe etmemesi, biyolojik arıtmada üzerinde önemle durulması gereken konulardır [157].

Yüksek fenolik bileşikleri parçalama yeteneğinde olan fungusların kullanılması ZYFA’nın ön arıtımı için yeni bir perspektif getirmektedir. ZYFA’da gelişebilen mikroorganizmaların bu fenolik zor ayrışabilen bileşikleri metabolize etmeleri ya da metabolize edebilecekleri bileşiklere dönüştürmeleri gerekir. Fenolik bileşiklerin metabolize edilebilir hale dönüştürülmesinde mikroorganizmaların lakkaz ve benzeri polifenoloksidazların üretimi rol oynamaktadır [153, 155]. Özellikle aerobik biyolojik yöntemler ile fenolik bileşik içeriğinin düşürüldüğü ve renginde açılım sağlandığı çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Son yıllarda zeytinyağı fabrikası atığının (ZYFA) koyu rengini gidermek için beyaz çürükçül funguslar kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda beyaz çürükçül funguslarla işlem görmüş ZYFA’da yüksek KOİ, fenol ve renk gideriminin sağlanacağı rapor edilmiştir [64, 65, 155, 157].

ZYFA’nın kullanım alanlarından birisi de besiyeri olarak kullanım sürecinde çeşitli enzimlerin üretimidir. Çalışmamızda da, bu amaçla atığın farklı konsantrasyonları kullanılarak selülaz ve ksilanaz enzim üretimi üzerine olan etkisine bakılmış ve bu üretimi arttırıcı etkisi olabileceği düşünülen lignoselülozik kaynak olarak kültür ortamlarına pamuk sapları ilave edilmiştir.

ZYFA’nın kültür ortamı olarak kullanım sürecinde enzim aktivitelerinin belirlenmesinin yanı sıra ZYFA’nın, renk gideriminde meydana gelen değişimler tespit edilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Son yıllarda enzimlerin endüstriyel kullanım alanlarının artması ile daha etkili mikrobiyal kaynakların araştırılması, daha ekonomik ve hızlı tekniklerin geliştirilmesi ve üretim koşullarının optimizasyonu ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır. Ayrıca çeşitli atıkların (tarımsal veya endüstriyel) hammadde olarak kullanılması sürecinde ekonomik enzim üretimine yönelik çalışmalar başlamıştır.

Beyaz çürükçül funguslar selüloz, ksilanaz, lakkaz gibi lignoselülozik enzimlerinde içerisinde olduğu çeşitli ekstraselüler enzimleri bol miktarda ürettiği bilinen ve son yıllarda üzerinde çok fazla çalışılan, önemli endüstriyel kullanım alanlarına sahip organizmalardır. Bu funguslar son yıllarda pek çok çevresel kirleticinin gideriminde en etkili organizmalar olarak dikkat çekmektedir.

Selüloz ve ksilanaz enzimlerinin tekstil, gıda, yem ve kâğıt endüstrilerinde kullanım alanlarının hızla artması sonucu, bu enzimlerin üretiminde daha etkili, ekonomik, hızlı tekniklerin geliştirilmesi için yapılan çalışmalar da hızlanmıştır. Son yıllarda tarımsal atıklar kullanılarak selüloz ve ksilanaz enzimlerinin üretiminin indüklenmesi ve ekonomik yollarla enzim üretimi ile ilgili pek çok çalışma bulunmaktadır.

Kerem vd. (1992) ligninin parçalanmasıyla ilgili lignoselülozik parçalanma, lakkaz ve selüloz enzimlerinin aktivitelerini belirlemek amacıyla, pamuk sapının katı substrat fermentasyonunda iki beyaz çürükçül fungus olan *Pleurotus ostreatus* ve *Phanerochaete chrysosporium*'u karşılaştırmalı olarak incelemişlerdir. *P. chrysosporium* kuvvetli ve hızlı bir şekilde gelişme göstermiş ve 15 gün içerisinde pamuk sapının organik bileşenini %55 oranında azaltmıştır. *P. ostreatus* ise lignin parçalanmasında daha seçici ve yavaş bir gelişme göstermiş ve 30 günlük gelişme döneminden sonra organik maddenin yalnızca %20'sini parçalamıştır. Lakkaz aktivitesi yalnızca *P. ostreatus*'da belirlenmiştir. Selüloz aktivitesi *P. chrysosporium*'da fermentasyonun ilk günlerinde artış gösterirken, *P. ostreatus*'da ise 18. güne kadar artış göstermiş daha sonra gelişme döneminin sonuna kadar sabit kalmıştır. Lignoselülozik parçalanma mekanizmasında, katı ortam koşullarında elde edilen aktivitenin sıvı kültürde yapılarına göre daha iyi sonuçlar verdiği de belirtilmiştir [158].

Sivaprakasam vd. (1994) *Pleurotus sajor-caju* üretiminde kullanılacak ortamların lignin ve selüloz içeriklerinin fungus veriminde etkili olduğunu; verimin ortamların selüloz içeriği ve selüloz/lignin oranıyla pozitif, lignin ve orto-dihidroksi fenolik içeriğiyle negatif yönde etkilendiğini açıklamışlardır. Ortamdaki yüksek selüloz içeriğinin selülaz enzim üretimini arttırdığını ve enzim üretiminin de verimi olumlu yönde etkilediğini; yüksek lignin ve fenolik madde içerikli ortamların ise selülaz aktivitesini azalttığını rapor etmişlerdir [159].

Nadia vd. (1996) yaptıkları çalışmada, beyaz çürükçül funguslardan *Phanerochaete chrysosporium* NRRL 6359, *P. chrysosporium* NRRL 6361 ve *Coriolus versicolor* NRRL 6102 kullanarak, bu fungusların selülaz, ksilanaz, glukanaaz enzim aktivitelerini belirlemişlerdir. *P. chrysosporium* NRRL 6359 enzim üretiminde en etkin tür olarak belirlenmiştir. Farklı tarımsal atıklar (şeker pancarı küspesi, buğday samanı, mısır çöpü, pirinç kabukları) kullanılarak bu fungusun enzim üretim koşulları karşılaştırılmıştır. Buna göre selülaz üretimi için optimum pH değerinin buğday samanında 5.5, şeker pancarı küspesinde 6.5 olduğunu belirlemişlerdir. Bütün substratlarla 7 günlük inkübasyon periyodunda glukanaaz üretimi için optimum pH aralığının 6.5-7.5, ksilanaz için ise optimum pH aralığının 4.5-5.5 olduğu tespit edilmiştir [160].

Tan ve Wahab (1997) pamuk sapı ve kauçuk talaşı üzerinde yetiştirilen *Pleurotus sajor-caju*'nın enzim üretimini incelemiştir. Pamuk sapı üzerinde yetiştirilen fungusun 15. günde selülaz enzim bileşenleri sellobiyohidrolaz, CMCaz ve β -glukosidaz sırasıyla 10.0, 71.4 ve 21.6 U/mg olarak belirlenmiştir. Kauçuk talaşı üzerinde 28-35 gün gelişme sonrasında aynı selülaz enzimleri sırasıyla 0.28, 0.62 ve 0.75 U/mg ile daha düşük seviyelerde elde edilmiştir. Kauçuk talaşı üzerinde 20. günde 0.63 U/mg ile en yüksek ksilanaz üretimi elde edilmiş ve en yüksek lakkaz üretimi ise 27.4 U/mg ile 35. günde bulunmuştur [161].

Gawande ve Kamat (1999) *Aspergillus niger* ve *A. terreus* tarafından üretilen ksilanaz enzimini indüklemek için, katı substrat fermentasyonu koşullarında kültür ortamına şeker kamışı posası, buğday kepeği, pirinç sapları ve soya fasulyesi kabukları gibi lignoselülozik atıkları eklemişler ve en iyi ksilanaz üretiminin buğday kepeği eklenen ortamda elde edildiğini rapor etmişlerdir. Ticari ksilanazların üretiminde çoğunlukla substrat olarak saf ksilanın kullanıldığı düşünülürse, buğday kepeği gibi ucuz bir substrat ile enzimin indüklenmesi oldukça ilgi çekmektedir [162].

Velazquez-Cedeno vd. (2002) tarafından yapılan bir çalışmada *Pleurotus ostreatus* ve *Pleurotus pulmonarius*'un lignolitik enzimlerin üretimini sağlamak için substrat olarak ortama kahve atığı eklenmiş ve enzim aktivitesindeki değişimler araştırılmıştır. Türlerin ekstraselüler enzimatik aktivitesini gözlemlemek için 16 günlük inkübasyon periyodu boyunca her 4 günde bir örnekler alınmıştır. Hidrolaz aktivitesi (endoglukanaz (CMCaz) ve sellobiyohidrolaz (CBH) inkübasyonun ilk günlerinde en yüksek değere ulaşırken, oksidaz aktivitesi ise (lakkaz ve Mn-peroksidaz) 12. günde en yüksek değere ulaşmıştır [163].

Reddy vd. (2003) *P. ostreatus* ve *P. sajor-caju*'nın katı substrat fermentasyonunda, muzun yaprak ve yalancı gövde artıkları üzerinde lakkaz, lignin peroksidaz, ksilanaz, endo-1,4- β -D-glukanaz (CMCaz) ve ekzo-1,4- β -D-glukanaz (FPA aktivitesi) gibi lignolitik ve selülitik enzim üretimlerini araştırmışlardır. Her iki türün 40 günlük gelişim süresinde enzim aktivite seviyeleri ve üretim miktarları benzerlik göstermiştir. Enzim üretiminde muzun yaprak örneği yalancı gövdeye göre daha uygun ortam olarak belirlenmiştir. En yüksek enzim aktiviteleri gelişme döneminin 10. ve 20. günlerinde elde edilmiş ve her iki türün selülitik enzim aktivitelerinin lignolitik enzim aktivitelerine göre oldukça düşük seviyelerde olduğu belirlenmiştir [164].

Mikiashvili vd. (2004) tarafından tıbbi öneme sahip farklı ekolojilerdeki Basidiomycetes'e ait 11 tür ve 26 ırkın lignoselülitik enzim aktiviteleri araştırılmıştır. *T. hirsutus* 71, *G. trabelum* 765 ve *T. versicolor* 897 yüksek karboksimetil selüloz aktivitesi göstermiş (sırasıyla 5.65 U/ml, 4.75 U/ml ve 4.29 U/ml) ve *T. versicolor* 897 iyi bir ksilanaz (5.54 U/ml) üretimi yapmıştır. Mandalina kabuklarının sıvı kültürdeki lakkaz aktivitesinin en yüksek seviyeleri *O. olearius* 174, *T. versicolor* 775 ve *P. ostreatus* 98 türlerinde (sırasıyla 100.1 nkat/ml, 74.8 nkat/ml ve 62.0 nkat/ml) bulunmuştur. Mandalina kabuklarının katı substrat fermentasyonunda lakkaz üretimi daha yüksek bulunmuş, bu değer *T. versicolor* 145'de 104.1 nkat/ml olmuştur. Tüm türler glukoz içeren sıvı kültürde düşük seviyelerde enzim aktivitesi göstermişlerdir [165].

Qinnghe vd. (2004) tarafından *Pleurotus ostreatus* SYJ 042 fungusu ile ksilanaz üretimi üzerine karbon ve azot kaynağı, hava, pH'da dahil olmak üzere çeşitli faktörlerin etkisi incelenmiştir. Optimum fermentasyon ortamı, karbon kaynağı (%2.5 mısır koçanı+%2.5 buğday kepeği), azot kaynağı (%0.8 pepton), aşılama seviyesi (dört disk, çapı 0.5 cm), havalandırma hızı (1/3 fermentasyon sıvı

hacim) ve başlangıç pH'sı (6.0) belirlenmiştir. Bu kültür koşulları altında maksimum ksilanaz aktivitesi (24.98 U/ml) 7. günde gözlenmiştir. Enzim 40 °C'de 15 dk. inkübe edildikten sonra aktivitesi %99.3 olarak belirlenmiş ve geniş bir pH (3-9) aralığında enzim aktivitesinin sabit kaldığı ifade edilmiştir [166].

Kang vd. (2004) tarafından pirinç samanı ve buğday kepeğinin farklı oranlarda katı substrat fermentasyonunda kullanılmasıyla *Aspergillus niger* KK2'nin selülaz ve hemiselülaz üretimi araştırılmıştır. *Aspergillus niger* KK2'nin substrat olarak yalnızca pirinç samanı eklenen fermentasyon ortamında maksimum FPA aktivitesi 4. günde 19.5 IU/g olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda CMCaz (129 IU/g), β -glukosidaz (100 IU/g), ksilanaz (5070 IU/g) ve β -ksilosidaz (193 IU/g) aktiviteleri fermentasyonun 5. ve 6. gününde elde edilmiştir. *A. niger* KK2 tarafından üretilen selülazlar ve hemiselülazların gazete ve kağıt endüstrisinde, yem endüstrisinde ve kimya endüstrisinde uygulanabilir olacağı da rapor edilmiştir [167].

Mata vd. (2005) tarafından yapılan çalışmada, kahve posası üzerinde yetiştirilen altı *Pleurotus* tür ve ırkının *Tricoderma* spp. ile karşılıklı etkileşimi ve lignoselüloolitik enzim aktivitelerindeki değişimleri incelenmiştir. Lakkaz ve mangan peroksidaz üretimi tüm uygulamalarda misel gelişiminin 12. günde en yüksek değere ulaşmış, selülaz aktivitesi ise misel gelişme döneminde düşük değerde bulunmuştur. Ayrıca ortamda *Tricoderma* türlerinin bulunmasının *Pleurotus* türlerinin oksidaz üretiminde önemli bir artışa neden olduğu da ifade edilmiştir [168].

Silva vd. (2005) okaliptus ağacı artıklarına belirli oranlarda eklenen (%0, %5, %10, %15 ve %20) soya, pirinç ve buğday kepeğinin, *Lentinus edodes*'in 3 farklı ırkının enzim aktivitesi üzerine etkisini incelemişlerdir. Okaliptus atıklarına tahıl kepeklerinin eklenmesi sonucu 30 günlük süre içerisinde, *L. edodes* miselleri hızlı bir gelişme göstermiştir. En yüksek enzim aktiviteleri, %20 soya kepeği eklenen okaliptus artıklarından elde edilmiştir. Ortamdaki %20 oranındaki soya kepeği, ırkların selülaz ve ksilanaz enzim üretimini arttırmış, mangan peroksidaz (MnP) üretimini ise azaltmıştır. MnP üretimi ancak %10 kepek içeren ortamda en yüksek bulunmuştur. Araştırmacılar, selülaz ve ksilanaz enzim üretimiyle ortamların, çözünebilir ve kullanışlı şekerlere tam olarak parçalanması sonucu, daha yüksek biyokütle oluştuğunu bildirmişlerdir [169].

Elisashvili vd. (2006) sıvı kültürde *Pleurotus dryinus* IBB 903'ün mandalina kabukları ve ağaç yaprakları üzerinde selülaz, ksilanaz, lakkaz ve mangan peroksidaz enzim üretimini incelemişlerdir. Ortam konsantrasyonunun %1'den %4-6'ya artış

göstermesi enzim aktivitesini arttırmıştır. Karbon ve azot kaynağı olarak mandalina kabukları ve maya özütü içeren basit ve ucuz bir ortam *P. dryinus* IBB 903'ün hidrolaz ve oksidaz enzim seviyelerinin yüksek olmasını sağlamıştır. Ortama bakır ve manganın eklenmesi lakkaz ve mangan peroksidazın daha erken ve hızlı birikmesine neden olmuştur. Farklı karbon kaynaklı sentetik ortamda mantar yetiştirildiğinde MnP üretimi olmadığı için lignoselülozik ortamın yapısında *P. dryinus* IBB 903'ün MnP üretimi zorunludur. Test edilen karbon kaynakları arasında karbon içermeyen kontrol ortamına göre yalnızca glukoz, lakkaz üretimini 21 kat arttırmış, karboksimetil selülaz ve ksilanaz uyarıcı enzimler olarak belirlenmiştir [170].

Stajić vd. (2006) *Pleurotus* türlerinin lakkaz ve peroksidaz üretimi üzerine farklı karbon ve azot kaynaklarının etkisini araştırmışlardır. *P. eryngii*, *P. ostreatus* ve *P. pulmonarius* çalışmada kullanılan karbon ve azot kaynaklarının hepsinde hem sıvı hem de katı fermentasyon koşullarında lakkaz üretmişlerdir. Lakkaz aktivitesinin en yüksek seviyeleri *P. eryngii* için öğütülmüş mandalina kabuklarının sıvı kültüründe (999.5 U/l), *P. ostreatus* 493 için asma talaşının katı fermentasyon koşullarında (2144.6 U/l) bulunmuştur. En yüksek peroksidaz seviyeleri *P. ostreatus* 494 ve *P. pulmonarius* için asma talaşının katı fermentasyonunda elde edilirken, bu aktiviteler sıvı kültürde yok denecek kadar az bulunmuştur [171].

Alexandrino vd. (2007) *P. ostreatus*'un lakkaz, mangan peroksidaz, ksilanaz ve endo-1,4-glukanaz gibi lignoselüloolitik enzimlerinin üretiminde portakal artıklarından yararlanmışlardır. Portakal artıklarında özellikle lakkaz (75 U/g, aşılardan 15 gün sonra) ve Mn peroksidazın (6.8 U/g , aşılardan 30 gün sonra) yüksek aktiviteleri elde edilmiştir [172].

Shashirekha ve Rajarathnam (2007) çeltik sapı ile hindistan cevizi lifi karışımı üzerindeki *P. florida*'nın gelişimini ve şapka oluşumu sırasındaki kimyasal ve biyokimyasal değişimleri incelemişlerdir. Selüloz, hemiselüloz ve lignin miktarı misel gelişme döneminde azalmıştır. Selülaz, hemiselülaz ve proteaz enzim aktiviteleri misel aşılamasından şapka oluşumunun sonuna kadar sürekli artış göstermiş, lakkaz aktivitesinin ise şapka oluşumu sırasında lignin parçalanmasının azalmasıyla uyum göstererek şapka oluşumu döneminde azaldığı belirlenmiştir [173].

Papinutti ve Forchiassin (2007) tarafından yapılan çalışmada *Fomes sclerodermeus*'un katı substrat fermentasyonu ile soya ve buğday kepeği kullanılarak

lignoselülozik enzim üretimi araştırılmış olup, soya kullanılan fermentasyon ortamında 12. günde selülag, ksilanaz ve pektinaz enzimleri maksimum seviyeye ulaşırken, MnP (14.5 U/g) 15. günde, lakkaz (520 U/g) ise 28. günde pik yapmıştır. Buğday kepeği ile soyanın 1:1 oranında karıştırılması ile hidrolazların değeri 15. günde artmış ve pektinazların oranı sadece soya kullanıllana oranla 3 kat artmıştır, ligninazların miktarı ise düşmüştür. MnP aktivitesi 4.64 U/g ve lakkaz aktivitesi 66.7 U/g olarak belirlenmiştir [174].

Gao vd. (2008) tarafından yapılan bir çalışmada, mısır artıkları kullanılarak *Aspergillus terreus* M11 fungusu ile selülag enzimi üretimi artırılmıştır. En yüksek selülag aktivitesi 45 °C’de, pH 3’de, karbon ve azot kaynağı olarakta %0.8’lik maya özütü kullanılan ortamda gözlenmiştir. Endoglukanaz aktivitesi 581 U/g, FPA aktivitesi 243 U/g, β-glukosidaz aktivitesi 128 U/g olarak belirlenmiş olup endoglukanaz için maksimum aktivite pH 2’de ve β-glukosidaz için maksimum aktivitenin ise pH 3’de elde edildiği rapor edilmiştir [175].

Elisashvili vd. (2008) farklı içerikteki lignoselülozik artıkların bulunduğu sıvı ve katı substrat fermentasyonunda *Lentinus edodes* ve *Pleurotus* türlerinin enzim aktivitelerini incelemişlerdir. CMCaz (62.3 U/ml), ksilanaz (84.1 U/ml), FPA (5.9 U/ml) ve lakkaz (4103 U/ml) aktiviteleri *Pleurotus* türlerinden şimdiye kadar elde edilen en iyi sonuçlar olmuştur. Kullanılan tarımsal atıkların yapısı ve fungus yetiştirme yöntemi fungusun enzim potansiyelinin belirlenmesinde etkili bulunmuştur. *L. edodes* ve *Pleurotus* türlerinin ağaç yapraklarının (*Fagus sylvatica*) katı substrat fermentasyonunda lakkaz ve Mn peroksidaz üretimi, sıvı kültürde ise hidrolaz enzim üretiminin iyi olduğu belirlenmiştir [176].

Membrillo vd. (2008) tarafından yapılan bir başka çalışmada, bir beyaz çürükçül fungus olan *Pleurotus ostreatus*’un iki soyu (IE-8, CP-50) ile selülag, ksilanaz ve lakkaz enzim üretimi çalışılmıştır. Kültür ortamlarına substrat olarak şeker pancarı küspesi eklendikten 8 gün sonra en yüksek enzim aktiviteleri elde edilmiş olup, ksilanaz 5.79 IU/g kuru ağırlık, selülag 0.18 IU/g kuru ağırlık ve lakkaz 0.040 IU/g kuru ağırlık olarak belirlenmiştir [177].

Singh vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada *Coprinellus disseminatus*’un yeni izole edilen yabani suşlarının (SH-1 ve SH-2) ksilanaz üretimi, optimizasyonu ve kısmi karakterizasyonu katı hal fermentasyonu ile gerçekleştirilmiştir. SH-1 ve SH-2 suşları, 37 °C’de, başlangıç pH’sı 6.4 olan ortamda 7 günlük inkübasyon

sürecinde yüksek ksilanaz (727.78 ve 227.99 IU/ml), çok düşük CMCaz (0.925 ve 0.660 IU/ml) ve lakkaz (0.640 ve 0.742 U/ml) aktivitesi göstermişlerdir. Bu süreçte azot kaynağı olarak maya özütü ve ucuz substrat olarak buğday kepeği kullanılmıştır. Bu enzimlerin geniş sıcaklık ve pH aralıklarında belirgin aktivite göstermiş olmalarından dolayı kağıt endüstrisinde hamur ağartma ajanı olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir [75].

Dinis vd. (2009) 4 beyaz çürükçül fungusun (*Trametes versicolor*, *Bjerkandera adusta*, *Ganoderma applanatum* ve *Phlebia rufa*) katı substrat fermentasyonunda buğday samanı ilave edilen ortamlarda, farklı fermentasyon sürelerinde MnP, LiP, lakkaz, CMCaz, aviselaz, ksilanaz, feruloil esteraz enzim aktivitelerini karşılaştırmıştır. MnP aktivitesi 28. günde *P. rufa*'da, lakkaz aktivitesi 7. günde *Ganoderma applanatum*'da, LiP aktivitesi 28. günde *B. adusta*'da, CMCaz aktivitesi 14. günde *Ganoderma applanatum*'da, ksilanaz aktivitesi 14. günde *Ganoderma applanatum*'da, feruloil esteraz aktivitesi ise 7. günde *Ganoderma applanatum*'da en yüksek değerler de gözlenmiştir [178].

Xu vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada *Irpex lacteus* CD2, katı substrat fermentasyonunda mısır koçanı ile 120 gün inkübe edilerek 5 günlük zaman periyotlarında, lignoselülozik bileşen kaybı, enzim üretimi, indirgen Fe^{3+} aktivitesi çalışılmıştır. Ortalama ağırlık kaybı 5-120 gün süresince %1.7 ile %60.5 arasında bulunmuştur ve ligninin aksine, hemiselüloz ve selüloz ilk dönemde bozulmuştur. 15 gün sonra hemiselülozun %65'i bozulmuş, selüloz ilk 10 gün içinde en fazla bozulan olmuş ve %17.2'si 10 gün sonra bozulmuştur. Ligninin %80'i gibi büyük bir kısmı ise 60 gün sonra bozulmuştur. Toplam selülaz aktivitesine karşılık gelen filtre kağıdı aktivitesi 5. günde pik yapmış ve 40 ile 60 gün arasında yüksek bir değerde kalmıştır. Sadece düşük lignin peroksidaz aktivitesi 25 gün sonra tespit edilmiştir. İndirgen Fe^{3+} aktivitesi *I. lacteus* CD2 tarafından ligninin yıkımında önemli bir rol oynayan tüm çürüme dönemlerinde tespit edilebilmiştir [179].

Soni vd. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada, pirinç kabuğu ve küspe kullanılarak *Aspergillus fumigatus* fresenius suşu (AMA) ile selülaz ve ksilanaz enzim üretimi artırılmıştır. Optimizasyon koşulları altında sırasıyla endoglukanaz, FPA, β -glukosidaz, sellobiyohidrolaz, ksilanaz enzim aktiviteleri (240.2, 9.73, 470,

15, 2800 U/g) gözlenmiş olup, optimize edilmemiş koşullar altında elde edilenlere göre enzim aktiviteleri ise sırasıyla 2.45, 2.88, 2.13 ve 1.29 kat artmıştır [180].

Kurt ve Büyükalaca (2010) *Pleurotus ostreatus* ve *Pleurotus sajor-caju*'nın katı substrat fermentasyonu koşullarında asma sapsarı, buğday samanı, çeltik samanı, susam samanı, talaş ile bu atıkların buğday kepeği karışımlarının lakkaz ve CMCaz üretimi üzerine olan etkiler incelenmiştir. Buğday kepeği ile karıştırılmış atıkların karbon ve azot içeriklerinin diğerlerine oranla daha yüksek olduğu gözlenmiştir. *P. ostreatus* ve *P. sajor-caju*'nın lakkaz aktiviteleri miselyal büyümenin 10. gününde en yüksek değerlere ulaşmıştır. Bu enzim aktivitesi kepek içeren substratlarda daha yüksek elde edilmiştir. CMCaz aktivitesi ise miselyal büyümenin 5. gününde ve sonraki ilk evrede olmak üzere iki pik yapmıştır. Buğday kepeği içeren yüzeylerde yetiştirilen *P. ostreatus* ve *P. sajor-caju*'nın yüksek CMCaz, lakkaz enzim aktiviteleri gösterdiği saptanmıştır [181].

Farinas vd. (2010) tarafından *Aspergillus niger* soyları kullanılarak katı substrat fermentasyonu ile selüloz ve ksilanaz enzim üretimleri pH ve sıcaklık değerleri bakımından karakterize edilmiştir. Buna bağlı olarak farklı sıcaklık ve pH değerlerinde endoglukanaz, β -glukosidaz ve ksilanaz aktiviteleri incelenmiş olup, her üç enzim için optimum sıcaklık değerleri 35 °C ve 60 °C aralığında, optimum pH aralığının ise 4 ile 5.5 arasında olduğu rapor edilmiştir [182].

Dias vd. (2010) Basidiomycetes *EUC-1* ve *Irpex lacteus*'u kullanarak selülozun enzimatik hidroliz yoluyla erişilebilirliğini geliştirmek amacıyla buğday samanı ile uygulama yapmışlardır. Uygulama yapılmamış buğday samanında selüloz/lignin oranı 2.7 iken *EUC-1* ve *Irpex lacteus* uygulamasıyla bu oranlar sırasıyla 5.9 ve 4.6'ya yükselmiştir. Buğday samanı ile ön uygulamadan sonra fungusların lakkaz, mangan peroksidaz, lignin peroksidaz, karboksimetil selüloz, ksilanaz, aviselaz ve feruloil esteraz enzim aktivitelerine bakılmış ve iki fungusunda selülitik ve ksilanolitik aktivitelerinin düşük, lignolitik aktivitelerinden ise özellikle MnP aktivitesinin yüksek olduğu gözlenmiştir [183].

Sharma ve Arora (2010) tarafından *Phlebia floridensis* beyaz çürükçül fungusu ile katı substrat fermentasyonunda buğday samanını substrat olarak kullanarak lignoselülozik enzim üretimi için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla enzim üretimi üzerine nem içeriği, inorganik azot kaynağı (NH₄Cl), malt

özünün etkisi incelenmiştir. NH_4Cl ve malt özütünün hemen hemen eşit miktarının varlığında ve nem içeriğinin artışıyla lakkaz enzimi 34 kat artış göstermiş, mangan peroksidazda ise optimal üretim gözlenmiştir. Bu uygulamalar önemli ölçüde ($p<0.05$) CMCaz ve ksilanaz üretimini arttırmıştır. İn-vitro sindirilebilirlik hemen hemen %50 artmıştır. Ayrıca beyaz çürükçül fungusların yıkım yetenekleri sayesinde buğday samanının sindirilebilirliğinin artması, değerli bir hayvan yemi olarak kullanılabilirliğini göstermektedir [184].

Malik vd. (2010) tarafından yapılan çalışmada selülaz üreticisi olan *Trichoderma viride*'nin şeker pancarı küspesi kullanılarak yapılan optimizasyon sürecinde, selülazların maksimum üretimi (CMCaz 1.57 U/ml/dk, FPA 0.921 U/ml/dk) 30 °C inkübasyon sıcaklığında ve 72 saat fermentasyon süresinden sonra gözlenmiştir. Kültür ortamının başlangıçtaki pH'sı optimize edilerek maksimum büyüme için pH değeri 5.5 olarak bulunmuş ve enzim üretimi CMCaz 1.66 U/ml/dk ve FPA 0.932 U/ml/dk olarak rapor edilmiştir [185].

Singh vd. (2011) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise *Aspergillus heteromorphus* ile selülaz, ksilanaz, lakkaz, MnP enzimleri çalışılmış ve kültür ortamına tarımsal atık olarak pirinç kabuğunun eklenmesiyle bu enzimlerin indüklenerek daha hızlı üretimi sağlanmıştır. Selülaz ve ksilanaz aktivitesi fermentasyonun 6. gününde maksimum değerlere ulaşırken, lakkaz ve MnP aktivitesi ise 12. günde en yüksek değerlere ulaşmıştır [186].

Yang vd. (2011) transgenik *Coprinopsis cinerea* suşları, *Agaricus bisporus*, *Flammulina velutipes* ve *Lentinula edodes* funguslarının, muz kabuklarının substrat olarak kullanılmasıyla lignoselülozik enzim aktiviteleri karşılaştırılmıştır. *Coprinopsis cinerea* suşlarından en fazla enzimatik aktivite Cabm44 suşunda belirlenmiş olup, bu değerler endo- β -1,4-glukanaz için 0.48 U/ml, total selülaz için 0.26 U/ml ve endo- β -1,4-ksilanaz için 38.10 U/ml olarak ifade edilmiştir. CMCaz aktivitesinde substrat olarak muz kabuklarına ilaveten pirinç kabukları ve mısır çöpü eklenmiş ortamda ise en yüksek aktivite 7. günde gözlenmiştir [187].

Membrillo vd. (2011) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise şeker kamışı küspesi üzerinde yetiştirilen *Pleurotus ostreatus*'un enzim profili ve farklı substrat kompozisyonunda parçaçık geometrisinin etkisi incelenmiştir. Şeker pancarı küspesinin 3 farklı büyüklüğünün (0.92 mm çapında, 1.68 mm çapında ve ortalama

2.9 mm çapında heterojen parçaçıklar), *Pleurotus ostreatus*'un büyümesindeki etkisi analiz edilmiş ve spesifik büyüme oranının heterojen partiküllerde daha düşük ($\mu=0.043\text{ h}^{-1}$) olmasına rağmen çözülebilir protein üretiminin (809 $\mu\text{g/g}$ kuru ağırlık)daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Diğer iki partikülde ise büyüme oranları daha yüksek ($0.049\text{-}0.05\text{ h}^{-1}$) olup çözülebilir protein üretimi daha düşüktür (500 $\mu\text{g/g}$ kuru ağırlık). Ksilanaz (20 mU/g kuru ağırlık) ve lakkaz (24.5 mU/g kuru ağırlık) aktiviteleri heterojen parçaçıklarda daha yüksekken, maksimum hemiselülaz yıkımıyla ilişkili olarak CMCaz (250 mU/g kuru ağırlık) ve FPA (130 mU/g kuru ağırlık) aktiviteleri ise 0.92 mm çapındaki parçaçıklarda daha yüksek gözlenmiştir [188].

Dutt vd. (2012) tarafından *Coprinus cinereus* AT-1 MTCC 9695 fungusu kullanılarak farklı karbon ve azot kaynaklarının (buğday kepeği, şeker pancarı kspesti, pirinç kabağu, buğday samanı, maya özütü vb.) selülaz, ksilanaz ve lakkaz enzimlerinin üretiminde etkisi incelenmiştir. 12 günlük inkübasyon sürecinde en yüksek enzim aktivitesi 7. günde buğday kepeği ve maya özütünün kullanıldığı ortamda 37 $^{\circ}\text{C}$ 'de ve pH 6.4'de elde edilmiştir. Buna göre en yüksek selülaz aktivitesi 1.01 IU/ml, ksilanaz aktivitesi 698.75 IU/ml ve lakkaz aktivitesi ise 25.6 ± 3.2 IU/ml olarak belirlenmiştir [189].

Carabajal vd. (2012) yaptıkları çalışmada *Pleurotus ostreatus* ve *Pleurotus citrinopileatus* türleri ile lignoselülozik enzim üretimini, verim değerlerini ve morfolojik özelliklerini karşılaştırmışlardır. *P. ostreatus* ve *P. citrinopileatus*'un kültür ortamlarında elde edilen biyolojik verimliliği sırasıyla %95.3 ve %67.6 olarak elde edilmiştir. Endoksilanaz, endoglukanaz, β -glukosidaz, β -ksilosidaz enzim değerlerinde artış gözlenmiştir. En yüksek lakkaz (8.2 U/g) ve Mn-peroksidaz (7.5 U/g) aktiviteleri ile maksimum lignin yıkımı (%28), *P. ostreatus*'da tespit edilmiştir [190].

Pal vd. (2013) tarımsal bir atık olan hardal sapı ve samanını ilk kez *Termitomyces clypeatus*'da lignosellolitik enzimlerin üretimi ve sakkarifikasyonda substrat olarak kullanmışlardır. Hardal sapı ve samanı yüksek selüloz ve hemiselüloz içeriğinden dolayı enzimlerin (CMCaz, β -glukosidaz, ksilanaz ve β -ksilosidaz) retiminde tek karbon kaynağı olarak kullanılmıştır. Enzimlerin retiminde yaygın olarak kullanılan tarımsal atıklardan olan buğday kepeği, pirinç kabuklarında ilavesiyle enzimlerin üretimini 2-10 kat arası arttırmıştır. Hardalın tarımsal atığının

biyoetonal üretimi için ucuz, yenilenebilir bir ham materyal olarak kullanılabilirliği belirlenmiştir [191].

Çalışmamızda enzimlerin üretimi amacıyla besiyeri olarak kullanacağımız endüstriyel atık su ile ilgili literatürlere baktığımız zaman, endüstriyel atıksuların arıtımı ve çevreye olan zararlı etkilerinin indirgenmesi üzerine yapılan çok sayıda çalışmaya rastlanırken, atıkların besiyeri olarak kullanılması sürecinde enzim üretimi çalışmaları çok dikkat çekmektedir.

Kahraman ve Yeşilada [63, 64] tarafından yapılan çalışmalarda, ZYFA ve vinasın besiyeri olarak kullanımları sürecinde beyaz çürükçül funguslarda lakkaz enziminin üretimi araştırılmış ve sonuçta yüksek lakkaz üretiminin yanı sıra, atıkların KOİ ve renk gibi kirlilik parametrelerinde oldukça iyileşme sağlanmıştır. Bu çalışmalarda aynı zamanda enzim indüksiyonu için ortama pamuk sapları da eklenmiştir. Yeşilada vd. [65, 192] tarafından yapılan diğer çalışmalarda ise, ZYFA'nın besiyeri olarak kullanımı sürecinde, atığın kirlilik yükünde meydana gelen değişimin yanısıra, lakkaz enzim üretim koşulları optimize edilmiştir.

ZYFA ile ilgili yapılan literatür taramasında lakkaz, Mn-peroksidaz, ligninaz gibi enzimlerin üretim sürecinde endüstriyel atıkların besiyeri olarak kullanımı ile ilgili pekçok çalışmaya rastlanırken, selülaz ve ksilanaz üretimi amacıyla daha çok katı substrat fermentasyonuna dayalı üretim çalışmaları ön plana çıkmakta olup, bahsi geçen endüstriyel atıkların kullanımına yönelik çalışmaya rastlanmamıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Çalışmalarda Kullanılan Funguslar

Bu çalışmada, Basidiomycetes sınıfına dahil olan beyaz çürükçül funguslardan *Pleurotus ostreatus* ve doğadan yeni izole edilmiş *Pleurotus ostreatus* (y.i) kullanılmıştır. *Pleurotus ostreatus* (y.i) Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA tarafından toplanıp saf kültür olarak izole edilmiştir. Bu funguslar İnönü Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji-Biyoteknoloji laboratuvarında saf kültür olarak muhafaza edilmektedir.

3.2. Çalışmalarda Kullanılan Fungusların Üretimi ve Devamlılığının Sağlanması

Çalışmalarda kullanılan fungusların devamlılığını sağlamak için funguslar, Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) plaklarında 30 °C'ye ayarlanmış statik inkübatörde (Sanyo MIR 252) inkübe edilerek her 3-4 haftada bir taze besiyerine pasajlamaları yapılmıştır. İnkübasyon sonucu elde edilen fungus kültürleri +4 °C'de buzdolabında kullanılıncaya kadar muhafaza edilmiştir.

3.3. Çalışmalarda Kullanılan Stok Fungus Kültürlerinin Hazırlanması

SDA plaklarında üretilmiş olan fungus kültürlerinden yatık agara pasajlama yapıldıktan sonra, kültür 30 °C'de 4-6 gün inkübe edilmiştir. Yatık agarda üretilen fungus kültürlerine 10 ml steril distile su eklenerek misel süspansiyonu hazırlanmıştır. Elde edilen bu misel süspansiyonundan 5 ml alınarak 100 ml Sabouraud Dekstroz Broth (SDB) içeren 250 ml'lik erlene aktarılıp 30 °C'de 150 rpm'de çalkalamalı inkübatörde 5 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kültür, düşük devirde homojenize edilerek çalışmalarda kullanılacak stok kültür hazırlanmıştır. Çalışmanın amacına göre değişik şekillerde hazırlanmış 100 ml'lik erlenlerdeki 30 ml'lik besiyerlerine 2 ml olacak şekilde ekim yapılmıştır.

3.4. Çalışmalarda Enzim Üretim Ortamı Olarak Kullanılan Besiyerlerinin İçeriği ve Hazırlanması

Çalışmada fungusların üretimi amacıyla birbirinden farklı özellikler gösteren besiyerleri kullanılmıştır. Bu besiyerleri içerisinde doğal besiyeri olarak Zeytinyağı fabrikası atık suyu ve sentetik besiyerleri olarak Stok Temel Ortam (STO), glukoz içermeyen STO ve distile su ortamları kullanılmıştır. Enzim üretim ortamı olarak kullanılan STO ve glukoz içermeyen STO'nun içeriği Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. STO ve glukoz içermeyen STO'nun içeriği

Kullanılan Bileşen	STO	Glukoz içermeyen STO
KH ₂ PO ₄ (g/L)	0.2	0.2
CaCl ₂ .2H ₂ O (g/L)	0.1	0.1
MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	0.05	0.05
NH ₄ H ₂ PO ₄ (g/L)	0.5	0.5
FeSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	0.035	0.035
Glukoz (g/L)	2	0
Maya Özütü (g/L)	1	1
Sabouraud dextrose broth (g/L)	5	5

Çizelge 3.1'de belirtilen besiyeri bileşenlerinin oranları son hacim 1000 ml olacak şekilde ayarlandıktan sonra 100 ml'lik erlenlere 30 ml olacak şekilde eklenmiştir. Daha sonra hazırlanan besiyerleri 121 °C, 1.5 atm basınç altında 20 dakika süresince otoklavda steril edilip, soğumaya bırakılmıştır.

Doğal besiyeri olarak kullanılan zeytinyağı fabrikası atık suyu (ZYFA), Gaziantep yöresinden temin edilmiş olup fabrikadan getirildikten sonra kaba bir süzme işlemine tabi tutulmuş ve daha sonra 120 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Steril edilmiş olan zeytinyağı fabrikası atık suları değişik konsantrasyonlarda (%10, %20, %30, %40, %50) hazırlanarak 100 ml'lik erlenlere 30 ml olacak şekilde eklenmiştir. Daha sonra hazırlanan besiyerleri 121 °C, 1.5 atm basınç altında 20 dakika süresince otoklavda steril edilip soğumaya bırakılmıştır.

3.5. Çalışmada Kullanılan Lignoselülozik Materyalin Hazırlanması

Çalışmada enzimlerin üretimini indüklemek için lignoselülozik kaynak olarak pamuk sapları kullanılmıştır. Pamuk sapları GAP projesi kapsamında pamuk üretiminin hızla arttığı Şanlıurfa/Harran yöresinden temin edilmiştir. Pamuk sapları 1-1.5 cm olacak şekilde kesilerek kültür ortamlarına amaca göre değişik miktarlarda eklenmiştir. Pamuk sapları ayrı steril edilerek, kültür ortamlarına otoklav sonrası steril koşullarda ilave edilmiştir.

3.6. Selülaaz ve Ksilanaz Enzim Üretim Yöntemi

Yarı katı kültür fermentasyonu ile enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. Buradaki amaç tarımsal atıklar kullanılarak lignoselülozik enzimlerin üretimini indüklemektir. Üçer tekrarlı olacak şekilde, bölüm 3.4’de ifade edildiği gibi hazırlanan doğal ve sentetik besiyerlerine steril koşullarda pamuk sapları (0.5 gr) eklendikten sonra *Pleurotus ostreatus* ve *Pleurotus ostreatus* (y.i) fungusları (bölüm 3.3’de belirtildiği gibi hazırlanan) 2’şer ml eklenerek 30 °C’de statik koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. Belirlenen zaman aralıklarında steril koşullarda besiyerleri süzülerek örnekler alınmış ve enzim aktiviteleri (selülaaz ve ksilanaz) spektrofotometrik olarak tespit edilmiştir.

3.7. Optimizasyon Çalışmaları

3.7.1. İnkübasyon sürelerinin selülaaz ve ksilanaz enzim üretimi üzerine etkisinin saptanması

Bölüm 3.3’de belirtildiği gibi hazırlanan *Pleurotus ostreatus* ve *Pleurotus ostreatus* (y.i) stok kültürleri, pamuk sapı eklenmiş (0.5 gr) ve eklenmemiş doğal ve sentetik kültür ortamlarına 2’şer ml ekilerek 30 °C’de statik koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince 3 günlük zaman aralıklarında (3., 6., 9., 12., 15. gün) 15 gün boyunca steril koşullarda örnekler alınarak selülaaz (Filtre kağıdı aktivitesi (FPA), karboksimetil selülaaz (CMCaz)) ve ksilanaz aktiviteleri spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

3.7.2. Pamuk sapı miktarının ve büyüklüğünün, selüloz ve ksilanaz enzim üretimi üzerine etkisinin saptanması

Pamuk sapı miktarlarının selüloz ve ksilanaz enzim üretimindeki etkisini gözlemek amacıyla pamuk sapları, doğal ve sentetik besiyerlerine 0.1, 0.5, 1 gr olacak şekilde steril koşullarda eklenmiştir. Pamuk sapı büyüklüğünün selüloz ve ksilanaz enzim üretimindeki etkisini gözlemek amacıyla pamuk sapları küçük boy (0.1-0.2 cm) ve büyük boy (1-1.5 cm) olacak şekilde steril koşullarda doğal ve sentetik besiyerlerine eklenmiştir.

3.7.3. Çalkalama hızının selüloz ve ksilanaz enzim üretimi üzerine etkisinin saptanması

Selüloz ve ksilanaz enzim üretimi açısından en uygun çalkalama hızının saptanması amacıyla statik, 50 ve 100 rpm çalkalama hızlarında çalışmalar yürütülmüştür.

3.7.4. İnkübasyon sıcaklığının selüloz ve ksilanaz enzim üretimi üzerine etkisinin saptanması

Enzim üretimini en fazla indükleyen sıcaklık aralığının saptanması amacıyla çalışmalar 20, 30, 40 ve 50 °C’de yürütülmüştür.

3.7.5. Besiyeri pH’sının selüloz ve ksilanaz enzim üretimi üzerine etkisinin saptanması

Doğal ve sentetik besiyerlerinin başlangıç pH’larının enzim üretimleri üzerine olan etkisini belirlemek amacıyla aseptik koşullarda 1N HCl ve 1N NaOH kullanarak besiyerlerinin pH’sı 3.0, 5.0, 7.0 ve 9.0’a ayarlanmış ve enzim üretimi için en uygun ortam pH’sının belirlenmesine çalışılmıştır.

3.7.6. Pamuk sapı dışında farklı indüktörlerin enzim aktiviteleri üzerine etkisininin saptanması

Pamuk sapı dışında farklı indüktörlerin enzim aktivitesi üzerine etkisini test etmek amacıyla buğday samanı, mısır koçanı, çam kozalağı ve kavak talaşı kullanılmıştır. Bunlar kurutulup blendırdan geçirildikten sonra küçük parçacıklar şeklinde (0.1-0.2 cm) steril edildikten sonra %10, %20 ZYFA ve glukozsuz STO besiyerlerine 0.5 gr olacak şekilde eklenmiştir. Bölüm 3.3’de belirtildiği gibi hazırlanan *Pleurotus ostreatus* ve *Pleurotus ostreatus* (y.i) stok kültürleri 2’şer ml ekilerek 30 °C statik koşullarda inkübasyona bırakılmıştır.

3.8. Analizler

3.8.1. Kültür ortamındaki enzim aktivitelerinin saptanması

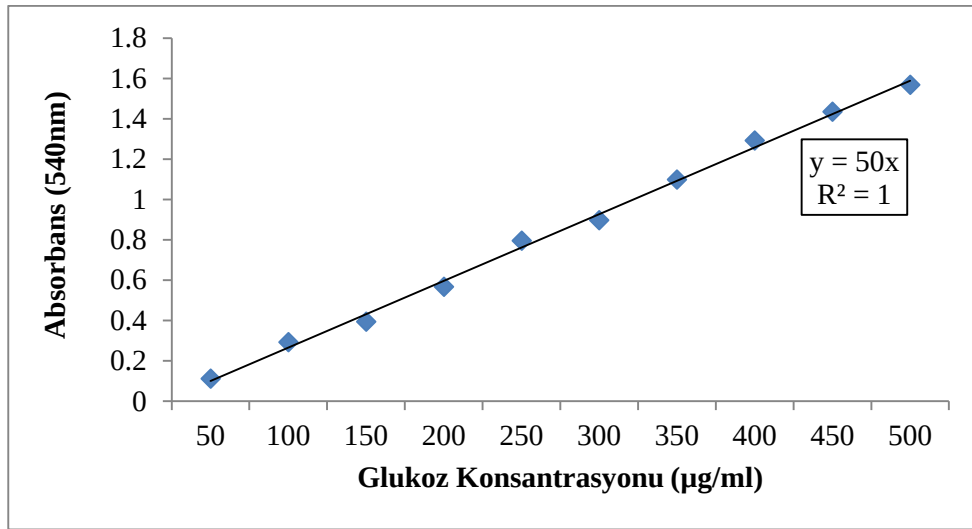
Kültür ortamlarındaki enzim aktiviteleri günlere bağlı olarak ölçülmüştür. Tüm enzim aktiviteleri, kültür ortamı filtre kağıdından (Whatman No:1, Toyo Advantec, 125 mm çap) süzöldükten sonra belirlenmiştir.

3.8.1.1. Kültür ortamındaki selülaz (FPA ve CMCaz) aktivitesinin tayini

FPA (Filter paper) aktivitesi:

Pleurotus ostreatus ve *Pleurotus ostreatus* (y.i) funguslarının yarı katı üretimleri sırasında selülaz (ekzo-1,4- β -D-glukanaz, FP aktivitesi EC 3.2.1.91) aktivitesi C_1 ve C_x (C_1 =Sellobiyohidrolaz, C_x =Endoglukanaz) aktivitelerini ortaklaşa göstermeleri nedeni ile Mandels vd. (1976) kullandığı yöntemle göre, substrat olarak filtre kağıdının kullanıldığı FPA aktivitesi olarak ölçülmüştür [193]. Bu yöntemde, 50 mg Whatman No:1 filtre kağıdı (1x6 cm) üzerine, 0.05 M pH 5.0, 1 ml asetat tamponu ve 1 ml ekstraselüler sıvı eklenerek reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Bu karışım 50 °C’de su banyosunda 1 saat inkübe edildikten sonra, karışımın 1 ml’sinde bir saatte oluşan indirgen şeker miktarı dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemi ile belirlenmiştir [194]. Birim FPA aktivitesi, indirgen şeker oluşturan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. DNS yönteminde 1 ml örnek üzerine 3 ml DNS reaktifi (g/100 ml olarak: 1 gr DNS, 0.2 gr fenol, 0.05 gr sodyum sülfid, 1 gr sodyum hidroksit, 2 gr

sodyum potasyum tartarat eklenmiş ve son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır) eklenerek 15 dakika kaynar su banyosunda bekletilmiş ve oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Enzimatik reaksiyon sonucu ortaya çıkan indirgen şeker miktarının belirlenmesi için spektrofotometrede (Shimadzu-UV-1601, UV/Visible) 540 nm'de absorbans ölçülmüştür. Enzim aktivitesinin hesaplanmasında glukoz standart çözeltisi ile hazırlanan glukoz standart eğrisi kullanılmıştır (Şekil 3.1). FPA enzim aktivitesi $\mu\text{mol/saat} \times 1000$ olarak ifade edilmiştir.



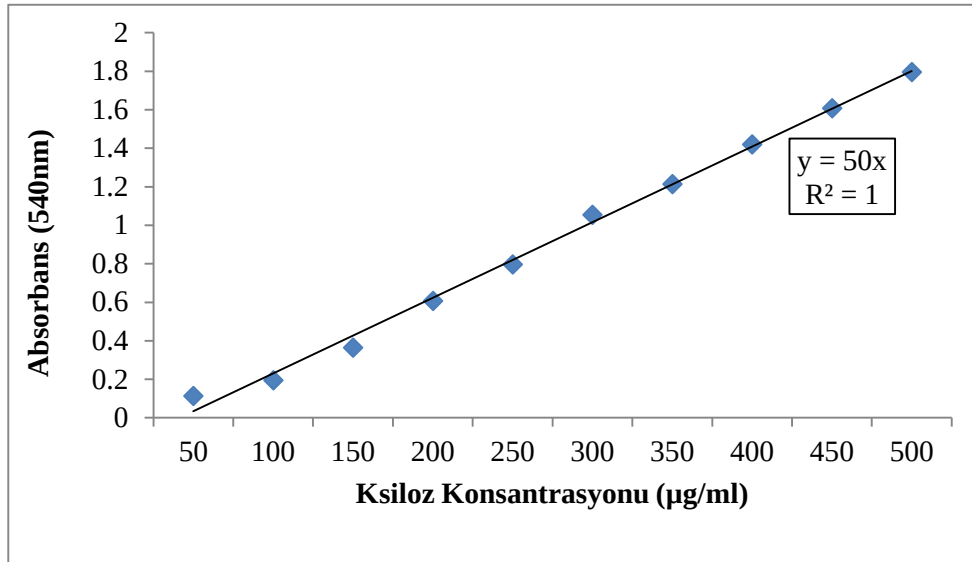
Şekil 3.1. DNS metodu için glukoz standart eğrisi

CMCaz (karboksimetil selülaz) aktivitesi:

Karboksimetil selülaz (EC 3.2.1.4) aktivitesinin tayini için, substrat olarak karboksimetil selüloz kullanılmıştır [195]. Reaksiyon karışımı; 0.5 ml karboksimetil selüloz (1 gr karboksimetil selüloz/100 ml, 0.05 M pH=5 sodyum asetat tamponu) ve 0.5 ml ekstraselüler sıvı içerecek şekilde hazırlandıktan sonra bu karışım 50 °C'de su banyosunda 30 dk bekletilmiş ve 1 ml'sinde oluşan indirgen şeker miktarı DNS yöntemi ile belirlenmiştir. Enzimatik reaksiyon sonucu ortaya çıkan indirgen şeker miktarının belirlenmesi için spektrofotometrede (Shimadzu-UV-1601, UV/Visible) 540 nm'de absorbans ölçülmüştür. Enzim aktivitesinin hesaplanmasında glukoz standart çözeltisi ile hazırlanan glukoz standart eğrisi kullanılmıştır (Şekil 3.1). CMCaz enzim aktivitesi $\mu\text{mol/30dakika} \times 1000$ olarak ifade edilmiştir.

3.8.1.2. Kültür ortamındaki ksilanaz aktivitesinin tayini

Ksilanaz (EC 3.2.1.8) aktivitesinin belirlenmesi için, substrat olarak ksilan kullanılmıştır [196]. Reaksiyon karışımı; 0.8 ml ksilan (0.5 gr ksilan/100 ml, 0.05 M pH 4.8 sodyum asetat tamponu) ve 0.2 ml ekstraselüler sıvı içerecek şekilde hazırlanmıştır. Bu karışım, 40  C’de su banyosunda 30 dakika inkübe edildikten sonra, 1 ml’sinde oluşan indirgen şeker miktarı DNS yöntemi ile belirlenmiştir. Enzimatik reaksiyon sonucu ortaya çıkan indirgen ksiloz miktarının belirlenmesi için spektrofotometrede (Shimadzu-UV-1601, UV/Visible) 540 nm’de absorbans ölçülmüştür. Enzim aktivitesinin hesaplanmasında ksiloz standart çözeltisi ile hazırlanan ksiloz standart eğrisi kullanılmıştır (şekil 3.2). Ksilanaz enzim aktivitesi $\mu\text{mol}/30\text{dakika} \times 1000$ olarak ifade edilmiştir.



şekil 3.2. DNS metodu için ksiloz standart eğrisi

3.8.2. Zeytin yağı fabrikası atık suyunun kirlilik parametreleri ile ilgili analizler

Funguslar için doğal besiyeri olarak kullanılan ZYFA’nın kirlilik yükünde meydana gelen değişimi belirlemek amacıyla renk değişimi değerleri ölçülmüştür.

3.8.2.1. ZYFA'nın renk değişiminin ölçümü

Atık suyun renk değişimi 395 nm dalga boyunda spektrofotometrik absorbans değerleri köre karşı okunarak belirlendi [192]. Renk değişimi kontrole karşı % renk değişimi olarak ifade edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Beyaz çürükçül fungusların selüloz ve ksilanaz enzimlerini ürettiği bilinmektedir. Fakat üretilen enzim miktarları endüstriyel uygulamalar için yeterli değildir. Bu nedenle en uygun üretim koşullarının ve en yüksek selüloz ve ksilanaz üreticisi organizmaların saptanması önemlidir.

Çalışmamızın önemli bir kısmını, pamuk sapı gibi ülkemizde yoğun miktarlarda üretilen bir tarımsal atığın indükleyici olarak kullanılması ile beyaz çürükçül funguslar tarafından sentezlenen hücre dışı lignoselülozik enzimlerin aktivitelerinin araştırılması ve maksimum üretimin gerçekleştiği koşulların tespiti ile en iyi üretici organizmaların belirlenmesi oluşturmaktadır.

Çalışmamızın diğer bir kısmını ise endüstriyel bir atık suyun (Zeytinyağı fabrikası atık suyu=ZYFA) besiyeri olarak kullanılması sürecinin enzim üretimi üzerine olan etkisini test etmek ve atığın kirlilik parametrelerinde meydana gelen iyileşmeyi belirlemek oluşturmaktadır. ZYFA, zeytinyağı üretimi sırasında büyük miktarlarda üretilen ve yüksek kirlilik kriterlerine sahip sıvı bir atıktır ve bu atığın çevreye arıtılmadan bırakılması sonucu toprak, bitki ve sucul yaşam üzerine pek çok olumsuz etkisinin olduğu bildirilmektedir [143]. Son yıllarda, zeytinyağı fabrikası atık suyunun arıtımı ve çevreye olan zararlı etkilerinin indirgenmesi üzerine yapılan çalışmalara baktığımız zaman, atıkların besiyeri olarak kullanılması sürecinde enzim üretimi çalışmaları çok dikkat çekmektedir [63, 64, 79, 152].

Pleurotus fungusunun lignini ve lignin parçalanma ürünlerini metabolize edebilme yeteneğine sahip olmasından dolayı, üzerinde çok sayıda biyoteknolojik çalışmalar yapılmaktadır [190].

Bu amaçla çalışmamızda *Pleurotus ostreatus* ve *Pleurotus ostreatus* (y.i) suşları kullanılarak selüloz (FPA ve CMCaz) ve ksilanaz üretimi için en uygun koşullar saptanmıştır. Bu enzimlerinin üretimini indüklemek için kültür ortamlarına indüktör olarak pamuk sapsarı eklenmiştir. Fungusları üretmek için kültür ortamı olarak, sentetik sıvı kültür ortamları (Stok temel ortam (STO), glukoz içermeyen STO ve Distile su) ve doğal kültür ortamları (%10 ZYFA, %20 ZYFA, %30 ZYFA) kullanılmıştır. Sentetik ve doğal kültür ortamlarındaki enzim aktiviteleri günlere

bağlı olarak, 15 gün süresince, statik koşullarda, 3 günlük zaman aralıklarında karşılaştırılarak belirlenmiştir.

4.1. *Pleurotus ostreatus*'un Selülaz ve Ksilanaz Enzim Üretimi Üzerine Etkili Faktörlerin İncelenmesi

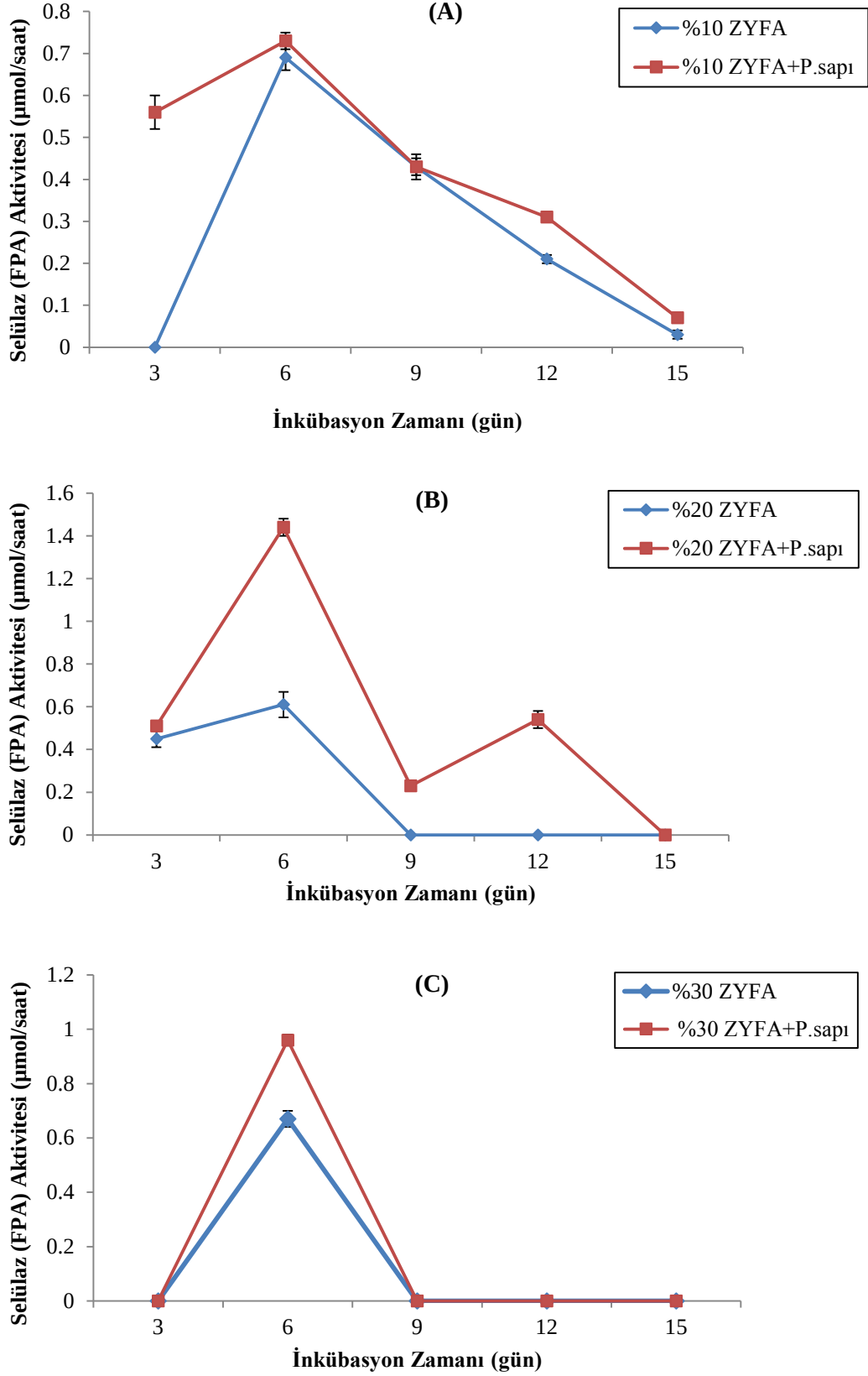
4.1.1. İnkübasyon sürelerinin selülaz (FPA ve CMCaz) ve ksilanaz enzim üretimi üzerine etkisi

Pleurotus ostreatus ile selülaz (FPA ve CMCaz) ve ksilanaz enzimlerinin üretimi 30 °C'de statik koşullarda, indüktör olarak 0.5 gr/30 ml pamuk sapı eklenmiş ve eklenmemiş doğal ve sentetik kültür ortamlarında, 15 gün süresince 3 günlük zaman aralıklarında belirlenmiştir.

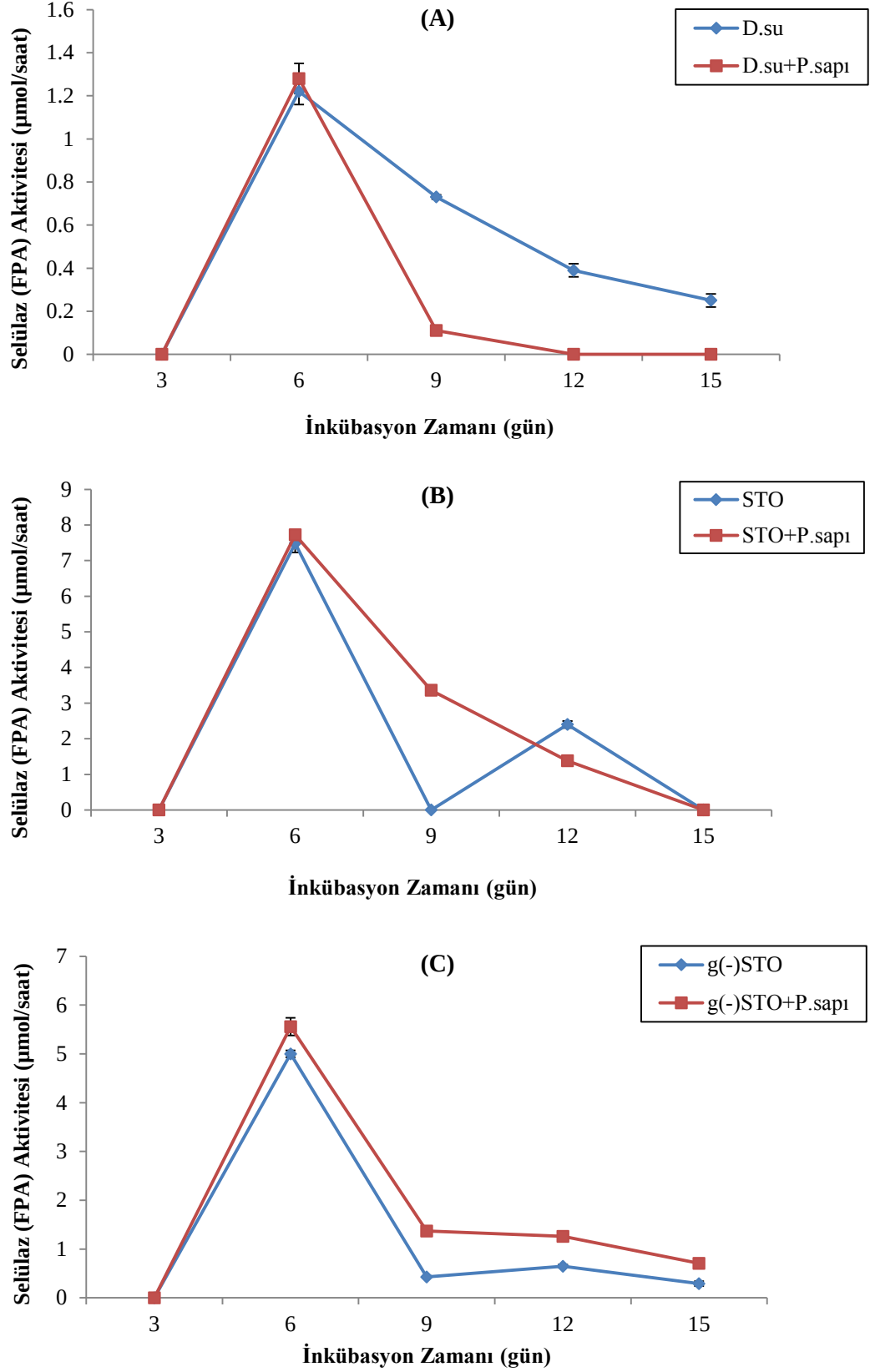
Şekil 4.1 (A, B, C)'de doğal kültür ortamlarında (%10-20-30 ZYFA) belirlenen selülaz (FPA) aktivite değişimleri günlere bağlı olarak verilmiştir. Yapılan ölçümler sonucunda en yüksek enzim aktivitesi inkübasyonun 6. gününde belirlenmiş olup periyodun sonraki günlerinde aktivite azalarak devam etmiştir. Buna göre pamuk sapı eklenmemiş %10, %20 ve %30 ZYFA ortamları pamuk sapı eklenmiş %10, %20 ve %30 ZYFA ortamları ile karşılaştırıldığında enzim aktivitelerinin pamuk sapı eklenen ortamlarda daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla doğal kültür ortamlarında pamuk sapı eklenmesinin FPA enzim aktivitesini indüklediği açıkça görülmektedir. En yüksek enzim aktivitelerinin elde edildiği 6. günde doğal kültür ortamlarında FPA aktivitesi, %20 ZYFA+P.sapı ortamında 1.44 µmol/saat, %30 ZYFA+P.sapı ortamında 0.96 µmol/saat, %10 ZYFA+P.sapı ortamında ise 0.73 µmol/saat olarak ölçülmüştür.

Şekil 4.2 (A, B, C)'de ise sentetik kültür ortamlarının selülaz (FPA) aktivite değişimleri günlere bağlı olarak verilmiştir. Sentetik ortamların hepsinde 3. günde herhangi bir enzim aktivitesi gözlenmezken, 6. günde en yüksek değerlere ulaşmış ve devamındaki diğer günlerde ise kademeli bir azalma gözlenmiştir. Pamuk sapı eklenmesi ile selülaz (FPA) aktivitesinin çok hafif indüklendiği görülmektedir. 6. günde en yüksek selülaz (FPA) aktivitesinin STO+P.sapı ve STO ortamında sırasıyla

7.72 $\mu\text{mol/saat}$, 7.48 $\mu\text{mol/saat}$ olarak tespit edilmiştir. g(-)STO ve g(-)STO+P.sapı ortamlarında ise selüloz (FPA) aktiviteleri sırasıyla 5 $\mu\text{mol/saat}$ ve 5.56 $\mu\text{mol/saat}$ olarak belirlenmiştir. En düşük enzim aktivitesi ise D.su+P.sapı ortamında gözlenirken bu ortamda 6. ve 9. günlerde enzim aktivitesi belirlenmiş olup diğer günlerde enzim aktivitesi gözlenmemiştir. Dolayısıyla pamuk sapı eklenmesinin distile su ortamında FPA aktivitesini yeterince indüklediği aksine baskıladığı söylenebilir.



Şekil 4.1. *P. ostreatus* ile pamuk sapı eklenmiş ve eklenmemiş doğal kültür ortamlarında (A, B, C) günlere bağlı olarak elde edilen selüloz (FPA) aktivitesi (Sıcaklık: 30 °C, çalkalama hızı: statik, p.sapı miktarı: 0.5 gr/30 ml)



Şekil 4.2. *P. ostreatus* ile pamuk sapı eklenmiş ve eklenmemiş sentetik kültür ortamlarında (A, B, C) günlere bağlı olarak elde edilen selüloz (FPA) aktivitesi (Sıcaklık: 30 °C, çalkalama hızı: statik, p.sapı miktarı: 0.5 gr/30 ml)

Şekil 4.3 (A, B, C)'de *P. ostreatus* ile doğal kültür ortamlarında elde edilen selüloz (CMCaz) aktivite değişimleri günlere bağlı olarak verilmiştir. En yüksek selüloz (CMCaz) aktivitesi 6. günde pamuk sapı içeren ortamlarda sırasıyla %30 ZYFA+P.sapı, %20 ZYFA+P.sapı ve %10 ZYFA+P.sapı ortamlarında 3.03 $\mu\text{mol}/30$ dk, 1.65 $\mu\text{mol}/30$ dk, 0.77 $\mu\text{mol}/30$ dk olarak elde edilmiştir. %30 ZYFA ve %30 ZYFA+P.sapı ortamlarında 6. gün dışındaki günlerde enzim aktivitesi belirlenmemiştir. Şekil incelendiği zaman her üç kültür ortamında pamuk sapı eklenmesinin selüloz (CMCaz) aktivitesini indüklediği görülmektedir.

Şekil 4.4 (A, B, C)'de ise sentetik kültür ortamlarında elde edilen selüloz (CMCaz) aktivite değişimleri günlere bağlı olarak verilmiştir. Şekil incelendiğinde en yüksek CMCaz aktivitelerinin 6. ve 9. günlerde olduğu ve diğer günlerde azalarak aktivitenin düşük düzeyde korunduğu gözlenmektedir. En yüksek enzim aktivitesi pamuk sapı içeren ortamlarda elde edilmiş olup pamuk saplarının CMCaz aktivitesini indüklediği açıktır. STO+P.sapı ve g(-)STO+P.sapı ortamında 9. günde en yüksek CMCaz aktiviteleri gözlenmiş olup bu değerler sırasıyla 9.41 $\mu\text{mol}/30$ dk ve 8.53 $\mu\text{mol}/30$ dk olarak ölçülmüştür. D.su+P.sapı ortamında ise diğer ortamlardan daha düşük enzim aktivitesi gözlenmiş olup en yüksek aktivite değeri 6. günde 1.87 $\mu\text{mol}/30$ dk olarak belirlenmiştir. FPA aktivitesinde olduğu gibi en düşük enzim aktivite değeri distile su ortamında saptanmıştır.

Doğal ve sentetik kültür ortamlarının selüloz (FPA) ve selüloz (CMCaz) enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında CMCaz aktivitelerinin daha yüksek ve kararlı olduğu açıkça görülmektedir. Doğal kültür ortamlarında en yüksek FPA aktivitesi %20 ZYFA+P.sapı içeren ortamda belirlenirken, en yüksek CMCaz aktivitesi ise %30 ZYFA+P.sapı içeren ortamda gözlenmiştir. Sentetik kültür ortamlarında ise en yüksek FPA aktivitesi STO+P.sapı ortamında, en yüksek CMCaz ise STO+P.sapı ve g(-)STO+P.sapı ortamlarında tespit edilmiştir.

Çeşitli çalışmalarda fermentasyon sürecinde CMCaz aktivite değerlerinin FPA aktivite değerlerinden daha yüksek olduğu rapor edilmiştir. Aynı şekilde enzim aktivitelerinin kullanılan fungusa ve substrata bağlı olarak oldukça değişkenlik gösterdiği belirtilmiştir [164, 185]. Selülozun kristal yapısının yıkımında FPA ve CMCaz'ın sinerjik etkisinin gerekli olduğu bildirilmiştir [164, 197].

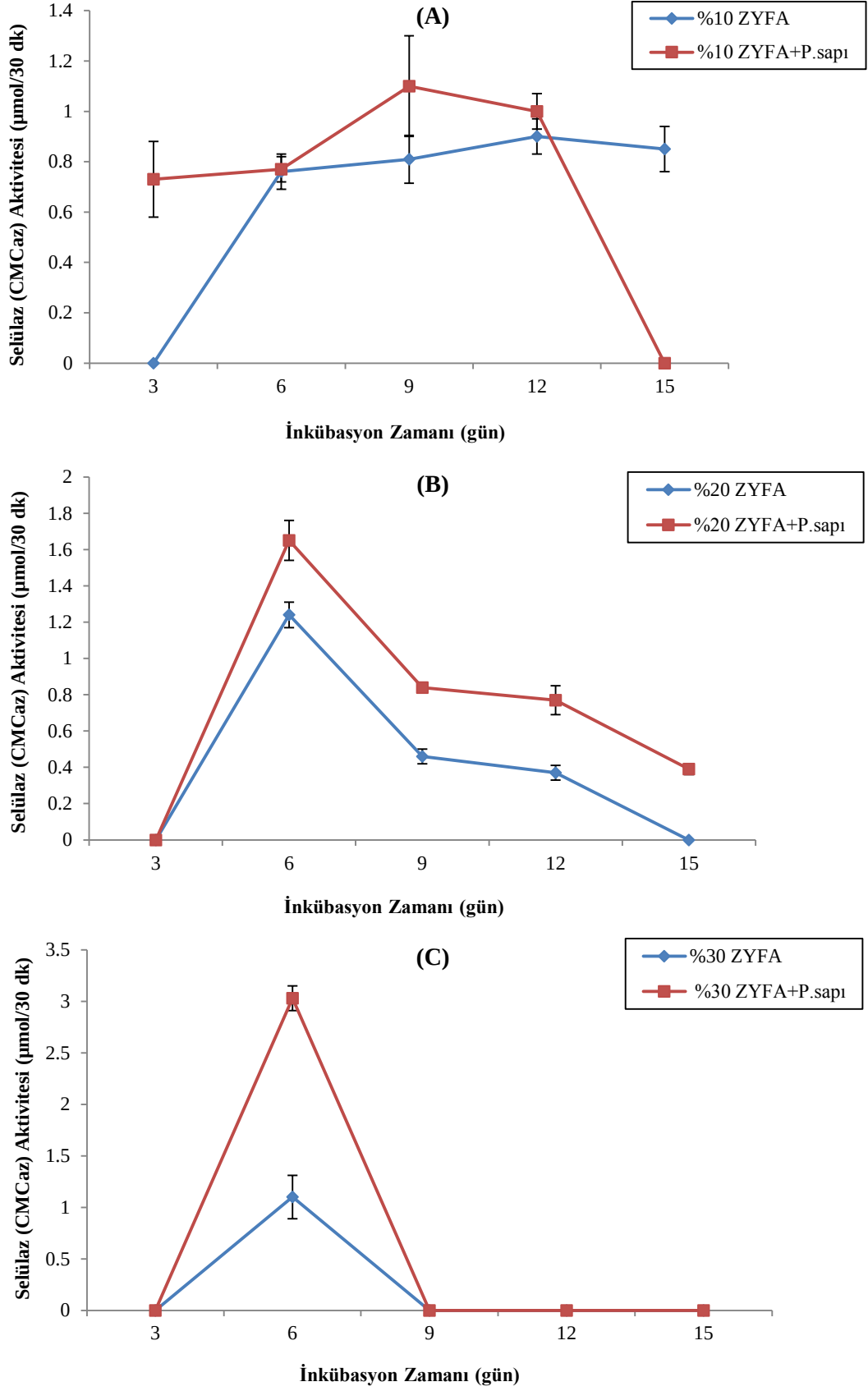
Reddy vd. (2003) tarafından *P. ostreatus* ve *P. sajor-caju*'nın katı substrat fermentasyonunda, CMCaz ve FPA aktiviteleri 40 günlük inkübasyon süresinde 5 günlük zaman aralıklarında incelenmiş olup en yüksek enzim aktiviteleri 10. ve 20. günler arasında elde edilmiştir. FPA aktivitelerinin inkübasyon periyodu boyunca CMCaz aktivitelerinden çok düşük değerlerde gözlemlendiği rapor edilmiştir [164].

Yapılan diğer bir çalışmada ise maksimum selüloz üretimi inkübasyonun 72. saatinde CMCaz 1.57 U/ml ve FPA 0.921 U/ml olarak belirlenmiştir [185].

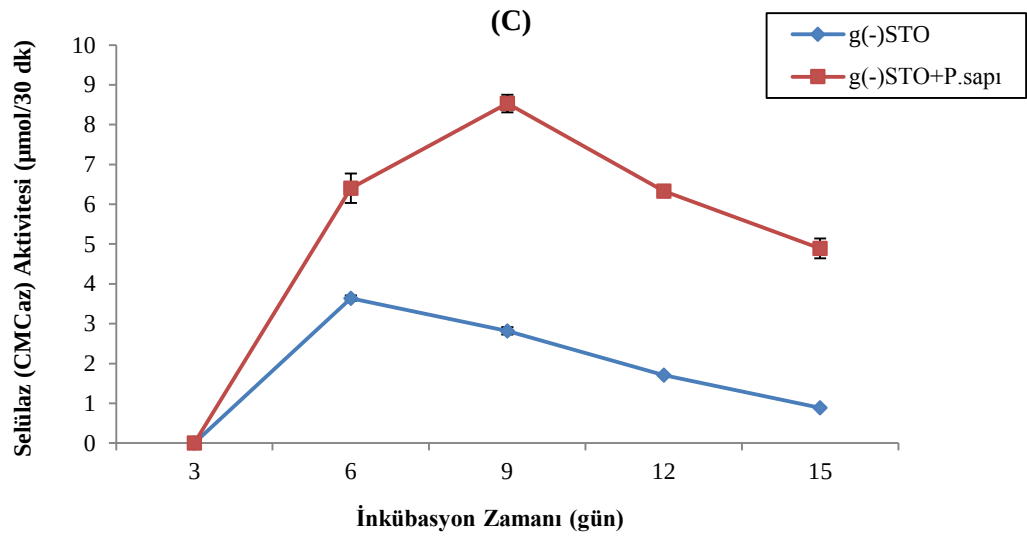
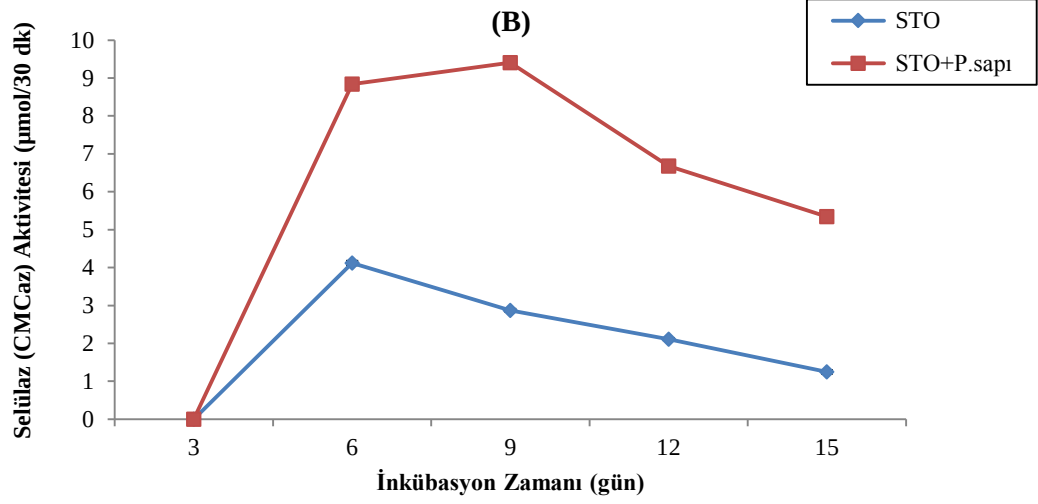
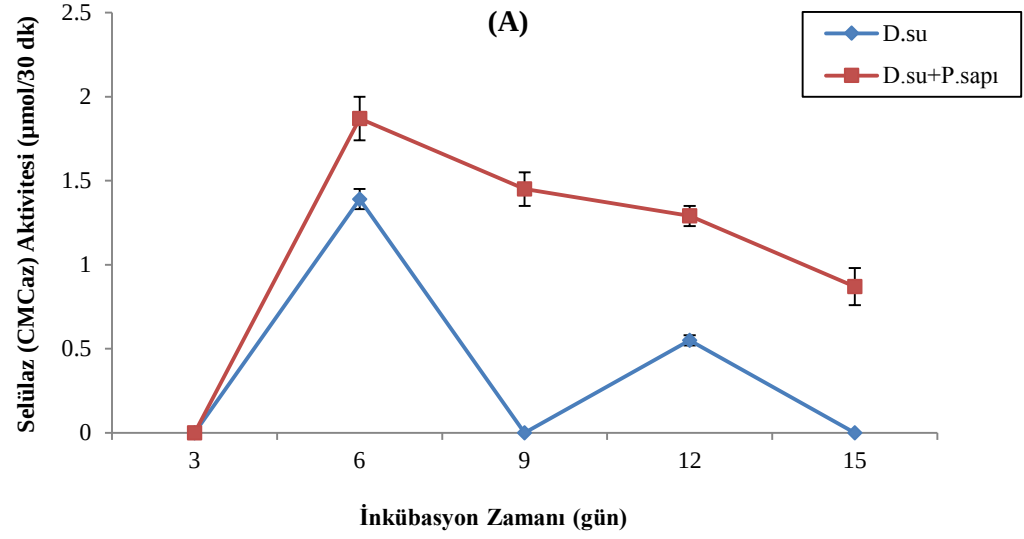
Kang vd. (2004) yaptıkları çalışmada *Aspergillus niger* KK2'nin substrat olarak yalnızca pirinç samanı eklenen fermentasyonda maksimum FPA aktivitesi inkübasyonun 4. günde 19.5 IU/g, maksimum CMCaz aktivitesi ise inkübasyonun 5. günde 129 IU/g olarak belirlenmiştir [167].

Yang vd. (2011) transgenik *Coprinopsis cinerea* suşları ve *Agaricus bisporus*, *Flammulina velutipes* ve *Lentinula edodes* fungusları kullanılarak 15 günlük inkübasyon periyodun da en fazla enzimatik aktivite *Coprinopsis cinerea* Cabm44 suşunda 7. günde belirlenmiştir. Bu değerler endo- β -1,4-glukanaz için 0.48 U/ml, total selüloz için 0.26 U/ml olarak ifade edilmiştir [187].

Yapmış olduğumuz çalışmada hem doğal hemde sentetik kültür ortamlarında FPA enzim aktivitelerinin CMCaz enzim aktivitelerinden daha düşük olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla yapılan önceki çalışmalar yapmış olduğumuz çalışmayı destekler niteliktedir. Ayrıca en yüksek enzim aktiviteleri, yapılan çalışmalarda da gözlemlendiği gibi 4 ile 12. günler arasında belirlenmiş olup, çalışmamızda da 6. günde bulunmuştur. Bu sonuçlarımız literatür verileriyle uygunluk göstermektedir.



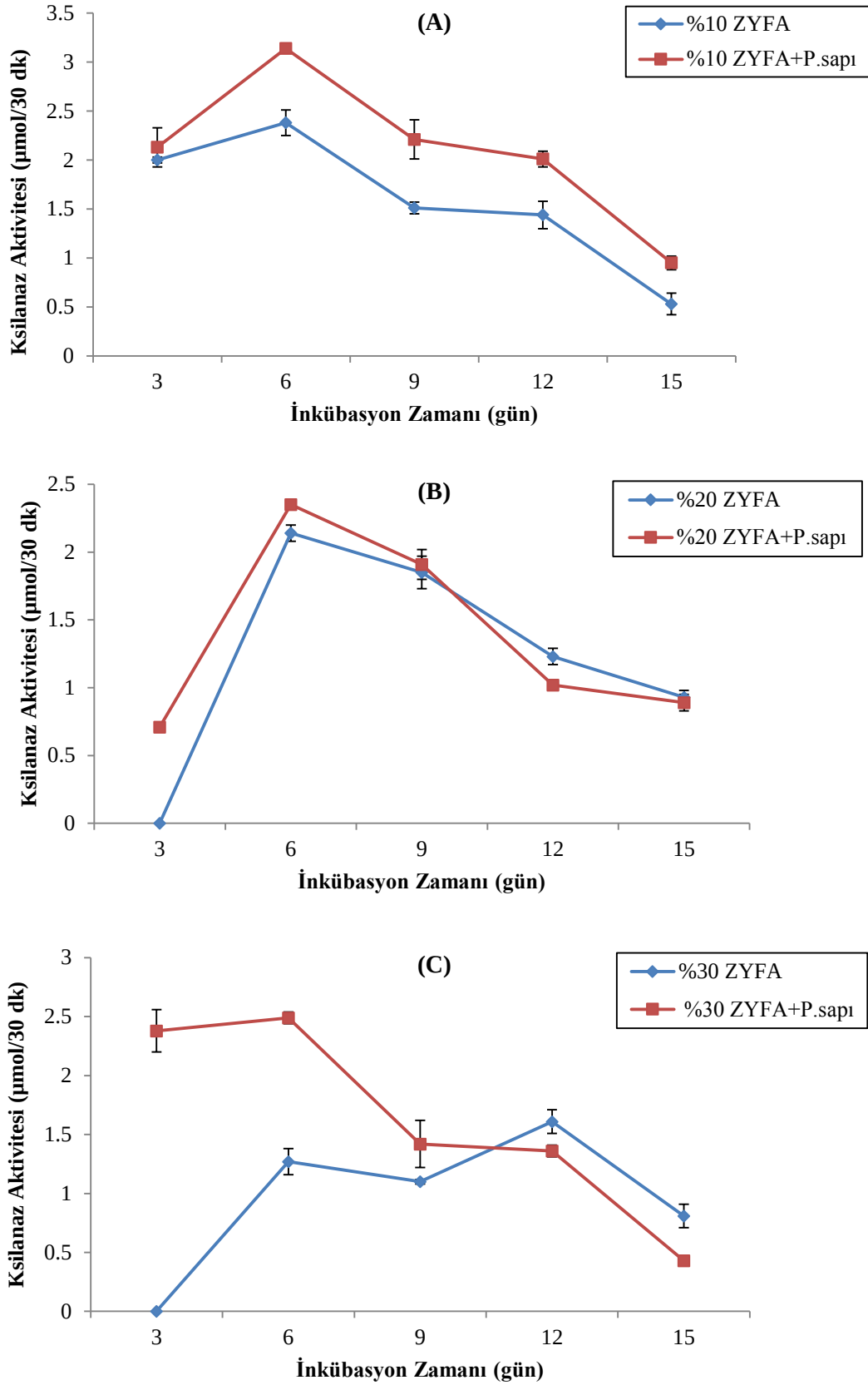
Şekil 4.3. *P. ostreatus* ile pamuk sapı eklenmiş ve eklenmemiş doğal kültür ortamlarında (A, B, C) günlere bağlı olarak elde edilen selülag (CMCaz) aktivitesi (Sıcaklık: 30 °C, çalkalama hızı: statik, p.sapı miktarı: 0.5 gr/30 ml)



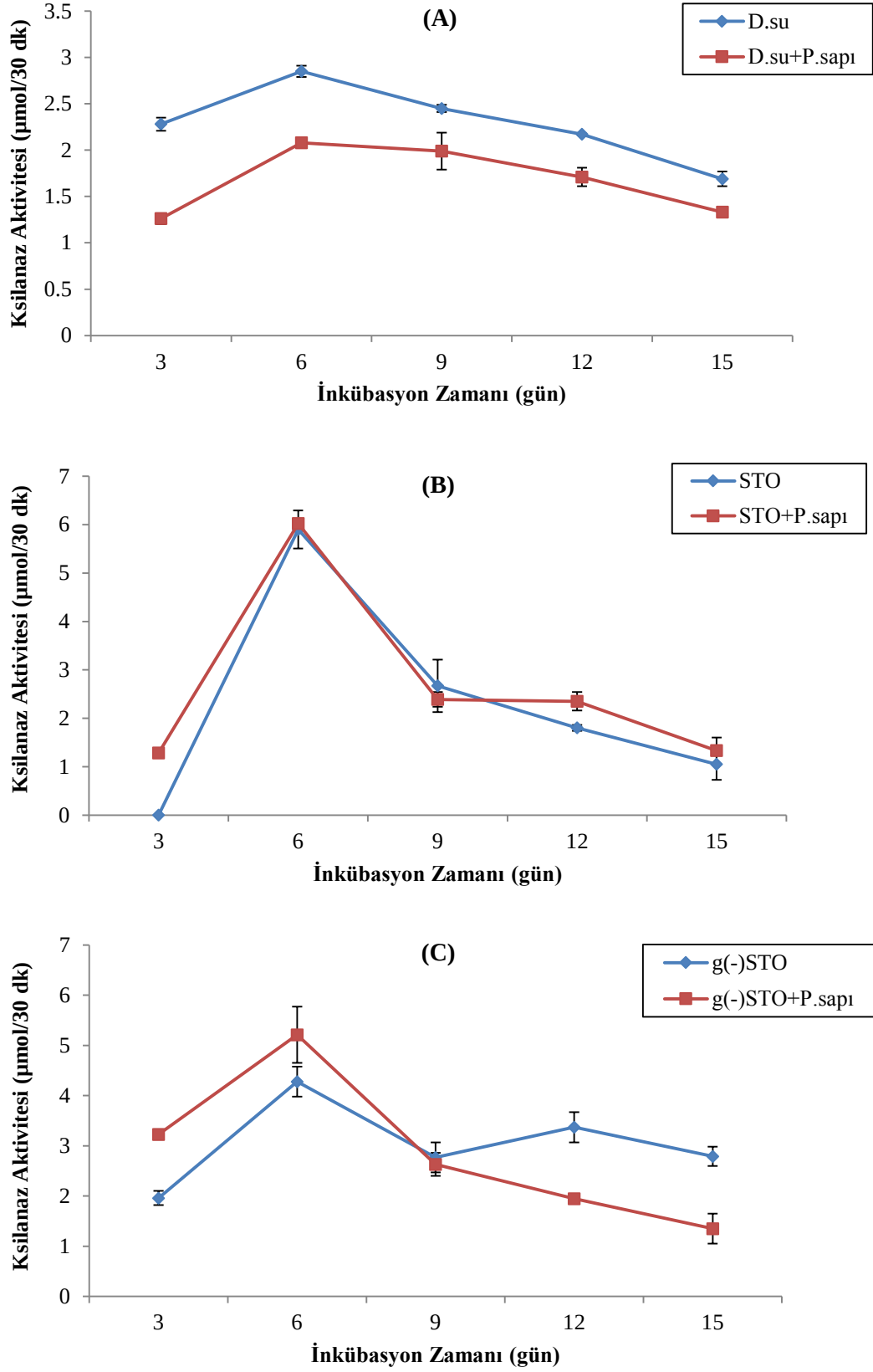
Şekil 4.4. *P. ostreatus* ile pamuk sapı eklenmiş ve eklenmemiş sentetik kültür ortamlarında (A, B, C) günlere bağlı olarak elde edilen selülaz (CMCaz) aktivitesi (Sıcaklık: 30 °C, çalkalama hızı: statik, p.sapı miktarı: 0.5 gr/30 ml)

Şekil 4.5 (A, B, C)'de doğal kültür ortamlarında *P. ostreatus* ile elde edilen ksilanaz aktivite değişimleri günlere bağlı olarak verilmiştir. En yüksek ksilanaz enzim aktivitesi genel olarak 6. günde belirlenmiş ve devamındaki günlerde azalarak aktiviteler korunmuştur. %10 ZYFA+P.sapı, %30 ZYFA+P.sapı, %20 ZYFA+P.sapı en yüksek ksilanaz aktivitesi 6. günde gözlenmiş olup sırasıyla 3.14 $\mu\text{mol}/30\text{ dk}$, 2.49 $\mu\text{mol}/30\text{ dk}$, 2.35 $\mu\text{mol}/30\text{ dk}$ olarak elde edilmiştir. Her üç ortamda da kültürlerle pamuk saplarının eklenmesi ksilanaz aktivitesi belirgin biçimde indüklenmiştir.

Şekil 4.6 (A, B, C)'da ise sentetik kültür ortamlarında elde edilen ksilanaz aktivite değişimleri günlere bağlı olarak verilmiştir. En yüksek ksilanaz enzim aktivitesi STO+P.sapı ve g(-)STO+P.sapı ortamında gözlenmiştir. STO+P.sapı kültüründe en yüksek ksilanaz aktivitesi 6. günde 6.02 $\mu\text{mol}/30\text{ dk}$ olarak elde edilirken, g(-)STO+P.sapı kültüründe yine 6. günde 5.21 $\mu\text{mol}/30\text{ dk}$ olarak ölçülmüştür. D.su+P.sapı ortamında ise en yüksek ksilanaz aktivitesi 6. günde 2.08 $\mu\text{mol}/30\text{ dk}$ olarak belirlenmiştir. Distile su kültürüne pamuk sapı eklenmesi ksilanaz aktivitesini indüklememiştir.



Şekil 4.5. *P. ostreatus* ile pamuk sapı eklenmiş ve eklenmemiş doğal kültür ortamlarında (A, B, C) günlere bağlı olarak elde edilen ksilanaz aktivitesi (Sıcaklık: 30 °C, çalkalama hızı: statik, p.sapı miktarı: 0.5 gr/30 ml)



Şekil 4.6. *P. ostreatus* ile pamuk sapı eklenmiş ve eklenmemiş sentetik kültür ortamlarında (A, B, C) günlere bağlı olarak elde edilen ksilanaz aktivitesi (Sıcaklık: 30 °C, çalkalama hızı: statik, p.sapı miktarı: 0.5 gr/30 ml)

Kang vd. (2004) yapılan benzer bir çalışmada *Aspergillus niger* KK2, pirinç samanı ve buğday kepeğinin substrat olarak kullanıldığı fermentasyonda, 8 gün boyunca inkübe edilerek ve 2 günde bir ksilanaz aktivite değerleri ölçülmüştür. Maksimum ksilanaz aktivitesi fermentasyonun 6. gününde 5070 IU/g olarak elde edilmiştir [167].

P. ostreatus fungusu ile yapılan bir çalışmada, en yüksek ksilanaz aktivitesi fermentasyonun 20. günde 0.0408 U/mg olarak gözlenmiş olup daha sonraki günlerde kademeli olarak azalmıştır [164].

Singh vd. (2011) *Aspergillus heteromorphus* ile selüloz, ksilanaz enzimleri çalışılmış ve kültür ortamına tarımsal atık olarak pirinç kabuğu ve samanının 2 gr eklenmesiyle bu enzimlerin indüklenerek daha hızlı üretimi sağlanmıştır. 30 °C’de statik koşullarda 18 günlük inkübasyon periyodunda 3 günlük zaman aralıklarında enzim aktiviteleri ölçülmüş olup, selüloz ve ksilanaz aktivitesi fermentasyonun 6. gününde maksimum değerlere ulaşmıştır. Maksimum FPA aktivitesi pirinç samanında ve pirinç kabuğunda sırasıyla 14.1, 8.2 U/g, ksilanaz aktivitesi ise 160.8, 134.2 U/g olarak belirlenmiştir [186].

En yüksek ksilanaz enzim aktiviteleri, yapılan çalışmalarda da gözlemlendiği gibi 4 ile 6. günler arasında belirlenmiş olup, çalışmamızda da 6. günde bulunmuştur. Bu sonuçlarımız literatür verileriyle uygunluk göstermektedir.

Yapılan çeşitli çalışmalarda fungal üremeyi arttırmak ve enzim aktivitesini indüklemek için kültür ortamlarına glukoz ilave edilmesinin, kullanılan funguslara bağlı olarak delignifikasyonu arttırabileceği gibi bazende azaltabileceği bildirilmiştir [79, 183]. Yapılan başka bir çalışmada ise glukoz ve ksiloz gibi basit şekerlerin selüloz üretimini fazla indüklemediği bildirilmiştir [183].

Çalışmamızın bundan sonraki kısımlarında, şimdiye kadar elde ettiğimiz sonuçlara bakarak, doğal kültür ortamlarından %10-20-30 ZYFA ile sentetik kültür ortamlarından ise distile su ve daha ekonomik olması sebebiyle glukozsuz STO ortamlarıyla enzim üretim çalışmalarına devam etmeye karar verilmiştir.

4.1.2. Pamuk sapı miktarının selüloz (FPA ve CMCaz) ve ksilanaz enzim üretimi üzerine etkisi

Pleurotus ostreatus tarafından üretilen selüloz (FPA ve CMCaz) ve ksilanaz enzim aktivitesi üzerine pamuk sapı miktarının etkisini incelemek için doğal ve sentetik kültür ortamlarına 0.1, 0.5 ve 1 gr pamuk sapı eklenerek 30 °C’de statik koşullarda inkübe edilmiştir. *Pleurotus ostreatus* ile en iyi enzim aktivitesinin gözlemlendiği 6. ve 12. günlerde selüloz (FPA ve CMCaz) ve ksilanaz enzim aktiviteleri ölçülmüştür.

Çizelge 4.1’de doğal kültür ortamlarına farklı miktarlarda pamuk sapı eklenmesi sonucu 6. ve 12. günlerde elde edilen selüloz (FPA) aktivitesi verilmiştir. Eklenen pamuk sapı miktarının değişmesi *P. ostreatus* tarafından üretilen enzim aktivitelerini değiştirmiştir. Tüm doğal kültür ortamlarında 6. günlerde 12. günlere göre daha yüksek FPA elde edilirken, en yüksek FPA değeri %30 ZYFA+0.1 gr pamuk sapı içeren ortamda (2.91 $\mu\text{mol/saat}$) 6. günde belirlenmiştir. %20 ZYFA içeren ortamında da 0.1 gr pamuk sapı miktarı enzim aktivitesini (1.95 $\mu\text{mol/saat}$) daha fazla indüklerken, %10 ZYFA ortamında 1 gr pamuk sapı eklenmesi (1.26 $\mu\text{mol/saat}$) daha etkili olmuştur. Çizelge 4.1 incelendiğinde tüm doğal kültür ortamlarında 12. günde enzim aktiviteleri düşmüştür.

Çizelge 4.2’de ise sentetik kültür ortamlarına farklı miktarlarda pamuk sapı eklenmesi sonucu 6. ve 12. günlerde elde edilen selüloz (FPA) aktivitesi verilmiştir. Sentetik kültür ortamlarına eklenen pamuk sapı miktarının değişmesi FPA enzim aktivitelerini değiştirmiştir. Tüm sentetik kültür ortamlarında 6. günlerde 12. günlere göre daha yüksek FPA elde edilirken, en yüksek FPA değeri glukoz içermeyen STO+0.5 gr pamuk sapı içeren ortamda (5.56 $\mu\text{mol/saat}$) 6. günde belirlenmiştir. Distile su ortamında ise aynı şekilde 0.5 gr pamuk sapı eklenmesi (1.28 $\mu\text{mol/saat}$) enzim aktivitesini daha fazla indüklemiştir.

Çizelge 4.1. *P. ostreatus* ile farklı miktarlarda pamuk sapı içeren doğal kültür ortamlarında, 6. ve 12. günlerde elde edilen selülaz (FPA) aktivitesi (μmol/saat)

P.sapı (gr) miktarı	%10 ZYFA		%20 ZYFA		%30 ZYFA	
	6.gün	12. gün	6. gün	12.gün	6. gün	12. gün
0.1	0.06±0.02	0.57±0.21	1.95±0.16	0.11±0.03	2.91±0.08	0.54±0.04
0.5	0.73±0.02	0.31±0.01	1.44±0.04	0.54±0.04	1.01±0.13	0.65±0.03
1.0	1.26±0.12	1.25±0.12	1.17±0.13	0.55±0.15	2.7±0.09	0±0

Çizelge 4.2. *P. ostreatus* ile farklı miktarlarda pamuk sapı içeren sentetik kültür ortamlarında, 6. ve 12. günlerde elde edilen selülaz (FPA) aktivitesi (μmol/saat)

P.sapı (gr) miktarı	D.su		g(-)STO	
	6. gün	12. gün	6. gün	12. gün
0.1	1.09±0.09	0.13±0.02	1.21±0.19	0±0
0.5	1.28±0.07	0±0	5.56±0.18	1.26±0.02
1.0	0.39±0.17	0.23±0.08	4.56±0.21	0.43±0.32

Çizelge 4.3’de doğal kültür ortamlarına farklı miktarda (0.1, 0.5, 1 gr) pamuk sapı eklenmesi sonucu 6. ve 12. günlerde elde edilen selülaz (CMCaz) aktivitesi verilmiştir. Her üç doğal kültür ortamında da 6. günlerde daha yüksek CMCaz değerleri elde edilirken, en yüksek CMCaz değeri %30 ZYFA+0.5 gr pamuk sapı içeren ortamda (3.03 μmol/30 dk) belirlenmiştir. %10 ZYFA içeren ortamda da 1 gr pamuk sapı miktarı enzim aktivitesi daha fazla indüklerken (2.69 μmol/30 dk), %20 ZYFA ortamında ise 0.5 gr pamuk sapı eklenmesi enzim aktivitesinde (1.65 μmol/30 dk) daha etkili olmuştur.

Çizelge 4.4’de ise sentetik kültür ortamlarına farklı miktarlarda pamuk sapı eklenmesi sonucu 6. ve 12. günlerde elde edilen selülaz (CMCaz) aktivitesi verilmiştir. Sentetik kültür ortamlarına eklenen pamuk sapı miktarının değişmesi CMCaz enzim aktivitelerini değiştirmiştir. En yüksek CMCaz değeri glukoz

içermeyen STO+0.5 gr pamuk sapı içeren ortamda (6.40 $\mu\text{mol}/30\text{ dk}$) 6. günde belirlenmiştir. Distile su ortamında ise 1 gr pamuk sapı eklenmesi (2.66 $\mu\text{mol}/30\text{ dk}$) enzim aktivitesini daha fazla indüklemiştir.

Çizelge 4.3. *P. ostreatus* ile farklı miktarlarda pamuk sapı içeren doğal kültür ortamlarında, 6. ve 12. günlerde elde edilen selülaz (CMCaz) aktivitesi ($\mu\text{mol}/30\text{ dk}$)

P.sapı (gr) miktarı	%10 ZYFA		%20 ZYFA		%30 ZYFA	
	6. gün	12. gün	6. gün	12. gün	6. gün	12. gün
0.1	0.47 $\pm$ 0.08	1.11 $\pm$ 0.15	0.19 $\pm$ 0.13	0.94 $\pm$ 0.11	1.26 $\pm$ 0.28	0.38 $\pm$ 0.28
0.5	0.77 $\pm$ 0.05	1.0 $\pm$ 0.07	1.65 $\pm$ 0.11	0.77 $\pm$ 0.08	3.03 $\pm$ 0.12	0 $\pm$ 0
1.0	2.69 $\pm$ 0.07	2.53 $\pm$ 0.11	0.63 $\pm$ 0.01	0.75 $\pm$ 0.05	1.01 $\pm$ 0.07	2.11 $\pm$ 0.06

Çizelge 4.4. *P. ostreatus* ile farklı miktarlarda pamuk sapı içeren sentetik kültür ortamlarında, 6. ve 12. günlerde elde edilen selülaz (CMCaz) aktivitesi ($\mu\text{mol}/30\text{ dk}$)

P.sapı (gr) miktarı	D.su		g(-) STO	
	6. gün	12. gün	6. gün	12. gün
0.1	0.73 $\pm$ 0.15	0.11 $\pm$ 0.05	4.77 $\pm$ 0.30	1.5 $\pm$ 0.34
0.5	1.87 $\pm$ 0.13	1.29 $\pm$ 0.06	6.40 $\pm$ 0.37	6.33 $\pm$ 0.15
1.0	1.1 $\pm$ 0.16	2.66 $\pm$ 0.20	3.48 $\pm$ 0.32	5.59 $\pm$ 0.11

Çizelge 4.5’de doğal kültür ortamlarına farklı miktarlarda pamuk sapı eklenmesi sonucu 6. ve 12. günlerde elde edilen ksilanaz aktivitesi verilmiştir. Tüm doğal kültür ortamlarında 12. günlerde 6. günlere göre daha yüksek ksilanaz aktivitesi elde edilirken, en yüksek aktivite %20 ZYFA+1 gr pamuk sapı içeren ortamda (6.10 $\mu\text{mol}/30\text{ dk}$) belirlenmiştir. %30 ZYFA ve %10 ZYFA ortamlarında da 1 gr pamuk sapı eklenmesi enzim aktivitelerini daha fazla indüklemiş olup sırasıyla 5.13 $\mu\text{mol}/30\text{ dk}$ ve 4.91 $\mu\text{mol}/30\text{ dk}$ değerleri belirlenmiştir.

Çizelge 4.6’da ise sentetik kültür ortamlarına farklı miktarlarda pamuk sapı eklenmesi sonucu 6. ve 12. günlerde elde edilen ksilanaz aktivitesi verilmiştir. Sentetik kültür ortamlarında en yüksek ksilanaz aktivitesi glukoz içermeyen STO ortamında 1 gr pamuk sapı eklenmesiyle (5.67 $\mu\text{mol}/30\text{ dk}$) 12. günde elde edilmiştir. Distile su ortamında ise 0.5 gr pamuk sapı eklenmesi ksilanaz aktivitesini (4.79 $\mu\text{mol}/30\text{ dk}$) daha fazla indüklemiştir.

Çizelge 4.5. *P. ostreatus* ile farklı miktarlarda pamuk sapı içeren doğal kültür ortamlarında, 6. ve 12. günlerde elde edilen ksilanaz aktivitesi ($\mu\text{mol}/30\text{ dk}$)

P.sapı (gr) miktarı	%10 ZYFA		%20 ZYFA		%30 ZYFA	
	6. gün	12. gün	6. gün	12. gün	6. gün	12. gün
0.1	1.25 $\pm$ 0.19	4.54 $\pm$ 0.61	2.89 $\pm$ 0.81	2.81 $\pm$ 0.67	0.70 $\pm$ 0.04	1.72 $\pm$ 0.42
0.5	3.14 $\pm$ 0.04	2.01 $\pm$ 0.08	1.01 $\pm$ 0.11	3.107 $\pm$ 0.32	2.86 $\pm$ 0.56	2.24 $\pm$ 0.28
1.0	4.82 $\pm$ 0.35	4.91 $\pm$ 0.30	2.58 $\pm$ 0.30	6.10 $\pm$ 0.66	2.57 $\pm$ 0.04	5.13 $\pm$ 0.08

Çizelge 4.6. *P. ostreatus* ile farklı miktarlarda pamuk sapı içeren sentetik kültür ortamlarında, 6. ve 12. günlerde elde edilen ksilanaz aktivitesi ($\mu\text{mol}/30\text{ dk}$)

P.sapı (gr) miktarı	D.su		g(-) STO	
	6.gün	12. gün	6. gün	12. gün
0.1	2.36 $\pm$ 0.06	2.79 $\pm$ 0.13	2.44 $\pm$ 0.25	2.59 $\pm$ 0.15
0.5	1.41 $\pm$ 0.40	4.79 $\pm$ 0.42	5.21 $\pm$ 0.56	1.95 $\pm$ 0.06
1.0	1.81 $\pm$ 0.15	2.79 $\pm$ 0.13	3.92 $\pm$ 0.18	5.67 $\pm$ 0.30

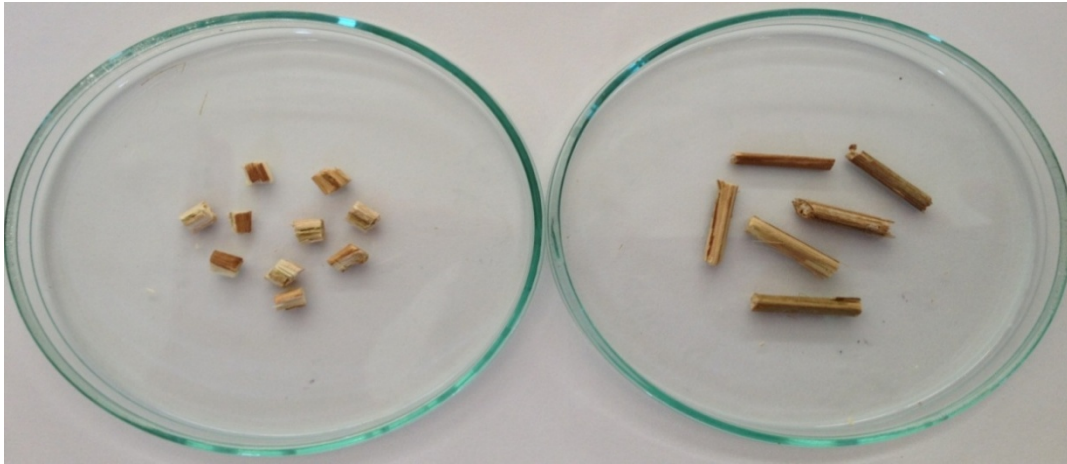
Sonuç olarak, yapmış olduğumuz çalışmada pamuk sapı miktarının artması ile enzim aktivitelerinin arttığı gözlenmektedir. Hem doğal hemde sentetik kültür ortamlarında genellikle 0.5 ve 1 gr pamuk saplarının selüloz (FPA ve CMCaz) ve ksilanaz enzim aktivitelerini daha fazla indüklediği gözlenmiştir. Ancak yapılan sonraki çalışmalara daha ekonomik olması sebebiyle 0.5 gr pamuk sapı ile devam etmeye karar verilmiştir.

Papinutti ve Forchiassin (2007) tarafından yapılan çalışmada beyaz çürükçül fungus *Fomes sclerodermeus*'un katı substrat fermentasyonu ile soya kepeği ve buğday kepeğinin farklı miktarları kullanılarak 28 °C'de 28 gün boyunca inkübe edilmiştir. Soya kepeğinden tek başına 4 gr eklenen ve 2 gr soya kepeği+2 gr buğday kepeği eklenen ortamlar karşılaştırıldığında, 2 gr soya eklenen ortamda selüloz, ksilanaz ve pektinaz enzim aktivitelerinin 4 gr kullanılan ortama oranla 3 kat daha fazla arttığı ifade edilmiştir [174].

Çalışmalarımızda şimdiye kadar elde edilen sonuçlara göre doğal kültür ortamlarından %10-20 ZYFA ve sentetik kültür ortamlarından glukoz içermeyen STO ile çalışmalara devam etmeye karar verilmiştir.

4.1.3. Pamuk sapı büyüklüğünün selüloz (FPA ve CMCaz) ve ksilanaz enzim üretimi üzerine etkisi

Pleurotus ostreatus tarafından üretilen selüloz (FPA ve CMCaz) ve ksilanaz enzim aktivitesi üzerine pamuk sapı büyüklüğünün etkisini incelemek için doğal ve sentetik kültür ortamlarına, büyük boy (yaklaşık 1-1.5 cm) ve küçük boy (yaklaşık 0.1-0.2 cm) pamuk sapları 0.5 gr eklenerek 30 °C'de statik koşullarda inkübe edilmiştir. Küçük boy ve büyük boy pamuk saplarının görünümü Şekil 4.7'de verilmiştir. Sonuçlar *Pleurotus ostreatus*'da en iyi enzim aktivitelerinin gözlemlendiği 6. ve 12. günlerde selüloz (FPA ve CMCaz) ve ksilanaz enzim aktiviteleri ölçülerek belirlenmiştir.

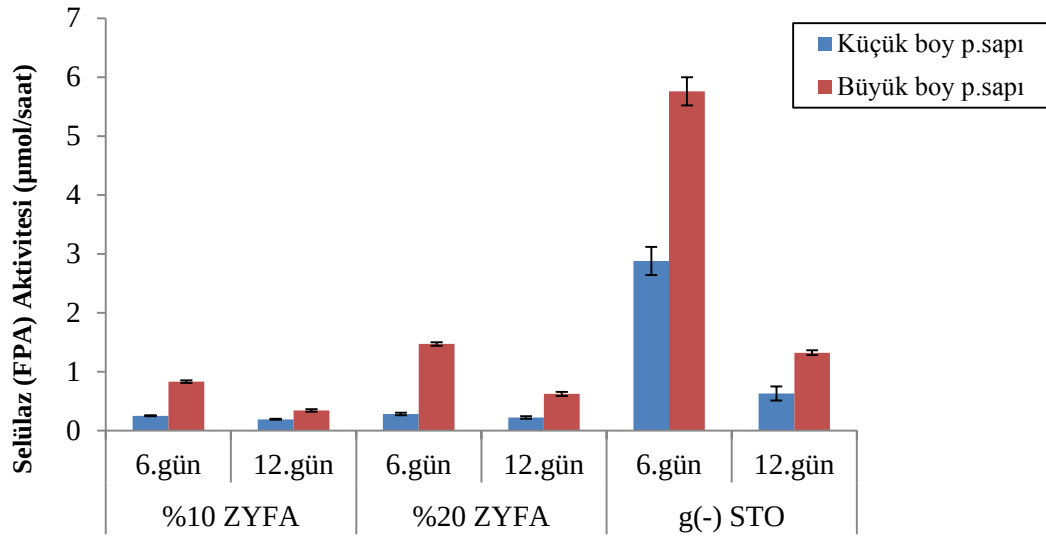


Şekil 4.7. Küçük boy ve büyük boy pamuk saplarının görünümü

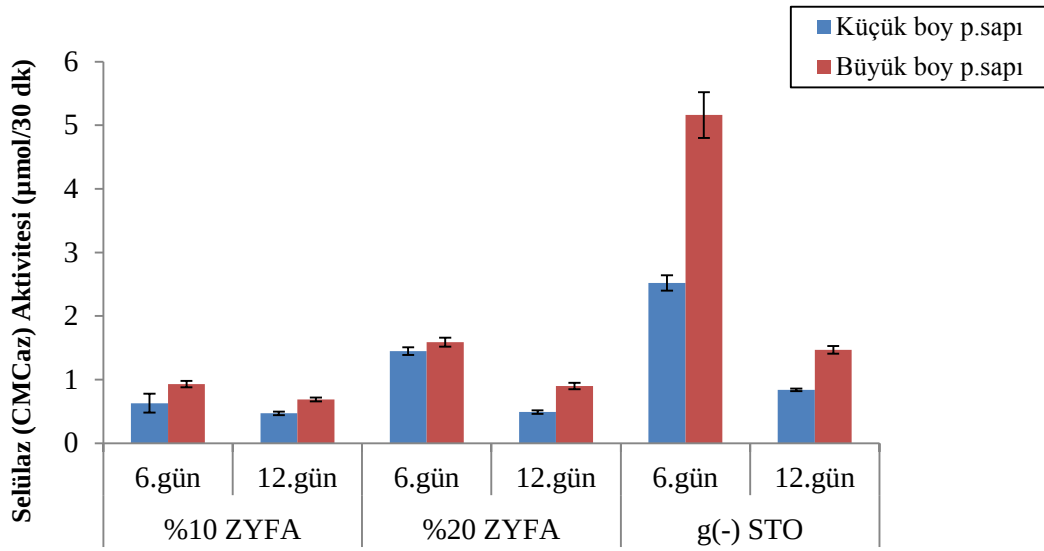
Şekil 4.8’de doğal ve sentetik kültür ortamlarına farklı büyüklüklerde eklenen pamuk saplarının 6. ve 12. günlerde selüloz (FPA) aktivitesi üzerine olan etkisi görülmektedir. Şekil 4.8 incelendiğinde %10 ZYFA, %20 ZYFA ve glukoz içermeyen STO ortamlarının hepsinde de büyük boy pamuk saplarının enzim aktivitesini küçük boy pamuk sapına göre daha fazla arttırdığı görülmektedir. En yüksek FPA aktivitesi büyük boy pamuk sapı eklenen glukoz içermeyen STO ortamında 5.76 $\mu\text{mol/saat}$, %20 ZYFA ortamında 1.47 $\mu\text{mol/saat}$ ve %10 ZYFA ortamında ise 0.83 $\mu\text{mol/saat}$ olarak belirlenmiştir.

Şekil 4.9’da ise doğal ve sentetik kültür ortamlarına farklı büyüklüklerde eklenen pamuk saplarının 6. ve 12. günlerde selüloz (CMCaz) aktivitesi üzerine olan etkisi görülmektedir. %10 ZYFA, %20 ZYFA ve glukoz içermeyen STO ortamlarında CMCaz aktivitesini, büyük boy pamuk saplarının daha fazla indüklediği açıkça görülmektedir. En yüksek CMCaz aktivitesinin gözlemlendiği glukoz içermeyen STO ortamında 6. gündeki küçük boy ve büyük boy pamuk saplarının enzim aktivitelerini karşılaştıracak olursak, küçük boy pamuk sapı eklenen ortamda 2.52 $\mu\text{mol/30 dk}$, büyük boy pamuk sapı eklenen ortamda ise 5.16 $\mu\text{mol/30 dk}$ CMCaz enzim aktivitesi belirlenmiştir.

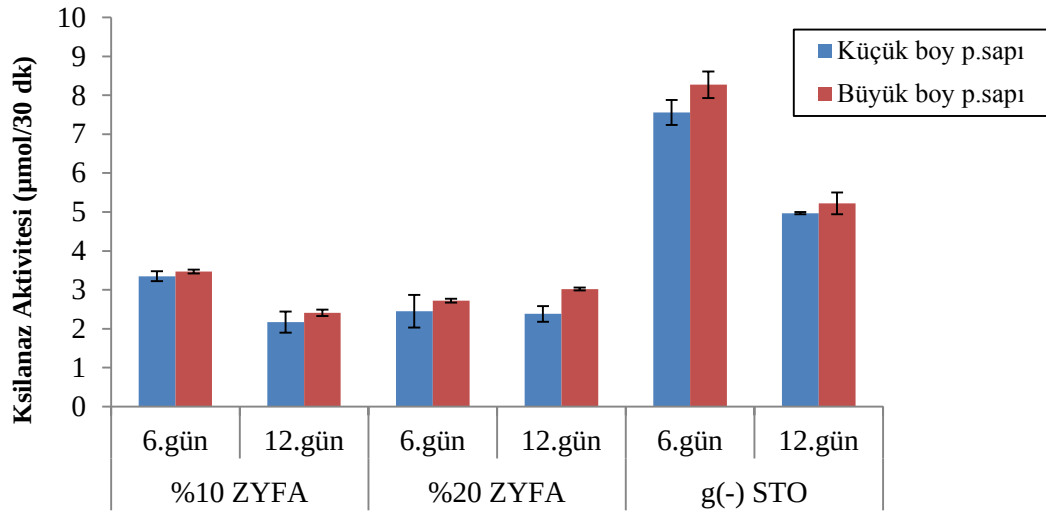
Şekil 4.10’da doğal ve sentetik kültür ortamlarına farklı büyüklüklerde eklenen pamuk saplarının 6. ve 12. günlerde ksilanaz aktivitesi üzerine olan etkisi görülmektedir. %10 ZYFA ve %20 ZYFA ortamında, 6. ve 12. günlere bakıldığında küçük boy ve büyük boy pamuk saplarının benzer şekilde ksilanaz aktivitelerini indüklediği belirlenirken, glukoz içermeyen STO ortamında ise 6. ve 12. günde büyük boy pamuk sapları ksilanaz enzim aktivitesini daha fazla indüklemiştir. Glukoz içermeyen STO ortamında 6. günde enzim aktivitesi daha yüksek olup, küçük boy pamuk sapları eklenmiş ortamda 7.56 $\mu\text{mol/30 dk}$, büyük boy pamuk sapları eklenmiş ortamda ise 8.27 $\mu\text{mol/30 dk}$ ksilanaz aktivitesi elde edilmiştir.



Şekil 4.8. *P. ostreatus* ile farklı boyutlarda pamuk sapı içeren doğal ve sentetik kültür ortamlarında elde edilen selülaz (FPA) aktivitesi



Şekil 4.9. *P. ostreatus* ile farklı boyutlarda pamuk sapı içeren doğal ve sentetik kültür ortamlarında elde edilen selülaz (CMCaz) aktivitesi



Şekil 4.10. *P. ostreatus* ile farklı boyutlarda pamuk sapı içeren doğal ve sentetik kültür ortamlarında elde edilen ksilanaz aktivitesi

Pamuk sapı büyüklüğünün enzim aktivitesi üzerine etkisinin test edildiği çalışmanın sonuçlarına göre, büyük boy pamuk sapının tüm enzim aktivitelerinde küçük boya göre daha etkili olduğu söylenebilir. Bu nedenle bundan sonraki çalışmalarda büyük boy pamuk sapı ile çalışmalara devam etmeye karar verilmiştir.

Membrillo vd. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada, şeker pancarı küspesinin 3 farklı büyüklüğünün (0.92 mm çapında, 1.68 mm çapında ve ortalama 2.9 mm çapında heterojen parçaçıklar) *Pleurotus ostreatus*'un enzim aktivitesi üzerindeki etkisi incelenmiştir. 15 günlük inkübasyon süresinde 3 günlük zaman aralıklarında enzim aktiviteleri ölçülmüştür. En yüksek ksilanaz (14. günde 20 mU/g) aktivitesi heterojen parçaçıklarda, en yüksek CMCaz (7. günde 250 mU/g) ve FPA (2. günde 130 mU/g) aktivitesi ise 0.92 mm çapındaki parçaçıklarda olduğu rapor edilmiştir [188].

Yang vd. (2006) tarafından yapılan çalışmada ise termofilik *Paecilomyces thermophila* J18 fungusuyla farklı lignoselülozik substratlar (buğday kepeği, buğday samanı, şeker pancarı küspesi, mısır kabukları, pirinç kabukları) 0.18, 0.18-0.3, 0.3-0.45, 0.45-0.9 ve 0.9-2 mm partikül büyüklüklerinde kültür ortamına eklenerek statik koşullarda 70 °C'de pH 7.0-8.0 aralığında, 7 gün inkübe edilmiş ve ksilanaz aktivitesi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Buğday samanının 0.3-0.45 mm partikül büyüklüğünde diğer partiküllere oranla daha yüksek ksilanaz (18.580 U/g) aktivitesi belirlenmiştir [198]. Yapılan çalışmalarda da ifade edildiği gibi kullanılan substratın

büyükluğüne bağlı olarak enzim aktiviteleri değişmektedir. Bazı enzim aktivitelerinde kullanılan substratın küçük boyları daha etkiliyken bazısında ise substratın büyük boyları daha etkili olmuştur. Ancak çalışmamızda küçük boy ve büyük boy pamuk saplarının selüloz ve ksilanaz enzim aktiviteleri üzerindeki etkisi incelendiğinde büyük boy pamuk saplarının daha etkili olduğu belirlenmiştir.

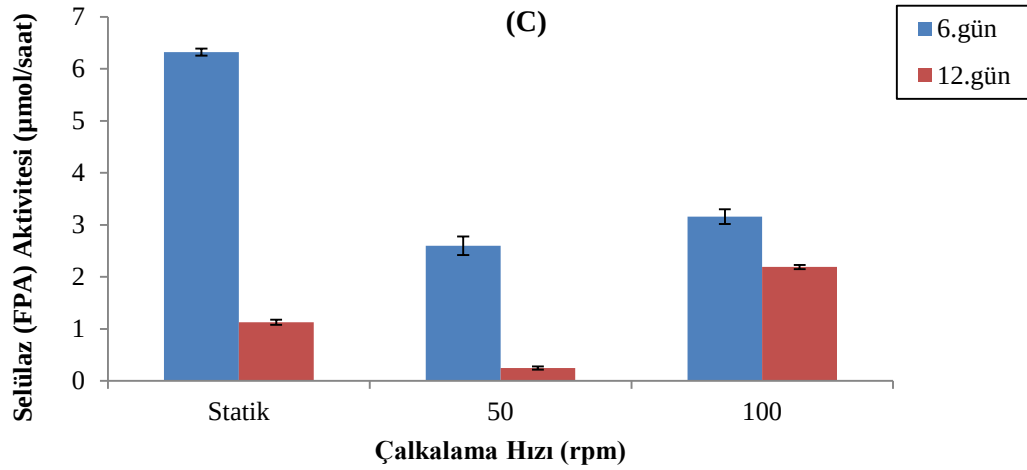
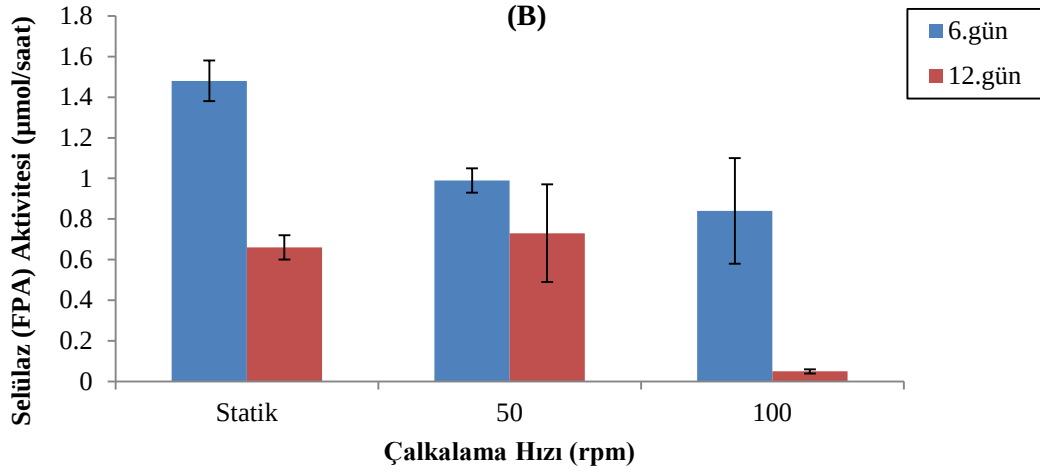
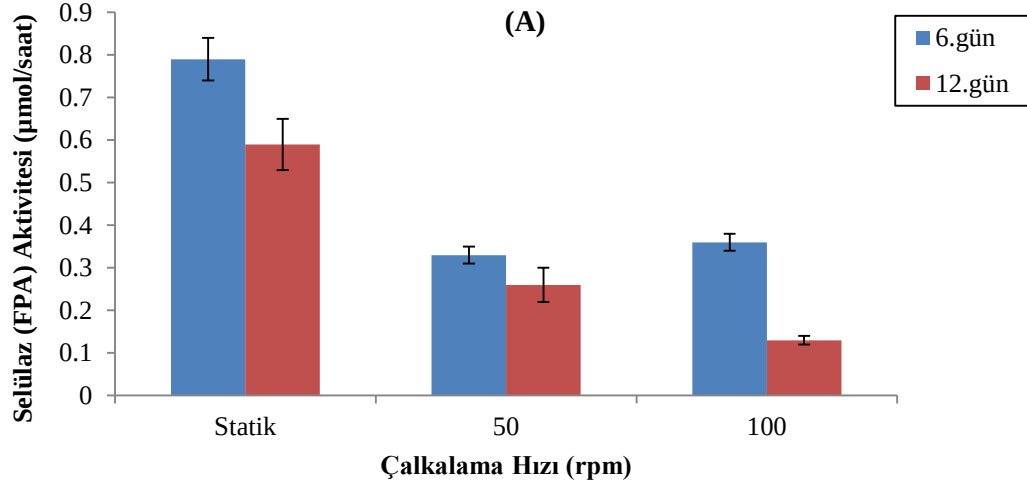
4.1.4. Çalkalama hızının selüloz (FPA ve CMCaz) ve ksilanaz enzim üretimi üzerine etkisi

Çalışmamızın bu kısmında *Pleurotus ostreatus* tarafından %10 ZYFA, %20 ZYFA ve glukoz içermeyen STO ortamlarında selüloz (FPA ve CMCaz) ve ksilanaz enzim aktivitesi üzerine farklı çalkalama hızlarının (statik, 50 ve 100 rpm) etkisi araştırılmıştır. Kültür ortamları 0.5 gr büyük boy pamuk sapı eklenerek 30 °C’de farklı çalkalama hızlarında inkübe edilmiş ve 6. ve 12. günlerdeki enzim aktiviteleri belirlenmiştir.

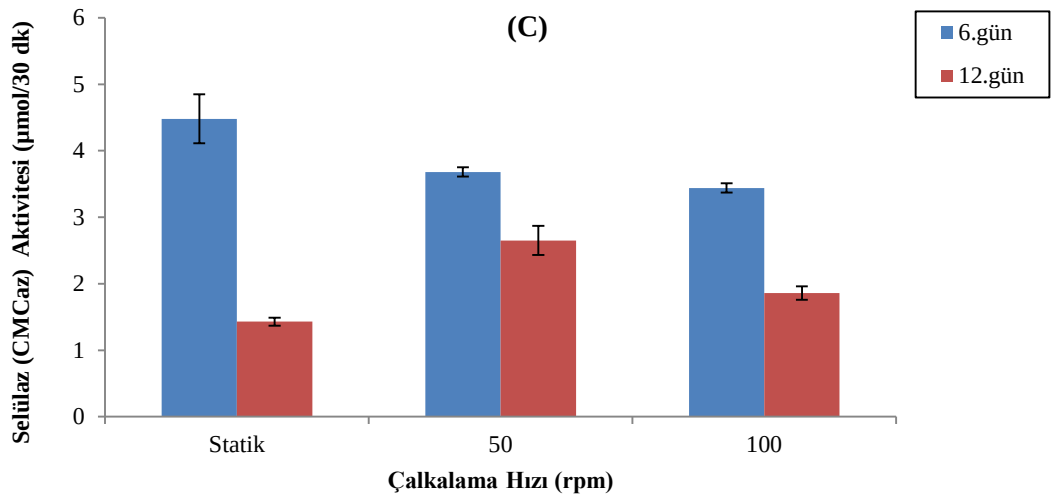
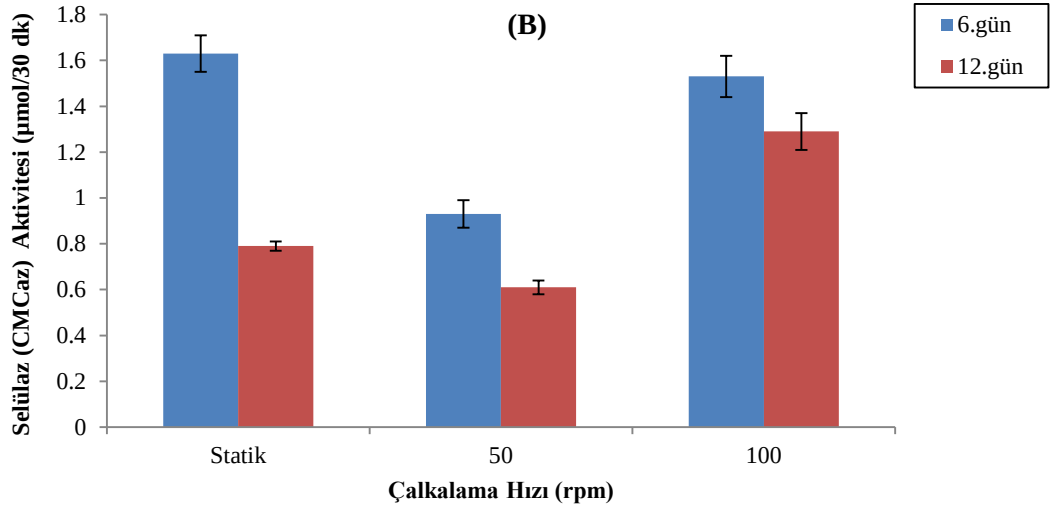
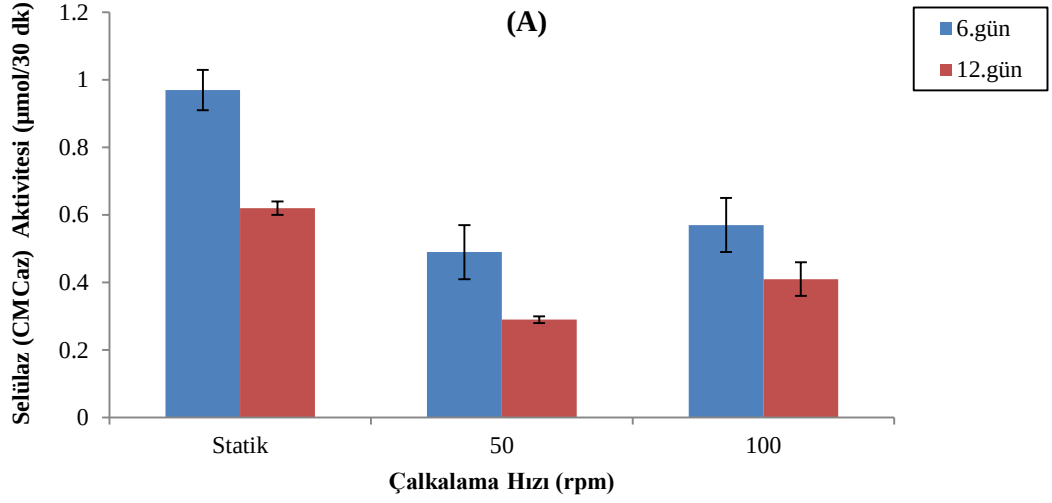
Şekil 4.11 (A, B, C)’de doğal ve sentetik kültür ortamlarında ve farklı çalkalama hızlarında *P. ostreatus* tarafından üretilen selüloz (FPA) aktivite değerleri verilmiştir. Her üç kültür ortamında da statik koşullarda daha belirgin FPA aktivitesi gözlenmiştir. 6. günde en yüksek FPA aktivitesi statik koşullarda glukoz içermeyen STO ortamında 6.32 µmol/saat, %20 ZYFA ortamında 1.48 µmol/saat ve %10 ZYFA ortamında ise 0.79 µmol/saat olarak belirlenmiştir.

Şekil 4.12 (A, B, C)’de doğal ve sentetik kültür ortamlarında ve farklı çalkalama hızlarında *P. ostreatus* tarafından üretilen selüloz (CMCaz) aktivite değerleri verilmiştir. En yüksek CMCaz aktivitesi statik koşullarda 6. günde glukoz içermeyen STO ortamında 4.48 µmol/30 dk olarak gözlenmiştir. Yine statik koşullarda %20 ZYFA ortamında 1.63 µmol/30 dk ve %10 ZYFA ortamında ise 0.97 µmol/30 dk olarak en yüksek CMCaz aktiviteleri belirlenmiştir.

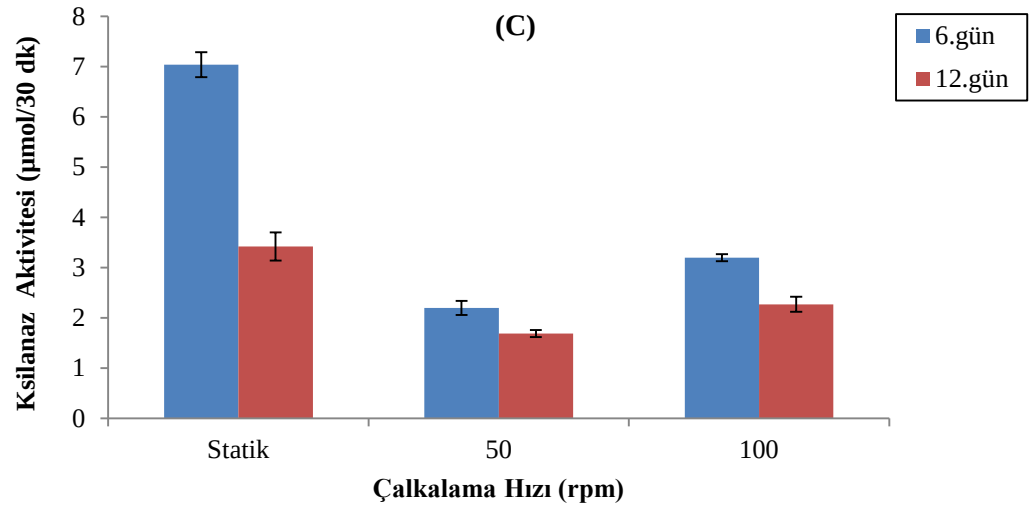
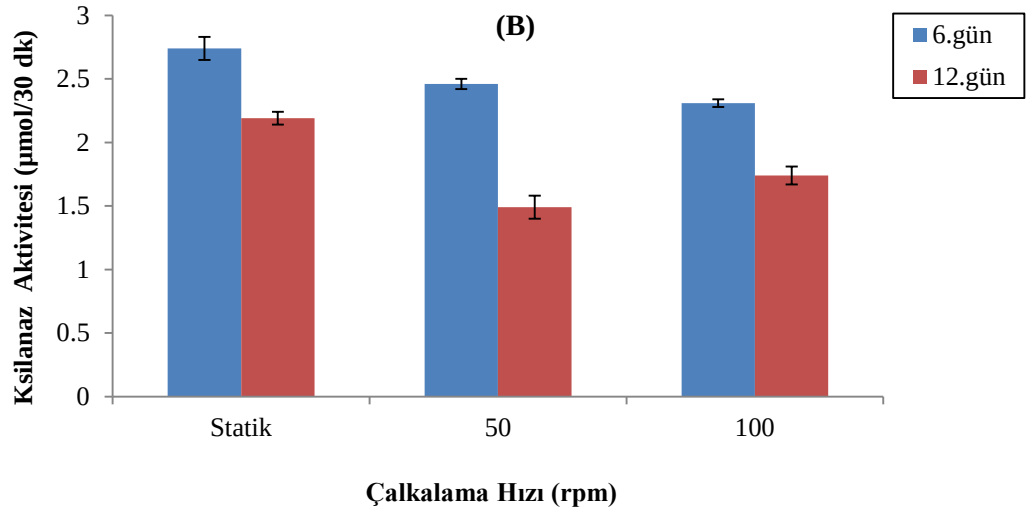
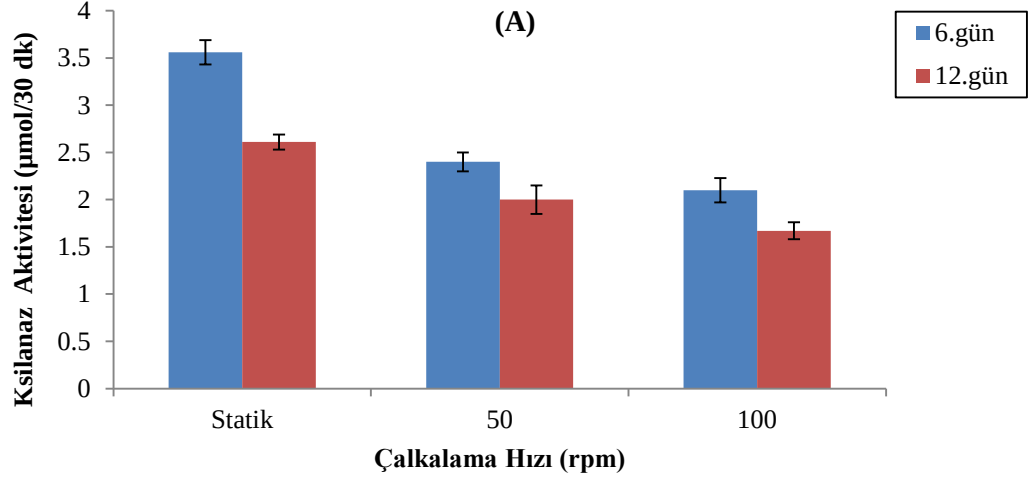
Şekil 4.13 (A, B, C)’de doğal ve sentetik kültür ortamlarında ve farklı çalkalama hızlarında *P. ostreatus* tarafından üretilen ksilanaz aktivite değerleri verilmiştir. En yüksek ksilanaz aktiviteleri diğer enzim aktivitelerinde belirlendiği gibi tüm kültür ortamlarında statik koşullarda elde edilmiştir. En yüksek ksilanaz aktivitesi 6. günde glukoz içermeyen STO ortamında 7.04 µmol/30 dk, %10 ZYFA ortamında 3.56 µmol/30 dk ve %20 ZYFA ortamında ise 2.74 µmol/30 dk olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.11. Farklı çalkalama hızlarında A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında üretilen *P. ostreatus* ile 6. ve 12. günlerde elde edilen selüloz (FPA) aktivitesi



Şekil 4.12. Farklı çalkalama hızlarında A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında üretilen *P. ostreatus* ile 6. ve 12. günlerde elde edilen selülaz (CMCaz) aktivitesi



Şekil 4.13. Farklı çalkalama hızlarında A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında üretilen *P. ostreatus* ile 6. ve 12. günlerde elde edilen ksilanaz aktivitesi

Yüksek çalkalama hızları, hem enzimlere hemde organizmaya zarar verebileceğinden her enzimin uygun çalkalama hızında optimize edilmesi gerekmektedir ve bu durum endüstriyel çalışmalar için oldukça önemlidir [199].

Kahraman (1998) 30 °C’de statik koşullarda, Kang vd. (2004) 28 °C’de statik koşullarda, Singh vd. (2011) 30 °C’de statik koşullarda, Liu vd. (2006) 30 °C’de statik koşullarda yapılan çalışmalarda en yüksek lignoselülozik enzim (selülaz, ksilanaz, lakkaz, MnP) üretiminin olduğunu rapor etmişlerdir [79, 167, 186, 200].

Yapılan başka bir çalışmada ise *Aspergillus niger* fungusu ve substrat olarak talaş kullanılarak optimizasyon çalışması yapılmıştır. Fungus statik ve 120 rpm çalkalama hızında 28 °C’de 96 saat inkübe edilerek 24 saatte bir enzim aktivitesi ölçülmüştür. Yapılan çalışma sonucunda statik koşullarda en yüksek selülaz aktivitesi 72. saatte 0.046 IU/ml, 120 rpm çalkalama hızında ise inkübasyonun 96. saatinde 0.0925 IU/ml olarak tespit edilmiştir [201].

Shahriarinnour vd. (2011) tarafından yapılan çalışmada *Aspergillus terreus* fungusu ve substrat olarak palmye kabukları kullanılarak statik, 100, 200 ve 300 rpm çalkalama hızlarında 28 °C’de 12 gün inkübe edilerek 2 günde bir enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Çalışma sonucunda en yüksek FPA ve CMCaz aktivitesi 200 rpm çalkalama hızında 6. günde elde edilmiştir [202].

Yapmış olduğumuz çalışmada statik koşullarda enzim aktivitelerinin daha yüksek olduğu belirlenmiş olup, karşılaştırmalı yapılan çalışmalardaki literatür verilerinin bazılarıyla farklılık göstermektedir. Yapmış olduğumuz çalışmalar doğrultusunda statik koşullarda çalışmalara devam edilmiştir.

4.1.5. İnkübasyon sıcaklığının selülaz (FPA ve CMCaz) ve ksilanaz enzim üretimi üzerine etkisi

Pleurotus ostreatus tarafından selülaz ve ksilanaz enzim aktiviteleri üzerine sıcaklığın etkisinin tespit edilebilmesi için yapılan çalışmada funguslar farklı sıcaklıklara (20, 30, 40, 50 °C) ayarlanmış inkübatörlerde statik koşullarda inkübe

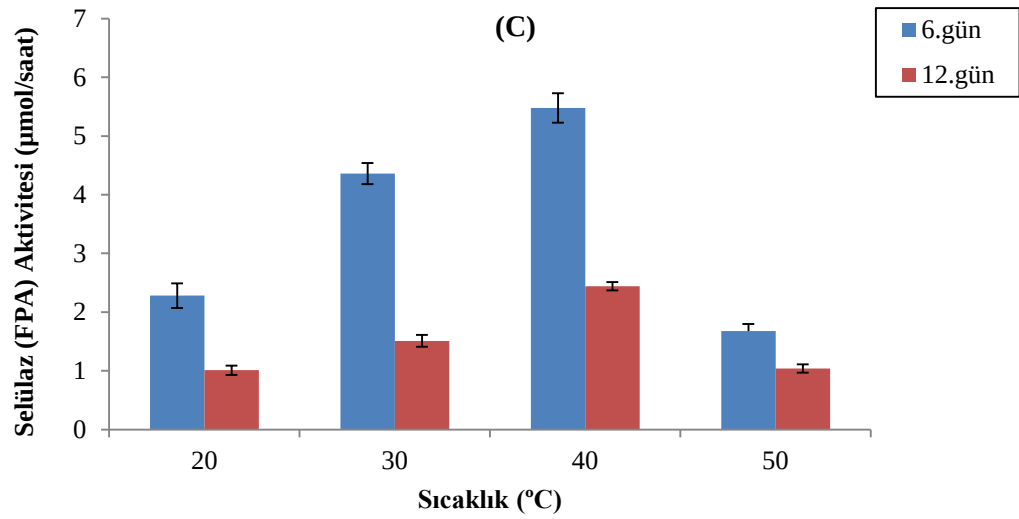
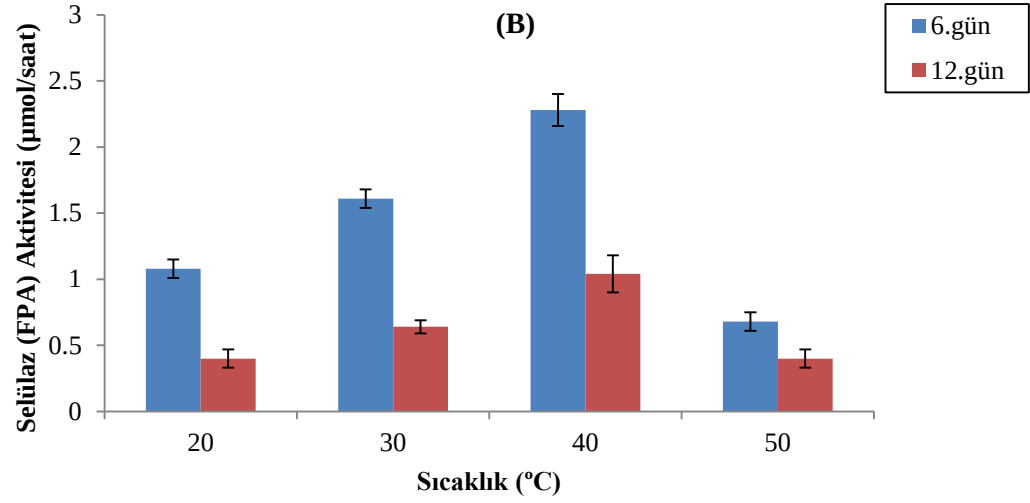
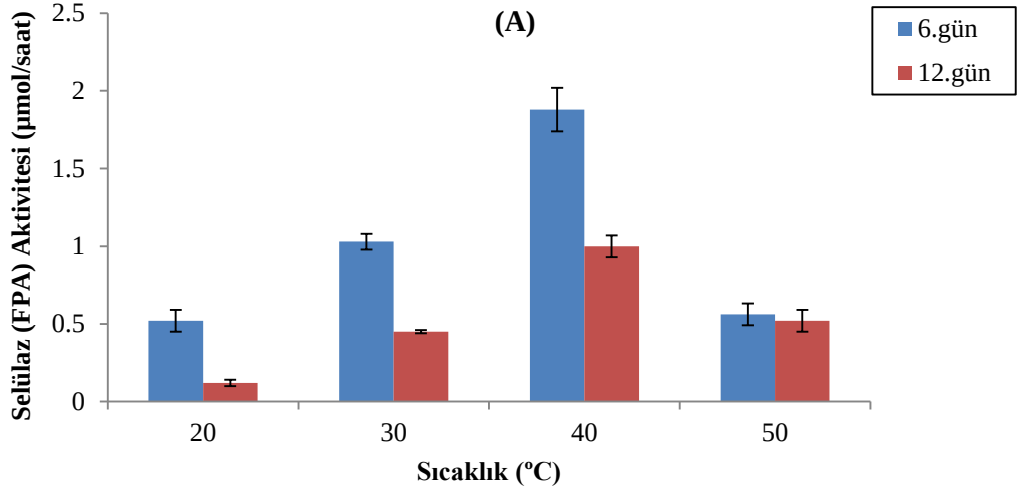
edilerek enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Kültür ortamlarına 0.5 gr büyük boy pamuk sapı eklenerek 6. ve 12. günlerdeki enzim aktiviteleri belirlendi.

Şekil 4.14 (A, B, C)'de doğal ve sentetik kültür ortamlarında ve farklı inkübasyon sıcaklıklarında *P. ostreatus* tarafından üretilen selülaz (FPA) aktivite değerleri verilmiştir. Tüm kültür ortamlarında da FPA aktivitelerinin yüksek olduğu 6. günleri incelediğimizde 40 °C'ye kadar aktivitenin kademeli olarak arttığı devamında ise azaldığı gözlenmektedir. 30 ve 40 °C'nin enzim üretiminde daha etkili olduğu görülmektedir.

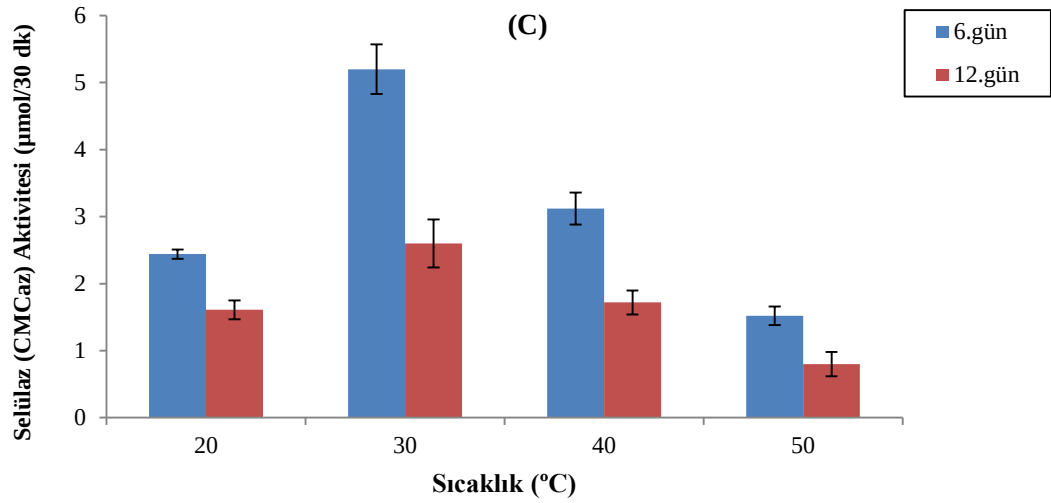
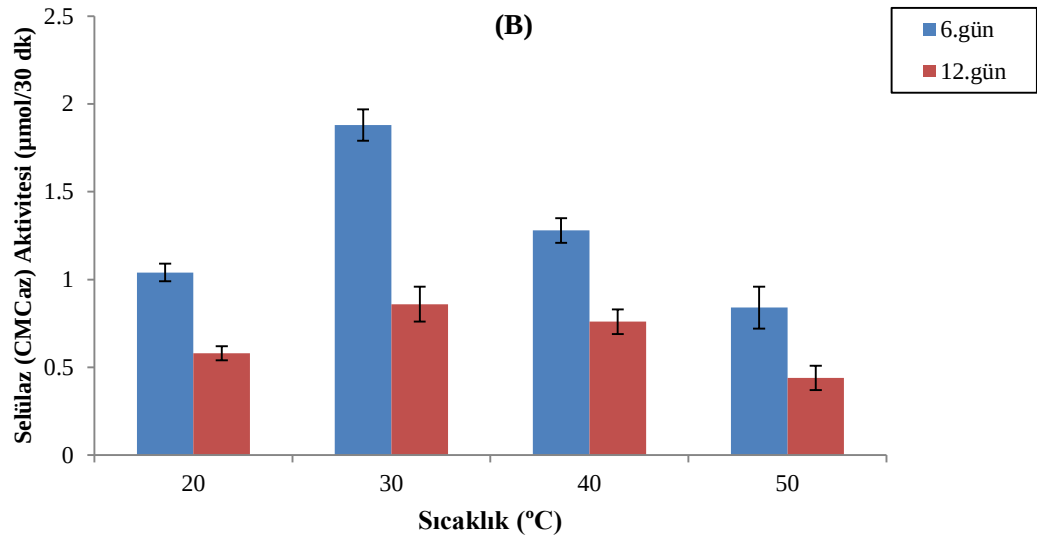
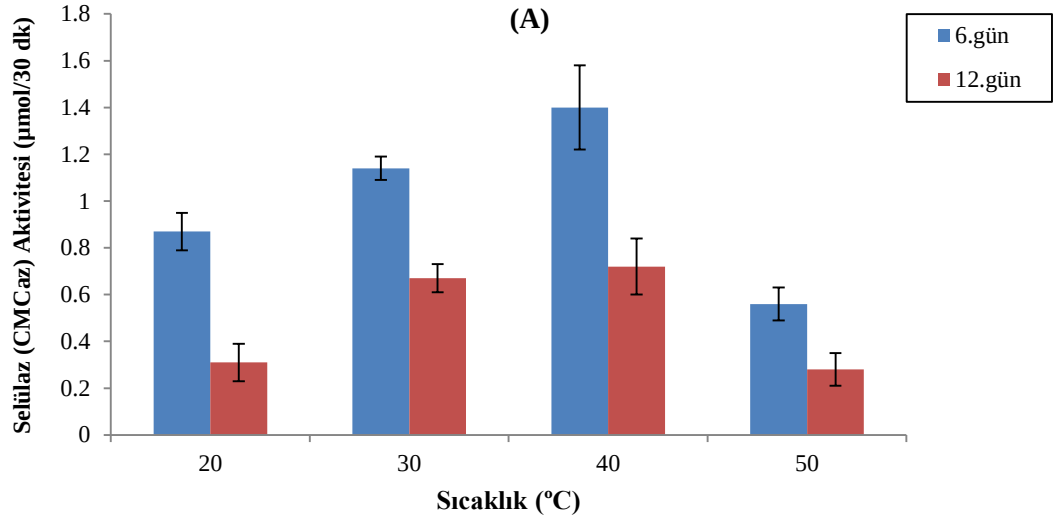
Şekil 4.15 (A, B, C)'de doğal ve sentetik kültür ortamlarında ve farklı inkübasyon sıcaklıklarında *P. ostreatus* tarafından üretilen selülaz (CMCaz) aktivite değerleri verilmiştir. %10 ZYFA ortamında 40 °C'ye kadar enzim aktivitesinde bir artışın olduğu 50 °C'de ise azalmanın olduğu görülmektedir. Bu ortamda 40 °C'de 6. günde en yüksek CMCaz aktivitesi belirlenmiştir. %20 ZYFA ortamında ise 30 °C'ye kadar enzim aktivitesinde artışın olduğu diğer sıcaklıklarda ise azalmanın olduğu görülmektedir. Glukoz içermeyen STO ortamında da en yüksek CMCaz aktivitesi 30 °C'de belirlenmiştir.

Şekil 4.16 (A, B, C)'de doğal ve sentetik kültür ortamlarında ve farklı inkübasyon sıcaklıklarında *P. ostreatus* tarafından üretilen ksilanaz aktivite değerleri verilmiştir. Tüm kültür ortamlarında en yüksek ksilanaz aktivitesi FPA aktivitesinde de olduğu gibi inkübasyonun 6. gününde 30 °C'de elde edilmiştir.

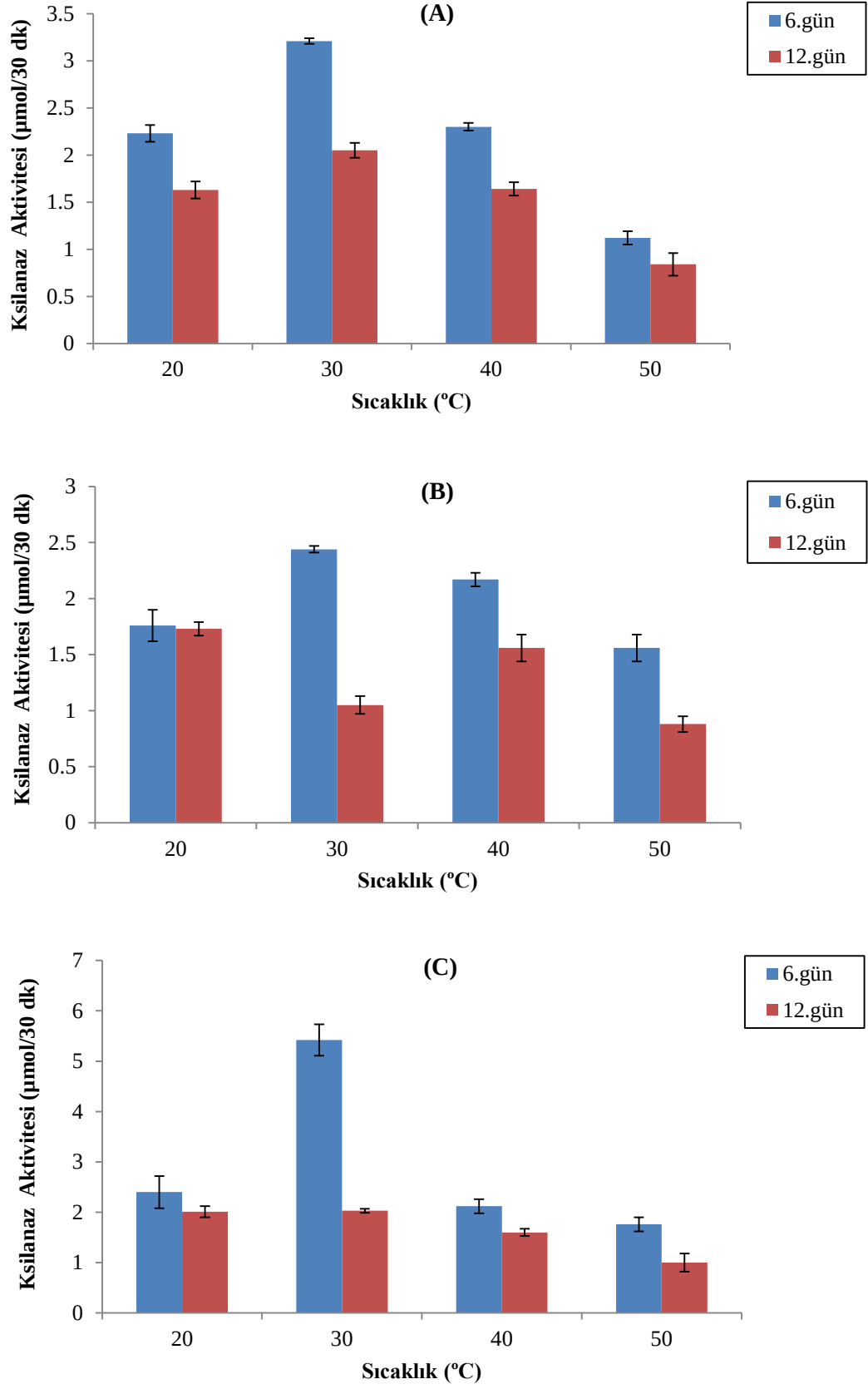
Şekiller (Şekil 4.14, 4.15, 4.16) incelendiğinde selülaz (FPA ve CMCaz) ve ksilanaz enzim üretimi için gerekli optimum sıcaklığın kültür ortamlarına ve günlere bağlı olarak farklılık gösterdiği ve 30-40 °C sıcaklıkların enzimlerin aktivitelerini daha fazla indüklediği görülmektedir.



Şekil 4.14. *P. ostreatus* ile farklı inkübasyon sıcaklıklarında A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında 6. ve 12. günlerde elde edilen selülaz (FPA) aktivitesi



Şekil 4.15. *P. ostreatus* ile farklı inkübasyon sıcaklıklarında A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında 6. ve 12. günlerde elde edilen selülag (CMCaz) aktivitesi



Şekil 4.16. *P. ostreatus* ile farklı inkübasyon sıcaklıklarında A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında 6. ve 12. günlerde elde edilen ksilanaz aktivitesi

İnkübasyon sıcaklığı fungusun gelişimini etkilediği için enzim üretimini ve aktivitesini etkileyen önemli bir faktördür. Enzimlerin izole edildiği fungusa bağlı olarak aktivite gösterdikleri optimum sıcaklık değeri değişmektedir [75, 182].

Singh vd. (2009) tarafından yapılan benzer bir çalışmada *Coprinellus disseminatus*'un yabani suşları (SH-1 ve SH-2) katı substrat fermentasyonu ile 27, 32, 37, 42, 52 °C'de inkübe edilmiş en uygun inkübasyon sıcaklığı 37 °C olarak tespit edilmiştir [75].

Farinas vd. (2010) tarafından *Aspergillus niger* soyları kullanılarak katı substrat fermentasyonu ile 23 °C ile 87 °C arasındaki sıcaklık değerlerinde 96 saat boyunca inkübe edilerek her 24 saatte bir enzim aktiviteleri izlenmiştir. Endoglukanaz, β -glukosidaz ve ksilanaz aktiviteleri incelenmiş olup, her üç enzim için optimum sıcaklık değerleri 35 °C ve 60 °C aralığında tespit edilmiştir [182].

Aspergillus niger ile yapılan başka bir çalışmada ise 23, 28, 37 °C'nin selüloz aktivitesi üzerindeki etkisi incelendiğinde, 28 °C'de en yüksek selüloz aktivitesi elde edilmiştir [201].

Çalışmamızda da selüloz ve ksilanaz enzim aktiviteleri 30-40 °C arasında değişmektedir. Yapılan daha önceki çalışmalarla karşılaştırıldığında literatür verileriyle uyumlu olduğu görülmektedir.

4.1.6. Besiyeri pH'sının selüloz (FPA ve CMCaz) ve ksilanaz enzim üretimi üzerine etkisinin saptanması

Enzim üretimini etkileyen diğer bir faktör ise besiyeri ortamının başlangıç pH'sıdır. *Pleurotus ostreatus*'un selüloz ve ksilanaz üretimi açısından en uygun ortam pH'sının tespit edilmesi amacıyla %10 ZYFA, %20 ZYFA ve glukoz içermeyen STO kültür ortamlarının pH'sı 3.0, 5.0, 7.0, 9.0'a ayarlanarak 30 °C'de statik koşullarda inkübe edilmiştir. Kültür ortamlarına 0.5 gr büyük boy pamuk sapı eklenerek 6. ve 12. günlerdeki enzim aktiviteleri belirlenmiştir.

Şekil 4.17 (A, B, C)'de doğal ve sentetik kültür ortamlarında ve farklı pH'larda *P. ostreatus* tarafından üretilen selüloz (FPA) aktivite değerleri verilmiştir. Tüm kültür ortamlarında 6. günde 12. güne göre daha yüksek FPA aktivitesi elde edilmiştir. En yüksek FPA aktivitesi %20 ZYFA ortamında pH 5.0'da 6. günde belirlenmiştir. %10 ZYFA ortamında pH 3.0 ve 5.0'da ve glukoz içermeyen STO ortamında ise pH 5.0'da en yüksek FPA değerleri elde edilmiştir.

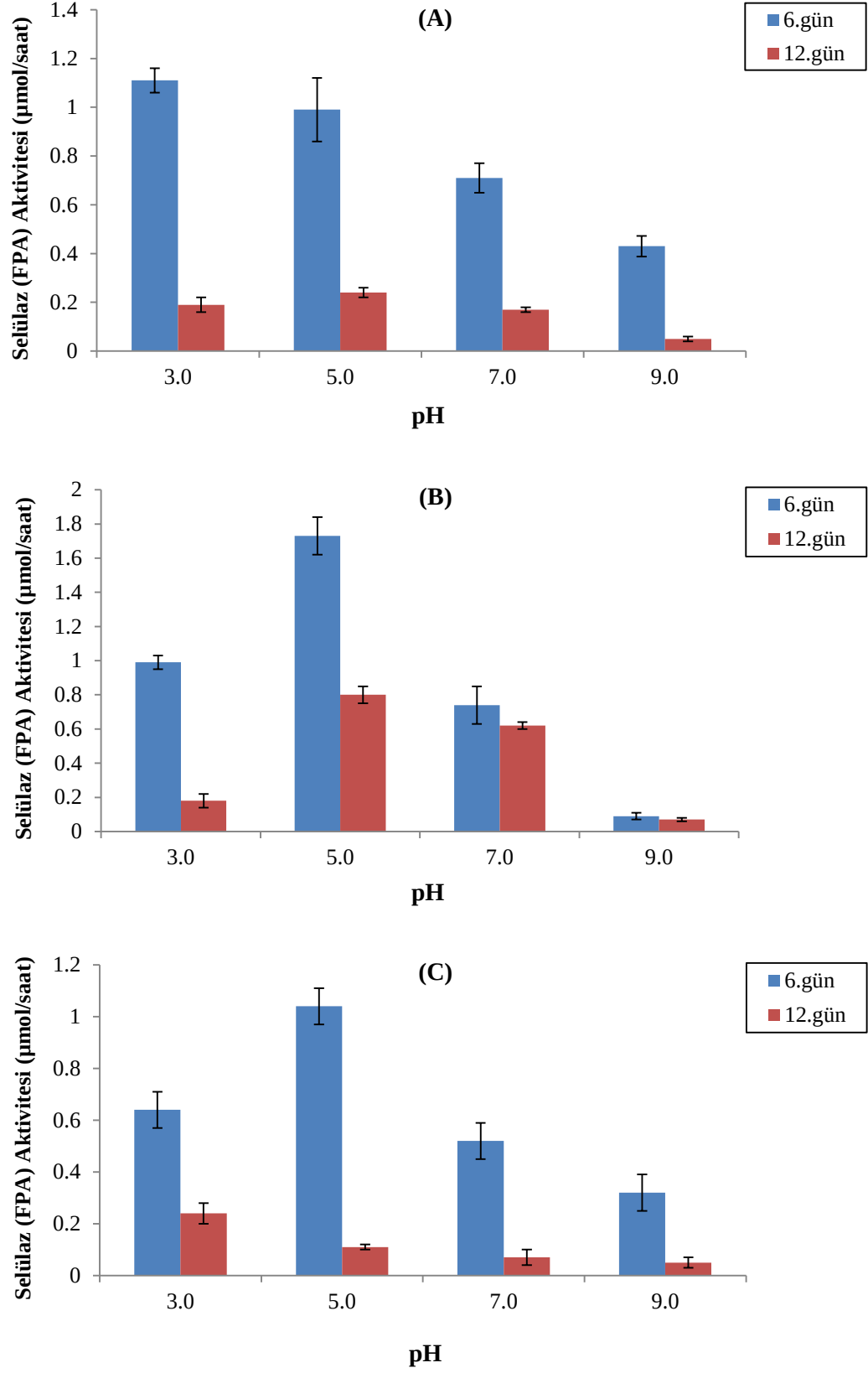
Şekil 4.18 (A, B, C)'de doğal ve sentetik kültür ortamlarında ve farklı pH'larda *P. ostreatus* tarafından üretilen selüloz (CMCaz) aktivite değerleri verilmiştir. Şekil 4.18 incelendiğinde tüm kültür ortamlarında en yüksek CMCaz aktivitesi 6. günde ve pH 5.0'da gözlenmiştir.

Şekil 4.19 (A, B, C)'de doğal ve sentetik kültür ortamlarında ve farklı pH'larda *P. ostreatus* tarafından üretilen ksilanaz aktivite değerleri verilmiştir. Kültür ortamlarının hepsinde en yüksek ksilanaz aktivitesi, CMCaz aktivitesinde olduğu gibi 6. günde pH 5.0'da belirlenmiştir.

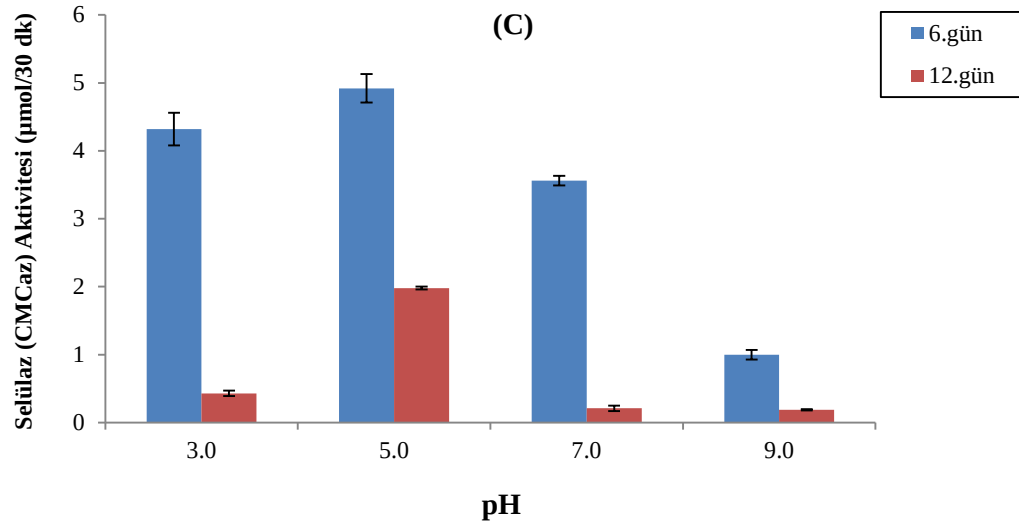
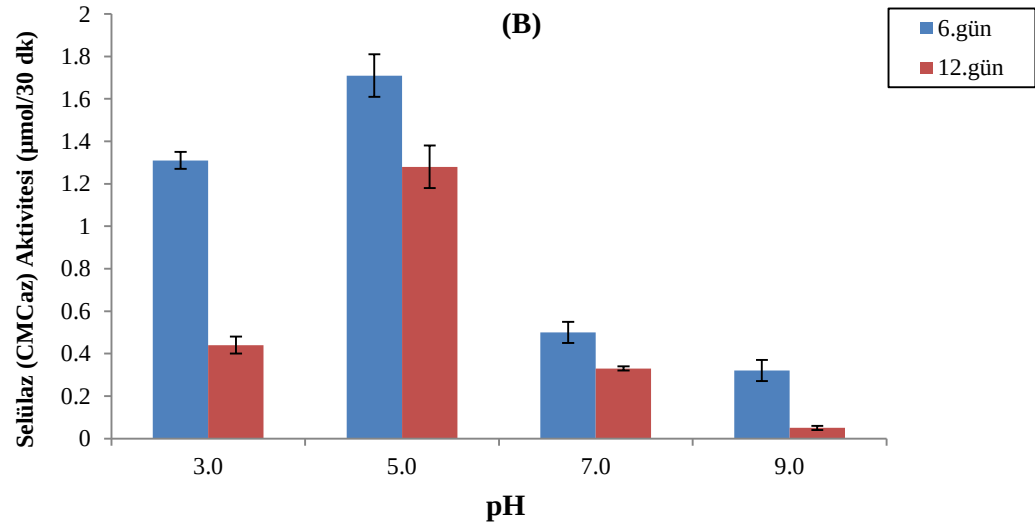
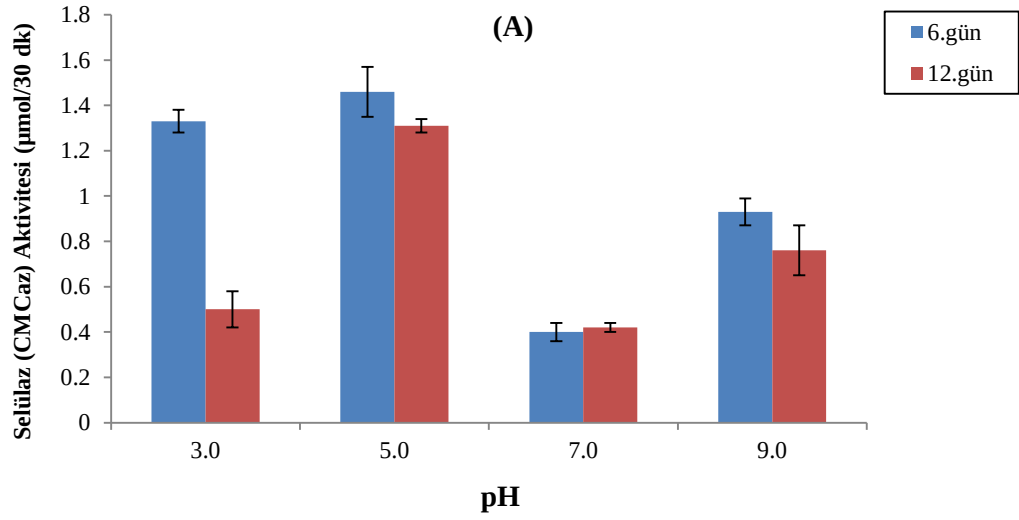
Shah vd. (2005) tarafından yapılan çalışmada *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 üretildiği ortamın pH'sı 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0'a ayarlanmış ve fungus 30 °C'de 7 gün boyunca inkübe edilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda en yüksek ksilanaz aktivitesinin inkübasyonun 3. gününde pH 5.0 ortamında 80.5 U/ml olduğu ve bu değerden sonra en yüksek aktivitenin pH 3.0-4.0 aralığında gözlemlenmiş olup pH 5.0'dan sonra enzim aktivitesinin düştüğü rapor edilmiştir [203].

Malik vd. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada ise *Trichoderma viride*'nin inkübe edildiği ortam pH' sı 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5'a ayarlanmış ve 30 °C'de 96 saat boyunca inkübe edilmiştir. En yüksek CMCaz ve FPA aktivitesi 72. saatte pH 5.5'de sırasıyla 1.66, 0.932 U/ml olarak ölçülmüştür [185].

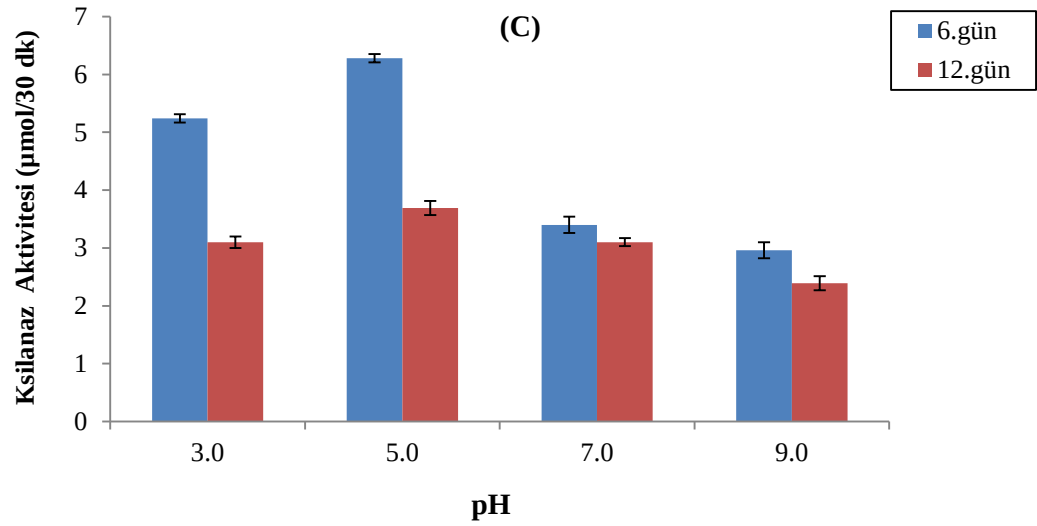
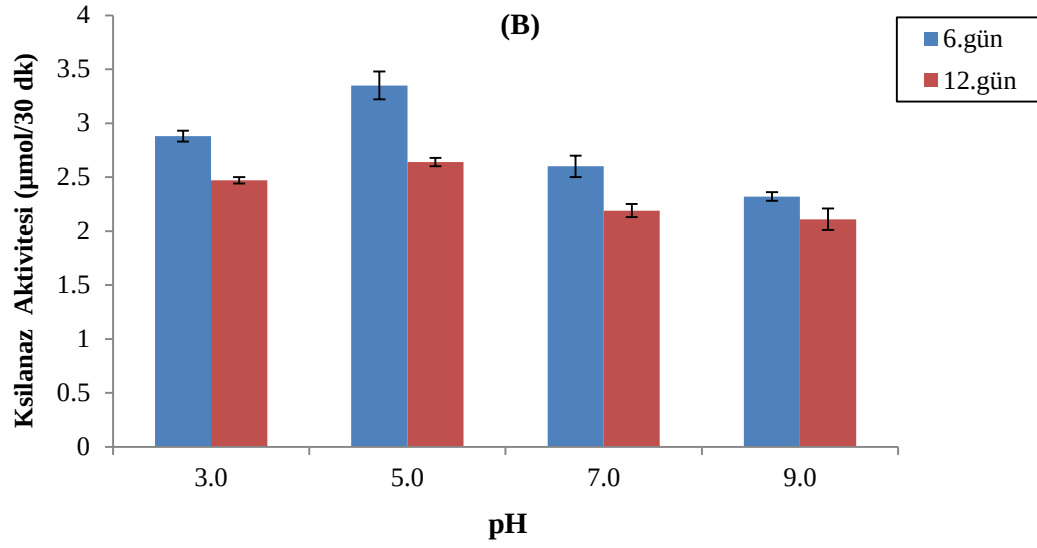
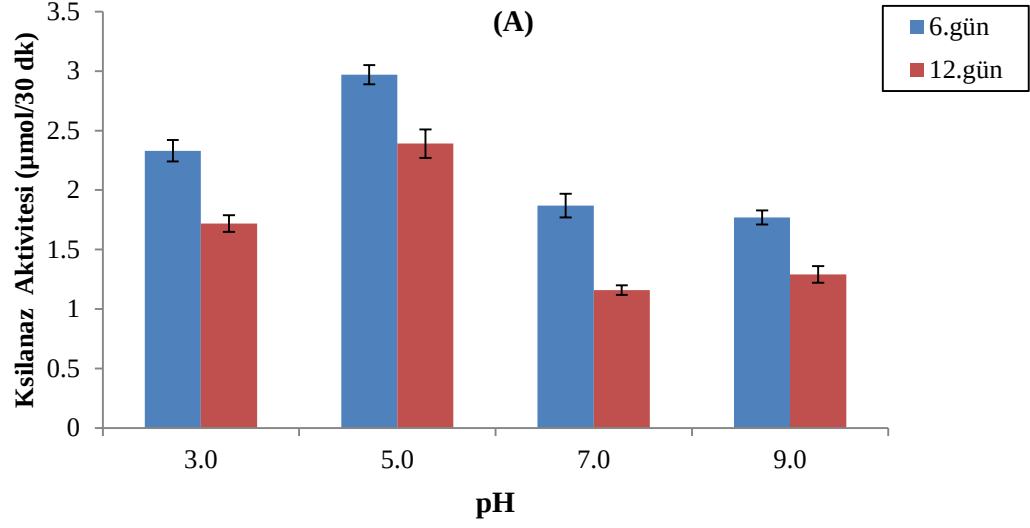
Çalışmamız sonucunda *P. ostreatus* ile en yüksek selüloz (FPA ve CMCaz) aktivitesi 6. günde pH 3-5 aralığında elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, literatürde elde edilen sonuçlar ile benzerlik göstermektedir.



Şekil 4.17. *P. ostreatus* ile farklı başlangıç pH'larındaki A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında, 6. ve 12. günlerde elde edilen selülaz (FPA) aktivitesi



Şekil 4.18. *P. ostreatus* ile farklı başlangıç pH'larındaki A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında 6. ve 12. günlerde elde edilen selüloz (CMCaz) aktivitesi



Şekil 4.19. *P. ostreatus* ile farklı başlangıç pH'larındaki A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında 6. ve 12. günlerde elde edilen ksilanaz aktivitesi

4.2. *Pleurotus ostreatus* (y.i)'un Selülaaz ve Ksilanaz Enzim Üretimi Üzerine Etkili Faktörlerin İncelenmesi

Çalışmamızın bu kısmında *Pleurotus ostreatus* ile elde edilen selülaaz ve ksilanaz enzim aktivite değerlerini karşılaştırmak amacı ile yeni izole edilmiş bir tür olan *Pleurotus ostreatus* (y.i) ile enzim optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla *Pleurotus ostreatus* ile yapılan çalışmalarda en yüksek enzim aktivitelerinin gözleendiği %10 ZYFA, %20 ZYFA ve glukoz içermeyen STO ortamları kullanılmıştır. Enzim üretimi üzerine farklı çalkalama hızları, inkübasyon sıcaklıkları ve ortam pH'larının etkisi test edilmiştir.

4.2.1. İnkübasyon süresinin selülaaz (FPA ve CMCaz) ve ksilanaz enzim üretimi üzerine etkisi

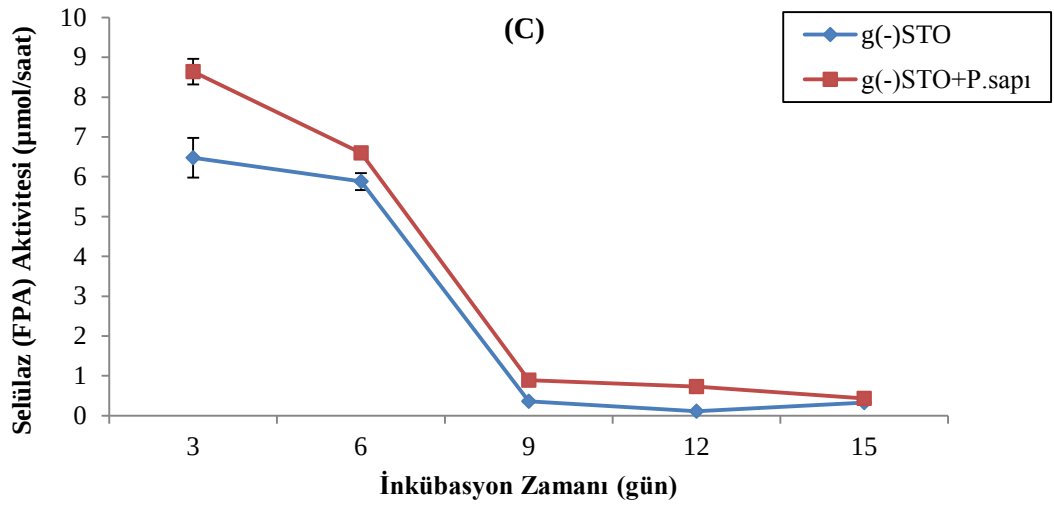
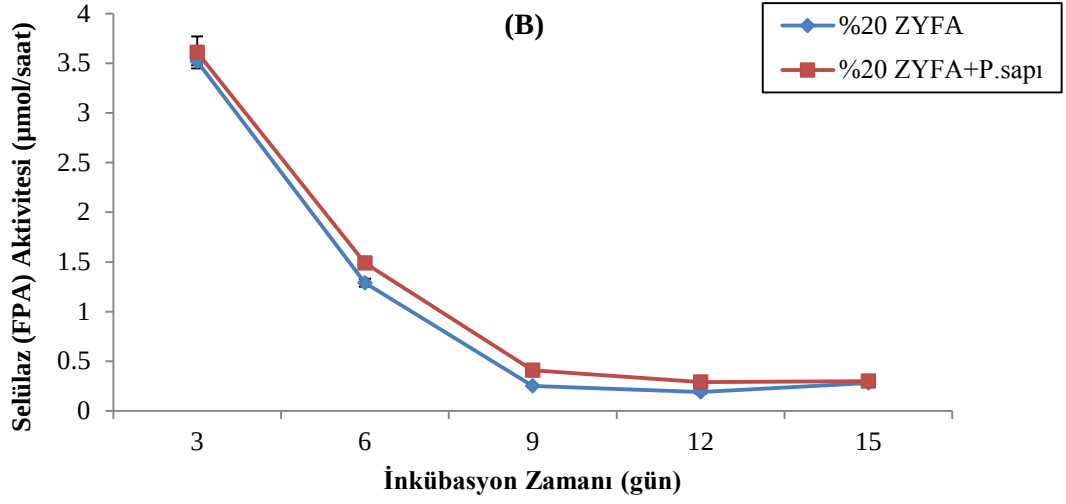
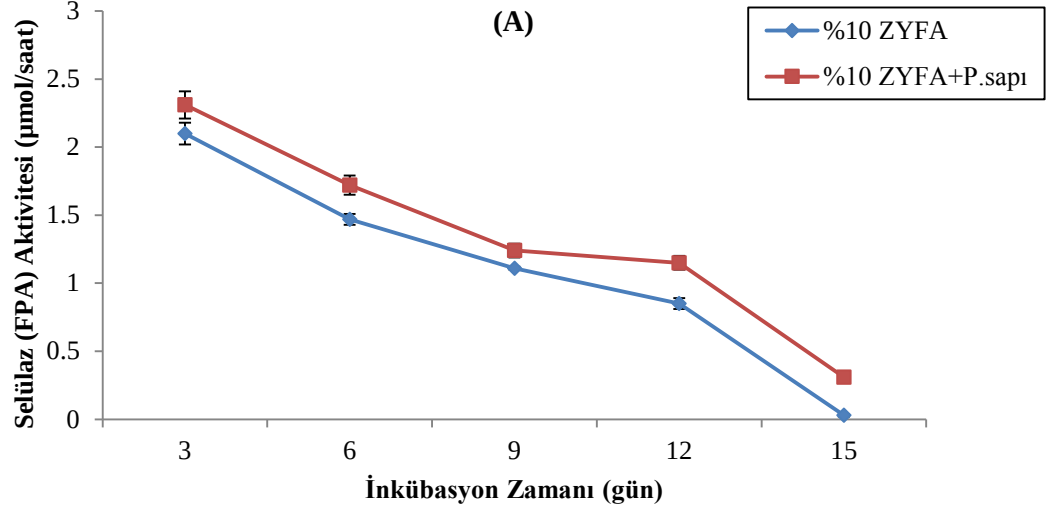
Pleurotus ostreatus (y.i) ile selülaaz (FPA ve CMCaz) ve ksilanaz enzimlerinin üretimi, 30 °C'de statik koşullarda, indüktör olarak 0.5 gr/30 ml büyük boy pamuk sapı eklenmiş ve eklenmemiş doğal ve sentetik kültür ortamlarında, 15 gün süresince 3 günlük zaman aralıklarında ölçülerek maksimum aktivitelerin elde edildiği günler belirlenmiştir.

Şekil 4.20 (A, B, C)'de doğal ve sentetik kültür ortamlarında elde edilen selülaaz (FPA) aktivite değişimleri günlere bağlı olarak verilmiştir. Yapılan ölçümler sonucunda en yüksek enzim aktivitesi inkübasyonun 3. gününde belirlenmiş olup, aktivite periyodun sonraki günlerinde azalarak devam etmiştir. Buna göre pamuk sapı eklenmemiş %10 ZYFA, %20 ZYFA ve glukoz içermeyen STO ortamları, pamuk sapı eklenmiş %10 ZYFA+P.sapı, %20 ZYFA+P.sapı ve g(-)STO+P.sapı ortamları ile karşılaştırıldığında enzim aktivitelerinin pamuk sapı eklenen ortamlarda daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. 3. günde en yüksek enzim aktivitesi glukoz içermeyen STO ortamında 8.64 µmol/saat, %20 ZYFA+P.sapı ortamında 3.61 µmol/saat ve %10 ZYFA+P.sapı ortamında 2.31 µmol/saat olarak ölçülmüştür.

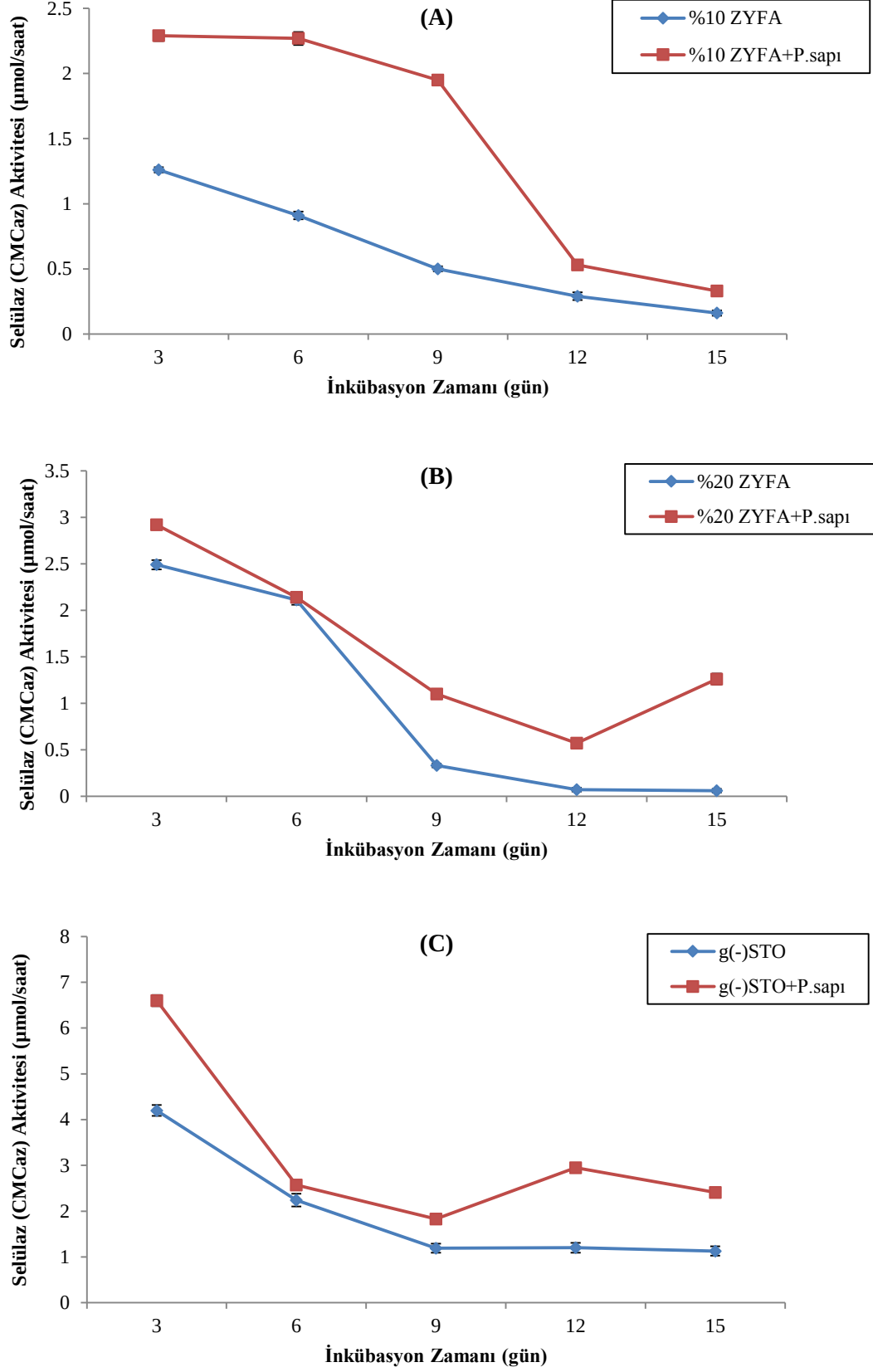
Şekil 4.21 (A, B, C)'de doğal ve sentetik kültür ortamlarında elde edilen selülaaz (CMCaz) aktivite değişimleri günlere bağlı olarak verilmiştir. En yüksek selülaaz (CMCaz) aktivitesi 3. günde pamuk sapı eklenen kültür ortamlarında gözlenmiştir. Buna göre en yüksek CMCaz aktivitesi g(-)STO+P.sapı ortamında 6.6

$\mu\text{mol}/30\text{ dk}$, %20 ZYFA+P.sapı ortamında 2.92 $\mu\text{mol}/30\text{ dk}$ ve %10 ZYFA+P.sapı ortamında 2.29 $\mu\text{mol}/30\text{ dk}$ olarak belirlenmiştir. Kùltür ortamlarına pamuk sapı eklenmesinin selùlaz (CMCaz) aktivitesini indüklediği gör÷lmektedir.

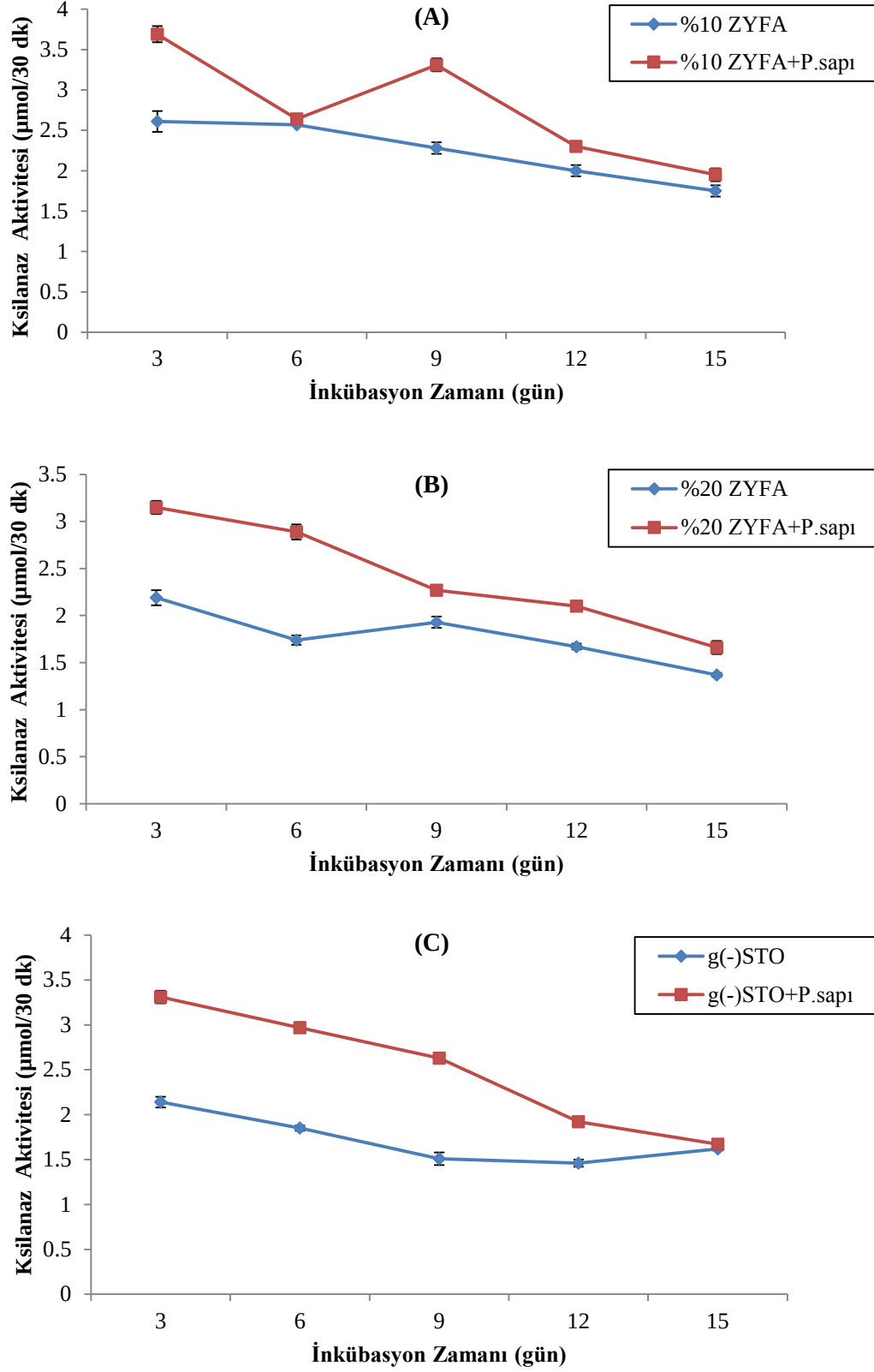
Şekil 4.22 (A, B, C)'de doğal ve sentetik kùltür ortamlarında elde edilen ksilanaz aktivite değişimleri günlere bağlı olarak verilmiştir. En yüksek ksilanaz enzim aktivitesi genel olarak 3. günde belirlenmiş ve devamındaki günlerde azalarak aktiviteler korunmuştur. 3. günde %10 ZYFA+P.sapı ortamında 3.69 $\mu\text{mol}/30\text{ dk}$, %20 ZYFA+P.sapı ortamında 3.15 $\mu\text{mol}/30\text{ dk}$, glukoz içermeyen STO ortamında ise 3.31 $\mu\text{mol}/30\text{ dk}$ olarak ölç÷lmüştür. Pamuk sapı eklenen ortamların enzim aktivite değerlerinin daha yüksek olduğu açıkça gör÷lmektedir.



Şekil 4.20. *Pleurotus ostreatus* (y.i) ile pamuk sapı eklenmiş ve eklenmemiş A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında günlere bağlı olarak elde edilen selülaz (FPA) aktivitesi (Sıcaklık: 30 °C, çalkalama hızı: statik, p.sapı miktarı: 0.5 gr/30 ml)



Şekil 4.21. *Pleurotus ostreatus* (y.i) ile pamuk sapı eklenmiş ve eklenmemiş A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında günlere bağlı olarak elde edilen selülaz (CMCaz) aktivitesi (Sıcaklık: 30 °C, çalkalama hızı: statik, p.sapı miktarı: 0.5 gr/30 ml)



Şekil 4.22. *Pleurotus ostreatus* (y.i) ile pamuk sapı eklenmiş ve eklenmemiş A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında günlere bağlı olarak elde edilen ksilanaz aktivitesi (Sıcaklık: 30 °C, çalkalama hızı: statik, p.sapı miktarı: 0.5 gr/30 ml)

Liu vd. (2006) yaptıkları çalışmada *Trichoderma viride*'de CMCaz ve ksilanaz üretimi için farklı lignoselülozik atıkları kullanarak 30 °C'de statik koşullarda 18 gün süresince inkübe edilerek 2 günde bir enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Her iki enzim aktivitesi de en yüksek 3. günde statik koşullarda belirlenmiştir [200].

Acharya vd. (2008) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise *Aspergillus niger* ile 8 günlük inkübasyon süresince hergün selülaz aktiviteleri ölçülmüş olup en yüksek selülaz aktivitesi inkübasyonun 4. gününde, 0.0962 IU/ml olarak elde edilmiştir [201].

Khan vd. (2007) tarafından *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma* spp. ve *Phanerochaete chrysosporium* ile yapılan çalışmada ise en yüksek CMCaz aktivitesi azalan şeker miktarına da bağlı olarak fermentasyonun 4. gününde sırasıyla 1.88, 1.53, 2.40 IU/ml olarak ölçülmüştür [204].

Yapılan çalışmalarda yüksek enzim aktivitelerinin, farklı funguslarda farklı inkübasyon sürelerinde elde edildiği görülmektedir. Yapmış olduğumuz çalışmada da en yüksek selülaz ve ksilanaz aktivitesi 3. ve 6. günlerde elde edilmiş olup literatür verileriyle uyumludur. *Pleurotus ostreatus* (y.i) ile bundan sonra yapılacak çalışmalara maksimum enzim aktivitelerinin elde edildiği 3. ve 6. günlerde enzim aktiviteleri belirlenerek devam edilmiştir.

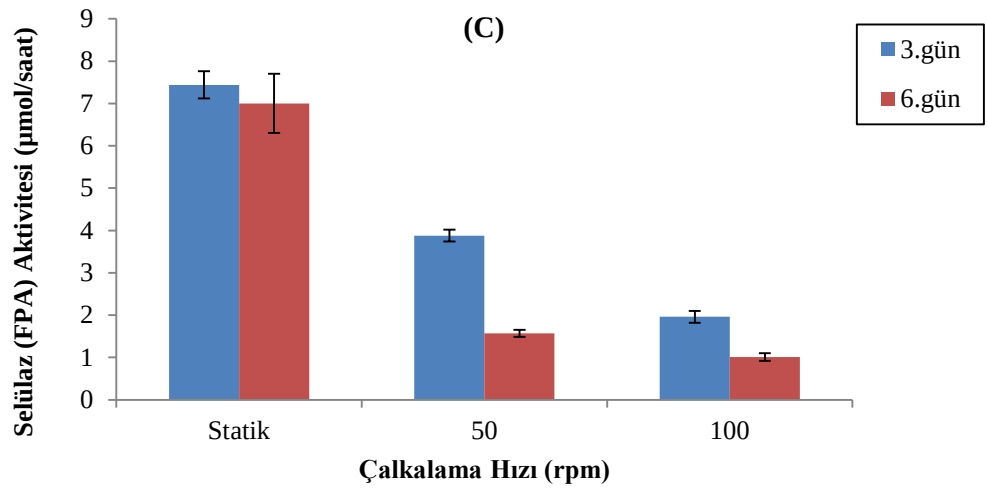
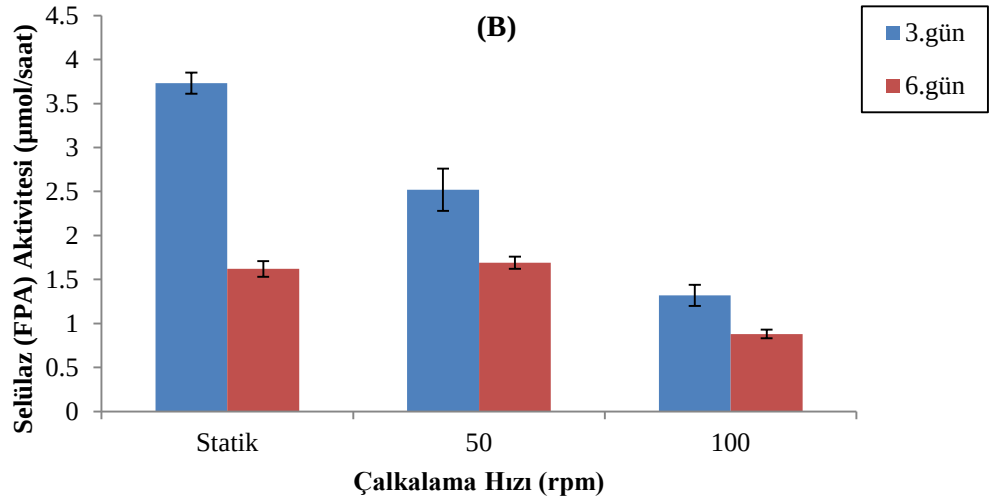
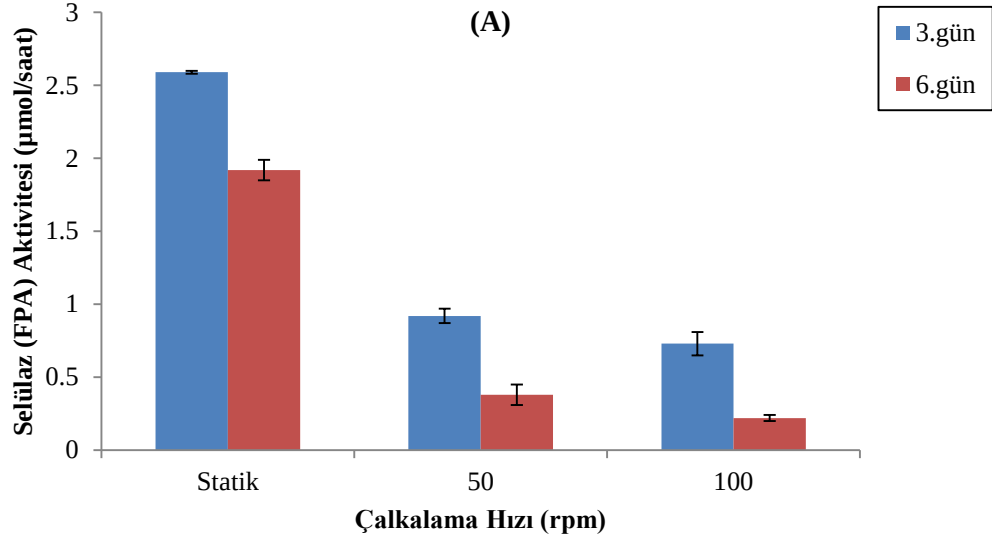
4.2.2. Çalkalama hızının selülaz (FPA ve CMCaz) ve ksilanaz enzim üretimi üzerine etkisi

Bu bölümde, *Pleurotus ostreatus* (y.i) tarafından selülaz (FPA ve CMCaz) ve ksilanaz enzim aktivitesi üzerine farklı çalkalama hızlarının (statik, 50 ve 100 rpm) %10 ZYFA, %20 ZYFA, glukoz içermeyen STO ortamlarında etkisi araştırılmıştır. Fungus kültür ortamlarına 0.5 gr büyük boy pamuk sapı eklenerek 30 °C'de farklı çalkalama hızlarında inkübe edilmiş ve enzim aktivitelerinin yüksek olduğu 3. ve 6. günlerdeki enzim aktivitelerine bakılmıştır.

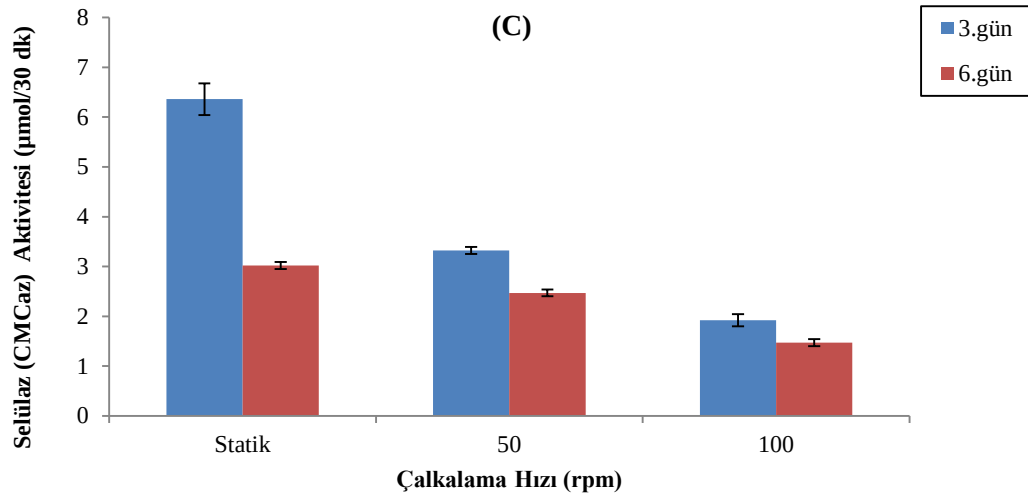
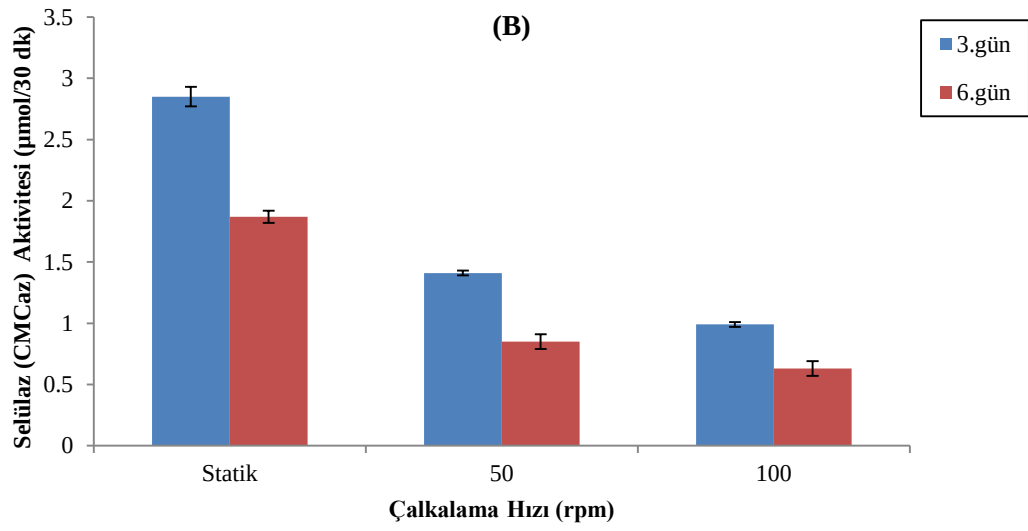
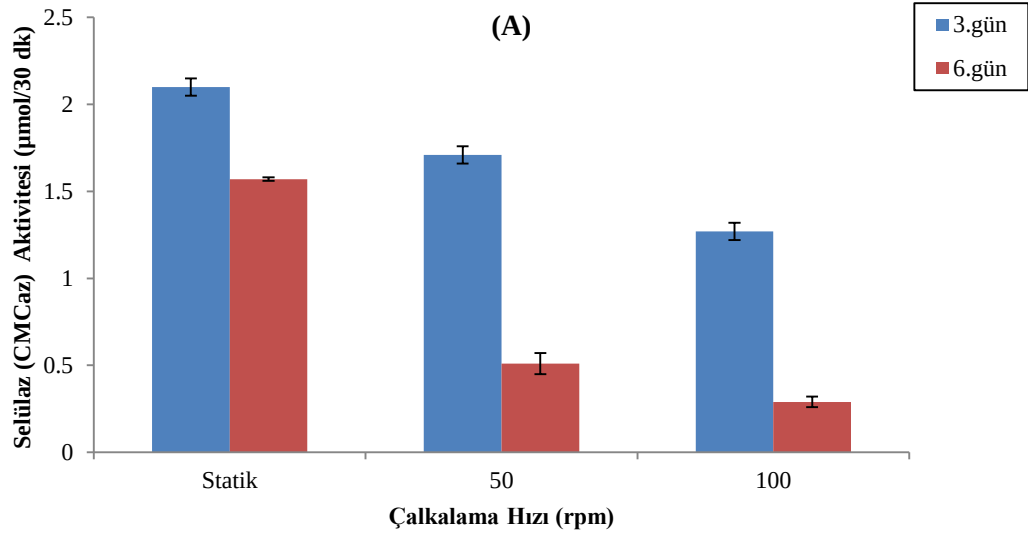
Şekil 4.23 (A, B, C)'de doğal ve sentetik kültür ortamlarında ve farklı çalkalama hızlarında *P. ostreatus* (y.i) tarafından üretilen selüloz (FPA) aktivite değerleri verilmiştir. Her üç kültür ortamında da statik koşullarda daha yüksek enzim aktivite değerleri elde edilmiş olup, en yüksek FPA aktivitesi 3. günde glukoz içermeyen STO ortamında 7.44 $\mu\text{mol/saat}$ olarak belirlenmiştir. %20 ZYFA ortamında 3.73 $\mu\text{mol/saat}$ ve %10 ZYFA ortamında ise 2.59 $\mu\text{mol/saat}$ olarak ölçülmüştür.

Şekil 4.24 (A, B, C)'de doğal ve sentetik kültür ortamlarında ve farklı çalkalama hızlarında *P. ostreatus* (y.i) tarafından üretilen selüloz (CMCaz) aktivite değerleri verilmiştir. CMCaz aktivitesinde de FPA aktivitesinde olduğu gibi tüm kültür ortamlarında statik koşullarda enzim aktivitesi daha yüksektir. En yüksek CMCaz aktivitesi sırasıyla glukoz içermeyen STO ortamında ise 6.36 $\mu\text{mol/30 dk}$, %20 ZYFA ortamında 2.85 $\mu\text{mol/30 dk}$ ve %10 ZYFA ortamında ise 2.1 $\mu\text{mol/30 dk}$ olarak belirlenmiştir.

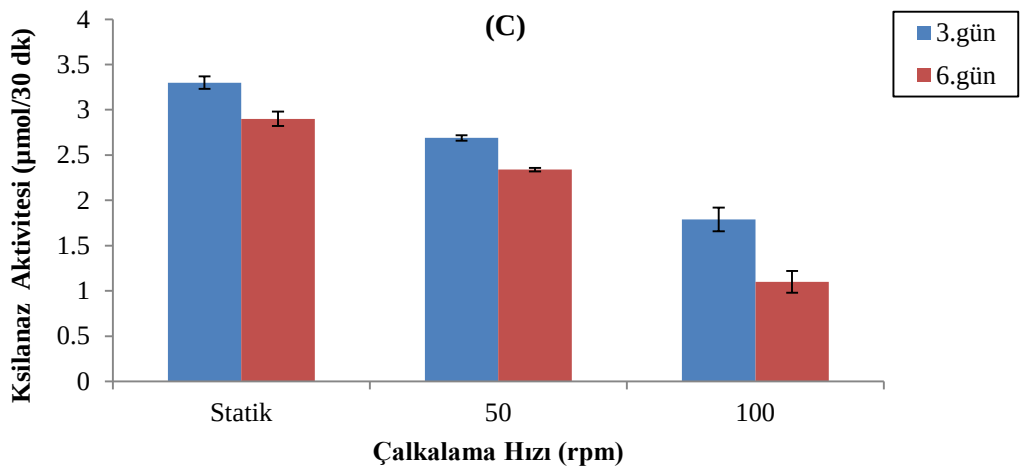
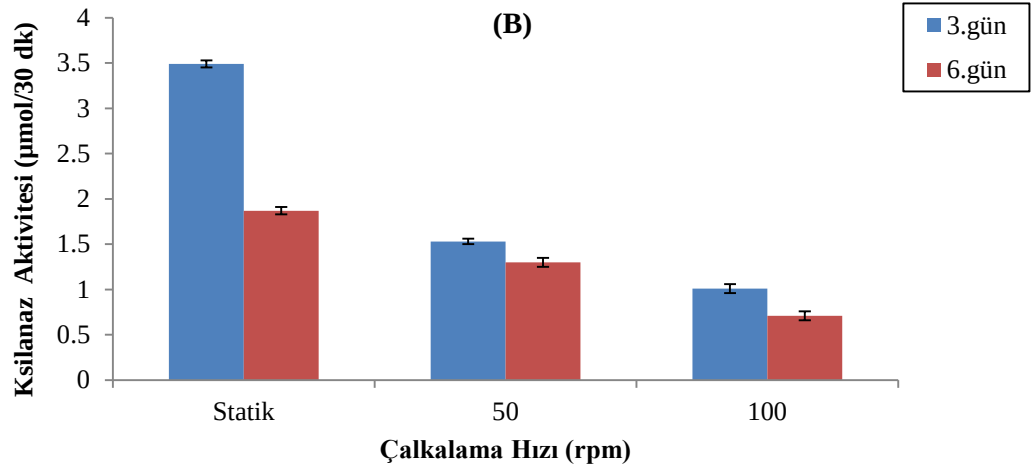
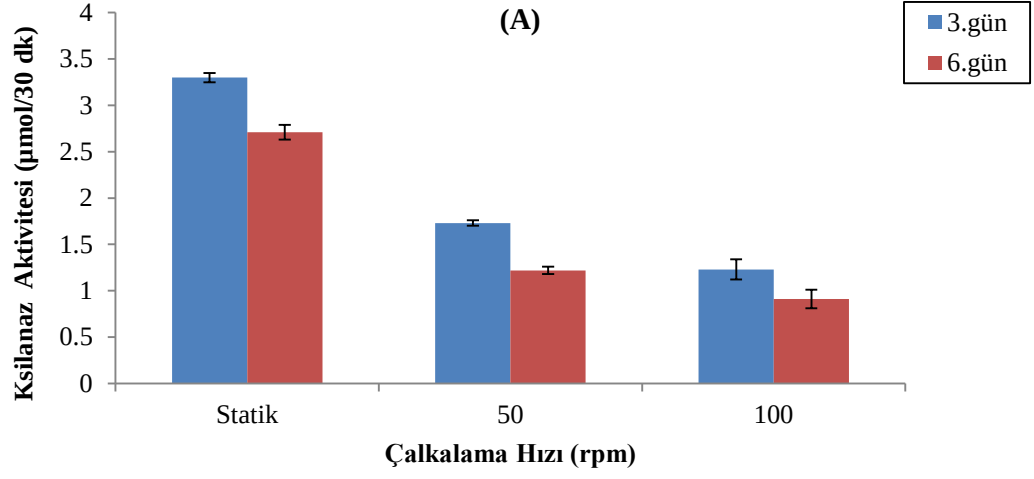
Şekil 4.25 (A, B, C)'de doğal ve sentetik kültür ortamlarında ve farklı çalkalama hızlarında *P. ostreatus* (y.i) tarafından üretilen ksilanaz aktivite değerleri verilmiştir. Şekil 4.25 incelendiğinde statik koşulların özellikle 3. günde ksilanaz aktivitesinin artışında daha etkili olduğu görülmektedir. En yüksek ksilanaz aktivitesi %20 ZYFA ortamında 3.49 $\mu\text{mol/30 dk}$, glukoz içermeyen STO ortamında 3.3 $\mu\text{mol/30 dk}$ ve %10 ZYFA ortamında ise 3.3 $\mu\text{mol/30 dk}$ olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.23. Farklı çalkalama hızlarında A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında üretilen *Pleurotus ostreatus* (y.i) ile 3. ve 6. günlerde elde edilen selülaz (FPA) aktivitesi



Şekil 4.24. Farklı çalkalama hızlarında A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında üretilen *Pleurotus ostreatus* (y.i) ile 3. ve 6. günlerde elde edilen selülag (CMCaz) aktivitesi



Şekil 4.25. Farklı çalkalama hızlarında A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında üretilen *Pleurotus ostreatus* (y.i) ile 3. ve 6. günlerde elde edilen ksilanaz aktivitesi

Pleurotus ostreatus (y.i) ile yapmış olduğumuz çalışma sonucunda selüloz ve ksilanaz enzim aktivitelerinin *P. ostreatus*'da olduğu gibi statik koşullarda daha fazla indüklendiği açıkça görülmektedir.

Abdel-Fatah vd. (2012) tarafından yapılan çalışmada *Aspergillus terreus* DSM 826 fungusu, substrat olarak pirinç kabuğu ve şeker pancarı küspesinin kullanıldığı statik ve 150 rpm çalkalama hızında 30 °C'de 8 gün inkübe edilerek hergün CMCaz enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Çalışma sonucunda en yüksek CMCaz aktivitesi 150 rpm çalkalama hızında, pirinç kabuğu eklenen ortamda 2.36 U/ml, şeker pancarı küspesi eklenen ortamda ise 2.28 U/ml olarak 3. günde elde edilmiştir [205].

4.2.3. İnkübasyon sıcaklığının selüloz (FPA ve CMCaz) ve ksilanaz enzim üretimi üzerine etkisi

Pleurotus ostreatus (y.i) tarafından selüloz ve ksilanaz enzim aktiviteleri üzerine sıcaklığın etkisinin tespit edilebilmesi için yapılan çalışmada funguslar farklı sıcaklıklara (20, 30, 40, 50 °C) ayarlanmış inkübatörlerde statik koşullarda inkübe edilerek enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Kültür ortamlarına 0.5 gr büyük boy pamuk sapı eklenerek 3. ve 6. günlerdeki enzim aktiviteleri belirlenmiştir.

Şekil 4.26 (A, B, C)'da doğal ve sentetik kültür ortamlarında ve farklı inkübasyon sıcaklıklarında *P. ostreatus* (y.i) tarafından üretilen selüloz (FPA) aktivite değerleri verilmiştir. Her üç kültür ortamında da FPA aktivitelerinin yüksek olduğu 3. günleri incelediğimizde, %10 ZYFA, %20 ZYFA ve glukoz içermeyen STO ortamlarında sırasıyla 40 °C, 30 °C, 30 °C'nin etkili olduğu görülmektedir.

Şekil 4.27 (A, B, C)'de doğal ve sentetik kültür ortamlarında ve farklı inkübasyon sıcaklıklarında *P. ostreatus* (y.i) tarafından üretilen selüloz (CMCaz) aktivite değerleri verilmiştir. %10 ZYFA ortamında en yüksek CMCaz aktivitesi 40 °C'de gözlenmiştir. Diğer sıcaklıklarda ise enzim aktivitesinde azalma görülmektedir. %20 ZYFA ve glukoz içermeyen STO ortamlarında ise 30 °C'ye kadar bir artış devamında ise kademeli olarak enzim aktivitesinde azalma gözlenmektedir.

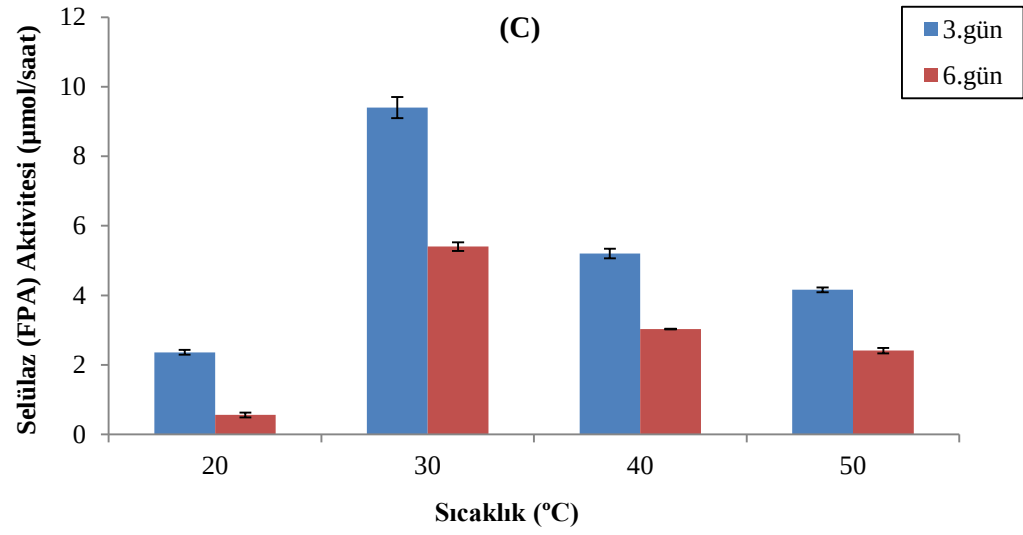
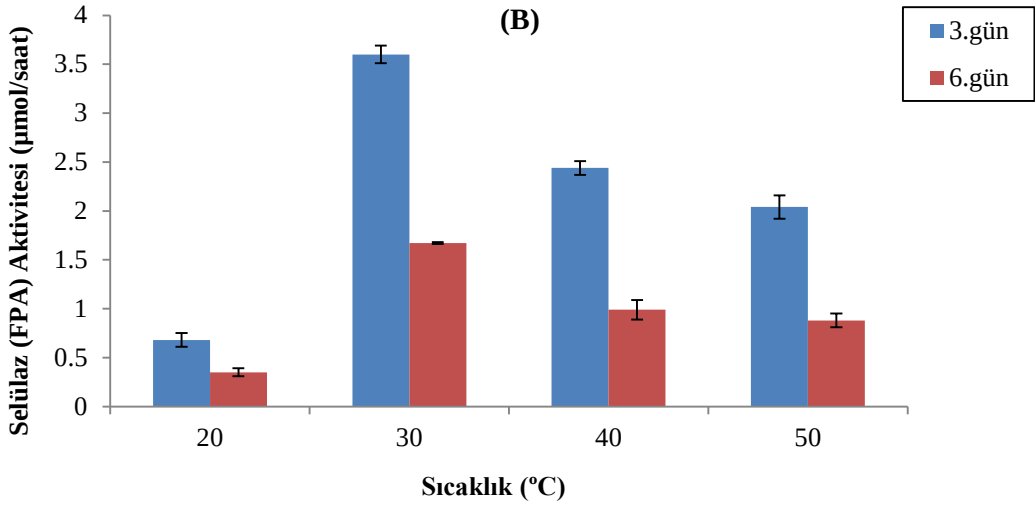
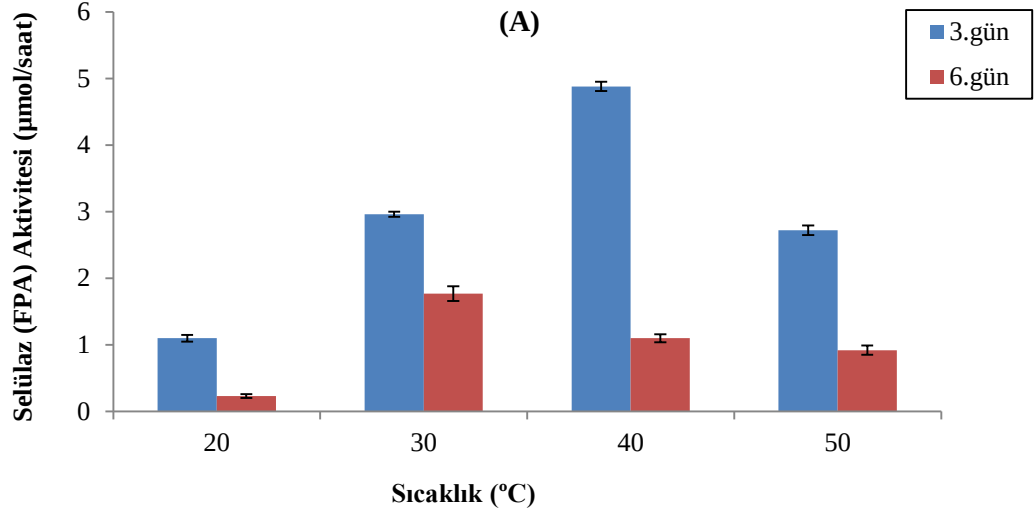
Şekil 4.28 (A, B, C)'de doğal ve sentetik kültür ortamlarında ve farklı inkübasyon sıcaklıklarında *P. ostreatus* (y.i) tarafından üretilen ksilanaz aktivite değerleri verilmiştir. Tüm kültür ortamlarında 30 °C'de diğer sıcaklıklara göre daha yüksek ksilanaz aktivitesi belirlenmiştir.

Qinnghe vd. (2004) tarafından yapılan çalışmada *Pleurotus ostreatus* SYJ 042 substrat olarak mısır koçanı ve buğday kepeği eklenerek 25, 40, 50, 60, 70 °C'de 11 günlük inkübasyon sonucunda en uygun inkübasyon sıcaklığının 25-40 °C arasında pH 6.0'da olduğu belirlenmiştir. Bu kültür koşulları altında maksimum ksilanaz aktivitesi 24.98 U/ml olarak 7. günde gözlenmiştir [166].

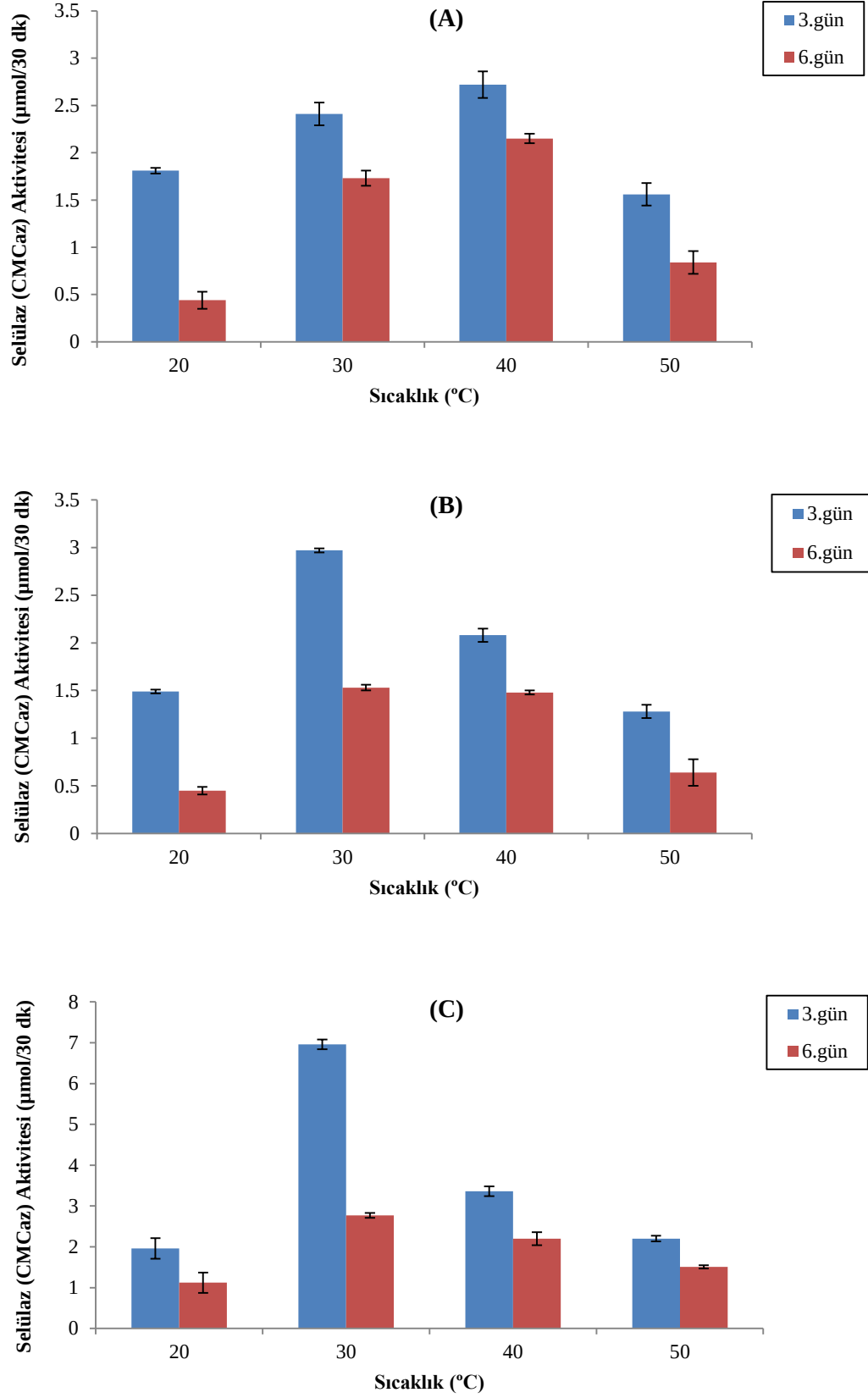
Soni vd. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada ise *Aspergillus fumigatus* fresenius suşu katı substratfermentasyon sürecinde pirinç kabuğu ve küspe kullanılarak 30, 35, 40, 45, 50 °C'de inkübasyon sonucunda en uygun inkübasyon sıcaklığının 45 °C olduğu belirlenmiş olup FPA, ksilanaz enzim aktiviteleri sırasıyla 9.73, 2800 U/g olarak rapor edilmiştir [180].

Li vd. (2006) tarafından yapılan çalışmada *Paecilomyces thermophila* J18 substrat olarak mısır koçanı (0.45-0.9 mm) kullanılan ortamda 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 °C'de 7 günlük inkübasyon periyodunda en yüksek ksilanaz enzim aktivitesi 5. günde 50 °C'de 1470 U/ml olarak belirlenmiştir [206].

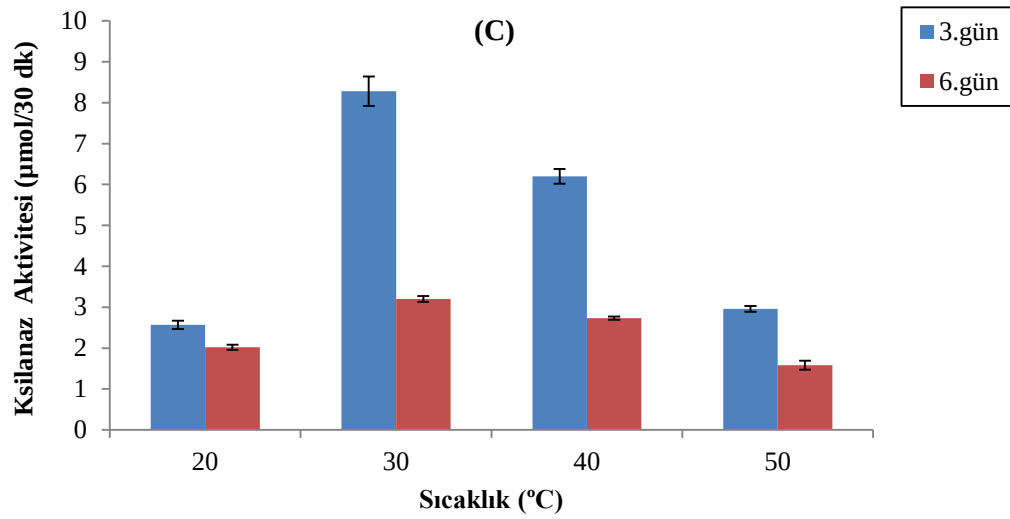
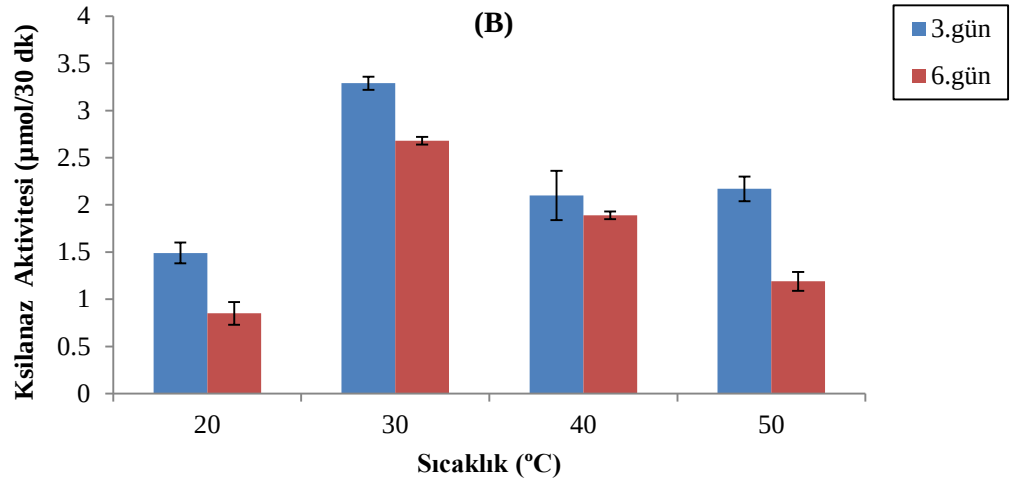
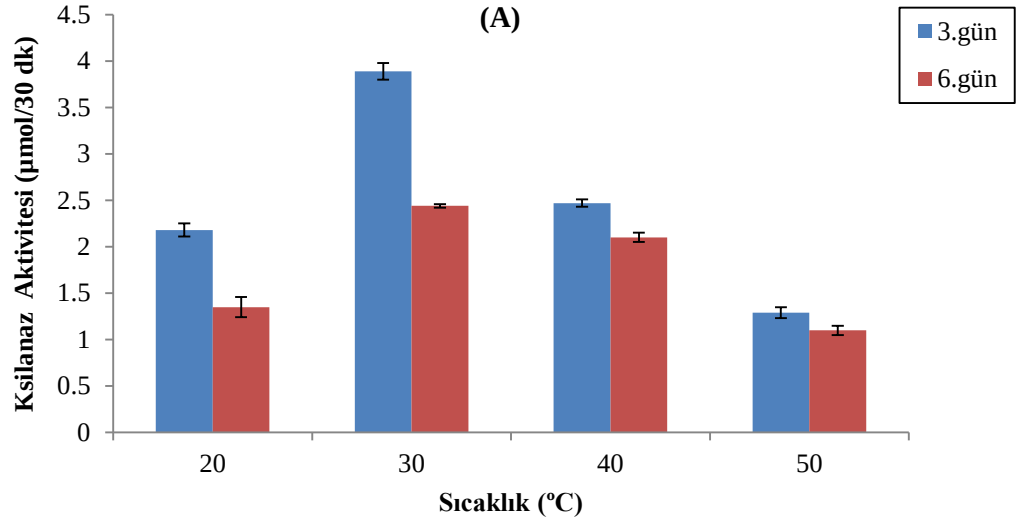
Çalışmamızda da *P. ostreatus* (y.i) ile maksimum enzim aktivite değerlerinin elde edildiği sıcaklıklar 30-40 °C olarak belirlenmiş olup, bu veriler literatür ile benzerlik göstermektedir.



Şekil 4.26. *Pleurotus ostreatus* (y.i) ile farklı inkübasyon sıcaklıklarında A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında 3. ve 6. günlerde elde edilen selülaz (FPA) aktivitesi



Şekil 4.27. *Pleurotus ostreatus* (y.i) ile farklı inkübasyon sıcaklıklarında A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında 3. ve 6. günlerde elde edilen selülag (CMCaz) aktivitesi



Şekil 4.28. *Pleurotus ostreatus* (y.i) ile farklı inkübasyon sıcaklıklarında A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında 3. ve 6. günlerde elde edilen ksilanaz aktivitesi

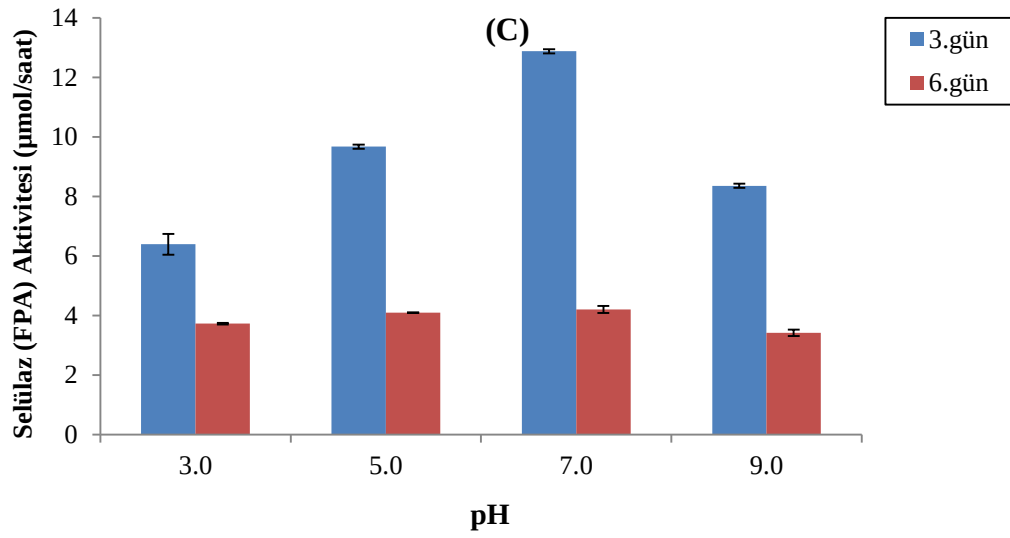
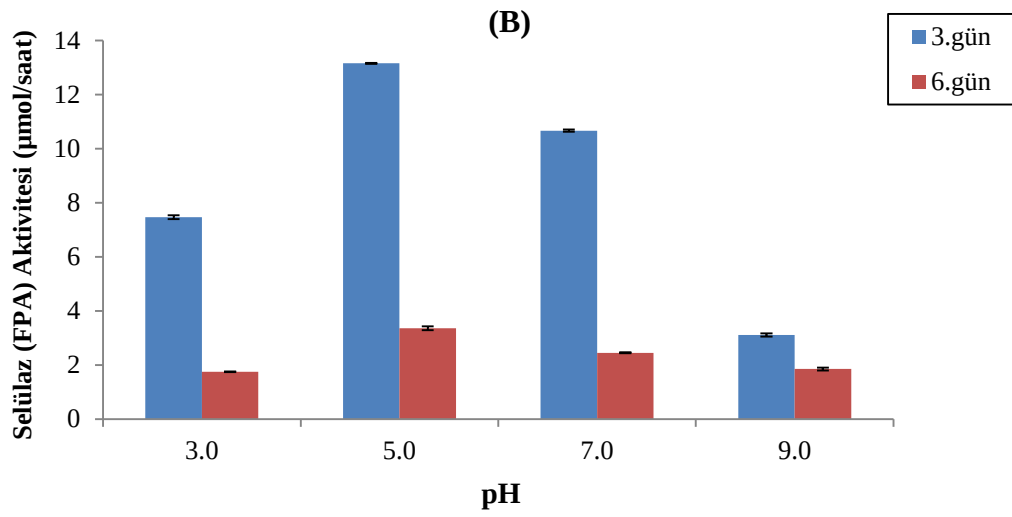
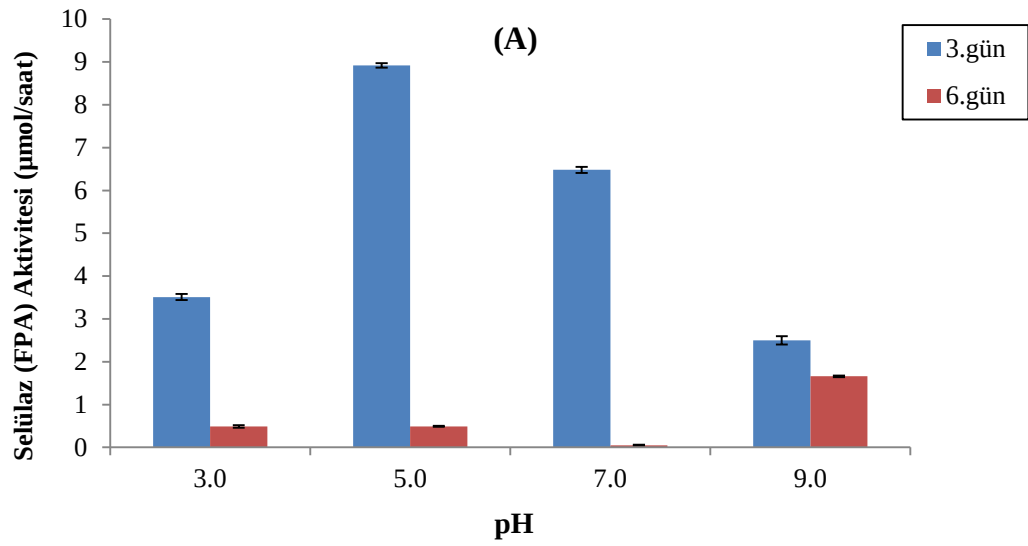
4.2.4. Besiyeri pH'sının selülaz (FPA ve CMCaz) ve ksilanaz enzim üretimi üzerine etkisinin saptanması

Pleurotus ostreatus (y.i)'un selülaz ve ksilanaz üretimi açısından en uygun ortam pH'sının tespit edilmesi amacıyla, fungus %10 ZYFA, %20 ZYFA ve glukoz içermeyen STO kültür ortamlarının pH'sı 3.0, 5.0, 7.0, 9.0'a ayarlanarak 30 °C'de statik koşullarda inkübe edilmiştir. Kültür ortamlarına 0.5 gr büyük boy pamuk sapı eklenerek 3. ve 6. günlerdeki enzim aktiviteleri ölçülmüştür.

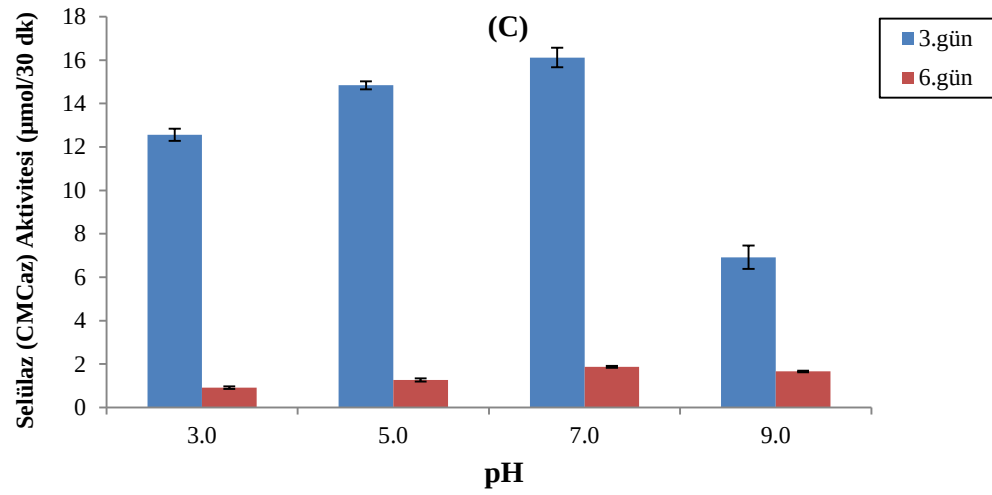
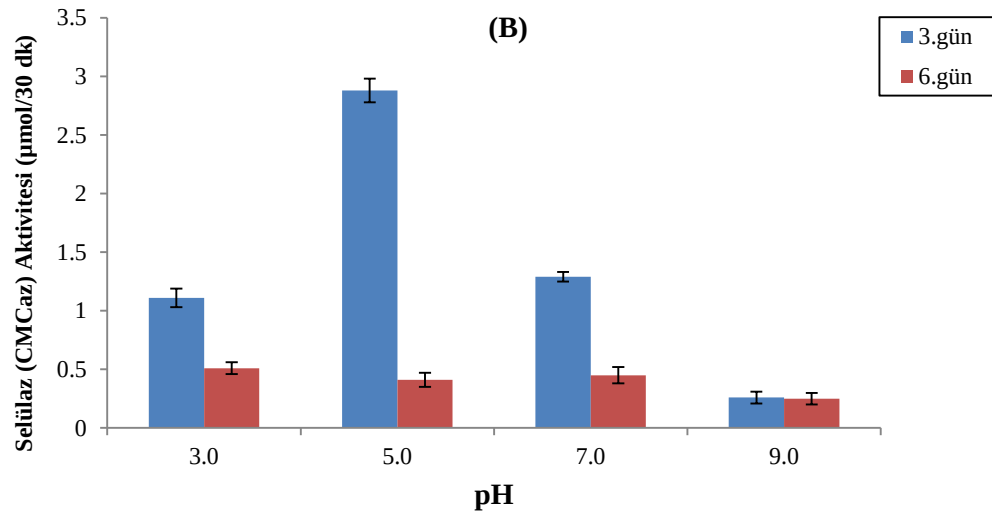
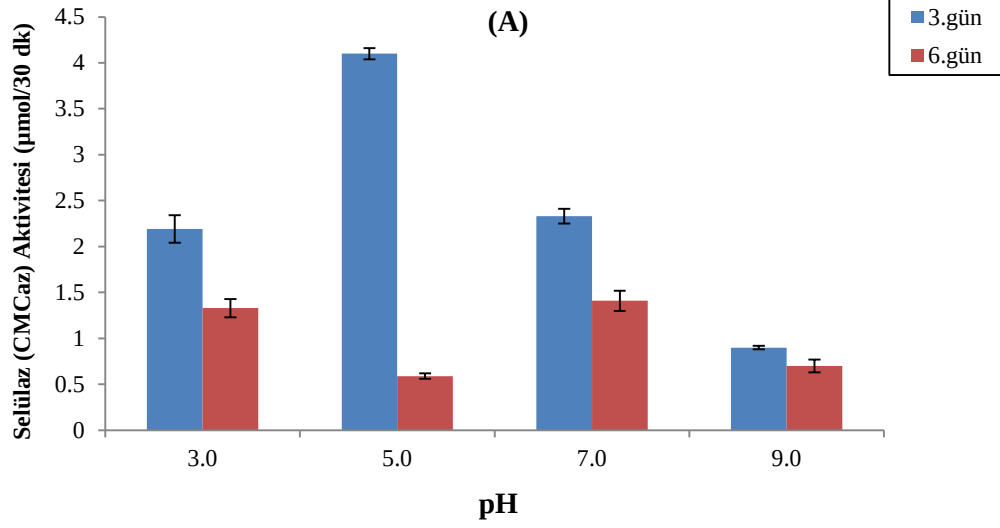
Şekil 4.29 (A, B, C)'da doğal ve sentetik kültür ortamlarında ve farklı pH'larda *P. ostreatus* (y.i) tarafından üretilen selülaz (FPA) aktivite değerleri verilmiştir. 3. ve 6. günlerde en yüksek enzim aktivitesi %10 ZYFA ve %20 ZYFA ortamında pH 5.0'da, glukoz içermeyen STO ortamında ise pH 7.0'da belirlenmiştir.

Şekil 4.30 (A, B, C)'da doğal ve sentetik kültür ortamlarında ve farklı pH'larda *P. ostreatus* (y.i) tarafından üretilen selülaz (CMCaz) aktivite değerleri verilmiştir. CMCaz aktivitelerinin daha yüksek olduğu 3. günler incelendiğinde %10 ZYFA ve %20 ZYFA ortamında pH 5.0'ın, glukoz içermeyen STO ortamında ise pH 7.0'ın enzim üretimini daha fazla indüklediği görülmektedir.

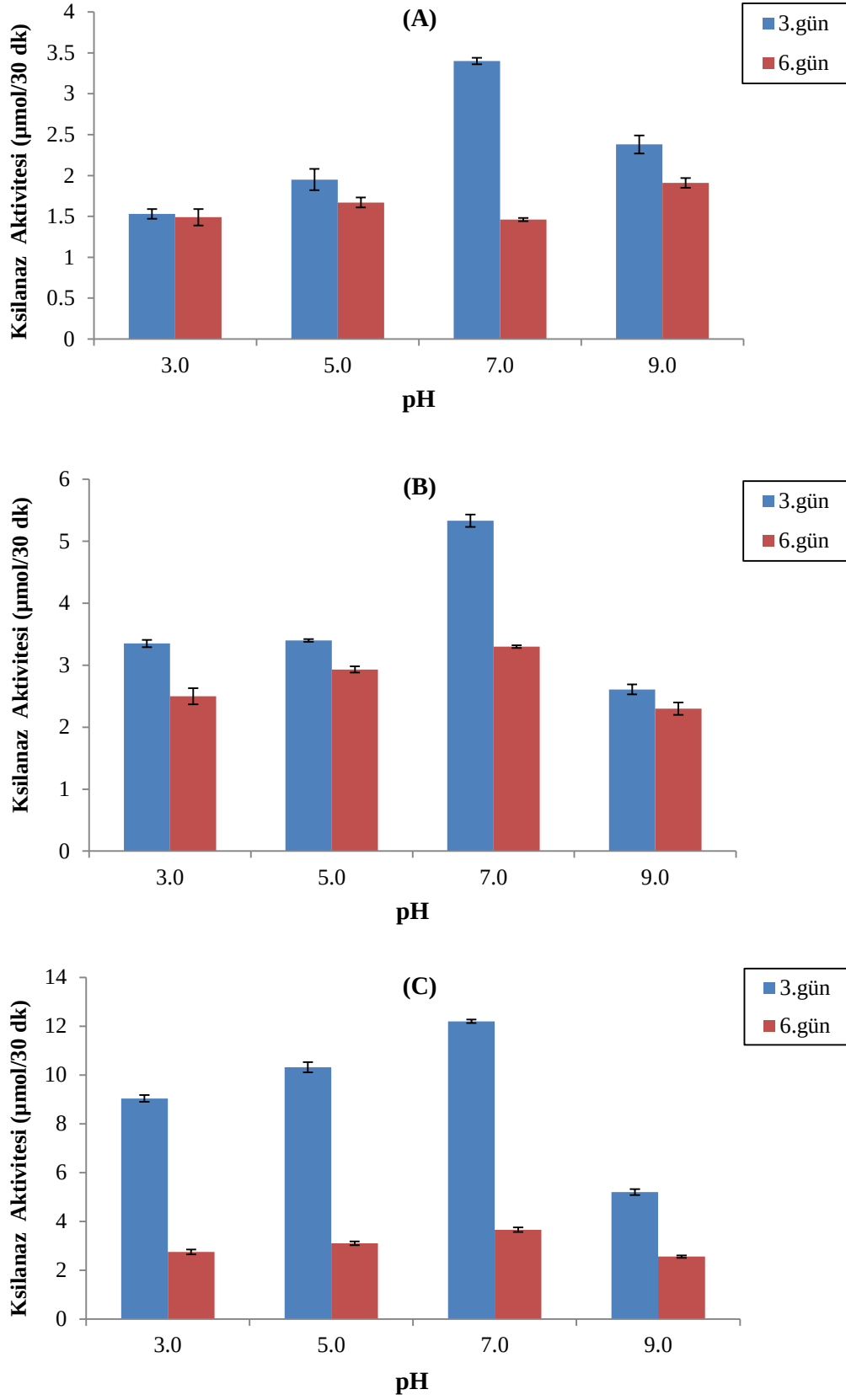
Şekil 4.31 (A, B, C)'de doğal ve sentetik kültür ortamlarında ve farklı pH'larda *P. ostreatus* (y.i) tarafından üretilen ksilanaz aktivite değerleri verilmiştir. Tüm kültür ortamlarında en yüksek ksilanaz aktivitesi pH 7.0'da belirlenmiştir.



Şekil 4.29. *Pleurotus ostreatus* (y.i) ile farklı başlangıç pH'larında A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında 3. ve 6. günlerde elde edilen selülaz (FPA) aktivitesi



Şekil 4.30. *Pleurotus ostreatus* (y.i) ile farklı başlangıç pH'larında A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında 3. ve 6. günlerde elde edilen selüloz (CMCaz) aktivitesi



Şekil 4.31. *Pleurotus ostreatus* (y.i) ile farklı başlangıç pH'larında A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında 3. ve 6. günlerde elde edilen ksilanaz aktivitesi

Singh vd. (2009) tarafından yapılan benzer bir çalışmada *Coprinellus disseminatus*'un yabani suşları (SH-1 ve SH-2) katı hal fermentasyonu ile 37 °C ortam pH'sı 4.0, 6.0, 8.0, 10, 12 ayarlanmış ve en uygun pH 6.4 olarak tespit edilmiştir. 7 günlük inkübasyon sürecinde buğday kepeği eklenen ortamda yüksek ksilanaz ve çok düşük CMCaz aktivitesini rapor etmişlerdir [75].

Farinas vd. (2010) tarafından *Aspergillus niger* soyları kullanılarak katı substrat fermentasyonu ile ortam pH'sı 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 olarak ayarlanmış ve en uygun pH 4.0-5.5 arasında belirlenmiştir. En yüksek enzimatik aktivite (selülaz, ksilanaz) değerleri 55 °C'de pH 4.5'de elde edilmiştir [182].

Pleurotus ostreatus (y.i) ile yapmış olduğumuz çalışma sonucunda en yüksek selülaz ve ksilanaz enzim üretim aktiviteleri için, başlangıç pH'sının 5-7 aralığında olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlarımızın literatür verilerini destekler niteliktedir.

4.3. Pamuk Sapı Dışında Farklı Lignoselülozik İndüktörlerin Selülaz (CMCaz) ve Ksilanaz Enzim Üretimi Üzerine Etkisi

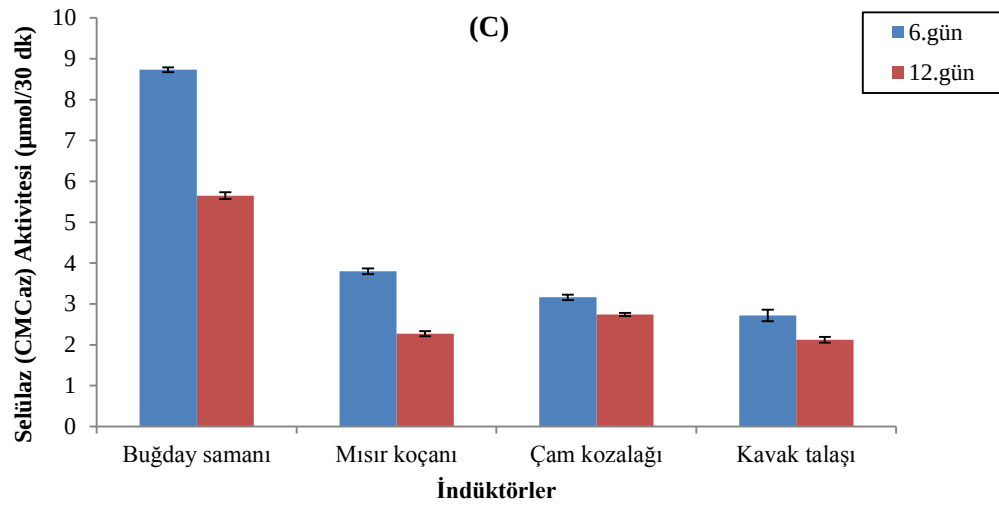
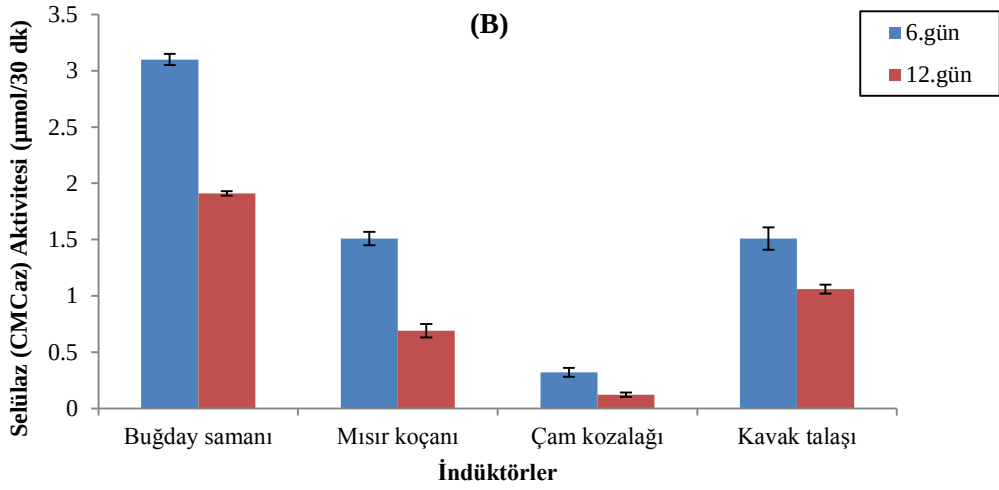
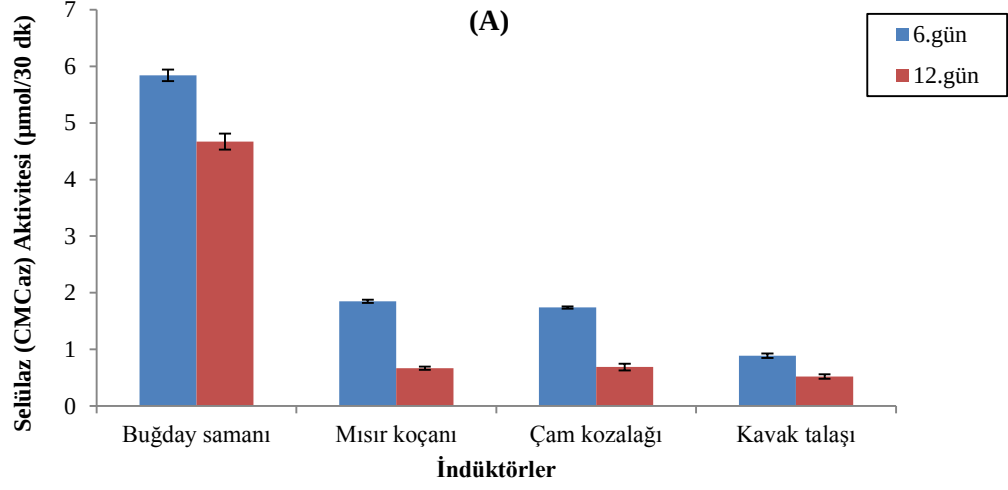
Çalışmalarımızın bundan sonraki kısımlarında, pamuk sapı dışında farklı lignoselülozik indüktörlerin (buğday samanı, mısır koçanı, çam kozalağı ve kavak talaşı) selülaz (CMCaz) ve ksilanaz enzim üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla bahsi geçen indüktörler %10, %20 ZYFA ve glukoz içermeyen STO ortamlarına 0.5 gr olacak şekilde eklenmiş ve funguslar 30 °C statik koşullarda inkübe edilmiştir. Enzim aktiviteleri, *Pleurotus ostreatus*'da en iyi enzim aktivitesinin gözlemlendiği 6. ve 12. günlerde, *Pleurotus ostreatus* (y.i)'da ise 3. ve 6. günlerde ölçülmüştür.

4.3.1. *Pleurotus ostreatus* ile farklı indüktörlerin eklendiği ortamlarda elde edilen selülaz (CMCaz) ve ksilanaz enzim aktiviteleri

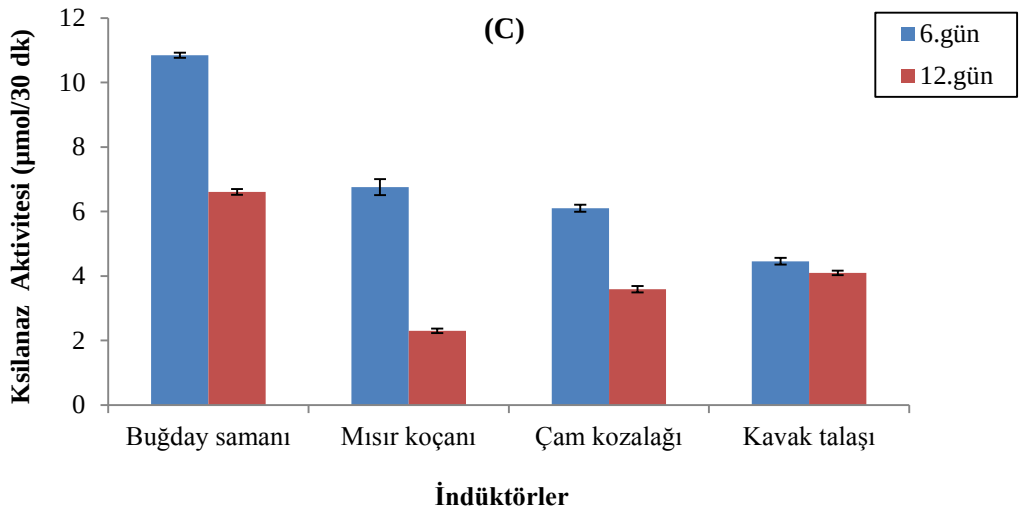
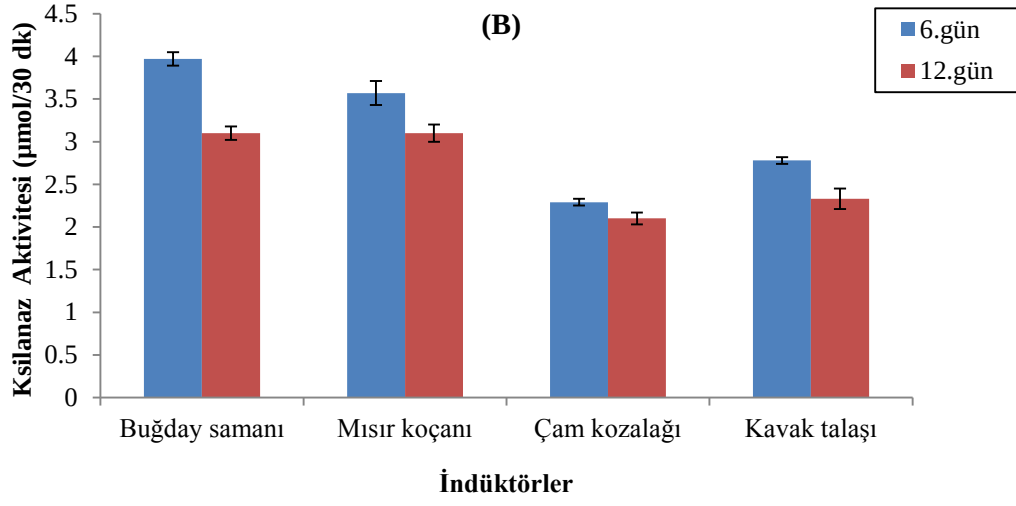
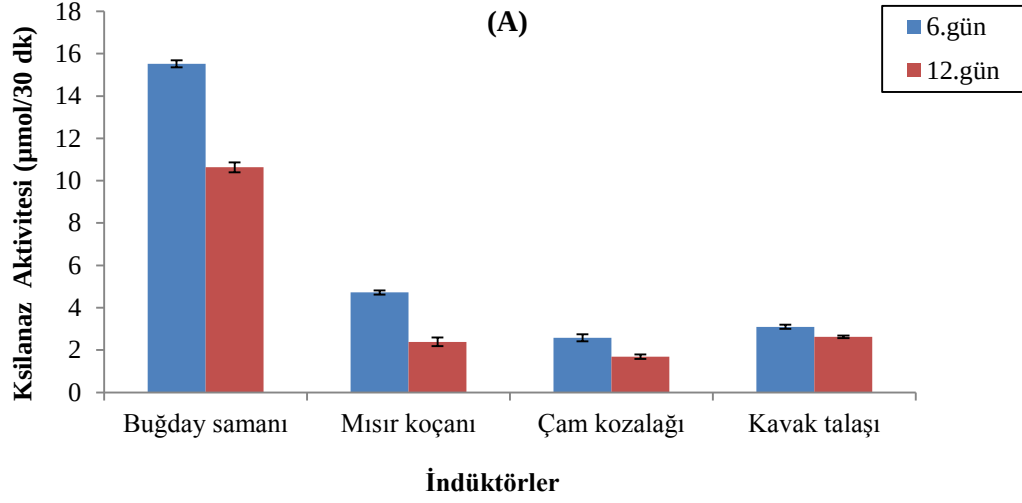
Şekil 4.32 (A, B, C)'de *Pleurotus ostreatus* ile farklı indüktörlerin eklendiği kültür ortamlarında 6. ve 12. günlerde elde edilen selülaz (CMCaz) enzim aktivitesi değerleri gösterilmiştir. Her üç kültür ortamında da buğday samanının diğer

indüktörlere göre CMCaz aktivitesini daha fazla arttırdığı, diğer üç indüktörün (mısır koçanı, çam kozalağı ve kavak talaşı) ise enzim aktivitesini benzer şekilde etkilediği görülmektedir. En yüksek CMCaz aktivitesi 6. günde buğday samanı eklenmiş %10, %20 ZYFA ve glukoz içermeyen STO ortamlarında sırasıyla 5.84, 3.1, 8.73 $\mu\text{mol}/30\text{ dk}$ olarak belirlenmiştir.

Şekil 4.33 (A, B, C)'de ise *Pleurotus ostreatus* ile farklı indüktörlerin eklendiği kültür ortamlarında 6. ve 12. günlerde elde edilen ksilanaz enzim aktiviteleri karşılaştırılarak verilmiştir. CMCaz aktivitesinde olduğu gibi ksilanaz aktivitesinde de buğday samanının enzim aktivitesini daha fazla indüklediği açıkça görülmektedir. En yüksek ksilanaz aktivitesi 6. günde buğday samanı eklenmiş %10, %20 ZYFA ve glukoz içermeyen STO ortamlarında sırasıyla 15.52, 3.97, 10.85 $\mu\text{mol}/30\text{ dk}$ olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.32. *Pleurotus ostreatus* ile farklı indüktörlerin eklendiği A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında 6. ve 12. günlerde elde edilen selülaz (CMCaz) aktivitesi

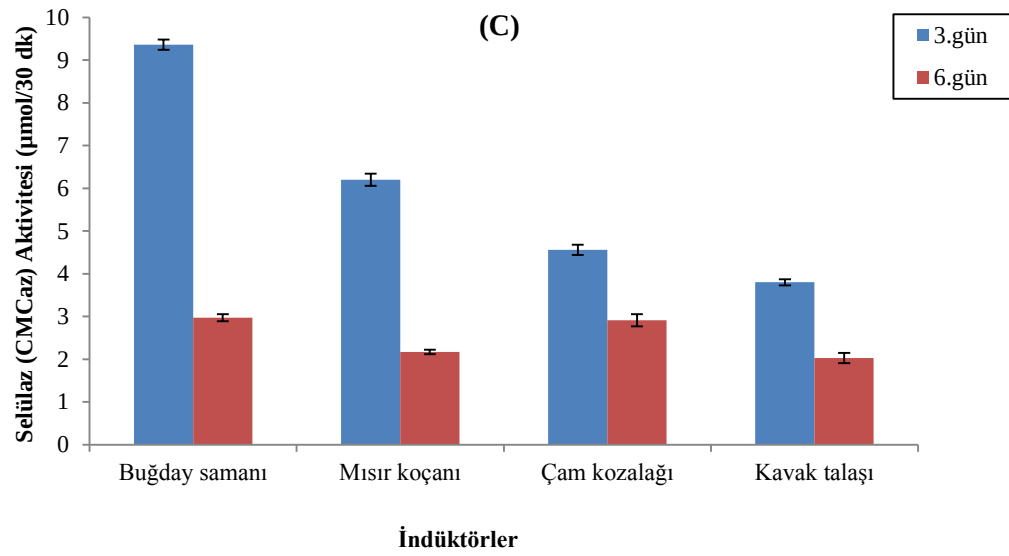
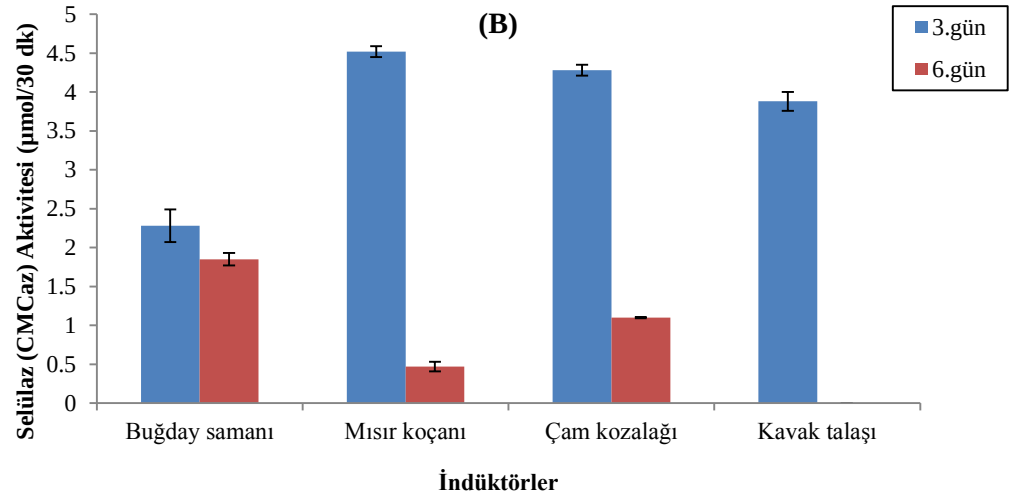
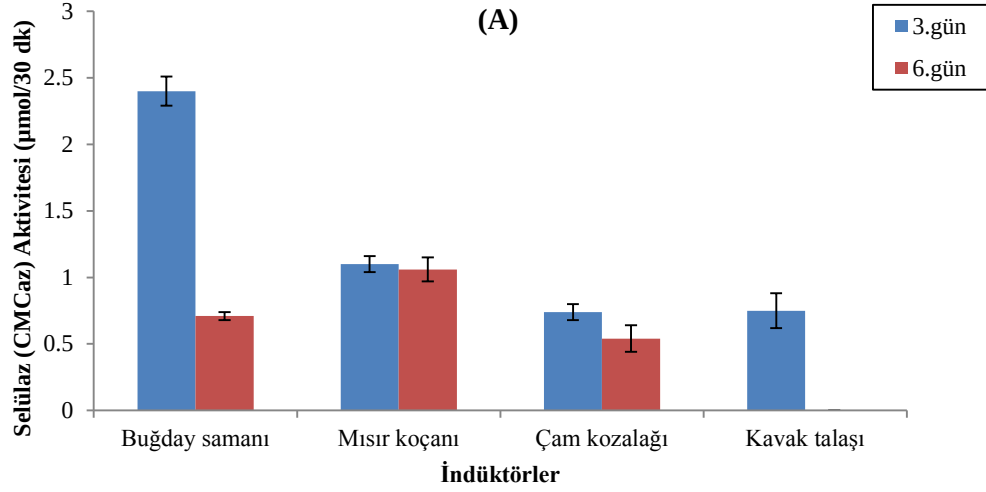


Şekil 4.33. *Pleurotus ostreatus* ile farklı indüktörlerin eklendiği A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında 6. ve 12. günlerde elde edilen ksilanaz aktivitesi

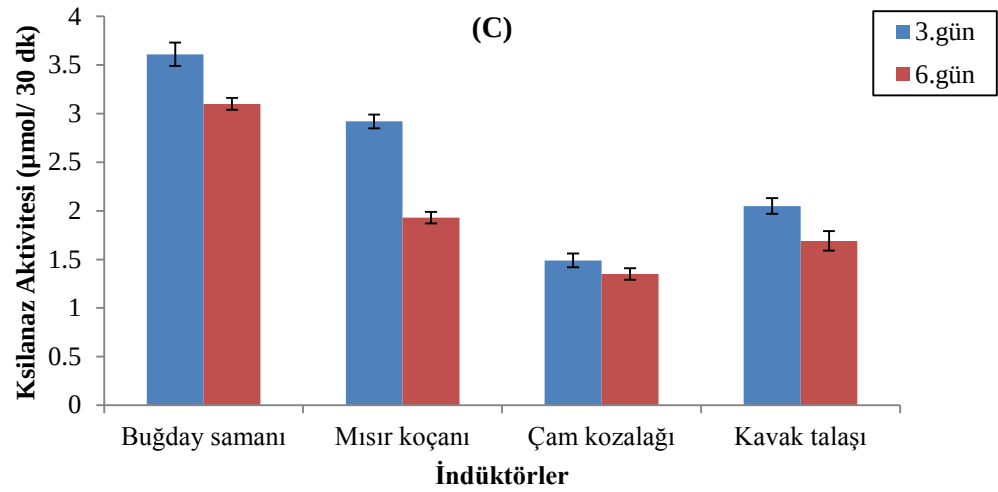
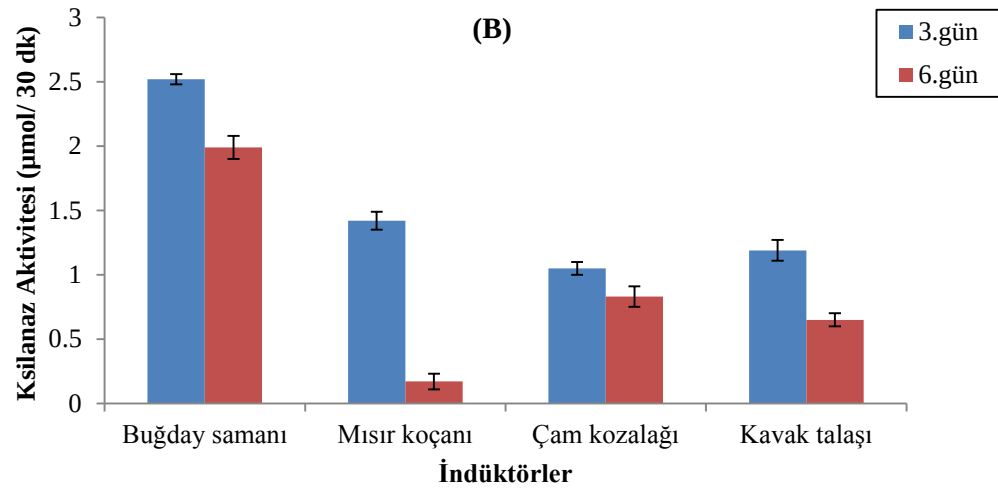
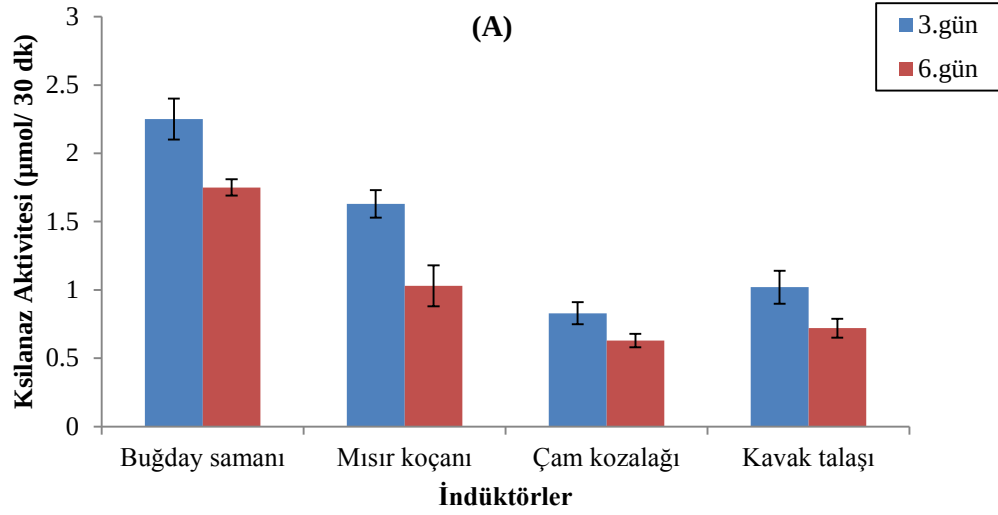
4.3.2. *Pleurotus ostreatus* (y.i) ile farklı indüktörlerin eklendiği ortamlarda elde edilen selülaz (CMCaz) ve ksilanaz enzim aktiviteleri

Şekil 4.34 (A, B, C)'de *Pleurotus ostreatus* (y.i) ile farklı indüktörlerin eklendiği kültür ortamlarında 3. ve 6. günlerde elde edilen selülaz (CMCaz) enzim aktivitesi verilmiştir. Şekil 4.34 (A, B, C) incelendiği zaman, buğday samanı ve mısır koçanının CMCaz enzim aktivitesini diğer lignoselülozik atıklara göre daha fazla indüklediği görülmektedir. En yüksek CMCaz enzim aktivitesi 3. günde %10 ZYFA+buğday samanı eklenmiş ortamda 2.4 $\mu\text{mol}/30\text{ dk}$, %20 ZYFA+mısır koçanı eklenen ortamda 4.52 $\mu\text{mol}/30\text{ dk}$ ve glukoz içermeyen STO+buğday samanı eklenen ortamda ise 9.36 $\mu\text{mol}/30\text{ dk}$ olarak ölçülmüştür.

Şekil 4.35 (A, B, C)'de *Pleurotus ostreatus* (y.i) ile farklı indüktörlerin eklendiği kültür ortamlarında 3. ve 6. günlerde elde edilen ksilanaz enzim aktivitesi değerleri verilmiştir. CMCaz aktivitesinde olduğu gibi buğday samanı ve mısır koçanı ksilanaz enzim aktivitesinide diğer indüktörlere göre daha fazla arttırmış, ancak en yüksek ksilanaz aktivitesi buğday samanı eklenmiş tüm kültür ortamlarında elde edilmiştir. Buna göre 3. günde buğday samanı eklenmiş %10, %20 ZYFA ve glukoz içermeyen STO ortamlarında ksilanaz aktivitesi sırasıyla 2.25, 2.52, 3.61 $\mu\text{mol}/30\text{ dk}$ olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.34. *Pleurotus ostreatus* (y.i) ile farklı indüktörlerin eklendiği A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında 3. ve 6. günlerde elde edilen selülag (CMCaz) aktivitesi



Şekil 4.35. *Pleurotus ostreatus* (y.i) ile farklı indüktörlerin eklendiği A (%10 ZYFA), B (%20 ZYFA) ve C (glukozsuz STO) ortamlarında 3. ve 6. günlerde elde edilen ksilanaz aktivitesi

Şekiller (Şekil 4.32, 4.33, 4.34, 4.35) incelendiğinde her iki beyaz çürükçül fungus için buğday samanı ve mısır koçanının enzim aktivitelerini (CMCaz ve ksilanaz) diğer iki indüktöre göre daha fazla arttırdığı gözlenmektedir.

Li vd. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada *Paecilomyces thermophila* J18 ile substrat olarak mısır koçanı, mısır samanı, buğday samanı, buğday kepeği, pirinç samanı ve şeker pancarı küspesi kullanılan ortamda 7 günlük inkübasyon periyodunda en yüksek ksilanaz enzim aktivitesi 50 °C’ de 5. günde elde edilmiştir. En yüksek ksilanaz aktivitesi (998 U/ml) mısır koçanı eklenen ortamda belirlenmiş olup, daha sonra en yüksek aktivitenin buğday samanı eklenen ortamda (543 U/ml) elde edildiği rapor edilmiştir [206].

Qinnghe vd. (2004) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise *Pleurotus ostreatus* SYJ 042 fungusu substrat olarak belli oranlarda mısır koçanı ve buğday kepeği eklenen ortamda 11 gün inkübe edilmiş ve ksilanaz enzim aktiviteleri incelenmiştir. Sonuçta %5 mısır koçanı eklenen ortamda ksilanaz aktivitesi 1.87 U/ml, %5 buğday kepeği eklenen ortamda 2.67 U/ml, %2.5 mısır koçanı+%2.5 buğday kepeği eklenen ortamda ise en yüksek ksilanaz aktivitesi 3.04 U/ml olarak belirlenmiştir [166].

Yang vd. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada ise termofilik *Paecilomyces thermophila* J18 fungusu farklı lignoselülozik substratlar (buğday kepeği, buğday samanı, şeker pancarı küspesi, mısır kabukları, pirinç kabukları) kullanılarak statik koşullarda 7 gün inkübe edilmiş ve buğday samanı içeren ortamda diğer substratlara oranla daha yüksek enzim aktivitesi (7745 U/g) elde edilmiştir [198].

Abd El-Nasser vd. (1997) tarafından yapılan bir çalışmada *Phanerochaete chrysosporium* NRRL 6539 fungusu substrat olarak şeker pancarı küspesi, buğday samanı, mısır koçanı içeren ortamlarda, 30 °C’de 7 günlük inkübe edilmiş ve en yüksek selülaz aktivitesi sırasıyla buğday samanında (2.4 U/ml), mısır koçanında (1.5 U/ml) ve şeker pancarı küspesinde ise 0.6 U/ml olarak belirlenmiştir. Ksilanaz aktivitesi ise aynı sırayla 21.9, 16.2, 11.1 U/ml olduğu rapor edilmiştir [160].

Çalışma sonuçlarımız literatürde daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu olup, her üç kültür ortamında da CMCaz ve ksilanaz aktivitelerini en fazla indükleyen indüktör olarak buğday samanı ve mısır koçanı belirlenmiştir. Bizim çalışmamızın sonuçları ve literatürdeki diğer çalışmaların sonuçlarına göre, buğday samanı ve

mısır koçanının endüstriyel amaçla lignoselülozik enzim üretiminde indüktör olarak kullanılabileceği söylenebilir.

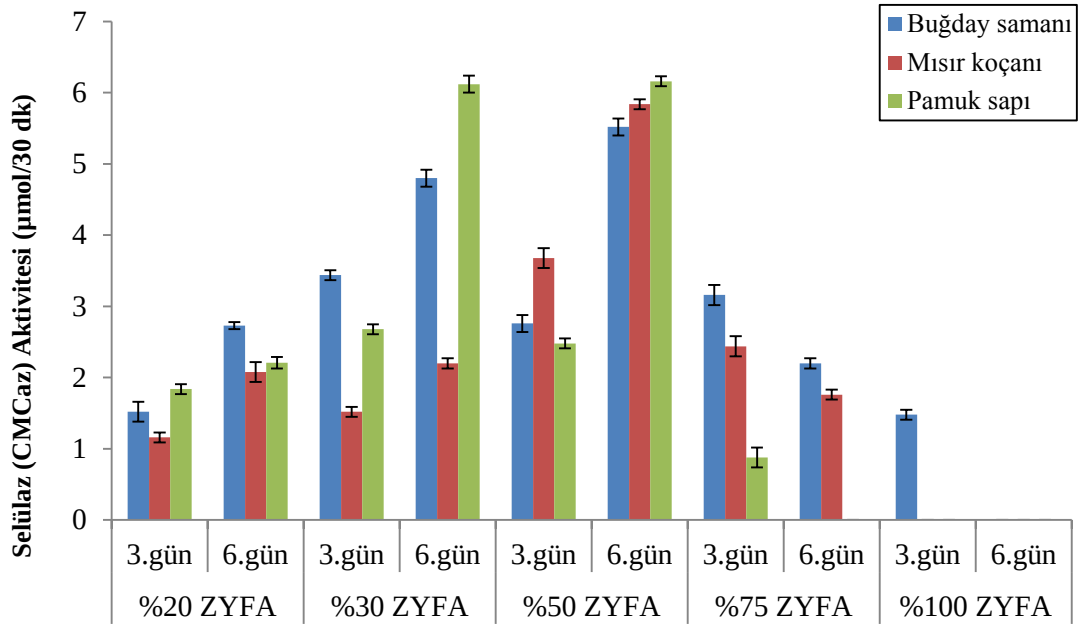
4.4. Farklı Konsantrasyonlardaki ZYFA Ortamlarında Elde Edilen Selülag (CMCaz) ve Ksilanaz Enzim Aktiviteleri, Renk Giderimi Değerleri

Çalışmamızın bundan sonraki kısmında, *Pleurotus ostreatus* ve *Pleurotus ostreatus* (y.i) ile selülag (CMCaz) ve ksilanaz enzim üretim sürecinde doğal besiyeri olarak kullanılan ZYFA'nın farklı konsantrasyonlarının enzim üretimine etkisi ve bu süreçte atığın kirlilik parametrelerinde meydana gelen değişim belirlenmiştir. Bu amaçla her iki fungus ile farklı indüktörleri (pamuk sapı, buğday samanı ve mısır koçanı) içeren ortamlarda ZYFA'nın renk giderim değerlerinde meydana gelen değişimlerin yanısıra selülag ve ksilanaz enzim aktiviteleri 3. ve 6. günlerde optimum koşullarda incelenmiştir.

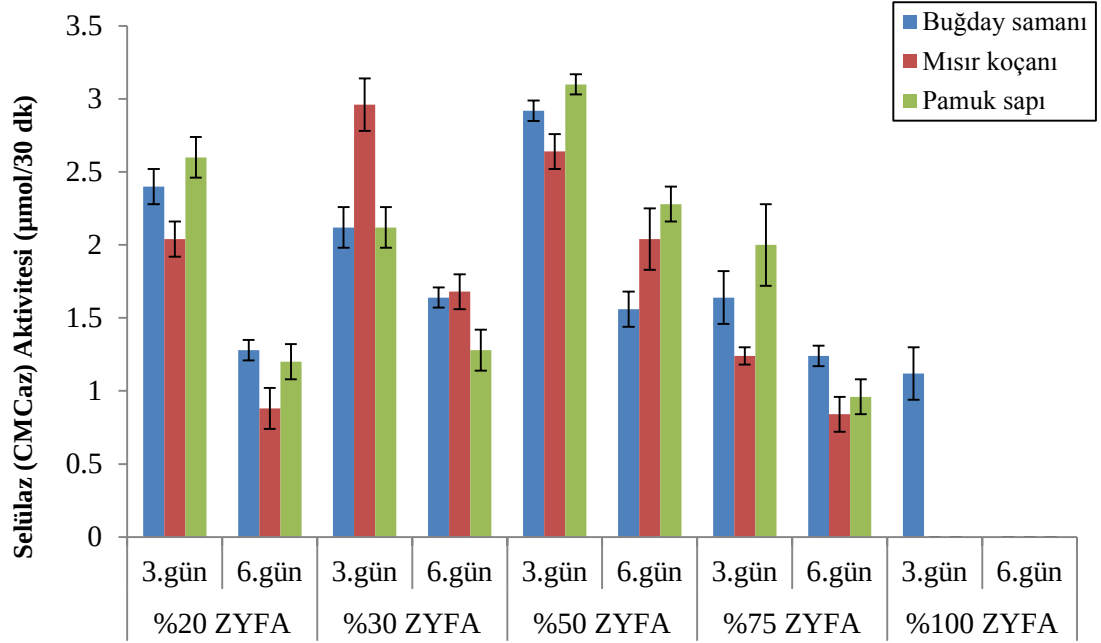
4.4.1. Farklı konsantrasyonlardaki ZYFA ortamlarında elde edilen selülag (CMCaz) ve ksilanaz enzim aktiviteleri

Şekil 4.36'da *Pleurotus ostreatus* ile pamuk sapı, buğday samanı ve mısır koçanı eklenmiş %20, %30, %50, %75, %100'lük ZYFA ortamlarında 3. ve 6. günlerde elde edilen selülag (CMCaz) aktiviteleri verilmiştir. *P. ostreatus* ile en yüksek CMCaz aktivitesi %50'lik ZYFA konsantrasyonunda 6. günde ve pamuk sapı eklenmiş ortamda elde edilmiştir. %50'lik ZYFA konsantrasyonunda 6. günde buğday samanı, mısır koçanı ve pamuk sapı eklenen ortamlarda sırasıyla 5.52, 5.84, 6.16 $\mu\text{mol}/30\text{ dk}$ enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Şekil 4.36 incelendiğinde, atık konsantrasyonunun %50'ye artışı ile enzim aktivitesinde de bir artışın olduğu, ancak %50'den sonraki konsantrasyonlarda ise enzim aktivitesinde azalmanın olduğu gözlemlenmektedir.

Şekil 4.37’de ise *Pleurotus ostreatus* (y.i) ile pamuk sapı, buğday samanı ve mısır koçanı eklenmiş %20, %30, %50, %75, %100’lük ZYFA ortamlarında 3. ve 6. günlerde elde edilen selüloz (CMCaz) aktiviteleri verilmiştir. *P. ostreatus* (y.i) ile en yüksek CMCaz aktivitesi %50’lik ZYFA konsantrasyonunda 3. günde ve pamuk sapı eklenmiş ortamda elde edilmiştir. %50’lik ZYFA konsantrasyonunda 3. günde CMCaz aktivitesi buğday samanı, mısır koçanı ve pamuk sapı eklenen ortamlarda sırasıyla 2.92, 2.64, 3.1 $\mu\text{mol}/30\text{ dk}$ olarak ölçülmüştür. *Pleurotus ostreatus*’da olduğu gibi *Pleurotus ostreatus* (y.i)’da da enzim aktivitesinin %50’lik ZYFA konsantrasyonuna kadar arttığı, daha sonraki konsantrasyonlarda ise düştüğü gözlenmektedir.



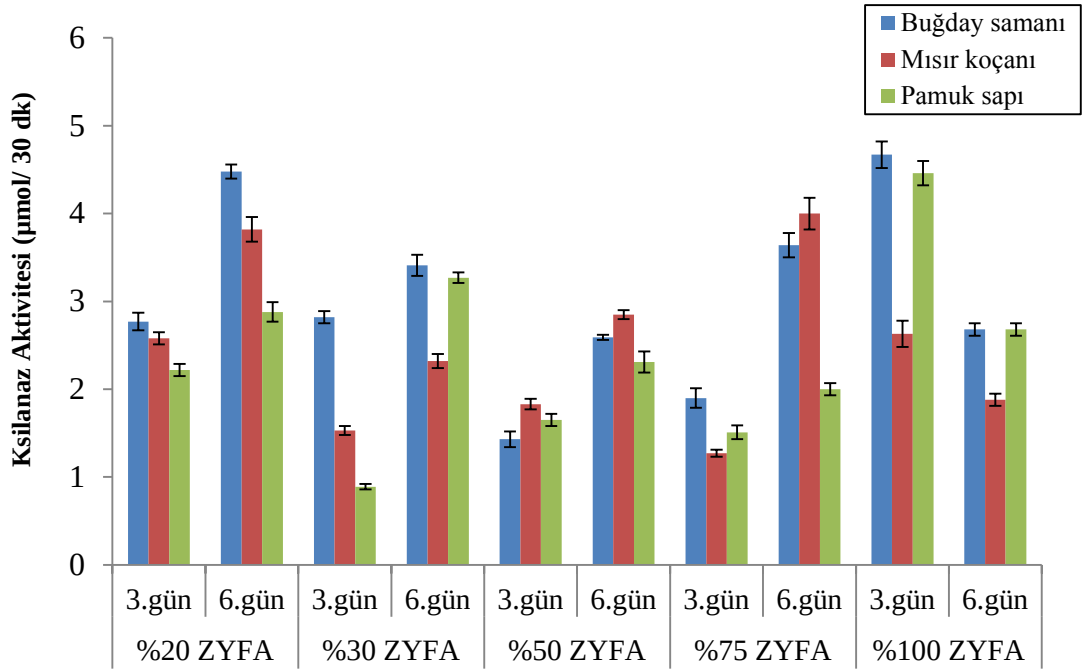
Şekil 4.36. *Pleurotus ostreatus* ile buğday samanı, mısır koçanı ve pamuk sapı içeren farklı ZYFA konsantrasyonlarında 3. ve 6. günlerde elde edilen selüloz (CMCaz) aktivitesi



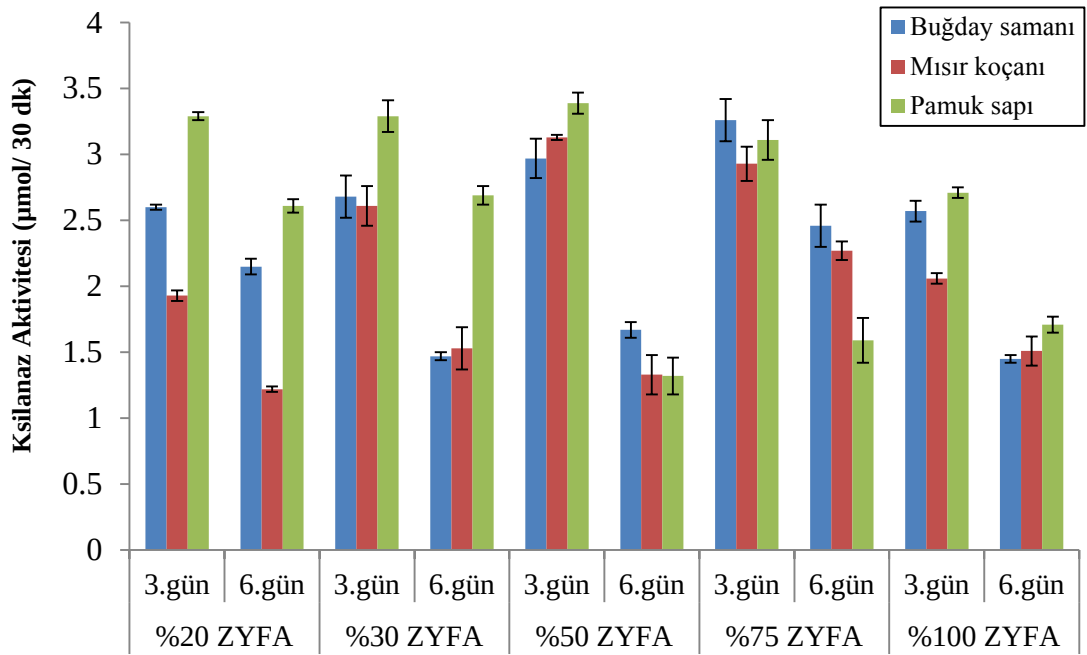
Şekil 4.37. *Pleurotus ostreatus* (y.i) ile buğday samanı, mısır koçanı ve pamuk sapı içeren farklı ZYFA konsantrasyonlarında 3. ve 6. günlerde elde edilen selülaaz (CMCaz) aktivitesi

Şekil 4.38’de *Pleurotus ostreatus* ile pamuk sapı, buğday samanı ve mısır koçanı eklenmiş %20, %30, %50, %75, %100’lük ZYFA ortamlarında 3. ve 6. günlerde elde edilen ksilanaz enzim aktiviteleri verilmiştir. En yüksek ksilanaz aktiviteleri 6. günde elde edilmekle beraber ZYFA konsantrasyonlarına ve indüktörlere bağlı olarak değerler farklılık göstermektedir. En yüksek ksilanaz aktiviteleri, buğday samanında 3. günde %100’lük ZYFA ortamında 4.67 $\mu\text{mol}/30\text{ dk}$, mısır koçanında 6. günde %75’lik ZYFA ortamında 4 $\mu\text{mol}/30\text{ dk}$, pamuk sapında 3. günde %100’lük ZYFA ortamında 4.46 $\mu\text{mol}/30\text{ dk}$ olarak ölçülmüştür.

Şekil 4.39’da ise *Pleurotus ostreatus* (y.i) ile pamuk sapı, buğday samanı ve mısır koçanı eklenmiş %20, %30, %50, %75, %100’lük ZYFA konsantrasyonlarında 3. ve 6. günlerde elde edilen ksilanaz aktiviteleri verilmiştir. 3. günlerde ksilanaz aktiviteleri daha yüksek olup, buğday samanında %75’lik ZYFA ortamında 3.26 $\mu\text{mol}/30\text{ dk}$, mısır koçanında %50’lik ZYFA ortamında 3.13 $\mu\text{mol}/30\text{ dk}$, pamuk sapında %50’lik ZYFA ortamında 3.39 $\mu\text{mol}/30\text{ dk}$ olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.38. *Pleurotus ostreatus* ile buğday samanı, mısır koçanı ve pamuk sapı eklenen farklı ZYFA konsantrasyonlarında 3. ve 6. günlerde elde edilen ksilanaz aktivitesi



Şekil 4.39. *Pleurotus ostreatus* (y.i) ile buğday samanı, mısır koçanı ve pamuk sapı içeren farklı ZYFA konsantrasyonlarında 3. ve 6. günlerde elde edilen ksilanaz aktivitesi

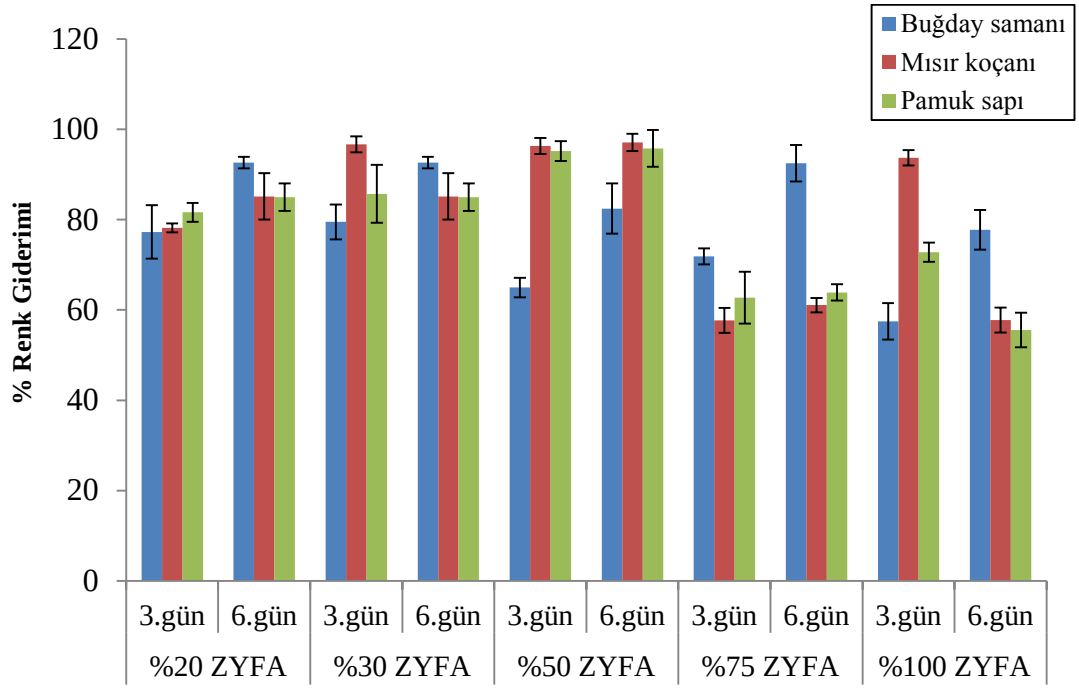
Çalışmamızda ZYFA, funguslarla enzim üretimini indükleyebilmek amacıyla doğal besiyeri olarak kullanılmıştır. Bu süreç esnasında, doğal besiyerlerinin sentetik ortamlar kadar ve hatta bazen daha iyi bir biçimde enzim aktivitesini indüklediği tespit edilmiştir.

Kahraman (1998) yapmış olduğu çalışmada *Coriolus versicolor*, *Funalia trogii*, *Pleurotus sajor-caju* fungusları ile farklı konsantrasyonlarda ZYFA içeren kültür ortamlarına pamuk sapı ekleyerek lakkaz aktiviteleri belirlenmiştir. En yüksek lakkaz aktivitesi %30 ZYFA konsantrasyonunda *F.trogii*'de elde edilmiştir [79].

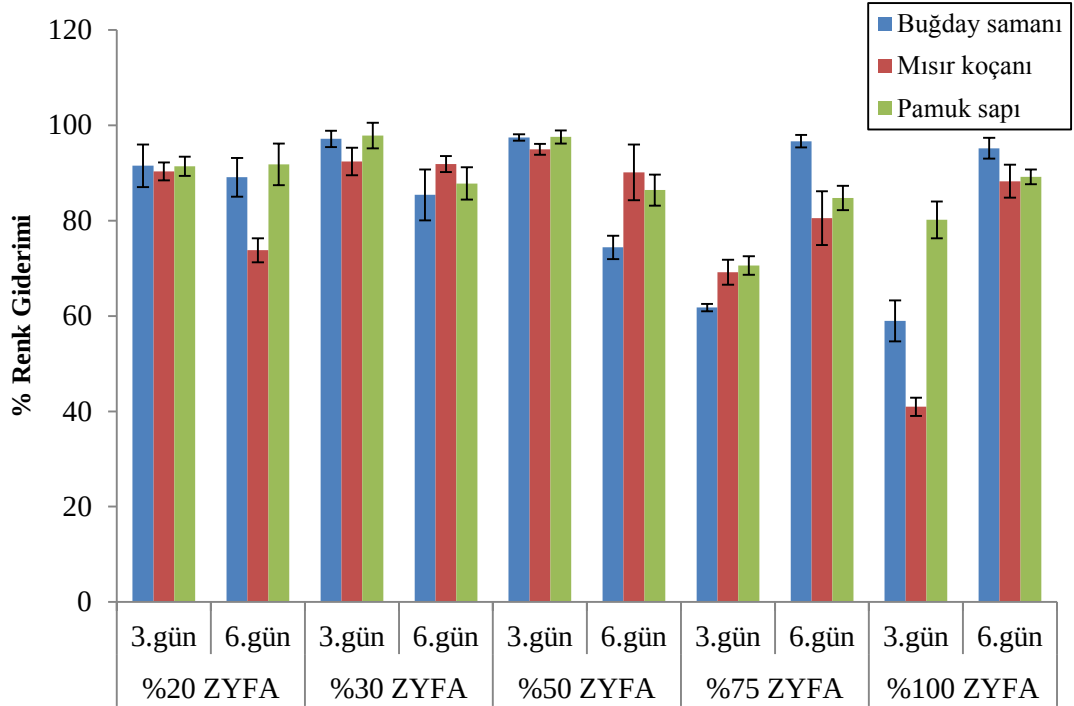
Tsioulpas vd. (2002) tarafından yapılan başka bir çalışmada beyaz çürükçül funguslardan *Pleurotus* spp.'nin ZYFA ortamında üretimi sonucunda 12-15 günde fenolik bileşiklerin %69-76 oranında giderildiği, ZYFA'nın siyah renginin sarı-kahverengiye dönüştüğü, daha parlak hale geldiği ve üreme ortamında yüksek lakkaz aktivitesinin olduğu rapor edilmiştir [207].

4.4.2. Farklı konsantrasyonlardaki ZYFA ortamlarında elde edilen % renk giderimi

%20, %30, %50, %75 ve %100'lük ZYFA konsantrasyonlarında, buğday samanı, mısır koçanı ve pamuk sapı içeren ortamlarda 3. ve 6. günlerde meydana gelen renk giderim değerleri, kontrole karşı okunan % renk giderimi olarak verilmiştir (Şekil 4.40, 4.41). Şekiller incelendiğinde farklı konsantrasyonlarındaki ZYFA ortamlarına farklı indüktörlerin eklenmesinin renk giderimini arttırdığı gözlemlenmektedir. Hem *Pleurotus ostreatus*'da hem de *Pleurotus ostreatus* (y.i)' da birbirine yakın renk giderim yüzdelerinin olduğu görülmektedir. %20, %30, %50 ZYFA konsantrasyonlarındaki renk giderimlerinin diğer konsantrasyonlara göre az bir farkla yüksek olduğu görülmektedir. Her iki fungusta da farklı ZYFA konsantrasyonlarına buğday samanı, mısır koçanı ve pamuk sapının eklenmesinin renk giderimini indüklediği açıkça görülmektedir. % renk giderim değeri %40.96 ve %97.81 arasında değişmektedir.



Şekil 4.40. *Pleurotus ostreatus* ile buğday samanı, mısır koçanı ve pamuk sapı içeren farklı ZYFA konsantrasyonlarında % renk giderimi



Şekil 4.41. *Pleurotus ostreatus* (y.i) ile buğday samanı, mısır koçanı ve pamuk sapı içeren farklı ZYFA konsantrasyonlarında % renk giderimi

Kachouri vd. (2005) tarafından yapılan çalışmada *Aspergillus flavus* F2 ile %10 ZYFA ortamında 3. günün sonunda %33 ve 6. günün sonunda %58 renk giderimi sağlamıştır [208].

Annibale vd. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada ise karasuyun kirlilik yükünü azaltmak için beyaz çürükçül fungus *Panus tigrinus* CBS 577.79 kullanılmıştır. KOİ giderimi, defenolizasyon ve dekolorizasyon sırasıyla %60.9, %97.2 ve %75 olarak belirlenmiştir [209].

Kahraman ve Yeşilada (1999) yapmış oldukları çalışmada farklı oranlardaseyreltilmiş ZYFA'yı dört beyaz çürükçül fungus (*Coriolus versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Funalia trogii*, *Pleurotus sajor-caju*) ile muamele etmişler ve üreme ortamına tarımsal atık olan pamuk sapı ekleyerek fungusların renk ve KOİ giderim yeteneklerini araştırmışlardır. *Phanerochaete chrysosporium* %20'lik atık su ortamda KOİ'yi %48 ve rengi %58 oranında giderirken, *F. trogii* %30'luk atık su ortamında %51 KOİ ve %55 oranında renk giderimi sağlamışlardır [64].

Çalışmamızda ZYFA içerisine sadece tarımsal atıklar eklenerek yüksek enzim aktivitesi değerlerine ulaşılması ve aynı zamanda yüksek renk giderimi elde edilmesi biyoteknolojik açıdan oldukça önemlidir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bugün uygulanmakta olan verimi düşük, çevre kirletici etkisi ve toksik atık oranı fazla, yan reaksiyonları çok ve yoğun enerji harcayan kimyasal işlemlerin yerini alacak, biyokatalizörlerin kullanıldığı çevre dostu üretim teknolojilerinin geliştirilmesi yönünde çalışmalar sürdürülmektedir. Biyokatalizörler bugün özellikle gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmakta olup, kağıt sanayinde ve tekstil terbiyesinde enzimatik yöntemler kullanılması da yaygınlaşmaktadır. Ülkemizde de kullanımı giderek yaygınlaşan enzimlerin yerli olanaklarla ve kaynaklarla üretim için etkinlik kazanılması gerekir. Enzim teknolojisindeki gelişmelere bağlı olarak önceleri bitkisel ve hayvansal kaynaklardan sağlanan pek çok enzim artık mikroorganizmalardan üretilmektedir [11, 34].

Lignoselülozik materyallerin enzimatik hidrolizi üzerine gerçekleştirilen biyoteknolojik işlemler günümüzde oldukça artmıştır. Yenilenemeyen kaynakların giderek azalması, lignoselülozu gıda, enerji, yakıt ve diğer ürünler için temel ham materyal haline getirmiştir. Enzimatik hidroliz, daha az enerji kullanılması ve toksik maddelerin veya aşındırıcı asitlerin kullanılmasına ihtiyaç bırakmamasından dolayı oldukça avantajlıdır. Bu nedenle lignoselülozun, lignoselülaz enzimleri ile hidrolizi geniş ölçüde araştırılan bir konudur. Bu yüzden son yıllarda yapılan araştırmalar selülaz ve ksilanaz gibi lignoselülozik enzimlerin aktivitesini arttırmak, en yüksek enzim üreten organizmaları belirlemek, daha ekonomik ve etkili yöntemlerle bahsi geçen enzimlerin üretimi gerçekleştirmek üzerine odaklanmaktadır [35, 36].

Selülaz ve ksilanaz enzimleri pek çok endüstriyel alanda farklı amaçlarla kullanılmaktadır. Selülaz ve ksilanaz enzimleri; kağıt hamurunun ağartılması, hayvan yemi üretimi ve yemlerde sindiriminin artırılması, atıkların giderimi, tarımsal atıkların fermentatif ürünlere indirgenmesi sürecinde kullanılmaktadır [97, 111, 115]. Ayrıca içecek endüstrisinde meyve sularının berraklaştırılmasında, biyoetanol üretiminde substrat eldesi amacıyla, tekstil endüstrisinde renk parlaklığının artırılması ve yumuşaklığının geri kazandırılmasında, kumaşlarda fazla boyanın alınmasında faydalanılmaktadır [81, 103, 104, 113]. Özellikle son yıllarda bu enzimlerin ticari kullanım potansiyellerinin hızla artması, bu enzimleri üreten organizmalar ile ilgili çalışmaların hızlanmasına yol açmıştır.

Lignoselülozun enzimatik hidrolizi için yapılan çalışmalar genellikle lignoselülozik enzimleri salgılayan mikroorganizmaların ortama doğrudan ilave edilmesi şeklinde gerçekleştirilmiştir, ancak elde edilen verimin düşük olduğu görülmüştür. Bununla beraber, selülaı ve ksilanazları selüloz ve ksilan ile doğrudan muamele etmek daha iyi bir çözümdür. Bu işlem öncelikle bahsi geçen enzimlerin üretilmesi, kısmen saflaştırılması ve hidroliz çalışmaları için kullanılması şeklinde gerçekleştirilebilir. Bu nedenle lignoselülozik substratların, selülaı ve ksilanaz ile hidrolizi geniş ölçüde araştırılan bir konudur [7].

Bu çalışmada beyaz çürükçül funguslardan *Pleurotus ostreatus* ve *Pleurotus ostreatus* (y.i) ve substrat olarak lignoselülozik atık (pamuk sapı) kullanılarak selülaı (FPA ve CMCaz) ve ksilanaz enzim üretimi optimize edilmiştir. Öncelikle her iki fungusunda enzim üretimlerini arttırmak için indüktör olarak pamuk sapı eklenmiş ve eklenmemiş doğal (%10, %20, %30 ZYFA) ve sentetik (distile su, glukoz içermeyen STO, STO) kültür ortamlarında en uygun inkübasyon süresi belirlenmiştir. 15 günlük inkübasyon sonucunda, *Pleurotus ostreatus*'da 6. ve 12. günlerde, *Pleurotus ostreatus* (y.i)'da ise 3. ve 6. günlerde daha yüksek enzim aktiviteleri elde edilmiştir. Kültür ortamlarına pamuk sapı eklenmesi her iki fungusda da enzim aktivitelerini indüklemiştir.

Enzim üretiminde en uygun pamuk sapı miktarı (0.1, 0.5 ve 1 gr) ve büyüklüğünün (küçük boy ve büyük boy) etkisinin test edildiğı çalışmaları sonucunda da 0.5 gr ve büyük boy pamuk sapının enzim aktivitesini daha fazla arttırdığı tespit edilmiştir. Yapılan pek çok çalışmada organizmanın yüksek miktarda enzim üretebilmesi için ortamda yeteri kadar oksijen ve besinin olması gerektiğı ifade edilmektedir. Kültür ortamı içerisindeki çözünmüş oksijenin ve besinin organizma ile teması yeterli çalkalama işlemi ile gerçekleşmektedir. Bu nedenle her iki fungus statik ve çeşitli çalkalama hızlarında (50, 100 rpm) inkübe edilmiş ve en uygun çalkalama hızı tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda en yüksek selülaı ve ksilanaz aktivitesi, ortamın katı substrat içermesi nedeniyle statik koşullarda saptanmıştır.

Selülaı ve ksilanaz üretim veriminin arttırılmasında inkübasyon sıcaklığı önemli bir faktör olduğundan, her iki fungus için çeşitli inkübasyon sıcaklıkları (20, 30, 40 ve 50 °C) test edilmiş ve en uygun inkübasyon sıcaklığının 30-40 °C arasında olduğu saptanmıştır.

Enzimlerin üretimini artırılması açısından önemli faktörlerden biride ortam pH'sıdır. Çünkü her organizmanın yüksek oranda enzim ürettiği bir ortam pH'sı bulunmaktadır [185]. Bu nedenle, her iki fungus türünde yüksek oranda enzim üreteceği ortam pH'sının tespit edilmesi amacıyla funguslar pH 3.0, 5.0, 7.0, 9.0'a ayarlanmış %10 ZYFA, %20 ZYFA ve glukoz içermeyen STO ortamlarında inkübe edilmişlerdir. Yapılan çalışmalar sonucunda *Pleurotus ostreatus* için en uygun ortam pH'sının pH 3-5 aralığında, *Pleurotus ostreatus* (y.i) için pH 5-7 aralığında olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda, optimizasyon çalışmaları kurgulanırken, her optimizasyon çalışmasından çıkan en uygun sonuç diğer bir optimizasyon çalışmasının temelini oluşturmuş, çalışma koşulları elde edilen veriler doğrultusunda düzenlenerek defalarca tekrarlanmıştır. Optimizasyonu yapılan parametre dışındaki tüm koşullar en uygun olacak şekilde literatürdeki daha önce yapılan çalışmalarda dikkate alınarak ayarlanmıştır.

Selülozun enzimatik yıkımı için en azından üç enzimin sinerjik etkisi gerekmektedir. Bunlar endoglukanaz, sellobiyohidrolaz ve β -glukosidazdır. Bu enzim kompleksinin en iyi indüktörü ise selülozdur. Selülozun yıkımı ise direkt olarak kültür ortamındaki glukoz-sellobiyoz oranına ve glukoz miktarına bağlıdır [100]. Yapılan çalışmalarda yüksek selülaz aktivitesinin devamlılığı için düşük glukoz miktarının olması gerektiği bildirilmiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada da glukoz içermeyen STO ortamında daha belirgin selülaz aktiviteleri elde edilmiştir. Ayrıca kültür ortamlarında elde edilen FPA aktivitelerinin CMCaz aktivitelerinden daha düşük olduğu belirlenmiştir. Yapılan pek çok çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir [164, 167, 185].

Pamuk sapı eklenen kültür ortamlarının hemen hemen hepsinde selülaz aktiviteleri indüklenmiştir. Selülozun, selülaz enzim kompleksi için en iyi indüktör olmasından dolayı bu indüksiyonu belirlememiz literatür verileri ile uyumludur. Ancak bazı ortamlarda pamuk sapı eklenmemiş ortam ile pamuk sapı eklenmiş ortam karşılaştırıldığında, pamuk sapı eklenmeyen ortamlarda da yüksek selülaz aktivitesi belirlenmiştir. Bunun sebebi inkübasyon sırasında salgılanan selülazın oduna tutunması ve enzim aktivitesinin tespitinin yapılmaması olabilir [79].

Odun hemiselülozunun en önemli bileşeni olan ksilan, selülozdan sonra doğada en çok yenilenen polisakkarittir [108]. Bu nedenle çalışmamızda ksilanolitik enzim sisteminin üyesi olan ksilanaz aktivitesindeki değişimler ve kültür koşullarının

enzim aktivitesine olan etkileride test edilmiştir. Sonuçlarımız ksilanaz aktivitesinin her iki fungusta da ilk 6 gün içerisinde maksimuma ulaştığı ve devamındaki günlerde ise aktivitede düşme olduğu gözlenmiştir.

Pleurotus ostreatus ve *Pleurotus ostreatus* (y.i) ile yürütülen ve enzimleri indüklemek için pamuk sapının kullanıldığı optimizasyon çalışmalarından sonra pamuk sapı dışındaki indüktörlerin (buğday samanı, mısır koçanı, çam kozalağı ve kavak talaşı) selülaz (CMCaz) ve ksilanaz enzim üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. Her üç kültür ortamında (%10 ZYFA, %20 ZYFA ve glukoz içermeyen STO) da en yüksek CMCaz ve ksilanaz aktiviteleri buğday samanı ve mısır koçanında belirlenmiştir. Tarımsal atıklar kullanılarak endüstriyel öneme sahip olan selülaz ve ksilanaz gibi lignoselülozik enzimlerin herhangi bir sentetik ek kaynak eklenmeyen ortamlarda yüksek oranda üretilmesi biyoteknolojik açıdan oldukça önemlidir. Enzim üretiminin yanı sıra, doğada kirlilik potansiyeline sahip atıkların (pamuk sapı, ZYFA gibi) arıtımında ekolojik dengeler açısından önemlidir.

Çalışmamızın son kısmında beyaz çürükçül fungusların enzim üretiminde doğal kültür ortamı olarak kullanılan ZYFA'nın arıtımında bu fungusların kullanılabilirlikleri araştırılmıştır. Yüksek kirlilik yüküne sahip olan bu atıkların doğaya direkt olarak verilmesi durumunda, doğayı çok hızlı bir şekilde kirletmesi kaçınılmazdır. Ülkemizde pekçok fabrika atıklarını herhangi bir arıtma işlemine tabi tutmadan alıcı ortama vermektedir. Önemli olan nokta bu atıkların değerlendirme işlemlerinden geçirildikten sonra ve atık deşarj kriterlerine göre alıcı ortama verilmesidir. Bizim çalışmamızda ise atıkların besiyeri olarak kullanım sürecinde hem değerlendirilmesi hemde oluşacak biyolojik yıkım ile atığın kirlilik ile ilgili parametrelerinin doğaya zarar vermeyecek düzeye indirilmesi hedeflenmiştir.

Çalışmalarımızın bir diğer kısmında daha önce enzim aktivitesini en fazla indüklediğini belirlediğimiz indüktörleri (buğday samanı, mısır koçanı ve pamuk sapı) içeren farklı konsantrasyonlarda ZYFA hazırlanmış ve 3. ve 6. günlerdeki selülaz (CMCaz) ve ksilanaz enzim aktiviteleri, renk giderim değerleri belirlenmiştir. Her iki fungusda da CMCaz enzim aktivitelerinde %50'lik ZYFA konsantrasyonuna kadar bir artış, daha sonra düşüş izlenmektedir. Ksilanaz aktiviteleri ise %50, %75, %100 ZYFA konsantrasyonlarında daha yüksek değerlerde elde edilmiştir.

Her iki fungus ile renk giderimleri ise funguslar ile işlem görmüş ve lignoselülozik indüktör içeren atıklarda günlere bağlı olarak belirlenmiştir. Buğday samanı, mısır koçanı ve pamuk sapı içeren ortamlarda renk giderimi belirgin bir

şekilde indüklenmiştir. Atık konsantrasyonuna bağlı olarak renk gideriminde belirgin bir değişme yoktur. Nispeten %20, %30, %50 ZYFA konsantrasyonlarındaki renk giderimlerinin diğer konsantrasyonlara göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. ZYFA'nın tüm konsantrasyonlarında %40.96 ile %97.81 arasında renk giderimi elde edilmiştir.

ZYFA ortamlarına tarımsal atık olarak pamuk sapı, buğday samanı, mısır koçanı eklendiği zaman daha yüksek giderimin elde edilmesi hem bu atıkların değerlendirilmesi ve hemde atıkların funguslar tarafından yıkımının arttırılması bakımından önem taşımaktadır. Ayrıca doğal besiyeri ortamlarında atıkların enzim üretiminde besiyeri amaçlı kullanılarak değerlendirilmeleri çalışmaları olumlu bir neticedir. Çünkü bu atıklar sentetik besiyerlerine göre daha ekonomik ve daha kolay elde edilebilir besiyerleridir. Atığın endüstriyel alanda kullanımı sağlanarak, çevre kirletici etkisinin azaltılmasında sağlanabilecektir. ZYFA'nın selülaaz ve ksilanaz enzim üretiminde ilk olarak kullanılması da çalışmanın orijinalitesini arttırmaktadır.

Günümüzde endüstriyel kullanımı olan enzim preparatları için en önemli konu enzim üretim maliyetinin ve sürecin girdi maliyetinin düşürülmesidir. Selülaaz ve ksilanaz gibi lignoselülozik enzimlerin de aralarında bulunduğu alfa amilaz, pektinaz, proteazlar, lipazlar gibi enzimlerin üretimi üzerine sürdürülen çalışmalar uygun bir üretici mikroorganizmanın bulunması ve aynı zamanda bol ve ucuz bulunabilen kaynaklardan oluşan bir üretim ortamı kompozisyonunun oluşturulması yönünde devam etmektedir.

Yakın gelecekte birçok kimyasal işlemin yerini daha ucuz ve etkili enzimatik yöntemlerin alacağı düşünülürse, ülkemizde de enzim kaynaklarının araştırılması ve patentlendirilmesi, çeşitli enzimlerin üretimi için uygun ve özgün teknolojiler geliştirilmesi ve bu enzimlerin üretiminde kullanılmasına yönelik Ar-Ge çalışmalarının desteklenmesi gerekmektedir.

Teknolojideki gelişmelere bağlı olarak lignoselülozik enzimlerin kullanım alanları yaygınlaşmakta ve daha da önem arz eder hale gelmektedir. Bu enzimlerin elde edilmesinde mikroorganizmaların önemi ve ucuz substratlar kullanarak enzimlerin üretilmesi çalışmaları her geçen gün artmaktadır. Beyaz çürükçül funguslar gibi çevre dostu organizmaları bahsi geçen enzimlerin üretiminde kullanılarak etkili ve ucuz yöntemlerle enzim üretebilmek bu çalışmanın temel hedefini oluşturmaktadır. Bu organizmaların, sentetik ve doğal kültür ortamlarında

tarımsal atıkları indüktör olarak kullanarak selüloz ve ksilanaz enzimlerini üretmesi sağlanmıştır. Selüloz ve ksilanaz enzimlerinin üretimine yönelik yapılan çalışmalarda daha çok *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp. ve *Bacillus* sp. ile yapılan çalışmalar dikkat çekerken, beyaz çürükçül funguslar ile yapılan az çalışmaya rastlanması bu çalışmanın önemli bir yönüdür ve orjinalitesini arttırmaktadır.

Çalışmamız sonucunda;

- 1- Lignoselülozlu hammaddelerin selüloz ve ksilanaz üretimini arttırmak için kullanılabileceği,
- 2- Ucuz ve bol olarak bulunan lignoselülozlu hammaddelerin kullanılmasının, enzim üretim süreçlerinin daha ekonomik olmasını sağlayabileceği,
- 3- Uygun besiyerine eklenecek olan lignoselülozlu hammaddenin çeşidi ve miktarı, kullanılacak fungus türü ve üretim yöntemi gibi faktörlerin optimizasyonu ile endüstriyel açıdan önemli olan selüloz ve ksilanaz enzimlerinin daha fazla miktarda üretilabileceği,
- 4- *Pleurotus ostreatus* ve doğadan yeni izole edilmiş *Pleurotus ostreatus* (y.i) funguslarının selüloz ve ksilanaz enzim üretiminde etkili olarak kullanılabileceği belirlenmiştir.

6. KAYNAKLAR

- [1] O. Kirk, T. V. Borchert and C. C. Fuglsang, *Industrial enzyme applications*, **Curr. Opin. Biotechnol.**, 13 (2002) 345-351.
- [2] M. J. Daniels, *Using biological enzymes in papermaking*, **Paper Technol.**, 33:6 (1992) 14-17.
- [3] A. Gessesse, *Purification and properties of two thermostable alkaline xylanases from an alkaliphilic Bacillus sp.*, **Appl. Environ. Microbiol.**, (1998) 3533-3535.
- [4] A. Wiseman, *The application of enzymes in industry p.*, Handbook of enzym biotechnology. Second edition. Chapter 3, (1987) 274-373.
- [5] M. B. Rao, A. M. Tanksale, M. S. Ghatge and V. V. Deshpande, *Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases*, **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 62:3 (1988) 597-635.
- [6] F. Niehaus, C. Bertoldo, M. Kahler, G. Antranikian, *Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application*, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 51 (1999) 711-729.
- [7] S. Hari Krishna, K. C. Sekhar, J. Babu Suresh, D. Reddy Srirami, *Studies on the production and application of cellulase from Trichoderma reesi QM-9414*, **Bioprocess Eng.**, 22 (2000) 467-470.
- [8] B. C. Salles, R. B. Cunha, W. Fontes, M. V. Sousa, E. X. F Filho, *Purification and characterization of a new xylanase from Acrophialophora nainiana*, **J. Biotech.**, 81 (2000) 199-204.
- [9] J. Lin, L. M. Ndlovu, S. Singh and B. Pillay, *Purification and biochemical characteristics of B-D xylanase from a thermophilic fungus, Thermomyces lanuginosus-SSBP*, **Biotechnol. Appl. Biochem.**, 30 (1999) 73-79.
- [10] <http://advantageaustria.org/tr/zentral/focus/technology/biotechnologiegenerell.tr.jsp>
- [11] Ö. Eren Kıran, U. Çömlekçiöğlu ve N. Dostbil, *Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları*, KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi, Kahramanmaraş, 9 (2006) 12-19.
- [12] <http://tr.wikipedia.org/wiki/Biyoteknoloji>
- [13] R. J. Wall, *Biotechnology for the production of modified and innovative animal products: Transgenic livestock bioreactors*, **Livest. Pro. Sci.**, 59 (1999) 243-255.
- [14] K. A. Ward, *Transgene-mediated modifications to animal biochemistry*, **Trends Biotechnol.**, 18 (2000) 99-102.
- [15] U. Stottmeister, A. Aurich, H. Wilde, J. Andersch, S. Schmidt, D. Sicker, *White biotechnology for green chemistry: fermentative 2-oxocarboxylic acids as novel building blocks for subsequent chemical syntheses*, **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, 32 (2005) 651-664.
- [16] N. Kolankaya, *Biyoteknolojiye bir bakış: Dünya ve Türkiye, küreselleşme sürecinde biyoteknoloji ve biyogüvenlik*, Sempozyum Bildirileri Kitabı, T.C. Çevre Bakanlığı, T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı ve Biyoteknoloji Derneği Ortak Yayını, Ankara, (2000) 1-6.
- [17] Anonymous, *The colours of biotechnology: Science, development and humankind*, **Electron. J. Biotechn.**, Editorial Page 1 sur 4, (2005).
- [18] <http://www.bio.org>

- [19] Ö. Özgen, *Tüketiciler ve modern biyoteknoloji: Model yaklaşımlar*, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Yayınları, No: 1 Ankara, (2007).
- [20] M. Özgen, F. Ertunç, G. Kınacı, M. Yıldız, M. Birsin, H. Ulukan, H. Emiroğlu, N. Koyuncu, C. Sancak, *Tarım teknolojilerinde yeni yaklaşımlar ve uygulamalar: bitki biyoteknolojisi*, TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongresi, Ankara, (2005) 315-346.
- [21] S. A. Miller, *Novel foods: safety and nutrition*, **Food Technol.**, 46 (1992) 114-118.
- [22] J. B. Wohl, *Consumers decision-making and risk perceptions regarding foods produced with biotechnology*, **J. Consum. Policy.**, 21 (1998) 387- 404.
- [23] <http://www.europabio.org/what-biotechnology>
- [24] EFB, Environmental biotechnology, European federation of biotechnology task group on public perceptions of biotechnology, Briefing Paper No: 4, (1999).
- [25] O. A. Daini, *Fundamentals of genetic engineering*, Samrol Ventures and Printing Co., Ijebu-Igbo, Ogun State, Nigeria, (2000).
- [26] W. Soetaert and E. Vandamme, *The impact of industrial biotechnology*, **Biotechnol. J.**, 1 (2006) 756-769.
- [27] J. Maury, M. A. Asadollahi, K. Moller, A. Clark, J. Nielsen, *Microbial isoprenoid production: an example of green chemistry through metabolic engineering*, **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, 100 (2005) 19-51.
- [28] M. Kircher, *White biotechnology: Ready to partner and invest in*, **Biotechnol. J.**, 1 (2006) 787-794.
- [29] R. Bachmann, *Industrial biotechnology-New value-creation opportunities*, McKinsey and Co., presentation at the Bio-Conference, New York, (2003).
- [30] OECD, *The application of biotechnology to industrial sustainability*, Canada, (2001) p. 15.
- [31] EuropaBio, *Industrial or white biotechnology: A driver of sustainable growth in Europe*, (2011) p. 7-8.
- [32] F. Sijbesma, H. Schepens, *White biotechnology: gateway to a more sustainable future*, **EuropaBio**, Brussels, (2004) p. 1-16.
- [33] S. Y. Lee, S. H. Jang, *Commentaries and analyses-White biotechnology*, **Asia Pacific Biotech News (APBN)**, 10 (2006) 559-563.
- [34] A. Akkaya ve N. Pazarlıoğlu, *21. Yüzyılın anahtar teknolojisi: Beyaz biyoteknoloji*, Kırıkkale Üniversitesi Bilimde Gelişmeler Dergisi, Cilt:1 Sayı:1, (2012) 22-33.
- [35] C. Sánchez, *Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi*, **Biotech. Adv.**, 27 (2009) 185-194.
- [36] R. L. Howard, E. Abotsi, E. L. Jansen van Rensburg and S. Howard, *Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production*, **Afr. J. Biotechnol.**, 2:12 (2003) 602-619.
- [37] H. T. Şahin, M. B. Arslan, M. Cengiz, *Lignoselülozik maddelerin asit hidrolizi*, IV. Yenilebilir Enerji Kaynakları Sempozyumu, Gaziantep, 31 Ekim-2 Kasım (2007) 50-53.
- [38] H. Yang, R. Yan, H. Chen, D. H. Lee and C. Zheng, *Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis*, **Fuel**, 86 (2007) 1781-1788.
- [39] Y. Sun, J. Cheng, *Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production*, **Bioresource Technol.**, 83 (2002) 1-11.
- [40] M. B. Valenzuela, C. W. Jones, P. K. Agrawal, *Batch aqueous-phase reforming of woody biomass*, **Energy Fuels**, 20:4 (2006) 1744-1752.

- [41] Anonymous, *Difco manuel dehydrate culture media and reagents for microbiology*, Detroit, Michigan USA, (1984), 1155.
- [42] J. J. Yoon, Y. L. Kim, *Degradation of crystalline cellulose by brown-rot basidiomycete Fomitopsis palustris*, **J. Microbial.**, 43 (2002) 487-492.
- [43] S. Yaman, *Pyrolysis of biomass to produce fuels and chemical feedstocks*, **Energ. Convers. Manage.**, 45 (2004) 651-671.
- [44] G. O. Aspinall, *Polysaccharides*, Pergamon Press Headington Hill Hall, Oxford, (1970) 431-438.
- [45] A. T. Martinez, S. Camerero, A. Gutierrez, *Studies on wheat lignin degradation by Pleurotus species using analytical pyrolysis*, **J. Anal. Appl. Pyrol.**, 59 (2001) 401-411.
- [46] C. Chrestini, G. G. Sermanni, D. S. Argyropoulos, *Structural modifications induced during biodegradation of wheat lignin by Lentinula edodes*, **Bioorgan. Med. Chem.**, 6 (1998) 957-973.
- [47] M. Adosinda, M. Martins, Ferreira, C. Isabel, *Biodegradation of bioaccessible textile azo dyes by Phanerochaete chrysosporium*, **J. Biotech.**, 89 (2002) 91-98.
- [48] <http://www.biology.ed.ac.uk/research/groups/jdeacon/FungalBiology/woodrots.Htm>
- [49] S. Shary, S. A. Ralph, K. E. Hammel, *New insights into the ligninolytic capability of a wood decay Ascomycete*, **Appl. Environ. Microb.**, 73 (2007) 6691-6694.
- [50] A. Hatakka, *Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: Production and role in lignin degradation*, **Fems. Microbiol.**, 13 (1994) 125-135.
- [51] E. De Jong, F. De Vries, J. Field, R. Van Der Zwan, And J. De Bont, *Isolation and screening of basidiomycetes with high peroxidative activity*, **Mycol. Res.**, 96 (1992) 1098-1104.
- [52] F. Palaez, M. Martinez and A. Martinez, *Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation*, **Mycol. Res.**, 99 (1995) 37-42.
- [53] R. Waldner, M. Leisola, and A. Fiechter, *Cornparison of ligninolytic activities of selected white-rot fungi*, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 29 (1988) 400- 407.
- [54] S. B. Pointing, *Feasibility of bioremediation by white-rot fungi*, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 57 (2001) 20-33.
- [55] H. Call, L. Mucke, *History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym process)*, **J. Biotech.**, 53 (1997) 163-202.
- [56] www.mikrobiyoloji.org/pdf/702031102.pdf
- [57] Ö. Yesilada, K. Fıskın, *Decolorization of alcoholic waste water by white rot fungi Coriolus versicolor, Funalia trogii and P. chrysosporium ME 446*, **Tr. J. Biology**, 19 (1995) 191-200.
- [58] L. M. Larraya, G. Perez, M. M. Penas, J. P. Baars, T. S. P. Mikosch, A. G. Pisabarro and L. Ramirez, *Molecular karyotype of the white rot fungus Pleurotus ostreatus*, **Appl. Environ. Microbiol.**, 65:8 (1999) 3413-3417.
- [59] N. Muthukrishnan, M. S. Venugopal and R. Janarthanan, *Recycling spent larval food of corcyra cephalonica stainton for preparing spawn and sporophore of Pleurotus sajor-caju (Fr.) singer*, **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 16 (2000) 265-270.

- [60] R. Cohen, L. Persky and Y. Hadar, *Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus Pleurotus*, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 58 (2002) 582-594.
- [61] D. S. L. Balan, R. T. R. Monteiro, *Decolorization of textile indigo dye by ligninolytic fungi*, **J. Biotech.**, 89 (2001) 141-145.
- [62] N. F. Ali, R. S. R. El-Mohamedy, *Microbial decolourization of textile waste water*, **J. Saudi Chem. Soc.**, 16 (2012) 117-123.
- [63] S. Kahraman, Ö. Yeşilada, *Industrial and agricultural wastes as substrates for laccase production by white-rot fungi*, **Folia Microbiol.**, 46:2 (2001) 133-136.
- [64] S. Ş. Kahraman and Ö. Yeşilada, *Effect of spent cotton on color removal and chemical oxygen demand lowering in olive oil mill waste water by white rot fungi*, **Folia Microbiol.**, 44:6 (1999) 673-676.
- [65] Ö. Yeşilada, S. Şık, M. Şam, *Treatment of olive oil mill waste water with fungi*, **Tr. J. Biology**, 23 (1999) 231-240.
- [66] R. Say, A. Denizli, M. Y. Arica, *Biosorption of cadmium (II), lead (II) and copper (II) with the filamentous fungus Phanerochaete chrysosporium*, **Bioresource Technol.**, 76 (2001) 67-70.
- [67] P. Baldrian, *Interactions of heavy metals with white-rot fungi*, **Enzyme Microbial Technol.**, 32 (2003) 78-91.
- [68] D. L. Huang, G. M. Zeng, C. L. Feng, S. Hu, M. H. Zhao, C. Lai, Y. Zhang, X. Y. Jiang, H. L. Liu, *Mycelial growth and solid-state fermentation of lignocellulosic waste by white-rot fungus Phanerochaete chrysosporium under lead stress*, **Chemosphere**, 81 (2010) 1091-1097.
- [69] S. Cing, D. Asma, E. Apohan, O. Yesilada, *Decolorization of textile dyeing waste water by Phanerochaete chrysosporium*, **Folia Microbiol.**, 48:5 (2003) 639-642.
- [70] Ö. Yeşilada, *Decolorization of crystal violet by fungi and commercial horseradish peroxidase*, **Tr. J. Biology**, 20 (1996) 129-138.
- [71] Ö. Yeşilada, *Decolorization of crystal violet by fungi*, **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 11 (1995) 601-602.
- [72] S. Kahraman, F. Kuru, D. Dogan, Ö. Yeşilada, *Removal of indigo carmine from an aqueous solution by fungus Pleurotus ostreatus*, **Arch. Environ. Prot.**, 38:3 (2012) 51-57.
- [73] Barış Otlı, *Peyniraltı Suyu ve Alkol Fabrikası Atıksularının Arıtımı ve Değerlendirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya, 2002.
- [74] E. Birhanli, Ö. Yeşilada, *Increased production of laccase by pellets of Funalia trogii ATCC 200800 and Trametes versicolor 200801 in repeated-batch mode*, **Enzyme Microbial Technol.**, 39 (2006) 1286-1293.
- [75] S. Singh, C. H. Tyagi, D. Dutt and J. S. Upadhyaya, *Production of high level of cellulase-poor xylanases by wild strains of white-rot fungus Coprinellus disseminatus in solid-state fermentation*, **New Biotechnol.**, 26 (2009) 3-4.
- [76] Sibel Şık, *Tarımsal Bir Atık Olan Pamuk Sapının Bio-pulp Yönünden Kullanılabilirliğinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya, 1994.
- [77] S. Kahraman, A. Ünyayar, *Pamuk sapı ile P. Chrysosporium ve F.trogii'nin yarı-katı fermantantasyonu sonucu oluşan lakkaz, peroksidaz, ligninaz ve sellüloz aktiviteleri*, **Doğa Türk Biyoloji Dergisi**, 22:3 (1998) 287-298.

- [78] Pınar Aytar, *Beyaz Çürükçül Funguslarla Linyit Kömüründen Kükürt Giderimi için Optimum Kosulların Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir, 2007.
- [79] Sibel Kahraman, *Endüstriyel ve Tarımsal Atıkların Biyoteknolojik Olarak Değerlendirilmesinde Yeni Bir Yaklaşım*, Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya, 1998.
- [80] R. Kumar, S. Singh, O. V. Singh, *Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives*, **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, 35 (2008) 377-391.
- [81] R. C. Kuhad, R. Gupta and A. Singh, *Microbial cellulases and their industrial applications*, **Enzyme Research**, 10.4061 (2011) 280696.
- [82] R. H. Doi, A. Kosugi, K. Murashima, Y. Tamaru, and S. O. Han, *Cellulosomes from mesophilic Bacteria*, **J. Bacteriol.**, 185 (2003) 5907-5914.
- [83] V. Arantes, J. N. Saddler, *Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis*, **Biotechnol. Biofuels**, 3 (2010) 4.
- [84] L. R. Lynd, P. J. Weimer, V. H. Van-Zyl and I. S. Pretorius, *Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology*, **Microbiol. Mol. Biol.**, 66 (2002) 506-577.
- [85] Ashabil Aygan, *Haloalkalofil BACILLUS SP. İzolasyonu, Amilaz, Selülaz ve Ksilanaz Enzimlerinin Üretimi, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulamalarda Kullanılabilirliği*, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 2008.
- [86] http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Types_of_Cellulase2.png
- [87] S. Thirumale, D. S. Rani, K. Nand, *Control of cellulase formation by trehalose in Clostridium papyrosolvens CFR-703*, **Process Biochem.**, 37 (2001) 241-245.
- [88] H. Tanaka, K. Koike, S. Itakura, A. Enoki, *Degradation of wood and enzyme production by Ceriporiopsis subvermisporea*, **Enzyme Microb. Technol.**, 45:5 (2009) 384-90.
- [89] P. Shrestha, S. K. Khanal, A. L. Pomettoiii, J. Van Leeuwen, *Enzyme production by wood-rot and soft-rot fungi cultivated on corn fiber followed by simultaneous saccharification and fermentation*, **J. Agric. Food Chem.**, 57:10 (2009) 4156–61.
- [90] C. M. Lo, Q. Zhang, N. V. Callow, L. K. Ju, *Cellulase production by continuous culture of Trichoderma reesei Rut C30 using acid hydrolysate prepared to retain more oligosaccharides for induction*, **Bioresource Technol.**, 101:2 (2010) 717-23.
- [91] M. Dashtban, H. Schraft, W. Qin, *Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities and perspectives*, **Int. J. Biol. Sci.**, 5:6 (2009) 578-95.
- [92] L. G. Ljungdahl, *The cellulase/hemicellulase system of the anaerobic fungus Orpinomyces PC-2 and aspects of its applied use*, **Ann. NY. Acad. Sci.**, 1125 (2008) 308-321.
- [93] W. Chung-Yi, H. Yi-Ru, C. C. Ng, H. Chan, H. T. Lin, T. Wen-Sheng, Y.T. Shyu, *Purification and characterization of a novel halostable cellulase from Salinivibrio sp. strain NTU-05*, **Enzyme Microb. Technol.**, 44 (2009) 373-379.

- [94] F. G. de Siqueira, E. G. de Siqueira, P. M. D. Jaramillo, M. H. L. Silveira, J. Andreus, F. A. Couto, L. R. Batista, EXF. Filho, *The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi*, **Int. Biodeter. Biodegr.**, 64:1 (2010) 20-6.
- [95] G. M. Mathew, R. K. Sukumaran, R. R. Singhanian, P. Ashok, *Progress in research on fungal cellulases for lignocellulose degradation*, **J. Sci. Ind. Res.**, 67:11 (2008) 898-907.
- [96] J. S. Bak, J. K. Ko, I. G. Choi, Y. C. Park, J. H. Seo, K. H. Kim, *Fungal pretreatment of lignocellulose by Phanerochaete chrysosporium to produce ethanol from rice straw*, **Biotechnol. Bioeng.**, 104:3 (2009) 471-482.
- [97] M. K. Bhat and S. Bhat, *Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications*, **Biotechnol. Adv.**, 15 (1997) 583-620.
- [98] R. R. Singhanian, R. K. Sukumaran, A. K. Patel, C. Larroche, A. Pandey, *Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases*, **Enzyme Microbial Technol.**, 46 (2010) 541-549.
- [99] M. K. Bhat, *Cellulases and related enzymes in biotechnology*, **Biotechnol. Adv.**, 18 (2000) 355-383.
- [100] F. Niehaus, C. Bertoldo, M. Kahler, G. Antranikian, *Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application*, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 51 (1999) 711-729.
- [101] B. Shrivastava, S. Thakur, Y. P. Khasa, A. Gupte, A. K. Puniya and R. C. Kuhad, *White-rot fungal conversion of wheat straw to energy rich cattle feed*, **Biodegradation**, 22:4 (2011) 823-831.
- [102] C. W. Bamforth, *Current perspectives on the role of enzymes in brewing*, **J. Cereal Sci.**, 50:3 (2009) 353-357.
- [103] E. A. Körlü, K. Duran, D. M. Bahtiyari, S. Perincek, *Selülaz enziminin selülozik esaslı kumaşlar üzerine etkisi*, *Tekstil ve Konfeksiyon*, Cilt:18, Sayı:1, (2008) 35-41.
- [104] M. Asla, A. Körlü, *Selülaz enziminin denim yıkamada kullanımı*, *Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi* Cilt: 3, Sayı:1, (2009) 11-23.
- [105] O. Balcı, G. Asker, N. Kurtoğlu, *Biyoparlatma ve reaktif boyama işlemlerinin kombine uygulanması ile hızlı boyama prosesi*, *Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi* Cilt:1, Sayı:1, (2010) 39-48.
- [106] M. Sandgren, J. Stahlberg, C. Mitchinson, *Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes*, **Prog. Biophys. Mol. Bio.**, 89 (2005) 246-291.
- [107] U. Topuz, Ö. E. Kıran, U. Çömlekçi, *Selülaz üreticisi Bacillus suşlarının enzimatik özelliklerinin araştırılması*, *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, Cilt:10, Sayı:2, (2007) 13-16.
- [108] N. Kulkarni, A. Shendye and M. Rao, *Molecular and biotechnological aspects of xylanases*, **FEMS Microbiol.**, 23 (1999) 411-456.
- [109] A. Cobos, P. Estrada, *Effect of polyhydroxylic cosolvents on the thermostability and activity of xylanase from Trichoderma reesei QM 9414*, **Enzyme Microbial Technol.**, 33 (2003) 810-818.
- [110] T. Collins, C. Gerday, G. Feller, *Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases*, **FEMS Microbiol. Rev.**, 29 (2005) 3-23.
- [111] M. L. T. M. Polizeli, A. C. S. Rizzatti, R. Monti, H. F. Terenzi, J. A. Jorge, D. S. Amorim, *Xylanases from fungi: properties and industrial applications*, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 67 (2005) 577-591.

- [112] P. Raweesri, P. Riengrunrojana, P. Pinphanichakarn, *α -L arabinofuranosidase from Streptomyces sp. PC 22: Purification, characterization and its synergistic action with xylanolytic enzymes in the degradation of xylan and agricultural residues*, **Bioresource Technol.**, 99 (2008) 8981-8986.
- [113] S. Subramaniyan, P. Prema, *Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology and application*, **Crit. Rev. Biotechnol.**, 22 (2002) 33-64.
- [114] S. Subramaniyan, P. Prema, *Cellulase-free xylanases from Bacillus and other microorganisms*, **FEMS Microbiol. Lett.**, 183 (2000) 1-7.
- [115] Q. K. Beg, M. Kapoor, L. Mahajan and G. S. Hoondal, *Microbial xylanases and their industrial applications*, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 56 (2001) 326-338.
- [116] S. Ahmed, S. Riaz, A. Jamil, *Molecular cloning of fungal xylanases: an overview*, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 84 (2009) 19-35.
- [117] V. W. Yang, Z. Zhuang, G. Elegir and T. W. Jeffries, *Alkaline-active xylanase produced by an alkaliphilic Bacillus sp. isolated from kraft pulp*, **J. Ind. Microbiol. Biot.**, 15 (1995) 434-441.
- [118] J. Lin, L. M. Ndlovu, S. Singh and B. Pillay, *Purification and biochemical characteristics of B-D xylanase from a thermophilic fungus, Thermomyces lanuginosus-SSBP*, **Biotechnol. Appl. Biochem.**, 30 (1999) 73-79.
- [119] L. P. Christov, M. Akhtar and B. A. Prior, *Impact of xylanase and fungal pretreatment on alkali solubility and brightness of dissolving pulp*, **Holzforschung**, 50 (1996) 579-582.
- [120] L. Viikari, M. Ranva, A. Kantelinen, J. Sandquist, M. Linko, *Bleaching with enzymes*, Third International Conference in biotechnology in pulp and paper industry, Stockholm, 16-19 June, (1986) 67-69.
- [121] A. Gessesse, *Purification and properties of two thermostable alkaline xylanases from an alkaliphilic Bacillus sp.*, **Appl. Environ. Microbiol.**, (1988) 3533-3535.
- [122] X. Chen, D. Whitmire and J. P. Bowem, *Xylanase homology modeling using the inverse protein folding approach*, **Protein Sci.**, 5 (1996) 705-708.
- [123] T. W. Jeffries, V. W. Yang and M. W. Davis, *Comparative study of xylanase kinetics using dinitrosalicylic, arsenomolybdate, and ion chromatographic assays*, **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 70:72 (1998) 257-265.
- [124] K. K. Y Wong, J. D. Richardson and S. D. Mansfield, *Enzymatic treatment of mechanical pulp fibers for improving paper making properties*, **Biotechnol. Prog.**, 16 (2000) 1025-1029.
- [125] W. Aehle, *Enzymes in industry*, Second Edition, WILEY-WCH, Weinheim, (2004) p. 514.
- [126] K. G. Güner, O. Dağlıoğlu, *Ksilanaz enziminin ekmek yapımında kullanımı*, Türkiye 10. Gıda Kongresi, Erzurum, 21-23 Mayıs (2008).
- [127] S. Rani and K. Nand, *Development of cellulase-free xylanase producing anaerobic consortia for the use of lignocellulosic wastes*, **Enzyme. Microb. Technol.**, 18 (1996) 23-28.
- [128] R. A. Moreau, M. J. Powell, B. D. Whitaker, B. A. Bailey, J. D. Anderson, *Xylanase treatment of plant cells induces glycosylation and fatty acylation of photosterols*, **Physiol. Plant.**, 91 (1994) 575-580.

- [129] M. J. Vazquez, J. L. Alonso, H. Dominquez, J. C. Parajo, *Xylo-oligosaccharides: manufacture and applications*, **Trends Food Sci. Technol.**, 11 (2000) 387-393.
- [130] O. Akpınar, K. Erdogan, S. Bostancı, *Production of xylo-oligosaccharides by controlled acid hydrolysis of lignocellulosic materials*, **Carbohydr. Res.**, 344 (2009) 660-666.
- [131] R. Khandeparker, M. Th. Numan, *Bifunctional xylanases and their potential use in biotechnology*, **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, 35 (2008) 635-644.
- [132] F. Evrendilek, C. Ertekin, *Assessing the potential of renewable energy sources in Turkey*, **Renew. Energ.**, 28 (2003) 2303-2315.
- [133] Ç. Karadağ, I. I. Gülsaç, A. Ersöz, M. Çalışkan, *Çevre dostu ve temiz: Yenilenebilir enerji kaynakları*, **Bilim ve Teknik**, 498 (2009) 24-27.
- [134] K. Kaygusuz, *Energy and environmental issues relating to greenhouse gas emissions for sustainable development in Turkey*, **Renew. Sust. Energ. Rev.**, 13 (2009) 253-270.
- [135] Y. Kar, Y. Tekeli, *The potential of biomass residues in Turkey and their importance as energy resources*, **Energy Sources**, Part A., 30:6 (2008) 483-493.
- [136] H. H. Ozturk, A. Bascetincelik, *Energy exploitation of agricultural biomass potential in Turkey*, **Energ. Explor. Exploit.**, 24 (2006) 313-330.
- [137] <http://www.agrowaste-tr.org>
- [138] K. Kaygusuz, S. Keleş, *Sustainable bioenergy policies in Turkey*, **J. Eng. Res. Appl. Sci.**, 1:1 (2012) 34-43.
- [139] M. Wayman and S. R. Parekh, *Biotechnology conversion*, Open University Press., Milton Keynes, (1990).
- [140] TÜİK, (2009). Türkiye İstatistik Kurumu, Bitkisel Üretim İstatistikleri Verileri, Ankara.
- [141] C. Güler, R. Özen, H. Kalaycıoğlu, *Pamuk (gossypium hirsutum L.) saplarından üretilen yonga levhaların bazı teknolojik özellikleri*, **Fen ve Mühendislik Dergisi**, Cilt:4, Sayı:1, (2001) 98-108.
- [142] H. Eroğlu ve A. Kırmızı, *Pamuk sapının kimyasal analizi ve lif özellikleri*. K. T. Ü. Orman Fakültesi Dergisi, 2, 2, Trabzon, (1979) 209-222.
- [143] N. Azbar, İ. Turan ve I. Cevilan, *Karasuyun kentsel arıtma tesisleri üzerindeki etkisi ve ön arıtma gerekliliğinin değerlendirilmesi*, I. Zeytin Yağı Üretiminde Çevre Sorunları ve Çözümleri Uluslararası Çalıştayı Bildiriler Kitabı, (2002) 1-6.
- [144] M. Masghouni, M. Hassairi, *Energy applications of olive-oil industry by-products: I. the exhaust food cake*, **Biomass Bioenerg.**, 18 (2000) 257-262.
- [145] E. Oktav, E. Ç. Çatalkaya ve F. Şengül, *Zeytinyağı üretimi atıksularının kimyasal yöntemlerle arıtımı*, DEÜ Mühendislik Fakültesi Fen ve Mühendislik Dergisi, 5:3 (2003) 11-21.
- [146] P. Paraskeva and E. Diamadopoulos, *Technologies for olive mill wastewater (OMW) treatment: a review*, **J. Chem. Technol. Biot.**, 81 (2006) 1475-1485.
- [147] N. Azbar, A. Bayram, A. Filibeli, A. Muezzinoglu, F. Sengul, A. Ozer, *A review of waste management options in olive oil production*, **Crit. Rev. Env. Sci. Tec.**, 34 (2004) 209-247.
- [148] F. Şengül, *Endüstriyel atıksuların özellikleri ve arıtılması*, Dokuz Eylül Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Yayınları, İzmir, (1991) 476.
- [149] N. Oruç, *Zeytinyağı fabrikası atığı karasu ekolojik kirlilik yerine toprak düzenleyici olabilir*, SAÜ Fen Edebiyat Dergisi, Cilt:14, Sayı:1, (2012).

- [150] N. Vassilev, M. Vassileva, V. Bravo, M. Fernandez-Serrano and I. Nikolaeva, *Simultaneous phytase production and rock phosphate solubilization by Aspergillus niger grown on dry olive wastes*, **Ind. Crop. Prod.**, 26 (2007) 332-336.
- [151] J. A. Morillo, B. Antizar-Ladislao, M. Monteoliva-Sánchez, A. Ramos-Cormenzana and N. J. Russell, *Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes*, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 82 (2009) 25-39.
- [152] A. Tsioulpas, D. Dimou, D. Iconomou, G. Aggelis, *Phenolic removal in olive mill wastewater by strains of Pleurotus pp. in respect to their phenol oxidase (laccase) activity*, **Bioresource Technol.**, 84 (2002) 251-257.
- [153] F. E. Ergul, S. Sargın, G. Ongen and F. V. Sukan, *Dephenolization and decolorization of olive mill wastewater through sequential batch and co-culture applications*, **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 27 (2010) 107-114.
- [154] F. Kalyoncu, E. Kalmış, *Pirinanın farklı pleurotus türlerinin yetiştiriciliğinde kullanım olanaklarının araştırılması*, BAÜ FBE Dergisi, Cilt:9, Sayı:2, Aralık (2007) 87-92.
- [155] E. Ü. Deveci, Ö. Çınar, *Zeytinyağı endüstrisi atıksularının arıtımında fungal defenolizasyonun önemi*, Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi, 4:2 (2011) 107-111.
- [156] U. Sidal, N. Kolankaya, C. Kurtonur, *Pseudomonas sp. ile zeytinyağı fabrikası atığından biyosüpfektan eldesi*, **Turk J. Biol.**, 24 (2000) 611-625.
- [157] M. Y. Kılıç, G. Kaya, K. Kestioğlu, *Kimyasal, biyolojik ve ileri arıtma yöntemleri ile zeytin karasuyunun arıtımına yönelik bir envanter çalışması*, Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi, Cilt:14, Sayı:2, (2009) 183-198.
- [158] Z. Kerem, D. Friesem and Y. Hadar, *Lignocellulose degradation during solid-state fermentation: Pleurotus ostreatus versus, Phanerochaete chrysosporium*, **Appl. Environ. Microbiol.**, 58:4 (1992) 1121-1127.
- [159] K. S. Sivaprakasam, M. Doraisamy and K. Seetharaman, *Factors influencing the sporophore production in oyster mushroom with special reference to Pleurotus sajor-caju*, **Int. J. Med. Mushrooms**, (1994) 134-138.
- [160] N. H. Abd El-Nasser, S. M. Helmy and A. A. El-Gammal, *Formation of enzymes by biodegradation of agricultural wastes with white rot fungi*, **Polym. Degrad. Stabil.**, 55 (1997) 249-255.
- [161] Y. H. Tan and M. N. Wahab, *Extracellular enzyme production during anamorphic growth in the edible mushroom, Pleurotus sajor-caju*, **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 13 (1997) 613-617.
- [162] P. V. Gawande, M. Y. Kamat, *Production of Aspergillus xylanase by lignocellulosic waste fermentation and its application*, **J. Appl. Microbiol.**, 87 (1999) 511-519.
- [163] M. A. Velazquez-Cedeno, G. Mata and J. M. Savoie, *Waste reducing cultivation of Pleurotus ostreatus ve Pleurotus pulmonarius on coffee pulp: Changes in the production of some lignocelleolytic enzymes*, **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 18 (2002) 201-207.
- [164] G. V. Reddy, P. R. Babu, P. Komaraiah, K. R. M. Roy and I. L. Kothari, *Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two Pleurotus species (P. osreatus and P. sajor-caju)*, **Process Biochem.**, 38 (2002) 1457-1462.

- [165] N. Mikiashvili, S. Wasser, E. Nevo, D. Chichua and V. Elisashvili, *Lignocellulolytic enzyme activities of medicinally important basidiomycetes from different ecological niches*, **Int. J. Med. Mushrooms**, 6 (2004) 63-71.
- [166] C. Qinnghé, Y. Xiaoyu, N. Tiangui, J. Cheng, M. Qiugang, *The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot fungus Pleurotus ostreatus*, **Process Biochem.**, 39 (2004) 1561-1566.
- [167] S. W. Kang, Y. S. Park, J. S. Lee, S. I. Hong, S. W. Kim, *Production of cellulases and hemicellulases by Aspergillus niger KK2 from lignocellulosic biomass*, **Bioresource Technol.**, 91 (2004) 153-156.
- [168] G. R. Mata, D. M. Murrieta Hernandez, L. G. Iglesias Andreu, *Changes in Lignocellulolytic enzyme activities in six Pleurotus spp. strains cultivated on coffee pulp in confrontation with Trichoderma spp.*, **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 21 (2005) 143-150.
- [169] E. M. Silva, A. Machuca and A. M. F. Milagres, *Effect of cereal brans on Lentinus edodes growth and enzyme activities during cultivation on forestry waste*, **Lett. Appl. Microbiol.**, 40 (2005) 283-288.
- [170] V. Elisashvili, M. Pennickx, E. Kachlishvili, M. Asatiani and G. Kvesitadze, *Use of Pleurotus dryinus for lignocellulolytic enzymes production in submerged fermentation of mandarin peels and tree leaves*, **Enzyme Microbial Technol.**, 38 (2006) 998-1004.
- [171] M. Stajić, L. Persky, D. Friesem, Y. Hadar, S. P. Wasser, E. Nevo and J. Vukojevic, *Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected Pleurotus species*, **Enzyme Microbial Technol.**, 38 (2006) 65-73.
- [172] A. M. Alexandrino, H. G. Faria, C. G. M. Souza and R. M. Peralta, *Reutilisation of orange waste for production of lignocellulolytic enzymes by Pleurotus ostreatus (Jack:Fr)*, **Ciênc. Technol. Aliment.**, 27:2 (2007) 364-368.
- [173] M. N. Shashirekha and S. Rajarathnam, *Bioconversion and biotransformation of coir pith for economic production of Pleurotus florida: Chemical and biochemical changes in coir pith during the mushroom growth and fructification*, **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 23 (2007) 1107-1114.
- [174] V. L. Papinutti, F. Forchiassin, *Lignocellulolytic enzymes from Fomes sclerodermeus growing in solid-state fermentation*, **J. Food Eng.**, 81 (2007) 54-59.
- [175] J. Gao, H. Weng, D. Zhu, M. Yuan, F. Guan, Y. Xi, *Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal Aspergillus terreus M11 under solid-state cultivation of corn stover*, **Bioresource Technol.**, 99 (2008) 7623-7629.
- [176] V. Elisashvili, M. Pennickx, E. Kachlishvili, N. Tsiklauri, E. Metreveli, T. Kharziani and G. Kvesitadze, *Lentinus edodes ve Pleurotus species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition*, **Bioresource Technol.**, 99 (2008) 457-462.
- [177] I. Membrillo, C. Sanchez, M. Meneses, E. Favela, O. Loera, *Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by Pleurotus ostreatus strains*, **Bioresource Technol.**, 99 (2008) 7842-7847.

- [178] M. J. Dinis, R. M. F. Bezerra, F. Nunes, A. A. Dias, C. V. Guedes, L. M. M. Ferreira, J. W. Cone, G. S. M. Marques, A. R. N. Barros, M. A. M. Rodrigues, *Modification of wheat straw lignin by solid state fermentation with white-rot fungi*, **Bioresource Technol.**, 100 (2009) 4829-4835.
- [179] C. Xu, F. Ma and X. Zhang, *Lignocellulose degradation and enzyme production by *Irpex lacteus* CD2 during solid-state fermentation of corn stover*, **J. Biosci. Bioeng.**, 108:5 (2009) 372-375.
- [180] R. Soni, A. Nazir, B. S. Chadha, *Optimization of cellulase production by a versatile *Aspergillus fumigatus* fresenius strain (AMA) capable of efficient deinking and enzymatic hydrolysis of solka floc and bagasse*, **Ind. Crop. Prod.**, 31 (2010) 277-283.
- [181] S. Kurt, S. Buyukalaca, *Yield performances and changes in enzyme activities of *Pleurotus* spp. (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*) cultivated on different agricultural wastes*, **Bioresource Technol.**, 101 (2010) 3164-3169.
- [182] C. S. Farinas, M. M. Loyo, A. B. Junior, P. W. Tardioli, V. B. Neto and S. Couri, *Finding stable cellulase and xylanase: evaluation of the synergistic effect of pH and temperature*, **New Biotechnol.**, 27:6 (2010) 810-815.
- [183] A. A. Dias, G. S. Freitas, G. S. M. Marques, A. Sampaio, I. S. Fraga, M. A. M. Rodrigues, D. V. Evtuguin, R. M. F. Bezerra, *Enzymatic saccharification of biologically pre-treated wheat straw with white-rot fungi*, **Bioresource Technol.**, 101 (2010) 6045-6050.
- [184] R. K. Sharma, D. S. Arora, *Production of lignocellulolytic enzymes and enhancement of in vitro digestibility during solid state fermentation of wheat straw by *Phlebia floridensis**, **Bioresource Technol.**, 101 (2010) 9248-9253.
- [185] S. K. Malik, H. Mukhtar, A. A. Farooqi and I. Ul-Haq, *Optimization of process parameters for the biosynthesis of cellulases by *trichoderma viride**, **Pak. J. Bot.**, 42:6 (2010) 4243-4251.
- [186] A. Singh, S. Tuteja, N. Singh, N.R. Bishnoi, *Enhanced saccharification of rice straw and hull by microwave-alkali pretreatment and lignocellulolytic enzyme production*, **Bioresource Technol.**, 102 (2011) 1773-1782.
- [187] P. Yang, L. Guo, S. Cheng, N. Lou, J. Lin, *Recombinant multi-functional cellulase activity in submerged fermentation of lignocellulosic wastes*, **Renew. Energ.**, 36 (2011) 3268-3272.
- [188] I. Membrillo, C. Sánchez, M. Meneses, E. Favela, O. Loera, *Particle geometry affects differentially substrate composition and enzyme profiles by *Pleurotus ostreatus* growing on sugar cane bagasse*, **Bioresource Technol.**, 102 (2011) 1581-1586.
- [189] D. Dutt, C. H. Tyagi, R. P. Singh, A. Gautam, S. Agnohotri and A. Kumar, *Isolation and biochemical characterization of crude xylanase from *coprinus cinereus* AT-1 MTCC 9695 and its effectiveness in biodeinking of sop*, **Cellulose Chem. Technol.**, 47 (3-4) (2013) 203-217.
- [190] M. Carabajal, L. Levin, E. Albertó, B. Lechner, *Effect of co-cultivation of two *Pleurotus* species on lignocellulolytic enzyme production and mushroom fructification*, **Int. Biodeter. Biodegr.**, 66 (2012) 71-76.
- [191] S. Pal, S. P. Banik, S. Khowala, *Mustard stalk and straw: A new source for production of lignocellulolytic enzymes by the fungus *Termitomyces clypeatus* and as a substrate for saccharification*, **Ind. Crop. Prod.**, 41 (2013) 283-288.

- [192] Ö. Yeşilada, S. Şık, M. Şam, *Biodegradation of olive oil mill waste water by Coriolus versicolor and Funalia trogii: Effects of agitation, initial COD concentration, inoculum size and immobilization*, **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 14 (1998) 37-42.
- [193] M. Mandels, R. Andreotti, C. Roche, *Measurement of saccharifying cellulase*, **Biotechnol. Bioeng. Symp.**, 6 (1976) 21-31.
- [194] G. L. Miller, *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*, **Anal. Biochem.**, 31 (1959) 426-428.
- [195] T. K Ghose, *Measurement of cellulase activities*, **Pure Appl. Chem.**, 59 (1986) 257-268.
- [196] Y. E. Lee, S. E. Lowe, J. G. Zeikus, *Regulation and characterization of xylanolytic enzymes of Thermoanaerobacterium saccharolyticum B6A-R1*, **Appl. Environ. Microbiol.**, 59:3 (1993) 763-771.
- [197] A. Singh, N. Singh, N. R. Bishnoi, *Production of cellulases by Aspergillus heteromorphus from wheat straw under submerged fermentation*, Proceedings of international conference on energy and environmental; March 19-21, (2009) 2070-3740.
- [198] 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 thermophila J18 on wheat straw in solid-state fermentation*, **Bioresource Technol.**, 97 (2006) 1794-1800.
- [199] M. T. Moreira, C. Palma, G. Feijoo, J. M. Lema, *Strategies for the continuous production of ligninolytic enzymes in fixed and fluidised bed bioreactors*, **J. Biotech.**, 66 (1998) 27-39.
- [200] J. Liu, X. Yuan, G. Zeng, J. Shi, S. Chen, *Effect of biosurfactant on cellulase and xylanase production by Trichoderma viride in solid substrate fermentation*, **Process Biochem.**, 41 (2006) 2347-2351.
- [201] P. B. Acharya, D. K. Acharya and H. A. Modi, *Optimization for cellulase production by Aspergillus niger using saw dust as substrate*, **Afr. J. Biotechnol.**, 7:22 (2008) 4147-4152.
- [202] M. Shahriarinnour, M. N. Abdul Wahab, R. Mohamad, S. Mustafa and A. B. Ariff, *Effect of medium composition and cultural condition on cellulase production by Aspergillus terreus*, **Afr. J. Biotechnol.**, 10:38 (2011) 7459-7467.
- [203] A. R. Shah, D. Madamwar, *Xylanase production by a newly isolated Aspergillus foetidus strain and its characterization*, **Process Biochem.**, 40 (2005) 1763-1771.
- [204] M. D. M. H. Khan, S. Ali, A. Fakhru'l-Razi, M. D. Z. Alam, *Use of fungi for the bioconversion of rice straw into cellulase enzyme*, **J. Environ. Sci. Health Part B.**, 42 (2007) 381-386.
- [205] O. M. Abdel-Fatah, M. M. Hassan, A. M. Elshafei, B. M. Haroun, H. M. Atta, A. M. Othman, *Physiological studies on carboxymethyl cellulose by Aspergillus terreus DSM 826*, **Braz. J. Microbiol.**, (2012) 01-11.
- [206] L. Li, H. Tian, Y. Cheng, Z. Jiang, S. Yang, *Purification and characterization of a thermostable cellulase-free xylanase from the newly isolated Paecilomyces thermophila*, **Enzyme Microbial Technol.**, 38 (2006) 780-787.
- [207] A. Tsioumpas, D. Dimou, D. Iconomou, G. Aggelis, *Phenolic removal in olive oil mill waste water by strains of Pleurotus spp. in respect to their phenol oxidase (laccase) activity*, **Bioresource Technol.**, 84 (2002) 251-257.

- [208] S. Kachouri, S. Halaouli, A. Lomascolo, M. Asther and M. Hamdi, *Decolourization of black oxidized olive-mill waste water by a new tannase-producing Aspergillus flavus strain isolated from soil*, **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 21 (2005) 1465-1470.
- [209] A. D. Annibale, D. Quarantino, F. Federici, M. Fenice, *Effect of agitation and aeration on the reduction of pollutant load of olive mill waste water by the white-rot fungus Panus tigrinus*, **Biochem. Eng. J.**, 29 (2006) 243-249.

ÖZGEÇMİŞ

İsim ve Soyadı : Demet DOĞAN
Doğum Yeri ve Tarihi : Yeşilyurt/MALATYA 16.02.1983
E-Posta : demet.dogan@inonu.edu.tr
Lisans : İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü 3. olarak bitirdi. 2001-2005.
Yüksek Lisans : İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, 2005-2008.

BİLİMSEL FAALİYETLER

- 1- Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu, 15-16 Haziran 2006, MALATYA
- 2- XVIII. Ulusal Biyoloji Kongresi, 26-30 Haziran 2006, Kuşadası/AYDIN. Dinleyici
- 3- Biyoloji Eğitimde Evrim Sempozyumu, 3-4 Mayıs 2007, MALATYA. Dinleyici
- 4- Biyokimya Anabilim Dalı Bahar Toplantısı, 18-19 Mayıs 2007, MALATYA. Dinleyici
- 5- VII. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, 10-13 Eylül 2007, MALATYA. Dinleyici
- 6- XVIII. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran 2008, TRABZON. Bildiri
- 7- Filiz Boran, Demet Doğan, Sibel Kahraman, Özfer Yeşilada, Yeni izole edilmiş *Pleurotus ostreatus*'un boyar madde giderim kapasitesinin saptanması, 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 03-07 Eylül 2012, Ege Üniversitesi, İZMİR (poster sunusu).

YAYINLAR

- 1- S. Kahraman, F. Kuru, D. Dogan, Ö. Yeşilada, *Removal of indigo carmine from an aqueous solution by fungus Pleurotus ostreatus*, **Arch. Environ. Prot.**, 38:3 (2012) 51-57.