

## Pamuk Sapı ile *Phanerochaete chrysosporium* ve *Funalia trogii*'nin Yarı-Katı Fermentasyonu Sonucu Oluşan Lakkaz, Peroksidaz, Ligninaz ve Selüloz Aktiviteleri

Sibel ŞİK

İnönü Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Biyoloji, Malatya-TÜRKİYE

Ali ÜNYAYAR

Mersin Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği, Mersin-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 22.06.1995

**Özet:** İki Beyaz-çürüçül fungus *Phanerochaete chrysosporium* ME 446 ve *Funalia trogii* tarafından pamuk sapının yarı-katı fermentasyonu ile lignosellülozik yıkım ve lignolitik enzim aktiviteleri çalışılmıştır. Lignosellülozik kaynak olarak pamuk sapının kullanılmasının sebebi, ülkemizde oldukça önemli miktarda oluşması ve lignin selüloz içeriğinin tespit edilmesi ile kağıt üretim endüstrisinde kullanılabilirliğinin araştırılmasıdır.

Yapılan çalışmalarda, pamuk sapının %23±2 lignin ve %40±3 selüloz içerdiği tespit edilmiştir. Yarı-Katı fermentasyon ile 20 günlük inkübasyon sonucu, *P. chrysosporium* %22 lignin ve %24 selüloz yıkımına, *F. trogii* ise %23 lignin, %27 selüloz yıkımına yol açmıştır.

Inkübasyon periyodu esnasında *P. chrysosporium* ve *F. trogii* tarafından ekstrasellüler olarak stok bazal ortamına salgılanan lakkaz, peroksidaz, ligninaz, selüloz enzim aktiviteleri 20 gün süresince 48 saatte bir belirlenmiştir. Ayrıca, kültür ortamına glukoz eklenerek veya çıkarılarak, glukozun fungal metabolizma ve lignolitik enzim aktiviteleri üzerine olan katabolik etkisi de araştırılmıştır. Glukoz içermeyen ortamlarda yapılan çalışmalar göstermiştir ki, özellikle lignin ve selüloz gibi polimer moleküllerin yıkımı için, glukoz gibi basit yapılı bir moleküle ihtiyaç duyulmaktadır. Çünkü bu ortamlarda, kuru misel ağırlığı (KMA) ile bağlantılı olarak yukarıda bahsedilen tüm enzim aktiviteleri glukoz içeren ortam ile karşılaştırıldığı zaman azalmıştır.

Sonuçlarımız göstermiştir ki, *P. chrysosporium* ve *F. trogii*'nin lignolitik sistemi fungal gelişimin sekonder metabolizması esnasında aktive edilmektedir.

**Anahtar Sözcükler :** Lignin yıkımı, lakkaz, peroksidaz, ligninaz, selüloz

### ***Phanerochaete chrysosporium* and *Funalia trogii* for the Degradation of Cotton stalk and Their Laccase, Peroxidase, Ligninase and Cellulase Enzyme Activities Under Semi-Solid State Conditions**

**Abstract:** The potential of white rot fungi, namely *Phanerochaete chrysosporium* ME 446 and *Funalia trogii* for the degradation of lignocellulosics and their ligninolytic enzyme activities under

semi-solid state conditions has been studied. In this study, cotton plant stalk which is an agrowaste, is used as lignocellulosics material. It's very good source of fibrous raw material for the manufacture of pulp and paper industry, and also is available abundantly. In this study, proportion of lignin and cellulose is in cotton stalk  $23\pm 2\%$  and  $40\pm 3\%$  respectively. Degradation of lignin and cellulose by *P. chrysosporium* and *F. trogii* under semi-solid state were determined during the 20 days of incubation period. Growth of *P. chrysosporium* on the cotton stalks resulted in the degradation of 22% lignin and 24% cellulose and also growth of *F. trogii* on the cotton stalks resulted in the degradation of 23% lignin and 27% cellulose. During the incubation period all extracellular enzyme activities, laccase, peroxidase, cellulase, ligninase, in the stock basal medium were determined in 48 hr. time intervals. Moreover, culture medium supplemented with glucose to investigate catabolic effects of glucose on the fungal metabolism, and also on the ligninolytic enzyme activities. For the degradation of polymeric molecules, such as lignin and cellulose, structurally simple molecules, like glucose is required. Because all enzyme activities that is described above related with dried mycelium weight decreased when compared with medium that is supplemented with glucose.

From these results, we conclude that ligninolytic enzyme systems of *P. chrysosporium* and *F. trogii* were activated during the secondary metabolism of fungal growth.

**Key Words:** Lignin degradation, laccase, peroxidase, ligninase, cellulase

## Giriş

Günümüzde kullanım alanı oldukça yaygın olan biyoteknolojik süreçler, organizma ve bileşenlerin tarım, besin ve diğer endüstriyel alanlarda kullanımı esasına göre çalışılmaktadır. Endüstriyel mikrobiyoloji ve biyoteknolojinin en önemli uygulama alanlarından biri olan yenilenebilir kaynak teknolojisi, özellikle tarım ve ormancılıktan gelen atık lignosellülozik maddelerin kimyasal hammadde ve enerji üretimi için kullanımını amaçlar.

Çevre kirliliği açısından atık lignosellülozik maddeler oldukça önemli bir yere sahiptir. Çünkü bu maddelerin yapısında bulunan lignin polimeri biyolojik ayrışmaya dirençli, rekalsitran bir maddedir.

Bitki biyokütlesi fotosentetik olarak fikse edilen karbondan meydana gelmiş lignin, selüloz ve hemisellülozdan oluşmuştur. Gymnosperm ve Angiosperm'lerin odunsu hücre duvarının %15-30'unu meydana getiren lignin selülozdan sonra bitki bünyesinde en bol bulunan doğal polimerdir. Lignin selüloz'un etrafında bir matriks şeklinde yer alır ve bu kabuk şeklindeki yapıdan dolayı selülozun mikrobiyel yıkımı geciktirilir. O halde lignin yıkımı global karbon döngüsündeki en önemli basamak olarak kabul edilebilir. Ayrıca bu karmaşık polimerin bitki bünyesinde yer alması, endüstriyel proseslerin büyük çoğunluğunda selüloz kullanımına da engel olur(1).

Lignosellülozik maddelerin doğada normal olarak süregelen biyolojik çevrimi biyoteknolojik alanlarda kullanılabilir. Doğada mikroorganizmalar tarafından üretilen enzimler aracılığı ile nötral pH'da ve düşük sıcaklıkta gerçekleşen bu süreçler endüstriyel alanda kullanıldığı zaman büyük oranda enerji tasarrufu sağlanabilir(2).

Çalışmamızda tarımsal bir atık olan pamuk sapının, kağıt üretim endüstrisi için ham-

madde kaynağı olabilirliği araştırılmıştır. Kağıt tüketiminin günden güne artması ve kağıt endüstrisinin temel hammaddesi olan ormanlarımızın hızla azalması nedeniyle alternatif hammadde kaynakları bulunması zorunluluğu vardır. Bu koşullar altında pamuk bitkisinin bir yan ürünü olan ve kağıt yapımı için kullanılan fibrilli hammaddelerin en iyi kaynağı olan pamuk sapı alternatif bir tarımsal atık olabilir(3).

Çalışmamızda lignosellülozik maddelerdeki lignini salgıladıkları enzimler ile yıkma özelliği gösteren Beyaz-çürükçül funguslar, pamuk sapı ile muamele edilerek üretilen enzimlerin aktiviteleri saptanmıştır. Bu nedenle, pamuk sapı Beyaz-Çürükçül funguslarla muamele edilmiş ve salgılanan ekstrasellüler enzimler aracılığı ile lignin yıkımı sağlanarak kimyasal kağıt hamuru üretim süreçlerinde oluşacak atık lignin miktarının azaltılması hedeflenmiştir.

## Materyal ve Metod

### Kullanılan Funguslar

Bu çalışmada, iki ayrı Beyaz-çürükçül fungus *Phanerochaete chrysosporium* ME 446 ve *Fusarium troglodytes* (Malatya) kullanılmıştır. Funguslar yatık saboraau dextrose agar(Oxoid) tüplerinde üretilmiş ve devamlılığı sağlamak için 20 günde bir transfer yapılmıştır. Hazırlanan fungal kültürler, deneylerde kullanılmak üzere +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

### Kullanılan Substrat

Çalışmamızda lignosellülozik kaynak olarak pamuk sapı kullanılmıştır. Pamuk sapsarı 0.5-2cm büyüklüğünde kesilerek fermentasyon ortamına ilave edilmiştir. Fungus ile işlem görmüş pamuk sapı değirmende (*Coffea grandis*) öğütülerek 0.180 mm parça büyüklüğünde toz haline getirilmiş ve lignin-sellüloz içeriği tespit edilmiştir. Lignin ve sellüloz içeriği Rosenberg ve Udegraff'ın kullandığı yöntemler Ünyayar'ın önerdiği şekilde modifiye edilerek belirlenmiştir (2,4,5).

### Kültür Ortamı

Çalışmamızda kullanılan kültür ortamı Ünyayar (2) tarafından kullanılan besiyeri gibidir. Bu ortam stok bazal medium (SBM) olarak bilinmektedir. Stok bazal ortam; 0.01 g/L  $CaCl_2$ , 0.05 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1 g/L  $(NH_4)_2H_2PO_4$ , 0,0025 g/L Yeast extract, 2 g kesilmiş pamuk sapı ve %1 oranında karbon kaynağı olarak glukoz içermektedir.

Kültür ortamına 1 mL fungal spor süspansiyonu eklenmiş ve her iki tip fungus için kültürler statik olarak 30°C'de 20 gün etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

### Enzim Analizleri

Tüm enzim analizleri (Fenoloksidazlar, ligninaz, sellülaz) kültür ortamının filtre kağıdından (Sands 5893,100 mm,mavi band) süzülmesi ile ekstrasellüler sıvı içerisinde belirlenmiştir.

Ligninaz(lignin peroksidaz) aktivitesi Tien ve Kirk (6) tarafından anlatıldığı gibi ölçülmüştür.Enzim aktivitesi 310 nm dalga boyuna ayarlanmış spektrofotometrede (Phillips

PU 8715) veratil alkolün veratil aldehite oksidasyonu ile saptanmıştır. Ligninaz aktivitesi, filtre kağıdından süzülerek elde edilen ekstraselüler sıvının Oledich Mikro santrifüjünde +4°C'de, 10 dak., 12.000xg'de santrifüjü sonucu elde edilen süpernatant solusyonu içinde belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı; 100 mM, pH 3.0 olan sodyum tartarat tamponu içinde hazırlanmış 0.4 mM, 20 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 2mM olan 2 µL veratil alkol ve 1 mL kültür süpernatant sıvısı içermektedir. Reaksiyon H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilave edilmesiyle derhal başlar ve 310 nm dalga boyunda absorbanans doğrusal olarak artar. Enzim aktivitesi µmol/L olarak tanımlanmıştır (7,8,9)

Fungusların lignolitik etkinliği ile ilgili olduğu öne sürülen fenoloksidaz aktiviteleri Lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin ölçülmesi ile saptanmıştır(2). Lakkaz (O<sub>2</sub>P-difenoloksidoredüktaz, E.C.1.10.32) aktivitesi ölçümünde, 4.9 mL guaiakol çözeltisi (0,1 M, pH 6.0 olan fosfat tamponu içinde hazırlanmış) ve 0.1 mL enzim kaynağı içeren reaksiyon karışımı (5 mL) 30°C'de 1 saat inkübe edilir ve 465 nm dalga boyunda absorbanans okunur. Peroksidaz (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: oksidoredüktaz, E.C.1.11.1.7) aktivitesi, Lakkaz aktivitesi tayininde kullanılan yöntemle göre ölçülmüştür, ancak reaksiyon karışımı 1.5 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içerecek şekilde hazırlanmıştır. Lakkaz ve peroksidaz enzim aktiviteleri OD olarak belirtilmiştir (10,11,12).

Selüloz enzim aktivitesi substrat olarak filtre kağıdının kullanılması ile Cfpaz aktivitesi olarak ölçülmüştür (13). Bu yöntemde, 50 mg Watman No:1 (1x6 cm) filtre kağıdı üzerine 0,005 M, pH 4.8 olan Asetat tamponundan 1 mL ve kültür süzuntüsünden 1 mL eklenerek, 50°C'de 3 saat inkübasyon uygulanmıştır. Bu karışımın 1 mL'sinden bir saatte oluşan indirgen şeker miktarı Dinitrosalisilik asit(DNS) yöntemi ile ölçülmüştür(14).

#### Kuru Misel Ağırlığı (KMA)

20 günlük inkübasyon perodu esnasında günlere bağlı olarak fungal kütle pamuk saplarından pens yardımı ile kazınmak ve koparılmak suretiyle ayrılmış ve 50°C'de, 24 saat kurutulduktan sonra KMA belirlenmiştir.

#### İstatistik Değerlendirme

Deneyler üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Elde edilen tüm verilerin aritmetik ortalamaları ve herbir ortalamanın standart sapması (Sd) hesaplanmıştır. Standart sapmaların hesaplanmasında SLIDE programı kullanılmıştır.

## Sonuç ve Tartışma

### Lignosellülozik Materyalin Lignin-Selüloz Oranı

Çalışmamızda lignosellülozik kaynak olarak kullanılan pamuk sapı, selüloz içediği yönünden zengin, ülkemizde oldukça önemli miktarlarda oluşan ve kullanım alanı çok kısıtlı olan (sadece yakacak olarak) bir tarımsal atıktır.

Pamuk sapının belirlenen lignin ve selüloz içeriği Tablo 1'de verilmiştir. Pamuk sapının lignin ve selüloz içeriği, sert odunluların lignin ve selüloz içeriğine benzemektedir(15,16). Pamuk sapının tespit edilen selüloz içeriği, çeşitli odun örnekleri ile karşılaştırıldığında, kara

çamda %47.50, kavakta %30, arpa samanında %35.30, kayında %42.50'dir(17,18). Bu bahsedilen odunsu maddelerin çoğu, günümüzde kağıt üretiminde kullanıldığı için pamuk sapının da selüloz içeriği kağıt üretimine uygun bir hammadde kaynağı olduğu söylenebilir.

Lignoselülozlu materyal	Lignin(%)	Selüloz(%)
Pamuk sapı	23.00	40.00

Tablo 1. Pamuk Sapının Lignin (%) ve Selüloz (%) Miktarı

Ülkemiz gibi, pamuk üretiminde önde gelen ülkelerden birisi olan Hindistan'da, son 10 yılda pamuk sapı ile ilgili yapılan çalışmalarda, kağıt üretimine uygunluğu ile ilgili pekçok sonuç elde edilmiştir. Yapılan çalışmalarda pamuk sapından birinci kalite kağıt üretileceği gösterilmiştir(3,19,20).

#### Yarı-Katı Fermentasyon ile Pamuk Sapında Meydana Gelen Lignin-Selüloz Yıkımı:

F. trogii ve P. chrysosporium'un glukoz içeren SBM ve içermeyen SBM'de neden oldukları lignin ve selüloz kayıpları Tablo 2'de verilmiştir. Glukoz içeren ortamda, glukoz içermeyen ortama göre daha fazla lignin ve selüloz kaybı meydana gelmesi, glukoz içermeyen ortama göre daha fazla lignin ve selüloz kaybı meydana gelmesi, glukoz içermeyen ortamda fungusların üreyebilmek için yeterli karbon ve enerji kaynağı bulamamasından kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla, KMA glukoz içeren SBM ile karşılaştırıldığında zaman glukoz içermeyen ortamda oldukça düşüktür. F. trogii ve P. chrysosporium 'da Glukoz(-) ortamla, Glukoz(+) ortamdaki lignin ve selüloz yıkım değerlerinin yakın olması; pamuk sapında bulunan hemisellüloz miktarından kaynaklanmış olabileceği fikrini vermektedir. Çünkü, funguslar tarafından lignin ve selüloz yıkım metabolizmasının düzenlenmesi, hemisellülozun yıkımı ile de yakından ilgilidir. Yapılan diğer çalışmalar göstermiştir ki odun yıkıcı fungusların çoğu hemisellüloz fraksiyonlarını selüloza tercih ederler(21,22). Bunun nedeni, odun hemisellülozunun amorf yapısı selülozun kristal yapısına göre daha kolay depolimerize olabileceği için fungusların selüloz yıkımından önce hemisellüloz yıkımına girmeleri olarak açıklanmaktadır (23). Bu bulgumuz diğer araştırmacıların sonuçlarını destekler niteliktedir. Ayrıca dünya literatürlerinde daha önce kullanılmayan F. trogii fungusunda da benzer metabolizmanın bulunması dikkate değer bir bulgudur.

Fungus türü	Lignin kaybı(%)		Selüloz kaybı (%)	
	Glukoz(-)	Glukoz(+)	Glukoz(-)	Glukoz(+)
P. chrysosporium	20.00	22.00	22.00	24.00
F. trogii	21.00	23.00	23.00	27.30

Tablo 2. F. trogii ve P. chrysosporium Funguslarının Glukoz İçeren ve içermeyen SBM'de Neden Oldukları Lignin ve Selüloz Kayıpları

## Ligrosellülozik Enzim Aktiviteleri

### P. chrysosporium için;

P. chrysosporium'da fenoloksidaz (Lakkaz-peroksidaz) enzim aktivitesi gözlenmemiştir. Bunun nedeni, Eriksson ve Ander tarafından fenoloksidaz aktivitesinin maskelenmesiyle açıklanmıştır (24,25).

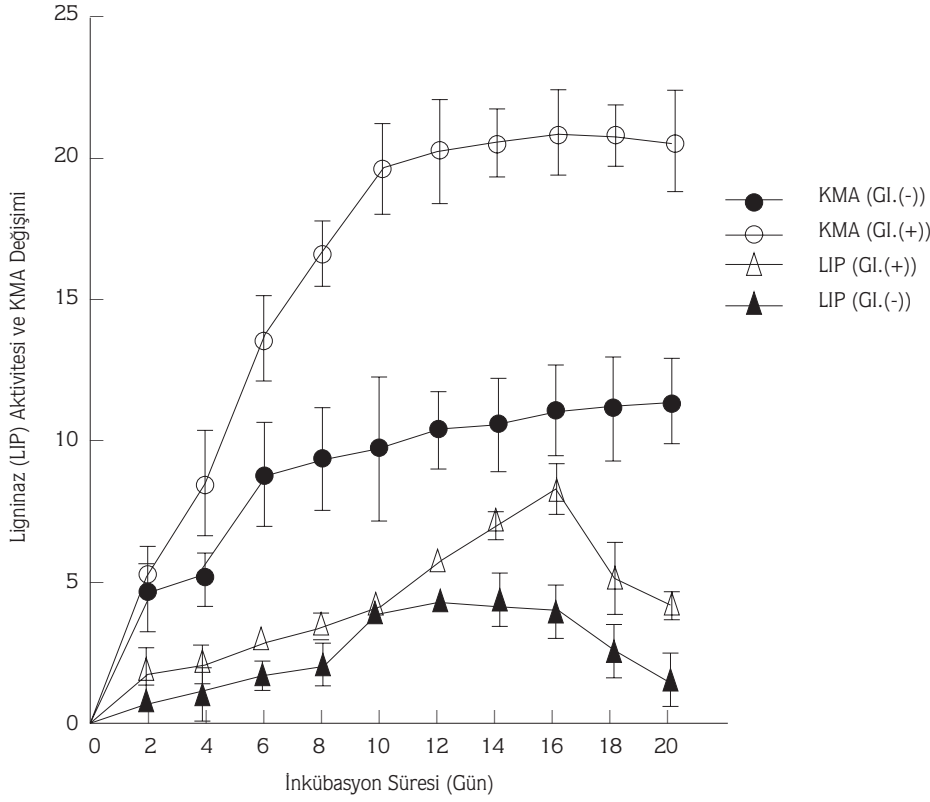
Maksimum lignin peroksidaz(ligninaz) enzim aktivitesi, 8.4 µmol/L olarak fermentasyon periyodunun 16. gününde elde edilmiştir. Glukoz içermeyen ortamda maksimum ligninaz aktivitesi 4.4 µmol/L olarak 12. günde elde edilmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre glukoz içermeyen ve glukoz içeren ortamlar arasındaki lignin peroksidaz aktivite farkları önemli bulunmuştur ( $p<0.05$ ) (Şekil 1). Glukoz içeren ortam ve içermeyen ortamda enzim aktivitelerinin, KMA artışının durduğu döneme denk geldiği şekilde de görülmektedir. Bu sonuçlar göstermektedir ki, bu enzim sekonder metabolizmanın ürünü olarak ekstrasellüler ortama salgılanmaktadır.

P. chrysosporium kültür ekstraktlarındaki maksimum selüloz aktivitesi 11.5 µmol/h olarak 12. günde elde edilmiştir. Glukoz içermeyen ortamda maksimum selüloz aktivitesi 5.6 µmol/h olarak 4. günde elde edilmiştir. İstatistiksel olarak selüloz aktivitesi glukoz içermeyen ve içeren ortamlarda karşılaştırıldığı zaman aradaki fark önemli bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Şekil 2'de görüldüğü gibi, selüloz aktivitesi glukoz içeren ve içermeyen ortamlarda inkübasyon periyodunun ilk günlerinde aynı düzeyde başlamış, ancak glukoz içeren ortamda maksimum selüloz aktivitesi inkübasyon periyodunun 12. gününde elde edilirken, glukoz içermeyen ortamda maksimum selüloz aktivitesinin inkübasyon periyodunun ilk gün-

Tablo 3. *P.chrysosporium* ile 20 Günlük Inkübasyon Sonucu (,Glukoz(-) ve Glukoz(+) Ortamlarda) Oluşan Enzim Aktivite ve KMA Değişimleri (KMA:mg/100 mL;Ligninaz: µmol/L; Sellüloz: µmol/h)

GÜN	KMA <sup>a</sup>		LIGNINAZ <sup>a</sup>		SELÜLAZ <sup>a</sup>	
	GL(-)	GL(+)	GL(-)	GL(+)	GL(-)	GL(+)
0	0	0	0	0	0	0
2	4.7±1.34	5.2±0.43	0.7±0.2	1.8±0.75	4.8±0.87	5.7±0.43
4	5.2±0.87	8.5±1.85	1.2±0.6	2.1±0.65	5.66±0.91	6.5±0.6
6	8.8±1.92	13.8±1.51	1.8±0.4	3±0.17	4.3±0.75	7.2±0.36
8	9.4±1.81	6.7±1.08	2.1±0.7	3.4±0.4	4±0.26	8.4±1.1.3
10	9.8±2.6	19.8±1.68	3.9±0.26	4.2±0.3	3.9±1.11	10.8±1.76
12	10.5±1.35	20.4±1.83	4.4±0.34	5.8±0.2	2.4±0.7	11.5±1.27
14	10.7±1.64	20.7±1.21	4.2±0.83	7.1±0.43	2.2±0.36	9.6±0.9
16	11.2±1.68	21.1±1.51	4.1±0.62	8.4±0.85	2±1.32	7.4±2.1
18	11.3±1.86	21±1.12	2.7±0.78	5.2±1.27	1.7±0.26	6.5±1.5
20	11.5±1.43	20.8±1.75	1.6±0.87	4.3±0.43	0.006±0.04	6.2±2.17

a:GL(-) ve GL(+) ortamlar arasındaki fark  $p<0.05$  seviyesinde önemlidir.



Şekil 1. *Phanerochaete chrysosporium* için Glukoz İçeren SBM ve Glukoz İçermeyen SBM'de Lignin Peroksidaz (LIP=Ligniniaz ( $\mu\text{mol/h}$ ) Aktivitesi ve KMA ( $\text{mg}/100\text{ mL}$ ) Değişimi

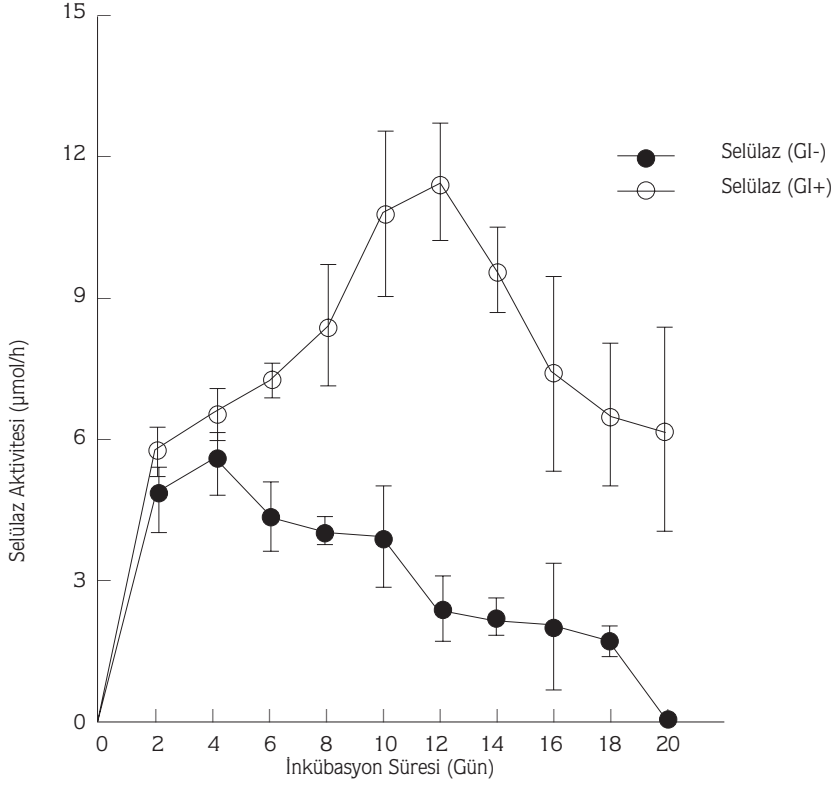
Tablo 4. *F. trogii* ile 20 Günlük İnkübasyon Sonucu (Glukoz(-) ve Glukoz(+)) Ortamlarda Oluşan Enzim Aktivite ve KMA Değişimleri (KMA: $\text{mg}/100\text{ mL}$ ; Ligniniaz:  $\mu\text{mol/L}$ ; Sellüloz:  $\mu\text{mol/h}$ )

GÜN	KMA <sup>a</sup>		LIGNINAZ <sup>a</sup>		SELÜLAZ <sup>a</sup>		LAKKAZ <sup>a</sup>		PEROKSIDAZ <sup>a</sup>	
	GL(-)	GL(+)	GL(-)	GL(+)	GL(-)	GL(+)	GL(-)	GL(+)	GL(-)	GL(+)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	2.8±0.36	3.6±0.26	0.8±0.1	3.9±0.26	5.8±0.34	5±0.4	0.142±0.009	0.198±0.016	0.098±0.01	0.162±0.005
4	3.2±0.3	5.4±0.52	1.2±0.17	4.8±0.4	6.6±0.34	5.3±0.36	0.165±0.006	0.231±0.003	0.104±0.00	0.174±0.003
6	4±0.43	6.3±0.26	1.5±0.3	5.7±0.6	2.1±0.3	10.8±0.72	0.228±0.017	0.488±0.029	0.157±0.00	0.283±0.005
8	4.5±0.51	7.8±0.51	1.8±0.26	6.2±0.26	1.3±0.36	13.3±0.43	0.260±0.013	0.547±0.007	0.162±0.00	0.302±0.003
10	5.3±0.55	8±0.2	2.2±0.2	7.6±0.45	1.8±0.34	13.3±0.45	0.326±0.008	0.596±0.007	0.182±0.00	0.296±0.005
12	5.7±0.43	8.2±0.26	2.4±0.26	8.1±0.26	2.66±0.4	13.3±0.43	0.302±0.006	0.428±0.002	0.154±0.00	0.165±0.006
14	5.8±0.26	8.3±0.4	2.1±0.36	6.3±0.2	2.66±0.19	12.6±0.52	0.332±0.005	0.502±0.009	0.165±0.00	0.177±0.006
16	5.9±0.55	8.4±0.36	1.1±0.3	5.4±0.17	2.66±0.12	10.6±0.36	0.435±0.013	0.586±0.013	0.214±0.00	0.296±0.014
18	5.9±0.2	8.5±0.26	1.1±0.36	3.3±0.26	3.7±0.36	8.2±0.36	0.485±0.02	0.492±0.003	0.226±0.00	0.258±0.007
20	6±0.26	8.5±0.1	1.2±0.3	1.5±0.2	6.6±0.1	6.66±0.44	0.308±0.009	0.469±0.015	0.213±0.00	0.247±0.005

a:GL(-) veGL(+) ortamlar arasındaki fark  $p<0.05$  seviyesinde önemlidir.

lerinde açığa çıkması fungusun karbon kaynağı olarak ortamda glukoz olmadığı için selüloza gereksinim duymasından kaynaklanmaktadır.

*P.chrysosporium* ile yapılan çalışmalarda elde edilen enzim aktivite değerleri ve KMA değişimleri aritmetik ortalama+Sd olarak Tablo 3'te toplu olarak gösterilmektedir.

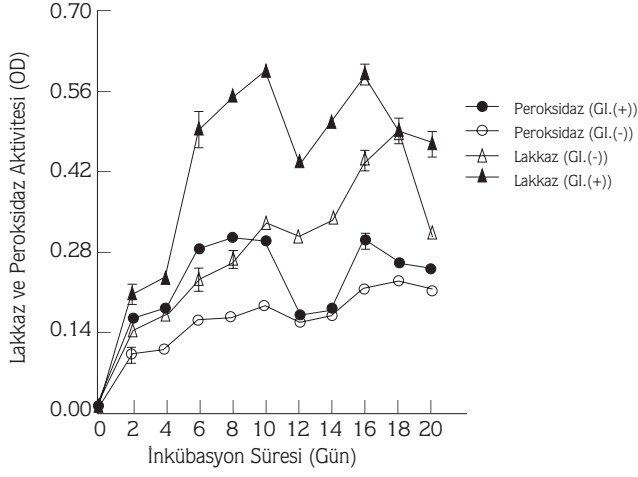


Şekil 2. *Phanerochaete chrysosporium* İçin Glukoz İçeren SBM ve Glukoz İçermeyen SBM'de Sellülaz (µmol/h) Aktivite Değişimi

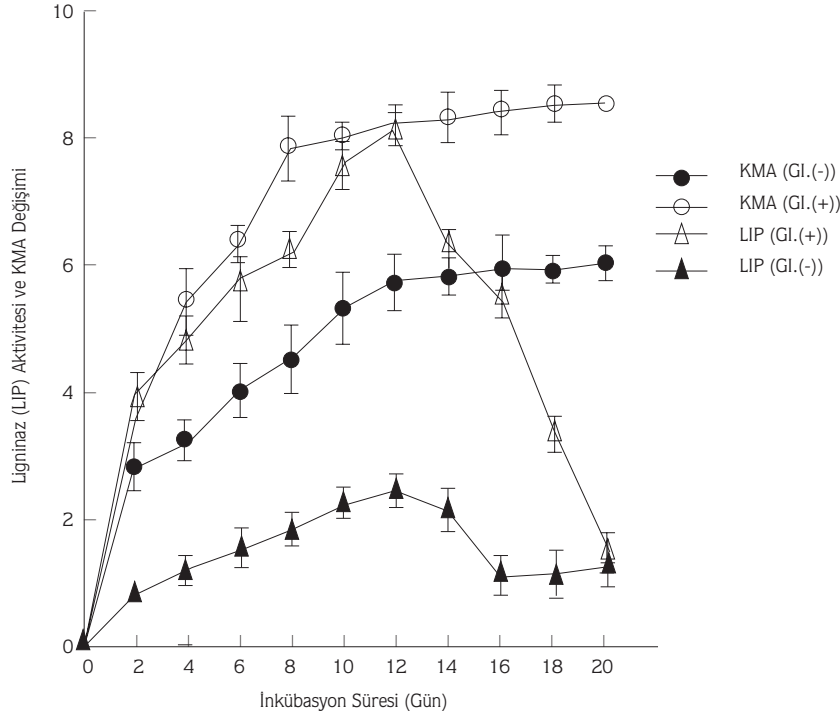
### F. trogii için

Beyaz-çürükçül fungus *F. trogii*'nin oldukça yüksek lakkaz ve peroksidaz aktivitesi gösterdiği saptanmıştır. Glukozlu ortamda lakkaz ve peroksidaz enzimleri 10. ve 16. günlerde maksimum aktivite gösterirken, glukoz içermeyen ortamda aynı enzimler 18. günde maksimum aktiviteye ulaşmıştır. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre, glukoz içeren ve içermeyen ortamlardaki lakkaz ve peroksidaz aktivite farkları önemli bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). *F.trogii* ile yapılan çalışmada, lakkaz ve peroksidaz enzimlerinin sentezinin primer fazda başladığı, se-

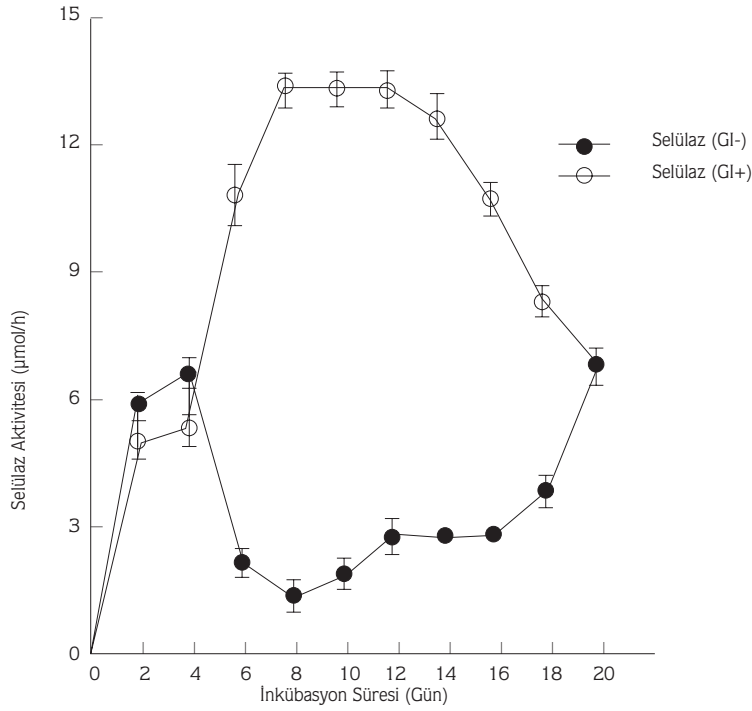




Şekil 3. *Funalia trogii* için Glukoz içeren SBM ve Glukoz İçermeyen SBM'de Lakkaz, Peroksidaz (OD/0.1 mL) Aktivite Değişimi



Şekil 4. *Funalia trogii* için Glukoz İçeren SBM ve İçermeyen SBM'de Lignin Peroksidaz (LIP=Ligninaz (µmol/h) Aktivitesi ve KMA (mg/100 mL) Değişimi



Şekil 5. *Funalia trogii* için Glukoz içeren SBM ve Glukoz İçermeyen SBM'de Sellülaz (µmol/h) Aktivite Değişimi

konder fazda sentezin devam ettiği gözlenmiştir, bu sırada da enzim aktivitesinde bir artma saptanmıştır(Şekil 3). Glukoz içermeyen SBM ortamında lakkaz ve peroksidaz enzimlerinin maksimum aktiviteye inkübasyon periyodunun sonuna doğru ulaştığı gözlenmiştir. Bunun sebebi ise, ortamda hazır halde kullanılabilir yeterli karbon ve enerji kaynağının bulunmaması ile açıklanabilir.

Fungusun odundaki hemisellüloz gibi lignin ve selüloza göre daha kolay metabolize edebildiği polisakkaritlerin yıkımı sonucu elde ettiği enerjiyi lignin yıkımı ile ilişkisi olan enzimlerin sentezi için kullandığını öne sürebiliriz. Maksimum lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin, bu nedenden dolayı inkübasyon periyodunun sonuna doğru açığa çıktığı düşünülebilir.

Fenoloksidazlar, ligninaz, selülaz enzim aktivitelere bakıldığı zaman, glukoz içermeyen ortamlarda her iki fungus için bahsedilen enzim aktivite baskılanmış gibi görünmektedir. Gold ve Alic(1) lignin yıkımının ortamda daha kolay metabolize edilen glukoz gibi bir ko-substrat varlığında daha fazla aktivite edildiğini göstermiştir. Bu aktivasyon artışı, glukozun kolaylıkla hücre tarafından metabolize edilerek, hücre üremesini artırması ve dolayısıyla enzim aktivitesinin yüksek olarak ortaya çıkması ile açıklanmaktadır.

Glukoz bulunmayan ortamda her iki fungusun da kolaylıkla metabolize edebileceği bir karbon ve enerji kaynağı büyüme ortamında olmadığı için, üreme hızları, glukozlu ortama göre çok düşük kalmıştır. Bu nedenle glukozlu ve glukozsuz ortamdaki enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında, glukozsuz büyüme ortamında daha düşük olduğu gözlenmiştir.

Tüm dünyada, erdüstriyel alanlarda biyoteknolojik yöntemler kullanılarak maliyetin düşürülmesi prensibine göre yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. Ülkemizde de, bu anlamda yapılan çalışmaları desteklemek açısından, pamuk sapının kağıt üretimi için uygun bir hammadde kaynağı olduğunu ve Beyaz-çürükçül fungusların kağıt üretim endüstrisinde kullanımının enerji tasarrufu sağlayacağını söyleyebiliriz. Çünkü kağıt üretimi için kullanılacak lignoselülozik maddelere funguslar ile bir ön işlem uygulandığı zaman, süreç sonunda oluşacak atık lignin oranında bir azalma olacak ve ligninin çevre kirlenici rolü azalacaktır. Aynı zamanda süreç sonunda yaklaşık %30 oranında bir enerji tasarrufu eldesi mümkün olacaktır(26,27,28).

Bu amaçla, fungus fizyolojisi içerisinde yer alan lignin yıkımından sorumlu olan enzim ve enzim sistemleri arasındaki ilişkinin saptanarak daha ayrıntılı bir şekilde açıklanması gerekmektedir.

### Teşekkür

Bu çalışma TUBİTAK,TBAG-AY121 projesi tarafından desteklenmiştir.

### Kaynaklar

1. Gold, M., Alic, M., Molecular biology of the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *Microbiological Reviews*,57:3,605-622,1993
2. Ünyayar, A., Biyoteknolojik bir yaklaşımla Beyaz-çürükçül funguslarda lignolitik enzim sistemi ve Absisik asit (ABA) arasında ilişkinin araştırılması, İnönü Üniv. Fen Bilimleri Enst. Doktora tezi. 1992
3. Pandey, S.N.,Shaikh, A.J., Production of various grades of paper from cotton stalk, *Indian pulp and paper*, 40:14-18,1986
4. Rosenberg, S.L., Physiological studies of lignocellulose degradation by the Thermotolerant Mold *Chrysosporium prunosum*, *Symposium on the biological transformation of lignocellulose*, 12:133-142,1980
5. Ubdegraff, M.D., Semimicrodetermination of cellulose in biological materials, *Analytical biochemistry*, 32:420-424,1969
6. Tien, M., Kirk, T.K., Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium* purification, characterization and catalytic properties of a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring oxygenase, *Proc.Natl.aced.Sci.USA*, 81:2280-2284,1984
7. Kirk, T.K., Croan, S., Tien, M., Production of multiple ligninase by *P.chrysosporium*:effect of selected growth condition and use of a mutant strain. *Enzyme Microb.Technol.* 8:27-32,1986
8. Faison, B.D., Kirk, T.K., Factors involved in the regulation of a ligninase activity in *P. chrysosporium*. *Appl. and Environ.Microbiol.*29:2,229-304,1985
9. Kirk, T.K., Tien, M., Johnsrud, S.C., Eriksson, K.E., Lignin degrading activity of *P. chrysosporium* Burds: Comparison of cellulase-negative and other strain. *Enzyme Microb. Technol.* 8:75-80,1986

10. Fişkin, K., Ünyayar, A., Yeşilada, Ö., Beyaz-çürükçül fungusların lakkaz ve peroksidaz aktivitelerine bağlı lignin degradasyonu. Doğa Türk Biyoloji Dergisi, 13:3, 141-148,1989
11. Yeşilada, Ö., Ünyayar, A., Fişkin, K., Gözükara, E., Statik inkübasyon sırasında Beyaz-çürükçül fungusların lakkaz ve peroksidaz aktiviteleri. KÜKEM Dergisi, 12,2: 91-96,1989
12. Ünyayar, A., Fişkin, K., Lignin yıkımından sorumlu enzimlerden lakkaz, peroksidaz ve lignin peroksidaz'ın (Biodisk Reaktörde) regülasyonunun araştırılması, Proje No:I.Ü.A.F. 89-07,1992
13. Mandels, M., Kostick, J.,Parizel, R., The use of absorbed cellulose in the continous conversion of cellulose to glucose.Jour. polymer Sci. Part C,36:445-459,1971
14. Miller, G.L., Use of dinitrosalicilik acid reagent for determination of reducing sugar. Anal.Chem.31:426-428,1959
15. Reid, I.D., Chao, E.E., Dawson, P.P.S., Lignin degradation by P.chrysosporium in agitated cultures. Can.J.Microbiol. 31:88-90,1985
16. Musha, Y., Goring, D.A.I., Klason and acid-soluble lignin content of hardwoods. Wood Sci. 7:133-134,1974
17. Ünyayar, A., Bio-pulp üretiminde Beyaz-çürükçül fungusların kullanılması. Master Tezi.Hacettepe Ün.v.Fen Bilimleri Enst. Ankara,1988
18. Gök, S., Arpa ve buğday samanının sindirimini artırılması üzerine araştırmalar. Doktora Tezi. Hacettepe Ün.v.Fen Bilimleri Enst. Ankara,1985
19. Balasubramanya, R.H., Pai, Y.D., Shaikh, A.J., Khandeparkar, V.G., Biological softening of spent cotton-plant stalks for the preparation of pulp. Biological wastes,30:317-320,1989
20. Shaikk, A.J., Blending of cotton stalk pulp with bagasse pulp for paper making. Biological wasters, 31:37-43,1990
21. Blanchette, R.A., Screening wood decayed by White-rot fungi for preferential lignin degradation. App.Enviro. 48:647-653,1984
22. Blanchette, R.A., Reid, I.D., Ultrastructural aspects of wood delignification by Phlebia(Merulius) tremellosus. App. Environ. Microbiol. 52:239-245,1986
23. Reid, I.D., Deschamp, A.M., Nutritional regulation of synthetic lignin (DHP) degradation by the selctive White-rot fungus Phleia (Merulius) tremellosa:effect of glucose and other cosubstates. Can. J.Bot. Vol:69,147-155,1991
24. Eriksson, K.E., Enzyme mechanism involved in cellulose hydrolysis by the rot fungus Sporotrichum pulverulentum. Biotech. and Bioeng., 20:317-332,1978
25. Ander, P., Eriksson, K.E., Degradation of lignin and lignin relater substance by Sporotrichum pulverulentum (P. chrysosporium) Lignin biodegradation. Microbiology chemistry and potential applications, T.K. Kirk, T. Higuchi and H.Chang (eds), CRC,Press Inc.Boca Raton, Florida,II,1,2,-14, 1981
26. Akhtar, M. Artrridge, M.C.,Myers, G.C., Blanchette, R.A., Biome hanical pulping of loblolly pine chips with selected White-rot fungi. Holzforschung, 47:36-40, 1993
27. Leatmaan, G.F., Myers, G., Wigner, T.H., Blanchette, R.A., Energy saving in biomechanical pulping, in bootechnology in pulp and paper manufacture. Stoneham, Butterworths, MA1989
28. Eriksson, K.E., Valender, L., Biomechanical pulping in lignin biodegradation. Microbiology Chemistry and Applications, CRC. Press Inc., 1980