

58

DELİGNİFİKASYON İŞLEMİNDE
PLEUROTUS TÜRLERİNİN KULLANIMI
ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Özfer Yeşilada

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav
Yönergesi'nin

Biyoloji Anabilim Dalı için öngördüğü

BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

MALATYA
Haziran, 1988

"Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne"

İş bu çalışma, jürimiz tarafından BİYOLOJİ
Anabilim Dalında BİLİM UZMANLIĞI TEZİ olarak
kabul edilmiştir.

Başkan Prof. Dr. A. Nihat BOZCUK

Üye Prof. Dr. Engin M. GÖZÜKARA

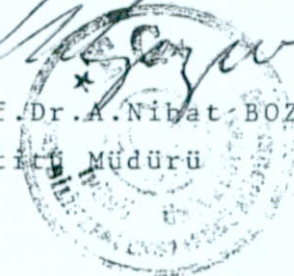
Üye Yrd. Doç. Dr. Kayahan FİSKİN

ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait
olduğunu onaylarım.

.30./..6./ 1988

Prof. Dr. A. Nihat BOZCUK
Enstitü Müdürü



Aileme,

TEŞEKKÜR

Bu çalışma İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde yapılmıştır.

Araştırmanın başlamasından bitirilmesine kadar ilgi ve desteğini esirgemeyen tez yöneticim, İnönü Üniversitesi Rektör'ü Sayın Prof. Dr. Engin M. GÖZÜKARA'ya teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmanın bütün aşamalarında değerli öneri, eleştiri ve yardımları ile katkıda bulunan Bölüm Başkanı Prof. Dr. A. Nihat BOZCUK'a ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Yrd. Doç. Dr. Kayahan FIŞKIN'a; çalışmalar sırasında yardımcı olan Arş.Grv. Ali ÜNYAYAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

I Ç İ N D E K İ L E R

	<u>Sayfa</u>
TEŞEKKÜR	V
TABLolar DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX-X
1. GENEL BİLGİLER.	1
1.1. Giriş	1
1.2. Lignoselüloz'un Kimyası ve Biyolojik Parçalanması	3
1.2.1. Bitki hücre duvarı yapısı	3
1.2.2. Lignoselülozlu materyalin biyolojik parçalanması	6
2. YÖNTEM ve GEREÇLER	12
2.1. Çalışmalarda Kullanılan Lignoselülozlu Materyalin Hazırlanışı ve Kimyasal Analiz	12
2.1.1. Lignoselülozlu örneklerde lignin ve selüloz mik- tarının ölçümü	12
2.2. Çalışmalarda Kullanılan Mikroorganizmalar	13
2.3. Fermentasyon Besiyerlerine Ekim ve Üretim	14
2.4. Kültürlerde Fenoloksidaz Aktivitelerinin Ölçülmesi	14
3. BULGULAR	16
3.1. Lignoselülozlu Örneğin Kimyasal Bileşimi	16
3.2. Pleurotus Cinsi Fungusların Optimum Fizyolojik Koşulların Saptanması	16
3.3. Beyaz Çürükçül Fungusların Çam Odununda Uygulanma- sı Sonucunda Lignoselülozlu Örnekteki Lignin (%) ve Selüloz (%) Kayıpları	25
3.4. Funguslarda Fenoloksidaz (Lakkaz ve Peroksidaz) Sentezinin Günlere Bağlı Değişimi	27
4. TARTIŞMA	33

ÖZET 38
SUMMARY. 39

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Lignoselülozlu örnekte % lignin, % selüloz ve % toplam şeker miktarları	16
3.2. Statik şişe (yarı-katı ortam) fermentasyonu ile üretilen fungusların çamda oluşturdukları lignin ve selüloz kaybı	26
3.3. %0.005 indulin AT, %1 glukoz içeren SBM besiyer- lerinde <i>P. sajor-caju</i> , <i>P. florida</i> ve <i>P. ostreatus</i> - un bağıl lakkaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi	32
3.4. %0.005 indulin AT, %1 glukoz içeren SBM besiyerle- rinde <i>P. sajor-caju</i> , <i>P. florida</i> ve <i>P. ostreatus</i> 'un bağıl peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı de- ğişimi	32

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Lignin molekülünün fenilpropan birimleri	4
1.2. Ligninin kimyasal yapısı	5
3.1. Değişik pH'larda üretilen <i>P. sajour-caju</i> 'nun çam odununda neden olduğu lignin ve selüloz kaybı	17
3.2. Değişik pH'larda üretilen <i>P. florida</i> 'nın çam odununda neden olduğu lignin ve selüloz kaybı	18
3.3. Besiyeri pH'sının <i>P. sajour-caju</i> 'nun üremesine ve çam odununda lignin kaybına etkisi	19
3.4. Besiyeri pH'sının <i>P. florida</i> 'nın üremesine ve çam odununda lignin kaybına etkisi	20
3.5. Değişik sıcaklıklarda üretilen <i>P. sajour-caju</i> 'nun çam odununda neden olduğu lignin ve selüloz kaybı.	21
3.6. Değişik sıcaklıklarda üretilen <i>P. florida</i> 'nın çam odununda neden olduğu lignin ve selüloz kaybı. . .	22
3.7. Besiyeri sıcaklığının <i>P. sajour-caju</i> 'nun üremesine ve çam odununda lignin kaybına etkisi	23
3.8. Besiyeri sıcaklığının <i>P. florida</i> 'nın üremesine ve çam odununda lignin kaybına etkisi	24
3.9. Çam odununda üremiş <i>P. florida</i> 'nın görünüşü.	26
3.10. Lakkaz aktivitesi sonucu inkübasyon süresine göre ölçülen absorbans değerindeki değişim	27
3.11. Peroksidaz aktivitesi sonucu inkübasyon süresine göre ölçülen absorbans değerindeki değişim	28
3.12. %0.005 indulin AT, %1 glukoz içeren SBM besiyerinde <i>P. sajour-caju</i> 'nun bağıl lakkaz ve peroksidaz aktivitesinin günlere bağlı değişimi	29

- 3.13. %0.005 indulin AT, %1 glukoz içeren SBM besiye-
rinde *P. florida*'nın bağıl lakkaz ve peroksidaz
aktivitesinin günlere bağılı değişimi 30
- 3.14. %0.005 indulin AT, %1 glukoz içeren SBM besiye-
rinde *P. ostreatus*'un bağıl lakkaz ve peroksidaz
aktivitesinin günlere bağılı değişimi 31
- 4.1. Lignin degradasyonu ve selüloz hidrolizi arasın-
daki ilişki 35

I. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Bitkilerin yapısındaki lignoselülozlu materyaller biyolojik olarak CO₂, H₂O ve humus gibi maddelere dönüşür. Bununla beraber, her yıl yaprak döküntüleri saman ve odun talaşı yapısındaki lignoselülozlu artıklar sanayi fazlası olarak birikmekte ve artık maddelerden yeterince yararlanılamamaktadır.

Lignin vasküler bitkilerin kuru ağırlığının yaklaşık %30'unu oluşturur. Yüksek bitkilerin sekonder (ikincil) duvarı ve orta lamelinde bulunan 3 boyutlu heterojen bir polimer olan lignin, bitki hücre duvarının dayanıklılığını sağlamaktadır (Sarkanen ve Hergert, 1971; Mudgett ve Paradis, 1985; Evans, 1987). Bitkilerin içerdiği lignin miktarı türden türe ve hatta aynı türde bile değişiklik göstermektedir.

Lignin bileşikleri yapılarında organik karbon içermektedir. Bundan dolayı lignin içeren dokuların, özellikle odunun, biyolojik parçalanmasının doğadaki karbon kaynağı döngüsünde önemli bir yeri vardır (Daniel vd., 1987). Lignin, dayanıklı yapısına karşın, enerjice zengin basit bileşikler oluşturmak ve ekolojik dengeyi sağlamak amacıyla doğada mikroorganizmalar tarafından parçalanmaktadır.

Lignoselülozlu materyalin, kağıt endüstrisinde ve geviş getiren hayvanlar için besin olarak yeterince kullanılabilmesi için yapısında bulunan ligninin parçalanması gerekir (Arora ve Sandhu, 1987). Lignin kağıt hamuru üretiminde temel atık üründür. Kağıt hamuru üretiminde selülozdan tam olarak yararlanabilmek için odun yapısında bulunan ligninin uzaklaştırılması gereklidir. Lignin birçok süreçte işlenen selüloz ve hemiselülozun parçalanmasını engeller (Bellamy, 1974; Kirk ve Farrell, 1987).

Kağıt hamuru üretiminde ligninin uzaklaştırımı için mekanik ve kimyasal süreçlerden yararlanılmaktadır. Fakat bu tür işlemlerin pahalı olması, günümüzde araştırmacıları değişik alternatifler aramaya yöneltmiştir.

Kağıt hamuru endüstrisinde, lignin moleküllerini kullanılabilir ürünlere çevirme ve atıklarla muamele gibi süreçlerde biyolignolitik sistemler potansiyel olarak uygulanabilir. Bundan dolayı son yıllarda ligninin biyolojik parçalanması üzerinde araştırmalar geliştirilmektedir (Eriksson ve Vallender, 1981; Pilon vd., 1982; Eaton, 1985; Kirk vd., 1986).

Ligninin biyolojik parçalanmasının moleküler mekanizmasını anlamak için yapılan çalışmalar yıllardır sürdürülmektedir. (Crowford ve Crawford, 1984). Fakat biyolojik reaksiyonların moleküler işlevleri hakkındaki bilgi azlığı, biyoteknolojinin kağıt endüstrisi içinde yaygın kullanım alanı bulmasını önlemektedir (Eriksson, 1985).

Bununla beraber son yıllarda, selüloz ve ligninin metabolik olarak değişikliğe uğratılmasında ve parçalanmasında rol oynayan enzim mekanizmalarının anlaşılmasında önemli adımlar atılmıştır (Westermarck ve Eriksson, 1974; Higuchi, 1982; Kirk vd., 1986; Miki vd., 1986).

Pekçok fungus, odun bileşenleri olan selüloz, hemiselüloz ve lignini parçalayabilen hücre dışı enzimler salgırlar. Şüphesiz biyolojik süreçte en kullanışlı olanı, lignin dahil bütün hücre bileşenlerini parçalayan ve Basidiomycetes sınıfına dahil olan beyaz çürükçül funguslardır (Eriksson ve Vallender, 1981).

Kağıt hamuru üretiminde beyaz çürükçül fungusların kullanılabilmesi için araştırmalar sürdürülmektedir. Bazı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda Basidiomycet'ler ile

muamele edilmiş kıymıkların rafine edilmesinde daha az enerjiye ihtiyaç duyulduğu ortaya konmuştur (Pilon vd., 1982). Ayrıca bazı araştırmacılar kağıdın direnç ve parlaklığını artırmak için kimyasal kağıt hamurlarını mayalar ve funguslar ile muamele etmektedirler (Pilon vd., 1982).

Çalışmamızda son yıllarda lignolitik özellikleri geniş bir şekilde ortaya konan bazı beyaz çürükçül funguslar (*Pleurotus florida*, *Pleurotus ostreatus* ve *Pleurotus sajor-caju*) kullanılmıştır. Bu funguslardan *P. florida* ve *P. sajor-caju*'nun lignoselülozlu (çam odunu) besi ortamlarında üretilmesi halinde lignolitik özelliklerinin araştırılması ve her bir beyaz çürükçül fungus için ligninin uzaklaştırılması yönünden optimum fizyolojik koşulların saptanması amaçlanmıştır.

Ayrıca *P. florida*, *P. ostreatus* ve *P. sajor-caju*'nun, indulin AT (lignin) içeren besiyerlerinde günlere bağlı fenoloksidaz aktivitelerindeki değişimler incelenmiştir.

1.2. Lignoselüloz'un Kimyası ve Biyolojik Parçalanması

1.2.1. Bitki Hücre Duvarı Yapısı

Bitkilerin hücre duvarında üç önemli bileşen bulunmaktadır. Bunlar; selüloz, hemiselüloz ve lignin olup duvarın yapısında 4:3:3 oranında yer almaktadırlar (Fröss vd., 1980).

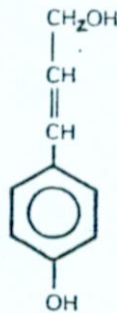
Ağaçların ve diğer yüksek yapıllı bitkilerin hücre duvarının temel yapısal bileşeni olan selüloz, β -(1-4)- glikozid bağları ile bağlı; β -D-glukopiranoz birimlerinin lineer bir polimeridir (Wilson ve Hamilton, 1986). Birçok odun türünde kuru ağırlığın yaklaşık %40-45'i selülozdur. Bunun büyük bir kısmı sekonder hücre duvarında yer almaktadır.

Pamuk liflerinde %90 oranında selüloz bulunmaktadır (Cowling ve

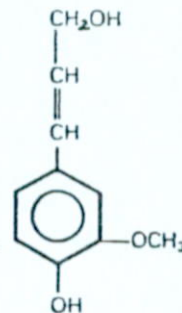
Brown, 1969). Uzun düz zincirli bir yapıya sahip olduğu gösterilen bu bileşikte, bazı düzensiz dallanmaların da meydana geldiği ileri sürülmüştür (Gök, 1985).

Hemiselüloz molekülleri de selüloz gibi, polisakkarittir. Fakat, bunların selülozdan birçok farkları vardır (Wilson ve Hamilton, 1986). Hemiselüloz 5 temel şekerden meydana gelir. Bunlar, 3 heksoz (glukoz, mannoz, galaktoz) ve 2 pentoz (ksiloz, arabinoz) şekeridir (Haun, 1970). Hemiselülozda ayrıca uronik asit de yer almaktadır (Wilson ve Hamilton, 1986). Çalışmalarda çam trakeidlerinin hemiselüloz dağılımı saptanmıştır. Buna göre hücre duvarının orta lamelindeki karbohidrat materyalinin yaklaşık %67'sini hemiselüloz oluşturmaktadır. Sekonder tabakanın dış kısmı (S₁) orta kısma (S₂) göre hemiselülozca daha zengindir. S₂ duvarında yer alan hemiselüloz toplam karbohidrat materyalinin yaklaşık %37'sini içermektedir. Hemiselüloz selülozdan daha kısa zincirlidir ve önemli bir özelliği ise, kolaylıkla hidroliz edilmesidir (Haun, 1970).

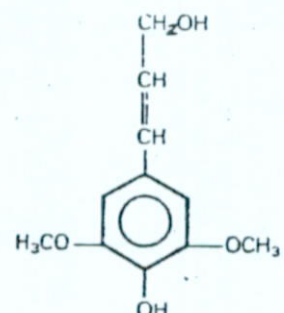
Lignin molekülü fenilpropan birimlerinden oluşan bir aromatik polimerdir. Fenilpropan monomerlerinin aromatik halkalarında yer alan gruplar lignin tipini vermektedir (Şekil 1.1) (Evans, 1987).



p-Koumaril alkol



Koniferil alkol



Sinapil alkol

Şekil 1.1. Lignin molekülünün fenilpropan birimleri (Evans, 1987).

Lignin molekülü bitki hücre duvarında, selüloz ve hemiselüloza bağlı olduğu için, lignini kimyasal olarak değişmeden izole etmek zordur. Lignin, izole edilme yöntemine göre; Klason lignini, Kraft lignini, Milled Wood lignini (öğütülmüş odun lignini) ve Braun's Native lignini olarak adlandırmalar yapılmaktadır (Gök, 1985).

Klason lignin metodu %72'lik sülfürik asitle 20°C'da veya %3'lük asitle 100°C'da polisakkaritlerin uzaklaştırımını içermektedir. Bu metod konifer odunundaki lignin miktarı için doğru sonuçlar vermektedir (Sarkanen, 1970).

1.2.2. Lignoselülozlu Materyalin Biyolojik Parçalanması

Lignin molekülünün biyolojik parçalanması üzerine birçok araştırma yapılmasına karşın, bazı funguslar dışında, mikroorganizmaların lignin molekülünü parçalayabilme yetenekleri tam olarak açıklanmamıştır. Ayrıca bu süreçte rol oynayan mekanizmalar, yani ligninin biyolojik parçalanmasında rol oynayan mekanizmalar, tam anlamı ile ortaya konulamamıştır. Bu alandaki çalışmalar ve araştırmalar sürekli olarak artmaktadır.

Bazı araştırmacılara göre lignin çeşitli kimyasal metodlarla parçalanmaktadır. Ligninin kimyasal süreçlerle parçalanması çok pahalı olup, kimyasal işlemler sonucu oluşan değişikliğe uğratılmış lignin ticari açıdan düşük değerlidir. Bu nedenle daha kullanışlı lignin uzaklaştırma yöntemleri geliştirmek için, biyolojik-lignin parçalayıcı sistemler üzerinde çalışılmaktadır (Rosenberg, 1980). Lignoselülozlu kalıntıların biyolojik süreçle kullanılabilir kimyasallara çevrildiği açıklanmıştır (Arora ve Sandhu, 1985).

Lignin aneorobik olarak parçalanamaz (Kirk ve Farell, 1987). Bazı fungus, Actinomycetes ve bakterilerin lignini parçalayabildikleri bilinmektedir (Kirk ve Highley, 1973; Hiroi ve Eriksson, 1976; Daniel vd., 1987; Ginterova ve Lazarova, 1987; Njoku ve Antai, 1987).

Streptomyces türlerinden ikisinin kullanıldığı bir çalışmada, lignin molekülünün yüksek oranda parçalanabildiği ve lignoselülozlu maddenin protein içeriğinin arttığı gösterilmiştir (Njoku ve Antai, 1987). Yapılan bazı çalışmalarda radyoaktif işaretli (^{14}C)-koniferil alkol dehidropolimerinin *Nocardia* ile 15 günlük inkübasyonu sırasında yaklaşık %4'ünün $^{14}\text{CO}_2$ olarak ortaya çıktığı belirtilmiştir (Forney ve Reddy, 1980).

Funguslar odun çürümesine farklı şekilde neden olmakta ve bunlar yumuşak çürükçül, kahverengi çürükçül veya beyaz çürükçül olarak adlandırılmaktadır (Eriksson ve Vallander, 1981).

Yumuşak çürükçül funguslar Ascomycetes ve Fungi Imperfecti sınıfına dahildirler (Eriksson ve Vallander, 1981; Higuchi, 1982; Evans, 1987). Bunlar tarafından oluşturulan çürümede esas olarak odun polisakkaritleri parçalanmakta yani lignin parçalanması polisakkarit parçalanmasının gerisinde kalmaktadır (Eriksson ve Vallander, 1981; Higuchi, 1982; Kirk, 1984).

Odun dokusunda ortaya çıkan kahverengi çürüme ve beyaz çürüme esas olarak Basidiomycetes sınıfına giren funguslar tarafından oluşturulmaktadır. Kahverengi çürükçül funguslar odundaki selüloz ve hemiselülozu parçalarken, lignini sınırlı olarak parçalarlar (Kirk ve Adler, 1970; Pilon vd., 1982; Kirk, 1984). Kahverengi çürükçül funguslar ve beyaz çürükçül funguslar taksonomik olarak çok yakın olmalarına karşın, her iki grubun lignin ve selüloz üzerindeki etkileri farklıdır. Muhtemelen her iki

grup da lignini aynı reaksiyonlar ile yıkmakta fakat kahverengi çürükçül funguslarda bazı reaksiyonların durdurulması sonucu lignin parçalanmamaktadır (Kirk, 1984).

Basidiomycetes sınıfına dahil olan beyaz çürükçül funguslar bitki hücre duvarının, selüloz, hemiselüloz ve lignin dahil bütün bileşenlerini parçalamaktadır (Higuchi, 1982; Pilon vd., 1982; Evans, 1987; Kirk ve Farrell, 1987). Beyaz çürükçül funguslar tarafından lignin parçalanması aerobik şartlarda meydana gelmekte ve oksidatif bir süreçte oluşmaktadır (Gök, 1985). Lignin molekülü, mineralizasyon sırasında aromatik halka kırılması dahil, çeşitli oksidatif değişiklikler geçirmektedir (Kirk ve Farrell, 1987).

Beyaz çürükçül bir fungus olan *Phanerochaete chrysosporium*'un lignini parçalayıcı etkisi geniş olarak çalışılmıştır (Kirk vd., 1976; Ander vd., 1981; Johsroun ve Eriksson, 1985; Kirk vd., 1986). Araştırmalar beyaz çürükçül fungusların birçoğunun, kısıtlı azot içeren ortamlarda, lignini daha fazla parçaladığını göstermiştir (Keyser vd., 1978). *Phanerochaete chrysosporium* ile sentetik ^{14}C -ligninin $^{14}\text{CO}_2$ 'e parçalanması sırasında, besi yerine selüloz veya glukozun eklenmesinin gerekli olduğu ileri sürülmüştür (Kirk vd., 1978). Bazı araştırmacıların lignin parçalanmasını artırmak için yaptıkları çalışmalara göre, selüloz ortamında gelişen *P. chrysosporium* kültürüne glukoz eklenmesi sonucu, selüloz parçalama aktivitesinin baskılandığı belirtilmektedir (Eriksson, 1985).

Lignin tek başına fungusların üreme ortamı olarak kullanılamaz ve lignolitik sistemin sentezi üzerine de herhangi bir etkisi yoktur. Fungusda sekonder metabolizmanın bir bölümü olarak görülen lignolitik sistem, sınırlı azot içeren ortamda ve

glukoz ya da selüloz varlığında faaliyete geçmektedir (Forney vd., 1982; Higuchi, 1982). Beyaz çürükçül fungusların lignini parçalayabilmek için, polisakkaritlere ve düşük moleküllü şekerlere ihtiyaç duydukları belirtilmektedir. Şeker molekülünün, hücre büyümesinde, metabolizma için gerekli olan hidrojen peroksitin oluşturulmasında gerekli olduğu bilinmektedir (Eriksson, 1985). Oksijen konsantrasyonunun da ligninin parçalanma hızını etkilediği gösterilmiştir (Higuchi, 1982).

Geliştirilen radyoaktif işaretli preparatların (^{14}C -lignin) ligninin parçalanması çalışmalarında kullanılmaya başlanması, bu alanda hızla bilgi artışını sağlamıştır. Sentetik ve doğal ligninlerle yapılan çalışmalar, sentetik ligninlerin doğal ligninlerle aynı yapısal alt birimleri içerdiğini göstermektedir. Bu nedenle sentetik ligninlerin, parçalanma çalışmalarında, uygun bir polimer olarak kullanılabilmesi bildirilmiştir (Kirk vd., 1975). Alkali süreçte kağıt hamuru eldesi sırasında oluşan Kraft lignini (^{14}C -lignin) parçalanması üzerine yapılan çalışmada, kraft lignininin ilk 100-200 saatlik inkübasyon süresinde daha hızlı parçalanmasına rağmen, gerçekte doğal lignine göre mikrobiyolojik bozunmaya daha dirençli olduğu ve kraft lignininin, düşük molekül ağırlıklı kısımlarının yüksek molekül ağırlıklı kısımlarına göre daha hızlı parçalandığı ortaya konmuştur (Crawford vd., 1977).

Kompleks bir aromatik molekül olan ligninin nasıl parçalanabildiği, 2 teori ile açıklanmaya çalışılmıştır.

1) Ligninin parçalanması mikrobik enzimler aracılığı ile olmaktadır.

2) Lignin parçalanmasında hidroksi radikaller ($\cdot\text{OH}$), superoksit anyonu ($\text{O}_2^{\cdot-}$), tekil (singlet) oksijen ($^1\text{O}_2$) ve hidrojen

peroksit (H_2O_2) gibi aktif oksijen türleri rol almaktadır (Crawford ve Crawford, 1984).

Son zamanlarda ligninin parçalanmasında rol oynadıkları düşünülen çeşitli enzimler saptanmıştır. Ligninaz, fenoloksidaz ve Mangan peroksidaz enzimleri bunlar arasındadır.

Fenoloksidazlar ligninin tamamı ile parçalanmasını sağlayan enzim kompleksinin bir parçasıdır (Westermarck ve Eriksson, 1974). Ander ve Eriksson (1976) ligninin parçalanması için fenoloksidaz aktivitesinin gerekli olup olmadığını karşılaştırdıkları çalışmada, fenoloksidaz eksikliği olan mutantların kraft lignini ve odun ligninini parçalamadığını, oysa ortama yüksek derecede saflaştırılmış lakkaz ilavesi ile lignin parçalanmasının sağlandığını saptamışlar ve beyaz çürükçül fungusların lignin parçalama yeteneğinin hücre dışı enzim olan fenoloksidazların üretilmesi ile ilgili olduğunu açıklamışlardır.

Lignini parçalayan beyaz çürükçül fungusların fenoloksidaz aktivitesi bakımından pozitif reaksiyon verdiği belirtilmektedir. Bir kısım araştırmacılara göre fenoloksidazlar lignin oksidasyonu ve parçalanmasını sağlamaktadır. Fakat bu enzimin esas görevi lignin ve lignin yıkım ürünlerinin polimerizasyonudur. Yine bazı araştırmacıların yaptıkları çalışmalarda fenoloksidazların lignin fenollerinden metil grubu uzaklaştırımına neden olduğu bildirilmiştir (Ander ve Eriksson, 1976). *Polyporus sanguineus*'dan izole edilen lakkazın lignin benzeri aromatik bileşiklerin demetilasyonunu ve oksidasyonunu sağladığı belirtilmektedir (Sandhu ve Arora, 1985).

Parçalanmada görevli bir başka enzim ise sellobioz: kinon oksidoredüktaz (COR) (sellobioz dehidrogenaz)dır. Bu enzim lakkaz vasıtası ile oluşan kinonların indirgenmesinden

sorumlu olup, polimerik ligninin yeniden sentezini önlemektedir (Westermarck ve Eriksson, 1974).

Tien ve Kirk (1984) *P. chrysosporium* kültürlerinden lignin modelleri ile polimerik lignini parçalayabilen ve lignin peroksidaz (ligninaz) olarak tanımlanan bir protein izole ettiklerini ve bu enzimin aromatik halka kırılması, fenol oksidasyonu ve metil grubu uzaklaştırım fonksiyonlarına sahip olduğunu bildirmişlerdir. Lignini parçalayabilen Mangan peroksidaz enziminin *P. chrysosporium* kültürlerinden izole ve karakterize edildiği belirtilmektedir (Evans, 1987; Kirk ve Farrell, 1987). Faison ve Kirk'e (1985) göre *P. chrysosporium* kültürlerine veratril alkol eklenmesi, ligninaz üretimini artırmaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalara göre, hidrojen peroksit üretim aktivitesi ile lignolitik aktivite arasında bir ilişki olup, hidrojen peroksitten oluşan hidroksi radikallerin, lignin yapısının parçalanmasında rolü vardır (Forney vd., 1982). Ancak, yapılan bu çalışmalar sonucu elde edilen bilgilere rağmen, bugün için parçalanma mekanizmasının biçimi ve bu mekanizmada görevli olan enzimlerin tamamı tam olarak saptanamamış olup, araştırmalar yoğun bir biçimde sürdürülmektedir.

2. YÖNTEM VE GEREÇLER

2.1. Çalışmalarda Kullanılan Lignoselülozlu Materyalin Hazırlanışı ve Kimyasal Analiz

Çalışmalarda lignoselüloz kaynağı olarak çam (*Pinus nigra*) odun kıymıkları kullanılmıştır. Kullanılan çam odunları Malatya Sanaayi bölgesinden temin edilmiştir. Çam odunlarından önce kıymık talaşı hazırlanmış, daha sonrada bu talaşlar öğütülerek ince toz haline getirilmiş ve 0.150 mm'lik eleklerden elenmiştir.

2.1.1. Lignoselülozlu Örneklerden Lignin ve Selüloz Miktarının Ölçümü

Toplam şeker ve lignin miktarı Rosenberg'in (1980) önerdiği yöntemine göre hesaplanmıştır. Bunun için 200 mg kurutulmuş toz halindeki materyal, 5 ml %72'lik H_2SO_4 ile 3 saat hidroliz edilmiş ve daha sonra, distile su ile toplam hacim 50 ml'ye tamamlanmıştır. Bu örnekler 1 gece bekletildikten sonra daha önce darası alınmış filtre kağıtlarından (Sand S, 589³, mavi bant, 110 mm çap) süzülmüştür. Uygun biçimde seyreltilen süzüntünün 1 ml'sine %72'lik H_2SO_4 içinde hazırlanan antron reaktifinden 5 ml eklenerek çalkalayıcıda (Nuvemix) hızla karıştırılmıştır. Bu karışım 12 dakika kaynar su banyosunda tutulmuş ve soğutulduktan sonra oluşan renk, 620 nm dalga boyunda, kolorimetrede (Bousch Lomb, spectronic 200) su ile hazırlanmış köre karşı okunmuştur. Bulunan absorbans değerleri glukoz ile çizilmiş standart eğriden hesaplanmış ve % toplam şeker glukoz cinsinden ifade edilmiştir.

Ayrıca selüloz ile çizilen standart grafikten % selüloz bulunmuştur. Standart selüloz grafiğinin çizimi için, Ünyayar (1988) tarafından kısmen değiştirilen, Updegraff'ın (1969)

önerdiği yöntem kullanılmıştır. Bu amaçla 6 saat 105°C da kurutulmuş ve desikatörde soğutulmuş stok selülozdan 50 mg alınmış ve 10 ml %72'lik H_2SO_4 'de hidroliz edilmiştir. Daha sonra toplam hacim distile su ile 500 ml'ye tamamlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan çözelti $100 \mu\text{g/ml}$ selüloz içermektedir. Bu örneklere 5 ml antron reaktifi eklenmiş ve selüloz standart grafiği elde edilmiştir. Absorbans değerleri standart eğriden hesaplanmıştır. Bu absorbanslardan yararlanılarak selüloz % değerleri hesaplanmıştır.

Lignin miktarını ölçmek için filtre kağıdı üzerindeki kalıntı kullanılmıştır. Bu kalıntı, filtrat pH'sı 5.0 olana kadar distile su ile yıkanmış ve bir gece 65°C 'lık fırında kurutulmuştur. Daha sonra ağırlıkları tesbit edilmiştir. Filtre kağıdı ve örnekler, darası alınmış krozelere konmuş ve bir gece 550°C 'de kül fırınında (Nüve MF 100) bırakılmıştır. Daha sonra fırından çıkarılan örneklerin kül miktarı ve filtre kağıdının kül miktarı hesaplanmış ve bunlardan yararlanılarak lignin miktarı saptanmıştır.

2.2. Çalışmalarda Kullanılan Mikroorganizmalar

Çalışmalarda Basidiomycetes sınıfına giren beyaz çürükçül funguslar kullanılmıştır. Bunlardan *Pleurotus sajor-caju* ve *Pleurotus florida* Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümünden temin edilmiştir. *Pleurotus ostreatus* ise Işıloğlu tarafından Malatya bölgesinden izole edilip, laboratuvarımızda kültüre alınmıştır.

Bu mikroorganizmalar sabouraud dextrose agar (Difco) eğik besiyeri tüplerinde 30°C 'de 5 veya 6 gün inkübe edildikten sonra çalışmalarda kullanılmak üzere $\pm 4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

2.3. Fermentasyon Besiyerlerine Ekim ve Üretim

Çalışmalarda kullanılan besiyerleri, Forney ve Reddy (1980) ve Kirk'ün (1981) önerdikleri besiyerlerinde bazı değişiklikler yapılarak hazırlanmıştır. Besiyeri gr/lt'de; 0.2 K₂HPO₄; 0.1 CaCl₂ . 2H₂O; 0.05 MgSO₄.7H₂O; 0.5 (NH₄)H₂PO₄., 0.1 Malt özütü (Sigma) içermektedir. Besiyerlerinde karbon kaynağı olarak değişik miktarlarda glikoz ve çam odunu kullanılmıştır. Erlenmayer şişelerine konulan besiyerlerinin pH'sı, 0.1 N HCl ve 0.1 N NaOH ile ayarlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan besiyerleri otoklavda 120°C, 15 dakikada ve 1 atmosfer basınç altında steril edilmiştir.

Hazırlanan steril besiyerlerine ekim mişelyum süspansiyonu şeklinde yapılmıştır. Bu teknikte eğik agarlı stok besiyerlerinde üretilen funguslar 10 ml serum fizyolojik ile karıştırılarak misel kitlesi kaldırılmış ve iyice homojenize edilerek misel süspansiyonu hazırlanmıştır. Daha sonra besiyerlerine 1 ml misel süspansiyonu/20 ml besiyeri olacak şekilde ekim yapılmıştır.

Organizmaların üretiminde yarı-katı üretim tekniği kullanılmıştır. Yarı-katı üretimde; yukarıda anlatılan şekilde hazırlanmış kültürler statik (durağan) şekilde 20 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresince besiyerlerinin buharlaşmasını önlemek için inkübatör içindeki bağıl nem, %70-80 olarak tutulmuştur.

2.4. Kültürlerde Fenoloksidaz Aktivitelerinin Ölçülmesi

Fungusların lignolitik etkinliğinde önemli bir rolü olduğu ileri sürülen fenoloksidaz aktiviteleri *Pleurotus* cinsine giren funguslarda yarı-katı üretim süresince incelenmiştir. *Pleurotus sajour-caju*, *Pleurotus florida* ve *Pleurotus ostreatus* türlerinin

kullanıldığı çalışmada inkübasyon süresine bağlı olarak fenoloksidaz aktivitelerindeki değişimler incelenmiştir. Çalışmalarda fenoloksidaz aktiviteleri lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin ölçülmesi ile saptanmıştır (Westermarck ve Eriksson, 1974; Ander ve Eriksson, 1976; Hiroi ve Eriksson, 1976; Gök, 1985).

Lakkaz (O_2 : p-difenol oksido-redüktaz, E.C.1.10.3.2) aktivitesi ölçümünde guaiakol (Sigma) substrat olarak kullanılmış ve bunun oksidasyonu sonucu ortaya çıkan kinonlara bağlı olarak oluşan renk 465'nm dalga boyunda kolorimetrede okunmuştur. Bulunan absorban değerleriyle bağlı lakkaz aktivitesi hesaplanmıştır. Lakkaz aktivitesi ölçümünde, reaksiyon karışımı sodyum fosfat tamponu (0.1 M, pH 6.0) ile 5 ml'de 10 mikro mol. guaiakol çözeltisi eklenerek karışım $30^{\circ}C$ 'de 60 dakika inkübe edilmiştir. Bağlı lakkaz aktivitesi inkübasyon karışımının optik yoğunluğunda 0.01 birim artışa neden olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

Peroksidaz (verici H_2O_2 : oksidoredüktaz, E.C.1.11.1.7) aktivitesi, lakkaz aktivitesi tayinine benzer yöntemle ölçülmüştür. Ancak bu yöntemden farklı olarak reaksiyon karışımı $1.5 \mu l$ H_2O_2 içerecek şekilde hazırlanmıştır. Bağlı peroksidaz aktivitesi inkübasyon karışımının optik yoğunluğunda 0.01 birim artışa neden olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Lignoselülozlu Örneğin Kimyasal Bileşimi

Yürütülen çalışmalarda kullanılan lignoselülozlu örnekte lignin, selüloz ve toplam şeker miktarının tayini, bu örneklerin % cinsinden kimyasal içeriğini saptamak amacı ile yapılmış; elde edilen değerler çalışmalar süresince lignoselülozlu örneğin kimyasal bileşimindeki değişiklikleri araştırmak ve ortaya koymak için kullanılmıştır. İncelenen lignoselülozlu örneğin lignin (%), selüloz (%) ve toplam şeker (%) yönünden kimyasal bileşimi tablo 3.1'de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre Gymnosperm odun örneği olarak kullanılan çam odununun lignin içeriği %30, selüloz içeriği %47.5 olarak saptanmıştır.

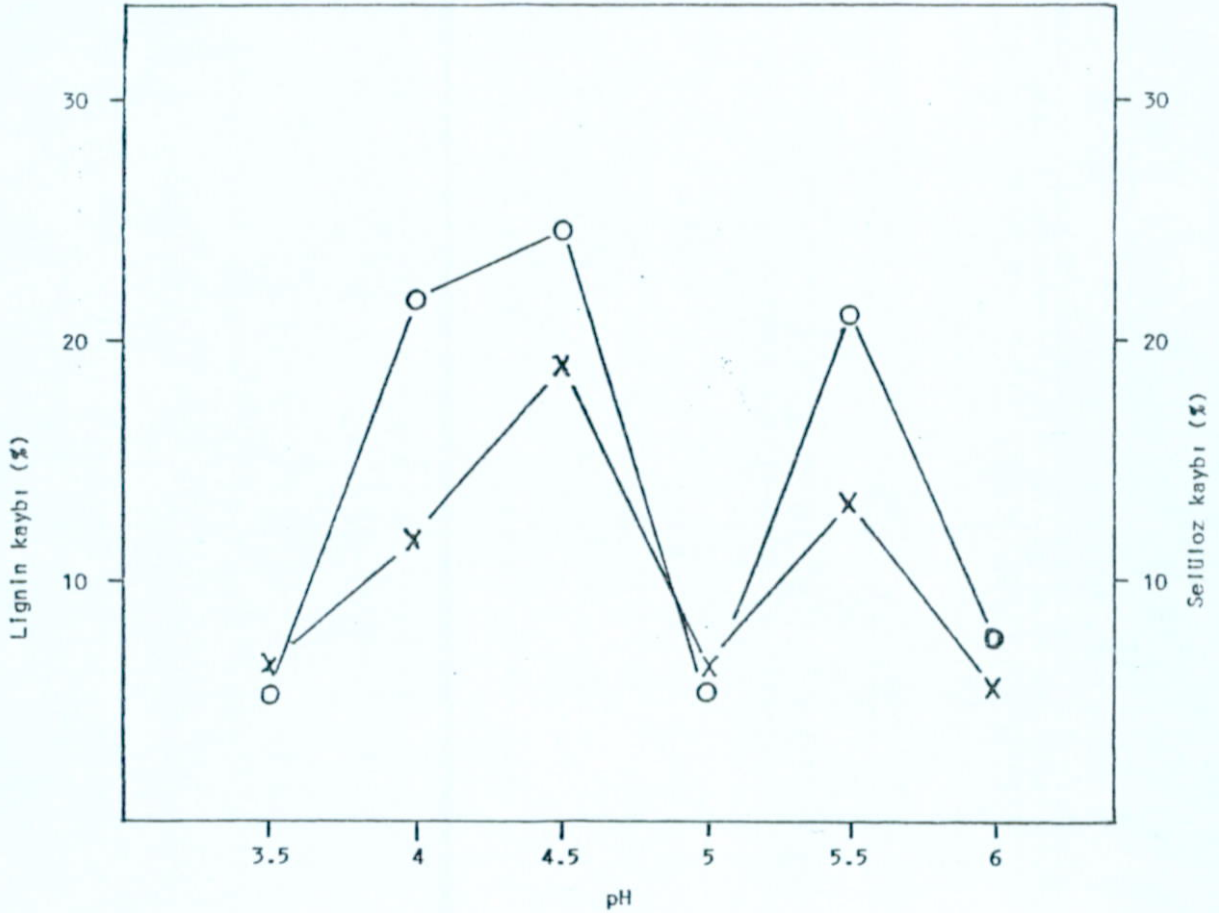
Tablo 3.1. Lignoselülozlu örnekte % lignin, % selüloz ve % toplam şeker miktarları.

Lignoselülozlu			
Örnek	Lignin (%)	Selüloz (%)	Toplam Şeker (%)
Kara Çam (<i>Pinus nigra</i>)	30.0	47.5	60.0

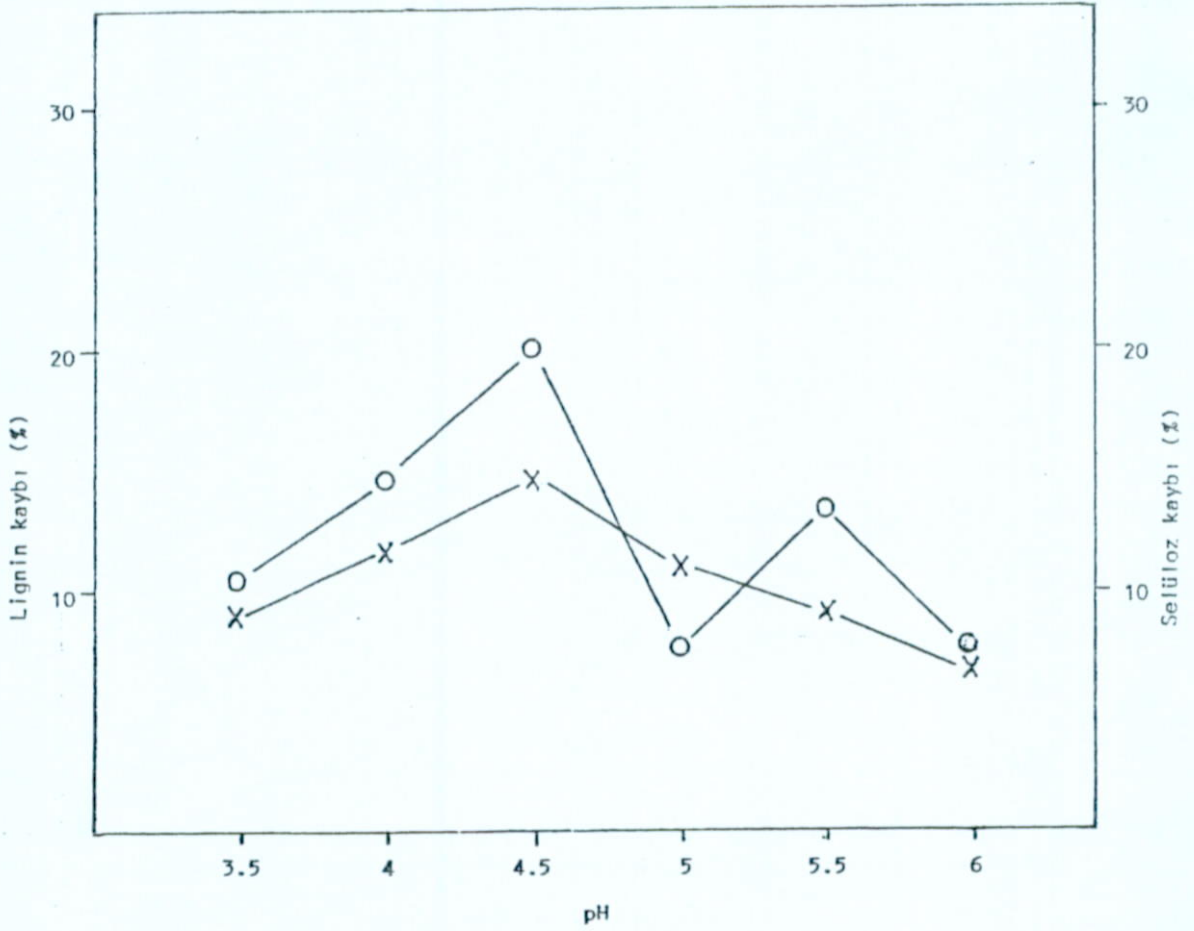
3.2. *Pleurotus* Cinsi Fungusların Optimum Fizyolojik Koşullarınının Saptanması.

Çalışmamızda kullanılan *P. sajor-caju* ve *P. florida*'nın inkübasyon süresi 20 gün olarak saptandıktan sonra, lignin parçalanmasının en fazla hangi pH değerinde gerçekleştiğini bulmak için kurulan bu çalışmada, *P. sajor-caju*'nun pH 4.5'de %19 lignin kaybına neden olduğu saptanırken, aynı pH değerinde selüloz kaybı %24.7 olarak bulunmuştur. Bu pH'nın altındaki ve üzerin-

deki pH değerlerinde, lignin kaybı daha az gözleendiğinden, *P. sajor-caju* için en uygun pH 4.5 olarak ele alınmıştır (Şekil 3.1). *P. florida* ile yürütölen çalışmada ise en yüksek lignin kaybı pH 4.5'de %14.6 olarak gerçekleşirken, aynı pH değerinde selüloz kaybı %20 olarak saptanmıştır (Şekil 3.2). Bu üretim koşullarında sıcaklık 30°C olarak ele alınmıştır (Gök, 1985; Ünyayar, 1988). Her iki fungus için uygun pH'nın 4.5 olduğu saptanmış ve daha sonraki çalışmalarda bu değer ortam pH'sı olarak kullanılmıştır.

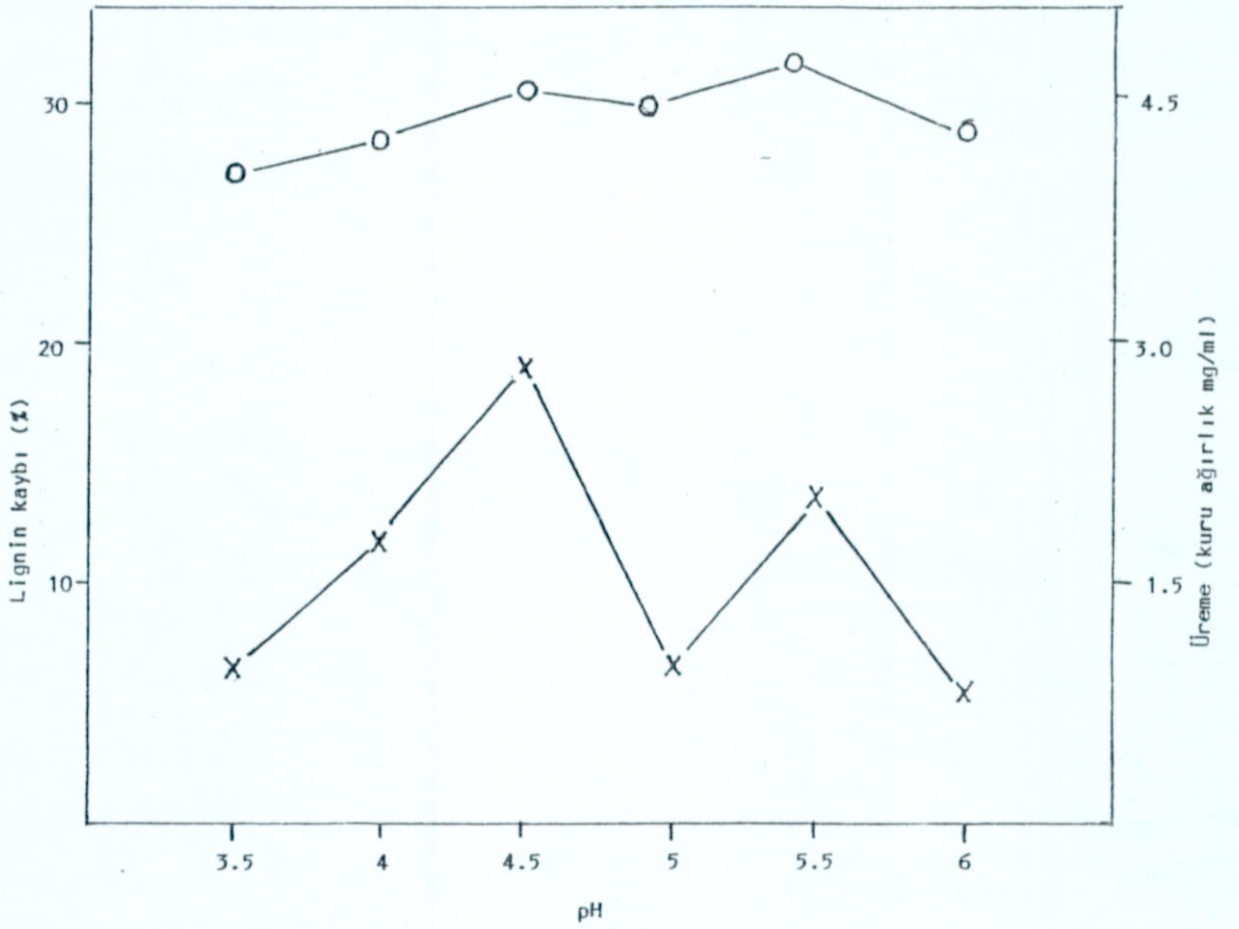


Şekil 3.1. Değişik pH'larda üretilen *P. sajor-caju*'nun çam odununda neden olduğu lignin ve selüloz kaybı. (x-x) lignin kaybı (o-o) selüloz kaybı.

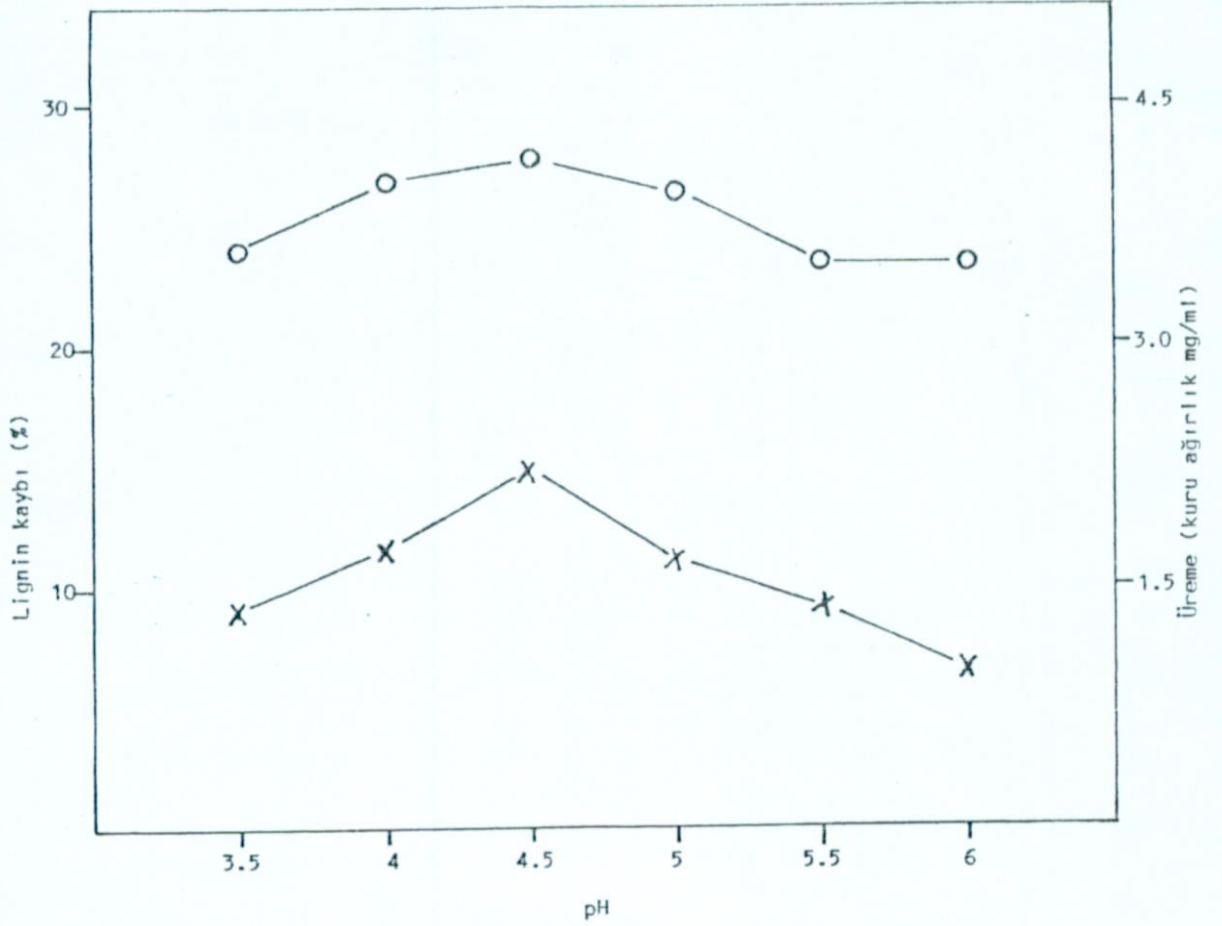


Şekil 3.2. Değişik pH'larda üretilen *P. florida*'nın çam odunun-
da neden olduğu lignin ve selüloz kaybı.
(x-x) lignin kaybı (o-o) selüloz kaybı.

Farklı pH'ların *P. sajor-caju* ve *P. florida*'nın üremesine ve buna bağlı olarak lignin kaybına olan etkisinin incelendiği çalışmanın sonuçları şekil 3.3. ve 3.4'de verilmiştir.



Şekil 3.3. Besiyeri pH'sının *P. sajor-caju*'nun üremesine ve çam odununda lignin kaybına etkisi.
(x-x) lignin kaybı (o-o) üreme.

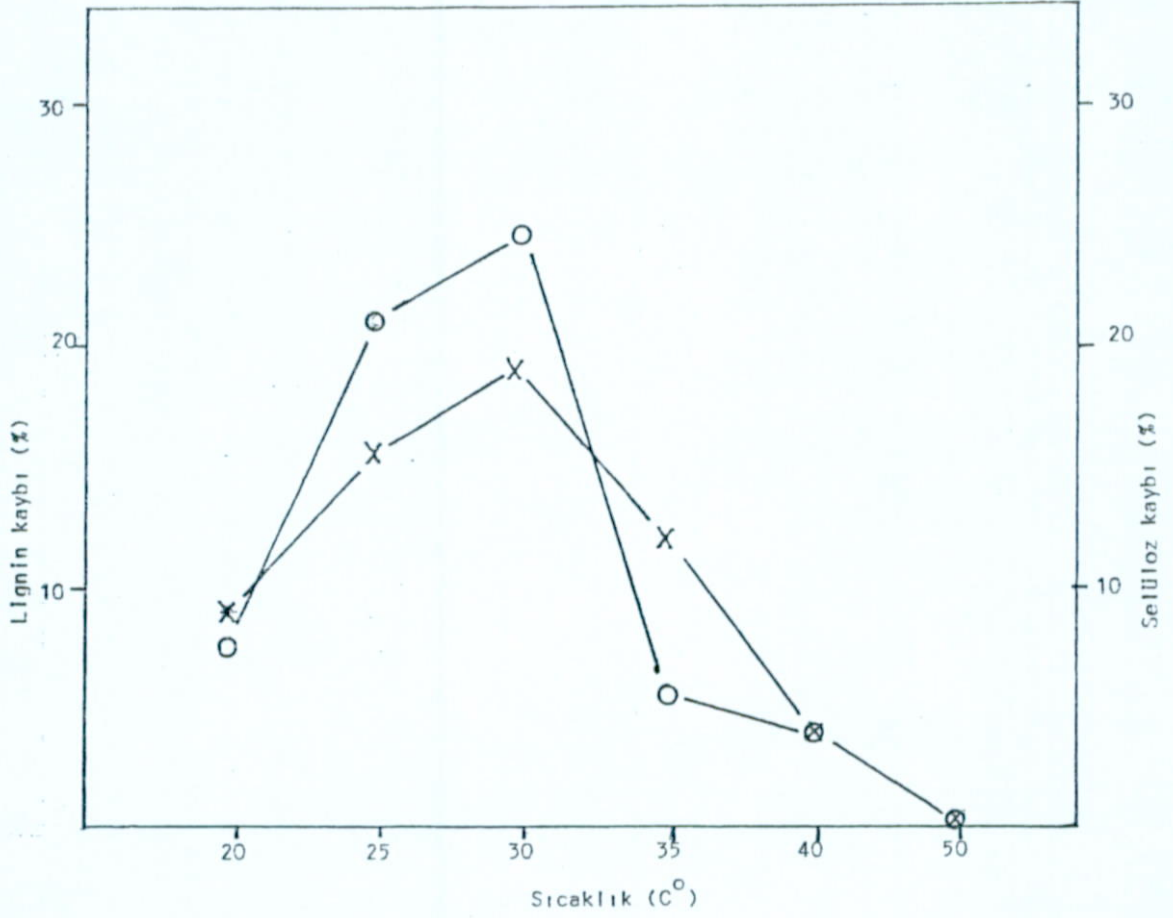


Şekil 3.4. Besiyeri pH'sının *P. florida*'nın üremesine ve çam odununda lignin kaybına etkisi.

(x-x) lignin (o-o) üreme.

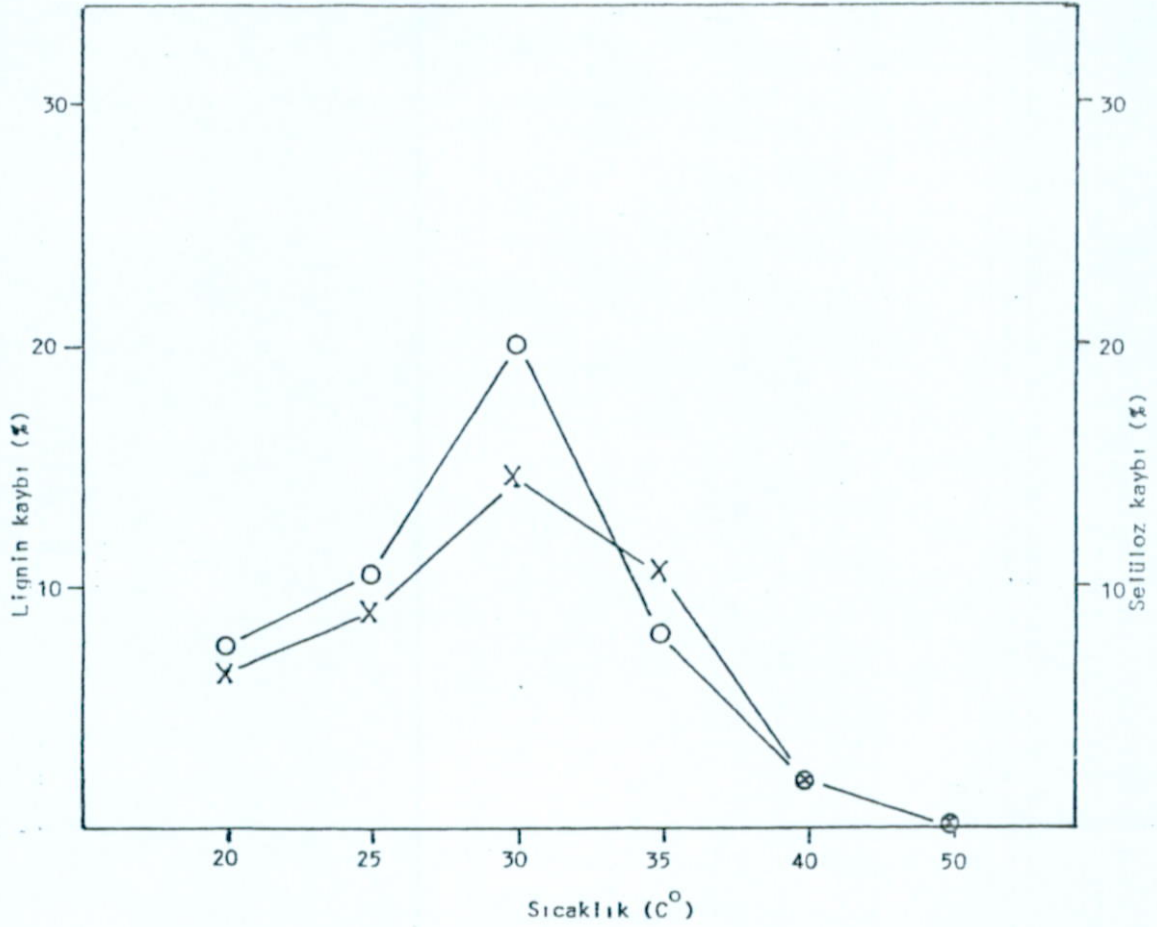
Daha sonra kurulan inkübasyon koşullarında en uygun sıcaklık aralığının bulunması amaçlanmış ve sıcaklığa bağlı lignin ve selüloz kaybı saptanmıştır.

P. sajor-caju için lignin kaybı yönünden uygun sıcaklık aralığı 30°C olarak bulunmuş ve aynı sıcaklık aralığının *P. florida* için de geçerli olduğu saptanmıştır (Şekil 3.5 ve 3.6).



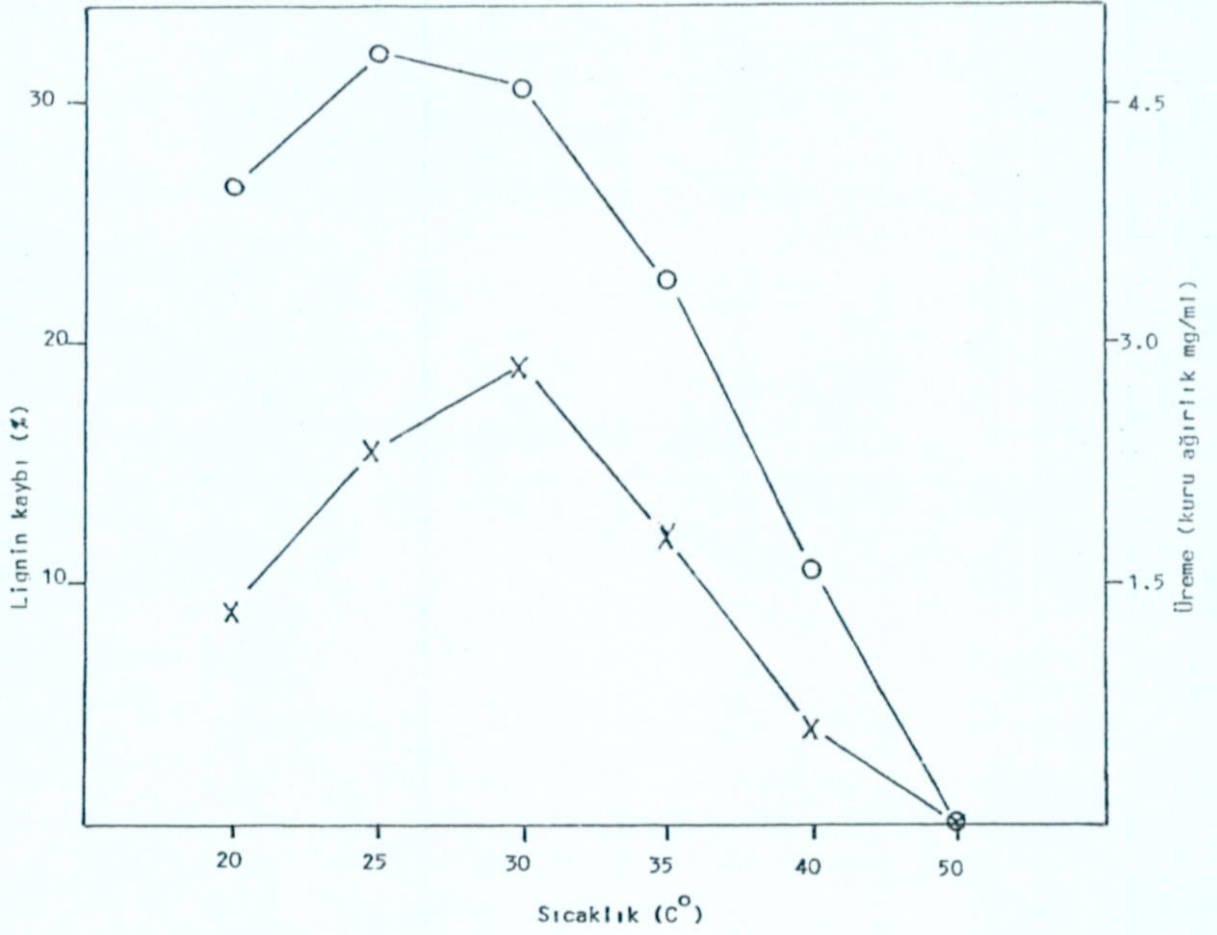
Şekil 3.5. Değişik sıcaklıklarda üretilen P. sajor-caju'nun çam odununda neden olduğu lignin ve selüloz kaybı.

(x-x) lignin (o-o) selüloz.



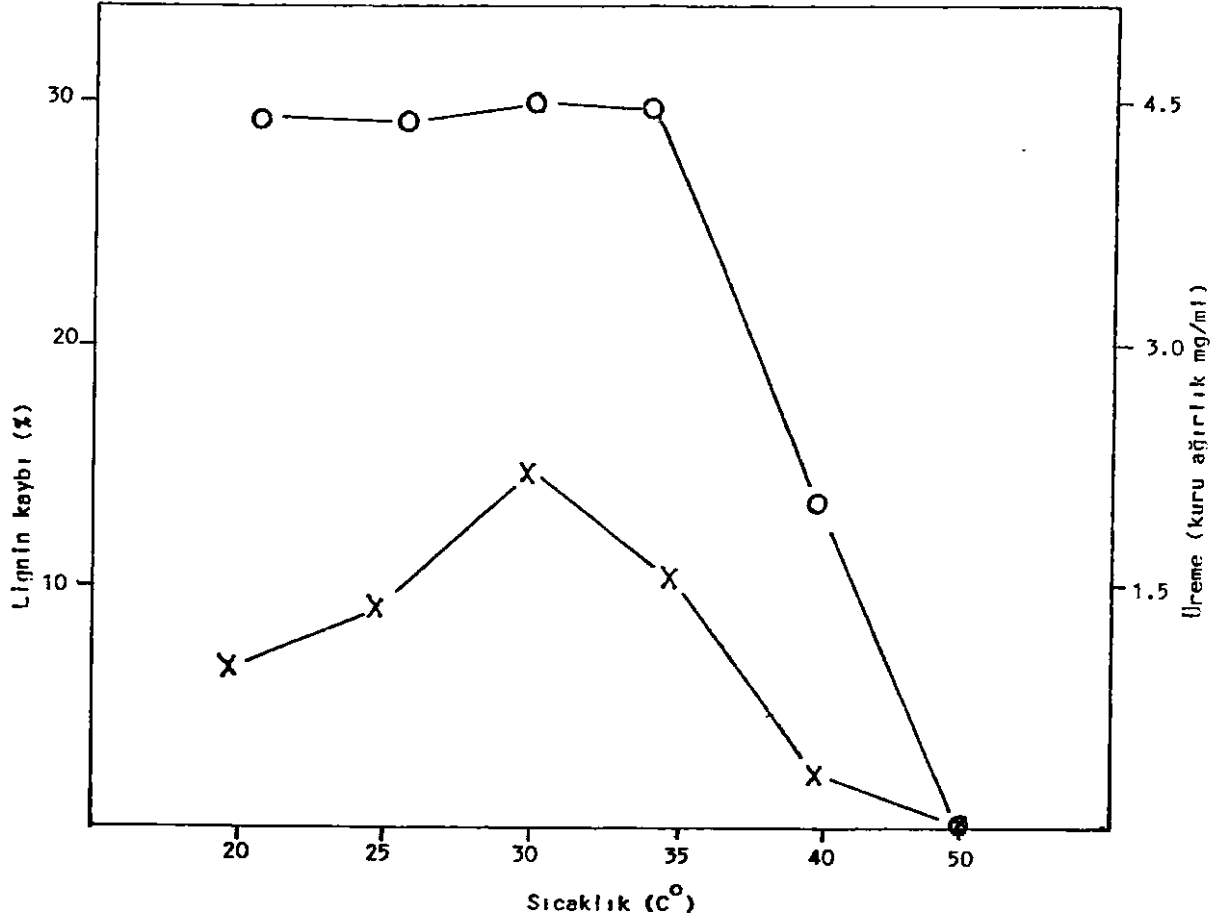
Şekil 3.6. Değişik sıcaklıklarda üretilen *P. florida*'nın çam odununda neden olduğu lignin ve selüloz kaybı.
(x-x) lignin (o-o) selüloz.

Şekil 3.7 ve 3.8'de gösterilen grafiklerde ise sıcaklığın kullanılan fungusların üremesi üzerine etkisi ve buna karşılık gelen lignin kaybı gösterilmiş ve *P. sajor-caju* ile *P. florida*'nın sıcaklığa bağlı biyokitle değişimleri saptanmıştır. *P. sajor-caju*'nun 30°C daki kuru misel ağırlığı 4.6 mg/ml olarak saptanırken aynı koşullarda üretilmiş olan *P. florida*'nın kuru misel ağırlığı 4.5 mg/ml olarak saptanmıştır.



Şekil 3.7. Besiyeri sıcaklığının *P. sajor-caju*'nun üremesine ve çam odununda lignin kaybına etkisi.

(x-x) lignin (o-o) üreme.



Şekil 3.8. Besiyeri sıcaklığının *P. florida*'nın üremesine ve çam odununda lignin kaybına etkisi.

(x-x) lignin (o-o) üreme.

3.3. Beyaz Çürükçül Fungusların Çam Odununda Uygulanması Sonucunda Lignoselülozlu Örnekteki Lignin (%) ve Selüloz (%) Kayıpları.

Beyaz çürükçül funguslardan *P. sajor-caju* ve *P. florida* ile yapılan üretim çalışmalarında çalkalamalı şişe üretimi ve statik (yarı-katı) üretim teknikleri denenmiştir. Üretim sürecinde daha iyi sonuç veren yarı-katı üretim tekniği kullanılmıştır. Çalışmalarda kullanılan beyaz çürükçül fungusların, yarı-katı besiyerinde üretildikten 4-5 gün sonra, odun kıymıkları üzerinde misel kitlesi oluşturdıkları gözlenmiştir. İnkübasyondan 20 gün sonra fungus misellerinin odun yüzeylerini tamamı ile örtükleri gözlenmiş ve odunun kimyasal analizinin yapılması için kültürler inkübatörden alınmıştır (Şekil 3.9). Daha sonra besi yerlerinden kıymıklar alınmış ve basınçlı su altında funguslardan temizlenmiştir. Temizlenmiş olan kıymıklar, bölüm 2.1.1'de belirtildiği gibi bir gece kurutulduktan sonra kimyasal analizleri yapılmıştır.

Yarı-katı ortam ve statik şişe fermentasyonu ile üretilen fungusların çam odununda neden oldukları lignin ve selüloz kayıpları tablo 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.9. Çam odununda üremiş *P. florida*'nın görünüşü.

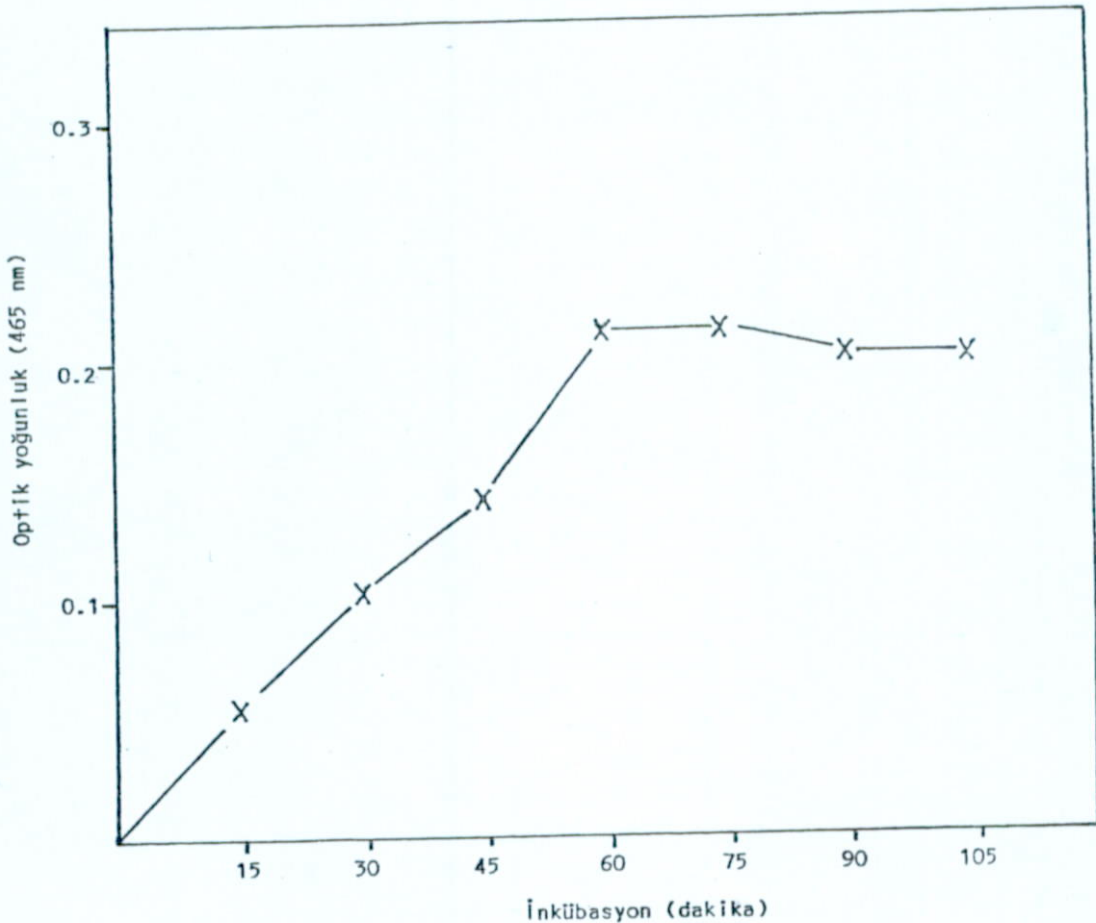
Tablo 3.2. Statik şişe (yarı-katı ortam) fermentasyonu ile üretilen fungusların çamda oluşturdukları lignin ve selüloz kaybı.

Fungus Türü	Lignin Kaybı (%)	Selüloz Kaybı (%)
<i>P. sajor-caju</i>	19.0	24.7
<i>P. florida</i>	14.6	20.0

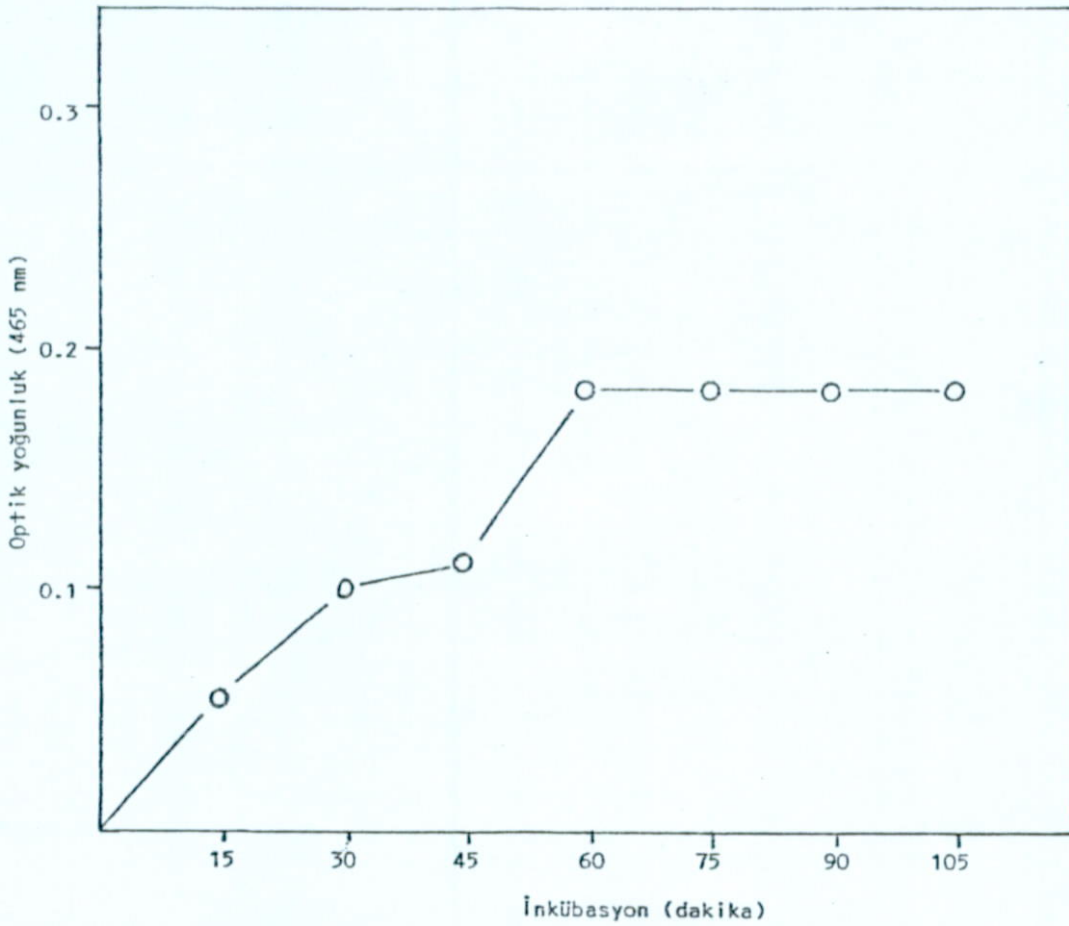
Üretim 20 gün süresince yapılmıştır.

3.4. Funguslarda Fenoloksidaz (Lakkaz ve Peroksidaz) Sentezinin Günlere Bağlı Değişimi.

Beyaz çürükçül fungusların *P. sajour-caju*, *P. florida* ve *P. ostreatus* türleri ile yapılan bu çalışmada 24 günlük inkübasyon süresinde fenoloksidaz sentezi incelenmiştir. Çalışmalarda fenoloksidaz aktiviteleri, bağlı lakkaz ve peroksidaz cinsinden, %0.005 Indulin AT içeren ortamlarda bölüm 2.4'de anlatılan şekilde ölçülmüştür. Bu aktivitelerin ölçümünde kullanılacak inkübasyon süresini saptamak amacı ile yapılan çalışmalar sonucunda, her iki enzimin de inkübasyonun 20. gününün 60. dakikasında en yüksek absorbans değerini verdiği ve daha sonraki sürelerde absorbans değerinde artış olmadığı saptanmıştır (Şekil 3.10 ve 3.11). Elde edilen bu inkübasyon süreleri esas alınarak bağlı lakkaz ve peroksidaz aktiviteleri ölçülmüştür.



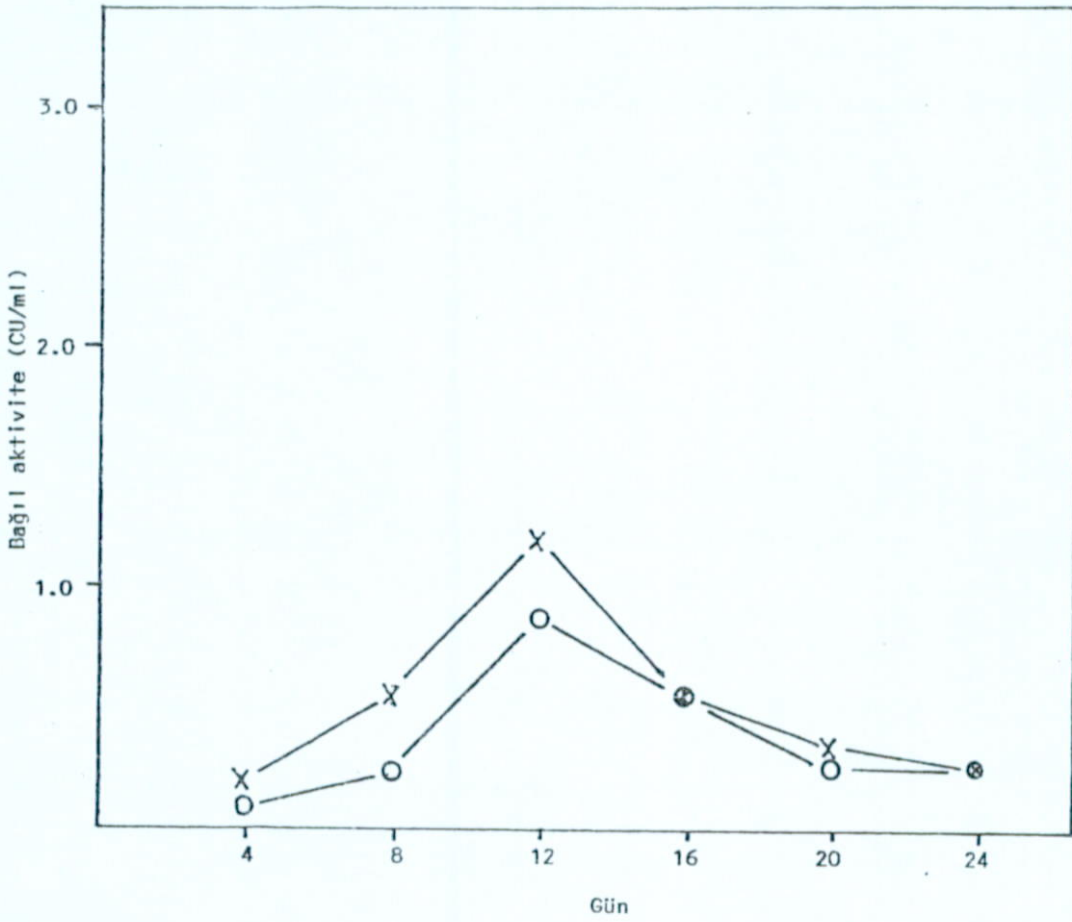
Şekil 3.10. Lakkaz aktivitesi sonucu inkübasyon süresine göre ölçülen absorbans değerindeki değişim.



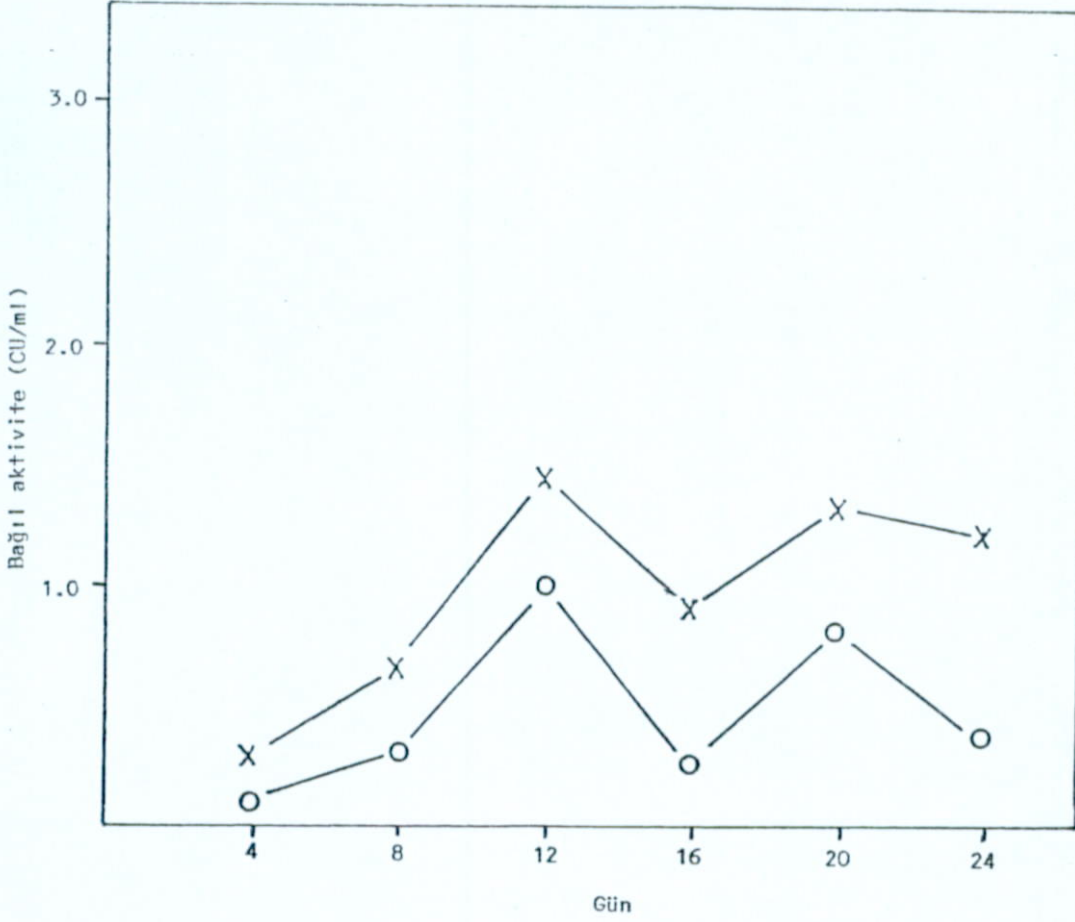
Şekil 3.11. Peroksidaz aktivitesi sonucu inkübasyon süresine göre ölçülen absorbands değerindeki değişim.

P. sajour-caju'nun, Indulin AT içeren ortamlarda, en yüksek bağıl aktiviteyi 12. günde verdiği saptanmıştır. Bu fungusun 12. günde bağıl lakkaz aktivitesi 1.2 olarak saptanırken, bağıl peroksidaz aktivitesi 0.9 olarak bulunmuştur. İnkübasyon süresinin sonunda (24. gün) ise her iki enzim aktivitesinin büyük oranda azaldığı saptanmıştır (Şekil 3.12). Yine *P. florida*'nın kullanıldığı çalışmalarda bağıl lakkaz ve peroksidaz aktivitesinin 12. günde en yüksek absorbands değerini verdiği ve bunun üzerindeki inkübasyon sürelerinde enzim aktivitesi açısından 1.4 değerini gösterirken bağıl peroksidaz aktivitesi de 1.0 değerini vermiştir (Şekil 3.13). Beyaz çürükçül

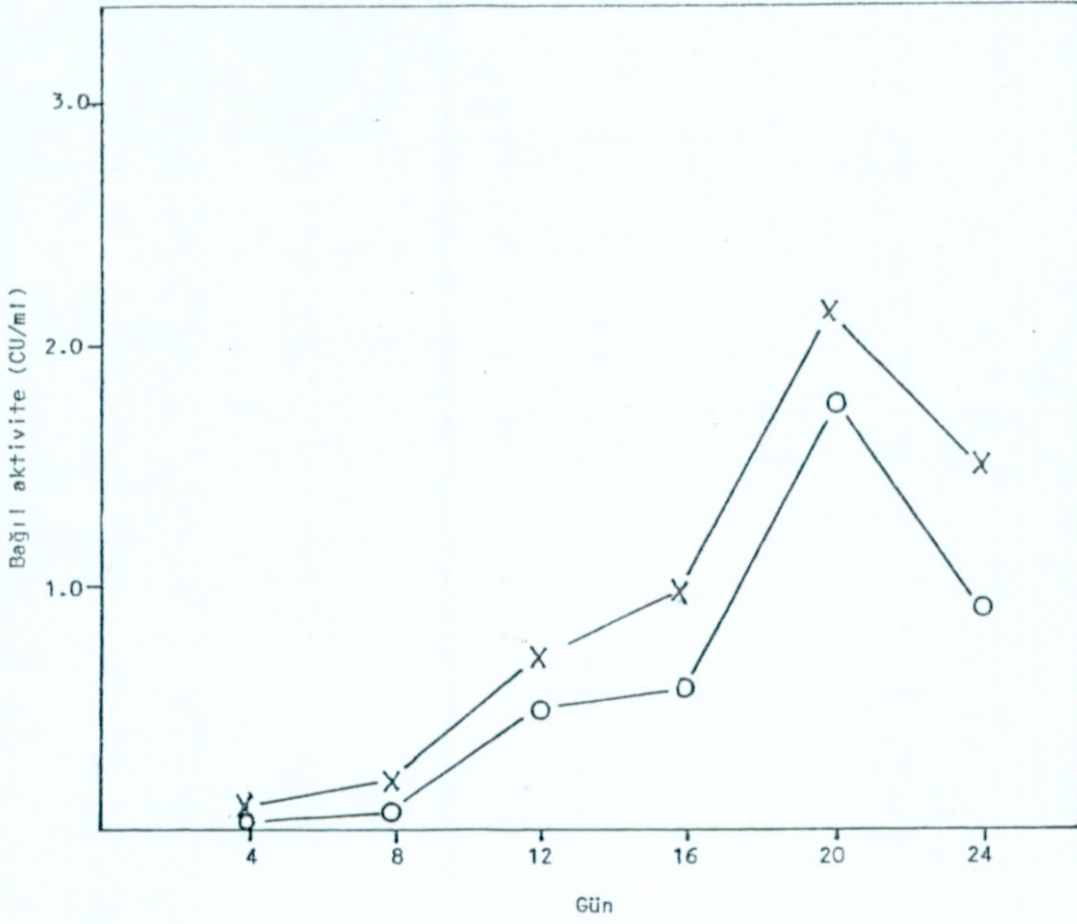
funguslardan *P. ostreatus*'un kullanıldığı çalışmada en yüksek bağıl lakkaz ve peroksidaz aktivitesi, diğer 2 türe göre daha uzun inkübasyon sürelerinde saptanmıştır. *P. ostreatus* en yüksek absorbans değerini 20. günde vermiştir. Bu fungusun 20. günde bağıl lakkaz aktivitesi 2.2 ve bağıl peroksidaz aktivitesi de 1.7 değerinde bulunmuştur (Şekil 3.14).



Şekil 3.12. %0.005 indulin AT, %1 glukoz içeren SBM besiyerinde *P. sajor-caju*'nun bağıl lakkaz ve peroksidaz aktivitesinin günlere bağlı değişimi.
(x-x) lakkaz (o-o) peroksidaz.



Şekil 3.13. %0.005 indulin AT, %1 glukoz içeren SBM besiyerinde *P. florida*'nın bağlı lakkaz ve peroksidaz aktivitesinin günlere bağlı değişimi.
(x-x) lakkaz (o-o) peroksidaz.



Şekil 3.14. %0.005 indulin AT, %1 glukoz içeren SBM besiyerinde *P. ostreatus*'un bağli lakkaz ve peroksidaz aktivitesinin günlere bağli değişimi.
(x-x) lakkaz (o-o) peroksidaz.

Tablo 3.3 ve 3.4'de fungusların 25 günlük üretim sürecinde günlere bağli bağli lakkaz ve peroksidaz aktivitelerindeki değişimler karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Tablo 3.3 %0.005 indulin AT, %1 glukoz içeren SBM besiyerlerinde P. sajor-caju (A), P. florida (B) ve P. ostreatus'un (C) bağıl lakkaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi.

İnkübasyon Süresi (Gün)	Bağıl Lakkaz aktivitesi		
	A	B	C
0	-	-	-
4	0.2	0.3	0.1
8	0.5	0.6	0.2
12	1.2	1.4	0.7
16	0.5	0.9	1.0
20	0.3	1.3	2.2
24	0.3	1.2	1.5

Tablo 3.4. %0.005 Indulin AT, %1 glukoz içeren SBM besiyerlerinde P. sajor-caju (A), P. florida (B) ve P. ostreatus'un (C) bağıl peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi.

İnkübasyon Süresi (Gün)	Bağıl Peroksidaz aktivitesi		
	A	B	C
0	-	-	-
4	0.1	0.1	0.03
8	0.2	0.3	0.08
12	0.9	1.0	0.5
16	0.5	0.3	0.6
20	0.3	0.8	1.7
24	0.3	0.4	0.9

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada, biyolojik olarak odunun delignifikasyonunun araştırılması ve delignifikasyondan sorumlu oldukları düşünülen fenoloksidaz (lakkaz ve peroksidaz) enzimlerinin günlere bağlı bağlı aktivitelerindeki değişimlerin saptanması amaçlanmıştır. Çalışmanın ilk kısmında lignoselülozlu örneğin kimyasal içeriği (% olarak) saptanmıştır. Lignoselülozlu örneğin kimyasal bileşimi tablo 3.1'de verilmiştir. Bu değerler genelde literatür verileri ile benzerlik göstermektedir (Kirk, 1984; Gök, 1985; Wilson ve Hamilton, 1986; Ünyayar, 1988). Çalışmamızda elde edilen değerlerle, literatür değerleri arasındaki bazı farkların kullanılan kimyasal analiz yöntemlerine, bitki materyalinin türüne ve yaşına, yetiştirilme şartlarına ve mevsimsel faktörlere bağlı olabileceği kabul edilmiştir (Kirk ve Highley, 1973; Gök, 1985).

Çalışmamız boyunca lignolitik etkinlikleri sonucunda lignoselülozlu maddenin delignifikasyonuna neden oldukları ortaya konan beyaz çürükçül funguslar kullanılmıştır (Ander ve Eriksson, 1977; Yang vd., 1980; Johnsrud ve Eriksson, 1985; Mudget ve Paradis, 1985; Arora ve Sandhu, 1987).

Uygun üretim tekniğinin belirlenmesi amacı ile *Pleurotus* cinsine giren funguslar çalkalamalı şişe ve yarı-katı üretim ortamlarında denenmiştir. Çalkalamalı şişe üretimi sırasında fungus miselleri çalkalama sonucunda odun yüzeyine tutunamamış ve hif oluşturamamıştır. Bu yüzden çalışma sırasında yarı-katı üretim tekniği tercih edilmiştir. *P. sajor-caju* ve *P. florida* nın en uygun fizyolojik koşulları sıcaklık ve pH açısından 30°C ve pH: 4.5 olarak saptanmıştır (Şekil 3.1, 3.2, 3.3 ve 3.4)

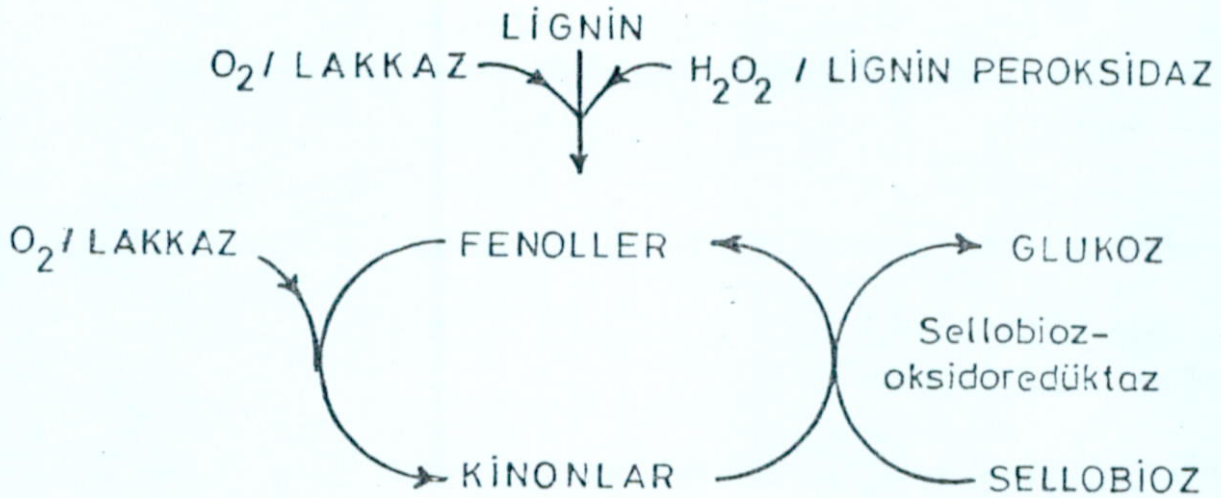
Bu koşullar daha 6nce saptanmış olan literat6r verileri ile uyum içerisinde dir (Rosenberg, 1980; G6k, 1985; 6nyayar, 1988).

Bitki materyalinin dayanıklılığını sağlayan lignin molek6l6n6n, bitki dokusundan uzaklaştırılması sırasında, odun bileşeni olan sel6lozun da parçalandığı çalışmamızda saptanmıştır. Beyaz 6r6k6l funguslar ile lignin degradasyonunda sel6lozun da hidroliz edildiği bazı araştırmalarda bildirilmektedir (Ginterova ve Lazorova, 1987).

Çalışmamızın ikinci kısmında fenoloksidaz aktiviteleri y6ksek sıklıkta çalışılmakta olan beyaz 6r6k6l funguslardan *P. sajor-caju*, *P. florida* ve *P. ostreatus* kullanılmıştır. Bu b6l6mde ind6kleyici ajan olarak %0.005 indulin AT (lignin) içeren SBM besiyerine bu 6 fungus inokule edilmiş ve k6lt6rler 30°C'de statik olarak ink6basyona bırakılmışlardır. Yirmibeş g6nl6k 6retim sırasında en y6ksek bağıl aktivite *P. sajor-caju* ve *P. florida* için 12. g6nde saptanırken aynı koşullarda *P. ostreatus* için 20. g6nde saptanmıştır. *P. ostreatus* ve *P. sajor-caju*'nun lignolitik aktivitesi çeşitli araştırmacılar tarafından da ortaya konmuştur (Ander ve Eriksson, 1976; Arora ve Sandhu, 1987). Bu 6 fungus t6r6n6n indulin AT içeren SBM'li besiyerinde lakkaz ve peroksidaz sentezlerinde artış g6zlenmesi, diğer araştırmacıların verileri ile uygunluk g6stermektedir (Arora ve Sandhu, 1985; Sandhu ve Arora, 1985; Arora ve Sandhu, 1987). Enzim sentezinin y6ksek indulin AT konsantrasyonlarında inhibe edildiği bildirilmektedir. Bu indulin AT'nin toksisitesi ile açıklanabilir (Arora ve Sandhu, 1985).

Çalışmamızda adıgeçen fungusların bağıl lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin y6ksek olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar, fenoloksidaz aktivitesi ile lignin degradasyonunun ilişkili

olduğunu destekler niteliktedir (Ander ve Eriksson, 1977; Arora ve Sandhu, 1987). Bu organizmalarda lakkaz ve peroksidaz enzimlerinin polimerize edici veya katabolize edici özelliklerini yönlendiren bazı düzenleyici sistemlerin bulunması gereklidir. Genellikle, enzim sentezinin düzenlenmesi tepkimenin son ürünü aracılığıyla gerçekleştirilir. Odun hücre duvarında lignin degradasyonu selüloz hidrolizi ile birlikte olmaktadır. Böylece selüloz aktivitesinin son ürünü olan sellobioz'un glukoz oksidasyonu sırasında kinonlar fenollere indirgenmekte ve daha sonra oluşan kateşol birimleri diğer enzim sistemleri (oksigenaz) aracılığı ile kullanılmaktadır (Şekil 4.1). İşte bu mekanizmalarda rol oynayan enzimler lignin katabolizmasının son ürünlerini düzenlemede anahtar role sahip enzimler olabilirler (Westermarck ve Eriksson, 1974; Westermarck ve Eriksson, 1974; Evans, 1987).



Şekil 4.1. Lignin degradasyonu ve selüloz hidrolizi arasındaki ilişki (Evans, 1987).

Gelişmekte olan ülkelerde maliyeti düşürecek yöntemlerin teknolojik uygulamada kullanılması önemlidir. Kağıt hamuru eldesi için Kraft sürecine girecek lignoselülozik maddeye biyolojik işlem uygulandığında, %10-25 oranında lignin kaybı olacağından hem bu süreçte oluşan atık lignin miktarı azalacak, hemde bu süreçte kullanılan enerjiden tasarruf edilecektir. Şüphesiz bu çeşit araştırmaların başarılı olabilmesi ve endüstriyel ölçeklere uygulanabilmesi, biyodegradasyonun biyokimyasal basamaklarının çok açık bir şekilde ortaya konması, ürünün yapı ve özelliklerinin anlaşılması ve mikroorganizmalar üzerindeki bilgilerin artmasına bağlıdır.

Beyaz çürükçül funguslar dışındaki mantar ve bakterilerin, lignin degradasyon mekanizmalarının iyice araştırılması ve özellikle, beyaz çürükçül fungusların enzim sistemlerinin tamamı ile ortaya konmasının gerekliliği bu gibi çalışmalarda göze çarpmaktadır. Artan deliller ligninaz (lignin peroksidaz) enziminin lignin degradasyonu mekanizmasında anahtar role sahip olduğunu göstermektedir (Miki vd., 1986). Bu enzimin fizyolojik ve biyokimyasal açıdan çeşitli özelliklerinin çalışılması gerekmektedir.

Daha çok fungus ve daha çok odun türünün farklı besiyerlerinde denenmesi günden güne önem kazanmaktadır. Bu tekniğin geliştirilip kağıt hamuru üretiminde yapılacak bir biyodelignifikasyon sürecine uygulanması, bu süreçlerde önemli oranda enerji tasarrufunu sağlayacağından ve ayrıca kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinin atık ürününün temizlenmesinde uygulanabilir bir süreç olacağından, ülke ekonomisine katkıda bulunacaktır. Bu konuda yapılacak yeni araştırmalar ve bilgilerimizin çoğalması ve ayrıca uygulama alanlarının saptanıp,

teknolojik uygulamaya geçilmesi hem ülke ekonomisi ve hemde çevre kirlenmesinin önlenmesi açısından önemli yararlar sağlayacaktır.

Ö Z E T

Lignin doğada en bol bulunan aromatik maddelerden birisidir. Dayanıklı yapısı enerjice zengin basit bileşikler oluşturmak ve ekolojik dengeyi korumak amacıyla çeşitli mikroorganizmalarla parçalanmaktadır. Lignoselüloz materyalinin kağıt endüstrisinde yüksek verimle kullanılabilmesi için yapısında bulunan ligninin uzaklaştırılması gereklidir. Birçok araştırmacı biyokimyasal kağıt hamuru üretimi için ligninin uzaklaştırılması üzerinde çalışmaktadır.

Çalışmamızda iki *Pleurotus* türü (*Pleurotus sajor-caju* ve *Pleurotus florida*) çam odunu ile steril şartlarda karıştırılmış ve bunların lignoselülozu yıkma yetenekleri 20 günlük üretim sürecinde incelenmiştir. Sonuç olarak, *P. sajor-caju*'nun %19 lignin uzaklaştırımına neden olurken, *P. florida*'nın %14.6 lignin uzaklaştırımına neden olduğu bulunmuştur.

Diğer yandan üç çürükçül fungusun (*Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus Florida* ve *Pleurotus ostreatus*) lakkaz ve peroksidaz sentez yeteneklerini araştırmak için karşılaştırmalı bir çalışma yürütülmüştür. Enzim sentezi indulin AT içeren SBM besiyerlerinde dört gün aralarla 24 günlük üretim süresince çalışılmıştır. *P. sajor-caju* ve *P. florida*'da en yüksek bağıl lakkaz ve peroksidaz aktiviteleri 12. günde saptanırken, *P. ostreatus*'da ise en yüksek aktivite 20. günde tesbit edilmiştir.

SUMMARY

Lignin is the most abundant aromatic material on the earth. In spite of its resistive nature, it is decomposed by various microorganisms to maintain balanced ecological set up and, to provide energy-rich simple compounds. Lignin component of lignocellulosic material should be removed for their efficient utilization in paper industry. Various investigators have been involved in selective removal of lignin for biochemical pulping.

In the present study two different *Pleurotus* strains (*Pleurotus sajor-caju* and *Pleurotus florida*) were grown on pine wood lignocellulose and their lignocellulose decomposing ability was studied; consequently, 19% delignification in pine wood was obtained with *P. sajor-caju* and 14.6% with *P. florida*.

On the other hand, a comparative study has been conducted on three species of white rot fungi (*Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus florida* and *Pleurotus ostreatus*) to investigate their abilities to produce laccase and peroxidase. The pattern of enzyme production was studied in the SBM medium, which contains lignin (indulin AT), during a period 24 days and at four day intervals. The maximum relative laccase and peroxidase enzyme production were recorded on 12th day for *P. sajor-caju* and *P. florida* species and 20th day for *P. ostreatus*.

BIBLIYOGRAFYA

- Ander, P. and Eriksson, K.E., "The importance of Phenoloxidase Activity in Lignin Degradation by the White-Rot Fungus *Sporotrichum pulverulentum*", Arch, Microbiol., 109, 1976, 1-8.
- Ander, P. and Eriksson, K-E., "Selective Degradation of Wood Components by White-Rot Fungi", Physiol Plant., 41, 1977, 239-248
- Ander, P., Hattaka, A., Eriksson, K-E., Degradation of lignin and lignin related substances by *Sporotrichum pulverulentum* (*Phanerochaete chrysosporium*): Lignin biodegradation, microbiology, chemistry and potential applications, T.K. Kirk, T.Higuchi and H. Chang (Eds.), CRC, Press Inc., Boca Raton, Florida, II, 1,2-14, 1981.
- Arora, D. S. and Sandhu, K.D., "Laccase Production and Wood Degradation by a White-Rot Fungus *Daedalea flavida*", Enzyme Microb. Technol., 7, 1985, 405-408.
- Arora, D.S. and Sandhu, K.D., "Decomposition of Angiospermic Wood Sawdust and Laccase Production by two *Pleurotus* Species", J.Basic Microbiol., 27, 1987, 4, 179-184.
- Bellamy, W.D., "Single Cell Proteins from Cellulosic Wastes", Biotechnology And Bioengineering., 16, 1974, 869-880.
- Cowling, E.B. and Brown, N., "Structural Feature of Cellulosic Materials in Relation to Enzymatic Hydrolysis", Adv. in Chem. Series., 95, 1969, 152-187.
- Crawford, D.L., Floyd, S., Pometto, A.L and Crawford, R.L., "Degradation of Natural and Kraft Lignins by the Microflora of Soil and Water", Can. J. Microbiol., 23, 1977, 434-440.

- Crowford, R.L. and Crawford, D.L., "Recent Advances in Studies of the Mechanisms of Microbial Degradation of Lignins", Enzyme Microb. Technol., 6, 1984, 434-442
- Daniel, G.F. Nilsson, T., and Singh, A.P., "Degradation of Lignocellulosics by Unique Tunnel-Forming Bacteria", Can. J. Microbiol., 33, 1987, 943-948.
- Eaton, D.C., "Mineralization of Polychlorinated Biphenyls by *Phanerochaete chrysosporium*", Enzyme Microb. Technol., 7, 1985, 194-196.
- Eriksson, K-E. and Vallander, L., Biomechanical pulping: Lignin biodegradation, Microbiology, Chemistry and potential applications, T.K. Kirk, T. Higuchi and H. Chang (Eds.), CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, II, 14, 214-224, 1981.
- Eriksson, K-E., "Swedish Developments in Biotechnology Related to the Pulp and Paper Industry." Tappi Journal., 68, 1985, 46-5
- Evans, C.S., "Lignin Degradation", Process Biochemistry., 8, 1987, 102-107.
- Faison, B.D. and Kirk, T.K., "Factors Involved in the Regulation of a Ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*", Appl. and Environ. Microbiol., 49, 2, 1985, 299-304.
- Forney, J.L. and Reddy, A.C., "Bacterial degradation of Kraft Lignin", Develop. in Industrial Microbiol., 20, 1980, 163-175.
- Forney, J.L., Reddy, A.C., Tien, M. and Aust. D.S., "The Involvement of Hydroxyl Radical Derived from Hydrogen Peroxide in Lignin Degradation by the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*", The Journal of Biological Chemistry, 257, 19, 1982, 11455-11462.

- Freudenberg, K., "Lignin: Its Constitution and Formation from p-Hydroxycinnamyl Alcohols", Science., 148, 1965, 595-600.
- Fross, K., Rahkila, L. and Savolainen, M., The utilization of sugar and residue fractions in chemical on microbial process: Conversion of lignocellulosics material to simple carbohydrates, Proceedings OECD-COST, Amersfoot, the Netherlands, 286-335, 1980.
- Ginterova, A. and Lazarova, A., "Degradation Dynamics of Lignocellulose Materials by Wood-Rotting Pleurotus Fungi", Folia Microbiol., 32, 1987, 434-437.
- Gök, S., "Arpa ve Buğday Samanının Sindiriminin Artırılması Üzerine Araştırmalar", H. Üniv. Fen Bilimleri Enst. Doktora Tezi (Aralık), 1985.
- Haun, J.L., Hemicellulose: Hand book of pulp and paper technology, K.W. Britt (Ed.), VNR Company, New York, 25-30, 1970.
- Higuchi, T., "Degradation of Lignin", Experientia., 38, 1982, 159-166.
- Hiroi, T. and Eriksson, K-E., "Microbial Degradation of Lignin: Part 1. Influence of Cellulose on the Degradation of Lignins by the White Rot Fungus Pleurotus Ostreatus", Svenk Papperstidning., 5, 1976, 157-161.
- Johsrud, C.S. and Eriksson, K-E., "Cross-breeding of Selected and Mutated Homokaryotic Strains of Phanerochaete chrysosporium K-3: New Cellulase Deficient Strains with Increased Ability to Degrade Lignin", Appl. Microbiol Biotechnol., 21, 1985, 320-327.

- Keyser, P., Kirk, T.K. and Zeikus, J.G., "Lignolytic Enzyme System of *Phanerochaete chrysosporium* Synthesized in the Absence of Lignin in Response to Nitrogen Starvation", Journal of Bacteriology., 135, 6, 1978, 790-797.
- Kirk, T.K. and Adler, E., "Methoxyl-deficient Structural Elements in Lignin of Sweetgum Decayed by a Brown-rot Fungus", Acta Chem. Scand., 28, 9, 1970, 3379-3390.
- Kirk, T.K. and Highley, T.L., "Quantitative Changes in Structural Components of Conifer Woods During Decay by White-and Brown-Rot Fungi", Phytopathology., 63, 11, 1973, 1338-1342.
- Kirk, T.K., Connors, W.J., Bleam, R.D., Hackett, W.F. and Zeikus, J.G., "Preparation and Microbial Decomposition of Synthetic (^{14}C) Lignins", Proc.Nat.Acad. Sci. USA, Biochemistry., 72, 7, 1975, 2515-2519.
- Kirk, T.K., Connors, W.J. and Zeikus, J.G., "Requirement for a. Growth Substrate During Lignin Decomposition by Two Wood-Rotting Fungi", Applied and Environmental Microbiology., 32, 1, 1976, 192-194.
- Kirk, T.K., Schulz, E., Connors, W.J., Lorez, L.F. and Zeikus, J.G., "Influence of Culture Parameters on Lignin Metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*", Archs. Microbiol., 117, 1978, 277-285.
- Kirk, T.K., Degradation of lignin: Microbial degradation of organic compounds, D.T. Gibson (Ed.), Microbiology series, 13, New York, Marcel Dekker, Inc., 14, 399-437, 1984.

- Kirk, T.K., Croan, S., Tien, M., Murtugh, K.E. and Farrell, R. L., "Production of Multiple Ligninase by *Phanerochaete chrysosporium*: Effect of Selected Growth Conditions and Use of a Mutant Strain.", Enzyme Microb. Technol., 8, 1986, 27-32.
- Kirk, T.K., Tien, M., Kersten, P.J., Mozuch, M.D. and Kalyanaraman B., "Ligninase of *Phanerochaete chrysosporium*", Biochem. J., 236, 1986, 279-287.
- Kirk, T.K., Tien, M., Johnsrud, S.C and Eriksson, K-E., "Lignin Degrading Activity of *Phanerochaete chrysosporium* Burds: Comparasion of Cellulose-negative and Other Strains"., Enzyme Microb. Technol., 8, 1986, 75-80.
- Kirk, T.K. and Farrell, R.L., "Enzymatic "Combustion". The Microbial Degradation of Lignin", Ann. Rev. Microbiol., 41, 1987, 465-505.
- Miki, K., Renganathan, V., Gold, M.H., "Mechanism of B-Aryl Ether Dimeric Lignin Model Compound Oxidation by Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*", Biochemistry, 25, 17, 1986, 4790-4796.
- Mudgett, R.E. and Paradis, A.J., "Solid-state Fermentatation of Natural Birch Lignin by *Phanerochaete chrysosporium*, Enzyme Microb. Technol., 7, 1985, 150-154.
- Njoku, C.C. and Antai, S.P., "Lignocellulose Degradation and Crude Protein Formation by Three Lignolytic *Streptomyces* Strains", Letters in Applied Microbiology., 4, 1987, 133-136.

- Pilon, L., Barbe, M.C, Desrochers, Mand Jurasek, L., "Fungal Treatment of Mechanical Pulps-Its Effect on Paper Properties", *Biotechnology and Bioengineering.*, 24, 1982, 2063-2076.
- Rosenberg, S.L., 1980, Physiological Studies of Lignocellulose Degradation by the Thermotolerant Mold *Chrysosporium prunosum*", Symposium on the Biological Transformation of Lignocellulose., 12, 1980, 133-142.
- Sandhu, D.K. and Arora, D.S., "Laccase Production by *Polyporus sanguineus* under different Nutritional and Environmental Conditions", Experientia., 41, 1985, 355-356.
- Sarkanen, K.V., Lignin: Hand book of pulp and paper technology, K.W. Britt (Ed.), VNR Company, New York, 33-36, 1970.
- Sarkanen, K.V. and Hergert, H.L., Classification and distribution, Lignin occurrence, formation, structure and reactions, K.V. Sarkanen and C.H. Ludwig (Eds.), John Wiley and Sons Inc., New York, 43-89, 1971.
- Tien, M. and Kirk, T.E., "Lignin Degrading enzyme from *Phanerochate chrysosporium* Purification, Characterization and Catalitic Properties of an Unique H_2O_2 -requiring Oxigenase", Proc.Natl. Acad. Sci., USA, 81, 1984, 2280-2284.
- Updegraff, M.D., "Semimicrodetermination of Cellulose in Biological Materials.," Analytical Biochemistry., 32, 1969, 420-424.
- Ünyayar, A., "Bio-Pulp Üretiminde Beyaz-Çürükçül Fungusların Kullanılması", H. Üniv. Fen Bilimleri Enst. Bilim Uzmanlığı Tezi (Şubat), 1988.

- Westermarck, U. and Eriksson, K-E., "Carbohydrate-dependent Enzymic Quinone Reduction during Lignin Degradation", Acta Chemica Scandinavica., B 28, 1974, 204-208.
- Westermarck, U. and Eriksson, K-E., "Cellobiose: Quinone Oxidoreductase, a New Wood-degrading Enzyme from White-rot Fungi", Acta. Chem. Scand., B 28, 2, 1974, 209-214
- Wilson, J.D. and Hamilton, J.K., "Wood Cellulose as a Chemical Feed stock for the Cellulose Esters Industry", Journal of Chemical Education., 63, 1, 1986, 49-53.
- Yang, H.H., Effland, M.J and Kirk, T.K., "Factors Influencing Fungal Degradation of Lignin in a Representative Lignocellulosic, Thermomechanical Pulp", Biotechnology and Bioengineering., 22, 1980, 65-77.