

Katı Faz Fermentasyonu ile Ligninolitik Enzimlerin Üretimi

Firdevs Özşölen

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Mayıs, 2010

Production of Ligninolytic Enzymes with Solid State Fermentation

Firdevs Özşölen

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

May, 2010

Katı Faz Fermentasyonu ile Ligninolitik Enzimlerin Üretimi

Firdevs Özşölen

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç. Dr. Ahmet ÇABUK

Mayıs 2010

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Firdevs ÖZŞÖLEN'in YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Katı Faz Fermentasyonu ile Ligninolitik Enzimlerin Üretimi" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Ahmet ÇABUK

İkinci Danışman :

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye : Doç. Dr. Ahmet ÇABUK

Üye : Prof. Dr. Nazif KOLANKAYA

Üye : Doç. Dr. Semra İLHAN

Üye : Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ

Üye : Yrd. Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Nimetullah BURNAK

Enstitü Müdürü

ÖZET

Trametes versicolor (ATCC 200801), *Phanerochaete chrysosporium* (ME 446) and *Pleurotus sajor-caju* gibi beyaz çürükçül funguslar, buğday kepeği, arpa kepeği, *P.nigra* kozalağı, talaş, mısır kepeği, yulaf, pirinç kepeği, kanola, kurutulmuş çay, yonca, ayçiçeği sapı, soya fasulyesi küspesi, kurutulmuş distile tohum (DDGS) gibi çeşitli substratlar kullanılarak katı faz fermentasyon şartlarında lakkaz, mangan peroksidaz ve lignin peroksidaz üretimi açısından değerlendirilmiştir. Katı substratlardan yonca ile en yüksek lakkaz aktivitesi (22.36 U/ml), yulaf ile de en yüksek MnP aktivitesi (0.36 U/ml) elde edilmiştir. Yüksek enzim aktivitesinin değerlendirilen holoselüloz, azot ve karbon içeriği açısından substratın kimyasal kompozisyonu ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. Bunun yanı sıra katı faz kültüründe substratın kullanılmadan önce ve sonra kimyasal değişimleri FTIR analizi ile gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Katı faz fermentasyonu, ligninolitik enzimler, katı substrat.

SUMMARY

The potentials of thirteen lignocellulosic wastes wheat bran, barley bran, cone of *Pinus nigra*, sawdust, corn bran, oat, rice bran, canola, dried tea, ground clover, sunflower stalk, soybean bagasse, dried distillers grains with solubles (DDGS) as solid substrates in respect of laccase, manganese dependent peroxidase and lignin peroxidase production by the white-rot fungus *Trametes versicolor* (ATCC 200801), *Phanerochaete chrysosporium* (ME 446) and *Pleurotus sajor-caju* (ATCC 22.36 U/l) under solid-state conditions were assessed. While ground trifolium gave the highest laccase activity, showing a maximum value of 22.36 U/ml, respectively, oat gave the highest MnP activity, showing a maximum value of 0.36 U/ml. The high enzyme activity was observed to correspond with chemical composition of substrate evaluated in respect of holocellulose, nitrogen and carbon content. In addition, FTIR analysis was performed to chemical changes of substrate before and after using in solid state culture.

Keywords: Solid state fermentation, ligninolytic enzymes, solid substrate.

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasının planlanmasında ve gerçekleştirilmesinde yardımlarını esirgemeyen, her zaman yol gösteren değerli hocam, Sayın Doç. Dr. Ahmet ÇABUK'a,

Tezimin planlanmasında, takibinde, yazımda en içten özveriyle yardımını ve desteğini esirgemeyen canım arkadaşım Serap GEDİKLİ'ye,

Çalışmamın hem deneysel aşamasında hem de çerçevesinin oluşmasında yardımcı olan çalışma arkadaşlarım Meltem ÇELİKDEMİR ve Pınar AYTAR'a,

Hayatımın her döneminde yanımda olan ve güvenlerini, sevgilerini, inançlarını hep hissettiğim canım annem, babam ve kardeşlerime,

Sabriyla, inancıyla ve desteğiyle her zaman yanımda olan, moral kaynağım, sevgili eşim Serkan ÖZŞÖLEN'e,

en içten dileklerle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
ŞELİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Katı Faz Fermentasyon	3
2.1.1. Tanımı ve Tarihçesel Gelişimi.....	3
2.1.2. KFF’de Katı Desteğin Önemi.....	5
2.1.3. KFF’nin Üstünlükleri ve Eksiklikleri.....	6
2.1.4. KFF’de Dikkat Edilecek Hususlar.....	8
2.1.5. KFF Uygulamaları.....	9
2.1.5.1. Enzimlerin Üretimi.....	10
2.1.5.2. KFF Tekniği Kullanılarak Sekonder Metabolitlerin Üretimi...	14
2.1.5.3. KFF’de Sporların Üretimi.....	17
2.1.6. KFF’nin Biyokimya Mühendisliği Açısından Değerlendirilmesi.....	19
2.1.7. KFF’de Modelleme.....	20
2.1.8. KFF’de Biyoreaktör Tasarımı.....	20
2.1.8.1. İmmersion biyoreaktörü.....	23

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.1.8.2. Paket yatak reaktör.....	23
2.1.8.3. Döner silindir biyoreaktör.....	23
2.1.8.4. Tepsi biyoreaktör.....	23
2.2. Beyaz Çürükçül Funguslar.....	25
2.2.1. Beyaz Çürükçül Fungusların Kullanım Alanları.....	26
2.3. Fenoloksidaz ve Peroksidaz Grubu Enzimler.....	27
2.3.1. Fenol Oksidaz Grubu Enzimler.....	27
2.3.1.1. Lakkaz (EC 1.10.3.2).....	28
2.3.2. Peroksidaz Grubu Enzimler.....	29
2.3.2.1. Mangan Peroksidaz (EC 1.11.13).....	32
2.3.2.2. Lignin Proksidaz (EC 1.11.1.14).....	34
2.4. Katı Substrat Olarak Kullanılan Bitkisel Materyallerin Ana Bileşenleri.....	35
2.4.1. Selüloz.....	35
2.4.2. Hemiselüloz.....	36
2.4.2.1. Yumuşak Odun Hemiselülozları.....	36
2.4.2.2. Sert Odun Hemiselülozları.....	36
2.4.3. Lignin.....	37
2.5. KFF’de Ligninolitik Enzim Üretimi.....	37
3. YÖNTEM ve GEREÇLER.....	40
3.1. Çalışmalarda Kullanılan Funguslar.....	40
3.2. Çalışmalarda Kullanılacak Fungus Kültürlerinin Hazırlanması.....	40
3.3. Çalışmada Kullanılan Katı Substratlar.....	40
3.4. Katı Substrat Ortamının Hazırlanması, Ekimi ve Üretimi.....	41
3.5. Katı Substrat Ortamından Enzim Ekstraksiyonu.....	41
3.6. Enzim Aktivitelerinin Ölçümü.....	41
3.7. Günlük Enzim Aktivitelerinin Taranması.....	42

İÇİNDEKİLER (devam)

3.8. Seçilen Substratın Karbon, Azot ve Holoselüloz Miktar Tayini ve Ağırlık Ölçümü ile İnkübasyon Sürecindeki Değişimin Belirlenmesi.....	43
3.9. Katı Substrat Fermentasyonu Öncesi ve Sonrası Katı Substrat Olarak Seçilen Yoncanın FT-IR Analizi.....	43
4. BULGULAR.....	45
4.1. Beyaz Çürükçül Funguslarla Farklı Katı Substratlar Kullanılarak Lakkaz, MnP ve LiP Üretimi.....	45
4.2. Günlük Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	46
4.3. Katı Substrat Fermentasyonu Öncesi ve Sonrası Katı Substrat Olarak Seçilen Yoncanın Karbon, Azot ve Holoselüloz Miktar Değişimi ve Ağırlık Kaybı.....	47
4.4. Katı Substrat Fermentasyonu Öncesi ve Sonrası Katı Substrat Olarak Seçilen Yoncanın FT-IR Analiz Değerlendirilmesi.....	48
5. TARTIŞMA.....	49
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	54

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. KFF şartlarında işletilen ligninolitik enzimlerin üretiminde kullanılan 4 farklı biyoreaktör tipi.....	24
Şekil 3.1. Genel deneysel akış şeması.....	44
Şekil 4.1. Farklı substratlar üzerinde büyütülen <i>T.versicolor</i> , <i>P.chryso sporium</i> ve <i>P.ostreatus</i> 'dan elde edilen lakkaz aktivite değerleri açısından karşılaştırılması.....	45
Şekil 4.2. Farklı substratlar üzerinde büyütülen <i>T.versicolor</i> , <i>P.chryso sporium</i> ve <i>P.ostreatus</i> 'dan elde edilen mangan peroksidazın aktivite değerleri açısından karşılaştırılması.....	46
Şekil 4.3. Yonca üzerinde büyütülen <i>T.versicolor</i> 'dan elde edilen lakkazın günlük aktivitesinin değişimi.....	47
Şekil 4.4. Katı substrat fermentasyonu öncesi ve sonrası katı substrat olarak seçilen yoncanın FT-IR analiz değerlendirilmesi.....	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Katı faz fermentasyonun tarihsel gelişimi.....	4
Çizelge 2.2. Sıvı fermentasyona karşın KFF'nin biyoteknolojik üstünlükleri ve süreç değerlendirilmesi.....	7
Çizelge 2.3. Katı faz fermentasyonda kullanılan materyaller, rol oynayan mikroorganizmalar, çeşitli substrat ve ürünler.....	11
Çizelge 2.4. KFF ve sıvı fermentasyonda mikroorganizmalarla enzim üretme etkinliğinin karşılaştırılması.....	13
Çizelge 2.5. Sıvı fermentasyonla karşılaştırıldığında KFF'de çeşitli mikroorganizmalarla sekonder metabolitlerin üretimi.....	15
Çizelge 2.6. KFF tekniği ile ligninolitik enzimlerin üretimi.....	38
Çizelge 4.1. KFF öncesi ve sonrası yoncanın holoselüloz ve karbon içerikleri ve ağırlık kaybı.....	47

1. GİRİŞ

Katı faz fermantasyonu (KFF) , nemli katı destekler üzerinde mikroorganizmaların üretilmesi olarak tanımlanmaktadır. Bu destekler ya inert taşıyıcılar ya da suda çözülemeyen substratlar olmalıdır. Bununla birlikte, substrat olarak kullanılacak katı materyal karbon ve enerji kaynağı olarak da mikroorganizmalar tarafından tüketilebilmelidir. Fermentasyon süreci serbest suyun varlığından bağımsız olarak gerçekleşebilir (Pandey vd, 2000). Bu teknik, eski zamanlardan beri uygulanan bir fermentasyon tekniğidir (Mitchell ve Lonsane 1990). KFF, zirai-endüstriyel atıkların işlenmesinde birçok olanak sunmaktadır. Katı faz kullanımı daha az enerji gereksinimi, daha az atık su oluşturması, katı atık deşarj problemine de bir çözüm oluşturması açısından çevre dostu bir teknik olması nedeni ile tercih edilmektedir (Pandey, 2003).

Katı substratlarda daha çok fungusların büyütülmesi tercih edilmektedir. Askomiset ve Basidiyomisetlerin evrimsel sürecinde sadece birkaç türün su ortamına adapte olması dışında genelde toprağa adaptasyon söz konusudur (Hölker ve Hölfer, 2004). KFF tekniğinin Basidiyomiset üyeleri mikroorganizmaların doğal habitatlarına yakın olması nedeni ile aktivetelerinin artışı ve böylece daha verimli ürün elde edildiği bilinmektedir. Bu da katı faz fermantasyon süreçlerinde Basidiyomiset grubu fungusların önemini artırmıştır.

Basidiyomiset üyesi beyaz çürükçül fungusların iyi birer ligninolitik enzim üreticisi olduğu bilinmektedir. Beyaz çürükçül funguslar ile ligninolitik enzim üretiminde tarımsal atıklar doğal formunda kullanılabilir. Bu atıkların çoğu, ligninolitik aktiviteyi indükleyici olarak rol oynayan lignin, selüloz ve hemiselüloz içermektedir ve ayrıca birçoğunun, yüksek oranda şeker içermesi işlemlerin çok daha ekonomik olmasını sağlamaktadır. Endüstriyel süreçlerde büyük miktarlarda enzimlere gereksinim duyulmaktadır. Bununla birlikte, ham enzim preparasyonları genellikle yüksek maliyetle temin edilebilmektedir. Bu yüzden ekonomik enzim üretimi biyoteknolojik süreçlerde önem kazanmaktadır. Böylece ucuz zirai- endüstriyel atıklardan enzim

PDF Eraser Free

üretimine son zamanlarda dikkat çekilmiş ve araştırmacılar tarafından çalışılmaya başlanmıştır.

Ligninolitik enzimler, toprak ekosistemlerinde ligninoselülozik maddelerin doğal parçalanma süreci açısından önemlidir. Bu, fotosentezle fikse edilen organik karbonun dolaylı olarak çevrime girmesine olanak sağlar. Aynı zamanda selülozu kullanırken ligninin uzaklaştırılmasını gerektiren kağıt hamuru üretimi, biyoetanol üretimi gibi ligninoselülozik biyokütleyi kullanan birçok endüstriyel süreçte de lignin yıkımı ve ligninolitik enzimler kullanılmaktadır. Ligninolitik bir enzim olan lakkaz, oksitleyici ajan olarak çözünmüş oksijeni kullanırken diğer peroksidaz grubu enzimlerden lignin peroksidaz ve mangan peroksidaz bu amaçla H_2O_2 'e gereksinim duyar.

Yapılan bu tez çalışmasında katı faz fermantasyonu ile iyi birer ligninolitik enzim üreticisi olan beyaz çürükçül funguslardan *Trametes versicolor*, *Phenorochaeta chrysosporium*, *Pleurotus sajor-caju*'nun lakkaz, lignin peroksidaz ve mangan peroksidaz üretim yetenekleri farklı katı substratlar denenerek araştırılmıştır. Katı faz olarak talaş, mısır kepeği, yulaf, buğday kepeği, kurutulmuş çay, kanola, pirinç kepeği, soya fasulyesi kepeği, ayçiçeği kepeği, yonca, arpa kepeği, DDGS ve *Pinus nigra* kozalağı gibi tarımsal kökenli materyaller kullanılmıştır. Bu substratlar besin içeriği, kolay erişilebilirliği ve maliyetinin düşük olması nedeniyle tercih edilmiştir. Yapılan tarama çalışmasından sonra seçilen mikroorganizma, substrat ve enzim için günlük enzim aktivite tayinleri yapılmıştır. Katı substrat olarak seçilen yoncanın fermantasyon öncesi ve sonrası azot, karbon ve holoselüloz miktar tayinleri yapılmış ve ağırlık kaybına bakılmıştır. Ayrıca yoncanın ana bileşenleri olan lignin, selüloz ve hemiselülozun kimyasal yapılarında fermantasyon öncesi ve sonrasında herhangi bir değişiklik olup olmadığını ve de böylece biyolojik yıkıma uğradığını da oluşan değişikliği belirleyebilmek için FT-IR analizleri yapılmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Katı Faz Fermentasyon

2.1.1. Tanımı ve Tarihsel Gelişimi

Katı faz fermentasyonu (KFF) serbest suyun yokluğunda ya da az miktarda suyun varlığında katı ortamda gelişen fermentasyon sürecini tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Ancak, mikroorganizmanın büyümesini ve metabolizmasını desteklemek amacı ile substrat yeterince nemli olmalıdır (Pandey, 1992; Pandey, 1994; Pandey et.al., 2000; Pandey et. Al. 2001). Bu teknik, eski zamanlardan beri uygulanan bir fermentasyon tekniğidir (Mitchell ve Lonsane 1990). Bu nedenle eski zamanlarda kullanılan fermentasyon süreçlerinin katı faz fermentasyon ilkelerine dayandığını söyleyebiliriz. Daha az enerji gereksinimi, daha az atık su üretmesi, katı atık deşarj problemlerine de bir çözüm oluşturması açısından çevre dostu bir teknik olması nedeni ile zirai-endüstriyel atıkların substrat olarak kullanılmalari tercih edilmektedir (Pandey, 2003).

Son yıllarda enzim üretiminde katı faz fermentasyonundan yararlanma konusunda gittikçe artan bir eğilim söz konusudur. KFF'nin yaklaşık olarak M.Ö. 2600'lü yıllarda kullanıldığı bilinmektedir. Çizelge 2.1, KFF'nin tarihsel gelişimini kısaca özetlemektedir (Pandey, 1992).

Fermentasyon teknolojisinin tarihsel gelişimine bakıldığında KFF'nin; batı ülkelerinde 1940'lı yıllardan sonra sıvı fermentasyon teknolojisine giderek bu eski tekniğin yerini alması nedeniyle neredeyse tamamen ihmal edildiğini görmekteyiz. II. Dünya savaşı süresince penisiline olan gereksinim giderek artması ve bu ürünün sıvı batık fermentasyonda üretilmeye başladığı dönemden bugüne sıvı fermentasyon tekniği herhangi bir bileşiğin üretimi için de önemli bir model olmuştur. 1950–1960 yıllarında fungal kültürlerle steroid transformasyonu KFF sistemleri üzerinde çalışılmıştır. 1960–1970 yıllarında ise KFF için bir diğer kilometre taşı olacak gelişmeler meydana gelmiştir; mikotoksinlerin üretimi bu teknikle yapılmak istenmiş ve denemeler yapılmıştır. Zirai-endüstriyel atıkları kullanarak katma değer sağlayan bu teknikle gerçekleştirilen protein açısından zengin hayvan yemlerinin üretimi de bu konu ile ilgili

diğer bir gelişmedir. Bu gelişmelerden sonra araştırmacılar son yıllarda bu fermentasyon tekniğı üzerine daha fazla yoğunlaşmıştır. KFF'nin temel bakış açıları, biyoreaktörlerin geliştirilmesi, modellendirilmesi, bu teknikle gıda, yem, çeşitli primer ve sekonder metabolitlerin üretilmesi, biyoliçing, biyopulping, biyoremediasyon gibi biyosüreçlerin geliştirilmesi üzerine çok sayıda patent ve yayın mevcuttur (Ogbonna et. al., 2001; Han et. al., 2001; Haddadin et. al., 2001; Yang et. al., 2001; Pandey et. al., 1999; Classen et. al., 2000; Medeiros et. al., 2000).

Çizelge 2.1. Katı faz fermentasyonun tarihsel gelişimi (Pandey, 1992'e göre)

Dönem	Gelişme
M.Ö. 2600	Mısırlılar tarafından ekmek yapımı
Asya'da Günümüzden 1000 yıl öncesi	<i>Penicillium roqueforti</i> ile peynir yapımı
Günümüzden 2500 yıl öncesi	Şeker, nişasta, tuzla balık fermentasyonu/ saklanması, koji prosesi
7. yüzyıl	Budist rahiplerle Çin'den Japonya'ya koji üretimini taşınması
18. yüzyıl	Gallik asit üretimi
1860–1900	Atıksu iyileştirmesi
1900–1920	Fungal enzimler (özellikle amilaz), kojik asit üretimi
1920–1940	Fungal enzimler, glukonik asit, sitrik asit üretimi, döner fermentörde uygulama
1940–1950	Fermentasyon endüstrisinde önemli gelişmeler. KFF ve sıvı fermentasyonla penisilin üretimi.
1950–1960	Fungal kültürlerle steroid transformasyonu
1960–1980	Miktoksin, proteince zengin yemlerin üretimi
1980-günümüze değin	Alkol, giberellik asit gibi diğer çeşitli ürünler

KFF'nin geleneksel anlamda örnekleri Japonya'da koji, Endonezya'da tempeh ve Fransa'da mavi peynir üretiminde kullanılması olarak sıralanabilir (Rodriguez Couto ve Sanroman, 2005).

2.1.2. KFF'de Katı Desteğin Önemi

Katı faz kültürasyonu gerçekleştirmek için destek materyalin seçimi önemlidir; çünkü sürecin başarısı bu seçime bağlıdır. Pastrana ve arkadaşları (1995) ve Murado ve arkadaşları (1996) çavdar saplarından ve ıslatılmış poliüretan köpük parçalarından oluşan sistemleri kullanarak katı faz kültürü ile giberellik asit ve amilaz üretimini çalışmışlardır. Her iki süreçte de destek materyal seçiminde dikkat edilmesi gereken en önemli faktörlerin partikül boyutu, porozite ve kimyasal kompozisyon olduğunu belirlemişlerdir. Buna ilaveten katı substratın kolay bulunabilirliği ve maliyeti de önemli kısıtlardanır (Pastrana ve arkadaşları, 1995, Murado ve arkadaşları, 1996).

KFF'de kullanılan katı materyaller 2 kategoride sınıflandırılabilir: mikroorganizmanın sadece entegre olduğu yer olarak işlev gören inert olanlar ve hem mikroorganizmanın entegre olduğu yer hem de mikroorganizmanın bazı besin gereksinimlerini karşılayabilen inert olmayanlar (Durand vd., 1993; Ralph, 1976). Bu nedenle ikincisi 2 role sahip olduğu için destek-substrat olarak adlandırılmıştır. Bu maddeler genelde nişasta- ya da (ligno-) selüloz temelli tarımsal ürünler ya da tohum veya tohum yan ürünleri tarımsal-endüstriyel kaynaklardır (Pandey, 1992). Bununla birlikte, bu tip destek maddelerini kullanmak hem ekonomik hem de bu tip atıkların doğuracağı çevresel problemleri çözmede yardımcı olacaktır. Bu tip desteklerin kompozisyonu üretilecek enzim dikkate alınarak seçilmelidir; çünkü bu maddeler söz konusu enzimler için indükleyici olarak işlev görebilir. Örneğin, lignin peroksidaz üretimi lignin açısından zengin organik atıkların kullanımı ile artırılabilir (Rodriguez Couto vd., 2000). Lakkaz üretimi ise selülozca zengin organik atıkların kullanımı ile artırılabilirken nişasta açısından zengin atıkların kullanılması da amilazın üretimini indükleyebilecektir (Lorenzo vd., 2002; Rodriguez Couto, 2002).

2.1.3. KFF'nin Üstünlükleri ve Eksiklikleri

KFF'nin amacı, çözülemeyen substratlarla sıkı temasta bulunan bakteri ve fungusların büyütülmesini sağlamaktır. Bu sayede fermentasyon için en yüksek substrat konsantrasyonu kullanılmaktadır. Çizelge 2.2, sıvı fermentasyonla karşılaştırıldığında KFF'nin potansiyel ekonomik ve ekolojik önemini belirten üstünlükleri sıralamaktadır. Fakat KFF'nin endüstriyel kullanımını sınırlayacak eksiklikleri vardır. Ana engel inkübasyon süresince sıcaklık, pH, nem, substrat konsantrasyonu veya pO_2 gradientlerinin oluşturulmasıdır. Bu değişkenlerin sınırlı suyun varlığında kontrol edilmesi zordur (Hölker vd., 2004). Diğer eksiklikleri, ölçek büyütmede sıkıntı, süreç hakkında az bilginin olması, yüksek saflıkta ürün elde edilmesinin zorluğu ve ürün iyileştirmede maliyet artışı olarak sıralanabilir (Robinson vd., 2001).

KFF avantajlarından biri, aynı suş ve aynı fermentasyon sıvısında enzim titrelerinin sıvı fermentasyonda üretilenden daha yüksek olmasıdır (Vinięra vd., 1998). Fakat bunun nedenini açıklayan bir araştırma yoktur. Son zamanlarda Vinięra-Gonzalez ve arkadaşları (2003) sıvı fermentasyon ve KFF tekniklerini kullanarak fungal kaynaklı invertaz, pektinaz ve tannaz enzimlerini karşılaştırmışlar ve KFF kültürasyonu hızlı oksijenlenme ile birlikte sürekli bir kültür olarak çalıştığından KFF'de daha yüksek titreler bulmuşlardır. Ayrıca KFF'de mekanik enerji harcaması olmaksızın durağan bir süreç olması avantaj olarak görülmektedir. Castilho ve arkadaşları (2000) *Penicillium restrictum* ile lipaz üretimi için KFF ve sıvı fermentasyon süreçlerinin karşılaştırmalı maliyet analizini yapmış ve yılda 100 m³'lük lipaz üreten bir tesis için sıvı fermentasyona dayalı süreçte KFF'ye nazaran %78 daha fazla sermaye gereksinimi olduğunu ve ürünün pazar fiyatının %68 daha fazla olduğunu saptamışlardır. Bu sonuçlar KFF'nin en büyük avantajlarından birinin düşük maliyet olduğunu göstermiştir.

Çizelge 2.2. Sıvı fermentasyona karşın KFF'nin biyoteknolojik üstünlükleri ve süreç değeriendirilmesi (Hölker vd., 2004)

Avantajlar	Sonuçlar	Çözülecek problemler
Biyolojik avantajlar		
Düşük su ihtiyacı	Daha az atık su	Nem gradiyentlerinin ayarlanması
Yüksek konsantrasyonda son ürün	Daha düşük aşağı akışlı sistem maliyeti	
Katabolit represyon çok az ya da yok	Glikozun varlığında fermentasyon	
Katı substratın kullanılması	Yüksek konsantrasyonlu büyüme substratları	Substrat gradiyentlerinin ayarlanması pH gradiyentlerinin ayarlanması
Sterilizasyona daha az gerek duyulması	Fermentasyon mikroorganizmalarının karışık kültürleri	
Mikroorganizmalar için katı substrat		
Doğal ortama benzerlik	Kültür organizmalarının daha yüksek performansı	
Suda çözülemeyen katı substratların fermentasyonu		
Karışık kültürlü mikroorganizmaların kullanılabilirliği	Metabolik performansın sinerjizmi	
Süreç avantajları		
Yüksek hacimli üretim	Daha küçük fermentör hacmi	
Isıtma için düşük enerji		Sıcaklık gradiyentinin ayarlanması
Kolay havalandırma		Büyük ölçekte oksijen gradiyentinin ayarlanması
Kullanılmayan karbon Kaynaklarının tüketilmesi	Ucuz ve bol karbon kaynağı	
Köpük kırıcı kullanılmaz	Fermentasyon süresince mikroorganizma kaybı olmaz	

2.1.4. KFF’de Dikkat Edilecek Hususlar

KFF’de herhangi bir süreç geliştirmek için dikkat edilmesi gereken önemli hususlar vardır. Bunlar uygun mikroorganizma, uygun substrat seçimi, süreç parametreleri için uygun koşulların belirlenmesi, ürünün izolasyonu ve saflaştırılmasını kapsamaktadır. Su aktivitesine dayanan teorik sınıflandırma göz önünde bulundurulursa sadece fungusların KFF için uygun olduğu düşünülebilir. Nispeten yüksek su aktivitesi gereksiniminden dolayı bakteri kültürlerinin üretim için kullanılmasının çok uygun olmadığı söylenebilir. Ancak, bakteri kültürleri ile yapılan çalışmalar, KFF süreçleri için fermentasyon koşullarında değişiklik yapılabileceğini ve bakterilerin üretici olarak kullanılabilceğini göstermektedir (Pandey, 1992; Pandey vd., 2000; Nampoothiri ve Pandey, 1996; Selvakumar ve Pandey, 1999; Pandey, 1998). KFF ile elde edilen ürün ve çıktıların batık fermentasyon ürünlerinden daha verimli olduğu genel bir yaklaşımdır. Ancak, şimdiye kadar bu iki tekniğin ürünlerini karşılaştırmak için herhangi bir yöntem ya da inşa edilmiş büyük ölçekli bir model söz konusu olamamıştır. KFF’de daha yüksek ürün titreleri elde etmenin nedeni tam olarak bilinmemektedir. KFF mikrobiyal kültürlerinin yaşam alanlarına benzerliği ve bu nedenle fizyolojik olarak etkinliklerinin daha fazla olması bu konuya mantıklı bir neden olarak önerilebilir.

Uygun bir substratın seçimi bu teknikte bir diğer önemli noktadır. KFF’de katı madde hem fiziksel destek olması hem de besin kaynağı sağlaması açısından çözülebilir olmamalıdır. Katı madde tarımsal ekinler, zirai-endüstriyel kalıntılar ya da inert destek gibi doğal olarak meydana gelen katı bir substrat olabilir (Pandey vd., 2000; Peralta-Perez vd., 2001; Hoogschagen vd., 2001). Destek ve substratın rolünü birleştirmek gerekli değildir. Ancak besin çözeltisi ile ıslatılan doğal inert bir madde kullanarak da üretim yapmak mümkündür. Substratın seçimi ile ilgili olarak iki önemli ölçüt söz konusudur; katma değer sağlayacak ve/veya tamamen atık olan özellikli bir substrat olması diğeri ise uygun substrattan elde edilen özel bir ürün üretme hedefidir. Bu açıdan bakıldığında çeşitli substratları taramak ve en uygun olanını seçmek gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Benzer şekilde uygun mikroorganizmaları taramak ve denenilen konuda en iyi verim elde edenini seçmek de önem kazanmaktadır. Poliüretan köpük gibi

inert bir madde kullanıldığında ürün izolasyonu; buğday kepeği gibi doğal ham maddelerin kullanılmasına göre nispeten daha kolay ve daha ucuz olacaktır. Çünkü, doğal hammadde substrat olarak kullanıldığında fermentasyon sonrası ürünün ekstrakte edilmesi ve saflaştırılması sırasında karşılaşılabilecek güçlükler, substrattan gelen suda çözülebilir bileşenlerin de ortamda bulunması gibi nedenler birer engel olarak görülebilir. İnert maddeler KFF'nin temel ilkelerini ya da modellendirmeyi çalışmak için daha çok tercih edilmektedir.

Bu konuda bir diğer önemli konu ise süreç parametrelerinin seçimi ve onların optimizasyonudur. Bunlar partikül boyutu, başlangıç nem konsantrasyonu, pH, substratın ön işleme tabi tutulması, nispi nem, inkübasyon sıcaklığı, karıştırma ve havalandırma, inokulumun yaşı ve miktarı, azot, fosfor ve iz elementler gibi besinlerle desteklenmesi, ilave karbon kaynağı ve indükleyicilerin eklenmesi, ürünün ekstraksiyonu ve saflaştırılması gibi fizikokimyasal ve biyokimyasal parametrelerdir. Deneyin tür, düzey ve uygulamasına bağlı olarak tek ve/veya çoklu değişken parametre optimizasyon yöntemi bu fermentasyon tekniği için de kullanılabilir.

2.1.5. KFF Uygulamaları

Tehlikeli bileşiklerin biyolojik yıkımı ve biyolojik iyileştirilmesi, tarımsal ve endüstriyel atıkların biyolojik detoksifikasyonu, besinsel zenginleştirme için ekin ve ekin kalıntılarının biyolojik transformasyonu, biyolojik pulping, antibiyotik, alkaloid, bitki büyüme faktörleri, enzim, organik asitler, biyopestisitler, biyosürefektanlar, biyoyakıt, aroma bileşikleri gibi biyolojik açıdan aktif sekonder metabolitlerin üretilmesi ile ilgili uygulamalar KFF tekniği ile çalışılmış ve bu konu üzerine dikkat çekilmiştir. Son 20 yıldır KFF sistemleri düşük teknoloji sistemleri olarak düşünülmüşse de, yakın zamanlarda biyofarmasötik gibi düşük hacimde üretilen ancak maliyeti yüksek daha değerli ürünlerin üretiminde de kullanımı çalışılmaktadır. KFF süreçleri tehlikeli ve toksik bileşiklerin biyolojik zehirsizleştirilmesi (detoksifikasyonu) ve biyolojik iyileştirilmesinde potansiyel üstünlükler sunmaktadır (Nigam ve Singh, 1996; Gautam vd., 2002; Brand vd., 2000).

2.1.5.1. Enzimlerin Üretimi

Endüstriyel enzimlerin yaklaşık %90'ı son zamanlarda spesifik olarak optimize edilmiş, genetiği değiştirilmiş mikroorganizmalar kullanılmak suretiyle sıvı fermentasyon tekniği ile üretilmektedir. Bu açıdan sıvı fermentasyon KFF'ye nazaran oldukça önemli bir üstünlük sağlamaktadır. Diğer yandan, neredeyse tüm enzimler, yabancı tipteki mikroorganizmalar kullanılarak KFF'de de üretilebilmektedir (Filer, 2001; Pandey vd., 2001). Son yıllarda, KFF'de kullanılan fungus, bakteri ve mayaların katı substrat ve sıvı fermentasyon şartlarında farklı metabolik strateji sergilemesi dikkat çekmektedir. Büyüme hızı, verimlilik veya hacimsel aktivite gibi çeşitli parametrelerin karşılaştırılması KFF'yi ön plana çıkarmaktadır. Aynı zamanda maliyet faktörü de KFF'nin bir üstünlüğü olarak değerlendirilmektedir. Tengerdy (1996) selüloz üretim maliyetini in situ KFF'de 0.2 \$/kg olarak karıştırılmalı tank reaktörde ise 20 \$/kg olarak hesaplamıştır.

KFF'nin tahmin edilen düşük maliyeti KFF'nin geleneksel olarak tercih edilmiş olmasından da kaynaklanıyor olabilir. KFF, substrat olarak kompleks, heterojen tarımsal atıkları kullanılmasına olanak sağlar. Sterilizasyon ve regülasyon talepleri ile alakalı olarak düşük maliyetli teknoloji olarak da bilinmektedir. Diğer kültürasyon teknolojileri ile mikroorganizmalar ve substratların karşılaştırılmasına olanak sağlayacak yöntemler arasında bir ortaklık yoktur. KFF'de kullanılan substratlar ucuz, kolay ve bol bulunabilir olması ve sıvı fermentasyon tekniğine uygulanamaması gibi üstünlüklere sahipken sürecin ölçeği büyütülmek istendiğinde bilimsel ve teknolojik veriler yetersiz kalabilmektedir (Gautam vd., 2002). Çizelge 2.3, katı substrat fermentasyonda rol oynayan mikroorganizmalar, çeşitli substrat ve ürünleri göstermektedir. Sonuçların karşılaştırılmasını kolaylaştırmak için katı substrat olarak inert substratların kullanımı giderek daha fazla kullanılmaktadır (Ooijkaas vd., 2000).

Ekstrem pH veya yüksek sıcaklıkta üretilen enzimlerin stabilitesi gibi biyolojik parametrelerin KFF'de daha iyi sonuç vermesi de ilginçtir (Deschamps ve Huet, 1985; Acuna-Arguelles vd., 1995). Sıvı fermentasyon tekniğinde ciddi bir problem olan proteazlarla katabolit represyon ya da protein degradasyonu, KFF'de yoktur ya da

indirgenmiş durumdadır (Solis-Pereira vd., 1993; Aguilar vd., 2001). Buna karşın KFF ya da sıvı fermentasyonda mikroorganizmalar inkübe edildiğinde metabolik farklılıklarını ön plana çıkaran az sayıda çalışma mevcuttur.

Çizelge 2.3. Katı faz fermentasyonda kullanılan materyaller, rol oynayan mikroorganizmalar, çeşitli substrat ve ürünler

Substratlar	Ürün	Mikroorganizma	Referans
Badem	Lipaz	<i>Rhizopus oligosporus</i>	Ul-Haq vd., 2002
Elma pulpu, mısır püskülü, arpa kabuğu	Boya degradasyonu	Beyaz çürükçül fungus	Robinson vd., 2002
Muz kabuğu	Ligninolitik enzimler	<i>Pleurotus</i> sp.	Reddy vd., 2003
Izgara et kalıntıları	Biyokontrol ajanı	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Adams vd., 2002
Kakao jeli	Endo-poligalakturonaz	<i>Peacilomyces clavisporus</i>	Souza vd., 2003
Kassava, soya fasulyesi, horozibiği çiçeği tohumu	Aroma	<i>Rhizopus oryzae</i>	Christen vd., 2000
Hindistan cevizi kabuğu	Lipaz	<i>Candida rugosa</i>	Benjamin ve Pandey, 1997
Kahve rezidüleri	Yenebilir mantar	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Fan vd., 2000
Mısır püskülü	Selülotik enzimler	<i>Fusarium oxysporum</i>	Panagiotou vd., 2003
Ökalyptus kraft hamuru	Ksilanaz	<i>Streptomyces</i> sp.	Beg vd., 2000
Sert odun talaşı	Tempeh	<i>Aspergillus</i> sp.	Reyes-Moreno vd., 2000
Linyit	Sıvılaştırılmış kömür	<i>Trichoderma atroviride</i>	Hölker ve Hölfer, 2002
Portakal atıkları	Pektinaz	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Martins vd., 2002
Ananas, karışık meyve atıkları	Sitrik asit	<i>Aspergillus niger</i>	Kumar vd., 2003
Lastik	Geri dönüşüm	<i>Gordonia</i> sp.	Arenskötter vd., 2003
Soya fasulyesi kabuğu	Proteaz	<i>Penicillium</i> sp.	Germano vd., 2003
Tahiti ağacı talaşları	Pektinaz	<i>Aspergillus</i> sp.	Dartora vd., 2002
Ahududu tohum tozu ile kırık buğday	<i>Neomisin</i>	<i>Streptomyces mariensis</i>	Ellaiah vd., 2003

KFF, diğer funguslarla enzim üretim etkinliğinde avantajlara sahiptir (Çizelge 2.4). *Melanocarpus albomyces* IIS-68 ile ksilanaz (Jain, 1995); *Peacilomyces clavissporus* ile endopoli-galakturonaz (Souza vd., 2003), *Kleyveromyces lactis* ile β -galaktozidaz (Becerra ve Gonzalez Siso, 1996) için KFF'de sıvı fermentasyona göre daha yüksek enzim üretimi sağlanmıştır. KFF koşullarında katabolit repressiyonun yokluğu ya da azlığı model organizma *Aspergillus*'ta olduğu gibi diğer fungus ve bakterilerde de mevcuttur. KFF'de *Penicillium canescence* ile ksilanaz üretimi, sıvı fermentasyonla üretildiğinin aksine yüksek glikoz ya da ksiloz konsantrasyonu ile baskılanmamaktadır (Bakri vd., 2003). Ancak, *Rhizopus oryzae* için tannazın katabolit repressiyonu gözlemlenmiştir. 70 saatlik bir inkübasyondan sonra tannaz aktivitesi hızlıca azalmıştır. Yine de bu etki toksik maddenin oluşumu ya da son ürün gallik asidin regülasyonundan dolayı olabilir (Kar vd., 1999).

KFF'nin avantajları bakteriler için de söz konusudur. Kapoor ve Kuhad farklı büyüme şartlarında *Bacillus* sp. MG- cp-2 ile alkalın poligalakturonazın üretimini değerlendirmişler ve KFF'de 23,076 U (g katı substrat)⁻¹ ve sıvı fermentasyonda 342 U (ml kültür süspansiyonu)⁻¹ maksimum katalitik aktivite bulmuşlardır. Fakat sıvı fermentasyonda birim hacim başına değerler katı substrat fermentasyonda birim ağırlık başına değerlerle kıyaslandığı için bu sonuçlar birbirleri ile karşılaştırılmaz. Dey ve Agarwal (1999) bakterileri de KFF tekniği ile *Streptomyces megasporus*'dan elde edilen ısı açısından stabil α -amilazın 3-4 kat daha fazla aktiviteye sahip olduğunu bulmuşlardır. Beg ve arkadaşları (2000) aynı kültür şartlarında büyütülen *Streptomyces* sp. QG-11-3'den elde edilen ksilanazın 2,5 kat daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Benzer şekilde sıvı fermentasyonla karşılaştırmak suretiyle KFF'de büyütülen *Bacillus subtilis* yaklaşık 12 kat daha fazla selülaz (Krishna, 1999) ve daha fazla pektinaz (Kashyap vd., 2003) üretmiştir. KFF'de *Bacillus thuringiensis*'den enzim üretimi 70 m³'lük biyoreaktöre aktarılıp başarılı bir şekilde ölçek büyütmesi gerçekleştirilmiştir (Hongzhang vd., 2002).

Çizelge 2.4. KFF ve sıvı fermentasyonla mikrobiyal enzim üretim etkinliğinin karşılaştırılması

Ürün	Mikroorganizma	Parametre	KFF	Sıvı fermentasyon	Referans
α -amilaz	<i>Streptococcus megasporus</i>	Verimlilik (U min ⁻¹ mg protein ⁻¹)	206	643-804	Dey ve Agarwal, 1999
Selüaz	<i>Bacillus subtilis</i>	Toplam enzim üretimi	12	1	Krishna, 1999
Selüaz	<i>Trichoderma</i> sp.	Maliyet (US \$/kg)	0.2	20	Tengerdy, 1996
Lakkaz	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Aktivite değışkenliği	Düşük	Yüksek	Baldrian ve Gabriel, 2002
Lakkaz	<i>Panus tigrinus</i>	Toplam enzim aktivitesi	2.5	1	Fenice vd., 2003
Ligninaz	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Aktivite	6	1	Fujian vd., 2001
MnP	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Aktivite	10	1	Fujian vd., 2001
MnP	<i>Panus tigrinus</i>	Toplam enzim aktivitesi	7	1	Fenice vd., 2003
Poligalakturonaz	<i>Bacillus</i> sp. MG-cp-2	Üretim U/g vs U/ml	23.706	360	Kapoor ve Kuhad, 2002
Tannaz	<i>Rhizopus oryzae</i>	Aktivite (U/l)	32.76	23.86	Kar ve Banerjee, 2000
Ksilanaz	<i>Streptomyces</i> sp. QG-11-3	Üretim (U/ml)	203	81	Beg vd., 2000
Ksilanaz	<i>Penicillium canescens</i> 10-10c	Katabolit represyon	Yok	Var	Bakri vd., 2003

2.1.5.2. KFF Tekniği Kullanılarak Sekonder Metabolitlerin Üretimi

Sekonder metabolitlerin üretimi son yıllarda önem kazanan KFF uygulamasının diğer bir alanını oluşturmaktadır. Biyolojik açıdan aktif çeşitli sekonder metabolitlerin üretimi kullanılan mikroorganizmanın stasyonere büyüme fazı ile ilişkilendirilir ve fazla karbon ve enerji kaynağı ile birlikte azot veya fosfor sınırlamasına bağlıdır. KFF’de sekonder metabolit üretimi su ve besin içeriğinin azaltılması ile de tetiklenmektedir. Bununla birlikte katı substrat ya da inert bir destek ile mikrobiyal misellerin ilişkisine bağlıdır. Bir çok fungus optimum büyüme ve verimlik için dayanak olarak katı substrata gereksinim duymaktadır. Bu nedenle sıvı kültür şartlarında optimize edilmiş genetiği değiştirilmiş organizmalar genelde sıvı kültürlerde kullanılırken doğal izolatlar katı substrat fermentasyonunda büyütülmesi tercih edilebilmektedir.

Geleneksel bir Asya yiyeceği olan kırmızı pirinç binlerce yıldır KFF’de *Monascus purpureus* ile hazırlanmaktadır. Fungus hem gıda katkı maddesi hem de farmasötik olarak uygulama alanı bulunan açık sarıdan koyu kırmızıya kadar renk skalasında olan altı farklı poliketid pigmenti üretir (Johns ve Stuart, 1991; Juzlova vd. 1996). Bu fungus sıvı kültürde büyütüldüğü zaman daha az pigment üretimi gözlenmiştir (Hsu vd., 2002). İşletmelerde daha çok steril olmayan koşullar kullanıldığı için KFF; Asya gıdalarının üretiminde anahtar rol oynamaktadır (Han vd., 2001; Su vd., 2003). Fungus ve mayaların karışık kültürü sıvı fermentasyonda gerçekleştirilemezken KFF ortamında sinerjik yolla çeşitli aroma-aktif bileşikleri üretebilmektedir (Nout ve Aidoo, 2002).

Sıvı fermentasyon tekniğinde çözülemeyen bir diğer problem de fermentasyon süresince büyüme ortamındaki değişikliklerden dolayı oksijen takviyesindeki değişimlerdir. Birçok durumda funguslar istenilen metabolitlerin sentezi için yüksek viskoz ortama gereksinim duymaktadır. Bu viskosite, fungal büyüme süresince polimerik maddelerin sentezi ile gerçekleştirilir. Böyle zamanlarda karıştırma hızı ve oksijen desteği süreçte önemli olmadığı için KFF daha iyi bir alternatif olabilmektedir (Elibol ve Muvituna, 1997).

Antibiyotik, mikotoksin (Barrios-Gonzalez ve Tomasini, 1996), bakteriyel endotoksinler, alkaloidler veya bitki büyüme faktörleri gibi biyolojik açıdan aktif çeşitli sekonder metabolitler sıvı fermentasyon tekniği ile de karşılaştırılarak KFF koşullarında elde edilmiş ve Çizelge 2.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 2.5. Sıvı fermentasyonla karşılaştırıldığında KFF'de çeşitli mikroorganizmalarla sekonder metabolitlerin üretimi

Ürün	Mikroorganizma	Parametre	KFF	Sıvı fermentasyon	Referans
6-pentil- α -piron	<i>Trichoderma harzianum</i>	Verimlilik	17	1	Sarhy-Bagnon vd., 2000
Bafilomisin B1+C1	<i>Streptomyces halstedii</i> K122	Üretim	Var (İnce tabakada kültürasyon)	Yok	Frandsberg vd., 2000
Benzoik asit	<i>Bjerkandera adusta</i>	Üretim	3.5	1	Lapadatescu ve Bonnarme, 1999
Benzil alkol	<i>Bjerkandera adusta</i>	Üretim	10	1	Lapadatescu ve Bonnarme, 1999
Sefamisin C	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	Stabilite	Daha yüksek	Daha düşük	Kota ve Sridhar, 1998
Hindistan cevizi aroması	<i>Trichoderma sp.</i>	Üretim	Daha yüksek	Daha düşük	Alberto vd., 2002
Ergot alkaloidi	<i>Claviceps fusiformis</i>	Üretim	3.9	1	Hernandez vd., 1993
Giberellik asit GA ₃	<i>Gibberella fujikuroi</i>	Üretim (mg/kg vs mg/l)	492	80	Machado vd., 2002
Giberellik asit GA ₃	<i>Gibberella fujikuroi</i>	Üretim (mg/kg vs mg/l)	240	23	Tomasini vd., 1997
Giberellik asit GA ₃	<i>G.fujikuroi</i>	Verimlilik (akümülatif)	3.5	1	Balakrishnan ve Pandey, 1996

Çizelge 2.5. Sıvı fermentasyonla karşılaştırıldığında KFF’de çeşitli mikroorganizmalarla sekonder metabolitlerin üretimi (devamı)

Ürün	Mikroorganizma	Parametre	KFF	Sıvı fermentasyon	Referans
Iturin	<i>Bacillus subtilis</i>	Verimlilik (mg g yaş kültür- ¹ /gün)	0.55-0.8	0.032-0.044	Ohno vd., 1993
Okratoksin	<i>Aspergillus ochraceus</i>	Ürün	Daha yüksek	Daha düşük	Harris ve Mantle, 2001
Oksitetrasiklin	<i>Streptomyces rimossus</i>	Depolama stabilitesi (>6 ay)	Aktivite kaybı yok	Aktivite kaybı var	Yang ve Wang, 1996
Penisilin	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Üretim (mg/l)	13	9.8	Barrios-Gonzalez vd., 1993
Rifamisin-B	<i>Amycolatopsis mediterranei</i>	Üretim	16	1	Venkateswarlu vd., 2000
Tetrasiklin	<i>Streptomyces viridifaciens</i>	Üretim stabilitesi	Daha yüksek	Daha düşük	Yang ve Ling, 1989

Bakterilerin havasal miselleri ile meydana gelen sporların oluşumu sayesinde sekonder metabolitlerin üretimi gerçekleştiğinden özellikle *Streptomyces* kültürasyonunda KFF doğru bir seçim olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle penisilin (Barrios-Gonzalez vd., 1993), sefalosporin (Jermini ve Demain, 1989), siklosporin A (Balakrishnan ve Pandey, 1996; Ramana Murthy vd., 1999), tetrasiklin (Yang ve Wang, 1996), rifampicin (Krishna vd., 2003) ve iturin (Ohno vd., 1993) gibi antibiyotikler sıvı fermentasyonla karşılaştırıldığında KFF ortamında daha yüksek verimlilikte üretilmişlerdir.

Liserjik asit dietilamid gibi ergot alkaloidleri farmasötik ilaç olarak kullanılmaktadır. Hernandez ve arkadaşları (1993) *Claviceps fusiformis*'ten alkaloid üretilmesinde sıvı fermentasyon tekniği ile karşılaştırdığında KFF’de 3,9 kat daha

yüksek ürün elde edebilmiştir. *Claviceps purpurea*'nın sıvı fermentasyon ve katı faz fermentasyon koşullarında farklı kültürasyonları üretilen ergot alkaloid miktarında bir farklılık oluşturmamıştır. Fakat sekonder metabolit spektrumu farklılık göstermiştir. Bu büyük olasılıkla köpük kırıcı maddelere fungusun duyarlılığı, yüksek oksijen talebi ve/veya ergot alkaloidlerini sentezleyen enzimlerin son ürün inhibisyonundan kaynaklanabilir (Balakrishnan ve Pandey, 1996).

Bazı funguslar sıvı fermentasyon koşullarında oldukça iyi gelişim göstermelerine rağmen sekonder metabolitlerini sadece katı yüzeylerde büyütüldüğü zaman geç stasyonere fazda üretirler. Koprofilik fungus *Conichaeta ellipsoidea* sadece KFF'de büyütüldüğünde tetramik asit antibiyotiğini üretebilir (Segeth vd., 2003). Kültür kompozisyonunun optimizasyonu, benzer şartlar altında eş zamanlı sürdürülen deneylerin takibi için yapılan yeni bir KFF biyoreaktör tipi 1 kg katı substrat ölçeğinde çalıştırılmıştır (Hölker, 2002). Sonuçlar, KFF'de *C.ellipsoidea*'nın kültürasyonunda en iyi substratların çavdar ve yulaf kepeği olduğunu göstermiştir. Bu süreç damlatmalı film/akışkan yatak biyoreaktör kombinasyonu ile 5 kg katı substrat hacmine büyütülmüş ve 1 gram kurutulmuş substrat başına 1.4 mg konisetin konsantrasyonu elde edilmiştir.

2.1.5.3. KFF'de Sporların Üretimi

KFF, havasal hiflerle fungal sporlar elde etmede günümüzdeki en iyi yöntemdir. KFF'de üretilen sporların özellikleri sıvı fermentasyonda üretilen sporlardan farklıdır. *Botrytis cinera*, *Sclerotinia sclerotiorum* veya beyaz çürükçül funguslar gibi fungal bitki patojenlerine karşı biyokontrol ajanı olarak kullanılan fungal sporlar daha yüksek kalitede üretilebildiği için tercihen katı substrat fermentasyonda elde edilmektedir. Bu şekilde geliştirilen sporlar kuru fazda daha stabil ve kurumaya da daha fazla dirençlidir. Fazla sayıda spor elde etmek için sıvı fermentasyon (ilk aşamada biyokütle üretimi için) ile KFF'nin (ikinci aşama olan spor üretimi için) kombinasyonunun oldukça başarılı olduğu kanıtlanmıştır (Deshpande, 1999; Tengerdy ve Szakacs, 2003). KFF ile elde edilen *Penicillium oxalicum* sporlarının daha fazla yüzey hidrofobluğuna sahip olduğu gösterilmiştir. Böylece 27 haftalık depolamadan sonra aktifleşme oranı daha fazla olmuştur ve liyofilizasyondan daha az zarar görmüştür. Bununla birlikte KFF'de

üretileen sporlar *Fusarium oxysporum*'a karşı daha iyi bir biyokontrol ajanı olmuştur (Pascual vd., 2000). KFF' de geliştirilen sporlar batık fermentasyon ile üretilen sporlarla karşılaştırıldığında doğal çevresel şartlarda daha uzun süreli kalabildiği gibi morfolojik, fonksiyonel ve biyokimyasal açıdan da farklılıklar göstermiştir.

B.cinera gibi çeşitli bitki patojenlerine karşı potansiyel olarak kullanılan *Trichoderma harzianum* daha yoğun hücre duvarına sahip ve UV radyasyonuna dirençli daha küçük sporlar oluşturur. Munoz ve arkadaşları (1995) havasal sporların yüzeylerine salgıladıkları büyük (14 kDa) bir hidrofobin benzeri proteinden dolayı KFF' de üretilen sporların yüksek ölçüde hidrofobisiteye sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. Sıvı fermentasyon kültürlerinin ölçek büyütmesi, müdahale ve kontrol edilmesi daha kolay olması nedeni ile *B.cinera*'ya karşı aktif olan *Ulocladium atrum* sporlarını üretme üzerine çalışmış ve iyi sonuçlar elde etmişlerdir. Fakat KFF'de üretilen sporların aksine sıvı fermentasyonda üretilen sporların germinasyon yetenekleri 6 ay sonra azalmıştır (Frey ve Magan, 2001).

Gıda endüstrisindeki uygulamalarda kullanılan sporlar daha çok katı substrat fermentasyonunda üretilmektedir. Küflü peynir ve salam üretiminde kullanılan başlangıç kültür olarak kullanılan *Penicillium roquefortii*, *P.camembertii* ve *P.nalgoviensis* daha fazla verimli homojen ve saf sporlar elde edildiği için KFF'de üretilmesi tercih edilmektedir (Larroche ve Gros, 1989). Sıvı fermentasyonda geliştirilen *P.camembertii* sporları üretmek için kesikli sıvı fermentasyon tekniği kullanılıp 1 ml kültür sıvısında 1.6×10^8 spor elde edilmiştir. Fakat bu sporların kalitesi değerlendirilmemiş ve sporulasyonları ancak kalsiyum eklenmesi ile glukoz represyonu baskılandığında olabilmıştır. Ayrıca kalsiyumla muamele test edilen tüm suşlarda başarılı olamamıştır (Bockelmann vd., 1999). *P.nalgoviensis*'in endüstriyel spor üretimi, 18 günlük kültürasyondan sonra $1-2 \times 10^9$ g⁻¹ miktarda sporla sonuçlanan katı substrat olarak 100 g'ında gerçekleştirilmiştir. Gıda uygulamaları yüksek sterilite gerektirdiği için ve oluşan metabolik ısıdan dolayı geçerli bir uygulama olamamıştır.

2.1.6. KFF'nin Biyokimya Mühendisliği Açısından Değerlendirilmesi

Son yıllarda KFF'nin temel prensiplerini anlama konusunda büyük bir uğraş verilmiş ve bu konuda birçok çalışma yapılmıştır. Bugün artık KFF süreçlerinde ana zorluklar olarak bilinen ısı ve kütle transfer etkileri hakkında daha fazla bilgi mevcuttur. Fakat hala cevaplanması gereken birçok soru vardır. KFF süresince büyük miktarda ısı üretilmektedir. Bu da mikroorganizmanın metabolik aktivitesi ile doğrudan ilgilidir. KFF için kullanılan katı maddeler/matrisler düşük termal iletkenliğe sahiptir. Bu nedenle bu süreçten ısının uzaklaştırılması çok yavaş olabilmektedir. Zaman zaman ısı birikimi yüksek olmaktadır bu da oluşan ürünün denatüre olmasına neden olabilmektedir. Yatak reaktörün bazı bölgelerindeki sıcaklık inkübasyon sıcaklığından 20 °C daha yüksek olabilmektedir. KFF'nin ilk fazında; substrat da çok fazla değişikliğe uğramadığı için oksijen konsantrasyonu ve sıcaklık değişmeden kalabilmekte, ancak fermentasyonun ilerleyen dönemlerinde ısının üretilmesi ile sonuçlanan oksijen transferi oluşur. KFF sistemi içine ya da dışına ısı transferi fermentasyon sisteminin havalandırılması ile yakından ilgilidir. Substratın sıcaklığı da KFF'de çok önemlidir. Çünkü, bu durum nihayetinde mikroorganizmaların büyümesini, spor oluşumunu, sporun çimlenmesini, ve ürün oluşumunu etkilemektedir. Yüksek nem substrat porozitesinin azalmasına neden olmakta ve dolayısıyla oksijen penetrasyonunu önlemektedir. Böyle bir durum da bakteriyel kontaminasyonun oluşması için uygun bir ortam oluşturacaktır. Diğer yandan düşük nem; besinlerin zayıf alınabilirliği ile sonuçlanmaktadır. Yine bu da fermentasyon için yapılan aşı kültürü büyümesini zayıflatabilir (Pandey, 2003).

KFF ile ortamdaki suyun ilişkisi çok iyi değerlendirilmelidir. Substratın su aktivitesi (a_w), mikrobiyal aktivite üzerine belirleyici etkiye sahiptir. Genellikle KFF sistemlerinde büyüeyebilen mikroorganizmaların tipi a_w ile belirlenmektedir. Su aktivitesinin önemi çeşitli araştırmacılar tarafından kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır. Mikroorganizmanın büyüdüğü ortamın a_w değeri mikrobiyal hücrelerin bir tarafından öbür taraflarına doğru su ve solütlerin kütle transferleri açısından önemli bir parametre olarak bilinmektedir. Bu parametrenin kontrolü mikroorganizmanın metabolik üretimini ve ürünü salgılamasını modifiye etmede kullanılabilir (Pandey, 2003).

2.1.7. KFF'de Modelleme

KFF sisteminde modelleme, detaylı olarak çalışılması gereken bir diğer önemli konudur. KFF sistemlerinde reaksiyonların kinetikleri üzerine yeterli bilgi mevcut değildir. Bu, büyüme parametrelerinin ölçülmesi, hücresel büyümenin analiz edilmesi, substrat tüketiminin belirlenmesinde karşılaşılan zorluklardan dolayıdır. Çünkü genelde kullanılan substratlar yapısal ve doğal olarak heterojen bir yapıya sahip kompleks bileşiklerdir. Bu problemin üstesinden gelmek için ileri sürülen yaklaşımların arasında sentetik model substrat kullanmak vardır. Fermentasyon kinetiklerinin ortamın değişikliğine ve internal gaz kompozisyonuna duyarlı olduğu iyi bilinmektedir. Mikroorganizmaların hücresel büyümesi biyoreaktör içinde meydana gelen gaz kompozisyonlarının değişimi ölçülerek belirlenebilir. Mikrobiyal büyüme aynı zamanda substratın ne kadar kullanıldığı, ne kadar ısı üretildiği, substratın ne kadar santrifüj edildiği, ne kadar ışık reflektansı kullanıldığı yöntemleri ile, glukozamin seviyelerine bakıp DNA ölçümleri ile protein içeriği ile, oksijen tüketim oranı ve karbondioksit değişim oranı ile de ölçülebilir (Pandey, 2003).

2.1.8. KFF'de Biyoreaktör Tasarımı

Her fermentasyon sürecinde biyoreaktör (fermentör) biyolojik reaksiyonların gerçekleştiği mikroorganizmaların büyümesi ve aktivitesi için ortam sağlamaktadır. Her fermentasyon süreci için uygun biyoreaktör seçiminde; havalandırma, pH, karıştırma, sıcaklık gibi değişkenler vardır. Fermentasyon endüstrisinin gelişmesi ile birlikte sıvı kültür sürecinde bilgisayarla kontrol edilen sofistike otomasyon örneğinde olduğu gibi fermentör dizaynında da önemli adımlar atılmıştır. Fakat KFF için çok daha sınırlı fermentör tasarımları ve kontrol sistemleri geliştirilmiştir (Rodriguez Couto vd., 2004). KFF biyoreaktörlerinin nasıl tasarlandığını, nasıl işlediğini ve ölçek büyütüldüğünü anlama konusunda son yıllarda önemli gelişmeler olmuştur. Bu gelişmelerde kilit nokta; sistemle çeşitli fizikokimyasal ve biyokimyasal fenomenleri belirlemek için matematiksel modelleme tekniklerinin uygulanmasıdır (Mitchell vd., 2000; Pandey, 1991; Smits vd., 1999; Smits vd., 1998).

Sıvı kültürle karşılaştırıldığında KFF’de kullanılan katı ortam daha az su içermektedir. Ancak partiküller arasında önemli bir gaz fazı oluşmaktadır. Bu özellik önemlidir; çünkü havanın termal iletkenliği su ile karşılaştırıldığında çok zayıftır. Bununla birlikte KFF, kompozisyonu, mekanik direnci, porozitesi ve su tutma kapasitesi değişebilen çeşitli matrislerde işletilmektedir. Tüm bu faktörler parametreler açısından kontrol stratejisini ve reaktör tasarımı etkilemektedir. Sıvı kültür fermentasyonunda önemli bir zorluk olarak karşımıza çıkmaktadır: mikroorganizmalara oksijen transferi. Buna karşın KFF’de bu faktör bazı tasarımlar için sınırlayıcı bir faktör olabilirken ortaya çıkan problemler daha kompleksdir. İki önemli parametrenin kontrolünü etkilemektedir: sıcaklık ve katı ortamın su içeriği (Durand, 2003). Biyoreaktör tasarımı etkileyen diğer faktörler fungusun morfolojisi ve fungusun mekanik karıştırmaya direnci ve steril işlem gerekip gerekmediğidir (Durand, 2003). Genellikle laboratuvar ölçeğinde çalışabilen çeşitli reaktör tipleri az miktarda besiyortamı gerektirir, fakat ölçek büyütme daha komplikedir; ısının artması ve sistemin heterojenliği söz konusudur (Durand, 2003; Lonsane vd., 1992).

Büyük bir ölçekte endüstriyel atık suların biyolojik ağartımı ve renk giderimi gibi endüstriyel biyolojik süreçlere ligninolitik enzimlerin uygulanması etkili bir üretim sistemi gerektirir. Ticari açıdan değerli ürünlerin üretilmesi için KFF’nin potansiyeli olmasına rağmen bu teknik günümüzde az kullanılmaktadır (Robinson vd., 2001). Ticari KFF uygulamalarında başlıca engellerden biri büyük ölçekli reaktörlerin tasarımı ve işletilmesi ile ilgili bilgilerin azlığıdır (Ashley vd., 1999). Kütle transferi, ısının düşürülmesi gibi önemli kültür parametrelerini kontrol etmede karşılaşılan zorlukların tamamen üstesinden gelinebilmiş değildir (Cohen vd., 2002). KFF sürecinde paket yatak döner reaktör, gaz-katı akışkan yatak ve diğer karıştırmalı biyoreaktörler gibi çeşitli biyoreaktör tipleri kullanılmıştır (Mitchell vd., 2000). Ancak mevcut bilgi KFF süreci için ideal bir biyoreaktör oluşturacak düzeyde değildir. Günümüze dek KFF ile ilgili birkaç matematiksel model önerilmiştir. Bunlar iki kategoride incelenebilir: büyük ve küçük ölçekli modeller. Biyolojik fenomen ile kütle ve ısı transferini belirleyen doğru modeller, KFF biyoreaktör sürecini optimize etmeyi gerektirir (Gemli vd., 2002). Fakat biyoreaktör davranışının kompleksliği ve sürecin ölçümünün güçlüğü nedeni ile reaktör boyutunda üretim zordur (Pena-Lillo vd., 2000).

KFF için biyoreaktör tasarımı ile ilgili bir derleme Durand tarafından yayınlanmıştır (Durand, 2003). Durand, son 10 yılda işletilen başlıca tasarımlar ve her kategorideki reaktör için ölçek büyütme potansiyeli üzerinde yoğunlaşmıştır. Kütle ve ısı transferi, tasarım, ölçek büyütme, ölçme ve kontrol gibi mühendislik konularını da değerlendirmiştir (Bellon-Maurel vd., 2003, Mitchell vd., 2003, Raghavarao vd. 2003). Bununla birlikte, Banarjee ve Bhattacharyya (Banarjee ve Bhattacharyya, 2003).

Diğer yandan Mitchell ve arkadaşları (2004) mikrobiyal büyüme kinetiklerinin modellenmesinde son gelişmeleri ve gelecekte gereksinim duyulabilecek modellere bu tarz çalışmaların ve gelişmelerin modellenmesi ile gerçekleştirilen yaklaşımları tartışarak KFF fenomenini derlemiştir (Mitchell ve arkadaşları, 2004).

Avantajlarla birlikte KFF sürecini gerçekleştirmede biyoreaktör tasarımının zorluğu, daha önce önerilen tasarımları modifiye etme veya yeni biyoreaktör konfigürasyonlarını geliştirmenin gerekliliğini artırır. Bu biyoreaktör tasarımları, uzun süreli yüksek miktarda enzim üretimi olan sürekli işletilebilir olmalıdır. Katı substrat yatak, nemli katı ve fazsız partiküller arasından oluşmaktadır. KFF geleneksel olarak, partikülün yüzeyinde büyüeyebilen ve partiküller arası boşluk boyunca yatağın dibine kadar penetre olabilen filamentli funguslar için daha uygundur ve süreç aerobik olarak gerçekleştirilmektedir. Isı ve kütle transfer etkilerinin üstesinden gelmek için ve kolay difüze edilebilir ve ekstrakte edilebilir metabolitlerin üretimi için tasarlanacak uygun bir biyoreaktörde ısı takibi yapabiliyor olmalıdır. Tepsi ya da davul tipi fermentörler çalışılmış ve uzun yıllar kullanılmış olmasına rağmen son birkaç yıldır dikkatler paket yatak fermentörler üzerine çekilmiş durumdadır. Bu tip reaktörler daha ekonomiktir ve kontrol edilmesi, müdahale edilmesi daha kolaydır (Hardin vd., 2001; Lu vd., 1998; Carrasco vd., 1999; Lillo vd., 2001; Mitchell vd., 2000). Tepsi reaktör, havalandırması güçlendirilmeksizin ya da istenildiğinde manuel olarak dışardan hava verilmeksizin tasarlanmış karışmamış yataklardır. Ancak tepsi tasarımında çok da önemli gelişmeler mevcut değildir. Paket yataklar; havalandırılması güçlendirilmiş karıştırması olmayan yataklardır. Döner davul tipi reaktörler ise aralıklı karışımları olan dışardan güçlü havalandırması olmayan sürekli ya da yarı-sürekli modda çalışan reaktörlerdir. Bu

reaktörlerin değişik kombinasyonları kullanılmak sureti ile yatak güçlü bir havalandırma varlığında sürekli ya da kesikli biçimde karıştırılabilir (Mitchell vd., 2000). Kullanılan biyoreaktörler havalandırma tipine ya da işletilen karışık sisteme göre ayrılabilirler.

2.1.8.1. İmmersion biyoreaktörü

Yuvarlak kalıplı ceketli silindirik camdan oluşur. Telden yapılmış sepetler fungusun kolonize olduğu destek materyalle doldurulmuş ve biyoreaktöre yerleştirilmiştir. Reaktör pnömatik sistemle aşağı ve yukarı akmaktadır (Şekil 2.1-A) (Rodriguez Couto S., Sanroman, M.A.2005).

2.1.8.2. Paket yatak reaktör

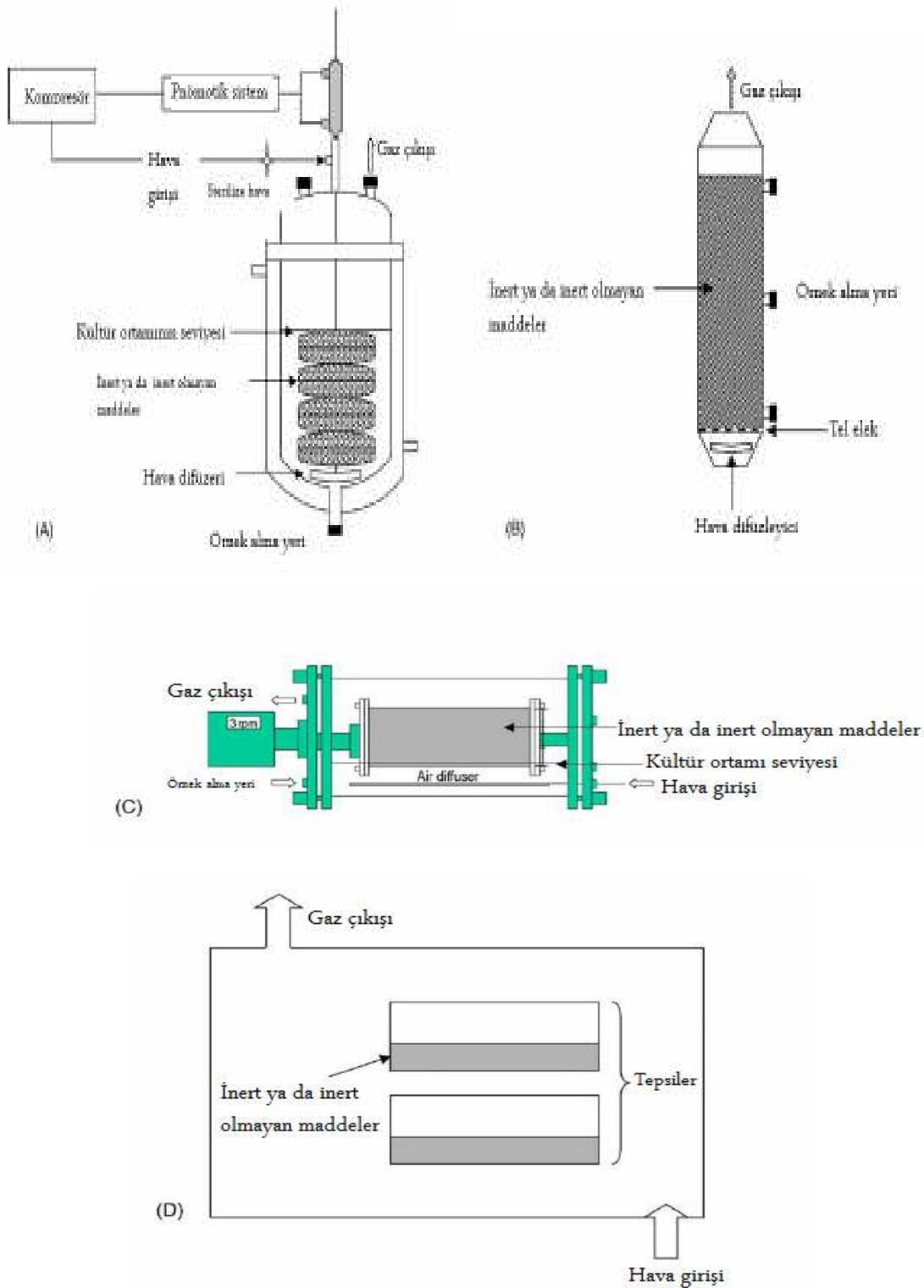
Biyolojik partikül sistemi (destek materyali-fungus) ile doldurulan ceketli cam bir kolondan oluşur. Nemli hava sürekli sağlanır (Şekil 2.1-B) (Rodriguez Couto S., Sanroman, M.A.2005).

2.1.8.3. Döner silindir biyoreaktör

Kültür ortamı içeren silindirik camın içinde yavaşça dönen (3 rpm'den daha az) tel bağlantılı silindirden oluşur. Tel bağlantılı silindir fungusla birlikte destek materyali içerir. Bu silindir dönünce hem taşıyıcı hem de fungus kültür ortamı ile doldurulur. Aynı zamanda bunlar, yeterli oksijen transferine olanak sağlayan reaktörün üst kısmından hava ile temastadır (Şekil 2.1-C) (Rodriguez Couto S., Sanroman, M.A.2005).

2.1.8.4. Tepsi biyoreaktör

Yaklaşık 1.5 veya 2 cm kalınlığında bir tabakaya biyopartikül sisteminin yerleştirildiği düz tepsilerden oluşur. Biyoreaktör pasif havalandırmalı sabit sıcaklıktaki bir odada tutulur (Şekil 2.1-D) (Rodriguez Couto S., Sanroman, M.A.2005).



Şekil 2. 1. KFF şartlarında işletilen ligninolitik enzimlerin üretiminde kullanılan 4 farklı biyoreaktör tipi: (A) immersion (nemli hava, mekanik karıştırma); (B) paket yatak (nemli hava, statik); (C) döner davul reaktör (nemli hava, mekanik karıştırma); (D) tepsi (pasif havalandırma, statik) (Rodriguez Couto S., Sanroman, M.A.2005).

2.2. Beyaz Çürükçül Funguslar

Beyaz çürükçül funguslar hem lignini hem de selülozu parçalamaktadır. Bu funguslar, kahverengi çürükçüllerin bıraktığı toz gibi kahverengi lekelerden tamamen farklı olarak beyaz ve daha çok lifli kalıntılar bırakır. (Michael vd., 2001) Hücre duvarını oluşturan selüloz ve hemiselüloz gibi polisakkaritler ligninle birlikte parçalanırlar ve odun ligninin uzaklaştırılmasından dolayı çok daha açık bir renk alır (Hasenekoğlu ve Yeşilyurt, 2001). Fakat bazıları önce lignini uzaklaştırır sonra selüloza atak yapar bu da seçici delignifikasyon olarak tanımlanır (Michael vd., 2001).

Beyaz çürükçül funguslar ortama bırakılan enzimlerle selülozu ayrıştırabilir. Bununla birlikte neredeyse tamamı polifenollerini okside eden enzimler üretmektedir. Bunların çoğu aktif bölgesinde bakır atomları içeren ve lakkaz denilen polifenol oksidaz grubuna aittir. Lignini parçalayan funguslar ekstraselüler enzimlerini kullanarak lignini depolimerize ve mineralize edebilme yeteneklerine göre karakterize edilir. Ekstraselüler enzimler olan lignin peroksidaz, mangan peroksidaz, H₂O₂ üreten enzimler ve lakkaz, ligninin parçalanması ile ilişkilidir. Beyaz çürükçül funguslarla yapılan çeşitli çalışmalar peroksidaz ve fenoloksidaz grubu enzimlerin türden türe farklılık göstermesine rağmen tüm ligninolitik funguslar tarafından salgılandığını göstermiştir. Lignini parçalayan funguslardan *Phanerochaete cryosporium* ve *Trametes versicolor* en çok çalışılmış olan funguslardır. Ligninolitik basidiomycete *Phanerochaete cryosporium*' un lignini oldukça iyi yıkabildiği bulunmuştur ve ligninin biyolojik olarak parçalanmasının fizyolojik gereksinimlerinin çalışılması için model organizma olarak kullanılmaktadır. *Phanerochaete cryosporium*' un ligninolitik enzimleri sadece 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. *Coriolus versicolor* ve *Polyporus versicolor* olarakta bilinmektedir. *Phanerochaete cryosporium*'a benzer şekilde *Trametes versicolor*'da lignin peroksidaz ve mangan peroksidaz enzimlerini salgılar. Birçok lakkaz mantarın ağaç üzerindeki büyümesi sırasında konstitutif (indükleyici bir maddeye ihtiyaç duymadan enzim salgılayan) olarak düşük konsantrasyondaki üretimi xylidine ve ferulik asit gibi

aromatik bileşiklerin ilave edilmesiyle yüksek konsantrasyonlara indüklenir. *Trametes versicolor* en çok çalışılmış lakkaz üreten fungustur ve lakkaz hakkındaki birçok bilgi bu çalışmalardan elde edilmiştir. (Dizge, 2007).

2.2.1. Beyaz Çürükçül Fungusların Kullanım Alanları

Beyaz çürükçül fungus olan *Trametes versicolor* ve *Phanerochaete chrysosporium*'un çeşitli biyoteknolojik uygulamalar için kullanımı, özellikle çevresel açıdan yaygındır. Beyaz çürükçül funguslar, organik moleküller üzerinde rol oynayan çeşitli enzimler üretirler. Özgül olmayan bu enzimler parçalanmaya karşı dirençli olan kirliticilerin yıkımında etkin olarak kullanılabilirler. Lignin kağıt endüstrisinde istenmeyen bir bileşiktir. Lignin bu endüstride pahalı ve çevreye zarar veren kimyasal bir işlemle uzaklaştırılmaktadır. Bu nedenle beyaz çürükçül funguslar kağıt endüstrisinde kullanım alanı bulmaktadırlar. Beyaz çürükçül funguslar, biyoteknolojide pestisit, trinitrotoluen (TNT) içeren atık su boşaltımları ve kağıt endüstrisi tarafından üretilen klorlanmış lignin artıkları gibi çeşitli karışık fenol içeren bileşikler parçalamakta da kullanılabilir. Bu fungusların lakkaz, lignin peroksidaz ve mangan peroksidaz gibi sekonder metabolitleri, polisiklik aromatikleri, poliklorlanmış bifenil ve diotoksinleri, DDT'yi ve birçok klorlu fenolik bileşikler parçalayabilir, tekstil boyalarının renk gideriminde kullanılabilir (Kirk ve arkadaşları, 1992). Beyaz çürükçül funguslar, fenol oksidazlar ve peroksidazlar dışında enzimlerde salgırlar.

Bu fungusların sahip oldukları enzimleri üçe ayırmak mümkündür;

- 1) İlki oduna atak yapan enzimlerdir. Bunlar karbonhidrat bileşenleri (selüloz, hemiselüloz) üzerinde hem de lignin üzerinde rol oynarlar.
- 2) İkinci grup, süperoksit dismutaz ve gliksidaz içerir. Bunlar birinci gruptaki enzimlerle birlikte çalışır ancak tek başına odunu etkilemezler.
- 3) Üçüncü grup ise glukoz 1-oksidad, piranoz 2-oksidad, sellobioz dehidrogenazı kapsar. Bu enzimlerin hepsi lignin yıkımında rol oynar.

2.3. Fenoloksidaz ve Peroksidaz Grubu Enzimler

2.3.1. Fenol Oksidaz Grubu Enzimler

Fenol oksidazlar oksidoredüktaz sınıfında yer alan enzimlerin oluşturduğu bir grup olup, fenolik bileşiklerin oksidasyon tepkimelerini katalizlerler. Tirozinaz ve lakkaz gibi iki temel enzim de bu grupta bulunmaktadır (Karam and Nicell, 1997). Her iki enzim de aktivite göstermek için moleküler oksijenin varlığına gereksinim duyar. Genel olarak polifenol oksidaz, fenolaz ya da kateşolaz olarak da adlandırılan tirozinaz (EC 1.14.18.1) ardışık iki tepkimeyi katalizler (Atlow vd., 1984). Bu tepkimeler sırasıyla; (1) monofenollerin moleküler oksijen varlığında orto difenollere hidroksilasyonları (kresolaz aktivite), (2) oluşan o-difenollerin o-kinonlar oluşturmak üzere dehidrojenasyonları (kateşolaz aktivite) şeklinde gerçekleşir. Ardışık tepkimelerin son ürünü olan kinonlar kendiliğinden basit filtrasyon yöntemleriyle atıksulardan kolayca uzaklaştırılabilecek suda çözünmeyen polimerik yapılara dönüşürler. Böylece en önemli çevre kirleticileri arasında bulunan fenolik bileşikler atıksulardan kolayca uzaklaştırılabilir duruma gelirler (Atlow vd., 1984; Sun vd., 1992; Wada vd., 1995).

Tirozinaz tipik olarak tirozin üzerine etkide bulunur ve reaksiyon sonucunda 3,4 dihidroksifenilalanin oluşur. Oluşan 3,4 dihidroksifenilalanin enzimin aktivitesi sonucu kinonlara oksitlenir. Kinonlardan oluşan heteroksiklik kırmızı bileşikler daha sonra melanine polimerize olurlar (Atlow vd., 1984). Atlow ve arkadaşları (1984), yaptıkları çalışmalarda, tirozinaz enzimi ile fenollerini başarılı bir şekilde pressipite ettiklerini ve atık sudan uzaklaştırdıklarını bildirmişlerdir (Atlow vd., 1984). Buna karşılık Wada ve arkadaşları (1995), yaptıkları çalışmalarda elde ettikleri sonuçların Atlow ve arkadaşlarının çalışmaları ile çeliştiğini ve kendi çalışmalarında, tirozinaz ile fenollerin polimerizasyonu sonucunda çökelek oluşmadığını, ancak renksiz olan solüsyonun koyu kahverengi bir renge dönüştüğünü gözlediklerini bildirmişlerdir (Wada vdl., 1995). Bu araştırmacılar çökelek oluşumu gözlemediklerinden, reaksiyon sonucu oluşan ürünleri adsorblamak amacıyla kitin ve kitosandan yararlanmışlardır. Tirozinaz tarafından fenollerin oksidasyonu ile oluşan kinonların ve diğer ara ürünlerin kitozan üzerine başarılı olarak adsorbe oldukları Sun ve Payne (1996) tarafından da bildirilmiştir.

2.3.1.1. Lakkaz (EC 1.10.3.2)

Lakkaz (EC 1.10.3.2) çok bakırlı mavi bir oksidazdır. Orto ve para-fenolleri oksitleme yeteneğindedir (Arcand and Archibald, 1991). Aromatik bileşiklerin hidroksil gruplarından bir proton ve elektronun ayrılması ile serbest radikal formlar oluşturur (Mason vd., 1955). Lakkazlar doğada geniş çaplı bir dağılım gösterirler ve pek çok bitki ve fungus türlerinde bulunurlar.

Yoshida ilk olarak 1883'te bir gözlem sonucunda lakkazları keşfetmiştir. Lakkazlar oksidaz olarak bilinen enzim ailesine üye olan çok çekirdekli bakır içeren proteinlerdir. En çok özellikle "mavi" oksidazlar ve polifenol oksidazlarda görülürler. Lakkaz, bir polimerizasyon reaksiyonunu başlatabilecek döngüde bir fenolik substratı okside edebilen polifenol oksidazdır. Çeşitli kaynaklardan elde edilen lakkaz kinetik özellikler, moleküler ağırlık ve glikolizilasyon derecelerine göre değişmektedirler (Jordan, 2005).

Lakkaz tipi fenol oksidazlar beyaz çürükçül *Basidiomycete Trametes versicolor* tarafından oluşturulan temel oksidatif enzimlerdir. *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkaz enzimi ile klorofenolik bileşiklerin direkt deklorinasyonu gerçekleştirilmiştir (Arcand and Archibald, 1991). Basidiomycetes grubu içerisinde yer alan beyaz çürükçül funguslardan olan *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkaz enzimi tetraguaiacol gibi çeşitli klorlu aromatiklerin klor gideriminde (deklorinasyon) kullanılmıştır. Klorlu organik maddede yaklaşık %85 oranında bir yıkım gözlenmiştir (Limura vd., 1996). Literatürde yer alan bir diğer çalışma ise fenolik bileşiklerin lakkaz enzimi aracılığıyla detoksifikasyonudur (Bollag vd., 1988).

Aktif haloenzim formu olarak lakkaz molekülü dimer veya tetradimer bir glikoproteindir. Çoğunlukla monomer başına üç redoks bölgesine bağlı dört bakır atomu içerir. Monomer sınıflarının molekül ağırlığı 50-100 kDa arasındadır. Önemli bir özelliği de yapısında bulunan % 10-45 oranındaki karbonhidrat kısmının enzime yüksek stabilite sağlamasıdır (Dizge, 2007).

Lakkazlar monomerik veya multimerik bakır içeren enzimlerdir ve bu enzimlerde bakır atomu önemli bir prostetik gruptur. Monomerik lakkaz moleküllerinin çoğu yapılarında 4 tane bakır atomu içerir ve yapıları UV/visible ile elektron paramanyetik rezonans (EPR) spektroskopisi teknikleri kullanılarak üç gruba ayrılmıştır:

Tip I bakır (T1); enzimin 600 nm' de gözlenebilen yoğun mavi renginden sorumludur ve EPR ile belirlenebilir. T1 bakırını çoğunlukla iki histidin aminoasitinin iki azotu ve sistein amino asitinin de kükürt grubu ile bağ yapmış durumdadır. Lakkaz enziminin karakteristik mavi renginden TipI bakırın, sistein (Cys) aminoasidinin kükürt (S) grubu ile yaptığı bağ sorumludur.

Tip II bakır (T2); renksizdir. Görünür bölgede çok zayıf absorpsiyon vermesine karşın EPR ile belirlenebilir,

Tip III bakır (T3); iki çekirdekli konformasyonda bir çift bakır atomu içerir. T3 bölgesinin iki bakırını yakın (near) UV'de 330 nm de verdiği zayıf absorpsiyon bandıyla karakterize edilirken EPR'ta sinyal vermeyen bir çift bakır atomu içerir (Dizge, 2007).

2.3.2. Peroksidaz Grubu Enzimler

Bazı basidiyomiset funguslar tarafından yüksek redoks potansiyeline sahip peroksidazlar ligninin parçalanmasında merkezi rol oynayan enzimlerdir (Kirk ve Cullen, 1998). Bryofitler hariç bitki biyokütlesi iki polisakkaritten (selüloz ve hemiselüloz) ve kompleks aromatik bir polimer olan ligninden oluşmaktadır (Fengel ve Wegener, 1984). Bitki hücre duvarında ligninin ana rolü hidrolitik enzimlerin faaliyetine karşı polisakkaritleri korumaktır. Bu aynı zamanda kök rijitliğine ve su taşınımına katkıda bulunur. Bu özellikler, üç farklı *p*-hidroksisinnamil alkolden türetilen üç alt birim içeren ligninin rekalsitrant olmasından ve yapısal kompleksliğinden ileri gelmektedir (Higuchi, 1997; Boerjan vd., 2003). Bu fenilpropanoid birimler çeşitli eter ve C-C bağları ile birbirine bağlıdır. Böylelikle lignin degradasyona dirençli bir hal alır.

Lignin polimerinin biyolojik parçalanması; bazı organizmaların enzimleri olan yüksek redoks potansiyelli peroksidazlar tarafından katalizlenen bir reaksiyonda ligninolitik basidiyomisetlerin sentezlediği hidrojen peroksitle aromatik birimlerin oksitlendiği “enzimatik yıkım” olarak gerçekleşmektedir (Kirk ve Farrell, 1987). Ligninolitik basidiyomisetler tarafından bozulan odunun açık renginden dolayı bu organizmalar beyaz çürükçül funguslar olarak bilinmektedir (Martinez vd., 2005). Buna karşın kahverengi çürükçül funguslar ligninolitik enzim üretmez. Ancak bunun yerine odunu lignince zengin kahverengi materyale dönüştürür. Peroksidazlara ilaveten lakkaz ve hidrojen peroksit üreten oksidazlar gibi diğer fungal enzimler de ligninin biyolojik parçalanmasında rol oynar. Ligninolitik enzimler, toprak ekosistemlerinde ligninoselülozik maddelerin doğal parçalanma süreci açısından önemlidir, bu, fotosentezle fikse edilen organik karbonun tekrardan çevrime girmesine olanak sağlar. Aynı zamanda selülozu kullanırken ligninin uzaklaştırılmasını gerektiren kağıt hamuru üretimi, biyoetanol üretimi gibi ligninoselülozik biyokütleyi kullanan birçok endüstriyel süreçte de lignin yıkımı kullanılmaktadır.

İki ligninolitik peroksidaz olan lignin peroksidaz (LiP) ve mangan peroksidaz (MnP), 1983-84'te beyaz çürükçül fungus olan *Phanerochaete chrysosporium*'da bulunmuş ve dimerik lignin model bileşiklerini oksidasyona uğratan yüksek redoks potansiyellerinden dolayı “ligninaz” olarak tanımlanmıştır (Tien ve Kirk, 1983; Glenn vd., 1983; Kuwahara vd., 1984). LiP, fenolik olmayan lignin birimlerini (polimerin % 90'ı) veya basit bileşik olan 3,4-dimetoksibenzil (veratril) alkolü parçalayabilir (Tien ve Kirk, 1983). Buna karşın fenolik lignin birimlerinin difüzlenebilir bir okside edici ajanı olarak rol oynayan oksalik asitle ve diğer organik asitlerle şelatlandığında MnP; Mn^{+3} üretmektedir (Glenn vd., 1986). Ligninolitik peroksidazların üçüncü tipi olan versatil peroksidaz (VP) yakın zamanda *Pleurotus* ve *Bjerkandera* türlerinde tanımlanmıştır (Martinez vd., 1996; Mester ve Field, 1998; Ruiz-Duenes vd., 1999).

Lignin parçalanmasında rol oynayan diğer hücre dışı enzimler hidrojen peroksit üreten enzimler ve misel ilişkili dehidrogenazlardır. Hidrojen peroksit üreten enzimlerden ilki aril alkol oksidaz olup (AAO) ilk kez *Pleurotus* ve *jerkandera*

türlerinde (Bourbonnais ve Paice, 1988; Muheim vd., 1990; Gullien vd., 1992) diğeri glioksal oksidaz olup *P.chryso sporium* ve diğ er basidiyomisetlerde bulunmuştur (Kertsen, 1990). Aril alkol dehidrogenazın (AAD) içinde bulunduğu fungal dehidrogenazlar lignin parçalanmasında da rol oynamaktadır (Gutierrez vd., 1994; Brock vd., 1995).

Ligninolitik enzimler (LiP, MnP ve VP) kasyon radikal oluşumuyla (fenolik birimlerden fenoksi radikallerin oluşumu) sonuçlanan tek elektron reaksiyonu aracılığıyla lignin polimerini oksidasyona uğratmaktadır (Kertsen vd., 1985). Oluşan aromatik kasyon radikalleri; eter ve C-C birimler arası bağlantıların ayrılması, demetoksilasyon ve aromatik halkanın ayrılması ile sonuçlanan enzimatik olmayan reaksiyonlarla değışir (Schoemaker, 1990; Martinez vd., 2005). Lignin birimlerinin yan zincirlerinin oksidatif parçalanmasından sonra açığa çıkan aromatik aldehitler, *Pleurotus* türlerinde peroksidazlar tarafından lignin parçalanması için gereksinim duyulan hidrojen peroksidin üretimi için substrat oluşturur. Bu ve diğ er beyaz çürükçül funguslarda, hem AAO hem de miselial AAD'yi kapsayan siklik redoks reaksiyonlarında sürekli olarak H₂O₂ oluşturulur (Gullien vd., 1994). Bazı oksidaz ve lakkazlar da odunun biyolojik parçalanmasında rol oynayan çok güçlü bir okside edici ajan olan hidroksil serbest radikal ürününü veren H₂O₂ ile reaksiyona giren ferrik demirin ferro demire indirgenmesine doğrudan ya da dolaylı katılmaktadır (Evans vd., 1994; Gullien vd., 2000; Hammel vd., 2002). Son olarak, lignin parçalanmasından gelen basit ayrılma ürünleri fungal hiflere girer ve hücreler arası katabolik yola entegre olur. Buna karşın ligninolitik peroksidazlar yüksek redoks potansiyelli bileşikleri parçalayabilen mediatörlere gereksinim duymazlar. Bu da lakkazlarla karşılaştırıldığında önemli bir avantaj sağlar. Bu nedenden dolayı farklı endüstriyel uygulamalarda lignini uzaklaştırmada veya yüksek redoks potansiyelli aromatik bileşikleri transforme etmede peroksidazların kullanımı tercih edilebilir. Bu enzimlerin yapısı ve fonksiyonu ile ilgili bilgiler son yıllarda açığa kavuşturulmuştur. Günümüzde mevcut bilgi, yönlendirilmiş mutagenез kullanarak işletimsel özellikleri (enzim stabilitesi gibi) ve katalitik özellikleri (substrat spesifitesi) değıştirmek için kullanılmaktadır (Yeung vd., 1997; Wilcox vd., 1998; Timofeevski vd., 1999; Reading ve Aust, 2000; Celik vd., 2001; Mester ve Tien, 2001; Feng vd., 2003). Bununla

birlikte gen füzyonu peroksidaz etkinliğini artırmak için selüloz bağlayan domainlerin açılmasına olanak sağlar (Levy vd., 2003) ya da işlevsel çok enzimli sistemlerin geliştirilmesine olanak tanır. Gen mühendisliği tekniklerinin ligninolitik enzimlerin endüstriyel olarak kullanılması yolunda karşılaşılan engellerin üstesinden gelmede de katkıda bulunması beklenmektedir. Hedef genin ekspresyon seviyesini arttırmaya (promoter ya da sinyal peptidi değiştirerek, gen ko-ekspresyonu ya da füzyonu) ilaveten protein mühendisliği ile yüksek redoks potansiyelli bileşikler okside edebilmeyi sağlayarak ticari bir peroksidaz üretme üzerine alternatif yaklaşımlar araştırılmaktadır. Yönlendirilmiş mutagenез, yönlendirilmiş evrim ve kimyasal stabilizasyon, modifiye biyokatalistler gibi diğer tekniklerin kombinasyonu kullanılarak lignin parçalayan funguslar tarafından üretilen yüksek redoks potansiyelli peroksidazların özelliklerinin endüstriyel boyuta taşınması gerçekleştirilebilecektir.

2.3.2.1. Mangan Peroksidaz (EC 1.11.13)

İlk kez 1983 yılında, *P. chrysosporim* beyaz çürükçül fungusunun ekstraselüler kültür sıvısında tespit edilmiştir (Kuwahara vd., 1983). MnP enzimi, moleküler ağırlığı 46.000 olan, bir prototrombin-IX prostetik grup taşıyan, glikoprotein yapısında bir moleküldür (Perez and Jeffries, 1993; Wariishi vd., 1989). Enzim, Mn^{2+} 'yi Mn^{3+} 'e oksitlemek yoluyla hareket etmektedir. Enzimin peroksidatif etkisi, H_2O_2 ve Mn^{2+} 'ye bağımlılık göstermektedir (Paszczynski vd., 1985). Bununla beraber, H_2O_2 yokluğunda enzim, NADPH, GSH, dithiothreitol (DTT) ve dihidroksimaleik asidi (oksijeni oksidant olarak kullanarak) oksitlemek yoluyla H_2O_2 üretir ve bu aktivite de Mn^{2+} 'ye bağımlılık göstermektedir. Enzim aktivitesi, α -hidroksi asitler (laktat, malat, tartarat ve sitrat) ve proteinlerce stimüle edilebilmektedir (Glenn vd. 1986). Ayrıca, kinetik ve spektroskopik çalışmalar, laktat gibi organik asitlerin Mn^{3+} 'ü şelatlama yoluyla, Mn^{3+} 'ün enzim-manganez kompleksinden daha kolay ayrılmasını ve bu şekilde çözünmesi çok zor olan lignin polimerine difüze olarak, ligninin çözünmesini kolaylaştırdığını göstermiştir. Buna ek olarak organik asitler, oldukça yüksek bir redoks potansiyeline (0.9-1.2 V) sahip olan Mn^{3+} 'ün, stabilizasyonunu da sağlamaktadırlar.

MnP, pek çok beyaz çürükçül fungusun, lignin yıkan enzim sisteminin bir parçası olarak, sekonder metabolizma sırasında sentezlenir (Wariishi vd., 1989).

Bütün organik substratların MnP tarafından oksidasyonunda, MnP tamamen Mn^{+2} 'ye bağımlıdır. Bir diğer metal iyonu Mn^{+2} 'nin yerine geçemez. MnP, Mn^{+2} 'yi Mn^{+3} 'e oksitler ve oluşan bu Mn^{+3} de, çeşitli organik bileşikleri oksitleyen nonspesifik bir oksidanttır. Daha önce yapılmış olan geçici-konum kinetik analizleri, Mn^{+2}/Mn^{+3} 'ün enzim bağlayıcı bir aktivatör olmaktan ziyade, bir redoks çifti gibi hareket ettiğini ortaya koymuştur (Gold and Glenn, 1988).

Mangan peroksidaz enziminin aktivitesi, üretim koşullarının ve özellikle üretim ortamındaki eser elementlerin varlığı ve miktarı ile sınırlanır. Bu eser elementlerden Mn^{+2}/NH_4^+ iyonlarının oransal miktarı sadece MnP enzimi için değil, diğer lignolitik enzimlerin sentezleri için de en önemli bir kriter teşkil eder. NH_4^+ iyonunun MnP enziminin sentezi için sınırlayıcı özellik göstermesine karşılık, Mn^{+2} iyonu enzim sentezini stimüle edici etki gösterir. Bonnarme ve Jeffries (1989) adlı araştırmacılar, Mn^{+2} iyonu içermeyen kültür ortamında, Lignin peroksidaz aktivesini hem inkübasyonun ilk günlerinde tespit ettiklerini hem de 2,5 kez daha fazla aktivite ölçtüklerini ancak MnP üretiminin çok düşük oranda kaldığını kaydetmişlerdir. Aynı çalışmada, 11–15 ppm (temel ortamda bulunan miktar) Mn^{+2} iyonu bulunan kültür ortamında, MnP aktivitesi 24 kez daha fazla ölçülmüştür (Bonnarme and Jeffries, 1989).

Inkübasyon ortamına veratril alkolün eklenmesinin, ligninaz kadar mangan peroksidazın da sentezini stimüle ettiği *Chrysosporium pruinosum*, *C. versicolor* ve *P. ostreatus* ile yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Rajarathnam vd., 1998).

Oksijenin, beyaz çürükçüllerin lignolitik sistemleri üzerine olan etkisi, oldukça geniş bir biçimde çalışılmıştır. Bu konuda bazı araştırmacıların düşünceleri, oksijenin lignolitik sistemin üzerindeki stimüle edici etkisinin, oksijenin öncelikle veratril alkol sentezini artırmasından kaynaklandığı yönündedir. *P. chrysosporium* beyaz çürükçül kültürasyonu yapılmış statik ve çalkalamalı kültür ortamlarına, periyodik veya devamlı

olarak oksijen baloncuklarının verilmesinin, MnP ve ligninaz sentezini stimüle edici etki sağladığı gösterilmiştir (Rajaratnam vd., 1998).

2.3.2.2. Lignin peroksidaz (EC 1.11.1.14)

Lignin peroksidaz veya diarilpropan oksijenaz, iki grup araştırmacı tarafından ilk kez 1983 yılında *Phanerochaete chrysosporium*'un kültür sıvısında keşfedilmiştir (Karam ve Nicell, 1997). Enzim, moleküler ağırlığı 42 kDa olan bir hemiproteindir. Ligninaz (LiP), genel olarak beyaz çürükçül funguslar tarafından, ekstrasellüler olarak mikroorganizmaların sekonder metabolizmaları sırasında sentezlenir. Lignin peroksidaz, oksidasyon, hidroksilasyon ve aromatik halkadaki bağların koparılması gibi reaksiyonları katalizler. Enzim ayrıca, doğal ve sentetik ligninin depolimerizasyonunu başarmasının yanı sıra, çeşitli rekalsitrant aromatik bileşikler ile pek çok polisiklik aromatik ve fenolik bileşiklerin minerilizasyonunu da yapabilmektedir (Elisashvili, 1993). Bütün bu reaksiyonlar, lignin bileşeninin enzim tarafından H₂O₂ aracılığı ile tek elektron oksidasyonu yoluyla oksitlenmesi ile gerçekleşmektedir (Karam ve Nicell, 1997). Ligninazın aktivite tayinlerinde, model bileşik olarak veratril alkol kullanılır. Veratril alkol bir sekonder metabolittir ve ligninaz tarafından veratril aldehite dönüştürülür (Leisola vd., 1987).

P. chrysosporium beyaz çürükçül fungusu ile yapılan çalışmalarda, lignolitik aktivitenin gözlenebilmesi için üreme ortamındaki besinsel faktörlerin çok önemli olduğu saptanmıştır (Leisola, 1987). ¹⁴C işaretli CO₂'in ayrılmasını temel alan yöntemlerin kullanıldığı çalışmalarda, azot miktarının çok az olduğu ortamlarda, *P. chrysosporium*'un lignolitik enzimlerinin aktivitelerini yüksek miktarlarda tespit edebilmişlerdir. Ayrıca karbon kaynağı miktarının ve çeşidinin de lignolitik enzimlerin üretiminde önemli rol oynadığı, farklı beyaz çürükçüllerle yapılan çalışmalarla da saptanmıştır (Michell vd., 1991). Jager ve arkadaşlarının yaptığı bir dizi deneyde, karıştırmalı ve çeşitli deterjanların (Tween 80 gibi) eklendiği kültürlerde lignolitik aktivitenin arttığını tespit etmişlerdir (Higuchi, 1987). Leisola ve arkadaşları (1987) veratril alkolün inkübasyon ortamına eklenmesi ile lignolitik aktivitenin indüklendiğini göstermişlerdir (Higuchi, 1987).

2.4. Katı Substrat Olarak Kullanılan Bitkisel Materyallerin Ana Bileşenleri

2.4.1. Selüloz

Selüloz bitkiler tarafından sentezlenen temel karbonhidrattır. Yılda 1×10^8 tonu kağıt endüstrisinde kullanılmak üzere yaklaşık $1,5 \times 10^8$ ton selüloz, ham fibriler materyal formunda tüketilmektedir. Bundan dolayıdır ki selülozik biyokütlelerin yıkımı, biyosfer içerisindeki karbon döngüsünün önemli bir bölümünü oluşturur. Aynı nedenden dolayı, etanola fermente edilebilecek şeker substratlarının üretimi gibi endüstriyel süreçler için selüloolitik enzimlerin kullanımı biyoteknologların ilgisini çekmektedir. Selüloz, bitki hücre duvarlarının temel bileşenidir ve oranı bitkiye bağlı olarak %35-40 (w/w) arasında değişmektedir. Selüloz aynı zamanda fungusların, bakterilerin alglerin ve bazı deniz hayvanlarının yapısında da bulunmaktadır. Selüloz, birbirlerine β -1,4 glukozidik bağlarla bağlanmış glukoz alt ünitelerinden oluşan lineer bir polimerdir.

Doğal şartlar altında glukoz birimlerinin %98 (w/w) 'den daha fazlası, moleküler enerji gereksinimlerini indirgeme biçimi olarak, *cis* konfigürasyonu gösterirler. Bunun sonucunda β -1,4 glukozidik bağlar, sellobiyozu selülozun tekrarlamalı birimleri haline getirecek biçimde, şeker birimlerini molekülün vertikal ekseni etrafında 180° döndürürler. Selülozun bileşke polimeri glukozun 3. karbonundaki hidroksit grubu ile komşu piranozid halkasının oksijen atomu arasındaki zincir içi hidrojen bağlarının sıkı bir biçimde tutulması şeklindedir. Aynı zamanda piranoz halkasının 2. ve 6. karbon pozisyonlarındaki hidroksil grupları arasında da hidrojen bağı oluşumu meydana gelebilmektedir. Selüloz molekülleri 10–15 molekülün bir araya gelmesi ile protofibriler (4nm eninde) şeklinde gruplar oluştururlar. Bunlar mikrofibrilleri (25 nm eninde) oluşturmak için yaklaşık 40 protofibrilden oluşan gruplar halinde bir araya gelirler. Mikrofibriller 3. karbondaki hidroksil grubu ve bitişik zincirlerdeki piranoz halkasındaki oksijen atomu ile birbirlerine tutunurlar. Bunlar daha sonra Van der Walls bağları ile güçlenirler.

Glukozun depo polimeri olan nişastanın aksine selülozun rolü sadece yapısaldır. Selülozun gerilmeye karşı yüksek dayanıklılığı, bitki hücrelerinin osmotik basınca karşı

dayanabilmelerini sağlar ve bitkilerin mekanik baskılara karşı direncinden sorumludur. Selülozun mekanik dayanıklılığı, özellikle tekstil fibrinlerinde açıkça görülmektedir (Kuru, 2003) .

2.4.2. Hemiselüloz

Hemiselülozların bileşenleri yapısal olarak selüloza benzer kompleks polisakkaritlerdir çünkü 1,4-bağlı β -D-piranosil (pyranosyl) birimlerinden oluşan bir ana hatta sahiptirler. Selüloz bir türden bir diğerine yapıda çok küçük değişiklik gösteren doğrusal bir homopolimerken, hemiselülozlar yüksek derecede dallı genellikle kristal olmayan heteropolisakkaritlerdir. Hemiselülozlarda bulunan şeker kalıntıları pentozları (D-xylose, L-arabinoz), heksozları (D-galaktoz, L-galaktoz, D-mannoz, L-rhamnoz, L-fukoz) ve üronik asitleri (D-glukuronik asit) içerir. Bu kalıntılar değişik şekilde asetilasyon veya metilasyon tarafından değişime uğratılabilir. Hemiselülozlar selülozdan daha bir düşük polimerizasyon derecesi (<200 şeker kalıntısı) gösterir (Glazer ve Nikaido, 2007).

2.4.2.1. Yumuşak Odun Hemiselülozları

Üç ana yumuşak odun selülozu vardır: glukomannan, galaktoglukomannan ve arabinaglukuronoksilan (arabinoglucuronoxylan). İki mannoz-içerikli polimer, içerilen galaktoz açısından büyük ölçüde farklılık gösterir. Yaklaşık şeker bileşimleri galaktoz:glukoz:mannoz) sırasıyla 0.1:1:4 ve 1:1:3 'dir. Ana hatları 1,4-bağlı β -D-glukopiranoz ve β -D-mannopiranoz birimlerinden oluşur. Burada, α -D-Galaktopurenaz birimleri, ana hatta 1,6 bağlarıyla bağlanmıştır. Ana hat şekerleri, 3-4 birime bir asetil grubu gelecek şekilde C-2 veya C-3'te asetile edilir (Glazer ve Nikaido, 2007).

2.4.2.2. Sert Odun Hemiselülozları

Sert odun hemiselülozu, çoğunluğu C-2 veya C-3'te asetile edilen 1,4-bağlı β -D-eksilopiranoz birimlerinden oluşan ana hatta sahip glukuroksilandır. Aşağı yukarı bir 4-

O-metil- α - β -glukuronik asidi C-2'de ana hatta bağlanmıştır, her bir 10 eksiloz biriminde mevcuttur (Glazer ve Nikaido, 2007).

2.4.3. Lignin

“Lignin” terimi Latince odun anlamına gelen “Lignum” kelimesinden türetilmiştir ve selülozdan sonra doğada doğal olarak ortaya çıkan ve en bol bulunan polimerdir. Tipik bir odun fibrininde lignin orta lamelde, piriler ve sekonder hücre duvarlarında bulunur. Proteinler, nükleik asitler ve polisakkaritler gibi doğal olarak ortaya çıkan diğer polimerlerden farklı olarak lignin, düzenli ve kesin bir kimyasal bileşime sahip değildir. Lignin, bitkilerde *p*-hidroksinamil akollerden bitki peroksidazları aracılığı ile gerçekleşen radikal eşleştirme ile sentezlenir. Bu rastgele eşleştirme aril gliserol- β -aril eter bifenil, difenileter, fenilkumaran ve 1,2-diaril propan gibi çeşitli kimyasal bağlar ile kompleks 3 boyutlu, fenolik bir polimerin oluşumu ile sonuçlanır.

Ligninin bu moleküler kompleksliliği onu lignoselüloz ile birlikte bitkisel materyallerin kimyasal ve biyolojik yıkımını sınırlayan inatçı bir doğal substrat yapar. Bununla birlikte lignin bitki dokularında çok önemli mekanik bir role sahip olmanın yanı sıra (örneğin; mekanik baskılara karşı direnç kazandırarak ve hücreler arasında bağlayıcı bir ajan rolü üstlenerek), bitki patojeni mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilecek mikrobiyal saldırıya karşı dirençlilik ve su geçirmez ksilem dokusunun oluşumunu da sağlamaktadır (Kuru, 2003).

2.5. KFF'de Ligninolitik Enzim Üretimi

Ligninolitik enzim üretimi sıvı fermentasyon tekniği ile üretildiği gibi katı substrat üzerinde büyütülmesi de mümkündür. Çizelge 2.6'da destek materyal olarak özellikleri tarımsal atıkların kullanılması suretiyle üretilen ligninolitik enzimleri listelemektedir. Fakat ürün iyileştirilmesinin substrat olarak kullanılan doğal maddelere göre daha az karmaşık olduğu inert destekler üzerinde KFF ile ligninolitik enzimlerin

üretimi ile ilgili çok az çalışma bildirilmiştir. Hücre dışı ürünler inert destekten çok daha kolay ekstrakte edilebilir bu ürünün saflığını da olumlu açıdan etkiler (Ooijkaas vd., 2000). Ancak ortamın maliyeti daha fazladır. Bu nedenle doğal destekler kullanıldığında ürün iyileştirme ve saflaştırma daha maliyetli olmasına rağmen bu desteklerden yararlanmak ürün maliyetini düşürdüğü gibi daha yüksek aktiviteler elde etmeyi de sağlamaktadır (Rodriguez vd., 2004). Spesifik bir hedefe geçerliliğini belirlemek amacı ile tüm süreçlerin ekonomik açıdan değerlendirilmesi yapılması gerekir. Bu sistem özellikle enzim gibi yüksek değerlikli ürünlerin üretiminde uygundur.

Çizelge 2.6. KFF tekniği ile ligninolitik enzimlerin üretimi (Rodriguez Couto ve Sanroman, 2005).

Destek	Mikroorganizma	Ligninolitik enzimler
Üzüm posası	<i>Polyporus</i> BH1, <i>Polyporus</i> BW1 <i>T. versicolor</i> <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Ligninaz MnP, lakkaz Lakkaz, MnP, LiP
Ballico tohumu	<i>Botryosphaeria</i> sp.	Lakkaz
Muz atığı	<i>P. ostreatus</i> , <i>Pleurotus sajor-caju</i>	Lakkaz, LiP
Kanola kökleri	<i>Cyathus olla</i>	Lakkaz, MnP
Mısır	<i>Lentinus edodes</i> strain CS-495 <i>Sporotrichum</i> sp. <i>Pleurotus pulmonaris</i>	Lakkaz Ligninolitik enzimler Lakkaz
Pamuk	<i>P. ostreatus</i> , <i>Pleurotus cystidiosus</i> , <i>P. pulmonarius</i> , <i>Pholiota nameko</i> <i>P. chrysosporium</i> , <i>Funalia trogii</i>	Lakkaz, HRP, MnP, SOD Lakkaz, peroksidaz, sellülaz
Üzüm	<i>Coriolus versicolor</i> , <i>Panus tigrinus</i> , <i>P. chrysosporium</i> <i>Daedaleopsis confragosa</i> , <i>Marasmius allaceus</i> , <i>P. Chrysosporium</i> <i>Aspergillus niger</i>	Ligninaz Lakkaz, MnP Glikozidaz
Zeytin kara suyu	<i>P. tigrinus</i>	Lakkaz, MnP

Çizelge 2.6. KFF tekniği ile üretilen ligninolitik enzimlerin üretimi (devamı)
(Rodriguez Couto ve Sanroman, 2005).

Destek	Mikroorganizma	Ligninolitik enzimler
Talaş	<i>Rigidoporus lignosus</i> <i>Coriolus hirsutus</i>	MnP Lakkaz, MnP
Buğday tanesi	<i>Pleurotus eryngii</i> , <i>P. pulmonarius</i>	MnP
Buğday kepeği	<i>P. pulmonarius</i> <i>P. ostreatus</i> , <i>P. chrysosporium</i> <i>Fomes sclerodermeus</i>	Lakkaz Lakkaz, MnP, LiP Lakkaz, MnP
Buğday samanı	<i>C. versicolor</i> , <i>P. tigrinus</i> , <i>P. chrysosporium</i> <i>P. radiata</i> <i>Pleurotus</i> sp. <i>P. chrysosporium</i> <i>Pleurotus</i> sp.2, <i>Trametes gallica</i> <i>P. chrysosporium</i> <i>P. ostreatus</i> <i>P. pulmonarius</i>	Ligninaz LiP, MnP, lakkaz Lakkaz, MnP LiP, MnP MnP, lakkaz LiP, MnP Lakkaz Lakkaz
Odun	<i>Bjerkandera</i> sp. strain BOS55 <i>Ceriporiopsis subvermispota</i> <i>P. ostreatus</i> , <i>P. chrysosporium</i>	LiP, MnP MnP, lakkaz, hemiselüloz, selülaz Lakkaz, MnP, LiP

3. YÖNTEM ve GEREÇLER

Çalışmanın genel olarak izlenen deneysel akış şeması Şekil 3.1.'de verilmiştir.

3.1. Çalışmalarda Kullanılan Funguslar

Çalışmalarda Bacidiomycetes sınıfından beyaz çürükçül funguslardan *Trametes versicolor* ATCC200881, *Phenorochoeta chrysosporium* ATCC34541, *Pleurotus sajor-caju* kullanılmıştır. Mikroorganizmalar Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Sn. Nazif Kolankaya'dan temin edilmiştir.

Çalışmada kullanılan funguslar, Malt extract agarda (MEA) 30 °C'de 7 gün inkübe edilmiştir. Fungus kültürleri +4 °C'de buzdolabında saklanmaktadır.

3.2. Çalışmada Kullanılacak Fungus Kültürlerinin Hazırlanması

Aktiflenen kültürlere 10 ml steril distile su eklenerek misel süspansiyonları hazırlanmıştır. Süspansiyonundan 4 ml alınarak 100 ml Potato Dekstrose Broth (PDB) içeren 250 ml'lik erlenlere ekim yapılmış ve 30°C'de 125 r.p.m.'de çalkalamalı etüvde 4 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kültür, düşük devirde homojenize (Heidolph) edilmiştir. Homojenizat aşılama amacı ile kullanılmıştır.

3.3. Çalışmada Kullanılan Katı Substratlar

Çalışmada katı substrat olarak zirai ve doğal atıklar olan talaş, mısır kepeği, yulaf, buğday kepeği, kurutulmuş çay, kanola, pirinç kepeği, soya fasulyesi kepeği, ayçiçeği kepeği, yonca, arpa kepeği, kurutulmuş damıtma çözünür daneleri (DDGS) ve *Pinus nigra* kozalağı kullanılmıştır. Bu substratlar besin içeriği, kolay erişilebilirliği ve maliyetinin düşük olması nedeniyle tercih edilmiştir.

3.4. Katı Substrat Ortamının Hazırlanması, Ekimi ve Üretimi

Erlenlerde (250 ml) 5 gram olacak şekilde talaş, mısır kepeği, yulaf, buğday kepeği, çay, kanola, pirinç kepeği, soya fasulyesi kepeği, ayçiçeği kepeği, DDGS ve *Pinus nigra* hazırlanmış ve 15 ml nemlendirme sıvıları her bir erlene eklenmiştir. İnkübasyon sürecinde substrat ile fungusun karışımının ve homojen bir büyüme olanağının sağlayabilmesi için erlenlerin içerisine cam çubuklar yerleştirilmiştir. Daha sonra 121°C’de 1 atm. basınç altında 20 dakika süresince otoklavda steril edilmiştir. Her bir erlen 3.2’de anlatıldığı gibi hazırlanan homojenize edilmiş hücre süspansiyonundan 4 ml alınarak ekimler yapılmış ve erlenler 30°C’de statik olarak 12 gün süresince inkübasyona bırakılmıştır. Çalışma en az 3 tekrarlı olacak şekilde yürütülmüştür. Her bir substrat için ekim yapılmaksızın oluşturulan kontrol gruplarında eş zamanlı olarak inkübasyona bırakılmıştır.

3.5. Katı Substrat Ortamından Enzim Ekstraksiyonu

İnkübasyonun sonunda her bir erlene 40 ml distile su eklenmiş ve katı substratlar içine tamamen penetre olmuş olan fungus cam çubuk ile karıştırılarak parçalanmıştır. Erlenler 30°C ve 200 r.p.m.’ de 1 saat süre ile çalkalamalı etüvde çalkalanmış ve 1 saat sonunda örnekler süzölmüştür. Süzöntü, 4000 r.p.m.’ de 15 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı, lakkaz, LiP ve MnP aktivitesi ölçümünde kullanılmıştır.

3.6. Enzim Aktivitelerinin Ölçülmesi

Lakkaz aktivitesi ölçümü için tepkime tüplerinde toplam hacim 5 ml olacak şekilde substrat olarak 4.9 ml ve 1 mM guaiakol içeren 50 mM Sodyum-Asetat tamponu (pH: 4.5) ve enzim kaynağı olarak 0.1 ml kültür süpernatantı kullanıldı. 37°C’de 15 dakika inkübasyondan sonra 465 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Sp70 2102UVP Spectrum UV-Vis spectrophotometer-Shimadzu 2550 UV-VU) absorbans ölçülmüştür (Taşpınar ve Kolankaya, 1998).

Çalışmada, 37°C, 1 dakika, 465 nm dalga boyunda absorbanası 0.1 birim artıran enzim aktivitesi 1 Unit aktivite olarak tanımlanmıştır.

Mangan peroksidaz aktivitesi ölçümü için tepkime tüplerinde toplam hacim 3 ml olacak şekilde 0,25 M'lık sodyum tartarat tamponundan (pH4.5) 1.8 ml, substrat olarak 20 mM 2,6 DMP 0.15ml, 0,15 ml 20 mM MnSO₄, enzim süpernatantından 0.6 ml ve reaksiyonun başlatılması için 4 mM H₂O₂'den 0.3 ml deney tüpüne ilave edilmiş ve sonra spektrofotometrede 469 nm'de 10 sn aralıklarla 3 dk boyunca 25°C'de ölçümler alınmıştır. (Erden vd., 2009)

Çalışmada 25°C'de, bir dakikada 1 mmol dimetoksifenolü (2,6-DMP) okside eden enzim miktarı 1 Unit aktivite olarak tanımlanmıştır.

Lignin peroksidaz aktivitesi ölçümü için tepkime tüplerinde toplam hacim 3ml olacak şekilde 100 mM'lık sodyum tartarat tamponundan (pH 2.5) 2.3 ml substrat olarak 200 mM veratril alkolden 0.3 ml, enzim süpernatantından 0.1 ml ve reaksiyonun başlatılması için 4 mM H₂O₂ çözeltisinden 0.3 ml deney tüpüne ilave edilmiş ve sonra spektrofotometrede 310 nm de 10 sn aralıklarla 3 dk boyunca 37 °C'de ölçümler alınmıştır. (Erden vd., 2009)

Çalışmada 37 °C'de, bir dakikada 1 µmol veratril alkolü veratril aldehite dönüştüren enzim miktarı 1 Unit aktivite olarak tanımlanmıştır.

3.7. Günlük Enzim Aktivitesinin Taranması

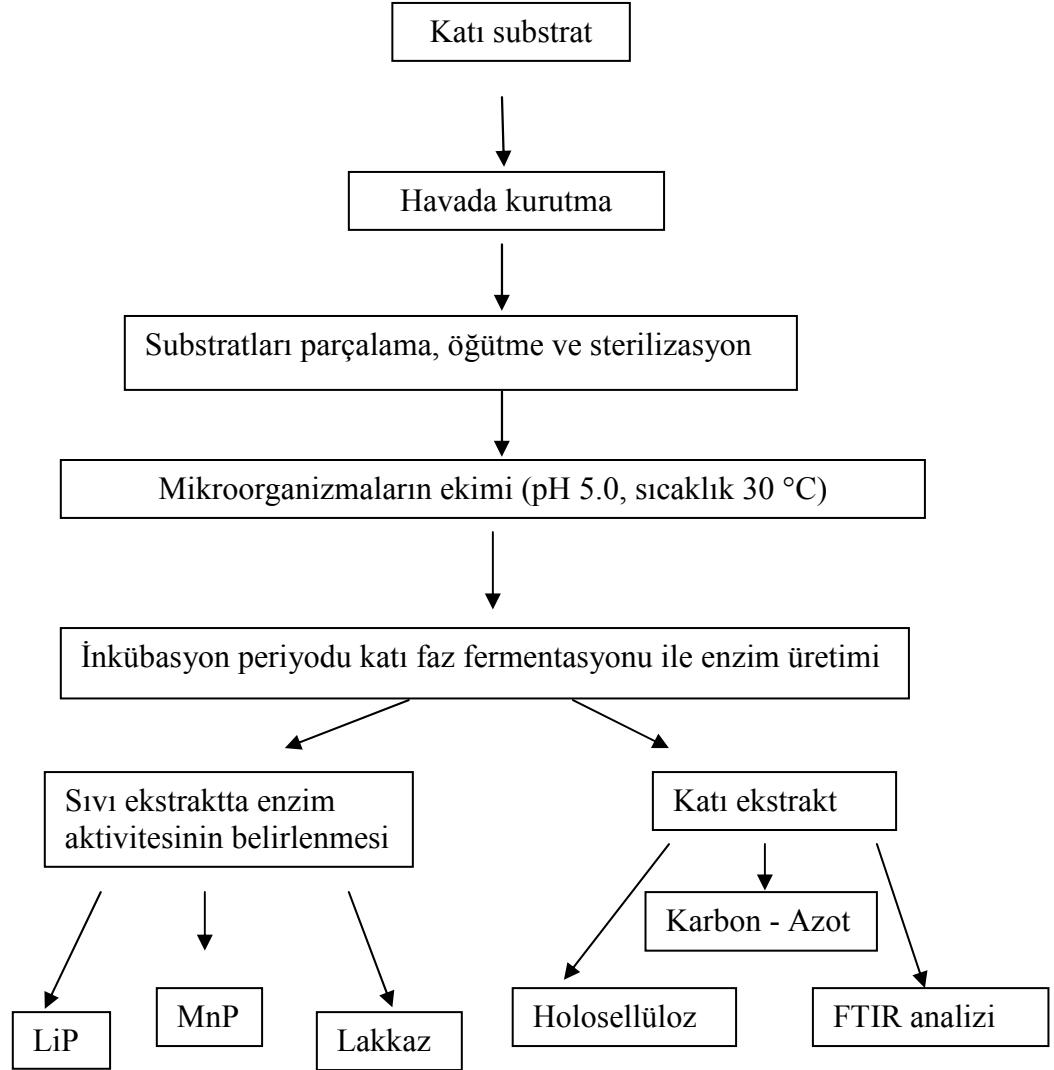
Çalışmada en iyi katı substrat, fungus ve enzim seçildikten sonra periyodik olarak 3, 6, 9, 12, 15 ve 21. günlerde örnekler alınarak 3.5'de anlatıldığı gibi enzim ekstraksiyonu yapıp 3.6'da anlatıldığı üzere enzim aktiviteleri belirlenmiştir.

3.8. Seçilen Substratın Karbon, Azot ve Holoselüloz Miktar Tayini ve Ağırlık Ölçümü ile İnkübasyon Sürecindeki Değişimin Belirlenmesi

Denenen substratlar arasında en fazla enzim üretimine olanak sağlaması nedeniyle yonca seçilmiştir. *Trametes versicolor* fungal kültürü ile substratın yonca kullanıldığında en yüksek enzim aktivitesine lakkaz enzimi ile ulaşılmıştır. Katı substrat fermentasyonu öncesi yonca örneklerinin ve yoncayı substrat olarak kullanan *T. versicolor* 15 günlük inkübasyonu sonunda karbon, azot ve holoselüloz miktar tayinleri yapılmıştır. Holoselüloz tayinleri Çevre ve Orman Bakanlığı Çevre Referans Laboratuvarı'nda (Ankara) yapılmıştır. Çalışmada yapılan azot ve karbon tayinleri ise Çevre ve Orman Bakanlığı, Orman, Toprak ve Ekoloji Araştırmaları Enstitüsü'nde (Eskişehir) yapılmıştır. Katı substrat öncesi ve sonrası yonca örneklerinde ağırlık ölçümleri de yapılmıştır.

3.9. Katı Substrat Fermentasyonu Öncesi ve Sonrası Katı Substrat Olarak Seçilen Yoncanın FT-IR Analizi

Katı substrat fermentasyonu öncesi ve sonrası yonca örneklerinin FT-IR analizleri yapılmıştır. Yonca örnekleri ve KBr 3 mg/500 mg oranında karıştırılıp hazırlanan tabletlerin analizi Perkin Elmer FT-IR 100 spektrometer da gerçekleştirilmiştir. FTIR analizleri Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Fizik Bölümü'nde yapılmıştır.

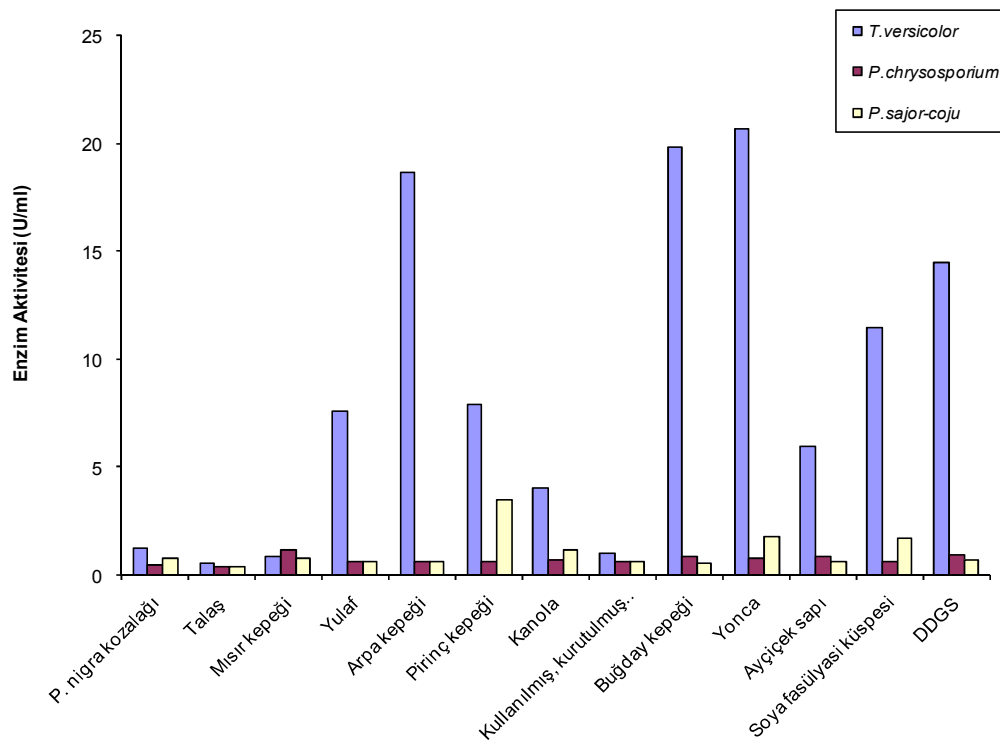


Şekil 3.1. Deneysel akış şeması

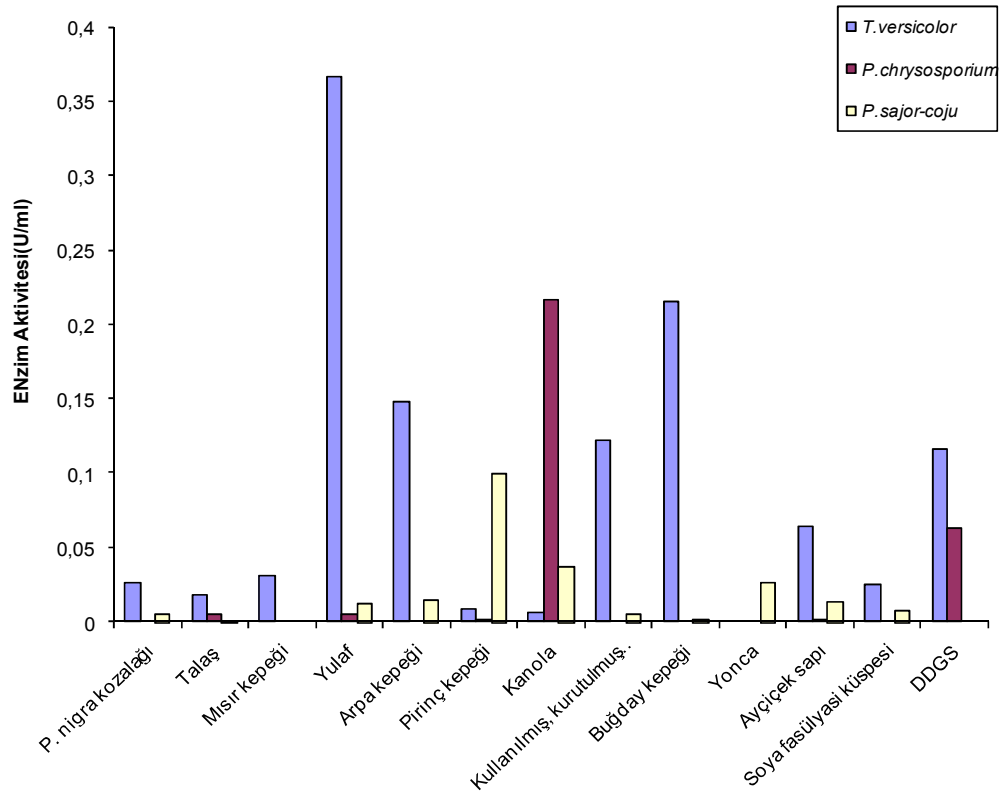
4. BULGULAR

4.1. Beyaz Çürükçül Funguslarla Farklı Katı Substratlar Kullanılarak Lakkaz, MnP ve LiP Üretimi

Farklı katı substratlarda üretilen beyaz çürükçül fungusların enzim aktiviteleri açısından değerlendirilmesinde Şekil 4.1'de de görüldüğü gibi katı substrat olarak yonca, mikroorganizma olarak *T.versicolor* ve enzim olarak da lakkaz enzimi (22.36 U/ml) seçilmiştir. En iyi MnP aktivitesi *T.versicolor*'da yulafın substrat olarak kullanıldığı ortamda elde edilmiştir (0.367 U/ml) (Şekil 4.2). Çalışmada LiP aktivitesine rastlanmamıştır.



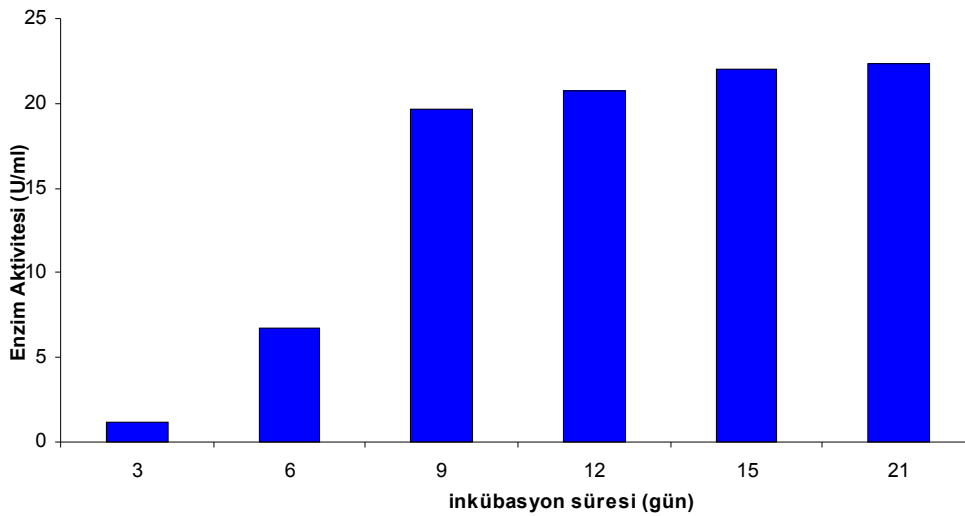
Şekil 4.1. Farklı substratlar üzerinde büyütülen *T.versicolor*, *P.chrysosporium* ve *P.ostreatus*'dan elde edilen lakkaz aktivite değerleri açısından karşılaştırılması (Çalışma koşulları: 30 °C, 5 gram katı substrat 4 ml inokulum, statik koşullarda 12 günlük inkübasyon)



Şekil 4.2. Farklı substratlar üzerinde büyütülen *T.versicolor*, *P.chrysosporium* ve *P.ostreatus*'dan elde edilen mangan peroksidazın aktivite değerleri açısından karşılaştırılması (Çalışma koşulları: 30 °C, 5 gram katı substrat 4 ml inokulum, statik koşullarda 12 günlük inkübasyon)

4.2. Günlük Lakkaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Katı substrat olarak seçilen yonca üzerinde büyütülen *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkaz aktivitesinin inkübasyon sürecinde değişiminin takibi ile en iyi aktivitenin 15. günde olduğu Şekil 4.3'de görülmektedir.



Şekil 4.3. Yonca üzerinde büyütülen *T.versicolor*'dan elde edilen lakkazın günlük aktivitesinin değişimi. (Çalışma koşulları: 30 °C, 5 gram katı substrat 4 ml inokulum, statik koşullarda 21 günlük inkübasyon).

4.3. Katı Substrat Fermentasyonu Öncesi ve Sonrası Katı Substrat Olarak Seçilen Yoncanın Karbon, Azot ve Holoselüloz Miktar Değişimi ve Ağırlık Kaybı

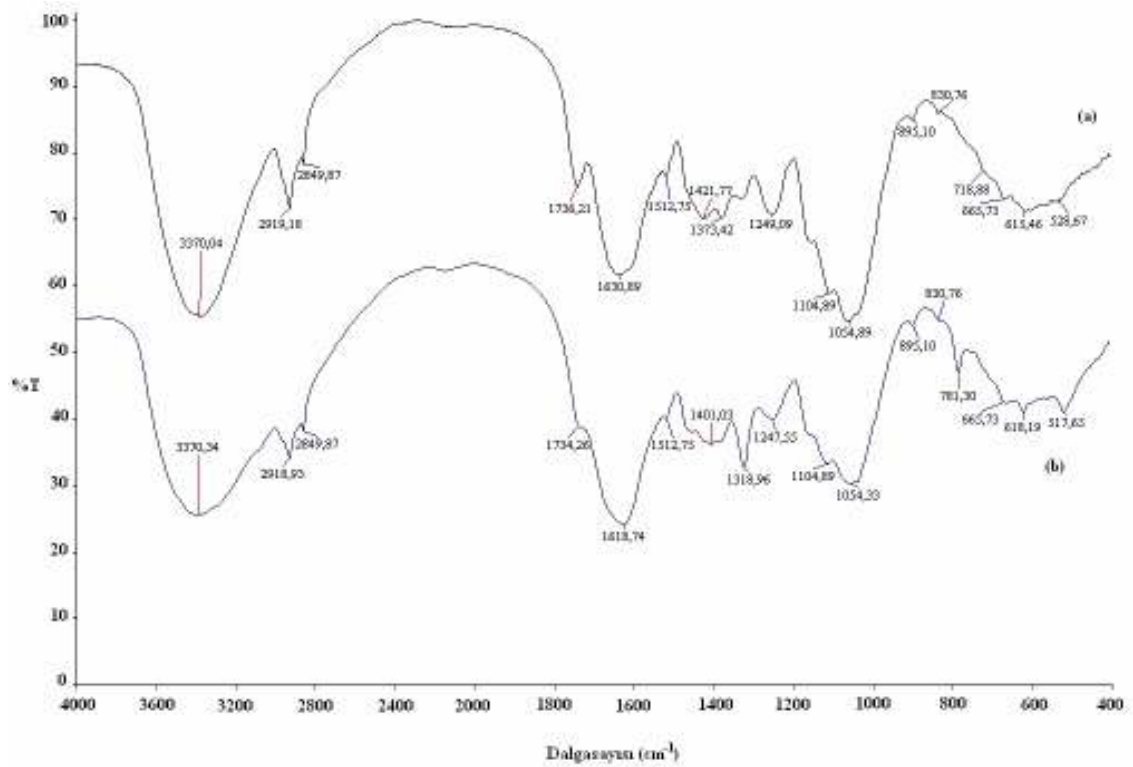
Yapılan çalışmalar sonunda katı substrat fermentasyonu öncesi ve sonrası yonca örneklerinin karbon, azot ve selüloz miktar tayinleri ve ağırlık kaybı sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. KFF öncesi ve sonrası yoncanın holoselüloz ve karbon içerikleri ve ağırlık kaybı.

	Holoselüloz miktarı (%)	Karbon İçeriği (%)	Ağırlık Kaybı (g)	Azot (%)
KFF öncesi	73,15	44,007	5,00	3,022
KFF sonrası	57,37	39,821	4,393*	3,046

4.4. Katı Substrat Fermentasyonu Öncesi ve Sonrası Katı Substrat Olarak Seçilen Yoncanın FT-IR Analiz Değerlendirilmesi

Katı substrat fermentasyonu öncesi ve sonrası yonca örneklerinin FT-IR sonuçları Şekil 4.4’de verilmiştir.



Şekil 4.4. Katı substrat fermentasyonu öncesi ve sonrası katı substrat olarak seçilen yoncanın FT-IR analiz değerlendirilmesi (a) KFF öncesi yonca örneği, (b) KFF sonrası yonca örneği.

5. TARTIŞMA

Beyaz çürükçül fungusların doğal habitatlarına çok benzer yapıda olmaları nedeniyle ligninoseülözük maddeler üzerinde gerçekleştirilen katı faz fermentasyonu ile elde edilen ürün çeşitliliği her geçen gün artmaktadır. Beyaz çürükçül fungusların çevresel uygulamalar açısından önemli üstünlüklere sahip olan fenol oksidaz ve peroksidaz grubu enzimlerinin üretimleri için de katı faz fermentasyonları oldukça kullanışlıdır. Bu fungusların ürettiği ligninolitik enzimler çevre şartları tarafından indüklenbilir ya da baskılanabilir özelliktedir (Fenice vd., 2003). Katı faz fermentasyonları; daha yüksek fermentasyon verimliliği, elde edilen ürünün yüksek konsantrasyona sahip olması, yüksek ürün stabilitesi, daha düşük katabolit represyon, suda çözünemeyen substratların veya çeşitli fungusların karışık kültürasyonu için özelleştirilmiş mikroorganizma kültürasyonu, daha düşük su aktivitesinden dolayı sterilizasyona harcanan maliyetin düşmesi, gibi birtakım üstünlüklere sahiptir.

Bu çalışmada, buğday kepeği, arpa kepeği, *P.nigra* kozalağı, talaş, mısır kepeği, yulaf, pirinç kepeği, kanola, kurutulmuş çay, yonca, ayçiçeği sapı, soya fasulyesi küspesi, DDGS gibi çeşitli substratlar; *T.versicolor*, *P.chrysosporium* ve *P.sajor-caju* mikroorganizmaları kullanılarak lakkaz, LiP ve MnP gibi ligninolitik enzimlerin üretiminde büyüme ortamı olarak değerlendirilmiştir. Substratlardan yonca üzerinde büyütülen *T.versicolor* lakkazının diğer substratlar üzerinde büyütülen mikroorganizma enzimlerine nazaran en yüksek aktiviteye (22.36 U/ml) sahip olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, buğday kepeği substratında büyütülen *T.versicolor* lakkaz aktivitesi 19.77 U/ml olarak belirlenirken aynı fungus arpa kepeği üzerinde büyütüldüğünde lakkaz aktivitesi 18.66 U/ml olarak bulunmuştur.

Bu çalışma, MnP aktivitesi açısından değerlendirilecek olursa yulaf üzerinde büyütülen *T.versicolor* en yüksek aktiviteye (0.367 U/l) sahipken kanola üzerinde büyütülen *P.chrysosporium* aktivitesi 0.216 U/l bulunmuştur. Bunun yanı sıra pirinç kepeği üzerinde büyütülen *P.sajor-caju* MnP aktivitesi de 0.1 U/l olarak belirlenmiştir.

Katı ortam üzerinde büyütülen fungusların ligninolitik enzim üretimi açısından değerlendirilmesi üzerine yapılan bu tez çalışmasında denenen substratlar ile LiP aktivitesi belirlenememiştir.

Lakkaz ve MnP beyaz çürükçül fungusların ligninolitik enzimleri arasında en yaygın bulunanlarıdır (Nerud ve Misurcova, 1996). Farklı beyaz çürükçül fungus suşları ile yapılan çalışmalarda lakkaz ve MnP aktivitelerinin diğer enzimlere nazaran dominant olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda lakkaz ve MnP enzim aktiviteleri belirlenmiş olup lakkaz aktivitesinin genellikle MnP aktivitesine nazaran daha yüksek bulunduğu bildirilmiştir (Vyas vd., 1994; Hofrichter vd., 1999; Tekere vd., 2001; Arora vd., 2002).

Rosales ve arkadaşları (2002) lakkaz üretimi için *Trametes hirsuta*'yı elma, portakal ve patates kabuğu gibi farklı katı substratlar üzerinde büyütmüş ve bunlar arasından en iyi katı substratın patates kabuğu olduğunu bulunmuş ve 8 günde 5 U/l aktivite elde etmişlerdir. Rodriquez Couto ve arkadaşları (2003) *T. versicolor* ile yaptıkları bir çalışmada katı substrat olarak arpa samanı kullanılmış ve üretimin 18. gününde 3500 U/l lakkaz aktivitesi rapor edilmiştir. Kumar ve arkadaşlarının (2006) yaptıkları çalışmaya göre katı faz fermentasyonun kültür sıvısında MnP'nin en yüksek aktivitesini pH 5.0'de, 37°C'de ve 1.2 U/l olarak saptanmıştır. Mazumder ve arkadaşları da (2009) destek maddesi olarak poliüretan köpüğü ve patates dekstroz maya özütü ortamı kullanarak *P.ostreatus* lakkazını katı faz fermentasyon tekniği ile üretmişler ve en yüksek aktivite olarak 30 U/ml elde etmişlerdir. Dinis ve arkadaşları (2009) *T. versicolor*, *Bjerkandera adusta*, *Ganoderma applanatum* and *Phlebia rufa* funguslarını buğday kepeği üzerinde büyüterek enzim üretimi amaçlamış, farklı sürelerde inkübasyon periyoduna tabi tutmuş ve en yüksek aktiviteleri de 28 gün sonunda *P.rufa* MnP aktivitesi 2.95 U/l, *B.adusta* MnP aktivitesi 1.95 U/l elde etmişlerdir. Rosales ve arkadaşları (2007) katı faz şartlarında lakkaz üretimini etkileyen çeşitli değişkenleri optimize etmek suretiyle yüksek lakkaz aktivitesi elde etmeyi hedefledikleri çalışmada 2.5 g öğütülmüş portakal kabuğu ve 5 mM bakır sülfatı substrat olarak kullanmak suretiyle en iyi aktiviteyi (0.0317 U/ml) elde etmişlerdir. Gomez ve arkadaşları (2005) beyaz çürükçül fungus olan *Coriolopsis rigida*'yı katı fazda büyütmüş ve katı faz olarak da lignoselülozik atık olan fındık kabuğu ve arpa kepeği kullanarak lakkaz enzimi

üretmişlerdir. En yüksek lakkaz aktivitesi (3.105 nkat/L) fungus arpa kepeği üzerinde büyütüldüğü zaman elde edilmiştir. Elde edilen bu aktivite fındikkabuğundan olan katı substratta yetiştirilen fungusun enziminin aktivitesine oranla 25 kat daha yüksek bulunmuştur. Aradaki bu fark, substratların kimyasal kompozisyonuna bağlı olabilir. Arpa kepeği holoselüloz (%55.7), lignin (%21.4) içeriğine sahipken fındık kabuğu holoselüloz (%48.5) ve lignin (%59.4) miktarına sahiptir. Bu durum Srinivasan ve arkadaşları (1995) ile Lorenzo ve arkadaşlarını (2002) yaptıkları çalışmaların sonuçları ile uyumluluk göstermektedir. Bu çalışmalarda da selüloz açısından zengin substratların yüksek lakkaz üretiminde kullanılabileceği sonucu çıkmaktadır. Ancak Moldes ve arkadaşlarının (2003) yaptıkları çalışmada yüksek lignin içeriğine sahip destek materyal kullanıldığında katı faz fermentasyonu ile büyütülen *Trametes hirsuta*'dan elde edilen lakkaz aktivitesinin diğer substratlara nazaran daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu da enzim üretiminin üretilen fungusun büyütüldüğü katı substrat tipine bağlı olduğu kadar kullanılan mikroorganizmanın cinsine de bağlı olduğunu göstermiştir.

Sunulan tez çalışmasında elde edilen lakkaz aktiviteleri incelendiğinde, yukarıda sıralanan literatürdeki değerler ile kıyaslanabilir bir aktivite elde edildiği söylenebilir. Denenen 13 katı substrat arasında en yüksek lakkaz aktivite değerine, substrat olarak yonca kullanıldığında ulaşılmıştır. Yoncanın lakkaz üretimi açısından önemli olabilecek selüloz içeriği ile karbon ve azot miktarları fermentasyon öncesi ve sonrası ölçülerek değişimler belirlenmiştir. Fermentasyon öncesi yoncada % 73.15 holoselüloz bulunurken, fermentasyon sonrasında bu değer % 57.37 seviyesine düşmüştür. Benzer olarak karbon ve azot miktarlarında da düşüşler gözlenmiştir (Çizelge 4.1). Katı faz fermentasyonlarında takip edilen bir diğer parametre de kullanılan substratın ağırlık kaybıdır. Fermentasyondan önce ve sonra yapılan ağırlık ölçümlerinde %12.14'lük bir ağırlık kaybının olduğu görülmüştür. Burada belirtilen özelliklerdeki değişimlerin yanı sıra kullanılan substratların ferulik, vanilik, *p*-kumarik asit gibi etkin lakkaz indükleyicilerini de içermesi enzim aktivitesinin artmasında etkili olabileceği bildirilmiştir (De Souza ve arkadaşları, 2006).

PDF Eraser Free

Diğer yandan katı substratın sahip olduğu pürüzsüz olması, porozite ve partikül boyutu gibi fiziksel özelliklerin de enzim üretimini etkileyebileceği bildirilmektedir (Pandey, 1992).

Beyaz çürükçül fungusların çoğu lignini parçalayan enzim olan LiP enziminden yoksundur (Hatakka, 1994). Bu fungusların ligninolitik sistemlerindeki anahtar enzim lakkazdır. Ayrıca odun ve bitki ekstraktları lakkaz aracı maddeler içerebilir. Ardon ve arkadaşlarının (1998) yaptıkları çalışmada pamuk sapları *P.ostreatus* lakkazı tarafından okside edilmiştir.

Stepanova ve arkadaşlarının (2003) yaptıkları bir çalışmada yulaf kepeği içeren sıvı ortam ve katı ortam üzerinde büyütülen *Trametes versicolor*, *Coriolus zonatus* ve *Cerrena maxima* beyaz çürükçül fungusları ile *Mycelia sterilia*, *Trichoderma reesei* filamentli fungusları karbon kaynağı olarak yulaf kepeğini kullanmışlardır. Katı fazda yulaf kepeği kullanılarak yapılan fermentasyonda beyaz çürükçül funguslar 83 günde selülozun %75'ini ve ligninin %55'ini tüketmiştir. Yulaf kepeğini tüketen fungus, yulaf kepeğinin dekompozisyonunu ve humifikasyonunu hızlandırarak büyüebilmiştir.

Katı faz fermentasyonda substrat ile fungal miselyum arasında doğrudan bir temasın olması önemlidir. Bu nedenle fungusun substrata kısa sürede difüze olabilmesi ve çapraz bağlı ve kompleks lignin yapısına penetre olabilmesi substrat ile miseller arasındaki doğrudan temasa bağlıdır.

Bu çalışma ile elde edilen sonuçlara göre en iyi organizma *T.versicolor*, en iyi aktivite gösteren enzim lakkaz ve en iyi substrat da yonca seçilmiş ve bundan sonra günlük aktivite deneylerine geçilmiştir.

Katı substrat tarama deneylerinden sonra seçilen organizma olan *T.versicolor*'u en iyi substrat olarak bulunan yonca üzerinde büyüterek lakkaz üretmesi sağlanmış ve bu 21 gün devam ettirilmiştir. Günlük aktivite tarama sonucunda en iyi aktiviteye 15. günde ulaşıldığı saptanmıştır.

Ligninolitik enzim üreticisi olan fungusun büyütüldüğü katı substrat kültür ortamının C/N oranı önemlidir. Bazı organizmalar için yüksek miktarda azot lakkaz üretimini arttırırken (Gianfreda ve arkadaşları, 1998) bazı organizmalar için de azotun sınırlandığı ortamlarda lakkaz üretimi indüklenmektedir (Herpoel ve arkadaşları, 2000; Pointing ve Vrijmoed, 2000). Tychanowicz ve arkadaşlarının (2004) yaptıkları çalışmada en yüksek lakkaz aktivitesi C/N oranı 30:1 olan kültür ortamı kullanıldığında elde edilmiştir. Yoncanın C/N oranı yaklaşık olarak 15:1 bulunmuştur. Katı substrata fermentasyon öncesi ve sonrası yapılan karbon ve azot miktar tayinine göre karbon miktarının inkübasyon sonrası azaldığı, azot miktarının ise değişiklik göstermediği bulunmuştur. Bu sonuç da mikroorganizmanın katı substrat olan yoncayı karbon kaynağı olarak kullandığını kanıtlamaktadır.

Fermentasyon sürecinde katı substrat olarak seçilen yoncanın bileşenlerinde meydana gelen değişimleri görebilmek için, fermentasyon öncesi ve sonrasında FTIR analizleri yapılmıştır. FTIR analizinde su absorpsiyonunun gözleendiği bölge olan 3000-3700 cm^{-1} ve değişimlerin gözlenebileceği farklı fonksiyonel gruplarda -1800 cm^{-1} ve 900-1550 cm^{-1} elde edilen spektrumlardaki değişimler Şekil 4.4.1.'de verilmiştir. Ligninin FTIR spektrum bölgesi 1800 cm^{-1} - 4000 cm^{-1} aralığındadır. Bu alanda diğer hidroksil ya da alifatik CH grupları gözlenmemiştir. Yaklaşık 3400 cm^{-1} de görülen absorpsiyon suyun -OH grubundan ya da alifatik ve aromatik gruplardan da gelebilir. 1618 cm^{-1} bölgesinde pek çok band görülmekte ve ayrıca, 1630 cm^{-1} değer değişimi ketonlardaki karbonil grupları ya da karboksil gruplarından gelmektedir. Elde edilen veriler lignin yapısında bir değişimin olduğunu göstermektedir.

Bazı ligninoselülozik atıkların kullanıldığı çalışmalarda basidiyomisetlerde enzim üretimi uyarılmıştır (Reddy vd., 2003; Elisashvili vd., 2008). Ligninolitik funguslarla yapılan bazı çalışmalarda farklı zirai atıklar besinsel destek amacıyla kullanılmıştır. Ancak literatürde *T.versicolor* lakkazı üretiminde yoncanın katı substrat olarak kullanıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Elde edilen sonuçlar da literatürde diğer katı substratların kullanımı ile ulaşılan bulgularla kıyaslanabilir düzeydedir.

KAYNAKÇA

- Acuna-Arguelles, M.E., Gutierrez-Rojas, M., Viniegra-González, G., Favela-Torres, E. 1995, Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation., *Appl Microbiol Biotechnol* 43: 808–814 p.
- Adams, T.T., Eiteman, M.A., Hanel, B.M. 2002, Solid state fermentation of broiler litter for production of biocontrol agents, *Bioresour Technol* 82:33–41 p
- Aguilar, C.N., Augur, C., Favela-Torres, E., Viniegra-González, G. 2001, Production of tannase by *Aspergillus niger* Aa-20 in submerged and solid-state fermentation: influence of glucose and tannic acid, *J Ind Microbiol Biotechnol* 26:296–302 p
- Alberto, A.A., de Pastore, G.M., Berger, R.G. 2002, Production of coconut aroma by fungi in solid-state fermentation. *Appl Biochem Biotechnol* 98–100:747–751 p
- Arcand, R.L., Archibald, F.S., 1991, Direct dechlorination of chlorophenolic compounds by laccases from *Trametes (Coriolus) versicolor*, *Enzyme Microb Technol*, 13, 194-203 p
- Ardon, O., Kerem, Z., Hadar, Y. 1998, Enhancement of lignin degradation and laccase activity in *Pleurotus ostreatus* by cotton stalk extract, *Can.J.Microbiol.* 44(7): 676-680 p
- Arenskötter, M., Baumeister, D., Bröker, D., Hölker, U., Ibrahim, E.M.A., Lenz, J., Karsten, K., Steinbüchel, A. 2003, Entwicklung eines biotechnologischen verfahrens zur stofflichen wiederverwertung kautschukhaltiger rest- und abfallstoffe. In: Heiden S, Erb R (eds) *Transkript Sonderheft, Nachhaltige Biokatalyse*. DBU, Osnabruck, pp 28–32 p
- Arora, D.S., Chander, M., Gill, P.K., 2002, Involvement of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase in degradation and selective ligninolysis of wheat straw, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 50, 115–120 p
- Ashley, V.M., Mitchell, T., Howes, D.A., 1999, Evaluating strategies for overcoming overheating problems during solid-state fermentation in packed bed Bioreactors, *Biochem. Eng. J.* 3 141–150 p

- Atlow, S.C., Banadonna-Apora, L., and Klibanov, A.M. 1984, Dephenolization of industrial wastewaters catalysed by polyphenol oxidase, *Biotechnology and Bioengineering*, 26, 599-603 p
- Bakri, Y., Jacques, P., Thonart, P. 2003, Xylanase production by *Penicillium caescens* 10–10c in solid-state fermentation. *Appl Biochem Biotechnol* 108:737–748 p
- Balakrishnan, K., Pandey, A. 1996, Production of biologically active secondary metabolites in solid state fermentation. *J Sci Ind Res* 55:365–372 p
- Baldrian, P., Gabriel, J. 2002, Variability of laccase activity in the white-rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus*, *Folia Microbiol* 47:385–390 p
- Banarjee, R., Bhattacharyya, B.C. 2003, Evolutionary operation as a tool optimization for solid state fermentation, *Biochem. Eng. J.* 13 (2003) 149–155 p
- Barrios-Gonzalez, J., Castillo, T.E., Mejia, A. 1993, Development of high penicillin producing strains for solid state fermentation, *Biotechnol Adv* 11:525–537 p
- Barrios-Gonzalez, J., Mejía, A. 1996, Production of secondary metabolites by solid-state fermentation, *Biotechnol Annu Rev* 2:85–88 p
- Barrios-Gonzalez, J., Tomasini, A. 1996, Production of aflatoxines in solid state fermentation, *J Sci Ind Res* 55:424–430 p
- Becerra, M., Gonzalez, Siso M.I. 1996, Yeast β -galactosidase in solidstate fermentations, *Enz Microb Technol* 19:39–44 p
- Beg, Q.K., Bhushan, B., Kapoor M., Hoondal, G.S. 2000, Enhanced production of a thermostable xylanase from *Streptomyces* sp. QG-11–3 and its application in biobleaching of eucalyptus kraft pulp, *Enzyme Microb Technol* 27:459–466 p
- Bellon-Maurel, V., Orliac, O., Christen, P. 2003, Sensors and measurements in solid state fermentation: a review, *Proc. Biochem.* 38 881–896 p
- Benjamin, S., Pandey, A. 1997, Coconut cake—a potent substrate for the production of Lipase by *Candida rugosa* in solid-state fermentation, *Acta Biotechnol* 17:241–251 p
- Bockelmann, W., Protius, S., Lick, S., Heler, K.J. 1999, Sporulation of *Penicillium camemberti* in submerged batch culture, *SystemAppl Microbiol* 22:479–485 p
- Boerjan, W., Ralph, J. and Baucher, M. 2003. Lignin biosynthesis, *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 519–546 p

- Bollag J.M., Shuttleworth K.L., Anderson D.H., 1988, Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds, *Appl Environ Microbiol.*, 54 (12): 3086-3091 p
- Bonnarme, P. and Jeffries, T. W., 1989, Mn (II) regulation of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases from lignin degrading white rot fungi, *Appl. and Environ. Microbiol.* 56 (1), 210-217 p
- Bourbonnais, R., Paice, M.G. 1988, Veratryl alcohol oxidases from the lignin degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caj*, *Biochem. J.* 255, 445–450 p
- Brand, D., Pandey, A., Roussos, S., Soccol, C.R. 2000, Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system, *Enzyme Microb. Technol.* 27 (1–2) 127–133 p
- Brock, B.J., Rieble, S., Gold, M.H. 1995, Purification and characterization of a 1,4-benzoquinone reductase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3076–3081 p
- Carrasco, T., Valino, E., Medina, I., Ravelo, D. 1999, Design and evaluation of a bioreactor for solid state fermentation, *Cuban J. Agric. Sci.* 33 (4) 409–414 p
- Castilho L.R., Polato, C.M.S., Baruque, E.A., Sant’Anna G.L. Jr., Freire, D.M.G. 2000, Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations, *Biochem. Eng. J.* 4 (2000) 239–247 p
- Celik, A., Cullis, P.M., Sutcliffe, M.J., Sangar, R., Raven, E.L. 2001, Engineering the active site of ascorbate peroxidase, *Eur. J. Biochem.* 268, 78–85 p
- Christen, P., Bramorski, A., Revah S., Soccol C.R. 2000, Characterization of volatile compounds produced by *Rhizopus* strains grown on agro-industrial solid wastes. *Bioresour Technol* 71:211–215 p
- Classen, J.J., Engler, C.R., Kenerley, C.M., Whittaker, A.D. 2000, A logistic model of subsurface fungal growth with application to bioremediation, *J. Environ. Sci. Health A* 35 (4) (2000) 465–488 p
- Cohen, R., Persky, L., Hazan-Etlan, Z., Yarden, O., Yitzhak, H. 2002, Mn²⁺ alters peroxidase profiles and lignin degradation by the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* under different nutritional and growth conditions, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 102–103 (2002) 415–429 p

- Dartora, A.B., Bertolin, T.E., Bilibio, D., Silveira, M.M., Costa, J.A.V. 2002, Evaluation of filamentous fungi and inducers for the production of endopolygalacturonase by solid state fermentation, *Z Naturforsch* 57:666–670 p
- Deschamps, F., Huet, M.C. 1985, Xylanase production in solid-state fermentation: a study of its properties, *Appl Microbiol Biotechnol* 22:177–180 p
- Deshpande, M.V. 1999, Mycopesticide production by fermentation: potential and challenges, *CRC Microbiol* 25:229–243 p
- Dey, S., Agarwal, S.O. 1999, Characterization of a thermostable alpha amylase from a thermophilic *Streptomyces megasporus* strain SD12, *Indian J Biochem Biophys* 36:150–157 p
- Dinis, M.J., Bezerra, R.M., Nunes, F., Dias, A.A., Guedes, C.V., Ferreira, L.M., Cone, J.W., Marques, G.S., Barros, A.R., Rodrigues, M.A. 2009, Modification of wheat straw lignin by solid state fermentation with white-rot fungi, *Bioresour Technol* Volume:100, Issue 20, 4829-4835 p
- Dizge, Göksel, M., 2007, *Trametes versicolor* beyaz çürükçül fungusundan lakkaz enziminin saflaştırılması ve kısmi nitelendirilmesi, GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Durand, A., 2003, Bioreactor designs for solid state fermentation, *Biochem.Eng. J.* 13 113–125 p
- Durand, A., Renaud, R., Almanza, S., Maratray, J., Diez, M., Desgranges, C. 1993, Solid-state fermentation reactors: from lab scale to pilot plant, *Biotechnol. Adv.* 11 591–597 p
- Elibol, M., Muvituna, F. 1997, Characteristics of antibiotic production in a multiphase system, *Process Biochem* 35:85–90 p
- Elisashvili, V. I., 1993, Physiological regulation of ligninolytic activity in higher basidium fungi, *Microbiology.* 62 (5), 480-487 p
- Elisashvili, V., Penninckx, M., Kachlishvili, E., Tsiklauri, N., Metreveli, E., Kharziani, T., Kvetsidatze, G., 2008, *Letinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition, *Bioresour Technol.*, 99, 457–462 p

- Ellaiah, P., Srinivasulu, B., Adinarayana, K. 2003, Optimisation studies on neomycin production by a mutant strain of *Streptomyces marinensis* in solid state fermentation. *Process Biochem* (in press)
- Erden, E., Uçar, C., Gezer, T., Pazarlıoğlu K.N. 2009, New and different lignocellulosic materials from Turkey for laccase and manganese peroxidase production by *Trametes versicolor*, *Eng. Life Sci.* 2009, 9, No. 1, 60–65 p
- Evans, C.S., Dutton, M.V., Guillén, F., Veness, R.G. 1994, Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 235–240 p
- Fan, L., Pandey, A., Mohan, R., Soccol, C.R. 2000, Use of various coffee industry residues for the cultivation of *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation. *Acta Biotechnol* 20:41–52 p
- Feng, M.L., Tachikawa, H., Wang, X.T., Pfister, T.D., Gengenbach, A.J. and Lu, Y. 2003, Resonance Raman spectroscopy of cytochrome c peroxidase variants that mimic manganese peroxidase, *J. Biol. Inorg. Chem.* 8, 699–706 p
- Fengel, D., Wegener, G. 1984, *Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions*. De Gruyter, Berlin.
- Fenice, M., Sermanni, G.G., Federici, F., D'Annibale, A. 2003, Submerged and solid-state production of laccase and Mnperoxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media, *J Biotechnol* 100:77–85 p
- Filer, K. 2001, The newest old way to make enzymes. *Feed Mix* 9:27–29 p
- Frandsberg, E., Peterson, C., Lundgren, L.N., Schnurer, J. 2000, *Streptomyces halstedii* K122 produces antifungal compounds bafilomycin B1 and C1. *Can J Microbiol* 46:753–758 p
- Frey, S., Magan, N. 2001, Production of the fungal biocontrol agent *Ulocladium atrum* by submerged fermentation: accumulation of endogenous reserves and shelf-life studies, *Appl Microbiol Biotechnol* 56:372–377 p
from *Kraft Pulp. Bull. of Environ. Contamin. and Toxicol.* 61:15-21 p
- Fujian, X., Hongzhang, C., Zuohu, L. 2001, Solid-state production of lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) by *Phanerochaete chrysosporium* using steam-exploded straw as substrate, *Bioresour Technol* 80:149–151 p

- Gautam, P., Sabu, A., Pandey, A., Szakacs, G., Soccol, C.R. 2002, Microbial production of extra-cellular phytase using polystyrene as inert solid support, *Bioresour Technol* 83:229–233 p
- Gemli, C., Perez-Correa, R., Agosin, E., 2002, Modelling *Gibberella fujikuroi* growth and GA3 production in solid-state fermentation, *Proc. Biochem.* 37 :1033–1040 p
- Germano, S., Pandey, A, Osaku, C.A., Rocha, S.N., Soccol, C.R. 2003, Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp produced by solid-state fermentation, *Enzyme Microb Technol* 32:246–251 p
- Gianfreda, L., Sannino, F., Filazzola, M.T., Leonowicz, A.1998, Catalytic behaviour and detoxifying ability of a laccase from the fungal strain *Cerrena unicolor*, *J. Mol. Catal.* ;4:13–23/999 p
- Glazer AN.,Nikaido H., 2007, *Microbial Biotechnology Fundamentals of Applied Microbiology*, Cambridge Univesity Press, Second Edition.
- Glenn, J., Akileswaran, L., Gold, M., 1986, Mn (II) oxidation is the principal function of the extracellular Mn-peroxidase from *P. chrysosporium*, *Arch. Biochem. And Biophy.* 251, 688-696 p
- Glenn,J.K., Morgan, M.A., Mayfield, M.B., Kuwahara, M., Gold, M.H. 1983, An extracellular H₂O₂ – requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 114, 1077-1083 p
- Gold, M. H., Glenn, K. J., 1988, Manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*, *Methods in Enzymology.* 161, 258-270 p
- Gomez J., Pazos M., Rodriguez Couto S., Sanroman A. 2005, Chestnut shell and barley bran as potential substrates for laccase production by *Coriolopsis rigida* under solid-state conditions, *Journal of Food Engineering*, 68 315-319 p
- Guillén, F., Gómez-Toribio, V., Martínez, M.J., Martínez, A.T. 2000, Production of hydroxyl radical by the synergistic action of fungal laccase and aryl alcohol oxidase, *Arch. Biochem. Biophys.* 383, 142–147 p
- Guillén, F., Martínez, A.T., Martínez, M.J. 1992, Substrate specificity and properties of the arylalcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*, *Eur. J. Biochem.* 209, 603–611 p

- Guillén, F., Martínez, A.T., Martínez, M.J. and Evans, C.S. 1994. Hydrogen peroxide-producing system of *Pleurotus eryngii* involving the extracellular enzyme aryl-alcohol oxidase, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41, 465–470 p
- Gutiérrez, A., Caramelo, L., Prieto, A., Martínez, M.J. and Martínez, A.T. 1994. Anisaldehyde production and aryl-alcohol oxidase and dehydrogenase activities in ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*, *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1783–1788 p
- Haddadin, M.S.Y., Abu-Reesh, I.M., Haddadin, F.A.S., Robinson, R.K. 2001, Utilisation of tomato pomace as a substrate for the production of vitamin B-12—a preliminary appraisal, *Bioresource Technol.* 78 (3) 225–230 p
- Hammel, K.E., Kapich, A.N., Jensen, K.A. Jr., Ryan, Z.C. 2002. Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi, *Enzyme Microb. Technol.* 30, 445–453 p
- Han, B.Z, Rombouts, F.M., Nout, M.J.R. 2001, A Chinese fermented soybean food. *Int J Food Microbiol* 65, 1–10 p
- Hardin, M.T., Howes, T., Mitchell, D.A. 2001, Residence time distributions of gas flowing through rotating drum bioreactors, *Biotechnol. Bioeng.* 74 145–153 p
- Haris, J.P., Mantle, P.G. 2001, Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. *Phytochemistry* 58:709–716 p
- Hasenekoğlu, İ., Yeşilyurt, S. 2001, Mikrobiyoloji, Erzurum,
- Hatakka, A. 1994, Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation, *FEMS Microbiol. Rev.* 13:125-135 p
- Hernández, M.R.T., Lonsane, B.K., Raimbault, M., Roussos, S. 1993, Spectra of ergot alkaloids produced by *Claviceps purpurea* 1029c in solid-state fermentation system: influence of the composition of liquid medium used for impregnation sugarcane pith bagasse, *Process Biochem* 28:23–27 p
- Herpöel, I., Moukha, S., Lesage-Meessen, L., Sigoillot, J.C., Asther, M. 2000, Selection of *Picnoporus cinnabarinus* for laccase production. *FEMS Microbiol Lett* ;183:301–306 p
- Higuchi, T. 1997, *Biochemistry and Molecular Biology of Wood*, Springer Verlag, London.

- Higuchi, T., 1987, Catabolic pathways and role of ligninase for degradation of lignin substructure model compounds by white rot fungi, *Wood Res.* 73, 58-81p
- Hofrichter, M., Vares, T., Kalsi, M., Galkin, S., Scheibner, K., Fritsche, W., Hatakka, A., 1999, Production of manganese peroxidase and organic acids and mineralization of ¹⁴C-labelled lignin (14C-DHP) during solid-state fermentation of wheat straw with the white rot fungus *Nematoloma frowardii*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1864–1870 p
- Holker, U., Hofer, M., Lenz, J. 2004, Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi, *Applied Microbiology and Biotechnology* 64, 175–186 p
- Hongzhang, C., Fujian, X., Zhonghou, T., Zuohu, L. 2002, A novel industrial-level reactor with two dynamic changes of air for solid-state fermentation, *J Biosci Bioeng* 93:211–214 p
- Hoogschagen, M., Zhu, Y., Tramper, H. van As, J. 2001, A. Rinzema, Influence of wheat type and pretreatment on fungal growth in solid-state fermentation, *Biotechnol. Lett.* 23 (14) 1183–1187 p
- Hölker, U. 2002, Bioreactor having at least two reaction chambers. Patent WO 02/100999 A3 p
- Hölker, U. 2003b, Fermentation auf festen Substraten. *BioTec* 3–4:32–33 p
- Hölker, U., Höfer, M. 2002, Solid substrate fermentation of lignite by the coal solubilizing mould *Trichoderma atroviride* in a new type of bioreactor, *Biotechnol Lett* 24:1643–1645 p
- Hölker, U., Höfer, M., Lenz, J. 2004, Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 175–186 p
- Hsu, F.L., Wang, P.M., Lu, S.Y., Wu, W.T. 2002, A combined solid-state and submerged cultivation integrated with adsorptive product extraction for production of *Monascus* red pigments, *Bioprocess Biosyst Eng* 25:165–168 p
- Jain, A. 1995, Production of xylanase by thermophilic *Melanocarpus albomyces* IIS-68. *Process Biochem* 30:705–709 p
- Jermini, M.F.G., Demain, A.L. 1989, Solid state fermentation for cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus* and *Cephalosporin acremonium*, *Experientia* 45:1061–1065 p

- Johns, M.R., Stuart, D.M. 1991, Production of pigments by *Monascus purpureus* in solid culture, *J Ind Microbiol* 8:23–28 p
- Jordan, J., 2005, Isolation and characterization of a novel thermostable and catalytically efficient laccase from *Peniophora* sp. strain UD4, Doctor of Philosophy of Rhodes, University South Africa.
- Juzlova, P., Martinkova, L., Kren, V. 1996, Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: a review, *J Ind Microbiol* 16:163–170 p
- Kapoor, M., Kuhad, R.C. 2002, Improved polygalacturonase production from *Bacillus* sp. MG-cp-2 under submerged (SmF) and solid state (SSF) fermentation, *Lett Appl Microbiol* 34:317–322 p
- Kar, B., Banerjee, R. 2000, Biosynthesis of tannin acyl hydrolase from tannin-rich forest residue under different fermentation conditions, *J Ind Microbiol Biotechnol* 25:29–38 p
- Kar, B., Banerjee, R., Bhattacharyya, B.C. 1999, Microbial production of gallic acid by modified solid state fermentation, *J Ind Microbiol Biotechnol* 23:173–177 s
- Karam, J., Nicell, J. A., 1997, Potential applications of enzymes in waste treatment, *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 69, 141-153 p
- Kashyap, DR, Soni, S.K., Tewari, R. 2003, Enhanced production of pectinase by *Bacillus subtilis* using solid state fermentation, *Bioresour Technol* 88:251–254 p
- Kersten, P.J. 1990, Glyoxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: Its characterization and activation by lignin peroxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2936–2940 p
- Kersten, P.J., Tien, M., Kalyanaraman, B., Kirk, T.K. 1985, The ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* generates cation radicals from methoxybenzenes, *J. Biol. Chem.* 260, 2609–2612 p
- Kirk T.K., Lamar T., Glasser JA., 1992, The potential of white rot fungi in bioremediation Mongkolsuk S., Lovett PS., Trempy JE. (Ed), *Biotechnology and Environmental Science-Molecular Approaches*, Plenum Press, New York, 131.
- Kirk, T.K., Farrell, R.L. 1987, Enzymatic “combustion”: The microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* 41, 465–505 p
- Kirk, T.K., Cullen, D. 1998, Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white rot fungi, p. 273–308. *In* R.A. Young and M. Akhtar (eds.),

- Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry. TAPPI Press, Atlanta.
- Kota, K.P., Sridhar, P. 1998, Solid state cultivation of *Streptomyces clavuligerus* for producing cephamycin, C. J Sci Ind Res 57:587–590 p
- Krishna, C. 1999, Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes, Bioresour Technol 69:231–239 p
- Krishna, P.S., Venkateswarlu, G., Pandey, A., Rao, L.V. 2003, Biosynthesis of rifamycin SV by *Amiclotopsis mediterranei* MTCC17 in solid cultures, Biotechnol Appl Biochem 37:311–315
- Kumar, D., Jain, V.K., Shanker, G., Srivastava, A. 2003 a, Utilisation of fruit wastes for citric acid production by solid state fermentation, Process Biochemistry, 38, 1725–1729 p
- Kumar, D., Shanker, G., Srivastava, A. 2003 b, Citric acid production by solid state fermentation using sugarcane bagasse, Process Biochemistry 38, 1731–1738 p
- Kuru A. 2003, Lignoselüloz Degradasyonunu Sağlayan *Streptomyces* Enzimleri Hakkında Bir Araştırma, Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Kuwahara, M., Glenn, J. K., Gold, M. H., 1983, Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *P. chrysosporium*, Federation of Eur, Biochem. Societies. 169, 247–250 p
- Kuwahara, M., Glenn, J.K., Morgan, M.A., Gold, M.H. 1984, Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Lett. 169, 247–250 p
- Lapadatescu, C., Bonnarme, P. 1999, Production of aryl metabolites in solid-state fermentations of the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*, Biotechnol Lett 21:763–769 p
- Larroche, C, Gros, J.B. 1989, Strategies for spore production by *Penicillium roquefortii* using solid state fermentation techniques. Process Biochem 24:97–103 p
- Leisola, M. S., Kozulic, B., Meussdoerffer, F., 1987, Homolog among multiple extracellular peroxidases from *P. chrysosporium*, J. Biol. Chem. 262, 419-424 p
- Levy, I., Ward, G., Hadar, Y., Shoseyov, O., Dosoretz, C.G. 2003, Oxidation of 4-bromophenol by the recombinant fused protein cellulose-binding domain-

- horseradish peroxidase immobilized on cellulose, *Biotechnol. Bioeng.* 82, 223–231 p
- Lillo M.Y.P., Perez-Correa, R., Agosin, E., Latrille, E. 2001, Indirect measurement of water content in an aseptic solid substrate cultivation pilot-scale bioreactor, *Biotechnol. Bioeng.* 76 (1) (2001) 44–51 p
- Limura, Y., Hartikainen, P., Tatsumi, K. 1996, Dechlorination of tetrachloroguaiacol by laccase of white-rot basidiomycete *Coriolus versicolor*, *Applied Microbiology and Biotechnology.* 45 (3), 434-439 p
- Lonsane B.K., Saucedo-Castaneda, G., Raimbault, M., S. Roussos, S., Viniegra- G., Gonzalez, N.P., Ghildyal, M., Ramakrishna, M., Krishnaiah, M. 1992, Scale-up strategies for solid state fermentation systems, *Proc. Biochem.* 27 259–273 p
- Lorenzo M., Moldes, D., Rodriguez Couto, S., Sanroman, A. 2002, Improvement in laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Trametes versicolor*, *Bioresour. Technol.* 82 109–113 p
- Lu M.Y., Maddox, I.S., Brooks, J.D. 1998, Application of a multi-layer packed-bed reactor to citric acid production in solid-state fermentation using *Aspergillus niger*, *Process Biochem.* 33 (1998) 117–123 p
- Machado, C.M., Soccol, C.R., Oliveira, de B.H., Pandey, A. 2002, Gibberellic acid production by solid-state fermentation in coffee husk, *Appl Biochem Biotechnol* 102–103:179–191 p
- Martínez, A.T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F.J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M.J., Gutiérrez, A. and del Río, J.C. 2005, Biodegradation of lignocellulosics: Microbiological, chemical and enzymatic aspects of fungal attack to lignin, *Intern. Microbiol.* 8, 195–204 p
- Martínez, M.J., Ruiz-Dueñas, F.J., Guillén, F., Martínez, A.T. 1996, Purification and catalytic properties of two manganese-peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*, *Eur. J. Biochem.* 237, 424–432 p
- Martins, E.S., Silva, D., Silva, da R., Gomes, E. 2002, Solid state production of thermostable pectinase from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*, *Process Biochem* 37:949–954 p
- Mason, H.S., Fowlks, W.B., Peterson E.W., 1955, Oxygen transfer and electron transport by the phenolase complex, *J Am Chem Soc.*, 77, 2914-2915 p

- Mazumder, S., Soumendra, B.K., Mukherjee, M. 2009, Laccase production in solid-state and submerged fermentation by *Pleurotus ostreatus*, *Engineering in Life Sciences*:9,1: 45-52 p
- Medeiros, A.B.P., Pandey, A., Freitas, R.J.S., Christen, P., Soccol, C.R. 2000, Optimization of production of aroma compounds by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation using factorial design and response surface methodology, *Biochem. Eng. J.* 6 (1) 33–39 p
- Mester, T., Ambert-Balay, K., Ciofi-Baffoni, S., Banci, L., Jones, A.D., Tien, M. 2001, Oxidation of a tetrameric nonphenolic lignin model compound by lignin peroxidase, *J. Biol. Chem.* 276, 22985–22990 p
- Mester, T., Field, J.A. 1998, Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera* species strain BOS55 in the absence of manganese, *J. Biol. Chem.* 273, 15412–15417 p
- Michael, C.J., Watkinson, S.C., Gooday, G.W., 2001, *The Fungi*, Academic Press, 2. baskı
- Michel, F. C., Jr, Dass, S.B., Grulke, E. A., Reddy, A. C., 1991, Role of manganese peroxidase and lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of kraft bleach plant effluent, *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (8), 2368–2375 p
- Mitchell, D.A., Krieger, N., Stuart, D., Pandey, A. 2000, New developments in solid-state fermentation. II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors, *Proc. Biochem.* 35, 1211–1225 p
- Mitchell, D.A., Lonsane, B.K. 1990, Definition, characterization and economic evaluation, in: H.W. Doelle, C. Rolz (Eds.), *General Principles of Solid Substrate Fermentation*, Rapid Publications of Oxford Ltd., UK.
- Mitchell, D.A., Meien, von O.F., Krieger, N. 2003 Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors, *Biochem. Eng. J.* 13, 137–147 p
- Mitchell, D.A., Meien, von O.F., Krieger, N., Dalsenter, F.D.H. 2004, A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in solid-state fermentation, *Biochem. Eng. J.* 17, 15–26 p

- Mitchell, D.A., Pandey, A., Sangsurasak, P., Krieger, N. 2000, Scale-up strategies for packed-bed bioreactors for solid-state fermentation, *Process Biochem.* 35 (1–2) 167–178 p
- Moldes, D., Gallego, P. P., Rodríguez Couto, S., Sanroma'n, A., 2003, Grape seeds: The best lignocellulosic waste to produce laccase by solid state cultures of *Trametes hirsuta*, *Biotechnology Letters*, 25, 491–495 p
- Muheim, A., Waldner, R., Leisola, M.S.A. and Fiechter, A., 1990, An extracellular aryl-alcohol oxidase from the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*, *Enzyme Microb. Technol.* 12, 204–209 p
- Munoz, G.A., Agosin, E., Cotoras, M., San Martin, R., Volpe, D., 1995, Comparison of aerial and submerged spore properties for *Trichoderma harzianum*, *FEMS Microbiol Lett* 125:63–70 p
- Murado, M.A., Gonzalez, M.P., Torrado, A., Pastrana, L.M. 1996, Amylase production by solid state culture of *Aspergillus oryzae* on polyurethane foams. Some mechanistic approaches from an empirical model, *Proc. Biochem.* 32, 35–42 p
- Nampoothiri, K.M., Pandey, A., 1996, Solid state fermentation for l-glutamic acid production using *Brevibacterium* sp., *Biotechnol. Lett.* 16 (2), 199–204 p
- Nerud, F., Misurcová, Z., 1996, Distribution of ligninolytic enzymes in selected white-rot fungi, *Folia Microbiol.* 41, 264–266 p
- Nigam, P., Singh, D. 1996, Processing of agricultural wastes in solid-state fermentation for microbial protein production, *J. Sci. Ind. Res.* 55, 373–380 p
- Nout, M.J.R., Aidoo, K.E. 2002, Asian fungal fermented food. In: Osiewacz X (ed) *The Mycota*, Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 23–47 p
- Ogbonna, D.N., Sokari, T.G., Achinewhu, S.C. 2001, Development of an owoh-type product from African yam beans (*Sphenostylis stenocarpa*) (Hoechst (ex. A. Rich.) Harms.) seeds by solid substrate fermentation, *Plant Foods Human Nutr.* 56 (2), 183–194 p
- Ohno, A., Ano, T., Shoda, M., 1993, Production of the antifungal peptide, iturin, by *Bacillus subtilis* NB22 using wheat bran as substrate, *J Ferment Bioeng* 75:23–27 p

- Ooijkaas, L.P., Weber, F., Buitelaar, R.M., Tramper, J., Rinzema, A., 2000, Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production system, *Trends Biotechnol* 18:356–360 p
- Panagiotou, G., Kekos, D., Macris, B.J., Christakopoulos, P., 2003, Production of cellulolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. *Ind Crops Prod* 18:37–45 p
- Pandey A., 1991, Aspects for design of fermenter in solid-state fermentation, *Process Biochem.* 26 (3), 355–361.
- Pandey, A., 1992, Recent process developments in solid-state fermentation, *Process Biochemistry*, 27, 109–117 p
- Pandey, A., 1994, Solid-state fermentation: an overview, in: A. Pandey (Ed.), *Solid State Fermentation*, Wiley, New Delhi, India, pp. 3–10 p
- Pandey, A., 2003, Solid-state fermentation. *Biochem Eng J* 13:81–84 p
- Pandey, A., Kavita, P., Selvakumar, P., 1998, Culture conditions for production of 2-1- β -D- fructan-fructanohydrolase in solid culturing on chicory (*Cichorium intybus*) roots, *Braz. Arch. Biol. Technol.* 41 (2), 231–236 p
- Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C.R., Nigam, P. 1999, Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes, *Curr. Sci.* 77 (1),149–162 p
- Pandey, A., Soccol, C.R., Mitchell, D.A. 2000, New developments in solid-state fermentation. I. Bioprocesses and products, *Process Biochem.* 35 (10), 1153–1169 p
- Pandey, A., Soccol, C.R., Rodriguez-Leon, J.A., Nigam, P., 2001, Solid state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications. Asiatech, New Delhi: Asiatech Publishers, 113-126 p
- Pandey, A., Soccol, C.R., Leo, J.A.R., Nigam, P., 2001, Solid-state Fermentation in Biotechnology, Asiatech Publishers, Inc., New Delhi, p. 221 p
- Pascual, S., Cal, de A., Magan, N., Melgarejo, P. 2000, Surface hydrophobicity, viability and efficacy in biological control *Penicillium oxalicum* spores produced in aerial and submerged culture, *J Appl Microbiol* 89:847–853 p
- Pastrana, L.M., Gonzalez, M.P. , Pintado, J., Murado, M.A., 1995, Interactions affecting gibberellic acid production in solid-state culture: a factorial study, *Enzyme Microb. Technol.* 17, 784–790 p

- Paszczynski, A., Huynh, V., Crawford, R., 1985, Comparisson of ligninase-I and peroxidase-M2 from the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, Arch. Biochem and Biophy. 244 (2), 750-765 p
- Pena-Lillo, M., Perez-Correa, R., Latrille, E., Fernandez, M., Acuna, G., Agosin, E., 2000, Data processing for solid substrate cultivation bioreactors, Bioprocess Eng. 22, 291–297 p
- Peralta-Perez, M.R., Saucedo-Castaneda, G., Gutierrez-Rojas, M., Campero, A. 2001, SiO₂ xerogel: a suitable inert support for microbial growth, J. Sol–Gel Sci. Technol. 20 (1), 105–110 p
- Perez, J., Jeffries, W., 1993, Role of organic acid chelators in manganese regulation of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*, Appl. Biochem. Biotech. 39, 227-238 p
- Pointing, S.B., Vrijmoed, L.L.P., 2000, Decolorization of azo and triphenylmethane dyes by *Picnoporus sanguineus* producing laccase as the sole phenoloxidase. World J Microbiol Biotechnol., 16:317–8 p
- Pointing, S.B., Vrijmoed, L.L.P., 2000, Decolorization of azo and triphenylmethane dyes by *Picnoporus sanguineus* in submerged liquid culture, World J. Microbiol. 16, 317–318 p
- Raghavarao, K.S.M.S., Ranganathan, T.V. , Karanth, N.G. 2003, Some engineering aspects of solid-state fermentation, Biochem. Eng. J. 13, 127–135 p
- Rajaratnam, S., Shashirekha, M. N., Bano, Z. 1998, Biodegradative and biosynthetic capacities of mushrooms: Present and future strategies, Crit. Rev. Biotechnol. 18: 91-236 p
- Ralph, B.J. 1976, Solid substrate fermentations, Food Technol. Aust. 28, 247–251 p
- Ramana Murthy, M.V., Mohan, E.V.S., Sadhukhan, A.K. 1999, Cyclosporin A production by *Tolypocladium inflatum* using solid state fermentation. Process Biochem 34:269–28 p
- Reading, N.S., Aust, S.D., 2000, Engineering a disulfide bond in recombinant manganese peroxidase results in increased thermostability, Biotechnol. Progr. 16, 326–333 p
- Reddy, G. V., Babu, P. R., Komaraiah, P., Roy, K. R. R. M., Kothari, I. L., 2003, Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic

- enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*), *Process Biochem.*, 38, 1457–1462 p
- Reyes-Moreno, C., Romero-Urías, C., Milán-Carrillo, J., Valdéz-Torres, B., Zárate-Márquez, E. 2000, Optimization of the solid state fermentation process to obtain tempeh from hardened chickpeas (*Cicer arietinum* L.), *Plant Foods Hum Nutr* 55:219–228 p
- Robinson, T., Chandran, B., Nigam, P. 2002, Studies on desorption of individual textile dyes and a synthetic dye effluent from dye-adsorbed agricultural residues using solvents, *Bioresour Technol* 84:299–301 p
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R., Nigam, P. 2001, Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative, *Bioresour. Technol.* 77, 247–255 p
- Rodríguez Couto S., Moldes, D., Liebanas, A., Sanroman, A. 2003, Investigation of several bioreactor configurations for laccase production by *Trametes versicolor* operating in solid-state conditions, *Biochem. Eng. J.* 15, 21–26 p
- Rodríguez Couto S., Rivela, I., Sanroman, A. 2000, Extracellular ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* in a new solid state bioreactor, *Biotechnology letters* 22:1443-1447 p
- Rodríguez Couto S., Rodríguez, R., Gallego, P.P., Sanroman, A. 2003, Biodegradation of grape cluster stems and ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* during semi-solid-state cultivation, *Acta Biotechnol.* 23, 62–64 p
- Rodríguez Couto S., Sanroman, M.A. 2005, Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production, *Biochemical Engineering Journal* 22, 211–219 p
- Rodríguez Couto S., Rosales, E., Gundin, M., Sanroman, M.A. 2004, Exploitation of a waste from the brewing industry for laccase production by two *Trametes* sp., *J. Food Eng.* 64, 423–428 p
- Rodríguez Couto, S., Barreiro, M., Rivela, I., Longo, M.A., Sanroman, A. 2002, Performance of a solid-state immersion bioreactor for ligninolytic enzyme production: evaluation of different operational variables, *Proc. Biochem.* 38 219–227 p

- Rosales, E., Couto, S.R., Sanromán, M.Á. 2007, Increased laccase production by *Trametes hirsuta* grown on ground orange peelings, *Enzyme Microb Technol* 40:1286–1290 p
- Rosales, E., Rodríguez Couto, S., Sanroman, A. 2002, New uses of food waste: application to laccase production by *Trametes hirsuta*, *Biotechnol. Lett.* 24 701–704 p
- Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., Martínez, A.T. 1999, Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*, *Mol. Microbiol.* 31, 223–236 p
- Sarhy-Bagnon, V.V., Lozano, P., Saucedo-Castaneda, G., Roussos, S. 2000, Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma harzianum* in liquid and solid state cultures, *Process Biochem* 36:103–109 p
- Schoemaker, H.E. 1990, On the chemistry of lignin degradation. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, 109, 255–272 p
- Segeth, M.P., Bonnefoy, A., Bronstrup, M., Knauf, M., Schummer, D., Toti, L., Vertesy, L., Wetzel-Raynal, M.C., Wink, J, Seibert, G., 2003, Coniosetin a novel tetramic antibiotic from *Coniochaeta ellipsoidea* DSM 13856. *J Antibiot* 56:114–122 p
- Selvakumar, P., Pandey, A., 1999, Solid-state fermentation for the synthesis of inulinase from the strains of *Staphylococcus* sp. and *Kluyveromyces marxianus*, *Process Biochem.* 34 (8), 851–855 p
- Smits, J.P., Rinzema, A., Tramper, J., Sonsbeek, van H.M., Hage, J.C., Kaynak, A., Knol, W. 1998, The influence of temperature on kinetics in solid-state fermentation, *Enzyme Microb. Technol.* 22, 50–57 p
- Smits, J.P., Sonsbeek, van H.M., Tramper, J., Knol, W., Geelhoed, W.W., Peeters, M., Rinzema, A. 1999, Modelling fungal solid-state fermentation: the role of inactivation kinetics, *Bioprocess Eng.* 20 (5), 391–404 p
- Solis-Pereira, S., Favela-Torres, E., Viniestra-Gonzalez, G., Gutierrez-Rojas, M. 1993, Effect of different carbon sources on the synthesis of pectinases in *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation, *Appl Microbiol Biotechnol* 39:36–41 p

- Souza, J.V.B., Silva, E.S., Maia, M.L.S., Teixeira, M.F.S. 2003, Screening of fungal strains for pectinolytic activity: endopolygalacturonase production by *Peacilomyces clavisporus* 2A.UMIDA.1, *Process Biochem* 39:455–458 p
- Srinivasan, C., D_Souza, T. M., Boominathan, K., & Reddy, C. A. 1995, Demonstration of laccase in the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767, *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 4274–4277 p
- Stepanova, E.V., Koroleva, O.V., Vasilchenko, L.G. 2003, Fungal decomposition of oat straw during liquid and solid-state fermentation, *Applied Biochemistry and Microbiology*, Vol. 39, No. 1, 65–74 p
- Su, Y.C., Wang, J.J., Lin, T.T. 2003, Production of secondary metabolites γ -aminobutyric acid and monacolin K by *Monascus*, *J Ind Microbiol Biotechnol* 30:41–4 p
- Sun, W. Q., Payne, G. F., 1996, Tyrosinase-containing chitosan gels: A combined catalyst and sorbent for selective phenol removal, *Biotechnology and Bioengineering*. 51, 79-86 p
- Sun, W. Q., Payne, G. F., Moas, M., Chu, J. H., Wallace, K.K. 1992, Tyrosinase reaction/chitosan adsorption for removing phenols from wastewater, *Biotechnology Progress*. 8, 179-186 p
- Taşpınar, A., Kolankaya, N. 1998. Optimization of Enzymatic Chlorine Removal from Kraft pulp, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. Vol. 61, no. 1, 15-21 p
- Tekere, M., Zvauya, R., Read, J.S., 2001, Ligninolytic enzyme production in selected sub-tropical white rot fungi under different culture conditions, *J. Basic Microbiol.* 41, 115–129 p
- Tengerdy, R.P. 1996, Cellulase production by solid substrate fermentation, *J Sci Ind Res* 55:313–316 p
- Tengerdy, R.P., Szakacs, G. 2003, Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation, *Biochem Eng J* 13:169–179 p
- Tien, M., Kirk, T.K. 1983, Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds, *Science* 221, 661–663 p

- Timofeevski, S.L., Nie, G., Reading, N.S., Aust, S.D. 1999, Engineering a functional hybrid of manganese peroxidase and lignin peroxidase, *Plant Peroxidase Newsletter* 13, 99–111 p
- Tomasini, A., Fajardo, C., Barrios-Gonzalez, J. 1997, Gibberellic acid production using different solid state fermentation systems, *World J Microbiol Biotechnol* 13:203–206 p
- Tychanowicz, G.K., Zilly, A., Souza, de C.G.M., Peralta, R.M., 2004, Decolourisation of industrial dyes by solid-state cultures of *Pleurotus pulpulmonarius*, *Process Biochemistry* 39, 855-859 p
- Ul-Haq, I., Idrees, S., Rajoka, M.I. 2002, Production of lipases by *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation, *Process Biochem* 37:637–641 p
- Venkateswarlu, G., Murali Krishna, P.S., Pandey, A., Rao, L.V. 2000, Evaluation of *Amycolatopsis mediterranei* VA18 for production of rifamycin-B, *Process Biochem* 37:331–338 p
- Viniegra-Gonzalez G., 1998, Strategies for the selection of mold strains geared to produce enzymes on solid substrates, in: E. Glindo, O.T. Ramirez (Eds.), *Advances in Biprocess Engineering II*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht., 123–136 p
- Viniegra-Gonzalez, G., Favela-Torres, E., Noe Aguilar, C., Jesus Romero-Gomez, de J., Diaz-Godinez, G., Augur, C. 2003, Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems, *Biochem. Eng. J.* 13, 157–167 p
- Vyas, B.R.M., Volc, J., Sasek, V., 1994. Ligninolytic enzymes of selected white rot fungi cultivated on wheat straw. *Folia Microbiol.* 39, 235–240 p
- Wada, S., Ichikawa, H., Tatsumi, K., 1995, Removal of phenols and aromatic amines from waste water by a combination treatment with tyrosinase and a coagulant, *Biotechnology and Bioengineering.* 45, 304-309 p
- Wariishi, H., Valli, K., Gold, M. H., 1989, Oxidative cleavage of a phenolic diarylpropane lignin model dimer by manganese peroxidase from *P. chrysosporium*, *Biochem.* 28, 6017-6023 p
- Wilcox, S.K., Putnam, C.D., Sastry, M., Blankenship, J., Chazin, W.J., McRee, D.E., Goodin, D.B. 1998, Rational design of a functional metalloenzyme:

- Introduction of a site for manganese binding and oxidation into a heme peroxidase, *Biochemistry* 37, 16853–16862 p
- Yang, S.S., Ling, M.Y. 1989, Tetracycline production with sweet potato residues by solid state fermentation, *Biotechnol Bioeng* 33:1021–1028 p
- Yang, S.S., Wang, J.Y. 1996, Morphogenesis, ATP content and oxytetracycline production by *Streptomyces rimosus* in solid substrate cultivation, *J Appl Bacteriol* 80:545–550 p
- Yang, X.X., Chen, H.Z., Gao, H.L., Li, Z.H. 2001, Bioconversion of corn straw by coupling ensiling and solid-state fermentation, *Bioresource Technol.* 78 (3), 277–280 p
- Yeung, B.K.S., Wang, X.T., Sigman, J.A., Petillo, P.A. and Lu, Y. 1997, Construction and characterization of a manganese-binding site in cytochrome c peroxidase: Towards a novel manganese peroxidase, *Chem. Biol.* 4, 215–221 p