



## Farklı Gelişim Dönemlerinde *Pleurotus ostreatus* Kompostundan Ligninolitik Enzim Ekstraksiyonu İçin Uygun Yöntem Seçimi

<sup>1</sup>Cansu BAYBURT <sup>2</sup>Ayşe Betül KARADUMAN <sup>3</sup>Uğur ÇELİK <sup>4</sup>Mustafa YAMAÇ

<sup>1</sup> LTS Özel Gıda Kontrol Laboratuvarı, Etap İş Merkezi, Acıbadem, Kadıköy, İSTANBUL

<sup>2</sup> Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, ESKİŞEHİR

<sup>3</sup> İzzet Baysal Cad. Güler 2 İş Hanı, No: 88/9, Merkez, BOLU

<sup>4</sup> Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, ESKİŞEHİR

**Özet:**Lignoselülozik atıklar mikrobiyal saldırı ve parçalanmaya karşı oldukça dirençli yapısal bileşenlerdir. Beyaz çürükçül funguslar, bu dirençli bileşenin degradasyon ve mineralizasyonunu başarılı biçimde gerçekleştirebilirler. Bu çalışmada *Pleurotus ostreatus* fungusunun atık kompostu ligninolitik enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

Çalışmada, atık *Pleurotus ostreatus* kompostundan lignin degrade edici enzimlerin ekstraksiyon verimliliğini karşılaştırmak amacıyla, 6 farklı ekstraksiyon sıvısı (distile su, fizyolojik tuzlu su (%0.9 NaCl), 50 mM Na-asetat tamponu (pH: 4.6), 50 mM Na-sitrat tamponu (pH:4.8), %0,5 (v/v) Triton X100 ve 50 mM fosfat tamponu (pH: 5.8)) üç farklı gelişim döneminde (vegetatif misel gelişimi, primordium oluşumu ve hasat sonrası) karşılaştırılmıştır. Kompost örnekleri, oda sıcaklığında 200 rpm' de 1 saat ekstrakte edilmiştir. Filtrasyon ve santrifüjleme işlemleri sonrasında elde edilen süpernatant ligninolitik enzim (lignin peroksidaz, lakkaz, mangan peroksidaz ve versatil peroksidaz) aktiviteleri açısından incelenmiştir.

Çalışmada elde edilen sonuçların istatistiksel analizi, atık *Pleurotus ostreatus* kompostundan ligninolitik enzim ekstraksiyonu için distile su ve Triton X100' ün en başarılı ekstraksiyon sıvıları olduğunu göstermektedir. Çalışmadan elde edilen veriler ışığında, atık kompostlardan enzim ekstraksiyonu için ucuz, etkin ve uygun bir ekstraksiyon sıvısı olarak distile su önerilmektedir. Ayrıca, ligninolitik enzim üretiminin hasat öncesi dönemlerde maksimum olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Enzim Ekstraksiyonu, Ligninolitik enzim, Kompost, *Pleurotus ostreatus*

### Method Selection for Ligninolytic Enzyme Extraction from *Pleurotus ostreatus* Compost at Different Growth Stages

**Abstract:**Lignocellulosic wastes are extremely resistant to microbial attack and degradation. Degradation and mineralisation of this polymer can be performed by white rot fungi, successfully. In this study, spent compost of *Pleurotus ostreatus* was investigated as a source of ligninolytic enzymes.

The recovery of lignocellulose-degrading enzymes from spent *Pleurotus ostreatus* compost was compared using six different extraction liquids (distilled water, serum physiological (%0.9 NaCl), 50 mM Na-acetate buffer (pH: 4.6), 50 mM Na-citrate buffer (pH:4.8), %0,5 (v/v) Triton X100 ve 50 mM phosphate buffer (pH: 5.8) at three developmental stages (vegetative mycelium, primordium and post harvest). The compost samples were extracted at room temperature for 1 h at 200 rpm. After filtration and centrifugation, supernatants were used for assay of ligninolytic enzymes such as lignin peroxidase, laccase, manganese peroxidase and versatile (manganese independent) peroxidase.

With the statistical analysis of the obtained data, we can argue that distilled water and Triton X100 are very appropriate for ligninolytic enzyme extraction from spent *Pleurotus ostreatus* compost. For that purpose, we suggest to using of distilled water as a cheap, effective and convenient extraction liquid. Besides, the highest ligninolytic enzyme activities of *Pleurotus ostreatus* were determined at pre-harvest stages.

**Keywords:** Enzyme Extraction, Ligninolytic enzyme, Compost, *Pleurotus ostreatus*



## GİRİŞ

Dünyada en fazla miktarda gerçekleşen katı faz fermentasyon uygulaması makrofungus üretimidir (Moore and Chiu, 2001). Bu yolla atıkların doğa dostu bir yaklaşım ile ekonomiye geri dönüşümü sağlandığı gibi, insanlar için değerli bir besin maddesi de elde edilebilmektedir. Günümüze dek çok sayıda makrofungus türü kültüre alınabilmiş olmasına karşın, sadece 10 kadarının üretimi yaygınlaşabilmiştir (Chakravarty, 2011). Bu türler arasında üretimi tüm Dünyada yaygınlaşabilmiş olanlar ise özellikle *Agaricus bisporus*, *Lentinus edodes* ve farklı *Pleurotus* türleridir. Sendi ve ark. (2013), son 30 yılda Dünya çapındaki makrofungus üretiminin 6 katlık bir artış ile 1.3 milyon tondan 8 milyon tona ulaştığını bildirmektedir. Üretilen her bir kg mantar için açığa çıkan kompost miktarına ilişkin olarak ise 3 kg (Singh ve ark., 2003) ve 5 kg (Semple ve ark., 2001; Williams ve ark., 2001) gibi tahminler yapılmaktadır. Bu durumda 2012 yılında üretildiği bildirilen 8 milyon ton makrofungus için açığa çıkan kompost miktarının 24 ile 40 milyon ton arasında olduğu öngörülebilir.

Üzerinden maksimum ürün alınmış ya da ürün alınması kârsız hale gelmiş olan substrat, "atık mantar kompostu" olarak değerlendirilmektedir (Ahlawat, 2011). Atık mantar kompostunun uzaklaştırılması ya da işlenmesi, mantar üreticileri için halen ciddi bir problem olup, atılma ve yakılma en sık karşılaşılan uzaklaştırma yöntemlerindedir. Yağmur ile yıkama yolu ile yeraltı sularının kirlenmesine de neden olan atık mantar kompostları (Ahlawat, 2011) sadece üreticiler değil yerel yönetimler açısından da çözülmesi gereken bir problem yaratmaktadır. Bu sorunun giderilmesine ve kaynağın ekonomiye geri döndürülmesine yönelik çeşitli seçenekler üzerinde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. *Agaricus bisporus*, *Pleurotus spp.*, *Volvariella volvacea*, *Lentinus edodes* gibi makrofungusların atık kompostlarının alternatif kullanım alanları arasında; fakir toprakların ıslahı (Ahlawat, 2011), toprak ve su remediasyonu (Trejo-Hernandez ve ark., 2001), etanol üretimi

(Hideno ve ark., 2007), biyogaz üretimi (Bisaria ve ark., 1990), solucan gübresi üretimi (Tajbakhsh ve ark., 2008) hayvan yemi olarak değerlendirme (Zhang ve ark., 1995; Williams ve ark., 2001) ya da gübre olarak kullanım (Jonathan ve ark., 2011) gibi seçenekler sorgulanmıştır.

Makrofungusların ticari boyutlu üretimleri için substrat olarak en fazla lignoselüloz içerikli bitkisel materyaller kullanılır. Yetiştirilecek olan makrofungus türünün kompostun lignoselülozik bileşenlerini kullanabilmesi için selülaz, hemüselülaz ve lignin depolimerize edici enzimlerin bir ya da birkaçına sahip olması gerekmektedir (Singh ve ark., 2003). Lignin depolimerize edici enzimler karpofor üretimi için vazgeçilmez olsa da maksimum enzim üretim zamanı türlere göre değişebilmektedir (Kües ve Liu, 2000; Rühl ve ark., 2008). Sonuç olarak karpofor hasatı sonrasında açığa çıkan atık mantar kompostu, lignin depolimerize edici enzimlerin yanı sıra hemiselülaz ve selülaz gibi enzimlerin önemli bir kaynağıdır (Kumaran ve ark., 1997; Trejo-Hernandez ve ark., 2001)

Lignin degradasyonu ile ilgili enzim sisteminin en önemli enzimleri lakkaz, lignin peroksidaz, mangan peroksidaz ve bazı funguslarda versatil peroksidaz enzimleridir. Bu enzimler polifenoller, sentetik boyalar, aromatik aminler ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi substratları kapsayan çok geniş bir substrat spektrumuna sahiptir. Ayrıca fenolik olmayan birçok substratı da kullanabildiği bilinmektedir.

Lignin depolimerize edici enzimlerin biyoteknolojik önemi dikkate alınarak gerçekleştirilen bu çalışmada;

- Pleurotus ostreatus* izolatu tarafından üretilen hücre dışı enzimlerin atık mantar kompostundan ekstraksiyonu için en uygun ekstraksiyon sıvısının belirlenmesi,
- Çalışmada kullanılan *Pleurotus ostreatus* izolatının lignin depolimerize edici enzim üretim kapasitesinin belirlenmesi,



c. Lignin depolimerize edici enzimlerin karpofor üretiminin hangi aşamasında (vejetatif misel gelişimi, primordium oluşumu ve hasat sonrası) en fazla üretildiğinin belirlenmesi, amaçlanmıştır.

#### **MATERYAL ve METOT**

Bu çalışmanın materyalini Anadolu Üniversitesi kampüsünden (Eskişehir) toplanan basidiomata örneğinden izole edilen ve dikaryotik misel formunda büyütülerek Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünde oluşturulan "Basidiomycetes Kültür Koleksiyonu" bünyesinde stoklanan *Pleurotus ostreatus* OBCC 1021 izolatı oluşturmaktadır. İzolat, patates dekstroz agar besiyerinde 4 °C' de yatık kültür halinde saklanmış ve her 6-8 ayda rutin olarak taze besiyerine aktarılmıştır.

#### **Kompost Hazırlığı ve Karpofor Üretimi**

*Pleurotus ostreatus* karpofor üretimi için kompost olarak yüksek biyolojik etkinlik değeri sağlayan ve birçok araştırmacı tarafından tercih edilen %80 buğday samanı ve %20 buğday kepeği karışımı kullanılmıştır. Karışıma % 1 oranında CaCO<sub>3</sub> ilave edilerek homojen biçimde karıştırılmış ve materyalin nem oranı % 70 olacak biçimde (50 ml melas/ 20 litre su ile) nemlendirilmiştir. Bileşim ve nem değerleri ayarlanan kompostlar, 1 kg lık ısıya dayanıklı ve ağız pamukla kapatılmış polietilen torbalara aktarılarak 121°C de 1,5 saat otoklavlanmıştır. Soğumaya bırakılan kompostlar önceden hazırlanan spawnlar ile kompost ağırlığının %5'i oranında inoküle edilmiştir.

*Pleurotus ostreatus* karpofor üretimi için birçok araştırmacı tarafından tercih edilen geleneksel kültürel yöntemler izlenmiştir. Özet olarak kompost üzerinde vejetatif misel gelişimi ve karpofor üretimi aşamalarında sırası ile 25 ve 15 °C lik inkübasyon sıcaklığı uygulanmış, karpofor üretimi aşamasında nemlendirme, havalandırma ve sirkülasyon işlemleri dikkatli biçimde izlenmiştir.

#### **Enzim Ekstraksiyonu**

*Pleurotus ostreatus* karpofor üretimi sırasında; vejetatif misel gelişimi (inkübasyonun 10. günü), primordium oluşumu ve hasat sonrası dönemlerinde alınan kompost örnekleri plastik bir zemin üzerinde el ile parçalanmış, karıştırılmış ve homojen hale getirilmiştir. Elde edilen homojen kompost örnekleri lignin depolimerize edici enzimlerin ekstraksiyonu için 1:10 oranında ekstraksiyon sıvısı ile oda sıcaklığında 200 rpm' de 1 saat muamele edilmiştir. Ekstraksiyon verimliliğini karşılaştırmak amacıyla distile su, fizyolojik tuzlu su (%0.9 NaCl), 50 mM Na-asetat (pH: 4.6), 50 mM Na-sitrat (pH:4.8), %0,5 v/v Triton X100 ve 50 mM fosfat tamponu (pH: 5.8) olmak üzere 6 farklı ekstraksiyon sıvısı kullanmıştır. Elde edilen ekstraktlar filtre kağıdı ile süzülerek 5000 rpm de 10 dakika santrifüjlenmiş ve elde edilen süpernatant 4 farklı ligninolitik enzim (lignin peroksidaz, lakkaz, mangan peroksidaz ve versatil peroksidaz) aktiviteleri açısından incelenmiştir.

#### **Enzim Aktivite Tayinleri**

Lignin peroksidaz (LiP) aktivitesi veratril alkol oksidasyonunun H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında 310 nm dalga boyunda 3 dk boyunca spektrofotometrik olarak izlenmesi ile tayin edilmiştir. Lakkaz aktivitesi, 420 nm dalga boyunda 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), (ABTS) oksidasyonunun 3 dk boyunca spektrofotometrik olarak izlenmesi ile belirlenmiştir. Mangan Peroksidaz (MnP) ve versatil peroksidaz (VP) aktiviteleri 469 nm dalga boyunda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında 2,6 dimethoxyphenol (DMP) oksidasyonunun MnSO<sub>4</sub> varlığında (MnP) ve yokluğunda (VP) 3 dk boyunca spektrofotometrik olarak izlenmesi ile belirlenmiştir.

#### **İstatistiksel Analiz**

*Pleurotus ostreatus* karpofor üretimi sırasında 3 farklı aşamada alınan kompost örneklerinden 6 farklı ekstraksiyon sıvısı ile ekstrakte edilen çözeltilerde 4 farklı ligninolitik enzim aktivitesine ilişkin çalışmalar 3 paralel halinde gerçekleştirilmiş,



elde edilen sonuçlar SPSS paket programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Verilerin çözüm ve yorumlanması için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi kullanılmış ve gruplar arasındaki fark Tukey testi ile  $P < 0.05$  anlamlılık seviyesinde sorgulanmıştır.

## BULGULAR

*Pleurotus ostreatus* karpoforu üretimi sırasında vejetatif misel gelişimi, primordium

oluşumu ve hasat sonrası aşamalarında komposttan 6 farklı ekstraksiyon sıvısı ile elde edilen enzim aktivite sonuçları Tablo 1 de sunulmuştur. Gerçekleştirilen enzim ekstraksiyon çalışması sonucunda LiP enzimi dışındaki tüm enzimlerin aktiviteleri belirlenebilmiştir. Test edilen enzimlerin aktiviteleri hem kullanılan ekstraksiyon sıvısına hem de fungusun gelişim aşamasına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir.

Tablo 1. Farklı ekstraksiyon sıvılarının *Pleurotus ostreatus* kompostundaki ligninolitik enzimlerin aktivitesine etkisi(u/L)  
V: vejetatif misel gelişimi dönemi, P: Primordium oluşumu dönemi,

H: Hasat sonrası dönemi. İstatistiksel olarak benzer gruplar, aynı harf ile simgelenmiştir. ( $P < 0,05$ )

		Distile su	FTS (%0.9 NaCl)	Na-Asetat Tamponu	Na-Sitrat Tamponu	Triton-X100	Fosfat Tamponu
Lakkaz	V	7.45±0.98a	4.80±0.29b	3.63±0.64bc	4.31±0.17bc	8.07±0.74a	3.01±0.41c
	P	10.44±0.15ab	9.25±0.86a	9.64±0.65a	10.95±1.69ab	12.84±1.28b	8.20±0.83a
	H	0.83±0.05a	0.00±0.00b	0.20±0.00c	0.00±0.00b	0.83±0.15a	0.00±0.00b
MnP	V	50.74±2.01a	35.02±1.25b	26.94±6.63bc	19.17±2.78c	57.94±2.36a	18.64±2.03c
	P	168.24±1.76a	151.18±14.12a	121.76±9.24b	68.63±7.00c	207.52±5.57d	65.82±6.56c
	H	71.30 ± 13.70a	37.79 ± 3.53b	7.24 ± 2.37c	5.34 ± 0.37c	5.42 ± 0.66c	3.63 ± 2.38c
VP	V	10.34 ± 0.74a	11.35 ± 2.52a	4.53 ± 0.61b	5.69 ± 0.95b	10.54 ± 1.06a	3.24 ± 0.10b
	P	4.43 ± 1.01a	2.52 ± 0.25b	2.34 ± 0.10b	3.95 ± 0.20a	4.54 ± 0.41a	2.45 ± 0.25b
	H	1.89 ± 0.12ab	0.81 ± 0.02d	2.01 ± 0.00a	1.57 ± 0.13bc	1.36 ± 0.15c	0.86 ± 0.17d

Maksimum lakkaz aktivitesi primordium oluşumu aşamasında  $12.84 \pm 1.28$  u/L olarak belirlenmiş olup, hasat sonrası dönemde ekstraksiyon sıvılarının çoğu ile lakkaz aktivitesi gözlenmemiştir. Farklı gelişim aşamalarında elde edilen MnP aktiviteleri  $3.63 \pm 2.38$  ile  $207.52 \pm 5.57$  u/L aralığında belirlenmiştir. Maksimum VP aktivite değeri ise vejetatif misel gelişim döneminde  $11.35 \pm 2.52$  u/L olarak saptanmıştır.

## TARTIŞMA

Lignoselüloz yapısını oluşturan lignin, hemiselüloz ve selüloz'un makrofungus tarafından kendileştirilerek fungal biyomasa dönüştürülebilmesi için öncelikle fungus tarafından kolaylıkla kullanılabilir form olan düşük molekül ağırlıklı bileşiklere dönüşümü gerekir. Bu dönüşüm, bir ön fermentasyon aşaması sırasında diğer mikroorganizmalar tarafından ya da beyaz çürükçül funguslarda olduğu gibi bir ön fermentasyon aşamasına gerek kalmaksızın fungusun kendisi

tarafından hücre dışı sindirim enzimleri ile gerçekleştirilir. Bu nedenle atık mantar kompostları; büyütülen fungusun miselleri, kullanılmamış lignoselülozik materyaller ve kolonize olmuş mikrobiyal biota üyelerinin yanı sıra büyüme sırasında üretilen hücre dışı enzimleri de içeren kompleks bir bileşimdir (Ko ve ark., 2005).

Lignin depolimerize edici enzimlerin polifenoller, aromatik aminler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve fenolik olmayan birçok substratı kapsayan çok geniş bir substrat spektrumu vardır. Bu özellikleri nedeni ile fungal ligninolitik enzimlerin zeytinyağı atık sularının fenol ve renk giderimi, tekstil atık sularının renk giderimi, azo, trifenil ve heterosiklik boyaların degradasyonu, pentaklorofenollerin giderimi, atık su ve kontamine toprakların remediasyonu gibi önemli uygulama alanları vardır (Singh ve ark., 2003; Khammuang ve Sarnthima, 2007).



Bu nedenle makrofungus türlerinin lignin degrade edici enzimlerinin üretim potansiyelini belirlemeye (Dhouib ve ark., 2005; Songulashvili ve ark., 2007; Kalmış ve ark., 2008; Goud ve ark., 2011; Krupodorova ve ark., 2014) ve optimize etmeye (Levin ve ark., 2005; Revankar ve Lele 2006; Patrick ve ark., 2013; do Valle ve ark., 2014) yönelik çok sayıda araştırma gerçekleştirilmiştir. Hatta, *Cerrena unicolor* (Moilanen ve ark., 2014), *Pleurotus sajor-caju* (Bettin ve ark., 2011), *Pycnoporus sanguineus* (Saat ve ark., 2012), *Trametes versicolor* (Thiruchelvam ve Ramsay, 2007) ve *Trametes hirsuta* (Rodriguez Couto ve ark., 2006) gibi fungus türleri ile reaktör çapında enzim üretimi denemeleri de gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak biyoteknolojik ve ekonomik önemleri gereği çok sayıda fungus türünün lignin degrade edici enzimlerin üretimi araştırılmış ve optimize edilmiştir. Oysa atık mantar kompostları biyoteknolojik ve endüstriyel öneme sahip olan ligninolitik enzimlerin üretim maliyetlerinin düşürülerek ucuz ve hızlı bir yolla elde edilmesi için oldukça iyi bir alternatif olarak değerlendirilebilir. Bu bakış açısı ile günümüze dek *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes*, *Flammulina velutipes*, *Hericium erinaceum* gibi makrofungusların kompostlarından enzim ekstraksiyonuna yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Ko ve ark., 2005; Mayolo-Deloisa ve ark., 2009).

*Pleurotus* türleri tüm dünyada yaygın olarak üretilen ve yenen/tıbbi makrofunguslar arasında üretimi ikinci sırada olan beyaz çürükçül funguslardır. Diğer yenilebilir makrofungus türlerine oranla *Pleurotus* türlerinin 1990-2000 yılları arasında üretim miktarlarındaki artış % 500 kadar olmuştur (Chiu et al., 2000). Sadece Çin'de 2003 yılındaki üretim miktarları 2.5 milyon ton kadardır (Chang, 2005). *Pleurotus ostreatus* türünün lignin peroksidaz üretmemesine karşın, lakkaz ve mangan peroksidaz'ın yanı sıra az sayıda makrofungus türünde görülen bir özellik olmak üzere iyi bir versatil peroksidaz (mangan bağımsız peroksidaz) üreticisi olduğu

bilinmektedir (Cohen ve ark., 2002; Stajic ve ark., 2004). Bu nedenle *Pleurotus ostreatus*, dünyadaki üretim potansiyeli dikkate alındığı zaman, ligninolitik enzim üretimi açısından değerli bir kaynak durumundadır. Bu yaklaşımla gerçekleştirilen çalışmada, *Pleurotus ostreatus* OBCC 1021 izolatının buğday samanı esaslı kompost üzerinde gelişimi sırasında üretilen ligninolitik enzimleri maksimum düzeyde elde etmek için farklı ekstraksiyon sıvılarının etkisi karşılaştırılmıştır. Ayrıca, fungusun farklı gelişim dönemlerindeki ligninolitik enzimlerinin aktiviteleri araştırılmıştır. Ekstraksiyon verimliliğini belirlemek amacıyla, üç farklı gelişim döneminde alınan kompostlardan 6 farklı ekstraksiyon sıvısı ile enzim ekstrakte edilmiştir. Aynı kompost örneğinden farklı ekstraksiyon sıvıları ile elde edilen ekstraktların ligninolitik enzim aktiviteleri (Tablo 1), her üç dönemde de benzer görülmektedir. Lakkaz, mangan peroksidaz ve versatil peroksidaz aktiviteleri açısından distile su ve Triton X100 tüm dönemlerdeki en yüksek enzim aktivite ve dolayısı ile en başarılı ekstraksiyon değerlerini sunmuştur. Bu ekstraksiyon sıvıları toplam 9 deneme grubunun (3 enzim x 3 dönem) 6 tanesinde istatistiksel olarak benzer sonuçlar vermiştir ( $P < 0.05$ ). İstatistiksel farklılık olan MnP – primordium döneminde Triton X100, MnP – hasat döneminde ise distile su en başarılı sonuçları vermiştir. VP – hasat dönemi örneklerinde ise distile su ve Na-asetat tamponu en başarılı ekstraksiyon sıvılarıdır. Sonuç olarak distile su, 9 deneme grubundan 8 tanesinde en yüksek enzim aktivitesi ve en başarılı ekstraksiyon değerleri veren istatistiksel grupta yer almıştır. Triton X100 ise 9 deneme grubundan 7 tanesinde en yüksek enzim aktivitesi ve en başarılı ekstraksiyon değerlerine sahip görülmektedir. MnP – hasat grubunda distile suyun enzim aktivite değeri  $71.30 \pm 13.70$  u/L iken, fosfat tamponu ile elde edilen enzim aktivitesi  $3.63 \pm 2.38$  u/L seviyesinde kalmıştır. Bir diğer ifade ile aynı kompost örneğinden distile su ile ekstrakte edilen enzim miktarı fosfat tamponundan 19.64 kat fazla olmuştur.





Tüm sonuçların birlikte değerlendirilmesi sonucunda distile su, (MnP - primordium dönemi dışında) tüm dönemlerdeki tüm enzim aktiviteleri için istatistiksel anlamda en başarılı grup içinde yer almıştır ( $P < 0.05$ ). Önceki çalışmalarda *Agaricus bisporus* ve *Pycnoporus sanguineus* ile alınan ekstraksiyon sonuçları da distile suyun en iyi ekstraksiyon sıvısı olduğunu onaylamaktadır (Ball ve Jackson 1995; Vikineswary ve ark., 2006). Bu açıdan “hangi ekstraksiyon sıvısı kullanılmalıdır?” sorusunun cevabı, ucuz, kolay ulaşılabilir ve/veya hızlı hazırlanabilir olması ve yüksek enzim eldesini sağlaması nedeni ile distile su olarak düşünülmelidir.

Makrofungusların yapay kültür ortamlarında üretimleri sırasında vejetatif misel gelişim dönemi ve fruktifikasyon dönemi olmak üzere iki farklı dönem söz konusudur. Vejetatif misel gelişim döneminde fungus miseli substrat üzerinde kolonize olur. Çevresel koşulların değişimi ile fruktifikasyon dönemine geçilerek fungusun karpoforu üretilmiş olur. Bu farklı dönemlerde üretilen enzimler, her fungus türü için nicelik ve nitelik açısından farklılık gösterir.

*Pleurotus ostreatus* OBCC 1021 izolatının buğday samanı esaslı kompost üzerinde gelişimi sırasında lignin peroksidaz enzimi üretmediği ve üretilen lakkaz, mangan peroksidaz ve versatil peroksidaz enzimlerinin ise ekstrakte edilebildiği anlaşılmaktadır. *Pleurotus ostreatus* tarafından lignin peroksidaz üretimi henüz rapor edilmediği için çalışmamızda elde edilen sonuç onaylayıcı durumdadır. Lakkaz ve mangan peroksidaz enzimlerinin primordium oluşumu sırasında, versatil peroksidaz enziminin ise vejetatif gelişim sırasında maksimum üretildiği görülmektedir. Her ne kadar farklı ekstraksiyon sıvıları arasında farklı enzim aktivite değerleri elde edilmiş olsa da, bu durum tüm ekstraksiyon sıvıları için geçerlidir (Tablo 1). Önceki araştırmalarda da *Pleurotus osteratus* tarafından ligninolitik enzim üretiminin substrat üzerinde vejetatif misel gelişimi sırasında arttığı ve karpofor üretimi aşamasında düşüşe geçtiği belirlenmiştir (Mata ve ark., 2007; Elisashvili ve ark., 2008a). *Pleurotus ostreatus*' un Fransa (030) ve

Hollanda (K12) kökenli 2 farklı suşu ile buğday samanı esaslı kompost üzerinde gerçekleştirilen diğer bir çalışmada farklı gelişim aşamalarındaki ligninolitik enzim üretimi üç hasat dönemi boyunca izlenmiştir. Her iki suşun maksimum enzim üretimini vejetatif misel gelişimi aşamasında sunduğu görülmektedir (Rühl ve ark., 2008).

*Pleurotus ostreatus*' un enzim aktivite değerlerine ilişkin karşılaştırma da literatür ile uyumlu görülmektedir. Kullanılan hasat yöntemine göre yapılan hesaplamalarda *P. ostreatus* OBCC 1021 izolatının lakkaz, MnP ve VP aktiviteleri; 0.00 – 1.28, 0.36 – 20.70 ve 0.08 – 1.14 u/ g kuru kompost olarak hesaplanmıştır. Asma talaşı ile gerçekleştirilen benzer bir çalışmada bir *P.ostreatus* izolatının 0.12-32.2 ve 0.37-6.9 u/g kuru kompost lakkaz ve MnP aktiviteleri sunduğu belirtilmektedir (Stajic ve ark., 2008). Ağaç yaprakları ile gerçekleştirilen diğer bir çalışmada ise *P.ostreatus*' un 3.8 ve 2.0 u/g kuru substrat lakkaz ve MnP değerleri belirlenmiştir (Elisashvili ve ark., 2008b). *Pleurotus ostreatus* tarafından üretilen en yüksek aktiviteye sahip enzim Rühl ve ark., (2008) tarafından bildirildiği gibi mangan peroksidaz olarak belirlenmiştir. Ayrıca, Stajic ve ark. (2004) ile Rühl ve ark., (2008) tarafından bildirildiği gibi bu çalışmada da VP aktivitesi MnP nin yaklaşık % 10 u oranındadır.

Günümüze dek atık kompostların enzim kaynağı olarak değerlendirilmesini sorgulayan çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu kapsamda *Pleurotus ostreatus* atık kompostundan  $\alpha$ -amilaz, selülaz,  $\beta$ -glukozidaz, ksilanaz (Ko ve ark., 2005), lakkaz (Stajic ve ark., 2004; Ko ve ark., 2005; Mata ve ark., 2007; Rühl ve ark., 2008) ve mangan peroksidaz (Stajic ve ark., 2004; Mata ve ark., 2007; Rühl ve ark., 2008) gibi enzimlerin ekstraksiyona yönelik çeşitli veriler bildirilmiştir. Ancak bu çalışmalarda sunulan veriler enzim aktivitesi ve enzim ekstraksiyon değerleri açısından büyük bir değişkenlik göstermektedir.



Gerçekleştirilen bu çalışmalarda kullanılan izolatın, kullanılan kompostun organik madde bileşiminin (özellikle azot seviyesinin), ekstraksiyon sıvısının, ekstraksiyon yöntem ve süresinin, kullanılan kompost miktarının, kompost – ekstraksiyon sıvısı oranının, ekstrakte edilen gelişim döneminin farklı olması objektif bir karşılaştırma yapma olanağını zayıflatmaktadır. Örneğin ekstraksiyon için kullanılan kompost miktarı 16 gramdan (Stajic ve ark., 2004; Elisashvili ve ark., 2008b) 500 grama kadar (Mata ve ark., 2007) değişebilmektedir. Benzer olarak ekstraksiyon süresi de hiç beklemeden doğrudan elle

sıkmaktan (Rühl ve ark., 2008) saatten 18 saate kadar (Singh ve ark., 2003) değişebilmektedir. Ayrıca, *P. ostreatus* üretiminde batı ülkelerinde buğday samanı, Asya da ise daha çok pirinç esaslı hammadde kullanılmakta olup odun talaşı ve yongaları ve diğer tarımsal atıklar da kompost bileşiminde kullanılmaktadır. Bu substratlar üzerinde üretilecek ligninolitik enzimlerin aktiviteleri de doğal olarak değişik olacaktır. Bu nedenle Dünyada yaygın olarak kullanılan substrat ve katkı maddelerine ilişkin benzer çalışmaların ligninolitik enzim ekstraksiyonu açısından yol gösterici olacağı öngörülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Ahlatwat O.P, Singh M., Vijay B., Kamal S., Wakchaure G.C. (Eds.), *Recycling of Spent Mushroom Substrate*, In: *Mushrooms Cultivation, Marketing and Consumption*, Directorate of Mushroom Research (ICAR), Solan (India), pp: 189-196, (2011).
- Ball A.S. ve Jackson A.M., *The Recovery of Lignocellulose-Degrading Enzymes from Spent Mushroom Compost*, *Bioresource Technology*, 54, 311-314, (1995).
- Bisaria R., Vasudevan P., Bisaria V.S., *Utilization of Spent Agro-residues from Mushroom Cultivation for Biogas Production*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 33, 607–609, (1990).
- Bettin F., da Rosa L.O., Montanari Q., Calloni R., Gaio T.A., Malvessi E., da Silveira M.M., Dillon A.J.P., *Growth Kinetics, Production, and Characterization of Extracellular Laccases from Pleurotus sajor-caju PS-2001*, *Process Biochemistry*, 46, 758–764, (2011).
- Chiu S.W., Law S.C., Ching M.L., Cheung K.W., Chen M.J., *Themes for Mushroom Exploitation in the 21st Century: Sustainability, Waste Management and Conservation*, *Journal of General and Applied Microbiology* 46, 269–282, (2000).
- Chakravarty B., *Trends in Mushroom Cultivation and Breeding*, *AJAE* 2(4), 102-109, (2011).
- Chang S.T., *Witnessing the Development of the Mushroom Industry in China*, *Acta Edulis Fungi*, 12(Supplement), 3-19, (2005).
- Cohen R., Persky L., Hadar Y., *Biotechnological Applications and Potential of Wood-degrading Mushrooms of the Genus Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58, 582-594, (2002).
- Dhouib A, Hamza M, Zouari H, Mechichi T, Hmidi R, Labat M, Martinez MJ ve Sayadi S, *Screening for Ligninolytic Enzyme Production by Diverse Fungi from Tunisia*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 1415–1423, (2005).
- do Valle J.S., de Souza Vandenberghe L.P., Santana T.T., Linde G.A., Colauto N.B., Soccol C.R., *Optimization of Agaricus blazei Laccase Production by Submerged Cultivation with Sugarcane Molasses*, *African Journal of Microbiology Research*, 8(9), 939-946, (2014).
- Elisashvili V., Kachlishvili E., Penninckx M.J., *Lignocellulolytic Enzymes Profile During Growth and Fruiting of Pleurotus ostreatus on Wheat Straw and Tree Leaves*, *Acta Microbiologica et Immunologica Hungaria*, 55, 157-168, (2008a).



- Elisashvili V., Penninckx M., Kachlishvili E., Tsiklauri N., Metreveli E., Kharziani T. and Kvesitadze G., *Lentinus edodes and Pleurotus Species Lignocellulolytic Enzymes Activity in Submerged and Solid-state Fermentation of Lignocellulosic Wastes of Different Composition*, *Bioresource Technology*, 99, 457-462, (2008b).
- Goud JVS, Hima Bindu NSVSSSL, Samatha B, Ram Prasad M, Singara Charya MA, *Lignolytic Enzyme Activities of Wood Decaying Fungi from Andhra Pradesh*, *Journal of the Indian Academy of Wood Science*, 8(1), 26-31, (2011).
- Hideno A., Aoyagi H., Isobe S., Tanaka H., *Utilization of Spent Sawdust Matrix after Cultivation of Grifola frondosa as Substrate for Ethanol Production by Simultaneous Saccharification and Fermentation*, *Food Sci. Technol. Res.*, 13(2), 111-117, (2007).
- Jonathan S.G., Lawal M.M., Oyetunji O.J., *Effect of Spent Mushroom Compost of Pleurotus pulmonarius on Growth Performance of Four Nigerian Vegetables*, *Mycobiology* 39(3) : 164-169, (2011).
- Kalmış E., Yaşa İ., Kalyoncu F., Pazarbaşı B., Koçyiğit A., *Lignolytic Enzyme Activities in Mycelium of Some Wild and Commercial Mushrooms*, *African Journal of Biotechnology*, 7 (23), 4314-4320, (2008).
- Khammuang S., Sarnthima R., *Laccase from Spent Mushroom Compost of Lentinus polychrous Lev. and its Potential for Remazol Brilliant Blue R Decolorisation*, *Biotechnology*, 6(3): 408-413, (2007).
- Ko H.G., Park S.H., Kim S.H., Park H.G., Park W.M., *Detection and Recovery of Hydrolytic Enzymes from Spent Compost of Four Mushroom Species*, *Folia Microbiol.* 50 (2), 103–106, (2005).
- Krupodorova T, Ivanova T, Barshteyn V, *Screening of Extracellular Enzymatic Activity of Macrofungi*, *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 3(4), 315-318, (2014).
- Kumaran S., Sastry C.A., Vikineswary S., *Laccase, Cellulase and Xylanase Activities During the Growth of Pleurotus sajor-caju on sago hampas*, *World Journal of Microbiol Biotechnol* 13, 43–49, (1997).
- Kües U., Liu Y., *Fruiting Body Production in Basidiomycetes*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54: 141-152, (2000).
- Levin L, Forchiassin F., Viale A, *Lignolytic Enzyme Production and Dye Decolorization by Trametes trogii: Application of the Plackett–Burman Experimental Design to Evaluate Nutritional Requirements*, *Process Biochemistry*, 40,1381–1387, (2005).
- Mata G., Cortes E., Salmones D., *Mycelial Growth of Three Pleurotus (Jacq.: Fr.) P. Kumm. Species on Sugarcane Bagasse: Production of Hydrolytic and Oxidative Enzymes*. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 9, 385-394, (2007).
- Mayolo-Deloisa K., Trejo-Hernandez M.R., Rito-Palomares M., *Recovery of Laccase from the Residual Compost of Agaricus bisporus in Aqueous Two-phase Systems*, *Process Biochemistry*, 44, 435–439, (2009).
- Moilanen U., Winquist E., Mattila T., Hatakka A., Eerikainen T., *Production of Manganese Peroxidase and Laccase in a Solid-state Bioreactor and Modeling of Enzyme Production Kinetics*, *Bioprocess Biosyst Eng*, in press, DOI 10.1007/s00449-014-1243-0, (2014).
- Moore D., Chiu S.W., *Filamentous Fungi as Food*. in: Pointing, S.B., Hyde, D. (Eds.), *Exploitation of Filamentous Fungi*, Fungal Diversity Press, Hong Kong, pp. 223–252, (2001).
- Patrick F, Mtui G, Mshandete AM, Kivaisi A, *Optimization of Laccase and Manganese Peroxidase Production in Submerged Culture of Pleurotus sajor-caju*, *African Journal of Biotechnology*, 10(50), 10166-10177, (2013).
- Revankar M.S., Lele, S.S., *Enhanced Production of Laccase Using a New Isolate of White Rot Fungus WR-1*, *Process Biochemistry*, 41, 581–588, (2006).
- Rodriguez Couto S., Rodriguez A., Paterson R.R.M., Lima N., Teixeira J.A., *Laccase Activity from the Fungus Trametes hirsuta Using an Air-lift Bioreactor*, *Letters in Applied Microbiology*, 42, 612–616, (2006).





- Rühl M., Fischer C., Kües U., *Ligninolytic Enzyme Activities Alternate with Mushroom Production during Industrial Cultivation of Pleurotus ostreatus on Wheatstraw-based Substrate*, Current Trends in Biotechnology and Pharmacy, 2 (4), 478-492, (2008).
- Saat M.N., Suffian M., Annuar M., Alias Z., Bakar B., *Effects and Optimization of Selected Operating Variables on Laccase Production from Pycnoporus sanguineus in Stirred Tank Reactor*, International Journal of Chemical Reactor Engineering, 10(1), DOI: 10.1515/1542-6580.3062.
- Semple K.T., Reid B.J., Fermor T.R., *Impact of Composting Strategies on the Treatment of Soils Contaminated with Organic Pollutants: A Review*. Environmental Pollution, 112, 269–283, (2001).
- Sendi H., Mohamed M.T.M., Anwar M.P., Saud H.M., *Spent Mushroom Waste as a Media Replacement for Peat Moss in Kai-Lan (Brassica oleracea var. Alboglabra) Production*, The ScientificWorld Journal, Volume 2013, Article ID 258562, 8 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/258562>, (2013)
- Singh A.D., Abdullah A., Vikineswary S., *Optimization of Extraction of Bulk Enzymes from Spent Mushroom Compost*, Journal of Chemical Technology and Biotechnology 78:743–752, (2003).
- Songulashvili G, Elisashvili V, Wasser SP, Nevo E, Hadar Y, *Basidiomycetes Laccase and Manganese Peroxidase Activity in Submerged Fermentation of Food Industry Wastes*, Enzyme and Microbial Technology, 41, 57–61, (2007).
- Stajic M., Persky L., Cohen E., Hadar Y., Brceski I., Wasser S.P., Nevo E., *Screening of Laccase, Manganese Peroxidase, and Versatile Peroxidase Activities of the Genus Pleurotus in Media with some Raw Plant Materials as Carbon Sources*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 117, 155-164, (2004).
- Tajbakhsh J., Abdoli M.A., Mohammadi Goltapeh E., Alahdadi I., Malakouti M.J., *Recycling of Spent Mushroom Compost Using Earthworms Eisenia foetida and Eisenia andrei*, Environmentalist, 28:476–482, (2008).
- Thiruchelvam A.T., Ramsay J.A., *Growth and Laccase Production Kinetics of Trametes versicolor in a Stirred Tank Reactor*, Appl Microbiol Biotechnol, 74, 547–554, (2007).
- Trejo-Hernandez, M.R., Lopez-Munguia, A., Ramirez, R.Q., *Residual Compost of Agaricus bisporus as a Source of Crude Laccase for Enzymatic Oxidation of Phenolic Compounds*, Process Biochemistry 36, 635–639, (2001).
- Vikineswary S., Abdullah N., Renuvathani M., Sekaran M., Pandey A., Jones E.B.G., *Productivity of Laccase in Solid Substrate Fermentation of Selected Agro-residues by Pycnoporus sanguineus*, Bioresource Technology, 97, 171–177, (2006).
- Williams B.C., Mc Mullan J.T., Mc Cahey S., *An Initial Assessment of Spent Mushroom Compost as a Potential Energy Feedstock*, Bioresource Technology, 79, 227-230, (2001).
- Zhang C. K., Gong F., Li D. S., *A Note on the Utilisation of Spent Mushroom Composts in Animal Feeds*, Bioresource Technology 52, 89-91, (1995).