

Pleurotus Ostreatus Makrofungusu ile Derin Kültür Koşullarında Biyoprotein Üretiminin Optimizasyonu

Cem ÖZKAN¹, Mustafa YAMAÇ², Zeki YILDIZ³

¹ Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bilim Dalı, Eskişehir.

² Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Eskişehir.

³ Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, İstatistik Bölümü, Eskişehir.

e-posta: myamac@ogu.edu.tr

Geliş Tarihi:21.05.2013; Kabul Tarihi:17.07.2013

Özet

Anahtar kelimeler

Biyoprotein; Derin kültür; *Pleurotus ostreatus*; Plackett-Burman.

Bu çalışmada, *Pleurotus ostreatus* makrofungus izolatının misel gelişimi üzerine etki eden çevresel faktörler belirlenmiştir. Ayrıca izolatın biyoprotein üretimi için en uygun besinsel bileşenler Plackett-Burman yöntemi ile seçilmiştir. Araştırma sonucunda 7 farklı inkübasyon sıcaklığı (15–45 °C), 9 farklı pH derecesi (4.0-8.0) ve 9 farklı inokülant miktarı (1-16 %) arasından en iyi misel gelişimi gözlenen sıcaklık 30 °C, pH 8 ve inokülant miktarı % 4 olarak belirlenmiştir Köpek yemi, laktoz, corn steep liquor, gibberellik asit, CaCl₂ ve KH₂PO₄ içerikli besiyerinin *Pleurotus ostreatus* izolatının biyoprotein üretimini önemli oranda arttırdığı belirlenmiştir.

Optimization of Bioprotein Production by *Pleurotus ostreatus* in Submerged Culture Conditions

Abstract

Key words

Bioprotein; Submerged culture; *Pleurotus ostreatus*; Plackett-Burman.

In this study, the effects of environmental factors on mycelium development of *Pleurotus ostreatus* was investigated. Besides, optimum nutritional factors for bioprotein production by the isolate were selected by Plackett-Burman design. Temperature of 30 °C, pH 8 and 4% inoculant size were selected among 7 incubation temperature (15-45 °C), 9 pH values (4.0-8.0), and 9 inoculant size (1-16%) for maximum mycelial growth of the isolate. In the case of *Pleurotus ostreatus*, dog food, lactose, corn steep liquor, gibberellic acid, CaCl₂ and KH₂PO₄ significantly influenced the bioprotein production.

© Afyon Kocatepe Üniversitesi

1. Giriş

Günümüzde 6.8 milyar kadar olan toplam Dünya nüfusunun 2050 yılında Birleşmiş Milletler Topuluğu' na ait tahminlere göre 7.4 ile 10.6 milyar arasında olacağı öngörülmektedir (Anonymous, 2011). Bu nüfus artış hızının günümüzdeki dengesiz, sağlıksız ve yetersiz beslenme kaynaklı sorunları arttıracığı tahmin edilmektedir. Beslenme sorununun temelinde protein eksikliği bulunmaktadır. Gelişmiş ülkelerde kişi başına günlük protein tüketimi 102 gram olup, bunun 70 gramı hayvansal kaynaklı proteinlerden oluşmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde ise

hayvansal protein tüketimi günde 12 gramı geçmemektedir. Türkiye'de 84 gram olan kişi başına protein tüketiminin ancak 17 gramı hayvansal kaynaklı proteinlerden karşılanmaktadır (Örücü ve Kanıbir, 2005). Nüfus artışının bir sonucu olarak günümüzdeki protein açlığı sorununun gelecek yıllarda da artmaya devam edeceği düşünülmektedir.

Dünyadaki protein açlığının önlenmesi için düşünülen alternatiflerden birisi, alternatif besin kaynakları yaratmaktır. Makrofunguslar yüksek protein içerikleri ile yetersiz beslenme ve protein açlığı için alternatif besin kaynağı olma potansiyeline sahiptir. Makrofungusların besin

olarak tercih edilmelerini arttıran faktörler arasında yüksek miktarda protein, vitamin ve aminoasit içermelerinin yanı sıra düşük yağ ve kaloriye sahip olmaları özellikle önemlidir.

Pleurotus ostreatus Dünya genelinde tanınan ve besin olarak tüketilen bir makrofungus türüdür. Antitümör, immun sistem düzenleyici, antioksidan, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antiviral, hipoglisemik ve hipolipidemik aktiviteleri de rapor edilmiştir (Gregori ve ark., 2007). Bu makrofungus türü, ülkemizde istiridye, kayın ve kavak mantarı isimleri ile tanınmakta olup yoğun olarak tüketilmektedir. *Pleurotus ostreatus* karpofor formunda üretiminin yanı sıra biyomas, enzim, intraselüler ve ekstraselüler polisakkarit, antimikrobiyal metabolit, vitamin üretimi amaçları ile derin kültür koşullarında da üretilebilmektedir (Gern ve ark., 2008). Derin kültürde büyütmenin az bir alanda ve kısa zamanda yüksek biyomas eldesine olanak vermesi, önemli bir avantaj olarak değerlendirilmektedir. Kontaminasyon riskinin az olması ve sürekli aynı kalitede ürün elde edilebilmesi de derin kültür sisteminin diğer avantajları arasındadır.

Mikrobiyal yolla ürün elde edilmesinde mikroorganizmanın gelişebilmesi ve istenilen ürünü maksimum verimlilikte üretebilmesi için bazı kültürel parametrelerin optimize edilmesi gerekmektedir. Bir mikrobiyal ürünün üretiminin optimize edilebilmesi, geleneksel ya da istatistiksel yolla gerçekleştirilebilmektedir. Geleneksel yöntem, araştırmanın her aşamasında sadece bir faktörün değiştirilmesi ve diğer faktörlerin sabit bir değerde tutulması ile (bir zamanda bir faktör yöntemi) uygulanmaktadır. Buna karşın istatistiksel deney tasarımları çok sayıda faktörün aynı zamanda çalışmasını mümkün kılmaktadır. Bu nedenle kısa zamanda ve daha güvenilir sonuç elde edebilme, ürün üzerine eden faktörlerin etkileşimini belirleyebilme, uygulanan deney sayısında azalma gibi avantajlara sahiptir. Bu nedenlerle, istatistiksel deney tasarım yöntemleri zaman, enerji ve parasal yönden daha ekonomik olan yöntemlerdir.

Plackett-Burman tasarımı “n” sayıda değişkenin ürün eldesi üzerine etkisinin “n+1” sayıda deneme ile belirlenmesine olanak tanıyan bir deney tasarım yöntemidir (Plackett and Burmann, 1946). Bu açıdan hızlı, güvenilir ve ekonomik sonuç elde etmek için sıkça tercih edilen bir yöntemdir. Bu bakış açısı ile gerçekleştirilen bu çalışmada *Pleurotus ostreatus* türü ile biyomas üretim koşullarına etki eden faktörlerin geleneksel ve istatistiksel yöntemlerle belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metodlar

Çalışmanın materyalini oluşturan *Pleurotus ostreatus* basidiomata örnekleri 06.09.2008 tarihinde Anadolu Üniversitesi, Yunus Emre kampüsünde bulunan kavak tomrukları üzerinden toplanarak geçerli literatürler aracılığı ile tanılanmış (Moser, 1978; Breitenbach and Kranzlin, 1986) ve dikaryotik misel formunda büyütülerek OBCC 1021 kodu ile Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünde oluşturulan “Basidiomycetes Stok Kültür Koleksiyonu” bünyesinde stoklanmıştır. İzolat, 4 °C’ de yatık kültür halinde saklanmış ve her 6-8 ayda rutin olarak taze besiyerine aktarılmıştır.

Çalışmada kullanılan *Pleurotus ostreatus* izolatu öncelikle Malt Agar besiyerine aşılansarak 27 °C de 7 gün süreyle inkübasyon ile aktif büyüme fazına geçirilmiştir. Gelişen koloninin aktif büyüme zonundan elde edilen 6 mm çapında diskleri PMP besiyerine (Malt Extract 10 g, Peptone 1 g, Potato Dextrose Broth 24 g, Distile su 1000 ml) aktararak 27 °C de 4 gün boyunca 100 rpm de inkübe edilmiştir. Inkübasyon süresi sonunda hasat edilen miseller homojenize edilerek (Heidolph, Silent Crusher M) inokülant olarak kullanılmıştır.

2.1. Çevresel Koşulların Biyoprotein Üretimine Etkisi

Bu çalışmada çevresel koşul olarak inkübasyon sıcaklığı ve besiyeri başlangıç pH sınırın *Pleurotus ostreatus* izolatının biyomas gelişimi üzerine etkisi

bir zamanda bir faktör yöntemi ile araştırılmıştır. Bu amaçla büyüme ortamı olarak kullanılan 50 ml basal medium (Glikoz 20 g, Peptone 2 g, KH_2PO_4 1 g, $MgSO_4$ 0.5 g, Distile su 1000 ml) % 4 oranında inoküle edilmiştir. *P. ostreatus* izolatının sıcaklık tercihi, izolatın basal mediumda 8 farklı sıcaklıkta (15–45 °C) 10 gün boyunca inkübasyona bırakılması sırasında oluşan biyomasın kuru ağırlık tayini esasına göre belirlenmiştir. İzolatın pH tercihi ise, basal mediumun pH ı otoklavlanmadan önce 8 farklı pH derecesine (4-8) ayarlanarak inkübasyon sonucu oluşan biyomasın kuru ağırlık tayini esasına göre belirlenmiştir. Her sıcaklık ve pH değeri için 3 paralel çalışma gerçekleştirilmiş olup sonuçlar elde edilen değerlerin ortalaması biçiminde sunulmuştur. Böylece *P. ostreatus* izolatının gelişimi için en uygun sıcaklık ve pH değerleri belirlenmiştir.

Ayrıca farklı inokülant miktarlarının biyomas üretimi üzerine etkisi de sorgulanmıştır. Bu amaçla %1-16 aralığında 9 farklı inokülant miktarı (ml/50 ml besiyeri) denenmiştir.

2.2. Biyoprotein Üretiminde Etkili Olan Besinsel Faktörlerin Plackett-Burman Yöntemi ile Seçilmesi

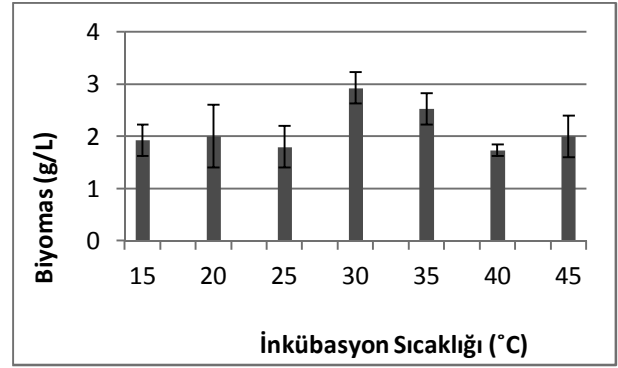
Pleurotus ostreatus OBCC 1021 izolatının derin kültür sisteminde biyoprotein üretimi üzerine etki eden faktörlerin seçilmesi iki düzeyli bir desen olan Plackett-Burman istatistiksel deney tasarımı ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın bu aşamasında biyomas üretimini arttıran değişkenlerin belirlenmesi için 23 farklı değişken 24 denemede araştırılmış (Tablo 1 ve 2) ve her değişkenin biyomas üretimi üzerine etkisi hesaplanmıştır.

Çalışmanın bu aşamasında, *P. ostreatus* OBCC 1021 izolatının biyomas üretimi için tercih ettiği karbon ve azot kaynağı tipinin seçilmesi ve çeşitli büyüme maddeleri ve mineral tuzların etkisinin olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Her deneme için 3 paralel çalışma gerçekleştirilmiş olup elde edilen verilerin çözümlenmesi SPSS programı aracılığı ile gerçekleştirilmiştir.

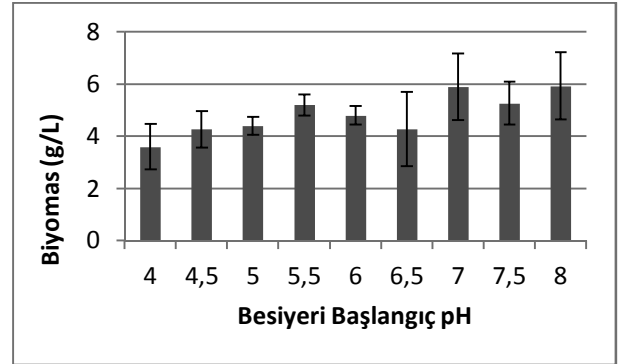
3. Bulgular

3.1.Çevresel Koşulların Biyoprotein Üretimine Etkisi

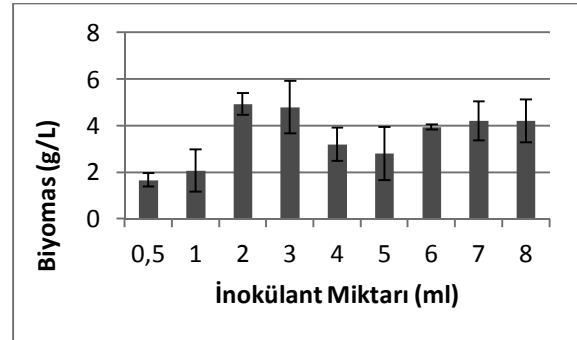
Çalışmada kullanılan *Pleurotus ostreatus* OBCC 1021 izolatının 10 günlük inkübasyon süresi sonrasında farklı inkübasyon sıcaklığı, farklı besiyeri başlangıç pH değerleri ve farklı inokülant miktarı değerlerinde elde edilen biyomas verileri sırası ile Şekil 1, 2 ve 3 te sunulmuştur.



Şekil 1. *Pleurotus ostreatus* izolatının farklı inkübasyon sıcaklıklarında biyomas üretimi



Şekil 2. *Pleurotus ostreatus* izolatının farklı başlangıç pH larında biyomas üretimi



Şekil 3. *Pleurotus ostreatus* izolatının farklı inokülant miktarlarında (ml/50 ml besiyeri) biyomas üretimi

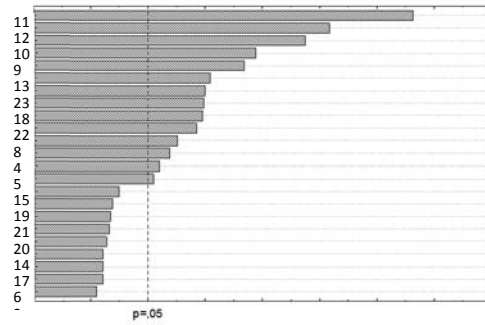
Tablo 1. *Pleurotus ostreatus* izolatının biyomas üretimine etkisi araştırılan besinsel parametreler ve düzeyleri

Kod	Grup	Değişken	Birimi	Düşük düzey	Yüksek düzey
1	Substrat	Buğday	% (w/v)	2	10
2		Mısır			
3		Yulaf			
4		Çavdar			
5		Pirinç			
6		Patates			
7		Elma posası			
8		Kayısı posası			
9		Köpek yemi			
10	Saf Karbon Kaynağı	Glukoz	% (w/v)	0.2	2
11		Laktoz			
12		Sukroz			
13	Azot kaynağı	Corn Steep Liquor	% (w/v)	0.1	0.5
14		Yeast Ekstrakt			
15		Pepton			
16		Amonyum klorit			
17		Sodyum nitrat			
18	Büyüme Maddesi	Giberellik asit	µg / L	1	10
19		Askorbik asit	µg / L	100	1000
20		Tiamin			
21	Mineral Tuz	KH ₂ PO ₄	% (w/v)	00.2	0.2
22		MgSO ₄			
23		CaCl ₂			

3.2. Biyoprotein Üretiminde Etkili Olan Besinsel Faktörlerin Plackett-Burman Yöntemi ile Seçilmesi

Eksik tasarımlar, tam faktöriyal tasarımın aksine, az sayıda deneme ile değişkenlerin etkisini öğrenebilme olanağı sağlamaktadır. Çalışmamızda 23 farklı besinsel değişkenin *Pleurotus ostreatus* OBCC 1021 izolatının biyoprotein üretimi üzerine etkisi 24 deneme ile araştırılabilmektedir. Çalışmada kullanılan *Pleurotus ostreatus* OBCC 1021 izolatının denemeye alınan 24 farklı besiyerinde 10 günlük inkübasyon süresi sonrasında elde edilen biyomas değerleri Tablo 2 de sunulmuştur. Her değişkenin yüksek düzeyinde kullanıldığı 1 numaralı denemede maksimum olarak 15.20 g/L biyomas değeri elde edilmiştir.

Denemeye alınan besinsel değişkenlerin etkisini karşılaştırmak için en uygun ifadelerden birisi olan Pareto kart Şekil 4 de sunulmuştur.



Şekil 4. Besinsel değişkenlerin standardize edilmiş etkilerinin Pareto kart ile ifadesi. (Kılavuz çizgi istatistiksel olarak önem sınırını ifade etmektedir).

Tablo 2. *Pleurotus ostreatus* OBCC 1021 izolatının biyomas üretimi için Plackett-Burman tasarımı ve elde edilen biyomas değerleri

Deneme	Değişkenler																							Biyomas (g/L)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15,20
2	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	4,93
3	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	6,53
4	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	7,47
5	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	7,40
6	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	10,47
7	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	10,73
8	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	11,40
9	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	9,80
10	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	11,40
11	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	10,13
12	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	5,87
13	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	3,80
14	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	5,27
15	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	5,07
16	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	5,33
17	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	7,07
18	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	8,07
19	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	7,07
20	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	6,13
21	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	8,20
22	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	7,20
23	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	8,13
24	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	7,13

4. Tartışma ve Sonuç

Günümüze dek *Agaricus bisporus* (Kurbanoglu ve ark., 2004), *Pleurotus florida* (Gbolagade et al., 2006b), *Lentinus subnudus* (Jonathan and Fasidi, 2001; Gbolagade et al., 2006a), *Schizophyllum commune* (Jonathan and Fasidi, 2001), *Tricholoma matsutake* (Kawagishi et al., 2004), *Coprinus cinereus*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes* (Hanai et al., 2005) *Pleurotus sajor-caju* (Mukhopadhyay et al., 2005), *Hericium spp.* (Ko et al., 2005), *Polyporus squamosus* (Özkan ve ark., 2011) ve *Grifola spp* (Hanai et al., 2005; Postemsky et al., 2006) gibi birçok makrofungus türü biyoprotein üretim ve optimizasyon denemelerine konu olmuştur. Bu çalışmalarda kullanılan optimum koşullarda ulaşılan biyomas üretim değerleri 1,47 g/L (*Schizophyllum commune*) ve 10,80 g/L (*Agaricus bisporus*) aralığındadır. Bu açıdan çalışmamızda *Pleurotus ostreatus* suşu ile ulaşılan 15,20 g/L

biyomas üretim değeri oldukça tatmin edici bir veri olarak değerlendirilebilir.

Pleurotus ostreatus biyomasının derin kültür koşullarında üretimi sadece fungal biyomas açısından değil, antitümör, immun sistem düzenleyici, antioksidan, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antiviral, hipoglisemik ve hipolipidemik aktivitelere sahip metabolitlerinin üretimi için de gerekli ve önemlidir. Bu nedenle türün derin kültürde büyümesini etkileyen faktörlerin belirlenmesi ve optimize edilmesi özel öneme sahiptir. Bu amaca yönelik olarak gerçekleştirilen çalışmamızda *Pleurotus ostreatus* türünün derin kültürde büyümesini etkileyen çevresel faktörlerin etkisi bir zamanda bir faktör yöntemi ile belirlenmiştir. Daha sonra büyüme üzerine etki göstermesi muhtemel olan 23 faktörden hangilerinin büyüme üzerine daha etkin olduğu Plackett-Burman deney tasarımı ile seçilmiştir.

Tablo 3. *Pleurotus ostreatus* OBCC 1021 izolatının biyomas üretimi için Plackett-Burman Tasarımı analiz sonuçları

Faktörler	Ortam Bileşenleri	Etki değeri	Standart Hata	t ₍₄₈₎	P değeri
X ₁	Buğday	0,105556	0,251170	0,42026	0,676174
X ₂	Mısır	0,138889	0,251170	0,55297	0,582852
X ₃	Yulaf	0,105556	0,251170	0,42026	0,676174
X ₄	Çavdar	-0,927778	0,251170	-3,69382	0,000565
X ₅	Pirinç	-0,761111	0,251170	-3,03026	0,003929
X ₆	Patates	0,161111	0,251170	0,64144	0,524287
X ₇	Elma posası	0,105556	0,251170	0,42026	0,676174
X ₈	Kayısı posası	0,983333	0,251170	3,91501	0,000285
X ₉	Köpek yemi	1,450000	0,251170	5,77298	0,000001
X ₁₀	Glukoz	1,883333	0,251170	7,49824	0,000000
X ₁₁	Laktöz	2,827778	0,251170	11,25842	0,000000
X ₁₂	Sukroz	2,094444	0,251170	8,33875	0,000000
X ₁₃	Corn Steep Liquor	1,350000	0,251170	5,37484	0,000002
X ₁₄	Yeast Ekstrakt	0,194444	0,251170	0,77415	0,442636
X ₁₅	Pepton	0,694444	0,251170	2,76484	0,008057
X ₁₆	Amonyum klorit	0,050000	0,251170	0,19907	0,843050
X ₁₇	Sodyum nitrat	0,172222	0,251170	0,68568	0,496214
X ₁₈	Giberellik asit	1,005556	0,251170	4,00348	0,000216
X ₁₉	Askorbik asit	0,605556	0,251170	2,41094	0,019789
X ₂₀	Tiamin	-0,250000	0,251170	-0,99534	0,324562
X ₂₁	KH ₂ PO ₄	0,550000	0,251170	2,18975	0,033435
X ₂₂	MgSO ₄	0,994444	0,251170	3,95925	0,000248
X ₂₃	CaCl ₂	1,050000	0,251170	4,18043	0,000123

4.1. Çevresel Koşulların Biyoprotein Üretimine Etkisi

Pleurotus ostreatus OBCC 1021 izolatının büyümesini destekleyen sıcaklık, pH ve inokülant değerlerini belirlemek amacı ile izolat, farklı inkübasyon sıcaklığı (15–45 °C), başlangıç pH (4.0–8.0) ve inokülant miktarı (0.5-8.0 ml/50 ml besiyeri) koşullarında büyütülmüştür. *P. ostreatus* izolatı denenen tüm sıcaklık değerlerinde inkübasyon süresinin uzamasına bağlı olarak dereceli biçimde artan bir büyüme göstermektedir (Şekil 1). İnkübasyonun 10. günündeki en yüksek biyomas değeri ise 30 °C sıcaklıkta elde edilmiştir. Değişik makrofungus türlerinin büyüebildiği ya da tolerans gösterebildiği sıcaklık aralığına yönelik çalışmalar

Volvariella speciosa'nın 20-35 °C (Fasiola ve ark., 2007), *Lentinus subnudus* (Gbolagade ve ark., 2006a), *Lepista nuda*, *Tricholoma equestre*, *Coprinus comatus*, *Agaricus campestris*, *Lentinus strigosus* (Özkan ve Yamaç, 2012) ve *Volvariella esculenta* (Jonathan ve ark., 2004)'nın 15-40 °C, *Pleurotus florida* (Gbolagade ve ark., 2006b) ve

Psathyrella atroumbonata (Jonathan ve Fasidi, 2003)'nın 15-45 °C, *Auricularia polytricha*'nın 10-40 °C (Jonathan ve ark., 2009) aralıklarında büyümesini başarılı biçimde sürdürdüğüne göstermiştir. Bu durum 15-45 °C sıcaklık aralığında inhibe olmadan büyümeye devam eden *P. ostreatus* izolatının geniş bir sıcaklık toleransına sahip olduğunu göstermekte olup izolatın değişik iklim zonlarında extensif kültürüne yönelik çalışmalar açısından da ümit verici bir özelliktir.

Fungusun sıcaklığa benzer olarak deneme kapsamındaki tüm pH değerlerinde de büyüebildiği ve inhibe olmadığı, pH: 7 -8 aralığında daha iyi büyüdüğü görülmüştür. Maksimum büyüme pH: 8.0 değerinde gerçekleşmektedir (Şekil 2). Bu sonuç izolatın nötrale yakın ve hafif alkali pH değerlerinde daha iyi büyüdüğünün bir ifadesi olarak değerlendirilebilir. Diğer *Pleurotus* tür ve izolatlarına ait optimizasyon çalışmalarında *P. tuber-regium* (Wu ve ark., 2003) *P. florida* (Gbolagade ve ark., 2006b) ve *P. ostreatus* (Gern

ve ark. 2008; Papaspyridi ve ark. 2010) izolatlarının 6.0 - 6.5 gibi hafif asidik pH değerlerini tercih ettiği görülmüştür. Oysa *P. nebrodensis* (Le ve ark., 2007) ve diğer bir *P. ostreatus* izolatu (Adebayo-Tayo ve ark., 2011) pH'nın 8 olduğu büyüme ortamında maksimum büyüme göstermiştir. Bu durum pH tercihinin tür ve izolata bağlı olarak değişen bir özellik olduğunu doğrulamaktadır. Bu arada izolatomuzun hafif alkali ortamlarda büyümesini sürdürebilmesi, büyütülmesinde farklı substratların kullanılabilme avantajı sağlamaktadır.

Fungusun aşamalı olarak yapılan optimizasyon çalışmalarından sıcaklık ve pH çalışmalarından elde edilen veriler ile gerçekleştirilen inokülant çalışmasında denemeye alınan 9 farklı inokülant (0.5-8.0 ml) değerinde de büyüebildiği ve hiçbir inokülant miktarında inhibe olmadığı görülmüştür. İnkübasyonun 10. günündeki en yüksek biyomas değeri ise 2 ml/50 ml besiyeri ve dolayısı ile % 4 inokülant miktarında elde edilmiştir (Şekil 3). *Grifola frondosa*, *Auricularia polytricha* ve *Pleurotus tuber-regium* ve gibi farklı makrofungus türleri ile biyomas üretiminde maksimum verim sağlayan inokulum miktarları % 3, 7 ve 8 olarak belirlenmiştir (Wu ve ark., 2003; Lee ve ark., 2004; Jonathan ve ark., 2009) Bu durumda inokülant miktarının optimizasyon çalışmalarında izolata göre oldukça değişken sonuçlar sunduğu ve her makrofungus izolatu için mutlaka optimize edilmesi gerektiği anlaşılmaktadır.

Elde edilen verilerden çalışma materyali olan OBCC 1021 kodlu *P. ostreatus* izolatu'nun çevresel koşullar açısından toleransının yüksek olduğu görülmektedir. Geniş bir sıcaklık ve pH aralığında büyümesi nedeni ile bu izolatu'nun farklı ortam koşulları ve substratlar üzerinde büyütülebileceği öngörülebilir.

Çalışmanın bu aşamasında büyümeyi olumlu olarak etkilediği belirlenen tüm koşullar, besinsel koşulların araştırılması sırasında kullanılmıştır.

4.2. Biyoprotein Üretiminde Etkili Olan Besinsel Faktörlerin Plackett-Burman Yöntemi ile Seçilmesi

Bir makrofungus izolatu'nun büyütüldüğü besiyerinin içeriği; sporların çimlendirilmesi, misellerin gelişim hızı, formu ve kalitesini doğrudan etkilemektedir. Bu nedenle mikrobiyal büyüme ya da ürün eldesi üzerine etki eden besinsel koşulların seçilmesi optimizasyon çalışmalarının neredeyse en önemli

aşamasıdır. Bu aşamada sıkça kullanılan bir zamanda bir faktör yöntemi; uzun zaman alması, ürün üzerine eden faktörlerin etkileşimini belirleyememe, çok sayıda deney gerçekleştirme zorunluluğu gibi nedenlerle, gereğinden fazla zaman, enerji ve para tüketilmesine neden olan bir yöntemdir. Bu açıdan istatistiksel deney tasarım yöntemleri önemli avantaja sahiptir. Çok faktörlü tasarımların deney sayısını ciddi biçimde arttırması nedeni ile iki düzeyli bir tasarım olan Plackett-Burman tasarımı optimizasyon çalışmalarının en hızlı ve ekonomik biçimde gerçekleştirilmesini sağlayan bir yöntemdir. Bu bakış açısı ile çalışmamızda Plackett-Burman tasarımı tercih edilmiştir.

Çalışmamızda 23 farklı besinsel faktörün *Pleurotus ostreatus* OBCC 1021 izolatu'nun biyoprotein üretimi üzerine etkisi sorgulanmıştır. Bu faktörlerden 14 tanesinin etkisinin istatistiksel anlamda önemli olduğu görülmektedir. Tablo 3 de sunulan etki ve t değerleri ile Şekil 4 te sunulan standardize edilmiş etki değerleri dikkate alındığında, bu faktörler arasında biyoprotein üretiminin en fazla etkileyen 3 değişkenin sırası ile karbon kaynaklarından laktoz, sukroz ve glukoz olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca alternatif ve ucuz bir substrat olarak köpek yeminin kullanılabilir bir substrat olduğu görülmektedir. Büyümeyi en fazla destekleyen azot kaynağı olarak 13. değişken olan corn steep liquor belirlenmiştir. Büyüme maddelerinden giberellik asit ve mineral maddelerden $CaCl_2$ ve KH_2PO_4 ilavesi biyoprotein üretimini arttırmaktadır (Şekil 4, Tablo 1). Bu verilerin birlikte değerlendirilmesi ile *Pleurotus ostreatus* tarafından biyoprotein üretiminin köpek yemi, laktoz, corn steep liquor, giberellik asit, $CaCl_2$ ve KH_2PO_4 içerikli olarak tasarlanacak bir besiyerinde maksimum olacağı değerlendirilmiştir. Böylece *Pleurotus ostreatus* izolatu'nun biyoprotein üretimini optimum şekilde gerçekleştireceği çevresel koşullar saptanmış ve besiyeri içeriği Plackett-Burman tasarımı ile başarılı biçimde belirlenmiş olmaktadır. *Pleurotus ostreatus* OBCC 1021 izolatu'nun bu çalışma ile tasarlanan çevresel koşullar ve besiyeri kullanılarak biyoreaktörde büyüme kinetiğinin incelenmesi sonraki çalışmaların hedefi olacaktır.

Kaynaklar

- Adebayo-Tayo B.C., Jonathan S.G., Popoola O.O. and Egbomuche R.C. 2011. Optimization of growth conditions for mycelial yield and exopolysaccharide production by *Pleurotus ostreatus* cultivated in Nigeria. *African Journal of Microbiology Research*, **5**, 2130-2138.
- Anonymous, 2011. World population to 2300, United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division Reports, 240 pp.
- Breitenbach, J. and Kranzlin, F., 1986. Fungi of Switzerland, Vol. II. Non Gilled Fungi, Verlag Mykologia, 412 pp.
- Fasiola T.R., Gbolagade J.S. and Fasidi I.O., 2007. Nutritional requirements of *Volvariella speciosa* (Fr. Ex. Fr.) Singer, a Nigerian edible mushroom. *Food Chemistry*, **100**, 904–908.
- Gern, R.M.M., Wisbeck, E., Rampinelli, J.R., Ninow, J.L. and Furlan, S.A., 2008. Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides. *Bioresource Technology*, **99**, 76–82.
- Gbolagade J.S., Fasidi I.O., Ajayi E.J. and Sobowale A.A., 2006a. Effect of physico-chemical factors and semi-synthetic media on vegetative growth of *Lentinus subnudus* (Berk.), an edible mushroom from Nigeria. *Food Chemistry*, **99**, 742–747.
- Gbolagade, J., Sobowal, A. and Adejoy, D., 2006b. Optimization of submerged culture conditions for biomass production in *Pleurotus florida* (Mont.) Singer, a Nigerian edible fungus. *African Journal of Biotechnology*, **5**, 1464-1469.
- Gregori, A., Svagelj, M., and Pohleven, J., 2007. Cultivation Techniques and Medicinal Properties of *Pleurotus* spp. *Food Technology and Biotechnology*, **45**, 238–249.
- Hanai H., Ishida S., Saito C., Maita T., Kusano M., Tamogami S. and Noma M., 2005. Stimulation of mycelia growth in several mushroom species by rice husks. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **69**, 123-127.
- Jonathan S.G. and Fasidi I.O., 2001. Studies on phytohormones, vitamins and mineral element requirements of *Lentinus subnudus* (Berk) and *Schizophyllum commune* (Fr. Ex. Fr) from Nigeria. *Food Chemistry*, **75**, 303-307.
- Jonathan S.G. and Fasidi I.O., 2003. Studies on *Psathyrella atroumbonata* (Pegler), a Nigerian edible fungus. *Food Chemistry*, **81**, 481-484.
- Jonathan S.G. Fasidi I.O. and Ajayi E.J., 2004. Physico-Chemical studies on *Volvariella esculenta* (Mass) Singer, a Nigerian edible fungus. *Food Chemistry*, **85**, 339-342.
- Jonathan S.G., Bawo D.D.S., Adejoye D.O. and Briyai O.F., 2009. Studies on Biomass Production in *Auricularia polytricha* Collected from Wilberforce Island, Bayelsa State, Nigeria. *American Journal of Applied Sciences*, **6**, 182-186.
- Kawagishi H., Hamajima K., Takanami R., Nakamura T., Sato Y., Akiyama Y., Sano M. and Tanaka O., 2004. Growth promotion of mycelia of the Matsutake mushroom *Tricholoma matsutake* by D-isooleucine, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **68**, 2405-2407.
- Kurbanoglu E.B. Algur O.F. and Zulkadir A., 2004. Submerged production of edible mushroom *Agaricus bisporus* mycelium in ram horn hydrolysate, *Industrial Crops and Products*, **19**, 225-230.
- Le J., Hu S. and Xu M. 2007. Optimization of submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharide by *Pleurotus nebrodensis*. *Annals of Microbiology*, **57**, 389-393.
- Lee B.C., Bae J.T., Pyo H.B., Choe T.B., Kim S.W., Hwang H.J. and Yun J.W. 2004. Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. *Enzyme and Microbial Technology*, **35**, 369-376.
- Moser, M., 1978. Keys to Agarics and Boleti, Roger Philipps, Stuttgart, 535 pp.
- Mukhopadhyay R., Chatterjee S., Chatterjee B.P. and Guha A.K., 2005. Enhancement of biomass production of edible mushroom *Pleurotus sajor-caju* grown in whey by plant growth hormones. *Process Biochemistry*, **40**, 1241–1244.
- Örücü E. ve Kanıbir H., 2005. Yumurta Pazarındaki Sorunlara Pazarlama Anlayışı Perspektifinden Bir Bakış ve Çözüm Önerisi, *Balıkesir Üniversitesi SBE Dergisi*, **8**, 145-164.
- Özkan, C., Bahadır, A., Karaduman, A.B., Özbulut, N., Yamaç, M., 2011. *Polyporus squamosus* (Huds.) Fr. OBCC 5003 suşu ile biyomas üretimi üzerine çalışmalar, *Journal of Fungus (Mantar Dergisi)*, **2(1-2)**, 37-47.
- Özkan, C. ve Yamaç, M., 2012. Bazı Yenebilir Makrofungus İzolatlarının Biyoprotein Üretimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi, IX. Türkiye Yemeklik Mantar Kongresi, 18-20 Ekim 2012, Denizli.
- Papaspyridi L.M., Katapodis P., Gonou-Zagou Z., Kapsanaki-Gotsi E. and Christakopoulos P. 2010. Optimization of biomass production with enhanced glucan and dietary fibres content by *Pleurotus ostreatus* ATHUM 4438 under submerged culture. *Biochemical Engineering Journal*, **50**, 131-138.
- Plackett, R.L. and Burman, J.P. 1946. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, **33**, 305-325.
- Postemsky P., Gonzalez Matute R., Figlas D., and Curvetto N., 2006. Optimizing *Grifola sordulenta* and *Grifola gargar* growth in agar and liquid nutrient media. *Mycologica Aplicata Internazionale*, **18**, 7-12.
- Wu J.Z., Cheung P.C.K., Wong K.H. and Huang N.L., 2003. Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer—Part 1: physical and chemical factors affecting the rate of mycelial growth and bioconversion efficiency. *Food Chemistry*, **81**, 389-393.