

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**BİYOTEKNOLOJİK YÖNTEMLERLE BASIDIOMYCETES TÜRÜ
MANTARLARDAN FONKSİYONEL ÜRÜNLERİN ELDESİ**

Eroll BYTYQİ

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ŞUBAT 2018

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**BİYOTEKNOLOJİK YÖNTEMLERLE BASIDIOMYCETES TÜRÜ
MANTARLARDAN FONKSİYONEL ÜRÜNLERİN ELDESİ**

Eroll BYTYQİ

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ŞUBAT 2018

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOTEKNOLOJİK YÖNTEMLERLE BASIDIOMYCETES TÜRÜ
MANTARLARDAN FONKSİYONEL ÜRÜNLERİN ELDESİ**

**Erol BYTYQİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ŞUBAT 2018

TC.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİK YÖNTEMLERLE BASIDIOMYCETES TÜRÜ
MANTARLARDAN FONKSİYONEL ÜRÜNLERİN ELDESİ

Erol BYTYQİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 26/02/2018.... tarihinde jüri tarafından Oybirliği /~~Oyçokluğu~~ ile kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Barçın KARAKAŞ BUDAK (Danışman)

Doç. Dr. İrfan TURHAN

Yrd. Doç. Dr. Hatice Reyhan ÖZİYCI

Barçın

I. Turhan

Hatice Reyhan

ÖZET

BİYOTEKNOLOJİK YÖNTEMLERLE BASIDIOMYCETES TÜRÜ MANTARLARDAN FONKSİYONEL ÜRÜNLERİN ELDESİ

Eroll BYTYQİ

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Barçın KARAKAŞ BUDAK

Şubat 2018; 49 sayfa

Basidiomycetes sınıfından pek çok mantar türü sağaltıcı etkileri için Uzak Doğu'da binlerce yıl kullanılan günümüzde de yaygın olarak pek çok spesifik kimyasalın veya kimyasal grubunun üretimi için başvurulmuş biyolojik kaynaklardır. *Trametes versicolor* bir beyaz çürükçül mantardır ve hem enzim üretme kapasitesi hem de biyoaktif bileşenlerin üretiminde değerlendirilebilmesi bakımından bu sınıf içinde yer alan en önemli türlerden biridir. Gerek ülkemizde, gerek yurt dışında bu türden mantarlardan elde edilebilecek polisakkaritler, enzimler ve diğer biyoaktif bileşikler üzerine çalışmalar bulunmaktadır.

T. versicolor'un misel yapısında bulunan β -glukanların ve özellikle de polisakkarit peptit (PSP) olarak adlandırılan (bağışıklık tetikleyici, kanser önleyici) özellikler göstermesi sebebiyle sağaltıcı etkileri bulunmaktadır. *T. versicolor*'un en önemli endüstriyel uygulama alanlarından biri enzim üretimidir. Bu mantarın lignin peroksidaz, mangan peroksidaz ve lakkaz enzimlerini sentezlemektedir. Lakkaz enzimi gıda, tekstil, kağıt vb. pek çok sanayi dalında aranılan çok fonksiyonlu bir enzimdir. Lakkaz enzimi gıda endüstrisinde meyve suyu durultma, birada durultma ve stabilizasyon, şarapta stabilizasyon, fırın ürünlerinde polimer çapraz bağlama ile tekstür modifikasyonu, gıda atık sularının arıtılmasında vb. kullanılmıştır. Lakkaz enzim miktarını artırmaya yönelik çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmada enzim miktarının artırmak için keçiyoynuzu posası değerlendirilmiştir. Keçiyoynuzu, Akdeniz bölgesinde yetişen ve pekmez üretiminde değerlendirilen önemli bir meyvedir. Keçiyoynuzundan pekmez elde edilirken geriye kalan posa selülozik yapıdadır. Diğer bir deyişle, keçiyoynuzu posası pekmez üretiminin bir atık ürünüdür.

Bu çalışmada *Trametes versicolor* CCBAS614 ve CCBAS1399 mantarları ile %0, 3, 6 ve 10 oranında kurutulmuş keçiyoynuzu posası ilave edilerek 7 gün boyunca fermantasyon süpernatant ortamında lakkaz enziminin değişimi incelenmiştir. Fermantasyonun son gününde biyokütle ortamında ise toplam glukan, β -glukan, α -glukan, diyet lif, kül ve protein miktarlarında meydana gelen değişikliklerde incelenmiştir. *T. versicolor* CCBAS614 kültürü ile inoküle edilen %10 seviyesinde keçiyoynuzu posası fermantasyon ortamında 5. günde en yüksek lakkaz miktarı (27874.22 U/L) saptandı. Her iki suş karşılaştırıldığında en yüksek toplam glukana *T. versicolor* CCBAS614 kültürü %10 keçiyoynuzu posası (%18.29), aynı şekilde α -glukan %10 keçiyoynuzu posası içeren örneklerde (%10.71) bulundu. β -glukan ise *T. versicolor* CCBAS1399 kültürü ile inoküle edilen %3 keçiyoynuzu posası ortamında

(%9.15) olarak bulundu. Proteine bakıldığında ise *T. versicolor* CCBAS1399 kültürü %3 keçiyoynuzu posası içeren kuru örneklerde en yüksek (%10.58) saptandı. Kül ise *T. versicolor* CCBAS614 kültürü ile %10 keçiyoynuzu posası kuru örneklerde (%10.83), diğer suş aynı şekilde *T. versicolor* CCBAS1399 kültürü ile %10 keçiyoynuzu kuru örneklerinde (%10.90) bulundu. Her iki suшта kül bakımında istatistiksel fark yoktur. Son olarak diyet lif bakımından *T. versicolor* CCBAS614 suşunda (%37.76) ve *T. versicolor* CCBAS1399 kültüründe (%37.21) bulundu. Her iki suшта diyet lif bakımında istatistiksel fark olmadığı görüldü.

T.versicolor CCBAS614 suşu ile %10 keçiyoynuzu posası içeren fermentasyon ortamı ile gerçekleştirilen fermentasyonda lakkaz enzimi, toplam glukan, α -glukan miktarında artış meydana gelmiştir. *T. versicolor* CCBAS1399 ile %3 keçiyoynuzu fermentasyonu ise protein ve β -glukan miktarında artış sağlandı.

ANAHTAR KELİMELEER: Basidiomycetes, Keçiyoynuzu posası, Lakkaz enzimi, *Trametes versicolor*.

JÜRİ: Yrd. Doç. Dr. Barçın KARAKAŞ BUDAK

Doç. Dr. İrfan TURHAN

Yrd. Doç. Dr. Hatice Reyhan ÖZİYCI

ABSTRACT

PRODUCTION OF FUNCTIONAL PRODUCTS FROM FUNGI BELONGING TO THE BASIDIOMYCETES sp WITH BIOTECHNOLOGICAL METHODS

Erol BYTYQI

M.Sc. Thesis in Food Engineering

Supervisor: Asst. Prof. Dr.Barçın KARAKAŞ BUDAK

February 2018; 49 pages

Fungi belonging to Basidiomycetes have been consumed in the Far East for thousands of years for their prophylactic properties. Today, they are important biological sources utilized for the production of specific chemicals and chemical groups. *Trametes versicolor* is a white rot fungus and is one of the most important species in this group in terms of its high enzyme production capacity as well as its capability of synthesising specific bioactive compounds. Studies have been carried out in Turkey and abroad on the production of polysaccharides, enzymes and other bioactive compounds using this species of fungus.

β -Glucan structures and especially polysaccharopeptide (PSP) complexes present in the mycelial mass in *Trametes versicolor* have been implicated in providing therapeutic benefits (i.e. immune stimulatory and anti-cancerogenic). One of the most important industrial application areas of *T. versicolor* is the production of enzymes. This fungus synthesizes lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase enzymes. Laccase enzyme, on the other hand, is a multifunctional enzyme demanded by many sectors including food, textile and paper industries. Laccase enzyme is used for food industry for juice clarification, sedimentation and clarification in beer, wine stabilization, textural modification, bakery products with polymer cross-linking, used for the reclamation of food wastewaters. There are studies to increase the amount of laccase enzyme. In this study, the carob pulp was evaluated to increase the amount of enzyme. Carob is an important fruit grown in the Mediterranean region and evaluated in the production of molasses. When molasses is obtained from carob, the remaining pulp is cellulosic. In other words, the carob pulp is a waste product of molasses production. In this study, the change of laccase enzyme in the fermentation supernatant medium was investigated for 7 days by adding 0, 3, 6 and 10% carob pulp with two strains *Trametes versicolor* CCBAS614 and *Trametes versicolor* CCBAS1399 fungi. On the last day of fermentation, changes in total glucan, β -glucan, α -glucan, dietary fiber, ash and protein were investigated in the biomass medium.

The highest laccase activity was found in *Trametes versicolor* CCBAS614 in media containing 10% carob pulp on day 5 of fermentation at 27,874.23 U/L. The highest total glucan *T. versicolor* CCBAS614 culture was found to contain 10% carob pulp (18.29%) and α -glucan 10% carob pulp (10.71%) as compared to both strains. β -glucan content (9.15%) were found in *Trametes versicolor* CCBAS1399 and 3% level carob pulp fermentation medium. When the protein was examined, the culture of *T.*

versicolor CCBAS 1399 was highest (10.58%) in dry samples containing 3% carob pulp. The ash was found in *T. versicolor* CCBAS614 culture and in 10% of carob pulp samples (10.83%). The other strain was also found in 10% carob pulp samples (10.90%) with protein *T. versicolor* CCBAS1399 culture. There is no statistical difference in ash maintenance in both strains. Finally, dietary fiber was found in *T. versicolor* CCBAS614 strain (37.76%) and in *T. versicolor* CCBAS1399 culture (37.21%). There was no statistically significant difference in dietary fiber care in both strains.

By summarizing the overall effect of carob pulp, fermentation of *T.versicolor* CCBAS614 with 10% carob increased the enzyme laccase, total glucan and α -glucan. On the other hand, 3% carob fermentation with *T. versicolor* CCBAS1399 increased protein and β -glucan positively.

KEYWORDS: Basidiomycetes, Carob pulp, Laccase enzyme, *Trametes versicolor*.

COMMITTEE: Asst. Prof. Dr. Barçın KARAKAŞ BUDAK

Assoc. Prof. İrfan TURHAN

Asst. Prof. Dr. Hatice Reyhan ÖZİYCI

ÖNSÖZ

Basidiomycetes sınıfından pek çok mantar sağlığa yararlı etkileri ile bilinmektedir. Başta Japonya olmak üzere farklı ülkelerde Basidiomycetes sınıfındaki mantarların çay, kahve gibi gıda ürünlerle kombine edildiği yenilikçi gıdalar bulunmaktadır. Ülkemizde ise son yıllarda mantar üreticimi artmıştır. Mantar üretiminde hem sıvı ortamda gerçekleştirilen biyoteknolojik üretim hem de odun v.b selülozik materyalin değerlendirildiği katı fazda basit üretim yöntemleri uygulanmaktadır. Amaç enzim üretimi olduğu taktirde sıvı kültür fermantasyonu üretimi katı kültür fermantasyonundan daha fazla tercih edilmektedir. Sıvı ortamda üretim sayesinde elde edilen enzimi saflaştırmak daha pratik ve düşük maliyetli olmaktadır. Gerek sıvı gerekse de katı kültür fermantasyonu üretimde çoğu zaman kullanılan ortam bazı besin öğelerince zenginleştirilmektedir. Bu çalışmada keçiboynuzu pekmezi üretimden arda kalan selülozik madde olan keçiboynuzu posası ile zenginleştirme yapılarak *T. versicolor* mantarıyla yeni biyoteknolojik ürünler elde edilmiştir.

Bu çalışmanın adını koyarak bana bu yönde araştırma fırsatı veren danışmanım Yrd. Doç. Dr. Barçın KARAKAŞ BUDAK, yapıcı eleştirilerinden dolayı Prof. Dr. Mehmet İNAN'a, Uzm. Dr. Ebru KAYA BAŞAR'a, çalışmamın her aşamasında ilgilerini yardımlarını eksik etmeyen sayın Gürkan YILMAZ'a, Eda KABACAOĞLU'na, Arş. Gör. Fatma ERSÖZ'e, destekleyici ekip olarak Seda İÇEN'e, Özgül GÜZEL'e, Merve HADİMİOĞLU'na, her zaman yanımda olan eşim Ünzile BÜTÜÇ'e ve annem Nazmiye BÜTÜÇ'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	3
2.1. Basidiomycetes Türü Mantarlar	3
2.1.1. <i>T. versicolor</i>	4
2.1.1.1. <i>T.versicolor</i> mantarının biyoaktif özellikleri	5
2.1.1.2. Lakkaz enzimi ve endüstriyel uygulamaları	7
2.2. Keçiboynuzu (<i>Ceratonia siliqua</i>).....	11
3. MATERYAL ve METOT	13
3.1. Materyal	13
3.2. Kültür Suşu.....	13
3.2.2. Örnek kültür	13
3.2.3. Mantar türlerinin sıvı ortamda geliştirilmesi	13
3. 3. Analizler	14
3.3.1 Mantar türlerinde kuru madde miktarı tayini	14
3.3.2. Lakkaz enzimi analizi	14
3.3.3. Toplam glukan, α -glukan ve β -glukan analizi	15
3.3.3.1. Toplam glukan analizi.....	16
3.3.3.2. α -glukan analizi.....	16
3.3.3.3. Toplam glukan, α -glukan ve β -glukan miktarının hesaplanması	16
3.3.4. Protein miktarı tayini (Mikro Kjeldahl Yöntemi).....	17
3.3.5. Kül tayini	18
3.3.6. Toplam diyet lifi analizi.....	19
3.3.7. İstatistiksel değerlendirme	21
4. BULGULAR.....	22

4.1. <i>T. versicolor</i> CCBAS614 ve <i>T. versicolor</i> CCBAS1399 Suşları ile Gerçekleştirilen Fermantasyon.....	22
4.2. <i>T. versicolor</i> CCBAS614 ve <i>T. versicolor</i> CCBAS1399 Türü Mantarlar ile Keçiboynuzu Posası İçeren Örneklerde Lakkaz Aktivitesi.....	25
4.3. <i>T. versicolor</i> CCBAS614 ve <i>T. versicolor</i> CCBAS1399 Mantarlarının Biyokütlelerinde Tespit Edilen Toplam Glukan, β -Glukan ve α -Glukan Miktarları.....	29
4.4. <i>T. versicolor</i> CCBAS614 ve <i>T. versicolor</i> CCBAS1399 Türü Mantarlar ile Fermantasyon Sonunda Elde Edilen Toplam Protein, Kül ve Diyet Lif Miktarları.....	31
5. TARTIŞMA	37
6. SONUÇ	41
7. KAYNAKLAR	42
8. EKLER.....	48
Ek-1 Fermantasyon Ortamı Olarak Kullanılacak Besiyerleri ve Bileşimi.....	48
Ek-2 Lakkaz aktivitesi ölçümünde kör ve süpernatant miktarları	49
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “BİYOTEKNOLOJİK YÖNTEMLERLE BASİDIOMYCETES TÜRÜ MANTARLARDAN FONKSİYONEL ÜRÜNLERİN ELDESİ” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

Tarih 26/02/2018

Öğrencinin Adı Soyadı

Erol BYTYQİ

İmzası



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	: Yüzde
µl	: Mikrolitre
dev/dk	: Dakikadaki devir
dk	: Dakika
é	: Elektron
<i>g</i>	: Göreceli santrifüj kuvveti
g	: Gram
L	: Litre
M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
°C	: Santigrat derece
v/v	: Hacimce
w/w	: Ağırlıkça

Tezde ondalık yazım ayracı olarak nokta kullanılmıştır (“21.01”)

Kısaltmalar

ABTS	: 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
ATTC	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection)
BRM	: Biyolojik tepki düzenleyiciler (biological response modifier)
CCBAS	: Basidiomycetes Kültür Koleksiyonu (Culture Collection of Basidiomycetes)
Cys	: Sistein
DK	: Düzeltilmiş kör
DM	: Tanımlanmış besiyeri (defined medium)
DÖK	: Düzeltilmiş örneklerin kalıntısı

ELISA	: Enzime bağılı bağışıklık deneyi (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
EPR	: Elektron paramagnetik rezonans
EPS	: Ekzopolisakkaritler
GOPOD	: Glikoz Oksidaz/Peroksidaz Ayracı
H ₂ SO ₄	: Sülfürik asit
His	: Histidin
İPS	: Hücre içi polisakkaritler
KB	: Keçiboynuzu posası içeren besiyeri ortamı
KH ₂ PO ₄	: Mono potasyum fosfat
KKkülM	: Kalıntı kör kül miktarı
KKM	: Kalıntı kör miktarı
KOH	: Potasyum hidroksit
KPM	: Kör protein kalıntı miktarı
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
MgSO ₄ ·7H ₂ O	: Magnezyum sülfat heptahidrat
Na ₂ HPO ₄	: Disodyum fosfat
NaOH	: Sodyum hidroksit
NH ₃	: Amonyak
NH ₄	: Amonyum
(NH ₄) ₂ SO ₄	: Amonyum sülfat
NH ₄ NO ₃	: Amonyum nitrat
ÖKkülM	: Örneklerin kalıntı kül miktarları
ÖKM	: Örneklerin kalıntı miktarı
ÖKPM	: Örneklerin kalıntı protein miktarları
PDA	: Patates dekstroza agar (potato dextrose agar)
PSK	: Polisakarit krestin
PSP	: Polisakarit peptit
U	: Ünite

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. a) Kurutulmuş <i>T. versicolor</i> mantarı (Chu vd. 2002); b) <i>T. versicolor</i> CCBAS 1399 mantarı ile %10 seviyesinde keçiboynuzu içeren fermantasyon çalışmasından elde edilen biyokütle.....	4
Şekil 2.2. Fungal hücre duvarının yapısı (Sánchez vd. 2014)	5
Şekil 2.3. <i>C.versicolor</i> COV1 suşunda bulunan PSP'nin kimyasal yapısı (Yeung vd. 2006; Zhou ve Yang 1999)	6
Şekil 2.4. Swissprot veritabanına girişi yapılan <i>T. versicolor</i> lakkazının Cn3D görünüm (Bertrand vd. 2002).....	8
Şekil 2.5. Lakkaz enziminin kullanım alanları (Mate ve Alcalde 2017)	9
Şekil 2.6. Keçiboynuzu pekmezi elde edilmesi (Turhan vd. 2007)	11
Şekil 2.7. a) Keçiboynuzu meyvesi; b) Öğütülmüş keçiboynuzu c) Keçiboynuzu tohumu (El Batal vd. 2016).....	12
Şekil 3.1. Toplam diyet lifi analizi şematik gösterimi (Megazyme, İrlanda).	20
Şekil 4.1. a) E2(<i>T. versicolor</i> CCBAS614), F1-F2 (<i>T. versicolor</i> CCBAS1399) mantar kültürünün fermantasyonun 3. gününde görünümü; b) E1-E2, (<i>T. versicolor</i> CCBAS614), F1-F2 (<i>T. versicolor</i> CCBAS1399) mantar kültürünün fermantasyonun 4. gününde görünümü.	22
Şekil 4.2. a) A1-A2 (<i>T. versicolor</i> CCBAS614), %3 seviyesinde keçiboynuzu posa ve mantar kültürü içeren, A3-A4 (<i>T. versicolor</i> CCBAS1399), %3 seviyesinde keçiboynuzu posası ve mantar kültürünün fermantasyonun 4. gününde görünümü; b) A4 (<i>T. versicolor</i> CCBAS1399), %3 seviyesinde keçiboynuzu posası ve mantar kültürü içeren fermantasyonun 4. gününde görünümü.	23
Şekil 4.3.a) B3-B4 (<i>T. versicolor</i> CCBAS1399), %6 seviyesinde keçiboynuzu ve mantar kültürü içeren fermantasyonun 4. gününde görünümü; b) C3-C4 (<i>T. versicolor</i> CCBAS1399), %10 seviyesinde keçiboynuzu ve mantar kültürü içeren fermantasyonun 6. gününde görünümü.	23
Şekil 4.4. a) <i>T. versicolor</i> CCBAS614 mantar kültürü fermantasyonu; b) <i>T. versicolor</i> CCBAS1399 mantar kültürü fermantasyonu; c) <i>T. versicolor</i> CCBAS1399, %10 seviyesinde posa ve mantar kültürü fermantasyonların 7. gününde yaş ağırlıkları görünümü.	24
Şekil 4.5. a) B1-B2 <i>T. versicolor</i> CCBAS614 ve B3-B4 <i>T. versicolor</i> CCBAS1399 %6 seviyesinde keçiboynuzu posası içeren örneklerde 1. gün	

lakkaz aktivitesi görünümü; **b)** A1-A2 *T. versicolor* CCBAS614 ve A3-A4 *T. versicolor* CCBAS1399 %3 seviyesinde keçiyoynuzu posası içeren örneklerin 2. gün lakkaz aktivitesi görünümü; **c)** E1-E2 *T. versicolor* CCBAS614, F1-F2 *Trametes versicolor* CCBAS1399 mantar içeren örneklerin ve C3-C4 *T. versicolor* CCBAS1399 %10 seviyesinde keçiyoynuzu posası içeren örneklerin 5. gün lakkaz aktivitesi görünümü.....28

Şekil 4.6. a) Kör, C3-C4 , *T. versicolor* CCBAS1399 %6 seviyesinde keçiyoynuzu posası içeren örneklerin toplam glukan miktarı görüntüsü (Pembe renk değişimi); **b)** A1 , *T. versicolor* CCBAS614 %3 seviyesinde keçiyoynuzu posası içeren örneklerin alfa glukan miktarı görüntüsü.....31

Şekil 4.7. a) Filtrasyon işlemlerinde filtre yardımcı maddesi kizelgur; **b)** Toplam diyet lif analizinde etanol ile çöktürme.31

Şekil 4.8. a) *T. versicolor* CCBAS1399 mantar kültür içeren örneklerin toplam diyet lifi analizinde etanol ile çöktürme işlemi; **b)** *T. versicolor* CCBAS614 mantar kültür içeren örneklerin toplam diyet lif analizinde etanol ile çöktürme işlemi.32

Şekil 4. 9. Toplam diet lif analizinde süzme işlemi.32

Şekil 4.10. a) Filtrasyon işlemi tamamlandıktan sonra A1-A2 (*T. versicolor* CCBAS614) %3 seviyesinde keçiyoynuzu içeren örnekler; **b)** Gece boyu 105 °C’de kurutulan (*T. versicolor* CCBAS1399) %10 seviyesinde keçiyoynuzu içeren kalıntı miktarın görüntüsü.32

Şekil 4.11. a) Gece boyu 105 °C’de kurutulan F1- (%0 posa ilaveli ortamda geliştirilen *T. versicolor* CCBAS1399 ile elde edilen örnekten) kalıntı görüntüsü; **b)** Gece boyu 105 °C’de e kurutulan E2-(%0 posa ilaveli ortamda geliştirilen *T. versicolor* CCBAS614 ile elde edilen örnekten) kalıntı görüntüsü.....33

Şekil 4.12. a) Protein yakma ünitesi; **b)** Protein distilasyon ünitesi görüntüsü.33

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Lakkaz enzim kaynağı olan mikroorganizmalar ve uygulama alanları (Demiralp vd. 2015).	10
Çizelge 4.1. <i>T. versicolor</i> CCBAS614 ve <i>T. versicolor</i> CCBAS1399 kültürlerinin geliştirilmesi ile elde edilen kuru madde oranları	24
Çizelge 4.2. <i>T. versicolor</i> CCBAS614 suşu ile %3, 6, 10 keçiyoynuzu posa içeren örneklerde lakkaz aktivitesi miktarları (U/L)	25
Çizelge 4.3. <i>T. versicolor</i> CCBAS1399 suşu ile %3, 6, 10 keçiyoynuzu posa içeren örneklerde lakkaz aktivitesi miktarları (U/L)	26
Çizelge 4.4. <i>T. versicolor</i> CCBAS 614 ve <i>T. versicolor</i> CCBAS 1399 türü mantarlar ile keçiyoynuzu posası içeren fermantasyon örneklerinde toplam glukan, α -glukan ve β -glukan miktarları (yaş ağırlık)	29
Çizelge 4.5. <i>T. versicolor</i> CCBAS614 ve <i>T. versicolor</i> CCBAS1399 türü mantarlar ile keçiyoynuzu posası içeren fermantasyon örneklerinde % protein miktarları (kuru kalıntı)	34
Çizelge 4.6. <i>T. versicolor</i> CCBAS614 ve <i>T. versicolor</i> CCBAS1399 türü mantarlar ile keçiyoynuzu fermantasyon örneklerinde % kül miktarları	35
Çizelge 4.7. <i>T. versicolor</i> CCBAS614 ve <i>T. versicolor</i> CCBAS1399 türü mantarlar ile keçiyoynuzu posası içeren fermantasyon örneklerinde % diyet lifi miktarları (kuru kalıntı)	35

1. GİRİŞ

Bazitli mantarlar doğada odunsu maddelerin bozunmasında temel görev üstlenen ve dünyanın pek çok bölgesinde orman alanlarında bulunabilen mantardır. Bu mantarlar toprak ve odun içinde misel yapıları oluşturarak gelişir ve yayılır. Eşeyli üremek üzere ise gözle görülebilen şapka (basidiocarp) yapıları oluştururlar. Bu mantarlardan bazıları, örneğin *Pleurotus* türleri, gıda olarak tüketilebilir, pişirilerek yenilebilir niteliktedir. *Trametes* gibi türlerde ise şapka yapısı serttir ve yemeye elverişli değildir, ancak bu tür mantarlar da Uzak Doğu'da yıllardır çayı demlenerek tüketilebilen ürünler olmuştur.

Bazitli mantarların yetiştiriciliği genel olarak; diğer yenilebilir mantarların üretiminde olduğu gibi, şapkaların üretimi amacıyla ve katı faz fermantasyonu ile gerçekleştirilir. Bu tip üretimlerde çoğu zaman bazı besin öğelerince zenginleştirilmiş bileşimi ağırlıklı olarak selülozik materyalden oluşan zirai atıklar değerlendirilir. Katı faz fermantasyonu bu amaçla tasarlanan kapalı mekânlarda kontrollü ortam koşulları temin edilerek yürütülür.

Biyoteknolojik yöntemlerle fungal biyokütle üretimi, bu yöntemlere bir alternatiftir. Günümüzde gelişmiş batı ülkelerinde büyük ilgi gören ve vejeteryan/vegan beslenmeyi benimsemiş kişilerin tüketebileceği Quorn® gibi et ikamesi ürünler de biyoteknolojik yöntemlerle üretilen fungal biyokütle kullanılarak elde edilir. Ayrıca sıvı kültür içinde yapılan geliştirme ile elde edilen biyokütle çeşitli maddelerin özütlenmesi amacıyla değerlendirilebilir. Bunun da ötesinde, mikrobiyal kültürler sıvı ortamda geliştirildiklerinde besiyeri bileşiminde bulunan nişasta, selüloz, protein vb. karmaşık bileşenleri sindirebilmek için hücre dışına hidrolitik enzimler bırakır. Kimi biyoteknolojik süreçte hedeflenen ürünler, bu enzimler veya diğer metabolitlerdir.

Bu çalışmada Çek Cumhuriyeti Kültür Koleksiyonu ile irtibat kurularak *Trametes versicolor* CCBAS614 ve *Trametes versicolor* CCBAS1399 suşları temin edilmiştir. Nihai olarak bu aynı türün farklı mantar suşunun sıvı kültür içinde geliştirilmesi ve biyoteknolojik üretim potansiyellerinin araştırılması kararlaştırılmıştır.

Basidiomycetes türlerinden *Trametes versicolor* doğal ortamında odunun bozunmasında görev almakta, mikrobiyal kültür olarak katı faz veya derin kültür fermantasyonu ile üretilmektedir. Derin kültürde yetiştirildiğinde elde edilen miselyum (biyokütle) ve sıvı fazda salgılanan enzimler (özellikle de lakkaz), oldukça yüksek değere sahip ürünlerdir. Salgıladıkları enzimler ile özellikle çevresel atıkların biyoremediasyonu (çevresel atıkların biyolojik süreçlerle arıtılması) bu mantarların kullanıldığı başlıca uygulamalar olmuştur.

Biyoteknolojik araştırmaların bir bölümünde ise bu organizmaların ürettiği enzimlerin saflaştırılmasına ve karakterizasyonuna odaklanılmıştır. *Trametes* türlerinin salgıladığı ve bu yönde araştırılan enzimler arasında lignin peroksidaz, mangan peroksidaz ve lakkaz enzimleri sayılabilir. Lakkaz aromatik substratı kullanabilen, ortam koşullarında hem katabolik reaksiyon hem de polimerizasyon reaksiyonlarını katalize edebilen bir enzimdir. Gıda alanında da gıda atık suların arıtılması, meyve suyu durultma uygulamalarında kullanılabilen çevre dostu bir enzimdir. Biyoteknolojik yollarla elde edilen pek çok enzim vb diğer ürünler kıymetli ürünlerdir. Bununla birlikte ürünlere kazandırılan katma değer, büyük ölçüde üretim sonrası uygulanan

işlemlerebağlı olarak sağlanmaktadır. Gıda katkısı ve analitik amaçlı olarak kullanılacak enzim preparatlarının yüksek saflıkta ve aktivitede olması tercih edilen bir durumdur. Bu bağlamda sıvı kültürde hücre dışına salgılanan bir enzimin üretiminin hedeflenmesi enzimin daha saf halde elde edilebilmesi açısından önemlidir.

Trametes versicolor mantarının en önemli özelliklerinden biri bu mantardan izole edilen bazı bileşiklerin gıda takviyesi olarak kullanıldığında sağladığı faydadır. Bu bileşikler esas itibarıyla mantarın bileşiminde bulunan polisakkarit peptit yapısındaki maddelerdir. Bu maddelerin ve bunlara ilave olarak mantarların hücre duvarını oluşturan β -glukanların sağlık üzerinde çok yönlü olumlu etkisi söz konusudur. Üretimde, biyokütlenin de bir besin kaynağı olarak değerlendirilebilirliğinin araştırılması açısından elde edilebilen biyokütle miktarı ve içerdiği β -glukan miktarının belirlenmesi önemlidir.

Keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua*), veya diğer bir adıyla harnup, Akdeniz ikliminin hüküm sürdüğü yerlerde doğal olarak yetişen, baklagiller familyasından her daim yeşil çalı ya da ağaç formunda olan bir bitkidir. Keçiboynuzu meyvesinin kabuk bölümü (tohum zarfı) yüksek oranda şeker içerir ve olduğu gibi çerez olarak tüketilebilir. Meyvenin iç kısmında bulunan 10-12 adet çekirdek (tohum) doğrudan yenilebilir nitelikte olmamakla beraber keçiboynuzu zıncık üretiminde değerlendirilmektedir. Ayrıca, meyveler sıcak su ile özütlenerek keçiboynuzu pekmezi veya harnup pekmezi olarak bilinen ürün elde edilir. Harnup pekmezi Akdeniz bölgesinde yaşayan yerel halk tarafından geleneksel yöntemlerle üretildiği gibi bu ürünü ticari ölçekte üreten sanayii kuruluşları da bulunmaktadır. Sanayi kuruluşları tarafından pekmeze işlendiği takdirde keçiboynuzu hammaddesinden atık (veya yan ürün) olarak keçiboynuzu çekirdekleri ve posa elde edilir. Çekirdekler zıncık üretiminde değerlendirilebilir ancak atık posanın hayvan yemi olarak kullanımının dışında bir değerlendirme yolu bulunmamaktadır. Bu atık pulp büyük oranda selülozik yapıdadır ve bileşiminde lignin bulunur.

Bu çalışmada derin kültür fermantasyon yöntemiyle keçiboynuzu posasının *T. versicolor* mantarıyla zenginleştirilerek başta lakkaz olmak üzere, glukan, diyet lif, protein üzerine etkisi incelenmiştir.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Basidiomycetes Türü Mantarlar

Mantarların işlenmesi söz konusu olduğunda türün delimitasyonu (tanılanması) kritik bir noktadır ve başlangıç materyalin karakterize edilmesi ve belgelenmesi bakımından önemlidir. Bunun için geçen yüzyıl sonlarına kadar geçerli yöntem morfolojik inceleme olmakla birlikte günümüzde moleküler filogenetik yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır (Grienke vd. 2014).

Chang (2008)'e göre, yenilebilir mantar üretimini özetlemiş ve ayrı bir bölümde de mantar biyoteknolojisi konusunu ele almıştır. Mantar biyoteknolojisi, fermantasyon teknolojisi, mantar biyolojisi/mikrobiyolojisi ve biyoproses prensiplerinin uygulanması ile ilgilidir. Mantar nötrasötikleri (diyet takviyeleri, biyolojik tepki düzenleyicileri), misellerden elde edilebilen ve günümüzde giderek artan bir ilgi ile araştırılan bir grup maddedir. Diğer yandan; Singh ve Singh (2014), odun bozunmasında görev alan mantarların biyoteknolojik önemleri üzerine hazırladıkları derlemede, sadece enzim üreticisi kültürler olarak değerlendirme yapmıştır. Genel olarak literatürde bu yönde bir ayrışmanın fiilen mevcut olduğu, yani gerek derleme gerek araştırma makalelerinde söz konusu mantarların ya polisakkaritler ya da enzimler açısından biyoteknolojik üretimde değerlendirildiği gözlenmektedir. Bunun istisnası olabilecek çalışmalarında eş-zamanlı olarak ekzopolisakkarit peptitlerin ve lakkaz enziminin üretimini hedeflemiştir (Que vd. 2014). Bu konuda ulaşılabilen bir diğer çalışmada Tavares vd. (2014), *T. versicolor*'dan ekzopolisakkarit ve lakkaz üretim sürecinde morfolojik değişimleri incelemiştir.

Günümüzde tıbbi mantarların üretimi için en çok kullanılan yöntem yemeklik mantar yetiştiriciliğinde olduğu gibi kompostta üretimdir. Basidiomların oluşumu için gerçekleştirilen üretimler günümüzde üretimin %80-85'ine karşılık gelir ve bu tür üretim aylarca zaman alır (Elisashvili 2012). İster (katı kültür fermantasyonu ile) miselyum için ister basidiokarp için olsun bu tür üretimlerde kontrolü sağlamak ve kontaminasyonu önlemekle ilgili riskler oluşabilmektedir. Katı kültür ortamında miselyum üretimi gerçekleştirildiğinde katı fazın kendisinden kaynaklanan bileşiklerin üretim sonrası saflaştırma işlemleri ile uzaklaştırılması güçlük yaratmaktadır. Derin (sıvı) kültür fermantasyon üretimi bu bakımdan tıbbi mantarlardan biyokütle ve metabolitlerin üretimi için elverişli ve tercih edilmesi gereken bir alternatiftir (Tang vd. 2007).

Poliporlar (Polyporaceae s.l., Agaromycetes, Basidiomycota) dünya ormanlarında en dikkat çekici ve en fazla bulunan mantarlardır. Bu organizmalar arazide gözle görülebilen basidiomları ve porlu himenofor yapıları ile kolaylıkla teşhis edilebiliyor olmakla beraber mikrobiyolojik, kültürel ve biyolojik açıdan oldukça polifiletik ve çeşitlidirler (Rajchenberg 2011). Doğadaki temel görevleri ağaçların bozunması ile ilgilidir. Bu mantarların toprak altında veya odun içinde gelişen vejetatif kısım sayılabilecek misel (hifli) yapıları fruktifikasyon denilen bir dönüşümle basidiokarp adı verilen yapıları oluşturur. Basidiokarplar kabuk, gal, kıkırdak veya kâğıt şeklinde olabilmektedir (Kües ve Liu 2000). Basidiomycetes mantarlarının çoğunda hatta tamamında, basidiokarplarında, kültüre edilmiş misellerinde ve kültür sıvısında biyolojik olarak aktif polisakkaritler bulunur. Bu mantarlar ayrıca lektinler, laktonlar,

terpenoidler, alkaloidler, antibiyotikler ve metal şelatlama ajanları gibi sağaltıcı etkileri olan ikincil metabolitler de üretirler (Wasser 2011).

Basidiomycetes türü mantarların ürettiği β -glukanların ve/veya heteropolisakkaritlerin antitümör, bağışıklık tetikleyici ve sağaltıcı etkilerinin olduğu bilinmektedir. Bu mantarların yenilebilir mantarlar olması nedeniyle ürettikleri bu polisakkaritlerin gıda katkı maddesi veya gıda takviyesi üretiminde güvenle kullanılabilmesi söz konusudur (Giavasis 2014; Giavasis 2013; Ren vd. 2012). Bu mantarlar günümüzde fizyolojik olarak önemli etkileri olan bileşenleri içeren fonksiyonel gıdalar olarak kabul görmektedir (Kozarski 2014).

2.1.1. *T. versicolor*

Trametes, Agaricales takımında yer alan ve özellikle lignoselülozik materyalde gelişen beyaz pamuksu hiflere sahip çürükçül (saprofit) bir mantar cinsidir. *Trametes* cinsi, tıp, biyoteknoloji ve çevre koruma alanlarında büyük öneme sahiptir (Córdoba ve Ríos 2012). Taksonomi adıyla daha önceleri *Coriolus versicolor* veya *Polyporus versicolor*, yeni adı ile *Trametes versicolor* olarak anılan ve genel ismi 'hindi kuyruğu' olarak bilinen mantar türü araştırmacılar için umut vadeden beyaz hifli mantar türlerinden biridir. *T. versicolor*'un kurutulmuş meyveleri Uzak Doğu'da yıllardır sıcak suda infüzyon şeklinde (çay gibi) tüketilmiştir. Çinlilere ait kaynaklarda 120 çeşidinin olduğu belirtilen bu mantar, yüz yıllarca pek çok hastalığın tedavisinde kullanılmıştır (Chu vd. 2002). *T. versicolor* mantarı solda Şekil 2.1 a'da görülebilir. Şekil 2.1 b'de ise fermantasyon çalışmasından elde edilen biyokütleyle ait bir görüntü verilmiştir.



(a)



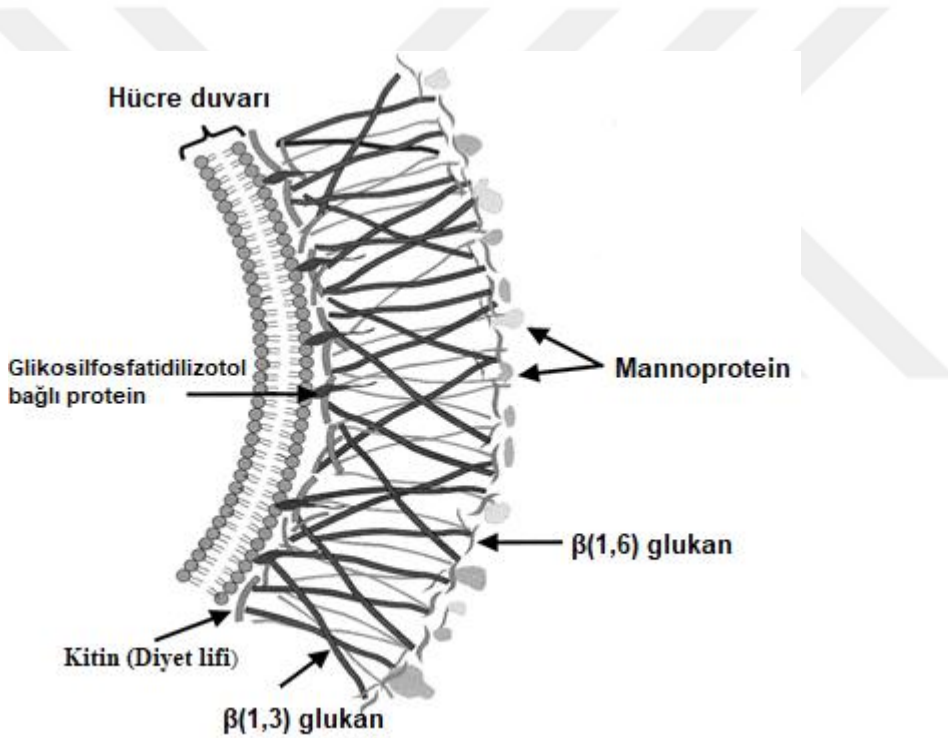
(b)

Şekil 2.1. a) Kurutulmuş *T. versicolor* mantarı (Chu vd. 2002); **b)** *T. versicolor* CCBAS 1399 mantarı ile %10 seviyesinde keçiyoynuzu içeren fermantasyon çalışmasında elde edilen biyokütle

T. versicolor'un en önemli endüstriyel uygulama alanlarından biri enzim üretimidir. Bu mantar lignin peroksidaz, mangan peroksidaz ve lakkaz enzimlerini sentezler. Enzimlerin hepsi mantarın yaşamsal faaliyeti açısından önemli olan lignin degradasyonunda etkili enzimlerdir (Córdoba ve Ríos 2012). Enzim fonksiyonunun yanı sıra lakkazın spor dayanımı rozomorf oluşumu, patojenez, basidiom oluşumu ve pigment sentezi gibi biyolojik olaylarda görev aldığı bilinmektedir (Maciel vd. 2010).

2.1.1.1. *T.versicolor* mantarının biyoaktif özellikleri

Fungal hücre duvarları (diyet lifi) kitin, diğer hemiselülozlar, mannanlar ve β -glukanlar içerir (Şekil 2.2). β -Glukanlar $\beta(1\rightarrow3)$, $\beta(1\rightarrow4)$ ve $\beta(1\rightarrow6)$ bağlar içeren homo- veya heteroglukan yapıda olabilmektedir ve mantarların sağlıkla ilgili pek çok olumlu etkisi bu bileşenlerden kaynaklanır (Manzi ve Pizziferrato 1999). Nitschke vd. (2011) geliştirdikleri kolorimetrik yöntemi kullanarak 100 g kuru *T. versicolor* biyokütlesinde 3.28 g β -glukan içeriği olduğunu tespit etmiştir. β -Glukanların analizi enzimatik, ELISA ve fluorometrik olarak da yapılabilmektedir ancak Nietsche vd. (2011), geliştirdiği yöntemin diğer yöntemlere göre bazı avantajlarının olduğu da bilinmektedir (Zhu vd. 2015). D-Glukanlar genel olarak misel biyokütlesinden veya basidiomdan sulu ve/veya alkali ekstraksiyon ile izole edilebilmektedir. Sulu ekstraksiyonun ilk aşamasında etanol ile yıkama yapılarak lipit ve apolar bileşikler uzaklaştırılabilir ve akabinde bazik bir çözelti ile (ör. %2'lik sıcak KOH ile) özütleme yapılabilir (Ruthes vd. 2015; Zhang vd. 2007).

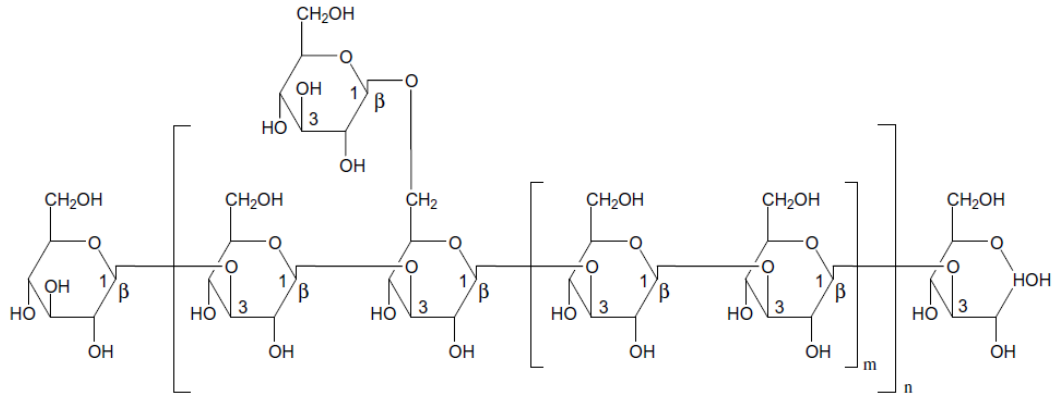


Şekil 2.2. Fungal hücre duvarının yapısı (Sanchéz vd. 2014)

Biyokütlenin haricinde, bu mantarların gelişme ortamlarına polisakkaritler salgıladığı bilinmektedir. Bunlar ekzopolisakkaritler (EPS) olarak adlandırılır (Wang vd. 2014), buna karşılık miselyumda bulunanlar ise literatürde hücre içi (intraselüler) polisakkaritler (IPS) (Hsu vd. 2013) veya endo-polisakkaritler olarak isimlendirilmektedir (Silva vd. 2013).

T. versicolor polisakkaritlerinden en önemlileri miselyumdan ekstrakte edilen polisakkarit peptit (PSP) ve polisakkarit krestin (PSK) fraksiyonlarıdır. Bu fraksiyonlarda protein peptid zincirine kovalent olarak bağlı polisakkaritte α -1,3

glikozidik ve β -1,4 glikozidik bağlar bulunur (Yang ve Zhang 2009; Ng 1998). PSK yapısında ayrıca β -1,6 yan zincirlerin de olduğu Kobayashi vd. (1995) tarafından belirtilmiştir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. *C.versicolor* COV1 suşunda bulunan PSP'nin kimyasal yapısı (Yeung vd. 2006; Zhou ve Yang 1999)

PSP ve PSK sırasıyla Japon ve Çin menşei ürünler olup derin kültür fermentasyonu veya katı faz fermentasyonu ile geliştirilen misellerden ekstrakte edilerek üretilen ticari öneme sahip maddelerdir. PSK *T. versicolor* CM-101 suşundan; PSP ise *T. versicolor* Cov-1 suşundan üretilir. Her ikisinin de fizyolojik etkileri benzer özelliktedir. Biyokütlenin kuru bazda yaklaşık %30 oranında polisakkaropeptit içerdiği belirtilmektedir (Cui vd. 2003). Bilindiği kadarıyla, Türkiye'de PSP/PSK üretimi yoktur ve PSP/PSK fiyatları yurt dışında farklı β -glukan içerikli (%40-60 β -glukan) tabletler halinde 30-95 €/27g civarında satışa sunulmaktadır. Türkiye'de preparat olarak yerli firmaların satışa sunduğu β -glukan içeren bazı bağışıklık düzenleyici takviyeler bulunabilmektedir (ör. İmmuneks® *Saccharomyces cerevisiae* β -glukanı içeren bir besin takviyesidir; 29TL/10mg β -glukan). Günlük 3 grama kadar *T.versicolor* mantarından elde edilen β -glukanın tüketiminin uzun yıllar sürdürebildiği ve sağlık üzerinde hiçbir olumsuz etkisinin görülmediği belirtilmektedir (Córdoba ve Ríos 2012).

T. versicolor polisakkaropeptitlerin bağışıklık düzenleyici veya biyolojik tepki düzenleyici (Biological Response Modifier, BRM) olarak etkileri oldukça iyi şekilde ortaya konulmuştur. Cheng ve Leung (2008), hazırladıkları derlemede PSK/PSK'nın farmakolojik etkilerini bağışıklık düzenleyici etki, anti-tümör etkisi, antimikrobiyal etki, anti-nosiseptif (ağrı hissini azaltıcı) etki, başlıkları altında özetlemiştir. Ramberg vd. (2010) polisakkaritlerin bağışıklık düzenleyici etkilerini ele aldıkları derlemede, *T. versicolor* glukanlarının insanlarda kanser karşıtı etkisinin olduğunu vurgulamıştır. Kobayashi vd. (1993) PSK'nın Japonyada anti-kanserojen olarak tüketildiğini ve pek az yan etkisi olduğu için uzun sürelerle kullanılabileceğini belirtmiştir. Unyanar vd. (2006), Adana'da izole edilmiş ve ATCC kültür koleksiyonuna girmiş bir *T. versicolor* suşu ile elde edilen preparatın anti kanserojen etkisinin olduğunu göstermiştir.

Mantar biyokütlesinde elde edilen polisakkarit ekstraktlarının antioksidan aktivite gösterdiği Kozarski vd. (2012) tarafından bildirilmiştir. Kozarski bu araştırma sonucunda, antioksidan aktivitenin polisakkarit fraksiyonunda bulunan α -glukanlar ve fenoller ile olumlu korelasyon gösterdiğini ortaya koymuştur.

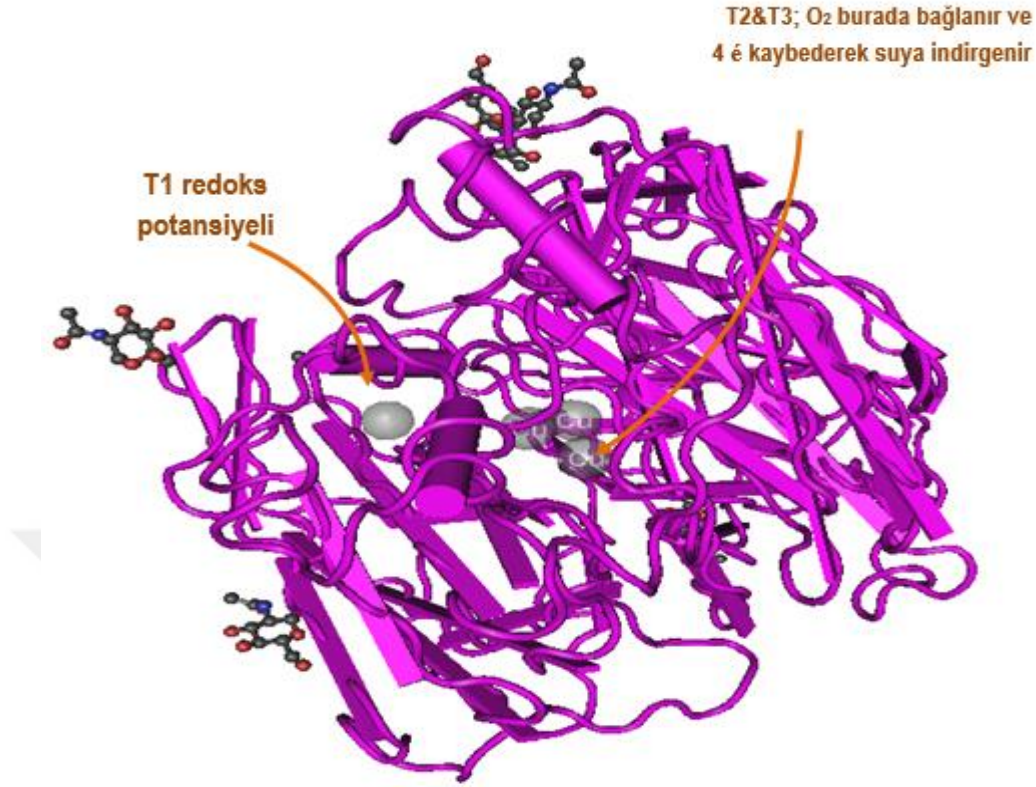
Ayrıca *T. versicolor* özütü PSP'nin antidiyabetik özellik göstererek şeker hastalığı semptomlarını azalttığı bildirilmektedir (Lindequist vd. 2005). Hsu vd. (2013) bu etki mekanizması ile ilgili olarak *T. versicolor* misellerinden ekstrakte ettikleri polisakkaritlerin α -glukosidaz aktivitesini baskılayıcı etkisini araştırmıştır.

T. versicolor polisakkaritlerinin ve PSP'lerinin bir diğer faydası ve potansiyel uygulama alanı, toksin oluşumunun engellenmesidir. Aflatoksin *Aspergillus parasiticus* küfünün ürettiği, gıdalarda ve yemde bulunması istenmeyen bir toksindir. Zjlac vd. (2006) *T. versicolor* polisakkarit ekstraktlarının toksin oluşumunu baskıladığını göstermiştir.

2.1.1.2. Lakkaz enzimi ve endüstriyel uygulamaları

Lakkazlar (benzendiol: oksijen redüktazlar; EC 1.10.3.2) eş zamanlı olarak moleküler oksijeni suya dönüştürmek suretiyle bir dizi aromatik bileşikler okside etme potansiyeline sahip çoklu-bakır oksidazlardır (multi-copper oxidases, MCO). Geniş yelpazede substrat kullanabiliyor olmaları bu enzimleri biyoteknoloji uygulamalarında aranan enzimler haline getirmiştir (Giardina vd. 2010). Lakkaz enzimi ilk olarak 1963'de Japonya'ya özgü bir ağacın öz suyunda tespit edilmiş ve 90'lı yıllarda bu enzime yoğun ilgi olmuştur. İlk ticari ürünü, Novozyme firmasınca (Novo Nordisk, Danimarka) 1996 yılında piyasaya sürülmüştür. Günümüzde ise çevreye duyarlı işlemlere olan talep bu enzimlere olan ilginin ve talebin katlanarak artmasına sebep olmuştur (Riva 2006). Bütün lakkazların yapılarında, bakır içeren T1, T2 ve T3 bölgeleri bulunur (Hakulinen vd. 2002). Bu üç bölge de lakkazın katalitik etkinliği için önemlidir. T2 ve T3 bölgeleri arasındaki boşluk substratın bağlanma noktasını oluşturur. Mononükleer bakır merkezi, iki His ve bir Cys kalıntısıyla trigonal olarak koordine olmuş bir Cu atomundan (Tip 1, T1) oluşur. Derin kültür fermantasyonu ile üretilen lakkazlar mavi renkte olmakta (Ng 2004) ve tip 1 (T1) bakır iyonu nedeniyle ~600 nm dalgaboyunda maksimum absorbans vermektedir. T1 ve T2 bakırları elektron paramagnetik rezonans (EPR) spektroskopisi ile tayin edilebilirler. T3 bakır çiftinde, bakırlar birbirlerine hidroksil köprüsü ile bağlandıklarından EPR de sinyal vermezler, ancak 330 nm de karakteristik bir absorbansa sahiptirler (Solomon vd. 1996).

Aktif formunda lakkaz enzimi dimerik veya tetramerik glikoproteinden oluşan bir holoenzim formundadır ve genelde bir monomerde 3 redoks bölgesine karşılık gelen dört metal iyonu bulunur (Madhavi ve Lele 2009).



Şekil 2.4. Swissprot veritabanına girişi yapılan *T. versicolor* lakkazının Cn3D görünüm (Bertrand vd. 2002)

Şekil 2.4’de *T. versicolor* lakkazının üç boyutlu yapısında 4 adet bakır iyonunun ve aktif bölgelerde 3 adet 2,5-ksilidin substratının yerleşimi görülebilir. Kaynağına bağlı olarak bu enzimin moleküler ağırlığı 60-100 kDa aralığında olabilmekte ve mantarlarda ağırlığının %10-25’i glikozilasyon kalıntılarından kaynaklanabilmektedir (Madhavi ve Lele 2009).

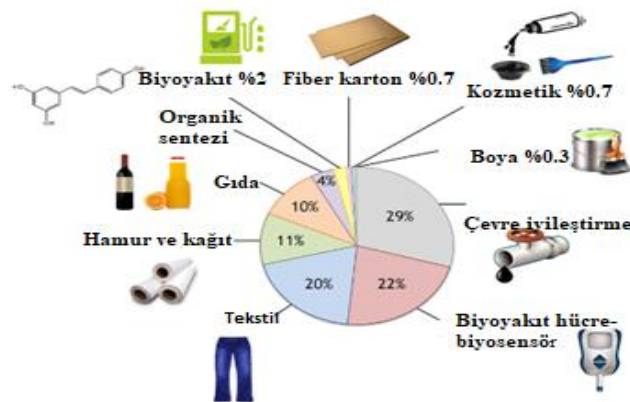
Lakkaz enziminde glikozilasyon, 4 noktadan gerçekleşebilmekte ve enzimin dayanımı, aktivitesi, substrat spesifikliği ve enzim mekanizması gibi özelliklerine doğrudan etkili olmaktadır (Bertrand 2002). Bazı mantar ve böcek hücreleri içinde de lakkazların bulunduğu tespit edilmiş olsa da literatüre geçmiş olan lakkazların pek çoğu hücre dışına salgılanan mikrobiyal enzimlerdir. Fungal lakkazların pH değerleri genellikle asidik olmaktadır (pH 3-7) (Madhavi ve Lele 2009).

Lakkaz enzimleri ile gerçekleşen tepkimelerin kaderi sentez işlemleri olabileceği gibi bozunma (degradasyon) yönünde de seyredebilir. Pek çok faktörün etkisine bağlı olarak lakkaz enzimi ile: 1) oksidatif eşleşme gerçekleşebilir ki bu dimerlerin ve/veya polimer türlerin sentezlenmesi ile sonuçlanır; 2) yeniden düzenleme tepkimeleri oluşabilir, bu durumda aynı yolla sonlanır ve belirli tepkime ürünleri oluşur; 3) fenolik olmayan bileşiklerde bağ kırılmaları ile sonuçlanan oksidasyon tepkimelerine aracı olabilir (Pezella vd. 2015). Bunlardan ilki boya ve polimer sentez işlemlerinin *in vitro* koşullarda yapılabilirliğini ilgilendirirken diğer ikisi ağartma, biyodönüşüm gibi pek

çok biyoteknolojik süreçte önemli işlevler anlamına gelir. Mikolasch ve Schauer (2009)'ın lakkazların yeni hibrit moleküllerinin ve biyomateryallerin sentezinde kullanımını anlattıkları derlemelerde lakkazlar, yüzün üzerinde aromatik substratı kullanabilen, ortam koşullarına bağlı olarak hem katabolik hem polimerizasyon reaksiyonlarını katalize edebilen, kararlı yapıda proteinler olarak tarif edilmiştir. Dolayısıyla, lakkaz enziminin fenolik ve fenolik olmayan pek çok substratı kullanabilme yeteneği mevcuttur ve enzim çok yönlü olarak farklı alanlarda uygulama bulabilmektedir.

Couto ve Herrera (2006), sonrada Pezella vd. (2015) lakkazların endüstriyel uygulama alanlarını açıklayan ayrıntılı derlemeler hazırlamışlardır. Minussi vd. (2002) ve Osma vd. (2010) ise, gıda endüstrisinde uygulamalarını ele aldıkları çalışmalarda lakkazın giderek artan uygulama alanları olduğunu vurgulamış ve bu enzime olan endüstriyel talebin giderek attığını ifade etmiştir. Bu derlemelerde altbaşlıklar halinde verilmiş bazı uygulamalar: meyve suyu durultma; birada durultma ve stabilizasyon; şarapta stabilizasyon; fırın ürünlerinde polimer çapraz bağlama ile tekstürün modifikasyonu; kakao, yağ vb gıdalarda organoleptik özelliklerin iyileştirilmesi; jelatinize pektin yapısının iyileştirilmesi; analitik yöntem ve biyosensörlerin geliştirilmesi; zeytin karasuyu, damıtım sıvı atıkları vb gıda atık sularının ıslahıdır. Bunun yanında diğer bazı uygulamalar ise; aroma bileşiklerinin (divanilin) sentezi (Krings vd. 2015); mikotoksinlerin (aflatoksin B1) degradasyonu (Alberts vd. 2009) ve akıllı ambalajlarda paket içi oksijen tespiti için kullanılabilecek indikatörde lakkaz kullanımı (Virtanen vd. 2014) olarak sayılabilir. Viswanath vd. (2014) fungal lakkazların atık suların ıslahı için değerlendirilmesini ele aldıkları derlemelerde lakkaz üreten fungal türlerin ve çeşitlerinin yeni lakkaz enzimlerinin tespiti açısından çok önemli olduğunu vurgulamıştır.

Mate ve Alcalde (2017), lakkaz enziminin kullanım alanlarını Şekil 2.5'de özetlemiştir. Lakkaz enzimi; çevresel iyileştirme (çevreye atılan kimyasalların giderilmesi), biyoyakıt hücre-biyosensör, tekstil (kot beyazlatma), kağıt hamuru-kağıt, gıda, organik sentezi, fiber karton, kozmetik, boya gibi geniş endüstri alanlarda kullanımına sahiptir.



Şekil 2.5. Lakkaz enziminin kullanım alanları (Mate ve Alcalde 2017)

Lakkaz enzimi kaynağı olan mikroorganizmalar ve uygulama alanları Çizelge 2.1’de verilmiştir. Bu çizelgede *T. versicolor* türünden lakkaz kaynağının bütün uygulama alanlarında kullanılabildiği görülmektedir.

Çizelge 2.1. Lakkaz enzim kaynağı olan mikroorganizmalar ve uygulama alanları (Demiralp vd. 2015).

Uygulama Alanı	Lakkaz Kaynağı	Uygulama Alanı	Lakkaz Kaynağı
Boyaların Renk Giderimi	<i>Aspergillus niger</i> <i>Cerrene unicolor</i> <i>Coriolopsis gallica</i> <i>Coriolopsis rigida</i> <i>Funalia trogii</i> <i>Gaeumannomyces graminis</i> <i>Irpex lacteus</i> <i>Myceliophthora thermophila</i> <i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> <i>Polyporus pinsitus</i> <i>Pleurotus eryngii</i> <i>Sclerotium rolfsii</i> <i>Streptomyces cyaneus</i> <i>Streptomyces coelicolor</i> <i>Streptomyces psamaticus</i> <i>Streptomyces viridosporus</i> <i>Trametes hirsuta</i> <i>Trametes modesta</i> <i>Trametes trogii</i> <i>Trametes versicolor</i> <i>Trametes villosa</i>	Biyosensörler	<i>Agaricus bisporus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Cerrena unicolor</i> <i>Coriolus hirsutus</i> <i>Coriolus versicolor</i> <i>Myceliophthora thermophila</i> <i>Rigidoporus lignosus</i> <i>Rhus vernicifera</i> <i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Pyricularia oryzae</i> <i>Polyporus pinsitus</i> <i>Trametes versicolor</i>
		Sıvı atık muamelesi	<i>Coriolopsis gallica</i> <i>Gliocladium virens</i> <i>Lentinula edodes</i> <i>Coriolopsis tigrinus</i> <i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Pleurotus spp.</i> <i>Pycnoporus coccineus</i> <i>Rhus vernicifera</i> <i>Trametes sp.</i> <i>Trametes versicolor</i>
Ksenobiyotiklerin Parçalanması	<i>Chaetomiaceae</i> <i>Cladosporium sphaerospermum</i> <i>Coprinus cinereus</i> <i>Coriolopsis gallica</i> <i>Coriolus hirsutus</i> <i>Coriolus versicolor</i> <i>Myceliophthora thermophila</i> <i>Panus tigrinus</i> <i>Polyporus pinsitus</i> <i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> <i>Pyricularia oryzae</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Rhus vernicifera</i> <i>Trametes pubescens</i> <i>Trametes hirsuta</i> <i>Trametes sp.</i> <i>Trametes versicolor</i> <i>Trametes villosa</i> <i>Trichophyton sp.</i>	Biyolojik Kağıt Hamuru	<i>Coriolus versicolor</i> <i>Fomes fomentarius</i> <i>Ganoderma collosum</i> <i>Lentinus edodes</i> <i>Merulius tremellosus</i> <i>Phlebia radiata</i> <i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Peniophora sp.</i> <i>Pycnoporus sanguineus</i> <i>Pseudomonas stutzeri</i> <i>Trametes versicolor</i> <i>Streptomyces cyaneus</i> <i>Trametes hirsuta</i>
		Gıda Endüstrisi	<i>Myceliophthora thermophila</i> <i>Polyporus pinsitus</i> <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> <i>Trametes hirsuta</i> <i>Trametes versicolor</i>
Organik Sentezi	<i>Coriolus hirsute</i> <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> <i>Phaseolus coccineus</i> <i>Pyricularia oryzae</i> <i>Trametes versicolor</i> <i>Trametes villosa</i>	Biyo-Beyazlatma	<i>Coriolus versicolor</i> <i>Pleurotus eryngii</i> <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> <i>Trametes versicolor</i>
		Kot Eskitme	<i>Trametes versicolor</i>

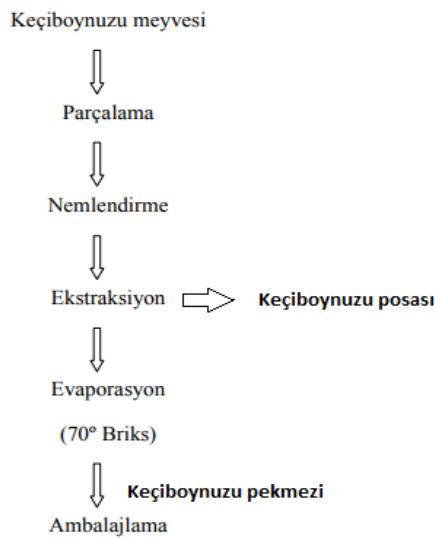
2.2. Keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua*)

Keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua*), baklagiller (Fabaceae) familyasından olup, Akdeniz ikliminde doğal olarak yetişen ve meyveleri yenen, ağaç formunda bir bitkidir (Karkacier vd. 1995). Keçiboynuzu meyvesi, yaklaşık % 90 meyve eti ve % 10 çekirdek kısmından oluşur. Keçiboynuzu meyvesinin çekirdekleri galaktomannan zengin olup gam üretiminde kullanılır. Bunun yanında; keçiboynuzu meyvesinin tüketim olgunluğuna ulaştığında % 91-92 toplam kuru madde, % 62-67 çözünür kuru madde ve bu çözünür kuru madde içinde % 34-42 sakaroz, % 10-12 fruktoz ve % 7-10 glukoz içerdiği bilinmektedir (Turhan vd. 2007).

Geleneksel olarak keçiboynuzu insan ve hayvan beslenmesinde kullanılmakla birlikte gıda endüstrisinde doğal gıda katkı maddeleri, endüstriyel ürünler, farmasötik ve kozmetik endüstrilerinde geniş bir uygulamaya sahiptir (Hafsa vd. 2017).

Keçiboynuzu tozunda %38.7 toplam şeker, %7.24 lif ve % 3.75 tanen bulunur (Yousif vd. 2000). Keçiboynuzu meyvesini en iyi şekilde ekstrakte edebilmek için yapılan çalışmalarda, ekstraksiyon koşulları olarak meyve tanecik boyutu (1 - 20 mm), ekstrakt sıcaklığı (20 - 100 °C), ekstrakte süresi (0.25 – 8 saat), su-meyve oranı (1 - 10) gibi farklı koşullar önerilmiştir (Kaya ve Özdemir 2015).

Sert yapısından dolayı preslenmesi mümkün olmayan keçiboynuzu meyvesinin su ile ekstrakte edilmesi daha uygundur ve elde edilen ekstrakt konsantre edilerek pekmeze işlenmektedir. Pekmez üretimi için genellikle keçiboynuzu zatkı üretmek amacıyla çekirdekleri uzaklaştırılmış keçiboynuzu kullanılır. Keçiboynuzu 1/5 ile 1/10 oranında su ile karıştırılarak ekstraksiyon gerçekleştirilir. Ekstraksiyonda difüzyon hızını artırmak amacıyla meyve parçaları önceden nemlendirilmekte ve ortam 80-90 °C'ye kadar ısıtılmaktadır (Turhan vd. 2007). Geleneksel olarak kesikli metotla ekstrakt elde edilirken, geriye kalan kısım keçiboynuzu posası olmaktadır. Şekil 2.6'de keçiboynuzu pekmezi eldesi için uygulanan işlem akışına yer verilmiştir.



Şekil 2. 6. Keçiboynuzu pekmezi elde edilmesi (Turhan vd. 2007)

Keçiboynuzu meyvesinin, tekstil, kağıt, ilaç, kozmetik, boya, petrol, alkol ve gıda endüstrisinde kullanılabilirliği ile ilgili pek çok çalışma vardır, meyvesi dışında ise işleme sonrası açığa çıkan posasında bir çok sanayi dalında kullanılabileceği belirtilmiştir (Turhan ve Karhan 2004). Genelde arta kalan posa selüloz içeriği yüksek olduğu için hayvan yemi olarak kullanılır (Demirtaş 2007). Keçiboynuzu, metabolik enerjiler açısından zengindir ve hayvan beslenmesi için yüksek enerji sağlayan ideal bir gıdadır (Hafsa vd. 2017).

Zunft vd. (2003) yapmış olduğu çalışmada keçiboynuzu posasının besin içeriğini %5.0 nem, %5.8 karbonhidrat (sakaroz-glukoz-fruktoz), %5.2 protein, %0.2 lipit, %3.36 kül, %6.2 çözünür posa, %68.4 çözünmez posa ve %2.84 suda çözünür polifenol olarak tespit etmiştir. Bu çalışmada, küspenin toplam kolestrol ve LDL kolesterolü belirgin düzeyde azaltığı vurgulanmıştır.

Başka bir çalışmada ise kuru öğütülmüş keçiboynuzunun %3.1 - 4.5 protein; %31.5 - 50.1 toplam şeker; %11.3 - 14.6 karbonhidrat; %0.5 - 0.8 lipit ve 2.05 - 4.60 mg/g polifenol içerdiği tespit edilmiştir (El Batal vd. 2016).

Raposo vd. (2016) yapmış oldukları bir çalışmada *Saccharomyces cerevisiae* ile yüksek yoğunlukta keçiboynuzunu kesikli fermantasyona uğratarak uygun maliyetli yüksek etanol verimi elde etmiştir.



Şekil 2. 7. a) Keçiboynuzu meyvesi; **b)** Öğütülmüş keçiboynuzu **c)** Keçiboynuzu tohumu (El Batal vd. 2016).

Yapılan çalışma, *T.versicolor* mantarıyla gerçekleştirilen derin kültür fermantasyonunda keçiboynuzu posasını değerlendirmeye yöneliktir. Keçiboynuzu pekmezinden arta kalan posa, yüksek selüloz içeriği sebebiyle hayvan yemi olarak kullanılabilir, ancak bu çalışmada alternatif olarak daha yüksek katma değer sağlayabilecek şekilde lakkaz enzimi üretiminde değerlendirilmek istenmiştir. Lakkaz enziminin ekstraselüler üretiminin yanı sıra, üretimde geliştirilen biyokütle örneklerinin de bileşimi araştırılarak ilerde yeni gıda ürünlerinde veya takviyelerinde kullanılabilecek materyallerin geliştirilmesi hedeflenmiştir. *T. versicolor* mantarı Uzak Doğu'da yıllardır sıcak suda infüzyon şeklinde (çay gibi) tüketilmiştir. Keçiboynuzu ise Akdeniz bölgesinde yetişen bir meyvedir. Keçiboynuzu posasının ham madde olarak değerlendirilebilmesine olanak sağlayacak yöntemlerin ulusal üretim potansiyelimize katkı sunacağı umulmaktadır.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

Araştırmada kullanılan keçiyoynuzu meyvesinin etli kısmı (8-10 mm) parçalanmış halde Antalya/Muratpaşa'da keçiyoynuzu pekmezi üreten Taç Ltd. Şti. tarafından parçalanmış halde temin edilmiştir. Ekstraksiyon için keçiyoynuzu öğütüldükten sonra 100 g keçiyoynuzuna 900 ml 80 °C sıcaklıkta su ile karıştırılmış ve 150 dev/dk'da 20 dk süreyle çalkalamaya bırakılmıştır (Turhan vd, 2007). Keçiyoynuzuna süzme işlemi uygulandıktan sonra tortu yine şişelere konulup 900 ml 80 °C sıcaklıkta su eklenerek 150 dev/dk'da 20 dk süreyle çalkalama sürdürülmüştür. Bu işlem 3 kez tekrarlanarak büyük ölçüde çözünebilir katılardan arındırılan keçiyoynuzu posası etüvde (105 °C) gece boyunca kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra değirmen kullanılarak öğütülmüş ve 1 mm çaplı eleklerden geçirilerek öğütülmüş keçiyoynuzu posası elde edilmiştir.

3.2. Kültür Suşu

Bu çalışmada Çek Cumhuriyeti'nde bulunan bir kültür koleksiyonu olan CCBAS'dan *Trametes versicolor* CCBAS614 ve *Trametes versicolor* CCBAS1399 suşları temin edilmiştir. Örnekler patates dekstrozu agar (PDA) besiyerine misel bırakacak şekilde yerleştirilerek mikrobiyal kültür hatları elde edilmiştir.

3.2.2. Örnek kültür

Fermantasyonda kullanılacak örnek kültür ise çalkalamalı inkubasyonda tanımlanmış besiyeri (Defined medium, DM) ortamında (PDA) besiyerinden alınan hifli materyal inoküle edilerek 7 gün süreyle çalkalamalı inkübatörde (Sartorius CERTOMAT®) 25 °C'de 150 dev/dk'da 250 ml erlenlerde 60 ml ortamda gerçekleşmiştir. Kültür ortamı 50 ml falcon tüpe alınarak paslanmaz çelik bilye (5 mm) ve girdap karıştırıcı yardımıyla steril ortam koşullarında homojenize edildikten sonra 1:2 oranında %50 (v/v) gliserol çözeltisi ile beraber, her bir kriyojenik vial 1.5 ml hacimde pipetlenerek -80 °C'de stok kültür şeklinde muhafaza edilmiştir. Daha sonra gerçekleştirilecek derin fermentasyonlarda her bir erlen için bir vial içeriği örnek kültür (inokulum materyal) olarak değerlendirilmiştir.

3.2.3. Mantar türlerinin sıvı ortamda geliştirilmesi

Fermantasyon, tanımlanmış besiyeri (Defined medium, DM) ortamına (w/w %0, 3, 6, 10; diğer bir ifadeyle, her bir erlen için 0, 1.8, 3.6, 6 g) keçiyoynuzu posası ve -80 °C'de muhafaza edilen stok kültürlerden eklenerek 7 gün süreyle çalkalamalı inkübatörde (Sartorius CERTOMAT®) 25 °C'de 150 dev/dk'da 250 ml erlenlerde 60 ml ortamda gerçekleşmiştir (Songulashvili vd, 2007). Kültür ortamına (10000 x g)'de 10 dk santrifüj (Allegra 25R Centrifuge) işlemi uygulanmıştır. Elde edilen pelet (biyokütle) daha sonra tartılarak yaş ağırlık belirlenmiştir. Biyokütle kurutma uygulanarak gerekli analizler için muhafaza edilmiştir. Fermantasyon ortamı kullanılan besiyeri ortamı ve bileşimi (Ek-1)'de verilmiştir. Fermantasyon 2 tekrarlı ve 2 paralelli gerçekleştirilmiştir.

3. 3. Analizler

3.3.1. Mantar türlerinde kuru madde miktarı tayini

Mantar örneklerinde kuru madde analizi ICC 109/1 yöntemine göre gerçekleştirilmiştir (ICC 1976). Fermantasyonun sonrasında elde edilen kültürler (10000 x g)'de 10 dk santrifüjlenerek (Allegra 25R Centrifuge) elde edilen biyokütle kurutulmuştur. Bu şekilde hem kuru madde analizi gerçekleştirilmiş, hem de diğer bazı bileşen analizlerinde kullanılacak kuru örnekler elde edilmiştir. Kurutma işlemi için örnekler 48 saat boyunca etüvde (Nüve FN 500) 45°C'de kurutulmuştur. Kurutma sonunda desikatöre alınarak soğutulan ve tartılan örnekler sabit tartım ağırlığına ulaşıldığı anlaşıncaya (3.1) eşitliği kullanılarak % kuru madde hesaplanmıştır.

$$\% \text{ KM} = \frac{(m_2 - m_1)}{(m)} \cdot 100 \quad (3.1)$$

% KM : Yüzde kuru madde oranı

m_2 : 48 saat sonraki kurutma kabı ve örneğin ağırlığı, g

m_1 : Sabit tartıma getirilmiş kurutma kabının ağırlığı, g

m : Tartılan örnek ağırlığı, g

3.3.2. Lakkaz enzimi analizi

Lakkaz aktivite ölçümü için her gün aynı saatte alınan örnekler (10000 x g)'de 10 dk santrifüjlendikten sonra (Allegra 25R Centrifuge) elde edilen süpernatantta spektrofotometrik olarak (Biochrom Libra-S50 UV-VIS spektrofotometre) 420 nm dalga boyunda absorbanst ölçülmüştür. Lakkaz enzim aktivitesi ölçümünde substrat olarak ABTS'nin (2,2'-azino-di-3-etil-benzo-tiazolin-sülfonat) kullanıldığı yöntem uygulanmıştır (Chandubhai, 2008 ve Kanberoğlu, 2006). Bu yöntemde göre, reaksiyon karışımı 100 µl 50 mM ABTS, 800 µl 0.1 M Na-asetat tamponu (pH 4.5) ve 100 µl süpernatant içermektedir. Kör ise 100 µl 50 mM ABTS, 800 µl 0.1 M Na-asetat tamponu (pH 4.5) ve 100 µl ayrı ayrı (%0, 3, 6, 10) seviyesinde keçiyoynuzu posası içeren besiyerinden oluşmuştur. Lakkaz aktivitesinde kör ve supernatant miktarları (Ek-2)'de verilmiş olup lakkaz aktivitesi formülü ise (3.2) eşitliğinde verilmiştir. Aktivite hesabı yapılırken 1 Ünite (U), 3 dakikada 1 µM ürün oluşturan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

- 1 Ünite (U) enzim, 3 dakika boyunca 1µmol konsantrasyondaki ABTS'yi dönüşüme uğratan lakkaz miktarıdır.
- DA: Absorbans değerindeki artış
- V: Toplam reaksiyon hacmi (ml) ⇒ 1
- DT: Reaksiyon süresi (saniye)
- DA/ DT: 3 dakikanın sonunda spektrofotometrede kinetik ölçülen absorbanst değeri.

- v: Enzim örneğinin hacmi (ml) $\Rightarrow 0.1$
- E_s = Substratın molar absorpsiyon katsayısı = $36000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$

$$\text{Lakkaz aktivitesi : (U/ml)} = \frac{(DA \cdot V \cdot 10^6)}{(E_s \cdot Dt \cdot v)} \quad (3.2)$$

3.3.3. Toplam glukun, α -glukun ve β -glukun analizi

Örnekler (10000 x g)'de 10 dk santrifüjlendikten (Allegra 25R Centrifuge) sonra elde edilen yaş biyokütle ortamında β -glukun, α -glukun, toplam glukun miktarları Mushroom and Yeast Beta Glucan Kit, (Megazyme, İrlanda) analiz kiti kullanılarak belirlenmiştir (Anonim 1).

Çözeltilerin hazırlanışı:

Sodyum Asetat Tamponu (200 Mm, pH 5):

Çözelti hazırlanırken 11.6 ml asetik asit (1.05 g/ml) 900 ml saf su içerisine alındı ve 4 M (16g/100 ml) sodyum hidroksit çözeltisi ile pH 5 ayarlanıp saf su ile 1 L'ye tamamlandıktan sonra 4 °C'de muhafaza edildi.

Sodyum Asetat Tamponu (1.2 M, pH 3.8):

Çözelti hazırlanırken 69.6 ml asetik asit (1.05 g/ml) 800 ml saf su içerisine alındı ve 4 M (16g/100 ml) sodyum hidroksit çözeltisi ile pH 3.8 ayarlanıp saf su ile 1 L'ye tamamlandıktan sonra oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Potasyum Hidroksit Tamponu (10 M):

Çeker ocak ortamında 561 g KOH tartılıp 700 ml saf su içerisinde karıştırıcıyla karıştırıldı. Çözelti oda sıcaklığına alınıp 1 L saf suya tamamlandıktan sonra oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Potasyum Hidroksit Tamponu (2 M):

Çeker ocak ortamında 112 g KOH tartılıp 800 ml saf su içerisinde karıştırıcıyla karıştırıldı. Çözelti oda sıcaklığına alınarak 1 L saf suya tamamlandıktan sonra oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Sülfürik Asit (12 M, %72 w/w):

Çeker ocak ortamında 640 ml konsantre asit (%98 saflıkta, 1.835 g) 300 ml saf su ile karıştırıldıktan sonra saf su ile 1 L'ye tamamlanıp oda sıcaklığında muhafaza edildi.

3.3.3.1. Toplam glukan analizi

Toplam glukan analizi, mantar ve keçiyoynuzu posası (%0, 3, 6, 10) içeren tüm örnekler uygulandı. Yaş mantar örnekleri 90 mg tartılıp 20 x 125 mm tüpler içerisine alındı. Buzda bekletilmiş 2 ml 12 M sülfürik asit tüplere ilave edildi. Tüpler 2 saat buzda bekletilerek hidroliz sağlandı. Örnekler saf su eklenerek 100 °C sıcaklıktaki su banyosunda inkubasyona bırakıldı. Süpernatanttan alınan 0.1 ml örneğe, 0.1 ml ekzo-1,3-β-glukanaz (20 U/ml), β-glukosidaz (4 U/ml) 200 mM (pH 5) çözeltisi eklendi. Karışım 40 °C'de 60 dk inkübasyona bırakıldı. Glukoz tayin reaktifinden (GOPOD Regent) 3 ml tüplere eklenerek 40 °C'de 20 dk inkubasyonda sonra spektrofotometrik olarak (Biochrom Libra-S50 UV-VIS Spektrofotometre) 510 nm dalga boyunda köre karşı absorbans değerleri okundu. Toplam glukan miktarı (3.3) eşitliğinde verilen formül kullanılarak hesaplanmıştır.

3.3.3.2. Alfa-glukan analizi

Yaş mantar örneklerinden 100 mg tartılıp 20 x 125 mm tüplere 2 ml 2 M KOH eklendikten sonra 20 dk miknatıslı karıştırıcı ile karıştırılan buz banyosuna bırakıldı. Tüplere 8 ml (pH 3.8) sodyum asetat tamponu eklendikten sonra 0.2 ml amiloglukosidaz (1.630 U/ml) ve invertaz (500 U/ml) içeren çözelti koyuldu. Karışım çalkalandıktan sonra 40 °C'de 30 dk inkubasyona bırakıldı. Örnekler 3000 x g'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatanttan 0.1 ml alınarak, 0.1 ml sodyum asetat çözeltisi (200 mM, pH 5) ve 3 ml Glukoz tayin reaktifi (GOPOD Regent) tüplere eklenip, 40 °C'de 20 dk inkubasyona bırakıldıktan sonra spektrofotometrik olarak (Biochrom Libra-S50 UV-VIS Spektrofotometre) 510 nm dalga boyunda köre karşı absorbans değerleri okundu. Alfa glukan miktarını hesaplamada kullanılan formül (3.4) eşitliğinde verilmiştir. β-Glukan miktarının hesaplanması ise (3.5) eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır.

3.3.3.3. Toplam glukan, α-glukan ve β-glukan miktarının hesaplanması

Toplam glukan miktarının hesaplanması:

$$\text{Toplam Glukan (w/w)} = \Delta E \cdot F \times \frac{100}{0.1} \cdot \frac{1}{1000} \cdot \frac{100}{w} \cdot \frac{162}{180}$$

$$\text{Toplam Glukan (w/w)} = \Delta E \cdot \frac{F}{w} \cdot 90 \quad (3.3)$$

Alfa glukan miktarının hesaplanması:

$$\alpha\text{-Glukan (w/w)} = \Delta E \cdot F \cdot 1000 \cdot \frac{1}{1000} \cdot \frac{100 \cdot 162}{W \cdot 180}$$

$$\alpha\text{-Glukan (w/w)} = \Delta E \cdot \frac{F}{W} \cdot 90 \text{ (son hacim 100 ml ise)}$$

$$\alpha\text{-Glukan (w/w)} = \Delta E \cdot \frac{F}{W} \cdot 9.27 \text{ (son hacim 10.3 ml ise)} \quad (3.4)$$

β -glukan miktarının hesaplanması:

$$\beta\text{-Glukan} = \text{Toplam Glukan} - \alpha\text{-Glukan} \quad (3.5)$$

(+ oligomer v.b) (+ oligomer v.b)

ΔE = reaksiyon absorbans– kör absorbans

F = D-glukozun μg cinsinden absorbans dönüşüm faktörü

$100/0.1$ = hacim düzeltme faktör katsayısı; toplam glukan (maya) için

103 = hacim düzeltme faktörü; α -glukan için ya da

1000 = hacim düzeltme faktörü; α -glukan için

$1/1000$ = μg miligram dönüşüm faktörü

$100/W$ = 100 mg numunenin dönüşümü (w/w)

W = analiz edilen numunenin ağırlığı

$162/180$ = serbest D-glikozdan dönüştürmek için faktör katsayı

3.3.4. Protein miktarı tayini (Mikro Kjeldahl Yöntemi)

Protein analizi, bir sonraki bölümde detayları anlatılan toplam diyet lifi analizinden elde edilen kuru kalıntı örneklerine uygulanmıştır (AACC1999). Protein analizinde kullanılan çözeltiler aşağıdaki gibidir:

Çözeltilerin hazırlanması:

%3'lük borik asit çözeltisi: 30 g/1000 ml saf su ile hazırlandı

%30'luk NaOH çözeltisi: 300g/1000 ml saf su ile hazırlandı

0.1 N HCl çözeltisi: 8.26 ml %37'lik HCl/1000 ml saf su ile hazırlandı

Örneklerden 1g 0.1 mg duyarlıkta tartılıp Kjeldahl balonuna alındıktan sonra üzerine 2 adet katalizör tablet ve 2 adet antifoam tablet koyuldu. Karışımın üzerine 10 ml derişik sülfürik asit konularak karıştırıldı.

Balon ve içeriği, yakma ünitesine alınarak yaklaşık 4 saat süreyle yakma işlemi gerçekleştirildi. İşlemi bittikten sonra Kjeldahl balonları cihazdan çıkarılarak soğumaya bırakıldı. Soğuduktan sonra balona 50 ml su eklenip karıştırıldı. Borik asit çözeltisi ile indikatör (4 damla) bir erlende karıştırılıp distilasyon ünitesine yerleştirildi. Toplama erleninde biriken destilat 0.1 N HCL ile dönüm noktasına kadar titre edildi. Gıdalardaki ham protein miktarı % protein olarak ifade edilir ve sonuç 100 g örnekteki protein

kütlesi olarak verilir. Protein miktarını bulmak için aşağıdaki formüllerden faydalanır. Azot miktarı (3.6) eşitliğiyle bulunduktan sonra, protein miktarı (3.7) eşitliğiyle faktörle çarpılarak bulundu.

$$\% \text{ Azot} = (V_1 - V_0) \cdot N \cdot 0.014 \cdot \frac{100}{m} = \dots \text{g}/100\text{g} \quad (3.6)$$

$$\% \text{ Protein} = \% \text{ Azot} \cdot F \quad (3.7)$$

V_1 = Titrasyonda harcanan H_2SO_4 çözeltisi veya HCl çözeltisi miktarı (ml)

V_0 = Kör deneme titrasyonunda harcanan H_2SO_4 çözeltisi veya HCl çözeltisi miktarı (ml)

N = Titrasyonda kullanılan H_2SO_4 veya HCl çözeltisinin normalitesi (0.1 N)

0.014 = Azotun mili ekivalen ağırlığı

m : Alınan gıda örneği miktarı (g)

F : Gıdaya ait protein kat sayısı

Gıda maddesindeki toplam organik azotun tayin edilmesine dayalı yöntemlerde toplam azot değeri gıdada bulunan proteinlerin içerdiği azot miktarına göre saptanan belirli bir faktörle çarpılarak ham protein miktarı saptanmaktadır. Örneğin genel olarak kullanılan 6.25 faktörü % 16 azot içeren proteine sahip gıdalar için kullanılmaktadır. Bu faktör; $F = 100 / 16 = 6.25$ 'den bulunur. Yapılan çalışmada da F için 6.25 değeri kullanılmıştır.

3.3.5. Kül tayini

Kül, organik maddelerin yakılması sonucu arta kalan inorganik madde oksitlerinin oluşturduğu bir kalıntıdır. Özellikle yapısında organik madde bulunan ürünlerin, inorganik madde içeriğini belirlemek için kül miktarı tayini yapılır. Ürünün özelliğine göre analizde bazı farklılıklar olmakla birlikte tayin, prensip olarak ürünün sabit tartıma getirilmiş bir krozede 525 °C dolayında yakılmasından sonra tekrar tartılması şeklinde yapılır (AACC1999).

Kurutulmuş örnekten 3-5 g tartıldıktan sonra, kül kapları doğrudan uygun sıcaklıktaki kül fırınına 550 – 590 °C yerleştirilip yakma yapıldı. Yakma işlemine sabit ağırlık veya açık gri kül elde edilene kadar devam edildi. Yakma işlemi biter bitmez kül kapları derhâl desikatöre alındı ve oda sıcaklığına gelince hemen tartıldı. Kül miktarını hesaplamada kullanılan denklem (3.8) eşitliğiyle verilmiştir.

Hesaplama:

$$\% \text{ Kül} = \frac{\text{Kül ağırlığı (g)}}{\text{Örnek ağırlığı (g)}} \cdot 100 \quad (3.8)$$

3.3.6. Toplam diyet lifi analizi

Analiz *T. versicolor* CCBAS614 veya *T. versicolor* CCBAS614 kültürü ile inoküle edilen %0, 3, 6 ve 10 seviyesinde kalıntı örneklerle uygulandı. Toplam diyet lifi analizi, Total Dietary Fiber Kit (Megazyme, İrlanda) ile yapıldı (Anonim 2).

Çözeltilerin hazırlanışı:

Fosfat Tamponu (0.08 M, pH 6.0): Disodyum fosfat anhidrat 1.400 g (Na_2HPO_4) (ya da 1.753 g dihidrat) ve 9.68 g disodyum fosfat monohidrat (NaH_2PO_4) (ya da 10.94 g dihidrat) yaklaşık 700 ml saf suda çözüldü ve pH'sı ayarlanıp saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

Sodyum Hidroksit Tamponu (0.275 N): NaOH 11.00 g tartıldıktan sonra yaklaşık 700 ml saf suda çözüldü. Soğutulup saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

Hidrolitik Asit Tamponu (0.325 N): HCl 325 ml 1.0 N stok çözelti 1 L saf su içerisinde çözünür.

Örnekler 0.3-0.5 mm kalınlıkta öğütüldü, 1 gram 0.1 mg hassasiyetle tartılıp 400 ml şişelere koyuldu. Fosfat tamponu 50 ml (0.08 M, pH 6.0) şişelere eklenip pH metre ile pH'sı ayarlandı (6.0 ± 0.1). Sabit sıcaklıkta 50 µl α -amilaz eklendikten sonra alüminyum folyo ile sarılan şişeler 15 dk 98-100 °C'ye ayarlanmış su banyosunda inkübasyona bırakıldı. Daha sonra oda sıcaklığına gelene kadar bekletildi ve 10 ml 0.275 N NaOH tamponu ile pH 7.5 ± 0.1 'e ayarlanarak 100 µL proteaz eklendi. Ardından alüminyum folyoya sarılı şişeler, 60 °C'de su içeren bir beherde manyetik karıştırıcı yardımıyla 30 dk inkübasyona bırakıldı. Hidroklorik asit tamponu (10 ml, 0.325 N) eklendikten sonra pH metre kullanılarak pH 4.5 ± 0.2 'e ayarlandı. Sonrasında 200 µl amiloglukosidaz ilave edildi ve 60 °C'de sürekli karıştırılan su içinde tekrar 30 dk inkübasyona bırakıldı. Ardından 280 ml 60 °C'de bekleyen %95 etanol ilave edildi ve 60 dk oda sıcaklığına bekletildi.

Delikli (gooch tipi) krozelere 0.1 mg hassasiyetle diatomit toprağı tartılıp %78 etanol ile yıkandı. Oda sıcaklığında beklemiş olan örnekler delikli krozelerde tartılan diatomit toprağı üzerine ilave edildikten sonra vakum yardımıyla geçişi sağlandı. Vakum altında 20 ml %78 etanol ile üç defa yıkama ardından 10 ml %95 etanol ile iki defa yıkama ve son olarak 10 ml %95 aseton ile iki defa yıkama işlemi yapıldı. Kalıntı içeren delikli krozeler gece boyu 105 °C'de kurutuldu. Kalıntı miktarları sabit ağırlığa gelince miktarları 0.1 mg hassasiyetle tartıldı ve kalıntı miktarı bulundu. Diatomit toprağı içeren kör kalıntı miktarı (3.9) eşitliği yardımıyla bulunurken, kalıntı örnek içeren ise (3.13) eşitliği ile bulunur. Ardından tüm örneklerden protein analizi gerçekleştirildi. Kör protein değeri (3.10) ve örneklerin protein değerleri (3.14) eşitliği yardımıyla bulundu. Aynı şekilde muamele edilen ikinci kalıntı örneği ise 5 saat 525 °C'de sabit tartım ağırlığına ulaşıncaya kadar yakıldıktan sonra kül miktarı hesaplandı. Kalıntı kör kül miktarı (3.11) eşitliğin örneklerin kalıntı kül içeriği ise (3.15) eşitliğinde kullanılarak hesaplanmıştır. Bu şekilde, düzeltilmiş kör ve düzeltilmiş örnek değerleri bulundu ve (3.17) eşitliğiyle diyet lifi miktarı hesaplandı.

Hesaplama

Kalıntı kör miktarı (KKM) = iki tekerrür kalıntı kör (diatomit toprağı) miktarları mg cinsinden (3.9)

Kör protein kalıntı miktarı (KPM) (diatomit toprağı) = $KKM \cdot \frac{\% \text{ protein kör miktarı}}{100}$ (3.10)

Kalıntı kör kül miktarı (diatomit toprağı) (KKülM) = $KKM \cdot \frac{\% \text{ kül kör miktarı}}{100}$ (3.11)

Düzeltilmiş kör (DK) = KKM-KPM-KKülM (3.12)

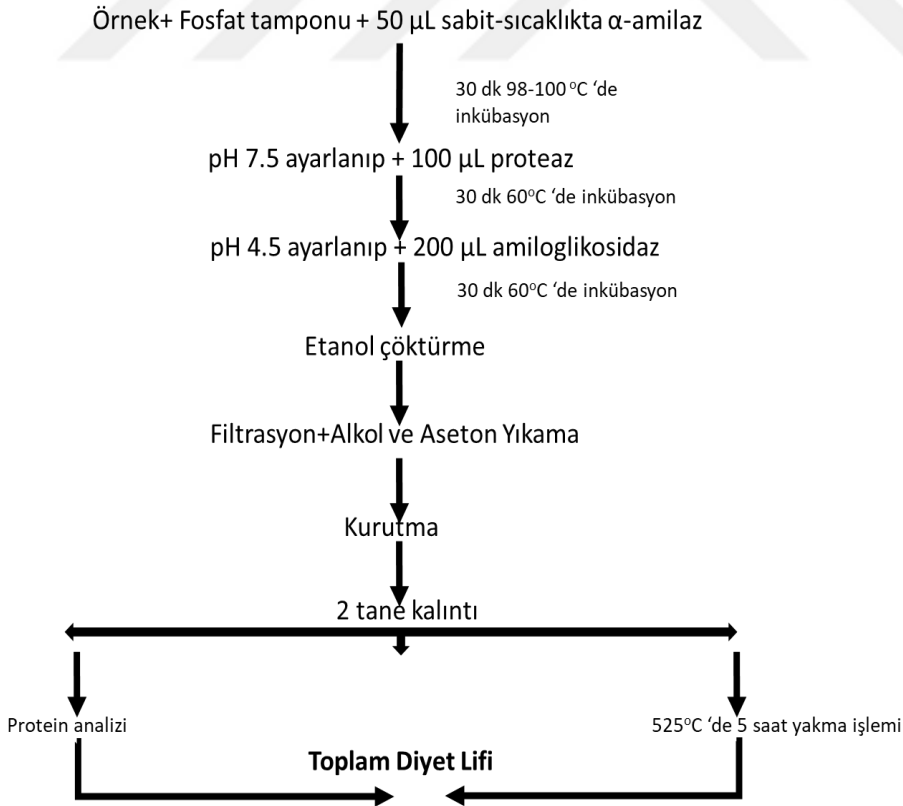
Örneklerin kalıntı miktarı (ÖKM) = Örneklerin (keçiboynuzu + mantar içeren) kalıntı miktarı mg cinsinden (3.13)

Örneklerin kalıntı protein miktarları (ÖKPM) = $ÖKM \cdot \frac{\% \text{ örneklerin protein miktarı}}{100}$ (3.14)

Örneklerin kalıntı kül miktarları (ÖKKülM) = $ÖKM \cdot \frac{\% \text{ örneklerin kül miktarı}}{100}$ (3.15)

Düzeltilmiş örneklerin kalıntısı (DÖK) = ÖKM-ÖKPM-ÖKKülM-DK (3.16)

% Toplama Diyet Lif = $100 \cdot \frac{DÖK}{\text{mg örnek miktarı}}$ (3.17)



Şekil 3. 1. Toplam diyet lifi analizi şematik gösterimi (Megazyme, İrlanda).

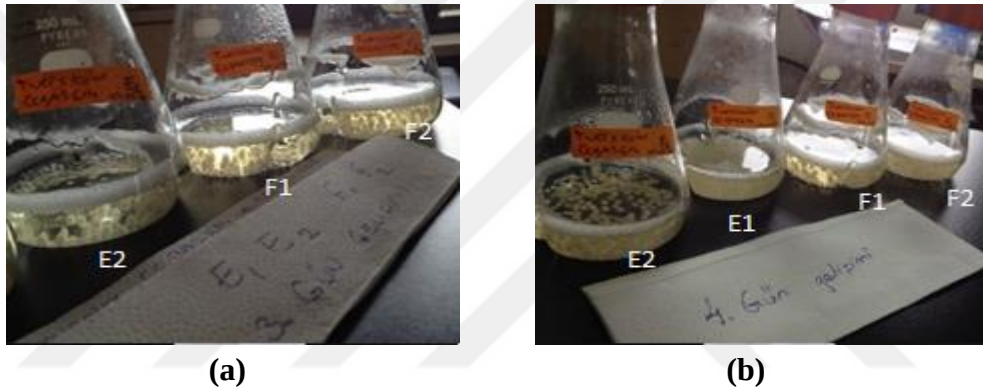
3.3.7. İstatistiksel değerlendirme

Tanımlayıcı istatistikler ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerleri ile sunulmuştur. Normallik varsayımı Shapiro Wilk Testi ile kontrol edilmiştir. Mantar çeşitlerinin zamana ve keçi boynuzu posası oranlarına göre oluşturduğu etkilerin araştırılmasında Mixed ANOVA kullanılmıştır. Anlamli çıkan durumlarda ikili karşılaştırmalar Bonferroni-Dunn Prosedürü ile yapılmıştır. Toplam glukan, β -glukan, α -glukan, diyet lif, protein ve kül analizleri için genel lineer model kullanılmıştır. Anlamli çıkan farkın sonucunda ikili karşılaştırmalarda Bonferroni-Dunn Prosedürü uygulanmıştır. Analizler SPSS 23.0 programı ile yapılmış olup $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamli kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. *T. versicolor* CCBAS614 ve *T. versicolor* CCBAS1399 Suşları ile Gerçekleştirilen Fermantasyon

T. versicolor CCBAS614 ve *T. versicolor* CCBAS1399 kültürü ile inoküle edilen %0, 3, 6 ve 10 seviyesinde keçiyoynuzu posası ilave edilerek hazırlanan besiyeri ortamlarında 7 gün fermantasyon uygulandı (%0 fermantasyon ortamında keçiyoynuzu posası ilave edilmemiştir). Fermantasyon süresi boyunca gelişim izlenerek lakkaz aktivitesindeki değişim 12 saatlik aralıklarla ölçüldü. Her iki mantar suşu ile gerçekleştirilen fermantasyon çalışmalarından elde edilen görüntüler Şekil 4.1'de verilmiştir. Şekillerden de görülebildiği üzere fungal biyokütle sıvı ortam içinde krem renkli hif yumakları (pelet) oluşturarak gelişti.

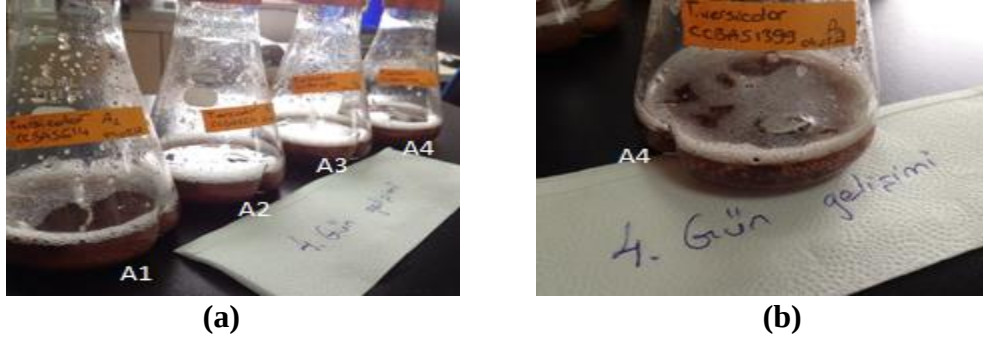


Şekil 4. 1. a) E2 (*T. versicolor* CCBAS614), F1-F2¹ (*T. versicolor* CCBAS1399) mantar kültürünün fermantasyonun 3. gününde görünümü; **b)** E1-E2², (*T. versicolor* CCBAS614), F1-F2 (*T. versicolor* CCBAS1399) mantar kültürünün fermantasyonun 4. gününde görünümü.

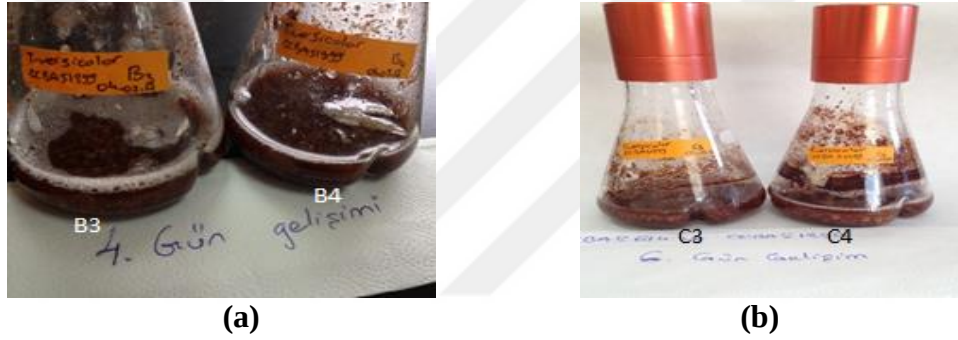
Şekil 4.2'de ise her iki mantar suşu ile %3 seviyesinde keçiyoynuzu posası ilave edilerek hazırlanan besiyeri ile gerçekleştirilen fermantasyon çalışmasından elde edilen görüntüler verilmiştir. Bu şekillerden görülebildiği üzere fungal biyokütle yine hif formunda gelişmiş ancak keçiyoynuzu posası ile yumaklaşarak bir bütün oluşturmuştur. Şekil 4.3'de her iki mantar suşu ile %6 ve %10 seviyesinde keçiyoynuzu posası ilave edilerek hazırlanan besiyeri ile gerçekleştirilen fermantasyon çalışmasından elde edilen görüntüler verilmiştir. Burada da biyokütlenin Şekil 4.2'de tarif edilene benzer şekilde kullanılan keçiyoynuzu posası ile birleşerek geliştiği gözlemlendi.

¹ F1 ve F2: Birbirinin paraleli olan *T. versicolor* CCBAS1399 suşu içeren örnekler için kullanılan örnek kodlarıdır.

² E1 ve E2: Birbirinin paraleli olan *T. versicolor* CCBAS614 suşu içeren örnekler için kullanılan örnek kodlarıdır.



Şekil 4.2. a) A1- A2³ (*T. versicolor* CCBAS614), %3 seviyesinde keçiyoynuzu posası ve mantar kültürü içeren, A3-A4⁴ (*T. versicolor* CCBAS1399), %3 seviyesinde keçiyoynuzu posası ve mantar kültürünün fermentasyonun 4. gününde görünümü; **b)** A4 (*T. versicolor* CCBAS1399), %3 seviyesinde keçiyoynuzu posası ve mantar kültürü içeren fermentasyonun 4. gününde görünümü.



Şekil 4.3. a) B3-B4⁵ (*T. versicolor* CCBAS1399), %6 seviyesinde keçiyoynuzu ve mantar kültürü içeren fermentasyonun 4. gününde görünümü; **b)** C3-C4⁶ (*T. versicolor* CCBAS1399), %10 seviyesinde keçiyoynuzu ve mantar kültürü içeren fermentasyonun 6. gününde görünümü.

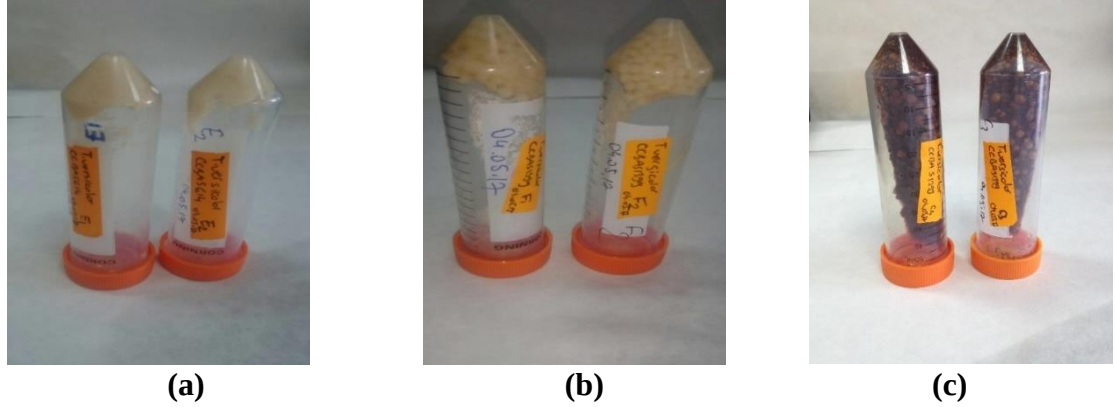
Her iki mantar kültürü ile farklı besiyerlerinde yürütülen fermentasyon denemeleri ile elde edilen biyokütlelerin sıvı besiyerinden ayrıştırılması amacıyla santrifüjleme işlemi uygulanmıştır. Bu şekilde elde edilen pelet görüntüleri Şekil 4.4’de verilmektedir. Darası alınmış olan santrifüj tüpleri kullanılarak yapılan bu ayırma işlemi sonrasında ve akabinde uygulanan kurutma işlemi % kuru madde miktarları belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar ve hesaplanan kuru madde oranları Çizelge 4.1’de verilmiştir.

³ A1-A2: *T. versicolor* CCBAS614 suşu kullanılarak %3 keçiyoynuzu posası içeren ortamda yürütülen ve birbirinin paraleli olan derin fermentasyon kültürleridir.

⁴ A3-A4: *T. versicolor* CCBAS1399 suşu kullanılarak %3 keçiyoynuzu posası içeren ortamda yürütülen ve birbirinin paraleli olan derin fermentasyon kültürleridir.

⁵ B3-B4: *T. versicolor* CCBAS1399 suşu kullanılarak %6 keçiyoynuzu posası içeren ortamda yürütülen ve birbirinin paraleli olan derin fermentasyon kültürleridir.

⁶ C3-C4: *T. versicolor* CCBAS1399 suşu kullanılarak %10 keçiyoynuzu posası içeren ortamda yürütülen ve birbirinin paraleli olan derin fermentasyon kültürleridir.



Şekil 4.4. a) *T. versicolor* CCBAS614 mantar kültürü fermantasyonu; **b)** *T. versicolor* CCBAS1399 mantar kültürü fermantasyonu; **c)** *T. versicolor* CCBAS1399, %10 seviyesinde posa ve mantar kültürü fermantasyonların 7. gününde yaş ağırlıkları görünümü.

Çizelge 4.1. *T. versicolor* CCBAS614 ve *T. versicolor* CCBAS1399 kültürlerinin geliştirilmesi ile elde edilen kuru madde oranları

Kültür suşu	Keçiboynuzu Posası Katkı Oranı w/w (%)	Kuru madde (%)
<i>T. versicolor</i> CCBAS 614	0	6.92±1.22cE
	3	10.00±0.95bD
	6	11.61±1.83bC
	10	15.12±2.15aA
<i>T. versicolor</i> CCBAS 1399	0	3.7±0.43cF
	3	9.63±0.34bD
	6	10.89±1.17baC
	10	13.05±0.43aB

A, B, C... Suşlar arası % posa ile değerlendirilmesi

a, b, c...Her suşun kendi içinde % posa ile değerlendirilmesi

Her bir değer, iki tekrarlı ve iki paralelli sonuçların ortalaması ± standart sapma şeklindedir.

Aynı sütunda farklı harfle gösterilen değerler birbirinden farklıdır, ancak her bir suş kendi içinde değerlendirilmiştir ($p < 0.05$).

İstatistik değerlendirme hem kültür suşlar arası hem de suşların kendi içerisinde katılan keçiboynuzu oranına göre yapılmıştır. Kuru madde değişimi incelendiğinde, katılan posa oranının istatistiksel olarak ($p < 0.05$) anlamlı bir etkiye sahip olduğu görülürken, posa ile suş interaksyonu incelendiğinde istatistiksel olarak bir fark olmadığı ($p > 0.05$) belirlenmiştir.

Katılan farklı oranlarda posanın farklı suşlardan elde edilen kuru madde miktarı üzerindeki etkisi incelenerek *T. versicolor* CCBAS614 ve *T. versicolor* CCBAS 1399 suşlarının kuru madde oluşturma potansiyeli kıyaslanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre %0 ve %10 posa ilavesinde iki suş ile istatistiksel olarak ($p < 0.05$) birbirinden farklı seviyede kuru madde elde edilmiştir. Fakat katılan posa oranı %3 ve %6 olduğunda, iki suş arasında elde edilen kuru madde bazında istatistiksel olarak farklılık olmadığı ($p > 0.05$) sonucuna ulaşılmıştır.

Elde edilen veriler iki suşta kendi içinde değerlendirildiğinde Çizelge 4.1’de küçük harfler kullanılarak elde edilen istatistiksel dağılım oluşmuştur. Buradan, her iki suşta da fermentasyon sonucu elde edilen kuru madde miktarlarının ilave edilen posa oranı arttıkça arttığı görülmektedir. Her iki suşta da %3 ile %6 seviyesinde posa ilavesi istatistiksel olarak anlamlı ($p>0.05$) farka sebep olmadığı, ancak %6 ile %10 seviyeleri arasında önemli fark olduğu söylenebilir.

4.2. *T. versicolor* CCBAS614 ve *T. versicolor* CCBAS1399 Türü Mantarlar ile Keçiboynuzu Posası İçeren Örneklerde Lakkaz Aktivitesi

T.versicolor CCBAS614 ve *T. versicolor* CCBAS1399 kültürü ile inoküle edilen %0, 3, 6 ve 10 seviyesinde keçiboynuzu posası ilave edilerek hazırlanan fermentasyon ortamında 7 gün boyunca süpernatantta lakkaz aktivitesi değişimi izlenmiştir. Elde edilen enzim aktivitesi değerleri *T. versicolor* CCBAS614 için Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4. 2. *T. versicolor* CCBAS614 suşu ile %3, 6, 10 keçiboynuzu posa içeren örneklerde lakkaz aktivitesi miktarları (U/L)

Gün	<i>T.versicolor</i> CCBAS614 (U/L)	<i>T.versicolor</i> CCBAS614 + %3 keçiboynuzu posası (U/L)	<i>T.versicolor</i> CCBAS614 + %6 keçiboynuzu posası (U/L)	<i>T.versicolor</i> CCBAS614 + %10 keçiboynuzu posası (U/L)
0.gün	TE	TE	TE	TE
1.gün	TE	TE	TE	TE
2.gün	6.17±2.18bA	26.23±3.98aCF	TE	TE
3.gün	-10.03±10.50bA	11658.95±307.87aA	10734.95±1207.75aA	487.26±58.53bD
4.gün	49.76±3.42dA	5005.78±328.05cB	11172.83±1003.54aA	6645.44±265.30bC
5.gün	7.71±4.54cA	1393.51±36.56cC	5728.39±786.43bC	27874.22±3047.89aA
6.gün	742.28±58.42bA	478.39±21.82cbCD	1986.11±365.44bB	19390.43±457.07aB
7.gün	1200.23±125.46bA	970.29±175.87cbCD	1182.09±266.73bB	23028.54±2913.64aB

TE: Lakkaz aktivitesi tespit edilemedi.

Her bir değer, iki tekrarlı ve iki paralelli sonuçların ortalaması ± standart sapma şeklindedir.

Aynı sütunda farklı harfle gösterilen değerler birbirinden farklıdır ($p<0.05$).

Çizelgede *T. versicolor* CCBAS614 suşu ile elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak incelendiğinde anlamlı fark olan değerler; fermentasyon süresine bağlı olarak karşılaştırıldığında büyük harflerle (A, B, C...), ilave edilen posa oranına bağlı olarak karşılaştırıldığında küçük harflerle (a, b, c...) gösterilmiştir.

T. versicolor CCBAS 614 suşunun fermentasyon süresine ve katılan posaya bağlı olarak besiyerine salgıladığı lakkazın aktivitesindeki istatistiksel değişim irdelendi. Lakkaz enzimi değişimi incelendiğinde *T. versicolor* CCBAS 614 suşunun geliştirildiği sıvı fermentasyon ortamına ilave edilen posanın ve uygulanan fermentasyon süresinin anlamlı etkisinin olduğu, ayrıca her iki faktörün de anlamlı ($p<0.05$) etkileşiminin olduğu (interaksiyon) belirtilebilir. Fermentasyonun ilk günlerinde oluşan lakkaz enziminin seviyesi analitik metodun tespit edebileceği seviyelere ulaşamamıştır. Fermentasyon ortamına hiç keçiboynuzu posası ilave edilmediğinde 2. günden itibaren düşük seviyede ve değişken lakkaz aktiviteleri elde edilmiş, ancak örnekler arasında fermentasyon süresince istatistiksel olarak anlamlı sayılabilecek ($p>0.05$) bir fark gözlemlenmemiştir. Ancak posa ilave edilen örnekler

arasında lakkaz aktivitesi fermentasyon süresince anlamlı ($p<0.05$) değişim göstermiştir. En yüksek lakkaz aktivitesine 5 gün fermentasyon neticesinde %10 posa ilaveli örnekte ulaşılmıştır. Burada hesaplanan ortalama lakkaz aktivite değeri olan 27874 U/L literatürde *T. versicolor* suşları ile yürütülen fermentasyon çalışmalarında elde edilen değerler ile kıyaslandığında sağlanan aktivite değerinin pek çok çalışmada elde edilenden daha yüksek olduğu belirtilebilir. Bu hususta daha detaylı bilgilere tartışma bölümünde değinilmiştir. Daha sonraki günlerde lakkaz aktivitesi bu örnekte bir miktar azalmıştır. Lakkaz aktivitesindeki bu düşüş fermentasyon ortamına salgılanan proteinlerin bir kısmında aktivitenin yitirilmesi veya proteinlerin degrade olması sebebiyle olabileceği düşünülmektedir. Aynı çizelgede 3. günde %3 ve %6 posa ilaveli ortamların (ikisi arasında istatistiksel fark olmaksızın) ve 4. günde %6 posa içeren ortamın *T. versicolor* CCBAS 614 suşunun fermentasyon süresince en yüksek seviyede lakkaz aktivitesi sağladığı örnekler olmuştur. Bu değerlere göre %10 posa ilavesinin enzim aktivitesinin arttırmada gecikmeye sebep olduğu düşünülebilir. Böyle bir etkinin muhtemel sebebi olarak keçiyoynuzu posasından kaynaklanan ve fermentasyonun ilk aşamalarında fazla miktarda bulunduklarında inhibitör etki yapan doğal bileşikler (ör. tanenler, diğer polifenolik bileşikler vb) gösterilebilir.

Çizelge 4. 3. *T. versicolor* CCBAS1399 suşu ile %3, 6, 10 keçiyoynuzu posa içeren örneklerde lakkaz aktivitesi miktarları (U/L)

Gün	<i>T.versicolor</i> CCBAS1399 (U/L)	<i>T.versicolor</i> CCBAS1399 + %3 keçiyoynuzu posası (U/L)	<i>T.versicolor</i> CCBAS1399 + %6 keçiyoynuzu posası (U/L)	<i>T.versicolor</i> CCBAS1399 + %10 keçiyoynuzu posası (U/L)
0.gün	TE	TE	TE	TE
1.gün	TE	TE	TE	TE
2.gün	113.04±39.02bA	972.99±369.13aCD	TE	TE
3.gün	265.81±52.80cbA	9797.83±865.89aA	1097.60±780.05bB	875.38±89.23bC
4.gün	305.94±163.64dA	10742.66±1450.60bA	7910.87±320.71cA	14008.48±1264.24aA
5.gün	27.77±7.86dA	4209.87±506.47cB	8773.14±779.95bA	13454.86±753.26aA
6.gün	134.25±21.19cbA	1721.45±20.41bC	3489.19±1095.92bCB	9463.73±1662.63aB
7.gün	169.75±75.13cbA	503.85±245.10bC	2213.73±152.19bB	7702.54±2215.15aB

TE: Lakkaz aktivitesi tespit edilemedi.

Her bir değer, iki tekrarlı ve iki paralelli sonuçların ortalaması ± standart sapma şeklindedir.

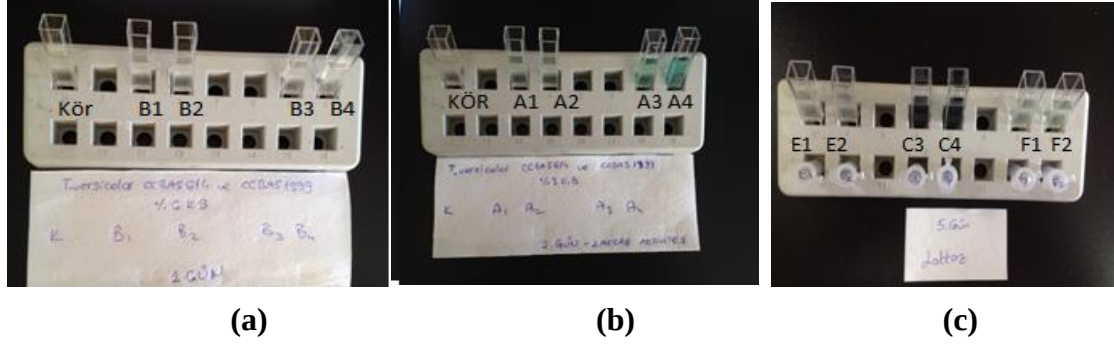
Aynı sütunda farklı harfle gösterilen değerler birbirinden farklıdır ($p<0.05$).

Çizelgede *T. versicolor* CCBAS614 suşu ile elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak incelendiğinde anlamlı fark olan değerler; fermentasyon süresine bağlı olarak karşılaştırıldığında büyük harflerle (A, B, C...), ilave edilen posa oranına bağlı olarak karşılaştırıldığında küçük harflerle (a, b, c...) gösterilmiştir.

Araştırılan diğer *T. versicolor* suşu olan CCBAS1399 için elde edilen enzim aktivitesi değerleri Çizelge 4.3'te verilmiştir. Bu tabloda özetlenen veriler için yapılan istatistiksel değerlendirmede *T. versicolor* CCBAS614 için elde edilen sonuçlara çok benzer değerler elde edildiğini, hem fermentasyon süresinin, hem ilave edilen posa oranının, hem de bu iki faktörün interaksyonunun istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) seviyede gerçekleştiğini söylemek mümkündür. *T. versicolor* CCBAS1399 suşu için de fermentasyon ortamına hiç keçiyoynuzu posası ilave edilmediğinde 2. günden itibaren düşük seviyede ve değişken lakkaz aktiviteleri elde edilmiş, ancak örnekler arasında fermentasyon süresince istatistiksel olarak ($p>0.05$) anlamlı sayılabilecek bir fark

gözlemlenmemiştir. Ancak posa ilave edilen örnekler arasında lakkaz aktivitesi fermentasyon süresince anlamlı ($p<0.05$) değişim göstermiş ve en yüksek lakkaz aktivitesine 4-5 günlük fermentasyon neticesinde %10 posa ilaveli örnekte ulaşılmıştır. Bu değerler (13454-14008 U/L) *T. versicolor* CCBAS614 için elde edilen lakkaz aktivitesinden düşüktür. *T. versicolor* CCBAS1399 suşu için de %3 ve %6 oranında posa ilave edilmiş ortamlarda yine 4. günde en yüksek lakkaz aktivite değerlerinin elde edilmiş olması ve %10 oranında posa içeren örnekte daha sonraki günde aktivitede artış gözlenmesi (gecikmiş üretim) yine aynı şekilde keçiyoynuzu posasındaki bazı bileşenlerin posa yüksek seviyelerde ilave edildiğinde inhibe edici etki göstermesi ile açıklanabilir. Ancak, bu suş üzerinde yürütülen denemelerde de keçiyoynuzu posası ilavesinin en yüksek seviyede katıldığında etkin şekilde lakkaz aktivitesini misliyle arttırdığı açıkça görülebilmektedir.

Şekil 4.5'de *T. versicolor* suşları ile yürütülen fermentasyon sıvılarına uygulanan lakkaz aktivite analizlerinden görüntüler verilmektedir. Şekil 2.5 a'da CCBAS614 ve *T. versicolor* CCBAS1399 suşları ile %6 seviyesinde keçiyoynuzu posası içeren sıvı besiyerinde örneklerin 1 gün fermentasyonu ile elde edilen örneklerde yürütülen spektrofotometrik kuvvetler görülmektedir. Bu tüplerde renk değişimi gözle de ayırt edilememektedir. Ancak fermentasyonun 2. gününde %3 posa ilaveli besiyerinde yapılan analizlerde reaksiyon sıvısındaki renk değişiminin gözle de algılanabildiği söylenebilir (Şekil 4.5 b). Burada, A1/A2 ile belirtilen örneklerde belirgin bir yeşil renk vardır ve *T. versicolor* CCBAS614 %3 seviyesinde keçiyoynuzu posası içeren bu örneklerde ortalama 26.23 U/L lakkaz aktivitesi tespit edilmiştir. Aynı görüntüde, A3/A4 örnekleri *T. versicolor* CCBAS1399 %3 seviyesinde keçiyoynuzu posası içeren besiyerinde 2. gün lakkaz aktivitesi tayini içindir, ölçülen aktivite 927.99 U/L seviyesindedir ve gözlemlenen yeşil renk daha yoğundur. Şekil 4.5 c'de E1/E2 ile etiketlenen *T. versicolor* CCBAS614 mantar içeren örneklerin lakkaz aktivitesi 5. gün için 7.71 U/L seviyesindedir ve reaksiyon sıvısındaki renk değişiminin gözle ayırt edilememektedir. Aynı görüntüde, C3/C4 etiketli örneklerde %10 seviyesinde keçiyoynuzu posası içeren ortamda geliştirilen *T. versicolor* CCBAS1399 süpernatant örneği ile hazırlanan reaksiyon sıvısında lakkaz aktivitesi 5. günde ortalama 13454.86 U/L seviyesindedir ve çok yoğun yeşil renk gözlemlenmektedir. Bu örneklerde yapılan spektrofotometrik ölçümlerde hazırlanan çözeltilerin absorbanans değerinin 1.7 altında olabilmesi için reaksiyon sıvısında seyreltme yapıldı.



Şekil 4. 5. a) B1-B2⁷ *T. versicolor* CCBAS614 ve B3-B4⁸ *T. versicolor* CCBAS1399 %6 seviyesinde keçiyoynuzu posası içeren örneklerde 1. gün lakkaz aktivitesi görünümü; **b)** A1-A2⁹ *T. versicolor* CCBAS614 ve A3-A4¹⁰ *T. versicolor* CCBAS1399 %3 seviyesinde keçiyoynuzu posası içeren örneklerin 2. gün lakkaz aktivitesi görünümü; **c)** E1-E2¹¹ *T. versicolor* CCBAS614, F1-F2¹² *Trametes versicolor* CCBAS1399 mantar içeren örneklerin ve C3-C4¹³ *T. versicolor* CCBAS1399 %10 seviyesinde keçiyoynuzu posası içeren örneklerin 5. gün lakkaz aktivitesi görünümü.

⁷ B1-B2: *T. versicolor* CCBAS614 suşu kullanılarak %6 keçiyoynuzu posası içeren ortamda yürütülen ve birbirinin paraleli olan derin fermantasyon kültürlerinden alınan örneklerle hazırlanan reaksiyon küvetleridir.

⁸ B3-B4: *T. versicolor* CCBAS1399 suşu kullanılarak %6 keçiyoynuzu posası içeren ortamda yürütülen ve birbirinin paraleli olan derin fermantasyon kültürlerinden alınan örneklerle hazırlanan reaksiyon küvetleridir.

⁹ A1-A2: *T. versicolor* CCBAS614 suşu kullanılarak %3 keçiyoynuzu posası içeren ortamda yürütülen ve birbirinin paraleli olan derin fermantasyon kültürlerinden alınan örneklerle hazırlanan reaksiyon küvetleridir.

¹⁰ A3-A4: *T. versicolor* CCBAS1399 suşu kullanılarak %3 keçiyoynuzu posası içeren ortamda yürütülen ve birbirinin paraleli olan derin fermantasyon kültürlerinden alınan örneklerle hazırlanan reaksiyon küvetleridir.

¹¹ E1-E2: Birbirinin paraleli olan *T. versicolor* CCBAS614 suşu kullanılarak hazırlanan reaksiyon küvetleridir.

¹² F1-F2: Birbirinin paraleli olan *T. versicolor* CCBAS1399 suşu kullanılarak hazırlanan reaksiyon küvetleridir.

¹³ C3-C4: *T. versicolor* CCBAS1399 suşu kullanılarak %10 keçiyoynuzu posası içeren ortamda yürütülen ve birbirinin paraleli olan derin fermantasyon kültürlerinden alınan örneklerle hazırlanan reaksiyon küvetleridir.

4.3. *T. versicolor* CCBAS614 ve *T. versicolor* CCBAS1399 Mantarlarının Biyokütlelerinde Tespit Edilen Toplam Glukan, β -Glukan ve α -Glukan Miktarları

T. versicolor CCBAS614 ve *T. versicolor* CCBAS1399 kültürü ile inoküle edilen %0, 3, 6 ve 10 oranında keçiyoynuzu posası ilave edilerek hazırlanan besiyeri ortamlarında 7. gün fermentasyon örnekleri santrifüj edildikten sonra alınan yaş fungal biyokütlede toplam glukan, β -glukan ve α -glukan miktarları Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4. 4. *T. versicolor* CCBAS 614 ve *T. versicolor* CCBAS 1399 türü mantarlar ile keçiyoynuzu posası içeren fermentasyon örneklerinde toplam glukan, α -glukan ve β -glukan miktarları (yaş ağırlık)

Kültür Suşu	Keçiyoynuzu Posası Katkı Oranı (%w/w)	Ortalama yaş biyokütle miktarı (mg)	Toplam Glukan (%)	α -Glukan (%)	β -Glukan (%)
<i>T. versicolor</i> CCBAS 614	0	130	9.51±1.08cD	0.73±0.13dG	8.73±1.12baB
	3	110	11.29±0.93bC	6.29±0.43bB	5.00±0.80cE
	6	100	12.72±1.77bB	4.27±0.40cC	8.45±2.10aC
	10	119	18.29±1.25aA	10.71±0.73aA	7.54±1.39aD
<i>T. versicolor</i> CCBAS 1399	0	140	5.42±0.48cG	0.92±0.13cG	4.49±0.46cE
	3	130	10.68±1.62aC	1.52±0.20bD	9.15±1.64aA
	6	175	7.15±1.20bF	2.80±0.13aE	4.35±1.21cF
	10	190	8.79±0.98bE	2.39±0.19aF	6.39±0.96bD

A, B, C... Suşlar arası % posa ile değerlendirilmesi

a, b, c...Her suşun kendi içinde % posa ile değerlendirilmesi

Her bir değer, iki tekrarlı ve iki paralelli sonuçların ortalaması ± standart sapma şeklindedir.

Aynı sütunda farklı harfle gösterilen değerler birbirinden farklıdır, ancak her bir suş kendi içinde değerlendirilmiştir ($p<0.05$).

İstatistik değerlendirme hem kültür suşlar arası hem de suşların kendi içerisinde katılan keçiyoynuzu oranına göre yapılmıştır. Toplam glukan değişimi incelendiğinde, katılan posa oranının, posa ile suş interaksyonu istatistiksel olarak ($p<0.05$) anlamlı bir etkiye sahip olduğu görülmüştür.

Katılan farklı oranlarda posanın farklı suşlardan elde edilen toplam glukan miktarı üzerindeki etkisi incelenmiştir. *T. versicolor* CCBAS614 suşundan elde edilen biyokütledeki toplam glukan oranı (w/w%) *T. versicolor* CCBAS 1399 ile fermentasyondan elde edilene göre hemen her posa ilave seviyesinde kayda değer ölçüde ($p<0.05$) daha yüksek tespit edildi. Fakat katılan posa oranı %3 olduğunda, iki suş arasında elde edilen toplam glukan miktarı bazında istatistiksel olarak farklılık olmadığı ($p>0.05$) sonucuna ulaşılmıştır.

Elde edilen veriler iki suşa kendi içinde değerlendirildiğinde Çizelge 4.4'de küçük harfler kullanılarak elde edilen istatistiksel dağılım oluşmuştur. *T. versicolor* CCBAS614 için elde edilen sonuçlara göre % posa oranı arttıkça elde edilen toplam glukan oranının arttığı, %3 ve %6 oranında posa ilavesi arasında değerde artış gözlemlenmekle birlikte örnekler arasında istatistiksel fark olmadığı tespit edildi. *T. versicolor* CCBAS1399 mantarı ile fermentasyon sonucunda ise bu suş için en yüksek

toplam glukan oranına %3 posa ilavesiyle ulaşıldığı, %6 ve %10 posa örneklerinde istatistiksel olarak farklılık olmadığı ($p>0.05$) görüldü.

En yüksek toplam glukan miktarı ise *T. versicolor* CCBAS614 suşu ile %10 posa ilaveli örnekte ulaşılmıştır (%18.29). Toplam yaş ağırlık kullanılarak fermantasyon sonucu elde edilen toplam glukan miktarı 2.177 g olarak bu örnekte tespit edildi. Bu miktarın 1.274 g'ının α -, 0.897 g'ının β -glukan olduğu ayrıca belirtilebilir.

Katılan posa oranına karşılık α -glukan değişimi incelendiğinde, posa ile suş interaksiyonunun istatistiksel olarak ($p<0.05$) anlamlı bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. Katılan farklı oranlarda posanın farklı suşlardan elde edilen α -glukan miktarı üzerindeki etkisi incelenerek *T. versicolor* CCBAS614 ve *T. versicolor* CCBAS 1399 suşlarından elde edilen biyokütlenin α -glukan oluşturma potansiyeli kıyaslanmıştır. En yüksek α -glukan miktarı *T. versicolor* CCBAS614 suşu ile %10 posa ilaveli örnekte ulaşılmıştır (%10.71). Elde edilen sonuçlara göre %0, %3, %6 ve %10 posa ilavesinde iki suş ile istatistiksel olarak ($p<0.05$) birbirinden farklı seviyede α -glukan miktarı elde edilmiştir.

Katılan posa oranına karşılık β -glukan değişimi incelendiğinde, posa ile suş interaksiyonunun istatistiksel olarak ($p<0.05$) anlamlı bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. Katılan farklı oranlarda posanın farklı suşlardan elde edilen β -glukan miktarı üzerindeki etkisi incelenerek *T. versicolor* CCBAS614 ve *T. versicolor* CCBAS 1399 suşlarından elde edilen biyokütlenin β -glukan oluşturma potansiyeli kıyaslanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre suşlar arası en yüksek β -glukan oranı (%9.15), *T. versicolor* CCBAS 1399 ile %3 biyokütle ortamında bulundu ve toplam üretilen miktar 1.19 g olarak hesaplandı.

Çalışma sırasında *T. versicolor* CCBAS1399 suşu ile %6 seviyesinde keçiyoynuzu içeren ortamda geliştirilen biyokütle ile gerçekleştirilen toplam glukan analizinde reaksiyon sıvılarının görüntüsü verilmiştir (Şekil 4.6 a). Şekil 4.6 b'de ise *T. versicolor* CCBAS614 suşu ile %6 posa içeren ortamda geliştirilen biyokütle ile gerçekleştirilen α -glukan analizindeki reaksiyon sıvıları görülmektedir. Reaksiyon sonucunda hafif pembe renk gözlemlenmiş, absorbans değerleri spektrofotometrik olarak tespit edilmiştir.

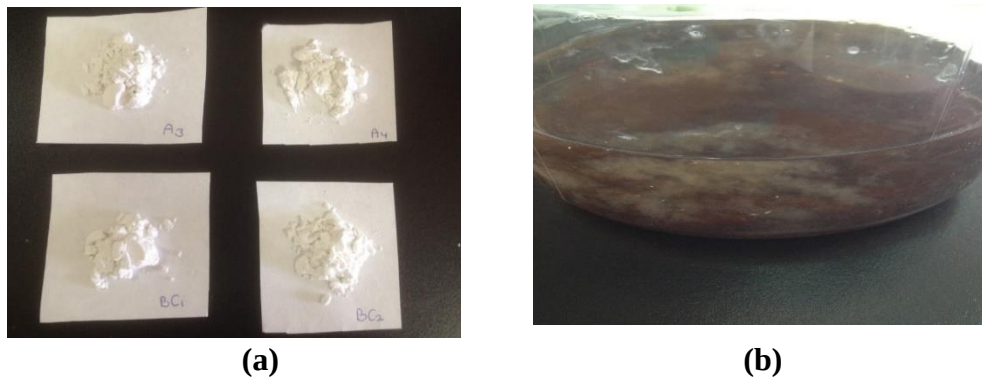


Şekil 4. 6. a) K r, C3-C4 ¹⁴, *T. versicolor* CCBAS1399 %6 seviyesinde keçiboynuzu posası içeren örneklerin toplam glukan miktarı görüntüsü (Pembe renk değişimi); **b)** A1 ¹⁵, *T. versicolor* CCBAS614 %3 seviyesinde keçiboynuzu posası içeren örneklerin alfa glukan miktarı görüntüsü.

4.4. *T. versicolor* CCBAS614 ve *T. versicolor* CCBAS1399 Türü Mantarlar ile Fermantasyon Sonunda Elde Edilen Toplam Protein, Kül ve Diyet Lif Miktarları

T. versicolor CCBAS614 ve *T. versicolor* CCBAS1399 kültürü ile inoküle edilen %0, 3, 6 ve 10 seviyesinde keçiboynuzu posası içeren 7. günde elde edilen kalıntı kuru örneklerinde diyet lifi, protein ve kül analizleri yapılmıştır.

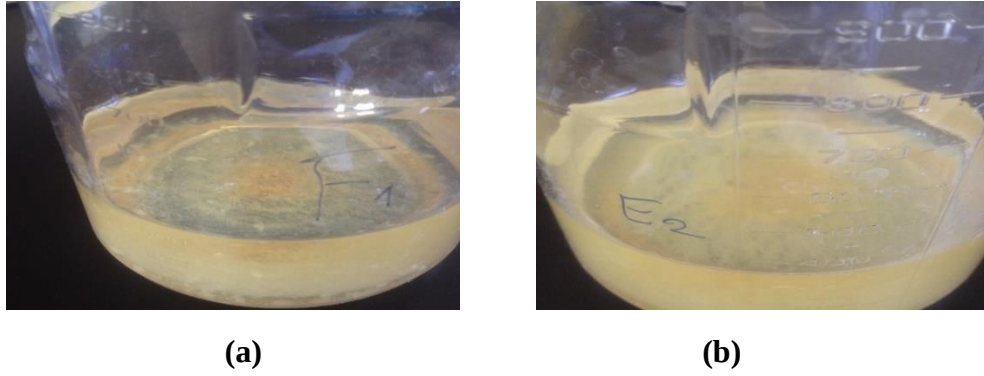
Örnekler  ekil 4.7’de filtrasyon işlemlerinde filtre yardımcı maddesi olan kizelgur kullanılarak etanol ile çöktürme yapıldıktan sonra mantar ve keçiboynuzunun iki fazlı değişimi görülmüştür. Şekil 4.8’de ise sadece mantar içeren örneklerin etanol ile çöktürme işleminde bir görüntü verilmiştir.



Şekil 4. 7. a) Filtrasyon işlemlerinde filtre yardımcı maddesi kizelgur; **b)** Toplam diyet lif analizinde etanol ile   kt rme.

¹⁴ C3-C4; *T.versicolor* CCBAS1399 su u kullanılarak %10 keçiboynuzu posası içeren ortamda yürütülen ve birbirinin paraleli olan derin fermantasyon kültürleridir.

¹⁵ A1; *T.versicolor* CCBAS614 su u kullanılarak %3 keçiboynuzu posası içeren ortamda yürütülen derin fermantasyon kültürüdür.



Şekil 4. 8. a) *T. versicolor* CCBAS1399 mantar kültür içeren örneklerin toplam diyet lifi analizinde etanol ile çöktürme işlemi; **b)** *T. versicolor* CCBAS614 mantar kültür içeren örneklerin toplam diyet lif analizinde etanol ile çöktürme işlemi

Çöktürme işlemi tamamlandıktan sonra filtreleme yoluyla örneklerin süzülmesi işlemi Şekil 4.9'da görülmektedir. Şekil 4.10-4.11'de ise mantar örneklerinin gece boyu kurutulması sonrasında elde edilen kalıntılar görülmektedir.



Şekil 4. 9. Toplam diyet lif analizinde süzme işlemi.



Şekil 4. 10. a) Filtrasyon işlemi tamamlandıktan sonra A1-A2 (*T. versicolor* CCBAS614) %3 seviyesinde keçiyoynuzu içeren örnekler; **b)** Gece boyu 105 °C'de kurutulan (*T. versicolor* CCBAS1399) %10 seviyesinde keçiyoynuzu içeren kalıntı örneklerin görüntüsü.



(a)



(b)

Şekil 4. 11. a) Gece boyu 105 °C’de kurutulan F1 (%0 posa ilave edilen ortamda geliştirilen *T. versicolor* CCBAS1399 ile elde edilen örnekten) kalıntı görüntüsü; **b)** Gece boyu 105 °C’de kurutulan E2 (%0 posa ilave edilen ortamda geliştirilen *T. versicolor* CCBAS614 ile elde edilen örnekten) kalıntı görüntüsü.

Şekil 4.12’de protein analizinde kullanılan protein yakma ünitesi ve protein distilasyon ünitesindeki görüntüleri verilmekte. Serbest azot miktarı analiz edilirken beherde menekşe renginde gözlemlenen indikatör rengi distilasyon işlemi sonrasında yeşile dönmektedir (Şekil 4.12 b).



(a)

(b)

Şekil 4. 12. a) Protein yakma ünitesi; **b)** Protein distilasyon ünitesi görüntüsü.

Çizelge 4.5'te elde edilen sonuçlarda her iki suş için protein miktarları yer almaktadır.

Çizelge 4. 5. *T. versicolor* CCBAS614 ve *T. versicolor* CCBAS1399 türü mantarlar ile keçiyoynuzu posası içeren fermentasyon örneklerinde %protein miktarları (kuru kalıntı)

Kültür Suşu	Keçiyoynuzu Posası Katkı Oranı w/w (%)	Protein (%)
<i>T. versicolor</i> CCBAS 614	0	5.44±0.53cF
	3	8.85±0.33aB
	6	8.42±0.042aC
	10	6.17±0.07bG
<i>T. versicolor</i> CCBAS 1399	0	5.79±0.52cH
	3	10.58±0.042aA
	6	6.30±0.16cE
	10	6.98±0.23bD

A, B, C... suşlar arası % posa ile değerlendirilmesi

a, b, c...her suşun kendi içinde % posa ile değerlendirilmesi

Her bir değer, iki tekrarlı ve iki paralelli sonuçların ortalaması ± standart sapma şeklindedir.

Aynı sütunda farklı harfle gösterilen değerler birbirinden farklıdır, ancak her bir suş kendi içinde değerlendirilmiştir (p<0.05).

İstatistik değerlendirme hem kültür suşlar arası hem de suşların kendi içerisinde katılan keçiyoynuzu oranına göre yapılmıştır. Protein değişimi incelendiğinde, katılan posa oranını ile suş interaksyonunun istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05) bir etkiye sahip olduğu görülmüştür.

Katılan farklı oranlarda posanın farklı suşlardan elde edilen protein miktarı üzerindeki etkisi incelenerek *T. versicolor* CCBAS614 ve *T. versicolor* CCBAS 1399 suşlarının protein miktarı oluşturma potansiyeli kıyaslanmıştır. Kuru biyokütledeki protein oranına bakıldığında en yüksek değer diğerlerinden önemli şekilde farklı olarak *T. versicolor* CCBAS 1399 suşu ile %3 posa oranında sağlandığı söylenebilir. Fermentasyon sonucu bu örnekte 1.32 mg protein elde edilirken aynı suş ile %10 posa içeriğinde yürütülen fermentasyon denemesi neticesinde üretilen toplam protein miktarı 1.73 mg olarak hesaplanmıştır.

Elde edilen veriler iki suşta kendi içinde değerlendirildiğinde Çizelge 4.5'de küçük harfler kullanılarak elde edilen istatistiksel dağılım oluşmuştur. Oransal olarak değerlendirildiğinde protein içeriğinin her iki suş için de %3 posa ilave edilen fermentasyon denemelerinde önemli seviyede (p<0.05) yüksek olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Protein içeriği oransal olarak değerlendirildiğinde net şekilde görülmemekle birlikte toplam protein içeriğine bakıldığında her suş için katılan posa oranı arttıkça fermentasyon sonunda toplam üretilen protein miktarında da artış olduğu belirtilebilir.

Çizelge 4.6'da elde edilen sonuçlarda her iki suş için kül miktarları yer almaktadır.

Çizelge 4. 6. *T. versicolor* CCBAS614 ve *T. versicolor* CCBAS1399 türü mantarlar ile keçiyoynuzu fermantasyon örneklerinde %kül miktarları (kuru kalıntı)

Kültür suşu	Keçiyoynuzu posası katkı oranı w/w (%)	Kül (%)
<i>T. versicolor</i> CCBAS 614	0	6.18±0.71cD
	3	4.17±0.31dF
	6	6.98±0.081bC
	10	10.83±0.25aA
<i>T. versicolor</i> CCBAS 1399	0	5.47±0.07cE
	3	4.74±0.35dH
	6	8.03±0.06bB
	10	10.90±0.18aA

A, B, C... suşalar arası % posa ile değerlendirilmesi

a, b, c...her suşun kendi içinde % posa ile değerlendirilmesi

Her bir değer, iki tekrarlı ve iki paralelli sonuçların ortalaması ± standart sapma şeklindedir.

Aynı sütunda farklı harfle gösterilen değerler birbirinden farklıdır, ancak her bir suş kendi içinde değerlendirilmiştir (p<0.05).

İstatistik değerlendirme hem kültür suşlar arası hem de suşların kendi içerisinde katılan keçiyoynuzu oranına göre yapılmıştır. Kül değişimi incelendiğinde, katılan posa oranının ve posa ile suş interaksyonu istatistiksel olarak (p<0.05) anlamlı bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. Katılan farklı oranlarda posanın farklı suşlardan elde edilen kül miktarı üzerindeki etkisi incelenerek *T. versicolor* CCBAS614 ve *T. versicolor* CCBAS 1399 suşlarının kuru biyokütlerdeki toplam mineral oranı kıyaslanmıştır. Katılan %10 posa ise her iki suş için kül oranının anlamlı şekilde (p>0.05) farklı olarak en yüksek değere ulaştığı görülmüştür. Toplam kuru madde miktarı kullanılarak içerikteki toplam kül miktarı hesaplandığında posa oranı arttıkça kül miktarının belirgin artış gösterdiği ve *T. versicolor* CCBAS614 için 1.95 mg ve *T. versicolor* CCBAS 1399 içinse 2.7 mg değerine ulaştığı belirtilebilir.

Çizelge 4.7’de son olarak her iki suş için diyet lif miktarları yer almaktadır.

Çizelge 4. 7. *T. versicolor* CCBAS614 ve *T. versicolor* CCBAS1399 türü mantarlar ile keçiyoynuzu posası içeren fermantasyon örneklerinde %diyet lifi miktarları (kuru kalıntı).

Kültür suşu	Keçiyoynuzu posası katkı oranı w/w (%)	Diyet lif (%)
<i>T. versicolor</i> CCBAS 614	0	37.76±0.81aA
	3	7.23±1.16dE
	6	13.30±2.65cD
	10	27.48±1.84bB
<i>T. versicolor</i> CCBAS 1399	0	37.21±1.87aA
	3	7.06±0.62dE
	6	12.19±0.42cD
	10	23.34±1.02bC

A, B, C... suşalar arası % posa ile değerlendirilmesi

a, b, c...her suşun kendi içinde % posa ile değerlendirilmesi

Her bir değer, iki tekrarlı ve iki paralelli sonuçların ortalaması ± standart sapma şeklindedir.

Aynı sütunda farklı harfle gösterilen değerler birbirinden farklıdır, ancak her bir suş kendi içinde değerlendirilmiştir (p<0.05).

İstatistik değerlendirme hem kültür suşlar arası hem de suşların kendi içerisinde katılan keçiyoynuzu oranına göre yapılmıştır. Diyet lif değişimi incelendiğinde, katılan posa oranının ve posa ile suş interaksyonu istatistiksel olarak ($p<0.05$) anlamlı bir etkiye sahip olduğu görülmüştür.

Katılan farklı oranlarda posanın farklı suşlardan elde edilen kuru biyokütlede diyet lif oranı üzerindeki etkisi incelenerek *T. versicolor* CCBAS614 ve *T. versicolor* CCBAS 1399 suşlarının diyet lif miktarı oluşturma potansiyeli kıyaslanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek lif içeriği her iki suş için de geçerli olmak üzere hiç posa ilavesi olmayan fermentasyon ürünlerinde sağlanmıştır ve iki suşta %0 posa katkı oranında diyet lif bakımında istatistiksel fark yoktur. Bununla birlikte, yine her iki suşta %3-10 seviyelerinde posa ilave oranı arttıkça diyet lifte anlamlı ($p<0.05$) artış olduğu gözlemlenmiştir.

Her örnekten elde edilen ortalama diyet lif oranı ve kuru madde miktarı kullanılarak fermentasyonda oluşan toplam diyet lif miktarı hesaplandığında, hiç posa ilavesi olmayan örnekte toplam 3.4 mg diyet lif olduğu tespit edilmiştir. Burada, aynı hesaplama %10 posa içeren örneklerde tekrarlandığında *T. versicolor* CCBAS614 için 4.9 mg ve *T. versicolor* CCBAS 1399 için 5.8 mg diyet lif miktarı hesaplanmaktadır. Bu değerlere bakılarak, toplam elde edilen diyet lifi miktarının %10 posa ilavesiyle yapılan fermentasyonla elde edilen kuru biyokütlede en fazla olduğu söylenebilir. Ancak burada, ilave edilen posanın da bir miktar diyet lif içerdiği unutulmamalıdır. Ayrıca, biyokütlede oluşması potansiyel olarak mümkün olan bir miktar diyet lifin muhtemelen katılan posa oranı ile ilişkili olarak artan lakkaz aktivitesi nedeniyle parçalanmaya uğradığı ve fermentasyon sürecinde degrade olduğu da düşünülebilir. Dolayısıyla, diyet lif ile ilgili olarak ilave edilen katkı, hem kendisi diyet lif içerdiği hem de diyet lifi degrade eden enzimlerin oluşumunu teşvik ettiği için biyokütlenin fermentasyon neticesinde sahip olacağı diyet lif içeriğini belirgin şekilde etkilemiştir.

5. TARTIŞMA

Lakkaz enzimi önemli bir enzim olup enzim miktarını artırmak için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Lakkazın yapısında bulunan bakır iyonları ve kimyasal yapısında 3 adet 2,5-ksilidin substratı içermesinde dolayı aktivite varlığını artırmak için çalışmalar genelde bakır ksilidin inokülümü yapılmıştır. Ayrıca karbon kaynağı, azot kaynağında değişiklikler yapılarak lakkaz miktarının değişimi irdelenmiştir. Bu çalışma ile yapılan çalışmalar benzerlikleri fermentasyon ortamında kullanılan substratlar incelenerek değişim ortaya konulmuştur.

Jang vd. (2002) *Trametes* sp. ile derin kültürde 28 °C’de 200 dev/dk’da çalkalamalı inkubatörde yürüttükleri çalışmada 1 mM ksilidin ekleyerek lakkaz aktivitesini 7. günde 14600 U/L olarak saptamıştır. Lakkaz aktivitesi ölçmek için ABTS substratının kullanılmıştır. Bu çalışmayla elde edilen sonuç ile yapmış olduğum çalışma karşılaştırıldığında ise en yüksek lakkaz aktivite değeri ise *Trametes versicolor* CCBAS614 kültürü ile %10 seviyesinde keçiyoynuzu posası içeren ortamda 5. gün 27874.23 U/L elde edildi. Eklenen %10 keçiyoynuzu posası Jang vd. (2002) çalışmamsıda elde edilen lakkaz miktarının yaklaşık iki katıdır. Keçiyoynuzu posası ksilidine göre enzim miktarının artmasında daha etkili olduğu söylenebilir.

Couto vd. (2003) yapmış oldukları biyoreaktör denemelerinde *T. versicolor* en yüksek lakkaz aktivitesini tava tipi biyoreaktörde elde etmiştir. Biyoreaktörde destekleyici olarak naylon sünger ve saman kullanmıştır. Tava tipi biyoreaktörde naylon sünger kullanıldığında kültür oluşumunun 18. gününde 343 U/L düzeyinde lakkaz aktivitesi elde edilirken, saman substrat olarak kullanıldığında ise 18. günde 3500 U/L düzeyinde lakkaz aktivitesine ulaşmıştır. Biyoreaktörde saman substratı kullanılarak elde edilen lakkaz düzeyi %10 keçiyoynuzu posasında elde edilen değerden çok altındadır. Keçiyoynuzu posası saman substratına göre lakkaz aktivitesi düzeyinin artmasında önemli rol oynamıştır.

Birhanli ve Yesilada (2006), yapmış olduğu bir çalışmada *Trametes versicolor* mantarını 1 mM bakır içeren sıvı çalkalamalı fermentasyon ortamında 2096 U/L lakkaz aktivitesi saptanmıştır. Keçiyoynuzu posası %10 içeren fermentasyon ortamı bakır içeren fermentasyon ortamına göre lakkaz aktivitesi değerinde değişmesinde daha etkili olmuştur.

Revankar ve Lele (2006), *Trametes versicolor*’dan farklı besiyeri kullanarak lakkaz değişimini incelemiştir. Azot kaynağı olarak maya ekstraktı, karbon kaynağı ise nişasta ve glikoz kullanmıştır. Optimize edilen besiyeri ortamına 1 mM bakır ilavesi 150 dev/dk’da 28 °C’de de 50 ml ortamda 406000 U/L belirlemiştir. Besiyeri ortamına 1 mM 2,5 ksilidin eklediğinde ise 820000 U/L değerine yükselmiştir. Lakkaz aktivitesi ölçmek için ABTS substratının kullanmış ve 420 nm dalga boyunda 1 dakika boyunca 1 µmol konsantrasyondaki ABTS’yi dönüşüme uğratan lakkaz miktarını saptamıştır. Optimize edilen besiyeri ortamına 1 mM bakır ilavesi %10 keçiyoynuzu fermentasyonunda elde edilen lakkaz miktarına göre yüksektir. Diğer taraftan 1 mM 2.5 ksilidin elde edilen lakkaz aktivitesinde %10 keçiyoynuzuna göre daha yüksek etki sağlamıştır.

Xavier (2007) yapmış olduğu bir çalışmada indükleyici maddeler ve *Trametes versicolor* mantarını kombine kullanmıştır. İndükleyici olarak lignin, lignosülfonatlar, veratril alkol, ksilidin ve etanol kullanmıştır. Sıvı kültür ortamında 10 gün 180 dev/dk'da çalkalayıcı fermantasyon devam etmiştir. Lignin indüksiyonunda maksimum lakkaz aktivitesi 1240 U/L olarak verirken, lignosülfonat için en iyi sonuç ise 270 U/L olarak saptanmıştır. 2,5-ksilidin ve veratril alkol içeren ortamda ise 345 U/L düzeyinde lakkaz aktivitesi saptanmıştır. En yüksek lakkaz aktivitesi (1583 U/L) ksilidin ilavesi ve glikozu baskılayarak kombine etkisi ile elde etmiştir. Keçiboynuzu posası %10 içeren fermantasyon ortamında elde edilen lakkaz aktivitesine göre bu değer düşük olup, %10 posa ksilidine göre lakkaz düzeyini artırmakta etkili olmuştur.

Gedikli (2008) lakkaz aktivitesi kültür sıvısının üretiminde tarımsal atık olarak buğday kepeği kullanmıştır. Patates dekstrozu besiyerine buğday kepeği ilave etmiş ve yüksek lakkaz 25080 U/L aktivitenin elde etmiştir. Gedikli (2008), Basidiomycetes sınıfına ait bir mantar olan *T. versicolor* ATCC 200801 kullanılmıştır. Stok kültürlerden yatık PDA besiyerlerine ekim yapılarak 30 °C'de 7 gün inkübasyona bırakılmış ve bu kültürler aşılama için aktif kültürler olarak kullanılmıştır. Kültürün yüzeyinden kazıma ile distile su içerisine alınan miseller toplam 40 ml hacimde homojenize edilmiştir. Homojenizattan 4 ml alınarak içerisinde 3 g buğday kepeği bulunan 100 ml'lik patates dekstrozu (PDB) besiyerine aseptik şartlarda ilave edilmiştir. Kültürler 150 dev/dk'da çalkalama hızında 30 °C'de 12 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonucunda gelişen biyokütleler filtrasyon ve santrifüj işlemleri ardışık olarak uygulanarak ortamdan uzaklaştırılmıştır. Elde edilen kültür sıvısı enzim kaynağı olarak kullanılarak lakkaz aktivitesi ölçülmüştür. Gedikli (2008) elde ettiği lakkaz düzeyi (25080 U/L) %10 keçiboynuzu posası eklenen fermantasyonda elde edilen lakkaz düzeyiyle (27874.23) U/L hemen hemen aynıdır.

Freixo vd. (2008) karbon kaynağı olarak patates posasının kullanarak katı kültürde *Trametes versicolor*'un lakkaz üretimi üzerine etkisini incelemiş ve en yüksek lakkaz aktivitesini 3. günde 362 U/L olarak belirlemiştir. Lakkaz aktivitesi ölçmek için ABTS substratının kullanılmıştır. En iyi lakkaz aktivite değeri pH 3-4 aralığında saptanırken, en uygun sıcaklığın 80 °C'de olduğugörmüştür. Freixo vd. (2008) çalışmasında elde edilen sonuç %10 keçiboynuzu fermantasyonunda lakkaz aktivitesine göre oldukça düşüktür.

Erdem (2014) yapmış olduğu tez çalışmasında *T. versicolor* ATCC 200801 suşunu kullanarak lakkaz aktivitesindeki değişimi 8 gün boyunca incelemiştir. En yüksek aktivite 8. günde 4740 U/L olarak bulmuştur. Aynı çalışmada farklı karbon kaynakları ve farklı azot kaynakları kullanarak lakkaz aktivitesindeki değişiminin farklılığını incelemiştir. Farklı karbon kaynakları ve lakkaz aktiviteleri sırasıyla verilmiştir. Fruktoz 180 U/L, maltoz 4930 U/L, pektin 800 U/L, ksiloz 9015 U/L, glikoz 4770 U/L ve nişasta 13220 U/L. Farklı azot kaynakları ve lakkaz aktiviteleri sırasıyla verilmiştir. Pepton: 6110 U/L, maya özütü: 1490 U/L, (NH₄)₂SO₄: 1440 U/L, KNO₃: 240 U/L, NH₄Cl: 5160 U/L, NaNO₃: lakkaz aktivitesi yok, NH₄NO₃: 4770 U/L. En yüksek aktivite nişasta inokülüm ile 13220 U/L düzeyindedir. Keçiboynuzu posası %10 fermantasyona göre bu değer iki katı azdır.

Adekunle vd. (2017) sıvı besiyeri ortamında 0.2 g/l, 0.4 g/l, 0.8 g/l, 1.2 g/l, 2 g/l lignin ekleyerek lakkaz aktivitesini 7. gün değişimini izlemiştir. Maksimum lakkaz düzeyini 1213.93 U/L ile 1.2 g/l lignin içeren sıvı ortamında olduğunu tespit etmiştir. Bu değer %10 posa içeren ortama göre çok düşüktür.

Bu çalışmada, *Trametes versicolor* CCBAS614 mantar kültürü ile inoküle edilen %0, 3, 6, 10 keçiboynuzu posası içeren yaş biyokütlede en yüksek toplam glukun %10 keçiboynuzu posası ortamında %18.29 elde edildi. En yüksek β -glukun *Trametes versicolor* CCBAS1399 ile %3 keçiboynuzu içeren ortamda %9.15, alfa glukun ise %10.72 olarak %10 keçiboynuzu posası içeren yaş örneklerde tespit edildi.

Kozarski vd. (2012) yapılan bir çalışmada kuru mantar ağırlıklarından toplam glukun, alfa glukun ve β glukun değerleri saptanmıştır (Mushroom and Yeast β glucan kit, Megazyme). Bu değerler *T.versicolor* kuru ağırlık için; Toplam glukun, 36.3 ± 0.7 , alfa glukun 2.9 ± 0.1 ve β glukun 33.4 ± 0.8 olarak saptanmıştır (g/100g). Farklı mantarlardan *G. applanatum* için bu değerler toplam glukun 22.4 ± 0.5 , alfa glukun 6.4 ± 0.4 ve β glukun 16.00 ± 0.5 . *G. lucidum* için toplam glukun 47.1 ± 0.6 , alfa glukun 5.7 ± 0.1 ve β glukun 41.4 ± 1.4 . *L. edodes* için toplam glukun 42.6 ± 0.2 , alfa glukun 1.4 ± 0.2 ve β glukun 41.2 ± 0.5 bulmuştur (g/100g). Keçiboynuzu posası ile zenginleştirilmiş örneklerde alınan yaş örneklerle elde edilen toplam glukun, α ve β glukun değerleri Kozarski vd, (2012) çalışmasına göre düşüktür.

Bari vd. (2015) kayın ağacında *Pleurotus ostreatus* ve *Trametes versicolor* mantarlarının bozunma yetenekleri arasında karşılaştırma yaparak toplam glukunda değişimi izlemiştir. Çalışmada toplam glukunun *P. ostreatus* % 48.60 ± 0.35 ve *Trametes versicolor* % 48.35 ± 0.48 olarak tespit etmiştir. Aynı şekilde bu çalışmayla keçiboynuzu posası zenginleştirilmiş ürünler karşılaştırıldığında glukun bakımından düşük olduğu görülüyor.

Çalışmada *Trametes versicolor* ve inoküle edilen %3, 6, 10 seviyesinde keçiboynuzu içeren 7. gün elde edilen kalıntı kuru örneklerden diyet lif analizi yapıldı. En yüksek diyet lif her iki suşta da istatistiksel olarak fark olmadığı ve %37 olarak bulundu.

Manzi (2000) yılında bir araştırmasında yenilebilir mantar olana *Pleurotus ostreatus* (SMR 127), *Pleurotus ostreatus* (SMR 138), *Pleurotus ostreatus* (SMR 172) üç farklı suş ve *Lentinula edodes* (SMR 90) mantarlarında çözünür diyet lif araştırmıştır. *Pleurotus ostreatus* (SMR 127) %37.8, *Pleurotus ostreatus* (SMR 138) %27.1, *Pleurotus ostreatus* (SMR 172) %16.8 ve *Lentinula edodes* (SMR 90) %46 çözünür diyet lif saptamıştır.

Kim vd. (2004) *Auricularia* (kulak mantarı) diğer mantar türlerinden daha yüksek diyet lif içeriğine (%50) sahip olduğu bir çalışmada bildirmiştir.

Cheung vd. (2013) yemeklik mantarların içeriği ve sağlığa faydaları hakkında yapmış olduğu bir araştırmada sırasıyla toplam diyet lif miktarları *Agrocybe aegerita*; 26.7 ± 1.51 , *Agaricus blazei*; 29.6 ± 3.52 , *Agrocybe chaxinggu*; 36.4 ± 1.01 , *Coprinus comantus*; 34.6 ± 5.28 , *Flammulina velutipes*; 38.2 ± 2.77 , *Grifola frondosa*; 44.0 ± 1.55 , *Hericium erinaceus*; 34.0 ± 0.98 , *Hypsizigus marmoreus*; 32.0 ± 1.35 , *Hericium ramosun*; 26.9 ± 0.84 , *Lentinus giganteus*; 34.8 ± 0.53 , *Pholiota adiposa*; 30.8 ± 0.48 , *Pholiota namkeo* 37.9 ± 0.79 ; *Stropharia rugosa-annulata*; 28.4 ± 0 . Her üç çalışmaya bakıldığında yenilebilir mantarlarda elde edilen diyet lif miktarları *Trametes versicolor* kuru kalıntılarla elde edilen sonuçlarla aynıdır.

6. SONUÇ

T. versicolor tıp, biyoteknoloji ve çevre koruma alanlarında büyük öneme sahiptir mantar türüdür. Bu mantarın kurutulmuş meyveleri Uzak Doğu'da yıllardır çayı demlenerek tüketilebilen, ayrıca kahveye konularak tüketilmektedir. *T. versicolor* mantarının salgıladığı lakkaz enzimi kıymetli bir enzimdir. Lakkaz çevre dostu bir enzim olup çevreye atılan atık suların ıslahında kullanıldığı için bu enzime endüstride talep giderek artmaktadır. Bu çalışmada keçiboynuzu posası yüksek selüloz içeriğinden dolayı hayvan yemi dışında lakkaz enzim miktarını artırmak amacıyla kullanılmıştır.

T. versicolor CCBAS614 kültürü ile inoküle edilen %10 seviyesinde keçiboynuzu posası içeren fermantasyon ortamında 5. günde en yüksek lakkaz miktarı (27874.22 U/L) saptandı. *T. versicolor* CCBAS1399 kültürü ile ise inoküle edilen %10 seviyesinde keçiboynuzu posası içeren fermantasyon ortamında 4. gün (14008.45 U/L) ve 5. gün (13454.86 U/L) bulundu. En yüksek aktivitenin olduğu 4. ve 5. günlerde iki değer arasında istatistiksel bir fark olmadığı saptandı.

Her iki suş karşılaştırıldığında en yüksek toplam glukan oranı olan %18.29 değerine *T. versicolor* CCBAS614 kültürü ile %10 keçiboynuzu posası içeren ortamda yürütülen fermantasyon ile ulaşılmıştır. Aynı şekilde, α -glukan oranı en yüksek değere (%10.71) %10 keçiboynuzu posası katılmış fermantasyon denemeleri ile elde edilen örneklerde bulundu. β -Glukan ise *T. versicolor* CCBAS1399 kültürü ile inoküle edilen %3 keçiboynuzu posası ortamında geliştirme ile elde edilen yaş biyokütlerde %9.15 olarak bulundu. Proteinin ise *T. versicolor* CCBAS1399 kültürü ile %3 keçiboynuzu posası içeren fermantasyon denemesinde elde edilen kuru biyokütlerde en yüksek değere ulaştığı (%10.58) saptandı. *T. versicolor* CCBAS614 kültürü ile %10 posa ilavesiyle gerçekleştirilen fermantasyonda %10.83 kül değeri, *T. versicolor* CCBAS1399 kültürü ile yine aynı bileşimdeki ortamla %10.90 kül oranı tespit edilen en yüksek seviyede kül oldu. Her iki örnekte kül oranı bakımında istatistiksel fark yoktur. Diyet lif *T. versicolor* CCBAS614 suşunda %37.76 ve *T. versicolor* CCBAS1399 kültüründe %37.21 bulundu. Her iki örnekte diyet lif bakımında istatistiksel fark yoktur.

Yapılan çalışma, *T.versicolor* mantarıyla gerçekleştirilen derin kültür fermantasyonunda keçiboynuzu posasını değerlendirmeye yöneliktir. Keçiboynuzu pekmezinden arta kalan posa, yüksek selüloz içeriği sebebiyle hayvan yemi olarak kullanılabilir, ancak bu çalışmada alternatif olarak daha yüksek katma değer sağlayabilecek şekilde lakkaz enzimi üretiminde değerlendirilmek istenmiştir. Elde edilen bilgi ve bulgular ileride yapılabilecek lakkaz verimini arttırmaya ve saf lakkaz elde etmeye yönelik bilimsel araştırmalara ışık tutabilecek niteliktedir.

Lakkaz enziminin ekstraselüler üretiminin yanı sıra, üretimde geliştirilen biyokütle örneklerinin de bileşimi araştırılarak ileride yeni gıda ürünlerinde veya takviyelerinde kullanılabilecek materyallerin geliştirilmesi hedeflenmiştir. *T. versicolor* mantarı Uzak Doğu'da yıllardır sıcak suda infüzyon şeklinde (çay gibi) tüketilmiştir. Keçiboynuzu ise Akdeniz bölgesinde yetişen bir meyvedir. Keçiboynuzu posasının ham madde olarak değerlendirilebilmesine olanak sağlayacak yöntemlerin ulusal üretim potansiyelimize katkı sunacağı umulmaktadır.

7. KAYNAKLAR

- AACC, 1999. Approved methods of analysis. St. Paul, Minnesota: The American Association of Cereal Chemists. Tenth Edition, March 2000.
- Abu Hafsa, S.H., Ibrahim, S.A., Hassan, A.A. 2017. Carob pods (*Cerastium siliqua* L.) improve growth performance, antioxidant status and caecal characteristics in growing rabbits. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 101 (6): 1307-1315.
- Adekunle, E.A., Chen, G., Liu, C.Z. 2017. Lignin-enhanced laccase production from *Trametes versicolor*. *Waste Biomass Valor*, 8 (4): 1061-1066.
- Alberts, J.F., Gelderblom, W.C.A., Botha, A., Van Zyl, W.H. 2009. Degradation of aflatoxin B1 by fungal laccase enzymes. *International Journal of Food Microbiology*, 135: 47-52.
- Anonim 1: Total glukon, α -glukon, β -glukon online file. https://secure.megazyme.com/files/Booklet/K-YBGL_DATA.pdf. [Son erişim tarihi: 12.03.2018].
- Anonim 2: Total dietary fiber online file. https://secure.megazyme.com/files/Booklet/K-TDFR_DATA.pdf. [Son erişim tarihi: 12.03.2018].
- Bademkiran, P. 2011. *Trametes versicolor* ve *Phanerochaete chrysosporium* bkm-f 1767 lakkazlarının; indükleyiciye bağlı verimli salgılanma koşullarının ve indigo boyalar üzerindeki etkilerinin iyileştirilmesinde uygun medyatörün araştırılması. Yüksek lisans tezi, Dicle Üniversitesi, Diyarbakır, 123 s.
- Bari, E., Nazarnezhad, N., Kazem, S.M., Ghanbary, M.A.T., Mohebbi, B., Schmidt, O., Clausen, C.A. 2015. Comparison between degradation capabilities of the white rot fungi *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* in beech wood. In: Bari, E. (Ed.), *International Biodeterioration & Biodegradation*, pp. 231-237.
- Bertrand, T., Jolivat, C., Briozzo, P., Caminade, E., Joly, N., Madzac, C., Mougin, C. 2002. Crystal structure of four-copper laccase complexed with an arylamine: insights into substrate recognition and correlation with kinetics. *Biochemistry*, 41: 7325-7333.
- Birhanli, E. ve Yesilada, Ö. 2006. Increased production of laccase by pellets of *Funalia trogii* ATCC 200800 and *Trametes versicolor* ATCC 200801 in repeated batch mode. *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 1286-129.
- Chandubhai, P.H. 2008. Production, Purification and Characterization of Laccase from *Pleurotus ostreatus* HP-1 and its Possible Role in Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. PhD Thesis, University of India, 200 p.
- Chang, S.T. 2008. Overview of the Mushroom Cultivation and Utilization as Functional foods. In: *Mushrooms as Functional Foods*. (Ed) Cheung, C.K. New York, John Wiley & Sons Inc, pp. 280.
- Cheng, K.F., Leung, P.C. 2008. General review of (PSP) from *C. versicolor*: Pharmacological and clinical studies. *Cancer Therapy*, 6: 117-130.

- Cheung, P.C.K. 2013. Mini- review on edible mushrooms as source of dietary fiber: Preparation and health benefits. *Food Science and Human Wellness*, 2: 162-166.
- Chu, K.K.W., Susan, S.S.H., Chow, A.H.L. 2002. *Coriolus versicolor*: A medicinal mushroom with promising immunotherapeutic values. *Journal of Clinical Pharmacology*, 42: 976-984.
- Córdoba, M., Ríos, A.H. 2012. Biotechnological applications and potential uses of the mushroom *Trametes versicolor*. *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 19(1): 70-76.
- Couto, S.R., Moldes, D., Liebnas, A., Sanroman, A., 2003. Investigation of several bioreactor configurations for laccase production by *Trametes versicolor* operating in solid-state conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 15: 21–26.
- Couto, S.R. and Herrera, J.L.T. 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances*, 24 (7): 500-513
- Cui, J. and Christi, Y. 2003. Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses, and production. *Biotechnology Advances*, 21 (2): 109-22.
- Demiralp, B., Büyük, İ., Aras, S., Cansaran-Duman, D. 2015. Lakkaz enziminin endüstriyel ve biyoteknoloji alanında kullanımı. *Türk Hiyen Deneyisel Biyoloji Dergisi*, 72 (4): 351-368.
- Demirtaş, Ö. 2007. Keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua*) çekirdeklerinden gam üretim yollarının araştırılması. Yüksek Lisans tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 48 s.
- El Batal, H., Hasib, A., Dehbi, F., Zaki, N., Ouattmane, A., Boulli, A. 2016. Assessment of nutritional composition of carob pulp (*Ceratonia siliqua* Leguminosae) collected from various locations in Morocco. *Journal of Materials and Environmental Science*. 7 (9) : 3278-3285.
- Elisashvili V. 2012. Submerged cultivation of medicinal mushrooms: bioprocesses and products. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 14 (3): 211-239.
- Erdem, Ö. 2014. *Trametes versicolor* ile tekstil boya maddelerinin renginin giderimi. Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 58 s.
- Freixo, M. R., Karmali, A., Frazza, C., Arteiro, J. M. 2008. Production of laccase and xylanase from *Coriolus versicolor* grown on tomato pomace and their chromatographic behaviour on immobilized metal chelates. *Process Biochemistry*, 43: 1265–1274.
- Gedikli, S., Aytar, P., Çabuk, A., Ünal, A., Kolankaya, N. 2008. Lakkaz enzimi ile kot boyarmaddesinin dekolorizasyonu. *Anadolu University Journal of Science and Technology*, (1): 59-70.
- Giardina, P., Faraco, V., Pezzela, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S., Sannia, G. 2010. Laccases: a never ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67: 369-385.

- Giavasis, I. 2013. Production of microbial polysaccharides for use in food. In: Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes, and Nutraceuticals. (Eds), Giavasis, I., Harvey, L.M., McNeil, B., Archer, D.B. Woodhead Publishing, pp. 413-468.
- Giavasis, I. 2014. Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients in food and nutraceuticals. *Current Opinion in Biotechnology*, 26: 162-173.
- Grienke, U., Zöll, M., Peinter, U., Rollinger, J.M. 2014. European medicinal polypores - A modern view on traditional uses. *Journal of Ethnopharmacology*, 154: 564-583.
- Hakulinen, N., Kiiskinen, L.L., Kruus, K., Saloheimo, M., Paananen, A., Koivula, A., Rouvinenn, J. 2002. Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. *Nature Struct Biol*, 9: 601-605.
- Hsu, W.K., Hsu T.H., Lin, F.Y., Cheng, Y.K., Yang, J.P. 2013. Separation, purification, and α -glucosidase inhibition of polysaccharides from *Coriolus versicolor* LH1 mycelia. *Carbohydrate Polymers*, 92: 297-306.
- ICC, 1976. Determination of the moisture content of cereals and cereal products (Basic reference method). International Association for Cereal Science and Technology.
- Jang, M.Y., Ryu, W.R., Cho, M.H. 2002. Laccase production from repeated batch cultures using free mycelia of *Trametes* sp. *Enzyme and Microbial Technology* 30: 741-746.
- Kanberoğlu, B. 2006. Zeytin karasuyunun biyolojik yolla iyileştirilmesinde tannaz enziminin etkisi üzerine bir araştırma. Yüksek lisans tezi, Ege Üniversitesi, İzmir, 277 s.
- Karkacier, M. ve Artık, N. 1995. Keçiboynuzunun (*Ceratonia siliqua* L.) fiziksel özellikleri, kimyasal bileşimi ve ekstraksiyon koşulları. *The Journal of Food*, 20 (3): 131-136.
- Kaya, S.Y ve Özdemir, Y. 2015. Keçiboynuzu meyvesinden suda çözünür kuru madde özütlenmesi üzerine meyvenin su tutma kapasitesi ile özütlenme koşullarının etkisi. *Gıda Teknolojisi Derneği*, 40 (6): 327-334.
- Krings, U., Esparan, V., Berger, R.G. 2015. The taste enhancer divanillin: a review on sources and enzymatic generation. *Flavour and Fragrance Journal*, 30: 362-3654.
- Kobayashi, H., Matsunaga, K., Oguchi, Y. 1995. Antimetastatic effects of PSK (Krestin), a protein-bound polysaccharide obtained from Basidiomycetes: An Overview. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 4: 274-281.
- Kozarski, M., Klaus, A., Miroslav, M.N., Vrvic, M.M., Todorovic, N., Jakovljevic, D., Griensven, L.J.L.D.V. 2012. Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 26: 144-153.
- Kozarski, M.S., Klaus, A.S., Nikšić, M.P., Van Griensven, L.J.L.D., Vrvic, M.M., Jakovljevic, D.M. 2014. Polysaccharides of higher fungi: biological role, structure and antioxidative activity. *Hemijaska Industrija*, 68 (3): 305-320.

- Kües, U., Liu, Y. 2000. Fruiting body production in basidiomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54 (2):141-52.
- Lindequist, U., Neidermeyer, T.H.J., Jülich, W.D. 2005. The pharmacological potential of mushrooms. *Evidence Based Alternative and Complementary Medicine*, 2 (3): 285-299.
- Maciel, M.J.M., E Silva, A.C., Ribero, H.T.C. 2010. Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: A review. *Electronic Journal of Biotechnology*, (13): 6
- Madhavi, V., Lele, S.S. 2009. Laccase: properties and applications. *Bioresources*, 4 (4): 1694-1717.
- Manzi, P., Pizziferrato, L. 2000. B-glucans in edible mushrooms. *Food Chemistry*, 68: 315-318.
- Mate, D.M., and Alcalde, M. 2017. Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. *Microbial Biotechnology*, 10 (6): 1457–1467.
- Mikolasch, A., Schauer, F. 2009. Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82: 605-624.
- Minussi, R.C., Pastore, G.M., Durán, N. 2002. Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science and Technology*, 13: 205-216.
- Ng, T.B., Chan, W.Y. 1997. Polysaccharopeptide from the mushroom *Coriolus versicolor* possesses analgesic activity but does not produce adverse effects on female reproductive or embryonic development in mice. *Gen Pharmacol*, 29: 269 –273.
- Ng, T.B. 1998. A review of research on the protein-nound polysaccharide (Polysaccharopeptide, PSP) from the mushroom *Coriolus versicolor* (Basidiomycetes:Polyporaceae). *Gen. Pharmac.*, 30 (1): 1-4.
- Ng, TB. 2004. Peptides and proteins from fungi. *Peptides*, 25: 1055-1073.
- Nitschke, J., Modick, H., Busch, E., Von Rekowski, R.W., Altenbach, H.J., Mölleken, H. 2011. A new colorimetric method to quantify β -1,3-1,6-glucans in comparison with total β -1.3-glucans in edible mushrooms. *Food Chemistry*, 127: 791-796.
- Osma, J.F., Herrera, J.L.T., Couto, S.R. 2010. Uses of laccases in the food industry. *Enzyme Research*, 30: 1-8.
- Pezella, C., Guarino, L., Piscitelli, A. 2015.How to enjoy laccases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72: 923-940.
- Que, Y. Sun, Sh., Xu, L., Zhang, Y ., Zhu H. 2014. High-level coproduction, purification and characterisation of laccase and exopolysaccharides by *Coriolus versicolor*. *Food Chemistry*, 159: 208-213.
- Ramberg, J.E, Nelson, E.D, Sinnot, R.A. 2010. Immunomodulatory dietary polysaccharides: a systematic review of the literature. *Nutrition Journal*, 9: 54-76.

- Raposo, S., Constantino, A., Rodrigues, F., Rodrigues, B., Lima-Costa, M.E. 2016. Nitrogen sources screening for ethanol production using carob industrial wastes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 181:827–843.
- Rajchenberg, M. 2011. Nuclear behavior of mycelium and the phylogeny of polypores (Basidiomycota). *Mycologia*, 103 (4): 677-702.
- Ren, L., Perera, C., Hemar, Y. 2012. Antitumor activity of mushroom polysaccharides: A review. *Food & Function*, 3: 1118-1130.
- Revankar, M.S., Lele, S.S., 2006. Increased production of extracellular laccase by the white rot fungus *Coriolus versicolor* MTCC 138. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 22: 921-926.
- Riva, S. 2006. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology*, 24(5): 219-226.
- Rossman, A.Y. 1998. Protocols for all taxa Biodiversity inventory of fungi in a Costa Rica Conservation Area Perway Publishers, Inc, pp. 195.
- Ruthes AC, Smiderle FR, Iacomini M. 2015. D-glucans from edible mushrooms: a review on the extraction, purification and chemical characterization. *Carbohydrate Polymers*, 117: 753-761.
- Silva, A.M., Miranda, A., Fernandes, E., Santos, S., Fraga, I., Santos, D.L., Dias, A.A., Bezerra, R.M. 2013. Endopolysaccharides from *Ganoderma resinaceum*, *Phlebia rufa*, and *Trametes versicolor* affect differently the proliferation rate of HepG2 Cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169: 1919-1926.
- Singh, A.P., and Singh, T. 2014. Biotechnological applications of wood-rotting fungi: A review. *Biomass and Bioengineering*, 62: 198-206.
- Solomon, E.I., Sundaram, U.M., Machonkin, T.E. 1996. Multicopper oxidases and oxygenases, 96: 2563-2606.
- Songulashvili, G., Elisashvili, V., Wasser, S.P., Nevo, E., Hadar, Y. 2007. Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, 41; 57-61.
- Tang, Y.J., Zhu, L.W., Li, H.M., LiDS. 2007. Submerged culture of mushrooms in bioreactors – challenges, current state-of-the-art, and future perspectives. *Food Technology and Biotechnology*, 45 (3): 221-229.
- Tavares, A.P.M., Silva, R.P., Amaral, A.L, Ferreira, E.C., Xavier, A.M.R.B. 2014. Image analysis technique as a tool to identify morphological changes in *Trametes versicolor* pellets according to exopolysaccharide or laccase production. *Appl Biochem Biotechnol*, 172: 2132-2142.
- Tripathi, A.M., Tiwary, B.N. 2013. Biochemical constituents of a wild strain of *Schizophyllum commune* isolated from Achanakmar-Amarkantak Biosphere Reserve (ABR), India. *World Journal of Microbial Biotechnology*, 29: 1431-1442.

- Unyanar, A., Demirbilek, M., Turkoglu, M., Celik, A., Mazmanci, M.A, Erkut, E., Unyanar, S., Cekic, O., Atacag, H. 2006. Evaluation of cytotoxic and mutagenic effects of *Coriolus versicolor* and *Funalia trogii* extracts on mammalian cells. *Drug and Chemical Toxicology*, 29 (1): 69-83.
- Turhan, İ., ve Karhan, M. 2004. Doğal bir ürün; Keçiboynuzu. *Dünya Gıda*, 12: 76- 79.
- Turhan, İ., Tetik, N., Karhan, M. 2007. Keçiboynuzu pekmezinin bileşimi ve üretim aşamaları. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, (2): 39-44.
- Virtanen, H., Vehmas, K., Erho, T., Smolander, M. 2014. Flexographic printing of *Trametes versicolor* laccase for indicator applications. *Packaging Technology and Science*, 27: 819-830.
- Viswanath, B., Rajesh, B., Janardhan, A., Kumar, A.P., Narasimha, G. 2014. Fungal laccases and their application in Bioremediation. *Enzyme Research*, 1-21.
- Wang F., Hao L., Jia S., Wang Q., Zhang X., Niu S. 2014. A Review of Research on Polysaccharide from *Coriolus versicolor*. In: Zhang TC., Ouyang P., Kaplan S., Skarnes B. (Eds.), Proceedings of the 2012 International Conference on Applied Biotechnology (ICAB 2012). Lecture Notes in Electrical Engineering, vol 249.
- Wasser, S.P. 2011. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushroom. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89: 1323-1332.
- Xavier, A.M.R.B., Tavares, A.P.M., Ferreira, R., Amado, F. 2007. *Trametes versicolor* growth and laccase induction with by-products of pulp and paper industry. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10-3.
- Yang, L., Zhang, L.M. 2009. Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources, *Carbohydrate Polymers*, 76: 349-361.
- Yeung, J.H.K., Chan, S.L., Or, P.M.Y. 2006 ” Polysaccharide peptides from COV-1 strain of *Coriolus versicolor* inhibit tolbutamide 4-hydroxylation in the rat in vitro and in vivo ”, *Food and Chemical Toxicology*, 44: 1414-1423.
- Yousif, A.K. and Alghzawi, H.M., 2000. Processing and characterization of carob powder. *Food Chemistry*, 69: 283-287.
- Zhang, M., Cui, S.W., Cheung, P.C.K., Wang, Q. 2007. Antitumor polysaccharides from mushrooms: A review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science and Technology*, 18: 4-19.
- Zhu, F., Du, B., Bian, Z., Xu, B. 2015. B-glucans from edible and medicinal mushrooms: Characteristics, physicochemical and biological activities, *Journal of Food Composition and Analysis*, 41: 165-173.
- Zjlaç, S., Reverberi, M., Ricelli, A., Granito, V.M., Fanelli, C., Fabbri, A.A. 2006. *Trametes versicolor*: A possible tool for aflatoxin control, *International Journal of Food Microbiology*, 107: 243-249.
- Zhou, Y.L, Yang, Q.Y. 1999. Sayfa 111-124. Active principles from *Coriolus* sp. Advanced Research in PSP 1999. Editör: Yang, Q.Y. Hong Kong : Association for Health Care Limited.

8. EKLER

Ek-1 Fermantasyon Ortamı Olarak Kullanılacak Besiyerleri ve Bileşimi

Besiyeri adı Kısaltması	Bileşim g/L	Kaynak
Patates Dekstroz Agar (PDA)	Ambalajda tarif edildiği şekilde; 39 g/L	Tripathi ve Tiwary'nin 2013 ve Rossman 1998
Tanımlanmış besiyeri Defined Medium (DM)	Glukoz 10; NH_4NO_3 1; KH_2PO_4 0.8; Na_2HPO_4 0.2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5; yeast extract 2. Besiyeri ortamının pH 6.0 2 M NaOH ile ayarlanıp sterilizasyona edilmiştir; (g /L).	Songulashvili vd, 2007
Tanımlanmış besiyeri ortamına %3 keçiboynuzu posası ilaveli fermantasyon.	Glukoz 10; NH_4NO_3 1; KH_2PO_4 0.8; Na_2HPO_4 0.2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5; yeast extract 2. Besiyeri ortamının pH of 6.0 2 M NaOH ile ayarlanıp sterilizasyona edilmiştir; (g/L). Sterilizasyon edilmiş (DM) ortamına %3 seviyesinde keçiboynuzu eklenerek tekrardan sterilsayon işlemi uygulanmıştır.	¹⁶ Songulashvili vd, 2007 Modifiye edilmiştir.
Tanımlanmış besiyeri ortamına %6 keçiboynuzu posası ilaveli fermantasyon.	Glukoz 10; NH_4NO_3 1; KH_2PO_4 0.8; Na_2HPO_4 0.2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5; yeast extract 2. Besiyeri ortamının pH 6.0 2 M NaOH ile ayarlanıp sterilizasyona edilmiştir; (g/L). Sterilizasyon edilmiş (DM) ortamına %6 seviyesinde keçiboynuzu eklenerek tekrardan sterilsayon işlemi uygulanmıştır.	¹⁷ Songulashvili vd, 2007 Modifiye edilmiştir.
Tanımlanmış besiyeri ortamına %10 keçiboynuzu posası ilaveli fermantasyon	Glukoz 10; NH_4NO_3 1; KH_2PO_4 0.8; Na_2HPO_4 0.2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5; yeast extract 2. Besiyeri ortamının pH 6.0 2 M NaOH ile ayarlanıp sterilizasyona edilmiştir; (g/L). Sterilizasyon edilmiş (DM) ortamına %10 seviyesinde keçiboynuzu eklenerek tekrardan sterilsayon işlemi uygulanmıştır.	¹⁸ Songulashvili vd, 2007 Modifiye edilmiştir.

¹⁶ Songulashvili vd, 2007 yapmış olduğu çalışmada kullandıkları besiyeri ortamına %3 keçiboynuzu posası ilave edilerek modifiye edildi.

¹⁷ Aynı modikasyon %6 keçiboynuzu ve %10 keçiboynuzu posası eklenerek yapıldı.

¹⁸ Aynı modifikasyon %10 keçiboynuzu posası eklenerek yapıldı.

Ek-2 Lakkaz aktivitesi ölçümünde kör ve süpernatant miktarları

Lakkaz aktivitesi ölçümü-Kör içeriği		Lakkaz aktivitesi ölçümü-Süpernatant içeriği	
%3'lük K.B kör		%3'lük K.B örnek	
	Kör (µl)		Süpernatant(µl)
50 mM ABTS	100	50 mM ABTS	100
0,1 M Na-Asetat Tamponu (pH 4.5)	800	0,1 M Na-Asetat Tamponu (pH 4.5)	800
Tanımlanmış besiyeri Defined Medium(DM + %3 K.B) ve %3 seviyesinde keçiboynuzu içeren besiyeri	100	Tanımlanmış besiyeri Defined Medium(DM + %3 K.B) ve %3 seviyesinde keçiboynuzu ortamında gelişen mantar örneklerinden alınan supernatant miktarı	100
%6'luk K.B kör		%6'luk K.B örnek	
	Kör (µl)		Süpernatant(µl)
50 mM ABTS	100	50 mM ABTS	100
0,1 M Na-Asetat Tamponu (pH 4.5)	800	0,1 M Na-Asetat Tamponu (pH 4.5)	800
Tanımlanmış besiyeri Defined Medium(DM + %6 K.B)ve %6 seviyesinde keçiboynuzu içeren besiyeri	100	Tanımlanmış besiyeri Defined Medium(DM + %6 K.B) ve %6 seviyesinde keçiboynuzu ortamında gelişen mantar örneklerinden alınan supernatant miktarı	100
%10'luk K.B kör		%10'luk K.B örnek	
	Kör (µl)		Süpernatant(µl)
50 mM ABTS	100	50 mM ABTS	100
0,1 M Na-Asetat Tamponu (pH 4.5)	800	0,1 M Na-Asetat Tamponu (pH 4.5)	800
Tanımlanmış besiyeri Defined Medium(DM + %10 K.B)ve %10 seviyesinde keçiboynuzu içeren besiyeri	100	Tanımlanmış besiyeri Defined Medium(DM + %10 K.B) ve %10 seviyesinde keçiboynuzu ortamında gelişen mantar örneklerinden alınan supernatant miktarı	100
DM kör		DM örnek	
	Kör (µl)		Süpernatant(µl)
50 mM ABTS	100	50 mM ABTS	100
0,1 M Na-Asetat Tamponu (pH 4.5)	800	0,1 M Na-Asetat Tamponu (pH 4.5)	800
Tanımlanmış besiyeri Defined Medium(DM)	100	Tanımlanmış besiyeri Defined Medium(DM) ortamında gelişen mantar örneklerinden alınan supernatant miktarı	100

ÖZGEÇMİŞ

EROLL BYTYQİ

erol89_erol@hotmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2015- Devam ediyor	Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya
Lisans	Ankara Üniversitesi
2007-2012	Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara