

T.C.  
DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*Pleurotus ostreatus ve Ceriporiopsis subvermispora CZ-3*  
**LAKKAZLARININ; İNDÜKLEYİCİYE BAĞLI VERİMLİ  
SALGILANMA KOŞULLARININ VE İNDİGO BOYALAR  
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İYİLEŞTİRİLMESİNDE UYGUN  
MEDYATÖRÜN ARAŞTIRILMASI**

**Gülşen KAYA**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**DIYARBAKIR**

**Haziran 2011**

T.C. DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ  
DİYARBAKIR

Gülşen KAYA tarafından yapılan “*Pleurotus ostreatus ve Ceriporiopsis subvermispora* CZ-3 Lakkazlarının; İndükleyiciye Bağlı Verimli Salgılanma Koşullarının ve İndigo Boyalar Üzerindeki Etkilerinin İyileştirilmesinde Uygun Medyatörün Araştırılması” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. M. Çetin AYTEKİN (Danışman)

Üye : Doç. Dr. Zübeyde BAYSAL

Üye : Doç. Dr. Mehmet DOĞRU

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 24 / 06 / 2011

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

...../...../ 2011

Prof. Dr. Hamdi TEMEL

Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Bilgi ve deneyimleriyle yol gösterip sabrı ve anlayışıyla bana destek olan Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyelerinden çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. M. Çetin AYTEKİN' e teşekkür ederim.

Çalışmalar esnasında kullanılan indükleyicilerden (4E)-4-(2,5-Dimetilfenil imino)-2,5-dimetilsiklohegza-2,5-dienon'un sentezini gerçekleştiren Kimya Bölümü öğretim üyelerinden Doç. Dr. Murat KIZIL ve çalışma arkadaşlarına, çalışmamın her aşamasında yardım, öneri ve sağlamış olduğu motivasyon için hocam Doç. Dr. Zübeyde BAYSAL'a ve ayrıca hocam Doç. Dr. Göksel KIZIL'a teşekkür ederim.

Deney aşamasında kullanılan fungusların, fotoğraf çekimlerini gerçekleştiren Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Erhan ÜNLÜ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmaları ve tez yazımında değerli yardımlarından dolayı Arş. Gör. Dr. Murat YAVUZ'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca her zaman yanımda olan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli çalışma arkadaşım Pervin BADEMKIRAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her aşamasında sevgi ve desteğini esirgemediğim yanımda olan sevgili aileme ve değerli dostlarıma sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bu çalışma Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (DUAPK 09–FF-47) ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) (TBAG 209T021) tarafından desteklenmiştir. DÜBAPK ve TÜBİTAK yöneticilerine desteklerinden dolayı teşekkür ederim.



## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	I
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	II
<b>ÖZET</b> .....	V
<b>ABSTRACT</b> .....	VII
<b>ÇİZELGE LİSTESİ</b> .....	IX
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	X
<b>EK LİSTESİ</b> .....	XIII
<b>KISALTMA VE SİMGELER</b> .....	XIV
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2 KAYNAK ÖZETLERİ</b> .....	3
2.1 Odunun Yapısı.....	3
2.1.1. Ligninin Yapısı ve Özellikleri.....	4
2.2. Canlıların Sınıflandırılmaları .....	6
2.3. Fungusların Genel Özellikleri ve Temel Grupları.....	8
2.3.1 Morfolojileri.....	10
2.3.2. Fungusların Evrimi.....	11
2.4. Beyaz Çürükçül Funguslar.....	12
2.5. Beyaz Çürükçül Fungusların Salgıladığı Lignolitik Enzimler.....	14
2.5.1. Peroksidazlar.....	15
2.5.1.1. Mangan Peroksidaz .....	15
2.5.1.2. Lignin Peroksidaz.....	16
2.5.2. Fenoloksidazlar.....	17
2.5.2.1. Lakkaz .....	18
2.5.2.2. Lakkazların Yapıları ve Katalitik Mekanizmaları .....	19



2.5.2.3.	Lakkazın Biyokimyasal Özellikleri ve İnhibitörleri .....	24
2.5.2.4.	Lakkaz Medyatör Sistemleri.....	25
	-ABTS Aracılı Sistem.....	32
	- 1-hidroksibenzotriazol (HBT) Aracılı Sistem.....	33
2.5.3.	Lakkaz Salgılanması Üzerine İndükleyici Etkisi.....	33
2.6.	Lakkaz Enzimlerinin Kullanım Alanları.....	35
2.6.1.	Gıda Endüstrisi.....	35
2.6.2.	Kâğıt ve Kâğıt Hamuru Endüstrisi.....	35
2.6.3.	Atık Suların Dekolorizasyonu ve Zehirli Maddelerden Arındırılması.....	36
2.6.4.	Denim Yıkamada Kullanımı.....	36
2.6.5.	Nanobiyoteknoloji.....	38
2.6.6.	Toprağın Biyolojik İyileştirilmesinde Lakkazın Kullanılabilirliği.....	39
2.7.	Enzim Saflaştırma (Pürifikasyon) Teknikleri.....	39
2.8.	Araştırmanın Amacı.....	40
2.9.	Önceki Çalışmalar.....	42
<b>3.</b>	<b>MATERYAL ve METOT.....</b>	<b>49</b>
3.1.	Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	49
3.2.	Kullanılan Aletler.....	50
3.3.	Kullanılan Mikroorganizmalar.....	51
3.4.	Kullanılan Bitkisel Atık Materyaller ve C/N İçeriklerinin Tayini.....	51
3.5.	Katı Besiyerinin Hazırlanması.....	52
3.6.	Kültivasyon Koşulları.....	52
3.7.	Protein Miktarının Tayin Edilmesi.....	54
3.8.	Lakkaz Aktivitesi Tayini.....	55
3.9.	Enzim Saflaştırma/ Zenginleştirme.....	55
3.9.1.	Tuz İle Çöktürme.....	56
3.9.2.	Moleküler Elek Kromatografisi.....	56





3.10.	Elektroforez Analizi.....	57
3.11.	Zenginleştirilen Enzimlerin Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi.....	57
3.12.	Uygun Medyatörün Tayinine Yönelik Çalışmalar.....	58
<b>4.</b>	<b>ARAŞTIRMA BULGULARI.....</b>	<b>61</b>
4.1.	Protein Miktarı ve Lakkaz Aktivitesi.....	61
4.2.	Enzim Saflaştırma/Zenginleştirme .....	61
4.3.	Optimal pH, Sıcaklık ve Kinetik Parametre Verileri .....	61
4.4.	Lakkaz Medyatör Sistemlerinin İndigo Boyaları Renksizleştirmedeki Etkinliği.....	61
<b>5.</b>	<b>TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>91</b>
<b>6.</b>	<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>95</b>
EKLER	.....	113
ÖZGEÇMİŞ	.....	115



## ÖZET

*Pleurotus ostreatus* ve *Ceriporiopsis subvermispora* CZ-3 LAKKAZLARININ; İNDÜKLEYİCİYE BAĞLI VERİMLİ SALGILANMA KOŞULLARININ VE İNDİGO BOYALAR ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İYİLEŞTİRİLMESİNDE UYGUN MEDYATÖRÜN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gülşen KAYA

DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI

2011

Lakkazlar (EC 1.10.3.-, p-difenol:dioksijen oksidoredüktaz) bakır iyonları içeren oksidaz grubu enzimlerdir. Bu grubun bir üyesi ilk kez Japonya’da lake ağacının (*Rhus vernicifera*) reçine kanallarının bir bileşeni olarak 19. yüzyılın sonlarında keşfedildi. Doğada yaygın olarak bulunan ve glikoprotein olan, molekül ağırlıkları 50.000 ila 130.000 arasında değişen lakkazların ana kaynağını funguslar oluşturur. Son ürün olarak yalnızca su oluşturdukları için çevre dostu olarak tanımlanan bu enzim grubuna ilgi son zamanlarda giderek artmıştır.

Şimdiye kadar yüzün üzerinde lakkaz izole edilerek değişik kapsamlarda karakterize edilmiştir. 1990’da ABTS’nin lakkaz substrat medyatörü olarak davrandığı ya da bu bileşiğin enzimin etkisini artırdığı fark edildikten sonra çok sayıda başka bileşiğin de bu amaca yönelik kullanılabilirlikleri araştırılmıştır. Sonuç olarak lakkaz enziminin izole edildiği kaynağa ve/veya üzerine etkiyeceği substrata bağlı olarak medyatör niteliğine sahip bileşiğin değişebildiği saptanmıştır.

Amaca uygun lakkaz/medyatör sistemlerinin geliştirilmesi, ilgili endüstrilerde dışarıya bağımlılığı azaltacağından, ürünün maliyetinin düşmesine katkı sağlar. Bu çalışmada organizmanın cinsine, türüne ve ona ürettirilmek istenen maddeye bağlı olarak değişim gösterebileceği düşüncesinden yola çıkarak, *Pleurotus ostreatus* ve *Ceriporiopsis subvermispora*’nın katı faz kültürasyonu teknikleri kullanılarak test edilen indükleyicilerin etkisi ile en iyi miktarda ve en yüksek oranda aktiviteye sahip lakkaz enzimi/enzimleri salgılamalarının koşulları araştırıldı. *C. subvermispora* ve *P. ostreatus* kavun kabuğu, karpuz kabuğu ve kızıl çam kozalığının destek materyel olarak kullanıldığı yarı katı faz fermantasyon tekniği ile üretilip indükleyiciye bağlı lakkaz salgılama koşulları protein miktar tayini ve lakkaz aktivitesi testi yapılarak araştırıldı.

Destek materyale ilave edilen ve 4 farklı indükleyicinin (2,5-ksilidin, 3,5-ksilidin, 2,4-ksilidin ve sentezlenen (4E)-4-(2,5-Dimetilfenilimino)-2,5-dimetil siklo



hegza-2,5-dienon) iki ayrı derişimlerini içeren 25 mL sıvı besi yeri ortamında yüksek miktarlarda lakkaz üretimine, yapılan enzim aktivitesi sonucunda 16. günde ulaşıldığı belirlendi. *C. subvermispora*'nın, indükleyici olarak kullanılan 2,4-ksilidinin 5000 µM derişimi ile sentezlene maddenin 5 µM derişiminde kavun kabuğunun bulunduğu besi ortamındaki inkübasyonun 16. gününde en yüksek miktarda lakkaz ürettiği tespit edildi. *P. ostreatus*'un ise 16. günde sentezlenen bileşimin 5 µM ve 2,5-ksilidinin 5000 µM derişiminde kavun kabuğu ile inkübe edildiği koşullar altında en iyi miktarda lakkaz ürettiği belirlendi.

Ayrıca enzimlerin tekstil endüstrisinde yaygın olarak kullanılan indigo boya renksizleştirilmesi için katalitik etkinlik gösterebileceği redoks medyatörünün belirlenmesine yönelik çalışmalar yapıldı. İndigo boya üzerine seçilen medyatörlerin Siringate ve 1-hidroksibenzotriazol (HBT) ile kıyaslandığında renksizleştirmede genellikle etkili olmadıkları ancak indigo Carmin'in renksizleştirilmesinde 1-(4-Sulfophenyl)-3-methyl-5-pyrazolone, 3-Methyl-1-(4'-sulfoamidophenyl)-5-pyrazolone medyatörlerinin en az Siringate yada HBT kadar etkili oldukları gözlemlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Fungus, faz kültürasyonu, indükleyici, lakkaz, medyatör, indigo renksizleştirme



## ABSTRACT

*Pleurotus ostreatus* and *Ceriporiopsis subvermispora* CZ-3 LACCASE'S RESEARCH ON A SUITABLE INDUCER TO IMPROVE EFFECTIVE SECRETED CONDITIONS AND IT'S AFFECT ON INDIGO DYES DEPEND ON MEDIATORS

MSc THESIS

Gülşen KAYA

DICLE UNIVERSITY  
SCIENCE INSTITUTE  
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

2011

Laccases (EC 1.10.3.2, p-diphenol:dioksijen oksidoreductase) are oxidases that consist of copper ion. In the late nineteenth century, a member of that group was first discovered as a compound of resin ducts of lacquer tree in Japan. Fungi form the main source of the laccases which are found in nature widely and the weight of glycoprotein molecules of them change from 50.000 to 130.000. Interest in that enzyme group, which are known as environment friendly since they form as a last product, has increased recently.

Over one hundred of laccases have been isolated and categorized in different contexts, so far. After it was realized that ABTS acted as laccase substrate mediator and enzyme of that compound increased it's effect in 1990, lots of enzymes were researched in terms of their utility for his purpose. As a result it was determined that compound with a mediator nature can change depending on the source from which laccase enzyme is isolated and/or on the substrate it will affect.

As improvement of suitable laccase/ mediator system will decrease dependence on imports in relevant industries it will also contribute to reducing the costs. In this study, based on the assumption that organism can differ depending on it's type and matter it made produced, conditions to secrete laccase enzymes were researched. They had activity at the best and highest amount because of the inductive affect that were tested by using solid-phase cultivation techniques. *Pleurotus ostreatus* and *Ceriporiopsis subvermispora* was produced by semi-solid fermentation technique in which melon peel, watermelon peel and red pine cone was used as supporting material. Afterwards it was researched by using laccase activity testing, laccase secretion conditions and protein quantification. 25 ml liquid consisting two different concentration of four different inductive (2,5-xsilidine, 3,5-xsilidine, 2,4-xsilidine and synthesized (4E)-4-(2,5-Dimethylphenylimino)-2,5-Dimethylsiklohegza-2,5-dienon)





which was added to supporting material was determined to achieve to high amount of laccase production in medium environment in sixteenth day as a result of enzyme activity. It was determined that in 2,4-xsilidine 5000  $\mu\text{M}$  concentration of *C. subvermispora* which is used as inductive and in 5  $\mu\text{M}$  synthesized material, incubation in medium environment produce highest amount of laccase at sixteenth day. 5  $\mu\text{M}$  and 2,5-xsilidine compound of *P. ostreatus* which is synthesized in sixteenth days was determined to produce best amount of laccase when it was incubated with watermelon peel in 5000  $\mu\text{M}$  concentration.

Some studies were made to determine redox mediator. They can show catalytic activity of enzyme for decolorisation of indigo dyes which is used in textile widely. It was observed that mediators which were chosen on indigo dye were not generally affective on decolorisation when compared with methylsringeyt and 1-hydroxybenzotriazole (HBT). But it was also observed that in the decolorisation of the indigo Carmine 1-(4-Sulfophenyl)-3-methyl-5-pyrazolone, 3-methyl-1-(4'-sulfoamidophenyl)-5-pyrazolone mediators were as effective as methylsringeytor HBT.

**Key words:** Fungus, cultivation phase, inductive, laccase, mediator, indigo decolorisation



## ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>		<u>Sayfa</u>
<b>Çizelge 3.1.</b>	Kozalak, karpuz ve kavun kabuklarının karbon azot içerikleri	52
<b>Çizelge 4.1.</b>	<i>C. subvermispora</i> 'nın uygulanan koşullar altındaki protein miktarı	63
<b>Çizelge 4.2.</b>	<i>P. ostreatus</i> 'un uygulanan koşullar altındaki protein miktarı	65
<b>Çizelge 4.3.</b>	<i>C. subvermispora</i> 'nın uygulanan koşullardaki lakkaz aktivitesi	67
<b>Çizelge 4.4.</b>	<i>P. ostreatus</i> 'un uygulanan koşullar altındaki lakkaz aktivitesi.	69
<b>Çizelge 4.5.</b>	Seçilen 7 farklı koşulda örneklerin 16.gündeki protein miktarı ve lakkaz aktivitesi	71
<b>Çizelge 4.6.</b>	Ticari lakkaz ve kısmi saflaştırılan lakkazların farklı pH'lardaki aktiviteleri	76
<b>Çizelge 4.7.</b>	Ticari lakkaz ve kısmi saflaştırılan lakkazların farklı sıcaklıklarda ölçülen aktiviteleri	78
<b>Çizelge 4.8.</b>	Ticari lakkaz ve kısmi saflaştırılan lakkazların ölçülen absorban değerlerine bağlı olarak hesaplanan kinetik parametreler	80
<b>Çizelge 4.9.</b>	Ticari lakkaz-medyatör sisteminin indigo boya üzerine etkisi	84
<b>Çizelge 4.10.</b>	<i>C. subvermispora</i> lakkazı ve medyatörlerin indigo boya üzerine etkisi	85
<b>Çizelge 4.11.</b>	<i>P. ostreatus</i> lakkazı ve medyatörlerin indigo boya üzerine etkisi	86
<b>Çizelge 4.12.</b>	Ticari lakkaz-medyatör sisteminin indigo karmin boya üzerine etkisi	87
<b>Çizelge 4.13.</b>	<i>C. subvermispora</i> lakkazı ve medyatörlerin indigo karmin boya üzerine etkisi	88
<b>Çizelge 4.14.</b>	<i>P. ostreatus</i> lakkazı ve medyatörlerin indigo karmin boya üzerine etkisi	89



## ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1.	Odun hücre duvarının yapısı	3
Şekil 2.2.	Lignin fiberlerinin mikroskop altındaki görünümü	5
Şekil 2.3.	Lignin yapısının öncül molekülleri	5
Şekil 2.4.	Ligninin genel yapısı	6
Şekil 2.5.	Canlıların gelişimlerini gösteren şema	7
Şekil 2.6.	Karşılaştırmalı rRNA gen dizilimiyle tanımlanmış filogenetik yaşam ağacı	8
Şekil 2.7.	Fungusların filogenisi	
Şekil 2.8.	<i>C. subvermispora</i> hifalarının SEM görüntüsü	11
Şekil 2.9.	<i>P. ostreatus</i> 'un doğadan bir görüntüsü	13
Şekil 2.10.	Mangan peroksidazın kristal yapısı	16
Şekil 2.11.	Lignin peroksidazın kristal yapısı	17
Şekil 2.12.	<i>Bacillus subtilis</i> cotA protein lakkazının kurdela modeli.	20
Şekil 2.13.	<i>T. versicolor</i> lakkazının kristal yapısı	20
Şekil 2.14.	<i>T. versicolor</i> lakkazının aktif merkezlerinin yapısı ve gerçekleştirdikleri çevrimin şematik gösterimi	21
Şekil 2.15.	Beyaz çürükçül funguslar tarafından katalizlenen lignin biyodegradasyonu	22
Şekil 2.16.	Lakkaz moderatör (medyatör) sisteminin katalitik reaksiyon şeması	26
Şekil 2.17.	Odundaki fenolik grupların lakkaz ile oksidasyonu	26
Şekil 2.18.	Lakkaz ve TEMPO'nun substratı yükseltgeme mekanizması	29
Şekil 2.19.	Lakkaz medyatörü olarak kullanılan bazı bileşikler	30
Şekil 2.20.	ABTS'de elektron akışı	32
Şekil 2.21.	HBT'nin yapısı	33
Şekil 2.22.	Lakkaz katalizli indigo boya degradasyonu	37
Şekil 2.23.	Protein özelliklerine göre saflaştırma teknikleri	40



<b><u>Sekil No</u></b>		<b><u>Sayfa</u></b>
<b>Şekil 3.1.</b>	İnokülasyonda kullanılmak üzere katı besi yerinde üretilen funguslar	54
<b>Şekil 3.2.</b>	Büyük ölçekte <i>P. ostreatus</i> ve <i>C. subvermispora</i> 'nın inkübasyonu	54
<b>Şekil 3.3.</b>	Çalışmada kullanılan medyatörler	59
<b>Şekil 4.1.</b>	<i>C. subvermispora</i> 'nın uygulanan koşullar altındaki protein miktarı	64
<b>Şekil 4.2.</b>	<i>P. ostreatus</i> 'un uygulanan koşullar altındaki protein miktarı	66
<b>Şekil 4.3.</b>	<i>C. subvermispora</i> 'nın uygulanan koşullar altındaki lakkaz aktivitesi	68
<b>Şekil 4.4.</b>	<i>P. ostreatus</i> 'un uygulanan koşullar altındaki zamana bağlı lakkaz aktivitesi	70
<b>Şekil 4.5.</b>	Seçilen 7 farklı koşulda örneklerin 16. gündeki protein miktarı	72
<b>Şekil 4.6.</b>	Seçilen 7 farklı koşulda örneklerin 16. gündeki lakkaz aktivitesi	72
<b>Şekil 4.7.</b>	Kullanılan Sephacryl S-100 kolonu için kalibrasyon grafiği.	73
<b>Şekil 4.8.</b>	<i>C. subvermispora</i> ile elde edilen lakkazın kolon grafiği	73
<b>Şekil 4.9.</b>	<i>P. ostreatus</i> ile elde edilen lakkazın kolon grafiği	74
<b>Şekil 4.10.</b>	<i>C. subvermispora</i> lakkazının elektroforez profilleri	75
<b>Şekil 4.11.</b>	<i>P. ostreatus</i> lakkazının elektroforez profilleri	75
<b>Şekil 4.12.</b>	Ticari lakkaz ve kısmi saflaştırılan lakkazların farklı pH'larda ölçülen aktiviteleri.	76
<b>Şekil 4.13.</b>	<i>C. subvermispora</i> lakkazının optimal pH aktivitesi.	77
<b>Şekil 4.14.</b>	<i>P. ostreatus</i> lakkazının optimal pH aktivitesi.	77
<b>Şekil 4.15.</b>	Sıcaklığa bağlı lakkaz aktivitesi	78
<b>Şekil 4.16.</b>	<i>C. subvermispora</i> lakkazının optimal sıcaklık aktivitesi	79
<b>Şekil 4.17.</b>	<i>P. ostreatus</i> lakkazının optimal sıcaklık aktivitesi	79
<b>Şekil 4.18.</b>	Ticari lakkazın aktiviteye göre Lineweaver-Burk Grafiği	81
<b>Şekil 4.19.</b>	Ticari lakkazın aktiviteye göre Michaelis-Menten Grafiği	81
<b>Şekil 4.20.</b>	<i>C. subvermispora</i> lakkazının aktiviteye göre Lineweaver-Burk Grafiği	82
<b>Şekil 4.21.</b>	<i>C. subvermispora</i> lakkazının aktiviteye göre Michaelis-Menten Grafiği	82
<b>Şekil 4.22.</b>	<i>P. ostreatus</i> lakkazının aktiviteye göre Lineweaver-Burk Grafiği	83





<b><u>Sekil No</u></b>		<b><u>Sayfa</u></b>
<b>Şekil 4.23.</b>	<i>P. ostreatus</i> lakkazının aktiviteye göre Michaelis-Menten Grafiği.	83
<b>Şekil 4.24.</b>	Ticari lakkaz-medyatör sisteminin indigo boya üzerine etkisi	84
<b>Şekil 4.25.</b>	<i>C. subvermispora</i> lakkazı ve medyatörlerin indigo boya üzerine etkisi	85
<b>Şekil 4.26.</b>	<i>P. ostreatus</i> lakkazı ve medyatörlerin indigo boya üzerine etkisi	86
<b>Şekil 4.27.</b>	Ticari lakkaz-medyatör sisteminin indigo karmin boya üzerine etkisi	87
<b>Şekil 4.28.</b>	<i>C. subvermispora</i> lakkazı ve medyatörlerin indigo karmin boya üzerine etkisi	88
<b>Şekil 4.29.</b>	<i>P. ostreatus</i> lakkazı ve medyatörlerin indigo karmin boya üzerine etkisi	89



## **EKLER**

**EK 1.** Poliakrilamit Jel Elektroforezi için Kullanılan Çözeltiler

113



## KISALTMA VE SİMGELER

ABTS	: 2,2'-azino-bis(3-etilbenziltiazolin-6-sülfonik asit)
Cys	: Sistein
DEAE-sepharoze	: Dietil amino etil sefaroze
DHN	: Dihidroksinaftalen
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EPR	: Elektron paramanyetik rezonans
HAA	: N-hidroksiasetanilit
HBT	: 1-hidroksibenzotriazol
His	: Histidin
HPI	: N-hidroksiftalimid
$k_{cat}$	: Katalitik yeterlilik sabiti
$K_M$	: Michaelis-Menten sabiti
LI	: Lakkaz iyileştirici
LiP	: Lignin Peroksidaz (Ligninaz)
LMS	: Lakkaz medyatör sistemleri
MCD	: Magnetik Sirkular dikroizm
MnP	: Mangan Peroksidaz
MS	: Metilsiringate
MSPP	: 3-Methyl-1-(4'-sulfoamidophenyl)-5-pyrazolone
POX	: Fenol oksidaz
RBBR	: Remazol brillant blue
rRNA	: Ribozomal RNA
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez
SMP	: 1-(4-Sulfophenyl)-3-methyl-5-pyrazolone
TNT	: Trinitrotoluen
VA	: Violurik asit
VP	: Versatil Peroksidaz



## 1. GİRİŞ

Biyoteknoloji, organizmaların ve biyolojik sistemlerin pratik ve ticari amaçlar için kullanılması olarak tanımlanabilir. Biyoteknolojik teknikler, fermantasyon, enzim teknolojisi, hücre ve doku kültürü gibi çeşitli işlemleri içermektedir. Biyoteknolojik süreçlerde esas konu mikroorganizmaların atık maddeleri besin olarak kullanması ve çevreye zarar vermeyen ürünlere dönüştürmesidir (Qui ve Park 2001).

Biyoteknolojik tekniklerin başında yer alan enzim teknolojisinin hızla gelişmesi ile yeni ve farklı enzimlerin varlığı saptanmıştır. Birçok sektörün hemen her alanında enzimler sayesinde yapılan değişiklikler üzerine araştırmalar mevcuttur. Bu amaçla ilk olarak enzimlerin yünü keçeleşmesini önlemek için kullanılmasıyla lif mukavemetinin gelişmesi sağlanmıştır. 1960'larda proteazların deterjan formüllerinde kullanılması ile biyolojik deterjan dönemi başlamıştır. 1970'lerde selülozların deterjanlarda kullanılmasıyla çoğu kez yıkamalarda tüylenmeler engellenmiştir (Rowe 1999). Amilaz enziminin nişasta haşılını uzaklaştırmada kullanılması selülozu hidrolize eden selüloz enziminin kumaş yüzeyini düzgülendirmede, boncuklanma eğilimini azaltmada, biyo-parlatmada ve denim kumaşlara eskitilmiş görünüm kazandırmada kullanılması gibi çeşitli uygulamalar enzimlere olan ilgiyi her geçen gün artırmaktadır (Rowe 1999).

Enzimler bitkisel, hayvansal ve mikroorganizma kökenli olmakla birlikte endüstriyel alanda kullanılanlar çoğunlukla mikroorganizmalardan izole edilmektedirler. Bunun nedeni, mikroorganizma kaynaklı enzimlerin katalitik aktivitelerinin yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha kararlı ve ucuz olmaları, büyük ölçeklerde ve yüksek saflıkta elde edilebilmeleri gibi avantajlara sahip olmalarıdır (Aba dulla ve ark. 2000 ).

Bazı enzimlerin hayvan ve bitki dokularından ekstrakte edilmeleriyle birlikte enzimlerin çoğu fermentör denilen büyük reaktörlerde mikroorganizmalardan üretilirler. Mikroorganizmalar endüstriyel proseslerde kullanım için uygun canlılardır. Mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesi ve korunması biyoendüstrinin gelişimine çok önemli katkılarda bulunmakla birlikte çok yönlü yapıları ve yüksek büyüme hızları ile mikroorganizmalar yeni endüstrilerin oluşturulması için yüksek bir kullanım potansiyeli taşımaktadır. Verimlilikleri, seçicilikleri, ılımlı şartlar altında çalışabilmeleri ve biyolojik olarak parçalanabiliyor olmaları nedeniyle enzimler endüstride organik sentezler, klinik

analizler, ilaç üretimi, deterjanlar ve gıda üretimi gibi birçok alanda kullanılmaktadırlar. Özellikle tekstil endüstrisinde beyaz çürükçül funguslar tarafından salgılanan selüloz enzimi mikrofibril uzaklaştırmada, lakkaz enzimi ise renk ağartmada kullanılmaktadır. Beyaz çürükçül funguslar, hücre dışı ligninolitik enzim sistemleri ile çevre kirliliğine neden olan birçok yıkımı güç (recalcitrant) organik bileşikleri (xenobiyotikler, lignin, boyarmaddeler vb.) indirgeyebilmektedir (Beilen ve Li 2002).

Lakkaz (benzenediol: oksijen oksidoredüktaz; EC 1.10.3.-) enzimleri, hem fenolik hem de fenolik olmayan ligninle ilişkili bileşikleri okside edebildiği gibi biyolojik yıkıma dirençli olan çevre kirleticilerininide oksitleyebilmektedirler. Buna ek olarak elektron alıcısı olarak NAD(P)<sup>+</sup> gibi pahalı ko-faktörler yerine moleküler oksijeni kullanmaları ve zararlı olan hidrojen peroksida gereksinim duymamaları gibi nedenlerle, lakkaz enzimleri son zamanlarda oldukça ilgi çekici bir araştırma alanı oluşturmaktadırlar. Lakkaz enzimlerinin sahip olduğu bu oksidasyon yeteneği bazı endüstriyel ve biyoteknolojik süreçlerde kullanılabilirliğini artırmaktadır.

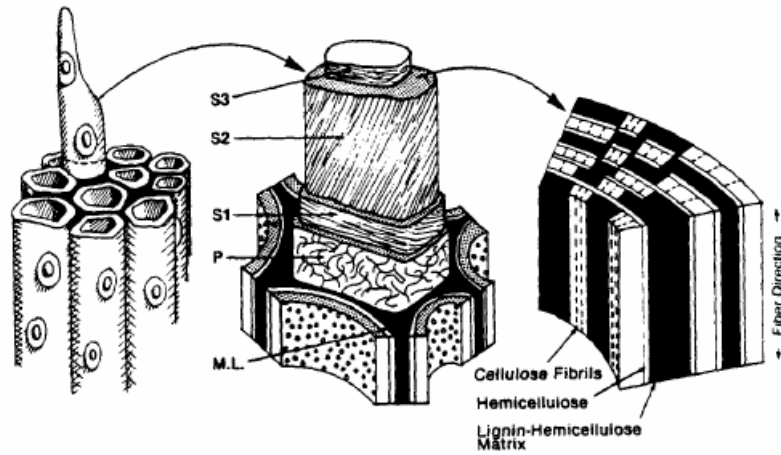


## 2.KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Odunun Yapısı

Ağaç (odun), yapısında selüloz, hemiselüloz ve hidroksifenil-propan alt birimlerinden oluşan kompleks bir polimer olan ligninden oluşan uzun ve ince fiberlerin yığılması olarak tanımlanabilir.

Odun, sert iç şeklinde hücrelerden oluşur. Hücre duvarı birincil ve ikincil hücre duvarı tabakalarından farklı olarak mikrofibrillerden oluşur. Birincil duvarda mikrofibriller matrikste bulunmaktadır. Matris, hücre yüzeyinde ksiloglukan ve pektin maddelerini içerir. İkincil duvarda üç tabaka gözlenir; S1, S2, S3 tabakaları. Bu tabakalarda bulunan mikrofibrillerin, hücre eksenine göre farklı paralel düzenlemeleri vardır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Odunun hücre duvarı yapısı, ince yapısı ve organizasyonunu gösteren genel bir şema

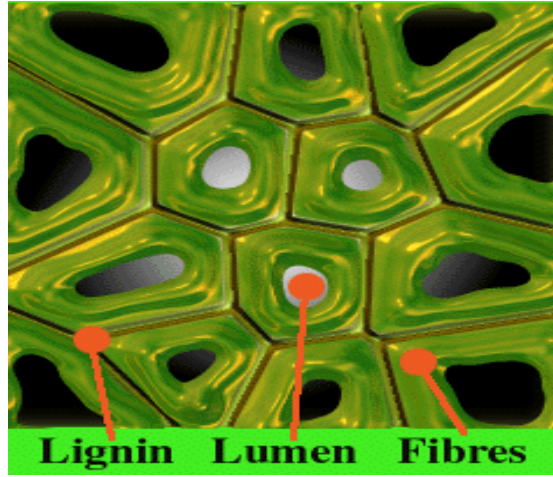
Yaklaşık olarak odun ağırlığının %45'ini oluşturan selüloz, odunun temel yapısı olan hücre duvarını kararlı yapar. Bu  $\beta(1\rightarrow4)$  glikozit bağla bağlı sellobiyoz birimlerinin lineer bir polimeridir. Selüloz moleküllerini, van der Waals kuvvetleri ve hidrojen bağları bir arada tutar. Bu etkileşim sonucu doğal selülozik yapıda; selüloz zinciri mikrofibrilleri olarak bilinen demetler halinde sıralanıp her mikrofibril yaklaşık 40 ayrı selüloz zinciri içerir (Kirk ve Cullen 1998).

Hemiselülozlar odun ağırlığının % 25 ile % 30'unu oluşturur. Hemiselülozlar da  $\beta(1\rightarrow4)$  monosakkarit lineer polimerleridir. Selülozun aksine, hemiselüloz molekülleri daha az dayanıklı biçimsiz ve rastgele yapılardan oluşur ve iskelet yapıdaki şeker kalıntılarına göre sınıflandırılır (Kirk ve Cullen 1998). Hemiselüloz; lignine proteinlere ve diğer polisakkaritlere kimyasal olarak çapraz bir şekilde bağlanır (Palonen 2004). Ligninin yapısını selüloz ve hemiselülozun etkilediği öne sürülmüştür.

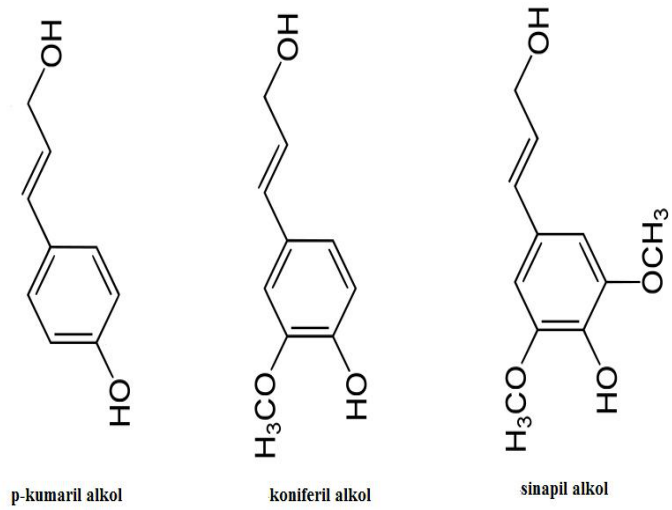
### 2.1.1. Ligninin Yapısı ve Özellikleri

Lignin, bitkilerde fiberleri, damarları ve hücreleri birbirine bağlayan organik bir maddedir. Selülozdan sonra doğada en çok bulunan ve yenilenebilen bir karbon kaynağıdır ve odunun kuru ağırlığının yaklaşık yüzde 20-30'unu oluşturur. Odunun mekanik özelliklerini amorf bir polimer olan lignin belirlemektedir. Hücre çeperinde lignin daima hemiselülozla beraber bulunmaktadır (Şekil 2.2). Bu hem fiziksel hem de kovalent bağlardan kaynaklanır. Birçok lignin esterleşmiş durumda aromatik karboksilli asitleri içermekte ve ligninlerin kimyasal bileşimi değişim gösterebilmektedir. Genel olarak, fenil propen temel birimlerinin dallı polimerleri olarak tanımlanabilirler (Çalgeriş 2010).

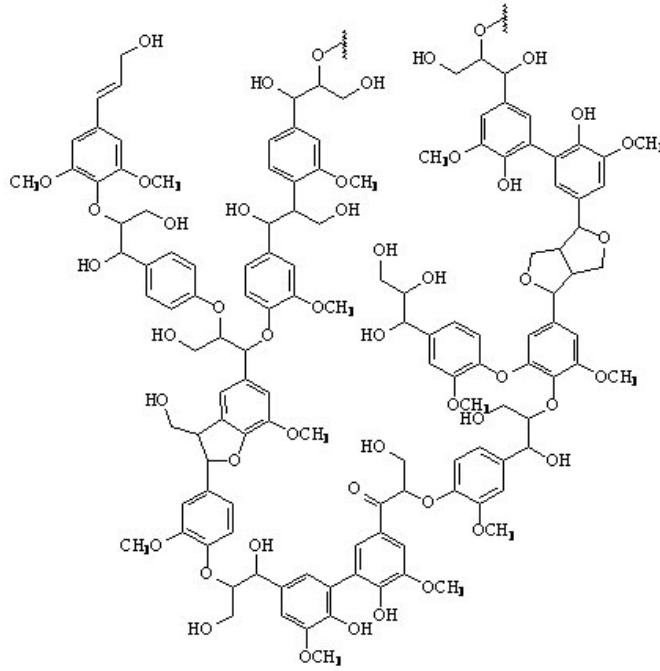
Kükürtlü ve kükürtsüz olmak üzere iki temel lignin yapısı vardır. Bugüne kadar ticari olarak kullanılan ligninler, kükürt içeren ligninlerdir. Bunlar lignosülfonatlar ve kraft ligninidir. Kükürt içermeyen ligninlerin henüz ticari değeri yoktur. Lignin ve lignin kaynaklı ürünler, toprakların oluşumunda ve hayvan besiciliğinde önemli rol oynar. Lignin içerdiği hidrofilik ve hidrofobik gruplarından ötürü gıda ve kozmetik sektöründe jelleşmede veya emülgator ve dispergatorların özelliklerinin iyileştirilmesinde kullanılır. Uygun maliyetinden ötürü doğal ve yenilenebilir hammadde olarak, günümüzde petrokimyasal maddelerin yerine kullanılabilir. Ligninlerin antioksidan, antibakteryal ve antiviral özelliklere de sahip olduğu belirtilmiştir (<http://www.ili-lignin.com/aboutlignin.php>).



Şekil 2.2. Lignin fiberlerinin mikroskop altında görünümü  
(Çalgeriş 2010)



Şekil 2.3. Lignin yapısının öncül molekülleri (Çalgeriş 2010)



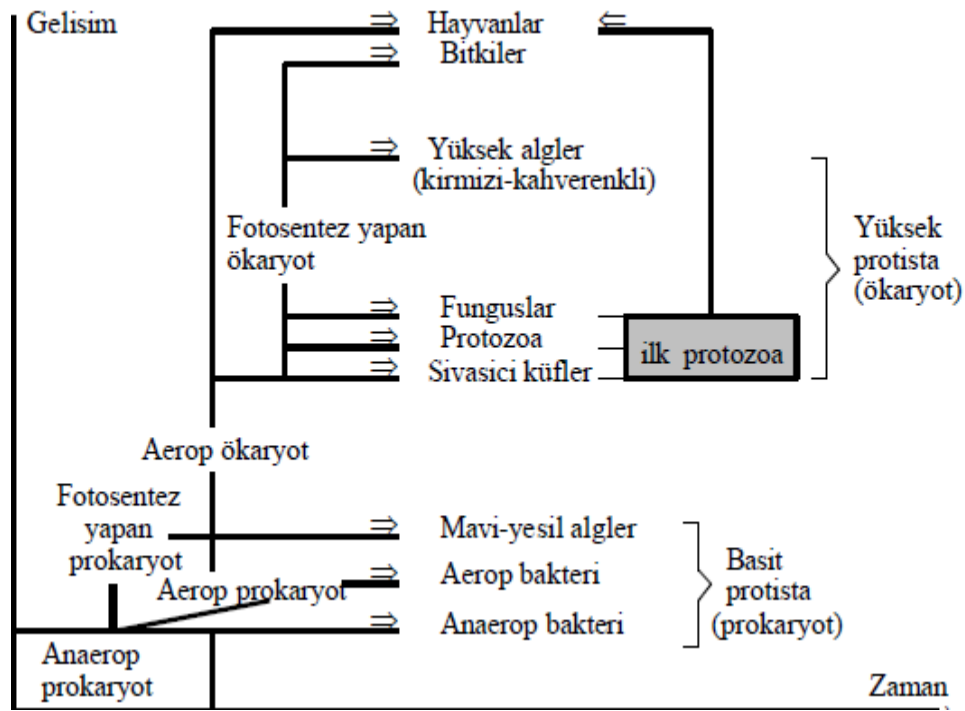
Şekil 2.4. Ligninin genel yapısı (Palonen 2004)

Lignin, süstitüe fenil propan birimlerinin birbirleriyle C-C ve C-O-C bağlanmalarıyla oluşan, hidrofobik karakteri yüksek, çapraz bağlanmalar içeren kompleks aromatik bir polimerdir. Bu çapraz bağlanmalar, p-kumaril, konoferil ve sinapil alkoller gibi aromatik bileşiklerle oluşmuştur (Şekil 2.3 ve Şekil 2.4) (Kirk ve Cullen 1998, Palonen 2004).

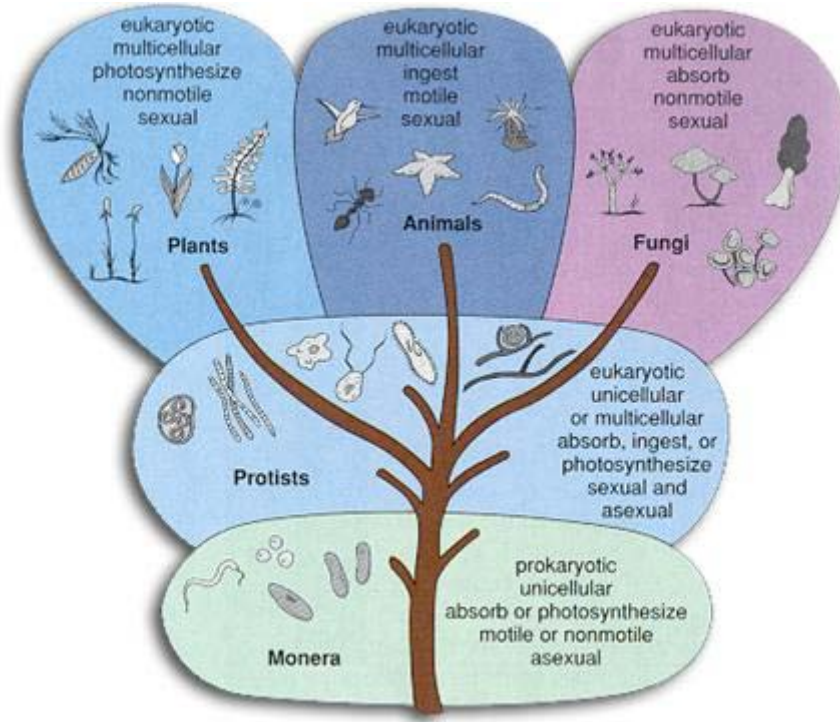
### 2.2. Canlıların Sınıflandırılmaları

Biyologlar eskiden canlıları, bitkiler ve hayvanlar olmak üzere iki alemde toplamışlar. Mikroorganizmalar; küçük, basit yapılı ve tek hücreli canlılar olup, basit bitkilerden ve basit hayvanlardan daha ilkindir. Anthony van Leeuwenhoek, 1674 yılında keşfettiği mikroskobunda bakterileri izleyerek küçük hayvancıklar diye tarif etmiş, ancak 19. yüzyılda bu mini canlıların bitki ve hayvan özelliklerinin ikisini birden taşıdıkları anlaşılmıştır. Gözle görülemeyen ancak mikroskoplarla görülebilen canlılara mikroorganizma (minicanlı) denir. Mikrobiyoloji; *Micros* (küçük), *bios* (hayat), *logos* (bilim) kelimelerinden türetilmiş olup bakteri, parazit ve fungus gibi doğada bulunan minicanlılar ile uğraşan bilim dalıdır. Haeckel 1866 yılında, bakterileri bitki ve hayvan aleminden ayırt ederek Protista adını verdiği üçüncü bir aleme koymuştur. Protistaların çoğu tek hücrelidir ve farklılaşma görülmeyip çok hücreli olanlarda çok az farklılaşma

olabilir. Protistalar, yüksek ve basit protistalar olmak üzere iki sınıfta incelenir. Yüksek protistalar ökaryot, basit protistalar prokaryot hücre özelliklerine sahiptir. Funguslar yüksek protista sınıfında yer alırlar (Şekil 2.5 ve Şekil 2.6). Yüksek protistalar hücre yapıları, bitki ve hayvan hücrelerine benzer ökaryotik tiptedir. Hücrede çekirdek ve çekirdek zarı, sitoplazma, endoplazmik retikulum, mitokondriler, ribozomlar ve hareket organelleri bulunup mitozla çoğalırlar. Kromozom sayısı 3 veya daha fazladır. Hücre duvarında mukopeptid yapı bulunmaz. Fungusların dışında diğerlerinin hücre duvarı sert değildir. Yüksek protista aleminde ayrıca algler, protozoa, ve küfler (molds) yer almaktadır (Özbal 2011).



Şekil 2.5. Canlıların gelişimlerini gösteren şema ( Özbal 2011)



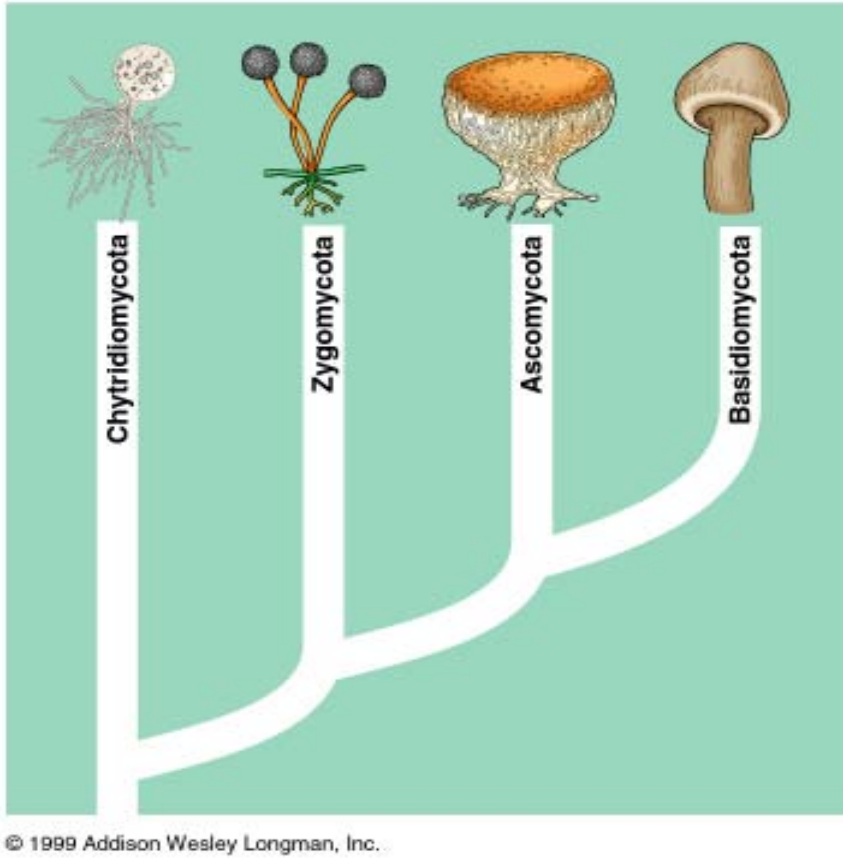
Şekil 2.6. Karşılaştırmalı rRNA gen dizilimiyle tanımlanmış filogenetik yaşam ağacı (Beş krallık, <http://crperiod5.edublogs.org> )

### 2.3. Fungusların Genel Özellikleri ve Temel Grupları

Fungusların fotosentetik pigmentleri yoktur. Fotosentetik pigmentlerinin olmayışı, fungusları karbon kaynağı olarak organik maddeleri kullanmaya zorunlu kılmıştır (Demir ve ark. 2004). Funguslar doğada oldukça yaygın olarak bulunurlar. Yaklaşık 400,000 çeşitten oluşan, oldukça gelişmiş hücresel yapıya sahip ökaryotik canlılardır (Murray 1990). Ökaryotik hücreler de tüm hücreler gibi bir plazma membranla çevrili olmalarının yanında ekstra bir membranla çevrili farklı hücresel görevler için özelleşmiş organellere sahiptir. Fungusların hücre duvarlarında kitin ve selüloz karakterinde maddelerin bulunmasından dolayı devamlı değişen çevre koşullarına uyum sağlamada oldukça dirençli olurlar. Funguslar genellikle düşük pH değerlerinde bile kolayca üreyebilir ve böyle ortamlara adapte olabilirler. Fungusların üreme ısı limitleri oldukça geniştir ve türler arasında farklılıklar gösterir. Bu sınırlar 0-60 °C arasında değişmektedir (Arda 2000).

Flamentli funguslar renkleri, sertlik dereceleri (yumuşaklık) ve çürütme (çürüme) çeşitlerine göre beyaz, kahverengi ve yumuşak olarak üç sınıfa ayrılırlar. Yumuşak çürükçül funguslar Askomiset ve fungi imperfecti (deutromiset) gruplarını içerir ve selülozu ayrıştırırken lignini kısmi olarak parçalayabilir. Kahverengi çürükçül funguslar basidiomisetlerin bir kısmını içerir ve hemiselüloz ile selülozun ayrıştırılması için tercih edilir. Lignini metil giderimi yaparak parçalar ve bunun sonucunda da ürün olarak amorf, kahverenkli ve kolayca ufalanan artıklar oluşur. Lignini kinonlara yıkar ve dolayısıyla kahverenk oluşur. Üçüncü olarak beyaz çürükçül funguslarda bazı basidiomyceteleri içerir. Lignin, beyaz çürükçül funguslar tarafından oldukça etkili ve hızlı bir şekilde parçalanır. Diğer birçok fungus ve bakterinin yanında beyaz çürükçül funguslar lignini karbondioksit ve suya tamamen parçalayabilmektedir (Scklarz ve ark. 1989).

Funguslar pek çok farklı morfolojik şekle sahip olan çok geniş ve heterojen bir grup oluştururlar. Tek hücreli maya şeklinden miselyum oluşturan tiplere kadar değişirler (Şekil 2.7). Fungusların varlığının tanınması çok eski zamanlara dayanır. Pling (M.S. 23-79) depolarda saklanan tahıllarda fungusların ürediğini bildirmiştir. Marcello Malpighi 1676 yılında *Rhizopus*, *Mucor* ve *Penicilin* gibi bazı funguslar üzerinde araştırmalar yapmıştır (Akan 1993).



Şekil 2.7. Fungusların filogenisi. Beyaz çürükçül funguslar basidiomycota grubu üyesidirler (<http://bionerds.freesevers.com/catalog.html>).

### 2.3.1. Morfolojileri

Funguslar maya ve küf olmak üzere iki şekilde ürerler. Küf şeklinde üreme çok hücreli filemantöz kolonilerin oluşumunu gösterir. Bu koloniler, çapı 2-10  $\mu\text{m}$  arasında değişen dallanmış silindirik yapılardan oluşmuştur. Bunlara hifa adı verilir (Şekil 2.8). Küf formunda aktif üreme esnasında hifalar iç içe girerek saç şeklinde kitleler oluştururlar. Bunlara mycelium adı verilir. Pek çok fungusta hifalar sayısız transvers bölmeler veya septalarla bölümlere ayrılmıştır. Bölümler genellikle tek çekirdekli olup böyle hifalara septalı hifa adı verilir. Septalı hifalarda hücreler birbirinden tam olarak ayrılmamışlardır. Septalarda bulunan delik veya delikler aracılığıyla birbirleri ile ilişki halindedirler. Bazı hifalar septalarla bölünmemiştir. Bu hifalar ince, uzun bir tüp veya iplik şeklinde olup çekirdekler dağınık vaziyette bulunurlar. Böyle hifalara septasız hifa denir. Fungusların diğer bir formu genellikle yuvarlak veya oval şekilde ve 3-15  $\mu\text{m}$  çapında maya olarak isimlendirilen tek hücrelerdir. Mayalar genellikle tomurcuklanma



ile çoğalırlar. Bazı çevre şartlarının etkisi altında maya hücreleri pseudomycelium oluşturmak için uzarsa da normal şartlar altında mayalar tek hücreli mikroorganizmalardır (Akan 1993).



**Şekil 2.8.** Beyaz çürükçül fungus olan *Ceriporiopsis subvermispora* Hifalarının SEM görüntüsü  
(<http://www.jgi.doe.gov/sequencing/why/csubvermispora.html> )

### 2.3.2. Fungusların Evrimi

Funguslar bitkilerden çok hayvanlara daha yakındırlar. Fungusların evrimsel orijini; funguslar, hayvanlar ve bitkiler arasındaki filogenetik bağlantıları saptamada önemlidir. Funguslarla hayvanlar arasındaki bağlantıları destekleyen anahtar kanıtları; protein sekans analizleri, biyosentetik yollar, sitokrom sistemleri, mitokondriyal genetik materyal, biyokimyasal ve yapısal hücresel özellikler (hücre duvarlarının yapısı ve sitoplazmik organeller), glikoproteinler, beslenme şekli ve besleyici materyallerin depolanması, ayrıca hif duvarlarının kimyasal yapısı ve ribozomal RNA ile ilgili elde edilen sonuçlar oluşturur. Funguslar hem çoklu doymamış yağ asitlerinin senteziyle hem de sitokrom sistemleriyle hayvanlara benzemektedir. Funguslar, bitkilerde olmayan b ve c tip sitokramlara sahiptirler. Funguslar ortak morfolojik ve yapısal hücresel özellikleri hayvanlarla paylaşırlar. Funguslar depoladıkları besin materyalleri bakımından da hayvanlara benzerler ve birçok ökaryotik organizmaya benzer olarak,

karbon rezervi olarak lipitleri biriktirebilirler. Diğer ortak depo maddesi ise, bakteri, protozoa ve yüksek hayvanlarda olduğu gibi glikojendir. Bitkilerde ise karbon rezervi olarak nişasta kullanılır. Hücre duvarı selülozdan oluşan fungusların duvarlarında, hayvanlardakine benzer olarak kolesterol türevleri vardır (Cavalier-Smith 1986).

Fungal evrim hakkındaki çalışmalar; karşılaştırmalı morfoloji, hücre duvarı içeriği, sitolojik testler, ince yapı, hücresel metabolizma, fosil kayıtlar ve özellikle rRNA üzerinde temellenmiştir (Guarro ve ark. 1999).

### 2.4. Beyaz Çürükçül Funguslar

Basidiomiset ve askomisetler, odunda beyaz çürükçüllüğün başlıca nedenidir. Beyaz çürükçüllüğe sebep olan türler kahverengi çürükçüllüğe neden olanlardan çok daha fazladır. Bu türler genelde basidiomisetler içinde yer almaktadır. Beyaz çürükçül funguslar hem lignini hem de selülozu parçalamaktadır. Bu funguslar, kahverengi çürükçüllerin bıraktığı toz gibi kahverengi lekelerden tamamen farklı olarak beyaz ve daha çok lifli kalıntılar bırakır (Michael ve ark. 2001). Hücre çeperini oluşturan selüloz ve hemiselüloz gibi polisakkaritler ligninle birlikte parçalanırlar ve odun ligninin uzaklaştırılmasından dolayı çok daha açık bir renk alır (Hasenekoğlu ve Yeşilyurt 2001). Fakat bazıları önce lignini uzaklaştırır sonra selüloza atak yapar bu da seçici delignifikasyon olarak tanımlanır (Michael ve ark. 2001).

Basidiomiset sınıfına ait olan beyaz çürükçül fungusların sentezledikleri lakkaz, Mn-peroksidaz, lignin peroksidaz ve NADH peroksidaz (NADH oksidaz) ekstrasellüler enzimleri biyoteknolojik çalışmalarda yoğun olarak kullanılmaktadır. Boyar madde giderimi başta olmak üzere pek çok biyoteknolojik çalışmalarda kullanılan bu funguslara *Trametes (Cariolus) versicolor*, *Funalia trogii*, *Phanerochate chryso sporium*, *Pleurotus ostreatus* (Şekil 2.9), *Pleurotus sajor-caju* ve *Pleurotus eryngii*'yi örnek olarak verebiliriz ( Aretxago ve ark. 2001, Chagas ve Durrant 2001, Wesenberg ve ark. 2002).

Beyaz çürükçül funguslar karbon döngüsünün düzenlenmesinde anahtar rol oynamaktadırlar (Hatakka 1994). Lignini parçalayan funguslar ekstrasellüler enzimlerini kullanarak lignini depolimerize edebilme yeteneklerine göre karakterize edilir. Ekstrasellüler enzimler olan lignin peroksidaz, mangan peroksidaz, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üreten enzimlerdirler.



Şekil 2.9. *Pleurotus ostreatus*'un doğadan bir görüntüsü  
([http://www.mykoweb.com/CAF/species/Pleurotus\\_ostreatus.html](http://www.mykoweb.com/CAF/species/Pleurotus_ostreatus.html))

Lakkazlar ise  $H_2O_2$  oluşturmadan ya da  $H_2O_2$ 'ye gereksinim duymadan ligninin parçalanmasını sağlar. Beyaz çürükçül funguslarla yapılan çeşitli çalışmalar peroksidaz ve lakkaz enzimlerinin türden türe farklılık göstermesine rağmen tüm ligninolitik funguslar tarafından salgılandığını göstermiştir (Waldner ve ark. 1988, De Jong ve ark. 1992, Palaez ve ark. 1995). Ligninolitik funguslar ağaçların köklerinde beyazlığa sebep olarak doğada yıkımı güç olan birçok bileşiği substrat özgünlüğü geniş olan enzimlerle parçalayabilmektedirler. Bu yıkımı güç (recalcitrant) bileşiklerden böcek zehirleri (pestisit), polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), poliklorlubifeniller (PCB), organoklorlar, sentetik boyalar, cephane atıkları, sentetik polimerler gibi birçoğu büyük çevre kirliliklerine sebep olurlar (Pointing 2001). Beyaz çürükçül funguslar lignin, aromatik bileşikler ve tekstil boyaları gibi mikrobiyal ataklara karşı dayanıklı bileşikleri salgıladıkları spesifik olmayan ekstraselüler enzimlerle oksitleyebilirler (Cripps ve ark. 1990). Bu fungus kültürleri lignini modifiye eden enzimleri yani lignin peroksidaz (LiP), mangan peroksidaz (MnP), mangan bağımsız peroksidaz (MnIP) ve sellobiyoz dehidrogenaz (CDH) azot, karbon veya kükürtün sınırlı olduğu ortamlarda sekonder metabolitler olarak salgırlar (Kirk ve Farrell 1987). Birçok lakkaz, fungusun ağaç üzerindeki büyümesi sırasında konstitutif (indükleyici bir maddeye ihtiyaç duymadan enzim salgılayan) olarak düşük konsantrasyondaki üretimi ksilidin ve ferulik asit gibi

aromatik bileşiklerin ilave edilmesiyle yüksek oranlarda indüklenir. (Call ve Mucke 1997).

### 2.5. Beyaz Çürükçül Fungusların Salgıladığı Lignolitik Enzimler

Ağaçta beyaz çürümeye neden olan, basidiomiset fungusları doğadaki en verimli lignin parçalayıcı ve muhtemelen doğadaki lignin içeren dokuların karbon döngülerini sağlayan birincil ajanlardır (Kirk ve Farrel 1987, Eriksson ve ark. 1990). Bu funguslar taksonomik olarak heterojen yüksek funguslara dahil bir gruptur, ama en büyük özellikleri, bir takım ekstraselüler ligninolitik enzimler kullanarak lignini depolimerize edebilme yeteneği olan tek fungus türü olmalarıdır (Akhtar ve ark. 1992, Lamar ve ark. 1992).

Ekstraselüler veya intraselüler olarak salgılanan bu biyokatalizörlerin fiziksel fonksiyonları mikroorganizmadan mikroorganizmaya farklılık göstermesine rağmen sonuçta hepsi polimerizasyon veya depolimerizasyon proseslerini katalizler (Mayer ve Staples 2002). Lignin molekülleri hücre içine taşınabilmesi için oldukça büyüktür. Lignin, bitki hücre duvarının yapısal bileşenidirler. Heterojen yapıya sahip lignin biyolojik olarak parçalanması ekstraselüler enzimlerle olasıdır (Kirk ve Cullen 1998). Lignin degradasyonundan sorumlu iki tip ekstraselüler enzim vardır. Bunlar peroksidazlar ve fenoloksidazlardır.

Beyaz çürükçül funguslar lignolitik seçiciliklerine göre farklılıklar gösterir. Örneğin; *P. chrysosporium* salgıladığı enzimlerle hem lignini hem de selülozu parçalar -ken, *C. subvermispota* ise lignini hızlı bir şekilde parçalar ancak selüloz üzerinde aynı derecede etkin değildir. *P. ostreatus*, lignini degrade eden mikroorganizmaların alt sınıfına aittir, lakkaz mangan peroksidaz ve veratril alkol oksidaz üretirken lignin peroksidaz üretmez (Palmieri ve ark. 1997). *Pycnoporus cinnabarinus* ligninolitik enzim olarak sadece lakkaz üretir (Eggert ve ark. 1996).

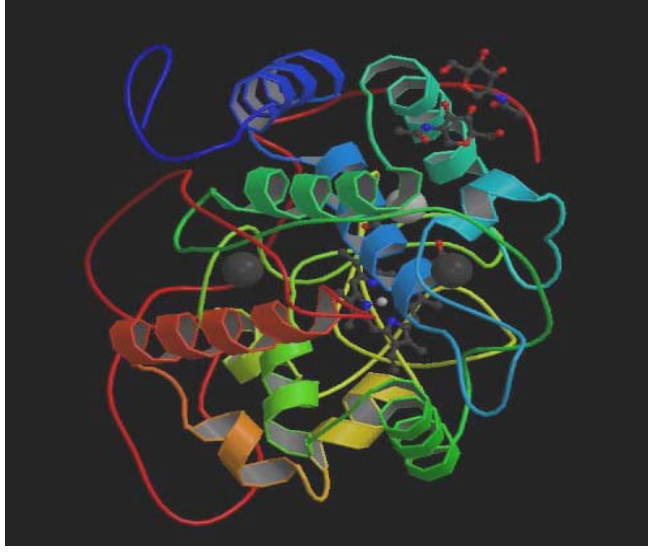
### 2.5.1. Peroksidazlar

Peroksidazlar Hem (Heme) grubu içeren enzimlerdir. Hem peroksidazlar *Phanerochaete cryso sporium* gibi lignini parçalayan basidiomisetler tarafından üretilir (Munirathinam ve ark. 1994). Substrat spektrasına dayalı olarak ikiye ayrılır. Birinci tür mangan peroksidaz (MnP)'dır ve  $Mn^{2+}$  onun için en iyi indirgen substrattır. Lignin peroksidaz (LiP) ise nonfenolik ve fenolik aromatik bileşikleri oksitler. Lignin ve benzeri bileşikler oksitleyebilmeleri için hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ihtiyaç duyarlar (Mester ve ark. 1996).

#### 2.5.1.1. Mangan Peroksidaz

MnP hemen hemen tüm beyaz ve kahverengi çürükçül fungusların en yaygın ürettiği ligninolitik peroksidazdır (Hatakka 1994, Willman ve Fakoussa 1997). *P. Chr - ysosporium*'dan elde edilen manganaz peroksidaz ilk olarak yaklaşık 25 yıl önce tanımlanmıştır (Kuwahara ve ark. 1984 ).

MnP'in belirgin özelliği, yapıdaki aktif bölümde iki adet kalsiyum iyonunun bulunmasıdır. Aktif bölgesi Asp rezidüsüne Hidrojen bağı ile bağlı bir His ligandı ve cep içeren katalitik Arg ve His bağı peroksit distal tarafı içerir (Banci, 1997). MnP beş adet disülfür bağına sahiptir. Beşinci disülfür bağı MnP'a özgüdür. Bu bağı bir bileşeni C-terminal uçtur ve kısmen proteinin ana gövdesinden C-terminal ucu uzak tutmak için uygulanan kuvetten sorumludur. MnP,  $Mn^{2+}$ 'yi  $Mn^{3+}$ 'e yükseltgeme kabiliyeti konusunda eşsizdir. MnP'in substrat bağlanan bölgenin kristal yapısı, sadece bir Mn bağlanma bölgesi olduğunu gösterir (Şekil 2.10).  $Mn^{2+}$  bağlanma bölgesi, bir Hem propiyonik asit, üç asidik ligand ve iki su molekülü içerir. Mangan peroksidaz iki domainden oluşur ve Hem grubu bu iki domain arasında sıkışıp kalmıştır. Domainlerin her biri 10 büyük ve 1 adet küçük heliks yapı içerir (Welinder ve Gajhede 1993).



Şekil 2.10. Mangan peroksidazın kristal yapısı (Dizge 2007)

### 2.5.1.2 Lignin Peroksidaz

LiP beyaz çürükçül fungus *P. cryosporium*'un ligninolitik kültüründen izole edilmiş hem grubu içeren bir glikoprotein (Şekil 2.11) ve oksidatif lignin depolimerizasyonunu elektron transferiyle gerçekleştirebilen hidrojen peroksit bağımlı oldukça önemli bir enzimdir. LiP ayrıca fenol içermeyen, elektron yönünden zengin aromatik lignin benzeri bileşiklerin oksidasyonunu katalizleyebilmektedir (Kertsen ve ark. 1985, Schoemaker ve Leisola 1990).

Lignin peroksidaz tarafından kullanılan indirgen substrat türleri mangan peroksidazın substratından biraz farklılık gösterir. Lignin peroksidaz için bir bileşiğin substrat olup olmadığını belirlemede iki faktör etkilidir; birincisi molekülün büyüklüğü ikincisi de redoks potansiyelidir. Lignin peroksidazın diğer peroksidazlardan daha yüksek redoks potansiyeline sahip olması bu enzimi poliaromatik hidrokarbonlar (PAH) için iyi bir yükseltgen yapar. Lignin peroksidaz da indirgen substratın bağlanma bölgesi tam olarak doğrulanmamış olması lignin gibi büyük moleküllerle lignin peroksidazın kinetik parametrelerini belirlemenin oldukça zor olmasına sebep olur (Ferapontova ve ark. 2006).



Şekil 2.11. Lignin peroksidazın kristal yapısı  
(Renganathan ve Gold 1994)

### 2.5.2. Fenoloksidazlar

Mavi bakır enzimler olarakta bilinen fenoloksidazlar önemli kofaktörlerden dolayı primer amino asit zincirleri ve biyolojik fonksiyonlarında farklılık göstermesine rağmen üç boyutlu yapıları ve üç değişik tipteki bakır (Cu) bağlanma bölgeleri oldukça benzerdir (Call ve Mucke 1997, Messerschmidt 1997). Substrat olarak moleküler oksijen ( $O_2$ ) kullandığı bilinen 200' den fazla oksijenaz ve oksidaz vardır. Ancak bunlardan sadece 6 tanesi oksijeni su molekülüne indirger.

- Mavi oksidaz (lakkaz) (EC 1.10.-.-)
- Sitokrom-C oksidaz (EC 1.9.-.-)
- L-askorbat oksidaz (EC 1. 10.-.-)
- Seruloplazmin (EC 1. 16.-.- )
- Bilirubin oksidaz (EC 1. 3.-.-)
- Fenoksozinon sintaz (EC 1. -. -. -)

### 2.5.2.1. Lakkaz

Lakkaz (EC 1.10.3.-, p-difenol: dioksijen oksidoredüktaz), oksidazların bakır ailesindedir ve  $AH_2 + 1/2O_2 \rightarrow A + H_2O$  denkleminde göre hidrojen peroksit oluşturmadan, moleküler oksijenin suya indirgenmesini katalizleyen enzimlerdir. Şimdiye kadar yüzden fazla lakkaz izole edilerek değişik kapsamlarda incelenmişlerdir. Bu enzimlerin ilk üyesi 19. yüzyılın sonlarına doğru Yoshida tarafından Japon lake ağacı (*Rhus vernicifera*)'nın reçine kanallarının bir bileşeni olarak tanımlanmıştır. Bu enzim izolasyonu ve saflaştırılmasından yaklaşık 10 yıl sonra 'lakkaz' olarak adlandırılmıştır. Sonrasında 1896 yılında Bertrand ve Labord, lakkazın funguslar tarafından da salgılanan bir enzim olduğunu bulmuştur (Call ve Mucke 1997). Lakkazın ayrıca ağaç, lahana, şalgam, şekerpancarı, elma, şeftali, kuşkonmaz gibi birçok sebze de bulunduğu belirtilmektedir (Thurston 1994).

Lakkazlar molekül ağırlıkları 50.000 ila 130.000 arasında değişen glikoproteinlerdendirler. Doğada her yerde yüksek bitkilerde ve araştırılan bütün funguslarda, bakteri ve böceklerde bulunan lakkazlar, bitkilerde hücre duvarı formasyonu içinde bağlanmışlardır (Riva 2006). Bitki kaynaklı lakkazların karbonhidrat oranları %45'in üzerinde iken fungal lakkazlar daha düşük oranlarda (%10 - 30) karbonhidrat içerirler (Baldrian 2006). Karbonhidrat kısmının, molekülün üçüncül yapısına kararlılık kazandırdığına ve onu proteolizden ve radikaller tarafından inaktivasyondan koruduğu düşünülmektedir (Yoshitake ve ark. 1993, Ko ve ark. 2001).

Lakkaz enzimleri bitkilerde yaygın olarak bulunmasına rağmen, bitkisel lakkazların karakterizasyonu ve kullanımı mikrobiyal kökenli lakkaz enzimlerine göre çok da yaygın değildir. Bunun nedenlerinden biri, ham bitkisel özütlerin oldukça geniş bir substrat özgüllüğü gösteren çok sayıda oksidatif enzimleri içermesi nedeniyle bitkisel lakkazların belirlenmesinin ve saflaştırılmasının zor olmasıdır (Ranocha 1999). Şimdiye kadar karakterizasyonu yapılmış olan lakkaz enzimlerinin büyük bir çoğunluğunun kaynağını ise genellikle iyi bir lignin parçalayıcısı olan beyaz-çürükçül funguslar oluşturmaktadırlar (Chefetz ve ark. 1998).

Geniş bir substrat aralığına sahip olan fungal lakkazların, fenolik bileşiklerin polimerizasyonunu, depolimerizasyonunu, metilasyonunu ve/veya demetilasyonunu katalizledikleri bilinmektedir (Leonowicz ve ark. 1979, Leonowicz ve ark. 1985).



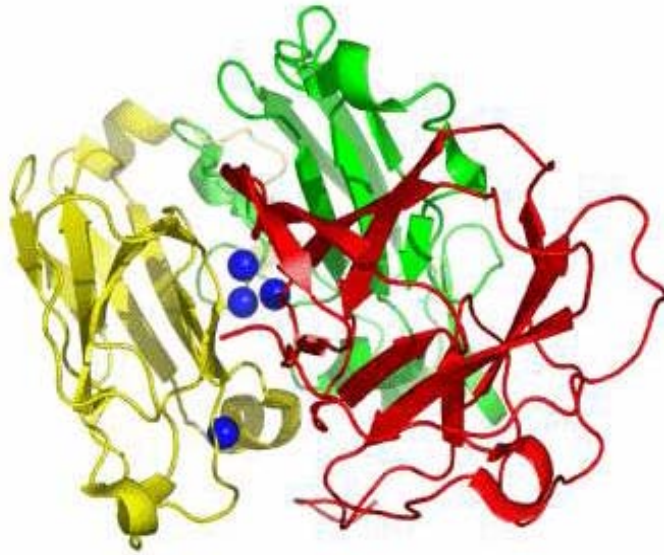
Ayrıca fungal lakkazlar, bitki patojenitesinde (VanEtten ve ark. 1989), ligninin parçalanmasında, meyvelenme yapılarının pigmentasyonunda, eşeysel farklılaşmada, hücre lizisine dirençlilikte ve detoksifikasyonda rol almaktadırlar (Thurston 1994).

### **2.5.2.2. Lakkazların Yapıları ve Katalitik Mekanizmaları**

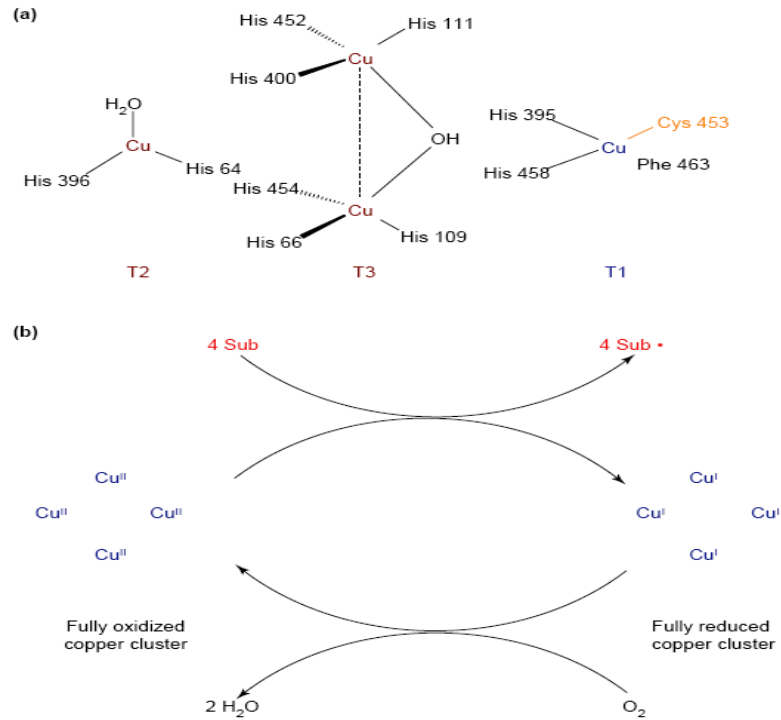
Bütün lakkazlar yapılarında, (büyüklükleri ve şekilleri yaklaşık olarak benzer) bakır içeren T1, T2 ve T3 bölgelerini bulundurur (Şekil 2.12 ve Şekil 2.13). Bakırın bulunduğu bölgeler, bitkisel, plautosiyanin ve bakteriyel azurin gibi basit bakır ihtiva eden proteinlere benzediği gibi (Norris ve ark. 1983, Inoue ve ark. 1999) daha kompleks çok sayıda bakır içeren askorbat oksidaz (Messerschmidt ve ark. 1997) ve seruloplazmin (Murphy ve ark. 1997) gibi proteinlerinki ile de benzerlik gösterir. Bu üç bölgede lakkazın katalitik etkinliği için önemlidir. T2 ve T3 bölgeleri arasındaki yarı substratın bağlanma noktasını oluşturur. Mononükleer bakır merkezi, iki His (Histidin) ve bir Cys (sistein) artığıyla trigonal olarak koordine olmuş bir Cu atomundan (Tip 1, T1) oluşur. T1 ile Cys artığının arasındaki koordinasyon bağı güçlü kovalent karakter taşır ve bu yüzden 600 nm civarında şiddetli bir absorpsiyona sahiptir. Lakkazlara tipik mavi rengini veren de bu özelliğidir (Solomon ve ark. 1996). Trinükleer bakır kümesi bir tane tip-2 (T2) bakır atomu ve bir çift tip-3 (T3) bakır atomu içerir (Messerschmidt 1997). T2 bakırını iki ve T3 bakırını altı His artığı ile koordine olmuş durumdadır. T1 ve T2 bakırları paramagnetiktirler ve 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 absorbanza sahiptirler (Şekil 2.14) (Solomon ve ark. 1996).



**Şekil 2.12.** *Bacillus subtilis* cotA protein lakkazının kurdela modeli. Bakır atomları kırmızı küreler olarak gösterilmiştir (Enguita ve ark. 2003).

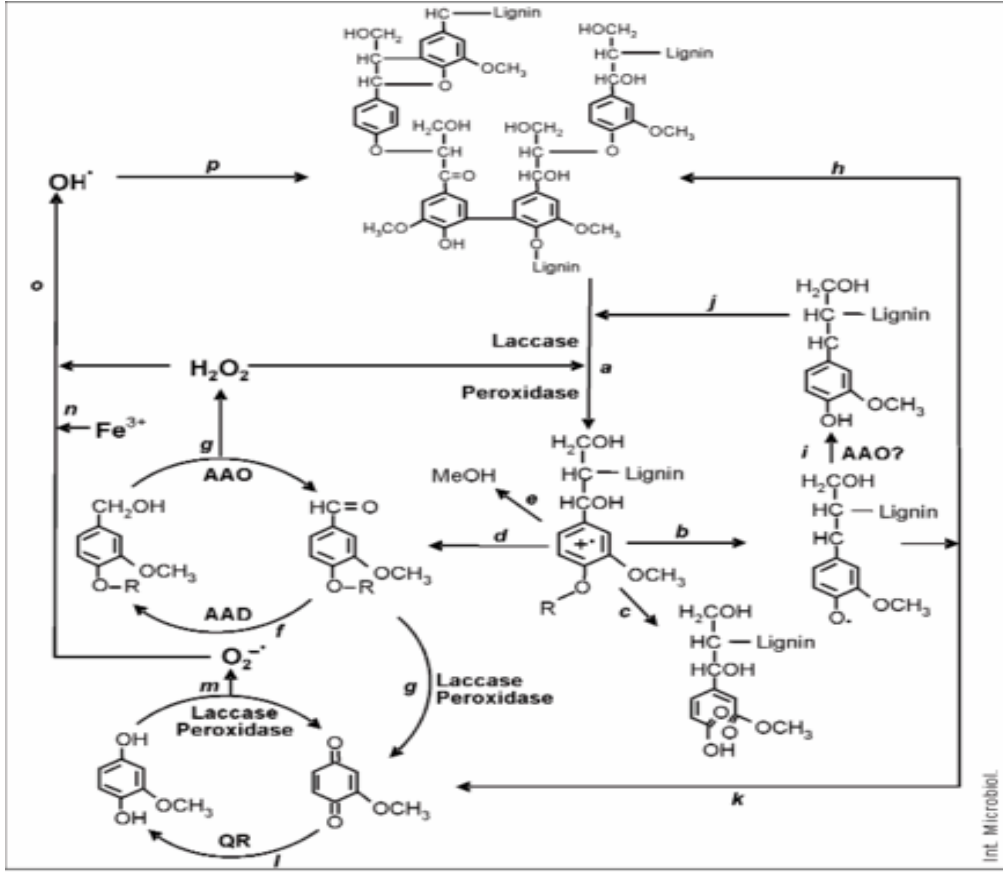


**Şekil 2.13.** *T. versicolor*'dan elde edilen lakkazın kristal yapısı (Mavi küreler katalitik reaksiyonda rol oynayan 4 bakır iyonunu göstermektedir. 3 domain de farklı renklerle gösterilmiştir) (Aytar 2007).



Şekil 2.14. *T.versicolor* lakkazının aktif merkezlerinin yapısı ve gerçekleştirdikleri çevrimin şematik gösterimi (Riva 2006).

Lakkazlar, difenoller, lignini (Şekil 2.15) ve benzer bileşikler yükseltgerken moleküler oksijeni elektron alıcısı olarak kullandıklarından enzim komisyonu (E.C) sınıflandırmasına göre oksidoredüktazlardandır. Bir çok enzim genellikle dar bir substrat özgünlüğüne sahipken, lakkazlar; difenoller, polifenoller, süstitüe fenoller, diaminler, aromatik aminler, benzentiyyoller ve iyot gibi bir kaç inorganik bileşiğe substrat olarak etki ederler (Xu 1996). Lakkaz substratı yükseltgerken onun bir elektron kaybetmesine ve genellikle bir serbest radikale dönüşmesine yol açar (Kertsen ve ark. 1990, Thurston 1994). Kararsız radikal, lakkaz tarafından daha ileri oksidasyona uğratılabileceği gibi enzimatik olmayan reaksiyonlar da verebilir (Thurston 1994).



Şekil 2.15. Beyaz çürükçül funguslar tarafından katalizlenen enzimatik lignin biyodegradasyonu ve oksijen aktivasyonu (Gutiérrez ve Martínez 1996).

Substrat, lakkaz tarafından yükseltildiğinde T1 bakırına bir elektron verir. Oksijenin indirgenmesi ise trinükleer bakır merkezinde gerçekleşir (Bertrand 2002, Piontek 2002). Bir katalitik çevrimde dört elektronun His-Cys-His tripeptidi aracılığıyla T1'den T2/T3 kümesine taşındığı tahmin ediliyor (Bertrand 2002, Piontek 2002). Lakkazların reaksiyon mekanizmaları reaksiyon çevrimi esnasında bakırların yükseltgenme basamakları Elektron Paramagnetik Rezonans (EPR), Magnetik Sirkular Dikroizm (MCD) ve X-ışınları spektroskopisi gibi spektroskopik yöntemlerle izlenerek açıklanmaya çalışılmaktadır. Ancak oksijenin trinükleer merkezde indirgenmesi mekanizması, tam olarak açıklanamamıştır (Cole ve ark. 1990, Shin ve ark. 1996, Lee ve ark. 2002). Moleküler oksijen, tamamen indirgenmiş lakkazı muhtemelen peroksit ara ürün üzerinden yükseltirken hemoksi suya indirgenir (Shin ve ark. 1996, Soloman ve ark. 1996, Lee ve ark. 2002).

Lee ve ark. göre (2002) peroksi ara ürününün yükseltgenmesi oksijen ile aktive edilmiş lakkaz ara ürününün oluşmasına yol açar. Bu ara üründe dört Cu atomu da yükseltgenmiş formda  $\text{Cu}^{2+}$  ve trinükleer merkezdeki üç Cu atomu hidroksit veya okzo köprüleri ile bağlanmış durumdadırlar. Bu köprüler ara ürünü indirgenmeye ve hızlı bir şekilde yeni bir çevrime girmesini sağlar.

Bir bileşiğin lakkaz için substrat olma uygunluğu iki faktöre bağlıdır. Birincisi substratın T1 bölgesine geometrik uyumudur. Geometrik uyumu fenol halkasına bağlı substitüenlerin yapısı ve pozisyonuna bağlıdır (Xu 1996, Bertrand 2002). İkincisi substratın redoks potansiyelinin yeterince düşük olmasına bağlıdır. Çünkü lakkaz katalizli reaksiyonların hızının enzim ve substratın redoks potansiyelleri arasındaki farka ( $\Delta E^0$ ) bağlı olduğu bilinmektedir (Xu 1996, Xu ve ark. 1996, Xu ve ark. 2000, Xu ve ark. 2001). Substratın redoks potansiyelini onun kimyasal yapısı belirler. Çünkü farklı substitüentlerin, elektron çekme ve verme arzularına bağlı olarak, substratın sahip olacağı redoks potansiyeli üzerinde farklı etkileri olacaktır (Xu 1996). Örneğin metoksi substitüent elektron verici olduğu için fenoksi halkasında elektron yoğunluğu oluşmasına yol açar ve onu yükseltgenmeye elverişli hale getirir (Xu 1996, Garzillo ve ark. 1998).

$\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{+}$ 'in sudaki redoks potansiyeli 0.15 V iken, lakkazların redoks potansiyelleri 0.4-0.8 V arasında değişir. Bunun değerini belirleyen en önemli kriteri T1 Cu' nin çevresi oluşturur (Xu ve ark. 1996, Palmer ve ark. 1999, Xu ve ark. 1999). T1 bakırının aksiyal ligandının redoks potansiyelinin oluşmasında özel bir önemi vardır. Çünkü diğer çoklu bakır (multicopper) oksidazlar aksiyal pozisyonda Met artığı taşıdıklarından redoks potansiyelleri lakkazlardan çok düşüktür (Palmer ve ark. 1999, Xu ve ark. 1999). Mutant *T. villosa* lakkazında Phe yerine Met oluşturulduğunda redoks potansiyelinin 0.1 V düştüğü saptanmıştır (Xu ve ark. 1999). Yüksek redoks potansiyeline sahip lakkazlarda (0.8 V) bu pozisyonda Phe artığı bulunurken düşük (0.4 V) olanlarda Leu artığı bulunduğu gösterilmiştir (Eggert ve ark. 1998). Ancak redoks potansiyeli yüksek lakkazlarda Phe yerine Leu, düşük olanlarda Leu yerine Phe mutant organizmalarda sağlandığında bu koşullarda salgılanan lakkazların redoks potansiyellerinde bir değişme olmadığı yani  $E^0$  yüksekse yüksek, düşüğe düşük kaldığı gözlenmiştir (Xu ve ark. 1999). Bu sonuçlara dayanarak Piontek ve ark. (2002) redoks potansiyelinin geniş bir etkileşim ağına, örneğin T1 bakırının çevresindeki hidrojen

bağlarının T1 bakırı ile N<sub>His</sub> arasındaki koordinasyon bağının boyunun belirlenmesinde etkili olabileceğini iddia etmektedirler. Çünkü hidrojen bağları His artığını T1 bakırından uzaklaştırarak gerer. Bunun sonucunda bakır atomunun üzerindeki elektron yoğunluğu düşer.

### 2.5.2.3. Lakkazların Biyokimyasal Özellikleri ve İnhibitörleri

Bir enzimin katalitik etkinliği kantitatif olarak Michaelis-Menten sabiti  $K_M$  ve katalitik yeterlilik sabiti  $k_{cat}$  ile tanımlanır. Bu sabitler çok sayıda lakkaz için ölçülmüştür. Bu sabitler kaynaklarına bağlı olarak değişiklik gösterir. Lakkazların  $K_M$  değerleri indirgenen substrata ve enzimin kaynağına bağlı olarak 2-500  $\mu$ M aralığında değişir. Düşük  $K_M$  değerleri siringaldazin ile ölçülmüştür (Xu ve ark. 1996). Katalitik etkinlik sabitinde çok büyük farklılıklar gözlenmektedir. Aynı substrata karşı farklı lakkazların  $k_{cat}$  değerleri arasında 3500 kata kadar farklılık ölçülmüştür. Ancak aynı kaynaklı lakkazların  $k_{cat}$  değerleri substrat farklılığına bağlı olarak en fazla 2-10 kat farklılık gösterdiği görülmüştür. Çünkü  $k_{cat}$  değeri substratın enzime bağlandıktan sonraki elektron transfer hızı olarak tanımlanır (Xu ve ark. 2001). Bu ölçümler, sonuçlar üzerinde büyük etkisi olan değişik pH, iyonik şiddet, sıcaklık koşulları ve farklı protein derişimlerinde yapılarak elde edilmiştir.

Kinetik sabitlere ilave olarak lakkazların katalitik performansları farklı pH ve sıcaklık koşullarında aktiviteleri ve kararlılıkları ile tanımlanır. Lakkazların pH aktivite profili bir çan eğrisi verir ve fenolik substrat kullanıldığında optimal değer 4-6 arasında değişir ( Palmieri ve ark. 1993, Eggert ve ark. 1996, Chefetz ve ark. 1998, Garzillo ve ark. 2001). Nötral veya bazik pH'larda lakkaz aktivitesindeki düşüşün nedeni OH<sup>-</sup> iyonlarının inhibisyonundan kaynaklanmaktadır (Xu 1997). Diğer yandan pH yükselmesi fenolik substratların redoks potansiyonellerini düşürür, bu da substratı lakkaz tarafından oksidasyona dirençli kılar (Xu 1997). pH çan eğrisi profili iki karşıt etkinin sonucudur. ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiyozolin-6-sulfonik asit) gibi fenolik olmayan substratların oksidasyonu proton değişimi içermez ve bu yüzden tek düzelik göstererek optimal pH değerine 2-3 arasında ulaşır (Garzillo ve ark. 2001, Xu 1997, Hofman ve Eser 1997).

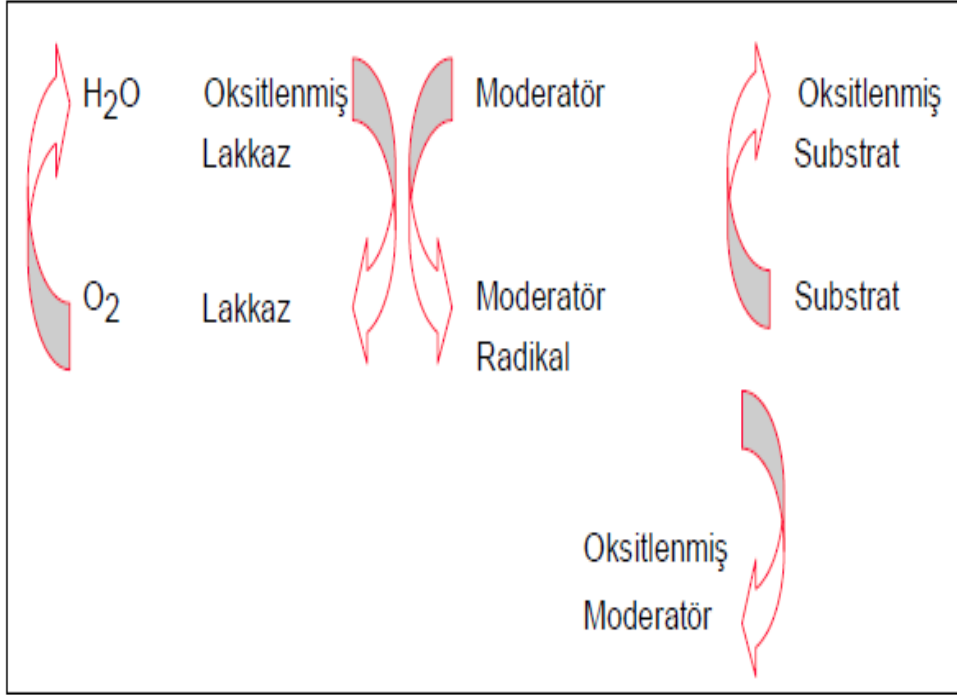
Lakkazların sıcaklık kararlılıkları kaynak organizmaya bağlı olarak anlamlı ölçüde değişiklik gösterir. Genellikle lakkazlar 30-50 °C kararlıdır ve 60 °C üzerinde

aktivitelerini hızlı bir şekilde kaybederler (Wood 1980, Xu ve ark. 1996, Chefet ve ark. 1998, Galhaup ve ark. 2002, Jung ve ark. 2002, Palonen ve ark. 2003). Termo kararlılığa sahip lakkazların çoğu bakterilerden izole edilmiştir. Örneğin; *Streptomyces lavendulçae* (Suzuki ve ark. 2003) lakkazın yarılanma ömrü 70 °C'de 100 dakika iken *Bacillus subtilis* (Martins ve ark. 2002) lakkazının 80 °C'de 112 dakikadır. Fungal lakkazların yarılanma ömrü genellikle 70 °C'de bir saatin altında ve 80 °C'de 10 dakikanın altındadır (Wood 1980, Nishizawa ve ark. 1995, Xu ve ark. 1996, Chefet ve ark. 1998, Schneider ve ark. 1999, Galhaup ve ark. 2002, Jung ve ark. 2002, Palonen ve ark. 2003).

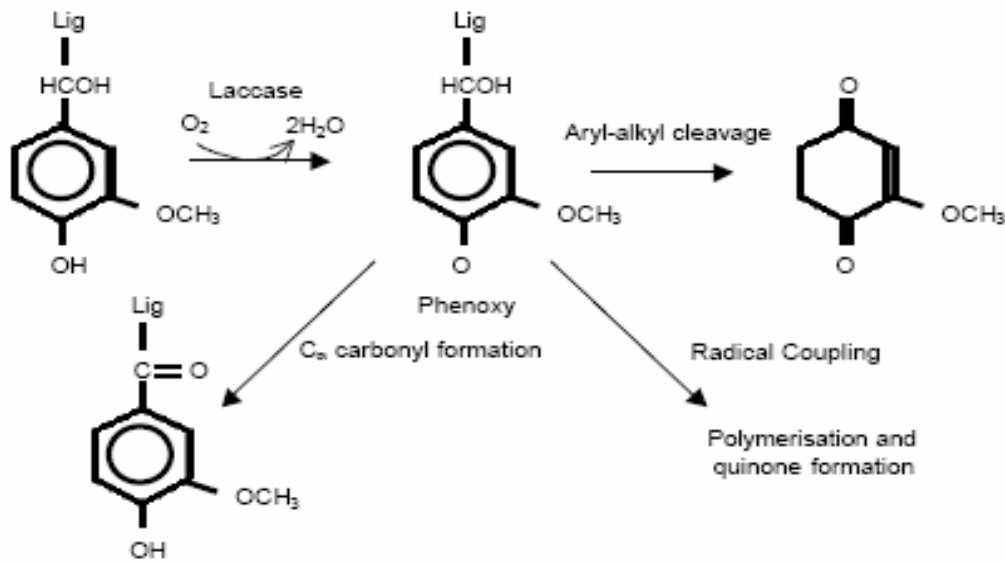
Lakkazlar çeşitli reaktifler ile çok güçlü bir şekilde inhibe edilebilir. Azid, siyanür, tiyosiyamid, florid ve tip2-tip3 bakıra bağlı hidroksit gibi küçük anyonlar; iç elektron transferinin bozulması ve dolayısıyla aktivitenin inhibisyonuna neden olmaktadır. Diğer inhibitörler; Hg<sup>2+</sup> gibi metal iyonları, yağ asitleri, sülfidril reaktifleri, hidroksiglisin, kolik asit, desferal ve katyonik kuarterner amonyum deterjanları şeklindedir. Konformasyonel değişikliklere bakıldığında bunların, bakır atomlarının oksidasyon durumuna bağlı olduğu görülmektedir. Bu, şelatlayıcı ajanlara karşı olan duyarlılığın bir sonucudur. Şelatlayıcı ajanlarla (EDTA, dimetilglioksim, N,N'-diethyl ditiyokarbamat) bakırın seçici olarak uzaklaştırılması, katalitik aktivitenin kaybına neden olmaktadır (Alcalde 2007).

#### 2.5.2.4. Lakkaz Medyatör Sistemleri

Bazen substratlar enzimin aktif merkezine giremeyecek kadar büyük oldukları için ya da yüksek redoks potansiyellerine sahip oldukları için lakkazlar tarafından yükseltgenemezler. Bu sınırlamayı ortadan kaldırmak çoğu kez ortama bir kimyasal medyatör ilave etmekle mümkündür. Kimyasal medyatörler, lakkazlar için ara substrattırlar ve bir redoks mekiği gibi davranarak bu enzimler tarafından büyük ya da yüksek redoks potansiyeline sahip hedef substratla etkileşebilen radikal formlarına yükseltgenirler (Şekil 2.16 ve Şekil 2.17 ) (D'acunzo ve ark. 2002).



Şekil 2.16. Lakkaz moderatör (medyator) oksidasyon sisteminin katalitik reaksiyon şeması (D'acunzo ve ark. 2002).



Şekil 2.17. Odundaki fenolik grupların lakkaz ile oksidasyonu (Bar 2001)

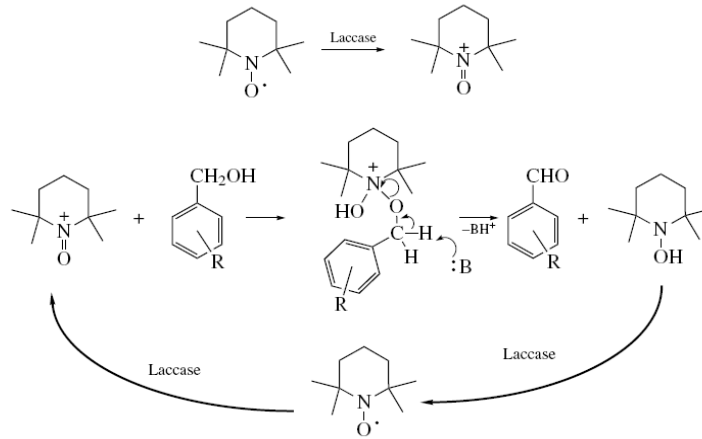


Bir kaç istisna hariç fungal lakkazların redoks potansiyelleri 0.4 - 0.8 V arasında değişir (Kertsen ve ark. 1990, Kumar ve ark. 2003). Bu değer  $Cu^{2+}/Cu^+$  iyonlarının sudaki redoks potansiyeli ( $\sim 0.15$  V) ile kıyaslandığında çok yüksek bir değerdir (Sheldon ve Arends 2004). Lakkazın redoks potansiyelinin yüksek olması, metal iyonu ile protein iskeleti arasındaki koordinasyon, sistemin gergin bir geometriye sahip olmasına yani, yüksek bir redoks potansiyeline sahip olmasına yol açar. Örneğin enzimin aktif merkezindeki T1 bu nedenledir ki  $\sim 0.6$  V'luk redoks potansiyeline sahip TEMPO'nun N-OH grubu yükseltgenerek ilgili okzal amonyum katyonuna transformasyonunu gerçekleştirebilmektedir (Rychnovsky 1999). Lakkazlar iyonlaşma potansiyelleri T1 bakır iyonunun redoks potansiyeline yakın bileşikler direkt olarak yükseltgeyebilirler (Xu 1997). 1990'da ABTS'nin diamonyum tuzunun lakkaz substrat medyatörü olarak ya da enzimin katalitik etkinliğini artıran bir unsur olarak kullanılabileceği anlaşıncaya lakkazlar tarafından yükseltgenebilen bileşiklerin sayısı ciddi bir şekilde artmıştır (Bourbonnais ve Paice 1990).

İdeal bir lakkaz medyatörü, iyi bir lakkaz substratı özelliğine sahip olmalıdır; onun yükseltgenmiş ya da indirgenmiş formları kararlı olmalı ve enzimatik reaksiyonu inhibe etmemelidir ve redoks dönüşümü çevrimsel olmalıdır (Johannes ve Majcherczyk 2000). Medyatör, enzimatik oksidasyonunda, yüksek redoks potansiyeline sahip kararlı ürünler veren, düşük molekül ağırlıklı lakkaz substratı olarak düşünülebilir. (Bourbonnais ve ark. 1998). İdeal bir redoks medyatörünün yan ürün oluşturmadan ve kendisi bozunmadan çok sayıda katalitik çevrimin gerçekleştirilmesine olanak sağlamalıdır. Bu özellikleri taşıyan sınırlı sayıda bileşik vardır. Bunlardan bazıları; geçiş elementlerinin değişik kompleksleri (potasyum oktasiyanomolibdat ve oktasiyanotungustat) demir-II'nin *o*-fenantrolin ve 4,4'-dimetilbipiridin ile yaptığı kompleksler ile ABTS ve TEMPO (1,1,6,6-tetrametil-1-piperidiniloksil) gibi. Bu bileşikler yeterli büyüklükte redoks potansiyeline sahip olup, bozunmadan çok sayıda katalitik çevrimin gerçekleştirilmesine katkıda bulunabilirler (Bourbonnais ve ark 2000, Fabbrini ve ark.2002). Metal kompleksleri organik medyatörlerle kıyaslandıklarında daha pahalı oldukları ve çevre kirliliği açısından yeterli derecede güvenli olmadıkları için tercih edilmezler.

Şimdiye dek lakkaz redoks medyatörü olarak bütün beklentileri karşılayan bir bileşik bulunamamıştır. Lakkaz redoks medyatörü olarak tanımlanan bileşikler, enzimatik reaksiyon sırasında düşük kararlılığa sahip ara ürün oluştururlar ve buna bağlı olarak da non-fenolik bileşiklerin katalitik oksidasyonu için az sayıda redoks çevriminin gerçekleştirilmesine olanak sağlarlar. Bu yüzden bu bileşikler için “medyatör” olarak değil lakkazın kinetik etkinliğini “iyileştirici (enhancer)” teriminin kullanılması daha doğru bulunmaktadır. Bu terim gerçek redoks medyatöründen farklı olarak, oksidasyonları daha fazla dönüşüme olanak veren aktif radikal oluşumunu artıran bileşikler kapsamaktadır. (Medyatör, enzimatik oksidasyonla yüksek redoks potansiyeline sahip ürün oluştururken kendisi korunabilen bileşikler kapsar.) Son zamanlarda lakkazın katalitik etkinliğini iyileştiren (lakkaz iyileştirici, Lİ) bileşiklerle ve işlem esnasında yer aldığı inanan mekanizmaların aydınlatılmasına yönelik araştırmalar yapılmıştır. Bu bileşiklerin çoğu gerçek redoks medyatörü değildirler. Çünkü bir veya birkaç çevrimden sonra kimyasal transformasyon sonucu elimine olmaktadır. Lİ olarak kullanılan bileşikler genel olarak >N-OH veya >N-O yapısal gruplarını içerirler. 1-hidroksibenzotriazol (HBT), TEMPO, N-hidroksiftalimid (HPI), violurik asit (VA) ve N-hidroksiasetanilit (HAA) bu bileşiklerden bazılarıdır (Xu ve ark. 2001). Deneyler, *T. villosa* lakkazı ile alkil arenlerin oksidasyonunda >N-OH tipi bu dört iyileştirici (HBT, HPI, VA ve HAA) arasında en etkililerinin HBT olduğunu göstermiştir (Cantarella 2003). Değişik >N-OH bileşiğinin katalitik oksidasyon yeterliliği lakkazın T1 Cu potansiyeli ile >N-OH bileşiğinin redoks potansiyeli arasındaki farka bağlı olan  $\log(k_{cat} / K_M)$  ifadesiyle tanımlanmaktadır.

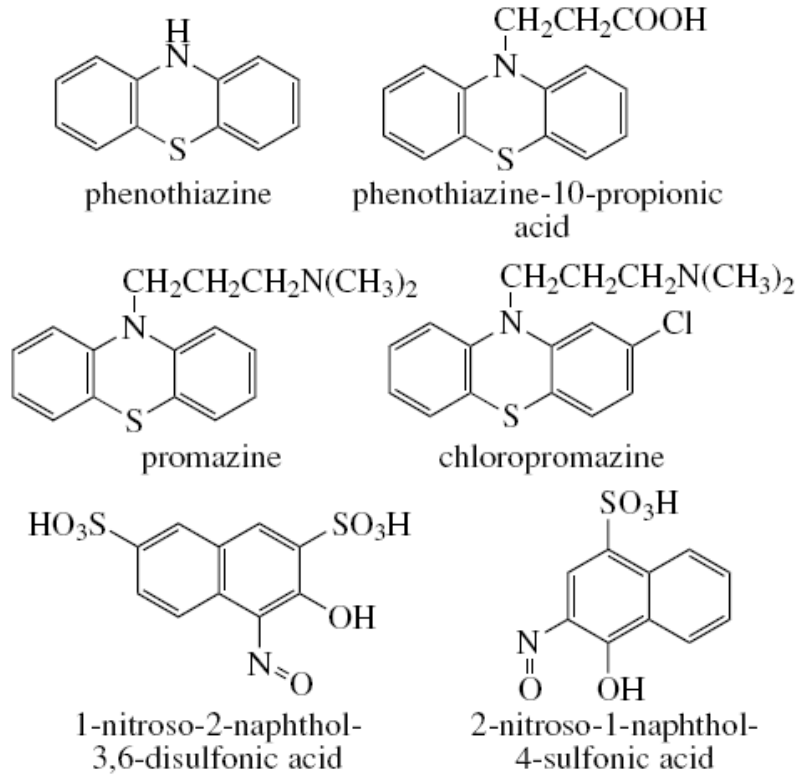
Aynı fenolik olmayan substrat ve medyatör/iyileştirici varlığında farklı funguslardan elde edilen lakkazların katalitik etkinliklerinin farklı olduğu gösterilmiştir (Li ve ark. 1999). TEMPO'nun ABTS, HBT, VA, HPI ve doğal lakkaz medyatörü 3-hidroksiantranilik asitten medyatör/iyileştirici olarak daha etkili bir bileşik olduğu gösterilmiştir. TEMPO çözeltide kısmen kararlı N-oksil radikali formunda bulunur. Bu da lakkaz ortamda olmadan substratın yükseltgenmek üzere yüksek potansiyele sahip olacak şekilde öncü modifikasyonunu sağlar.



**Şekil 2.18.** Lakkaz ve TEMPO'nun varlığında substratın yükseltgenme mekanizması (Fabbrini ve ark. 2002)

Lakkaz, TEMPO'yu substratla etkileşecek form olan okso-amonyum oluşturacak şekilde yükseltir. Proton ayrılması TEMPO'nun yükseltgenmiş ve indirgenmiş (N-OH) formlarını ürün olarak verir. İndirgenmiş TEMPO lakkaz tarafından yeniden okso-amonyum verecek şekilde yükseltgenir (Şekil 2.18).

Lakkaz iyileştirici olarak kullanılan diğer organik bileşik sınıflarından nitrozo bileşikleri ile fenotiyozin türevleri sayılabilir (Şekil 2.19) (Bourbonnais ve ark.1997). Bir fenotiyozin türevi olan fenotiyozin-10-propiyonik asit tekstil endüstrisinde indigo deklorizasyonunda lakkaz medyatörü olarak Novazymes firması (Danimarka) tarafından DeniLite<sup>®</sup> ticari formülasyonunda kullanılmaktadır (Morozova ve ark. 2007). Ancak firmanın Türkiye distribütörlüğü ile yapılan görüşmelerde medyatör olarak Metil-Siringate kullanıldığı ifade edildi.



**Şekil 2.19.** Lakkaz medyatörü olarak kullanılan bazı bileşikler (Bourbonnais ve ark.1997).

*T. versicolor* lakkazı için fenoller ve aromatik aminler yüksek potansiyele sahip iyileştiricilerdendir. Fenol, anilin, *p*-hidroksibenzoat ve *p*-hidroksibenzil alkol bu enzim için ABTS ve HBT kadar yeterli medyatorik etkiye sahiptirler. Metiyonin, sistein ve indirgenmiş glutatyon da *T. versicolor* lakkazı için etkin iyileştiricilerdendirler (Johannes ve Majcherczyk 2000).

Benzoik ve 3-hidroksiantranilik asitler gibi doğal bileşikler de medyatör olarak etkiyebilirler. *Pycnoporus cinnabarinus* beyaz çürükçülünün bir metaboliti olan 3-hidroksiantranilik asit, yine bu fungusun lakkazının, fenolik olmayan lignin yapılarını yükseltmesinde medyatör olarak etki ettiği gösterilmiştir (De Jong ve ark. 1994). Genellikle indikatör olarak bilinen fenol kırmızısı ve onun türevlerinin (diklorofenol red gibi) *Polyponus pinsitus* lakkazı için medyatör etkisine sahip olduğu gösterilmiştir. Bu bileşiklerin fenolik olmayan 4-hidroksibenzil alkolün yükseltgenmesinde medyatör olarak etkileri, doğal lakkaz medyatörü 3-hidroksiantranilik asitten on kat daha etkili oldukları gösterilmiştir (D'Acunzo ve Galli 2003).

Katı besiyerinde doğal lignoselülotik substratlar üzerinde salgılanan lakkazlarla birlikte tanımlanmamış medyatör bileşiklerin varlığı fark edilmiştir (Leontievsky 1999). Homojen, yoğunlaştırılmış çözeltilerinin sarı-kahverengimsi renginden dolayı bu lakkazlar “SARI” olarak adlandırılır. Bu lakkazlar ilk olarak *Pinus tigrinus*'un katı faz (buğday samanı) inkübasyonunda çoklu formda oldukları fark edildi. Aynı fungus sıvı besiyerine inkübe edildiğinde “MAVİ” lakkaz salgıladığı belirtilmektedir. Sarı ve mavi lakkazların aynı molekül ağırlığına, aynı izoelektrik pH değerine, aktif merkezlerinde dört Cu iyonuna ve fenolik substratların oksidasyonunda aynı kinetik değerlere sahip oldukları belirtilmektedir. Aradaki fark sarı lakkazın 600 nm’ de mavi lakkazın sahip olduğu absorpsiyon değerine sahip olmamasıdır. Bu lakkazlar herhangi bir redoks iyileştiricisine ya da medyatöre gereksinim duymadan fenolik olmayan model lignin yapılarını (örneğin veratril alkol veya dimerik bileşikleri) yükseltgeyebilmektedir. *Pleurotus ostreatus*'un katı faz inokülasyonu ile medyatör olmaksızın antreseni, antrakinaona yükseltgeyen “SARI LAKKAZ” salgıladığı bilinmektedir (Pozdnyakova 2006). Bu veriler katı faz inkübasyonu ile salgılanan lakkazların doğal medyatörleri enzimatik olarak yükseltgemesi sonucu oluşan radikallerin, proteinin üçüncül yapısında modifikasyona yol açacak şekilde yapılarında bulunan amino asitlerle etkileşmiş olabileceği fikrini doğurmuştur. Ancak bu düşüncüyü doğrulayacak deneysel veriler hala elde edilememiştir.

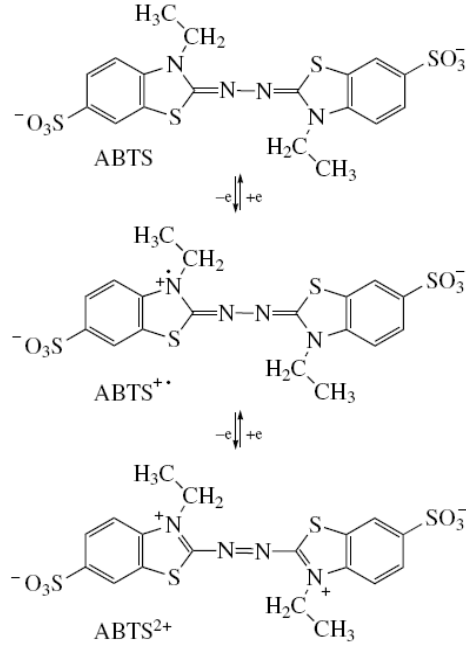
Lakkaz medyatörü seçiminde bir takım kriterlerin göz önüne alınması önerilmektedir ;

1. Bileşik konjüge çift bağlar, hetero siklik atomlar, -OH ve -NH<sub>2</sub> grupları gibi fonksiyonel gruplardan birkaçını ya da tümünü içermelidir.
2. Substrata bağlı olarak yeterli redoks potansiyeline sahip olması gerekir.
3. İzole edildiği kaynağa bağlı olarak lakkaz enziminin kinetik değerlerinde makul iyileştirmelere yol açmalı ve kinetik değerlerin deneysel ölçümünde interfer etkiye sahip olmamalıdır.

Bu kriterler göz önüne alındığında lakkaz medyatörü potansiyeline sahip yeni bileşiklerin araştırılmasının gerektiği düşünülmelidir.

### - ABTS Aracılı Sistem

Organik bileşikler içerisinde redoks medyatörü tanımına en iyi uyan bileşik ABTS'dir. Lakkaz-ABTS medyatör sisteminin yükseltgeme işlemini iki aşamada gerçekleştirdiği gösterilmiştir (Bourbonnais ve ark. 1998, Fabbrini ve ark. 2002).

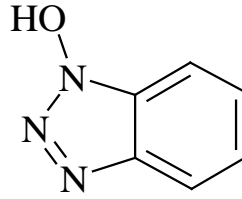


Şekil 2.20. ABTS'de elektron akışı (Fabbrini ve ark. 2002)

İlk aşamada ABTS<sup>+</sup> katyon radikali oluşur. Bunu katyon radikalinin ABTS<sup>2+</sup> ye yavaş bir şekilde yükseltgenmesi izler (Şekil 2.20). Ag/AgCl referans elektroda karşı ABTS/ABTS<sup>+</sup> çifti için redoks potansiyeli 0.472 V ve ABTS<sup>+•</sup> /ABTS<sup>2+</sup> için 0.885 V olarak ölçülmüştür. Yapılan araştırmalarda ligninin fenol gruplarının lakkaz tarafından yükseltgenmesi ABTS'nin varlığında arttığı gösterilmiştir. Ancak ligninin fenol gruplarının yükseltgenmesi için ABTS<sup>+</sup> ye gereksinim duyulurken ABTS<sup>2+</sup> fenolik olmayan grupların yükseltgenmesinde rol alır. Fakat ABTS<sup>+</sup> nin indigo gibi organik boyaların yıkımında medyatör olarak işlev görmesi önerilen mekanizmaya kuşku ile yaklaşılmasına yol açmıştır. Çünkü indigo boya fenolik lignin yapısında değildir ve önerilen mekanizmaya göre ona ABTS<sup>2+</sup> nin medyatör olarak etkimesi gerekirdi. Kaldı ki indigo boyanın yıkımında medyatör olarak etkiyen ABTS<sup>+</sup> işlem sonunda başlangıç yapısına (ABTS) indirgenir (Solís ve ark. 2005).

### - 1-hidroksibenzotriazol (HBT) Araçlı Sistem

HBT (1-hidroksibenzotriazol Şekil 2.21) N-OH grubu içeren heterosiklik bir bileşiktir ve lakkaz tarafından yükseltgenirken nitroksit katyon radikali oluşturur. Hamur özünün ağartılması üzerine yapılan denemelerde lakkaz/HBT sistemi iyi sonuçlar vermiştir ve odunda hakim fenolik olmayan  $\beta$ -O-4-bağlı alt üniteleri ve ayrıca  $\beta$ -1 bağli dimerleri yükseltgeyebilme yeteneğine sahiptir.



Şekil 2.21. 1-Hidroksibenzotriazol

Zille ve ark. (2005), *Trametes villosa* esaslı lakkaz ile HBT medyatörünü kullanarak süstitüe anilinlerin polimerleşmesini katalizlemeyi başarmışlardır. Bu medyatör geri dönüşümlü olarak kullanılamamaktadır. Lakkaz/HBT sisteminin nasıl çalıştığı tam olarak anlaşılammakla birlikte ABTS gibi HBT' nin yapıya girecek kadar küçük olduğu bilinmektedir (Bar 2001).

### 2.5.3. Lakkaz Salgılanması Üzerine İndükleyici Etkisi

Lakkaz aktivitesi, birçok fungus kültüründe tespit edilmiştir. Ham ve saflaş tırlmış lakkaza, biyoteknolojik ve çevre uygulamalarında bol miktarda gereksinim duyulmaktadır. Verimli lakkaz üretme koşullarını araştırmak üzere; en uygun kültür ortamı belirlemek, tekrarlanabilir sonuç elde etmek, ucuza mal etmek gibi konularda çalışmalar sürdürülmektedir (Gianfreda ve ark. 1999).

İlk lakkaz genleri yaklaşık 20 yıl kadar önce *Neurospora crassa* (German ve ark. 1988), *Aspergillus nidulans* (Aramayo ve Timberlake 1990), *Coriolus hirsutus* (Kojima ve ark. 1990) mantarlarından izole edilerek dizisi çıkartılmıştır. Bu tarihlerden sonra saflaştırılarak dizisi çıkarılan lakkaz genlerinin sayısında ciddi bir artış olmuştur. İzole edilerek dizisi çıkarılan yüzlerce lakkaz geninden ancak bir kaçının dizi homolojisi gösterdiği bulunmuştur. Tipik bir lakkaz geni 500-600 amino asitlik bir proteini kodlar.

Fungal lakkaz genlerinin kodlanma bölgelerinde 50-90 baz çiftlik uzunluktaki 8-13 intron bulunur (Kojima ve ark. 1990, Saloheimo ve ark. 1991).

Birçok fungal genomu birden fazla lakkaz geni ihtiva eder. Örneğin; *Trametes villosa* 5 lakkaz geni (Yaver ve ark. 1996), *Coprinus cinereus* 8 lakkaz geni (Hoegger ve ark. 2004), *Rhizoctonia solani* (Wahleithner ve ark. 1996), *Pleurotus sajor-caju* (Soden ve Dobson 2001) ve *Pleurotus ostreatus* (Palmieri ve ark. 2003) 4 lakkaz geni içerir.

Farklı lakkaz genlerinin ekspresyon düzeyleri kültürasyon koşullarına bağlıdır. Örneğin; yüksek oranda azot içeren besiyerinin *Pleurotus sajor-caju* (Soden ve Dobson 2001) lakkaz genlerinin transkripsiyonunu indüklediği belirtilmiştir. Bakır da lakkaz gen transkripsiyonun güçlü bir indükleyicisidir. Serbest bakır iyonlarının neden olduğu oksidatif strese karşı bir savunma mekanizması sonucu lakkazın salgılandığı düşünülmektedir (Collins ve Dobson 1997, Palmieri ve ark. 2000, Soden ve Dobson 2001, Litvintseva ve Henson 2002). Bakıra ilave olarak  $Mg^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  veya  $Hg^{2+}$  metal iyonlarında lakkaz gen ekspresyonunu situmule edebildiği gösterilmiştir (Scheel ve ark. 2000, Galhaup ve ark. 2002 ). Yapısal olarak liginin öncüleri benzeri 2,5- ksilidin veya ferulik asit gibi bazı aromatik bileşiklerin *Trametes villosa*, *T. versicolor* ve *P. sajor-caju* lakkaz gen transkripsiyonunu yükselttiği gösterilmiştir (Yaver ve ark. 1996, Collins ve Dobson 1997, Soden ve Dobson 2001).

Metal iyonları ve fenolik bileşikler tarafından lakkaz genlerinin transkripsiyonunun indüklenmesini genin promotor bölgesindeki spesifik regülatör kısmın etkilediğine inanılmaktadır. Lakkaz genlerinin dizi analizlerinin karşılaştırılması lakkazların 3 ana sınıfta incelenebileceğini göstermektedir; basidiomiset, askomiset ve bitki lakkazları (Eggert ve ark. 1998, Cassland ve Jönsson 1999, Valderrama ve ark. 2003). Aynı gruptaki lakkazların amino asit benzerliği %50 civarındayken farklı gruptakilerin %40'ın altındadır.



## 2.6. Lakkaz Enzimlerinin Kullanım Alanları

### 2.6.1. Gıda Endüstrisi

Gıdaların veya meşrubatların renklerinin iyileştirilmesi amacıyla lakkaz enzimleri kullanılmaktadır. Bu yolla, meyve sularında, biralarda ve şaraplarda kararmaya, puslanmaya ve bulanıklığa yol açan istenmeyen fenolik bileşiklerin giderilmesi amacıyla lakkazlar kullanılmaktadır.

Lakkaz enzimleri, biyopolimerlerin çapraz bağlanmasını sağlaması nedeniyle, hamurun karışma özelliklerini ve hamur ürününün yapısal özelliklerini iyileştirmek amacıyla fırıncılıkta da kullanılmaktadırlar. Minussi ve ark., (Cantarelli 1989) ise biyo-iyileştirme, meşrubat işleme, askorbik asidin tanımlanması, şeker pancarı pektin jelatinasyonu, fırıncılık ve biyosensör olarak kullanılması gibi gıda endüstrisinin farklı alanlarında lakkaz enzimlerinin potansiyel uygulamalarından söz etmektedirler. Buna rağmen, bu araştırmacılar lakkaz enzimlerinin endüstriyel kullanımlarının daha da geliştirilmesi için bu enzimlerin düşük maliyetlerle üretilmesini ve tutuklanmasını sağlayan tekniklerin daha fazla araştırılması gerektiğini ifade etmişlerdir.

### 2.6.2. Kâğıt ve Kâğıt Hamuru Endüstrisi

Kâğıdın endüstriyel üretimi, kâğıt hamurundaki ligninin ayrıştırılmasını ve kâğıt hamurundan uzaklaştırılmasını gerektirmektedir. Kâğıdın geleneksel tekniklerle üretildiği ve kirliliğe yol açan klorlama temelli delignifikasyon/beyazlatma prosedürlerinin ise çevresel sorunlar nedeni ile yeni teknolojiler ile yer değiştirmesi gerekmektedir. Delignifikasyonun oksijen ile sağlandığı süreçler ise endüstriyel olarak kullanılmaktadır, fakat odunsu kâğıt hamurlarının ligninolitik enzimlerle ön muamelesi ile yapılan bir delignifikasyon işlemi, hem daha ılımlı işlem koşulları gerektirmesi hem de daha çevre dostu olmasının yanında kâğıdın ana yapısı olan selülozun bütünlüğünü de korumaktadır (Kuhad 1997, Carter ve ark. 1997).

Kâğıt ve kâğıt hamurunun beyazlatılmasında biyolojik sistemlerin kullanılması kâğıt fabrikalarında, kâğıt hamurunun beyazlatılması amacıyla klor kullanımını ortadan kaldırmaktadır. Bunun sonucu olarak da bu fabrikaların atıkları aracılığı ile çevreye verilen ve toksit olan klorlu bileşikler elimine edilmektedirler. Buna ilaveten, lakkaz enzimleri çok daha kolay olarak temin edilebildiği gibi hem LiP hem de MnP

enzimlerine göre daha kolay kullanılabilir. Ayrıca lakkaz enzimleri, oksidatif olarak aktivite gösterdiklerinden ve aromatik bileşiklerin oksidasyonlarını çok daha az özgülükte sağladıklarından dolayı da çok fazla çeşitlilikteki bileşiklerin parçalanmasında kullanılabilir bir potansiyele sahiptirler (Call 1997).

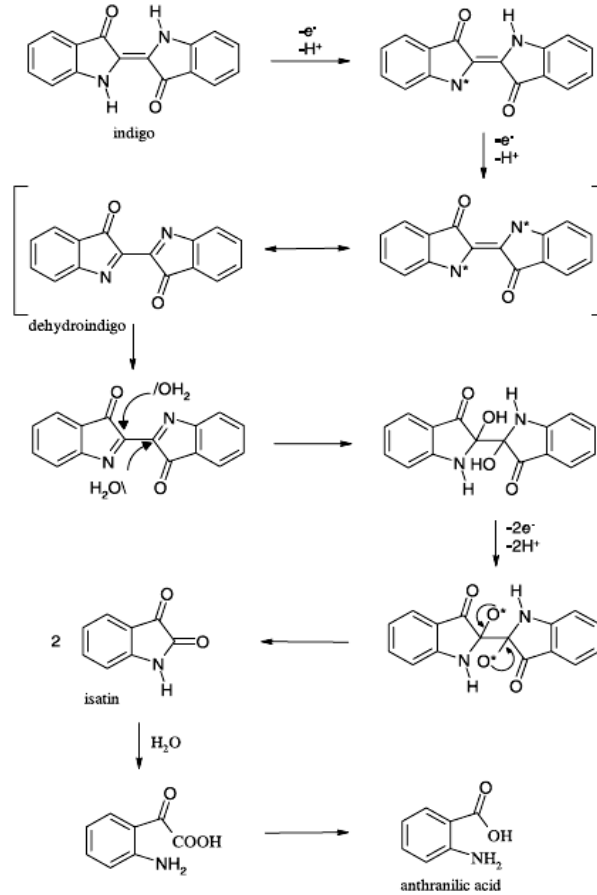
### 2.6.3. Atık Suların Dekolorizasyonu ve Zehirli Maddelerden Arındırılması

Endüstriyel atık sulardan fenolik maddelerin uzaklaştırılması uygulamada önemli bir problemdir. Çünkü bu bileşiklerin birçoğu zehirlidir ve içme ya da sulama suyuna karışması sağlığı tehdit eder. (Bar 2001). Atık suların serbest enzimlerle arıtılmasında karşılaşılan temel güçlük pH değişimine, sıcaklığa karşı dayanıksız olmalarıdır. Fenolik maddeler üzerinde, diğer enzimler gibi ortamda peroksit varlığına ihtiyaç duymadan etkili olması lakkazı avantajlı kılar. Ayrıca enzimin stabilitesini arttırmak adına serbest lakkaz farklı birçok materyale immobilize edilmiştir. Azo ve trifenilmetan boyarmaddeleri endüstride yaygın kullanılır fakat biyolojik olarak parçalanmazlar ve bu nedenle boyama atık sularında yaygın olarak bulunurlar. Çoğu durumda rengin uzaklaştırılması lignin peroksidaz ve mangan peroksidaz aktiviteleri ile gerçekleştirilir. *Pycnopus cinnabarinus*'dan elde edilen lakkazın, C.I. Reactive Blue 19, Direct Red 16 and Acid Blue 113 bileşiklerini içeren boyarmaddelerin parçalanmasını sağladığı ispat edilmiştir (Bar 2001).

### 2.6.4. Denim Yıkamada Kullanımı

Moda yaratmak adına denim ürünlerinin eskitilmesinde ponza taşının yıkama işlemlerinde kullanılması, yerini büyük ölçüde enzimatik yıkamaya bırakmıştır. Bu amaçla en yaygın olarak kullanılan enzim selülaz enzimidir. Bu enzimi kullanmanın iki dezavantajı vardır; birincisi selülaz, boyanmış pamuk (selüloz) liflerini kırarak etki gösterdiğinden giysinin dayanıklılığını azalmaktadır. İkincisi ve en önemlisi selülaz etkisiyle çözeltiye geçen ürünler hem çözgü, hem de atkı ipliklerini yeniden boyamalarıdır. Bir başka deyişle selülaz ile yıkamada geri boyama gerçekleşmektedir. Bunu önlemek için boyayı suda askıda tutacak lineer etoksillenmiş yağ asitleri ve modifiye poliakrilik asit gibi kimyasallar kullanmayı zorunlu kılmaktadır ki, bu da hem maliyeti artırmakta hem de çevre kirliliğine yol açabilmektedir. 2001 yılından bu yana özellikle çevre kirliliğini önemseyen ve güçlü tekstil endüstrisine sahip ülkelerde, denim kumaşların üzerindeki indigo boyanın ağartılmasında lakkaz enzimi ve kimyasal

medyatörler yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Lakkaz-Medyatör Sistemleri ile indigo boya parçalanarak renksiz ürüne (İsatin, İndol-2,3-dion) dönüştürüldüğünden geri boyama gibi bir problemle karşılaşılmamaktadır (Şekil 2.22).



Şekil 2.22. Lakkaz katalizli indigo boya degradasyonu için olası bir mekanizma (Campos ve ark. 2001)

Enzimlerin biyoteknolojide yaygın olarak kullanılabilmelerinde göz önüne alınan en önemli faktörler, bol miktarda ve düşük maliyetle üretilebilmeleridir. Günümüzde lakkaz üretiminde maliyet yüksek olduğu için, çevre dostu bu enzimin yaygın olarak kullanılabilirliğinde dezavantaj oluşturmaktadır. Dolayısıyla kolay ve ucuz lakkaz üretim yöntemlerinin geliştirilmesi önem arz etmektedir. (Campos ve ark. 2001)

### 2.6.5. Nanobiyoteknoloji

Son yirmi-yirmi beş yıldır, biyoelektrokimya alanında yapılan çalışmalar oldukça yoğunluk kazanmıştır. Biyoelektrokimya alanında kaydedilen ilerlemeler analitik kimya uygulamalarına entegre edilmiştir (Haghighi ve ark. 2003). Lakkazlar, ilave kofaktörlere gerek duymadan elektron transfer reaksiyonlarını katalizleme yeteneğinde olduklarından, çeşitli fenolik bileşiklerin (Kulys ve Vidziunaite 2003, Lisdat ve ark. 1997), oksijenin veya azidlerin belirlenmesi amacıyla biyosensörlerde kullanılmak tadırlar.

Lakkaz enzimlerine ilişkin olarak biyosensör duyarlılığı üzerinde enzim tutuklanmasının önemli bir etkisi bulunmaktadır. Martele ve ark., (Martele ve ark. 2003) katı bir yüzey üzerine lakkaz enziminin tutuklanarak çok fonksiyonlu bir biyosensör geliştirilebilmesi için, mikro-desenlemenin etkili bir metot olduğunu göstermişlerdir. Roy ve ark., (Roy ve ark. 2005). *T. versicolor* kaynaklı lakkazın, çapraz-bağlı enzim kristalleri (CLEC) halinde iken çözünmüş durumdaki enzimlere göre çok daha avantajlı bir şekilde biyosensör uygulamalarında kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Cabrita ve ark., (Cabrita ve ark. 2005) *T. versicolor*'dan elde ettikleri lakkazı, altın üzerine kendiliğinden-birleşen ve N-hidroksisüksinimid ile sonlanan tekli-tabakaya tutuklamışlardır. Bu işlem biyosensörlerin daha da geliştirilmesi için kullanışlı olabilir. Buna ilaveten, bir osmiyum redoks polimeri ve *T. versicolor* kaynaklı lakkaz enziminin camsı karbon elektrodu üzerine ko-tutuklanmasına dayalı bir enzim elektrodu, kateşolamin nörotransmitterleri dopamin, epinefrin ve norepinefrinin nanomolar düzeyinde belirleme limitine sahip olan ultra duyarlı amperometrik belirlenmesinde kullanılmıştır (Ferry ve Leech 2005).

Lakkaz enzimleri biyo-yakıt hücrelerinin katotlarına tutuklanarak, küçük transmitter sistemleri, güç üretmek amacıyla kullanılabilir (Calabrese 2002). Biyo-yakıt hücreleri ise yakıt kullanmadan elektrik enerjisi ürettikleri ve temiz bir enerji kaynağı sağladığı için, çevresel açıdan oldukça caziptirler.

### **2.6.6. Toprağın Biyolojik İyileştirilmesinde Lakkaz Enziminin Kullanılabilirliği**

Diğer ksenobiyotiklerle birlikte polisiklik aromatik hidrokarbonlar toprak kirliliğinin başlıca kaynaklarıdır. Bu nedenle bu bileşiklerin parçalanması çevresel açıdan önem arz etmektedir. Lakkazların katalitik özellikleri bu bileşikleri parçalamakta kullanılabilir. Lakkazlar, organik bir toprak matrisine indirgenmiş 2,4,6-TNT metabolitlerini bağlayarak atıkların detoksifikasyonuna aracılık edebilirler (Duran ve Esposito 2000). Bununla birlikte doğal petrol birikimleri ve fosil yakıtların kullanılmasından gelen bileşiklerinin de lakkazlar ile degrade edilebildiği rapor edilmiştir (Pointing 2001).

### **2.7. Enzim Saflaştırma (Pürifikasyon) Teknikleri**

Enzim (Protein) pürifikasyonunun amacı, kompleks protein karışımlarından ilgilenilen proteinin biyolojik aktivitesini kaybetmeden ayrılmasıdır. Biyolojik fonksiyonun korunması da; pH, sıcaklık ve iyonik kuvvetin kontrol edilmesiyle sağlanır. Pürifikasyon, proteinlerin üç boyutlu yapısına bağlıdır ki bu da saflaştırılacak proteinin yüzey gerilimi, molekül büyüklüğü ve biyolojik aktivitesini belirler. Bu özelliklere dayalı olarak protein saflaştırma teknikleri uygulanır (şekil 2.23). Bir protein veya enzimi homojen halde elde etmek için birçok metod birlikte uygulanmalıdır (Dizge 2007).

<i>Proteinin Karakteristik Özelliği</i>	<i>Ayırma Tekniği</i>
<b>Protein Yüzeyindeki Yüke Göre Ayırma</b>	İyon Değişim Kromatografisi
	Elektroforez
	İzoelektrik focussing
<b>Protein Polaritesine Göre Ayırma</b>	Adsorpsiyon Kromatografisi
	Kağıt Kromatografisi
	Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi
<b>Protein Moleküler Büyükliğine Göre Ayırma</b>	Diyaliz ve ultrafiltrasyon
	Jel elektroforez
	Jel filtrasyon kromatografisi
	Ultrasontrifüj
<b>Protein İlgisine Göre Ayırma</b>	Afinite (ilgi) Kromatografisi

Şekil 2.23. Protein özelliklerine göre saflaştırma teknikleri (Dizge 2007)

## 2.8. Araştırmanın Amacı

Organizmanın cinsine, türüne ve ona ürettirilmek istenen maddeye bağlı olarak değişim gösterebileceği düşüncesinden yola çıkarak, seçilen fungusların katı faz kültürasyonu teknikleri kullanılarak test edilecek indükleyicilerin etkisi ile en iyi miktarda ve en yüksek oranda spesifik aktiviteye sahip lakkaz enzimi/enzimleri salgılamalarının koşulları araştırılmıştır. Araştırmanın bir diğer temel amacı ise enzim/enzimlerin tekstil endüstrisinde yaygın olarak kullanılan indigo boyaları renksizleştirilmesi için katalitik etkinliği gösterebileceği redoks medyatörünün belirlenmesine yönelik çalışmalar oluşturmaktır. Etkinliği, kinetik özellikleriyle optimize edilmiş enzim, medyatörler eşliğinde indigo/indigo karmin boya ile etkileştirilerek renklerinin açılmasında kullanılabilirliğini araştırmak amaçlanmıştır.

Enzimlerin biyoteknolojide yaygın olarak kullanılabilmelerinde göz önüne alınan en önemli faktörler, bol miktarda ve düşük maliyetle üretilebilmeleridir. Günümüzde lakkaz üretiminde maliyet yüksek olduğu için, çevre dostu bu enzimin yaygın olarak kullanılabilirliğinde dezavantaj oluşturmaktadır. Dolayısıyla kolay ve ucuz lakkaz üretim yöntemlerinin geliştirilmesi önem arz etmektedir. Bu amaçla farklı ailelere mensup funguslar, lakkaz üretmek üzere ticari besiyerleri yerine, bitkisel artıklardan oluşan değişik destek materyaller kullanılarak katı faz kültürasyonu tekniği uygulanacaktır. Katı faz tekniği ile mikroorganizmaların hücre dışına salgıladıkları proteinleri saflaştırmak ya da zenginleştirmek daha basit ve daha kısa sürede mümkün olacağı düşünülmektedir. Lakkazlar geniş substrat özgünlüğüne sahip enzimlerdir. Bir lakkaz enziminin bir substrat üzerindeki katalitik etkinliği hem izole edildiği kaynağa bağlı olarak, hem de birlikte kullanılan medyatöre bağlı olarak değişmektedir. Saflaştırılacak ya da zenginleştirilecek enzimin test edilecek medyatörler eşliğindeki indigo ve indigo karmin boyaları renksizleştirmedeki etkinlikleri ticari olarak temin edilen enzim preparasyonu ile kıyaslanacaktır.

Amaca uygun lakkaz/medyatör sistemlerinin geliştirilmesi, ilgili endüstrilerde dışarıya bağımlılığı azaltacağından, ürünün maliyetinin düşmesine katkı sağlar. Bu araştırmada değişik destek materyalleri kullanılarak katı faz kültürasyonu ile *P. ostreatus* ve *C. subvermispota*'nın daha fazla ve daha aktif lakkaz salgılamaları indükleyicilerle stimüle edilerek, saflaştırılmış ya da zenginleştirilmiş lakkaz/lakkazlar yeni medyatörler eşliğinde indigo/indigo karmin boyaları renksizleştirme kinetikleri araştırılması amaçlanmıştır.

### 2.9. Önceki Çalışmalar

Sanjust ve ark. (1991) zeytinyağı fabrika atık suyunu dört *Pleurotus* türünün gelişiminde ortam olarak kullanmışlardır. *Pleurotus* türlerinin zeytinyağı atık suyu içeren ortam üzerinde gelişimi iyi olmuş ve belirli koşullarda iyi verim vermişlerdir. *Pleurotus* türlerinin gelişimi sırasında bazı biyokimyasal dönüşümler gözlemlenmiştir. Özellikle mantarlar aktif olarak ortama yüksek miktarda lakkaz salgılamışlar ve aynı zamanda fenolik ve diğer toksik maddelerin konsantrasyonunun önemli oranda azaldığını açıklamışlardır.

Kerem ve ark. (1992) ligninin parçalanmasıyla ilgili lignoselülozik parçalanma ve aktiviteleri belirlemek amacıyla pamuk sapının katı ortam fermantasyonunda iki beyaz çürükçül mantar olan *Pleurotus ostreatus* ve *Phanerochaete chrysosporium*'u karşılaştırmalı olarak incelemişlerdir. *P. chrysosporium* kuvvetli ve hızlı bir şekilde gelişme göstermiş ve 15 gün içerisinde pamuk sapının organik bileşenini % 55 oranında azaltmıştır. *P. ostreatus* ise lignin parçalanmasında daha seçici ve yavaş bir gelişme göstermiş ve 30 günlük gelişme döneminden sonra organik maddenin yalnızca % 20'sini parçalamıştır. Lakkaz aktivitesi yalnızca *P. ostreatus*'ta belirlenmiştir. Selülaz aktivitesi *P. chrysosporium*'da artış göstermiş, *P. ostreatus*'ta ise 8. güne kadar artış göstermiş daha sonra gelişme döneminin sonuna kadar sabit kalmıştır. Lignoselülozik parçalanma mekanizmasında katı ortam koşullarında yapılan mantar aktivite çalışmasının sıvı kültürde yapılabildiğine göre daha iyi açıklanmasına yardımcı olabileceğini belirtmişlerdir.

Collins ve Dobson (1997) bakır ve azot kaynağı olarak amonyum tartarat, aromatik bileşik olarakta HBT ve 2,5-ksilidin ayrı ayrı test edilmek üzere *T. versicolor* kültürlerinde değişik derişimlerde kullanıldıklarında zamana bağlı lakkaz mRNA derişimlerini ölçerek gözlemlemişlerdir. 2,5-ksilidin ile 15 dak, Cu ile 24 saat sonra mRNA derişimlerinde anlamlı artışlar ölçtüklerini belirtmektedirler.

Medeiros ve ark. (1999) *P. ostreatus*'un lakkaz üretiminde ortam bileşimi üzerine başlangıç pH'sı, maya özütü konsantrasyonu, katalizör ve tampon sisteminin etkilerini araştırmışlardır. Düşük pH ve yüksek maya özütü konsantrasyon değerleri, hem katalizör hem de tampon sisteminin bulunmayışı enzim seviyeleri üzerine olumlu etki göstermiştir. En yüksek lakkaz aktivite seviyeleri (489- 540 U/l) başlangıç pH'sı



6.0 - 6.5 arasında ve % 0 – 0.25 maya özütü konsantrasyonu içeren ortamların kullanılarak optimize edilen denemelerden elde edilmiştir.

Shin ve Lee (2000) *Coriolus hirsitus* ile yeni bir lakkaz enzimi saflaştırılarak karakterize edilmiştir. Bu lakkaz; aseton çöktürmesinden sonra DEAE sepharoz CL-6B, sephacryl S-200 HR, hitrap SP ve mono S kolon kromatografisi ile saflaştırılmış %32.3 verim 14.5 kat saflaştırılmış enzim preparasyonu elde etmişlerdir. Bu enzimin; %11 karbonhidrat içeren monomerik glikoprotein olduğunu, izoelektronik pH'sının 7.4, molekül ağırlığının da 73.000 olduğunu ve N-terminal artığının diğer beyaz çürükçül basidiomisetlerle homoloji gösterdiğini idda etmişlerdir.

Palmieri ve ark. (2000) birkaç ekstraselüler lakkaz üreten beyaz çürükçül *P.ostreatus*'un, fenol oksidaz A16 (POXA16), POXA2 ve POXC genlerini bakır ile indükleyerek lakkaz aktivitelerini test etmişlerdir. Deney koşullarında indükleyici ile gen transkripsiyonunun (mRNA yazılım aşamasının) regüle edildiğini belirtmektedirler. Bu genler içerisinde de en fazla POXA16 geninin sentezinden sorumlu olduğu mRNA miktarının inkübasyon süresince arttığını ifade etmektedirler.

Campos ve ark. (2001) *T. hirsuta* ve *S. rolfsi*' den saflaştırdıkları lakkazların indigo boyayı parçalamalarını, parçalama ürünleri HPLC ile analiz edilerek araştırmışlardır. Medyatör olarak, asetosirinan, HBT ve 4-hidroksibenzen sülfonik asit kullanarak indigonun enzimatik degradesyonu sonucu ortamda oluşan isatin (indol-2,3-dion) HPLC ile tayin edilmiştir. *T. hirsuta* ile molekül ağırlığı 45.000 ve 60.000 olan iki enzim, *S. rolfsi* LBS 350.80 ile molekül ağırlığı 55.000 olan enzimleri saflaştırmış olmaları dikkat çekicidir.

Soares ve ark. (2001) tekstil endüstrisinde kullanılan ticari olarak temin ettikleri lakkaz formülasyonundan, medyatörü uzaklaştırdıktan sonra elde ettikleri enzimin, RBBR boyasını renksizleştirmede medyatör olarak violurik asit ile 1-hidroksibenzotriazol (HBT) etkilerini kıyaslamışlardır. Violurik asidin 20 dakikada boyayı tamamen renksizleştirdiğini ve yüksek derişimlerde HBT'nin inhibitör etkisi gösterdiğini gözlemlemişlerdir.

Couto ve ark. (2002) destek materyal ve indükleyicilere bağlı olarak yarı katı fermantasyon tekniği ile *T. versicolor*'un lakkaz salgılama koşullarını araştırmışlardır. Poliüretan köpük, buğday ve arpa samanları, odun talaşı ve arpa kepeği katı destek

materyal olarak ve veratil alkol, 2,5-ksilidin de indükleyici olarak kullanıldıklarında 17 günlük inkübasyon sonucunda, arpa kepeği ve 2,5-ksilidin ile olumlu sonuçlar elde etmişlerdir. Bu koşullarda elde ettikleri enzimi asit fuksin, Kongo kırmızısı ve indigo karmin'i renksizleştirme çalışmalarında 6 günlük inkübasyon sonunda medyatör kullanmadan %85-96 oranlarında farklı sınıflardaki bu üç boyanın da renksizleştirildiğini gözlemlemişlerdir.

Maximo ve ark. (2003) *Geotrichum* sp. mantarından elde edilen enzimlerin sanayide kullanılan üç reaktif azo boyarmaddesini (Reactive Black 5, Reactive Red 158 ve ReactiveYellow 27) parçalama yeteneği araştırılmıştır. Her bir boyarmadde *Geotrichum* sp. ile işleme tabi tutulduğunda mantar siyah boyarmaddeyi hızlı bir şekilde dönüşüme uğratarken, diğer iki boyarmadde için iki kat süre gerekmiştir. 20 günlük eski kültürler, boyarmaddelerin ardışık miktarları (200 ppm) ile reaksiyona sokulduğunda ise toplam dönüşüm süresi üç boyarmadde için de yaklaşık 5 güne düşürülmüştür. Çalışmada, siyah boyarmaddenin dönüşümünde lignolitik enzimler olan Mn peroksidaz, Mangan bağımsız peroksidaz ve lakkazın etkisinin olası olduğu, ancak sarı ve kırmızı boyarmaddeler için ilave enzimlerin veya faktörlerin gerektiği ifade edilmiştir. Ayrıca *Geotrichum* sp.'nin büyük miktarlarda boyarmaddeyi (ardışık ilaveler sonrası 800 ppm) dönüşüme uğratabilme yeteneği sayesinde tekstil atık sularının renksizleştirilmesinde uygulama potansiyeli olabileceği belirtilmiştir.

Camarero ve ark. (2004) yüksek-kaliteli keten hamurundan, renk oluşumundan sorunlu olan lignin türevlerinin uzaklaştırılması için LMS'nin (lakkaz-medyatör sistemleri) potansiyelini araştırmışlardır. Bu araştırmacılar, yüksek-fiyatlı bu keten hamurlarının üretiminde kullanılan klorin-içerikli beyazlatma yerine LMS'nin kullanılabilir olduğunu göstermişlerdir.

Pazarlıoğlu ve Ürek (2004)  $ZrOCl_2$  ile aktive edilmiş ponza taşına tutuklanan *P. chrysosporium* ile yapısal olarak farklı dokuz azo boyar maddenin renksizleştirilmesini çalışmışlardır. Boya derişimine ve inkübasyon süresine bağlı olarak renksizleştirmenin %95-100 oranında gerçekleştirildiğini ifade etmektedirler.

Tychanowicz ve ark. (2004) katı ortam fermantasyonunda endüstriyel boyaların ağartılmasında *Pleurotus pulmonarius*'u kullanmışlardır. Mısır koçanının tek başına kullanıldığı ortamda yeterli bir gelişme sağlanamadığı gözlemlenmiş ve glukoz-

amonyum tartarat içeren ve C:N oranı 30 olan ortamda yeterli bir gelişme sağlanmış yüksek lakkaz üretiminin meydana geldiği belirlenmiştir. *P. pulmonarius* mısır koçanı ve glukoz-amonyum tartarat içeren ortama 200 ppm 'lik derişimlerde boyalar eklenip yetiştirildiğinde, yapısal olarak farklı sentetik boyaların (azo, trphenylmethane, heterosiklik ve polimerik boyalar) rengini açmıştır. Yetiştiricilikten 6 gün sonra amido siyahı, kongo kırmızısı, trypan mavisini, metilen yeşili ve remazol brilliant mavisini tamamen, poly R-478 ve metilen mavisini kısmen ağarlaştırmıştır. Mantar kültürünün endüstriyel boyaların rengini açma kabiliyetini çözünebilir fenolik maddelerin varlığına tepki olarak üretilen yüksek lakkazın (480 U/ml) olmasından kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir.

Pazarlıoğlu ve ark. (2005) maya özütü, glukoz,  $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ve  $\text{CaCl}_2$ 'den oluşan sıvı besiyerine inoküle ettikleri *T. versicolor* FPRL 28A 1M1 suşunu, 26 °C'de 175 rpm'de sekiz gün inkübe ettiklerini, kontrol dışında diğer kültür ortamlarına; katekol, ferulik asit, veratril alkol, indulin ve fenol ayrı ayrı belirli derişimlerde indükleyici olarak sıvı besiyerlerine ilave edildiklerinde, 10 mg/L derişimindeki fenol'ün 72 saatlik inkübasyon sonunda lakkaz aktivitesini %1227.5 oranında arttırdığını gözlemlemişlerdir. Diğer yandan ürettikleri enzimleri medyatör kullanmadan, ticari olarak temin ettikleri lakkaz formülasyonu ile boyamak üzere, cep büyüklüğündeki denim kumaşları inkübasyon süresi ve pH'ya bağlı olarak ağartmalarını CIE L ve K/S değerlerini ölçerek kıyaslamışlardır. Ağartmada CIE L değerleri göz önüne alındığında ürettikleri lakkazın ticari olarak temin edilen lakkaz formülasyonundan daha etkili olduğunu ifade etmektedirler. Geri boyamada ise ticari lakkazın, geri boyama inhibitörü reaktifler içermesinden dolayı daha uygun olduğu K/S değerlerinden anlaşılmaktadır.

Camarero ve ark. (2005) *P. cinnabarinus* lakkazı ve lignin türevi medyatörlerle çevre kirliliği oluşturan azo B, reaktive blue 19, acid blue 74, reaktive blue 38 ve aniline blue gibi boyaların renksizleştirilmelerini araştırmışlardır. Asetosiringan ve siringaldehitin düşük derişimlerinde (50µM) bile 2 saatlik inkübasyon sonucu reaktive black'in yaklaşık %90 oranında renksizleştirilebildiğini ifade etmektedirler.

Gnanomani ve ark. (2006) buğday samanı üzerinde indükleyici olarak [CuSO<sub>4</sub>, veratril alkol, siklohegzamit, gallik asit ve guiacol] kullanarak *P. chrysosporium* NCIM1197 lakkaz salgılamasını incelemişlerdir. Bakır sülfat ile 3.5 kat daha fazla enzim salgıladığını ifade etmişlerdir.

Erkurt ve ark. (2007) *Pleurotus ostreatus*, *Coriolus versicolor* ve *Funalia trogii* beyaz çürükçül mantarlarını sentetik boyaların ağartılmasında kullanmışlardır. 30 °C ve pH'sı 5 olan koşullarda 48 saat süren çalışmada, pH derecesi, kuru misel ağırlığı, boya konsantrasyonu, lakkaz aktivitesi ve protein içeriği analiz edilmiş ve her iki boyanın ağartılmasından sorumlu enzim belirlenmiştir. En yüksek ve en düşük beyazlaştırma ve beyazlaştırma ortamındaki lakkaz aktivitesi sırasıyla *F. trogii* ve *P. ostreatus*'ta elde edilmiştir. Her iki boyanın tüm konsantrasyonlarının *P. ostreatus* 'un gelişiminde toksik olduğu bulunmuş ve poliakrilamid elektro jel (SDS-PAGE) sonuçlarına göre sentetik boyaların ağartılmasından sorumlu tek enzimin lakkaz olduğunu belirlemişlerdir.

Parshetti ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146'nın miselyumu (mantarın lifsel kısmı) tarafından tekstil boyarmaddesi Reactive blue-25 (0.1g/l)'in renksizleştirilmesi ve parçalanmasını incelemişlerdir. Reactive blue-25, kromofor olarak bakır ftalosiyenin (Cu PC) ve reaktif kısım olarak monoklortriazin içeren reaktif bir boyarmadde olup tekstil sanayinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmanın esas amacı, bu boyarmaddenin renksizleştirilmesini, biyolojik parçalanmasını ve parçalanma ürünlerinin tanımlanmasını incelemek ve bunun yanı sıra renksizleştirme prosesi esnasında kültür süzüntüsündeki lakkaz, tirozinaz ve lignin peroksidaz gibi hücre dışı enzimleri belirlemektir. Yapılan spektrofotometrik ve görsel incelemeler, renksizleştirmenin fungal adsorpsiyonu takip eden parçalanma sayesinde olduğunu göstermiştir. Çalışma statik koşullar ile kıyaslandığında çalkalamalı koşulların, Reactive blue-25 boyarmaddesinin tamamen ve hızlı adsorpsiyonu (7 saat) ve renksizleştirilmesinde (20 gün) daha etkili olduğu bulunmuştur. Ortamda glikozun bulunması ise, daha hızlı bir adsorpsiyon (4 saat) ve renksizleştirme (7 gün) sağlamıştır. Renksizleştirme sonrası süzüntüde lignin peroksidaz, lakkaz ve tirozinaz gibi oksidatif enzimlerin varlığı, Reactive blue-25'in ftalimid ve diizo- bütiflatat gibi iki büyük metabolite (ara ürün) parçalanma işleminden sorumlu olduğunu göstermiştir.

Khammuang ve Sarnthimo (2007) *Lentinus polychrous* lakkazını kısmen saflaştırdıktan sonra remazol brilliant blue (RBBR) boyasını pH'ya bağlı olarak renksizleştirmeyi amaçlayarak yaptıkları çalışmada pH:4'te 210 dakikada boyayı %65.8 oranında renksizleştirebildiklerini saptamışlardır.

Camarero ve ark. (2008) *P. cinnabarinus* ile elde ettikleri lakkazın ve medyatör olarak p-hidroksisinamik asidin değişik derişimleri ile sanayi artığı olarak kirlilik oluşturan asit blue 74 (indigo karmin), reaktif black diazo boyaları ve heterosiklik azor B boyasını renksizleştirmeyi araştırmışlardır. Deney koşullarında lakkaz medyatör sistemi ile asit blue 74'ü 2 saatlik inkübasyon sonucu tamamen renksizleştirebildiklerini gözlemlemişlerdir.

Solis-Oba ve ark. (2008) tutuklanmış lakkaz ile yükseltgedikleri ABTS'yi medyatör olarak kullanarak ticari olarak temin edilen lakkazla birlikte denim kumaş parçalarının inkübasyona bağlı olarak ağartılmalarını incelemişlerdir. Diğer yandan benzer bir yaklaşımla 0.1 µM indigo boya çözeltisinin renksizleştirilmesi de araştırılmıştır.

Liu ve ark. (2009) *P. ostreatus* 10969 suşunun fermentasyon koşullarının optimizasyonunu ve salgılanan lakkazın karakterizasyonunu araştırmışlardır. Katı destek materyalin optimizasyonu matriks yüzey gruplarının FTIR ile analizine dayanarak belirlenmiştir. Elde edilen lakkaz %35 doygunlukta (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çöktürmesi ile elde edilen çökelek pH 4,5'ta sodyum asetat ile çözüldükten sonra bu tampona karşı diyalizlenip, ham enzim çözeltisi DEAE-sepharoz FF (1,5 cmx20 cm) ardından da polietilen glikol ile yoğunlaştırılan örnek sephadex-G-100 FF (2,5 cmx100 cm) kolonuna yüklenmiş. Aktif fraksiyon liyofilize edilerek yoğunlaştırılıp, SDS-PAGE ile molekül ağırlığının 40.000 olduğunu saptamışlardır. Daha sonra bu enzimin etkinliği üzerine çeşitli metal iyonlarının, organik çözücülerin etkisi, pH, sıcaklık ve diğer kinetik parametrelerin karakterizasyonunu belirlemişlerdir.

Hu ve ark. (2009) değişik derişimlerde lakkaz ve timol, floroglusinol gibi medyatörler kullanılarak çevre kirliliği oluşturan coomasie brilliant blue G-250, asit kırmızısı gibi boyaların inkübasyon süresine bağlı olarak renksizleştirilmelerini incelemişlerdir.

Neifar ve ark. (2010) *F. fametarius*'un buğday samanı üzerindeki külti - vasyonu ile ürettikleri lakkazı, amonyum sülfat çöktürmesi, moleküler elek ve anyon değiştirme kromatografisi ile saflaştırmışlardır. Enzimin molekül ağırlığının 51.000 ve N-terminal amino asit artığının izoleusin olduğunu ve  $K_M$ ,  $k_{cat}$  gibi kinetik parametrelerini tayin etmişlerdir. Diğer yandan enzimin RBBR boyasını medyatörsüz renksizleştirdiğini saptamışlardır.

Saparrat ve ark. (2010) beyaz çürükçül fungus *Coriopsis rigida*'nın lakkaz izoenzim genlerinin (*lcc1*, *lcc2* ve *lcc3*)  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ , 2,6-Dimetoksi-1,4-benzokinon,  $H_2O_2$ , kafein, amfoterisilin B ve siringik asit varlığında transkripsiyonlarını RT-PCR toplam RNA polimeraz zincir reaksiyonu ile kantitatif olarak analiz etmişlerdir.  $Cu^{2+}$ 'nin *lcc1*, amorf B'nin *lcc1* ve *lcc2*, siringik asidin *lcc1* ve *lcc3*, 2,6-Dimetoksi-1,4-benzokinon ise *lcc2* ve *lcc3* genlerini indüklediklerini idda etmektedirler. Doğal olarak bu genlerin indüklenmesi, inkübasyon süresine bağlı olarak lakkaz aktivitesinin de artmasına yol açmıştır.

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Malzeme	Marka
1. ABTS	Sigma
2. Malt ekstrat	Merck
3. $\text{KH}_2\text{PO}_4$	Merck
4. NaOH	Merck
5. KCl	Merck
6. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Merck
7. Etanol	Merck
8. Glukoz	Merck
9. Pepton	Amresco
10. Agar	Amresco
11. KOH	Merck
12. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Merck
13. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Merck
14. $(\text{NH}_4)\text{Cl}$	Merck
15. 2,4-Ksilidin	Sigma-Aldrich
16. 2,5-Ksilidin	Sigma-Aldrich
17. 3,5-Ksilidin	Sigma-Aldrich
18. (4E)-4-(2,5-dimetilfenilimino) -2,5 -siklohegzan-2,5-dienon	Tarafımızdan sentezlenmiştir
19. Standart protein	Sigma-Aldrich
20. Bradford reaktifi	Sigma-Aldrich
21. Tiyamin HCl	Sigma-Aldrich
22. İndigo	Sigma-Aldrich
23. İndigo karmin	Sigma-Aldrich

<b>Malzeme</b>	<b>Marka</b>
24. Süksinik asit	Merck
25. HBT	Sigma-Aldrich
26. MS	Sigma-Aldrich
27. SMP	Sigma-Aldrich
28. MSPP	Sigma-Aldrich

#### **3.2. Kullanılan Aletler**

- Fisons instrument EA1108 marka element analiz cihazı
- Alp marka, CLG-32L model otoklav
- Binder marka, KB400 model soğutmalı inkübatör
- Heraeus, Herasafe KS12 model Laminar flow
- Heraeus Fresco 21 marka, santrifüj
- Hettich rotanta 46012 marka santrifüj
- IKA MS3 Basic marka, vortex
- Perkin-Elmer Lambda 25 model, UV/VIS. Spektrofotometre
- Rabconcofreezone 2.5 marka liyofilizatör
- Nuaire, -86°C Ultralow Freezer marka, difriz
- GE Healthcare Aktaprime Plus, HiPrep Sephacryl S-100 HR marka, jel filtrasyon sistemi
- Mini-Protean Tetracell marka, elektroforez tankı
- PowerPac Universal güç kaynağı



### 3.3. Mikroorganizma

Boya renksizleştirmede birçok fungal kültürün lignolitik ekstraselüler enzimlerinin kullanılmasına yönelik çok sayıda araştırma vardır. *Streptomyces türleri*, *Phanerochaete chrysosporium* (Pasczynski 1991), *Picnoporus cinnabarinus* (Schliephake 1993), *Pleurotus türleri*, *Trametes türleri* (Swamy ve Ramsay 1999) ve *Bjerkandera adusta* (Heinfling 1998) bunlardan bazılarıdır. Bu çalışmada üç ayda bir yenilenen kültürleri %4.8'lik malt ekstrakt agarda ve 4 °C' de saklanan beyaz çürükçül mikro fungus *Ceriporiopsis subvermispora* ve makro fungus *Pleurotus ostreatus* kullanıldı (*C. subvermispora* İTÜ Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyesi Doç.Dr. Hakan Bermek'ten *P. ostreatus* ise Muğla Üniversitesinden Prof. Dr. Mustafa Işıloğlu'ndan sağlandı).

### 3.4. Bitkisel Atık Materyal ve C/N İçeriklerinin Tayini

Dicle Üniversitesi Yerleşke sahasında bulunan kızıl çam (*Pinus brutia*) kozalağı ile yörede mevsimsel olarak tüketilen kavun ve karpuz kabukları ayrı ayrı katı destek materyal olarak kullanıldı. Kurutulmuş, C/N oranları tayin edilmiş ve 10-15 mm boyutlarında doğranmış materyalin 10'ar gramı kullanılmadan önce içerdikleri organik asitleri nötralize etmek üzere 25 mL, 100 mM KOH ile ıslatıldı, daha sonra saf su ile iyice yıkandı, oda sıcaklığında kurutulduktan sonra da 121 °C' de 20 dakika sterilize edildi. Reçine asitlerinden arındırılarak kurutulmuş materyaller öğütülerek toz haline getirildi. Her bir materyalden 230 mesh'lik üçer örneğin C/N oranları element analiz cihazıyla (Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Merkez Araştırma Laboratuvarında ikişer, İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Merkez Araştırma Laboratuvarında ise bir örneğin C/N azot içerikleri tayin edildi (Çizelge 3.1).

### 3. MATERYAL VE METOT

**Çizelge 3.1.** Kozalak, karpuz ve kavun kabuklarının C\N içerikleri

	Kozalak				Karpuz Kabuğu				Kavun Kabuğu			
	Örnek 1 2,479mg	Örnek 2 2,191mg	Örnek 3 2,56mg	Ortalama	Örnek 1 2,098mg	Örnek 2 2,796mg	Örnek 3 2,32mg	Ortalama	Örnek 1 3,546mg	Örnek 2 2,422mg	Örnek 3 2,52mg	Ortalama
%C	47,914	48,436	46,25	47,53	38,04	38,034	37,06	37,71	39,52	39,66	38,51	39,23
%N	0,372	0,350	0,252	0,325	1,206	1,186	1,138	1,177	1,559	1,495	1,579	1,524
C/N	128,8	138,39	183,53	146,25	31,54	32,07	32,57	32,06	25,35	26,53	24,39	25,74

#### 3.5. Katı Besiyerinin Hazırlanması ve İnokülasyonda Kullanılmak Üzere Ekim Yapılması

Cam balona malt ekstrakt (20 g/L), glukoz (20 g/L), pepton (1 g/L) ve bakteriyolojik agar (20 g/L) alındıktan sonra 1 L saf su ilave edilip bir süre karıştırıldı. Daha sonra 121 °C'de 1.5 atm basınçta 30 dak. boyunca otoklavlandı . Oda sıcaklığına kadar soğuyan besiyeri laminar flow da steril petrilere yaklaşık 25 mL olacak şekilde ilave edilip katılaşması beklendi, kontaminasyonun olup olmadığını gözlemlemek için 1 gece boyunca 37 °C'de inkübatörde bekletildi. Kontaminasyon gözlenmeyen petrilere Muğla Üniversitesi (Prof. Dr. Mustafa Işıloğlu) ve İstanbul Teknik Üniversitesi'nden (Doç. Dr. Hakan Bermek) temin edilen *Pleurotus ostreatus*, (makro fungus) ve *Ceriporiopsis subvermispora*'dan (mikro fungus) birer plak ekim yapıldı. Ekim işlemi tamamlandıktan sonra petriler 28 °C'ye ayarlanmış soğutmalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı (Şekil 3.1).

#### 3.6. Kültivasyon Koşulları

250 mL'lik erlenlere, her birine yaklaşık 10 g olacak şekilde 100 mM KOH ile yıkanarak organik asitlerden arındırılmış kavun, karpuz kabuğu ve kozalak alınıp üzerlerine 150'şer mL saf su ilave edilerek 121 °C'de 20 dak. otoklavlandı. Materyaller 28 °C'de 7 gün inkübatörde bekletildi (Kültivasyon sürecinde kurutulmuş katı materya - lin sıvı besiyerindeki suyu emerek hacim azalmasına yol açmaması için). 7. günün sonunda Laminar flow içerisinde erlenlerdeki sular boşaltılarak her birine 25 mL steril

temel besiyeri [asetat tamponu (pH 4.5) içerisinde 2 g/L glukoz, 0,9 g/L (NH<sub>4</sub>)Cl, 2 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,1 g/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O ve 0,5 g/L KCl, 0,01 g/L CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O'tan oluşan temel besi 121 °C'de 20 dakika sterilize edildikten sonra 0,5 g/L olacak şekilde filtrasyonla sterilize tiyamin ilavesi yapılarak] ilave edildi. Hazırlanan ortama her bir fungus için biri kör ve filtrasyonla steril dört indükleyiciden her biri için iki farklı derişimdeki çözeltiler hazırlanıp (%70'lik alkol içindeki çözeltilerinden son derişimleri 2,5-ksilidin, 2,4-ksilidin ve 3,5-ksilidin'in inkübasyon ortamında 5000 µM ve 50 µM, sentezlenen (4E)-4-(2,5-dimetilfenilimino)-2,5-siklohegzan-2,5-dienon'un ise 50 µM ve 5 µM olacak şekilde) ilaveleri yapıldıktan sonra *P. ostreatus*, *C. subvermispora*'nın aktive edilmiş taze kültürlerinin her birinden 3'er plaklık ekim yapıldı. 28 °C'de, çalkalamaksızın karanlıkta inkübasyon gerçekleştirildi.

İnokülasyondan sonra 4., 8., 12., 16. ve 26. günlerde alınan 2'şer mL'lik örneklerin yapılan protein miktar ve lakkaz aktivite tayinleri sonuçlarına dayanarak *P. ostreatus*'un kavun kabuğu üzerinde 5000 µM derişiminde 2,5-ksilidin, ve 5 µM derişimde (4E)-4-(2,5-dimetilfenilimino)-2,5-siklohegzan-2,5-dienon, karpuz kabuğu üzerinde 50 µM derişiminde 2,5-ksilidin, ve 5 µM derişimde (4E)-4-(2,5-dimetilfenilimino)-2,5-siklohegzan-2,5-dienon ve *C. subvermispora*'nın kavun kabuğu üzerinde 5000 µM derişiminde 2,4-ksilidin, ve 5 µM derişimde (4E)-4-(2,5-dimetilfenilimino)-2,5-siklohegzan-2,5-dienon ve kozalak üzerinde 5000 µM derişiminde 2,5-ksilidin varlıklarında, her birinden ikişer örnek olacak şekilde katı materyal ve indükleyiciye bağlı olarak ~25 g katı materyal ve 100 mL temel besiyeri içeren 1 L'lik erlenlere üçer plak inoküle edildi (Şekil 3.2). Uygun zaman olarak saptanan 16 gün süreyle inkübasyona bırakıldılar ve 16. gün sonunda protein ve lakkaz aktivitesi bakımından test edildiler. Bu kültürler içerisinde; lakkaz aktivitesi bakımından en uygun bulunan *C. subvermispora*'nın 2,4-ksilidin 5000 µM derişiminde *P. ostreatus*'un ise 2,5-ksilidin 5000 µM derişiminde kavun kabuğu üzerinde kulture edildiği koşullarda elde edilen örneklerin (160'ar mL) saflaştırma/ zenginleştirme işlemine tabi tutularak kinetik parametreleri tayin edildi.



Şekil 3.1. İnokülasyonda kullanılmak üzere katı besiyerinde üretilen funguslar.



Şekil 3.2. Lakkaz aktivitesi yüksek bulunan koşullarda *P. ostreatus* ve *C. subvermispora* inkübasyonu

#### 3.7. Protein Miktar Tayini

Örneklerimizin protein miktar ve aktivite tayinleri için her defasında kültürasyon ortamına 2'şer mL temel besiyeri ilave edip hafif bir şekilde çalkalandıktan sonra alınan 2'şer mL'lik örnekler önce soğutmalı santrifüjde 10.000xg de 15 dakika santrifüjlendikten sonra çökelek dışında kalan kısımlar 5 mL'lik enjektörlerle alınıp 0,45 µm' lik filtreler ile süzülerek 2 mL'lik ependorf tüplere alındı. Protein miktar tayini Mikro Bradford Yöntemi ile yapıldı (Bradford 1976). Bunun için ticari olarak

temin edilen 20 mg/mL standart protein çözeltisinden cihazın kalibrasyonu ve standart eğri çizmek üzere 10, 50, 100, 150 ve 200 µg/mL'lik derişimlerinde çözeltiler hazırlandı. Bu çözeltilerin ve örneklerin 250'şer µL'leri üzerine ticari olarak temin edilen Bradford Reaktifinden 3'er mL ilave edilip vortexlenen karışımın beş dakika sonra 595 nm' de absorbansları okundu.

### 3.8. Lakkaz Aktivitesi Tayini

Lakkaz aktivitesi substrat olarak ABTS kullanılarak Niku-Paavola ve ark. (1988) tarafından verilen yöntem kullanılarak tayin edildi. C; substrat derişimi (M); ekstinsiyon katsayısı ( $M^{-1}cm^{-1}$ , 436 nm'de ABTS için  $29,3 \cdot 10^3 M^{-1}cm^{-1}$ ), d; ışık yolu (1 cm) olmak üzere Lamber-Beer Yasasına göre;

$$\frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{\Delta E / \Delta t}{\epsilon \cdot d} = \frac{\Delta E / \Delta t}{29,3 \times 10^3 M^{-1}cm^{-1} \cdot 1cm} [U/l]$$

Lakkaz aktivitesi =  $\{(\Delta E/2 \text{ dak.}) / 29,3 \times 10^3 \text{ Lmol}^{-1}\} \cdot (3000\mu\text{L}/2300\mu\text{L}) \cdot (\text{seyreltme çarpanı}) = \dots [U/L]$

Ya da

Lakkaz aktivitesi =  $22,26 \cdot (\text{seyreltme çarpanı})\Delta E = \dots [U/L]$  yazılabilir. Küvette reaksiyon hacmi 3 mL olacak şekilde, 25 mM süksinat tamponuyla (pH 4.5) yeterli miktarda seyreltilmiş ekstraselüler sıvının 2300'ü üzerine 20 mM derişimindeki ABTS çözeltisinden 700µL ilave edilip 2 dakika bekledikten sonra 436 nm' de absorbans değerleri okundu. Aktif ünite sayısı, deney koşullarında dakikada 1 µmol ABTS yükseltgeyen enzim miktarı olarak tanımlandı.

### 3.9. Enzim Saflaştırma/Zenginleştirme

Bu işlemler İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Biyofizik Anabilim Dalında gerçekleştirildi.

#### 3.9.1. Tuz ile Çöktürme

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile çöktürülecek örneklerin hacimlerine bağlı olarak +4 °C' de önce %35'lik ve bundan %85'lik tuz doygunluklarına ulaşmak üzere ilave edilmesi gereken (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> miktarları (<http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>) sayfasından bulundu. Örneklere %35 doygunluğuna ulaşmak üzere porsiyonlar halinde ve magnetik karıştırıcı ile karıştırılarak (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ilaveleri yapıldı (Otterbein ve ark. 2000, Forootanfar ve ark. 2011). %35'lik doygunluğa ulaşmak için 160 mL'lik örneklerin her birine 32.17 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ilavesi yukarıda belirtildiği gibi yapıldıktan sonra 30 dakika karıştırıldılar. Örnekler soğutmalı santrifüj ile 3.000xg de 30 dakika santrifüjlendi. Alınan üst sıvıların (supernatant) hacimlerine bağlı olarak %85 tuz doygunluğuna ulaşmak için gerekli miktarlarda (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ilaveleri yapıldıktan sonra 30 dakika karıştırıldılar ve 3.000xg de 30 dak. santrifüjlendiler. Üst sıvılar lakkaz aktivitesi bakımından test edildikten sonra, ihmal edilecek kadar aktivite gözlemlendiğinden atıldılar. Çökelekler (pellet) 20'şer mL 25 mM süksinat tamponunda (pH; 4.5) çözündükten sonra diyaliz hortumuna (10 mM K-EDTA içinde 3 dak. kaynatılarak ve defalarca destile su ile yıkanıp %0.2'lik NaN<sub>3</sub> içerisinde saklanan diyaliz hortumu kullanıldı) alındı. 2'şer litrelik 25 mM süksinat tamponuna (pH; 4.5) karşı tampon iki kez değiştirilmek koşuluyla 24 saat boyunca +4 °C'de diyalizlendi. -80' °C de bir gece dondurulan örnekler hacimleri ~5 mLye düşürülünceye dek liyofilize edildi.

#### 3.9.2. Moleküler Elek Kromatografisi

~5'er mL'lik örnekler ayrı ayrı kolon yıkama çözeltisiyle (200 mL mutlak etanol+800 mL destile su) yıkanarak kullanıma hazır hale getirilmiş jel filtrasyon sistemine (GE Healthcare Aktaprime Plus, HiPrep Sephacryl S-100 HR) yüklendiler. Proteinler, dakikada 1mL'lik fraksiyonlar toplanacak şekilde programlanmış cihazda 25 mM süksinat tamponuyla (pH; 4.5) elue edildiler. Mikrotiterlerde 20 mM ABTS'ye karşı anlamlı aktivite gözlenen *P. ostreatus* için 38-72 mL *C. subvermispora* için ise 35-68 mL aralığındaki fraksiyonlar birleştirildi.

### 3.10. Elektroforez Analizi

Örnekler, Laemmli yöntemine (Laemmli 1970) göre sodyum dodesil sülfat poli akrilamit gel elektroforezi (SDS-PAGE) ile test edildi. Cam plakalar arasına % 12'lik ayırma jeli döküldü. Düzgün bir jel yüzeyi oluşturmak üzere 1 cm'lik su tabakası oluşturulup 30 dakika polimerleşme için beklendi. Jelin üzerindeki su tabakası dökülerek % 5'lik yığınlama jeli eklendi. Örneklerin yükleneceği kuyucukları oluşturacak tarak cam plakalar arasına yerleştirildi ve polimerleşme için beklendi. Elektroforeze verilecek örnekler, denatüre edici (yükleme) tamponla 1:4 oranında karıştırılıp 2 dakika kaynatıldı. Elektroforez tankı anot ve katot hazneleri yürütme tamponu ile dolduruldu. Örnek yüklemesi sırasında birinci kuyuya da moleküler ağırlık standartları olarak, molekül ağırlığı 26.6 kDa ile 180 kDa arasında olan çoklu protein standartı ve sonuncu kuyuya da ticari olarak temin edilen lakkaz çözeltisi yüklendi.

Yığınlama jeli için 80 volt, ayırma jeli için 100 volt gerilim uygulandı. Elektroforez sırasında kullanılan işaret boyası (Brom fenol mavisi) jelin sonuna geldiğinde akım kesildi. Jel, elektroforez aletinden ve iki cam arasından çıkartılarak Coomassie parlak mavisi ile boyanmaya bırakıldı. Daha sonra jel, boya çıkarma çözeltisine bırakıldı. Protein bantları boyanmış olan jellerin resimleri çekildi.

### 3.11. Zenginleştirilen Enzimlerin Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi

#### (Enzim Karakterizasyonu)

Hem ticari olarak temin edilen lakkazın hem de *C. subvermispora* ve *P. ostreatus* kültürleriyle elde edilip zenginleştirilen ve lakkaz aktivitesi gösteren fraksiyonların substratla doygunluğa ulaştığı ABTS derişimlerinde; optimal pH, optimal sıcaklık ile bu optimal koşullardaki  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri tayin edildi.

Optimal pH tayini derişimleri 25 mM olmak üzere; pH 2.0, 2.5 ve 3.0 için tartarat, pH 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 6.0 için süksinat ve pH 7.0 ve 8.0 için ise fosfat tamponlarında substrat olarak 1 mM ABTS'ye karşı uygun seyreltmeler yapılmış enzim çözeltileri kullanılarak 2 dakikalık inkübasyonları sonucu 436 nm' de okunan absorbansa bağlı olarak tayin edildi.

Optimal sıcaklık pH'sı 3.0 olan 25 mM tartarat tamponu içinde 0,6 mM ABTS'ye karşı uygun oranlarda seyreltilmiş enzim çözeltilerinin 20, 30, 40, 50, 60 ve 70 °C sıcaklıklarda 10 dakika bekletildikten sonra 2 dakikalık inkübasyonları sonucu 436 nm'de okunan absorbansa bağlı olarak tayin edildi.

$K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri; 30 °C sıcaklıkta pH'sı 3 olan 25 mM tartarat tamponu içerisinde uygun oranlarda seyreltilmiş enzim çözeltileri ile aynı tampon içerisindeki 50, 100, 200, 600 ve 1000  $\mu$ M derişimlerindeki ABTS çözeltilerinin 2 dakikalık inkübasyonları sonucu 436 nm'de okunan absorbans değerlerine bağlı olarak tayin edildi.

#### 3.12. Uygun Medyatör (Aracı)'ün Tayinine Yönelik Çalışmalar

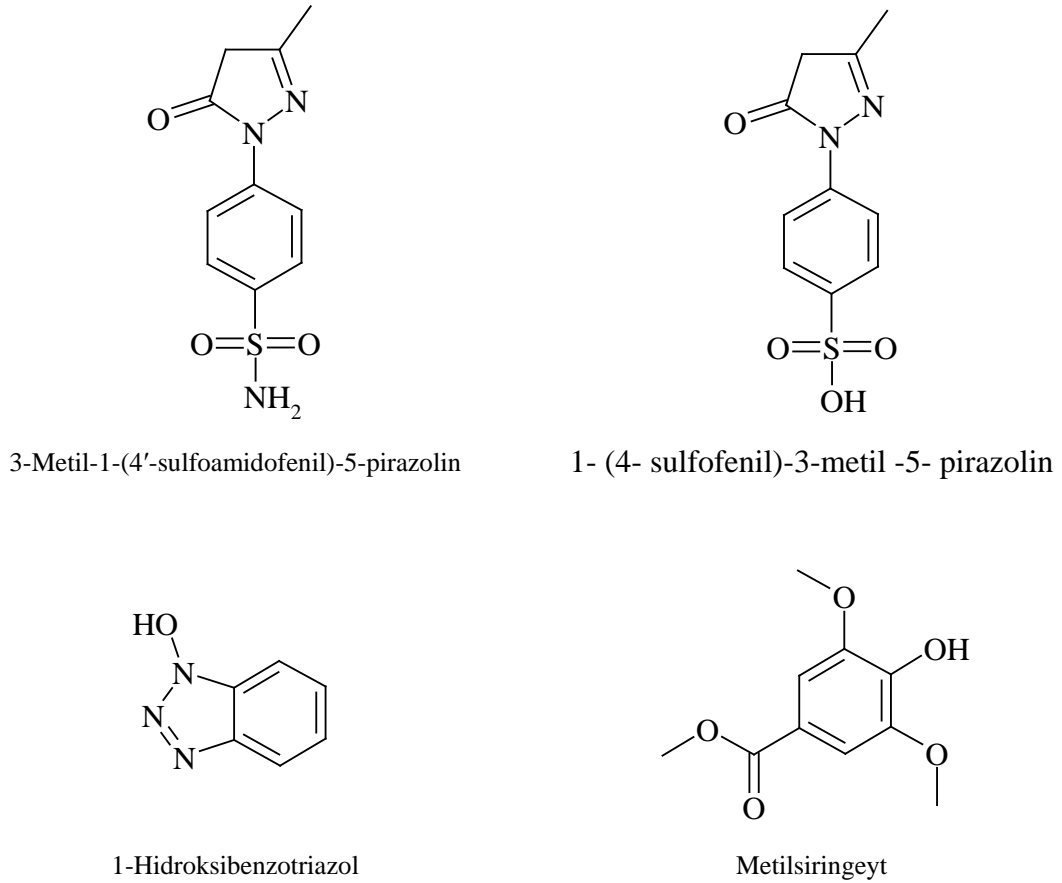
Uygun kinetik parametreleri belirlenmiş belli derişimlerdeki enzimlerin indigo ve indigo karmin boyaya karşı katalitik etkinliği medyatör kullanılarak ve medyatör kullanılmadan araştırıldı. Yapılan dalga boyu taramasında indigonun 664 nm'de indigo karminin ise 608 nm'de maksimum absorbansa sahip oldukları saptandı. Bu nedenle ölçümler indigo için 664 nm'de indigo karmin için 608 nm'de gerçekleştirildi. İndigonun suda çözünmemesi üzerine yaklaşık 20 mg indigo önce 25 mL DMSO (Dimetilsülfoksit) da manyetik karıştırıcı üzerinde çözüldükten sonra hacmi saf su ile 200 mL 'ye tamamlandı. İndigo karmin suda kolayca çözüldüğünden direk saf suda 20 mg/200 mL 'lik çözeltileri hazırlandı. Bu amaçla cam tüpte, reaksiyonun son hacmi 5 mL olmak üzere 4 mL boya çözeltileri, 500 mU/mL olacak şekilde hazırlanmış enzim çözeltilerinden (Ticari lakkaz, *P. ostreatus* C. *subvermispora* lakkazı) 500  $\mu$ L ve medyatörlü deneyler için de herbir medyatörden 500  $\mu$ L alınıp vortekslenerek karıştırıldıktan sonra 30 °C' de karanlıkta değişik zaman aralıklarında (0.5, 1, 2, 4, 8, ve 24 saat ) inkübasyona bırakılarak renk değişimi farkı gözlemlendi. Renk şiddetindeki azalma % olarak; aşağıda verilen formülle hesaplandı.

$$D = \frac{100(A_{ini} - A_{obs})}{A_{ini}}$$

D; % olarak renk şiddetindeki azalma,  $A_{ini}$ ; reaksiyon hacminin başlangıçta ölçülen absorpsiyon değeri ve  $A_{obs}$ ; zamana bağlı olarak ölçülen absorbans değeridir.



Bu amaçla; 1-(4-Sulfofenil)-3-metil-5-pirazolin (SMP) 10 mM ve 15 mM , 3-Metil-1-(4'-sulfoamidofenil)-5-pirazolin (MSPP) 3 mM ve literatürde kullanıldığı ifade edilen 1-hidroksibenzotriazol (HBT) 6 mM ile metilsiringate (MS) 6 mM derişimlerde (Şekil 3.3) hazırlanarak bu bileşiklerin ve lakkazın indigo boyayı ve indigo karmini renksizleştirmedeki etkinlikleri araştırıldı. Kullanılan bileşiklerden HBT dışında diğerlerinin çözünürlüklerinde problem olduğundan bu bileşiklerin çözeltileri manyetik karıştırıcı ve sonikatör kullanılarak ancak belli derişimlerde hazırlanabildi.



**Şekil 3.3.** Çalışmada kullanılan medyatörler



## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Protein Miktarı ve Lakkaz Aktivitesi

Kavun, karpuz kabukları ve kozalak üzerinde kültivasyonu yapılan iki mantarın 26 günlük inkübasyon süresine bağlı olarak salgıladıkları protein miktarları ve enzim aktiviteleri Çizelge 4.1-4.4 ve Şekil 4.1– 4.4'te verilmiştir. Protein miktarı ve enzim aktivitesi uygun görülerek 1 L'lik erlenlerde kültivasyonları yapılarak 16 günlük inkübasyon süresinin sonunda seçilen kültürlerin protein miktarları ve enzim aktiviteleri Çizelge 4.5. ile Şekil 4.5. ve Şekil 4.6.'da verilmiştir.

### 4.2. Enzim Safaştırma/Zenginleştirme

Amonyum sülfat çöktürmelerinden sonra liyofilize edilerek kalibre edilmiş (Şekil 4.7.) kolona ayrı ayrı yüklenen örneklerle ilgili cihaz çıktısı olarak elde edilen veriler Şekil 4.8. ve 4.9'da verilmiştir. Ham, amonyum sülfat çöktürmeleri sonrası ve kolon sonrası mikrotiterde kalitatif olarak gözlenen aktivite değerlerine dayanarak toplanan fraksiyonun elektroforez bant profilleri Şekil 4.10 ve 4.11'de verilmiştir.

### 4.3. Optimal pH, Sıcaklık ve Kinetik Parametre Verileri (Enzim Karakterizasyonu)

Ticari olarak temin edilen lakkaz ile kolon sonrası elde edilen enzim örneklerinin; optimal pH değerleri Şekil 4.12-4.14 ve Çizelge 4.6'da optimal sıcaklık değerleri ise Çizelge 4.7 ve Şekil 4.15 – 4.17'de verilmiştir.

25 mM tartarat tamponu içerisinde pH'sı 3 olan 30 °C sıcaklıktaki enzim çözeltileri ile 50, 100, 200, 600 ve 1000 µM derişimlerindeki ABTS çözeltilerinin 2 dakikalık inkübasyonları sonucu elde edilen verilerden yararlanılarak çizilen Lineweaver-Burk ve Michaelis-Menten Grafikleri ve hesaplanan  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri Çizelge 4.8 ile Şekil 4.18 – 4. 23'de verilmiştir.

### 4.4. Lakkaz Medyatör Sistemlerinin İndigo Boyaları Renksizleştirmedeki Etkinliği

İndigo/indigo karmin boyalarının renksizleştirilmesinde kullanılan medyatörlerin; SMP, MSPP, HBT ve MS'nin yüzde renksizleştirme oranları ticari lakkaz/indigo

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

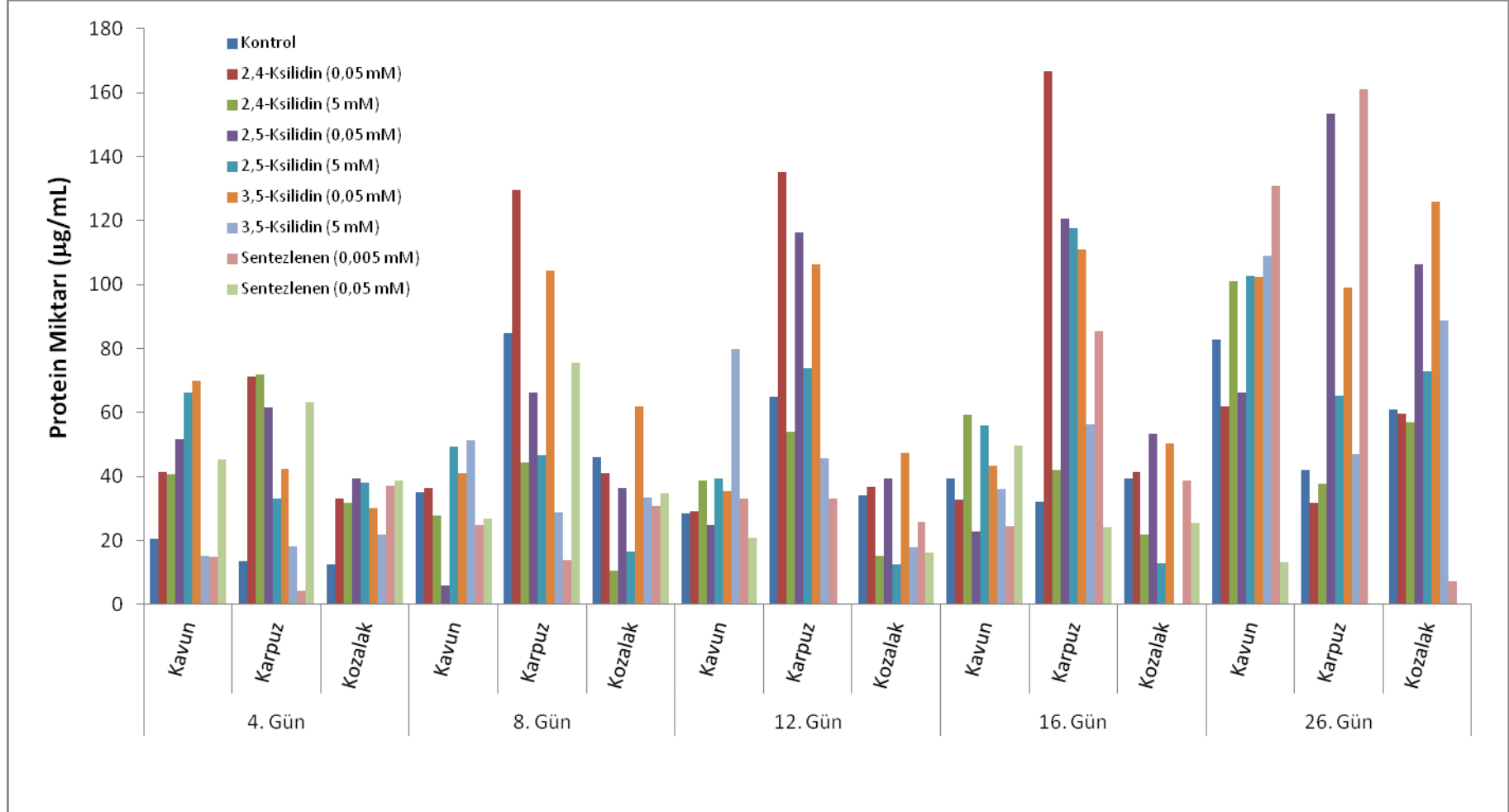
---

için izelge 4.9 ile Şekil 4.24'de indigo karmin için izelge 4.12 ile Şekil 4.27'de verilmiştir. *C. subvermispora* lakkazı /indigo için izelge 4.10 ile Şekil 4.25'de indigo karmin için ise izelge 4.13 ile Şekil 4.28'de verilmiştir. *P. ostreatus* lakkazı /indigo için izelge 4.11 ile Şekil 4.26'de indigo karmin için ise izelge 4.14 ile Şekil 4.29'da verilmiştir

**Çizelge 4.1.** *C. subvermispora*'nın uygulanan koşullar altındaki zamana bağlı protein miktarı

Mantar	İndükleyici	Derişim (Mm)	Protein Miktarı (µg/mL)														
			4. Gün			8. Gün			12. Gün			16. Gün			26. Gün		
			Kavun	Karpuz	Kozalak	Kavun	Karpuz	Kozalak	Kavun	Karpuz	Kozalak	Kavun	Karpuz	Kozalak	Kavun	Karpuz	Kozalak
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	Kontrol		20,54	13,51	12,66	35,22	84,92	46,11	28,32	64,91	34,25	39,36	32,01	39,52	82,77	42,00	61,03
	2,4-Ksilidin	0,05	41,38	71,08	33,00	36,42	129,58	40,94	29,20	135,09	36,89	32,65	166,76	41,43	62,00	31,76	59,54
		5	40,78	71,82	31,70	27,95	44,32	10,71	38,66	53,99	15,21	59,38	42,10	21,95	101,11	37,59	56,98
	2,5-Ksilidin	0,05	51,80	61,46	39,41	5,99	66,35	36,41	24,67	116,44	39,37	22,73	120,48	53,20	66,32	153,29	106,21
		5	66,19	33,05	38,12	49,26	46,83	16,43	39,54	73,91	12,57	55,81	117,75	13,02	102,76	65,16	72,87
	3,5-Ksilidin	0,05	69,90	42,32	30,28	41,04	104,51	62,06	35,53	106,28	47,42	43,28	110,89	50,37	102,27	98,89	126,05
		5	15,17	18,35	21,78	51,30	28,71	33,36	79,99	45,69	17,95	36,07	56,46	T.E	108,90	46,93	88,80
	Sentezlenen	0,005	14,73	4,43	36,97	24,78	14,05	30,85	33,03	33,10	25,92	24,60	85,58	38,58	130,86	160,91	7,21
		0,05	45,44	63,20	38,77	26,65	75,52	34,74	20,95	T.E	16,18	49,72	24,11	25,47	13,16	T.E	T.E

T.E., Tayin edilmedi

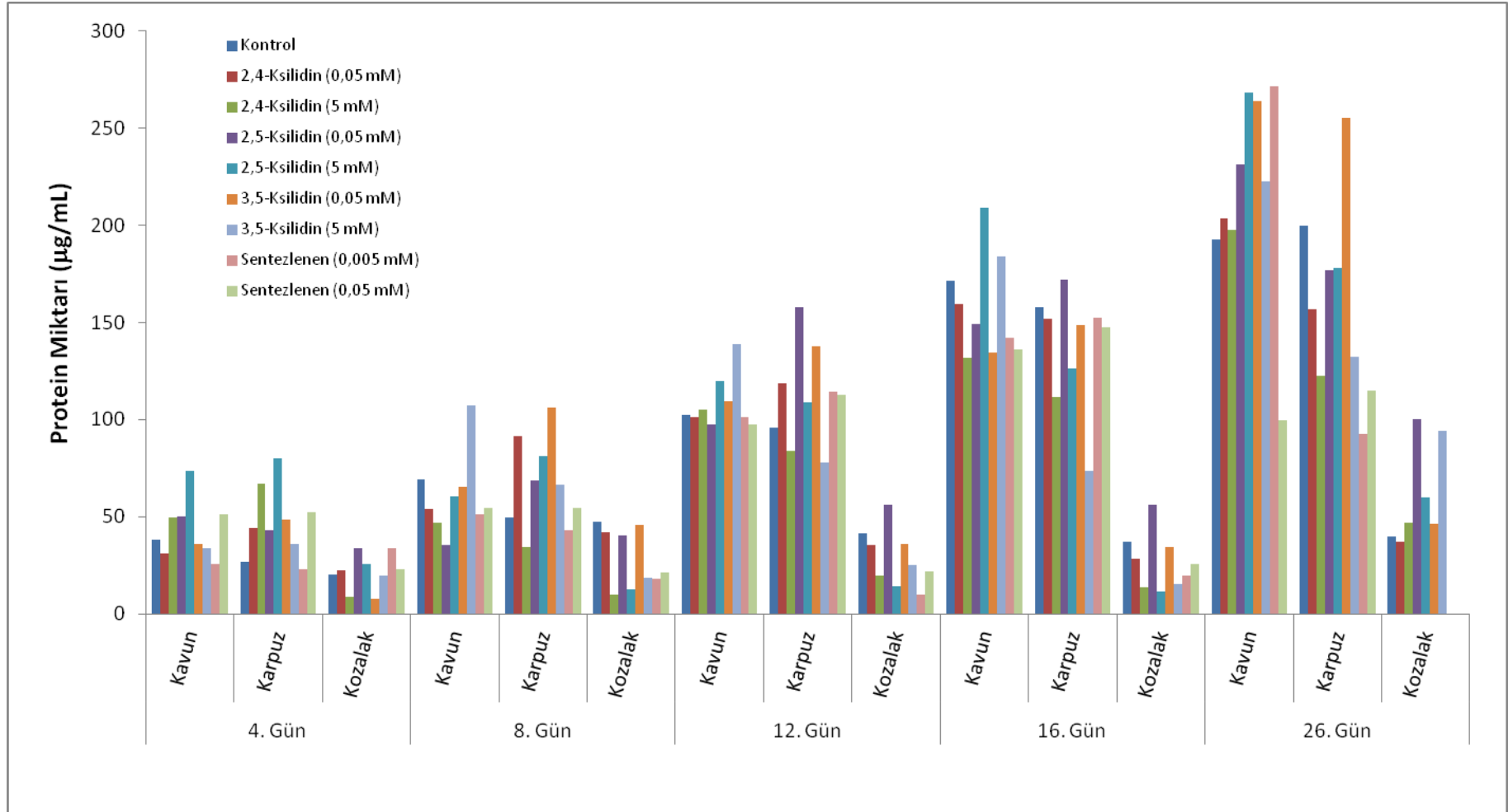


Şekil.4.1. *C. subvermispora*'nın uygulanan koşullar altındaki zamana bağlı protein miktarı.

**Çizelge 4.2.** *P. ostreatus*'un uygulanan koşullar altındaki zamana bağlı protein miktarı.

Mantar	İndükleyici	Derişim (mM)	Protein Miktarı (µg/mL)														
			4. Gün			8. Gün			12. Gün			16. Gün			26. Gün		
			Kavun	Karpuz	Kozalak	Kavun	Karpuz	Kozalak	Kavun	Karpuz	Kozalak	Kavun	Karpuz	Kozalak	Kavun	Karpuz	Kozalak
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Kontrol		37,91	26,83	20,00	68,91	49,76	47,65	102,58	95,72	41,62	171,52	157,69	36,93	192,84	199,57	39,86
	2,4-Ksilidin	0,05	31,30	44,39	22,63	53,67	91,24	42,24	101,28	118,75	35,64	159,50	151,79	28,13	203,75	156,53	37,13
		5	49,47	67,02	8,93	47,05	34,46	9,78	104,88	84,06	19,73	131,73	111,52	13,61	197,46	122,25	46,63
	2,5-Ksilidin	0,05	50,12	42,82	33,71	35,32	68,72	40,46	97,52	157,80	56,35	148,94	171,93	56,05	231,16	176,65	100,05
		5	73,48	80,28	25,86	60,53	80,96	12,76	119,90	108,64	14,09	208,96	126,28	11,72	268,31	178,10	60,06
	3,5-Ksilidin	0,05	36,20	48,76	7,59	65,38	106,31	46,01	109,30	137,70	36,06	134,22	148,36	34,10	264,09	255,49	46,58
		5	33,81	36,00	19,52	107,49	66,64	18,34	138,96	77,79	24,94	183,71	73,69	15,16	222,69	132,09	94,27
	Sentezlenen	0,005	25,46	22,95	33,84	51,19	43,15	18,09	101,20	114,49	10,13	142,23	152,43	19,73	271,72	92,56	T.E.
		0,05	51,28	52,20	22,95	54,50	54,47	21,08	97,60	112,89	21,76	136,24	147,50	25,47	99,63	114,65	T.E.

T.E., Tayin edilemedi



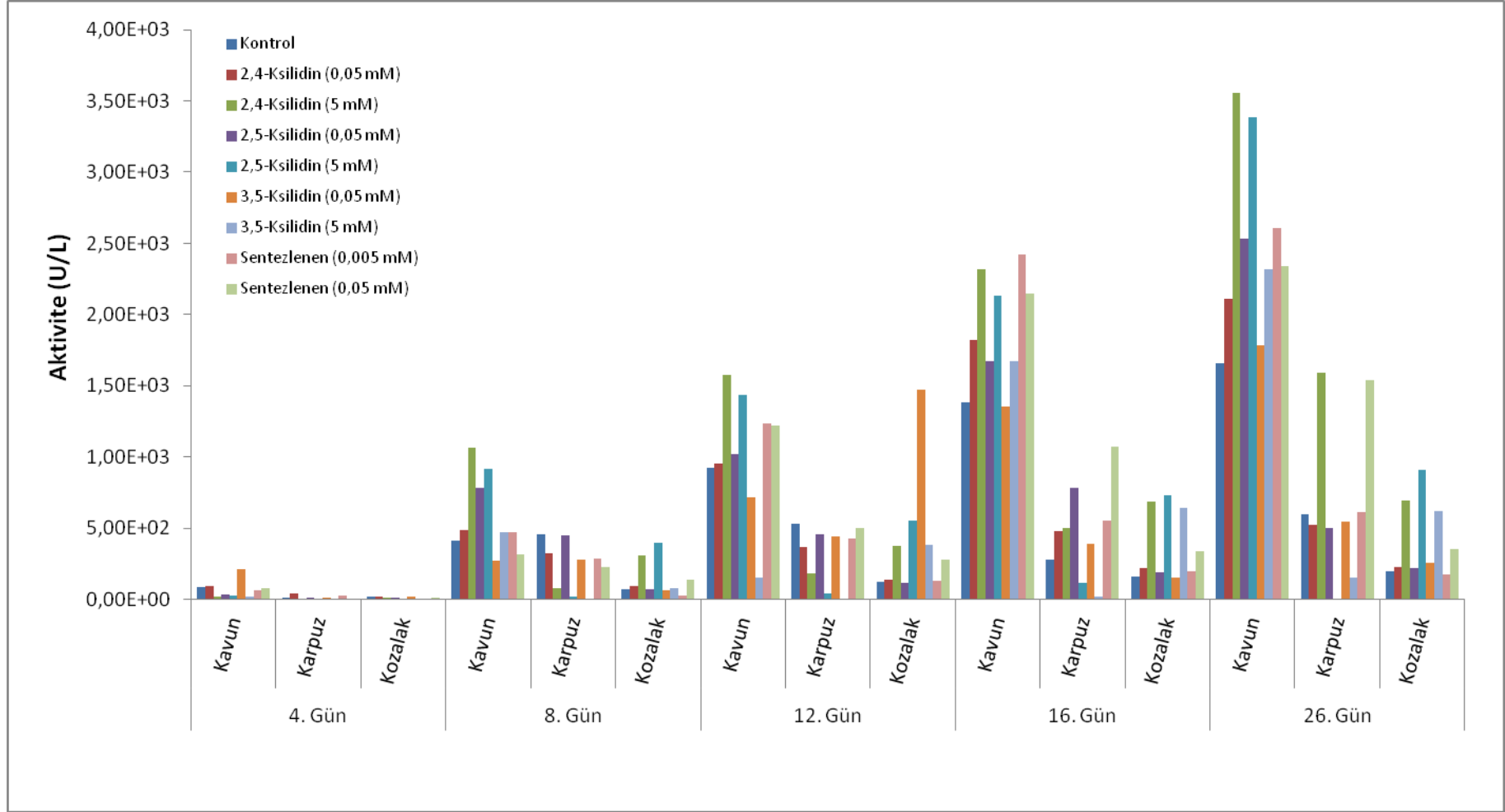
Şekil. 4.2. *P. ostreatus*'un uygulanan koşullar altındaki zamana bağlı protein miktarı



**Çizelge 4.3.** *C. subvermispora*'nın uygulanan koşullar altındaki zamana bağlı lakkaz aktivitesi

Mantar	İndükleyici	Derişim (mM)	Lakkaz (U/L)														
			4. Gün			8. Gün			12. Gün			16. Gün			26. Gün		
			Kavun	Karpuz	Kozalak	Kavun	Karpuz	Kozalak	Kavun	Karpuz	Kozalak	Kavun	Karpuz	Kozalak	Kavun	Karpuz	Kozalak
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	Kontrol		87,70	13,36	17,59	409,58	459,45	70,84	921,56	530,90	120,20	1380,12	282,70	160,27	1656,14	596,57	195,89
	2,4-Ksilidin	0,05	95,27	39,18	20,59	483,93	321,88	93,94	952,73	365,06	136,90	1823,09	476,36	218,15	2108,02	527,56	229,28
		5	20,37	8,68	13,91	1064,06	78,47	311,64	1573,78	185,87	375,08	2315,04	503,80	690,06	3552,70	1591,59	692,29
	2,5-Ksilidin	0,05	32,39	15,25	15,80	781,33	450,77	74,57	1023,96	454,10	113,53	1671,73	783,55	186,98	2530,69	505,30	222,60
		5	28,05	2,89	5,34	918,23	18,92	396,23	1438,00	40,74	552,05	2134,73	115,75	732,35	3383,52	T.E.	912,66
	3,5-Ksilidin	0,05	211,92	14,80	17,47	274,91	277,14	66,22	719,00	445,20	1469,16	1351,18	389,55	151,37	1780,80	547,60	253,76
		5	23,26	1,00	5,68	468,57	5,01	80,69	155,12	7,12	382,87	1669,54	22,26	641,09	2319,49	151,81	623,28
	Sentezlenen	0,005	62,88	28,83	8,68	471,91	284,93	30,61	1233,20	425,17	129,11	2419,66	556,50	198,11	2604,42	609,92	173,63
		0,05	78,02	6,01	11,80	319,99	228,17	135,23	1219,85	505,30	276,02	2148,09	1075,16	340,58	2337,30	1535,94	356,16

T.E., Tayin edilemedi

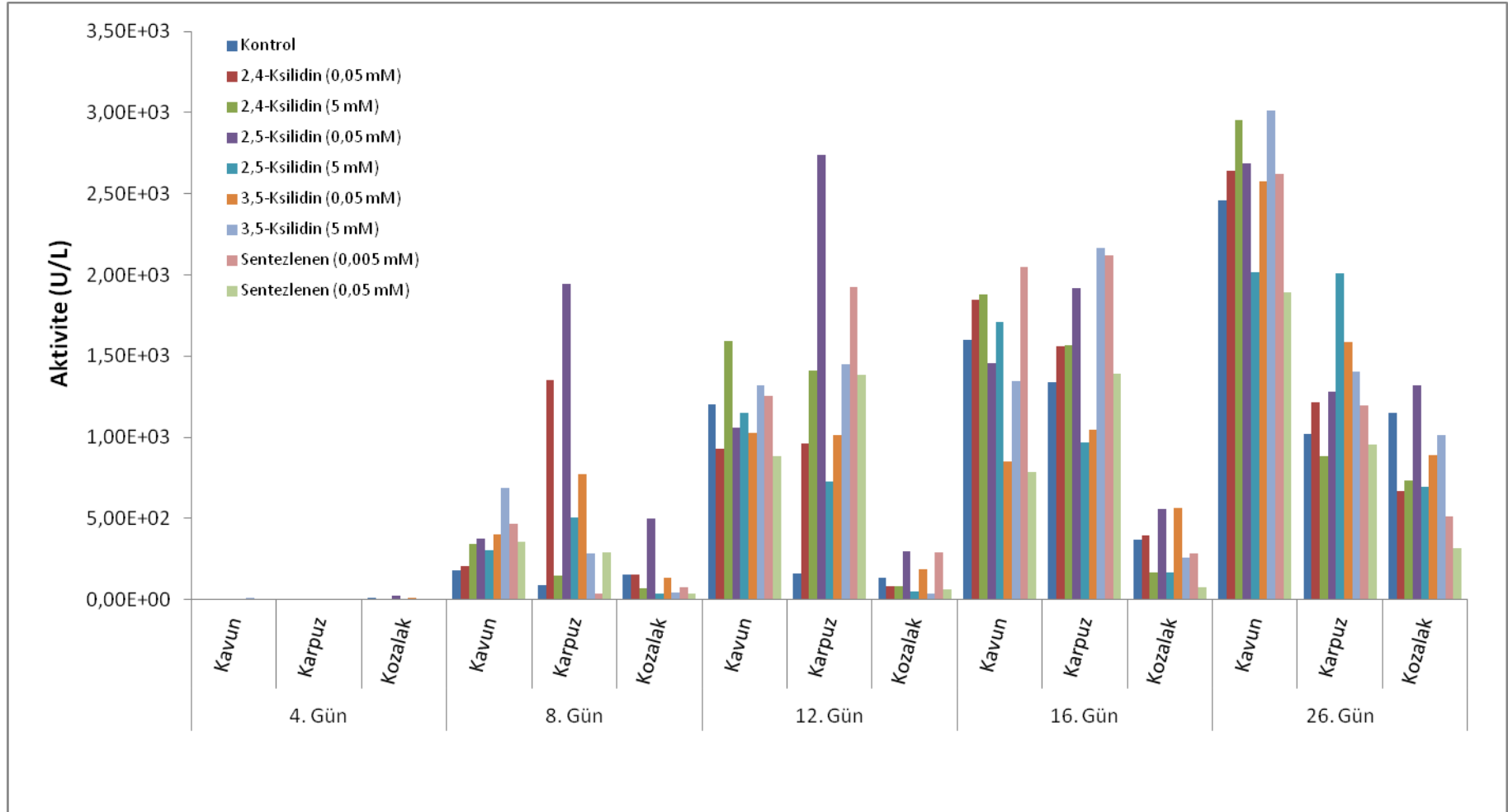


Şekil . 4.3. *C. subvermispora*'nın uygulanan koşullar altındaki zamana bağlı lakkaz aktivitesi

**Çizelge 4.4.** *P. ostreatus*'un uygulanan koşullar altındaki zamana bağlı lakkaz aktivitesi.

Mantar	İndükleyici	Derişim (mM)	Lakkaz (U/L)														
			4. Gün			8. Gün			12. Gün			16. Gün			26. Gün		
			Kavun	Karpuz	Kozalak	Kavun	Karpuz	Kozalak	Kavun	Karpuz	Kozalak	Kavun	Karpuz	Kozalak	Kavun	Karpuz	Kozalak
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Kontrol		5,57	0,89	11,04	182,13	87,26	154,93	1202,04	164,03	135,79	1598,27	1342,28	369,52	2457,50	1019,51	1150,84
	2,4-Ksilidin	0,05	T.E.	1,74	2,49	207,02	1353,41	156,27	929,36	962,75	85,70	1845,35	1562,65	394,00	2640,04	1213,17	665,57
		5	7,97	2,27	3,34	345,03	150,81	69,01	1596,04	1413,51	80,14	1878,74	1564,88	164,72	2956,13	883,72	732,35
	2,5-Ksilidin	0,05	4,99	3,12	26,98	373,08	1947,75	499,18	1061,80	2737,98	298,28	1458,03	1916,59	558,73	2689,01	1277,72	1322,24
		5	6,50	3,47	2,80	304,96	508,64	39,51	1148,62	730,13	48,97	1707,34	970,54	164,72	2016,76	2012,30	694,51
	3,5-Ksilidin	0,05	5,97	3,43	12,38	402,35	771,31	135,79	1026,19	1015,06	184,76	852,56	1048,45	563,18	2573,26	1589,36	890,40
		5	8,15	2,85	4,63	691,17	286,60	45,63	1322,24	1449,13	35,62	1345,01	2168,12	260,44	3014,00	1402,38	1015,06
	Sentezlenen	0,005	7,08	2,18	5,21	470,24	35,62	74,01	1257,69	1927,72	291,61	2047,92	2123,60	287,15	2622,23	1197,59	511,98
		0,05	4,27	1,47	2,09	358,94	292,16	35,06	881,50	1386,80	62,33	783,55	1393,48	77,91	1892,10	952,73	316,09

T.E., Tayin edilemedi

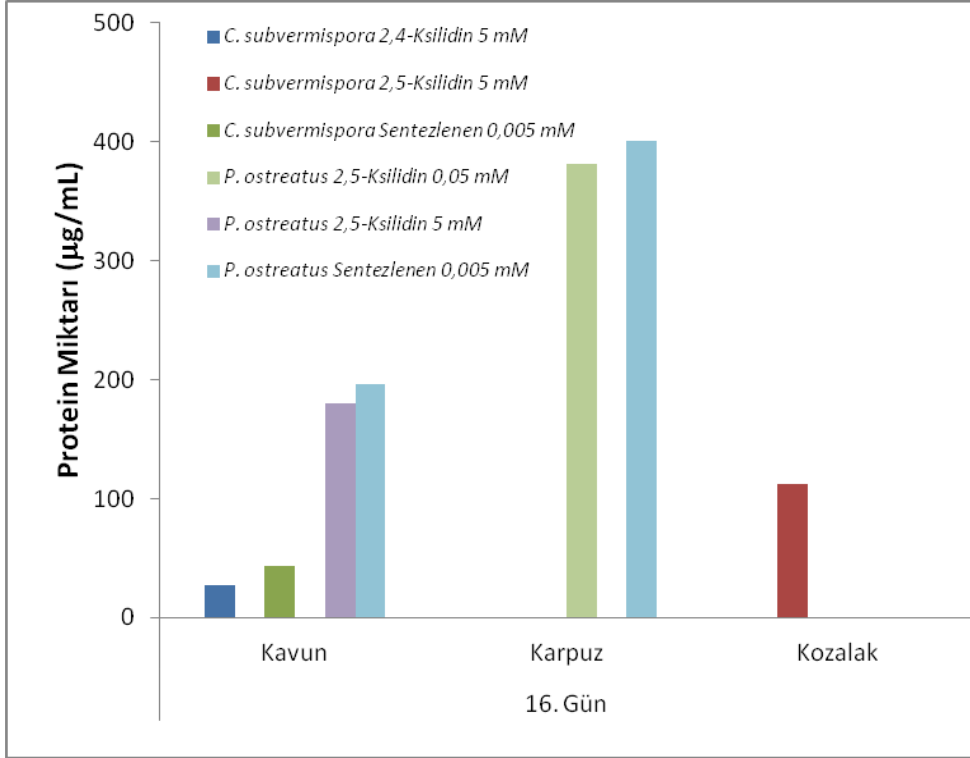


Şekil . 4.4. *P. ostreatus*'un uygulanan koşullar altındaki zamana bağlı lakkaz aktivitesi.

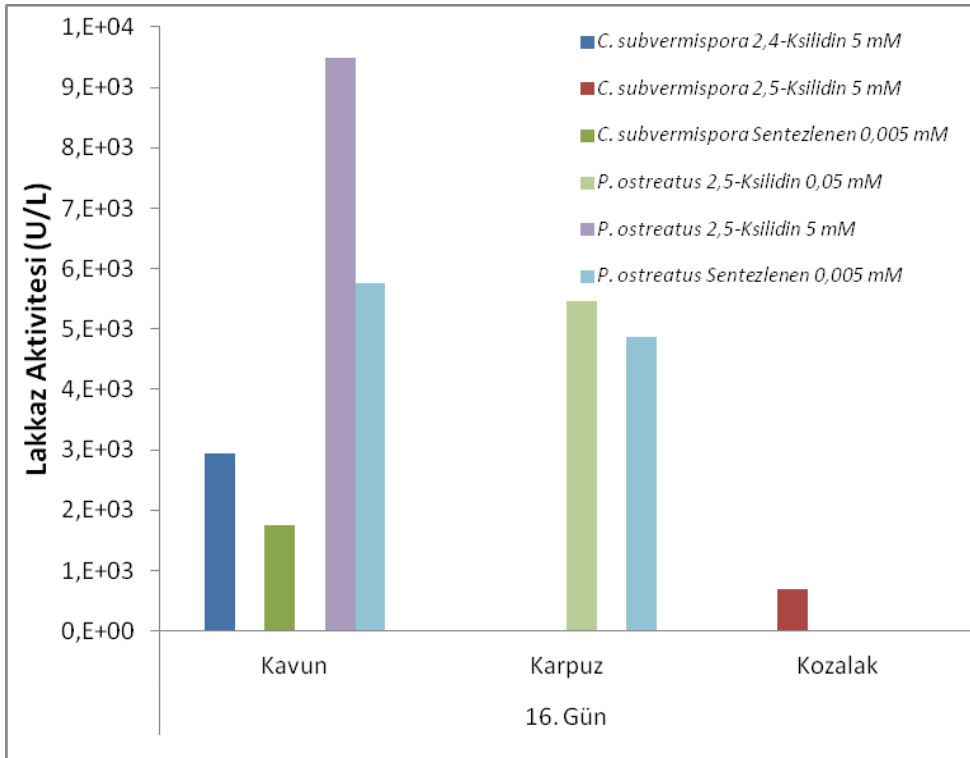
**Çizelge 4.5.** Seçilen 7 farklı koşulda örneklerin 16. gündeki protein miktarı ve lakkaz aktivitesi. Değerler her bir koşul için ikişer kültürasyonun ortalamalarıdır.)

<b>Tür / Koşul</b>	<b>Protein Miktarı (µg/mL)</b>	<b>Lakkaz Aktivitesi (U/L)</b>
<i>C. subvermispora</i> 5 mM 2,4-Ksilidin (Kavun)	26,87	2940,55
<i>C. subvermispora</i> 0,005 mM Sentezlenen (Kavun)	43,18	1748,53
<i>C. subvermispora</i> 5 mM 2,5-Ksilidin (Kozalak)	112,02	684,22
<i>P. ostreatus</i> 0,05 mM 2,5-Ksilidin (Karpuz)	381,21	5471,51
<i>P. ostreatus</i> 5 mM 2,5-Ksilidin (Kavun)	180,40	9498,34
<i>P. ostreatus</i> 0,005 mM Sentezlenen (Kavun)	195,77	5764,23
<i>P. ostreatus</i> 0,005 mM Sentezlenen (Karpuz)	401,17	4866,04

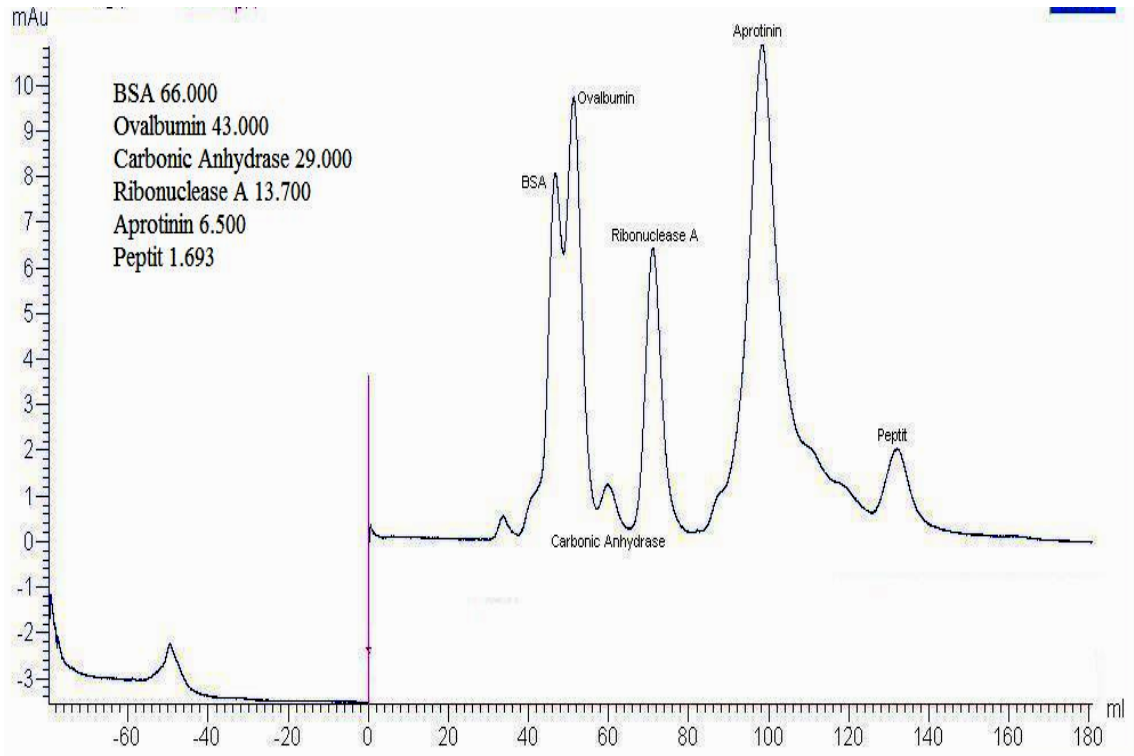
#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI



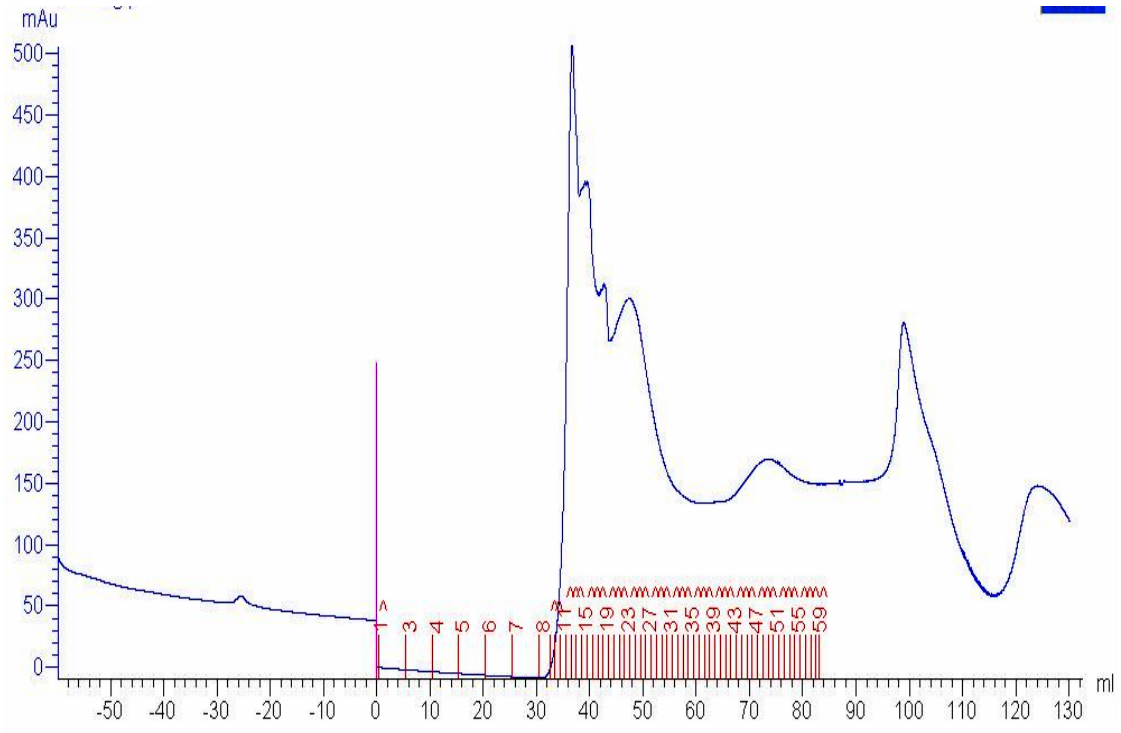
Şekil. 4.5. Seçilen 7 farklı koşulda örneklerin 16. gündeki protein miktarı



Şekil. 4.6. Seçilen 7 farklı koşulda örneklerin 16. gündeki lakkaz aktivitesi

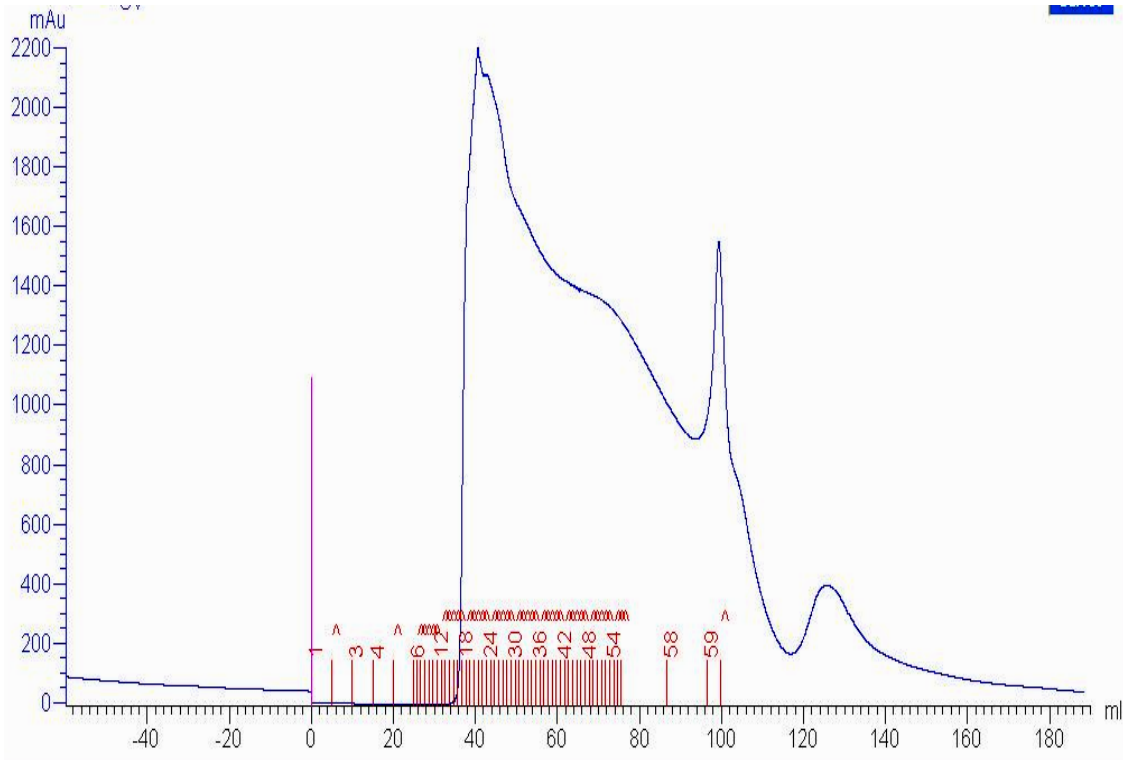


Şekil . 4.7. Kullanılan Sephacryl S-100 kolonu için kalibrasyon grafiği.



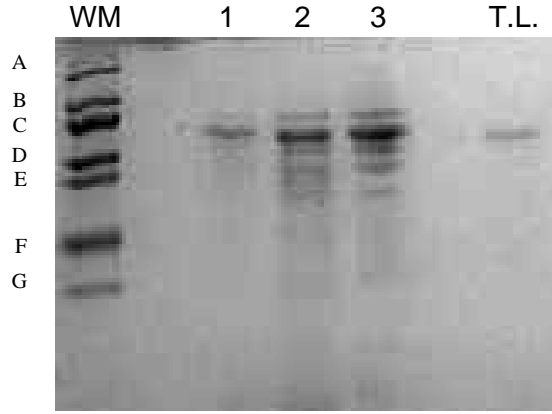
Şekil . 4.8. *C. subvermispora* ile elde edilen lakkazın kolon grafiği (35.- 68. mL arası fraksiyon toplanmıştır).

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

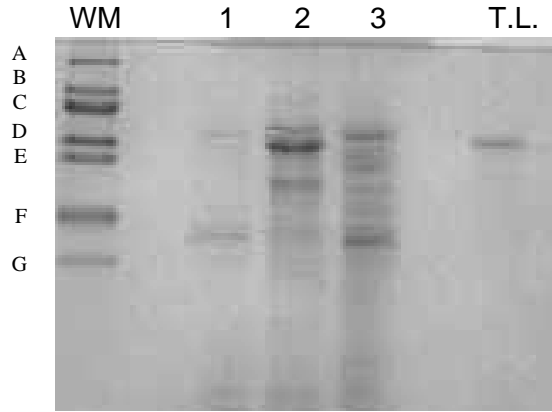


Şekil 4.9. *P. ostreatus* ile elde edilen lakkazın kolon grafiği (38.- 72. mL arası fraksiyon toplanmıştır).





**Şekil 4.10.** *C. subvermispora* lakkazı elektroforez profilleri. WM; protein standardı [(Weight Maker, A ;At serumu  $\alpha_2$ -makroglobulini M.A.: 180.000, B; *E. coli*  $\beta$ -galaktozidazı M.A.: 116.000, C; İnsan sütü laktoferini M.A.: 90.000 , D;Tavşan kası piruvat kinazı M.A.: 58.000, E;Domuz kalbi fumarazı M.A.: 48.500 , F;Tavşan kası laktat dehidrojenazı M.A.: 36.500 , G;Tavşan kası Triozfosfat izomerazı M.A.: 26.600) Sigma SDS7B2], 1; ham, 2; amonyum sülfat çöktürmesi sonrası, 3; Sephacryl S 100 kolonu sonrası, T.L.; satın alınan *T. versicolor* lakkazı.

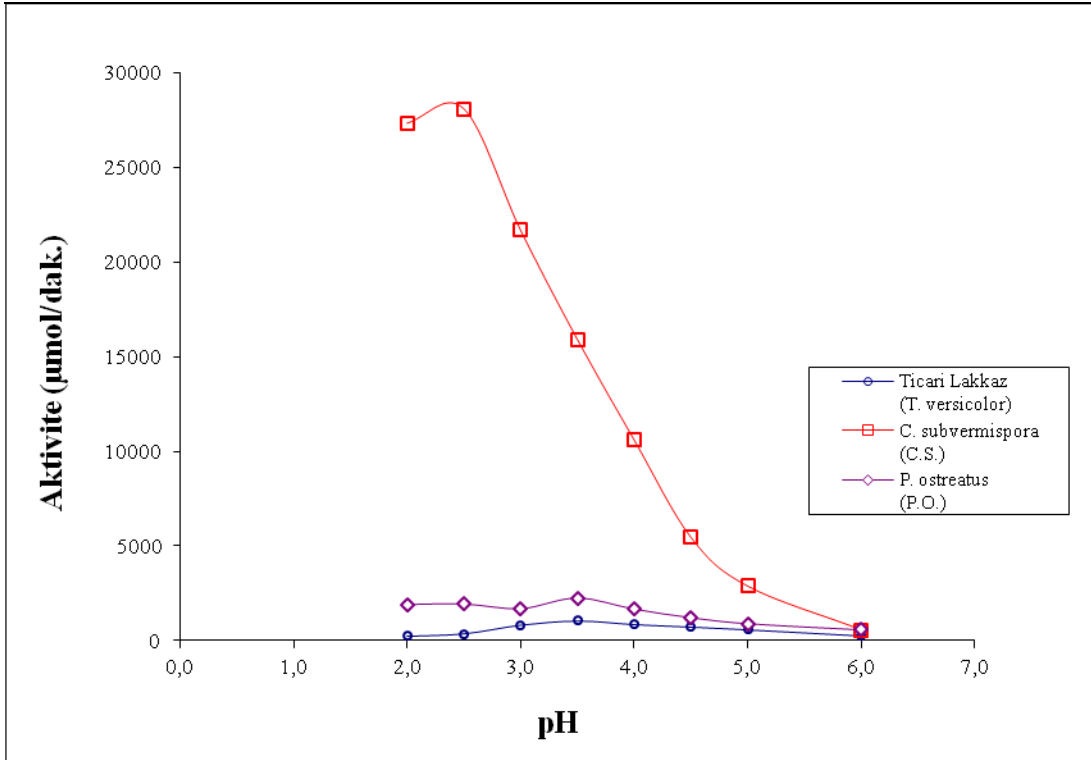


**Şekil 4.11.** *P. ostreatus* lakkazı elektroforez profilleri. WM; protein standardı [(Weight Maker, A ;At serumu  $\alpha_2$ -makroglobulini M.A.: 180.000, B; *E. coli*  $\beta$ -galaktozidazı M.A.: 116.000, C; İnsan sütü laktoferini M.A.: 90.000 , D;Tavşan kası piruvat kinazı M.A.: 58.000, E;Domuz kalbi fumarazı M.A.: 48.500 , F;Tavşan kası laktat dehidrojenazı M.A.: 36.500 , G;Tavşan kası Triozfosfat izomerazı M.A.: 26.600) Sigma SDS7B2], 1; ham, 2; amonyum sülfat çöktürmesi sonrası, 3; Sephacryl S 100 kolonu sonrası, T.L.; satın alınan *T. versicolor* lakkazı.

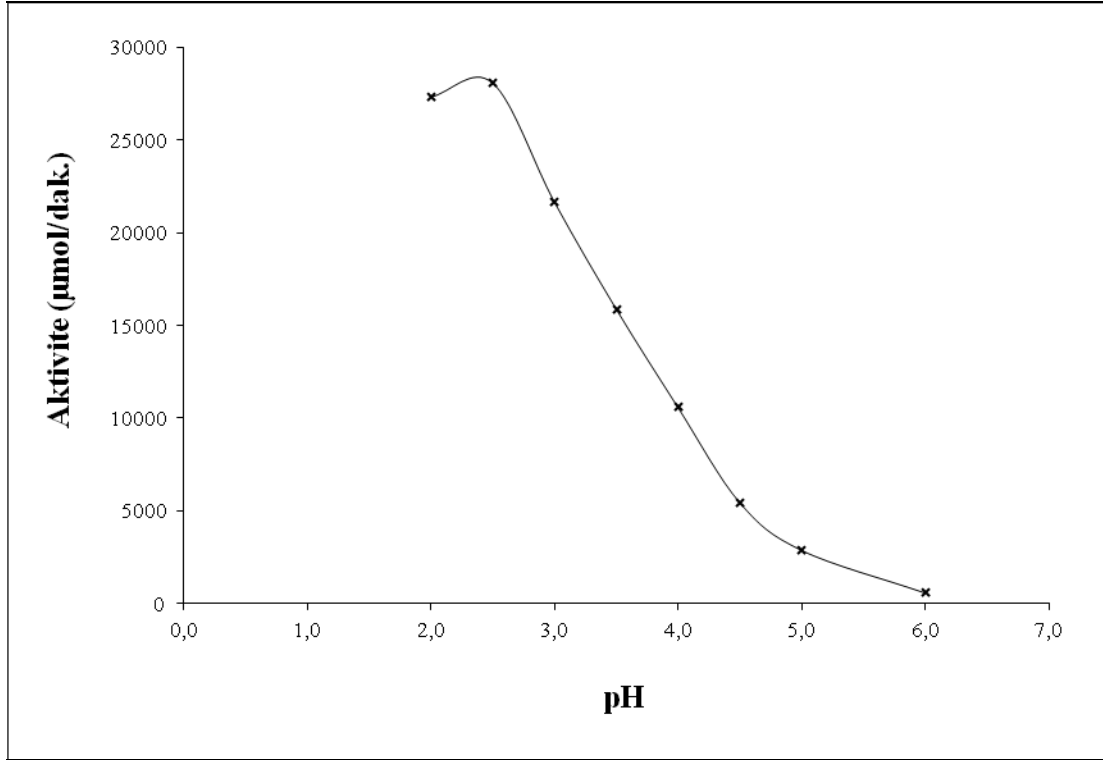
#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

**Çizelge 4.6.** Ticari lakkaz ve kısmi saflaştırılan lakkazların farklı pH'larda 1 mM ABTS'ye karşı 2. dakikada ölçülen aktiviteleri.

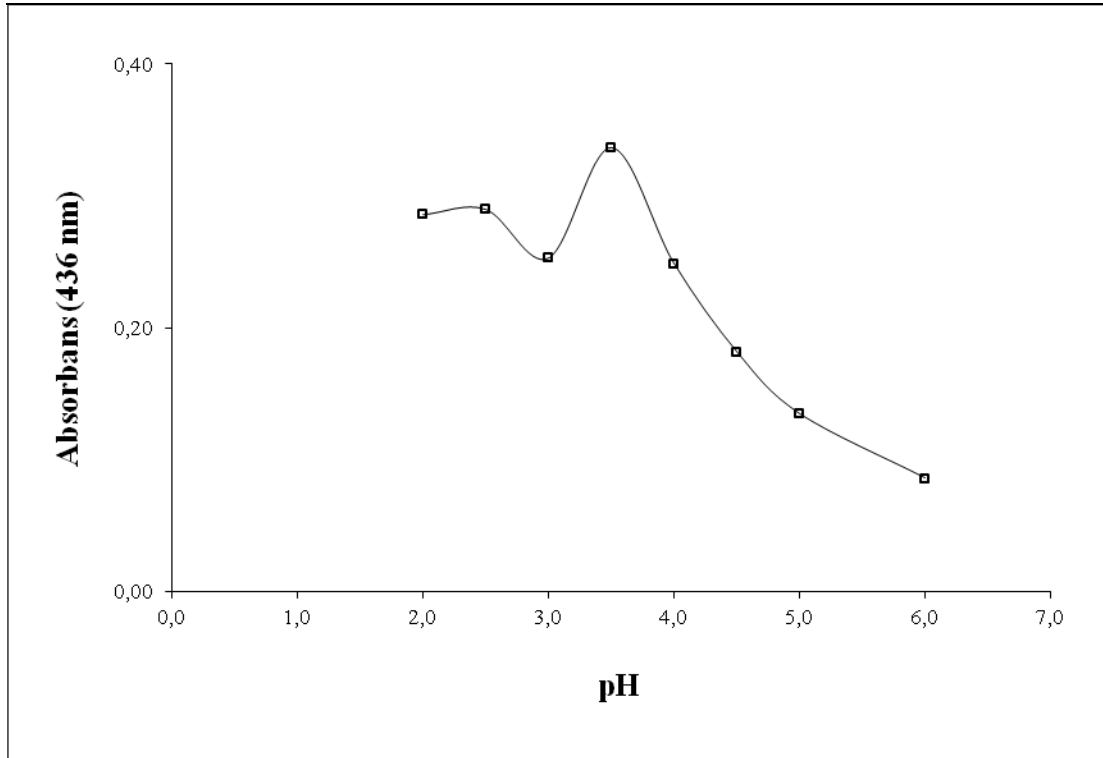
pH	Aktivite (µmol/dak.)		
	Ticari Lakkaz ( <i>T. versicolor</i> )	<i>C. subvermispora</i> (C.S.)	<i>P. ostreatus</i> (P.O.)
2,00	237,904	27313,020	1909,908
2,50	366,455	28080,990	1936,620
3,00	823,064	21670,110	1689,534
3,50	1045,942	15893,640	2250,486
4,00	853,115	10584,630	1662,822
4,50	722,894	5442,570	1215,396
5,00	575,978	2871,540	901,530
6,00	253,764	567,630	574,308



**Şekil. 4.12..** Ticari lakkaz ve kısmi saflaştırılan lakkazların farklı pH'larda 1 mM ABTS'ye karşı 2. dakikada ölçülen aktiviteleri.



Şekil. 4.13. *C. subvermispora* lakkazının optimal pH aktivitesi.

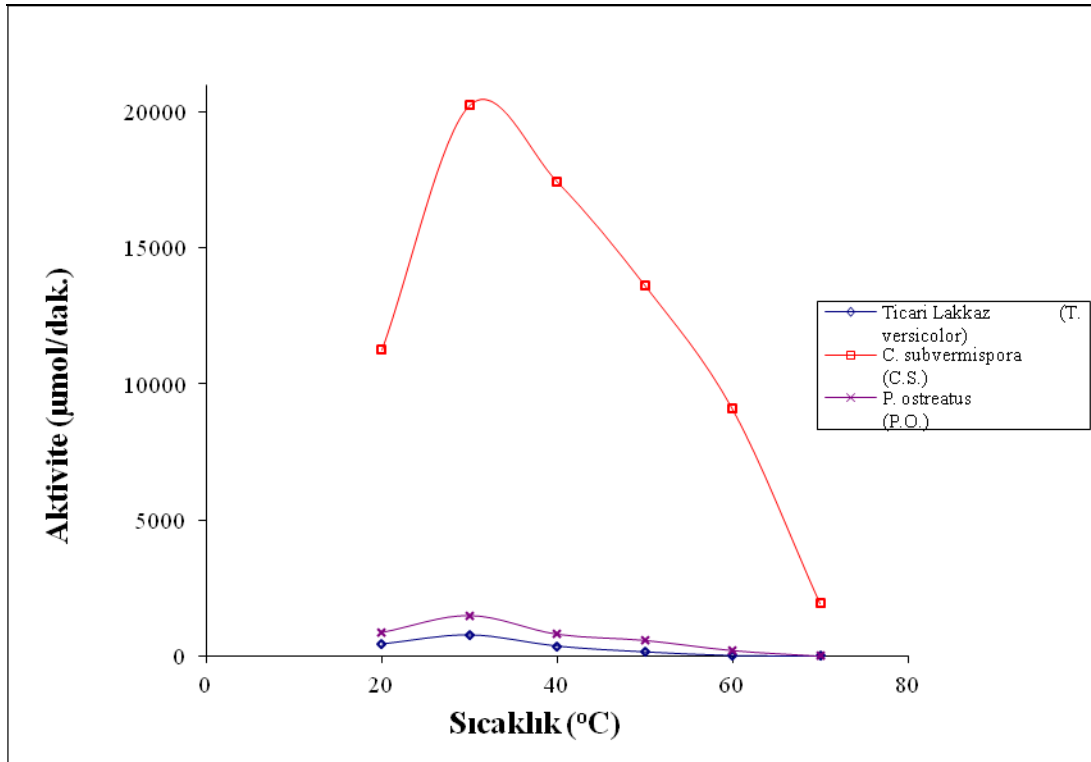


Şekil. 4.14. *P. ostreatus* lakkazının optimal pH aktivitesi

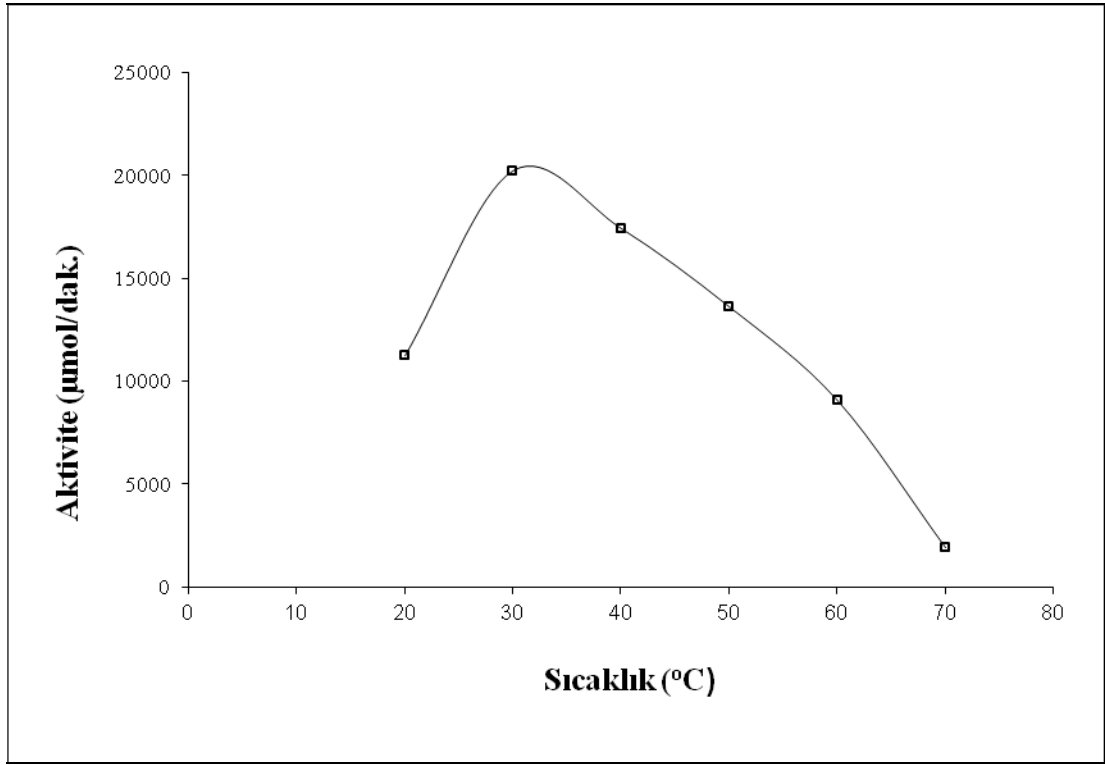
#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

**Çizelge 4.7.** Ticari lakkaz ve kısmi saflaştırılan lakkazların farklı sıcaklıklarda 0,6 mM ABTS'ye karşı 2. dakikada ölçülen aktiviteleri.

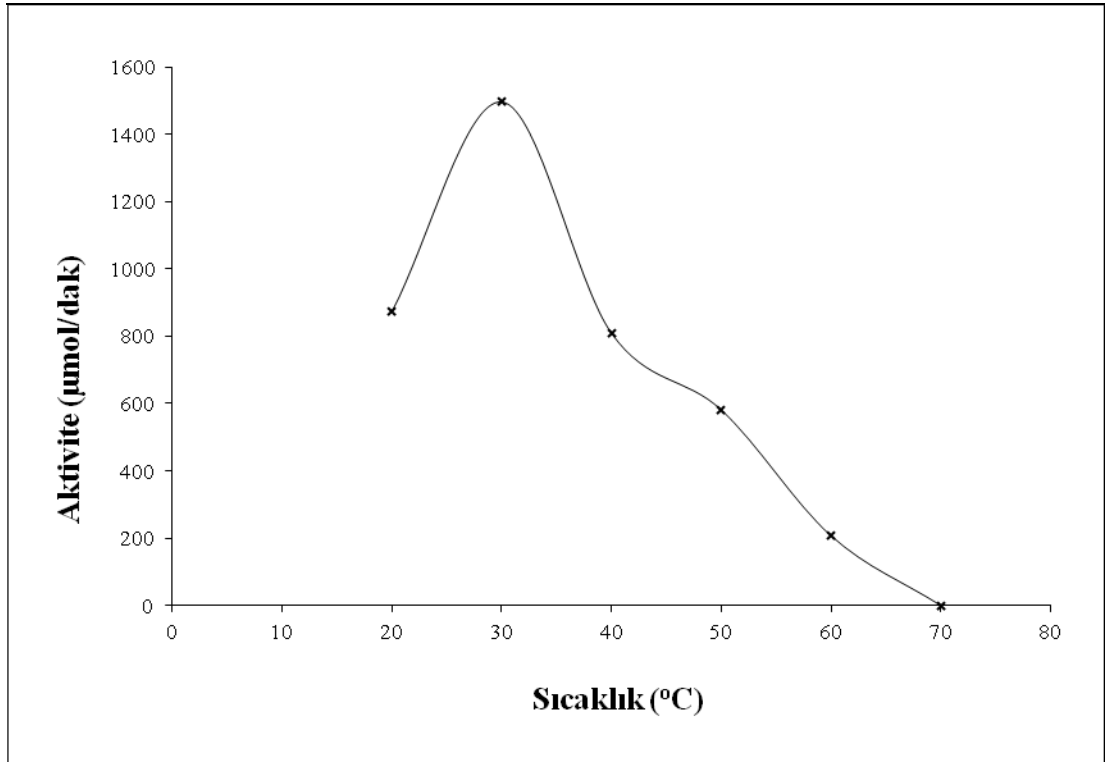
Sıcaklık (°C)	Aktivite (µmol/dak.)		
	Ticari Lakkaz ( <i>T. versicolor</i> )	<i>C. subvermispora</i> (C.S.)	<i>P. ostreatus</i> (P.O.)
20,00	439,913	11252,430	874,818
30,00	768,805	20234,340	1495,872
40,00	361,447	17429,580	808,038
50,00	153,594	13623,120	580,986
60,00	20,869	9082,080	207,018
70,00	0,000	1936,620	0,000



**Şekil. 4.15.** Sıcaklığa bağlı lakkaz aktivitesi



Şekil. 4.16. *C. subvermispora* lakkazının optimal sıcaklık aktivitesi.



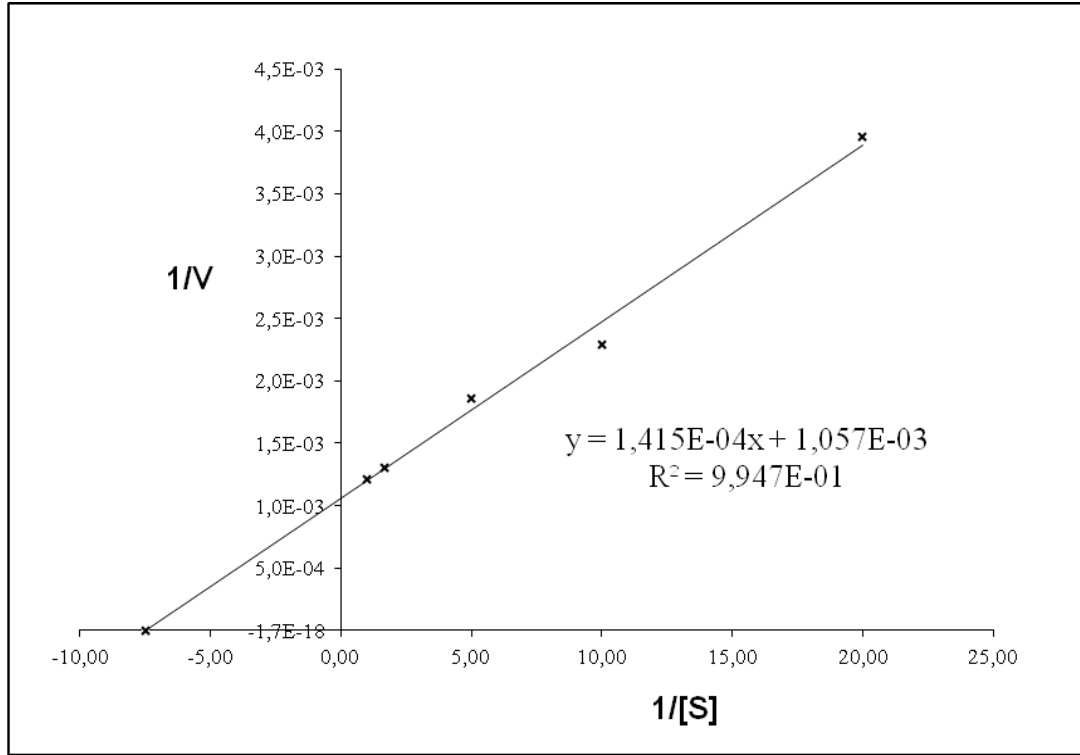
Şekil. 4.17. *P. ostreatus* lakkazının optimal sıcaklık aktivitesi.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

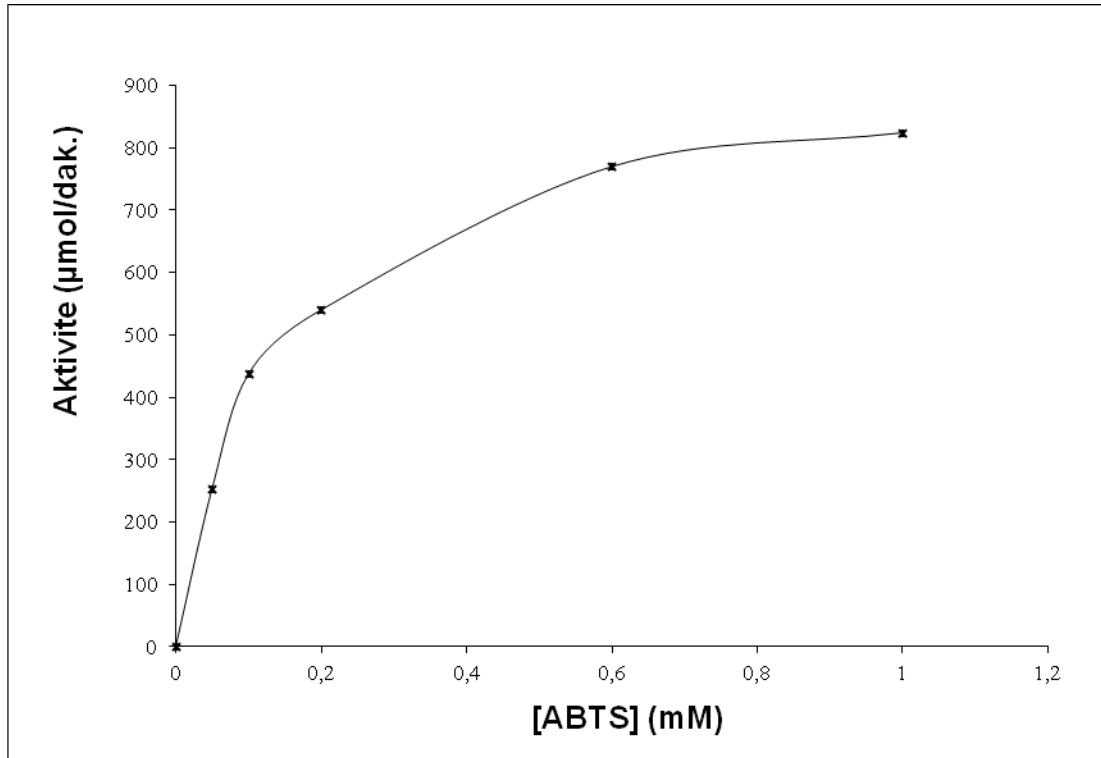
---

**Çizelge 4.8.** Ticari lakkaz ve kısmi saflaştırılan lakkazların 30 °C sıcaklık ve pH 3'te değişik ABTS derişimlerinde 436 nm'de ölçülen absorbans değerlerine bağlı olarak hesaplanan kinetik parametreler.

[ABTS] (Mm)	Aktivite (µmol/dak.)		
	Ticari Lakkaz ( <i>T. versicolor</i> )	<i>C. subvermispora</i> (C.S.)	<i>P. ostreatus</i> (P.O.)
0,05	252,929	5375,790	500,850
0,10	436,574	10384,290	707,868
0,20	539,249	15526,350	1061,802
0,60	768,805	20234,340	1495,872
1,00	823,064	21670,110	1689,534
V <sub>max</sub>	946,217	30248,034	1777,146
K <sub>M</sub>	0,134	0,222	0,132

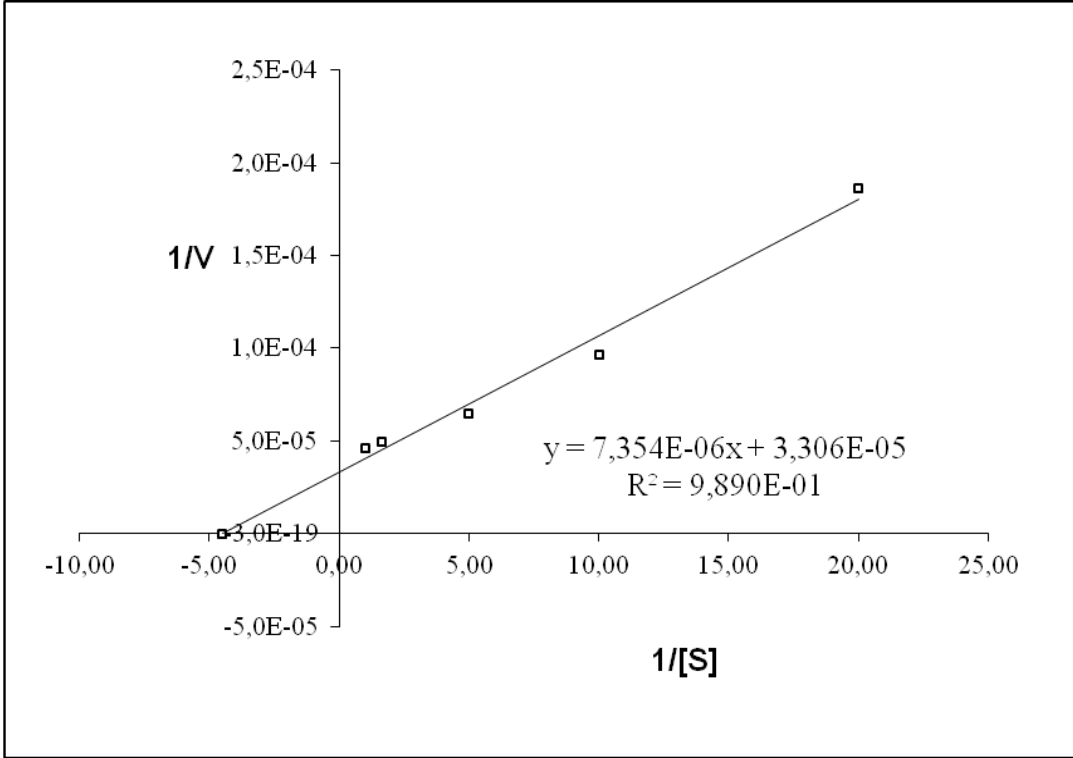


Şekil. 4.18. Ticari lakkazın aktiviteye ( $\mu\text{mol/dak.}$ ) göre Lineweaver-Burk Grafiği.

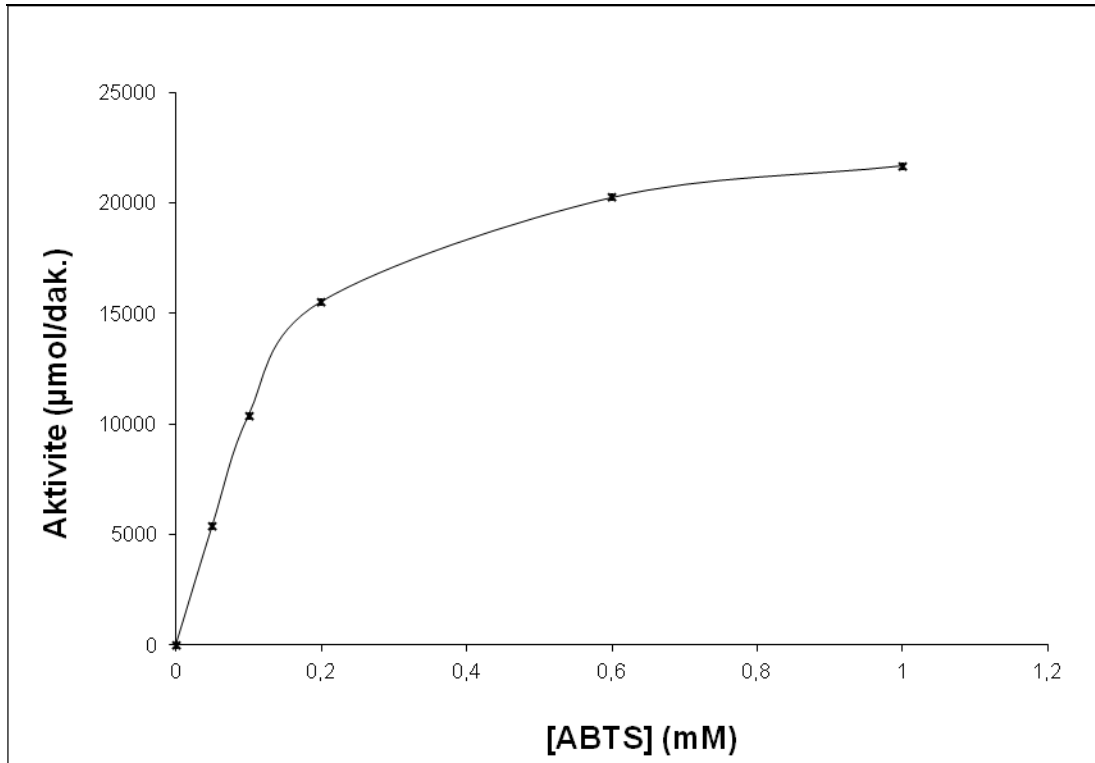


Şekil. 4.19. Ticari lakkazın aktiviteye ( $\mu\text{mol/dak.}$ ) göre Michaelis-Menten Grafiği.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

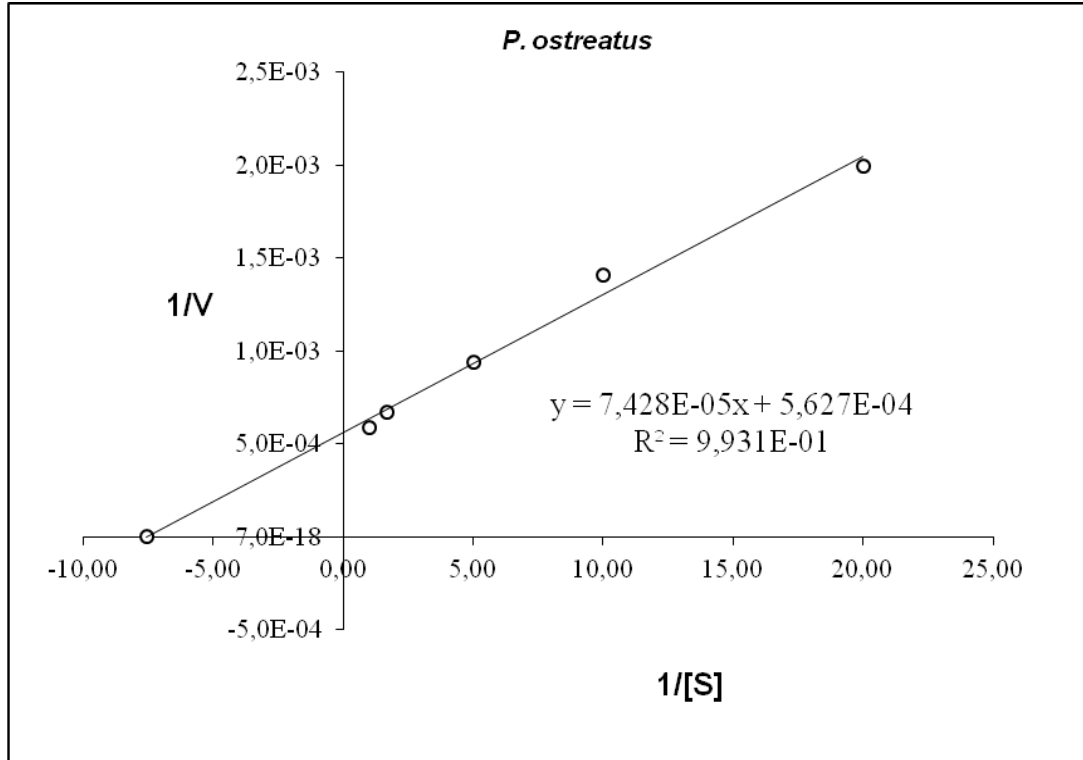


Şekil. 4.20. *C. subvermispora* lakkazının aktiviteye ( $\mu\text{mol/dak.}$ ) göre Lineweaver-Burk Grafiği.

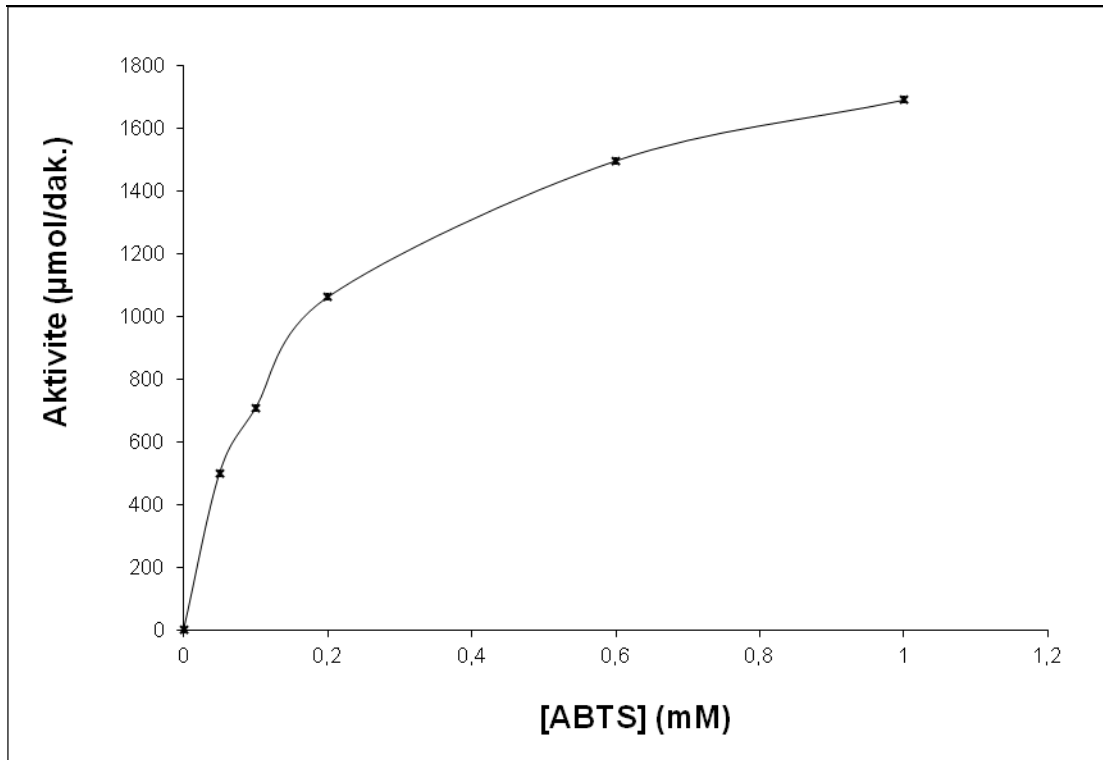


Şekil. 4.21. *C. subvermispora* lakkazının aktiviteye ( $\mu\text{mol/dak.}$ ) göre Michaelis-Menten Grafiği.





Şekil. 4.22. *P. ostreatus* lakkazının aktiviteye ( $\mu\text{mol/dak.}$ ) göre Lineweaver-Burk Grafiği.

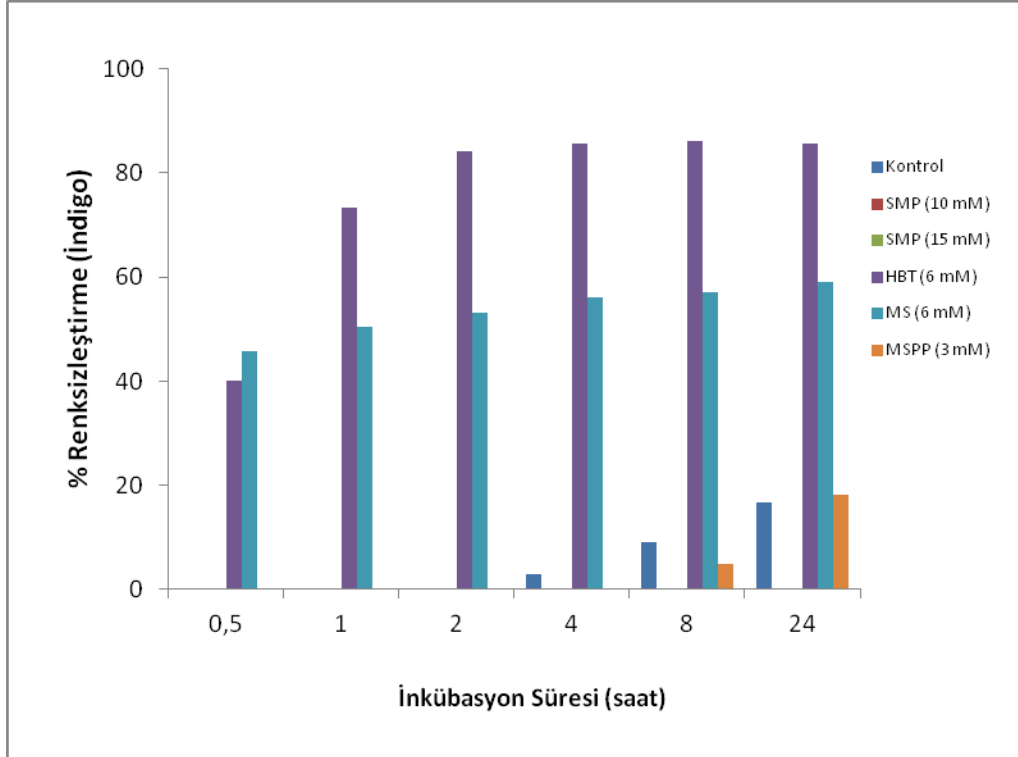


Şekil. 4.23. *P. ostreatus* lakkazının aktiviteye ( $\mu\text{mol/dak.}$ ) göre Michaelis-Menten Grafiği.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

**Çizelge 4.9.** Ticari lakkaz ile oluşturulan lakkaz-medyatör sistemlerinin indigo boya üzerine etkisi

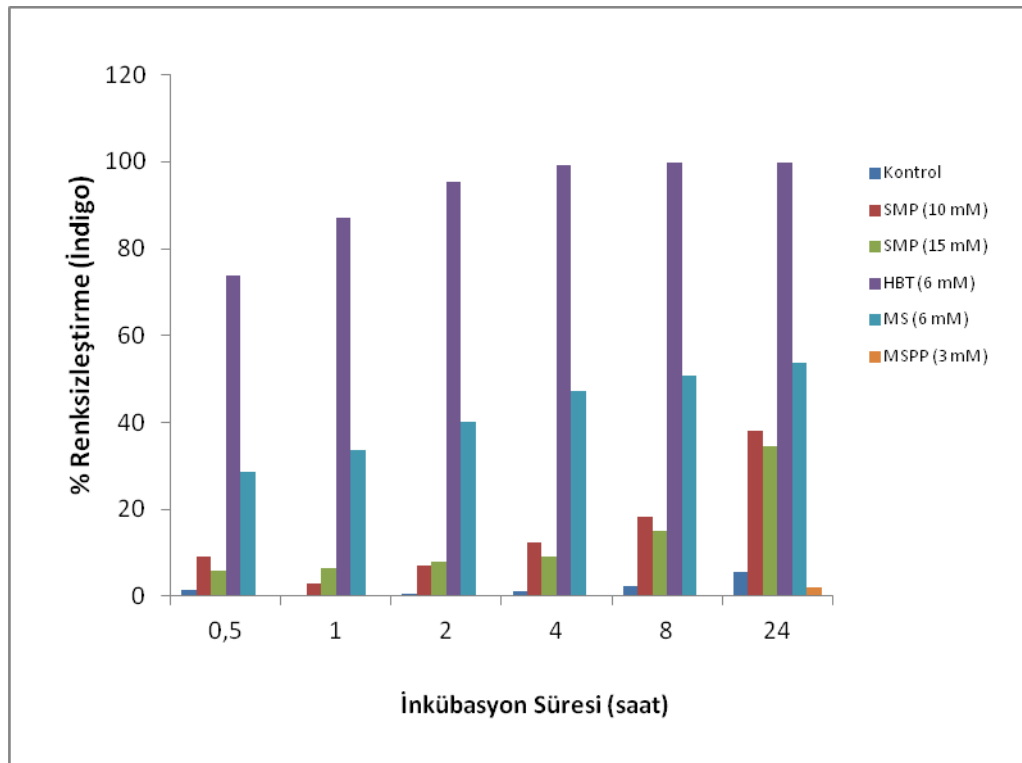
	Medyatör	Derişim (mM)	% Renksizleştirme (İndigo)					
			İnkübasyon Süresi (saat)					
			0,5	1	2	4	8	24
Ticari Lakkaz	Kontrol		-	-	-	2,99	9,20	16,67
	SMP	10	-	-	-	-	-	-
		15	-	-	-	-	-	-
	HBT	6	40,13	73,37	84,21	85,67	86,20	85,76
	MS	6	45,77	50,46	53,25	56,12	57,06	59,09
	MSPP	3	-	-	-	-	4,91	18,18



**Şekil. 4.24.** Ticari lakkaz ile lakkaz-medyatör sistemlerinin indigo boya üzerine etkisi

Çizelge 4.10. *C. subvermispora* ile oluşturulan lakkaz-mediyatör sistemlerinin indigo boya üzerine etkisi

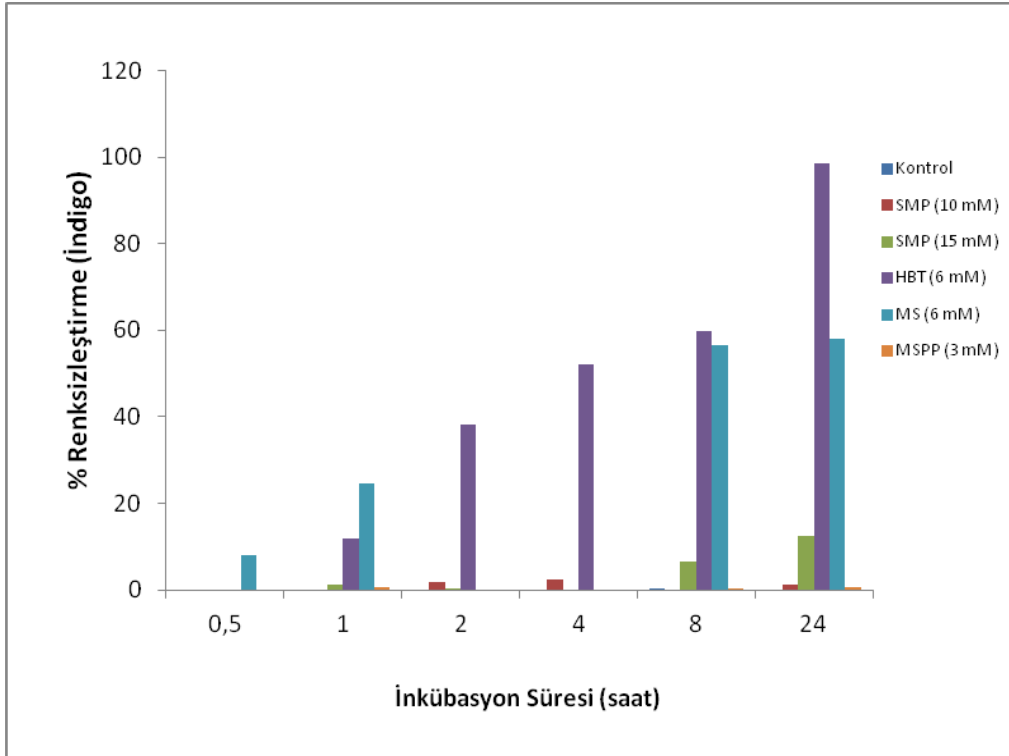
Mantar	Mediyatör	Derişim (mM)	% Renksizleştirme (İndigo)					
			İnkübasyon Süresi (saat)					
			0,5	1	2	4	8	24
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	Kontrol		1,36	0,09	0,66	1,28	2,38	5,58
	SMP	10	9,14	3,00	7,05	12,26	18,20	38,17
		15	5,75	6,38	8,00	9,28	14,90	34,61
	HBT	6	73,88	87,00	95,39	99,13	99,71	99,71
	MS	6	28,53	33,80	40,20	47,29	50,85	53,88
	MSP	3	-	-	-	-	0,34	2,08

Şekil 4.25. *C. subvermispora* lakkazı ile lakkaz-mediyatör sistemlerinin indigo boya üzerine etkisi

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çizelge 4.11 *P. ostreatus* ile oluşturulan lakkaz-mediyatör sistemlerinin indigo boya üzerine etkisi

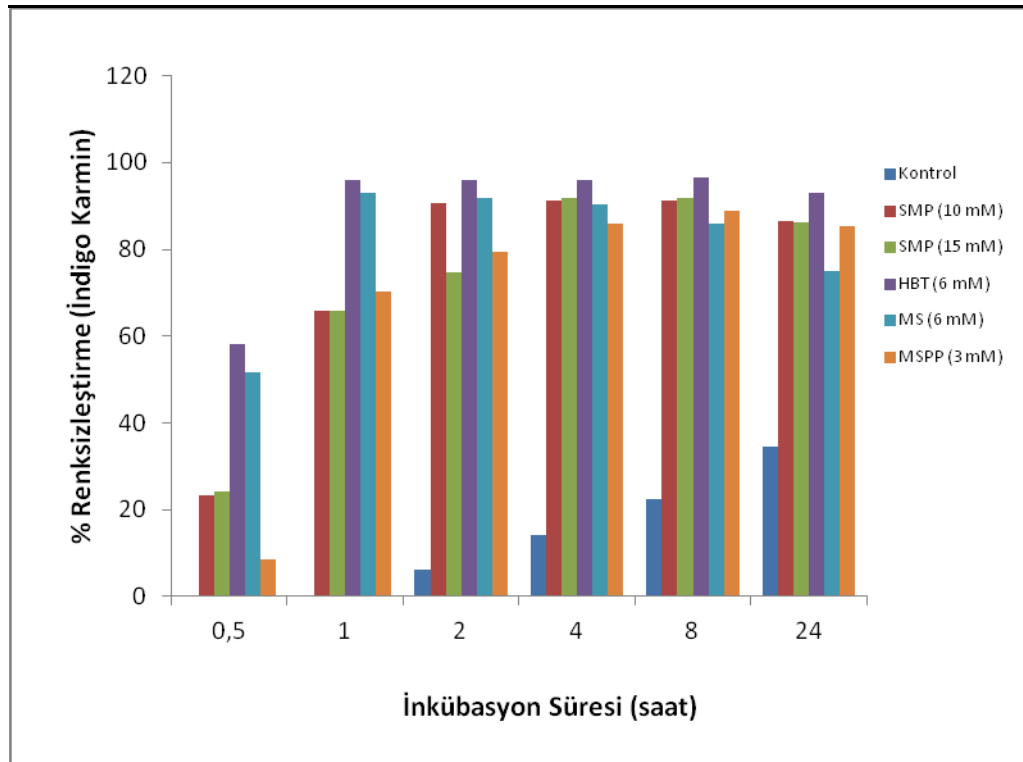
Mantar	Mediyatör	Derişim (Mm)	% Renksizleştirme (İndigo)					
			İnkübasyon Süresi (saat)					
			0,5	1	2	4	8	24
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Kontrol		-	-	-	-	0,29	-
	SMP	10	-	-	1,72	2,54	-	1,11
		15	-	1,31	0,12	-	6,44	12,38
	HBT	6	-	12,00	38,31	52,24	59,70	98,50
	MS	6	7,99	24,50	-	-	56,55	58,11
	MSPP	3	-	0,50	-	-	0,44	0,54



Şekil 4.26. *P.ostreatus* lakkazı ile lakkaz-mediyatör sistemlerinin indigo boya üzerine etkisi

Çizelge.4.12. Ticari lakkaz ile oluşturulan lakkaz-medyatör sistemlerinin indigo karmin boya üzerine etkisi

	Medyatör	Derişim (mM)	% Renksizleştirme (İndigo Karmin)					
			İnkübasyon Süresi (saat)					
			0,5	1	2	4	8	24
Ticari Lakkaz	Kontrol		-	0,34	6,17	14,10	22,51	34,58
	SMP	10	23,28	65,99	90,69	91,37	91,29	86,47
		15	24,14	65,96	74,74	91,89	91,82	86,21
	HBT	6	58,10	96,02	96,01	95,89	96,57	92,97
	MS	6	51,72	93,10	91,76	90,32	86,01	75,02
	MSPP	3	8,62	70,34	79,53	85,88	88,92	85,43

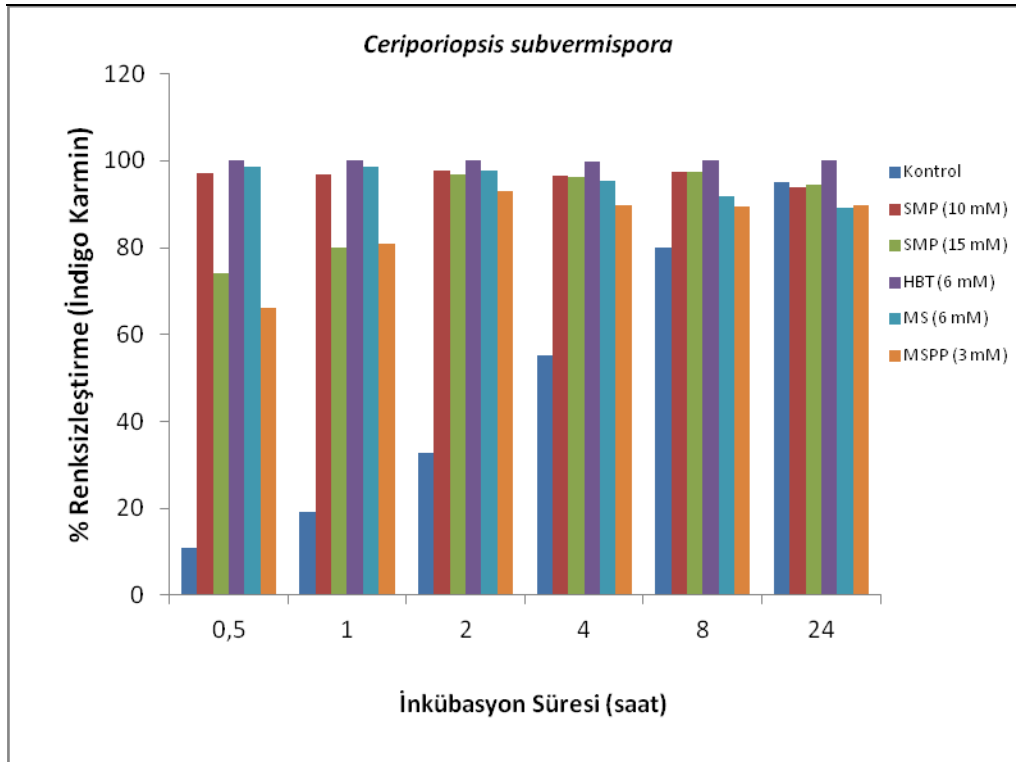


Şekil 4.27. Ticari lakkaz ile oluşturulan lakkaz-medyatör sistemlerinin indigo karmin boya üzerine etkisi

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

**Çizelge 4.13.** *C. subvermispora* ile oluşturulan lakkaz-medyatör sistemlerinin indigo karmin boya üzerine etkisi

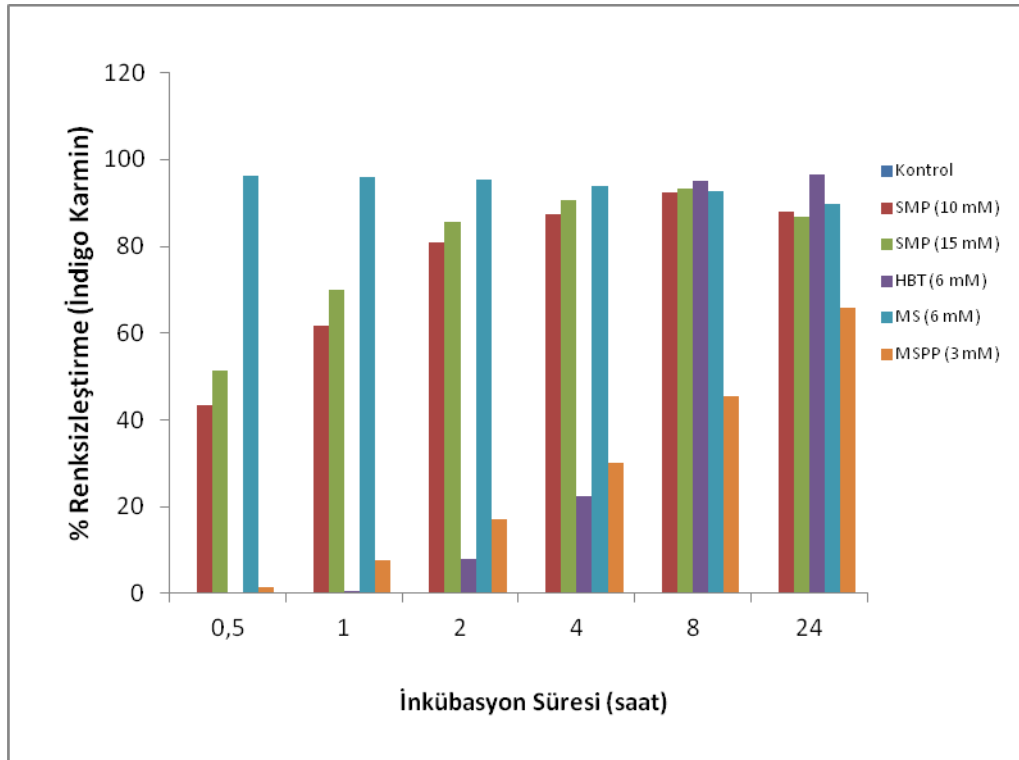
Mantar	Medyatör	Derişim (mM)	% Renksizleştirme (İndigo Karmin)					
			İnkübasyon Süresi (saat)					
			0,5	1	2	4	8	24
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	Kontrol		10,98	19,08	32,68	55,22	80,01	95,10
	SMP	10	97,02	97,00	97,81	96,48	97,53	93,95
		15	73,98	80,10	96,72	96,20	97,53	94,52
	HBT	6	100,81	101,09	101,09	99,73	100,82	101,73
	MS	6	98,64	98,64	97,81	95,39	91,78	89,05
	MSPP	3	66,09	80,92	93,16	89,70	89,59	89,62



**Şekil 4.28.** *C. subvermispora* ile oluşturulan lakkaz-medyatör sistemlerinin indigo karmin boya üzerine etkisi

Çizelge 4. 14. *P. ostreatus* ile oluşturulan lakkaz-medyatör sistemlerinin indigo karmin boya üzerine etkisi

Mantar	Medyatör	Derişim (mM)	% Renksizleştirme (İndigo Karmin)					
			İnkübasyon Süresi (saat)					
			0,5	1	2	4	8	24
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Kontrol		-	-	-	-	-	-
	SMP	10	43,45	61,79	80,86	87,53	92,33	87,89
		15	51,42	69,91	85,51	90,51	93,43	86,74
	HBT	6	-	0,49	8,04	22,45	95,07	96,54
	MS	6	96,20	95,91	95,35	93,77	92,60	89,62
	MSPP	3	1,33	7,63	17,17	30,06	45,44	65,75

Şekil 4.29. *P. ostreatus* ile oluşturulan lakkaz-medyatör sistemlerinin indigo karmin boya üzerine etkisi





## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Karbon-azot oranları tayin edilen kavun, karpuz kabukları ve çam kozalağı arasında kavun kabuğu ortalama C/N en düşük değer (C/N=25.74), kozalak için ise en yüksek değer (C/N=146.25) olarak bulunmuştur. Hem kontrolde hem de indükleyicilere bağlı kültürasyonlarda ölçülen protein miktarı ve lakkaz aktivitesi genellikle, katı destek materyal olarak kavun kabuğu kullanıldığında en yüksek, kozalak kullanıldığında ise genellikle en düşük değerler elde edilmiştir. Bu sonuçlar lakkaz üretiminde kullanılacak katı destek materyalin C/N'larının çok yüksek olmaması gerektirdiğini düşündürmektedir. Diğer yandan doğal materyallerdeki reçine asitlerinin fungus üremesini inhibe ettiği belirtilmiştir (Micales ve ark. 1991). Çam kozalağında reçine asitlerinin yüksek oranda bulunmasına karşın, kullanılan her üç destek materyal de KOH ile uzun süre (bir gece boyu) yıkandığı ve kuramsal olarak üç örneğinde reçine asitlerinden arındırılmış olduğu göz önüne alınırsa katı destek materyalin uygunluğunun, kimyasal kompozisyonuna bağlı C/N'dan kaynaklanmış olabileceği düşünülebilir. Özellikle lakkaz aktivitelerinin kavun kabuğuyla en yüksek değer olarak ölçülmüş olması, katı faz kültürasyonlarında lignoselülotik substratlar üzerinde hem lakkazlarla birlikte lakkaz aktivitesini artıran tanımlanmamış bir takım bileşiklerin de salgılandığı hem de lakkazların çoklu formda salgılandığının saptanmış olması (Leontievsky ve ark. 1999), kavun kabuğu kimyasal kompozisyonunun diğer destek materyallerle kıyaslandığında daha uygun olduğunu göstermektedir.

Test edilen indükleyiciler ve derişimleri arasında çok çarpıcı farklılıklar saptanmamıştır. En yüksek lakkaz aktivitesine 2,4- 2,5- ve 3,5-ksilidin ile ulaşılmıştır. 2,5-ksilidinin indükleyici olarak kullanıldığı çok sayıda çalışma vardır (Kollmann ve ark. 2005). Beyaz çürükçül mantar olan *P. cinnabarinus* SS3'ün indükleyici olarak 2,5-ksilidin kullanıldığında mantarın metabolik olarak bu bileşikten dokuz farklı türev sentezlediğini ve bunların içinde de (4E)-4-(2,5-dimetilfenilimino)-2,5 dimetil-siklohegza-2,5-dienon türevinin lakkaz salgılama üzerine indükleyici etkisinin en yüksek olduğunu yapmış oldukları araştırma ile iddia etmişlerdir. Ancak araştırmacıların önerdikleri yöntemle sentezlediğimiz bileşiğin 2 farklı fungus ve 3 farklı destek materyalin hiç birisinde kullanılan diğer indükleyicilerden daha olumlu bir etki göstermediği saptandı. Bu sonuç, kullanılan bu bileşiğin *P. cinnabarinus* SS3'ün lakkaz

geni üzerinde gösterdiği indükleyici etkisini *P. ostreatus* ve *C. subvermispora* lakkaz genleri üzerinde göstermemiş olabileceğini düşündürmektedir. 2,4- ve 3,5-ksilidinlerle, 2,5-ksilidinin indükleyici etkisine eşit ya da daha yüksek etki göstermeleri 2,4- ve 3,5-ksilidinlerle (4E)-4-(2,5-dimetilfenilimino)-2,5-siklohegzan-2,5-dienon sentezleneme - yeceği düşünülürse 2,4- ve 3,5-ksilidinlerin metabolitleri arasında idda edilen bileşik kadar ya da daha fazla indükleyici etkisine sahip bileşiklerin olabileceği kanısını uyandırmaktadır.

Kültivasyonla üretilen enzimlerin sephacryl S-100 kolonu hemen hemen aynı sürelerde geçmiş olması (*C. subvermispora* 35. - 68. mL arası, *P. ostreatus* 38. – 72. mL arası elüsyonlarda) molekül ağırlıklarının birbirine yakın olduğu düşüncesine yol açmıştır (Molekül ağırlıkları yaklaşık 60.000 ).

$K_M$  değerleri göz önüne alındığında kültürasyonla elde edilen iki enzim örneğinin de ticari olarak temin edilen lakkazdan daha yüksek aktiviteye sahip oldukları saptandı. Kendi örneklerimiz içinde de bir mikro mantar olan *C. subvermispora*'nın salgıladığı enzim diğeriyle kıyaslandığında gösterdiği aktivite dikkat çekmektedir. Bu mantarın salgıladığı protein miktarının diğeriyle kıyaslandığında düşük olması ancak enzim aktivitesinin yüksek olması dikkat çekici bulunmuştur. Yapılan gözlemlere dayanarak akademik çalışmalar dışındaki uygulamalar (tekstil, kağıt ve benzeri endüstriyel amaçlar) için amonyum sülfat çöktürmesiyle elde edilecek fraksiyonun daha fazla saflaştırma ya da zenginleştirme işlemine tabi tutulmadan kullanılabilceği düşünülmektedir.

Ticari olarak temin edilen lakkaz ile kültürasyonla elde ettiğimiz *P. ostreatus*'un salgıladığı lakkazın optimal pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 3,5 ve 30 °C iken *C. subvermispora*'nın optimal pH ve sıcaklık değerleri 2,5 ve 30 °C olarak bulunmuştur. Yapılan deneylerde iki lakkaz örneği için de pH 3 ve sıcaklık 30 °C olarak tercih edildi.

Araştırmamızın temel amaçlarından birini endüstride kullanılan indigo ve indigo karmin boyaların medyatör eşliğinde ürettiğimiz lakkaz tarafından renksizleştirilebilirliği oluşturmaktır. Enzimlerin tekstil endüstrisinde yaygın olarak kullanılan indigo boyaları renksizleştirme için katalitik etkinlik gösterebileceği redoks medyatörünün belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda indigo boya üzerine seçilen medyatörlerden 3-Metil-1-(4'-sulfoamidofenil)-5-pirazolon ve 1-(4- sulfofenil)-3-metil-

5-pirazolon'un literatürden 1-hidroksibenzotriazol (HBT) ve Novazymes Türkiye temsilciliği ile yapılan kişisel görüşmelerle temin edilen metilsiringeyt ile kıyaslandığında renksizleştirmede genellikle etkili olmadıkları ancak indigo karmin'in renksizleştirilmesinde 1-(4-Sulfofenil)-3-metil-5-pirazolon ve 3-Metil-1-(4'-sulfo amido fenil)-5-pirazolon'un en az metilsiringeyt ya da HBT kadar etkili oldukları gözlemlendi.

Sonuç olarak zenginleştirilen bu enzimlerin aynı medyatörlerin eşliğinde pH, sıcaklık, iyonik şiddet gibi parametreler değiştirilerek hem indigo hem de indigo karmin üzerindeki etkileri araştırılmalıdır.



## 6. KAYNAKLAR

- Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra, K., Cavaco, P., Guebitz, GM. 2000. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66( 8 ):3357–3362.
- Akan, E. 1993. Tıbbi Mikrobiyoloji . Saray Tıp Kitabevleri , 460-468, İstanbul
- Akhtar, M., Attridge, M.C., Myers, G.C., Kirk, T.K., Blanchette, R.A. 1992. Biomechanical pulping of loblolly pine with different strains of the white rot fungus *Ceripopiopsis subvermispota* TAPPI J, (75):105 109.
- Alcalde, M. 2007. Laccases: Biological functions, molecular structure and industrial applications, industrial enzymes structure, function and applications, J. Poliana, AP. MacCabe (Eds), Springer, Netherlands, 461-70.
- Aramayo, R., Timberlake, W. 1990. Sequence and molecular structure of the *Aspergillus nidulans* (laccase I) gene. *Nucleic Acids Res*,(18):3415-3415.
- Arda, M. 2000. Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayın Serisi no 46.
- Aretxaga, A. Romero, S. Sarra, M. and Vicent, T. 2001. Adsorption step in the biological degradation of a textile dye. *Biotechnol. Prog*, (17): 664-668.
- Aytar, P. 2007. Beyaz Çürükçül Funguslarla Linyit Kömüründen Kükür Giderimi İçin Optimum Koşulların Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir, 30.
- Baldrian, P. 2006. Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev*, 30(2): 215-242.
- Banci, L. 1997. Structural properties of peroxidases. *J. Biotechnol.*, (53): 253-263.
- Bar, M. 2001. Kinetics and physico-chemical properties of white-rot fungal laccases, University of Free State, Bloemfontein.,(12):116.
- Beilen, J., Li, Z. 2002. “Enzyme Technology: An Overview”. *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 338–344.
- Bertrand, T., Jolival, C., Briozzo, P., Caminade, E., Joly, N., Madzak, C., Mougín, C. 2002. Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylami

ne: insights into substrate recognition and correlation with kinetics. *Biochemistry*, (41):7325-7333.

Bourbonnais, R., Leech, D., Paice, M.G. 1998. Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin. *Biochim Biophys Acta*, (1379) :381–390.

Bourbonnais, R., Paice, M.G. 1990. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett* , (267): 99-102.

Bourbonnais, R., Paice, M.G., Freiermuth, B., Bodie, E., Borneman, S. 1997. Reactivities of various mediator and laccase with kraft pulp and lignin model compounds. *Appl. Environ. Microbiol*, (63): 4627-4632.

Bourbonnais, R., Rocheford, D., Paice, M., Renaud, S., Leech, D. 2000. Transition metal complexes : A new class of laccase mediators for pulp bleaching, *TAPPI J*, (80) : 68-79.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*,( 72 ): 248 – 254.

Cabrita, J.F., Abrantes, L.M., Viana, A.S. 2005. N-Hydroxysuccinimide-terminated self-assembled monolayers on gold for biomolecules immobilisation. *Electrochim. Acta*, ( 50 ): 2117–2124.

Calabrese, B.S. Pickard, M., Vazquez-Duhalt, R., Heler, A. 2002. Electro reduction of O<sub>2</sub> to water at 0.6 V (SHE) at pH 7 on the ‘wired’ *Pleurotus ostreatus* laccase cathode”, *Biosensors and Bioelectronics.*, (17 ):1071–1074.

Call, H., Mucke, L. 1997. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems *J. Biotechnol.*, (53): 163-202.

Camarero, S., Garcia, O., Vidal, T., Colom, J., del Rio, J.C., Gutierrez, A. 2004. Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system *Enzyme Microb. Technol.*, (35):113–120.

Camarero, S., Ana, C., Poula, N., Eric, R., Anne, L., Jesus, M.M., Angel, M. 2008. P-hydroxycinnamic acids as natural mediators for laccase oxidation of recalcitrant compounds. *Environmental Science and technology* ,42 (17): 6703-9.

Camerero, S., David, I., Jesus, M.M., Angel, M. 2005. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Applied and environmental microbiology*, 71(4) : 1775-84.

Campos, R., Kandelbauer, A., Robra, K.H., Cavaco-Paulo, A., Gubitz, G.M. 2001. Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii*. *J.Biotechnol*, (89) : 131–139.

Cantarelli, C., Brenna, O., Giovanelli, G., Rossi, M.1989. Beverage stabilization through enzymatic removal of phenolics, *Food Biotechnol*, (3): 203-213.

Carter, D.N., McKenzie, D.G., Johnson, A.P., Idner, K. 1997. Performance parameters of oxygen delignification. *Tappi* ,( 80):111–117.

Cassland, P., Jönsson, L.J., 1999. Characterization of a gene encoding *Trametes versicolor* laccase A and improved heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* by decreased cultivation temperature. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, (52):393-400.

Cavalier-Smith, T. 1986. The origin of fungi and pseudofungi. *In*: Rayner ADM, Brasier CM, Moore D, eds. *Evolutionary Biology of the Fungi*. Symposium of the British Mycological Society held at the University of Bristol. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 339-353

Chagas, E.P., Durrant, L.R. 2001. Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorcaju*. *Enzyme Microb Technol*, (29):473– 7.

Chefetz, B., Chen, Y., Hadar, Y. 1998. Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. *Appl. Environ. Microbiol*,( 64):3175-3179.

Cole, J.L., Tan, G.O., Yang, E.K., Hodgson, K.O., Solomon, E.I. 1990. Reactivity of the laccase trinuclear copper active site with dioxygen: an x-ray absorption edge study. *J. Am. Chem. Soc*,( 112):2243-2249.

Collins, P.J., Dobson, A.D.W. 1997. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol*, (63):3444-3450.

Couto, S.R., Guandin, M., Lorenzo, M., Sanroman, M.A. 2002. Screening of supports and inducers for laccase production by *Trametes versicolor* in semi-solid-state conditions. *Process biochemistry*,(38): 249-255.

Cripps, C., Bumpus, J.A., Aust, S.D. 1990. Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, (56): 1114-1118.

Çalgeriş, İ., 2010. Fındık Kabuğundan Lignin İzolasyonu ve Lignin / Nişasta Biyoçözünür Polimerlerin Elde Edilmesi . Yüksek lisans tezi. Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 9-10.

D'acunzo, F., C, Galli., B, Masci. 2002. Oxidation of phenols by laccase and laccase-mediator systems. Solubility and steric issues. *Eur. J. Biochem. Febs*, (269): 5330–5335.

D'acunzo, F., Gali, C. 2003. First evidence of catalytic mediation by phenolic compounds in the laccase-induced oxidation of lignin models. *Eur. J. Biochem.* , (270): 3634-3640.

De Jong, E., De Vries, F., Field, J., Van Der Zwan, R ., De Bont, J. 1992. Isolation and screening of basidiomycetes with high peroxidative activity *Mycol. Res*, (96): 1098-1104.

De Jong, E., Field, J.A., and de Bont, J.A.M. 1994. Aryl alcohols in the physiology of ligninolytic fungi. *FEMS Microbiol. Rev.*, (13):153-188.

Demir, G., Özcan, H.K., Elmaslar, E., Borat, M. 2004. Decolorization of azo dyes by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* *Fresenius Environmental Bulletin*, 13 (10): 979-984.

Dizge, M. 2007. *Trametes versicolor* beyaz çürükçül fungusundan lakkaz enziminin saflaştırılması ve kısmi nitelendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze, 4.

Duran, N., Esposito, E. 2000. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review *Appl Catal B Environ*, ( 28):83–99.



Eggert, C., LaFayette, P.R., Temp, U., Eriksson, K.E.L., Dean, J.F.D. 1998. Molecular analysis of a laccase gene from the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, ( 64):1766-1772.

Eggert, C., Temp, U., Eriksson, K.E.L. 1996. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl. Environ. Microbiol.*, ( 62):1151-1158.

Enguita, F.J., Martins, L.O., Henrique, A.O., Carrondo, M.A. 2003. Crystal structure of a bacterial endospore coat component: a laccase with enhanced thermostability properties *J. Biol. Chem.*, 278 (21): 19416–19425.

Erikson, K., Blanchette, R.A., Ander, P. 1990. Biodegradation of Lignin. In: Timell TE (ed), *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*, Springer-Verlag, New York, 225-399.

Erkurt, E.A., Ünyayar, A., Kumbur, H. 2007. Decolorization of synthetic dyes by white rot fungi, involving laccase enzyme in the process. *Process Biochemistry*,( 42): 1429-1435.

Fabbrini, M., Gali, C., Gentili, P. 2002. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. *J Mol Catal B Enzym*, (16) : 231–240.

Ferapontova, E.E., Castillo, J., Gorton, L. 2006. Bioelectrocatalytic properties of lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in reactions with phenols, catechols and lignin-model compounds. *Biochimica et Biophysica Acta*, (1760): 1343–1354.

Ferry, Y., Leech, D. 2005. Amperometric detection of catecholamine neurotransmitters using electrocatalytic laccase electrode *Electroanalysis*, (17): 2113–2119.

Forootanfar, H., Faramarzi, M.A., Shahverdi, A.R., Yazdi, M.T. 2011. Purification and biochemical characterization of extracellular laccase from the ascomycete *Paraconiothyrium variabile*. *Bioresource Technology*, 102(2) :1808-1814.

Galhaup, C., Goller, S., Peterbauer, C.K., Strauss, J., Haltrich, D. 2002. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiology*, ( 148):2159-2169.

Garzillo, A.M., Colao, M.C., Buonocore, V., Oliva, R., Falcigno, L., Saviano, M., Santoro, A.M., Zappala, R., Bonomo, R.P., Bianco, C., Giardina, P., Palmieri, G., Sanna, G. 2001. Structural and kinetic characterization of native laccases from *Pleurotus ostreatus*, *Rigidoporus lignosus*, and *Trametes trogii*. *J. Protein Chem*, (20):191-201.

Garzillo, A.M., Colao, M.C., Caruso, C., Caporale, C., Celletti, D., Buonocore, V. 1998. Laccase from the white-rot fungus *Trametes trogii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, (49):545-551.

Germann, U.A., Müller, G., Hunziker, P.E., Lerch, K. 1988. Characterization of two allelic forms of *Neurospora crassa* laccase. Amino- and carboxyl-terminal processing of a precursor. *J. Biol. Chem.*, (263):885-896.

Gianfreda, L., Xu, F., Bollag, J.M. 1999. Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation J*, (3): 1-25.

Gnanomani, A., Jayaprakashvel, M., Arulmani, M., Sadulla, S. 2006. Effect of inducers and culturing processes on laccase synthesis in *Phanerochaete chrysosporium* NCIM 1197 and the constitutive expression of laccase isozymes. *Enzyme and microbial Technology*, (38): 1017-1021.

Guarro, J., Gene, J., Stchigel, AM. 1999. Developments in fungal taxonomy. *Clin Microbiol Rev*, (12): 454.

Gutiérrez, A., Martínez, AT. 1996. Biodegradación de la lignina: Una perspectiva actual *Rev.Iberoam. Micol*, (13):18-23.

Haghighi, B., Gorton, L., Ruzgas, T., Jönsson, L.J. 2003. Characterization of graphite electrodes modified with use for bioelectrochemical monitoring of phenolic compounds in flow injection analysis *Anal. Chim. Acta.*, (487):3-14.

Hasenekoğlu D., Yesilyurt S. 2001. *Mikrobiyoloji*, Erzurum.

Hatakka, A. 1994. "Lignin-Modifying Enzymes from Selected White- Rot Fungi: Production and Role in Lignin Degradation" *Fems Microbiol Rev*, (13): 125– 35.

Heinfling, A., Martinez, M.C., Martinez, A.T. 1998. Transformation of industrial dyes by manganese peroxydase from *Bijercandera adusta* and *Pleurotua eryngii* in a manganese-independent reaction. *Appl. Environ. Microbiol*, (64): 2788-2793.

Hoegger, P.J., Navarro-Gonzalez, M., Kilaru, S., Hoffmann, M., Westbrook, E.D., Kues, U. 2004. The laccase gene family in *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*). *Curr. Genet*, (45):9-18.

Hoffmann, P., Esser, K. 1997. The phenol oxidases of the ascomycete *Podospora anserina*. *Arch. Microbiol*, (112):111-114.

(<http://bionerds.freeservers.com/catalog.html> 20.05.2011).

(<http://www.ili-lignin.com/aboutlignin.php> 20.03.2011).

(<http://www.jgi.doe.gov/sequencing/why/csubvermispورا.html> 15.06.2011

(<http://crperiod5.edublogs.org> 9.04.2011 )

(<http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>15.02.2011)

([http://www.mykoweb.com/CAF/species/Pleurotus\\_ostreatus.html](http://www.mykoweb.com/CAF/species/Pleurotus_ostreatus.html)

Hu, M.R., Chao, Y.P., Zhang, G.Q., Xue, Z.Q., Qian, S. 2009. Laccase-mediator system in the decolorization of different types of recalcitrant. *Microbiol biotechnol*, (36): 45-51.

Inoue, T., Gotowda, M., Sugawara, H., Kohzuma, T., Yoshizaki, F., Sugimura, Y., Kai, Y. 1999. Structure comparison between oxidized and reduced plastocyanin from a fern, *Dryopteris crassirhizoma*. *Biochemistry*, (38):13853.13861.

Johannes, C., Majcherczyk, A. 2000. Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Appl. Environ. Microbiol*, ( 66): 524-528.

Jung, H., Xu, F., Li, K. 2002. Purification and characterization of laccase from wood-degrading fungus *Trichophyton rubrum* LKY-7. *Enz. Microb. Technol*, (30):161-168.

Kerem, Z., Friesem, D., Hadar, Y. 1992. Lignocellulose degradation during solid-state fermentation: *Pleurotus ostreatus* Versus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Enviromental Microbiology*, 58 (4): 1121-1127.

Kersten, P., Kalyanaraman, B., Hamel, K.E., Reinhammar, B., Kirk, T.K. 1990. Comparison of lignin peroxidase, horseradish-peroxidase and laccase in the oxidation of methoxybenzenes. *Biochem. J.*, (268) : 475–480.

Kersten, P., Tien, M., Kalyanaraman, B., Kirk, T. 1985. The ligninase from *Phanerochaete chrysosporium* generates cation radicals from methoxybenzenes. *J. Biol. Chem.*, (260): 2609 –2612.

Khammuang, S., Sarnthimo, R. 2007. Laccase from spent mushroom compost of *Lentinus polychrous* Lev. and its potential for remazol brilliant blue decolourisation, *Biotechnology*, 3(6):408-413.

Kirk, K., Cullen, K. 1998. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry. John Wiley And Sons, Inc. New York. 273-307.

Kirk, T., Farrell, R. 1987. Enzymatic “combustion” the microbial degradation of lignin. *Annu Rev Microbiol*, (41): 465–505.

Ko, E.M., Leem, Y.E., Choi, H.T. 2001. Purification and characterization of laccase isozymes from the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, (57) : 98-102.

Kojima, Y., Kita, Y., Tsukuda, Y. (1990) DNA for expression and secretion. *Eur. Pat. Appl.* EP0388166.

Kuhad, R.C., Singh, A., Eriksson, K. 1997. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell wall *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, (57): 47–125.

Kulys, J., Vidziunaite, R. 2003. Amperometric biosensors based on recombinant laccases for phenols determination. *Biosens Bioelectron.*, (18): 319–325.

Kumar, S.V.S., Phale, P.S., Durani, S., Wangikar, P.P. 2003. Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnol. Bioeng.*, (83) : 386–394.

Kuwahara, M., Glenn, J., Morgan, M., Gold, M. 1984. Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Febs Lett*, (169): 247–250.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, (227) : 680-685.

Lamar, R.T., Glaser, J.A., Kirk, T.K. 1992. White rot fungi in the treatment of hazardous chemicals and wastes, in: *Frontiers of Industrial Mycology*, 127-143,

Lee, S.K., George, S.D., Antholine, W.E., Hedman, B., Hodgson, K.O., Solomon, E.I. 2002. Nature of the intermediate formed in the reduction of O<sub>2</sub> to H<sub>2</sub>O at the trinuclear copper cluster active site in native laccase. *J. Am. Chem. Soc.*, (124):6180-6193.

Leonowicz, A., Trojanowski, J., Barbara, O. 1979. *Basidiomycetes*: apparent activity of the inducible and constitutive forms of laccase with phenolic substrates *Acta Biochim. Pol.*, ( 25): 369–378.

Leonowicz, A., Szklarz, G., Wojtas-Wasilewska, M. 1985. The effect of fungal laccase on fractionated lignosylphonates (Peritan Na) *Phytochemistry*, (24): 393–396.

Leontievsky, AA., Myasoedova, N.M., Baskunov, B.P., Pozdnyakova, N.N., Vares, T., Kalkkinen, N., Hatakka, A.I., Golovleva, L.A. 1999. Reactions of blue and yellow fungal laccases with lignin model compounds. *Biochemistry (Mosc)*, 64(10) : 1150-1156.

Li, K., Xu, F., Eriksson, K.E.L. 1999. Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. *Appl Environ Microbiol*, (65):2654–2660.

Lisdat, F., Wollenberger, U., Makower, A., Hortnagl, H., Pfeiffer, D., Scheller, F.W.1997. Catecholamine detection using enzymatic amplification *Biosens Bioelectron*, (12): 1199–1211.

Litvintseva, A.P., Henson, J.M. 2002. Cloning, characterization, and transcription of three laccase genes from *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, the take-all fungus. *Appl. Environ. Microbiol.*, ( 68):1305-1311.

Liu, L., Lin, Z., Zheng, T., Lin, L., Zheng, C., Wang, S. 2009. Fermentation optimization and characterization of the laccase from *Pleurotus Ostreatus* strain 10969. *Enzyme and Microbial Technology*, (44): 426-433.

Martele, Y., Callewaerta, K., Naessens, K., Van Daeleb, P., Baetsb, R., Schacht, E. 2003. Controlled patterning of biomolecules on solid surfaces *Mater. Sci. Eng. C Biomim. Mater Sens Syst*, ( 23): 341–345.

Martins, L.O., Soares, C.M., Pereira, M.M., Teixeira, M., Costa, T., Jones, G.H., Henriques, A.O. 2002. Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *J. Biol. Chem.*, (277):18849-18859.

Maximo, C., Amorim, M.T.P., Costa-Ferreira, M. 2003. Biotransformation of industrial reactive azo dyes by *Geotrichum* sp. CCMI 1019 *Enzyme and Microbial Technology*, (32): 145–151.

Mayer, A.M., Staples, R.C. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme *Phytochemistry*, (60): 551–565.

Medeiros, M.B., Bento, A.V., Nunes, A.L.L., Oliveira, S.C. 1999. Optimization of some variables that affect the synthesis of laccase by *Pleurotus osreatus*. *Bioprocess Engineering*, (21): 483-487.

Messerschmidt, A. 1997. Copper metalloenzymes. In: *Comprehensive biological catalysis*. Academic Press Limited, (3):401-426.

Mester, T., Pena, M., Field, J. 1996. Nutrient regulation of extracellular peroxidases in the white rot fungus, *Bjerkandera* sp. strain bos55. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, (44): 778-784.

Michael, J., Carlile, Sarah, C. Watkinson, Graham W.Gooday. 2001. *The Fungi*. Academic Press 2. baskı, 588, San Diego (calif.).

Micales, J.A. Han, J.S. Davis, J.L. Young, R.A.1991. Chemical Composition and Fungitoxic Activities of Pine Cone Extractives. *Biodeterioration research 4: Mycotoxins, wood decay, plant stress, biocorrosion, and general biodeterioration: Proceedings of 4th meeting of the Pan American Biodeterioration Society; 1991 August 20–25; as an electronic symposium*. New York: Plenum Press: 317-332.

Morozova, O.V., Shumakovich, G.P., Shleev, S.V., Yaropolov, Y.I. 2007. Laccase mediator systems and their applications Applied Biochemistry and Microbiology, JP (Appl. no. JR2003128835, 2003.), 43(5):523-35.

Munirathinam, S., Katsuyukki, I., Michael, H., Gold-Thomas, L., Poulosn. 1994. The crystal structure of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.06-Å resolution. The Journal of Biological Chemistry, (269): 32759-32767.

Murphy, M.E.P., Lindley, P.F., Adman, E.T. 1997. Structural comparison of cupredoxin domains: Domain recycling to construct proteins with novel functions. Protein Sci, (6):761-770.

Murray, patric R .1990. Medical Microbiology. St. Louis: mosbay, 616.

Neifar, M., Jaouani, A., Ellouze-Ghorbel, R., Ellouze-Chaabouni, S. 2010. Purification, characterization and decolourization ability of fomes fomentarius laccase produced in solid medium. Journal of molecular catalysis, 64 (1-2): 66-74.

Niku-Paavola, K.E., Salola, P., Raunio, V. 1988. Lignolytic enzymes of the white rot fungus *Phlebia radiata* J. Biochem., (254):877–884.

Nishizawa, Y., Nakabayashi, K., Shinagawa, E. 1995. Purification and characterization of laccase from white rot fungus *Trametes sanguinea* M85-2. J. Ferment. Bioeng, (80):91-93.

Norris, G.E., Anderson, B.F., Baker, E.N. 1983. Structure of azurin from *Alcaligenes denitrificans* at 2.5 Å resolution. J. Mol. Biol, (165):501-521.

Otterbein, L., Record, E., Chereau, D., Herpoel, I., Asther, M., Moukha, S.M. 2000. Isolation of a new laccase isoform from the white-rot fungi *Pycnoporus cinnabarinus* strain ss3 , Canadian J. Microbiol, 46(8) : 759-63.

Özbal, Y. 2011. Tibbi mikrobiyolojiye giriş ve mikroorganizmaların canlılar alemindeki yeri. <http://cariebookgratis.com/tibbi-mikrobiyolojiye-giris-ve-mikroorganizmalarin-canlilar>, 22.03.2011.

Palaez, F., Martinez, M., Martinez, A. 1995. Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation, Mycol. Res, (99): 37-42.

Palmer, A.E., Randall, D.W., Xu, F., Solomon, E.I. 1999. Spectroscopic studies and electronic structure description of the high potential type 1 copper site in fungal laccase: insight into the effect of the axial ligand. *J. Am. Chem. Soc.*, (121):7138-7149.

Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Scaloni, A., Capasso, A., Sanna, G. 1997. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 272 (50): 31301-31307.

Palmieri, G., Cennamo, G., Faraco, V., Amoresano, A., Sanna, G., Giardina, P. 2003. A typical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enz. Microb. Technol.*, (33):220-230.

Palmieri, G., Giardina, P., Marzullo, L., Desiderio, B., Nitti, G., Cannio, R., Sanna, G. 1993. Stability and activity of a phenol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, (39):632-636.

Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B., Sanna, G. 2000. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.*,(66): 920-924.

Palonen, H. 2004. Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Journal of Biotechnology*,107(1):65-72.

Palonen, H., Saloheimo, M., Viikari, L., Kruus, K. 2003. Purification, characterization and sequence analysis of a laccase from the ascomycete *Mauginiella* sp. *Enz. Microb. Technol.*, (33):854-862.

Parshetti, G.K., Kalme, S.D., Gomare, S.S., Govindwar, S.P. 2007. Biodegradation of Reactive blue-25 by *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146 *Bioresource Technology*, (98): 3638–3642.

Pasczynski, A., Pasti, M.B., Goszcynski, S., Crawford, D.L. 1991. New approach to improve degradation of recalcitrant azo dyes by *Streptomyces spa* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microb. Technol.*, (13): 378-384.

Pazarlıoğlu, N.K., Sarıışık, M., Telefoncu, A. 2005. Laccase: production by *Trametes versicolor* and application to denim washing. *Process Biochemistry*, (40):1673–1678.



Pazarlıoğlu, N.K., Ürek, R.Ö. 2004. Purification and partial characterization of manganese peroxidase from immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. *Process Biochemistry*, (39): 2061-2068.

Piontek, K., Antorini, M., Choinowski, T. 2002. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *J. Biol. Chem*, (277):37663-37669.

Pointing, S.B. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi *Appl Microbiol Biotechnol*, (57):20–33.

Pozdnyakova, N.N., Turkovskaya, O.V., Yudina, EN., Rodakiewicz-Nowak, Y. 2006. Yellow laccase from the fungus *Pleurotus ostreatus* D1: Purification and characterization. *Appl. Biochem. Microbiol*, (42): 56-61.

Qui, Y., Park, K. 2001. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery, *Adv. Drug Deliver.Rev*, (53): 321-339.

Ranocha, P., McDougall, G., Hawkins, S., Sterjiades, R., Borderies, G., Stewart, D., Cabanes-Macheteau, M., Boudet, A.M., Goffner, D. 1999. Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases-a divergent gene family in poplar *Eur. J. Biochem*, (259): 485–495.

Renganathan, V., Gold, M.H., 1994. Purification of a 1,2,4-Trihydroxybenzene 1,2-Dioxygenase from the Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bact.*, (176): 4838-4844.

Riva, S. 2006. Laccases: blue enzyme for green chemistry. *Trends Biotechnol*, (24):219-226.

Rowe, H.D. 1999. Biotechnology in the textile/clothing industry – a review. *J. Consumer.Studies&H* Qui, Y., Park, K.,”Environment-sensitive hydrogels for drug delivery”, *Adv. Drug Deliver.Rev*, (53): 321-339.

Roy, J.J., Abraham, T.E., Abhijith, K.S., Sujith, K.P.V., Thakur, M.S. 2005. Biosensor for the determination of phenols based on cross-linked enzyme crystals (CLEC) of laccase. *Biosens Bioelectron*, ( 21): 206–211.

Rychnovsky, S.D. 1999. AM1-SM2 Calculations model the redox potential of nitroxyl radicals such as TEMPO. *J. Org. Chem*, (64) : 6745–6749

Saloheimo, M., Niku-Paavola, M.L., Knowles, J.K. 1991. Isolation and structural analysis of the laccase gene from the lignin-degrading fungus *Phlebia radiata*. *J. Gen. Microbiol*, (137):1537-1544.

Sanjust, E., Pompei, R., Rescigno, A., Rinaldi, A., Ballero, M. 1991. Olive milling wastewater as a medium for growth of four *Pleurotus* species. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, (31): 223- 234.

Saparrat, M., Balatti, P.A., Martinez, M.J., Jurado, M. 2010. Differential regulation of laccase gene expression in *Corioloropsis rigida* LPSC no.232. *British mycological society promoting fungal science*, (114): 999-1006.

Scheel, T., Höfer, M., Ludwig, S., Hölker, U. 2000. Differential expression of manganese peroxidase and laccase in white-rot fungi in the presence of manganese or aromatic compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, (54):686-691.

Schliephake, K., Lonergan, G.T., Jones, C.L. 1993. Decolorization of a pigment plant effluent by *Pycnoporus cinnabarinus* in packed-bed bioreactor. *Biotechnol. Lett*, (15): 1185-1188.

Schneider, P., Caspersen, M.B., Mondorf, K., Halkier, T., Skov, L.K., Østergaard, P.R., Brown, K.M., Brown, S.H., Xu, F. 1999. Characterization of a *Coprinus cinereus* laccase. *Enz. Microb. Technol*, (25):502-508.

Schoemaker, H., Leisola, M.1990. Degradation of lignin by *Phanerochaete chrysosporium*. *J Biotechnol.*,(13): 101– 109.

Scklarz, G., Antibus, R., Sinsabaugh, R., Linkins, A. 1989. Production of phenol oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. *Mycologia*, (81) : 234-240.

Sheldon, R.A., Arends, I.W.C.E. 2004. Organocatalytic oxidations mediated by nitroxyl radicals. *Adv. Synth. Catal*, (346) : 1051–1071.

Shin, W., Sundaram, U.M., Cole, J.L., Zhang, H.H., Hedman, B., Hodgson, K.O., and Solomon, E.I., 1996. Chemical and spectroscopic definition of the

peroxidelevel intermediate in the multicopper oxidases: Relevance to the catalytic mechanism of dioxygen reduction to water. *J. Am. Chem. Soc.*, (118):3202-3215.

Shin, K.S., Lee, Y.J. 2000. Purification and characterization of a new member of the laccase family from the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, (1): 109-115.

Soares, M.B.G., Amorim, M.T.P., Costa-Ferreira, M. 2001. Use of laccase together with redox mediators to decolourize remezol brilliant blue R. *Journal of biotechnology*, (89):123-129.

Soden, D.M., Dobson, A.D.W. 2001. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. *Microbiology*, (147):1755-1763.

Solis-Oba, M., Almendariz, J., Vinigera-Gonzalez, G. 2008. Biotechnological treatment for colorless denim and textil waste water treatment with laccase and ABTS. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 24(1): 5-11.

Solís-Oba, M., Ugalde-Saldívar, VM., González, I., Viniegra-González, G. 2005. An electrochemical-spectrophotometrical study of the oxidized forms of the mediator 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) produced by immobilized laccase. *J. Electroanal.Chem*, (579) : 59-66.

Solomon, E.I., Sundaram, U.M., Machonkin, T.E. 1996. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev*, (96):2563-2606.

Suzuki, T., Endo, K., Ito, M., Tsujibo, H., Miyamoto, K., Inamori, Y. 2003. A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: purification, characterization, nucleotide sequence, and expression. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (67):2167-2175.

Swamy, C., Ramsay, J.A.1999. The evaluation of white-rot fungi in the decoloration of textile dyes. *Enzyme Microb. Technol*, (24):130-137.

Thurston, C. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, (140):19-26.

Tychanowicz, G.K., Zilly, A., Souza, C.G.M., Peralta, R.M. 2004. Decolourisation of industrial dyes by solid-state cultures of *Pleurotus Pulmonarius*. Process Biochemistry, (39): 855-859.

Valderrama, B., Oliver, P., Medrano-Soto, A., Vazquez-Duhalt, R. 2003. Evolutionary and structural diversity of fungal laccases. Ant. v. Leeuwenh. (84):289-299.

VanEtten, H., Matthews, D., Matthews, P. 1989. Phytoalexin detoxification: importance for pathogenicity and practical implications Annu. Rev. Phytopathol, ( 27): 143–164.

Wahleithner, J.A., Xu, F., Brown, K.M., Brown, S.H., Golightly, E.J., Halkier, T., Kauppinen, S., Pederson, A., Schneider, P. 1996. The identification and characterization of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. Curr. Genet, (29):395-403.

Waldner, R., Leisola, M., Fiechter, A. 1988. Comparison of ligninolytic activities of selected white-rot fungi Appl. Microbiol. Biotechnol, (29): 400- 407.

Welinder, K.G. and Gajhede, M., 1993. In Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology. 35-42, Universe Of Geneva.

Wesenberg, D., Buchon, F., Agathos, S.N. 2002. Degradation of dye containing textile effluent by agaric white - rot fungus *Clitocybula dussenii*. Biotechnology Letters, (24): 989-993.

Willmann, G., Fakoussa, Rm. 1997. Biological bleaching of water- soluble coal macromolecules by a *Basidiomycete* strain Appl Microbiol Biotechnol, (47): 95–101.

Wood, D.A.1980. Production, purification and properties of extracellular laccase of *Agaricus bisporus* J. Gen. Microbiol, (117): 327–338.

Xu, F.1996. Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. Biochemistry, (35):7608-7614.

Xu, F. 1997. Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. J. Biol. Chem, 272 (2):924-928.

Xu, F., Kulys, J.J., Duke, K., Li, K., Krikstopaitis, K., Deussen, H.J., Abbate, E., Galinyte, V., Schneider, P. 2000. Redox chemistry in laccase-catalyzed oxidation of N-hydroxy compounds. *Appl. Environ. Microbiol.*, (66):2052-2056.

Xu, F., Deussen, H.J., Lopez, B., Lam, L., Li, K. 2001. Enzymatic and electrochemical oxidation of N-hydroxy compounds. Redox potential, electrontransfer kinetics, and radical stability. *Eur. J. Biochem.*, (268):4169-4176.

Xu, F., Palmer, A.E., Yaver, D.S., Berka, R.M., Gambetta, G.A., Brown, S.H., Solomon, E.I. 1999. Targeted mutations in a *Trametes villosa* laccase. Axial perturbations of the T1 copper. *J. Biol. Chem.*, (274):12372-12375.

Xu, F., Shin, W., Brown, S., Wahleithner, J.A., Sundaram, U.M., Solomon, E.I. 1996. A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. *Biochim. Biophys. Acta.*, (1292): 303-311.

Yaver, D.S., Golightly, E.J. 1996. Cloning and characterization of three laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*: genomic organization of the laccase gene family *Gene*, (181):95-102.

Yaver, D.S., Xu, F., Golightly, E.J., Brown, K.M., Brown, S.H., Rey, M.W., Schneider, P., Halkier, T., Mondorf, K., Dalbøge, H. 1996. Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Appl. Environ. Microbiol.*, (62):834-841.

Yoshitake, A., Katayama, Y., Nakamura, M., Iimura, Y., Kawai, S., Morohoshi, N. 1993. N-linked carbohydrate chains protect laccase III from proteolysis in *Coriolus versicolor* *Journal of General Microbiology*, (139) : 179-185.

Zille, A., Munteanu, F.D., Gübitz, G.M., Cavaco-Paulo, A. 2005. Laccase kinetics of degradation and coupling reactions. *Journal of Molecular Catalysis*, 33(1-2):23-28.



## EKLER

### EK-1 Poliakrilamit Jel Elektrofrez (PAGE ) İçin Kullanılan özeltiler

#### PAGE Alt Jel (Ayrırma jeli) : (%12)

5.2 mL	1,5 M Tris HCl pH:8,8
8.0 mL	Akrilamit/bisakrilamit (30:0,8)
200 µL	% 10 SDS
200 µL	% 10 Amonyumpersülfat
8 µL	6,56 M TEMED
6.6 mL	d H <sub>2</sub> O

#### PAGE Üst Jel (Yığınlama Jeli) :(%5)

1.0 mL	1 M Tris HCl pH:6,8
1.3 mL	Akrilamit/bisakrilamit (30:0,8)
80 µL	% 10 Sodyumdodesilsülfat
80 µL	% 10 Amonyumpersülfat
8 µL	6,56 M TEMED
5.5 mL	d H <sub>2</sub> O

#### PAGE Yürütme Tamponu

Tris bazı	3 g
Glisin	15 g
SDS	1 g d H <sub>2</sub> O ile 1000 mL'ye tamamlanır.

#### PAGE Yükleme Tamponu (2x):

1.2 mL	1 M Tris HCl pH:6,8
1,9 mL	% 99 Gliserin
1.0 mL	% 10 Sodyumdodesilsülfat
0,5 ml	14 M MET
0,2 mL	% 0,1 Bromfenol mavisi
10.4 mL	d H <sub>2</sub> O

Örneklerle 1:4 oranında seyreltilip, 2 dakika kaynatıldıktan sonra jele yükleme yapılır.

“Coomassie” Parlak Mavisi ile Gel Boyama Çözeltisi

% 0,2 “Coomassie” parlak mavisi

% 50 Metanol

% 10 Asetik asit

% 40 Su

Jelden Boya Çıkarma Çözeltisi

% 15 Metil alkol

% 10 Asetik asit

% 75 Su



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

**Adı Soyadı** : Gülşen KAYA  
**Doğum Tarihi** : 15.1.1985  
**Doğum Yeri** : DİYARBAKIR  
**Medeni Hali** : Bekar

### Eğitim ve Akademik Kariyer

İlkokul öğrenimimi Hüseyin Uluğ İlköğretim okulunda, Lise Eğitimimi ise Birlik Lisesinde tamamladım.

### Eylül 2005–Temmuz 2009

D.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümünden mezun oldum.

### Eylül 2009–Haziran 2011

Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalında “*Pleurotus ostreatus* ve *Ceriporiopsis subvermisporo* CZ-3 Lakkazlarının; İndükleyiciye Bağlı Verimli Salgılanma Koşullarının ve İndigo Boyalar Üzerindeki Etkilerinin İyileştirilmesinde Uygun Medyatörün Araştırılması” adlı yüksek lisans tezini Prof. Dr. M. Çetin AYTEKİN danışmanlığında yürütüyorum.