

T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*TRAMETES VERSICOLOR VE PHANEROCHAETE
CHRYSOSPORIUM*
BKM-F 1767 LAKKAZLARININ; İNDÜKLEYİCİYE BAĞLI
VERİMLİ SALGILANMA KOŞULLARININ VE İNDİGO
BOYALAR ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İYİLEŞTİRİLMESİNDE
UYGUN MEDYATÖRÜN ARAŞTIRILMASI

Pervin BADEMKIRAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR
Haziran 2011

T.C. DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DİYARBAKIR

Pervin BADEMKIRAN tarafından yapılan “*Trametes versicolor* ve *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F 1767 Lakkazlarının; indükleyiciye bağlı verimli salgılanma koşullarının ve indigo boyalar üzerindeki etkilerinin iyileştirilmesinde uygun medyatörün araştırılması” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından KİMYA Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

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

Üye : Doç. Dr. Göksel KIZIL

Üye : Doç. Dr. Mehmet DOĞRU

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 24 / 06 /2011

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

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

Prof. Dr. Hamdi TEMEL

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın planlanmasında ve yürütülmesinde deneyimlerini ve bilgilerini benden esirgemeyen değerli danışman hocam sayın, Prof. Dr. M. Çetin AYTEKİN'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmada indükleyici olarak kullanılan (4E)-4-(2,5-dimetilfenilimino)-2,5-sikloheksan-2,5-dienon bileşiğinin sentezlenmesinde yardımcı olan hocam Doç. Dr. Murat KIZIL ve ekibine, laboratuvar çalışmalarında her türlü desteği, motivasyonu sağlayan hocam Doç. Dr. Zübeyde BAYSAL'a, Göksel KIZIL hocama, laboratuvar çalışmalarındaki yardımları ve teknik açıdan her türlü desteğinden ötürü Arş. Gör. Dr. Murat YAVUZ'a, çalışmada kullanılan resimlerin çekilmesinde emeği olan biyoloji anabilim dalı öğretim üyesi hocam Prof. Dr. Erhan ÜNLÜ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarındaki yardımları ve dostluğu için çalışma arkadaşım Gülşen KAYA'ya, laboratuvar arkadaşlarıma ve ayrıca anabilim dalımızdaki diğer hocalarıma teşekkür ederim.

Ve beni bugünlere getiren sevgili ailem; annem, babam, ve sevgili kardeşlerime, bana tez çalışmam boyunca her türlü desteği sunan ve yol gösteren sevgili amcam D.Ü Veteriner Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Servet BADEMİRAN'a, özellikle PC kullanımı konusundaki yardımlarıyla sevgili kardeşim Hogır BADEMİRAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (DUAPK 09-FF-46) ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) (TBAG 209T021) tarafından desteklenmiştir. DÜBAPK ve TÜBİTAK'a desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VII
ÇİZELGE LİSTESİ.....	VIII
ŞEKİL LİSTESİ.....	IX
EK LİSTESİ.....	XII
KISALTMA VE SİMGELER.....	XIII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Odunun Yapısı.....	1
1.1.1. Ligninin Yapısı ve Özellikleri.....	2
1.2. Canlıların Sınıflandırılması.....	5
1.3. Fungusların Genel Özellikleri.....	6
1.3.1. Fungusların Temel Grupları.....	7
1.3.1.1. Chytridiomycota (Chytrids).....	7
1.3.1.2. Zygomycota.....	8
1.3.1.3. Ascomycetes.....	9
1.3.1.4. Basidiomycetes.....	10
1.3.2. Fungusların Hücresel Yapıları.....	11
1.3.2.1. Hifa (Hyphae).....	11
1.3.2.2. Septum.....	12
1.3.2.3. Hücre duvarı.....	14
1.3.2.4. Vesikül.....	14
1.3.2.5. Çekirdek ve Çekirdekçik.....	14
1.3.3. Funguslarda Büyüme ve Üreme.....	14
1.3.4. Fungusların Üremesinde Etkili Olan Faktörler.....	15
1.3.5. Fungusların İnsan Yaşamındaki Yeri.....	16

1.3.6.	Funguslarda Beslenme.....	16
1.3.7.	Beyaz Çürükçül Funguslar	16
1.3.7.1.	<i>Trametes versicolor</i>	18
1.3.7.2.	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	20
1.4.	Beyaz Çürükçül Fungusların Salgıladığı Ligninolitik Enzimler	20
1.4.1.	Peroksidaz.....	21
1.4.1.1.	Mangan Peroksidaz	22
1.4.1.2.	Lignin Peroksidaz	23
1.4.2.	Fenoloksidaz.....	24
1.4.3.	Lakkaz.....	24
1.4.3.1.	Lakkazların Yapıları ve Katalitik Mekanizmalar.....	25
1.4.3.2.	Lakkazların Biyokimyasal Özellikleri.....	30
1.4.3.3.	Lakkaz ve inhibitörleri.....	31
1.4.3.4.	Lakkaz ile Katalizlenen Reaksiyonlar.....	31
1.4.3.5.	Lakkaz Medyatör Sistemleri.....	33
1.4.3.6.	Lakkaz Üretimi ve İndükleyiciler.....	39
1.4.3.7.	Lakkazların Endüstriyel Kullanım Alanları.....	41
	-Lakkaz Enzimlerinin ve Lakkaz Aracılı Sistemlerin Tekstilde Kullanım Alanları.....	41
	- Lakkazların Kot (Denim) Yıkamada Kullanımı.....	43
	-Lakkazların Tekstil Atık Sularının Biyolojik Parçalanması ve Renksizleştirilmesinde Kullanımı.....	44
	-Kağıt Hamurundan Lignin Giderimi.....	44
	-Organik Sentez.....	45
	-Biyosensör.....	45
	-Şarap ve Bira Stabilizasyonu.....	45

1.5.	Katı Substrat Fermantasyonu.....	46
1.6.	Enzim Safılaştırma Teknikleri.....	47
1.7.	Araştırmanın Amacı	47
2.	KAYNAK ÖZETLERİ.....	49
3.	MATERYAL VE METOT.....	61
3.1.	Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	61
3.2.	Kullanılan Aletler.....	62
3.3.	Katı Materyallerin C/N Oranının Tayin Edilmesi.....	62
3.4.	Katı Besiyerinin Hazırlanması ve İnokülasyonda Kullanılmak Üzere Ekim Yapılması	63
3.5.	Kültivasyon Koşulları.....	63
3.6.	Protein Miktar Tayini.....	65
3.7.	Lakkaz Aktivitesi Tayini.....	66
3.8.	Enzim Safılaştırma/Zenginleştirme.....	66
3.8.1.	Tuz ile Çöktürme.....	66
3.8.2.	Moleküler Elek Kromatografisi.....	67
3.9.	Elektroforez Analizi.....	67
3.10.	Zenginleştirilen Enzimin Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi.....	68
3.11.	Uygun Medyatör (aracı)'ün Tayinine Yönelik Çalışmalar.....	69
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI.....	71
4.1.	Protein Miktarı ve Lakkaz Aktivitesi.....	71
4.2.	Enzim Safılaştırma/Zenginleştirme.....	71
4.3.	Optimal pH, Sıcaklık ve Kinetik Parametre Verileri.....	71
4.4.	İndigo Boyaları Renksizleştirmek Amacıyla Kullanılan Medyatörlerin Etkileri.....	72
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	97
6.	KAYNAKLAR.....	101
	EKLER.....	119
	ÖZGEÇMİŞ.....	123

ÖZET

TRAMETES VERSICOLOR VE *PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM* BKM-F 1767 LAKKAZLARININ; İNDÜKLEYİCİYE BAĞLI VERİMLİ SALGILANMA KOŞULLARININ VE İNDİGO BOYALAR ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İYİLEŞTİRİLMESİNDE UYGUN MEDYATÖRÜN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Pervin BADEMKIRAN

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

2011

Doğada yaygın olarak bulunan ve bir glikoprotein olan, molekül ağırlıkları 50.000 ile 130.000 arasında değişen lakkazların ana kaynağını funguslar oluşturur. Son ürün olarak su oluşturdukları için çevre dostu olarak tanımlanan bu enzim grubuna ilgi son zamanlarda giderek artmıştır. Tekstil endüstrisinden, kağıt endüstrisine, atık arıtma proseslerine kadar uygulama alanı bulan ve substrat özgünlüğü çok geniş olan bu enzim grubu, ilgili reaktif radikale dönüştürmek üzere substratın monoelektronik oksidasyonu şeklinde yürüyen reaksiyonları katalizler.

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.

Bu çalışmada *Phanerochaete chrysosporium* ve *Trametes versicolor*'ın değişik destek materyallerinin kullanıldığı (kavun, karpuz kabukları ve kızıl çam kozalağı) katı faz kültürasyonu ile çeşitli indükleyicilerle sitimüle edilerek daha fazla lakkaz salgılaması sağlandı. Buna göre *T. versicolor*'ın 26 günlük inkübasyon sonunda kozalak ve 50 µM 2,4-ksilidin ile, karpuz ve 5000 µM 2,5-ksilidin ile, 50 µM'lık 2,4-ksilidin kozalak 26.gün, ; 5000 µM'lık 2,5-ksilidin karpuz 26. gün, 5000 µM'lık 3,5-ksilidin 12. gün, 5 µM'lık sentezlenen (4E)-4-(2,5-dimetilfenilimino)-2,5-sikloheksan-2,5-dienon 26. gün kültürasyonda yüksek protein ve lakkaz aktivitesi değerlerine ulaşıldı. Yapılan ön denemelerde *P. chrysosporium* ile üç destek materyal ve dört indükleyici ile kayda değer protein miktarı ve lakkaz aktivitesi ölçülmedi. *T.versicolor* ile üretilen lakkazın ABTS'ye karşı K_M değeri 0.120, V_{max} değeri 20868,114 olarak hesaplandı.

Ayrıca enzimlerin tekstil endüstrisinde yaygın olarak kullanılan indigo boyaları renksizleştirilmesi için katalitik etkinlik gösterebileceği redoks medyatörünün belirlenmesine yönelik çalışmalar yapıldı. İndigo boya üzerine seçilen medyatörlerin MS ve HBT (1-

hidroksibenzotriazol) ile kıyaslandığında renksizleştirmede genellikle etkili olmadıkları ancak indigo karmin'in renksizleştirilmesinde NHP, RF ve MPP medyatörleri en az MS ya da HBT kadar etkili oldukları gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Fungus, indükleyici, lakkaz, medyatör, indigo renksizleştirme

ABSTRACT

INVESTIGATION OF *TRAMETES VERSICOLOR* AND *PHANEROCHAETE CHRYSPORIUM* BKM-F 1767
LACCASES; PRODUCTIVE SECRETION CONDITIONS DEPENDING ON
INDUCER AND PROPER MEDIATOR FOR THEIR EFFECT ON INDIGO DYES

MSc THESIS

Pervin BADEMKIRAN

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF DICLE

2011

Main source of laccases, which exist widely in nature and have glycoprotein structure and molecular weights range from 50.000 to 130.000, are fungus. Since they form water as the final product, this enzyme group is called as environment-friendly and it has been taking increasing interest. This enzyme group, which has a wide application field from textile to paper industry as well as waste refinement processes and of which substrate specificity is quite wide, catalyses reactions proceeding with the electronic oxidation of the substrate and converting it into the corresponding reactive radical.

So far, more than one hundred laccases were isolated and characterized from nature. After 1990 when it was realized that ABTS behaved as a laccase substrate mediator or improve the effect of the enzyme, usability of many other compounds as substrate for this purpose was investigated. Consequently, it was established that the mediator compounds can be changed depending on source of enzyme that is isolated and/or the substrate. Since development of proper laccase/mediator systems for such purpose will reduce foreign dependence in the related industries, it contributes cost reduction of the products.

In this labour, excreting more laccases of (melon-watermelon peels and red pine cone) in which it was used various support materials of *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor* was elicited by stimulating them by solid phase culturing and various inducers. According to this, in two different concentrations of these inducers; The maximum laccases excreting of 50 μM 2,4-xilidine cone is on 26th day, 5000 μM 2,5-xilidine watermelon is on 26th day, 5000 μM 3,5-xilidine is on 12th day, 5 μM synthesized is on 26th day culturing. It was dispensed with the large scale production because it was not observed enough amount of protein and (enough) laccases activity of(in) *P. chrysosporium*. The K_M value of *T.versicolor* was found as 0.120, the V_{max} value was found as 20868,114 in pretestings.

Besides redox mediator, can show catalytical effectiveness for decolorising the indigo colours used commonly in textile industry, of enzymes (deoxyribonucleases) determination oriented studies were done. When we compare the mediators selected for indigo colour with MS and HBT (1-hidroksibenzotriazol), It was observed that they are not usually effective, but NHP, RF and MPP mediators are as effective as at least MS or HBT in decolorising of indigo carmine.

Keywords: Fungus, inducer, laccase, mediator, indigo decolouration

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>		<u>Sayfa</u>
Çizelge 4.1.	Kavun, Karpuz Kabukları ve Kozalak için C/N oranları	72
Çizelge 4.2.	<i>P. chrysosporium</i> 'un uygulanan koşullardaki zamana bağlı protein miktarı	73
Çizelge 4.3.	<i>P. chrysosporium</i> 'un uygulanan koşullarda zamana bağlı lakkaz aktivitesi	75
Çizelge 4.4.	<i>T. versicolor</i> 'ın uygulanan koşullar altındaki zamana bağlı protein miktarı	77
Çizelge 4.5.	<i>T. versicolor</i> 'ın uygulanan koşullar altındaki zamana bağlı lakkaz aktivitesi	79
Çizelge 4.6.	Seçilen 6 farklı koşulda örneklerin 16. gündeki protein miktarı ve lakkaz aktivitesi	81
Çizelge 4.7.	Ticari lakkaz ve kısmi saflaştırılan lakkazın farklı pH'larda 1 mM ABTS'ye karşı ölçülen aktiviteleri	85
Çizelge 4.8.	Ticari lakkaz ve kısmi saflaştırılan lakkazın farklı sıcaklıklarda 0.6 mM ABTS'ye karşı ölçülen aktiviteleri	88
Çizelge 4.9.	Ticari lakkaz ve kısmi saflaştırılan lakkazın 30 °C sıcaklık ve pH 3'te değişik ABTS derişimlerinde 436 nm'de ölçülen absorbans değerlerine bağlı olarak hesaplanan kinetik parametreleri	90
Çizelge 4.10.	Ticari lakkaz ile oluşturulan lakkaz-mediyatör sistemlerinin indigo boya üzerine etkisi	93
Çizelge 4.11.	<i>T. versicolor</i> lakkazı ile oluşturulan lakkaz-mediyatör sistemlerinin indigo boya üzerine etkisi	94
Çizelge 4.12.	Ticari lakkaz ile oluşturulan lakkaz-mediyatör sistemlerinin indigo karmin boya üzerine etkisi	95
Çizelge 4.13.	<i>T. versicolor</i> lakkazı ile oluşturulan lakkaz-mediyatör sistemlerinin indigo karmin boya üzerine etkisi	96

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1.	Odunun hücre duvarı yapısı, ince yapısı ve organizasyonunu gösteren genel bir şema	2
Şekil 1.2.	Lignin fiberlerinin mikroskop altında görünümü	3
Şekil 1.3.	Lignin yapısının öncül molekülleri	4
Şekil 1.4.	Ligninin genel yapısı	4
Şekil 1.5.	Karşılaştırmalı rRNA gen dizilimiyle tanımlanmış filogenetik yaşam ağacı	5
Şekil 1.6.	Fungusların filogenisi	6
Şekil 1.7.	Chytridler'in suda yüzen sporlarının etrafa yayılması	7
Şekil 1.8.a	Eşeyli çoğalma	8
Şekil 1.8.b	Eşeysiz çoğalma	9
Şekil 1.9.	Ascomycota mikroskopik görüntüsü	9
Şekil 1.10.	Basidiomyceteleri özel yapan basidiumlar	10
Şekil 1.11.	Fungus hiflerinin yeraltındaki görünüşü	11
Şekil 1.12.	Flamentli bir beyaz çürükçül fungus olan <i>Phanerochaete chrysosporium</i> hifalarının SEM görüntüsü	12
Şekil 1.13.	<i>Neurospora crassa</i> suşunda FM4-64 ile boyanarak gözlemlenmiş septum oluşumu	13
Şekil 1.14.	Fungusların hifalardaki büyümesi	15
Şekil 1.15.	<i>Trametes versicolor</i> 'ın konsantrik renkli halkalarını gösteren doğadan bir görüntü	19
Şekil 1.16.	Toplu halde çıkmış <i>Trametes versicolor</i> 'ın doğadan bir görüntüsü	19
Şekil 1.17.	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> 'un doğadan bir görüntüsü	20
Şekil 1.18.	Mangan peroksidazın kristal yapısı	22
Şekil 1.19.	Lignin peroksidazın kristal yapısı	23
Şekil 1.20.	Lakkaz enziminin kristal yapısı	26
Şekil 1.21.	Lakkazın aktif bölgesindeki bakır atomlarının düzenlenişi	27

Şekil 1.22.	<i>T. versicolor</i> Lakkazının aktif merkezlerinin yapısı ve gerçekleştirdikleri çevrimin şematik gösterimi	29
Şekil 1.23.	Lakkaz katalizli redoks çevrimlerinde kimyasal medyatör yokluğunda (a) ve varlığında (b) substratın yükseltgenmesinin şematik gösterimi	30
Şekil 1.24.	Odundaki fenolik grupların lakkaz ile oksidasyonu	32
Şekil 1.25.	ABTS’de elektron akışı	34
Şekil 1.26.	Lakkaz ve TEMPO’nun varlığında substratın yükseltgenme mekanizması	35
Şekil 1.27.	Lakkaz medyatörü olarak kullanılan bazı bileşikler	36
Şekil 1.28.	Lakkaz katalizli indigo boya degradasyonu için olası bir mekanizma	39
Şekil 3.1.	İnokülasyonda kullanılmak üzere katı besiyerinde üretilen funguslar	64
Şekil 3.2.	Lakkaz aktivitesi yüksek bulunan koşullarda <i>T. versicolor</i> ’ın inkübasyonu	65
Şekil 3.3.	Çalışmada kullanılan medyatörler	70
Şekil 4.1.	<i>P. chrysosporium</i> ’un uygulanan koşullar altındaki zamana bağlı protein miktarı	74
Şekil 4.2.	<i>P. chrysosporium</i> ’un uygulanan koşullar altındaki zamana bağlı lakkaz aktivitesi	76
Şekil 4.3.	<i>T. versicolor</i> ’ın uygulanan koşullar altındaki zamana bağlı protein miktarı.	78
Şekil 4.4.	<i>T. versicolor</i> ’ın uygulanan koşullar altındaki zamana bağlı lakkaz aktivitesi.	80
Şekil 4.5.	Seçilen 6 Farklı Koşulda Örneklerin 16. gündeki Protein miktarı	82
Şekil 4.6.	Seçilen 6 Farklı Koşulda Örneklerin 16. gündeki Lakkaz aktivitesi	83
Şekil 4.7.	Kullanılan Sephacryl S-100 kolonunun kalibrasyonu (moleküler elek Kromatografisi)	84
Şekil 4.8.	<i>T. versicolor</i> ile elde edilen lakkazın moleküler elek kromatogramı	84
Şekil 4.9.	<i>T. versicolor</i> lakkazı elektroforez bant profilleri	85
Şekil 4.10.	Ticari lakkaz ve kısmi saflaştırılan lakkazların farklı pH’larda 1 mM ABTS’ye karşı 2. dakikada ölçülen aktiviteleri	86
Şekil 4.11.	Ticari Lakkazın pH-Aktivite ilişkisi	87
Şekil 4.12.	<i>T. versicolor</i> Lakkazının pH-Aktivite ilişkisi	87
Şekil 4.13.	Ticari lakkaz ve kısmi saflaştırılan lakkazın 0,6 mM ABTS derişiminde 2. dakikada ölçülen (436 nm), farklı sıcaklıklardaki aktiviteleri	88
Şekil 4.14.	Ticari Lakkazın Sıcaklık-Aktivite ilişkisi	89
Şekil 4.15.	<i>T.versicolor</i> Lakkazının Sıcaklık-Aktivite ilişkisi	89

Şekil 4.16.	Ticari lakkazın Lineveaver-Burk Grafiği	90
Şekil 4.17.	Ticari lakkazın Michaelis-Menten Grafiği	91
Şekil 4.18.	<i>T. versicolor</i> lakkazının Lineveaver-Burk Grafiği	91
Şekil 4.19.	<i>T. versicolor</i> lakkazının Michaelis-Menten Grafiği	92
Şekil 4.20.	Ticari lakkaz ile lakkaz-medyatör sistemlerinin indigo boya üzerine etkisi	93
Şekil 4.21.	<i>T. versicolor</i> lakkazı ile lakkaz-medyatör sistemlerinin indigo boya üzerine etkisi	94
Şekil 4.22.	Ticari lakkaz ile lakkaz-medyatör sistemlerinin indigo karmin boya üzerine etkisi	95
Şekil 4.23.	<i>T. versicolor</i> lakkazı ile lakkaz-medyatör sistemlerinin indigo karmin boya üzerine etkisi	96

EK LİSTESİ

- EK 1:** Elektroforezde Kullanılan Çözeltiler
EK 2: Sıvı Besiyerinin Bileşimi

KISALTMA VE SİMGELER

ΔE^0	: Redoks potansiyeli
ABTS	: 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazoline-6-sülfonik asit)
AR-GE	: Araştırma geliştirme
B6S	: Şeker kamışı posası
CDH	: Sellobiyoz dehidrogenaz
COD	: Kimyasal oksijen ihtiyacı
Cys	: Sistein
DEAE	: Dietilaminoetil
G-250	: coomasie brilliant blue
HAA	: N-hidroksiasetanilit
His	: Histidin
E.C	: Enzim komisyonu
EPR	: Elektron paramagnetik rezonans
FTIR	: İnfrared spektroskopisi
İTÜ	: İstanbul Teknik Üniversitesi
K2BP	: Reactive Brilliant Red
K_{cat}	: 1 sn'de aktif merkezde değişime uğrayan substrat sayısı
K_M	: Michaelis-menten sabiti
KOH	: Potasyum hidroksit
KSF	: Katı substrat fermantasyonu
Lcc	: Lakkaz gen ekspresyonu
LiP	: Lignin peroksidaz
LMS	: Lakkaz-medyatör sistemleri
MCD	: Magnetik sirkular dikroizim
MEA	: Malt extract agar
MnIP	: Mangan bağımsız peroksidaz
MnP	: Mangan peroksidaz
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
HBT	: 1-hidroksibenzotriazol

HPLC	: Yüksek performans sıvı kromatografisi
MPP	: 3-Metil-1-fenilpirazolin-5-on
MS	: Metilsilingeyt
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NHP	: <i>N</i> -Hidroksiftalimid
PAGE	: poliakrilamid jel elektroforezi
PAH	: Polisiklik aromatik hidrokarbonlar
PCB	: Poliklorlubifeniller
PCR	: polymerane cluacin reaction
POXA2	: lakkaz izoenzimi olan protein
POXA16	: Bir gen grubu
POXC	: Bir gen grubu
RBBR	: Remazol Brilliant Blue R
RB-5	: Remazol black-5
rRNA	: Taşıyıcı ribonükleik asit
RF	: Riboflavin
RO-16	: Remazol orange-16
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SEM	: Taramalı elektron mikroskopu
TEMPO	: 1,1,6,6-tetrametil-1-piperidiniloksil
T1	: Tip 1 bakır
T2	: Tip 2 bakır
T3	: Tip 3 bakır
VA	: Violurik asit

1. GİRİŞ

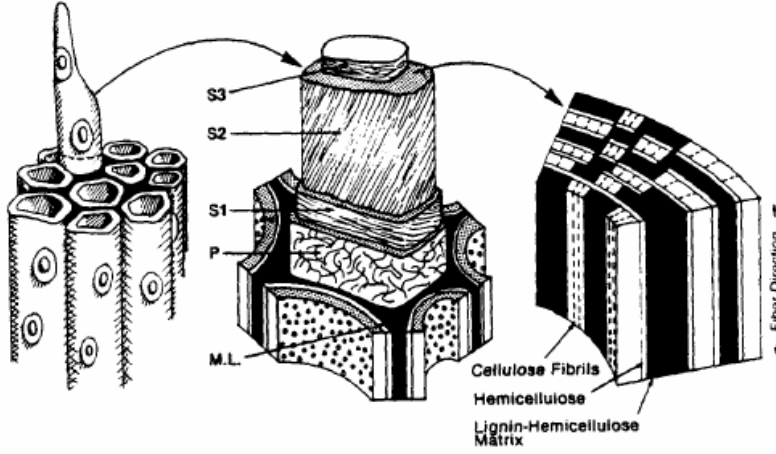
Beyaz çürükçül funguslar, hüre dışı ligninolitik enzim sistemleri ile çevre kirliliğine neden olan birçok yıkımı güç (recalcitrant) organik bileşikleri (zenobiyotikler, lignin, boyarmaddeler vb.) yükseltgeyebilmektedir. Özellikle lignin ve renk giderimi amacı ile en yaygın kullanılan beyaz çürükçül fungus türleri; *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes (Coriolus) versicolor*'dır. Son zamanlarda endüstriyel uygulamalarda, özellikle tekstil endüstrisinde, boyar maddelerin renk gideriminde yer alan üç fonksiyonel enzimden Lignin peroksidaz (LiP) ve Mangan peroksidaz (MnP) H₂O₂ bağlı peroksidazlar olduğu belirtilmiştir. Lakkaz ise sadece belirli türler tarafından üretilen diğer bir fonksiyonel hücre dışı enzimdir (Beilen ve Li 2002)

Enzimatik süreçlerin daha az çevre kirliliğine yol açması, kimyasal süreçlerden daha ılımlı koşullarda ve ekonomik olarak gerçekleştirilebilmesi nedenleri ile enzimlerin tekstil, deri ve deterjan endüstrileri ve atık giderme süreçlerindeki kullanımları büyük oranda artmıştır (Kirk ve ark. 2002). Verimlilikleri, seçicilikleri, ılımlı şartlar altında çalışabilmeleri ve biyolojik olarak parçalanabiliyor olmaları nedeniyle enzimler endüstride organik sentezler, klinik analizler, ilaç üretimi, deterjanlar gıda üretimi ve fermantasyon gibi birçok alanda kullanılmaktadırlar. Özellikle tekstil endüstrisinde beyaz çürükçül funguslar tarafından salgılanan selülaz enzimi mikrofibril uzaklaştırmada, lakkaz enzimi ise renk ağartmada kullanılmaktadır.

1.1. 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 (Gellerstedt ve ark. 1989).

Odun, sert iğ 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 1.1).



Şekil 1.1. Odunun hücre duvarı yapısı, ince yapısı ve organizasyonunu gösteren genel bir şema

Yaklaşık olarak odun ağırlığının %45'ni oluşturan selüloz, odunun temel yapısı olan hücre duvarını kararlı yapar. Bu β -1.4-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 sıralanıyor. Her mikrofibril yaklaşık 40 ayrı selüloz zinciri içerir (Kirk ve Cullen 1998).

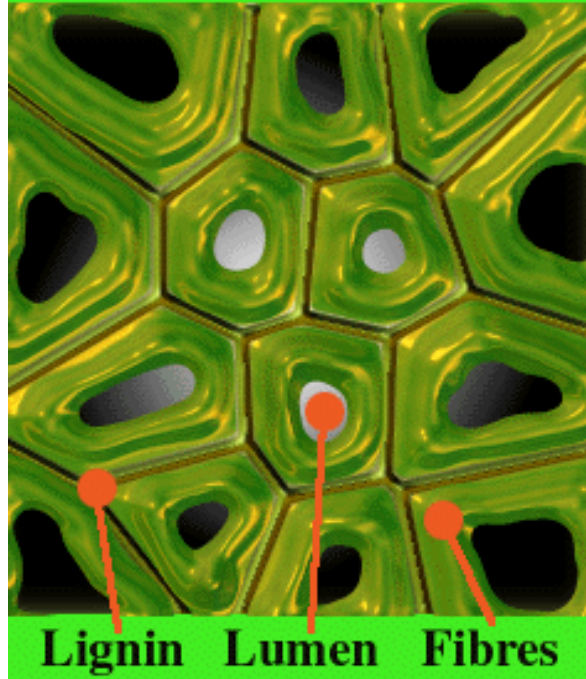
Hemiselülozlar odun ağırlığının % 25 ile % 30'nu oluşturur. Hemiselülozlar da β -1.4-monosakkarit lineer polimerleridir. Selülozun aksine, hemiselüloz molekülleri daha az dayanıklı biçimsiz, rastgele yapılardan oluşur ve iskelet yapıdaki şeker kalıntılarına göre sınıflandırılır (Kirk ve Cullen 1998). Hemiselüloz; lignine, proteinlere ve diğer polisakkaritlere kimyasal olarak çapraz bir şekilde bağlanır (Palonen 2004). Ligninin yapısını selüloz ve hemiselülozun etkilediği öne sürülmüştür.

1.1.1. Ligninin Yapısı ve Özellikleri

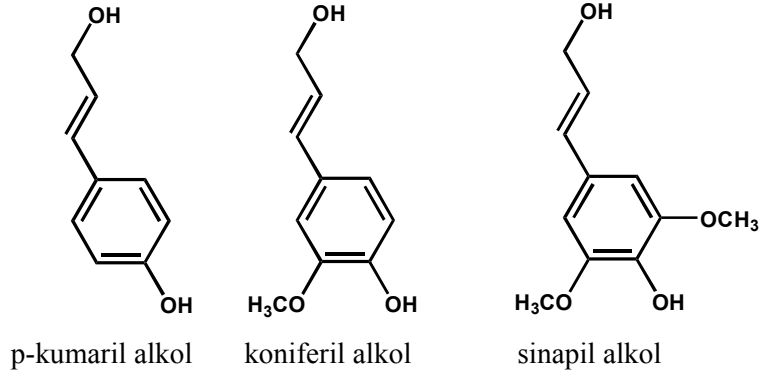
Lignin, bitkilerde fiberleri, damarları ve hücreleri birbirine bağlayan organik bir maddedir. Selülozdan sonra doğada en çok bulunan ve yenilenebilen bir karbon kaynağıdır ve odunun kuru ağırlığının yaklaşık yüzde 20-30'unu oluşturur. Odunun mekanik özelliklerini amorf bir polimer olan lignin belirlemektedir. Hücre çeperinde lignin daima hemiselülozla beraber bulunmaktadır (Şekil 1.2). 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).

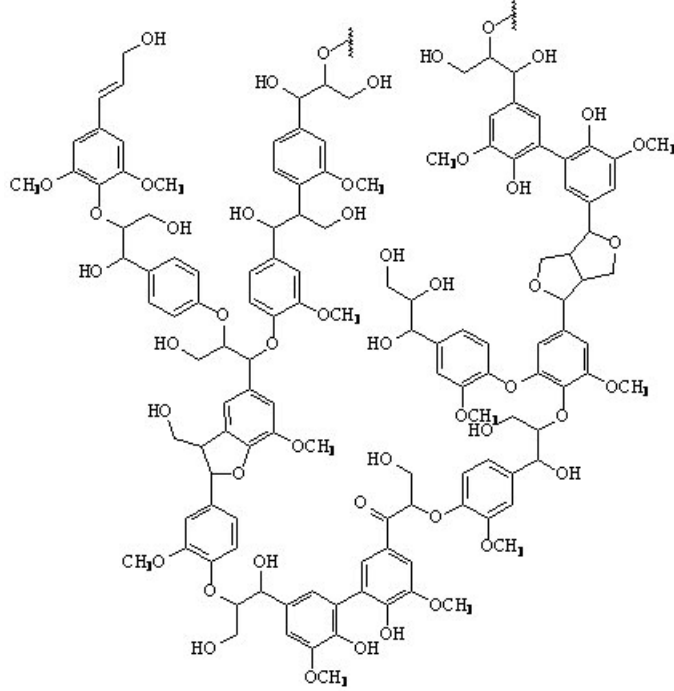
Kükürtlü ve kükürtsüz olmak üzere iki temel lignin yapısı vardır. Bugüne kadar ticari olarak kullanılan ligninler, kükürt içeren ligninlerdir. Bunlar lignosülfonatlar ve kraft ligninidir. Kükürt içermeyen ligninlerin henüz ticari değeri yoktur. Lignin ve lignin kaynaklı ürünler, toprakların oluşumunda ve hayvan besiciliğinde önemli rol oynar. Lignin içerdiği hidrofilik ve hidrofobik gruplarından ötürü gıda ve kozmetik sektöründe jelleşmede veya emülgator ve dispergatörlerin 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 1.2. Lignin fiberlerinin mikroskop altında görünümü



Şekil 1.3. Lignin yapısının öncül molekülleri (Çalgeriş 2010)

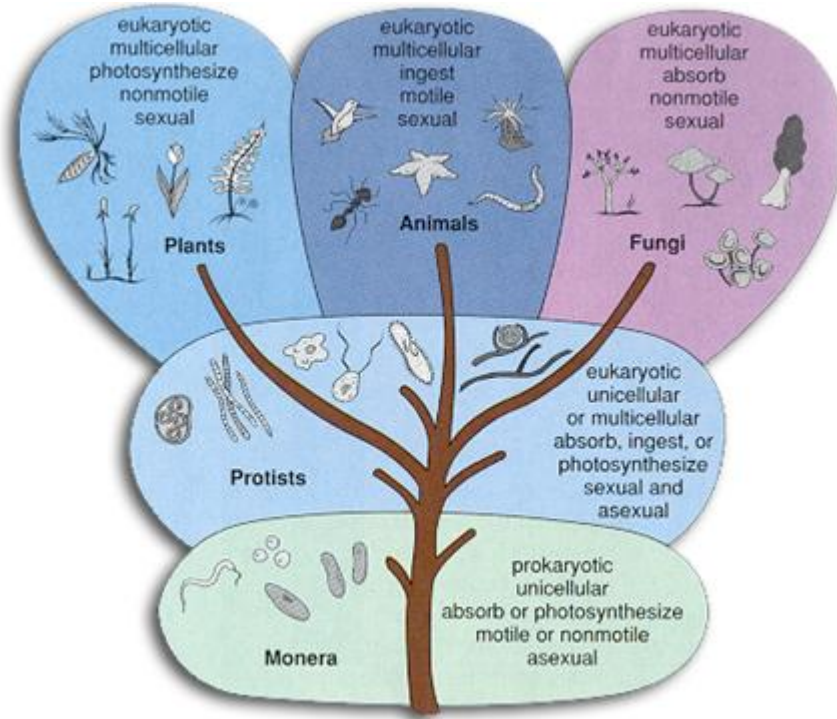


Şekil 1.4. Ligninin genel yapısı (Palonen 2004)

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, koniferil ve sinapil alkoller gibi aromatik bileşiklerle oluşmuştur (Şekil 1.3 ve Şekil 1.4) (Kirk ve Cullen 1998, Palonen 2004).

1.2. Canlıların Sınıflandırılması

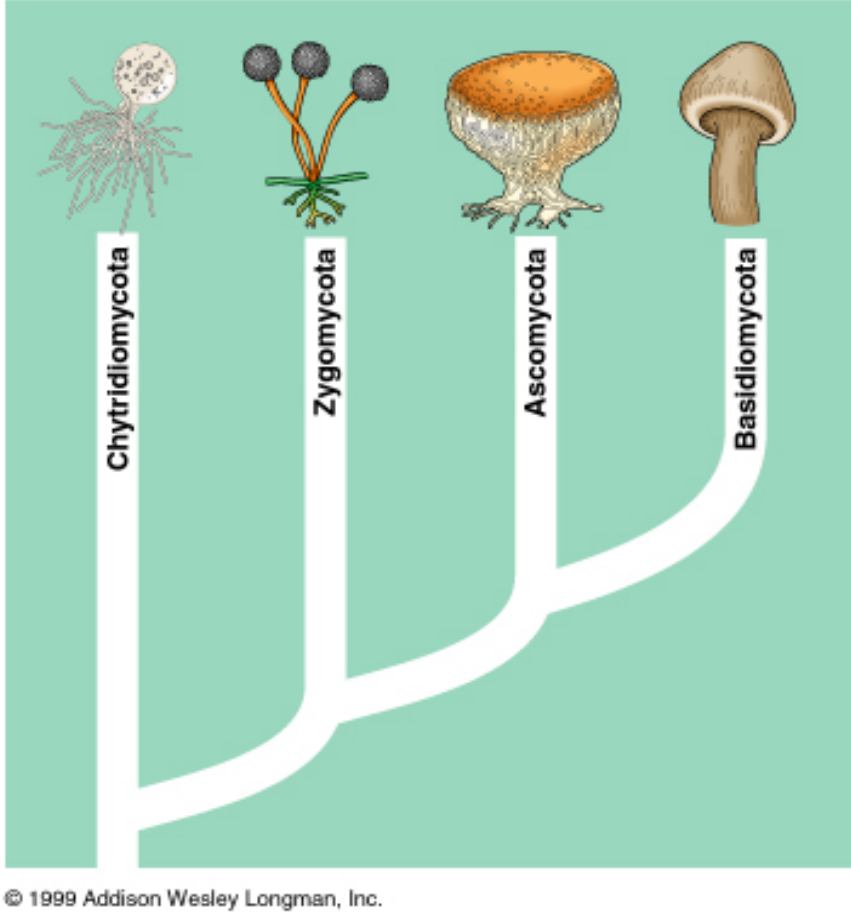
Canlılar sınıflandırılırken temelde hücre yapıları göz önüne alınır. Buna göre canlılar iki ana gruba ayrılır. Bunlar basit ilkel canlıların oluşturduğu prokaryotlar ve ileri yapıları canlıların yer aldığı ökaryotlardır. Yapısal olarak daha basit olan prokaryot hücre yapısı sadece bakterilerde bulunur. Diğer bütün organizmalar yani protista, fungi (fungus), bitkiler ve hayvanlar, daha karmaşık olan ökaryot hücre yapısına sahiptir (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Karşılaştırmalı rRNA gen dizilimiyle tanımlanmış filogenetik yaşam ağacı (<http://crperiod5.edublogs.org>)

Funguslar (Şekil 1.6), fotosentez yapamayan, hif'ler halinde üreyen mikroorganizmalardır. Protozoa'lardan değişimle oluşmuşlardır. Hücre yapıları bitkilere benzesede, funguslar besinlerini glikojen olarak depo ederler. İletim dokusu bulunmayan ve bu nedenle heteretrof, parazit ya da çürükçül beslenen, fotosentez yapmamaları nedeniyle ışığa bağımlı olmayan ökaryot canlılardır. Hücre duvarları ağırlıklı olarak kitin yapıdadır. Çok hücreli üyeleri, "hif" adı verilen özel vücut bölümlerinden oluşur. Hifler, bir araya gelerek "misel" yapılarını meydana getirir

(http://www.biltek.tubitak.gov.tr/bilgipaket/canlilar/fungi/fungi_giris.htm).



Şekil 1.6. Fungusların filogenisi. Chytridiomycota ve zygomycota mikro, ascomycota ve basidiomycota makro funguslar grubunu oluşturur. Beyaz çürükçül fungusların çoğu basidiomycota grubu üyesidirler. (<http://bionerds.freeservers.com/catalog.html>)

1.3. Fungusların Genel Özellikleri

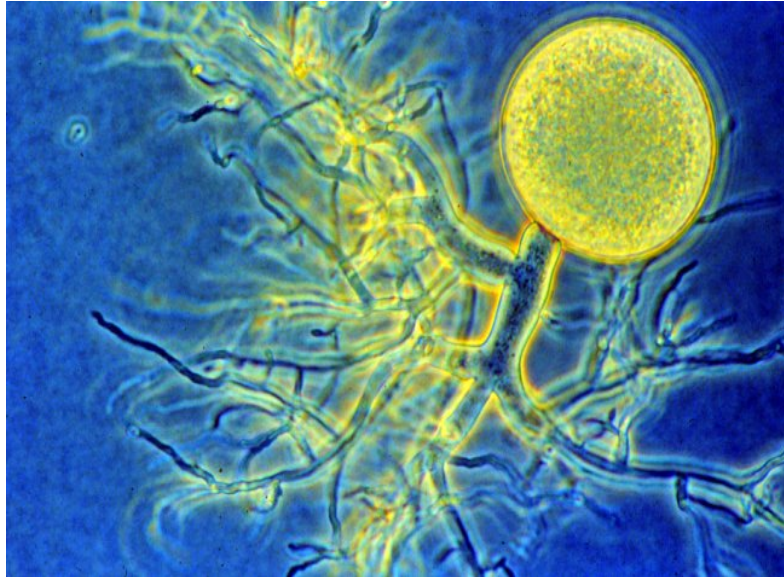
Fotosentetik pigmentlerinin olmayışı, fungusları karbon ve enerji kaynağı olarak organik maddeyi kullanmaya zorunlu kılmıştır (Demir ve ark. 2004). Funguslar doğada oldukça yağın olarak bulunurlar. Yaklaşık 400.000 çeşitten oluşan oldukça gelişmiş hücresel yapıya sahip ökaryot canlılardır (Murray 1990). Bütün çok hücreli hayvanlar ve bitkilere ek olarak algler, protozoalar ve funguslar da ökaryotik hücrelerden oluşmaktadır. Ökaryotik hücreler de tüm hücreler gibi bir plazma membranıyla çevrili olmalarının yanında ekstra bir membranla çevrili farklı hücresel görevler için özelleşmiş organellere sahiptir. Her bir organel kendi spesifik görevini yerine getirir (Purves 1998).

Fungusların hücre duvarlarında kitin ve selüloz karakterinde maddelerin bulunmasından dolayı devamlı değişen çevre koşullarına uyum sağlamada oldukça dirençli olurlar (Dizge 2007). Funguslar genellikle düşük pH değerlerinde bile kolayca üreyebilir ve böyle ortamlara adapte olabilirler. Bu sebeple fungusların minimum ve maksimum pH limitleri 2-11 arasında değişebilir. Fungusların üreme ısı limitleri oldukça geniştir ve türler arasında farklar gösterir. Bu sınırlar 0-60 °C arasında değişmektedir. Hifler maksimum ısı limitinin dışında kolayca ölmelerine karşın, sporları yüksek ısıya ve değişik çevre koşullarına çok fazla dayanıklılık gösterir (Arda 2000).

1.3.1. Fungusların Temel Grupları

1.3.1.1. Chytridiomycota (chytrids)

Chytridiomycota en küçük ve en basit fungustur. Prekambriyen çağından kısa bir süre sonra Kuzey Rusya Vendian’da ortaya çıkmıştır. Şu ana kadar bilinen “chytrid” benzeri en eski fosil fungustur (Hass ve ark. 1994). Bir kayada bulunan en eski fungus fosilinin (600 milyon yaşında) bir chytride ait olması da bu sonucu destekler (Aykut 2010).

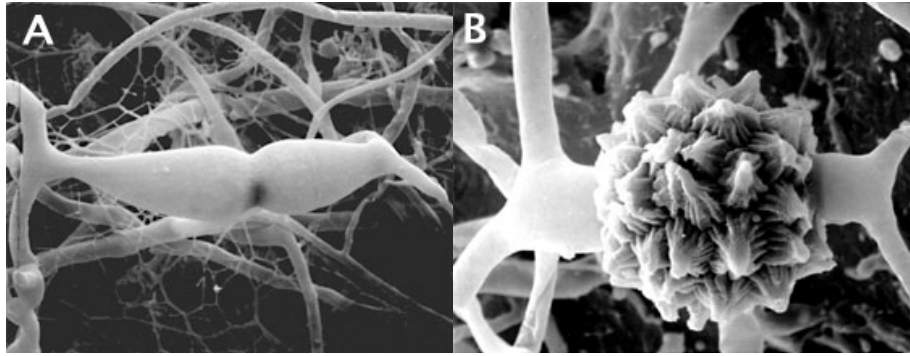


Şekil 1.7. Chytridler’in suda yüzen sporlarının etrafa yayılması
(<http://comenius.susqu.edu/bi/202/Fungi/chytridiomycota/chytridiomycota.htm>)

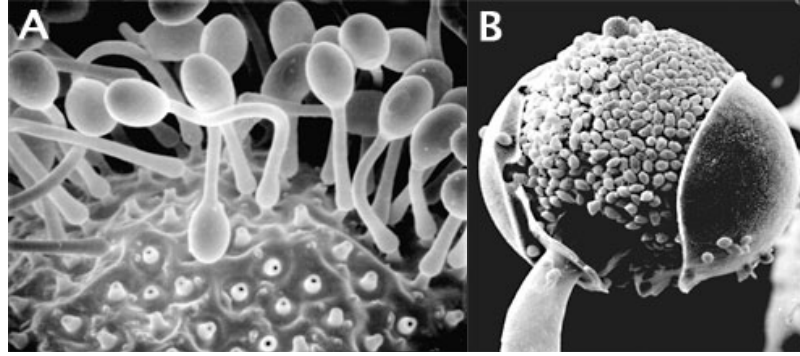
Diğer funguslardan farklı olarak chytridler suda yaşarlar. Su sayesinde yüzen sporlarını etrafa yayabilirler (Şekil 1.7). Bir chytrid sporu ucundaki tek kamçı sayesinde kendini iterek suya fırlatabilir. Başka hiçbir fungus grubunda kamçı yoktur. Fungus sistematigi araştırıldığında bu grubun diğer fungus gruplarından daha eski olduğu anlaşılmıştır (Aykut 2010).

1.3.1.2. Zygomycota

Çilek ve diğer yüksek oranda şeker içeren meyveler üzerinde etkili olan en ünlü küftür. Bu gruptaki fungusların eşeyli spor oluşumu Ascomycota'lar gibi spor üreten yapılar yerine fungal hifaların bir araya gelerek birleşmesi veya iki hifanın karşılaşmasıyla oluşan çok küçük yapılarda gerçekleşmesi dikkat çekicidir (Dizge 2007). Yaklaşık 600 çeşit zygomycota türü tanımlanmıştır. "zygomycota" terimi bölünmenin karakteristik temelini anlatır ki bu da zygospor olarak adlandırılan eşeyli sporların üretimidir. Diğer tüm funguslar gibi, zygomycota da hem eşeyli hem de eşeysiz olarak çoğalabilir. Eşeysiz çoğalma diğer funguslara benzerken eşeyli çoğalma ascomycota'nın çoğalmasına benzerlikler gösterir (Şekil 1.8.a ve Şekil 1.8.b) (Dizge 2007).



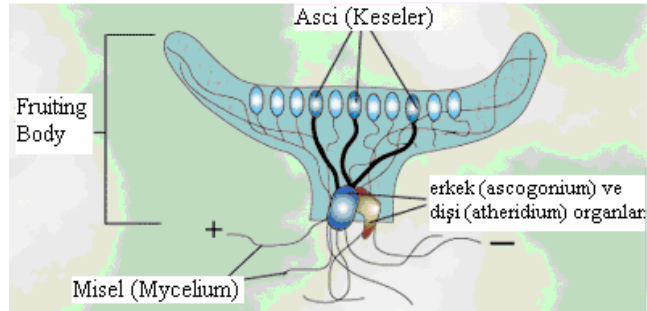
Şekil 1.8.a. Eşeyli çoğalma. (A) *Mucor mucedo*'da gametangia yapılarının birleşmesinin elektron mikroskobu ile çekilmiş görüntüleri (B)*Mycotypha africana*'da oldukça donanımlı zigospor yapıları (Dizge 2007)



Şekil 1.8.b. Eşeysiz çoğalma (A) *Benjaminiella poitrasii*'nin ergin sporlarının ve (B) *Gilbertella persicaria*'nin spor kesesinin açılarak sporlarına salınımının elektron mikroskop görüntüsü (Dizge 2007)

1.3.1.3. Ascomycetes

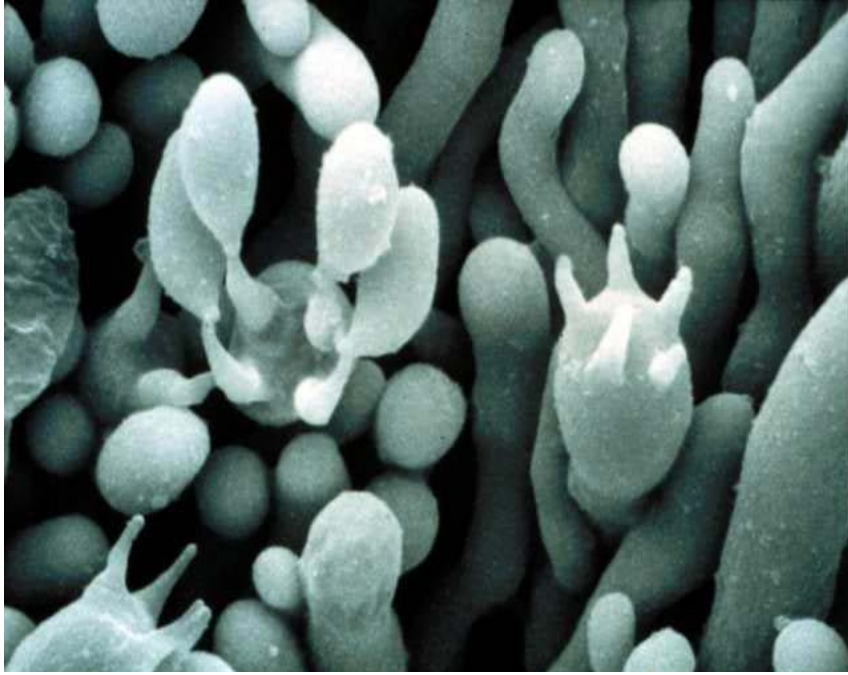
Ascomycetes veya keseli funguslar eşeyli ve eşeysiz üreyebilirler. Keseli fungusların eşeysiz sporları özelleştirilmiş hifler tarafından üretilir (Şekil 1.9). Eşeyli üreme esnasında sporlar iki farklı hifin birleşmesiyle kompleks olaylar zinciriyle üretilir. Bu olaylar 'ascu'nun oluşmasıyla sonlanır. Bu dala adını veren keseli yapılar birçok spor içerirler. Bazı ascomycetler çürümüş orman meyvelerinde yaşarlar. Bu grup depolanmış yiyeceklere saldıran meyvelere ve tohumlara zarar veren, ayrıca ilk antibiyotik olan penisilin de üreten değişik küfler içerir (Audesirk ve ark. 2008).



Şekil 1.9. Ascomycota mikroskopik görüntüsü (Duncan ve Deverall 1964)

1.3.1.4. Basidiomycetes

Basidiomycota sınıfı yaygın olarak bilinen fungusları içerir. Bu sınıf ismini basidia safhası olarak adlandırılan hayat döngüsünde diploid geçiş aşamasından alır (Şekil 1.10). Basidia birçok basidiomycete eşeyli sporelerden oluşur. Bu şekliinden dolayı da “club fungi” olarak adlandırılır. Club fungusların birçoğu çürükçüdür. Geri kalanı da mycorrhizae (kök fungus)’dir ve oldukça kuvvetli parazitlerdir (Şekil 1.11). Bu parazit fungusların birçoğu ağaçlarda bulunur ve ölü ağaçların bozunmasını sağlar. Basidiomycetes diğer türlerden daha az eşeysiz ve daha çok eşeyli çoğalmaya eğilimlidir (Read 1994).



Şekil 1.10. Basidiomyceteleri özel yapan basidiumlar (Audesirk ve ark. 2008)

Flamentli funguslar renkleri, sertlik dereceleri ve çürütme çeşitlerine göre beyaz, kahverengi ve yumuşak olarak üç sınıfa ayrılırlar. Yumuşak çürükçül funguslar Ascomycete ve fungi imperfecti (deutromycete) gruplarını içerir ve selülozu ayrıştırırken lignini kısmi olarak parçalayabilir. Kahverengi çürükçül funguslar basidiomycetelerin bir kısmını içerir ve hemiselüloz ile selülozun ayrıştırılması için tercih edilir. Lignini metil giderimi yaparak parçalar ve bunun sonucunda da ürün olarak amorf, kahve renkli ve kolayca ufalanan artıklar oluşur. Lignini kinonlara yıkar ve dolayısıyla kahve renk oluşur. Üçüncü olarak beyaz çürükçül funguslar da 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).

1.3.2. Fungusların Hücresel Yapıları

1.3.2.1. Hifa (Hyphae)

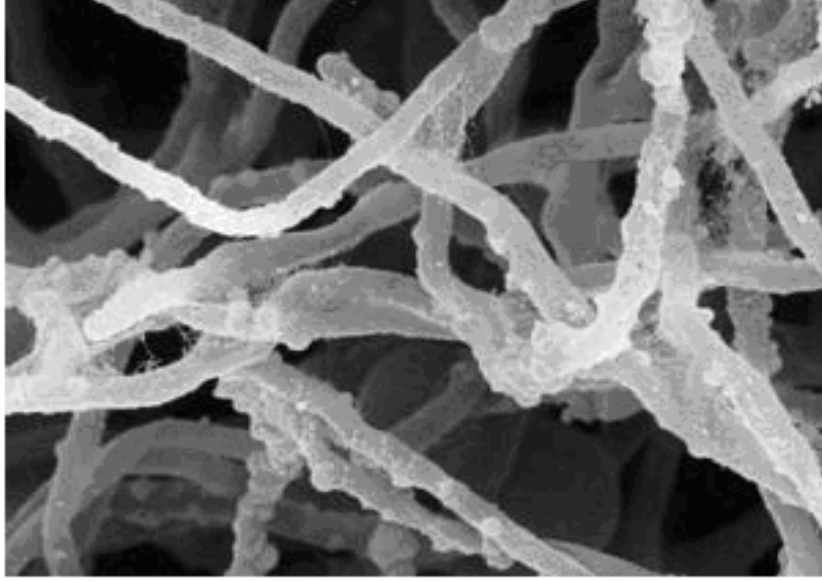
Fungus kolonileri, hifa adı verilen, genellikle ince uzun ve saydam mikroskopik filamentlerden (liflerden) oluşmuşlardır (Şekil 1.12). Uzunlukları türden türe değişmekle birlikte genellikle 1-3 cm ve çapları da 5-10 μm arasında olmaktadır. Bazıları dallanmamış ve ince bir tel şeklinde görünüme sahip olmasına karşın, bir kısım hifa genetik karakteri gereği dallanma gösterir. Hifalardan meydana gelen ağ benzeri oluşumlara miselyum adı verilir. Miselyumlar fungusun vejetatif gövdesini oluşturur (Arda 2000). Bu filamentler (lif), septum adı verilen bir duvarla bölümlere ayrılır. Septumlar hifaların oluşumunun ilk aşamalarında tamamlanmış halde bulunmazlar. Bu bölgeler iskelet olarak eski duvarların enzimatik olarak bozunması ve yeni duvarın oluşumu için materyal taşıyan iskelet olarak yayılırlar (Carlile ve Watkinson 2000).



Şekil 1.11. Fungus hiflerinin yeraltındaki görünüşü (Audesirk ve ark. 2008)

Funguslar hareket edemez. Fakat bu eksikliklerini hifleri sayesinde hızlıca büyüyüp herhangi bir yönde uygun bir ortam bulana kadar yayılarak kapatırlar. Bu

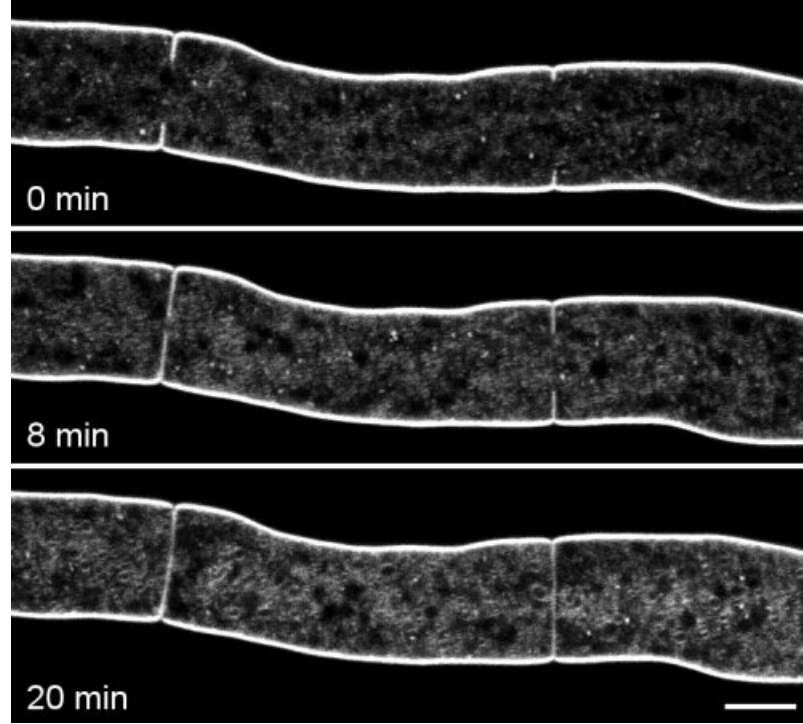
fungus yapıları, küf şeklinde dondurulmamış yiyeceklerde, görünür biçimde bulunur ve görebildiğimiz fungusun sadece bir kısmıdır (Audesirk ve ark. 2008).



Şekil 1.12. Filamentli bir beyaz çürükçül fungus olan *Phanerochaete cryosporium* hifalarının SEM görüntüsü (Dizge 2007)

1.3.2.2. Septum

Septum oluşumu genetik bir karakter olup hücre duvarının iç kısmından orijin alır ve içeri doğru uzayarak karşı duvara kadar devam eder. Yapısı hücre duvarının yapısı ile aynı kimyasal özelliktedir. Septum oluşumuna oomycetes ve zygomycetes sınıfı funguslar hariç diğer filamentli fungusların tümünde rastlanmaktadır (Arda 2000). Septumlar bölümler arasındaki turgor basıncına yapısal destek olarak hifaların rijitliğini artırır (Carlile ve Watkinson 2000) (Şekil 1.13).



Şekil 1.13. *Neurospora crassa* suşunda FM4-64 ile boyanarak gözlemlenmiş septum oluşumu. Septum dışında boyanan yerler yalnızca plazma membrandır (Swamy ve Ramsay 1999)

Yapılan elektron mikroskop incelemelerinde iki tür septumun varlığı belirlenmiştir; Birincil septum, bu tür septum genellikle ascomycetes ve deuteromycetes sınıfına ait fungus türlerinde bulunmaktadır. Bu septumun ortasına yakın yerde 0,005-0,5 μm çapında tek bir por bulunmaktadır ve bu por gerektiğinde kapanabilmektedir. İkincil septum, bu tür septuma basidiomycetes sınıfına ait funguslarda ve gelişmenin bazı aşamalarında rastlanmaktadır. Bu türde septumun ortasında çok dar bir delik (100–200 nm) vardır. Etrafı amorf ve kabarık bir zarla çevrilidir (Arda 2000).

Septumun fonksiyonlarını sıralayacak olursak;

- yapısal destek,
- hifalar zarar gördüğünde ilk savunma alanı olması,
- funguslar arasında farklılaşmaya yardımcı olmasıdır (Dizge 2007).

1.3.2.3. Hücre Duvarı

Genel olarak hücre duvarı; karbohidrat, protein, yağlar ve çok çeşitli polisakkaritlerle birlikte bağlanmış fibril (lifsi) materyallerden oluşur. Fibriler materyal, oldukça inert olmasına karşın içerdiği materyaller zamanla değişebilir. Bu fonksiyonel bileşenler besin taşınması, iletişim, substratlara karşı geçirgen olmaması (non-permeable) ve hücre duvarı modifikasyonları için oldukça önemlidir (Carlile ve Watkinson 2000). Hücre duvarının fibril özelliğini, kitin ve selüloz verir. Bunlar, N-asetilglukozamin ve glikoz polimerlerinin β -1,4 tarzında birleşmesinden meydana gelmiş düz zincirlerdir (Carlile ve Watkinson 2000).

1.3.2.4. Vesikül

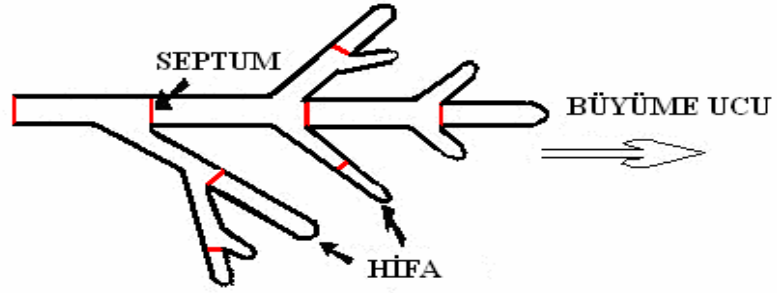
Büyümekte olan hifalar vesikül açısından oldukça zengindir. Vesiküllerin içinde, hücre duvarının sentezinde ve aynı zamanda, lizisinde görevli olan enzimler, inorganik elementler, polisakkaritler, lipitler bulunur. Bunları büyümekte olan hücre duvarı bölgesine taşırlar (Arda 2000).

1.3.2.5. Çekirdek ve Çekirdekçik

Fungus hücrelerinde, çekirdekler genellikle küçüktürler. Her hücrede bir tane çekirdek olmasına karşın çok genç ve çabuk üreyen hifalarda bazen birden çok çekirdeğe rastlanabilmektedir (Arda 2000).

1.3.3. Funguslarda Büyüme ve Üreme

Filamentli funguslarda hücre üremesi ile büyüme birbiri ile yakından ilişkilidir. Funguslar, hifaların genellikle uç kısmından büyüme ve dolayısıyla de üreme gösterir (Şekil 1.14). Hifalardaki bu büyüme ışık mikroskopunda gözlenebilmektedir. Funguslar sporlu, eşeyli ve eşeysiz olarak üreme yeteneğine sahiptir. Miselyumlar olgunlaşır ve yeterince gıda depo ederse veya çevresel koşullar sporlanmaya uygun ise, hifalarda sporlar gelişir. Sporlar olgunlaştıktan sonra hifadan ayrılarak serbest hale gelir ve böylece uygun koşullarda çimlenerek kendi türüne özgü fungusu oluştururlar. Sporların stoplazmasında çekirdek, vakuol, yağ ve bir fungusun oluşumuna yetecek miktarda inorganik ve organik maddeler vardır (Arda 2000).



Şekil 1.14. Fungusların hifalardaki büyümesi

1.3.4. Fungusların Üremesinde Etkili Olan Faktörler

Nem fungusların üremelerinde çok önemli faktörlerden birini oluşturmaktadır. Yüksek orandaki nem, genellikle, üreme üzerine olumlu etkide bulunur. Nem azaldıkça, fungusların çoğalmaları da sınırlanmaya başlar. Fungusların neme olan gereksinimleri, türler arasında değişiklik gösterir. Bazı fungus türleri bağıl nemi %10-15 arasında bulunan ortamlarda veya suyu çok azalmış olan kuru tanelerde üreme yeteneğine sahiptirler (Aykut 2010). Patojenik fungusların, özellikle, dermatofitlerin insan veya hayvan vücutlarında yerleşebilmesi ve hatta hastalık oluşturabilmesi için nem yine önemli bir faktördür. Eğer deri, su ile ıslanmış ise, fungusların yerleşmesi ve üremesi daha kolay olmaktadır.

Fungusların üreme ısısı limitleri oldukça geniştir ve türler arasında farklar gösterir. Bu sınırlar, 0 °C ile 60 °C arasında değişebilmektedir. Hifalar maksimum ısı limitinin üstünde kolayca ölmelerine karşılık, sporları yüksek ısıya ve değişik çevre koşullarına çok fazla dayanıklılık gösterirler. Buzdolabında düşük sıcaklıklarda üreyebilen ve gıdaların bozulmasına neden olan funguslara her zaman rastlamak mümkündür. Çok fazla soğuk, fungusların muhafazasında kullanılmaktadır. -195 °C'de funguslar uzun süre canlı kalabilirler (Arda 2000, Audesirk ve ark. 2008). Funguslar genellikle, aerobik karakter taşırlar ve oksijenin bulunduğu ortamlarda gelişirler ve ürerler. Bu nedenle, havada bulunduğu miktar (veya oran) kadar oksijen, üreme için gereklidir. Patojenik funguslardan, bazı *Actinomyces* türleri hariç, diğerleri aerobik koşullarda ürerler. Oksijenin azlığı veya mikroaerofilik koşullar üremeyi ve gelişmeyi sınırlar.

Fungusların üremeleri için ışık, gereksinim duyulan önemli bir faktör değildir. Işık olmadan da kolayca gelişebilirler. Patojenik funguslar da direkt ışık olmadan

üreyebilme yeteneğine sahiptirler. Direkt güneş ışınları, üremeyi ve gelişmeyi sınırlar (Audesirk ve ark. 2008).

1.3.5. Fungusların İnsan Yaşamındaki Yeri

Funguslar hayatımızda tahmin edilenden daha fazla yer tutarlar. Funguslar insanlar için önemli olan bitkilere saldırırlar. Funguslar bitki hastalıklarının temelini oluştururlar ve fungus patojenlerinin dünyanın gıda kaynaklarına tahrip edici etkisi vardır. Özellikle etkili olan basidiomisetler mısır tohumlarında milyon dolarlık yıkıcı etki yaratırlar. Funguslar bitkilerin gelişme süreçlerinde bile tahrip etmeye devam ederler. Özellikle kaygı verici olan ağaçları çürüten funguslardır. Bazı ascomycetler üremeleri için elverişli sıcak iklimlerde özellikle pamuk ve yün tekstillere zarar veren selülaz ve proteaz enzimlerini salgırlarlar. Fungusların tarımsal etkilerinin pozitif yanları da mevcuttur. Böceklere saldıran fungus parazitleri pestisit kontrolünde oldukça etkilidir. Bunun yanısıra biyologlar bazı fungus türlerinin sıtma taşıyan sivrisineklere de saldırdıklarını keşfetmişlerdir (Audesirk ve ark. 2008).

1.3.6. Funguslarda Beslenme

Fungusların kendine özgü beslenme tarzları bulunmaktadır. Enerji kaynağı ve biyosentez için organik bileşiklere gereksinim duyarlar. Funguslar karbon ve enerjiyi birçok substrattan temin edebilirler. Doğada serbest olarak yaşayan fungusların birçoğu enerji için bitkisel kökenli kaynaklardan yararlanırlar (Arda 2000). Funguslar gıdalarının bir kısmını kendileri sentezleyebilirler. Ancak, büyük bir bölümünü de dışardan sağlar. Dışarıda bulunan makromolekül veya polimerlerin membrandan girebilmesi ekstraselüler enzimlerin aktiviteleri ile mümkündür. Bu enzimler hücre içinde sentezlendikten sonra, bir kısmı hücre içinde kalır ve diğer kısmı ise dışarıya salınır. Enzimler hücre dışındaki polimerleri monomer haline getirdikten sonra aktif / pasif taşıma ile monomerler hücre içine alınır (Arda 2000).

1.3.7. Beyaz Çürükçül Funguslar

Basidiyomiset ve askomisetler, odunda beyaz çürükçüllüğün başlıca nedenidir. Beyaz çürükçüllüğe sebep olan türler kahverengi çürükçüllüğe neden olanlardan çok daha fazladır. Bu türler genelde basidiyomisetler 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).

Basidiomycetes 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 chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sajor-caju* ve *Pleurotus eryngii*'yi örnek olarak verebiliriz. İlk çalışmalarda *P. chrysosporium* üzerine yoğunlaşılmasına rağmen, son zamanlarda *T. versicolor*, *P. eryngii* ve *Clitocybula dusenii* tekstil atık sularının renk gideriminde çok geniş kullanım alanı bulmaktadır (Wesenberg ve ark. 2002, Chagas ve Durrant 2001, Aretxago ve ark. 2001).

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, H₂O₂ üreten enzimlerdirler. Lakkazlar ise H₂O₂ oluşturmadan ya da H₂O₂'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 bileşik substrat özgünlüğü geniş 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 ekstrasellüler 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). Lignini parçalayan funguslardan *P. cryosporium* ve *T. versicolor* en çok çalışılmış olan funguslardır. Ligninolitik basidiomycete *P. cryosporium*'un lignini oldukça iyi degrade ettiği bulunmuştur ve ligninin biyolojik olarak parçalanmasının fizyolojik gereksinimlerinin çalışılması için model organizma olarak kullanılmaktadır. *P. cryosporium*'un ligninolitik enzimleri sadece karbon, azot veya kükürt sınırlamasıyla tetiklenen sıvı kültürlerde sekonder metabolitler olarak ürettiği bulunmuştur (Call ve Mucke 1997). *T. versicolor* oldukça fazla çalışılmış ve önemli miktarda lakkaz salgılayan bir diğer beyaz çürükçül fungustur. *Coriolus versicolor* ve *Polyporus versicolor* olarakta bilinmektedir. *P. cryosporium*'a benzer şekilde *T. versicolor*'da lignin peroksidaz ve mangan peroksidaz enzimlerini de salgırlar. 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. *T. versicolor* en çok çalışılmış lakkaz üreten fungustur ve lakkaz hakkındaki birçok bilgi bu çalışmalardan elde edilmiştir (Call ve Mucke 1997).

1.3.7.1. *Trametes versicolor*

Polyporaceae grubuna ait bu fungus *Coriolus versicolor* ve *Polyporus versicolor* adlarıyla da bilinmektedir. Yüzey ince tüylü, organizmanın genetiğine ve bulunduğu çevreye göre değişen farklı renk tonlarına sahip yoğun renkli halkalar yeşil, gri, mavi, kahverengi, sarı, pas sarısı kuşaklar kenarları krem veya beyaz renkli bir kuşakla çerçevelemiştir (Şekil 1.15). Hindi kuyruğunu andırır. Dünyada çok yaygın olup odun tahripçisidir. Bu fungus bazen beyaz çürükçül olarak bazen de parazit olarak ağaçlar üzerinde görülür. İlkbahar ve sonbaharda ölü ve kurumak üzere olan ağaç kütüklerinde toplu şekilde çıkar (Şekil 1.16). Bu fungusun sahip olduğu ligninolitik enzimleri çevre biyoteknolojisi başta olmak üzere biyoteknolojide çok geniş bir şekilde kullanılmaktadır. Aynı zamanda bu fungusun tıbbi değeri yüksek bileşikleri de sentezledikleri bilinmektedir (Stamets 2000).



Şekil 1.15. *Trametes versicolor*'ın konsantrik renkli halkalarını gösteren doğadan bir görüntü (www.ilmyco.gen)



Şekil 1.16. Toplu halde çıkmış *Trametes versicolor*'ın doğadan bir görüntüsü (www.hiddenforest.co.nz)

1.3.7.2. *Phanerochaete chrysosporium*

Beyaz çürükçül funguslar olarak bilinen gruba dahil olan *P. chrysosporium* çeşitli biyosorpsiyon çalışmalarında kullanılan model organizmadır (Şekil 1.17) (Yetiş 1998, 2000). Ayrıca oksidasyon enzimlerini kullanmak sureti ile organik kirleticilerin parçalanması yönünde de *P. chrysosporium* kullanılarak birçok çalışma yürütülmüştür (Gadd 2000). *P. chrysosporium*'un metal bağlama kinetikleri detaylı bir biçimde incelenmiştir (Baldiran 2003). *P. chrysosporium* katı ve sıvı ortamlarda yaşayabilir. Ayrıca sınırlı besine de sahip olsalar ksenobiyotikleri etkili şekilde parçalama yeteneği sergilerler. Bu özelliklerinden dolayı kompleks çevre kirliliğinin bulunduğu ortamlara kolayca adapte olabilir ve inoküle (aşılandıkları) edildikleri toprakta diğer mikroorganizmalardan daha etkili şekilde büyür. Bu durum metal ile kirlenmiş toprakların bioremediasyonu (iyileştirme) için bir avantaj teşkil eder (Yu 2006).



Şekil 1.17. *Phanerochaete chrysosporium*'un doğadan bir görüntüsü (Volk 2007)

1.4. Beyaz Çürükçül Fungusların Salgıladığı Ligninolitik Enzimler

Ağaçta beyaz çürümeye neden olan, basidiomycete fungusları doğadaki en verimli lignin parçalayıcı ve muhtemelen doğadaki lignin içeren dokuların karbon döngülerini sağlayan birincil ajanlardır (Kirk ve Farrel 1987, Eriksson ve Jonson 1990). Bu funguslar taksonomik olarak heterojen yüksek funguslara dahil bir gruptur, ama en

büyük özellikleri, bir takım ekstraselüler ligninolitik enzimler kullanarak lignini parçalayabilme yeteneği olan tek fungus türü olmalarıdır (Akthar 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 proselerini 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.

Ligninin parçalanma derecesi odunun diğer bileşenlerin çevre koşullarına ve içerdiği fungus çeşitlerine bağlıdır ve bunun gerçekleşmesi için tek bir mekanizma olmadığı ve de bu mekanizmanın mikroorganizmalar arasında farklılık gösterdiği kanıtlanmıştır. Örneğin *Pleurotus 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).

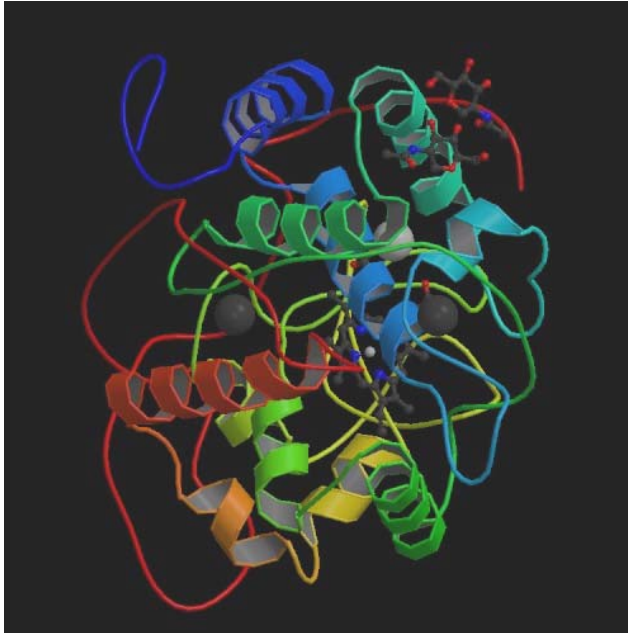
1.4.1. Peroksidazlar

Peroksidazlar Hem (heme) grubu içeren enzimlerdir. Hem peroksidazlar *Phanerochaete cryosporium* gibi lignini parçalayan basidiomycete'ler tarafından üretilir (Munirathinam ve ark. 1994). Substrat spektrasına dayalı olarak ikiye ayrılır. Birinci tür mangan peroksidaz (MnP)'dir 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 peroksite (H_2O_2) ihtiyaç duyarlar (Mester ve ark. 1996).

1.4.1.1. Mangan Peroksidaz

Mangan peroksidaz (MnP), hemen hemen tüm beyaz ve kahverengi çürükçül fungusların en yaygın ürettiği ligninolitik peroksidazdır (Hatakka 1994, Willman ve Fakoussa 1997). *P.chrysosporium*'dan elde edilen manganaz peroksidaz ilk olarak yaklaşık 25 yıl önce tanımlanmıştır (Kuwahara ve ark. 1984, Paszcynski ve ark. 1986).

MnP'in belirgin özelliği, yapıdaki aktif bölümde iki adet kalsiyum iyonunun bulunmasıdır. Aktif bölgesi Asp rezüdüsüne H- bağlı bir His ligandı ve cep içeren katalitik Arg ve His bağlı peroksit distal tarafı içerir (Banci, 1997). MnP beş adet disülfür bağı 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+} 'ye yükseltme kabiliyeti konusunda eşsizdir. MnP'in substrat bağlanan bölgenin kristal yapısı, sadece bir Mn bağlanma bölgesi olduğunu gösterir. Mn^{2+} bağlanma bölgesi, bir Hem propiyonik asit, üç asidik ligan ve iki su molekülü içerir (Glenn ve Gold 1985). Mangan peroksidaz iki domainden oluşur ve Hem grubu bu iki domain arasında sıkışıp kalmıştır. Domainlerin herbiri 10 büyük ve 1 adet küçük heliks yapı içerir (Welinder ve Gajhede 1993).

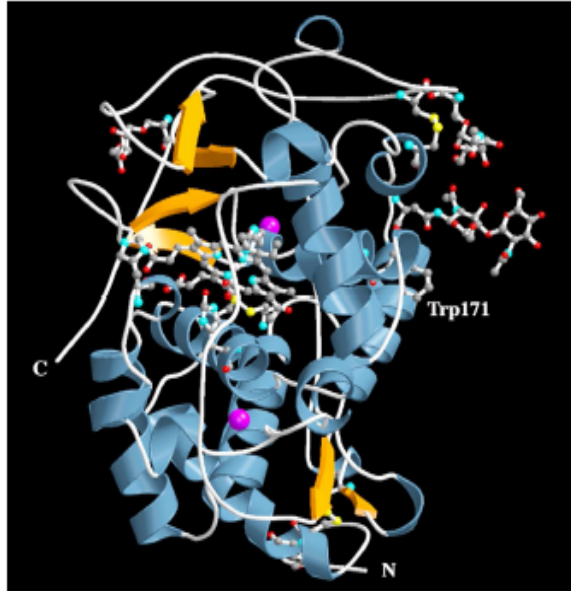


Şekil 1.18. Mangan peroksidazın kristal yapısı (Dizge 2007)

1.4.1.2. Lignin Peroksidaz

Lignin peroksidaz (LiP), beyaz çürükçül fungus *P. cryosporium*'un ligninolitik kültüründen izole edilmiş Hem grubu içeren bir glikoprotein (Şekil 1.19) 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 (Ferafontova ve ark. 2006).



Şekil 1.19. Lignin peroksidazın kristal yapısı
(Renganathan ve Gold 1994)

1.4.2. Fenoloksidazlar

Mavi bakır enzimleri olarakta bilinen fenoloksidazlar, içerdikleri 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 (a) 1997). Substrat olarak moleküler oksijen (O₂) 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. -. -. -)

1.4.3. Lakkaz

Lakkaz (EC 1.10.3.2, p-difenol: dioksijen oksidoredüktaz), 19. yy'dan beri üzerinde çalışmalar yapılan birkaç enzimden birisidir. İlk defa 1883 yılında Yoshida tarafından Japon vernik ağacından, *Rhus vernicifera*'dan elde edilmiştir. 1896 yılında, Bertrand ve Laborde lakkazın ilk defa fungus esaslı bir enzim olduğunu kanıtlamıştır. Lakkaz, küçük bir enzim grubu olan mavi bakır proteinleri ya da mavi bakır oksidazların bir üyesidir. Mavi bakır proteini grubundaki diğer enzimler, bitkisel askorbat oksidazlar ve memeli plazmasındaki seruloplazmin proteinleridir (Chakar 1999, Bar 2001).

Lakkazlar orto ve para-difenoller, amino fenoller, poliaminler ve lignin gibi geniş bir substrat özgünlüğüne sahiptirler. Çeşitli aromatik ve aromatik olmayan bileşikleri radikal katalizleme reaksiyon mekanizmasına göre oksitlerler (Claus 2004). İndirgenen substrattan dört elektronu bir oksijen molekülüne transfer ederek oksijenin suya indirgenmesini sağlarlar (Chakar 1999).

Lakkazlar, bakır içeren oksidazlardandır. Enzimin kökenine bağlı olarak yapılarındaki karbohidrat içeriği, protein miktarının ağırlıkça %10-45'ini

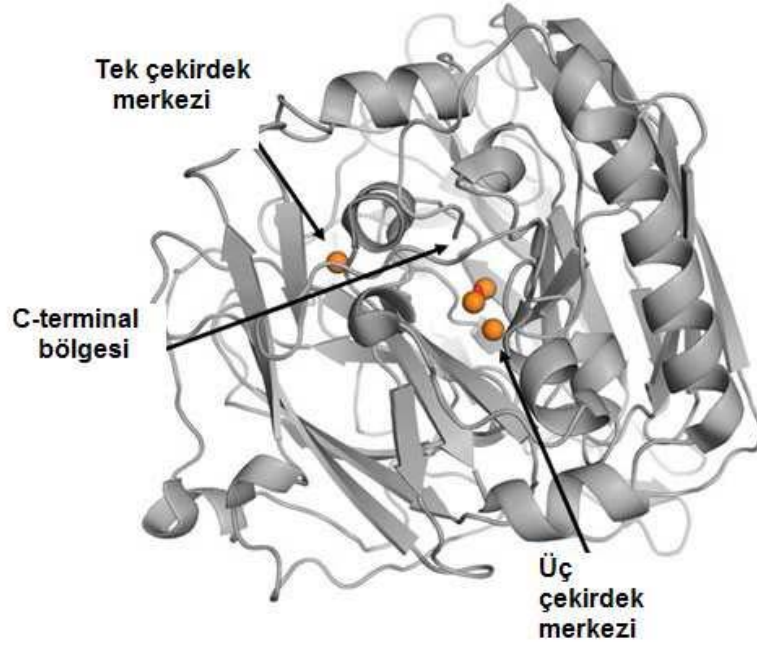
oluşturmaktadır. Lakkaz zincirinde değişiklik göstermekle birlikte yaklaşık 500 amino asit bulunmaktadır (Chakar 1999, Claus 2004). Pek çok fenolik substratın tek-elektronlu oksidasyonunu katalizlerler. Moleküler oksijen elektron alıcısı olarak davranır ve böylece iki su molekülüne indirgenir. Lakkaz, fenolik bileşikleri yükseltgeyebilmesinin yanı sıra, moleküler oksijeni suya indirgeme kabiliyeti nedeniyle üzerinde yoğun çalışmalar yapılan bir enzim olmuştur. Lakkazların fabrika atık sularının renksizleştirilmesinden kağıt hamurunun ağartılmasına, şaraptaki fenolik maddelerin uzaklaştırılmasından deterjanlardaki boyarmadde transferini bloke etme fonksiyonuna kadar çoğu patentli geniş uygulama alanları mevcuttur.

Normalde fenolik olmayan bileşiklere karşı etkili olmadıkları halde, bu bileşiklere karşı etkinlik göstermelerini sağlayan medyatör (aracı) olarak adlandırılan küçük moleküllerle birlikte biyoteknolojide kullanım alanları oldukça yaygınlaşmıştır.

Lakkaz *P. chrysosporium*'da rastlantısal olarak bulunduğu ilk zamanlarda, düşük miktarlarda ve sadece spesifik şartlarda üretilebilen bir enzimdi. Bu nedenle lakkaz, fungusun buğday samanında inkübasyonuna kadar istenilen miktarda elde edilememiştir (Srinivasan ve ark. 1995, Dittmer ve ark. 1997). En verimli ham lakkaz *T. versicolor*'dan elde edilmiştir (Bourbannis ve ark. 1997). Farklı kökenli lakkazların farklı performanslarının aminoasit dizilişlerinden ve buna bağlı olarak lakkazın yapısındaki Tip-1 bakırın çevresinden kaynaklandığı ifade edilmektedir (Li ve ark. 1999).

1.4.3.1. Lakkazların Yapıları ve Katalitik Mekanizmaları

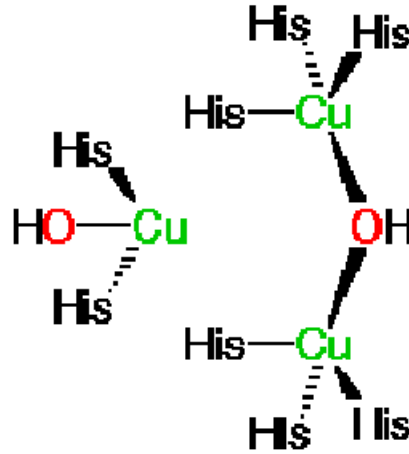
Lakkaz enzimi yapısal olarak bir glikoproteindir. Enzimin içerdiği karbonhidrat kısmı, heksozamin, glikoz, mannoz, galaktoz, fruktoz ve arabinozdan oluşmuştur. Değişik kaynaklardan elde edilen lakkazın molekül ağırlığı geniş bir aralıkta değişir (Yarapolov ve ark. 1994).



Şekil 1.20. Lakkaz enziminin kristal yapısı (Claus 2004)

Bütün lakkazların yapılarında, (büyüklikleri ve şekilleri yaklaşık olarak benzer) bakır içeren T1, T2 ve T3 bölgelerini bulundurmaz (Hakulinen ve ark. 2002) (Şekil 1.20). Bakırın bulunduğu bölgeler, bitkisel, plautosiyanın ve bakteriyel azurin gibi basit bakır ihtiva eden proteinlere benzediği gibi (Norris 1983, Inoue 1999) daha kompleks çok sayıda bakır içeren askorbat oksidaz (Messerschmidt (b) 1997) ve seruloplazmin (Murphy ve ark. 1997) gibi proteinleriyle benzerlik gösterir. Bu üç bölge de lakkazın katalitik etkinliği için önemlidir. T2 ve T3 bölgeleri arasındaki yarı substratın bağlanma noktasını oluşturur. Mononükleer bakır merkezi, iki His ve bir Cys artığıyla trigonal olarak koordine olmuş bir Cu atomunda (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 özelliktir (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 paramagnetikler ve elektron paramagnetik rezonans (EPR) spektroskopisi ile tayin edilebilirler. T3 bakır çiftinde, bakırlar birbirlerine hidroksil köprüsü (şekil 1.21) ile bağlandıklarından EPR de sinyal vermezler, ancak 330 nm de karakteristik bir absorbansa sahiptirler (Solomon ve ark. 1996).

Lakkazlar, difenoller ve benzer bileşikler yükseltgerken moleküler oksijeni elektron alıcısı olarak kullandıklarından enzim komisyonu (E.C) sınıflandırmasına göre oksidoredüktazdırlar. Bir çok enzim genellikle dar bir substrat özgünlüğüne sahipken, lakkazlar, difenoller, polifenoller, süstitüe fenoller, daiminler, aromatik aminler, benzeniyoller ve iyot gibi birkaç 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 1.21. Lakkazın aktif bölgesindeki bakır atomlarının düzenlenişi (Claus 2004).

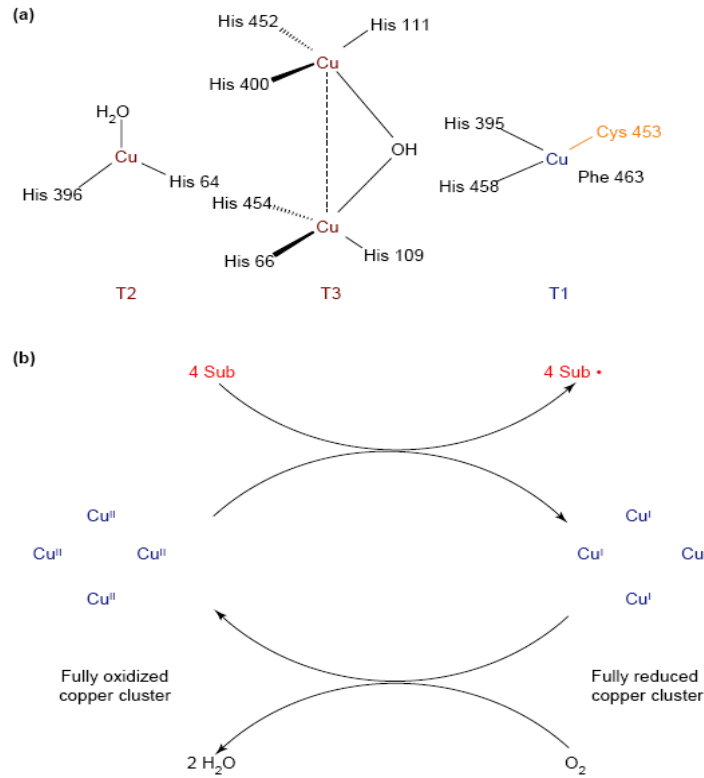
Substrat, lakkaz tarafından yükseltendiğinde T1 bakırına bir elektron verir. Oksijenin indirgenmesi ise trinükleer bakır merkezinde gerçekleşir (Bernard ve ark. 2002, Piontek 2002). Bir katalitik çevrimde dört elektronun His-Cys-His tripeptidi aracılığıyla T1'den T2/T3 kümesine taşındığı tahmin ediliyor (Messerschmidt ve ark. 1992, Bernard ve ark. 2002, Piontek 2002). Lakkazların reaksiyon mekanizmaları reaksiyon çevrimi esnasında bakırların yükseltgenme basamakları 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, Soloman ve ark. 1996, Lee ve ark. 2002). Moleküler oksijen, tamamen indirgenmiş lakkazı muhtemelen peroksit ara ürün üzerinden yükseltgerken 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 ana ara ürününün oluşmasına yol açar. Bu ana ara üründe dört Cu atomu da yükseltgenmiş formda (Cu^{2+}) ve trinükleer merkezdeki üç Cu atomu hidroksit veya okzo köprüleri ile bağlanmış durumdadırlar. Bu köprüler ana ara ürünün indirgenmesini ve enzimin hızlı bir şekilde yeni bir çevrime girmesine olanak sağlar (Forootanfar ve ark. 2011).

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 ve ark. 2002). İkincisi substratın redoks potansiyelinin yeterince düşük olmasına bağlıdır. Çünkü lakkaz katalizi reaksiyonların hızının enzim ve substratın redoks potansiyelleri arasındaki farka (ΔE^0) bağlı olduğu gösterilmiştir (Xu 1996, Xu ve ark. 1996, Xu ve ark. 2000, Xu ve ark. 2001). Substratın redoks potansiyeli onun kimyasal yapısını belirler. Çünkü farklı substitüenlerin, elektron çekme ve verme arzularına bağlı olarak, substratın sahip olacağı redoks potansiyeli üzerinde farklı etkileri vardır (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).

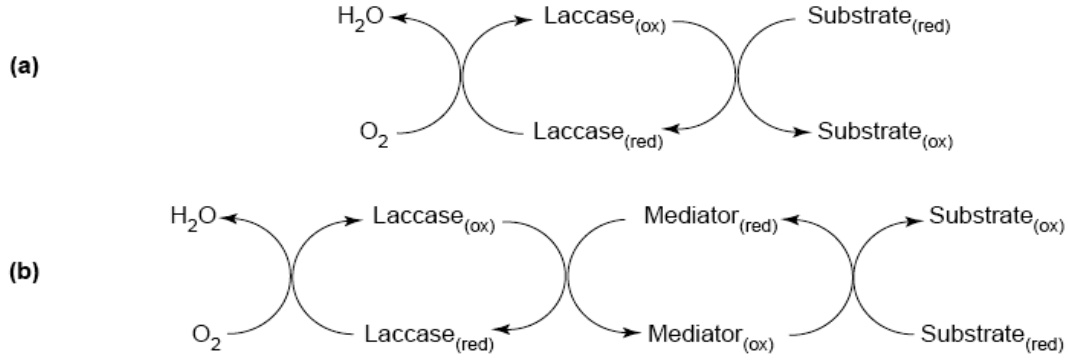
$\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{+}$ 'in sudaki redoks potansiyeli 0.15 V iken, lakkazların redoks potansiyelleri 0.4-0.8 V arasında değişir. Bunun değerini belirleyen en önemli kriter T1 Cu'nun çevresidir (Xu ve ark. 1996, Palmer ve ark. 1999, Xu ve ark. 1999). T1 bakırının aksiyal ligandının redoks potansiyelinin oluşmasında özel bir önemi olduğu düşünülmektedir. 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 *Trametes 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,

düşükse düşük kaldığı gözlenmiştir (Xu ve ark. 1997, Xu ve ark.1999). Bu sonuçlara dayanarak Piontek ve ark. (2002) redoks potansiyelinin geniş bir etkileşim ağından kaynaklanabileceği örneğin T1 bakırının çevresindeki hidrojen bağlarının T1 bakırı ile N_{His} arasındaki kordinasyon bağının boyunun belirlenmesi gibi bağlı olabileceğini iddia etmektedirler. Çünkü hidrojen bağları His artığını T1 bakırından uzaklaştırarak gerer. Bunun sonucunda bakır atomunun üzerindeki elektron yoğunluğu düşer (Şekil 1.27).



Şekil 1.22. *T. versicolor* Lakkazının aktif merkezlerinin yapısı ve gerçekleştirdikleri çevirimin şematik gösterimi (Riva 2006)

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 1.23).



Şekil 1.23. Lakkaz katalizli redoks çevrimlerinde kimyasal medyatör yokluğunda (a) ve varlığında (b) substratın yükseltgenmesinin şematik gösterimi (Riva 2006)

1.4.3.2. Lakkazların Biyokimyasal özellikleri

Bir enzimin katalitik etkinliği kantitatif olarak michels menten sabiti K_M ve katalitik yeterlilik sabiti k_{cat} ile tanımlanır. Bu sabitler çok sayıda lakkaz için ölçülmüştür. Bunlar kaynaklarına bağlı olarak değişiklik gösterir. Lakkazların K_M değerleri indirgenen substrata ve enzimin kaynağına bağlı olarak 2-500 μ M aralığında değişir. Düşük K_M değerleri siringaldazin ile ölçülmüştür (Xu ve ark. 1996). Katalitik etkinlik sabitlerinde (k_{cat}) 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 reaksiyon hızı olarak tanımlanır (Xu 2001). Bu ölçümler sonuçlar üzerinde büyük etkisi olan değişik pH, iyonik şiddet, sıcaklık koşulları ve farklı protein derişimlerinde ölçümler 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⁻ iyonlarının inhibisyonundan kaynaklanmaktadır (Xu 1997). Diğer yandan pH yükselmesi fenolik substratların redoks potansiyelini düşürür, bu da lakkazı substrat tarafından oksidasyona dirençli kılar (Xu 1997). pH çan eğrisi profili iki karşıt etkinin

sonucudur: $\Delta E^0_{[\text{lakkaz-substrat}]}$ yükselmesi ve OH⁻ tarafından inhibisyonu (Xu 1997). ABTS gibi fenolik olmayan substratların oksidasyonu proton değişimi içermez ve bu yüzden tek düzeliği göstererek optimal pH değerine 2-3 arasında ulaşır (Hofman ve Esser 1997, Garzillo ve ark. 2001).

Lakkazların sıcaklık kararlılıkları, kaynak organizmaya bağlı olarak anlamlı ölçüde değişiklik gösterir. Genellikle lakkazlar 30-50 °C'de kararlıdır ve 60 °C üzerinde aktivitelerini hızlı bir şekilde kaybederler (Wood 1980, Xu ve ark. 1996, Chefetz 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 lavendulae* (Suzuki ve ark. 2003) lakkazının yarılanma ömrü 70 °C iken *Bacillus subtilis* COA'nın lakkazı 80 °C'de 112 dak'dır (Martins ve ark. 2002). Fungal lakkazların yarılanma ömrü genellikle 70 °C'de 60 dak'nın altında ve 80 °C'de 10 dak'nın altındadır (Wood 1980, Nishizawa ve ark. 1995, Xu ve ark. 1996, Chefetz ve ark. 1998, Schneider ve ark. 1999, Galhaup ve ark. 2002, Jung ve ark. 2002, Palonen ve ark. 2003).

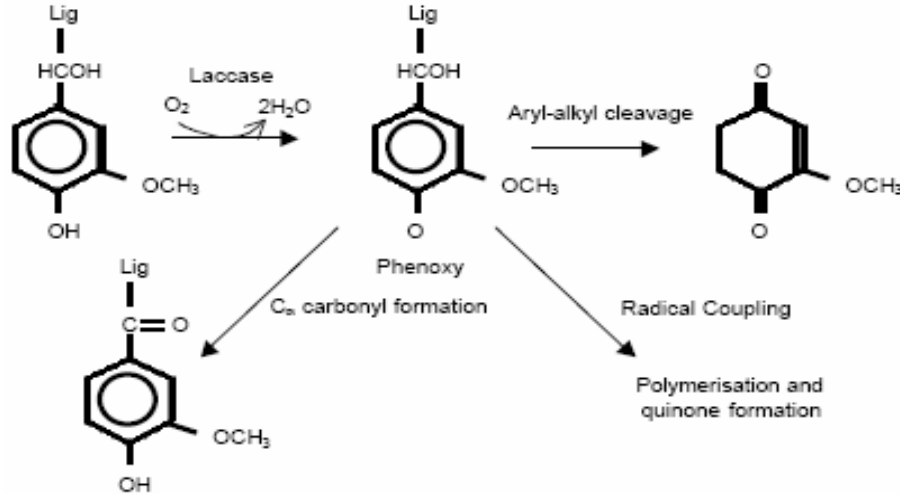
1.4.3.3. Lakkaz ve İnhibitörleri

Lakkazlar çeşitli reaktiflerle çok güçlü bir şekilde inhibe edilebilir. Azid, halid, siyanür, tiyosiyonür, flor ve Tip2-Tip3 bakıra bağlı hidroksit gibi küçük anyonlar; iç elektron transferini bozarak enzim aktivitesinin inhibisyonuna neden olmaktadır (Baldrian 2006). Diğer inhibitörler; Hg²⁺ gibi metal iyonları, yağ asitleri, sülfidril reaktifleri, hidroksiglisin, kojik asit, desferal ve katyonik kuarterner amonyum deterjanları sayılabilir. Bunlar Cu iyonlarına bağlanarak proteinin konformasyonunda değişikliğe yol açmaktadırlar. Bu, şelatlayıcı ajanlara karşı olan duyarlılığın bir sonucudur.

1.4.3.4. Lakkaz ile Katalizlenen Reaksiyonlar

Substratın tek elektronlu oksidasyonu neticesinde oksijenin dört elektronlu indirgenmesi söz konusudur, dolayısıyla reaksiyon mekanizmasının basit (doğrudan) olması beklenemez. Oluşan ilk ürün kararsızdır ve başka bir enzim tarafından katalizlenen oksidasyon reaksiyonuna katılabileceği gibi diğer taraftan enzimatik olmayan hidrasyon ya da polimerizasyon reaksiyonlarına girebilir. Doğal bir substrat

olan ligninde lakkaz tarafından bölünen bağlar, C_α - oksidasyon, C_α - C_β bölünme ve aril-alkil bölünme reaksiyonlarıdır (Bar 2001).



Şekil 1.24. Odundaki fenolik grupların lakkaz ile oksidasyonu (Archibald ve ark. 1997)

Substratların oksidasyonu sonucunda enzimatik olmayan reaksiyonlara giren reaktif radikaller oluşur (Şekil.1.24). Bu reaktif radikaller;

i. Monomerlerin çapraz bağlanması: fenolik bileşiklerin ve anilinlerin lakkaz tarafından enzimatik oksitlenmesi sonucunda birbirine C-C, CO, C-N bağları ile kovalent birleşebilen dimer, oligomer ya da polimerler oluşmaktadır. Lakkazın bu özelliğinden zehirli toprak ya da atık suların arındırılmasında faydalanılmaktadır.

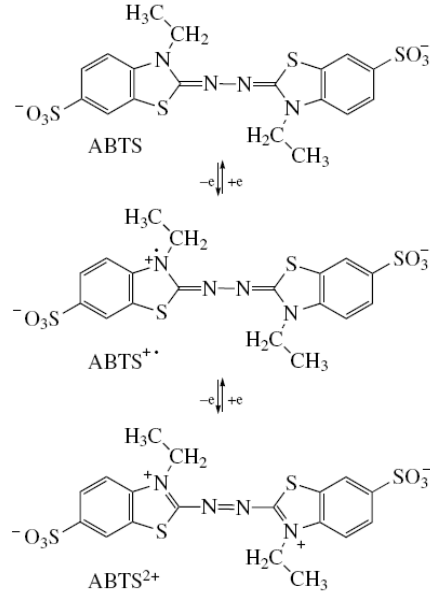
ii. Polimerlerin parçalanması: lakkazlar, kompleks doğal polimerleri parçalayabilmektedirler. Oluşan reaktif radikaller, kovalent bağların bölünmesini ve böylece monomerlerin açığa çıkmasını sağlamaktadır. Enzimlerin ulaşamayıp direkt temas edemediği polimerler, lakkaz tarafından aktifleştirilen küçük organik bileşikler ya da metal iyonları tarafından depolimerize olabilir.

iii. Aromatiklerde halka açılması reaksiyonlarının lakkaz tarafından katalizlendiği belirtilmiştir (Claus 2004).

1.4.3.5. Lakkaz Medyatör Sistemleri

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. 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 (Fabbrini ve ark. 2002, Bourbonnais ve ark. 2000). Metal kompleksleri organik medyatörlerle kıyaslandıklarında daha pahalı oldukları ve çevre kirliliği açısından yeterli derecede güvenli olmadıkları için tercih edilmezler.

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). İlk aşamada $ABTS^{\cdot+}$ katyon radikali oluşur. Bunu katyon radikalinin $ABTS^{2+}$ ye yavaş bir şekilde yükseltgenmesi izler (Şekil 1.25). Ag/AgCl referans elektroda karşı $ABTS/ABTS^{\cdot+}$ çifti için redoks potansiyeli 0.472 V ve $ABTS^{\cdot+}/ABTS^{2+}$ için 0.885 V olarak ölçülmüştür.



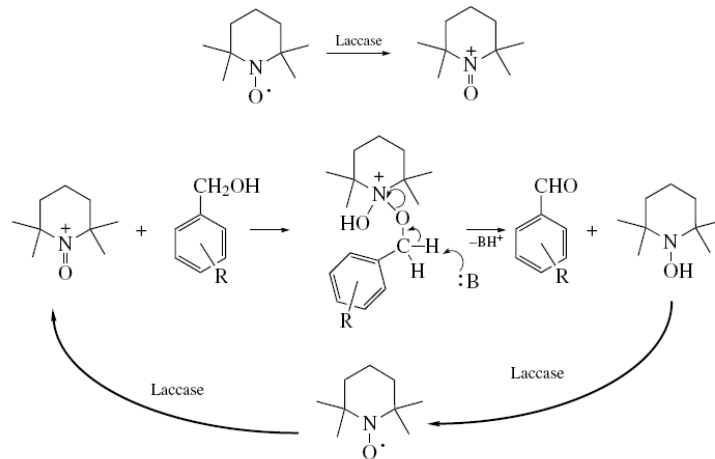
Şekil 1.25. ABTS’de elektron akışı (Fabbrini ve ark. 2002)

Yapılan araştırmalarda ligninin fenol gruplarının lakkaz tarafından yükseltgenmesi ABTS’nin varlığında arttığı gösterilmiştir. Ancak ligninin fenol gruplarının yükseltgenmesi için ABTS^{+•} ne gereksinim duyulurken ABTS²⁺ fenolik olmayan grupların yükseltgenmesinde rol alır. Fakat ABTS^{+•} 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 ABTS²⁺ nin medyatör olarak etkimesi gerekirdi. Kaldı ki indigo boyanın yıkımında medyatör olarak etkiyen ABTS^{+•} işlem sonunda başlangıç yapısına (ABTS) indirgenir (Solís-Oba ve ark. 2005).

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

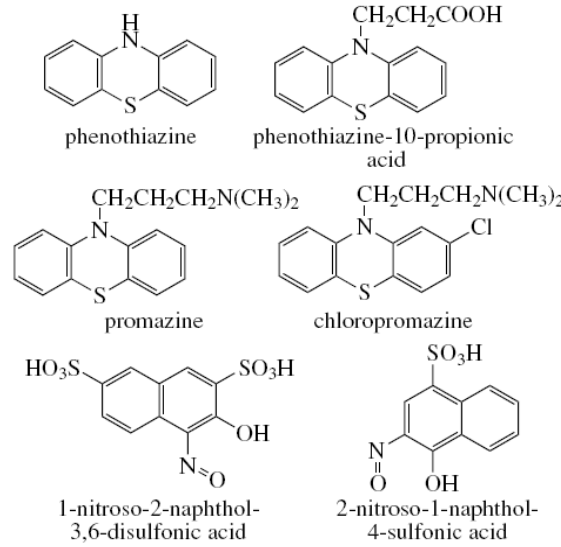
zamanlarda lakkazın katalitik etkinliğini İYİLEŞTİREN (lakkaz iyileştirici, Lİ) bileşiklerle ve işlem esnasında yer aldığına inanılan mekanizmaların aydınlatılmasına yönelik araştırmalar yapılmıştır. Bu bileşiklerin çoğu gerçek redoks medyatörü değildirler. Çünkü bir veya birkaç çevrimden sonra kimyasal transformasyon sonucu elimine olmaktadır. Lİ olarak kullanılan bileşikler genel olarak >N-OH veya >N-O yapısal gruplarını içerirler. 1-hidroksibenzotriazol (HBT), TEMPO, N-hidroksiftalimid (NHP), violurik asit (VA) ve N-hidroksiasetanilit (HAA) bu bileşiklerden bazılarıdır (Fabbrini ve ark. 2002, Xu ve ark. 2001, Sheldon ve Arends 2006). 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 ve ark. 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, NHP ve doğal lakkaz medyatörü 3-hidroksiantranilik asitten medyatör/iyileştirici olarak daha etkili bir bileşik olduğu gösterilmiştir (Fabbrini ve ark. 2002). 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 1.26. Lakkaz ve TEMPO'nun varlığında substratın yükseltgenme mekanizması (Fabbrini ve ark. 2002)

Lakkaz, TEMPO'yu substratla etkileşecek form olan okso-amonyum oluşturacak şekilde yükseltger. Proton ayrılması TEMPO'nun yükseltgenmiş ve indirgenmiş (N-OH) formlarını ürün olarak verir. İndirgenmiş TEMPO lakkaz tarafından yeniden oksamonyum verecek şekilde yükseltgenir (Şekil 1.26). Lakkaz iyileştirici olarak kullanılan diğer organik bileşik sınıflarından nitrozo bileşikleri ile fenotiyoazin türevleri sayılabilir (Şekil 1.27) (Bourbonnais ve ark. 1997, Int. Patent no. WO 2003023043 2003). Bir fenotiyoazin türevi olan fenotiyoazin-10-propiyonik asit tekstil endüstrisinde indigo deklorizasyonunda lakkaz medyatörü olarak Novazymes firması (Danimarka) tarafından DeniLite® ticari formülasyonunda kullanılmaktadır (Morozova ve ark. 2007). Ancak firmanın Türkiye distribütörlüğü ile yapılan görüşmelerde medyatör olarak Metil-Siringeyt kullanıldığı ifade edildi.



Şekil 1.27. Lakkaz medyatörü olarak kullanılan bazı bileşikler (Bourbonnais ve ark. 1990)

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

yükseltgemesinde 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 bileşiklerin varlığı fark edilmiştir (Leontievsky ve ark. 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 lakkazlar 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 lakkazı sahip olduğu absoprsiyon değerine sahip olmamasıdır. Bu lakkazlar herhangi bir redoks iyileştiricisine ya da medyatöre gereksinim duymadan fenolik olmayan model lignin yapılarını (örneğin veratril alkol veya dimerik bileşileri) yükseltgeyebilmektedir. *P. ostreatus*'un katı faz inokülasyonu ile medyatör olmaksızın antreseni, antrakinaona yükseltgeyen “SARI LAKKAZ” salgıladığı bilinmektedir (Pozdnyakova ve ark. 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.

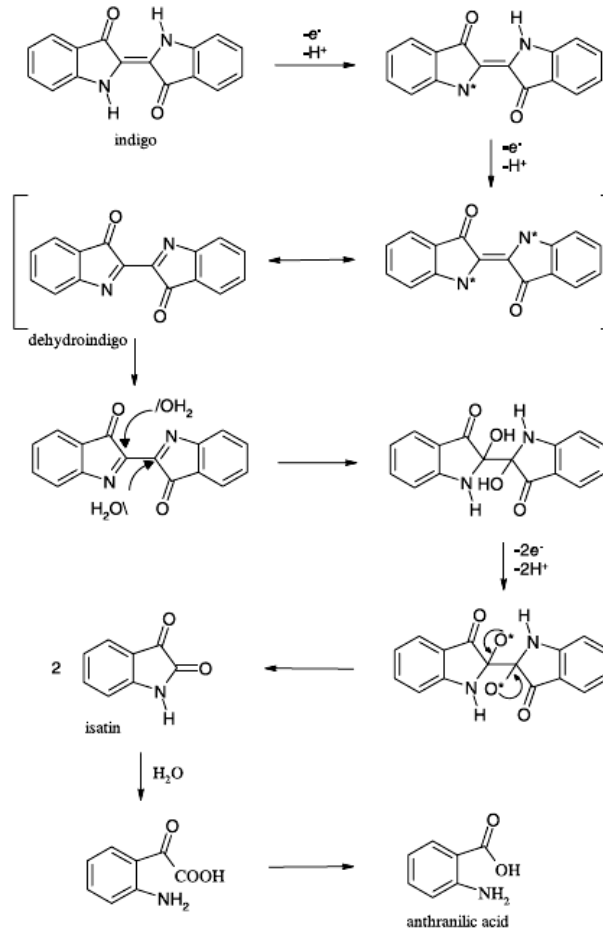
Lakkaz medyatörü seçiminde bir takım kriterlerin gözönüne alınması önerilmektedir (Shleev ve ark. 2004); 1. Bileşik konjüge çift bağlar, hetero siklik atomlar, -OH ve -NH₂ grupları gibi fonksiyonel gruplardan birkaçını ya da tümünü içermelidir. 2. Substarata bağlı olarak yeterli redoks potansiyeline 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 gözönüne alındığında lakkaz medyatörü potansiyeline sahip

yeni bileşiklerin araştırılmasının gerektiği düşünülmelidir. Örneğin 1-fenil-3-metilpirazolon-5; metil ve fenil gibi elektron verici süstitüe gruplar içeren heterosiklik bir bileşiktir. Çözeltide iki tautomerik formda bulunur.

Biyoteknolojide lakkaz ve LMS kullanılmasına yönelik çok sayıda makale ve patent bulunmaktadır (Duran ve ark. 2002, Minussi ve ark. 2002, Baldrian 2006, Riva 2006). Örneğin Danimarka'nın Novozymes şirketi birkaç lakkaz ve LMS formülü geliştirmiştir. DenLite® kumaş ağartmada ve Novozymes 51003® şişe fungusu üretimi modifikasyonunda ve Suberash® kağıt hamurunun delignifikasyonunda Dünya pazarında önemli bir paya sahiptir. Kağıt hamurunun ağartılması için 40-65 °C sıcaklık ve pH 4.5, basınç 10-14 barr, etki zamanı 1-4 saat, hamur kuru ağırlığının %0.01-2 kadar medyatör ve 20 U/g enzim miktarı reçete olarak verilmektedir (Call ve Mucke 1997).

Bunların dışında insektisit olarak kullanılan fosfoorganik bileşiklerin doğadaki parçalanma hızını artırmada da LMS kullanılmaktadır (JP Appl. no. JR2003128835 2003, Int. Patent no. WO 00078274, Morozova ve ark. 2000).

Moda yaratmak adına denim ürünlerinin eskitilmesinde pomza 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 azaltmaktadır. 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 maiyeti 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 1.28).



Şekil 1.28. Lakkaz katalizli indigo boya degradasyonu için olası bir mekanizma (Campos ve ark. 2001)

1.4.3.6. Lakkaz Üretimi ve İndükleyiciler

Lakkaz aktivitesi, bir çok fungi kültürlerinde tespit edilmiştir (Itoh ve Yatome 2004). Ham ve saflaştırılmış lakkaz, biyoteknolojik ve çevre uygulamalarında bolca 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) ve *Phlebia radiata* (Saloheimo ve ark. 1991) funguslarından izole edilerek dizisi çıkarılmıştır. Bu tarihlerden sonra saflaştırılarak dizisi çıkarılan lakkaz genlerinin sayısında dramatik bir artış olmuştur. İzole edilerek çıkarılan yüzlerce lakkaz geninden ancak birkaçının dizi homolojisi gösterdiği bulunmuştur. Tipik bir lakkaz geni 500-600

amino asitlik bir proteini kodlar. Fungal lakkaz genlerinin kodlanma bölgeleri 50-90 baz çiftlik uzunluktaki 8-13 intronda bulunur (Kojima 1990, Saloheimo ve Niku-Paavola 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 besiyerinde basidiomycet-62 (Mansur ve ark. 1998) ve *Pleurotus sajor-caju* (Soden ve Dobson 2001) lakkaz genlerinin transkripsiyonunu indüklediği gösterilmiştir.

Bakır lakkaz gen transkripsiyonun güçlü bir indükleyicisidir. Bu da serbest bakır iyonlarının neden olduğu oksidatif strese karşı bir savunma mekanizması sonucu gerçekleştiği ifade edilmektedir (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} gibi metal iyonlarında lakkaz gen ekspresyonunu stimule edebildiği gösterilmiştir (Scheel ve ark. 2000, Galhaup ve ark. 2002). Yapısal olarak lignin öncüleri benzeri 2,5-ksilidin veya fenolik asit gibi bazı aromatik bileşiklerin *T. villosa*, *P. sajor-caju* ve *T. versicolor* lakkaz gen transkripsiyonunu yükselttiği gösterilmiştir (Yaver ve Golightly 1996, Collins ve Dobson 1997, Soden ve Dobson 2001).

Metal iyonları ve fenolik bileşikler tarafından lakkaz genlerinin transkripsiyonunun indüklenmesi, genin promotor bölgesindeki spesifik regülatör kısmını etkilediklerine inanılmaktadır. Lakkaz genlerinin dizi analizlerinin karşılaştırılması lakkazların üç ana grupta incelenebileceğini göstermektedir: basidiomycete, ascomycete ve bitki lakkazları (Eggert ve ark. 1998, Cassland ve Jönsson 1999, Valderrama ve ark. 2003) aynı gruptaki lakkazların amino asit benzerliği %50 civarındayken farklı gruptaki lakkazların %40'ın altındadır.

Beyaz çürükçül fungus *T. versicolor*'da lakkaz gen ekspresyonu bakır ve azota bağlı olarak transkripsiyonu incelenmiştir. Patrick ve ark. (1997) tarafından yapılan *T. versicolor*'da gen transkripsiyonunun düzenlenmesi çalışmasında, fungus kültüründeki

azot ve bakır konsantrasyonu arttırıldığında, lakkaz enzimi gen transkripsiyonu düzeylerindeki artışa bağlı olarak lakkaz aktivitesindeki artış ters transkripsiyon ve PCR teknikleri kullanılarak gösterilmiştir. Buna ek olarak, lakkazla ilgili mRNA miktarı ve 10 günlük kültürdeki lakkaz aktivitesinin, ya lakkaz substratı olan 1-hidroksibenzotriazol'ün ya da iyi bilinen bir lakkaz indükleyicisi olan 2,5-ksilidin konsantrasyonunun direkt fonksiyonu olduğu gösterilmiştir. Yine bu çalışmada, başka bir beyaz çürükçül fungus kültür ortamında lakkaz üretimini indüklediği gösterilmiş olan iki aromatik asidin, (ferulik asit ve veratrik asidin) *T. versicolor* için indükleyici etkiye sahip olmadıkları ifade edilmektedir.

Bakır yokluğunda geliştirilen kültüre, bakır ya da 2,5-ksilidin veya her iki bileşiğin birden eklenmesi ile, 15 dakika içinde lakkaz transkript düzeyinin arttığı saptanmıştır. 2,5-ksilidin ile 15 dakika sonra, Sadece bakır varlığında ise 24 saatlik inkübasyon sonrası indüksiyon etkisi gözlemlendiği belirtilmektedir (Patrick ve ark. 1997).

Farklı fizyolojik koşullar altındaki fungus kültürlerinde indükleyicilerin etkisi, ters transkripsiyon ve PCR ile lcc mRNA düzeyi tayini yapılarak *T. versicolor*'daki lakkaz gen ekspresyonunun (lcc) düzenlenmesi araştırılmıştır. Bu çalışmada besinsel azot ve bakır varlığında lcc transkripsiyonunun aktiflendiği gösterilmiştir. Ayrıca, iki aromatik bileşik olan 2,5-ksilidin ve 1 hidroksibenzotriolün gen transkripsiyonu düzeyinde lakkaz indüksiyonu yaptığı gösterilmiştir. Bakırdan yoksun olarak geliştirilmiş 10 günlük kültüre bakır ya da ksilidin eklenmesi, lcc mRNA'nın hızlı bir şekilde attığı ancak bakırın neden olduğu indüksiyonun lakkaz aktivitesine yansıdığını gözlemlenmiştir (Patrick ve ark. 1997).

1.4.3.7. Lakkaz'ın Endüstriyel Kullanım Alanları

- Lakkaz Enzimlerinin ve Lakkaz Aracılı Sistemlerin Tekstilde Kullanım Alanları

Tekstil sanayi, toplam boyar madde pazarının üçte ikisini oluşturmakta ve tekstil yaş işlemleri için büyük hacimlerde su ve kimyasal tüketmektedir. Kullanılan kimyasal maddeler, inorganik bileşenlerden polimerlere ve organik ürünlere kadar değişen çeşitli kimyasal yapılardır. Kimyasal yapıları nedeniyle boyar maddeler, ışık, su ve farklı kimyasallar etkisinde solmaya karşı dirençlidir ve bunların çoğu sentetik esaslı

olduğundan renksizleştirilmeleri zordur. Ancak çevresel nedenlerle boyarmaddelerin endüstriyel atıklardan uzaklaştırılmaları gerekmektedir. Bu yüzden lakkaz esaslı yöntemlerin geliştirilmesi, lakkazların tekstil sanayinde sürekli kullanılan sentetik boyarmaddeler de dahil olmak üzere çeşitli kimyasal yapıdaki boyarmaddeleri parçalayabilme potansiyelleri nedeniyle uygun bir çözüm gibi görünmektedir.

Lakkazlar, tekstil sanayinde tekstil atık sularının renksizleştirilmesinin yanı sıra tekstillerin ağartılmasında, kaynatılmasında, denim yıkamada ve hatta boyar maddelerin sentezinde de kullanılmaktadır (Couto ve Herrera 2006).

Novozyme (Novo Nordisk, Danimarka) 1996'da kot ağartmada lakkaz enziminin endüstriyel uygulamasını başlatmıştır. DeniLite, ilk endüstriyel lakkaz ve araçlar yardımıyla etki gösteren ilk ağartıcı enzimdir. Ayrıca 2001'de Zytex şirketi (Zytex Pvt. Ltd., Hindistan), ticari adı Zylite olan ve indigoyu çok spesifik bir şekilde parçalayabilen lakkaz aracılı sisteme dayanan bir formülasyon geliştirmiştir (Couto ve Herrera 2006).

Lakkazlar, selülozik liflerde bulunan yağlar, mumlar, pektinler, proteinler ve pigmentler gibi doğal renklendirici maddelerin uzaklaştırılması ve bu sayede boyama, baskı ve bitim gibi işlemlere hazırlanması amacıyla kullanılmaktadır. Tekstillerin ağartılması işlemi klasik olarak asidik ve bazik koşullarda, geniş sıcaklık aralığında ve farklı yükseltgen maddelerle yapılmaktadır. Yüksek beyazlık dereceleri istendiğinde ard arda oksidasyon işlemleri uygulanmaktadır. Ağartma maddeleri, liflere aşırı miktarlarda verilmekte, bu da ileriki işlemlerin düzgün yapılabilmesini olumsuz yönde etkileyen zararlı atıklara neden olmaktadır. Bu nedenle tekrarlı yıkamalar gerekmektedir. Tzanov ve arkadaşları, 2003'te yaptıkları çalışmada kısa süreli lakkaz ön işleminin pamuklu kumaşların beyazlığını geliştirdiğini ve sonraki ağartma işleminde kullanılan hidrojen peroksitin konsantrasyonunu önemli derecede azalttığını belirtmişlerdir (Tzanov ve ark. 2003). Basto ve arkadaşları, pamuğun klasik kimyasal ağartma sürecine bir alternatif olarak ultrasonik dalgaların lakkazın ağartma yeteneği üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Çalışmada pamuk, 20 kHz ve 7 W gücündeki ultrasonik ortamda 30 dak'lık işlem görmüştür. Pamuklu kumaşların lakkaz ile ön işleminde ultrason uygulamasıyla ve peroksit ile beyazlık etkisi artmıştır (Basto ve ark. 2007).

- Lakkazlar'ın Kot (Denim) Yıkamada Kullanımı

Denim yıkama yöntemleri ile özel efektlerin ve çeşitliliğinin giderek artması, bu işlemi moda eğilimlerine yön verir hale getirmiştir. Yıkama süreçlerini bilimsel yapmayan firmaların ürün gamı sınırları giderek daralmaktadır. Küreselleşme süreci, son yıllarda dünya tekstil sektörünü, diğer sektörlerle kıyaslandığında daha fazla etkilemiştir. Bunun bir sonucu olarak fiyat konusunda aşırı rekabet ortamı oluşmuş ve bu da tekstil ürünleri üretimini gelişmiş ülkelere ve az gelişmiş ülkelere doğru kaymasına neden olmuştur. İş gücü, sermaye, üretim yeri, çevresel ve siyasal faktörler, dünya tekstil yatırımlarını, Hong Kong, Çin, Kore, Tayvan, Pakistan, Mısır ve Sudan gibi ülkelere kaydırmıştır. Türk tekstil sektörünün dış ticaret gücünün giderek azalmasının başlıca nedeni, üreticilerin maliyetlerini kısması gerektiği halde, bunu başaramamasıdır. Üretim maliyetlerinin artışının nedenleri arasında işçilik maliyetinin yüksek olması, hammadde alım fiyatlarındaki dalgalanmalar, enerji fiyatlarındaki artışlar ve yüksek orandaki vergi yükü sayılabilir. Bu maliyetlerden makul oranlarda kaçınmak için Türk tekstil üreticileri yurt dışına yatırım yapmaya yönelmiştir. Tekstil alanında 2003 yılı itibarıyla yurt dışına yapılan yatırım 3 milyon dolar iken, bu rakam 2005'te 485 milyon dolara ulaşmıştır. 2008 yılının ilk 6 ayının sonuna kadar bu alanda yurt dışına yapılan yatırım 745 milyon dolara ulaşmıştır. Bunun sonucu, sanayi istihdamının %20'sini oluşturan ve 6.5 milyon insana iş olanağı sağlayan tekstil sektöründe, 2006–2008 arası periyota 2 milyondan fazla insan işsiz kalmıştır ve ne yazık ki bu oran günden güne artmaktadır. Türkiye tekstil üreticileri, maliyeti düşürmek amacıyla kaliteden ödün vererek Pakistan, Çin, Mısır ve Bangladeş gibi ülkelerle rekabet etmeye çalışması, işsizlik sorununu daha da çözümsüz hale getirecektir. Bunun yerine İtalya, Fransa ve İngiltere gibi ülkelerle rekabeti tercih ettiğinde, kendi markalarını yaratmak adına AR-GE yatırımlarına önem vermesini gerektirir. Ülkemizdeki tekstil firmalarının AR-GE ve ilgili eğitim faaliyetlerine yeterli önemi vermemeleri, sektörün nitelikli ve verimli iş gücü temin etmesine olanak sağlamadığı gibi, katma değeri yüksek ürünlerin üretimine de imkân vermemektedir. Tekstil firmaları bu anlamda AR-GE çalışmaları yaparak kendi kalitelerini etkileyecek tüm aşamalarda üreticilerinin de kalitesini maksimuma taşımayı hedefleyen çalışmaları Onları bu alanda ünlü dünya firmalarıyla aynı düzeye çıkarmanın olmazsa olmazıdır.

-Lakkazlar'ın Tekstil Atık Sularının Biyolojik Parçalanması ve Renksizleştirilmesinde Kullanımı

Azo, trifenil metan ve ftalosiyenin gibi farklı kromofor grupların varlığı, boyarmaddelerin yapısal çeşitliliğini sağlamaktadır. Görsel etki ve kimyasal oksijen ihtiyacı (COD) açısından yan etkilerinin yanı sıra çoğu sentetik boyarmaddeler, toksik, kanserojen ve genotoksik etkiler de göstermektedir. Boyama atık sularının arıtılması, adsorpsiyon, koagülasyon, oksidasyon, filtrasyon ve iyonlaştırıcı radyasyon gibi kimyasal ve fiziksel yöntemler gerektirmektedir. Bu yöntemlerin tümü farklı renksizleştirme yeteneğine, sermaye maliyetine ve operasyon hızına sahiptir. Bu yöntemler arasında koagülasyon ve adsorpsiyon yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bunlar büyük miktarlarda atığa yol açmaktadır. Bu nedenle biyolojik işlemler ve özellikle lakkaz kullanımı, düşük maliyet ve az çamur oluşturmaları nedeniyle giderek önem kazanmaktadır (Park ve ark. 2007).

-Kağıt Hamurundan Lignin Giderimi

Ağaç, yapısında selüloz, hemiselüloz, hidroksifenil-propan alt birimlerinden oluşan kompleks bir polimer olan ligninden oluşan uzun ve ince fiberlerin yığılması olarak tanımlanabilir. Lignin orta tabakada bulunur ve burada doğal bir yapışkan görevi görür. Ağaç fiberlerinin ikinci hücre duvarında selüloz ve hemiselüloz arasında bağ oluşturucu olarak davranır. Dolayısıyla kağıt hamuru oluşturmak için, ligninin mekanik veya kimyasal yolla uzaklaştırılması gereklidir. Kimyasal kağıt hamuru proseslerinde, ağartma prosesi olarak adlandırılan lignin fraksiyonlarının eliminasyonu için güçlü kimyasal maddeler kullanılır.

Genellikle ağartma prosesinde klor (Cl_2), klordioksit (ClO_2) ve ozon (O_3) eklenir. Ancak günümüzde klor kullanımı kanserojenik maddelerin oluşumuna neden olduğundan dolayı yasaklanmış, klordioksit kullanımına da çok sıkı sınırlamalar getirilmiştir. Bu nedenle yeni uygulamalar geliştirilmeye çalışılmaktadır. Beyaz çürükçül fungusların oksidatif enzimlerinin karışımı kullanılarak ligninin degradasyonu gerçekleştirilebilir. Ancak ligninin kompleks yapısından dolayı enzimle etkileşime girebilmesi için aracı (medyator) bileşikler kullanılmalıdır (Riva 2006).

-Organik Sentez

Organik sentezde lakkazın biyokatalizör olarak kullanımı son zamanlarda artan bir ilgiyle çalışılmaktadır. Açık ortamda hidrojen peroksit kullanmadan ılıman (benign) çevresel koşullarda polimer üretimini sağlar. Ayrıca medyatör varlığında veya yokluğunda, radikal akrilamid polimerizasyonunu indüklediği rapor edilmiştir. Lakkaz ek olarak lignin kraft kopolimerlerinin kemoenzimatik sentezi için de kullanılmaktadır. Daha yakın bir tarihte de odunsu bileşiklerin fonksiyonelliği ve çapraz bağlanması için bu enzimin potansiyeli olduğu keşfedilmiştir (Zille 2005).

-Biyosensör

Biyosensör elektronik dönüştürücü içeren biyolojik komponentle bütünleşmiş bir probtur. Bu şekilde hazırlanan prob biyokimyasal veya fiziksel değişiklikler göz önüne alınarak biyokimyasal sinyalleri elektriksel değer olarak belirler ve kaydeder. Günümüzde lakkaz içeren birçok biyosensör, atık suda aromatik aminler ve fenolik bileşiklerin belirlenmesinde kullanımı amacıyla geliştirilmektedir (Zille 2005).

-Şarap ve Bira Stabilizasyonu

Şarap stabilizasyonunda alternatif bir fiziksel-kimyasal adsorbent olarak gıda endüstrisi lakkazın en büyük kullanım alanlarından biridir. Şarap, etanol ve organik asitler (koku verir), tuz ve fenolik bileşikler gibi farklı kimyasal bileşiklerin karışımını içerir. Polifenolün gideriminde, şarabın organoleptik karakterinde istenmeyen değişikliklerden kaçınmak gereklidir. Polifenol gideriminde lakkaz kullanımı bazı önemli şartlar gerektirir. Bunlar asidik ortamda stabilite ve sülfid ile tersinir inhibisyonudur (Zille ve ark. 2005).

Lakkaz biranın raf ömrünün arttırılmasında kullanılır. Birada, duman ve sis oluşumu mayalama endüstrisinde çok karşılaşılan bir problemdir. Fenol halkalarının nükleofilik substitüsyonuyla proteinin sülfidril grupları duman oluşumunu önleyebilir. Burada fenolün fazlası geleneksel işlemler yerine arpa mayasına lakkaz ilave edilerek yapılabilir (Riva 2006).

1.5. Katı Substrat Fermentasyonu

Lignin, pektin, lignoselüloz gibi bileşenleri içeren doğal materyalleri kullanan ve esas olarak kesikli bir işlem olan katı substrat fermentasyonu (KSF) serbest su akışının olmadığı ve nemli-katı substrat üzerinde mikroorganizmaların üretildiği bir uygulamadır (Raimbault 1998, Raghavarao ve ark. 2003) Bu işlemde kullanılan substrat, mikroorganizmaların üreme ve metabolizması için ihtiyaç duyduğu yeterli nemi sağlamalıdır (Pandey 2003, Ganesh ve ark. 2005) . Katı substrat, hem fiziksel destek hem de besin kaynağı olarak rol oynayacağından uygun substratın seçimi önemlidir (Raghavarao ve ark. 2003). Bu nedenle, substratın parça büyüklüğü, por yapısı ve kimyasal bileşimi uygulama açısından önemlidir. Substratın bol miktarda olması, kolay elde edilmesi ve ayrıca ucuz olması büyük önem taşımaktadır (Osma ve ark. 2006). Katı substrat fermentasyonu serbest suyun olmadığı ya da çok az olduğu durumda gerçekleştiğinden, mikroorganizmaların doğal çevrelerinde bulunduğu koşullara çok benzemektedir (Hölker ve ark. 2004). Çeşitli mikroorganizmalar (bakteriler, mayalar ve funguslar) katı substratlar üzerinde üretilirler ve bu amaçla kullanılacak en uygun mikroorganizmalar funguslardır (Raimbault 1998). Beyaz çürükçül fungusların düşük su aktivitesine karşı iyi tolerans göstermeleri ve misel formunda üremeleri bu açıdan kullanılabilme olasılıklarını arttırmaktadır. Geleneksel sıvı fermentasyona göre ekonomik avantajlarının olması ve substrat olarak ucuz ve bol bulunan tarım endüstrisi atıklarının kullanılabilmesinden dolayı mikrobiyal ürünlerin üretiminde katı substrat fermentasyonu önem kazanmaktadır (Shankar ve Mulimani 2006). Bu atıkların pek çoğunun ligninolitik aktivitenin indükleyicisi olarak rol oynayan lignin, selüloz ve hemiselülozları içermesi ve ayrıca pek çoğunun yüksek oranda şeker içermesi işlemlerin çok daha ekonomik olmasını sağlamaktadır (Osma ve ark. 2006). Katı substrat olarak kullanılacak tarımsal atıklar bu süreçle değerlendirileceğinden, tarımsal atıklardan dolayı oluşabilecek çevre problemlerinin alternatif bir çözümü olabilecek bir işlemdir. Koşullar birçok mikroorganizma için doğadaki şartlarına benzer olduğundan, üreme için yeterli koşullar sağlanabilir (Milagres ve ark. 2004). Çeşitli tarımsal atıklar, beyaz çürükçül funguslarla enzim üretiminde başarılı şekilde kullanılabilir (Gomez ve ark. 2005).

Bu çalışmada katı substrat olarak kavun, karpuz kabukları ve kızıl çam kozalağı kullanılmıştır.

1.6. Enzim Saflaştırma Teknikleri

Enzim (Protein) saflaştırmanın amacı, kompleks protein karışımlarından ilgilenilen proteinin biyolojik aktivitesini kaybetmeden ayrılmasıdır. Biyolojik fonksiyonun korunması da; pH, sıcaklık ve iyonik kuvvetin kontrol edilmesiyle sağlanır. Bu özelliklere dayalı olarak protein saflaştırma teknikleri uygulanır. Bir protein veya enzimi homojen halde elde etmek için birçok metot birlikte uygulanmalıdır.

İlgilenilen proteinin saflaştırılması için aşağıdaki adımlar takip edilmelidir.

1. İlgili protein için özel bir aktivite tayini olup olmadığı araştırılmalı
2. Toplam protein miktarı belirlenmeli
3. İlgili proteine uyarlanmış bir seri ayırma işlemi yapılmalı
4. Saflık analizi yapılmalıdır.

1.7. Araştırmanın Amacı

Organizmanın cinsine, türüne ve ona ürettirilmek istenen maddeye bağlı olarak değişim gösterebileceği düşüncesinden yola çıkarak, seçilen fungusların katı faz kültürasyon 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 oluşturmuştur. Etkinliği, kinetik özellikleriyle optimize edilmiş enzim, medyatörler eşliğinde indigo/indigo karmin boya ile etkileştirilerek renklerinin açılmasında kullanılabilirliğini araştırmak amaçlanmıştır.

Enzimlerin biyoteknolojide yaygın olarak kullanılabilmesinde gözönüne alınan en önemli faktörler, bol miktarda ve düşük maliyetle üretilmeleridir. 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 kültürasyon tekniği uygulanacaktır. Kullanılacak destek materyalin karbon/azot içeriği ve kimyasal kompozisyonunun, fungusların lakkaz salgılamaları üzerindeki etkisi araştırılacaktır. 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 *T. versicolor* ve *P. chrysosporium*'un 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. KAYNAK ÖZETLERİ

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

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.

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 basidiomycete'lerle homoloji gösterdiğini idda etmektedirler.

Couto ve ark. (2002) destek materyal ve indükleyicilere bağı olarak yarı katı fermantasyon tekniğı ile *T. versicolor*'un lakkaz salgılama koşullarını araştırmışlardır. Poliüretan köpük, buğday ve arpa samanları, odun talaşı ve arpa kepeğı katı destek materyal olarak ve veratil alkol, 2,5-ksilidin de indükleyici olarak kullandıklarında 17 günlük inkübasyon sonucunda, arpa kepeğı 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 gözlemlemiştirler.

Champagne ve Ramsay (2005) *Trametes versicolor*'la çalışmada öncelikle lakkaz ve mangan peroksidaz üretimi için farklı indükleyiciler içeren besiyerlerinde üretim yapılmış ve sonrasında pürifikasyon yapılmıştır. Saflaştırılan mangan peroksidaz ve lakkaz için sırasıyla 50 U ve 1200 U aktiviteye sahip % 10 ve % 57 verime ulaşımlardır. Molekül ağırlıkları da 44-45 ve 55 kDa olarak belirlenmiştir. Saflaştırılan enzimler boya gideriminde kullanılarak dekolorizasyon yetileri araştırılmış ve pürifiye mangan peroksidaz azo boyaların (amaranth, reaktive black 5 ve cibacron brilliant yellow) mangan bağımlı reaksiyonlarla rengini giderirken antrakinon boyaların (remazol brilliant blue) boyaların rengini gideremediği, bunun yanında pürifiye lakkazın 5 ila 10 kat renk giderimi gerçekleştirdiği öne sürülmüştür. Tipik bir fungal kültürle yapılan renk giderim çalışmasında Lac:MnP oranı enzim aktivitesine bağlı olarak başlangıçta 10:1 ile 20:1 oranında iken, renk giderimi tamamlandığında bu oran 30:1 olduğu bulunmuş buradan da MnP'nin boya giderimindeki enzim aktivitesinin Lakkazdan yaklaşık 30 kat daha hızlı olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Lorenzo ve ark. (2005) *T. versicolor* kültürlerindeki aktivite, aktivatör olarak ağır metaller kullanılarak indüklenmesine çalışılmıştır. Cd^{2+} , Ag^+ , Mn^{2+} , Zn^{2+} ve Cu^{2+} metallerinin ilavesi karşılaştırıldığında sadece Cu^{2+} metalinin lakkaz aktivitesini arttırdığı bulunmuştur. Bakır metalinin aktiviteyi 12 kat kadar büyük bir oranda artırdığı rapor edilmiştir. Bu aktivite artışı da tekstil boyası olan İndigo Karmin boyasının lakkaz tarafından yıkımında önemli rol oynayan bir faktör olarak bulunmuştur.

Moon-Jeong ve ark. (2005) beyaz bir çürükçül fungus olan *Trametes versicolor*'un ligninolitik enzimlerinden biri olan lakkazı etanol çöktürmesi, DEAEsefaroze, fenil-sefaroze ve G-100 kromatografi kolonları kullanılarak % 6.2 verimle kültür sıvısından 209 kat pürifiye etmiştir. *T. versicolor*, substrat olarak ABTS için oldukça yüksek aktivite (91.443 U mg^{-1}) gösteren monomerik lakkazı salgıladığı rapor edilmiştir. Enzimin yaklaşık molekül ağırlığı SDS-PAGE ile 97 kDa olarak belirlenmiştir ki bu değer diğer lakkaz molekül ağırlıklarına göre büyük bir değerdir. Enzim pH 3 ve 50 °C sıcaklıkta optimum aktivite göstermiştir. K_M değeri ABTS substratı için $12.8 \mu\text{M}$ ve V_{max} değeri de 8152.4 U mg^{-1} 'dir. Spesifik aktivitesi ve substrat afinitesi diğer beyaz çürükçül funguslardan daha yüksek olduğu bulunmuş böylece endüstriyel uygulamalarda potansiyele sahip olabileceği öne sürülmüştür.

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 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 kıyaslamak 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 boyanmada ise ticari lakkazın, geri boyanma inhibitörü reaktifler içermesinden dolayı daha uygun olduğu K/S değerlerinden anlaşılmaktadır.

Gnanomani ve ark. (2006) buğday samanı üzerinde indükleyici olarak CuSO_4 , 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 etmektedirler.

Revankar ve Lele (2006) etkili bir şekilde lakkaz üreten *Trametes versicolor*'dan farklı besiyeri bileşenlerinin lakkaz üretimine etkisi ortogonal düzenleme yöntemiyle optimize etmiştir. Azot kaynağı olarak maya ekstraktı, karbon kaynağı olarak nişasta ve glikoz kullanıldığında aktivitenin (305 U mL^{-1}) iki kat arttığı bulunmuştur. Optimize edilmiş besiyerine 1 mM bakır ilavesi yapıldığında da aktivite 406 U mL^{-1} değerine ulaşmıştır. Aynı konsantrasyonda farklı aromatik bileşikler kullanıldığında da aktivitede oldukça büyük artışlar kaydedilmiştir.

Liu ve ark. (2009) *P. ostreatus* 10969 suşunun fermantasyon koşullarının optimizasyonunu ve salgılanan lakkazın karakterizasyonunu araştırmışlardır. Katı destek materyalin optimizasyonu matriks yüzey gruplarının FTIR ile analizine dayanarak belirlenmiştir. Elde edilen lakkaz %35 doyumlukta $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 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 sephadeks-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.

Saparrat ve ark. (2010) beyaz çürükçül fungus *Corilopsis rigida*'nın lakkaz izoenzim genlerinin (lcc1, lcc2 ve lcc3) Cu^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} , 2,6-Dimetoksi-1,4-benzokinin, H_2O_2 , kafein, amfoterisilin B ve siringik asit varlığında transkripsiyonlarını 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-benzokinin ise lcc2 ve lcc3 genlerini indüklediklerini idda etmektedirler. Doğal olarak bu genlerin indüklenmesi, inkübasyon süresine bağlı olarak lakkaz aktivitesinin de artmasına yol açmıştır.

Cripps ve ark. (1990) *P. chryosporium*'un azo ve heterosiklik boya Orange II, Tropaeolin O, Congo Red, Azure B boylarını biyolojik olarak yıktığı gösterilmiştir. Bu çalışmalarda renk giderimi oranının boya kompleksi, azot varlığı ve kültürdeki ligninolitik aktiviteye bağlı olarak değiştiği belirtilmiştir. Düşük azot konsantrasyonunda rengin %90'ı yüksek azot konsantrasyonunda ise rengin %63-93'ü giderilmiştir. Genellikle azot sınırlamasının sağlanması, lignolitik aktiviteyi artırarak lignin peroksidaz ve Mn bağımlı peroksidaz aktivitesini arttırmakta ve böylece renk gideriminin arttığı gözlenmiştir.

Ollikka ve ark. (1993) Azo, triphenyl methane, heterosiklik ve polimerik boyların renginin giderimini *P. chryosporium*'dan izole edilen 3 lignin peroksidaz izoenzimleri (Lip 4.65 (H2), Lip 4.15 (H7) ve Lip 3.85 (H8)) kullanılarak araştırılmıştır. Renk giderici olarak kullanılan bu izoenzimler ile kültür besiyerinden izole edilen saf enzim sistemleri karşılaştırılmıştır. Azo, trifenil methone, heterosiklik ve polimerik boyları içeren 10 farklı boya tipleri saf enzim preparasyonları ile muamele edilmiştir. Bu saf enzimlerle çoğu boyanın renginin %75'den fazlası giderilirken, yalnızca Congo Red, Poly R-478 ve Poly T-128 boylarının renkleri sırasıyla %54, %46 ve %48

oranlarında giderilmiştir. 5 farklı boya tipi saflaştırılmış izoenzimlerle muamele edilerek renk giderimi test edilmiştir. Lip 3.85 izoenzimi methylene blue ve methyl orange'ın renklerinin %20'sini, toluidine blue O boyasının renginin %60'dan fazlasını gidermiştir.

Swamy (1998), tarafından Amaranth, Remazol Black B, Remazol Orange, Remazol Brilliant Blue, Reactive Blue ve Trapaedin O boyalarının agar plaklarında renk giderimi test edilmiştir. *Bjerkandera* sp. BOS55, *P. chrysosporium* ve *T. versicolor* beyaz çürükçül fungusların kullanıldığı bu çalışmada 9 günlük peryotta rengin büyük bir kısmı giderilmiştir. Bu üç beyaz çürükçül fungusın statik ve sulu kültürlerde besiyerinin yüzeyi boyunca somut bir şekilde gelişen misel yapısının boyaların rengini gidermediği gözlenmiştir. Çalkalamı kültürde *Bjerkandera* sp. BOS55 peletleri yalnızca Amaranth, Remazol Black B ve Remazol Orange boyalarının rengini giderirken *P. chrysosporium* ve *T. versicolor* peletleri pek çok boyanın rengini gidermiştir. *Bjerkandera* sp. BOS55 ve *P. chrysosporium*'un batch kültürlerine tekrarlı boya eklemeleri yapılmış ve renk giderim veriminin düştüğü gözlenmiştir. Buna karşın *T. versicolor*'ın farklı boyaların ve boya karışımlarının tekrarlı eklendiği batch kültürlerinde peletlerin boyayı gözle görülebilir bir biyosorpsiyonu olmaksızın rengi çok hızlı bir şekilde giderdiği saptanmıştır. Solüsyonun seçimi hem boya eklenmesi hem de renk giderimi sırasında pH'nın sabit tutulması için önemli bir etkiye sahiptir. pH stabilitesini sağlamak amacıyla 2,2'dimetil süksinik asit kullanılmıştır.

Yeşilada ve Özcan (1998), tarafından yapılan çalışmada beyaz çürükçül fungus olan *T. versicolor*'ın kültür filtratının Orange II boyasının renk giderimi üzerindeki etkisini araştırılmıştır. Renk giderim hızı ve genişliğinin fungus tam kültür süzüntüsünün yaşına (üreme safhasına) bağlı olarak değiştiği saptanmıştır. 12 gün üretilmiş *F. trogii*, *P. sajor-caju* ve *P. chrysosporium* ME446'nın tam kültür filtratlarının da renk giderim yetenekleri araştırılmıştır. *P. chrysosporium* ME446 kullanılan 4 boyanın hiçbirinin rengini giderememiştir. Enzim inhibitörü olan siyanid ve azid, kültür filtratının boya rengini giderim yeteneğini inhibe etmişlerdir. Kültür filtratının ısı ile muamelesi de renk giderim aktivitesini sonlandırmıştır. Bu çalışmada elde edilen renk giderim aktivitesi mangandan bağımsız bir aktivitedir. Sonuçlar Orange II'nin renginin gideriminde hem H₂O₂ bağımlı ve hem de H₂O₂ bağımsız enzimlerin rol

oynayabileceğini göstermiştir. Ayrıca bu çalışmada kültür süzıntüsünün yaşı ile renk giderim aktivitesinin ilişkisi ortaya çıkarılmıştır.

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 degradasyonu sonucu ortamda oluşan isatin (indol-2,3-dion) HPLC ile tayin edilmiştir. *T. hirsuta* ile moleköl ağırlığı 45.000 ve 60.000 olan iki enzim, *S. rolfsi* LBS 350.80 ile moleköl ağırlığı 55.000 olan enzimler saflaştırılmış olmaları dikkat çekicidir.

Minussi ve ark. (2001) 4 adet çürükçöl fungusın (*T. versicolor*, *T. villosa*, *P. chrysosporium* ve *Lentinus edodes*) katı besiyerinde hazırlanan kültürlerini tekstil endüstrisinde yaygın olarak kullanılan reaktif boyaların (Reactive Blue 19, Reactive Red 195, Reactive Yellow 145 ve Reactive Black 5) renk gideriminde kullanılmışlardır. Yapılan çalışmalar sonucunda tüm boyaların renginin giderildiği gözlenirken en hızlı renk giderimi *L. edodes* plaklarında belirlenmiştir. Bu plaklarda 7 gün içinde tüm boyaların renkleri tamamen giderilmiştir.

Soares ve ark. (2001) tekstil endüstrisinde kullanılan ticari olarak temin ettikleri lakkaz farüstasyonundan, 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.

Claus ve ark. (2002) *T. versicolor*, *P. pinisitus* ve *M. termophila* ile elde ettikleri lakkazların, medyatör olarak 1-hidroksibenzotriazol (HBT) varlığında ve yokluğunda değişik sınıflara ait boyaları (azo boya, indigo, amtraguinan ve heterosiklik) renksizleştirmedeki etkilerini incelediklerinde fungi ve boya cinslerine bağlı olarak değişiklik gösteren sonuçlar elde etmişlerdir.

Shin ve ark. (2002) hint keneviri üzerine tutukladıkları *T. versicolor* ATCC 20869 suşunun renk giderim aktivitesini araştırmışlardır. 4 haftalık inkübasyon süresi

sonunda, tutuklanmış fungusın Amaranth boyasının (50mg/L) rengini glukoz eklemesi yapılmaksızın $5 \text{ mg L}^{-1}\text{h}^{-1}$ oranında giderdiği belirlenmiştir. 1gL^{-1} glukoz eklemesi yapıldığında boyanın çok daha hızlı ($8\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$) parçalandığı gözlenmiştir. Bu çalışma sonucunda renk giderimi siklusunun sayısı arttıkça giderim veriminin azaldığı anlaşılmıştır.

Couto ve ark. (2003) *T. versicolor* ile yapmış oldukları çalışmada farklı biyoreaktörler kullanarak lakkaz üretimini araştırmışlardır. Bunun için immersiyon, genişletilmiş yatak ve tava tipi olmak üzere 3 laboratuvar ölçekli biyoreaktör seçmişlerdir. Destek olarak ise naylon sünger ve arpa samanı kullanılmıştır. Arpa samanı kullanılan biyoreaktörlerde naylon sünger kullanılanlara göre daha yüksek lakkaz aktiviteleri elde edilmiştir. Kullanılan biyoreaktörler arasında en yüksek lakkaz aktivitesi tava tipi biyoreaktörde elde edilmiştir. Tava tipi biyoreaktörde naylon sünger kullanıldığında kültür oluşumunun 18. gününde 343 U/L lakkaz aktivitesi elde edilirken, arpa samanı substrat olarak kullanıldığında 18. günde 3500 U/L lakkaz aktivitesine ulaşılmıştır. Bu da yaklaşık 10 kat daha yüksek enzim aktivitesi demektir. Lignoselülozik substrat kullanılarak *T. versicolor* ile lakkaz üretiminde tava tipi biyoreaktörün uygun olduğu rapor edilmiştir.

Amaral ve ark. (2004) tarafından yapılan çalışmalarda *T. versicolor*'ın 3 adet sentetik tekstil boyasının (R.Orange 4, R.Red 23 ve R.Black 5) eşit miktarda karışımıyla oluşturulan sentetik atık su ve gerçek tekstil atık suyundaki renk giderimi araştırılmıştır. Glukoz'un varlığında ve yokluğunda sürdürülen bu çalışmalarda farklı boya konsantrasyonları (0, 50, 100 ve 300 mg/L) test edilmiştir.10 günlük süre sonunda glukozun varlığında ve pH 4,5 iken 50-100 mg/L boya konsantrasyonlarında rengin %97'si; 300 mg/L boya konsantrasyonunda %87'si giderilmiştir. 42 kez sulandırılmış gerçek tekstil atık suyunda ise 50 mg/L boya konsantrasyonunda renk giderimi %92 olarak saptanmıştır.

Blánquez ve ark. (2004) pek çok metal kompleks boyalarının karışımından oluşan Grey Lanaset G boyasının renginin giderimi araştırmışlardır. Deneyler, *T. versicolor*'ın lakkaz enzimini üretmesi koşullarında devamlı pelet eklenmesi yapılan bir biyoreaktörde gerçekleştirilmiştir. Maksimum düzeyde %90 renk giderimi

gözlenmesine rağmen, renk giderimi ile ekstraselüler enzimler arasında direkt bir bağlantı kurulamamıştır. Dahası, ekstraselüler enzimlerin *in vitro* koşullarda boyayı parçalama yeteneği olmadığı açığa çıkarılmıştır. Böylece, boyanın adsorpsiyonu ve hücre içine transferi, boyanın metal kompleks bağlarının parçalanması sonucu hücre içerisinde metal bileşenlerin açığa çıkması ile takip edilmiştir. Biyomass'ın ve muamele solüsyonun metal (Cr ve Co) içeriği, boyanın intraselüller enzimler tarafından parçalandığını göstermektedir.

Levin ve ark. (2004) Arjantin'de izole edilen 26 beyaz çürükçül fungusun renk giderim kapasitelerinin araştırıldığı bir çalışmada, ekstraselular lignolitik enzim üretimine de bakılarak, Maya özütü/glukoz katı ortamına Malaşit yeşili, Azur B, Poli R-478, Antraquin mavi, Kongo kırmızısı ve Ksilidin boyar maddelerinin renginin gideriminin, enzim üretimiyle ilişkisi araştırılmıştır. Çalışılan funguslardan sadece on tanesi boyaların tümünü yıkamış ve bu fungusların hepsinde lakkaz, MnP ve LiP üretildiği saptanmıştır. Fakat, diğer dört fungus türünün hiçbirinin boyayı yıkamadığı ve bunlarda aynı zamanda LiP üretilmediği ve, 0.05 U/g'dan daha az MnP üretildiği saptanmıştır. Yeni izole edilen bu funguslar, boya yıkım özelliği iyi bilinen bir fungus olan *P. chrysosporium* ile karşılaştırıldığında, *Coriolus (Trametes) versicolor f. antarcticus*'un, biyolojik renk gideriminde potansiyel bir aday olabileceği belirtilmektedir. Bu fungusların onsekiz günlük kültürlerinde Ksilidin (24 mg/L), Poli R-478 (75 mg/L), Remazol Brilliant Blue R (9 mg/L), Malaşit yeşili (6 mg/L) ve Indigo karmin (23 mg/L)'in rengi bir saat içinde sırasıyla, 28%, 30%, 43%, 88% ve 98% giderilmiştir. Fungusların hücre dışı sıvılarında lakkaz aktivitesi 0.13 U/ml iken, LiP veya MnP aktivitesi saptanmamıştır.

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 renksizleştiriminin %95-100 oranında gerçekleştirildiğini ifade etmektedirler.

Yatome ve ark. (2004) beyaz çürükçül funguslarla yapılan renk giderim çalışmalarında çoğunlukla reaktif ve azo boyalar kullanılırken, diğer boya gruplarıyla da çalışmalar sürdürülmektedir. *T. versicolor*'la yürütülen bir çalışmada, altı çeşit ksantan

boyasının renk giderimi araştırılmış ve çalışmalar, 100 ppm boyar maddeleri içeren sıvı kültür ortamında 24 °C'de ve 120 rpm'de 14 gün süreyle yürütülmüştür. Sonuç olarak, Flororesein'in rengi %85, 4-Aminflorosein'in %95 ve 5-Aminoflorosein'in de %91.9 oranında giderilmiştir. Bunların yanı sıra Rodamin B, Rodamin 123 hidrat ve Rodamin 6G boyalarında renk giderimi gerçekleşmemiştir. Çalışmayı yapan araştırmacılar, renk gideriminin, ksantan halkasındaki gruplara bağlı olduğunu ileri sürmektedirler. Flororesein, 4-Aminflorosein ve 5-Aminoflorosein'in ksantan halkalarında hidroksi grubu bulunurken, Rodamin B, Rodamin 123 hidrat ve Rodamin 6G boyalarının ksantan halkalarında hidroksi grubu bulunmamaktadır. Fungusun ekstraselular sıvısında bulunan lakkaz enziminin, hidroksil gruplarını etkileyerek renk giderimini sağladığı öne sürülmektedir.

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

Couto ve ark. (2005) *Trametes hirsute* ham kültürünün, bir sentetik asit boyası olan RBBR'nin renk giderimi üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada ABTS, 1-hidroksibenzotriazol (HBT) gibi medyatörlerin lakkaz aktivitesini artırdığını belirtilmektedir. Bu anlamda, Sella Solid kırmızının rengini 10 dakikada %88 ve Luganil yeşilini 20 dakikada %49 giderimini sağlayan en etkili mediyatörün HBT olduğu söylenmektedir.

Ramsay ve ark. (2005) su yosunu bazlı bir ortamda geliştirilen *T. versicolor*'ın tekrarlı batch kültürlerde tekstil boyalarının renk giderimini çalışmışlardır. Bu çalışmada boya içeren 3 farklı modifiye Kirk's besiyeri kullanılmıştır (1. 0,22g⁻¹ amonyum tartarate, 2. aynı solüsyon thiamin, iz elementler ve glukoz, 3. yalnızca 1,5-10 g⁻¹ glukoz içeren Kirk's besiyeri). Yalnızca glukoz (0,5 g⁻¹) içeren besiyerinde Amaranth, Reactive Black 5, Reaktive Blue 19 ve Direct Black 22'nin renklerinin %75'i giderilmiştir. Aynı zamanda bu boyaların karışımlarının da renginin tamamen giderildiği belirlenmiştir. Sıvı besiyerinde homojenize edilerek geliştirilmiş misel

parçaları 1 gL⁻¹ CaCl₂ içeren stok solüsyonunda 6 °C'de 48 gün saklanmıştır. Stok solüsyonda saklanan bu misellerle boya gideriminin çok daha hızlı olduğu gözlenmiştir.

P. chrysosporium'un kullanıldığı renk giderim çalışmalarının çoğu steril koşullarda gerçekleştirilmiştir. Fakat Gao ve ark. (2006), steril olmayan koşullarda *P. chrysosporium*'un sıvı besiyerinde askıda kalmış, naylon ağ ve polyurethane köpükleri üzerine tutuklanmış misel peletlerini kullanarak çalkalamalı sıvı kültürlerde Reactive Brilliant Red K2BP boyasının renginin sırasıyla %0, %52 ve %95 değerlerinde giderildiğini göstermişlerdir. Askıda kalmış inkübasyon sisteminin ve naylon ağı sistemin mayalarla kontamine olması renk giderimini azaltmıştır. Polyurethane köpüğünün 3 boyutlu retiküler yapısı misellerin besin ve O₂'ni etkili bir şekilde almasını sağlayarak *P. chrysosporium*'un besiyerinde gelişmesini hızlandırdığı gözlenmiştir. Sonuçta polyurethane köpükleriyle çalışılan kültürlerde diğer mikroorganizmaların kolonizasyonu engellenmiştir.

Casas ve ark. (2007) akışkan biyoreaktörde *T. versicolor* peletleriyle, Oranj G azo boyasının yıkımını çalışmışlar ve %97 oranında renk giderimi sağlandığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar biyokütlede de, besiyerinde de renk kalmadığını ifade etmektedir. *T. versicolor*'dan elde edilen ticari lakkazla yapılan in vitro yıkım çalışmaları, lakkazın boyaları yıkabileceğini göstermiştir. Araştırmacılar, fungusla veya saf lakkazla yüksek seviyede renk giderimi elde edilebildiğini, fakat bunlar arasında önemli farklılık olduğu belirtmektedirler. *In vitro* uygulama sonucunda, geride bir renk kalmaktadır.

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

Cameros ve ark. (2008) *P. cinnabarinus* ile elde ettikleri lakkazın ve medyatör olarak p-hidroksisinamik asidin değişik derişimleri ile sanayi artığı olarak kirlilik oluşturan asid blue 74 (indigo karmin), reaktif black diazo boya 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.

Tilli ve ark. (2008) *F. (Trametes) trogii*'nin ham kültür filtratlarıyla yapılan çalışmada, tekstil sektöründe en fazla kullanılan Antraquin ve mono azo Cr kompleks sınıfına ait boyaların renginin enzimatik giderimi araştırılmıştır. Farklı kültür ortamlarında üretilen *F. trogii* fungusunda aktivatörlerin, lakkaz ve sellobiyoz dehidrogenaz enzimlerinin sentezlenmesini uyardığı bulunmuştur. Lakkaz içeren filtratların farklı sınıflara ait bazı boyaların rengini giderirken, rekalsitran olan boyaların renginin lakkaz ve HBT (1-hydroxybenzotriazole/violuric acid) medyatörü, ya da lakkaz- sellobiyoz dehidrogenaz uygulamasında etkili şekilde giderildiği rapor edilmiştir. Araştırmacılar, azo boyaların renginin gideriminde sellobiyoz dehidrogenazın, lakkaz aktivitesini desteklediği sonucuna varmışlardır ve enzimatik renk gideriminin, pahalı ve çevreye zarar veren kimyasal uygulamaların yerine kullanılabileceğini öne sürmektedirler.

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.

Murugezan ve ark. (2009) *G. lucidum* ile elde ettikleri lakkazın reaktif boyaları renksizleştirmesi üzerine değişik metal iyonlarının etkisini incelemişlerdir. Buğday samanı üzerine kültive edilen *G. lucidum* KMK2'nin 21 günlük süre sonunda, herhangi bir saflaştırmaya tabi tutulmayan sıvı örneklerinin lakkaz aktiviteleri ABTS kullanılarak test edilmiştir. Diğer yandan hem ABTS için enzim aktiviteleri hem de remazol black (RB-5) ve remazol orange-16 (RO-16) üzerindeki aktivite Cu^{2+} 'nin etkinliği artırdığını gözlemlemişlerdir.

Neifar ve ark. (2010) *F. fametarius*'un buğday samanı üzerindeki kültivasyonu 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.

3. MATERYAL VE METOT

3.1.Kullanılan Kimyasal Maddeler

Malzeme	Marka
1. ABTS	Sigma
2. Malt ekstrat	Merck
3. KH_2PO_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
24. Süksinik asit	Merck
25. HBT	Sigma-Aldrich

Malzeme	Marka
26. MS	Sigma-Aldrich
27. NHP	Sigma-Aldrich
28. RF	Sigma-Aldrich
29. MPP	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 Besic marka, vortex
- Perkin-Elmer Lamda 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. Katı Materyallerin C/N Oranının Tayin Edilmesi

Katı faz kültürasyonu tekniğinde destek materyal olarak kullanılan kızıl çam kozalağı, karpuz ve kavun kabukları toplandı. 5-10 mm büyüklüğündeki parçalar haline getirilen materyal, içerdikleri organik asitleri nötralize etmek üzere 1 L'lik erlenlerde katı materyali örtecek hacimde 100 mM KOH ile 30 °C de, yaklaşık 90 rpm'de geceboyu çalkalandı. Ardından önce şebeke suyu ile sonra saf su ile, yıkamada kullanılan suyun pH'sı yaklaşık 7 oluncaya dek durulandı, adi süzgeç kağıdı üzerinde laboratuvar koşullarında kurutuldu. Yeterince kurutulup toz haline getirilen 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 karbon azot içerikleri tayin edildi (Çizelge 4.1).

3.4. Katı Besiyerinin Hazırlanması ve İnokülasyonda Kullanılmak Üzere Ekim Yapılması

Cam balonda 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 dk boyunca otoklavlandı. Yaklaşık oda sıcaklığına kadar soğuyan besiyeri laminar flow da steril petrilere yaklaşık 25 mL olacak şekilde ilave edilip katılması beklendi, sonra 37 °C de inkibatörde kontaminasyonun olup olmadığını gözlemek için 1 gece boyunca bekletildi. Kontaminasyon gözlenmeyen petrilere İTÜ (Doç. Dr. Hakan Bermek) getirtilen *Trametes versicolor* (makro fungus) ve *Phanerochaete chrysosporium*'dan (mikro fungus) birer plak ekim yapıldı. Ekim işlemi tamamlandıktan sonra petriler 28 °C'ye ayarlanmış soğutmalı inkibatörde inkübasyona bırakıldı (Şekil 3.1).

3.5. Kültivasyon Koşulları

250 mL'lik erlenlere, her birine yaklaşık 10 g olacak şekilde 100 mM KOH ile yıkanarak organik asitleri nötrleştirilmiş C/N oranları tayin edilmiş yaklaşık 1'er cm² büyüklüklerindeki kavun, karpuz kabukları ve kozalak alınıp 150'şer mL saf su ilave edilerek 121 °C de 20 dk Otoklavlandı. Materyaller 28 °C de 7 gün süreyle inkübatörde bekletildi (Kültivasyon sürecinde kurutulmuş katı materyalin 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 ilave edildi. Hazırlanan ortama her bir fungus için biri kör ve filtrasyonla steril dört indükleyiciden her biri için iki farklı derişim oluşturmak üzere (%70'lik etil 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 0.20 µm ile filtre edilerek) ilaveleri yapıldıktan sonra *T. versicolor*, *P. chrysosporium*'un aktif taze kültürlerinin her birinden 1 cm çapında 3'er plaklık ekim yapıldı. 28 °C, çalkalamaksızın karanlıkta inkübasyon gerçekleştirildi. İnokülasyondan sonra 4., 8., 12.,

3. MATERYAL VE METOT

16. ve 26. günlerde alınan 2'şer mL'lik örneklerde yapılan protein miktar ve lakkaz aktivite tayinleri yapıldı. *P. chrysosporium*'un bu koşullardaki kültürlerinde lakkaz aktivite test sonuçları umut verici bulunmadığından daha büyük skalada kültürlerinin yapılmasına gerek görülmedi. Elde edilen sonuçlara dayanarak *T. versicolor*'ın kavun kabuğu üzerinde 5000 µM derişimlerinde 2,4-ksilidin ve 2,5-ksilidin, karpuz kabuğu üzerinde 5000 µM derişimlerinde 2,5-ksilidin, 3,5-ksilidin ve 5 µM derişimde (4E)-4-(2,5-dimetilfenilimino)-2,5-siklohegzan-2,5-dienon, kozalak üzerinde 50 µM 2,5-ksilidin varlıklarında, her birinden ikişer örnek olacak şekilde katı materyal ve indükleyiciye bağlı olarak ~25 g katı materyal 100 mL temel besiyeri içeren 1 L'lik erlenlere (12 adet) üçer plak aktif *T. versicolor* kültürü 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 *T. versicolor*'ın kavun kabuğu üzerinde 5000 µM derişiminde 2,5-ksilidin varlıklarında elde edilen örnekler (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 *T. versicolor*'ın inkübasyonu

3.6. Protein Miktar Tayini

Örneklerimizin protein miktar ve aktivite tayinleri için her keresinde kültür ortamına 2'şer mL temel besiyeri ilave edip hafif bir şekilde çalkalandıktan sonra ependorf tüplere alınan 2'şer mL'lik örnekler önce soğutmalı santrifüj de 10.000xg de 15 dakika santrifüjlendikten sonra çökelek dışında kalan kısımlar 5 mL'lik enjektörlerle alınıp 0,45'µm lik filtreler ile steri 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 örneklerimizin 250'şer µL'leri üzerine ticari olarak temin edilen Bradford Reaktifinden 3'er mL ilave edildi. Beş dakika sonra vortekslenen karışımın 595 nm'de absorbanları okundu.

3.7. Lakkaz Aktivitesi Tayini

Lakkaz aktivitesi substrat olarak ABTS kullanılarak Niku-Paavola ve ark. (1990) tarafından verilen yöntem kullanılarak tayin edildi. C; substrat derişimi (M), ϵ ; 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;

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

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

Ya da

Lakkaz aktivitesi = 22,26 . (seyreltme çarpanı) . $\Delta E = \dots [U/L]$

Formülü ile hesaplandı. Küvette reaksiyon hacmi 3 mL olacak şekilde, 25 mM süksinat tamponuyla (pH 4.5) yeterli miktarda seyreltilmiş ekstraselüler sıvının 2300 μL 'si üzerine 20 mM derişimindeki ABTS çözeltilisinden 700 μL 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. *T. versicolor*'un kavun üzerinde 5 mM 2,5-ksilidin varlığında 16. günde ölçülen lakkaz aktivitesi en yüksek bulunduğundan bu koşullarda salgılanan enzimin saflaştırılmasına/zenginleştirilmesine çalışıldı.

3.8. Enzim Saflaştırma/Zenginleştirme

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

3.8.1. Tuz ile Çöktürme

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile çöktürülecek örneklerin hacimlerine bağlı olarak $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ de önce %35'lik ve bundan %85'lik tuz doyunluklarına ulaşmak üzere ilave edilmesi gereken $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ miktarları <http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm> sayfasından bulundu. Örneklere %35 doyunluğuna ulaşmak üzere porsiyonlar halinde ve magnetik karıştırıcı ile karıştırılarak $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ilaveleri yapıldı. %35'lik doyunluğa ulaşmak için 160 mL'lik örneklerin her birine 32.17 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 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 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ilaveleri yapıldıktan sonra soğuk oda da 30 dakika karıştırıldılar ve 3.000xg de 30 dakika santrifüjlendiler. Üst sıvılar lakkaz aktivitesi bakımından test edildikten sonra, ihmal edilecek kadar aktivite gözleendiğinden atıldılar. Çökelekler (pellet) 20'şer mL 25 mM süksinat tamponunda (pH; 4.5) çözündükten diyaliz hortumuna (10 mM K-EDTA içinde 3 dak kaynatılarak ve defalarca destile su ile yıkanıp %0.2'lik NaN_3 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 derin dondurucu da bir gece dondurulan örnekler hacimleri ~5 mL'ye düşürülünceye dek liyofilize edildi.

3.8.2. 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 yüklendiler. Proteinler, dakikada 1 mL'lik fraksiyonlar toplanacak şekilde programlanmış cihazda 25 mM süksinat tamponuna (pH; 4.5) ile elue edildiler. Mikrotiterlerde 20 mM ABTS'ye karşı anlamlı aktivite gözlenen 32-54 mL aralığındaki fraksiyonlar birleştirildi.

3.9. 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 tankının anot ve katot hazneleri yürütme tamponu ile dolduruldu. Örnek yükleme 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. Jeller elektroforez aletinden ve iki cam arasından çıkartılarak Coomassie parlak mavsi ile boyanmaya 30 dak süreyle bırakıldı. Daha sonra, boya çıkarma çözeltisine bırakıldı. Protein bantları boyanmış olan jellerin resimleri çekildi (Ek – 1 Elektroforezde kullanılan çözeltiler).

3.10. Zenginleştirilen Enzimin Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi

Hem ticari olarak temin edilen lakkazın hem de *T. versicolor* 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 tayininde 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 substarat olarak 1 mM ABTS'ye karşı bu tamponlarla uygun seyreltmeler yapılmış enzim çözeltileri kullanılarak 2 dakikalık inkübasyonları sonucu 436 nm de okunan absorbansa bağlı olarak tayin edildi.

Optimal sıcaklık tayini için 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 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 μ M derişimlerindeki ABTS çözeltilerinin 2 dakikalık inkübasyonları sonucu 436 nm'de okunan absorbans değerlerine bağlı olarak tayin edildi.

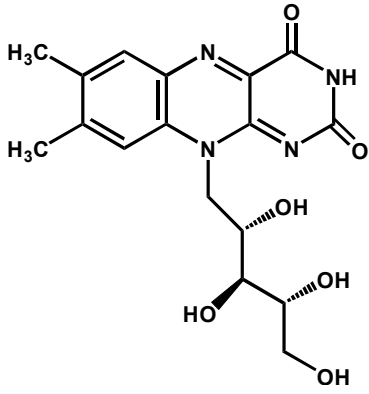
3.11. Uygun Medyatör (aracı)'ün Tayinine Yönelik Çalışmalar

En 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 karmin ise 608 nm'de bir maksimum absorbansa sahip oldukları saptandı. Daha sonra 20 mg indigo önce 25 mL DMSO içinde çözüdü bunun üzerine 175 mL destile su ilave edilerek çözüdü (20 mg indigo/200 mL DMSO+su). İndigo karmin saf su da çözüdüğü için DMSO'da çözümesine gerek duyulmadı 20 mg indigo karmin 200 mL destile su da çözüdü (20 mg indigo karmin/ 200 mL su). Bir cam tüpte son reaksiyon hacmi 5 mL olacak şekilde; 4 mL indigo/ indigo karmin, 500 mU/mL olacak şekilde hazırlanmış enzim (Ticari olarak temin edilen lakkaz ile zenginleştirdiğimiz lakkaz)'den 500 µL ve medyatörlü deneyler için de herbir medyatörden 500 µL alınıp vortekslenerek karıştırıldıktan sonra 30 °C'de karanlıkta değişik zaman aralıklarında (0.5, 1, 2, 4, 8 ve 24 saat) inkübasyona bırakılarak renk değişimi aynı dalga boylarında gözlemlendi. Renk şiddetindeki azalma % olarak;

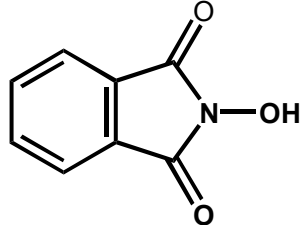
$$D = \frac{100(A_{ini} - A_{obs})}{A_{ini}}$$

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

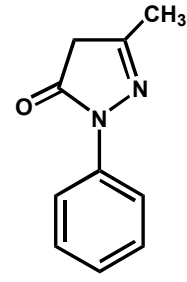
Bu amaçla; Riboflavin (Rf) 0,6 mM, *N*-Hidroksiftalimid (NHP) 10 ve 15 mM, 3-Methyl-1-phenyl-2-pyrazoline-5-one (MPP) 6 mM ve ticari olarak bilinen 1-hidroksibenzotriazol (HBT) 6 mM, metilsiringate (MS) 6 mM derişimlerindeki bileşiklerin ve lakkazın indigo/indigo karmin boyayı renksizleştirmedeki katkıları araştırıldı.



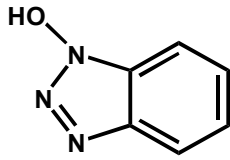
Riboflavin



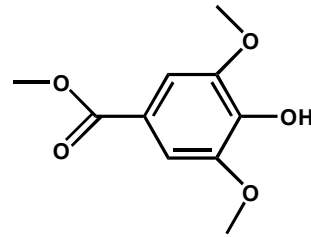
N-Hidroksiftalimid



3-Metil-1-fenilpirazolin-5-on



1-Hidroksibenzotriazol



Metilsiringeyt

Şekil 3.3. Çalışmada kullanılan medyatörler

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Protein Miktarı ve Lakkaz Aktivitesi

C/N oranları tayin edilmiş (Çizelge 4.1) Kavun, karpuz kabukları ve kozalak üzerinde kültivasyonu yapılan fungusların 4., 8., 12., 16 ve 26. günde inkübasyon süresine bağlı olarak salgıladıkları protein miktarları Çizelge 4.2 ile 4.4 ve Şekil 4.1 ile 4.3'te verilmiştir. Bu uygulamadaki enzim aktiviteleri ise Çizelge 4.3 ile 4.5 ve Şekil 4.2. ile 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 4.6 ile Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da verilmiştir.

4.2. Enzim Safaştırma/Zenginleştirme

Amonyum sülfat çöktürmelerinden sonra liyofilize edilerek hacimleri azaltılmış örnek kalibre edilmiş (Şekil 4.7) kolona yüklenerek elue edilmesi sonucu cihaz çıktısı olarak elde edilen veriler Şekil 4.8'de verilmiştir. Ham örnekler, amonyum sülfat çöktürmeleri sonrası ve kolon sonrası mikrotiterde kalitatif olarak gözlenen aktivite değerlerine dayanarak toplanan fraksiyonun elektroforez bant profilleri Şekil 4.9'da verilmiştir.

4.3. Optimal pH, Sıcaklık ve Kinetik Parametre Verileri

Ticari olarak temin edilen lakkaz ile kolon sonrası elde edilen enzim örneğinin; optimal pH değerleri Çizelge 4.7 ve Şekil 4.10-4.12'de optimal sıcaklık değerleri ise Çizelge 4.7 ve Şekil 4.13-4.15'te verilmiştir.

25 mM tartarat tamponu içerisinde pH'sı 3 olan 30 °C sıcaklıktaki enzim çözeltileri ile 50, 100, 200, 600 ve 1000 µM derişimlerdeki ABTS çözeltilerinin 2 dakikalık inkübasyonları sonucu elde edilen veriler ve hesaplanan K_M ve V_{max} değerleri Çizelge 4.8 ile Şekil 4.16-4.19 'da verilmiştir.

4.4. İndigo Boyaları Renksizleştirmek Amacıyla Kullanılan medyatörlerin etkileri

İndigo/indigo karmin boyalarının renksizleştirilmesinde kullanılan medyatörlerin; NHP, RF, MSPP, HBT ve MS'nin yüzdece renksizleştirme oranları ticari lakkaz/indigo için Çizelge 4.10 ile Şekil 4.20'de indigo karmin için Çizelge 4.12 ile Şekil 4.22'de verilmiştir. *T. versicolor* lakkazı /indigo için Çizelge 4.11 ile Şekil 4.21'de indigo karmin için ise Çizelge 4.13 ile Şekil 4.23'de verilmiştir.

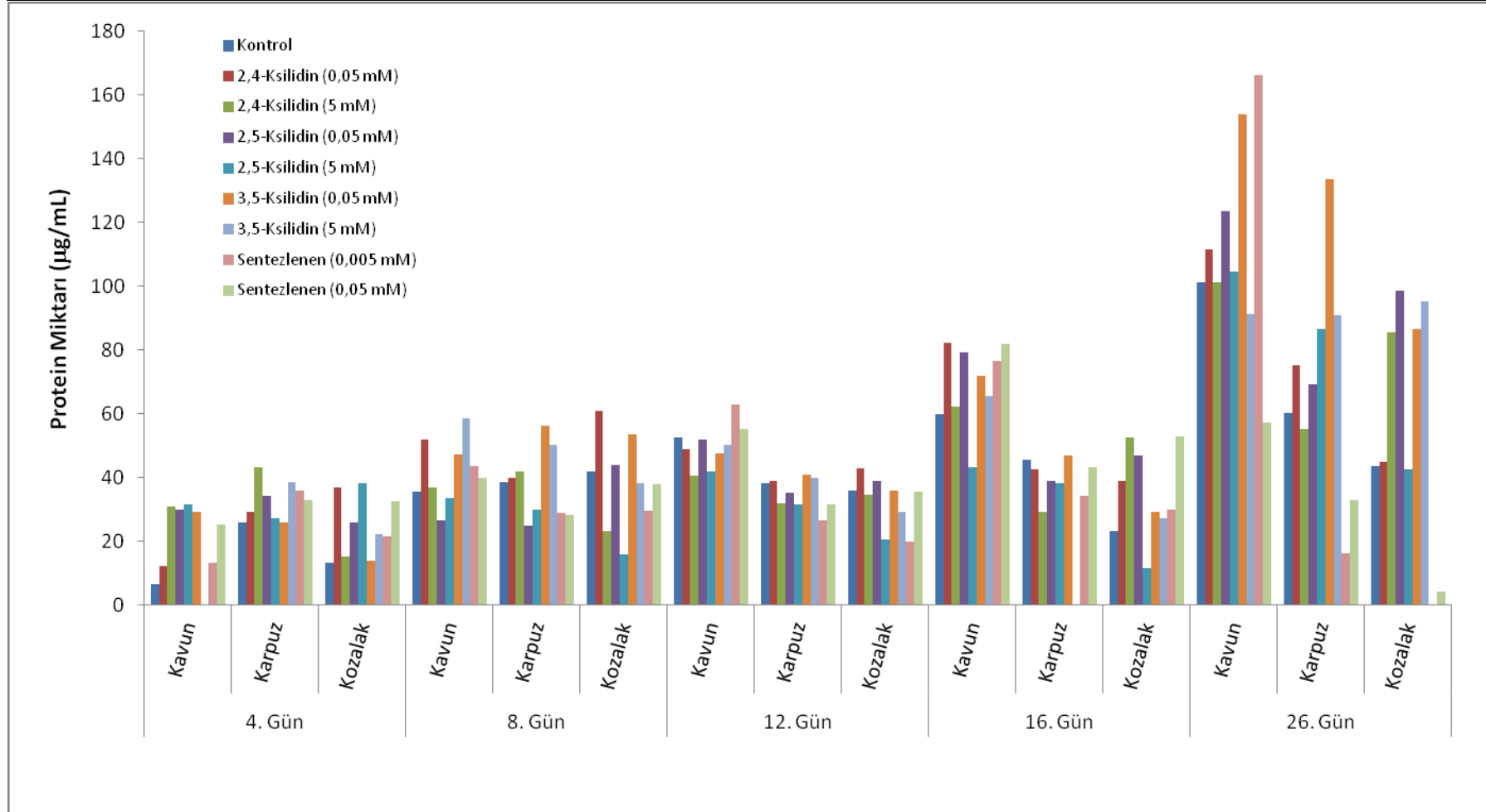
Çizelge 4.1. Kavun, karpuz kabukları ve kozalak için C/N oranları

	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

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

Fungus	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>Phanerochaete chrysosporium</i>	Kontrol		6,31	25,76	13,29	35,41	38,33	41,94	52,42	38,06	35,67	59,66	45,64	23,30	101,05	60,02	43,56
	2,4-Ksilidin	0,05	12,03	29,00	36,70	51,91	39,83	60,67	48,86	38,68	42,81	82,08	42,38	38,80	111,58	75,29	44,89
		5	30,87	43,26	15,23	36,93	41,77	23,01	40,64	31,72	34,33	62,24	29,29	52,42	101,26	55,19	85,39
	2,5-Ksilidin	0,05	29,83	34,18	25,90	26,44	24,96	43,66	51,94	35,10	38,78	79,28	38,88	46,73	123,47	69,16	98,41
		5	31,61	27,07	38,24	33,38	29,70	15,66	41,65	31,57	20,53	43,22	38,19	11,59	104,65	86,49	42,33
	3,5-Ksilidin	0,05	29,12	25,72	13,71	47,28	56,15	53,47	47,54	40,95	35,65	71,87	46,87	29,07	153,81	133,34	86,44
		5	T.E	38,46	22,24	58,52	50,17	38,13	50,21	39,76	29,04	65,49	T.E	27,25	91,20	90,75	95,04
	Sentezlenen	0,005	12,99	35,97	21,35	43,61	28,74	29,62	62,84	26,53	19,88	76,59	34,27	29,95	166,08	16,05	T.E
		0,05	25,18	32,65	32,48	39,80	28,21	37,80	55,05	31,41	35,42	81,85	43,21	52,94	57,14	32,74	4,30

T.E., Tayin edilemedi

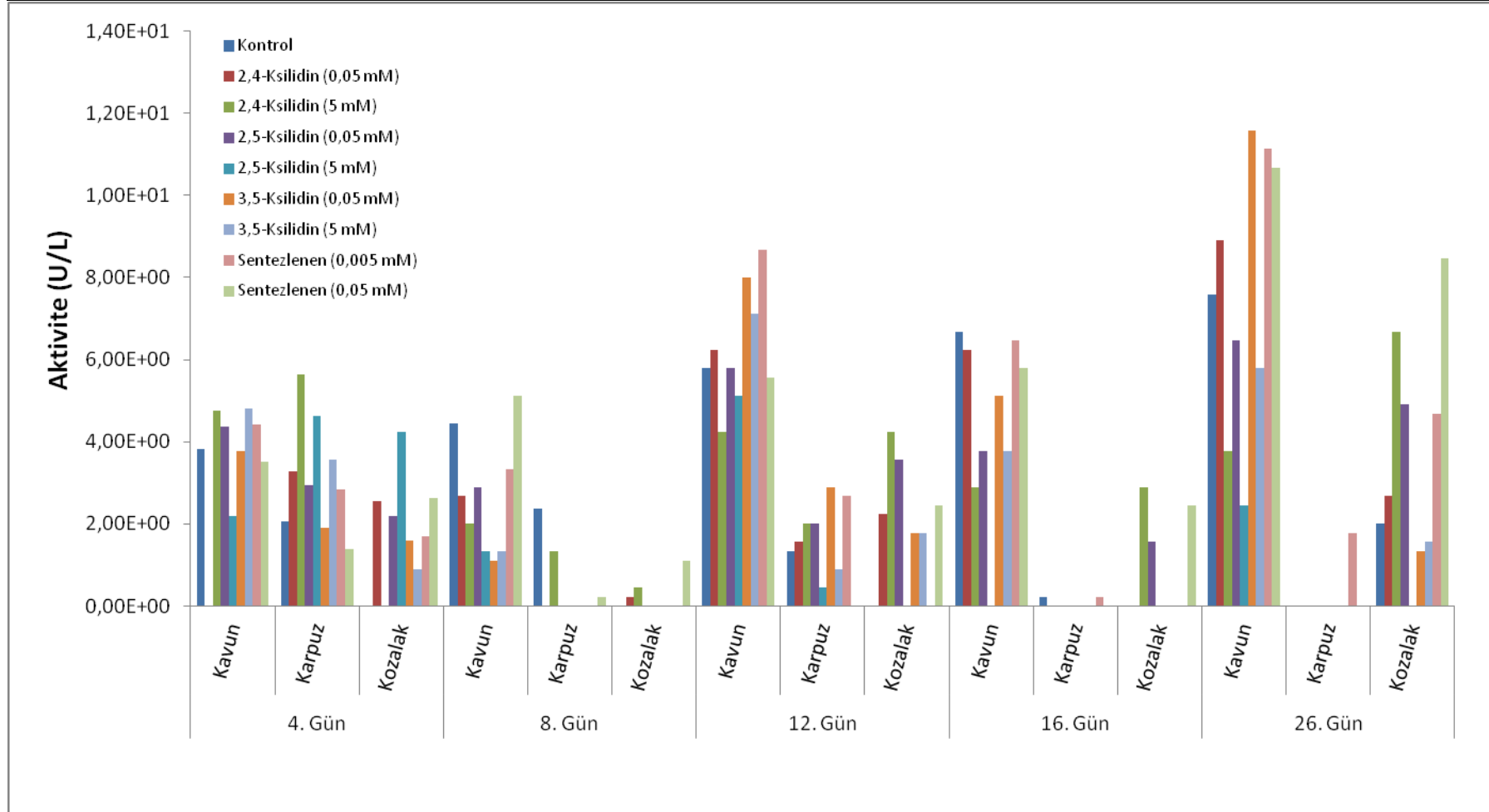


Şekil 4.1. *P. chrysosporium*'un uygulanan koşullar altındaki zamana bağlı protein miktarı

Çizelge 4.3. *P. chryso sporium*'un uygulanan koşullar altındaki zamana lakkaz aktivitesi

Fungus	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>Phanerochaete chryso sporium</i>	Kontrol		3,83	2,05	T.E.	4,45	2,36	T.E.	5,79	1,34	T.E.	6,68	0,22	T.E.	7,57	T.E.	2,00
	2,4-Ksilidin	0,05	T.E.	3,29	2,54	2,67	T.E.	0,22	6,23	1,56	2,23	6,23	T.E.	T.E.	8,90	T.E.	2,67
		5	4,76	5,65	T.E.	2,00	1,34	0,45	4,23	2,00	4,23	2,89	T.E.	2,89	3,78	T.E.	6,68
	2,5-Ksilidin	0,05	4,36	2,94	2,18	2,89	0,00	0,00	5,79	2,00	3,56	3,78	T.E.	1,56	6,46	T.E.	4,90
		5	2,18	4,63	4,23	1,34	T.E.	T.E.	5,12	0,45	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	2,45	T.E.	T.E.
	3,5-Ksilidin	0,05	3,78	1,91	1,60	1,11	T.E.	T.E.	8,01	2,89	1,78	5,12	T.E.	T.E.	11,58	T.E.	1,34
		5	4,81	3,56	0,89	1,34	T.E.	T.E.	7,12	0,89	1,78	3,78	T.E.	T.E.	5,79	T.E.	1,56
	Sentezlenen	0,005	4,41	2,85	1,69	3,34	T.E.	T.E.	8,68	2,67	T.E.	6,46	0,22	T.E.	11,13	1,78	4,67
		0,05	3,52	1,38	2,63	5,12	0,22	1,11	5,57	T.E.	2,45	5,79	T.E.	2,45	10,68	T.E.	8,46

T.E., Tayin edilemedi

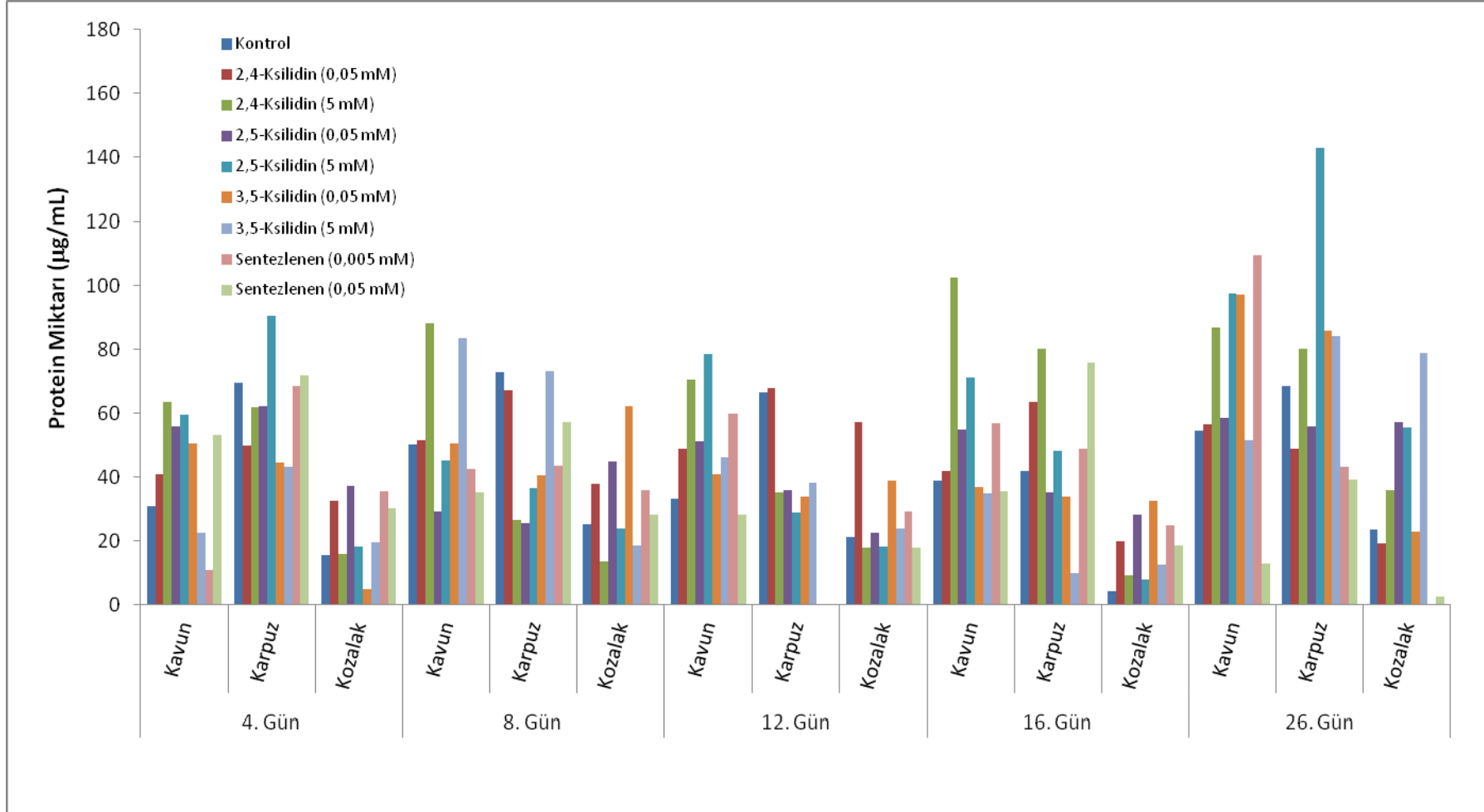


Şekil 4.2. *P. chrysosporium*'un uygulanan koşullar altındaki zamana bağlı lakkaz aktivitesi

Çizelge 4.4 *T. versicolor*'ın uygulanan koşullar altındaki zamana bağlı protein miktarı

Fungus	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>Trametes versicolor</i>	Kontrol		30,66	69,37	15,41	50,03	72,85	25,06	33,22	66,54	21,13	38,66	41,68	4,26	54,63	68,40	23,64
	2,4-Ksilidin	0,05	40,76	49,90	32,34	51,37	67,05	37,72	48,95	67,87	57,09	41,86	63,62	19,67	56,39	48,93	19,10
		5	63,60	61,65	15,95	88,26	26,35	13,50	70,38	35,17	17,86	102,58	80,05	9,29	86,66	80,26	35,74
	2,5-Ksilidin	0,05	55,91	62,16	37,20	29,29	25,59	44,94	51,02	35,84	22,54	54,80	35,07	28,21	58,63	55,98	57,06
		5	59,39	90,42	18,14	45,15	36,34	23,93	78,32	28,97	18,18	71,12	48,16	7,75	97,63	142,88	55,44
	3,5-Ksilidin	0,05	50,55	44,49	4,65	50,52	40,49	62,24	40,90	33,86	38,70	36,79	33,75	32,34	97,13	85,72	22,76
		5	22,35	42,99	19,56	83,48	73,23	18,42	46,30	38,07	23,92	34,97	9,91	12,36	51,55	84,28	78,78
	Sentezlenen	0,005	10,94	68,57	35,32	42,38	43,58	35,67	59,78	T.E	29,28	56,94	48,79	24,84	109,46	43,07	T.E.
		0,05	53,06	71,68	30,23	35,09	57,11	28,09	28,07	T.E.	17,94	35,52	75,78	18,37	12,65	39,17	2,47

T.E., Tayin edilemedi

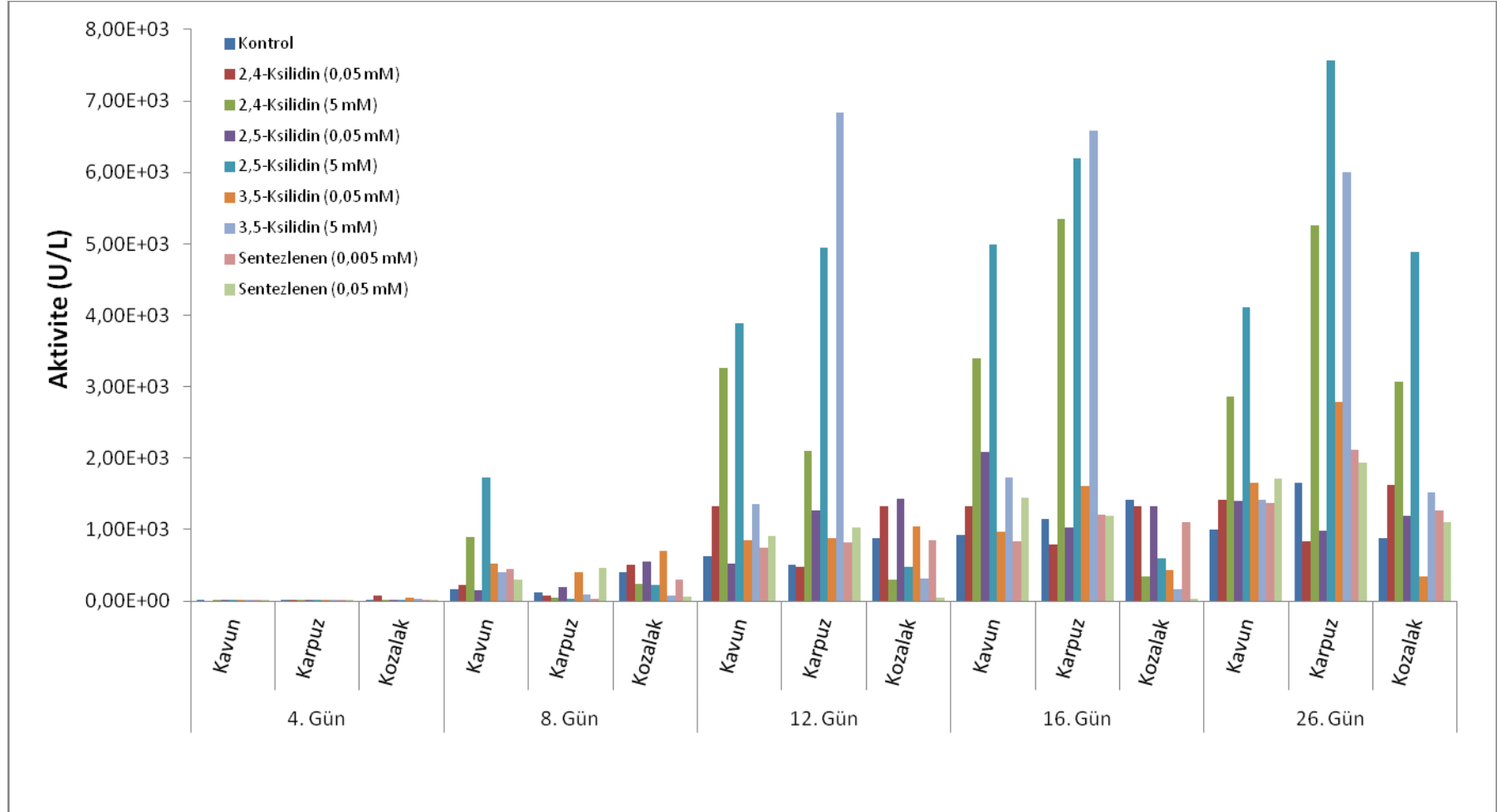


Şekil 4.3. *T. versicolor*'ın uygulanan koşullar altındaki zamana bağlı protein miktarı

Çizelge 4.5. *T. versicolor*'ın uygulanan koşullar altındaki zamana bağlı lakkaz aktivitesi

Fungus	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>Trametes versicolor</i>	Kontrol		5,01	3,90	18,39	160,90	114,06	398,45	631,07	500,85	880,38	919,34	1144,16	1413,51	1006,15	1658,37	883,72
	2,4-Ksilidin	0,05	T.E.	3,83	70,92	222,15	68,56	511,98	1328,92	479,70	1326,70	1320,02	794,68	1326,70	1409,06	828,07	1620,53
		5	2,00	2,00	14,91	899,30	44,52	244,86	3263,32	2096,89	296,06	3396,88	5342,40	340,58	2862,64	5262,26	3062,98
	2,5-Ksilidin	0,05	9,13	5,52	22,84	143,80	198,67	554,83	529,79	1273,27	1438,00	2090,21	1021,73	1324,47	1404,61	990,57	1188,68
		5	11,75	1,78	14,56	1727,38	29,49	217,59	3891,05	4941,72	471,91	4988,47	6197,18	589,89	4109,20	7568,40	4888,30
	3,5-Ksilidin	0,05	6,77	5,57	40,60	523,11	409,58	701,19	857,01	874,82	1041,77	968,31	1604,95	427,97	1660,60	2786,95	347,26
		5	6,81	1,11	36,46	410,70	93,49	71,79	1351,18	6838,27	307,19	1722,92	6580,06	164,72	1415,74	6001,30	1522,58
	Sentezlenen	0,005	4,90	6,01	22,39	447,43	26,16	293,28	750,16	816,94	848,11	832,52	1213,17	1097,42	1375,67	2119,15	1259,92
		0,05	8,15	2,89	10,20	296,06	468,57	58,43	908,21	1032,86	44,52	1440,22	1195,36	26,71	1718,47	1941,07	1108,55

T.E., Tayin edilemedi

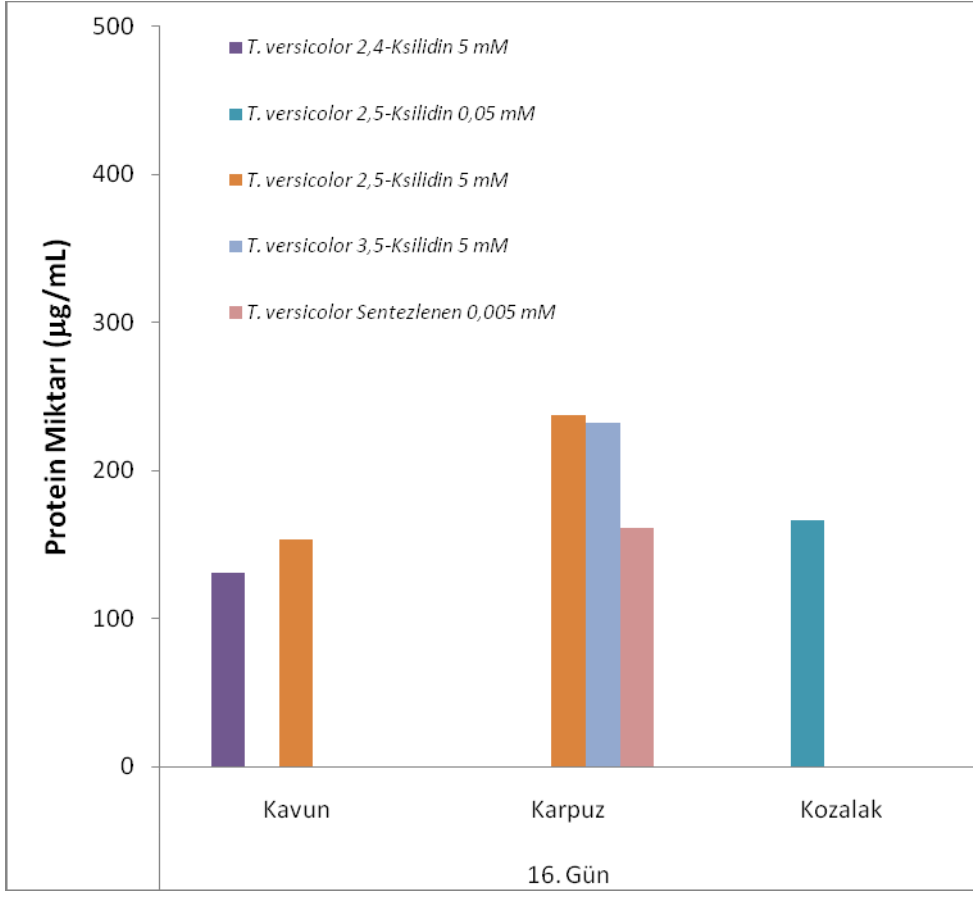


Şekil 4.4. *T. versicolor*'ın uygulanan koşullar altındaki zamana bağlı lakkaz aktivitesi

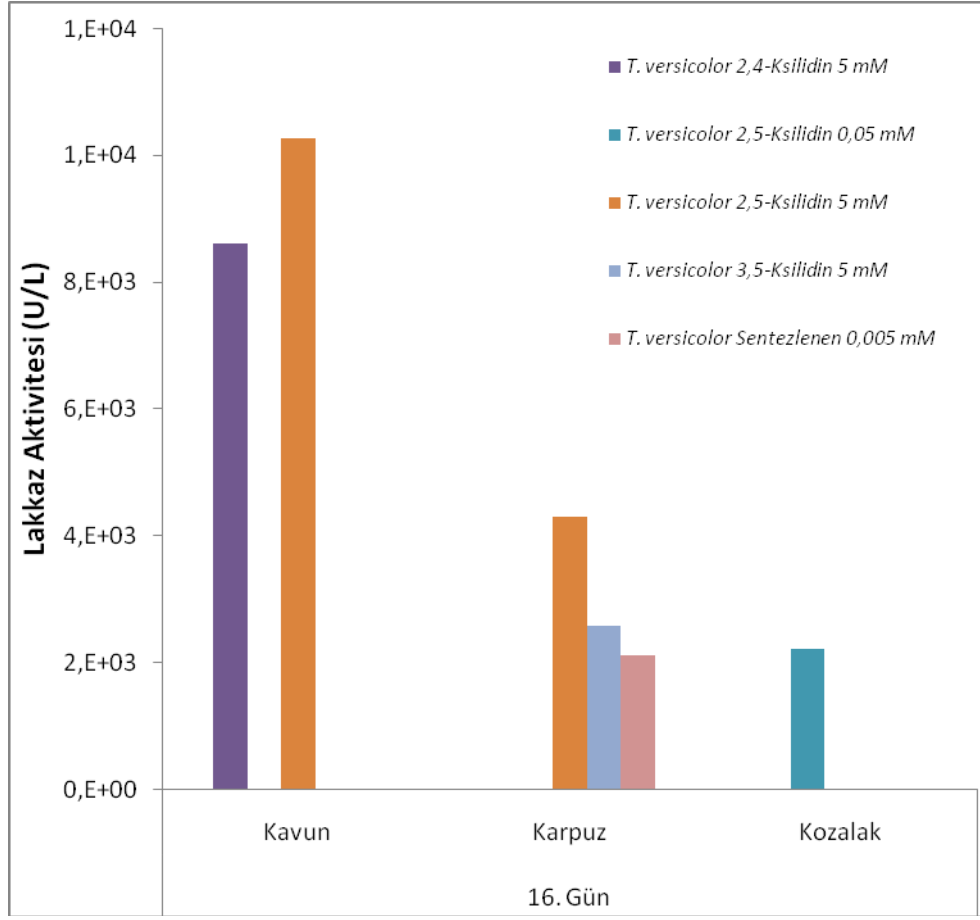
Çizelge 4.6. Seçilen 6 farklı koşulda örneklerin 16. gündeki protein miktarı ve lakkaz aktivitesi.
(Değerler her bir koşul için ikişer kültürasyonun ortalamalarıdır)

Tür / Koşul	Protein Miktarı (µg/mL)	Lakkaz Aktivitesi (U/L)
<i>T. versicolor</i> 5 mM 2,4-Ksilidin (Kavun)	131,24	8610,17
<i>T. versicolor</i> 5 mM 2,5-Ksilidin (Kavun)	153,41	10264,09
<i>T. versicolor</i> 5 mM 2,5-Ksilidin (Karpuz)	237,82	4301,75
<i>T. versicolor</i> 5 mM 3,5-Ksilidin (Karpuz)	232,17	2583,27
<i>T. versicolor</i> 0,05 mM 2,5-Ksilidin (Kozalak)	166,07	2218,21
<i>T. versicolor</i> 0,005 mM Sentezlenen (Karpuz)	161,53	2109,14

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

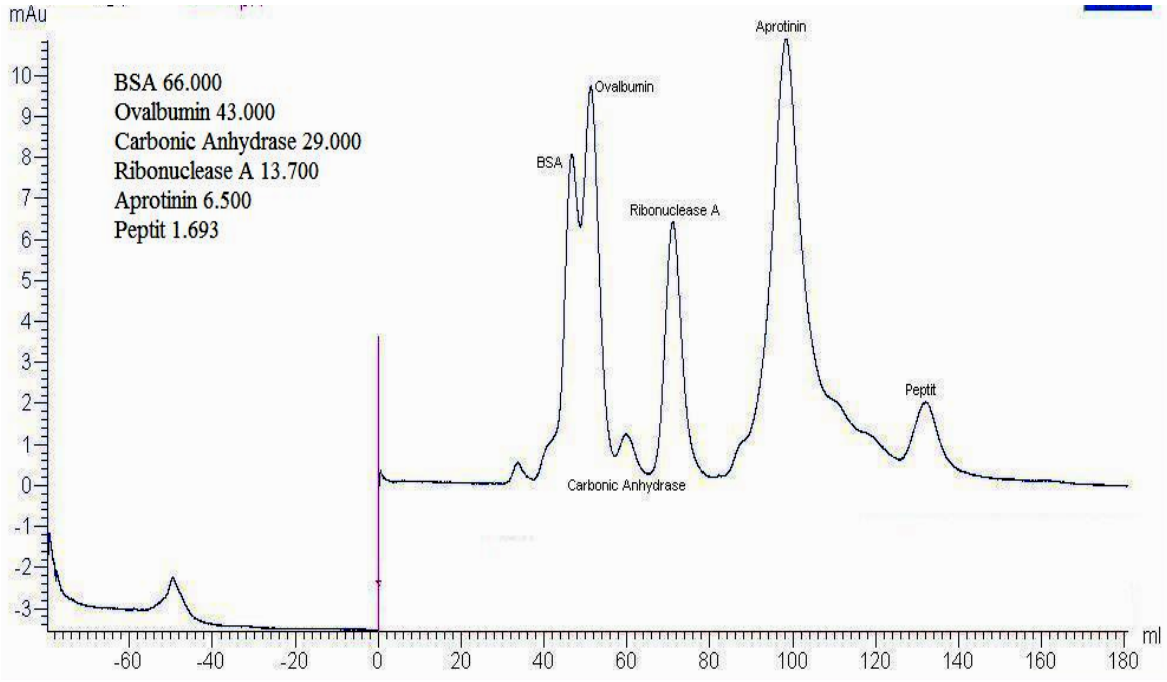


Şekil 4.5. Seçilen 6 farklı koşulda örneklerin 16. gündeki protein miktarı

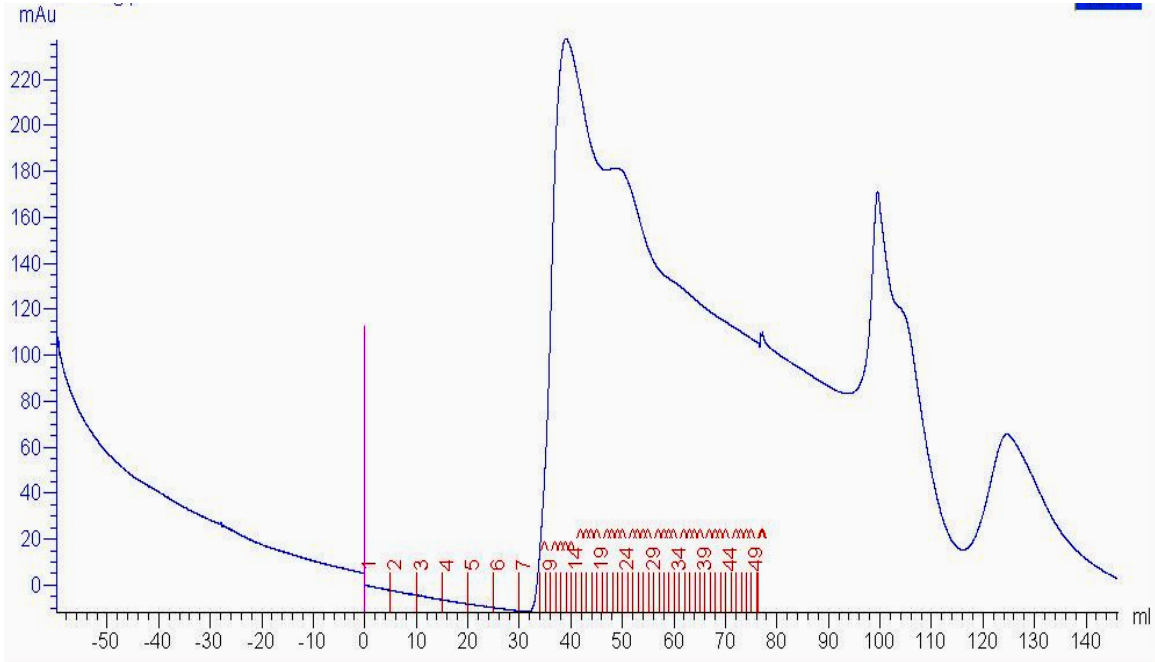


Şekil 4.6. Seçilen 6 farklı koşulda örneklerin 16. gündeki lakkaz aktivitesi

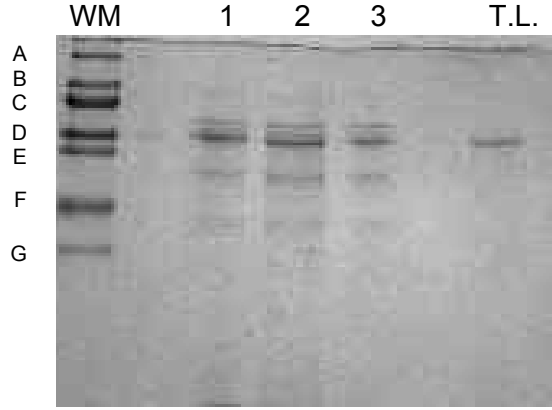
4. ARAŞTIRMA BULGULARI



Şekil 4.7. Kullanılan Sephacryl S-100 kolonunun kalibrasyonu



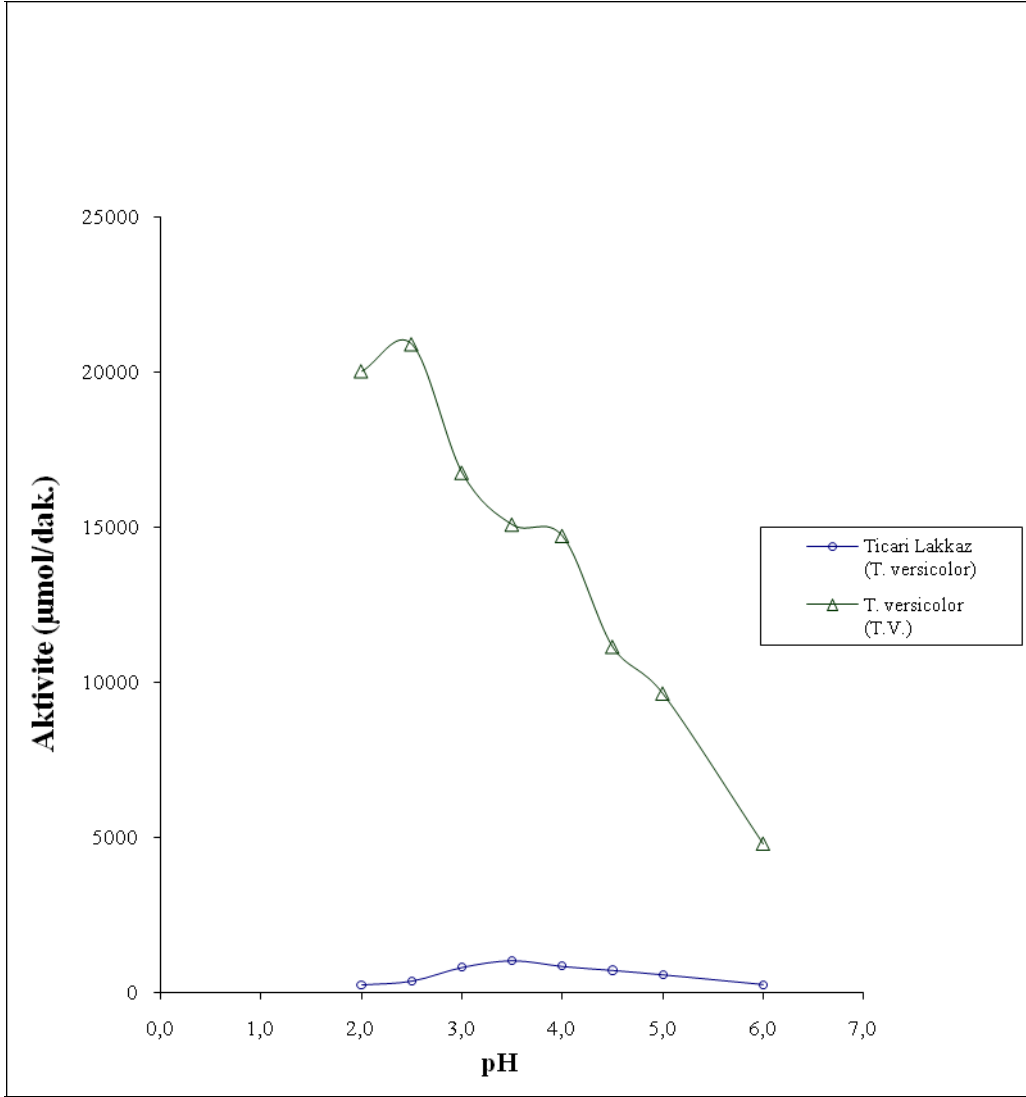
Şekil 4.8. *T. versicolor* ile elde edilen lakkazın moleküler elek kromatogramı



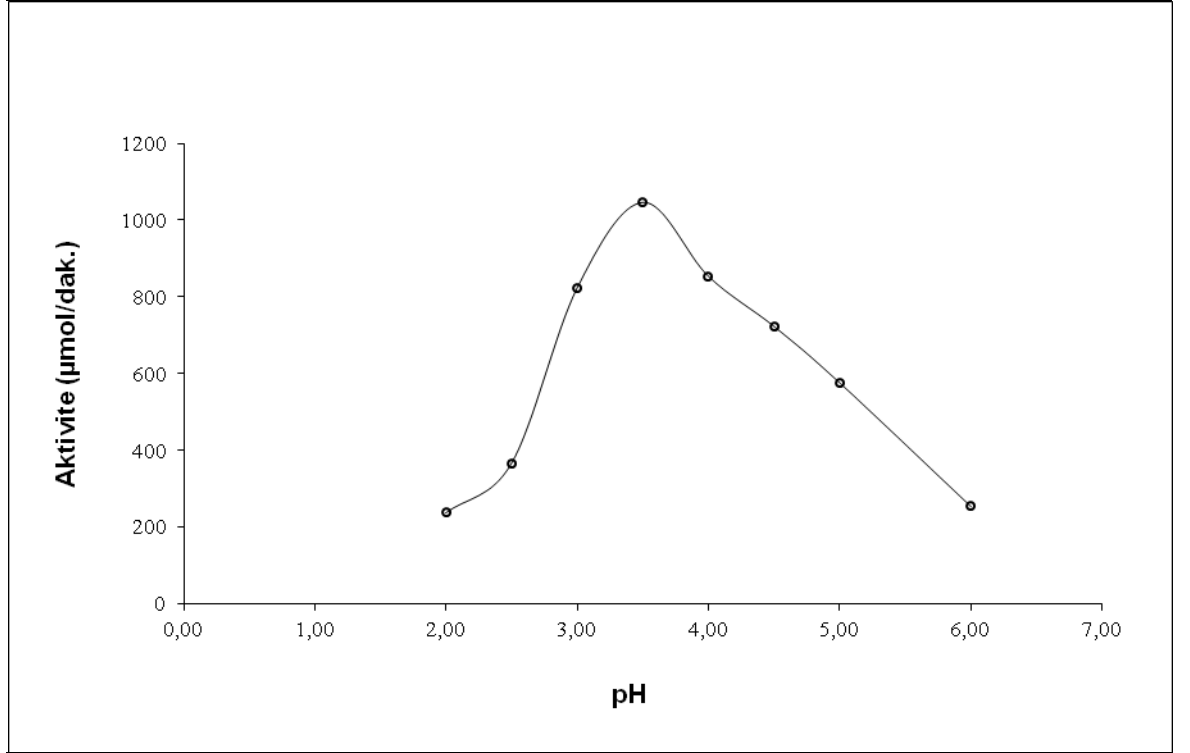
Şekil 4.9. *T. versicolor* lakkazı elektroforez bant profilleri. WM; protein standardı [(Weight Maker, A ;At serumu α_2 -makroglobulini M.A.: 180.000, B; *E. coli* β -galaktozidazı M.A.: 116.000, C; İnsan sütü laktoferini M.A.: 90.000 , D;Tavşan kası piruvat kinazı M.A.: 58.000, E;Domuz kalbi fumarazı 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 lakkaz.

Çizelge 4.7. Ticari lakkaz ve kısmi saflaştırılan lakkazın farklı pH'larda 1 mM ABTS'ye karşı ölçülen aktiviteleri.

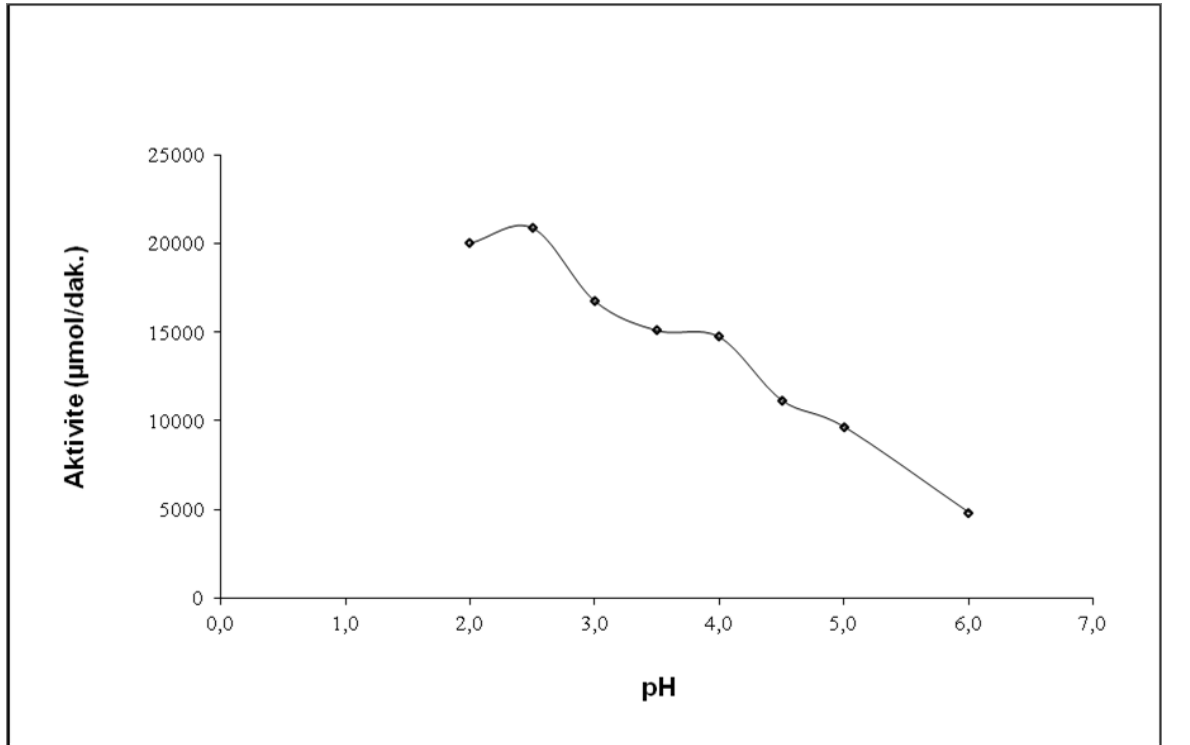
pH	Aktivite ($\mu\text{mol/dk}$)	
	Ticari Lakkaz	<i>T. versicolor</i> Lakkazı
2,00	237,904	20034,000
2,50	366,455	20902,140
3,00	823,064	16761,780
3,50	1045,942	15092,280
4,00	853,115	14724,990
4,50	722,894	11152,260
5,00	575,978	9649,710
6,00	253,764	4808,160



Şekil 4.10. Ticari lakkaz ve kısmi saflaştırılan lakkazların farklı pH'larda 1 mM ABTS'ye karşı olçülen aktiviteleri.



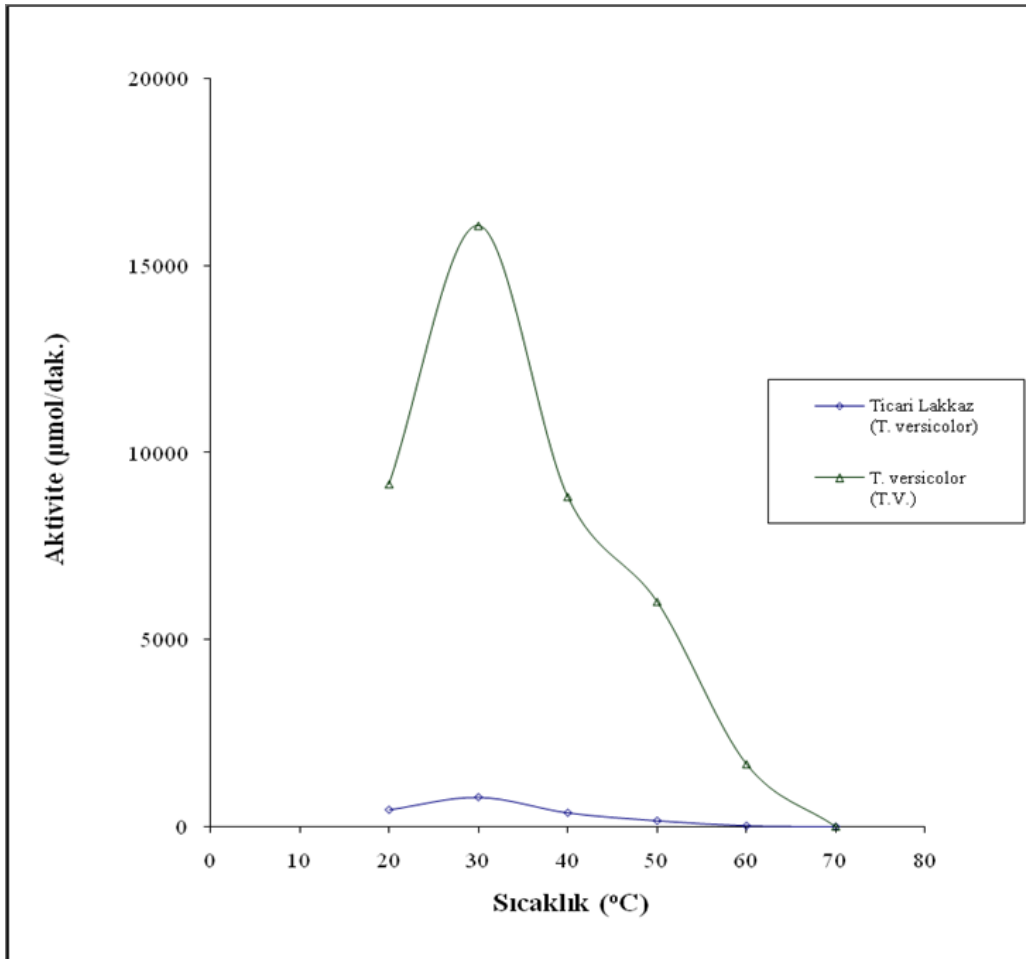
Şekil 4.11. Ticari lakkazın pH-aktivite ilişkisi

Şekil 4.12. *T. versicolor* lakkazının pH-aktivite ilişkisi

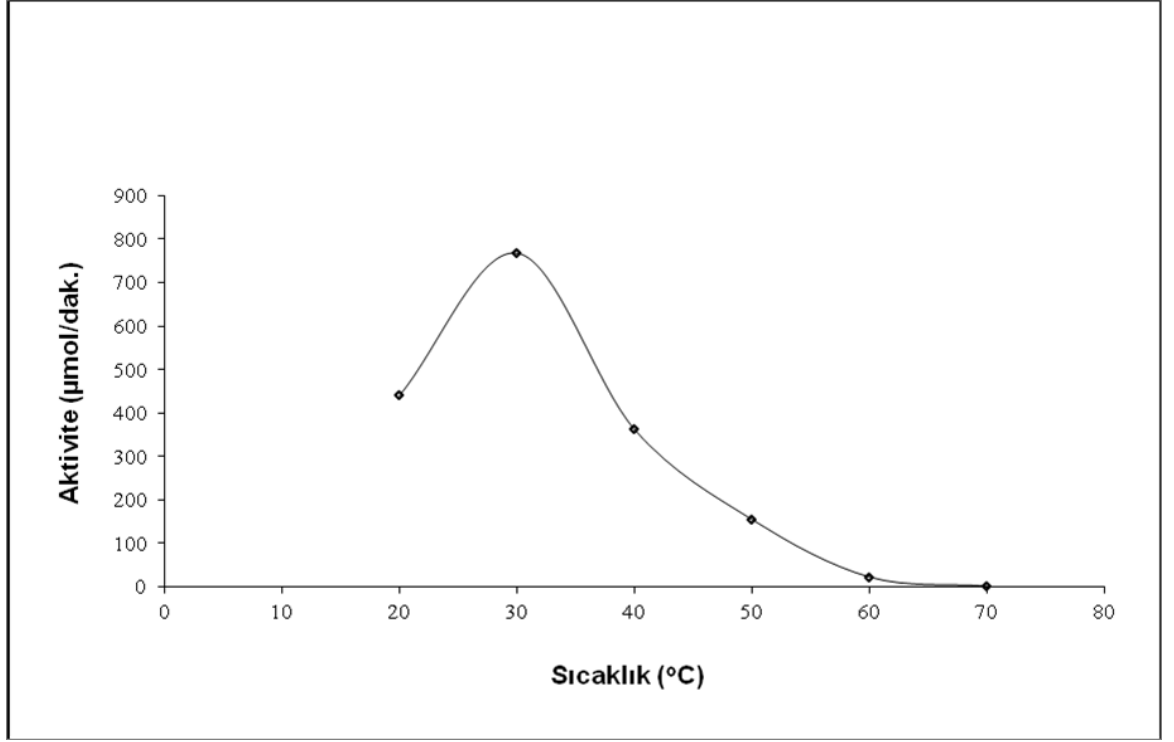
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çizelge 4.8. Ticari lakkaz ve kısmi saflaştırılan lakkazın farklı sıcaklıklarda 0,6 mM ABTS'ye karşı ölçülen aktiviteleri.

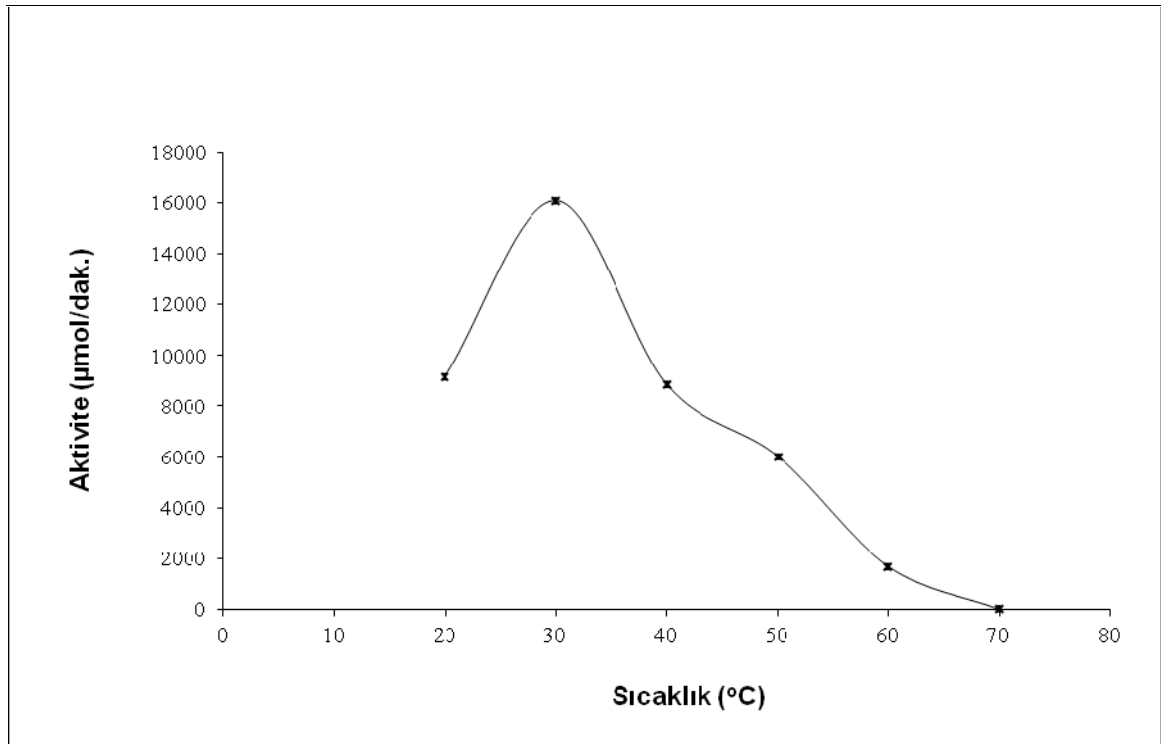
Sıcaklık (°C)	Aktivite (µmol/dk)	
	Ticari Lakkaz	<i>T. versicolor</i> (T.V.) Lakkazı
20,00	439,913	9148,860
30,00	768,805	16060,590
40,00	361,447	8814,960
50,00	153,594	6010,200
60,00	20,869	1669,500
70,00	0,000	0,000



Şekil 4.13. Ticari lakkaz ve kısmi saflaştırılan lakkazın 0,6 mM ABTS derişiminde ölçülen (436 nm), farklı sıcaklıklardaki aktiviteleri



Şekil 4.14. Ticari lakkazın sıcaklık-aktivite ilişkisi

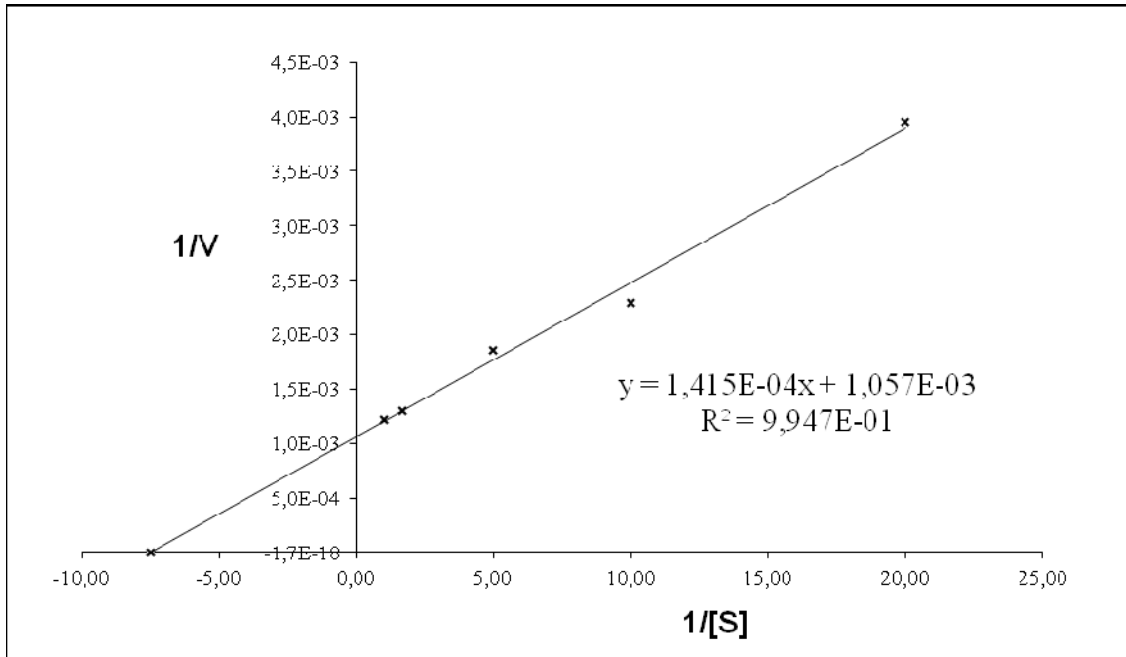


Şekil 4.15. *T. versicolor* lakkazın sıcaklık-aktivite ilişkisi

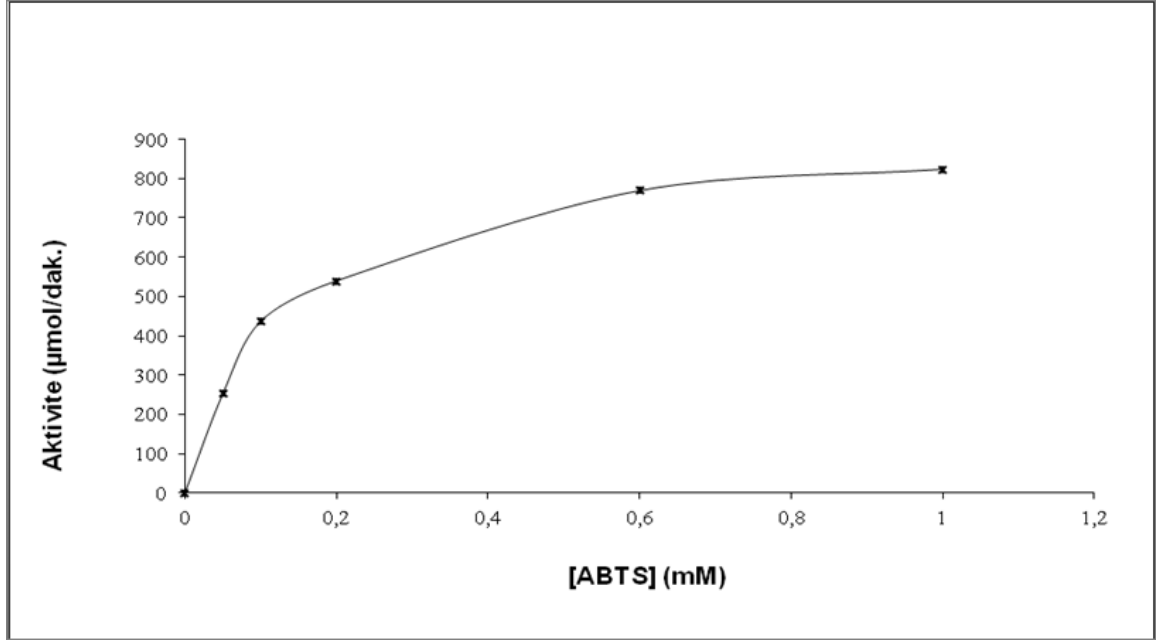
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çizelge 4.9. Ticari lakkaz ve kısmi saflaştırılan lakkazın 30 °C sıcaklık ve pH 3'te değişik ABTS derişimlerinde 436 nm'de ölçülen absorbans değerlerine bağı olarak hesaplanan kinetik parametreler.

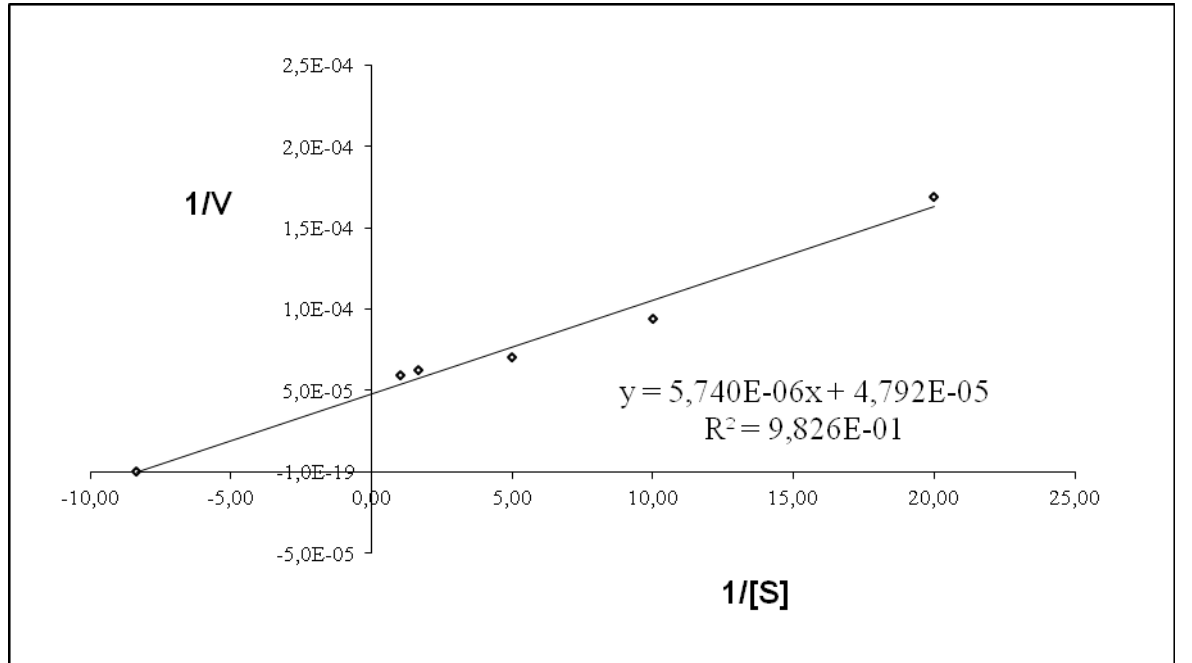
[ABTS] (mM)	Aktivite (µmol/dk)	
	Ticari Lakkaz	<i>T. versicolor</i> (T.V.) Lakkazı
0,05	252,929	5910,030
0,10	436,574	10651,410
0,20	539,249	14123,970
0,60	768,805	16060,590
1,00	823,064	16761,780
V_{max}	946,217	20868,114
K_M	0,134	0,120



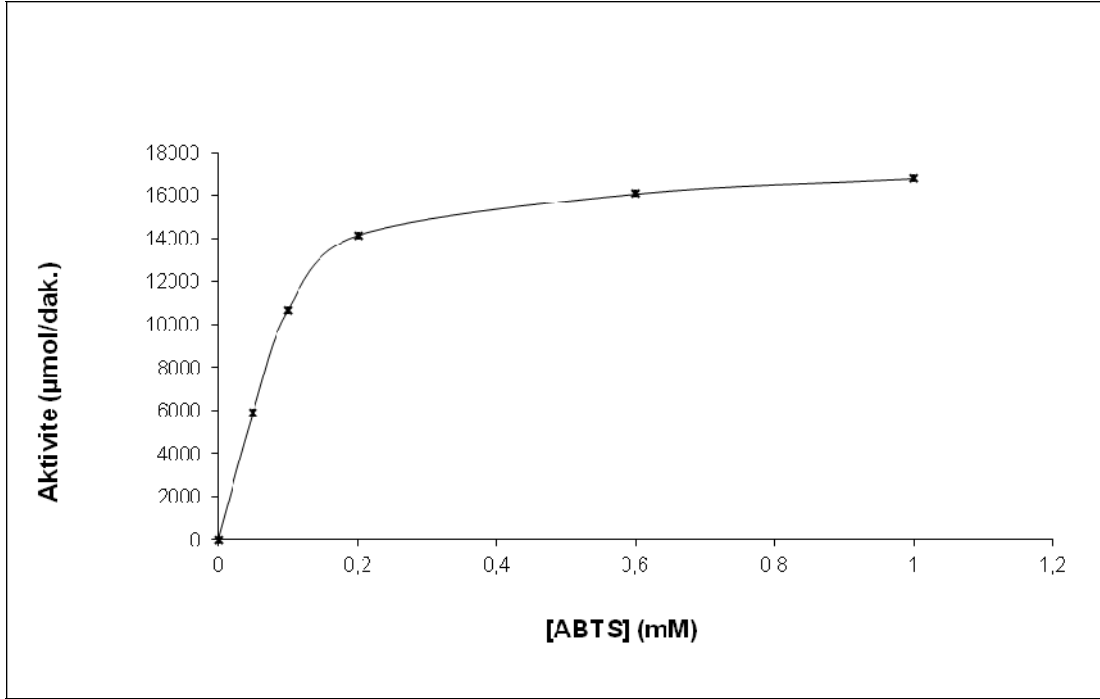
Şekil 4.16. Ticari lakkazın Lineveaver-Burk Grafiğı



Şekil 4.17. Ticari lakkazın Michaelis-Menten Grafiği

Şekil 4.18. *T. versicolor* lakkazının Lineveaver-Burk Grafiği.

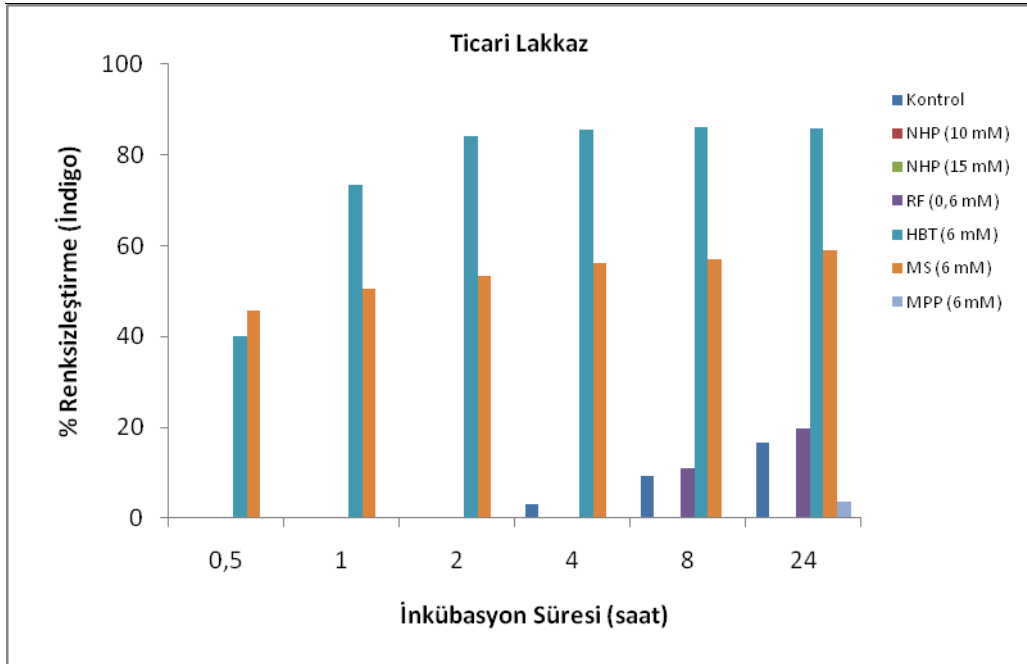
4. ARAŞTIRMA BULGULARI



Şekil 4.19. *T. versicolor* lakkazının Michaelis-Menten Grafiği.

Çizelge 4.10. Ticari lakkaz ile oluşturulan lakkaz-medyatör sistemlerinin indigo boya üzerine etkisi

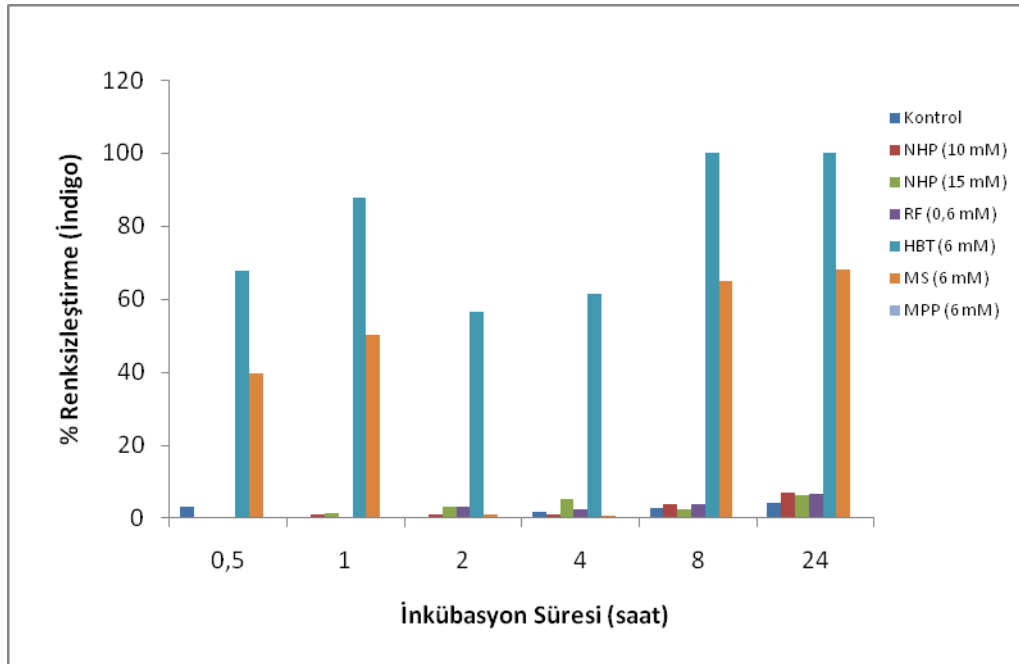
Fungus	Medyatör	Derişim (mM)	% Renksizleştirme (İndigo)					
			İnkübasyon Süresi (saat)					
			0,5	1	2	4	8	24
<i>Trametes versicolor (Ticari)</i>	Kontrol		-	-	-	2,99	9,20	16,67
	NHP	10	-	-	-	-	-	-
		15	-	-	-	-	-	-
	RF	0,6	-	-	-	0,00	11,04	19,70
	HBT	6	40,13	73,37	84,21	85,67	86,20	85,76
	MS	6	45,77	50,46	53,25	56,12	57,06	59,09
	MPP	6	-	-	-	-	-	3,64

**Şekil 4.20.** Ticari lakkaz ile lakkaz-medyatör sistemlerinin indigo boya üzerine etkisi

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çizelge 4.11. *T. versicolor* lakkazı ile oluşturulan lakkaz-mediyatör sistemlerinin indigo boya üzerine etkisi

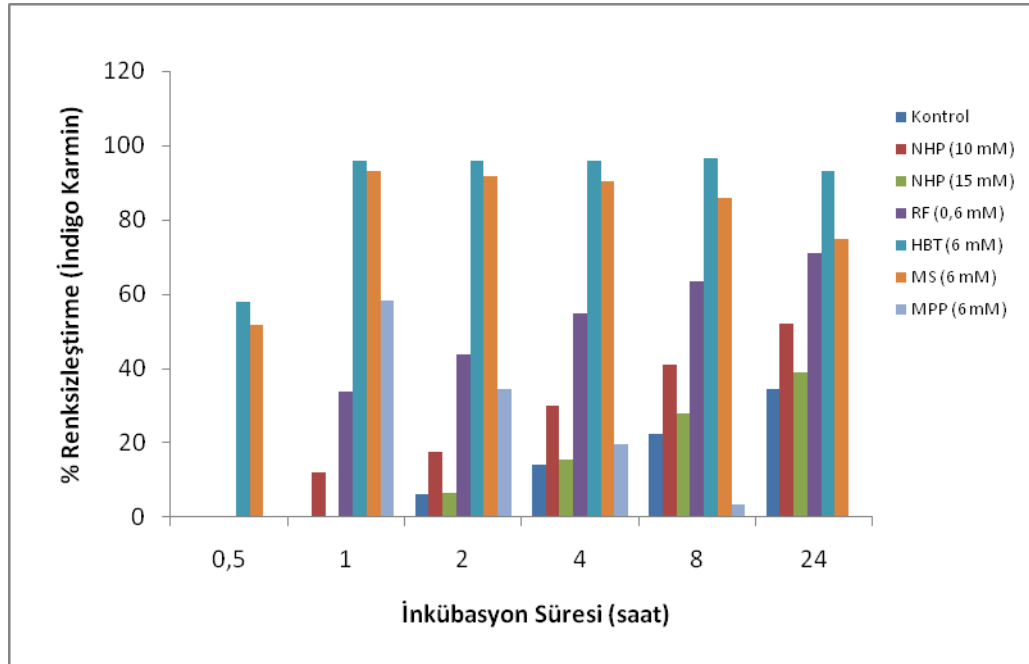
Fungus	Mediyatör	Derişim (mM)	% Renksizleştirme (İndigo)					
			İnkübasyon Süresi (saat)					
			0,5	1	2	4	8	24
<i>Trametes versicolor</i>	Kontrol		3,06	-	-	1,70	2,77	4,35
	NHP	10	-	1,04	1,21	0,95	3,76	7,02
		15	-	1,51	3,30	5,37	2,33	6,27
	RF	0,6	-	-	3,24	2,36	3,81	6,57
	HBT	6	67,88	87,64	56,46	61,43	100,58	103,90
	MS	6	39,73	50,31	0,94	0,84	65,14	68,31
	MPP	6	-	-	-	-	-	-



Şekil 4.21. *T. versicolor* lakkazı ile lakkaz-mediyatör sistemlerinin indigo boya üzerine etkisi

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

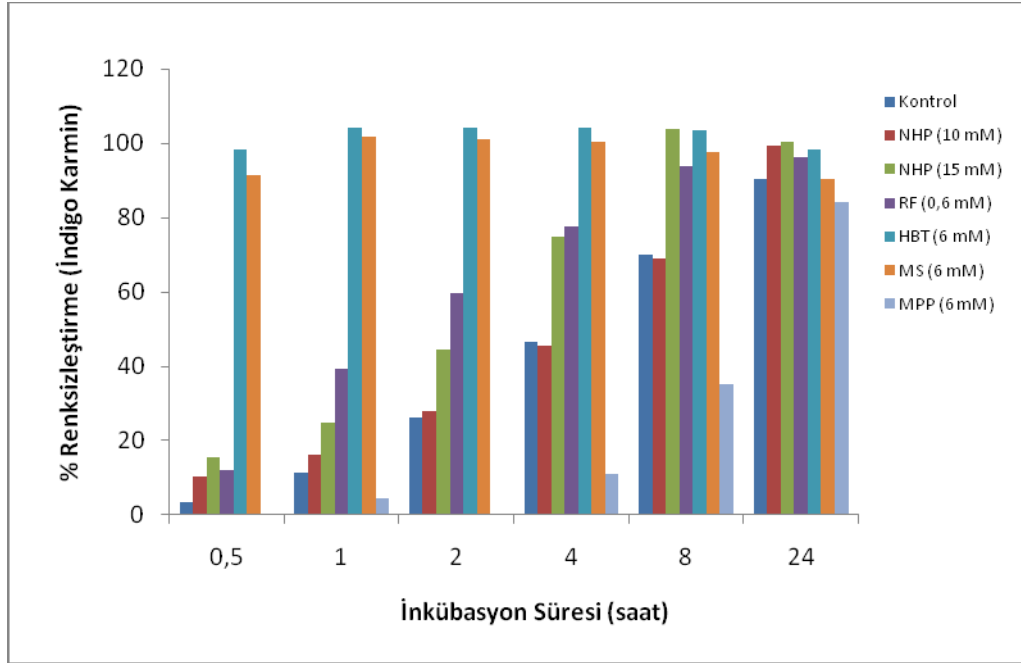
Fungus	Medyatör	Derişim (mM)	% Renksizleştirme (İndigo Karmin)					
			İnkübasyon Süresi (saat)					
			0,5	1	2	4	8	24
<i>Trametes versicolor</i> (Ticari)	Kontrol		-	0,34	6,17	14,10	22,51	34,58
	NHP	10	-	12,18	17,58	30,13	41,20	51,94
		15	-	-	6,38	15,61	27,90	39,14
	RF	0,6	-	33,67	43,82	54,99	63,42	71,14
	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
	MPP	6	-	58,40	34,49	19,48	3,54	-

**Şekil 4.22.** Ticari lakkaz ile lakkaz-medyatör sistemlerinin indigo karmin boya üzerine etkisi

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çizelge 4.13. *T. versicolor* lakkazı ile oluşturulan lakkaz-medyatör sistemlerinin indigo karmin boya üzerine etkisi

Fungus	Medyatör	Derişim (mM)	% Renksizleştirme (İndigo Karmin)					
			İnkübasyon Süresi (saat)					
			0,5	1	2	4	8	24
<i>Trametes versicolor</i>	Kontrol		3,45	11,44	26,30	46,63	70,18	90,37
	NHP	10	10,34	16,05	28,08	45,50	69,15	99,22
		15	15,52	24,78	44,59	74,90	103,69	100,26
	RF	0,6	12,07	39,40	59,64	77,51	93,93	96,10
	HBT	6	98,28	104,25	104,25	104,18	103,43	98,44
	MS	6	91,38	101,59	101,06	100,52	97,62	90,37
	MPP	6	-	4,43	-	11,09	35,29	84,13



Şekil 4.23. *T. versicolor* lakkazı ile 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 onların derişimlerine bağlı, kontrolle kıyaslandıklarında, protein miktarı ve lakkaz aktivitesinde çok çarpıcı farklar olmamasına karşın kavun ve karpuz kabukları üzerinde 2,4-, 2,5- ve 3,5-ksilidin ile daha yüksek lakkaz aktivitesine ulaşılmıştır. 2,5-ksilidinin indükleyici olarak kullanıldığı çok sayıda çalışma yapılmıştır (Couto ve ark. 2004, Kollman ve ark. 2005). Beyaz çürükçül fungus olan *P. cinnabarinus* SS3 'ün indükleyici olarak 2,5-ksilidinin kullanıldığında fungusun metabolik olarak bu bileşikten dokuz farklı türev sentezlendiğini ve bunların içinde de (4E)-4-(2,5-dimetilfenilimino)-2,5-siklohegzan-2,5-dienon türevinin lakkaz salgılama üzerinde indükleyici etkisinin en yüksek olduğunu idda etmişlerdir. Laboratuvarımızda sentezlenen bu bileşiği indükleyici olarak kullandığımızda lakkaz salgılama üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığını gözlemledik. Bu sonuç, kullanılan

bu bileşiğin *P. cinnabarinus* SS3'ün lakkaz geni üzerinde gösterdiği indükleyici etkisini *T. versicolor* lakkaz geni 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 sentezlenemeyeceği düşünülürse 2,4- ve 3,5-ksilidinlerin metabolitleri arasında idda edilen bileşik kadar ya da daha fazla indükleyici etkisine sahip bileşiklerin olabileceği kanısını uyandırmaktadır.

5 mM, 2,5-ksilidinin indüktif etkisi ve kavun kabuğu üzerinde *T. versicolor* inokülasyonunun ardından 16 günlük inkübasyon süresinin sonunda üst sıvıdan zenginleştirilen lakkazın substrat olarak ABTS kullanıldığında optimal pH'sı 2,5 optimal sıcaklığı da 30 °C olarak bulunmuşlardır. Bütün enzimler gibi lakkazların katalitik performansları farklı pH ve sıcaklık koşullarındaki aktivite ve kararlılıklarıyla tanımlanır. Lakkazlar substrat olarak fenolik bileşikler kullanıldığında optimal pH değerleri 4-6 arasında değişirken, ABTS gibi fenolik olmayan substratlara karşı 2-3 aralığında değiştiği belirtilmiştir (Palmieri ve ark. 1993, Chefetz ve ark. 1998, Garzillo ve ark. 2001, Xu 1997). Lakkazların sıcaklık kararlılıkları, kaynak organizmaya bağlı olarak anlamlı ölçüde değişiklik gösterir. Genellikle 30-50 °C aralığında karalıdırlar (Wood 1980, Xu ve ark. 1996, Jung ve ark. 2002, Palonen ve ark. 2003) . Hem pH hem sıcaklık için bulunan değerlerin önceki çalışmalarla uyum içerisinde oldukları görülmektedir.

K_M ve V_{max} gibi kinetik sabitler ticari lakkaz için sırasıyla 0,134 mM ve 946,22 $\mu\text{M}/\text{dk}$ iken zenginleştirdiğimiz lakkaz örneği için bu değerler 0,120 mM ve 20868,11 $\mu\text{M}/\text{dk}$ olarak bulunmuştur. Bir lakkaz enziminin elde edildiği kaynağa bağlı olarak kinetik parametrelerinin değişeceği anlaşılmıştır. K_M değeri 2-500 μM aralığında değiştiği ifade edilmektedir (Xu ve ark. 1996). Lakkazların K_M , K_{cat} ve V_{max} gibi kinetik değerleri üzerine etkidikleri substrata bağlı olarakta değişir (Xu ve ark. 2001). Ticari olarak temin ettiğimiz lakkaz da *T. versicolor*'dan saflaştırıldığı düşünüldüğünde K_M değerlerinin birbirlerine yakın olması doğaldır. Ancak ABTS'ye karşı testte kullanılan ünite sayılarının yaklaşık eşit olmasına karşın bizim zenginleştirdiğimiz lakkazın V_{max} değerinin yaklaşık 20 kat yüksek olması, enzimimizin ticari olarak temin ettiğimiz enzimden daha yüksek bir katalitik etkinliğe sahip olduğunu göstermektedir.

Kültivasyonla ürettiğimiz, tuz ile çöktürme ve moleküler elek kolonu (Sephacryl-S100) ile zenginleştirdiğimiz enzimin hem kalibre edilmiş kolonla (35-68 mL arası) hemde SDS-PAGE ile molekül ağırlığı yaklaşık 60.000 olarak belirlendi. *T. versicolor*'dan üretildiği belirtilen ticari lakkaz için de SDS-PAGE ile molekül ağırlığı yaklaşık olarak 60.000 bulundu

Elektroforez bant profillerinde hem tuzla çöktürme hem de kolon sonrası lakkaz bandı dışında bantlar bulunması kullanılan funginin lakkaz dışında salgıladığı lignolitik enzimlere ait olabileceği ya da fungi tarafından salgılanan lakkaz izoenzimlerine ait olabileceğini düşündürmektedir.

Araştırmamızın temel amaçlarından birini endüstride kullanılan indigo ve indigo karmin boyaların medyatör eşliğinde ürettiğimiz lakkaz tarafından renksizleştirilebilirliği oluşturmaktadır. Literatürden 1-hidroksibenzotriazol (HBT) ve Novazymes Türkiye temsilciliği ile yapılan kişisel görüşmelerle temin edilen metilsiringeyt (MS) kontrol medyatörler olarak kullanıldı. Medyatör ya da iyileştirici olarak test ettiğimiz riboflavin (RF), N-hidroksiftalimit (NHP) ve 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-on (MPP) çözünürlükleri dikkate alınarak, değişik derişimlerinin hem ticari lakkaz hem de ürettiğimiz lakkazla birlikte oluşturdukları lakkaz medyatör sistemlerinin (LMS) ayrı ayrı indigo ve indigo karmini renksizleştirmedeki etkinlikleri araştırıldı. Ticari lakkazın kontrol LMS'leri (HBT ve MS) indigo boyayı yarım saatlik inkübasyon sonunda yaklaşık %40-45 oranında renksizleştirirken, ürettiğimiz lakkazlar bu sürede HBT ile %68, MS ile %40 oranında bir renksizleştirmeye ulaştı. Ticari lakkaz ve NHP, RF ve MPP ile oluşturulan LMS'leri RF hariç (24 saatte %20) renksizleştirmede etkisiz olurlarken, ürettiğimiz lakkazla oluşturulan LMS'lerinden 15 mM NHP ve 0,6 mM RF ile 4. saatte yaklaşık %5 oranında bir renksizleştirme hesaplandı.

İndigo karmin üzerine medyatörsüz lakkazlar renksizleştirme etkisi gösterdi (8. saatte %70). Hem ticari lakkaz hem de ürettiğimiz lakkaz ile oluşturulan bütün LMS'leri ile (MPP hariç) 8. saatte yaklaşık %100'e varan renksizleştirme etkisi hesaplandı.

Bu sonuçların hem enzimlerin hem de medyatörün kullanılan substratlara bağlı olarak redoks potansiyellerinin uygun olup olmaması ile açıklanabilir. Seçtiğimiz medyatörlerin, öngörülen fonksiyonel gruplara ve kimyasal organizasyona sahip

olmalarına karşın özellikle indigo boya üzerinde etkisiz olmaları redoks potansiyellerinin uygun olmamasıyla, indigo karmin için ise uygun olması ile açıklanabileceği kanısındayız.

Sonuç olarak;

P. chryso sporium için anlamlı lakkaz aktivitesine ulaşılacak uygun kültürasyon koşullarının araştırılması gerekir.

T. versicolor ile üretilen enzimin ABTS'ye karşı katalitik etkinliği ticari lakkazdan daha yüksek olması sevindiricidir. Ancak bu enzimin inkübasyon koşulları değiştirilerek aynı medyatörlerle ya da farklı medyatörlerle indigo boyayı renksizleştirme denemelerinin yapılması gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Akthar, 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 *Ceriporiopsis subvermispora*, TAPPI J. (75):105-109.
- Amaral, P.F.F., Fernandes, D.L.A., Tavares, A.P.M., Xavier, A.B.M.R., Cammarota, M.C., Coutinho, J.P.A., and Coelho, M.A.Z., 2004. Decolorization of Dyes From Textile Wastewater by *Trametes versicolor*. Environ. Technol, (25): 1313-1320.
- Aramayo, R., and Timberlake, W.E., 1990. Sequence and molecular structure of the *spgillus nidulans* yA (laccase I) gene. Nucleic Acids Res. (18):3415-3415.
- Archibald, F.S., Bourbannis, R., Jurasek, L., Paice, M.G., & Reid, I.D., 1997. Kraft Pulp Bleaching and Delignification by *Trametes versicolor*. J. Biotechnol, (53):215-236.
- Arda, M., 2000. Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayın Serisi, 46, Türkiye.
- 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.
- Audesirk, T., Audesirk, G., Byers, B.E., 2008. Biology: Life on Earth. Pearson International Edition, 42, NewYork.
- Auterinen, A.L., 2006. White biotechnology & modern textile processing. Textile World, (16): 40-44p.
- Aykut, V.Ö., 2010. Beyaz Çürükçül Funguslardan Lakkaz Üretimini Araştırılması ve İndüksiyonu. Yüksek lisans tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul,10.
- Baldiran, P., 2003. Interactions of heavy metals with white-rot fungi. Enzyme Microb Tech. (32):78-91.
- Baldrian P., 2006. Fungal laccases occurrence and properties, Fems Microbiol Rev, 96 (30): 215-242.
- Banci, L. 1997. Structural Properties Of Peroxidases. J. Biotechnol., (53): 253-263.
- Banci, L., Ciofi-Baffoni, S., Tien, M., 1999. Lignin and Mn Peroxidase-Catalyzed Oxidation Of Phenolic Lignin Oligomers. Biochemistry, (38):3205-3210.
- Bar, M., 2001. Kinetics and Physico-chemical Properties of White-rot Fungal Laccases. University of Free State. Bloemfontein. 12: 116
- Basto, C., Tzanov, T., and Cavaco-Paulo, A., 2007. Combined ultrasound-laccase assisted bleaching of cotton. Ultrasonics Sonochemistry,(14): 350-354.

Beilen, J., and 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., And Mouglin, C., 2002. Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: insights into substrate recognition and correlation with kinetics. *Biochemistry* (41):7325-7333.

Blanquez, P., Casas, N., Font, X., Gabarrell, X., Sarra, M., Caminal, G., and Vicent, T., 2004. Mechanism of Textile Metal Dye Biotransformation by *Trametes versicolor*. *Water Research*, (38): 2166-2172.

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., and Borneman, S., 1997. Reactivities of various mediator and laccase with kraft pulp and lignin model compounds. *Appl. Environ. Microbiol*, (63): 4627-4632.

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., Rocheford, D., Paice, M.G., Renaud, S., and Leech, D., 2000. Transition Metal Complexes : A New Class of Laccase Mediators for Pulp Bleaching, *TAPPI J.*, (80): 68-79.

Bradford, M.M.A., 1976. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. *Anal. Biochem.*, (72): 248 – 254.

Call, H.P., and Mucke, I., 1997. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozymes[®]-process), *J. Biotechnol.*, 53(2) : 163–202.

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

Cameros, S., Ana, C., Poula, N., Eric, R., Anne, L., Jesus, M.M., Angel, M., 2008. P-hydroxyinnamis acids as natural mediators for laccase oxidation of recalcitrant compounds. *Environmental science and technology*, 42 (17): 6703-6709.

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

Candaş, D., 2011. Canlılar dünyası. http://www.biltek.tubitak.gov.tr/bilgipaket/canlilar/fungi/fungi_giris.htm, 12.5.2011.

Cantarella, G., Galli, C., Gentili, P., 2003. Free radical vs. electron-transfer routes of oxidation of hydrocarbons by laccase/mediator systems. Catalytic or stoichiometric procedures. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, (22): 135–144.

Carlile, M.J., and Watkinson, S.C., 2000. *The Fungi*. Academic Press, 173, London.

Casas, N., Blázquez, P., Gabarrell, X., Vicent, T., Caminal, G., Sarrà, M., 2007. Degradation of Orange G by laccase: fungal versus enzymatic process. *Environ Technol*, 28(10):1103-10.

Cassland, P., and 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.

Chagas, E.P., Durrant, L.R., 2001. Decolourization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajor-caju*. *Enzyme Microb. Technol.*(29): 473-477.

Chakar F.S., 1999. Overview of Laccase Biobleaching Technology for Kraft Pulps. Unpublished. Atlanta, Georgia: the Institute Georgia Institute of Technology, (794): 7-10.

Champagne, P.P., Ramsay, J.A., 2005. Contribution of Manganese Peroxidase and Laccase to Dye Decoloration by *Trametes versicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol*, (69): 276-285.

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.

Claus, H., Faber, G., König, H., 2002. Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccase, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59(122): 672-678.

Claus, H., 2004. Laccases: structure, reactions, distribution. *J. Micron.*, (35): 93–96.

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., and 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.

Couto, S.R., Moldes, D., Liebman, A., Sanroman, A., 2003. Investigation of several bioreactor configurations for laccase production by *Trametes versicolor* operating in solid-state conditions, *Biochemical Engineering Journal*, (15):21–26.

Couto, S.R., Rosales, E., Gundin, M., Sanroman, M.A., 2004 . Exploitation of a waste from the brewing industry for laccase production by two *Trametes* species. *Journal of Food Engineering*, (64) : 423–428.

Couto, S.R., Sanroman, M.A., Gubitz, G.M., 2005. Influence of redox mediators and metal ions on synthetic acid dye decolorization by crude laccase from *Trametes hirsute*. *Chemosphere*, 58(4): 417–422.

Couto, S.R., and Herrera, J.L.T., 2006. Industrial and Biotechnological Applications of Laccase: A Review. *Biotechnology Advances*, (24):500-513.

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

Çalgeri, 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., and 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.

Davin, L.B., Lewis, N.G., 2005. Lignin primary structures and dirigent sites. *Current Opinion in Biotechnology*. <http://www.ili-lignin.com/aboutlignin.php>. 12.5.2011. 16 (4): 407–415

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.

Dittmer, J.K., Patel, N.J., Dhawale, S.W., Dhawale, S.S., 1997. Production of Multiple Laccase Isoforms by *Phanerochaete chrysosporium* Grown Under Nitrogen Sufficiency", *FEMS Microbiol. Lett.* (149): 65-70.

Dizge, M.G., 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.

Duncan, C.G., and Deverall, F.J., 1964. Degradation of Wood Preservatives by Fungi. *Appl Environ Microbiol.* 12 (1): 57-62.

Duran, N., and 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.

Duran, N., Rosa, M., D'Annibale, A., Gianfreda, L., 2002. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme Microb Technol.* (31): 907–931.

Eggert, C., Temp, U., and Eriksson, K.L., 1996. The Ligninolytic System of The White Rot Fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and Characterisation of the Laccase. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (4): 1151-1158.

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

Eriksson. S., and Jansson. O., 1990. Direct photoaffinity-labelling of human deoxycytidine kinase with the feedback inhibitor dCTP. *Medical Nobel Institute, Department of Biochemistry*, (269): 201-205.

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.

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.

Gadd, G.M., 2000. Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Curr Opin Biotech.*, (112): 271–279.

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

Ganesh, K., Sekaran, A.G., Krishnamoorthy, S., 2005. Solid state fermentation of *Achras zapota* lignocellulose by *Phanerochaete chrysosporium*, *Bioresource Technology*, (46): 236-242.

Gao, D., Wen, X., Zeng, Y., and Qian, Y., 2006. Decolourization of a Textile-Reactive Dye With *Phanerochaete chrysosporium* Incubated in Different Ways Under Non-Sterile Conditions. *Water Practice Technology*, (5): 10801-10806.

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

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., and Sanna, G., 2001. Structural and kinetic characterization of native laccases from *Pleurotus ostreatus*, *Rigidoporus lignosus*, and *Trametes trogii*. J. Protein Chem., (20):191-201.

Gellerstedt, G., And Northy, R.A., 1989. Analysis of birch wood lignin by oxidative degradation. Wood Sci. Technol. (23): 75-83.

Germann, U.A., Müller, G., Hunziker, P.E., and 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., And Bollag, J.M., 1999. Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes. Bioremediation J, (3): 1-25.

Glenn, M., Gold, M.1985. Purification And Characterization Of An Extracellular Mn(II)-Dependet Peroxidase From The Lignin-Degrading Basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. Fems Microbiol. Lett., (29): 37-41.

Gnanamani, 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.

Golz-Berner, K., Walzel, B., Zastrow, L., and Doucet, O., 2004. Cosmetic and Dermatological Preparation Containing Copper-Binding Proteins for Skin Lightening. Int Pat Appl.WO2004017931.

Gomez, J., Pazos, M., Couto, S.R., Sanroman, M.A., 2005. Chestnut shell and barley bran as potential substrates for laccase production by *Coriolopsis rigida* under solid-state conditions, Journal of Food Engineering, (68): 315-319.

Hakulinen, N., Kiiskinen, L.L., Kruus, K., Saloheimo, M., Paananen, A., Koivula, A., Rouvinenn, J., 2002. Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site., Nature Struct Biol., (9):601-605.

Hasenekoğlu, İ., Yeşilyurt, S., 2001. Mikrobiyoloji. Erzurum.

Hass, H., Taylor, T.N., & Remy, W., 1994. Fungi from the Lower Devonian Rhynie chert: Mycoparasitism. American Journal of Botany, 81(1): 29-37.

Hatakka, A., 1994. Lignin-Modifying Enzymes from Selected White-Rot Fungi: Production and Role in Lignin Degradation. Fems Microbiol Rev., (13): 125– 135.

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

Hoffmann, P., and Esser, K., 1977. The phenol oxidases of the Ascomycete *Podospora anserina*. *Arch. Microbiol.*, (112):111-114.

Hölker, U., Höfer, M., Le nz, J., 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, (64): 175-186.

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., and Kai, Y., 1999. Structure comparison between oxidized and reduced plastocyanin from a fern, *Dryopteris crassirhizoma*. *Biochemistry*, (38):13853-13861.

Itoh, K., Yatome, C., 2004. Decolorization and degradation of xanthene dyes by a white rot fungus, *Coriolus versicolor*, *J Environ. Sci Health. A*, (39): 2383-2389.

Johannes, C., and 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.

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.

Kersten, P.J., 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.

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

Kirk, T., and Farrell, R., 1987. Enzymatic “Combustion” The Microbial Degradation of Lignin. *Annu Rev Microbiol*, (41): 465–505.

Kirk, K., and 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. pp 273-307.

Kirk, O., Borchert, T.V., and Fuglsang, C.C., 2002. Industrial Enzym Applications Current Opinion In Biotechnology, (13): 345-351.

Kojima, Y., Kita, Y., and Tsukuda, Y., 1990. DNA for expression and secretion. Eur. Pat. Appl. EP0388166., 14.03.1990

Kollmann, A., Boyer, F.D., Ducrot, P.H., Kerhoas, L., Jolival, C., Touton, I., Einhorn, J., and Mougin, C., 2005. Oligomeric compounds formed from 2,5-xylydine (2,5-dimethylaniline) are potent enhancers of laccase production in *Trametes versicolor* ATCC 32745 Appl Microbiol Biotechnol. (68) : 251–258.

Kunamneni, A., Francisco J., Plou Ballesteros, A and Miguel, A., 2003. Laccases and their applications: A patent review. Int. Patent no. WO 2003023043, 2003., 10.5.2011.

Kuwahara, M., Glenn, J., Morgan, M., Gold, M. 1984. Separation And Characterization Of Two Extracellular H₂O₂ Dependet 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*. pp.127-143. New York: Chapman and Hall.

Lee, S.K., George, S.D., Antholine, W.E., Hedman, B., Hodgson, K.O., and Solomon, E.I., 2002. Nature of the intermediate formed in the reduction of O₂ to H₂O at the trinuclear copper cluster active site in native laccase. J. Am. Chem. Soc. (124):6180-6193.

Leontievsky, A.A., 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) : 1150-115656.

Lepifre, S., Bono, P., Abächerli, A., 2011. Enzymatic lignin. <http://www.ili-lignin.com/aboutlignin.php>, 10.5.2011.

Levin, L., Papinutti, L., Forchiassin, F., 2004. Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes. Biores Technol, 94 (2):169-176.

Li, K., Xu, F., Eriksson, K.E., 1999. Comparison of Fungal Laccases and Redox Mediators in Oxidation of a Nonphenolic Lignin Model Compound. Appl. Environ. Microbiol., 65(6): 2654-2660.

Litvintseva, A.P., and 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.

Lorenzo, M., Moldes, D., Sanroma, M.A., 2005. Effect of Heavy Metals on the Production of Several Laccase Isoenzymes by *Trametes versicolor* and on Their Ability to Decolourise Dyes. *Chemosphere*, (63): 912-917.

Mansur, M., Suarez, T., and Gonzalez, A.E., 1998. Differential gene expression in the laccase gene family from Basidiomycete I-62 (CECT 20197). *Appl. Environ. Microbiol.* (64):771-774.

Martins, L.O., Soares, C.M., Pereira, M.M., Teixeira, M., Costa, T., Jones, G.H., and 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.

Mayer A.M., and Staples R.C., 2002. Laccases: New Functions for an Old Enzyme. *Phytochemistry*, (60): 551–565.

Messerschmidt, A., Ladenstein, R., Huber, R., Bolognesi, M., Avigliano, L., Petruzzelli, R., Rossi, A., and Finazzi-Agro, A. 1992. Refined crystal structure of ascorbate oxidase at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, (224):179-205.

Messerschmidt, A., 1997 (a). Copper metalloenzymes. In: *Comprehensive biological catalysis*. Vol. 3 (Sinet, M., Ed.). Academic Press Limited, 401-426, London.

Messerschmidt, A., 1997 (b). Spatial Structures of Ascorbate Oxidase, Laccase and Related Proteins: Implication for Catalytic Mechanism Multicopper Oxidases. *World Scientific@C*, Singapore, (260): 23-80.

Mester, T., Pena, M., And Field, J., 1996. Nutrient Regulation Of Extracellular Peroxidases in the White Rot Fungus, *Bjerkandera* sp. Strain bos55. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, (44): 778-784.

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.

Michael, J., Carlile Sarah, C., Watkinson, Graham, W., Gooday. 2001. *The Fungi*. Academic Press 2. bask1, 588, San Diego (calif.).

Milagres, A.M.F., Santos, E., Piovan, T., Roberto, I.C., 2004. Production of xylanase by *Thermoascus aurantiacus* from sugarcane bagasse in an aerated growth fermentor. *Process biochemistry*, (39): 1387-1391.

Minussi, R.C., De Moraes, S.G., Pastore, G.M., and Duran, N., 2001. Biodecolorization Screening of Synthetic Dyes by Four White – Rot Fungi in a Solid Medium: Possible Role of Siderophores. *Letters in Appl. Microbiol.*, (33): 21-25.

Minussi, R.C., Pastore, G.M., Duran, N., 2002. Potential applications of laccase in the food industry. *Trends Food Sci. Technol.*, (13): 205-216.

Moon-Jeong Han, Hyoung-Tae Choi and Hong-Gyu Song, 2005. Purification and Characterization of Laccase from the White Rot Fungus *Trametes versicolor*. *The Journal of Microbiology*, (35): 555-560.

Morozova, O.V., Shumakovich, G.P., Shleev, S.V., and Yaropolov, Y.I., 2000. Laccase mediator systems and their applications. Int. Patent no. WO 00078274, 2000., 10.5.2011.

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

Munirathinam, S., Katsuyukki, I., Michael, H., Gold, and Thomas, L., Poulos.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., and 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, Australia.

Murugesan, K., Kim, Y.M., Jeon, J.R., Chang, Y.S., 2009. Effect of metal ions on reactive dye decolorization by laccase from *ganoderma lucidum*. *Journal of hazardous materials*, (31): 790-784.

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 M.L., Raaska, L., Itävaara M., 1990. Detection of white-rot fungi by a non-toxic stain. *Mycological Research*, (94) : 27-31.

Nishizawa, Y., Nakabayashi, K., and 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., and Baker, E.N., 1983. Structure of azurin from *Alcaligenes denitrificans* at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* (165):501-521.

Ollikka, P., Alhonmaki, K., Leppanen, V.M., Glumoff, T., Rajola, T., Suominen, I., 1993. Decolorization of Azo, Triphenyl Methane, Heterocyclic and Polymeric Dyes by Lignin Peroxidase Isoenzymes From *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbio., 12 (59): 4010-4016.

Osma, J.F., Herrera, J.L.T., Couto, S.R., 2006. Banana skin: A novel waste for laccase production by *Trametes pubescens* under solid-state conditions. Application to synthetic dye decolouration, Dyes and pigments, (28):1-6.

Palaez, F., Martinez, M., and 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., and 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., Marzullo, L., Desiderio, B., Nitti, G., Cannio, R., And Sannia, 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., Scaloni, A., Capasso, A., And Sannia, G., 1997. A Novel White Laccase From *Pleurotus ostreatus*. The Journal Of Biological Chemistry, 272 (50): 31301-31307.

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

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

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

Palonen, H., 2004. Role of Lignin in the Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulose. Helsinki University of Technology, (520): 1846.

Pandey, A., 2003. Solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal, (13): 81-84.

Park, C., Lee, M., Lee, B., Kim S.W., Chase, H.A., Lee, J., and Kim, S., 2007. Biodegradation and biosorption for decolorization of synthetic dyes by *Funalia trogii*, Biochemical Engineering Journal, (36): 59-65.

Paszczynski, A., Huynh, V., Crawford, R., 1986. Comparison Of Ligninase-1 and Peroxidase-M2 From The White Rot Fungus *Phanerochaete Chrysosporium*. Arch.Biochem. Biophys. (244): 750-65.

Patrick, J., Collins and Alan, D.W., Dobson. 1997. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. American society for microbiology, (9): 3444-3450.

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

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

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

Pointing, S.B., 2001. Feasibility of Bioremediation by White-Rot Fungi. Applied Microbiology and Biotechnology, (57): 20–33.

Portfolyo.5.26.2011. Fungi [.http://bionerds.freesevers.com/catalog.html](http://bionerds.freesevers.com/catalog.html), 12.5. 2011.

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

Purves, 1998. Life: The Science of Biology, Sinauer Associates, Inc. 12. University of Winconsin-Madison, (2006) Department of Bacteriology lectures.

Raghavarao, K.S.M.S., Ranganathan, T.V., Karanth, N.G., 2003. Some engineering aspects of solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal, (13): 127-135.

Raimbault, M., 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation, EJB Electronic Journal of Biotechnology. 717-3458.

Ramsay, J.A., Mok, W.H.W., Luu, Y.S., and Savage, M., 2005. Decoloration of Textile Dyes by Alginated - Immobilized *Trametes versicolor*. Chemosphere, (61): 956-964.

Read, N.D., 1994. Cellular Nature and Multicellular Morphogenesis of Higher Fungi In: Shape and Form in Plants and Fungi. pp. 254-271. Academic Press: London.

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.

Revankar, M.S., Lele, S.S., 2006. Increased Production of Extracellular Laccase by the White Rot Fungus *Coriolus versicolor* MTCC 138. World Journal of Microbiology & Biotechnology, (22): 921-926.

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

Rogalski, J., Lundell, T., Leonowicz, A., And Hatakka, A., 1991. Production of Laccase Lignin Peroxidase by Various Strains of *Trametes versicolor* Depending on Culture Condition. *Acta Microbiological Polnica*, (40): 221-234.

Saloheimo, M., and Niku-Paavola, M.L., 1991. Heterologous production of a ligninolytic enzyme: expression of the *Phlebia radiata* laccase gene in *Trichoderma reesei*. *Biotechnology*, (9):987-990.

Saloheimo, M., Niku-Paavola, M.L., and 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.

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., and 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.

Schneider, P., Caspersen, M.B., Mondorf, K., Halkier, T., Skov, L.K., Østergaard, P.R., Brown, K.M., Brown, S.H., and 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., and Linkins, A., 1989. Production of Phenol Oxidases and Peroxidases By Wood-Rotting Fungi. *Mycologia*, (81) : 234-240.

Shankar, S.K., Mulimani, V.H., 2006. α -Galactosidase production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation, *Bioresource Technology*, (99): 3325-3330.

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

Sheldon, R.A., and Arends, I.W.C.E., 2006. Catalytic oxidations mediated by metal ions and nitroxyl radicals. *J. Mol. Catalysis A-Chemical*, 251(1-2) : 200-214.

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.

Shin, M., Nguyen, T., and Ramsay, J., 2002. Evaluation of Support Materials for The Surface Immobilization and Decolorization of Amaranth by *Trametes versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, (60): 218-233.

Shleev, S.V., Khan, I.G., Morozova, O.V., Mazhugo, Iu.M., Khalunina, A.S., and Iaropolov, A.I., 2004. Phenyl pyrazolones--novel oxidoreductase redox-mediators for degradation of xenobiotics. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiya*, 40(2):165-172.

Singh, G., Capalash, N., Goel, R., Sharma, P. A., 2007. pH-stable laccase from alkali-tolerant γ -proteobacterium JB: Purification, characterization and indigo carmine degradation. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(6-7), 794-799.

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

Solís-Oba, M., Ugalde-Saldívar, V.M., 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.

Solis-Oba, M., Almendariz, J., Viniegra-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.

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

Srinivasan, C., D'Souze, T.M., Boominthan, K., Reddy, C.A., 1995. Demonstration of Laccase in the White Rot Basidiomycete *Phanerochaete Chrysosporium* BKF1767. *Appl. Environ. Microbiol.*, (61):4274-4277.

Stamets, P., 2000. *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms 3RD ED.*, Ten Speed Pres, Berkely, C.A., (36):382-386.

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

Swamy, J., 1998. The Biodecoloration of Textile Dyes by White – Rot Fungus *Trametes versicolor*. A Master Thesis Submitted to The Department of Chemical Engineering, (28): 1-100.

Swamy, J., and Ramsay, J.A., 1999. The Evaluation of White – Rot Fungi in The Decolorization of Textile Dyes. *Enzyme. Microb. Technol.*, (24):130-137.

Thakker, G.D., Evans, C.S., and Rao, K.K., 1992. Purification and Characterisation Of Laccase From *Monocillium indicum* Saxena. Applied Microbiol Biotechnology, (37): 321- 323.

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

Tilli, S., Ciullini, I., Scozzafava, A., Briganti, F., 2008. Fungal laccase, cellobiose dehydrogenase, and chemical mediators: Combined actions for the decolorization of different classes of textile dyes. Biores Technol, (99): 7003-7010.

Tom Volks.1997. Tom Volk's Fungus of the Month for May 1997. For the rest of my pages on fungi, please click TomVolkFungi.net, 6.5.2011.

Tzanov, T., Basto, C., Guebitz, G., and Cavaco-Paulo, A., 2003. Laccases to improve the whiteness in a conventional bleaching of cotton. Macromol. Mater. Eng., (288): 807–810.

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

Wahleithner, J.A., Xu, F., Brown, K.M., Brown, S.H., Golightly, E.J., Halkier, T., Kauppinen, S., Pederson, A., and 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., and 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. Pp. 35-42, Universe Of Geneva.

Wesenberg, D., Buchon, F., and Agathos, S.N., 2002. Degradation of Dye Containing Textile Effluent by Agaric White - Rot Fungus *Clitocybula dusenii*. Biotechnology Letters, (24): 989-993.

Wesenberg A.2003. White Rot Fungi and Their Enzymes for The Treatment Of Industrial Dye Effluents. Biotechnology Advances, (22):161-187.

Willman, G., Fakoussa, R.M., 1997. Biological bleaching of water soluble coal macro- molecules 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., Shin, W., Brown, S., Wahleithner, J.A., Sundaram, U.M., and 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.

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

Xu, F., Palmer, A.E., Yaver, D.S., Berka, R.M., Gambetta, G.A., Brown, S.H., and 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., Kulys, J.J., Duke, K., Li, K., Krikstopaitis, K., Deussen, H.J., Abbate, E., Galinyte, V., and 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. *Eur. J. Biochem.*, (268) : 4169-4176.

Yaropolov, A.I., Skorobogat'ko O.V., Vartanov S.S., and Varfolomeyev S.D., 1994. Laccase: properties, catalytic mechanism, and applicability. *Appl. Biochim. Biotech*, 49 (3): 257-280.

Yatome, C., Itoh, K., 2004. Decolorization and degradation of xanthene dyes by a white rot fungus, *Coriolus versicolor*, *J Environ. Sci Health. A*, (39): 2383-2389.

Yaver, D.S., and 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., and 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.

Yeşilada, Ö., and Özcan, B., 1998. Decolorization of Orange II Dye With The Crude Culture Filtrate of White Rot Fungus, *Coriolus versicolor*. *Tr. J. of Biology*, (22): 463-476.

Yetiş, Ü., 1998. Heavy metal biosorption by white-rot fungi. *Water Sci. And Technol.* (42) :323-330.

Yetiş, Ü., 2000. The removal of Pb(II) by *Phanerochaete chrysosporium*. *Water Resour Res.*, (49): 4090-4100.

Yoshida, H., 1883. Chemistry of Lacquer (Urushi) part I, *J. Chem. Soc.*, (43): 472-486.

Yu, H. Y., 2006. Bioremediation of Pb-contaminated soil by incubating with *Phanerochaete chrysosporium* and straw, J. Hazard. Mater., (134): 268- 276.

Zille, A., 2005. Laccase reactions for textile applications. PhD Thesis. Universidade do Minho, Portugal.

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.

<http://crperiod5.edublogs.org>

<http://comenius.susqu.edu/bi/202/Fungi/chytridiomycota/chytridiomycota.htm>

www.ilmyco.gen

www.hiddenforest.co.nz

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

EKLER

EK 1: Elektroforezde kullanılan çözeltiler

PAGE (Poliakrilamit Jel Elektroforezi) İçin Kullanılan Çözeltiler

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 ₂ 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 ₂ O

PAGE Yürütme Tamponu

Tris bazı	3 g
Glisin	15 g
SDS	1 g d H ₂ 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 ₂ 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

EK 2: Sıvı besiyerinin bileşimi

Asetat tamponu (pH 4.5) içerisinde 2 g/L glukoz, 0,9 g/L (NH₄)Cl, 2 g/L KH₂PO₄, 0,5 g/L MgSO₄·7H₂O, 0,1 g/L CaCl₂·2H₂O ve 0,5 g/L KCl, 0,01 g/L CuSO₄·5H₂O'tan oluşan temel besiyeri 121 °C'de 20 dakika sterilize edildikten sonra 0,5 g/L olacak şekilde filtrasyonla (0,20 µm, sartorius stedim minisart streil selüloz nitrat filtre ile) sterilize tiyamin ilavesiyele hazırlandı.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Pervin BADEMİRKİRAN
Doğum Tarihi : 15.03.1984
Doğum Yeri : Hazro/DİYARBAKIR
Medeni Hali : Bekar
Lise : 2000 Namık Kemal Lisesi
Lisans : 2008 Dicle Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi
Kimya Bölümü
Yüksek Lisans : 2008-2009 Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,
Matematik ve Fen Bilgisi Kimya Öğretmenliği Programı
Tezsiz Yüksek Lisans
Yüksek Lisans : 2009-2011 Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Programı
Adres : Dicle Üniversitesi
Fen Fakültesi
Kimya Bölümü
21280–Diyarbakır
E-Mail : ronyaarin@gmail.com